

Aus dem Zentrum für molekulare Neurobiologie
Hamburg (ZMNH) des Universitätsklinikums
Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. T. Jensch

**Expressionsanalyse des
Transkriptionsfaktors Nkx6.1 in
Mus musculus (Linneaus, 1758)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin dem Fachbereich Medizin der Universität
Hamburg vorgelegt von

Normund Jabs

aus Riga

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich der Medizin der Universität

Hamburg am: 22.06.05

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der

Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende : Prof Th. Jentsch

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. M. Sander

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. D. Lorke

Inhaltsverzeichnis

Arbeitshypothese und Fragestellung _____ 1

1. Einleitung

1.1 Was ist Nkx6.1? _____ 2

1.2 Struktur der Nkx6 Homeodomänen Transkriptionsfaktoren _____ 2

1.3 Festlegung der neuronalen Identitäten im Rückenmark _____ 4

1.4 Prinzipielle Unterschiede zwischen Rückenmark und Hirnstamm _____ 8

1.5 Die Spezifizierung der sm, bm und vm Neuronentypen im Hirnstamm _____ 10

1.6 Das serotonerge System _____ 13

1.6.1 Nkx6.1 im serotonergen System _____ 14

1.7 Die Funktion und Entwicklung der Vestibulariskerne _____ 16

1.8 Die Entwicklung des Augenstiels _____ 18

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bezugsquellen häufig verwendeter Substanzen _____ 21

2.1.2 Zusammensetzung gebräuchlicher Medien und Lösungen _____ 22

2.2 Methoden

2.2.1 Schneiden und Linearisieren des Plasmids _____ 25

2.2.2 Elektrophorese in Agarosegelen _____ 26

2.2.3 Bestimmung von DNS- und RNS-Konzentrationen _____ 26

2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen _____ 27

2.2.5 Herstellung der DIG Sonde _____ 28

2.2.6 Präparation und Fixation der Embryonen und Gehirne _____ 29

2.2.7 Schneiden der Gewebeproben _____ 29

2.2.8 Hybridisierung von Embryoschnitten _____ 30

2.2.9	Cresylviolett f ärbung	31
2.2.10	Peroxidase f ärbung	32
2.2.11	Analyse der Schnitte	33

3. Ergebnisse

3.1	Die motorischen Kerne	35
3.1.1	Die Kerne der generellen somatomotorischen Säule	35
3.1.2	Die Kerne der branchiomotorischen Säule	38
3.1.3	Die Kerne der generellen viszeromotorischen Säule	39
3.2	Das serotonerge System (5-HT positive Kerne)	41
3.2.1	Der rostrale Anteil	42
3.2.2	Der kaudale Anteil	43
3.3	Die Tyrosinhydroxylase (TH) positiven Zellgruppen	46
3.3.1	Die noradrenergen Zellgruppen (A1/2 und A5/7 Zellgruppen)	46
3.3.2	Adrenerge Zellgruppen (C1-3 Zellgruppen)	47
3.3.3	Die dopaminergen Neurone (A8-A17 Zellgruppen)	48
3.3.4	Die cholinergen Neurone (Ch1-3) Zellgruppen	50
3.3.5	Histaminerge Zellgruppen	51
3.4	Nkx6.1 Expression in der Formatio reticularis des Mittelhirnes, Pons und der Medulla	51
3.5	Die vestibulären Kerne	56
3.6	Nervus opticus	57
3.7	Zusammenfassung	58

4. Diskussion

Ergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur

4.1	Nkx6.1 wird in der branchiomotorischen Kernsäule der Maus und im Huhn exprimiert	59
4.1.1	Funktionen von Nkx6.1 in postmitotischen branchiomotorischen Neuronen	60
4.2	Nkx6.1 Expression findet sich in postmitotischen Kernen der generellen somatomotorische Säule	62
4.3	Keine Hinweise auf Funktionen von Nkx6.1 bei späteren Entwicklungsprozessen in den Kernen der generellen viszeromotorischen Säule	62
4.4	Mögliche Funktionen von Nkx6.1 in den serotonergen Kerngruppen	64
4.4.1	Prinzipielle Unterschiede in der Expression zwischen Maus und Huhn sprechen gegen eine Rolle von Nkx6.1 bei der Spezifizierung rostraler Raphe Kerne	64
4.4.2	In den kaudalen Raphe Kernen kann Nkx6.1 an späteren Entwicklungsprozessen beteiligt sein	65
4.5	Nkx6.1 in der Formatio reticularis	67
4.6	Nkx6.1 ist zeitweise in den vestibulären Kernen der Maus exprimiert	67
4.7	Maus und Huhn zeigen Unterschiede in der Nkx6.1 Expression des viszerosensiblen Systems	68
4.8	Nkx6.1 Expression in der PTA (periventral tegmental area) des Huhns und dessen mögliche Korrelate in der Maus	69
4.9	Nkx6.1 Expression ist in der Maus nicht mit dem Kleinhirn assoziiert	70
4.10	Nkx6.1 Expression in der Hörbahn unterscheidet sich zwischen Maus und Huhn	70
4.11	Nkx6.1 ist in Hirnregionen exprimiert, die an komplexen motorischen Schaltkreisen beteiligt sind	71
4.11.1	Der vestibulo-okuläre Reflex (VOR)	73
4.12	Nkx6.1 wird in der Glia des Sehistils exprimiert	74
4.13	Zusammenfassung und Ausblick	76
5.	Literaturverzeichnis	77

Arbeitshypothese und Fragestellung

Die korrekte Funktion des Hirnstammes ist von grundlegender Bedeutung für jeden höheren Organismus. In den hier befindlichen Zentren werden die Atmung und andere lebensnotwendige Funktionen gesteuert. Dazu hat der Hirnstamm im Laufe der Evolution eine Menge hoch spezialisierter Neuronentypen entwickelt, die korrekt miteinander verschaltet sein müssen. Wie kommt es aber dazu, daß sich eine so große Vielzahl von unterschiedlichen Neuronentypen mit weitreichenden axonalen Projektionen entwickeln kann, wenn es sich bei den Ausgangszellen um eine relativ gleichartige Population neuronaler Vorläuferzellen handelt? Welche Mechanismen treiben nun die Differenzierung dieser Vorläuferzellen voran und welche Moleküle sind daran beteiligt?

Nkx6.1 ist ein Transkriptionsfaktor, von dem bekannt ist, daß er im Rückenmark bei der Bildung von Motoneuronen unentbehrlich ist. Bald zeigte sich, daß Nkx6.1 im Hirnstamm länger exprimiert wird als im Rückenmark, was vermuten ließ, daß er hier neue ungekannte Funktionen erhalten hat. Um diese neuen Funktionen identifizieren zu können, mußte als erstes festgestellt werden, in welchen Hirnregionen Nkx6.1 exprimiert wird. Dazu wurden *in situ* Hybridisierungen mit Digoxigenin markierten RNS-Sonden sowie Tyrosinhydroxylase Antikörperfärbungen durchgeführt. Im Anschluß wurden die Nkx6.1 exprimierenden Hirnregionen mit Hilfe von Mausatlanten identifiziert. So konnten weitere Aufgaben und mögliche Interaktionspartner von Nkx6.1 bei der Hirnstammentwicklung festgestellt werden.

Denn erst mit dem Verständnis dieser Interaktionen ist es möglich, entwicklungsbedingte Erkrankungen zu verstehen. So gibt es Hinweise darauf, daß bestimmte Formen von Gehirnmißbildungen durch Migrationsdefekte von Neuronen erklärbar sind. Kennt man also die Rolle eines Entwicklungsgens, werden die Auswirkungen eines Gendefektes besser abschätzbar. Ebenso wird dieses Wissen die Medizin in die Lage versetzen, durch Unfall oder Schlaganfall geschädigte Hirnnervenkerne zu ersetzen oder die Regeneration von diesen zu fördern.

1. Einleitung

1.1 Was ist Nkx6.1?

Nkx6.1 ist ein Transkriptionsfaktor, der zur Klasse der Homeodomänen Proteine gehört. Transkriptionsfaktoren regulieren die Transkription von Genen. Sie binden sich alleine oder zusammen mit anderen Proteinen an bestimmte DNS-Sequenzen und beeinflussen damit die Expression weiterer Gene, indem sie durch ihre sterische Konfiguration die Affinität und Spezifität anderer Faktoren zu diesen DNS-Abschnitten positiv oder negativ modifizieren. Die Entwicklung eines Lebewesens ist durch eine zeitlich genau bestimmte, sequentielle Abfolge dieser hierarchisch gegliederten Expression der Transkriptionsfaktoren charakterisiert. Jeder dieser Faktoren beeinflusst dabei die Expression eines anderen oder mehrerer weiterer Gene, was so den Phänotyp eines Organismus formt. Man kann Transkriptionsfaktoren also als Steuerungselemente für die Zellentwicklung verstehen, die in der Lage sind, Zellen in bestimmte Entwicklungswege zu leiten.

Für die Bindung an die DNS sind charakteristische Struktur motive innerhalb der Transkriptionsfaktoren verantwortlich. Ein solches Strukturmotiv ist die Homeobox (Scott, 1992; Scott et al., 1989). Diese Struktur motive sind im Laufe der Evolution über die Grenzen der Spezies hinaus konserviert geblieben und spielen häufig eine Rolle bei der Ausbildung der verschiedenen Körpersegmente. Auch Nkx6.1 enthält eine solche Homeobox.

1.2 Struktur der Nkx6 Homeodomänen Transkriptionsfaktoren

Es sind zwei Nkx6 Proteine in der Maus bekannt. Diese sind Nkx6.1 und Nkx6.2. Sie sind Mitglieder der Nkx Homeobox-Familie, die mit den NK-Genen der Fruchtfliege verwandt sind (Mellerick and Nirenberg, 1995). Beide Nkx6 Proteine weisen als typisches Strukturmerkmal eine DNS-bindende Homeodomäne auf (Abb.1). Des Weiteren besitzen diese Transkriptionsfaktoren ein NK-Dekapeptid, das ihnen ermöglicht, mit anderen Transkriptionsfaktoren zu interagieren. Studien haben gezeigt, daß Nkx6.1 und Nkx6.2 über ihre NK-Domäne auch an das Korepressor Protein *Groucho* binden können. Die Fähigkeit zu dieser Bindung vermittelt die Repressoraktivität der Nkx6 Proteine (Muhr et al., 2001).

NH₂—  —COO Nkx6.1

NH₂—  —COO Nkx6.2

Abbildung 1: Struktur der Nkx6 Proteine. Die Transkriptionsfaktoren Nkx6.1 und Nkx6.2 weisen eine DNS-bindende Homeodomäne (HD) und eine NK-Domäne (NK) auf. Die NK-Domäne ist ein hoch konserviertes Dekapeptid, das Repression vermittelt. Die Bindungsinterferenzdomäne (BID) im carboxyterminalen Bereich hemmt die Bindung des Proteins an die DNS. Nur bei Nkx6.1 befindet sich zwischen der NK-Domäne und der HD ein an Serin- (S)/Alanin- (A) reicher Bereich. Nach Müller 2003.

Darüber hinaus besitzen die Nkx6 Proteine eine Bindungsinterferenzdomäne (BID) im carboxyterminalen Bereich, welche die Bindung an die DNS hemmt. Ein Serin/Alaninreicher Abschnitt, der nur im Nkx6.1 Protein vorliegt, ist vermutlich ebenfalls für Protein-Protein Interaktionen notwendig (Awatramani et al., 2000; Rudnick et al., 1994).

Im ZNS wurde Nkx6.1 zuerst beim Huhn, nachfolgend auch bei der Maus identifiziert (Qiu et al., 1998). Nkx6.2 wurde ursprünglich unter dem Namen Gtx (glial and testis-specific homeobox gene) entdeckt (Qiu et al., 1998). Expressionsstudien der Nkx6 Gene im murinen Neuralrohr haben gezeigt, daß beide Transkriptionsfaktoren in ventralen Vorläuferzellen des Rückenmarks exprimiert werden (Cai et al., 1999; Vallstedt et al., 2001).

Durch zahlreiche funktionelle Analysen konnte gezeigt werden, daß die Nkx6 Faktoren die Entwicklung der Motoneurone im Rückenmark steuern (Briscoe et al., 2000; Qiu et al., 1998; Sander et al., 2000b; Vallstedt et al., 2001).

Obwohl sich diese Arbeit mit der Expression von Nkx6.1 im Hirnstamm befaßt, wird zunächst die Funktion der Nkx6 Faktoren im Rückenmark dargestellt, da hierzu mehr bekannt ist. Zudem ist ein solches einfacheres Model besser geeignet, um neue Funktionen von Nkx6.1 im komplizierter organisierten Hirnstamm erkennen zu können.

1.3 Festlegung der neuronalen Identitäten im Rückenmark

Alle Motoneurone des sich entwickelnden zentralen Nervensystems benötigen das *sonic hedgehog* (Shh) Protein für ihre Entstehung (Chiang et al., 1996; Ericson et al., 1996). Shh wird von der Bodenplatte des Neuralrohres und der sich ventral zu dieser befindenden *Chorda dorsalis* sezerniert. Dadurch entsteht entlang der dorso-

ventralen Achse des Neuralrohres ein Shh-Konzentrationsgradient, der nach dorsal abnimmt.

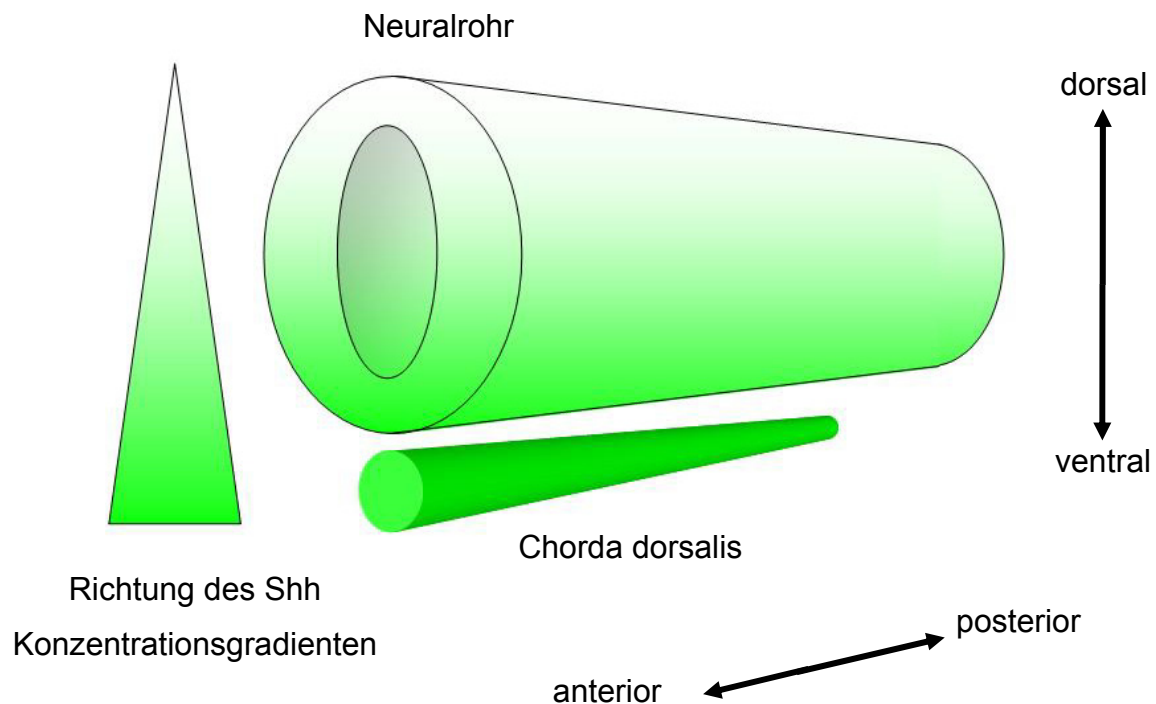


Abbildung 2: Zeigt eine schematische Darstellung des Neuralrohres. Ventral des Neuralrohres befindet sich die *Chorda dorsalis*. Diese sezerniert das Signalmolekül *sonic hedgehog* (Shh) (grün). Die Konzentration von Shh nimmt im Neuralrohr nach dorsal hin ab.

Shh induziert die Entstehung bestimmter Neuronensubtypen in Abhängigkeit von der Konzentration an Shh, denen diese Zellen ausgesetzt sind (Briscoe and Ericson, 2001; Lee, 2001). Somit etabliert Shh ein dorso-ventral strukturiertes Expressionsmuster bestimmter Homeodomänen Proteine und der *basischen Helix-loop-Helix* (bHLH) Transkriptionsfaktoren.

Damit erhalten die ursprünglich gleichartigen neuronalen Vorläuferzellen entsprechend ihrer dorso-ventralen Position ganz unterschiedliche Zellidentitäten (Briscoe and Ericson, 2001; Lee, 2001). Die in diesen Zellen nachweisbaren Transkriptionsfaktoren lassen sich hinsichtlich ihrer Reaktion auf Shh in zwei Klassen unterteilen. Die Klasse I Proteine werden durch Shh in ihrer Expression unterdrückt, wohingegen die Klasse II Proteine durch das Shh-Signal aktiviert werden (Briscoe et al., 2000). Viele dieser Proteine wirken als direkte Transkriptionsrepressoren (Muhr et al., 2001; Novitch, 2001), wobei wiederum diese repressiven Wirkungen durch bestimmte Interaktionen zwischen Klasse I und Klasse II Proteinen entstehen. Durch diese kommt es zur Etablierung und späteren Manifestierung ventraler

Vorläuferzelldomänen, was hier als Musterbildung bezeichnet wird. Sind diese Domänen etabliert, so scheint das Expressionsprofil der Klasse I und Klasse II Proteine auch das Schicksal der Neurone innerhalb dieser einzelnen Domänen zu kontrollieren, indem bestimmte nachgeschaltete Faktoren aktiviert werden, die ihrerseits wieder die Subtypen-Identität der postmitotischen Neurone bestimmen (Briscoe et al., 2000; Muhr et al., 2001; Novitch, 2001; Pierani et al., 1999; Pierani et al., 2001; Vallstedt et al., 2001; Zhou, 2002).

Es bilden sich Grenzen anhand derer sich die Ventrikularzone, mit ihren mitotisch aktiven Vorläuferzellen, in fünf verschiedene Vorläuferdomänen (p) einteilen läßt. Von dorsal nach ventral sind dies die pD, p0, p1, p2, pMN (Motoneuronenvorläuferdomäne) und die p3 Domäne (Abb.1.2). Aus der p0 – p3 Domäne entwickeln sich V0 –V3 Interneurone, während Motoneurone aus der pMN Domäne hervorgehen. Somit bestimmt der Shh Gradient letztendlich, durch die Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren, zu welchem neuronalen Subtyp sich eine Vorläuferzelle differenziert (Lu, 2002; Novitch, 2001; Zhou, 2002).

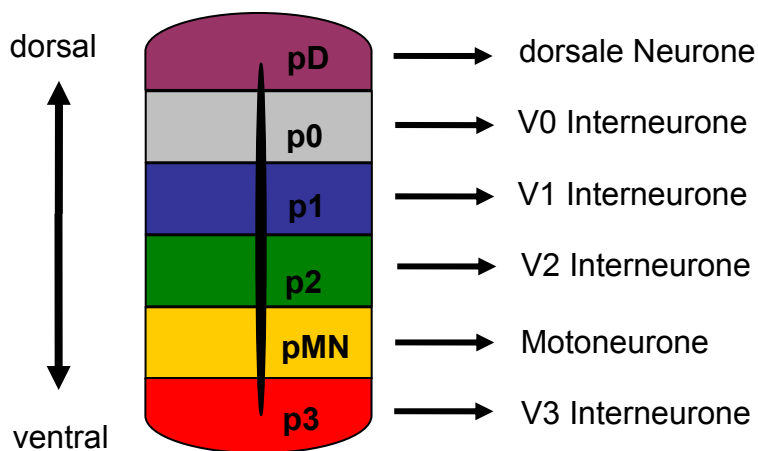


Abbildung 3: gezeigt ist ein Schema des Rückenmarks. Die verschiedenen Neuronenpopulationen befinden sich auf unterschiedlichen dorso-ventralen Höhen. Von dorsal nach ventral sind dies die pD, p0, p1, p2, pMN (Motoneuronen) und die p3 Domäne. Aus der pD entwickeln sich dorsale Neuronenpopulationen. Aus der p0 – p3 Domäne entwickeln sich V0 – V3 Interneurone, während Motoneurone aus der pMN Domäne hervorgehen. Nach Briscoe 2000.

Die pMN Domäne wird durch die Expression der Transkriptionsfaktoren Pax6 (Ericson et al., 1997; Pierani et al., 2001), Nkx6.1 (Sander et al., 2000a; Vallstedt, 2001) und Olig2 (Lu, 2002; Marquardt, 2001; Zhou, 2002) spezifiziert (Abb.4). Nkx6.1 wird außer in der pMN Domäne auch in der p3 und der p2 Domäne exprimiert. Jenseits von p2 verhindert die Expression von Dbx2, daß Nkx6.1 hier exprimiert wird. (Briscoe et al., 2000; Vallstedt et al., 2001).

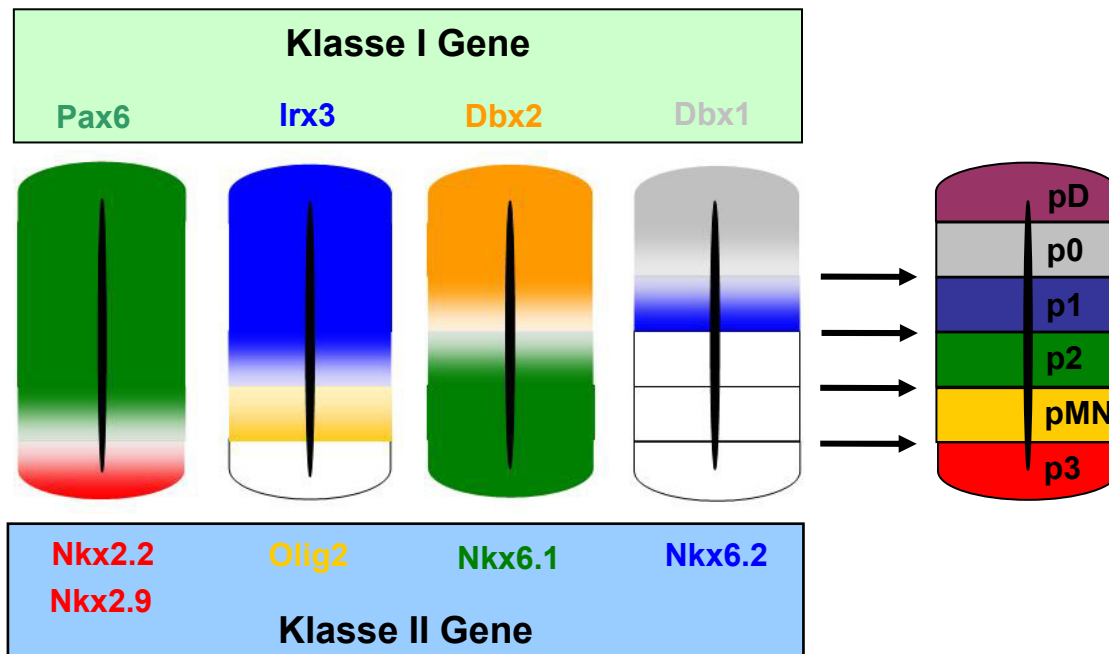


Abbildung 4: Das Schema zeigt die Expressionsmuster einiger Klasse I und II Gene und deren inhibitorisch wirkende Gegenspieler. Die ventrale Grenze der pMN Domäne wird durch repressive Interaktionen zwischen Nkx2.2 und Pax6 definiert. Die dorsale Grenze entsteht durch Interaktionen zwischen Irx3 und Olig2. Nkx6.1 wird in den Vorläuferdomänen (p) p3, pMN und p2 exprimiert. Nach dorsal hin wird seine Expression durch Dbx2 beschränkt. Nkx6.2 wird durch Dbx1 reprimiert, was die p1/p0 Grenze bildet. Auf die dorsalen Vorläuferzelldomänen (pD) wird nicht weiter eingegangen. Nach Briscoe et al., 2000.

Die p3/pMN Grenze wird durch repressive Interaktion zwischen Nkx2.2 und Pax6 (Briscoe et al., 2000) gebildet. In ähnlicher Weise werden entsprechend auch die anderen Domänen (p0-3) spezifiziert, was hier nicht weiter erläutert wird.

Um nachzuweisen, daß Nkx6.1 für die Induktion von Motoneuronen verantwortlich ist, wurde Nkx6.1 experimentell ektopisch im dorsalen Neuralrohr exprimiert. Hier verlieh es den dorsalen Vorläuferzellen (pD) eine pMN Identität. Außerdem fand sich, daß Nkx6.1 zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Irx3 auch für die Entstehung ektopter V2 Interneurone (Briscoe et al., 2000) verantwortlich ist. Diese Hypothese konnte durch die Analyse des folgenden „loss-of-function“ Modells für Nkx6.1 unterstützt werden. Mausmutanten, bei denen durch homologe Rekombination das Nkx6.1 Gen gezielt ausgeschaltet wurde, zeigen eine starke Verringerung sowohl der Anzahl an Motoneuronen als auch der V2 Interneuronen im Rückenmark (Briscoe et al., 2000; Sander et al., 2000a).

Außer diesem induktiven Charakter gibt es auch Hinweise auf eine repressive Wirkung von Nkx6.1. So vergrößert sich die Expressionsdomäne von Dbx2 in Nkx6.1 mutanten Embryonen. Normalerweise grenzt Dbx2 dorsal an die Nkx6.1 Domäne an. In den mutanten Nkx6.1 Embryonen wird Dbx2 nun ektopisch in der p2 und pMN

Domäne exprimiert, was dazu führt, daß sich hier V1 Interneurone anstelle von V2 Interneuronen und Motoneuronen bilden (Sander et al., 2000a). Damit beschränkt Nkx6.1 anscheinend die Ausbreitung von Dbx2 und besitzt somit auch eine repressive Wirkung, die für die korrekte Spezifizierung der p2/pMN Vorläuferzellen nötig ist.

Alle diese Ergebnisse zeigen, daß der Transkriptionsfaktor Nkx6.1 in den Vorläuferzellen benötigt wird, um Motoneuronen und V2 Interneuronen im Rückenmark zu bilden.

Auch der zu Nkx6.1 homologe Transkriptionsfaktor Nkx6.2 hat die Fähigkeit, die Differenzierung von Motoneuronen im dorsalen Rückenmark zu induzieren (Vallstedt et al., 2001). Dieses Ergebnis erschien zunächst unerwartet, denn Nkx6.2 wird bei Wildtyp Embryonen nicht mit Nkx6.1 zusammen exprimiert, sondern findet sich dorsal der pMN Domäne in der p1 Domäne. Folglich wäre nicht anzunehmen, daß es einen Einfluss auf Neuronen hat, die diesem Faktor nicht ausgesetzt sind. Es stellte sich jedoch heraus, daß Nkx6.1 auch die Expression von Nkx6.2 unterdrückt, ähnlich wie im Falle von Dbx2 (Vallstedt et al., 2001). Denn die Analyse von Nkx6.1 mutanten Mäusen zeigte, daß hier nicht nur Dbx2, sondern auch Nkx6.2 außerhalb seiner normalen Domäne exprimiert wird und nun auch in der p2 und pMN Domäne zu finden war. Diese ektopische Expression von Nkx6.2 in der Nkx6.1 Domäne führt zu einer partiellen funktionellen Kompensation von Nkx6.1 durch Nkx6.2. So werden bei Nkx6.1 mutanten Mäusen im Rückenmark trotz fehlender Nkx6.1-Funktion eine sehr geringe Anzahl von Motoneuronen gebildet, jedoch finden sich Störungen bei der Entwicklung dieser Motoneurone und der V2 Interneurone. Bei Nkx6.1/Nkx6.2 doppelt mutanten Mäusen entstehen im Rückenmark hingegen gar keine Motoneurone (Vallstedt et al., 2001). Ein wohl ähnlicher Kompensationsmechanismus für Nkx6.1 findet sich später auch auf Höhe des Hirnstammes wieder.

1.4 Prinzipielle Unterschiede zwischen Rückenmark und Hirnstamm

Wie oben erwähnt, ist die Hirnstammarchitektur komplexer als die des Rückenmarks. Der Hirnstamm kann aber insofern als die kraniale Fortsetzung des Rückenmarks verstanden werden, da auch hier die Neuronen in einzelnen motorischen und

sensorischen Säulen organisiert sind. Deren Anordnung entspricht aber nicht mehr der Rückenmarksarchitektur, wo die sensorischen Säulen dorsal und die motorischen Säulen ventral zu finden sind. Diese Säulen liegen im Hirnstamm nunmehr nebeneinander und nicht übereinander.

Ein weiterer Aspekt der Komplexität zeigt sich daran, daß im Hirnstamm drei verschiedene Klassen von Motoneuronen unterschieden werden können. Hierbei handelt es sich erstens um **somatomotorische (sm) Motoneurone**, die

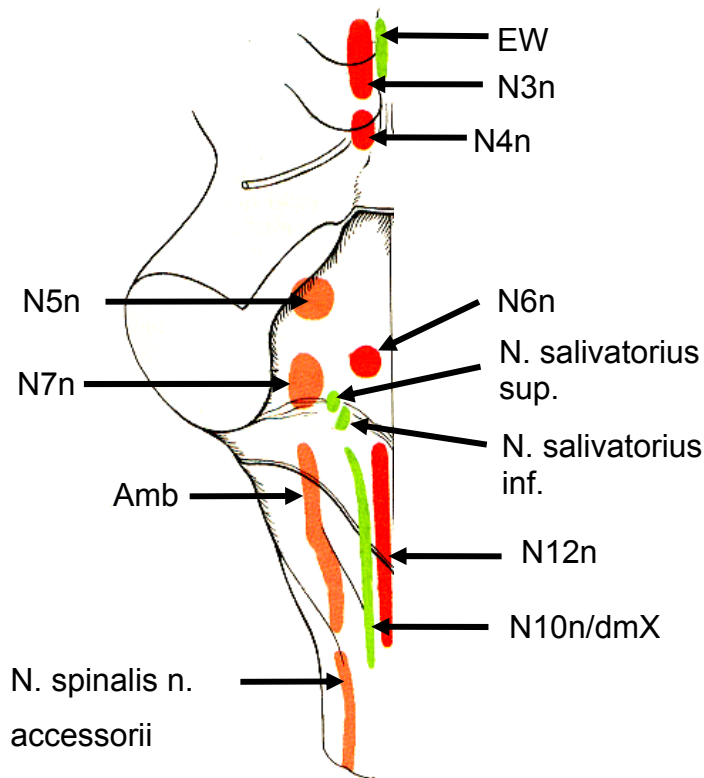


Abbildung 5: Gezeigt ist eine schematische Darstellung der motorischen Hirnnervenkerne. Zur somatomotorischen Säule (sm) (**rot**) gehören der Nucleus n. oculomotorii (N3n), Nucleus n. trochlearis (N4n), Nucleus n. abducentis (N6n) und der Nucleus n. hypoglossi (N12n). Zu den Kernen der branchiomotorischen Säule (bm) (**orange**) gehören der Nucleus motorius n. trigemini (N5n), der Nucleus n. facialis (N7n) der Nucleus ambiguus (Amb) sowie der Nucleus spinalis n. accessorii. Die Kerne der visceromotorischen Säule (vm) (**grün**) sind der Edinger-Westphal-Kern (EW), der Nucleus salivatorius superior (N. salivatorius sup.), der Nucleus salivatorius inferior (N. salivatorius inf.) sowie der dorsale motorische Vaguskerne (N10n/dmX). Nach Kahle 2001.

Skelettmuskeln innervieren, die aus den Somiten entstanden sind, zweitens um **viszeromotorische (vm) Neurone**, die über parasymphatische Ganglien sekretorische Drüsen und glatte Muskeln verschiedener Organe innervieren und drittens um **branchiomotorische (bm) Neurone**, die diejenigen Muskeln innervieren, die sich aus den Kiemenbögen entwickelt haben.

Auch sie entstehen während der Entwicklung des Nervensystems an genau festgelegten Positionen des ventralen Rückenmarks und des Hirnstammes. Am Ende des Entwicklungsprozesses steht das Bild des adulten Hirnstammes, dessen motorische Kerne in Abbildung 5 dargestellt sind. Ebenso wie im Rückenmark finden sich auch im Hirnstamm auf- und absteigende Bahnen. Sie liegen hier jedoch nicht über den Kernsäulen, sondern ziehen durch diese hindurch. Dadurch entsteht das netzartige Aussehen dieser Region, was zu dem Namen *Formatio Reticularis* geführt

hat. In ihr befinden sich zahlreiche Gruppen von Neuronen, die sowohl in einfachen als auch komplexen Reflexen verschaltet sind und funktionelle Zentren bilden, in denen Atmung und Kreislauf reguliert werden, und in denen die Motorik und der Wachzustand eines Organismus beeinflusst wird. Diese Zentren sind über den gesamten Hirnstamm verteilt, und werden entsprechend der rostrokaudalen Höhe den drei Abschnitten des Hirnstammes (Mesencephalon, Pons und Medulla oblongata) der *Formatio reticularis* zugeordnet.

Zur weiteren Unterscheidung der Neuronengruppen kann der Nachweis spezifischer Transmitter dienen. So gibt es im Hirnstamm eine Reihe spezialisierter Neurone, wie beispielsweise die Tyrosinhydroxylase produzierenden adrenergen, noradrenergen Zellgruppen, sowie die serotonergen Neurone der Raphe Kerne.

Im Hirnstamm finden sich äquivalent zum Rückenmark auch Kernsäulen der sensiblen Nervenanteile. Hiervon werden nur die Vestibulariskerne besprochen.

Im folgenden wird nun dargelegt, wie die einzelnen Gruppen der motorischen Hirnnervenkerne, der serotonergen Kerne und der vestibulären Kerne spezifiziert werden.

1.5 Die Spezifizierung der sm, bm und vm Neuronentypen im Hirnstamm

Über die dorso-ventrale Musterbildung des Hirnstammes ist sehr viel weniger bekannt, als im Falle des Rückenmarks. Jedoch konnten einige Arbeiten zeigen, daß ähnliche Mechanismen und Moleküle wie im Rückenmark für die Spezifizierung der verschiedenen Neuronenklassen im Hirnstamm verantwortlich sind (Briscoe et al., 1999; Ericson et al., 1997). So reguliert Shh auch im Hirnstamm die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren in den Vorläuferzelldomänen, wodurch die Zellen eine spezifische Identität annehmen (Osumi, 1997). Ähnlich wie im Rückenmark spielen verschiedene Mitglieder der Nkx Gen-Familie bei dieser Spezifizierung eine entscheidende Rolle (Briscoe et al., 1999; Qiu et al., 1998; Sander et al., 2000a).

Alle Vorläuferzellen der sm Neurone exprimieren im Hirnstamm Nkx6.1 (Muller et al., 2003). Ebenso werden ohne Nkx6.1-Aktivität weder die sm Neurone des *Nervus abducens* noch die des *Nervus hypoglossus* ausgebildet (Muller et al., 2003). Da auch im neonatalen Hirnstamm der Nkx6.1 mutanten Embryonen keine sm Neurone

nachweisbar sind, kann man ausschließen, daß deren Differenzierung lediglich verzögert ist. Das spricht dafür, daß Nkx6.1 bei der Spezifizierung der sm Vorläuferzellen im Hirnstamm eine zum Rückenmark analoge Rolle spielt. Der Unterschied besteht jedoch darin, daß im Rückenmark die beiden Nkx6 Proteine direkt sm Vorläuferzellen induzieren, im Hirnstamm hingegen indirekt wirken, indem sie andere Zellschicksale blockieren (Muhr et al., 2001; Novitch, 2001).

Auch der Homeobox-Faktor Phox2a spielt eine Rolle bei der Bildung einiger sm Kerne, denn in den Phox2a knock-out Mäusen fehlen N3n und N4n (Pattyn et al., 1997).

Anders als im Rückenmark, wo aus der ventralen Nkx2.2 exprimierenden p3 Domäne die V3 Interneurone entstehen (siehe Abb. 4), gehen im Hirnstamm aus dieser einen Domäne, sowohl viszero- als auch branchiomotorische Neurone (vmMN/bMN) hervor (vgl. Abb. 6)

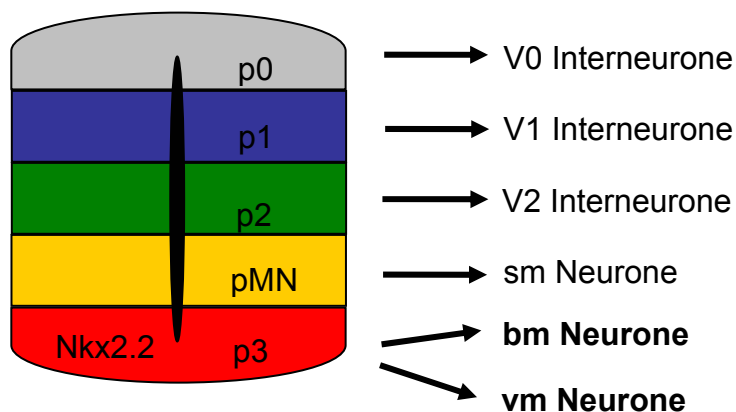


Abbildung 6:

Gezeigt ist ein schematischer Querschnitt durch das Hinterhirn zu einem frühen embryonalen Zeitpunkt auf Höhe der späteren Medulla oblongata. Entsprechend ihrer dorso-ventralen Position bilden sich in der pMN Vorläuferdomäne somatomotorische (sm) Neurone. In der p0-2 Vorläuferdomäne entstehen V0-2 Interneurone. Aus der Nkx2.2 positiven p3 Domäne entstehen hier sowohl branchiomotorische (bm) als auch viszeromotorische (vm) Neurone.

Welche Faktoren führen also im Hirnstamm zu dieser unterschiedlichen Differenzierung? Im Hirnstamm wird ebenfalls durch die Interaktion von Pax6 und Nkx2.2 die Grenze zwischen den Vorläufern der sm Neuronen einerseits und der vm/bm Neuronen andererseits etabliert (Osumi, 1997). Fehlt Pax6, so expandiert die Nkx2.2 Domäne nach dorsal in die pMN Domäne hinein und führt hier auch zur Bildung von bm und vm Neuronen (Ericson et al., 1997; Takahashi and Osumi, 2002). Fehlt jedoch Nkx2.2, so führt dieses wider Erwarten nicht dazu, daß auch die bm und vm Neuronen in der p3 Domäne fehlen (Briscoe et al., 1999). Möglicherweise kompensiert Nkx2.9, welches ebenfalls in p3 exprimiert wird, die Funktion von Nkx2.2 (Briscoe et al., 2000; Briscoe et al., 1999; Pabst et al., 2000). Nkx2.2 hat auch eine induktive Funktion. So reicht die Expression von Nkx2.2 in den

Vorläuferzellen des Hinterhirnes aus, um die Aktivierung des Homeobox-Proteins Phox2b zu vermitteln (Pattyn et al., 2000). Fehlt Phox2b, so fehlen alle vm Neurone (Pattyn et al., 2003a), und auch die bm Vorläuferzellen differenzieren nicht weiter (Pattyn et al., 2000), was eine wichtige Rolle für diesen Faktor impliziert.

Nkx6.1 scheint bei der Spezifizierung der vm/bm Vorläuferzellen hingegen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, denn bei den Nkx6.1 mutanten Embryonen werden die typischen Transkriptionsfaktoren Nkx2.2 und Phox2b dieser Domänen korrekt exprimiert. Auch die neu differenzierten Neurone zeigen die typischen Charakteristika der vm/bm Neurone, zu denen die korrekte Expression von Phox2b, Phox2a, Hoxb1 und Ebf1 zählt (Muller et al., 2003). Dennoch ist nicht abschließend bekannt, welcher Faktor definitiv die Spezifizierung dieser p3 übernimmt bzw. den Unterschied zwischen pMN und p3 Domäne ausmacht.

Auch in bezug auf die unterschiedliche Differenzierung von bm und vm Neurone konnte hierfür noch kein verantwortlicher Faktor ausgemacht werden. Zwar entstehen die vm und bm Neurone auf der gleichen dorso-ventralen Höhe in Form der p3 Domäne. Jedoch zeigen sich im Laufe der Differenzierung dieser Neurone deutliche Unterschiede zwischen diesen hieraus gebildeten Kernen. Indem Neurone dieser Domäne wandern, gruppieren sie sich zu den verschiedenen Hirnnervenkernen. Da diese Neurone zuvor auf der dorso-ventralen Ebene den gleichen Faktoren ausgesetzt waren, kommen für diese unterschiedliche Wanderung nur Faktoren in Betracht, die auf einer anderen, nämlich der antero-posterioren Achse wirken. Tatsächlich verfügt der Hirnstamm, anders als das Rückenmark, über eine solche schon mikroskopisch erkennbare antero-posteriore Gliederung. Diese 8 hintereinander angeordneten Abschnitte zeigen sich während der frühen Embryonalentwicklung zwischen Embryonaltag 8,5 (E8,5) und 12,5 (E12,5), und werden als Rhombomere bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, daß die einzelnen Rhombomere als embryologische Kompartimente ähnlich den p1-p3 Domänen des Rückenmarks fungieren. Auch die Identität dieser einzelnen Abschnitte wird durch ein Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Besonders hieran beteiligt sind die Hox-Gene und die durch Hox-Gene regulierten Kofaktoren wie *Gata* und *pbx*. Dabei wird auch die Hox-Genexpression durch einen Konzentrationsgradienten, hier der Retinsäure, reguliert (Papalopulu, et al., 1991). Gemäß der Hox-Kode-Hypothese wird also die Identität eines Rhombomers dadurch definiert, welche Kombination an Hox-Genen in diesem exprimiert wird (Guthrie und Lumsden, 1991;

Lumsden und Krumlauf, 1996). Entsprechend führen Mutationen bestimmter Hox-Gene zum Verlust der korrekten Zellidentität entlang der antero-posterioren Achse (Carpenter et al., 1993; Gavalas et al., 1997).

Vereinfacht gesagt, definiert also im Hinterhirn die dorso-ventrale Position, zu welcher Art von Motoneuronensubtyp bzw. Interneuron sich eine Vorläuferzelle entwickeln kann. Die anterior-posteriore Position definiert hingegen, welcher Hirnnervenkern sich bilden wird.

Interessanterweise fand man bei der Untersuchung von NKx6.1 und Nkx6.2 Doppelmutanten (Nkx6 Mutanten), daß die Expression von Hoxb1 in dem ventralen Anteil von R4 ausgelöscht war. Damit sind Nkx6-Proteine anscheinend nötig, um einen hohen Grad an Hoxb1-Expression in dem ventralen Anteil von R4 (ab E10, 5) aufrechtzuerhalten. Das ist erstaunlich, da von Hox-Genen eher bekannt ist, daß sie in der antero-posterioren Musterbildung involviert sind, was zweierlei impliziert. Erstens wirken die Nkx6-Proteine damit aufwärts von Hoxb1 und spielen somit auch eine Rolle bei der antero-posterioren Musterbildung im Hirnstamm und nicht nur, wie bisher bekannt, bei der dorso-ventralen. Und zweitens zeigt diese Interaktion, daß die dorso-ventrale und die anterior-posteriore Musterbildung nicht strikt parallel zueinander ablaufende Prozesse sind, sondern sich gegenseitig bedingen. Es ist zur Zeit jedoch noch unklar, wie die neuronalen Vorläuferzellen die unterschiedlichen Informationen miteinander integrieren, die sich aus ihrer Position auf der antero-posterioren und dorso-ventralen Achse ergeben.

1.6 Das serotonerge System

Serotonin oder auch 5-Hydroxytryptamine (5-HT) wird aus der Aminosäure Tryptophan synthetisiert und findet sich in den Neuronengruppen der Raphe Region der Pons und im oberen Hirnstamm. Diese verfügen über weitreichende Projektionen zum cerebralen Cortex.

Das serotonerge System läßt sich in einen rostralen und kaudalen Anteil unterteilen. Diese Unterteilung ist sinnvoll, da die Kerne dieser beiden Systeme unterschiedliche Funktionen wahrnehmen und darüber hinaus auch verschiedene Entwicklungswege haben.

Die rostralen Kerne und ihre ascendierenden Projektionen sind bei der Kontrolle des zerebralen Blutflusses (Edvinsson et al., 1983), des Schlafes (Puizillout et al., 1981) und der Stimmung (Stockmeier, 1997; van Praag and Korf, 1974) beteiligt.

Im Gegensatz dazu sind die kaudalen Raphe Kerne und deren absteigende Projektionen möglicherweise bei der Kontrolle kardiovaskulärer Funktionen (Loewy und Neil, 1981), der Schmerzwahrnehmung (Basbaum und Fields, 1984) und von Bewegungsabläufen beteiligt (Wessendorf et al., 1981). In diesem letzten Punkt besteht eine besonders enge Verknüpfung zu den bekannten Funktionen von Nkx6.1, die in der Entwicklung des motorischen Nervensystems liegen.

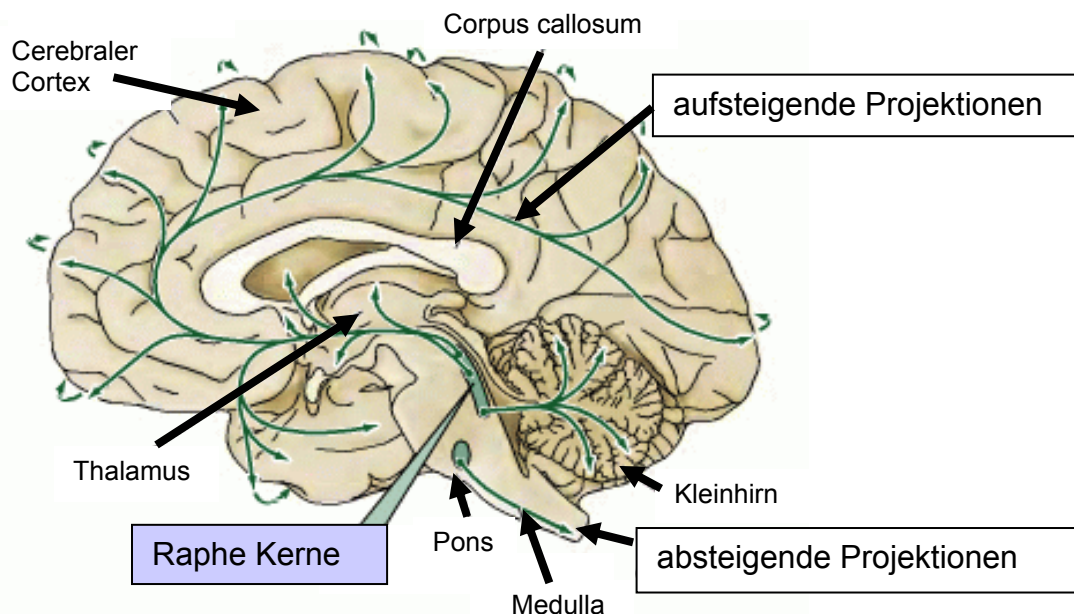


Abbildung 7: Gezeigt sind die Raphe Kerne mit ihren aufsteigenden Projektionen in die verschiedenen Hirnanteile: cerebraler Cortex, Thalamus und Kleinhirn Medulla. Die absteigenden Projektionen aus der Pons ziehen durch die Medulla ins Rückenmark. Nach Purves 2001.

Obwohl generell nicht mehr als die Hälfte der Raphe Kerne Serotonin als Neurotransmitter verwenden (Wiklund und Bjorklund, 1980), wird Serotonin als der wichtigste Transmitter dieses Systems betrachtet, da mehr als 90 % des Serotoninverbrauchs des gesamten Gehirnes aus dem Raphe System stammt (Nieuwenhuys 1985).

Die serotonergen Neurone entstehen zum Zeitpunkt E10,5 in ventralen Nkx2.2 positiven Vorläuferzellen, in denen die Transkriptionsfaktoren Nkx2.9 und Phox2b nicht mehr exprimiert werden und sich deshalb keine weiteren vm Neurone bilden (Pattyn et al., 2003a). Denn die Expression von Phox2b fördert die Bildung von vm Neuronen und unterdrückt gleichzeitig die Entstehung serotonerger Neurone.

Phox2b wirkt hier also wie ein molekularer Schalthebel, der entscheidet, ob Vorläuferzellen zu vm Neuronen oder serotonergen Neuronen werden. Noch ist unklar, welche Faktoren zur Etablierung der zukünftigen serotonergen Vorläuferneuronen führen. Es könnte sich um ein Signal handeln, das von der Bodenplatte des Neuralrohres produziert wird und einen bisher unbekanntem Faktor aktiviert. Dieser müsste in der Lage sein, im Zusammenspiel mit Nkx2.2 die Expression von Nkx2.9 und Phox2b zu unterdrücken (Pattyn et al., 2003a).

Auch Nkx6.1 hat eine Funktion bei der Bildung der serotonergen Neurone, die im folgenden besprochen wird.

1.6.1 Nkx6.1 im serotonergen System

Nkx6.1 und Nkx6.2 werden im Hirnstamm zeitgleich mit allen Nkx2.2 positiven Vorläuferzellen im Zeitraum zwischen E9,5 und E10,5 exprimiert. Weil aus diesen Vorläuferzellen, mit Ausnahme von denen, die sich in R4 befinden, auch serotonerge Neurone entstehen, impliziert dies auch gleichzeitig eine Beteiligung der Nkx6-Gene bei deren Entstehung (Pattyn et al., 2003a). Da sich Nkx6.1 und Nkx6.2 teilweise in ihren Funktionen überschneiden (Vallstedt et al., 2001), wurden Doppelmutanten (Nkx6 Mutanten) untersucht, um zu verhindern, daß eines der Gene das Fehlen des anderen kompensiert. Erstaunlicherweise entstehen bei diesen Nkx6-Mutanten aber serotonerge Neurone in R4, obwohl hier im Wildtyp keine serotonergen Neurone vorkommen.

Dies kann dadurch erklärt werden, daß in den Wildtyp-Mäusen der Transkriptionsfaktor Hoxb1 in R4 exprimiert wird und dieser wiederum Phox2b induziert, was die Differenzierung serotonerger Neurone verhindert. In den Nkx6.1 mutanten Mäusen ist jedoch die Expression von Hoxb1 deutlich reduziert, was dazu führt, daß Phox2b nicht induziert wird und dieses somit auch nicht die Entstehung der serotonergen Neurone blockieren kann. Da in den anderen Rhombomeren Hoxb1 erst gar nicht exprimiert wird, kann Nkx6.1 hier auch nicht die Bildung der serotonergen Neurone blockieren (Pattyn et al., 2003a).

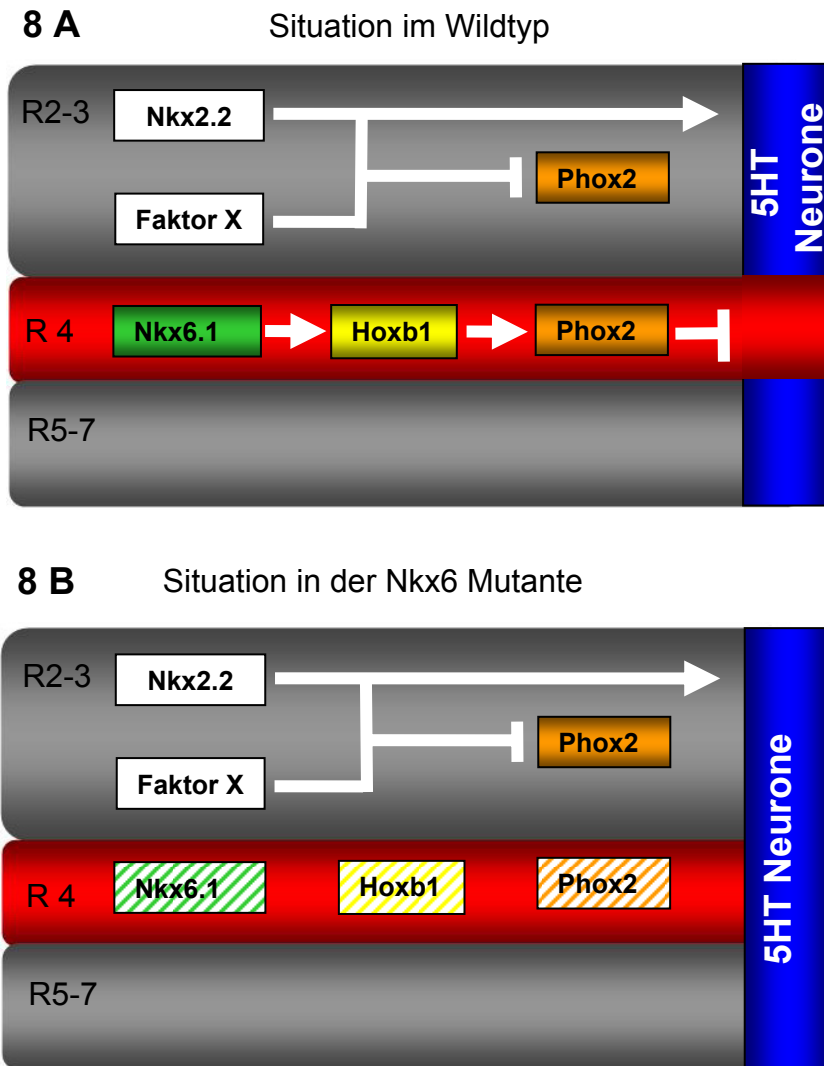


Abbildung 8: Im Wildtyp (**A**) induzieren Nkx2.2 und ein bisher noch unbekannter Faktor X die Bildung der serotonergen Neurone (5HT Neurone) (**blau**) und blockieren dabei gleichzeitig Phox2b (**orange**). In R4 (**rot**) ist Phox2b in der Lage, die Bildung serotonerger Neurone zu unterdrücken, da es hier durch Hoxb1 (**gelb**) induziert wird. Nkx6.1 wiederum induziert die Expression von Hoxb1. In den Nkx6.1 mutanten Mäusen (**B**) ist durch den Mangel an Nkx6.1 jedoch die Expression von Hoxb1 deutlich reduziert, was dazu führt, daß Phox2b nicht induziert wird und dieses somit nicht die Entstehung der serotonerger Neurone blockieren kann. Somit wirkt in der Nkx6 Mutante in R4 derselbe Mechanismus, wie in R2-3. Dieses führt hier zur Bildung von serotonerger Neuronen. Die Verhältnisse in R5-7 entsprechen R2-3 und werden zur Vereinfachung nicht dargestellt.

Das Rhombomer 4 ist auch aus anderen Gründen interessant. Denn es liefert Hinweise dafür, daß schon zu frühen Entwicklungsstadien zwischen Maus und Huhn drastische Unterschiede bezüglich der Spezifizierung elementarer Vorläuferdomänen erkennbar sind.

So entstehen beim Huhn serotonerge Neurone in R4, was bei Wildtyp Mäusen nicht der Fall ist, obwohl bei beiden Spezies Nkx6.1 und Hoxb1 in R4 zusammen exprimiert werden (Craven 2003). Es zeigte sich, daß im Gegensatz zur Maus Nkx6.1 bei der Bildung rostraler serotonerger Neurone im Huhn essentiell wichtig ist, denn es induziert zusammen mit Nkx2.2 die beiden Transkriptionsfaktoren Gata2 und Gata3. Gata2 wiederum ist alleine ausreichend, um die Bildung serotonerger Neurone zu induzieren (Craven et al., 2004). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß Nkx6.1 im Huhn in Form eines dorso-ventralen Gradienten, ähnlich wie Shh,

exprimiert wird (Craven et al., 2004). Im Gegensatz dazu findet sich kein solcher Gradient in der Maus.

Damit hat Nkx6.1 im Huhn eine grundsätzlich andere Funktion und wirkt zudem auch über andere Mechanismen, als in der Maus.

Etwas anders verhält es sich mit Gata3. Da Interaktionen zwischen Nkx6.1 und Gata3 nicht untersucht worden sind, kann nicht ausgeschlossen werden, daß beide Faktoren miteinander interagieren. Sollte sich das bestätigen, so impliziert das eine Rolle für Nkx6.1 bei der späteren Entwicklung der kaudalen Raphe Kerne. Denn wenn Gata3 fehlt, ist die Zytoarchitektur der kaudalen Raphe Kerne, besonders die des Nucleus Obscurus, verändert (van Doorninck et al., 1999). So zeigen diese Mäuse einen deutlichen Defekt bei lokomotorischen Bewegungsabläufen (locomotor Performance). Da es sich dabei um Effekte handelt, die erst in der späteren Entwicklung bzw. im adulten Tier erkennbar werden, konnte die gegenwärtige Forschung diese Effekte nicht erfassen, da die Nkx6.1^{-/-}-Mutanten kurz nach der Geburt versterben.

Um zu spekulieren, welche Funktionen und Mechanismen Nkx6.1 bei den kaudalen serotonergen Kernen im Verlauf der Entwicklung haben könnte, müßte zuerst geklärt werden, ob es zu späteren Zeitpunkten überhaupt exprimiert wird.

1.7 Die Funktion und Entwicklung der Vestibulariskerne

In dieser Arbeit werden in der Maus 2 Vestibulariskerne unterschieden. Dies sind der Nucleus medialis/Schwalbe und der Nucleus lateralis/Deiters. Diese Kerne stellen Schaltstellen zwischen dem Gleichgewichtsorgan und den Augen- und Halsmuskeln sowie dem extrapyramidalen System dar. Die Funktion des Vestibularapparates ist entscheidend für die Beibehaltung des Gleichgewichtes und damit einer aufrechten Haltung. Ebenso bedeutend ist der Vestibularapparat bei der Kontrolle von Kopfbewegungen und von Augenbewegungen, die das Fixieren von bewegten Objekten ermöglichen.

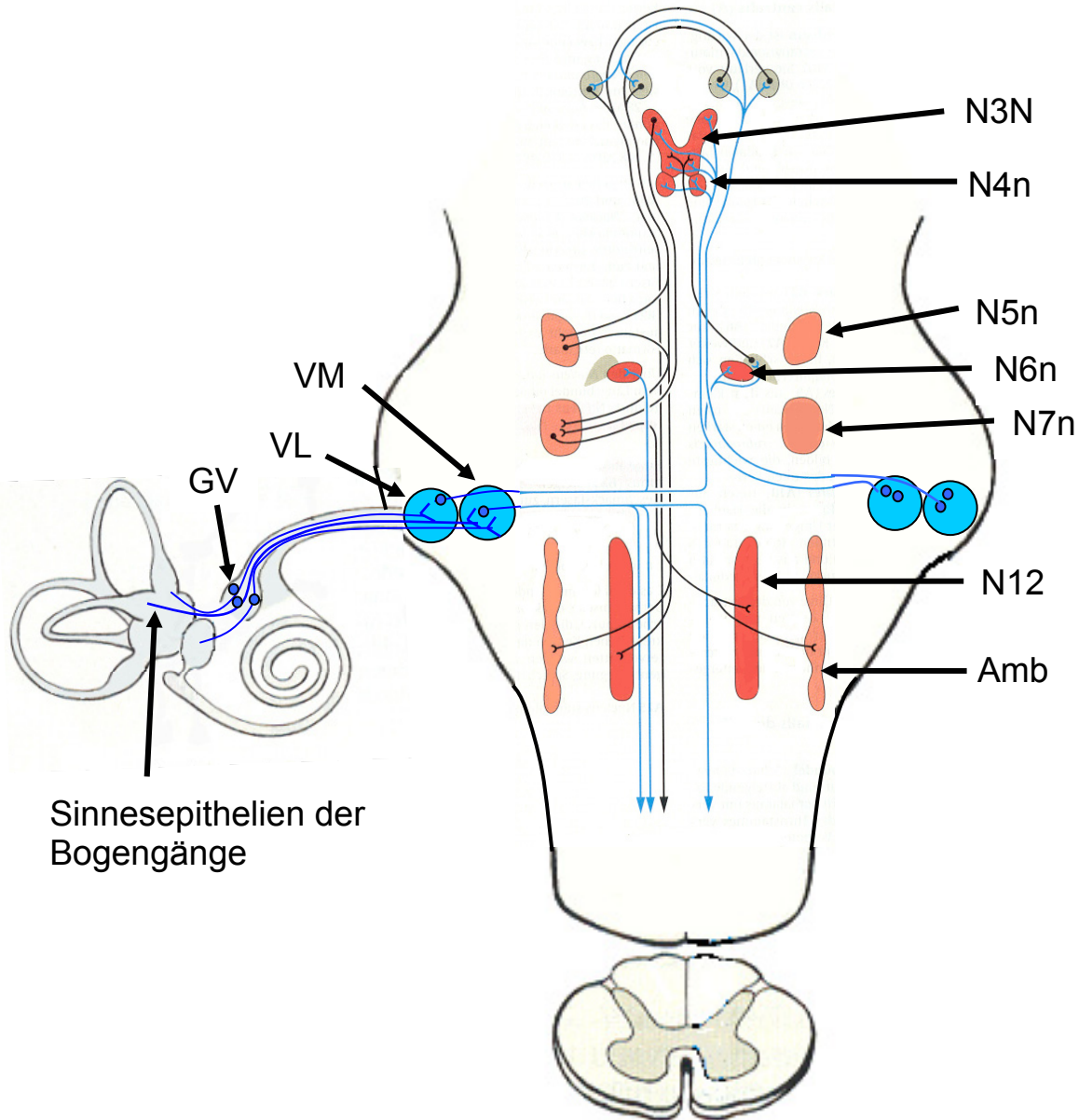


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Vestibulariskerne (**blau**) Nucleus medialis/Schwalbe (**VM**) und der Nucleus lateralis/Deiters (**VL**) und ihrer Verknüpfungen über das mediale Längsbündel zu den Augenmuskelkernen und dem Rückenmark. Die peripheren Fortsätze der bipolaren Nervenzellen des Ganglion vestibulare (**GV**) ziehen zu den Sinnesepithelien der Bogengänge. Die zentralen Fortsätze erreichen die Vestibulariskerne. Die Fortsätze der Vestibulariskerne projizieren zu verschiedenen Kernen des Hirnstammes, in das Kleinhirn (nicht gezeigt) und in das Rückenmark. Durch das *mediale Längsbündel* (**blaue Fasern**) wird der Vestibularapparat mit den Augen- und Halsmuskeln und dem extrapyramidalen System verknüpft. Nucleus n. oculomotorii (N3n), Nucleus n. trochlearis (N4n), Nucleus n. abducentis (N6n), Nucleus n. hypoglossi (N12n), Nucleus motorius n. trigemini (N5n), Nucleus n. facialis (N7n), Nucleus ambiguus (Amb). Nach Kahle 2001.

Die Vestibulariskerne werden von den zentralen Fortsätzen der bipolaren Nervenzellen des Ganglion vestibulare erreicht. Die peripheren Fortsätze dieser bipolaren Nervenzellen enden an den Sinnesepithelien der Bogengänge, des Sacculus und des Utriculus.

Des Weiteren sind die Vestibulariskerne mit den Augenmuskelkernen, dem Kleinhirn, dem Rückenmark und anderen Kernen durch das *mediale Längsbündel* verbunden. Diese Faserbahn reicht vom rostralen Mittelhirn bis in das Rückenmark und verknüpft dabei den Vestibularapparat mit den Augen und Halsmuskeln und dem extrapyramidalen System. Damit stellen die Vestibulariskerne eine bedeutende Interaktionsstelle zwischen dem motorischen und sensiblen System dar. Da der Nucleus vestibularis lateralis (Deiters) etwa zum Zeitpunkt E12 und der Nucleus vestibularis (Schwalbe) zwischen E13 und E14 entsteht (Altman und Bayer, 1980) kann eine Expressionsanalyse, die diesen Zeitraum abdeckt, auch eine mögliche Beteiligung von Nkx6.1 bei der Entstehung oder späteren Entwicklung dieser Kerne klären.

1.8 Die Entwicklung des Augenstiels

Das Auge hebt sich deutlich von den anderen neuroanatomischen Systemen ab und wird hier deshalb in einem separaten Kapitel besprochen. Als erstes sollten morphologische Entwicklungsaspekte dargelegt werden.

Das Wirbeltierauge entsteht im Gefolge zweier Prozesse. Bei dem ersten handelt es sich um einen morphogenetischen, der in der regionalen Spezifizierung der unterschiedlichen Augenstrukturen endet. Im Anschluß daran differenzieren sich Zellen in diesen so definierten anatomischen Domänen, um ihre späteren Aufgaben und Funktionen wahrnehmen zu können (Pei und Rhodin, 1970). Bei Mäusen beginnt diese morphogenetische Phase etwa zum Zeitpunkt E8.5, indem sich ein Teil des lateralen Prosencephalon ausstülpt, um das Augenbläschen zu bilden. Etwa in der Mitte der Gestationsphase berührt das Augenbläschen das darüber liegende Ektoderm und induziert die Bildung der Linsenanlage. Dabei stülpt sich diese Struktur ein und bildet den zweilagigen Augenbecher, der durch den *Sehstiel* mit dem Diencephalon verbunden ist. Aus dem Sehstiel entwickelt sich dann der Nervus opticus (Dakubo et al., 2003).

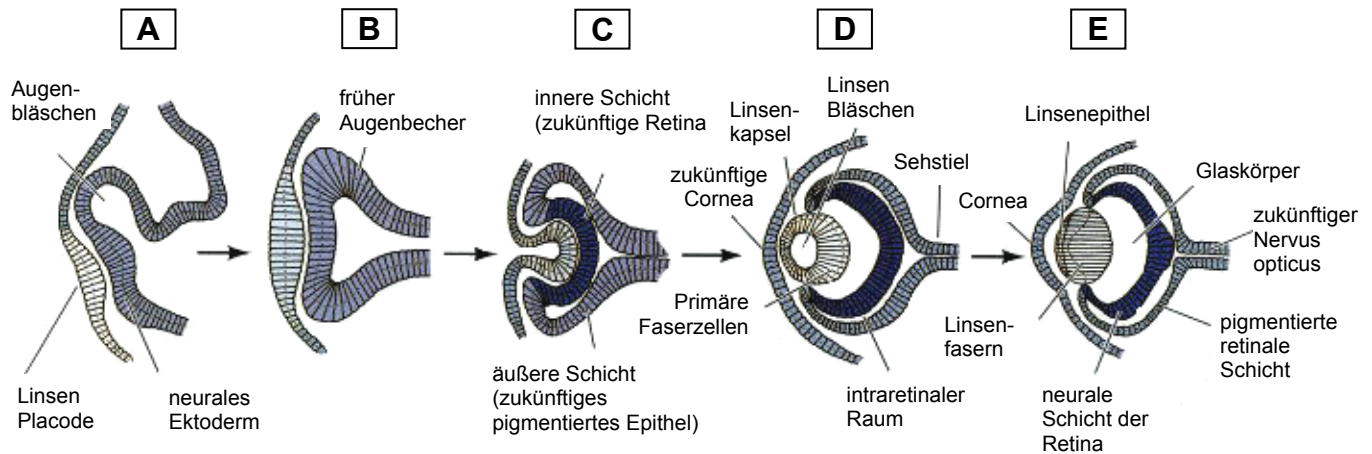


Abbildung 10: Schematisches Diagramm zur Entwicklung des Sehstiels. **A** Am embryonalen Tag (E) 9 berührt das Augenbläschen die Oberfläche des Endhirnektoderms. **B** In der Mitte von E9 hat sich die Linsenanlage verdickt und der frühe Augenbecher hat sich gebildet. **C** Etwa bei E10,5 stülpt sich der zentrale Anteil dieses Ektoderms ein und bildet den zweilagigen Augenbecher, dessen innere Schicht die zukünftige Retina und dessen äußere Schicht das zukünftige pigmentierte Epithel darstellen. **D** Zum Zeitpunkt E11,5 hat sich der Sehsteil gebildet. **E** Bei E13 läßt sich die neurale Schicht der Retina und die pigmentierte retinale Schicht unterscheiden. Nach Gilbert 2003.

Es stellt sich die Frage, ob Nkx6.1 prinzipiell auch eine Rolle bei der Entwicklung des Auges spielt und über welche Mechanismen dieses funktionieren könnte. Um diese Frage zu klären, ist es hilfreich zu überprüfen, welche bekannten Interaktionspartner in welchen Augenabschnitten überhaupt exprimiert werden. Hierbei fällt einem besonders Shh auf, das nicht nur im Rückenmark exprimiert wird und dort mit Nkx6.1 zusammen entscheidend für die Musterbildung ist, sondern von dem auch bekannt ist, daß es von der prechordalen Platte und anschließend von dem ventralen Epithel des Endhirnes sezerniert wird (Marti 1995) und zur Musterbildung sowohl ventraler Endhirnstukturen, inklusive des Hypothalamus, als auch des Augenbläschen führt (Chiang et al., 1996; Rubenstein und Beachy, 1998).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, daß das Shh aus den retinalen Ganglienzellen (rGZ) auch die Proliferation von Astrozyten des Nervus opticus reguliert (Wallace und Raff, 1999). Dabei findet sich tatsächlich das Shh Protein und nicht dessen mRNA im perinatalen Nervus opticus (Dakubo et al., 2003). Dieses spricht für ein Modell, in dem Shh anterograd in diesen Axonen transportiert werden könnte (Wallace und Raff, 1999). Dazu konnte gezeigt werden, daß die Expression von Shh in den rGZ tatsächlich für die Spezifizierung der Gliazelllinien der neuroepithelialen Zellen im *Sehstiel* notwendig ist. Denn nach Induktion von Shh im ventralen Endhirn migrieren die Oligodendrozytenvorläuferzellen in den perinatalen Nervus opticus, wo sie differenzieren und zu ausgereiften Oligodendrozyten werden.

Shh reguliert dabei die Entwicklung von Oligodendrozyten in den neuroepithelialen Zellen durch die Induktion der Gene Olig1 und Olig2 (Sussman et al., 2002).

Es konnte nachgewiesen werden, daß auch Nkx6.1 die Entwicklung von Oligodendrozyten im Rückenmark des Huhnes kontrolliert, indem Nkx6.1 möglicherweise die Expression der Olig-Gene im ventralen Neuroepithel reguliert (Liu et al., 2003). So ist im Rückenmark von Nkx6.1-Mutanten die Expression von Olig2 in der Motoneuronenvorläuferdomäne verringert und die Bildung und Differenzierung der Oligodendrozyten signifikant verzögert oder reduziert. Diese Regulation der Olig-Genexpression durch Nkx6.1 ist dabei stadienabhängig. So führt in frühen Stadien die ektope Expression von Nkx6.1 im embryonalen Rückenmark des Huhns zur Induktion von Olig2, in späten Stadien jedoch zur Inhibierung desselben. Darüber hinaus reguliert Nkx6.1 die Olig Genexpression und Oligodendrogenese in Abhängigkeit von der jeweiligen Hirnregion. So kann beispielsweise im Hirnstamm Olig1 und Olig2 sowohl innerhalb als auch außerhalb der Nkx6.1 exprimierenden Domänen exprimiert sein. In dieser Region ist die Oligodendrogenese damit nicht abhängig von der Aktivität von Nkx6.1 (Liu et al., 2003). Da von Nkx6.1 bekannt ist, daß es im Rückenmark mit Shh interagiert, sind auch im *Sehstiel* Interaktionen von Nkx6.1 mit Shh, oder den Olig-Genen bei der Oligodendrogenese denkbar.

Um die Oligodendrogenese im *Sehstil* zu verstehen, ist es hilfreich zu wissen, ob Nkx6.1 hier exprimiert wird.

Im folgenden werden die Techniken erläutert, mit denen diesen Fragen nachgegangen wurde.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bezugsquellen häufig verwendeter Substanzen

Agarose	Gibco/BRL, Eggenstein
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxy- und Ribonukleotide	Boehringer, Mannheim
DMSO	Merck, Darmstadt
DNSsel aus Rinderpankreas	Boehringer, Mannheim
DTT	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma, München
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid	Sigma, München
Glycerin	Carl Roth KG, Karlsruhe
Heringsspermien-DNS	Sigma, München
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
3MM-Papier	Whatman, Maidstone (USA)
Nitrozellulose	Schleicher & Schüll, Dassel
Normal goat serum (NGS)	Vector Laboratories (USA)
Phenol	Riedel-deHaen, Seelze
Paraformaldehyd	Carl Roth KG, Karlsruhe
RNase aus Rinderpankreas	Boehringer, Mannheim
SDS	Serva, Heidelberg
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Tris	Carl Roth KG, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Salze und sonstige Chemikalien	Merck, Darmstadt,
MediumVectashield Fluoreszens MountingVector,	Alexis, Grünberg Deutschland

2.1.2 Zusammensetzung gebräuchlicher Medien und Lösungen

1M Tris Puffer

121g Tris auf 800ml ddH₂O. PH Wert einstellen, auf 1L mit ddH₂O auffüllen.

1X TAE-Puffer

0,2 M Tris-Acetat,
10 mM EDTA pH8

Reagenzien für die Präparation

PBS-Puffer

0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl,
3,2 mM Na₂HP0₄, 1,5 mM KH₂PO₄
25 mM Tris-HCl, pH 8,0

0,2 M PB 1L

27,45g Na₂HPO₄ 7H₂O (Roth 76185 Karlsruhe)
7,16 1NaH₂PO₄ 2H₂O (Roth 76185 Karlsruhe)
wurden in H₂O gelöst.

4% Paraformaldehyde (PFA)

4g Paraformaldehyd (MECK, 64271 Darmstadt)
25µl 5M NaOH (Roth 76185 Karlsruhe)
wurden bei 60-70°C in H₂O bis zum Lösen erhitzt, dann steril
filtriert und ad. 100ml mit 0,2 M PB aufgefüllt und bei -20°
gelagert.

30 %ige Sucroslösung D(+)-Saccharose

15g D(+)-Saccharose (Roth 76185 Karlsruhe)
wurden in 50 ml PB gelöst.

Hybridisierungsreagenzien**1.Tag****10X Salz Lösung 50 ml**

5,7 g	NaCl (Roth 76185 Karlsruhe)
5ml	1 M Tris Lösung (Roth 76185 Karlsruhe) durch HCl auf einen pH 7,5 eingestellt
0,39 g	Na ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (Roth 76185 Karlsruhe)
0,355 g	Na ₂ HPO ₄ (Roth 76185 Karlsruhe)
5 ml	0,5 M EDTA (Roth 76185 Karlsruhe)

Denhardts Reagenz (50 X) aufzubewahren bei -20°C

1g	Ficoll 400(Sigma 89552 Steinheim)
1g	Polyvenylpyrrolidone (calbiochem-Novabiochem Corporation La Jolla Ca 92039- . 2087)
1g	BSA auf 100ml ddH ₂ O

Hybridisierungspuffer 50 ml aufzubewahren bei -20°C

5 ml	1X Salz
25 ml	Formamid (Roth 76185 Karlsruhe)
0,5 g	10% Dextransulfat Natriumsalz 10g /1L (Roth 76185 Karlsruhe)
0,5 ml	Hefe-tRNS (Gibco-BRL) 1mg / ml Stocks bei -20° C 10 mg/ ml
1ml	Denhardt`s Reagenz 50X mit sterilem H ₂ O auf 50 ml auffüllen.

20X SSC 1L pH 7,0 (mit HCl eingestellt)

175,3 g	NaCl (Roth 76185 Karlsruhe)
88,2 g	Tri-Natriumcitrat-Di-Hydrat (Roth 76185 Karlsruhe)

5X SSC / 50% Formamid 1L

250 ml	20X SSC s.o.
500 ml	Formamid (Roth 76185 Karlsruhe)

2.Tag**Waschlösung 1L**

50 ml	20X SSC
500 ml	Formamid (Roth 76185 Karlsruhe)
1 ml	Tween 100% (Roth 76185 Karlsruhe)

Maleinsäure 1M

116,1 g	Maleinsäure (Sigma 89552 Steinheim) in H ₂ O lösen und mit NaOH auf pH 7,5 einstellen.
---------	---

MABT 1L

100 ml	1M Maleinsäure
60 g	NaCl (Roth 76185 Karlsruhe)
1 ml	Tween 100% (Roth 76185 Karlsruhe)
	auf 1L mit sterilem H ₂ O auffüllen.

Blocking Reagenz 16 ml

3,2 ml	10% Blockinglösung Dig Protokoll
3,2 ml	inaktiviertes Goat Serum (Sigma 89552 Steinheim) 20 Minuten bei 56°C inaktiviert
9,6 ml	MABT

3.Tag**T/L –Mix**

2 g	Levamisol (Sigma 89552 Steinheim)
4 ml	Tween 1000 % (Roth 76185 Karlsruhe)
	auf 40 ml mit sterilem H ₂ O auffüllen.

Alkalischer-Phosphat–Färbungs-Puffer 500 ml

10 ml	5M NaCl (Roth 76185 Karlsruhe)
25 ml	1 M Mg Cl ₂ (Roth 76185 Karlsruhe)
50 ml	1 M Tris pH 7,9 s.o.
5 ml	T/ L-Mix mit sterilen dd H ₂ O auf 500 ml auffüllen.

10X Phosphate buffered saline (PBS) 1L

81,8 g	NaCl
2 g	KCl
14,4 g	Na ₂ HPO ₄ + 2H ₂ O
2g	KH ₂ PO ₄

Mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

PBST

Wie PBS herzustellen, jedoch zusätzlich 1 ml TritonX (Roth 76185 Karlsruhe) pro Liter

2.2 Methoden

Die Analyse der Nkx6.1-Expression im Gehirn wurde durch *in situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin (DIG) markierten RNS-Sonden durchgeführt. Diese Methode stellt eine Alternative zum herkömmlichen radioaktiven Nachweis von sequenzspezifischen DNS- bzw. RNS Abschnitten dar. Die Nukleinsäuremoleküle werden hierbei nicht radioaktiv, sondern durch den enzymatischen Einbau von an DIG gekoppelten Uridin-Nukleotiden markiert. Dort, wo sich im Gehirn nun die Nkx6.1 mRNA befindet, lagert sich der komplementäre Gegenstrang an. Im Anschluß daran führt ein Enzym-gekoppelter Immunonachweis zu einer Blaufärbung dieser Zellen.

Hier wird nun die Herstellung dieser RNS-Sonde beschrieben. Anschließend wird die Aufbereitung des Hirngewebes dargestellt und als letztes folgt die Beschreibung der *in situ* Hybridisierung selbst und die Durchführung weiterer Färbungen, wie der Cresylviolett und der Thyrosinhydroxylasefärbung.

2.2.1 Schneiden und Linearisieren des Plasmids

Ausgangspunkt für die Herstellung des komplementären RNA-Stranges ist ein cDNA-Fragment, welches die komplementäre Sequenz für einen typischen Abschnitt der zu detektierenden Nkx6.1 mRNA enthält. Dieses wurde bereits in einen sogenannten pBKS-Vektor kloniert. Die Herstellung dieses Plasmids ist in Sander et al.; 2000 beschrieben worden.

Prinzip:

Um die DNS-Vorlage der T7-RNS-Polymerase zugänglich zu machen, mußte die DNS, die sich in dem kreisförmigen Plasmid befindet, linearisiert werden. Dazu wurde die Plamid-DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* gespalten. Das Enzym sollte glatte oder 5'-Überhang Schnittenden hinterlassen. Dadurch wird die Transkription von Plasmid-DNS unterbunden.

Durchführung:

Ein 50µl-Verdau-Ansatz für die Linearisierung des Vektors enthielt 20µl Vektor-DNS und 100 Units *EcoRI* in 1X Restriktionpuffer. Die Inkubation erfolgte für 2h bei 37°C.

Um die beiden entstandenen Plasmidfragmente zu trennen und die Vollständigkeit der Reaktion zu überprüfen, wurde der gesamte Ansatz auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.2 Elektrophorese in Agarosegelen

Prinzip:

Zahlreiche Moleküle lassen sich entsprechend ihrer Größe in Gelapparaturen durch elektrische Feldern auftrennen.

Durchführung:

Hierfür wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet. Dazu wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer aufgekocht, auf circa 60°C abgekühlt, mit 5µl Ethidiumbromidlösung (5mg/ml) versetzt und anschließend in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Als Laufpuffer wurde ebenfalls TAE-Puffer verwendet. Die im *Loading Dye* aufgenommene DNA wurde bei 80-100 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurde die DNA unter UV-Licht (360 nm) analysiert und fotografiert.

Das etwa 1000 Kb große Fragment wurde ausgeschnitten und mit Quia Quick-Säulen von der Agarose gereinigt.

2.2.3 Bestimmung von DNS- und RNS-Konzentrationen

Die Konzentration wäßriger DNS-Lösungen wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt (Ultrospec

3000, Pharmacia). Bei dieser Wellenlänge findet sich das Absorptionsmaximum sowohl für einzel- als auch für doppelsträngige DNS. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Nukleinsäure-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ für doppelsträngige DNS sowie 20 $\mu\text{g/ml}$ für einzelsträngige DNS und 40 $\mu\text{g/ml}$ für RNS.

Zur Überprüfung der photometrisch ermittelten Meßergebnisse und zum exakten Abgleich kleinster DNS-Mengen wurden Aliquots der entsprechenden DNS-Lösungen zusammen mit Referenzproben bekannter Konzentration auf ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen koelektrophoretisiert. Die Konzentrationen der einzelnen DNS-Lösungen konnten anhand der Fluoreszenz-Intensitäten miteinander verglichen werden.

2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Prinzip:

Um DNS aus TAE- oder TBE-Gelen zu isolieren, wurde das Kit „NucleoSpin® Extract 2 in 1“, vertrieben durch Machrey-Nagel, benutzt. Durch Salze in den Puffern NT1 und NT2 wird die DNS an die Siliziummembran gebunden. Zusätzlich enthält der Puffer *NT1* Komponenten, um das Agarosegel zu lösen. Kontaminationen wie Salze und lösliche Makromoleküle werden durch zusätzliche Waschschriffe mit dem ethanolhaltigen Puffer NT3 entfernt. Schließlich wird die DNS durch einen leicht alkalischen Puffer NE (5mM Tris- Cl, pH 8,5) aus der Membran gelöst.

Durchführung:

Das zu isolierende DNS-Fragment wird mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gewogen und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Je 100 mg Agarosegel werden 300 μl Puffer NT1 zugegeben. Der Ansatz wird bei 50°C für ca. 5- 10 min inkubiert. Durch schütteln während der Inkubationszeit wird das Lösen des Agarosegel beschleunigt. Die NucleoSpin Extract Säule wird in ein 2ml Sammelgefäß eingesetzt und mit dem Reaktionsansatz beladen. Nach einer Zentrifugationszeit von 1 min bei 10.000 rpm kann die Flüssigkeit im Sammelgefäß verworfen werden. Ein zusätzlicher optionaler Reinigungsschritt kann durch die Zugabe von 500 μl Puffer NT2 erfolgen. Der Puffer wird durch eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 1 min entfernt. Nach Zugabe von 600 μl Puffer NT3 wird der Ansatz erneut für 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach einer abschließenden Zugabe von 200 μl Puffer NT3 wird der Ansatz zur vollständigen Entfernung des Puffers für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die NucleoSpin Extract Säule wird in ein 1,5ml Eppendorf

Reaktionsgefäß gegeben und die DNS wird durch Zugabe von 50µl NE oder ddH₂O aus der Membran gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 1 min kann die Lösung bei 14.000 rpm innerhalb von 1 min abzentrifugiert werden.

2.2.5 Herstellung der DIG-Sonde

Prinzip:

Von dem nun linearisierten und aufgereinigten DNS-Fragment werden durch *in vitro* Transkription RNS-Sonden synthetisiert, die in der späteren Hybridisierungsreaktion zur Detektion der Nkx6.1 mRNA verwendet werden.

Als Matrize für die Transkription dieser RNS-Sonde verwendet man die cDNS der zu detektierenden Nkx6.1 mRNA. Diese cDNS-Sequenz liegt in der multiplen Klonierungstelle des pBKS Plasmids und wird von dem T7 Promotor der RNS-Polymerase flankiert. Mit Hilfe der T7-RNS-Polymerase werden sogenannte "run-off"-Transkripte dieser Matrizen-DNS erzeugt. Während der Synthese der DIG markierten RNS durch *in vitro*-Transkription dient Digoxigenin markiertes Uridinphosphat (DIG dUTP) als Substrat für die RNS-Polymerasen. Zur Gewährleistung einer optimalen sterischen Interaktion zwischen dem Digoxigenin, welches anschließend als Hapten für den Anti-DIG-Antikörper während der Immundetektion fungiert, erfolgt der Einbau der DIG dUTP so, daß ca. jedes 20. bis 25. Nukleotid der neu-synthetisierten RNS ein DIG UTP enthält.

Durchführung:

Herstellung der DIG RNS-Sonde nach dem „DIG RNS-Protokoll Labeling Mix“ der Firma „Roche“.

1µg der linearisierten Plasmid DNS (100-200ng) wurden mit 2µl „DIG RNS-labeling-mix“ sowie 2µl 10X Transkriptionspuffer (Boehringer) und 13 µl sterilem RNase –freiem, doppelt destilliertem H₂O (dd H₂O) und 2µl RNA Polymerase T7 (2U/µl) gemischt und danach kurz abzentrifugiert. Anschließend wurde diese Mischung zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung der Matrizen-DNS wurden 2µl DNase 1 (RNase–frei) hinzugefügt und für 15 min bei 38°C inkubiert.

Nun wurde die Reaktion mit 2µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) gestoppt.

Im Anschluß wurden 2,5 µl 4M LiCl und 75 µl vorgekühltes (-20°C) Ethanol hinzugefügt und der Ansatz gut gemischt.

Dieses Gemisch wurde mindestens 30 min lang bei -70°C gefällt und anschließend bei 13000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417C).

Das Ethanol wurde hiernach vorsichtig dekantiert und das verbleibende Pellet mit 50µl vorgekühltem (- 20°C) Ethanol 70% (v/v) gewaschen.

Danach wurde erneut bei 13000 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Ethanol wurde nun wieder vorsichtig abgegossen und das Pellet unter Vakuum getrocknet. Nun wurde das Pellet in 50µl sterilem RNase freiem doppelt destilliertem H₂O gelöst.

Zum Schluß wurde 1µl RNase Inhibitor hinzugefügt und 1-2µl des Produktes auf einem Gel kontrolliert. Der Rest des Produktes wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.6 Präparation und Fixation der Embryonen und Gehirne

Prinzip:

Die Fixation dient zur Konservierung des Gewebes, indem das PFA durch Fixation der Schnitte unspezifische Bindungen der Sonde im Gewebe minimiert.

Durchführung:

Die tragenden Muttertiere wurden in einem CO₂-Bad (Trockeneis) betäubt und die Embryonen entnommen. Das Alter der Embryonen wurde mit Hilfe des Plug Datums des Muttertiers berechnet, wobei das Auftreten des Plugs als E0,5 definiert wurde. Zusätzlich erfolgte eine Altersbestimmung durch Analyse des Entwicklungsstandes der Extremitäten.

Bis zum Alter von E14,5 wurden die Embryonen als Ganzes fixiert. Bei älteren Embryonen wurde der Kopf abgetrennt und dieser fixiert. Bei E17 und älter wurde der Schädel zwecks besserer Fixation eröffnet.

Die Fixation erfolgte in 4%igem PFA für 3-4 Stunden bei 4°C auf dem Schüttler. Dann wurde das Gewebe zweimal für 10 Minuten in PBS gewaschen. Um das Gewebe gefrierfest zu machen, wurde es in eine 30%ige Sucroslösung aus PB bzw. PBS überführt und mindestens über Nacht bei 4°C inkubiert, bis das Gewebe vollständig in der Saccharoselösung abgesunken war. Die Einbettung erfolgte in O.C.T (Tissue-Tek, Miles) bei -80°C, um die Bildung von Eiskristallen zu verhindern.

2.2.7 Schneiden der Gewebeproben

Mit dem Kryostaten (2800 Frig-Cut E, Reichert-Jung) wurden bei $-20/25^{\circ}\text{C}$ Gefrierschnitte von 12-16 μm Dicke angefertigt, die getrocknet und danach bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch in Kryoboxen (Neolab) aufbewahrt wurden.

2.2.8 Hybridisierung von Embryoschnitten

Prinzip:

Um die zonenspezifische Verteilung bestimmter Transskripte innerhalb des Gehirnes bestimmen zu können, wird die Methode der *in situ* Hybridisierung eingesetzt. Das Hirngewebe wurde, wie beschrieben, im Kryostaten geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Unspezifischen Bindungen können nach der Hybridisierung, durch Waschen mit immer stärker verdünnten Salzlösungen, entfernt werden.

Durchführung:

1. Tag

Die bei -80°C aufbewahrten Gewebeproben wurden mindestens eine halbe Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut und dabei in den Plastiktüten belassen, um die Kondenswasserbildung zu vermeiden.

Der Hybridisierungs-Puffer (gelagert bei -20°C) wurde für 5-10 min auf 65°C erhitzt. Anschließend wurde darin die RNS-Sonde im Verhältnis von 1:1000 bis 1:2000 verdünnt. Dieser Sonde-Hyb-Mix wurde bei 70°C für 5-10 min denaturiert. Auf die Objektträger wurde 100 bis 200 μl Sonde-Hyb-Mix aufgetragen. Die Objektträger wurden mit Deckgläsern zugedeckt.

Die Hybridisierung fand in einer feuchten Kammer (5X SSC / 50% Formamid) bei 65°C über Nacht statt.

2. Tag

Die Objektträger wurden nun in eine Objektträgerhalterung gestellt und in der vorgewärmten Waschlösung bei 65°C für 15 min gewaschen. Nachdem die Deckgläschen abgefallen waren, wurden zwei weitere Waschungen bei 65°C für je 30 min durchgeführt.

Anschließend wurden die Objektträger in der MABT-Lösung zweimal bei Raumtemperatur für je 30 min gewaschen.

In einer anderen, wie oben beschrieben, vorbereiteten Schachtel, in der jedoch das Whatmanpaper mit Wasser befeuchtet ist, wurden die Objektträger nun mit 600µl Blocking-Reagenz für eine Stunde ohne Deckgläser geblockt.

Im Anschluß wurde das überschüssige Blocking-Reagenz abgegossen und eine Antikörper-Färbung durchgeführt. Dieser Dig-Antikörper wurde 1:2500 im Blocking-Reagenz verdünnt und je 100 µl auf die Objektträger aufgetragen und über Nacht in der Schachtel bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert.

3. Tag

Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur viermal für je 20 min in der MABT-Lösung gewaschen.

Danach wurden sie zweimal für 10 min in Alkalischem-Phosphat-Färbungs-Puffer gewaschen.

Die Färbereaktion wurde mit NBT/BICP Alkalischem-Phosphat-Färbungs-Puffer-Mix durchgeführt. Hiervon wurden je 200 µl je Objektträger aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert.

4. Tag

Bei ausreichender Färbung wurden die Objektträger zweimal je eine Minute in H₂O gewaschen.

War die Färbereaktion nicht ausreichend so wurde nochmals mit NBT/BICP Alkalischem-Phosphat-Färbungs-Puffer-Mix bei den gleichen Bedingungen einen Tag lang inkubiert.

Zum Schluß wurden die Objektträger an der Luft getrocknet und mit 3-5 Tropfen Entellan und einem Deckglas verschlossen.

2.2.9 Cresylviolett-färbung

Prinzip:

Cresylviolett gehört zu den Oxazin-Farbstoffen und wird besonders zur Kernfärbung und zur Darstellung von Nissl-Körperchen verwendet. Damit werden Kerne dunkelblau und Bindegewebe blau gefärbt.

Durchführung:

Die Gefrierschnitte wurden aufgetaut und für 3 min in eine Cresylviolettlösung und anschließend für 3 min in 96%ige Ethanol/1%ige Eisessig-Lösung getaucht. Hiernach wurden diese für 4 min in ein 96%iges Ethanolbad und danach zweimal je 5 min in ein Xylolbad gestellt. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte mit Entellan verschlossen.

2.2.10 Peroxidasefärbung**Prinzip:**

Bei den immunocytochemischen Färbungen werden Antikörper gegen bestimmte Antigene eingesetzt. Die im Gewebe oder in den Zellen lokalisierten Antigene werden sichtbar gemacht, indem der Antikörper durch weitere Bindungen markiert wird. Hierzu werden sekundäre Antikörper eingesetzt, die sich an den ersten Antikörper binden und gleichzeitig an ein Reportermolekül gekoppelt sind. Dieses ist ein Enzym, welches eine Farbstoffreaktion katalysiert (hier Alkalische Phosphatase). Um die Sensitivität der Detektion zu steigern, wird hier ein sekundärer Antikörper verwendet, der an Biotin gekoppelt ist. Biotin besitzt eine hohe Bindungsaffinität für Avidin, welches wiederum an die Alkalische Phosphatase gekoppelt ist.

Durchführung:

Die aufgetauten Gefrierschnitte wurden für 5 min in 1X PBS gewaschen. Zum Inaktivieren der endogenen Peroxidasen wurden die Gefrierschnitte in einer Mischung aus 250 ml Methanol (ROTH) und 5ml 30%igem H_2O_2 für 15 min bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde 5 min in H_2O und danach ebenso lange in 1X PBS gewaschen. Die unerwünschten Antikörperbindungsstellen wurden durch 30minütiges Inkubieren in 1%igem NGS in PBST geblockt. Der 1. Antikörper wurde in 1%igem NGS in PBST 1:200 verdünnt und auf den Objektträger über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gefrierschnitte zweimal für je 5 min in PBS gewaschen.

Der 2. Antikörper wurde in 5%igem NGS in PBST im Verhältnis 1:200 verdünnt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde die Peroxidaselösung des Vectastain ABC Kit von Alexis vorbereitet. Dazu wurde 1 Tropfen der Lösung A und 1 Tropfen der Lösung B in 5ml PBS gelöst und für

mindestens 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nachdem die Gewebeschnitte 2 x 5 min in PBS gewaschen worden waren, wurden sie 90 min in der ABC-Lösung inkubiert. Zur Vorbereitung der Färbelösung wurde eine DAB Tablette (3,3'-Diaminobenzidine) und eine Ure-Hydrogen-Peroxid Tablette (bei Sigma Fast im *DAB Tablet Set* enthalten) in 5ml H₂O gelöst und die Lösung dann filtriert. Die ABC-Lösung wurde durch zweimaliges Waschen in PBS entfernt und die Objektträger danach in eine 0,1M Tris Lösung (pH7,4) überführt.

Das DAB wurde auf einen Testschnitt aufgetragen und mit gestarteter Uhr wurde die sich entwickelnde Farbreaktion unter dem Mikroskop beobachtet, um den Zeitpunkt des optimalen Verhältnisses zwischen Signal und Artefakt bestimmen zu können. Die hierbei ermittelte Inkubationszeit wurde bei den restlichen Schnitten angewendet. Bei ausreichender Färbung wurde die Reaktion durch Spülen in Wasser beendet. Zum Schluß wurden die Objektträger getrocknet und mit Entellan verschlossen.

2.2.11 Analyse der Schnitte

Die Schnitte wurden mit Hilfe des Atlas *Chemoarchitektonic atlas of the developing mouse brain* von David M. Jacobowitz/Louise C. Abbot analysiert und unter dem Zeiss Mikroskop *Axiophot* fotografiert.

3. Ergebnisse

In der Einleitung wurde bereits die entscheidende Rolle von Nkx6.1 für die Spezifizierung der neuralen Vorläuferzellen zu Motoneuronen dargestellt. Da es Hinweise darauf gab, daß Nkx6.1 auch in Neuronen des postmitotischen Hirnstamms exprimiert wird, stellte sich nun die Frage, welche Funktion es hierbei einnehmen könnte. Denn seine aus dem Rückenmark bekannten Funktionen sind in diesen späten postmitotischen Neuronen bereits abgeschlossen. Möglicherweise hatte Nkx6.1 hier neue Aufgaben erhalten. Um mögliche Funktionen und Interaktionspartner von Nkx6.1 identifizieren zu können, wurde diese detaillierte Expressionsanalyse durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden *in situ* Hybridisierungen mit Digoxigenin (DIG) markierten Sonden bei verschiedenen embryonalen Stadien, in coronaler Schnittebene durchgeführt. Die benachbarten Schnitte wurden mit Cresylviolett gefärbt, um die Kerngebiete besser identifizieren zu können.

Da Nkx6.1-Expression auch in Regionen zu finden war, die in sehr enger Lagebeziehung zu anderen Hirnregionen stehen, war in einigen Fällen die Cresylviolett-färbung nicht ausreichend, um zuverlässige Aussagen treffen zu können. Daher wurden in diesen Fällen auf weiteren benachbarten Schnitten Tyrosinhydroxylase-Antikörperfärbungen durchgeführt, um diese Nkx6.1 positiven Kerngebiete spezifischen funktionellen Systemen des ZNS zuzuordnen.

Im folgenden werden die Nkx6.1 exprimierenden Regionen nach funktionellen Systemen geordnet dargestellt. Zuerst wird hier die Nkx6.1-Expression in den somatomotorischen, branchiomotorischen und viszeromotorischen Kernen beschrieben. Anschließend wird die Expression in den serotonergen und Tyrosinhydroxylase positiven Zellgruppen untersucht. Danach folgt die Darstellung der Nkx6.1-Expression in der Formatio reticularis und den damit assoziierten Regionen sowie den vestibulären Kernen. Der letzte Abschnitt zeigt die Expression im Nervus opticus.

3.1 Die motorischen Kerne

11 Die generelle somatomotorische und branchiomotorische Säule

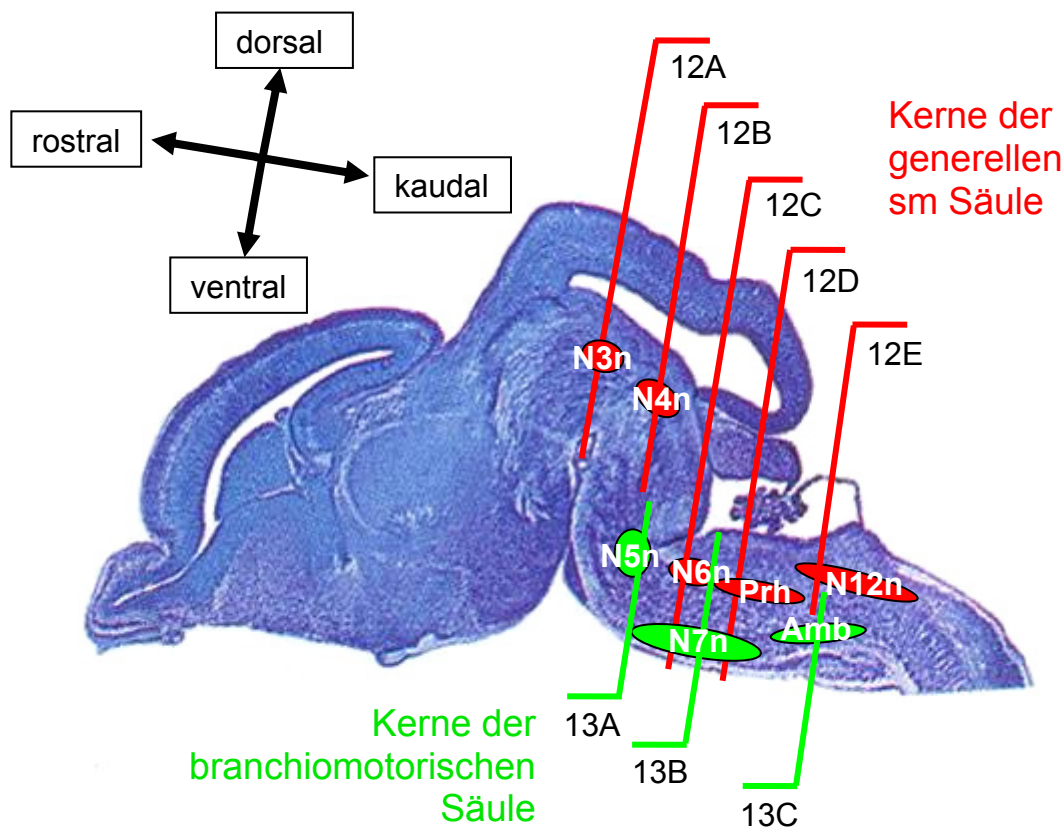


Abbildung 11: Die Ebenen 12A-E und 13A-C zeigen zur Orientierung die Schnittführung, wie sie sich bei den folgenden Abbildungen findet. Die Kerne der generellen somatomotorischen Säule (sm) sind **rot**, die der branchiomotorischen (motorische Kiemenbogennerve) **grün**. Dargestellt sind die rostrokaudalen Positionen folgender Kerne: Nucleus n. oculomotorii (N3n), Nucleus n. trochlearis (N4n), Nucleus n. abducentis (N6n), Nucleus prepositus Hypoglossus (Prh), Nucleus n. hypoglossi (N12n), Nucleus motorius n. trigemini (N5n), Nucleus n. facialis (N7n) und des Nucleus ambiguus (Amb). Die Kerne der parasympathischen viszeromotorischen Säule sind nicht dargestellt.

Das Diagramm links oben soll dem Verständnis der Verwendung rostrokaudaler und dorso-ventraler Positionsangaben dienen. Die Darstellung zeigt einen modifizierten, paramedialen, cresylviolett gefärbten Schnitt durch das Gehirn eines 15 Tage alten Mausembryos. Aus: Jacobowitz, D. M. und Abbott, L. C. (1997).

3.1.1 Die Kerne der generellen somatomotorischen Säule

Nkx6.1-Expression konnte in den Kernen der generellen somatomotorischen (sm) Säule nachgewiesen werden. Zu dieser Säule werden der Nucleus n. oculomotorii (N3n), der Nucleus n. trochlearis (N4n), der Nucleus n. abducentis (N6n), und der Nucleus n. hypoglossi (N12n) gezählt. Auch der Nucleus prepositus Hypoglossus (Prh) wird an dieser Stelle aufgeführt, da er wie die anderen Kerne dieser Säule, nahe der Mittellinie zu finden ist. Sowohl der N3n als auch der N4n zeigen vom 12,5 Embryonaltag (E12,5) bis 3 Tage postnatal (PN) eine deutliche Nkx6.1

Expression (Abb.12A+B). Der Prh (Abb.12D) exprimiert Nkx6.1 nur bis zum 15. Embryonaltag (E15) und in den Hirnnervenkernen N6n und N12n findet sich zum Zeitpunkt von E15 nur noch eine schwache und bei postnatal kaum noch Nkx6.1-Expression (Abb.12C+E).

12A Nucleus n. oculomotorii (N3n)

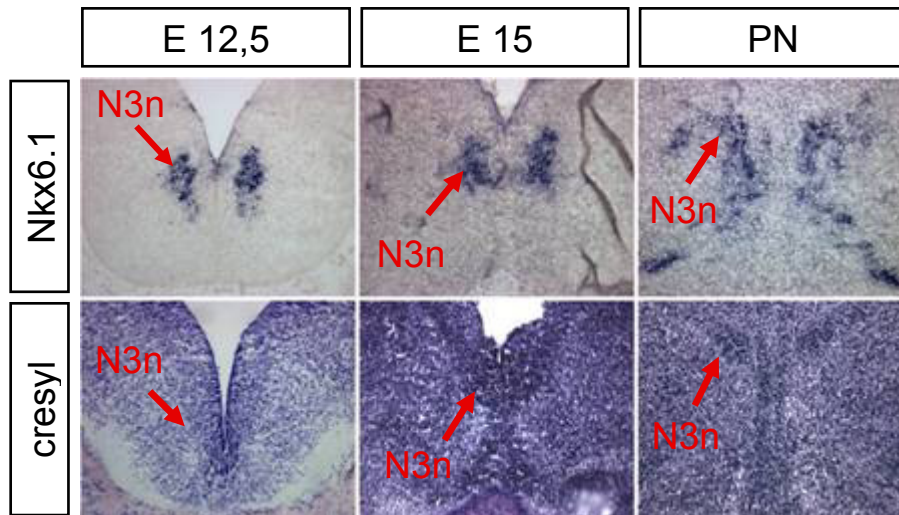
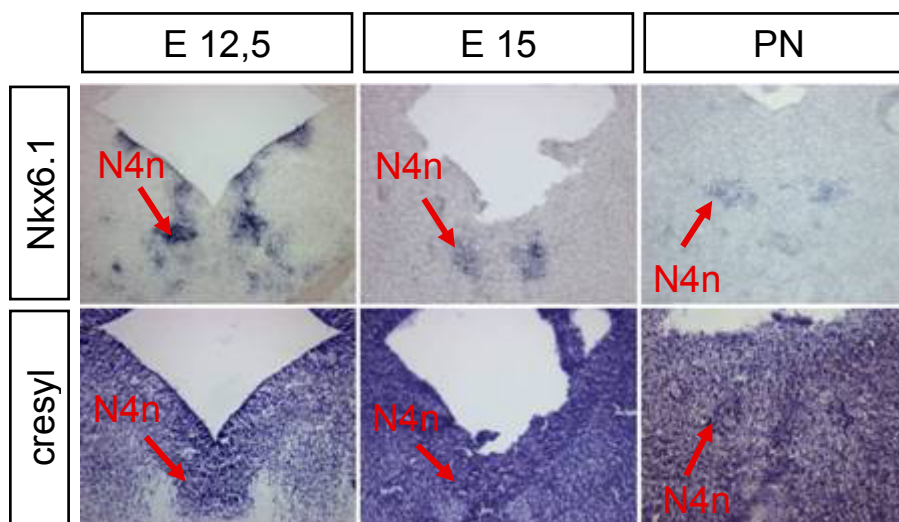


Abbildung 12A-E:

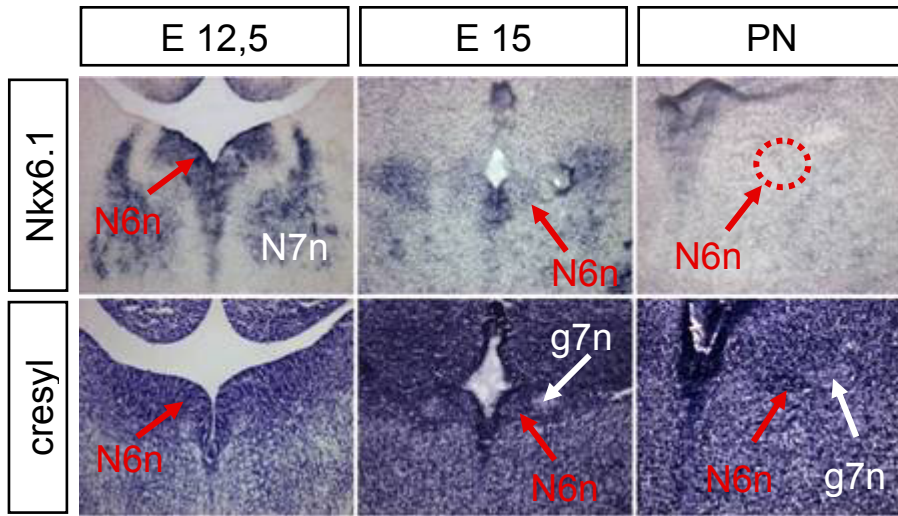
Dargestellt sind jeweils in der oberen Reihe *in situ* Hybridisierungen mit einer Nkx6.1 RNS Sonde (Nkx6.1) und in der unteren Reihe, dazu benachbarte, mit cresylviolett (cresyl) gefärbte Schnitte. Diese wurden bei 10facher Vergrößerung am

12B Nucleus n. trochlearis (N4n)



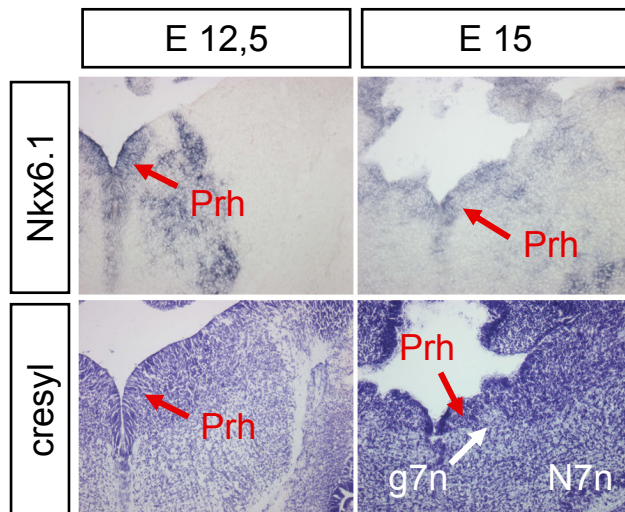
12,5. (E12,5) und 15. (E15) Embryonaltag, sowie drei Tage postnatal (PN) aufgenommen. **Die roten Pfeile** zeigen die Position der entsprechenden Kerne. Sowohl der Nucleus n. oculomotorii (N3n) als auch der Nucleus n. trochlearis (N4n) zeigen bei E12,5 bis PN eine deutliche Nkx6.1 Expression. Die

12C Nucleus n. abducentis (N6n)



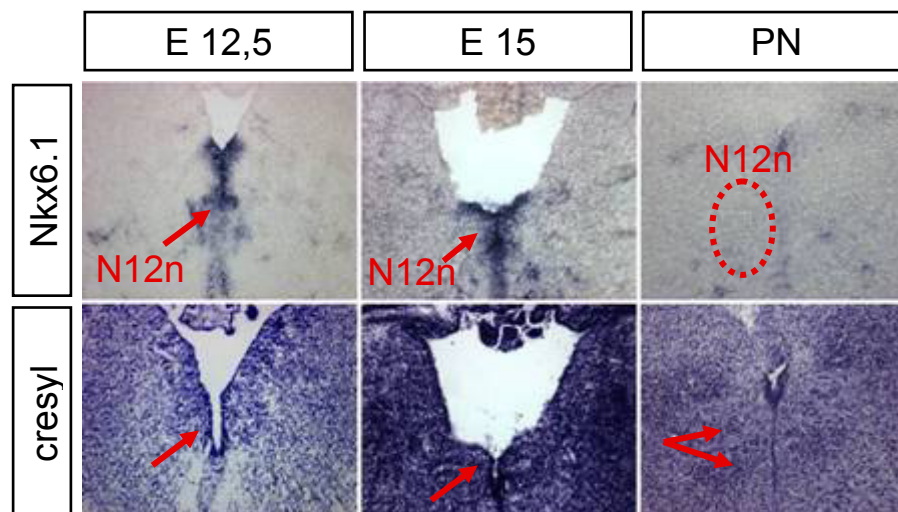
Hirnnervenkerne
Nucleus n.
abducentis
(N6n), Nucleus
prepositus
Hypoglossus
(Prh) und
Nucleus n.
hypoglossi
(N12n) zeigen
zum Zeitpunkt
von E15 nur noch
eine schwache
Nkx6.1-
Expression.
Rot eingekreist
sind postnatal
(PN) die
Regionen, an
denen sich N6n

12D Nucleus prepositus Hypoglossus (Prh)



bzw. N12n
befinden, wobei
hier allerdings
kaum noch
Nkx6.1-
Expression
erkennbar ist. Bei
Abb. 2C und 2D
sind der Nucleus
n. facialis (N7n)
und das genu
internum n.
facialis (g7n)
angeschnitten
(**weiße Pfeile**).

12E Nucleus n. hypoglossi (N12n)



3.1.2 Die Kerne der branchiomotorischen Säule

Bei den branchiomotorischen Kernen handelt es sich um motorische Kerngebiete, die Muskeln innervieren, welche entwicklungsgeschichtlich von der Kiemenbogenmuskulatur abstammen. Zu den Hirnnervenkernen der branchiomotorischen Säule gehören der Nucleus motorius n. trigemini (N5n), der Nucleus n. facialis (N7n) und der Nucleus spinalis n. accessorii, der hier nicht untersucht wurde. Der Nucleus ambiguus (Amb) wird an dieser Stelle ebenfalls dazugezählt, obwohl er eine Sonderstellung einnimmt, da es sich bei ihm bereits um eine gemischte Zellgruppe handelt, die aus branchiomotorischen Neuronen und präganglionären parasymphatischen Neuronen besteht (Purves 2001).

Alle diese Kerne zeigen eine deutliche Nkx6.1-Expression im Zeitraum zwischen E12,5 und PN (Abb. 13A,B,C).

13A Nucleus motorius n. trigemini (N5n)

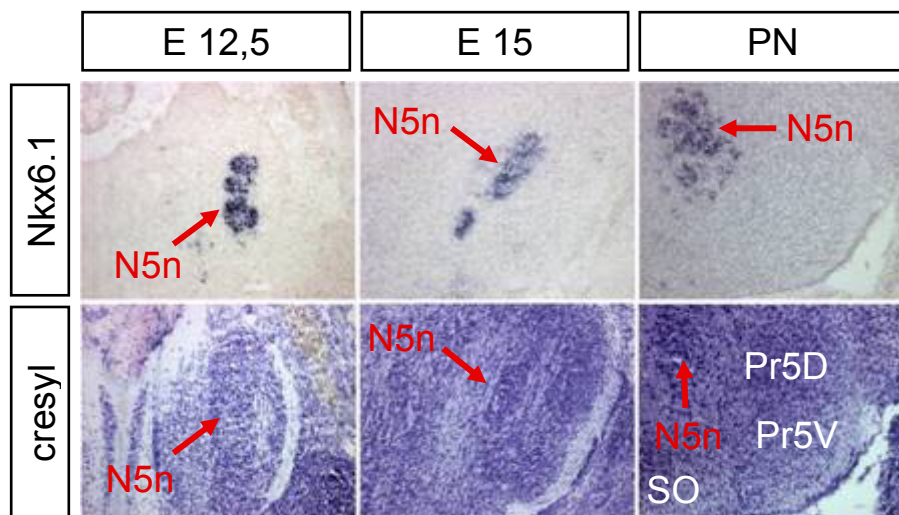
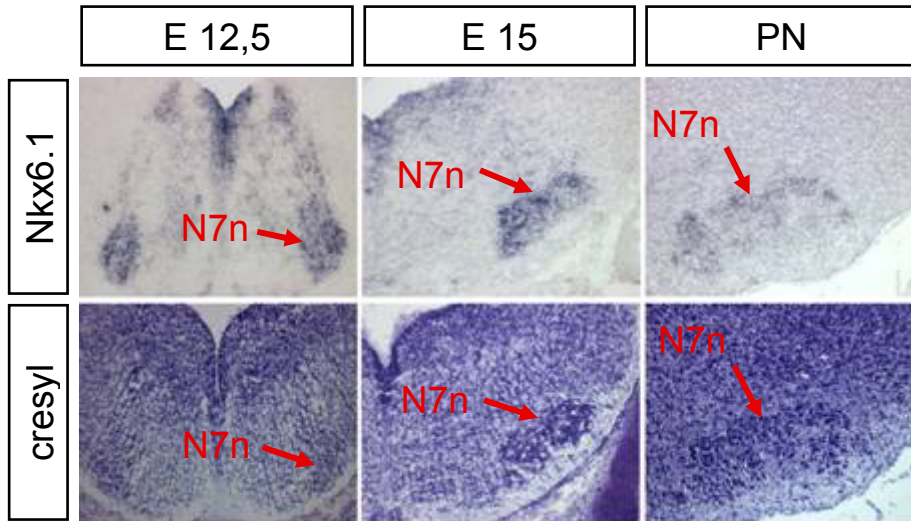


Abbildung 13A-C

Dargestellt sind in der oberen Reihe *in-situ*

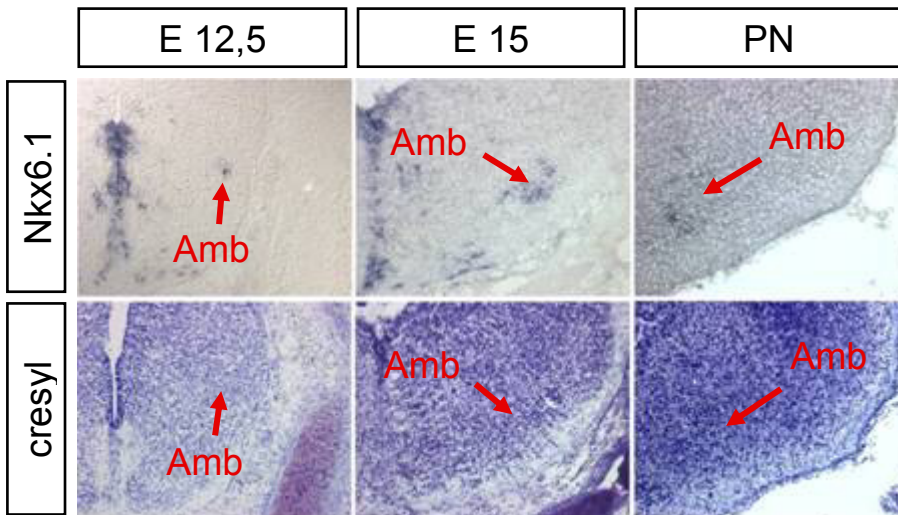
Hybridisierungen mit einer Nkx6.1 RNS Sonde (Nkx6.1) und in der unteren Reihe der dazu benachbarte mit Cresylviolett (cresyl) gefärbte Schnitt. Die Schnitte wurden bei 10facher Vergrößerung am 12,5. (E12,5) und 15. (E15) Embryonaltag,

13B Nucleus n. facialis (N7n)



sowie drei Tage postnatal (PN) aufgenommen. Der Nucleus motorius n. trigemini (N5n), der Nucleus n. facialis und der Nucleus ambiguus (Amb) zeigen zu den Zeitpunkten E12,5, E15 und PN eine deutliche Nkx6.1 Expression. In Abbildung 3A sind im Stadium PN zusätzlich der Nucleus principalis

13C Nucleus ambiguus (Amb)



nervi trigemini dorsomedial (Pr5DM), der Nucleus principalis nervi trigemini ventrolateral (Pr5VL) und die Oliva superior (SO) zu sehen (**weiße Beschriftung**)

3.1.3 Die generelle viszeromotorische Säule

Zu dieser Säule gehören der Edinger-Westphal-Kern, der dorsale motorische Vagus Kern (N10n), der Nucleus salivatorius superior und inferior sowie der vm Anteil des Ambiguuskerns (präganglionärer parasymphatischer Anteil), der schon oben als gemischter Kern beschrieben wurde und dessen einzelne Anteile mit der gewählten Methodik nicht unterscheidbar sind.

Der Edinger-Westphal-Kern ist erst nach der Geburt als solcher abgrenzbar. In den *in situ* Hybridisierungen findet sich zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Nkx6.1-Expression innerhalb des „oculomotorischen Komplexes“, von dem sich der Edinger-Westphal-Kern nicht eindeutig abgrenzen läßt (Abb.12A). Somit ist nicht zu ermitteln, ob dieser Kern Nkx6.1 exprimiert.

Die Nuclei salivatorii superior und inferior werden ebenfalls erst nach der Geburt erkennbar. In den *flat mounts* (Muller M., Jabs N. et al. 2003) läßt sich aber zeigen, daß ab E11,5 die Vorläuferzellen des N10n und auch diejenigen des Nucleus salivatorius superior und inferior Nkx6.1 exprimieren (Abb.14).

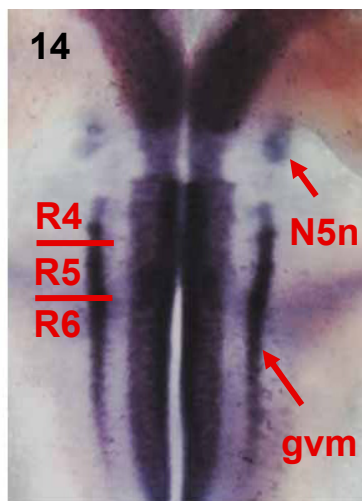


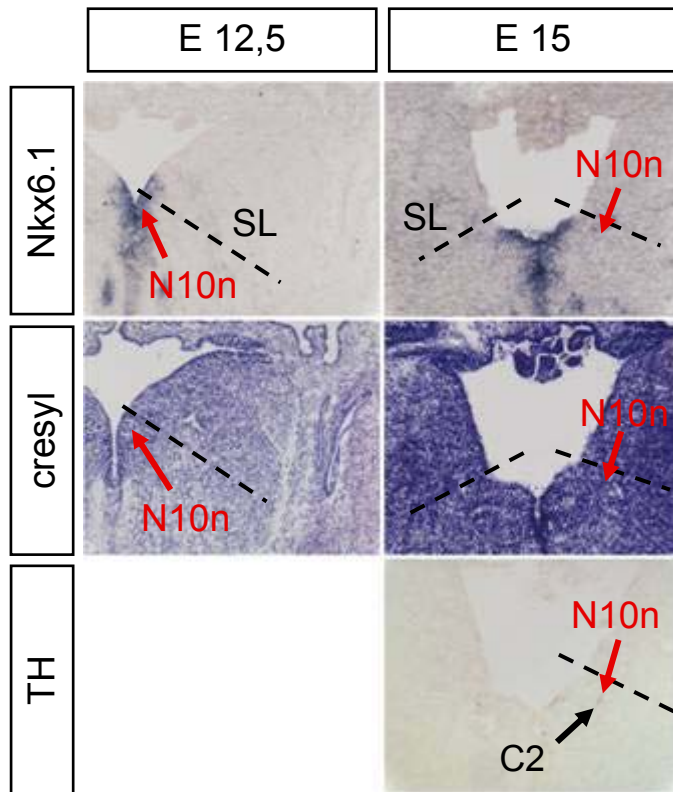
Abbildung 14:

zeigt den *flat mount* eines 11,5 Tage alten embryonalen Hinterhirns, der mit einer Nkx6.1 RNS Sonde hybridisiert wurde. Der Hirnstamm ist hier von anterior nach posterior eröffnet. Der dorsale Teil des Hinterhirns liegt sowohl links als auch rechts, der ventrale Bereich in der Mitte. Die beiden paramedianen Nkx6.1 exprimierenden Streifen stellen frühe differenzierte bzw. postmitotische Neurone der generellen viszeromotorischen (gvm) Säulen dar. Aus diesen differenzieren sich später die Edinger-Westphal-Kerne, der Nucleus dorsalis n. vagi, die Nuclei salivatorius superior und inferior. Bei R4-R6 handelt es sich um die Rhombomergrenzen. Ebenfalls zu erkennen sind die Neurone des späteren Nucleus motorius n. trigemini. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Myriam Müller.

Da solche frühen Stadien dieser Kerne im Atlas nicht verzeichnet sind, ist keine Aussage darüber möglich, ob diese vm Neurone nach E11,5 weiterhin Nkx6.1 exprimieren. So wären gemeinsame Antikörperfärbungen mit Nkx6.1 und Phox2b notwendig, um die Positionen dieser Kerne erkennen zu können.

Der motorische Vagus-Kern (N10n) exprimiert zum Zeitpunkt E12,5 Nkx6.1 (Abb. 15). Bei E15 läßt sich durch Vergleich mit der Thyrosinhydroxylase-Färbung (TH) vermuten, daß sich N10n dorsal bzw. lateral der C2-Zellgruppe befindet. Zu diesem Zeitpunkt scheint N10n nicht mehr Nkx6.1 zu exprimieren. Um jedoch eine zuverlässigere Aussage treffen zu können, wären Antikörperfärbungen gegen Nkx6.1 und Thyrosinhydroxylase auf einem Schnitt notwendig.

15 Nucleus dorsalis n. vagi (N10n)

**Abbildung 15:**

Dargestellt sind in der ersten Reihe *in situ* Hybridisierungen mit einer Nkx6.1 RNS Sonde (Nkx6.1), in der zweiten Reihe der dazu benachbarte cresylviolett (cresyl) gefärbte Schnitt und in der dritten Reihe ein weiterer benachbarter Schnitt in Tyrosinhydroxylase-Färbung (TH). Die Schnitte wurden bei 10facher Vergrößerung am 12,5. (E12,5) und 15. (E15) Embryonaltag aufgenommen. Die **roten Pfeile** zeigen die Position des motorischen Vaguskernelns (N10) und der **schwarze Pfeil** zeigt die adrenerge C2 Zellgruppe. Der *Sulcus limitans* (SL) wird durch die **schwarze gestrichelte Linie** repräsentiert.

Zum Zeitpunkt E12,5 liegt N10n im Nkx6.1 positiven Neuroepithel. Bei E15 kann man durch Vergleich der Position des *Sulcus limitans* und der C2 Zellgruppe auf den benachbarten Schnitten, die Lokalisation von N10n bestimmen. Es scheint, daß N10n zu diesem Zeitpunkt kein Nkx6.1 exprimiert.

3.2 Das serotonerge System (5HT positive Kerne)

Das serotonerge System lässt sich in zwei Anteile gliedern. Zu dem rostralen/pontinen Anteil zählen hier die medianen (MR), paramedianen (PMR) und die dorsalen (DR) Raphe Kerne. Zu dem kaudalen/medullären Anteil zählen die Raphe Magnus (RM), Raphe pallidus (RP), Raphe oralis (RO) und die B3 Kerngruppen.

Nkx6.1-Expression findet sich vor allem im kaudalen Raphe System. In den rostralen Raphe Kernen ist Nkx6.1 ausschließlich zum Zeitpunkt E12.5 in der *paramedianen Raphe* (PMR) exprimiert.

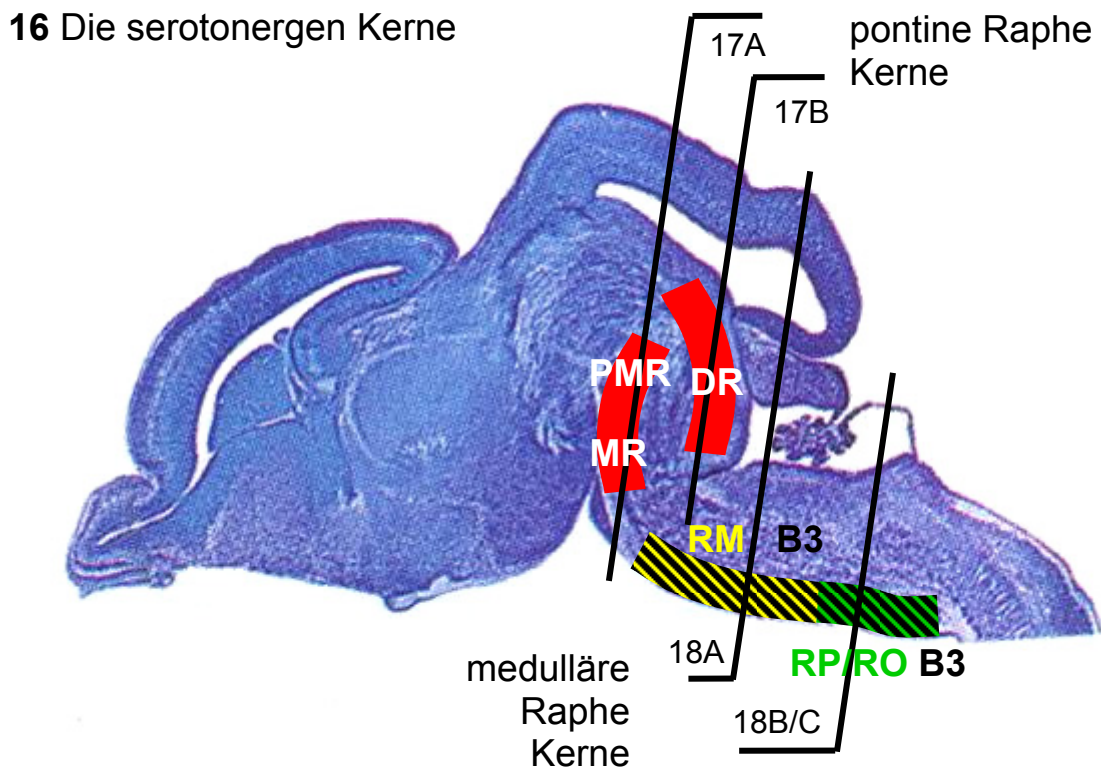


Abbildung 16: Gezeigt sind zur Übersicht die Schnittebenen (17A,B und 18A,B,C, aus denen die folgenden Abbildungen der Raphe Kerne stammen) auf einem cresylviolett gefärbten, paramedianen Schnitt durch das Gehirn eines E15 Mausembryos. Die rostralen/pontinen Raphe Kerne sind hier mit mediane Raphe (MR), paramediane Raphe (PMR) und dorsale Raphe (DR) bezeichnet worden (allesamt **rot**). Zu den kaudalen/medullären Kernen gehören Raphe magnus (RM) und B3 Zellgruppen, die auf derselben rostro-kaudalen Höhe liegen und deshalb **schwarz-gelb schraffiert** dargestellt sind. Die RP/RO-Zellgruppen und B3 liegen ebenfalls auf derselben Höhe und sind deshalb **schwarz-grün schraffiert** dargestellt. Modifiziert nach: Jacobowitz, D. M. und Abbott, L. C. (1997).

3.2.1 Der rostrale Anteil

Die B4- und B9-Zellgruppen, zu denen die pontinen Raphe Kerne, die mediane Raphe und die dorsalen Raphe Kerne gehören, projizieren zum oberen Hirnstamm, Hypothalamus, Thalamus und zum zerebralen Kortex.

17A mediane und paramediane Raphe Kerne (MR/PMR)

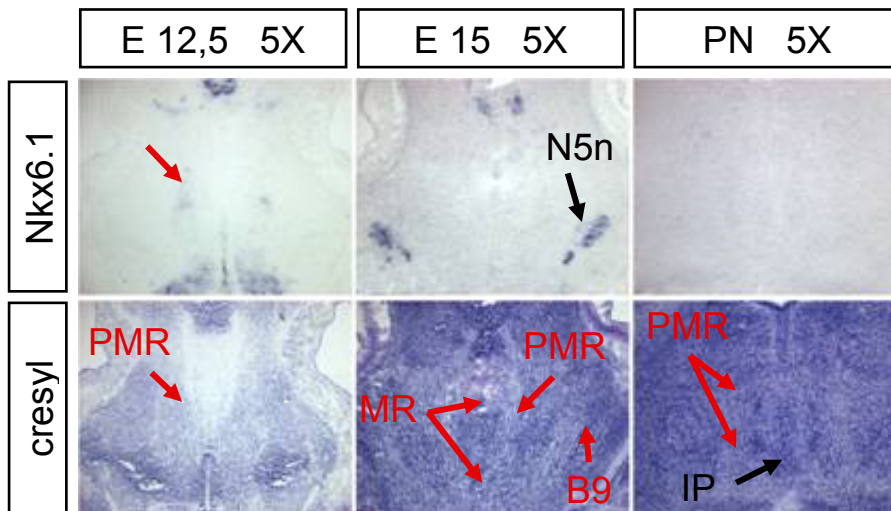
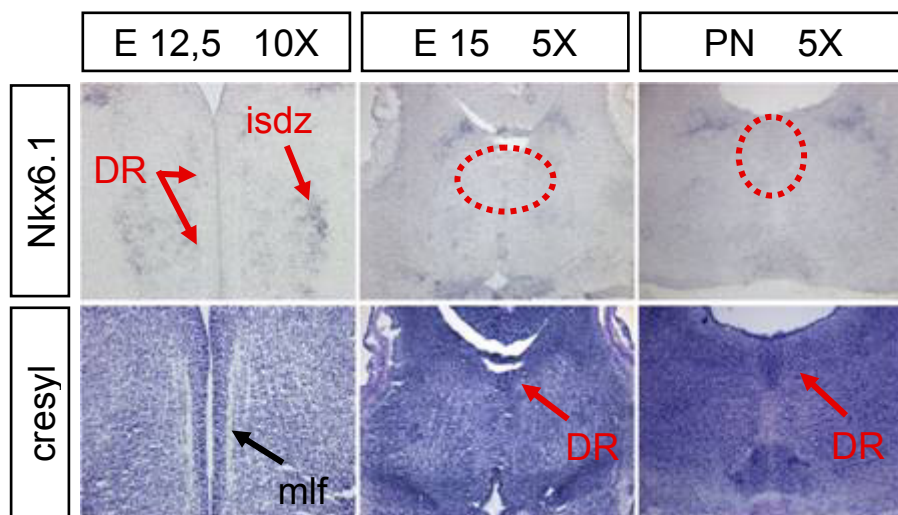


Abbildung 17A+B:

Dargestellt sind in der ersten Reihe *in situ* Hybridisierungen mit einer Nkx6.1 RNS Sonde (Nkx6.1) und in der zweiten Reihe der dazu benachbarte cresylviolett (cresyl) gefärbte Schnitt. Die Schnitte wurden am 12.5. (E12,5) 15. (E15) Embryonaltag

17B dorsale Raphe (DR)



und drei Tage postnatal (PN) aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten in 5facher (5X) und in 10facher Vergrößerung (10X). Die roten Pfeile zeigen die mediane Raphe (MR), paramediane Raphe (PMR), die B9 Zellgruppe (B9), die dorsale Raphe (DR) und die Isthmus Differenzierungszone (isdz).

Es findet sich lediglich bei E12,5 eine schwache Nkx6.1-Expression im Bereich der PMR. Bei E15 und PN exprimiert keine dieser Regionen Nkx6.1. Zum Zeitpunkt E12,5 zeigen jedoch Bereiche innerhalb der isdz Nkx6.1-Expression. Die DR befindet sich aber medial dieser Nkx6.1-Expression. Bei E15 und PN findet sich hier keine Expression (**rot eingekreist**). Die **schwarzen Pfeile** zeigen den Fasciculus longitudinalis medialis (mlf) und den Nucleus motorius n. trigemini (N5n) und Nucleus interpeduncularis (IP)

3.2.2 Der kaudale Anteil

Die Neurone, die zu den B1-3 Zellgruppen gehören, entsprechen den Raphe magnus, Raphe pallidus und Raphe oralis Kernen. Sie projizieren in den unteren Hirnstamm und in das Rückenmark (Purves 2001).

18A Raphe magnus (RM)

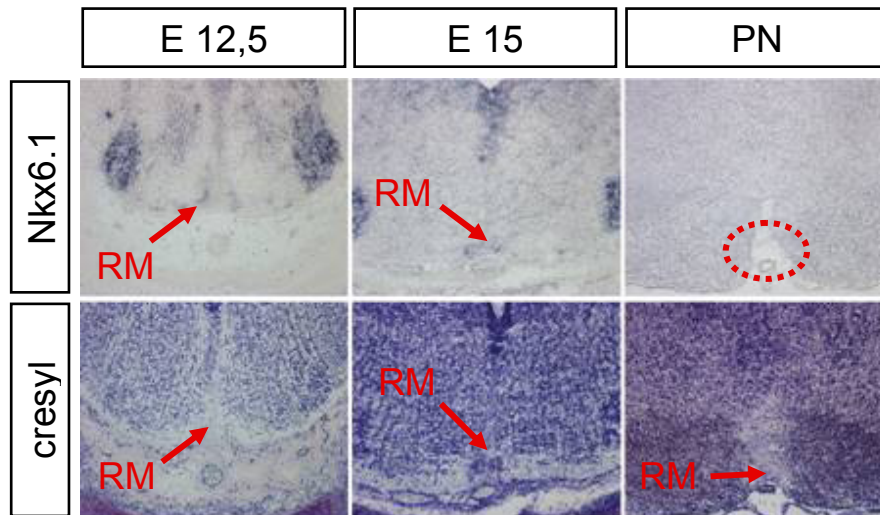
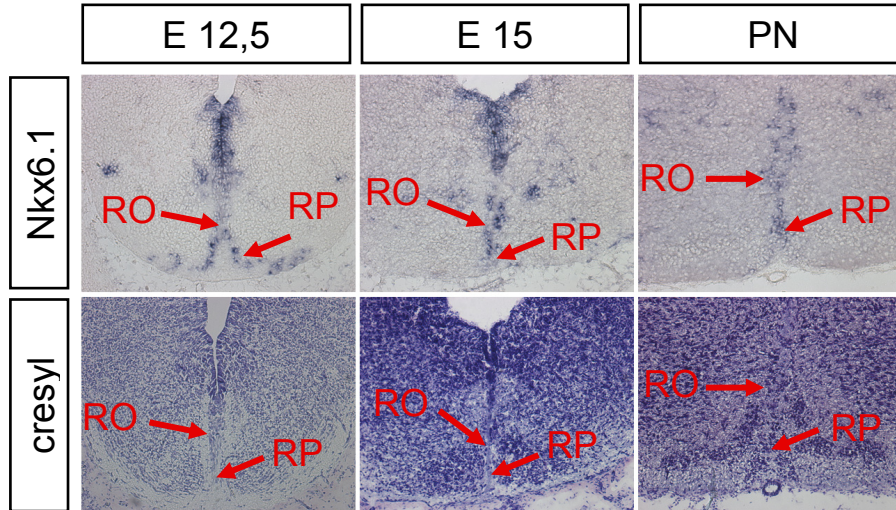


Abbildung 18A-C:

Dargestellt sind die kaudalen Raphe Kerne. Die erste Reihe zeigt bei 10facher Vergrößerung *in situ* Hybridisierungen mit einer Nkx6.1 RNS Sonde (Nkx6.1) und den dazu benachbarten cresylviolett cresylgefärbten Schnitt in der zweiten Reihe. In **18C** ist zusätzlich

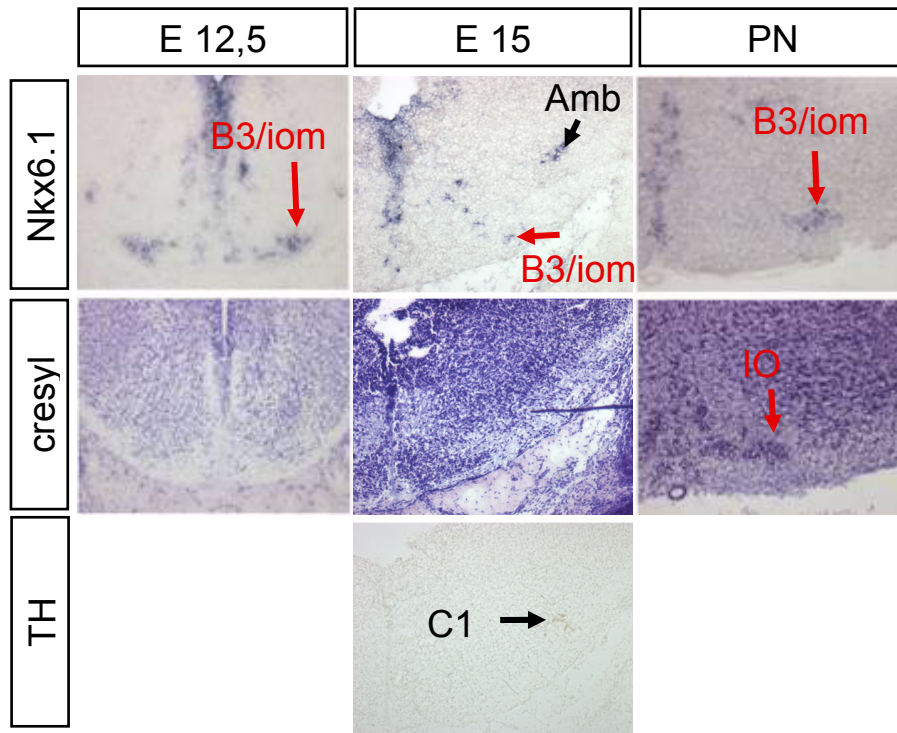
18B Raphe oralis (RO) und Raphe pallidus (RP)



eine Tyrosinhydroxylase-färbung (TH) eingefügt, die mit Hilfe der C1 Zellgruppe (**schwarzer Pfeil**) die korrekte rostro-kaudale Positionierung beweist. Die Schnitte zeigen den 12,5. (E12,5) und 15. (E15) Embryonaltag, sowie drei Tage postnatal (PN). Die **roten Pfeile** zeigen in **18A** die Raphe magnus Kerne

(RM). Alle Stadien, mit Ausnahme der postnatalen (PN), exprimieren hier Nkx6.1. Rote Pfeile zeigen in **18B** Raphe pallidus und Raphe oralis. Hier ist über alle Altersstadien Expression zu erkennen. In **18C** zeigen die roten Pfeile die serotonerge B3-Zellgruppe (B3) bzw. den „inferioren migratorischen Streifen“ (iom) und die inferiore Olive (IO). Die serotonerge B3-Zellgruppe bzw. der inferiore migratorische Streifen zeigen zu allen Stadien Nkx6.1-Expression. Außerdem angeschnitten (**schwarze Pfeile**) sind Nucleus Ambiguus (Amb) und die C1 Zellgruppe (C1).

18C B3 Zellgruppe (B3) und „inferiorer migratorischer Streifen (iom)“



Offensichtlich wird Nkx6.1 hauptsächlich in den kaudalen Raphe Kernen exprimiert. Hier kann Nkx6.1-Expression zwischen E12.5 und drei Tage postnatal nachgewiesen werden (Abb.18A-C). Eine Ausnahme stellt hier der Raphe magnus Kern dar, der postnatal kein Nkx6.1 exprimiert.

Im Gegensatz zu den kaudalen Raphe Kernen zeigen die rostralen serotonergen Zellgruppen (DR und MR) keine Nkx6.1-Expression (Abb.17A und B). Lediglich zum Zeitpunkt E12.5 ist ein Teil der paramedianen Raphe (PMR) Nkx6.1 positiv (Abb.17A).

Die Expression im inferioren migratorischen Streifen (B3/iom) zum Zeitpunkt E12.5 und E15 könnte auch von nicht serotonergen Neuronen in dieser Region stammen. Denn es läßt sich nicht ausschließen, daß Vorläuferzellen der späteren *inferioren Olive* Nkx6.1 exprimieren. Jedoch erkennt man in den postnatalen Schnitten, daß sich die Nkx6.1-Expression lateral der *inferioren Olive* befindet. Somit ist im Kontext mit den drei anderen Nkx6.1 exprimierenden, serotonergen Kernen am wahrscheinlichsten, daß auch hier die Nkx6.1-Expression aus den serotonergen Zellen der B3 Zellgruppe stammt.

3.3 Die Tyrosinhydroxylase (TH) positiven Zellgruppen

Um weitere Nkx6.1 exprimierende Regionen identifizieren zu können, wurde zusätzlich die Tyrosinhydroxylase-Färbung (TH) verwendet. Die Tyrosinhydroxylase ist das erste Enzym der Katecholaminbiosynthese und entsprechend lassen sich damit Dopa-, Dopamin-, Noradrenalin- und Adrenalinproduzierende Zellgruppen nachweisen. Im Anschluß werden nun nacheinander die noradrenergen, adrenergen, dopaminergen und cholinergen Zellgruppen daraufhin untersucht, ob Nkx6.1 in diesen Regionen exprimiert wird.

3.3.1 Die noradrenergen Zellgruppen (A1/2 und A5/7 Zellgruppen)

Noradrenerge Neurone finden sich in einer ventralen und in einer dorsalen Säule. Die ventrale Säule enthält Neurone, die mit dem Ambiguuskern assoziiert sind (A1 Gruppe). Auf derselben Höhe befindet sich auch die adrenerge C1 Säule, die hier als Orientierungshilfe dient.

19 A1 und C1 Zellgruppe

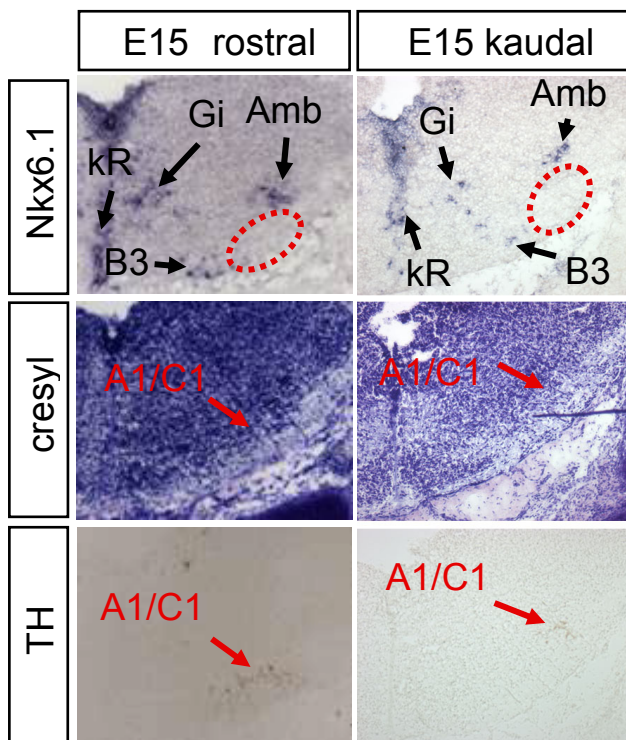


Abbildung 19:

Dargestellt ist die rostrale und kaudale Medulla am 15. Embryonaltag (E15). Die erste Reihe zeigt bei 10facher Vergrößerung *in situ* Hybridisierungen mit einer Nkx6.1 RNS Sonde (Nkx6.1) in der zweiten Reihe den dazu benachbarten cresylviolett (cresyl) gefärbten Schnitt und in der dritten die Tyrosinhydroxylase Färbung (TH). Die **roten Pfeile** zeigen die A1/C1 Zellgruppe. Es ist zu erkennen, daß sowohl auf rostraler als auch auf kaudaler Höhe in den A1/C1 Zellgruppen keine Nkx6.1-Expression zu finden ist (**rot eingekreist**). Bei den Nkx6.1 exprimierenden Regionen (**schwarze Pfeile**) handelt es sich um den Nucleus Ambiguus (Amb), die B3-Zellgruppe (B3) (ventral liegend) und Neurone innerhalb des Nucleus gigantocellularis (Gi) (paramedial liegend) sowie die kaudalen Raphe Kerne (kR).

Die A1/C1 Säule exprimiert kein Nkx6.1 (Abb.19). Stattdessen handelt es sich bei den Nkx6.1 exprimierenden Regionen in diesem Abschnitt um den Ambiguuskern, die kaudalen Raphe Kerne, die B3-Zellgruppe und um den *Nucleus*

gigantozellularis (Gi). Auch drei Tage postnatal läßt sich in der A1/C1 Säule keine Expression feststellen (nicht gezeigt).

Ähnlich verhält es sich mit der A2-Zellgruppe. Auch diese exprimiert kein Nkx6.1. Denn man erkennt in Abb. 15 bei E15, daß die C2-Zellsäule kein Nkx6.1 exprimiert und da diese Zellsäule wiederum topographisch mit der A2 Säule korreliert, kann daraus gefolgert werden, daß auch die A2-Zellsäule kein Nkx6.1 exprimiert.

Die Zellgruppen A5 und A7 liegen in der ventrolateralen, pontinen Formatio Reticularis. Weder die A5 noch die A7 noradrenerge Zellgruppe exprimiert Nkx6.1 (nicht gezeigt). Zwar sind einige Anteile der Pons Nkx6.1 positiv, wie z.B. N5n

20 Locus caeruleus (LC) /A6

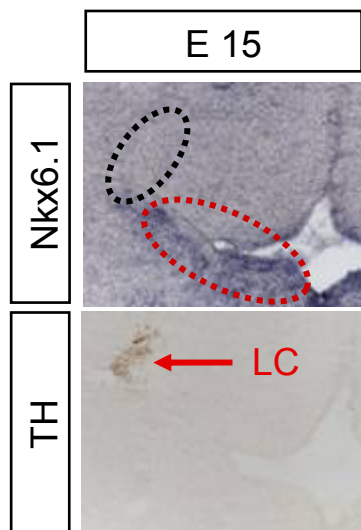


Abbildung 20:

Gezeigt ist der *Locus caeruleus* (LC) am 15. Embryonaltag (E15). Die obere Reihe zeigt bei 10facher Vergrößerung *in situ* Hybridisierungen mit einer Nkx6.1 RNS Sonde (Nkx6.1), in der unteren den dazu benachbarten Schnitt in Tyrosinhydroxylase Färbung (TH). Der rote Pfeil zeigt auf den LC. Es findet sich keine Nkx6.1-Expression im LC (schwarz eingekreist), sondern nur in dem medial und ventral davon liegenden Neuroepithel (rot eingekreist).

(Abb.13A) und Teile des pontinen reticulären Nucleus (Pr) (Abb.28), jedoch korreliert keine dieser Regionen mit noradrenergen Zellgruppen.

Die Zellgruppe A6 (Locus caeruleus) exprimiert kein Nkx6.1 (Abb.20).

3.3.2 Adrenerge Zellgruppen (C1-3 Zellgruppen)

Es sprechen zwei Beobachtungen gegen eine Expression von Nkx6.1 in den adrenergen Zellgruppen. Erstens korreliert die Nkx6.1-Expression nicht mit den anatomischen Grenzen der C3-Zellgruppe. Zweitens sind die C1- und C2-Zellgruppen, die ebenfalls zu diesem System gehören, Nkx6.1 negativ. Damit gibt es wahrscheinlich keine Nkx6.1-Expression in den adrenergen Zellgruppen. Um diese Frage jedoch definitiv zu klären, wäre eine Antikörperfärbung mit Nkx6.1-Antikörpern zusammen mit einer Antikörperfärbung gegen Tyrosinhydroxylase notwendig. In der konfokalen Mikroskopie wäre dann erkennbar, ob Nkx6.1 und Tyrosinhydroxylase innerhalb einer Zelle koexprimiert werden.

3.3.3 Die dopaminergen Neurone (A8-A17-Zellgruppen)

Die dopaminergen Zellgruppen des Mittelhirnes und Großhirnes wurden ursprünglich als rostrale Verlängerung des noradrenergen Systems verstanden, da man mit der Histofluoreszenz-Methode nicht zwischen dopaminergen und adrenergen Neuronen unterscheiden konnte. Dopaminerge Neurone befinden sich in der Substantia nigra compacta (SNC) in Form der A9-Zellgruppe sowie im angrenzenden retrorubalen Feld (RRf) in der A8 Zellgruppe und im ventralen tegmentalern Gebiet (VTA), in der sich die A10 Zellgruppe befindet. Die Substantia nigra enthält außerdem auch Eisen, was ein Merkmal des extrapyramidal-motorischen Systems ist.

21 Substantia nigra compacta (SNC) und nigrostriataler Faserzug (nsp) bei E15

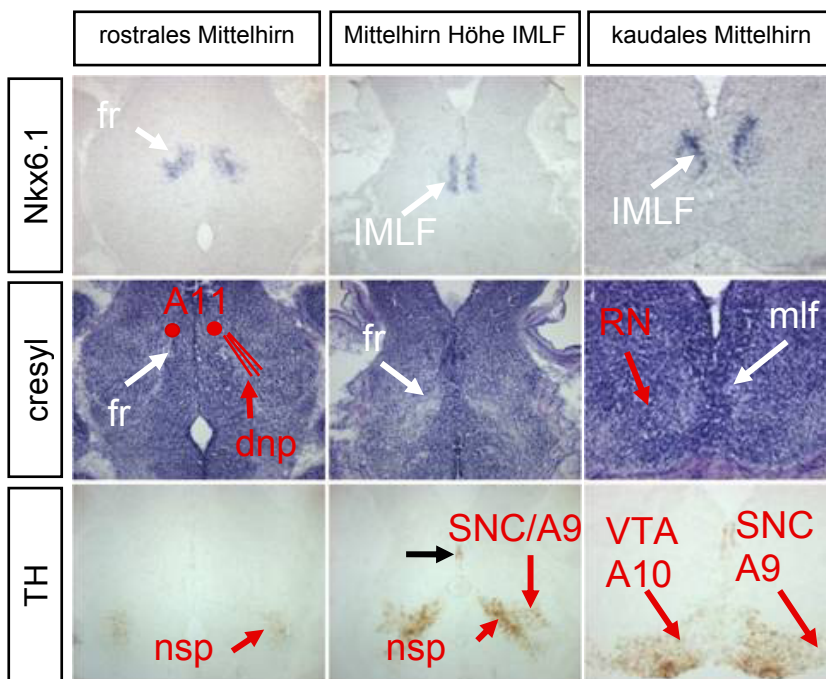


Abbildung 21:

Gezeigt ist das Mittelhirn im Bereich der Substantia nigra auf unterschiedlichen rostro-kaudalen Höhen am 15. Embryonaltag (E15). Die oberste Reihe zeigt *in situ* Hybridisierungen mit einer Nkx6.1 RNS Sonde (Nkx6.1), in der mittleren Reihe den dazu benachbarten cresylviolett (cresyl) gefärbten Schnitt und in der untersten Reihe die benachbarte Tyrosinhydroxylase (TH) Färbung. Das rostrale Mittelhirn und das Mittelhirn auf Höhe des IMLF wurden bei 5facher Vergrößerung aufgenommen, das kaudale Mittelhirn bei

10facher Vergrößerung. Die **roten Pfeile** zeigen den dorsalen noradrenergen Faserzug (dnp), die Substantia nigra compacta (SNC), den nigrostriatalen Faserzug (nsp) und den Nucleus ruber (RN). **Weißer Pfeil** zeigt den Fasciculus retroflexus (fr), den medialen longitudinalen Fasciculus (mlf) und den Komplex aus Nucleus interstitialis und medialem longitudinalen Fasciculus (IMLF).

Im rostralen Mittelhirn ist die A11-Zellgruppe und der dnp in der TH-Färbung nur schwach gefärbt (daher mit **roten Strichen** ergänzt). Mit Hilfe des nsp ist dennoch die korrekte rostro-kaudale Höhe dieses parallelen Schnittes erkennbar. Im Vergleich mit den Nkx6.1 Schnitten zeigt sich, daß weder die A11 Zellgruppe noch der dnp Nkx6.1 exprimieren. Auch auf Höhe des IMLF zeigt sich, daß die Nkx6.1-Expression weder mit dem nsp, der A9 Zellgruppe noch mit der SNC korreliert. Der **schwarze Pfeil** zeigt auf einen schmalen Streifen Tyrosinhydroxylase positiver Neurone, der sich bei dem benachbarten Schnitt zwischen den Kernen des IMLF projiziert und damit kein Nkx6.1 exprimiert. Im kaudalen Mittelhirn läßt sich erkennen, daß weder die dopaminergen Neurone der VTA/A10 Zellgruppe noch der kaudale Anteil der SNC/A9 Zellgruppe Nkx6.1 exprimieren. Auch im benachbarten RN findet sich keine Nkx6.1-Expression.

22 RRf und VTA/A10

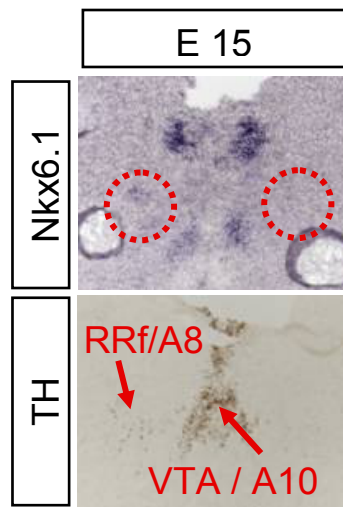


Abbildung 22:

Zu sehen ist das retrorubale Feld (RRf) und das ventrale tegmentale Gebiet (VTA/A10) am 15. Embryonaltag (E15). Das obere Bild zeigt eine *in situ* Hybridisierung mit einer Nkx6.1 RNS Sonde (Nkx6.1), das untere die benachbarte Tyrosinhydroxylase-Färbung (TH) in 10facher Vergrößerung aufgenommen.

Wie zu sehen ist, korreliert die Nkx6.1-Expression nicht mit den dopaminergen Neuronen der A8 und A10 Zellgruppe (rot eingekreist)

In den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra compacta (SNC), des nigrostriatalen Faserzugs (nsp), des dorsalen noradrengen Faserzugs (dnp) und in dem ventralen tegmentalen Gebiet (VTA) (Abb.21) sowie im retrorubalen Feld (RRf) (Abb.22) findet sich keine

Nkx6.1-Expression. Da sowohl die Substantia nigra als auch der Nucleus ruber kein Nkx6.1 exprimieren, liegt es nahe, daß Nkx6.1-Expression auch nicht mit eisenhaltigen Kerngebieten und damit nicht mit dem extrapyramidal-motorischen System in Verbindung steht.

23 Neuroepithel oberhalb des Chiasma opticum

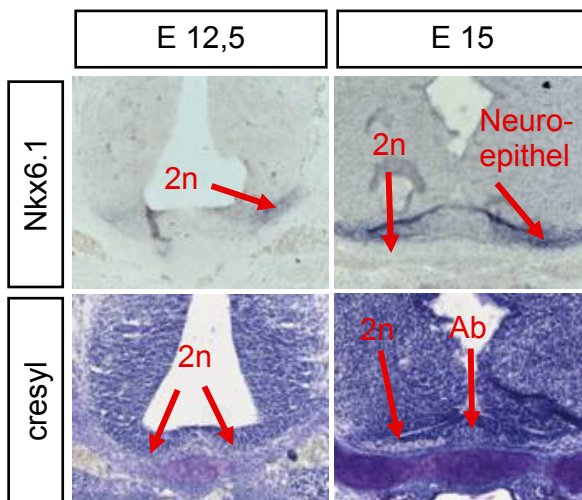


Abbildung 23:

Gezeigt ist das Neuroepithel oberhalb des Chiasma opticum am 12,5 und 15. Embryonaltag (E12,5)(E15). Die oberen Bilder zeigen *in situ* Hybridisierungen mit einer Nkx6.1 RNS Sonde (Nkx6.1), bei den unteren handelt es sich um die benachbarten Cresylviolett-färbungen in 10facher Vergrößerung aufgenommen (cresyl).

Sowohl bei E12,5 als auch bei E15 läßt sich erkennen, daß es in unmittelbarer Nähe des Chiasma opticum eine Nkx6.1 positive Region gibt. Hierbei handelt es sich weder um den Nervus opticus (2N) noch den Nucleus Arcuatus, da dieser weiter kaudal liegt und auch nicht um den anterobasalen Nucleus (Ab).

Auch die A13-Zellgruppe (Zona incerta, beim dorsalen medialen hypothalamischen Nucleus), die A15 (olfaktorische Tuberkel), A16 (olfaktorischer Bulbus) und die A17-Zellgruppen in der Retina befinden sich relativ weit von jeglicher Nkx6.1-Expression entfernt (nicht gezeigt).

Die A12- und A14-Zellgruppen liegen zwar in der Nähe des Chiasma Opticum, jedoch befinden sich die A12-Zellgruppe rostral des Nkx6.1-Signals und die A14 kaudal desselben. Damit exprimieren auch diese Zellgruppen kein Nkx6.1.

3.3.4 Die cholinergen Neurone (Ch1-6 Zellgruppen)

Die Ch1-Zellgruppe im medialen Septum sowie die Ch2-Zellgruppe als auch die Ch3-Zellgruppe (dorsal des Chiasmata) und die Ch4-Zellgruppe (Nucleus basalis (Meynert)) zeigen keine Nkx6.1-Expression (nicht gezeigt).

24 ventrales Tegmentum (VT)

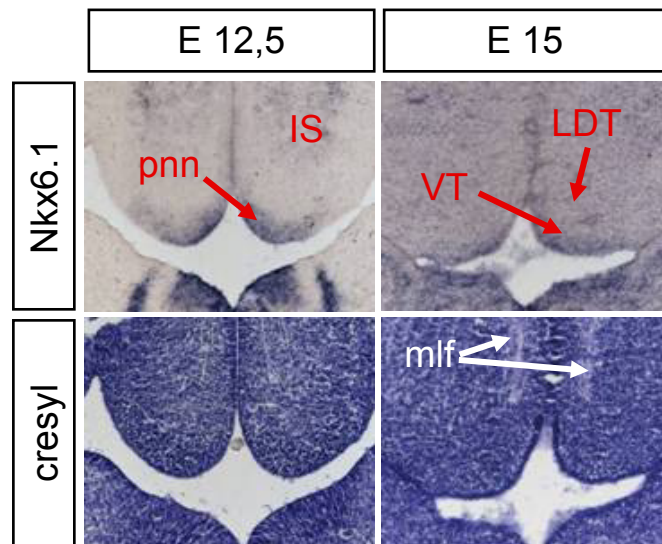


Abbildung 24:

Dargestellt ist das pontine Neuroepithel (pnn) im 4. Ventrikel auf Höhe des Isthmus (IS) am 12,5. und 15. Embryonaltag (E12,5)(E15). Die oberen Bilder zeigen *in situ* Hybridisierungen mit einer Nkx6.1 RNS Sonde (Nkx6.1). Bei den unteren handelt es sich um die benachbarten Cresylviolett-färbungen in 10facher Vergrößerung (cresyl)

Das pontine Neuroepithel (pnn) bei E12,5 bzw. das ventrale Tegmentum (VT) bei E15 zeigt eine deutliche Nkx6.1-Expression. Der *laterodorsale tegmentale Nucleus* (LDT) enthält die Ch5-Zellgruppe. Dieser liegt jedoch dorsal des Neuroepithels nahe dem *medianen longitudinalen Fasciculus* (mlf) (**weiße Pfeile**) und zeigt damit keine Expression.

Das Neuroepithel des ventralen Tegmentum (VT) exprimiert Nkx6.1. Dorsal hiervon liegt der *laterodorsale tegmentale Nucleus* (LDT) in dem sich die Ch5-Zellgruppe befindet. Wie in Abb. 24 zu sehen ist, exprimiert das LDT selbst kein Nkx6.1 und damit auch nicht die Ch5-Zellgruppe.

Die Ch6-Zellgruppe in den *pedunculo-pontinen tegmentalen Kernen* (PPT) befindet sich im *zentralen Höhlengrau* (CG) bzw. dem mesencephalen Tegmentum (MeT). Die Form und das Ausmaß der Nkx6.1 Expression im CG stimmt jedoch weder mit dem PPT noch mit dem *mesencephalen trigeminalen Tractus* (me5) (Abb.25) überein. Damit kann die Nkx6.1-Expression auf diesem Wege nicht zugeordnet werden.

25 Zentrales Höhlengrau (CG)

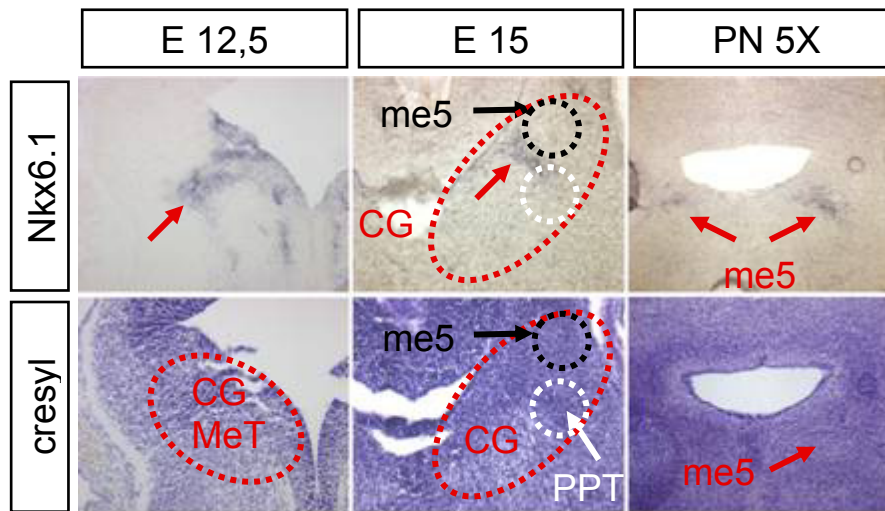


Abbildung 25:

Dargestellt ist das zentrale Höhlengrau um das Aquädukt am 12,5. und 15. Embryonaltag (E12,5)(E15), sowie drei Tage postnatal (PN). Die oberen Bilder zeigen *in situ* Hybridisierungen mit einer Nkx6.1 RNS Sonde (Nkx6.1), bei den unteren handelt es sich um die benachbarten

Cresylviolett-färbungen (E12,5 und E15 bei 10facher Vergrößerung, PN bei 5facher Vergrößerung).

Nkx6.1-Expression findet sich in einer flügelartigen Region im Aquädukt auf Höhe des N4n. Bei E12,5 liegt diese Nkx6.1-Expression innerhalb des zentralen Höhlengraus (CG) (**rot eingekreist**) bzw. des mesencephalen Tegmentum (MeT). Zu diesem Zeitpunkt exprimiert v.a. das Neuroepithel Nkx6.1. Die Form und Ausmaß der Nkx6.1-Expression paßt jedoch zu keiner der dortigen Strukturen.

Bei E15 findet sich Nkx6.1-Expression ebenfalls im CG. Der nächste Kern dieser Region ist der *pedunculo-pontine tegmentale Kern* (PPT) (**weiß eingekreist**). Die Nkx6.1-Expression korreliert jedoch kaum mit den PPT. Direkt dorsal von diesem befindet sich auch der mesencephale trigeminale Tract (me5) (**schwarz eingekreist**).

Auch drei Tage postnatal exprimiert eine Region nahe dem me5 Nkx6.1. Jedoch kann auch hier die Expression nicht genauer als dem CG zugeordnet werden.

3.3.5 Histaminerge Zellgruppen

Histaminerge Neurone finden sich im tuberomammillären Nucleus und in ein paar kleineren assoziierten Haufen.

In den histaminergen Zellgruppen findet sich keine Nkx6.1-Expression (nicht gezeigt).

3.4 Nkx6.1-Expression in der Formatio reticularis des Mittelhirnes, Pons und der Medulla

Im Folgenden wird die Nkx6.1-Expression in der *Formatio reticularis* des Mittelhirns, der Pons, und der Medulla oblongata dargestellt. Auch die Nkx6.1-Expression um den *Fasciculus retroflexus* (fr) und entlang des *medialen longitudinalen fasciculus* wird in diesem Abschnitt behandelt. Zur Übersicht der Nkx6.1-Expression dient Abb. 26.

26 Übersicht über die Nkx6.1-Expression in der Formatio reticularis

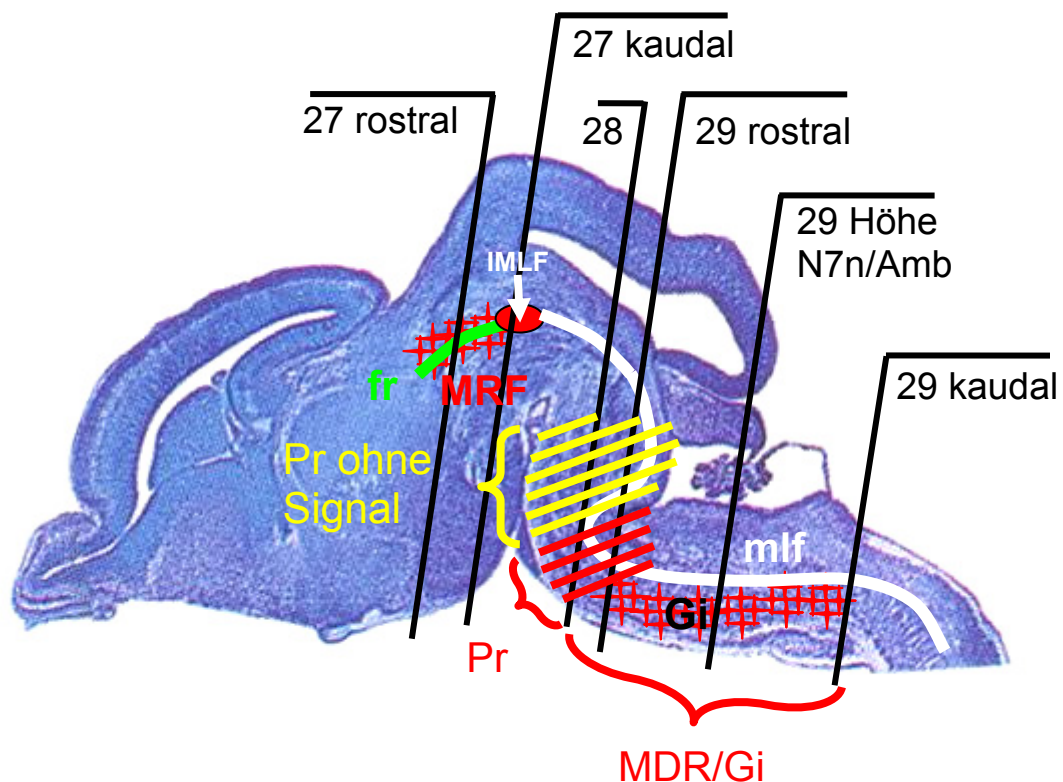


Abbildung 26: Die Abbildung zeigt Nkx6.1 exprimierende Regionen der Formatio reticularis sowie den Verlauf des *Fasciculus retroflexus* (fr) (**grün**) und des *medialen longitudinalen fasciculus* (mlf) (**weiß**). Die **schwarzen Balken** stellen die Schnittebenen dar, wie sie bei den folgenden Abbildungen Verwendung finden (27 rostral, kaudal, 28, 29 rostral, Höhe N7n/Amb und kaudal). Bei dem Hintergrund handelt es sich um einen cresylviolett gefärbten, paramedianen Schnitt durch das Gehirn eines 15 Tage alten Mausembryos.

Die Nkx6.1-Expression findet sich im Mittelhirn um den fr herum, im kaudalen Anteil der pontinen Formatio reticularis (Pr) (**rot schraffiert**) und in der medullären Formatio reticularis MDR bzw. im *gigantozellulären Nucleus* (Gi). Der rostrale Anteil der pontinen Formatio reticularis (Pr ohne Signal) (**gelb schraffiert**) zeigt keine Nkx6.1-Expression.

Nucleus interstitialis/medial longitudinal Fasciculus (IMLF), Modifiziert nach: Jacobowitz, D. M. und Abbott, L. C. (1997).

27 Nkx6.1-Expression um den Fasciculus retroflexus (fr)

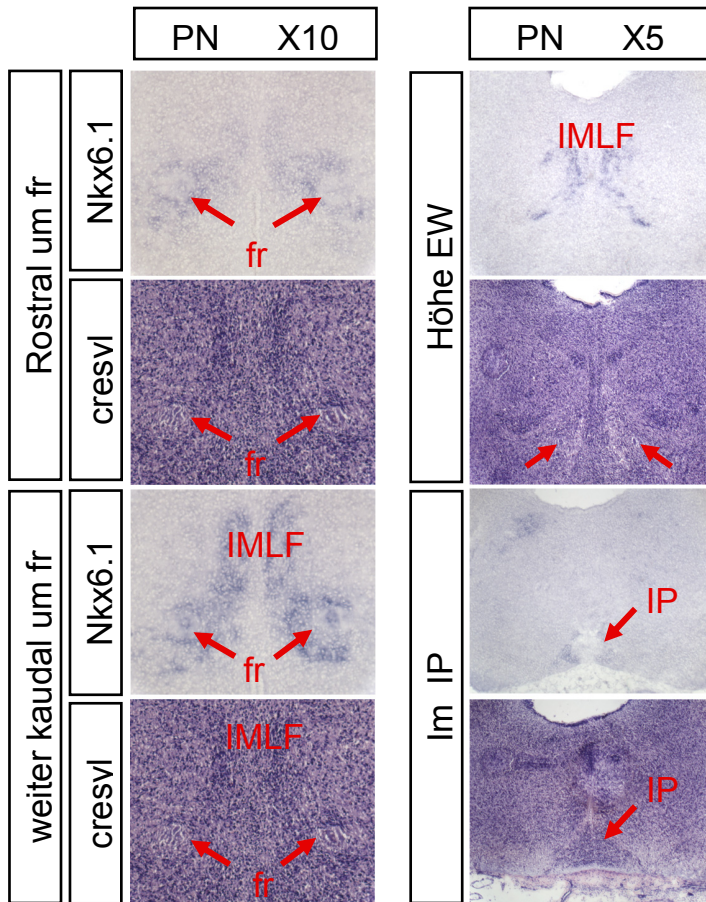


Abbildung 27:

Dargestellt ist die Nkx6.1-Expression um den Fasciculus retroflexus (fr) auf unterschiedlichen rostro-kaudalen Höhen bei drei Tage alten postnatalen Mäusen. Die mit Nkx6.1 beschrifteten Bilder zeigen *in situ* Hybridisierungen mit einer Nkx6.1 RNS Sonde (Nkx6.1), die mit cresyl beschrifteten zeigen den benachbarten cresylviolett gefärbten Schnitt. Linke Säule in 10facher Vergrößerung (X10), rechts in 5facher (X5).

Auf den rostralen Bildern ist zu erkennen, daß der fr selbst kein Nkx6.1 exprimiert, jedoch zeigt sich medial und ventral davon Expression. Die Expression setzt sich weiter kaudal im Nucleus interstitialis (Cajal)/medialer longitudinaler Fasciculus (IMLF) fort. Auf Höhe des Edinger-Westphal Kernes (EW), findet man eine X-förmige Expression. Auch weiter kaudal zeigt sich Expression im Nucleus interpeduncularis (IP).

28 Nucleus reticularis pontinii (Pr)

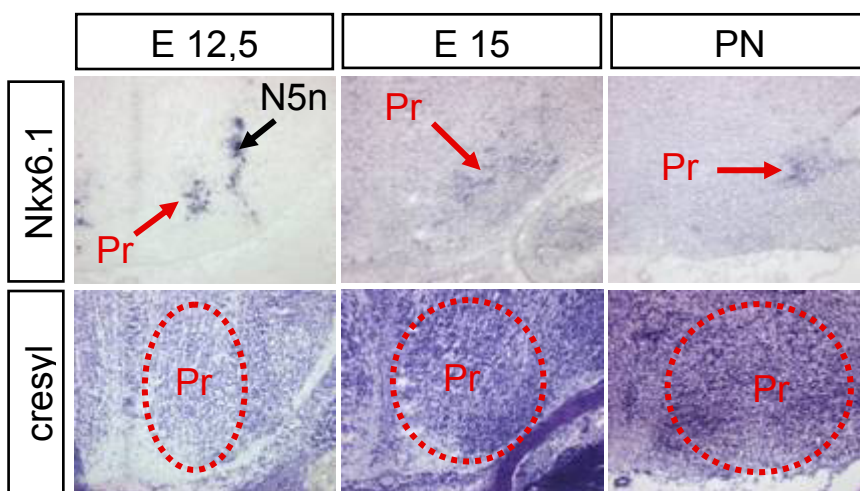


Abbildung 28:

Dargestellt ist der ventrale Anteil des Nucleus reticularis pontinii (Pr). Die oberste Reihe zeigt *in situ* Hybridisierungen mit einer Nkx6.1 RNS Sonde (Nkx6.1) und in der zweiten Reihe den dazu benachbarten cresylviolett (cresyl) gefärbten Schnitt bei 10facher Vergrößerung. Die Schnitte wurden am 12,5. (E12,5), sowie am 15. (E15)

Embryonaltag und drei Tage postnatal (PN) aufgenommen.

Die **roten Pfeile** zeigen auf die Nkx6.1-Expression. Die **roten Kreise** zeigen das eigentliche Ausmaß des pontinen Retikulariskernens. Man erkennt deutlich, daß nur ein kleiner ventraler Anteil dieses Kernes Nkx6.1 positiv ist. Angeschritten ist auch der Nucleus n. trigeminalis (N5n) (**Schwarzer Pfeil**).

29 ventrale medulläre Formatio reticularis (MDR /GI/ MDv)

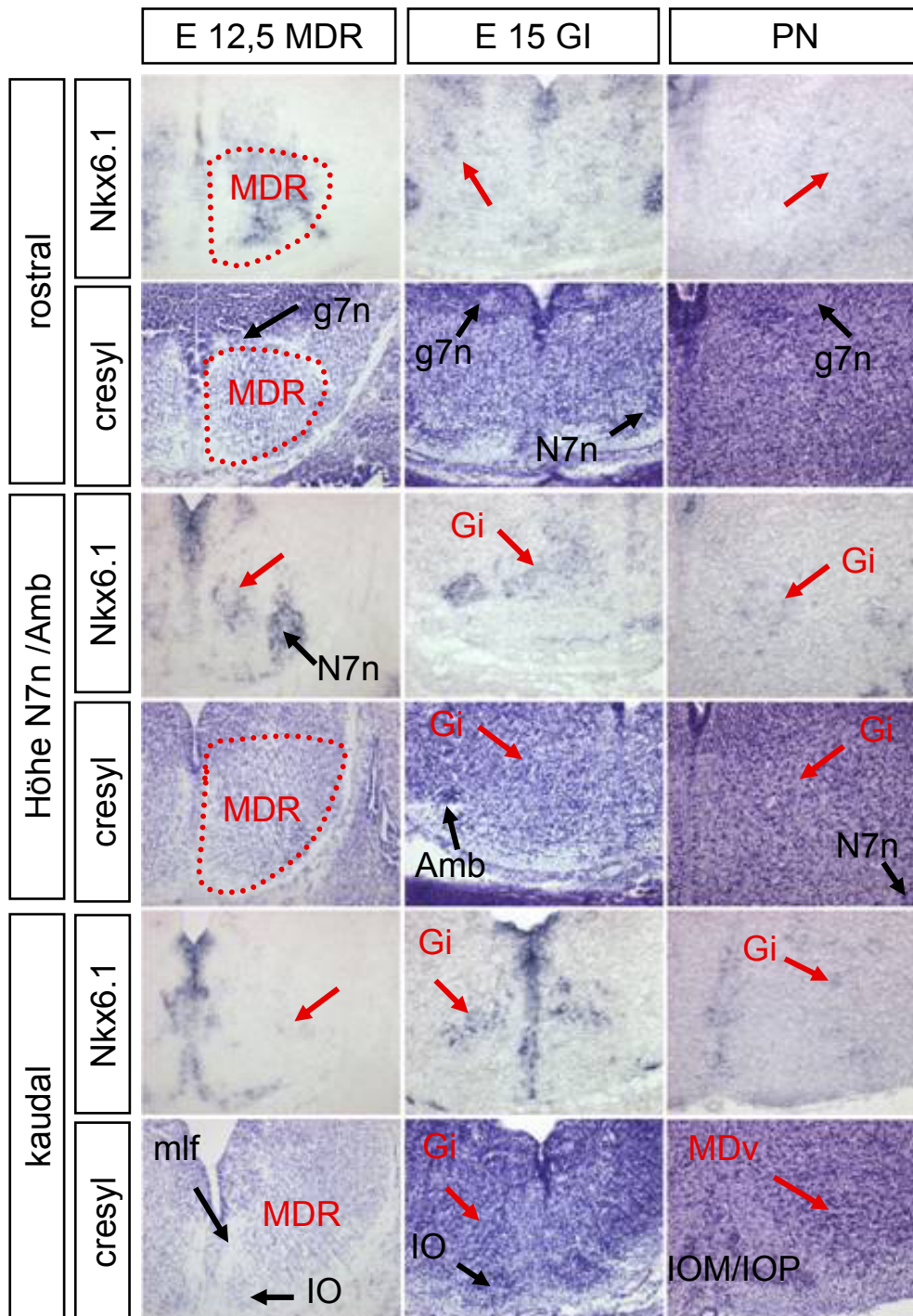


Abbildung 29: Dargestellt ist die ventrale medulläre Formatio reticularis auf unterschiedlichen rostrokaudalen Höhen. Die mit Nkx6.1 bezeichnete Reihe zeigt *in situ* Hybridisierungen mit einer Nkx6.1 RNS Sonde. Jeweils darunter findet sich der mit Cresylviolett (cresyl) gefärbte Schnitt. Die Schnitte zeigen den 12.5. (E12.5), 15. (E15) Embryonaltag und drei Tage postnatal (PN) bei 10facher Vergrößerung. Die **roten Pfeile** zeigen die Nkx6.1-Expression, den Nucleus gigantozellularis (Gi) und den ventralen medullären Nucleus reticularis (MDv). **Rot eingekreist** ist der Umfang der medullären Formatio reticularis (MDR). Man erkennt beim Vergleich der unterschiedlichen rostrokaudalen Höhen der MDR, daß Nkx6.1 hier in verschieden großem Ausmaß exprimiert wird. Bei E15 ist erkennbar, daß die Nkx6.1-Expression gut mit dem Gi übereinstimmt. Drei Tage postnatal ist die Expression hier jedoch schwach ausgeprägt. Die **schwarzen Pfeile** zeigen angeschnittene Strukturen wie das *innere Fazialisknie/genu internum n.*

facialis (g7n), den Fazialiskern (N7n), Fasciculus longitudinalis medialis (mlf), die Oliva inferior (IO), Ambiguuskern (Amb), sowie den Nucleus medialis und prinzipalis der Oliva inferior (IOM/IOP)

Obwohl die Nkx6.1-Expression im Mittelhirn schon am 12.5. Embryonaltag zu sehen ist, läßt sich drei Tage postnatal am besten erkennen, daß die Expression vor allem mit dem *Fasciculus retroflexus* (fr) assoziiert ist, da sie diesen von medial, dorsal und über einige Bereiche auch von ventral umgibt. Dieses setzt sich fort bis zum *Nucleus interstitialis (Cajal)*, der mit dem dort liegenden *medialen longitudinalen Fasciculus* eine anatomische Struktur bildet (IMLF). Von hier aus läuft der fr und mit ihm die Nkx6.1-Expression weiter und endet im *Nucleus interpeduncularis* (IP) (Abb.27).

Auf Höhe des Pons und der Medulla findet sich deutliche Nkx6.1-Expression ventral und paramedial der Mittellinie auf Höhe der großen branchiomotorischen Hirnnervenkerne (N5n, N7n und Amb) und verfolgt hier den *medialen longitudinalen Fasciculus* (mlf).

So findet sich Nkx6.1-Expression in dem ventralen Anteil des *Nucleus reticularis pontinii* (Pr), der sich in der Nähe des Nucleus n. trigeminini (N5n) befindet (Abb.28). Auch die medulläre *Formatio reticularis* (MDR) (Abb.29) zeigt auf Höhe des Fazialisknies (g7n) zum Zeitpunkt E12.5 deutliche Nkx6.1-Expression, wohingegen hier zu späteren Zeitpunkten (E15 und einen Tag postnatal) jedoch kaum noch Expression erkennbar ist.

Des weiteren findet sich in einem Teil der MDR medial des Fazialiskernes (N7n) zum Zeitpunkt E12.5 geringe Nkx6.1-Expression. Zu späteren Zeitpunkten (ab E15) hat sich hier der *Nucleus gigantozellularis* (Gi) formiert, innerhalb dessen eine deutliche Nkx6.1-Expression erkennbar ist. Diese Expression setzt sich bis nach kaudal auf Höhe der Oliva inferior (IO) (Abb.29) fort.

3.5 Die vestibulären Kerne

30 Nucleus vestibularis lateralis / Deiters (VL)

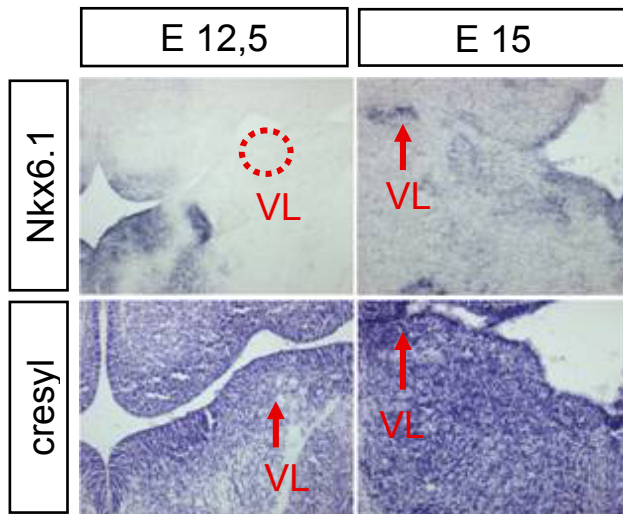


Abbildung 30:

Die **roten Pfeile** zeigen den Nucleus vestibularis lateralis/Deiters (VL) am 12,5. (E12,5) und am 15. Embryonaltag. Die mit Nkx6.1 bezeichnete Reihe zeigt *in situ* Hybridisierungen mit einer Nkx6.1 RNS Sonde. Die mit cresyl bezeichnete Reihe zeigt den dazu benachbarten cresylviolett gefärbten Schnitt (cresyl), jeweils bei 10facher Vergrößerung aufgenommen.

Zum Zeitpunkt E15 zeigt der VL deutliche Nkx6.1 Expression. Bei E12.5 findet sich an derselben Stelle jedoch keine Expression (**rot eingekreist**). Drei Tage postnatal exprimiert dieser Kern kein Nkx6.1 mehr (nicht gezeigt).

31 Nucleus vestibularis medialis / Schwalbe

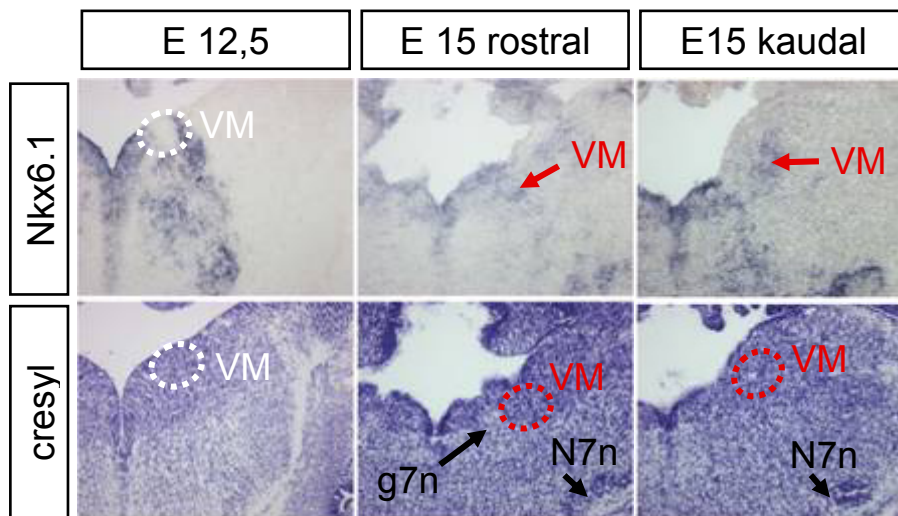


Abbildung 31:

Rote Pfeile zeigen den Nucleus vestibularis medialis/Schwalbe (VM) am 12,5. (E12,5) und am 15. Embryonaltag sowohl auf rostralen als auch kaudalen Höhen. Die mit Nkx6.1 bezeichnete Reihe zeigt *in situ* Hybridisierungen mit einer Nkx6.1 RNS Sonde. Die mit cresyl bezeichnete zeigt

den dazu benachbarten cresylviolett gefärbten Schnitt, jeweils bei 10facher Vergrößerung. Zum Zeitpunkt E15 zeigt der VM sowohl auf rostraler als auch auf kaudaler Höhe Nkx6.1 Expression (**rot eingekreist**). Früher, bei E12.5 findet sich an derselben Stelle noch keine Expression (**weiß eingekreist**). Angeschnitten sind außerdem: genu internum n. facialis (g7n), Nucleus n. facialis (N7n) (**schwarze Pfeile**)

Die beiden vestibulären Kerne (Nucleus vestibularis lateralis und medialis) zeigen zum Zeitpunkt E15 deutliche Nkx6.1-Expression (Abb. 30 und 31). Vorher zum Zeitpunkt E12.5 und drei Tage postnatal (nicht gezeigt) findet sich an diesen Positionen jedoch keine Expression.

3.6 Nervus opticus

32 Nervus opticus

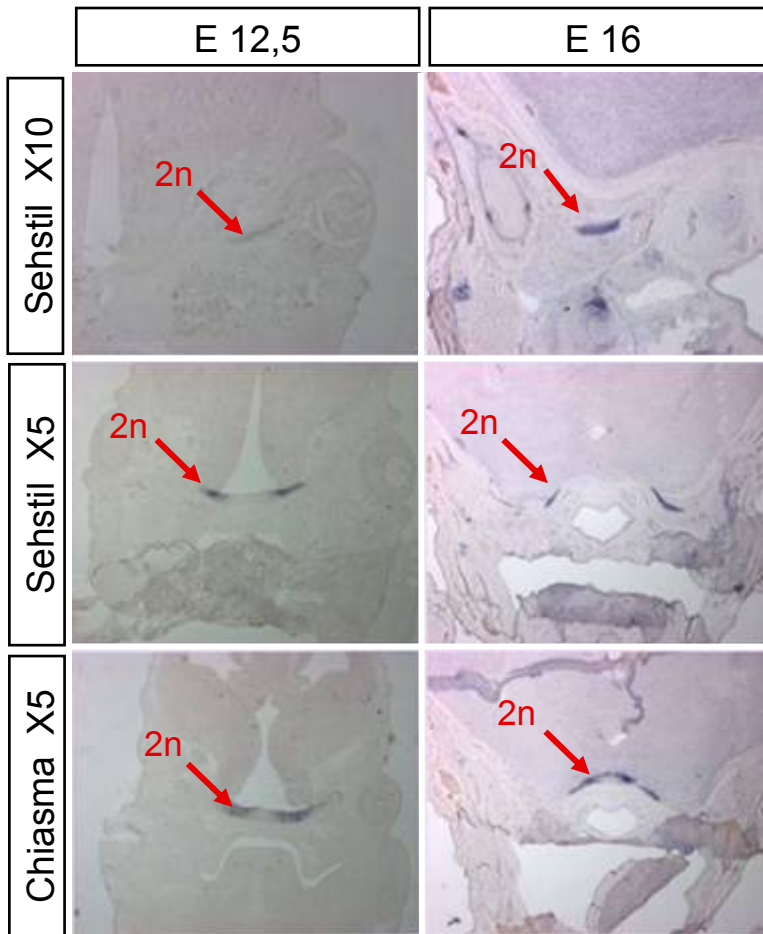


Abbildung 32:

Gezeigt sind *in situ* Hybridisierungen mit einer Nkx6.1 RNS Sonde. Die roten Pfeile zeigen Nkx6.1-Expression im Sehstil (Anlage des Nervus opticus) am 12,5. (E12,5) und am 16. Embryonaltag (E16) im Verlauf des Nerven bis zum Eintritt in das Chiasma opticum. Obere Reihe bei 10facher, alle anderen bei 5facher Vergrößerung.

Man erkennt eine deutliche Nkx6.1-Expression auf allen gezeigten Abschnitten der Nervus opticus Anlage. Im Chiasma selbst und im Tractus opticus findet sich keine Nkx6.1-Expression (nicht gezeigt).

Sowohl im Stadium E12,5 als auch in E16 zeigt der Sehstil (Anlage des sich entwickelnden Nervus opticus) eine deutliche Nkx6.1-Expression (Abb.32). Diese beginnt am hinteren Pol der Augenanlage und setzt sich kontinuierlich bis zum Chiasma opticum fort, an dem sie endet. Der Tractus opticus und die weiteren Anteile der Sehbahn exprimieren kein Nkx6.1.

3.7 Zusammenfassung

Nkx6.1 ist auch zu späteren Entwicklungszeitpunkten in weiten Teilen des Hirnstammes exprimiert. Besonders auffallend ist die ausgeprägte Expression in Regionen, die mit motorischen Funktionen assoziiert sind. Hierzu gehören die Kerne der *generellen somatomotorischen (sm)* Säule und der *branchiomotorischen (bm)* Säule. In all diesen wird Nkx6.1 bei E12.5 sowie größtenteils bei E15 und auch während postnataler Stadien exprimiert. An dieser Stelle ist auch die Expression im kaudalen Anteil der medullären Raphe Kerne des serotonergen Systems zu nennen, da diese Region bei der Generierung von Bewegungsabläufen involviert ist.

Innerhalb der *Formatio reticularis* exprimiert nur der ventrale Anteil des Nucleus reticularis pontinii (Pr) Nkx6.1. Auf Höhe der medullären *Formatio reticularis* (MDR) zeigt vor allem der Nucleus gigantozellularis (Gi) Expression. Auf Höhe des Mittelhirns begleitet Nkx6.1-Expression den Fasciculus retroflexus (fr) zum Nucleus interpeduncularis (IP). Ebenso findet sich deutliche Nkx6.1-Expression paramedial der Mittellinie in Begleitung des medialen Längsbündels mlf.

Darüber hinaus wird Nkx6.1 auch in den vestibulären Kernen und in der Anlage des Nervus opticus exprimiert.

4. Diskussion

Diese Arbeit beschreibt, in welchen Neuronen des Mausgehirnes Nkx6.1 über welchen Zeitraum exprimiert wird. Wie in der Einleitung gezeigt wurde, spielt Nkx6.1 bei der Spezifizierung der neuralen Vorläuferzellen zu Motoneuronen eine entscheidende Rolle. Die hier durchgeführte Untersuchung war hilfreich, um weitere mögliche Funktionen von Nkx6.1 in postmitotischen Neuronen zu beschreiben. Im folgenden werden die Ergebnisse auf Basis des aktuellen Forschungsstandes diskutiert, um eine Aussicht auf weitere Funktionen von Nkx6.1 bei der Gehirnentwicklung zu erhalten.

Ergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur

Bisher gibt es nur eine weitere Untersuchung, die die Expression von Nkx6.1 in postmitotischen Neuronen beschreibt (Puelles et al., 2001). Diese wurde jedoch im Huhn durchgeführt, daß sich auf vielen Ebenen von dem Gehirn der Maus unterscheidet. Somit lassen sich in einigen Fällen nur bedingt Vergleiche zwischen den jeweiligen Expressionsdomänen ziehen. Die Neuroanatomie der Maus ist derjenigen des Menschen ähnlicher, als der des Huhns. Daher stellt die hier vorliegende Untersuchung einen Zugewinn an Information dar.

Im folgenden werden die Expressionsdomänen von Nkx6.1 in der Maus und im Huhn, nach funktionellen Systemen geordnet, diskutiert.

4.1 Nkx6.1 wird in der branchiomotorischen Kernsäule der Maus und im Huhn exprimiert

Die branchiomotorischen Kerne (bm) N5n, N7n und Amb exprimieren in der Maus und im Huhn Nkx6.1, jedoch mit dem Unterschied, daß im Huhn zwei Arten von Trigeminskernen unterschieden werden (Hauptkern und dorsaler Kern). Ebenso werden hier zwei Fazialiskerne unterschieden (zentraler und superfizieller). Des weiteren exprimiert im Huhn ein sogenannter „retrofazialer Nucleus Glossopharyngeus“ Nkx6.1. Wenn dieser Kern den motorischen Anteil des Nervus glossopharyngeus wahrnimmt, so wird beim Menschen und der Maus diese Funktion am ehesten von dem kranialen Anteil des Nucleus ambiguus übernommen. Obwohl die bm Neurone bei Maus und Huhn in unterschiedlichen Kernen organisiert sind, findet sich Nkx6.1-Expression, in beiden Arten, in den bm Kernen.

Die Feststellung, daß die bm Kerne auch zu späteren Stadien Nkx6.1 exprimieren, implizierte eine Rolle von Nkx6.1 bei postmitotischen Prozessen dieser Kernsäule. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß in der Nkx6.1^{-/-}-Mutante nicht die frühe Spezifizierung der bm Neuronen gestört ist, sondern die nachfolgende Entwicklung dieser Kerne. Sowohl die Migration der Neurone als auch die Projektion der Axone weist verschiedene Defekte auf (Muller et al., 2003).

4.1.1 Funktionen von Nkx6.1 in postmitotischen branchiomotorischen Neuronen

Nkx6.1 ist in den bm Neuronen des *Nervus facialis* und des *Nervus trigeminus* während ihres gesamten Migrationsprozesses exprimiert und kann in diesen Kernen auch im neo- und postnatalen Hirnstamm nachgewiesen werden. Bei Nkx6.1^{-/-} mutanten Mäusen sind die bm Neurone des *Nervus facialis* und des *Nervus trigeminus* nicht richtig im Hirnstamm positioniert. Es ließ sich zeigen, daß die Ursache hierfür in einem Migrationsdefekt lag. Denn in den Nkx6.1^{-/-} mutanten Embryonen konnten sich im Gegensatz zu den Wildtyp Embryonen die meisten bm Neurone des *Nervus facialis* nicht aus Rhombomer (R) 4 herausbewegen. Nur wenige Neurone migrierten in R5, jedoch bis in R6 war dies bei den mutanten Nkx6.1^{-/-} Embryonen keinem Neuron mehr möglich (vgl. Abb.1).

Auch die bm Neuronen des *Nervus trigeminus* erreichten ihren dorsalen Bestimmungsort in R2 nicht, sondern stoppten ihre Wanderung nach zwei Dritteln des Wegs (Muller, Jabs et al. 2003).

Dieser Migrationsdefekt korreliert mit einer ektopen Expression bestimmter Zelloberflächenmoleküle, wie dem Netrin Rezeptor *Unc5h3* und dem GDNF Rezeptor *Ret* auf den postmitotischen bm Neuronen des *Nervus facialis*. Damit scheint am ehesten ein zellintrinsischer Mechanismus für die fehlerhafte Migration dieser bm Neurone verantwortlich zu sein (Muller, Jabs et al. 2003).

Ebenso scheint Nkx6.1 auch eine Rolle bei der korrekten Axonprojektion der bm Neuronen zu ihren Zielgeweben zu spielen. So ziehen in den Nkx6.1 Mutanten einige Axone der bm Neurone des *Nucleus ambiguus* und des *Nucleus trigeminus* fälschlicherweise zur Nervenaustrittsstelle des *Nervus facialis* in R4 (vgl. Abb.33) (Muller, Jabs et al. 2003). Eben diese Projektionsfehler der Axone können auch eine Erklärung dafür sein, daß in der Nkx6.1-Mutante zum Zeitpunkt E18,5 der *Nucleus trigeminus*, und der *Nucleus ambiguus* verkleinert sind. Denn das Überleben vieler

Neurone ist abhängig von der Ausbildung der korrekten Verknüpfungen zu seinen Zielzellen.

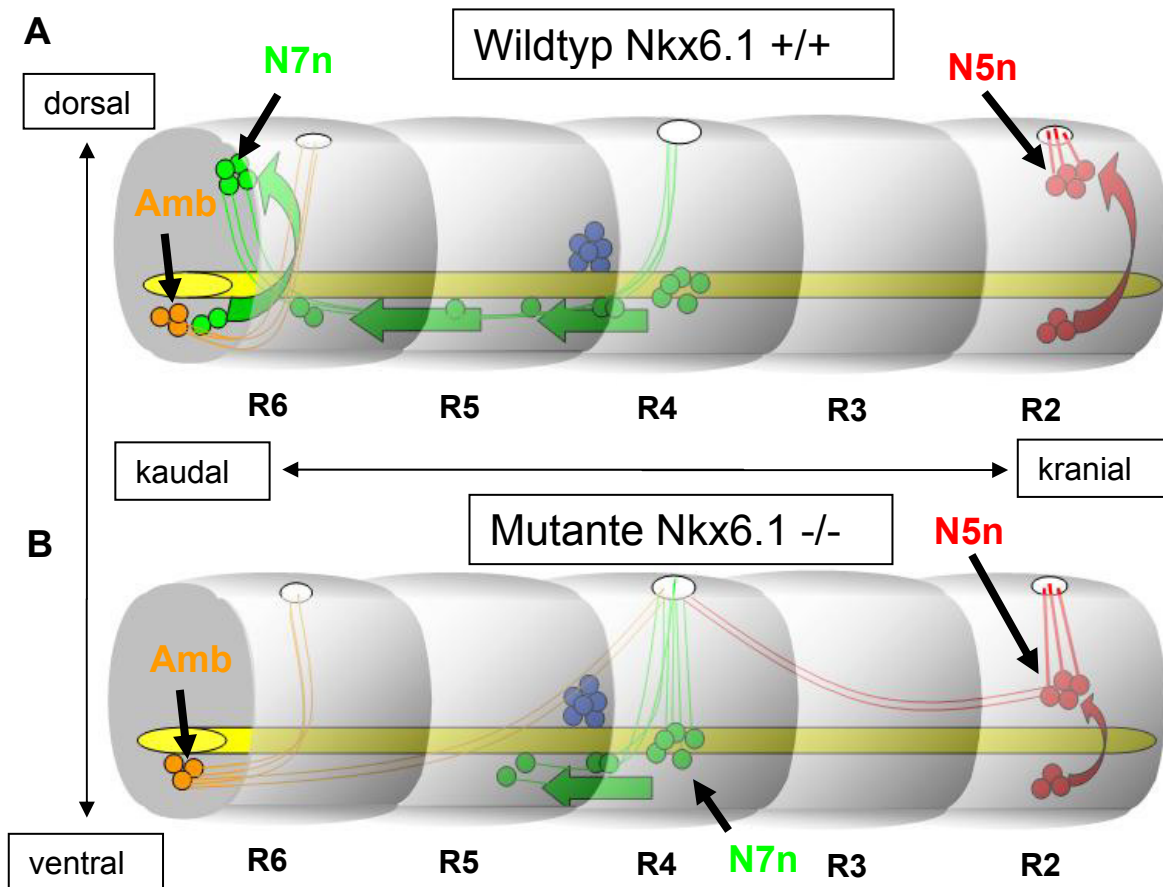


Abbildung 33: A zeigt eine schematische Darstellung der Migrationsbewegungen branchiomotorischer (bm) Neurone des Nervus facialis (**grüne Punkte**), des Nervus trigeminus (**rote Punkte**) und des Ambiguus (**orange Punkte**), sowie deren Axonprojektionsgebiete innerhalb der Rhombencephalons. Bm Neurone des Nervus facialis entstehen ventral in Rhombomer (R) 4. Sie wandern kaudal entlang der Bodenplatte (**gelb**) nach R6 (**grüne Pfeile**), wo sie dorsolateral migrieren. Nach einer letzten radialen Bewegung bilden sie den dorsal gelegenen Nucleus facialis (**N7n**). Da die Axone (**grüne Linien**) um den Nucleus abducens (**blaue Punkte**) ziehen, bilden sie dadurch das innere Facialisknie (Genu internum Nucleus facialis). Die bm Neurone des Nervus trigeminus haben ihren Ursprung ventral in R2. Die Neurone wandern dorsolateral, entlang ihrer Axone in Richtung ihrer dorsal gelegenen Nervaustrittsstelle (**roter Pfeil**) und bilden hier den Nucleus trigeminus (**N5n**). Die Axone beider Nerven verlassen den Hirnstamm dorsal, wobei Axone des Nervus facialis (**grüne Linien**) in R4 austreten und derjenigen des Nervus trigeminus (**rote Linien**) den Hirnstamm in R2 verlassen. Die Axone des Nucleus ambiguus (**Amb**)(IX/X) (**orange Linien**) projizieren zur einer weiteren Austrittsstelle in R6.

B zeigt die schematische Darstellung der Migrationsbewegungen und Axonprojektionsgebiete der branchiomotorischen (bm) Neurone in *Nkx6.1*^{-/-} mutanten Mäusen. Hier wandert nur eine frühe Population der bm Neurone des Nervus facialis (N7n) (**grüne Punkte**) in die rostrale Hälfte von R5 (**grüner Pfeil**). Später differenzierte Neurone bleiben in R4 liegen. Ebenso wandern die Neurone des Nervus trigeminus (N5n) (**rote Punkte**) entlang der sekundär ausgesandten Fortsätze nur 2/3 der üblichen Strecke (**roter Pfeil**). Auch die Axonprojektion ist in der Mutante gestört. So projizieren zwar die Axone des Nervus facialis (N7n) zu ihrer Nervaustrittsstelle in R4, jedoch treten einige Axone des Nervus trigeminus (N5N) (**rote Linien**) und des Nucleus ambiguus (Amb) (**orange Linien**) fälschlicherweise ebenfalls bei der Austrittsstelle des Nervus facialis in R4 aus, statt in R2 bzw. R6 wie beim Wildtyp (vgl.A).

Zur Vereinfachung sind in A und B nur die Kerne der einen Hirnstammseite dargestellt.

4.2 Nkx6.1 Expression findet sich in postmitotischen Kernen der generellen somatomotorische Säule

Auch bei den Kernen der *generellen somatomotorischen Säule* (sm) gibt es zwischen Maus und Huhn zahlreiche Unterschiede. So besteht im Huhn der okulomotorische Komplex aus drei Kernen (*akzessorischer*, *dorsomedialer* und *ventromedialer okulomotorischer Kern*). Dazu gibt es im Huhn einen *akzessorischen Abduzenskern*, sowie einen *Nucleus glossopharyngeus* (Puelles et al., 2001). Da jedoch der N3n, N4n, N6n und N12n bei beiden Tierarten vorkommt und hier gleichzeitig Nkx6.1 exprimiert wird, zeigt sich somit, daß die Nkx6.1-Expression im Laufe der Evolution der sm Kerne nicht abgeschaltet wurde. Da in den Nkx6.1-Mutanten der N6n und N12n fehlen, zeigt dies auch die Notwendigkeit von Nkx6.1^{-/-} bei ihrer Entstehung.

Ob Nkx6.1 auch zu späteren Entwicklungszeitpunkten benötigt wird und ob es darüber hinaus bei den sm Kernen auch zu Störungen in der Axonprojektion kommt, ist nicht bekannt. Um dieses nachzuweisen, kann man Immunofluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen *neurofilament* oder *β-tubulin* in der Nkx6.1^{-/-}-Mutante anwenden. Dieses könnte den Ausfall ganzer Faserbündel darlegen. Als weitere Methode bieten sich der Einsatz von „carbocyanine dye tracing“ (Dil) an, das in die beteiligten Kerne injiziert wird und im Axon entlang zu den Zielneuronen diffundiert. Damit ließe sich am besten zeigen, ob die Axone ihre entsprechenden Ziele auch tatsächlich erreichen.

Zusätzlich läßt sich in der Maus der Nucleus prepositus Hypoglossus (Prh) als Nkx6.1 positiver Kern nachweisen. Dieser Kern synthetisiert Stickstoffmonoxid (NO), welches für die Generierung horizontaler Augenbewegungen z.B. beim vestibulo-okulären Reflex (VOR) notwendig ist (Moreno-Lopez et al., 2002), worauf später eingegangen wird.

4.3 Keine Hinweise auf Funktionen von Nkx6.1 bei späteren Entwicklungsprozessen in den Kernen der generellen viszeromotorischen Säule

Zu den Kernen der *generellen viszeromotorischen Säule* (vm) gehören der Nucleus salivatorius superior und inferior, der Nucleus dorsalis n. vagi sowie der *Nucleus Edinger-Westphal*.

Der dorsale Vagus Kern zeigt in der Maus bis E12.5 und im Huhn sogar bis zum

Stadium 38 Nkx6.1-Expression. Da dieser Kern in den Nkx6.1 mutanten Mäusen bei E18,5 eine normale Größe hat (Muller et al., 2003), spricht dieses gegen eine Rolle von Nkx6.1 bei dessen Spezifizierung. Außerdem scheint Nkx6.1 bis zum Zeitpunkt E11,5 lediglich eine indirekte Rolle bei der Spezifizierung der vm Neurone zu spielen, indem es die Entstehung von V0 und V1 Interneuronen in der vm Vorläuferdomäne verhindert (Pattyn, Vallstedt et al. 2003b). Jedoch liefert die Untersuchung von Nkx6.1 und Nkx6.2 Doppelmutanten-Mäusen Hinweise dafür, daß die Nkx6 Gene zusammen dennoch unverzichtbar sind. Denn bei den Doppelmutanten fehlt der dorsale Vagus Kern zum Zeitpunkt E16,5 vollständig (Pattyn et al., 2003b). Dieser Unterschied im Phänotyp zwischen Nkx6.1 Einzel- und den Doppelmutanten kann zweierlei Mechanismen als Ursache haben. Entweder kompensiert das Nkx6.2 Gen die Funktion von Nkx6.1 in den Nkx6.1-Mutanten (analog zu dem im Rückenmark vermuteten Mechanismus). Oder der dorsale Vagus Kern fehlt tatsächlich auf Grund postmitotischer Prozesse. Denn sowohl in den Nkx6.1-Mutanten bei E12.5 als auch in den Nkx6-Doppelmutanten bei E10.5, projizieren einige Axone aus R6 und R7 nicht korrekt zum Nervenaustrittspunkt des Vagus (Muller et al., 2003; Pattyn et al., 2003b). Da auch hier das Überleben vieler Neurone von der Ausbildung der korrekten Verknüpfungen zu seinen Zielzellen abhängt, kann das Fehlen des dorsalen Vagus Kernes in den Nkx6-Doppelmutanten möglicherweise auf die gestörte Axonprojektion zurückgeführt werden. Dieses zeigt, daß die Nkx6-Gene eine Rolle bei postmitotischen Prozessen der vm Neurone spielen könnten.

Bedauerlicherweise läßt sich bei den *salivatorischen* Kernen und dem *Edinger-Westphal-Kern* mit der gewählten Methode nicht zweifelsfrei feststellen, ob hier Nkx6.1 später als E11,5 exprimiert wird. Denn der *Edinger-Westphal-Kern* ist in der Maus erst nach der Geburt vom Okulomotorius Kern abgrenzbar. Da es in diesem Kern auch Zellen gibt, die Substanz P-immunoreaktive Neurone enthalten (Puelles et al., 2001) könnte man eine Koimmunofluoreszenz-Färbung mit Antikörpern gegen Nkx6.1 und Substanz P einsetzen. So ließe sich in der konfokalen Mikroskopie feststellen, ob es Neurone gibt, die gleichzeitig Substanz P- und Nkx6.1- positiv sind, was ein Hinweis dafür wäre, daß es tatsächlich die Neurone des Nucleus Edinger-Westphal sind, die Nkx6.1 für deren weitere Entwicklung benötigen könnten.

Wie in der Maus gezeigt wurde, lassen sich die frühen, differenzierten, postmitotischen Neurone der superioren und inferioren salivatorischen Kerne nur bis E11,5 verfolgen, da der verwendete Atlas diese Kerngruppe nicht ausweist (David M.

Jacobowitz und Louise C. Abbott (1997)). Darüber hinaus ist nicht bekannt, ob das Huhn hier Nkx6.1 zu späteren Zeitpunkten exprimiert (Puelles et al., 2001). Bevor man bei den salivatorischen Neuronen über eine gestörte Migration oder Axonprojektion spekulieren kann, wäre hier vorher zu klären, wie diese Kerne im Wildtyp migrieren.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Expressionsmuster von Nkx6.1 in den motorischen Kernen bei Huhn und Maus ähnlich sind. Die Unterschiede ergeben sich am ehesten aus den Differenzen im zeitlichen Ablauf der Entwicklung einzelner Gehirnteile und der dadurch unterschiedlichen Lokalisation einiger Zellgruppen.

4.4 Mögliche Funktionen von Nkx6.1 in den serotonergen Kernen

4.4.1 Prinzipielle Unterschiede in der Expression zwischen Maus und Huhn sprechen gegen eine Rolle von Nkx6.1 bei der Spezifizierung rostraler Raphe Kerne

Bei der Maus und im Huhn findet sich eine deutliche Nkx6.1-Expression in den Raphe Kernen. Im Huhn sind die am weitesten rostral liegenden Raphe Kerne als Nkx6.1 positiv beschrieben worden (Puelles et al., 2001). In der Maus handelt es sich bei den rostralen Kernen jedoch um die dorsalen, medianen und paramedianen Raphe Kerne. Sie zeigen keine Nkx6.1-Expression (Abb.17A+B Ausnahme PMR geringfügig bei E12,5). Die paramediane Raphe wird jedoch im Huhn explizit als Nkx6.1 positiv beschrieben. Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen Maus und Huhn. Die Ursache dafür liegt vermutlich darin, daß die Spezifizierung der jeweiligen Vorläuferdomäne in den frühen Entwicklungsstadien (E9,5 bis E11,5) in beiden Tierarten prinzipiell unterschiedlich verläuft.

Ein Beweis hierfür findet sich in folgendem Vergleich. Wie in der Einleitung beschrieben, entstehen in Wildtyp-Mäusen in Rhombomer 4 (R4) keine serotonergen Neurone, da die hier exprimierten Faktoren (Nkx6 Gene und Hoxb1) die Entwicklung serotonerger Neurone inhibieren. Im Huhn hingegen entstehen in eben diesem Rhombomer serotonerge Neurone, obwohl hier ebenfalls Nkx6-Gene und Hoxb1 exprimiert werden (Craven et al., 2004). Offenbar nehmen Nkx6 Gene in Höhe von R4 bei den verschiedenen Spezies unterschiedliche Funktionen wahr.

Ein weiterer Unterschied in der Spezifizierung serotonerger Neurone zeigt sich auf

anderen rostrokardalen Ebenen in folgendem:

Im Huhn entstehen die am weitesten rostral liegenden serotonergen Neurone in R1. Hier konnte mit "gain" und "loss of function" Studien gezeigt werden, daß Nkx2.2 und eine starke Nkx6.1-Expression in R1 einen Homeodomänen Code etablieren, der für die Spezifizierung der serotonergen Neurone nötig ist (Craven et al., 2004). Dabei induzieren Nkx2.2 und Nkx6.1 zusammen die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren Gata2 und Gata3. Gata2 ist alleine ausreichend, um die Transkriptionsfaktoren LMX1b und Pet1 und damit die Bildung von serotonergen Neuronen zu induzieren. Im Huhn ist Nkx6.1 also für die Spezifizierung der serotonergen Neurone essentiell notwendig.

In der Maus entstehen aber die am weitesten rostral liegenden, später serotonergen Neurone in den Rhombomeren R2 und R3. In Nkx6.1 und Nkx6.2 doppelt mutanten Mäusen (Nkx6 Mutanten) hingegen findet sich in diesen rostralen Rhombomeren, anders als im Huhn, eine normale Entwicklung dieser serotonergen Neurone (Craven et al., 2004; Pattyn et al., 2003a) und daher scheint hier Nkx6.1 keine Rolle bei ihrer frühen Entwicklung zu spielen.

Hier zeigt sich, daß ein prinzipieller Unterschied zwischen den beiden Spezies hinsichtlich der Funktion von Nkx6.1 bei der Entwicklung der rostralen serotonergen Neuronen besteht. Daher ist es auch nicht verwunderlich, daß sich die verglichenen Expressionsmuster von Nkx6.1 während der späteren Entwicklungsstadien in beiden Arten unterscheiden.

4.4.2 In den kaudalen Raphe Kernen kann Nkx6.1 bei späteren Entwicklungsprozessen beteiligt sein

In der Maus exprimieren die kaudalen Raphe Kerne (RM, RP und RO) Nkx6.1 im Zeitraum E12,5 bis 3 Tage postnatal (PN) (vgl. Abb.9A-C). Die Entstehung der kaudalen serotonergen Neurone scheint grundsätzlich anders reguliert zu werden, als die der rostralen. So ist Gata2 im Huhn nicht in der Lage, die Entstehung der kaudalen serotonergen Neurone zu induzieren (Craven et al., 2004).

Im Gegensatz dazu scheint Gata3 in der Maus bei der Bildung kaudaler serotonerger Neuronen notwendig zu sein, da in erwachsenen „Gata3-Chimären“ Mäusen bestimmte kaudale serotonerge Neurone Defekte aufweisen (van Doorninck et al., 1999). Jedoch ist über eine Interaktion von Nkx6.1 mit Gata3 in den kaudalen Raphe Kernen nichts bekannt. Es besteht dennoch die Möglichkeit, daß Nkx6.1 auf Grund

seiner deutlichen Expression in den kaudalen Raphe Kernen während der späteren Entwicklung Funktionen wahrnimmt, die analog zu seiner Rolle bei der Axonwegfindung der branchiomotorischen Kerne sind. Möglich ist hier eine Beteiligung von Nkx6.1 bei der Bildung absteigender Projektionen, die bei der Kontrolle kardiovaskulärer Funktionen (Loewy and Neil, 1981), der Schmerzwahrnehmung (Basbaum and Fields, 1984) und der locomotorischen Bewegungsabläufe (Anderson und Proudfit 1981) involviert sind. Um Defekte bei locomotorischen Bewegungsabläufen nachzuweisen, müßte man adulte Mäuse untersuchen. Dieses verbietet sich aber, da die Nkx6.1^{-/-}-Mutanten kurz nach der Geburt, wahrscheinlich auf Grund des Motoneuronendefektes, versterben. Daher wäre eine konditionierte Knock-out-Maus notwendig, in der Nkx6.1 nach Möglichkeit nur in den Vorläuferzellen der kaudalen, serotonergen Neuronen fehlt. Zur Herstellung dieser Mäuse werden zwei *loxP* Sequenzen so in das Genom eingesetzt, daß eine funktionell kritische Region des Nkx6.1-Genes flankiert wird. Als zweites muß Cre-Rekombinase (Cre) so in das Genom integriert werden, daß es möglichst gewebespezifisch exprimiert wird (beispielsweise dort, wo auch Nkx2.2 exprimiert wird). Damit wird dann in allen Zellen, die Nkx2.2 exprimieren, auch Cre gebildet, welches dazu führt, daß die flankierte Nkx6.1-Gensequenz herausgeschnitten und damit speziell in dieser Zellgruppe inaktiviert wird. Damit wären die konditionierten Nkx6.1-Mutanten höchstwahrscheinlich überlebensfähig, da sich die motorischen Neurone des Rückenmarks normal bilden würden und man könnte dennoch die Folgen der fehlenden Nkx6.1-Expression in den vm bzw. serotonergen Kernen untersuchen.

Eine weitere sehr neue Möglichkeit besteht in der selektiven Ausschaltung der Translation der Nkx6.1 mRNA mittels *short interfering RNA* (siRNA/esiRNA) *in utero*. Bei dieser Methode werden kurze RNA-Fragmente mit Hilfe eines elektrischen Feldes in die Zellen des Embryo elektroporiert, die dann mit der Ziel-mRNA so interferieren, daß die Translation zum Protein verhindert wird und somit nur in der elektroporierten Hirnregion der Nkx6.1 Transkriptionsfaktor fehlt.

4.5 Nkx6.1 in der *Formatio reticularis*

Wie im Ergebnisteil dargelegt wurde, zeigen die einzelnen Anteile der *Formatio reticularis* der Maus, bestehend aus der *paramedianen Formatio reticularis*, dem ventralen Anteil des *Nucleus pontinii reticularis* und der ventralen medullären *Formatio reticularis*, eine starke Nkx6.1 Expression. Auch im Huhn findet sich Expression, jedoch werden hier die einzelnen Anteile nicht unterschieden (Puelles et al., 2001). Dennoch kann die Expression in der *Formatio reticularis* im Huhn auf Höhe N4n am ehesten mit der Expression in der *paramedianen Formatio reticularis* in der Maus verglichen werden. Die Expression um den N6n und *retrofazialen Nucleus Glossopharyngeus* im Huhn ist mit derjenigen der ventralen *medullären Formatio reticularis* der Maus vergleichbar.

In dieser groben vergleichenden Übersicht zeigen die beiden Spezies eine ähnliche Nkx6.1-Expression in der *Formatio Reticularis*. Interessanterweise befinden sich in der *Formatio reticularis* auf den verschiedenen Höhen des Hirnstammes Zentren, die in differenzierter Weise die Motorik beeinflussen. So hat die *Formatio reticularis* des Pons und Mittelhirns einen fördernden Einfluß auf die Motorik und die medulläre einen hemmenden. Hiermit besteht für diese Region also eine direkte Verbindung zum motorischen System. Es ist beispielsweise denkbar, daß Nkx6.1 hier bei der Bildung von Reflexschaltkreisen involviert ist, indem es eine korrekte Axonprojektion der beteiligten Neurone ermöglicht.

4.6 Nkx6.1 ist zeitweise in den vestibulären Kernen der Maus exprimiert

Bei den bisher diskutierten Nkx6.1 positiven Zellgruppen handelt es sich um motorische Kerne oder um solche, die in der Lage sind, motorische Systeme zu modulieren, wie beispielsweise die kaudalen Raphe Kerne oder Anteile der *Formatio reticularis*. Als Ausnahme findet sich nun Nkx6.1 Expression im *Nucleus vestibularis lateralis* (Deiters) und *Nucleus vestibularis medialis* (Schwalbe). Diese Kerne erhalten Afferenzen aus bipolaren Nervenzellen, die sich im Ganglion vestibulare befinden. Die peripheren Fortsätze dieser Ganglionzellen enden in den Sinnesepithelien der Bogengänge, des *Sacculus* und des *Utriculus*. Damit verarbeiten die vestibulären Kerne also Afferenzen eines sensiblen Organs, was dem bisher bekannten Expressionsmuster von Nkx6.1 widerspricht. Jedoch wurde auch

im Huhn Nkx6.1 Expression in den vestibulären Kerne beschrieben (Puelles et al., 2001). Da somit das Expressionsmuster von Nkx6.1 in der Evolution konserviert geblieben ist, zeigt dies, daß Nkx6.1 in den vestibulären Kernen im Laufe der Entwicklung relevant sein könnte. Tatsächlich ist bekannt, daß der *Nucleus vestibularis lateralis* zum Zeitpunkt E12 und der *Nucleus vestibularis medialis* zwischen E13 und E14 entstehen (Altman and Bayer 1980). Damit findet sich Nkx6.1 Expression in diesen Kernen ein bis drei Tage, nachdem diese gebildet werden. Da diese Kerne Teile komplexer motorischer Schaltkreise und Reflexe sind, besteht die Möglichkeit, daß Nkx6.1 bei der Ausbildung der entsprechenden Verbindungen beteiligt ist, indem es erneut eine Funktion, beispielsweise bei der Axonprojektion, inne hat. Hierbei wären in den Nkx6.1^{-/-}-Mutanten zwei Fragen durch die Injektion von Dil in diese Kerne zu beantworten. Als erstes wäre zu klären, ob die von den vestibulären Kernen ausgehenden Axone ihr Zielgewebe (gegenseitige vestibuläre Kerne, Kleinhirn und Kerne des visuellen und somatischen sensorischen Systems) auch tatsächlich erreichen. Zweitens wäre zu klären, ob diese Kerne selbst von den Axonen ihrer Interaktionspartner erreicht werden.

4.7 Maus und Huhn zeigen Unterschiede in der Nkx6.1-Expression des viszerosensiblen Systems

Im Huhn exprimiert der *Nucleus solitarius superior* Nkx6.1 (Puelles et al., 2001). Dieser gehört zum viszerosensiblen System. In dieser Säule enden Fasern, die aus den pseudounipolaren Neuronen des Ganglion inferius (nodosum) stammen. Der erste Anteil führt Geschmacksfasern und endet im kranialen Abschnitt des *Nucleus solitarius*, der zweite Anteil verläuft im *Tractus solitarius* und endet auf verschiedenen Höhen des *Nucleus solitarius*. Diese Kernsäule ist reich an peptinergen Neuronen (Vip, Corticoliberin, Dynorphin). In der Maus findet sich keine Nkx6.1-Expression in einer hierzu vergleichbaren, so weit lateral liegenden Kerngruppe.

4.8 Nkx6.1 Expression in der PTA (periventral tegmental area) des Huhns und dessen mögliche Korrelate in der Maus

Im Huhn findet sich Nkx6.1-Expression in einer als PTA (periventral tegmental area) bezeichneten Region (Puelles 2001). Im Huhn ist in den Abbildungen erkennbar, daß der rostrale Anteil dieser Nkx6.1 exprimierenden Region im Diencephalon auf Höhe des „mammillären“ und „retromammillären Gebietes“ beginnt und kaudalwärts auf Höhe des Trochleariskernes (N4n) endet. In der Maus gibt es jedoch keine als PTA bezeichnete Region. So kann der kraniale Anteil am ehesten mit der Region um das *Corpus mamillare* verglichen werden. In der Nähe von diesem befindet sich in der Maus auch das Chiasma opticum. Hier konnte in dem darüber liegendem Neuroepithel auch Nkx6.1-Expression nachgewiesen werden (vgl. Abb. 23). Zudem ist bekannt, daß diese Region LHRH-IR Neurone enthält (Mikami et al., 1988; Puelles et al., 2001). Auch ihre Entwicklung wird durch ein Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren reguliert. Interessanterweise bilden heterozygote Pax-6 Mutanten/Sey (Small eye) keine LHRH Neurone aus (Dellovade et al., 1998). Die Beteiligung von Pax6 an der Entwicklung dieser Region läßt auf Grund des bekannten Zusammenspiels von Nkx6.1 mit Pax6, im Falle der Motoneuronenentwicklung im Rückenmark, auch eine Beteiligung bei der Entwicklung der LHRH-IR Neurone möglich erscheinen. Um festzustellen, ob Nkx6.1 tatsächlich eine Funktion bei der Bildung dieser Neurone hat, müßte zuerst die Nkx6.1-Mutante auf einen Phänotyp speziell der LHRH-IR Neurone untersucht werden. Ebenso müßte man beispielsweise durch eine Koimmunofluoreszenz-Färbung mit Anti-Nkx6.1-Antikörpern und Anti-LHRH-Antikörperfärbungen nachweisen, daß Nkx6.1 mit den LHRH koexprimiert wird.

Der kaudale Anteil der PTA im Huhn kann bei der Maus am ehesten mit dem „zentralen Hohlengrau“ verglichen werden. Im Ergebnisteil wurde die Nkx6.1 Expression hier als „flügelförmig“ beschrieben. Im Huhn befinden sich in diesem Abschnitt der PTA auch Substanz P-immunoreaktive Neurone (Puelles et al., 2001) (Shiraishi 2000). Ob auch in der Maus in eben diesen Neuronen Nkx6.1 exprimiert wird, muß ebenfalls durch eine Koimmunofluoreszenz-Färbung mit Antikörpern gegen Nkx6.1 und gegen Substanz P nachgewiesen werden.

4.9 Nkx6.1-Expression ist in der Maus nicht mit dem Kleinhirn assoziiert

Im Huhn exprimiert die „cerebellare Zone“ Nkx6.1 mit Ausnahme von Strukturen, die sich in der Nähe des *Kleinhirnwurmes* („vermal neighborhoods“) und der „rhombic lip“ befinden. In der Maus findet sich keine Nkx6.1-Expression in solchen mit dem Kleinhirn assoziierten Strukturen.

4.10 Nkx6.1 Expression in der Hörbahn unterscheidet sich zwischen Maus und Huhn

In der Maus findet sich nach E11,5 keine Nkx6.1-Expression in Kernen des Hirnstammes, die mit der Hörbahn in Verbindung stehen. Lediglich bis E11,5 findet sich eine deutliche Nkx6.1-Expression in einem lateralen Streifen des Hirnstammes, aus dem die Vorläuferzellen der *generellen viszeromotorischen Säule* hervorgehen (Abb.14). Aus diesen werden später sowohl die salivatorischen Kerne als auch die efferenten Innenohrneurone gebildet. Nimmt man an, daß diese Kerne erst nach E11,5 spezifiziert werden, kann Nkx6.1 keine Funktion bei deren späterer Entwicklung haben, da es in diesen Kernen während des untersuchten Zeitraums nicht exprimiert wird.

Hierzu im Widerspruch steht die Tatsache, daß im Huhn Nkx6.1 in den „efferenten cochleo-vestibulären Kernen“ exprimiert wird (Puelles et al., 2001). Ebenso findet sich Expression im ventralen Anteil der *Nuclei lemnisci laterales*. Bei diesen handelt es sich um Zellgruppen, die in den Verlauf des *Lemniscus* eingestreut sind. Auch sie gehören zu dem System der Hörbahn und zeigen in der Maus keine Nkx6.1-Expression.

Ob Nkx6.1 in der Entwicklung des Hörsystems im Huhn eine Funktion wahrnimmt, ist nicht bekannt. In der Maus verbieten sich auf Grund des frühen Ablebens der Nkx6.1^{-/-}-Mutanten funktionale Analysen des Hörsystems. Es bleibt die Frage, ob Nkx6.1 vor E11,5 Funktionen in den Vorläuferzellen wahrnimmt, die sich erst sehr viel später bemerkbar machen. Hinweise auf eine solche Funktion könnte die Untersuchung der Migration und Axonprojektion der efferenten Innenohr-Neurone in den Mutanten mittels Dil geben.

4.11 Nkx6.1 ist in Hirnregionen exprimiert, die an komplexen motorischen Schaltkreisen beteiligt sind

Vergleicht man nun die Regionen, in denen Nkx6.1 innerhalb des Hirnstammes exprimiert wird, so stellt man fest, daß dieser Faktor in qualitativ grundsätzlich verschiedenen Systemen zu finden ist. Im Gegensatz zum Rückenmark läßt sich Nkx6.1-Expression keinem einheitlichen System, wie den motorischen Kernen zuordnen.

Da diese Regionen eine so große Vielfalt bezüglich ihrer Qualität, Histochemie und Lokalisation aufweisen, suchte ich nach funktionellen Systemen, in denen diese verschiedenen Regionen zusammenarbeiten. Dabei stellte ich fest, daß ein Großteil davon tatsächlich in Form von funktionellen Reflexschaltkreisen miteinander interagiert.

Abbildung 34 zeigt solche ausgewählten Expressionsgebiete von Nkx6.1.

Diese Regionen sind Bestandteile komplexer funktioneller Systeme. So stehen die motorischen Augenkerne (III, IV, VI), die vestibulären Kerne (Schwalbe und Deiters) und die Zellgruppen der *Formatio reticularis* über das *mediale Längsbündel* miteinander in Verbindung. Dabei sind alle an motorischen Schaltkreisen beteiligt, die das Zusammenspiel von Augenmuskeln, Halsmuskeln und Gleichgewichtsorgan koordinieren.

34 An Reflexschaltkreisen beteiligte Regionen mit Nkx6.1-Expression

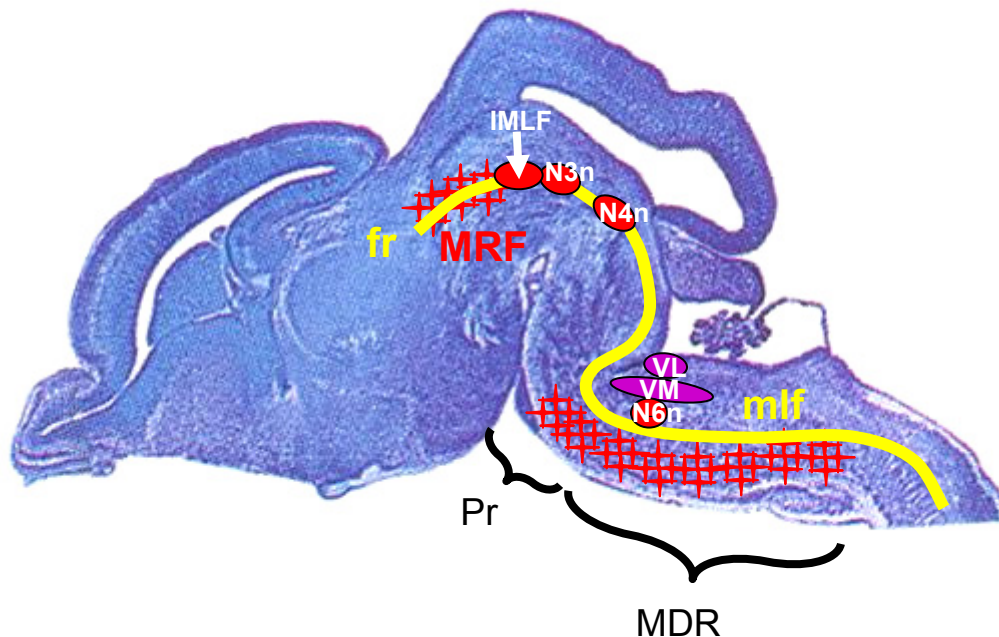


Abbildung 34: Die Abbildung zeigt eine Auswahl von Hirnnervenkernen, die Nkx6.1 exprimieren und von Faserbahnen, in deren unmittelbarer Nähe Nkx6.1 exprimiert wird. IMLF (Interstitial nucleus, medial longitudinal Fasciculus), fr (Fasciculus retroflexus/habenulo-interpeduncular tract), mlf (Fasciculus longitudinalis medialis), MRF (Formatio reticularis des Mittelhirnes), VL (Nucleus vestibularis lateralis/Deiters), VM (Nucleus vestibularis medialis/Schwalbe), Pr (pontine Formatio reticularis) MDR (medulläre Formatio reticularis). VM und VL liegen auf der hier gezeigten rostro-kaudalen Höhe, jedoch lateral der hier dargestellten paramedianen Ebene und sind daher zur Unterscheidbarkeit in dorso-ventraler Reihenfolge dargestellt. Es handelt sich um einen paramedianen Schnitt durch ein E15 Maushirnembryo modifiziert nach: Jacobowitz, D. M. und Abbott, L. C. (1997).

Ein gutes Beispiel für einen solchen Reflexschaltkreis ist der vestibulo-okuläre Reflex (VOR). Er ermöglicht, daß ein Objekt mit den Augen fixiert werden kann, auch wenn sich gleichzeitig der Kopf bewegt. So führt beispielsweise eine Linksrotation des Kopfes zu einer Reflexbewegung der Augen nach rechts. Die Abbildung 35 zeigt, wie dieser Reflexschaltkreis funktioniert und welche Strukturen daran beteiligt sind. Hierzu gehören der *Nucleus vestibularis medialis/Schwalbe* (VM), der Abduzenskern, der Okulomotoriuskern sowie der *Fasciculus medialis longitudinalis* (mlf). Wie gezeigt wurde, exprimieren alle diese Kerne Nkx6.1. Zwar exprimiert der *Fasciculus medialis longitudinalis* als Faserbahn kein Nkx6.1, jedoch verläuft er entlang von Regionen, die deutlich Nkx6.1 positiv sind, wie die *medulläre Formatio reticularis*.

4.11.1 Der vestibulo-okuläre Reflex (VOR)

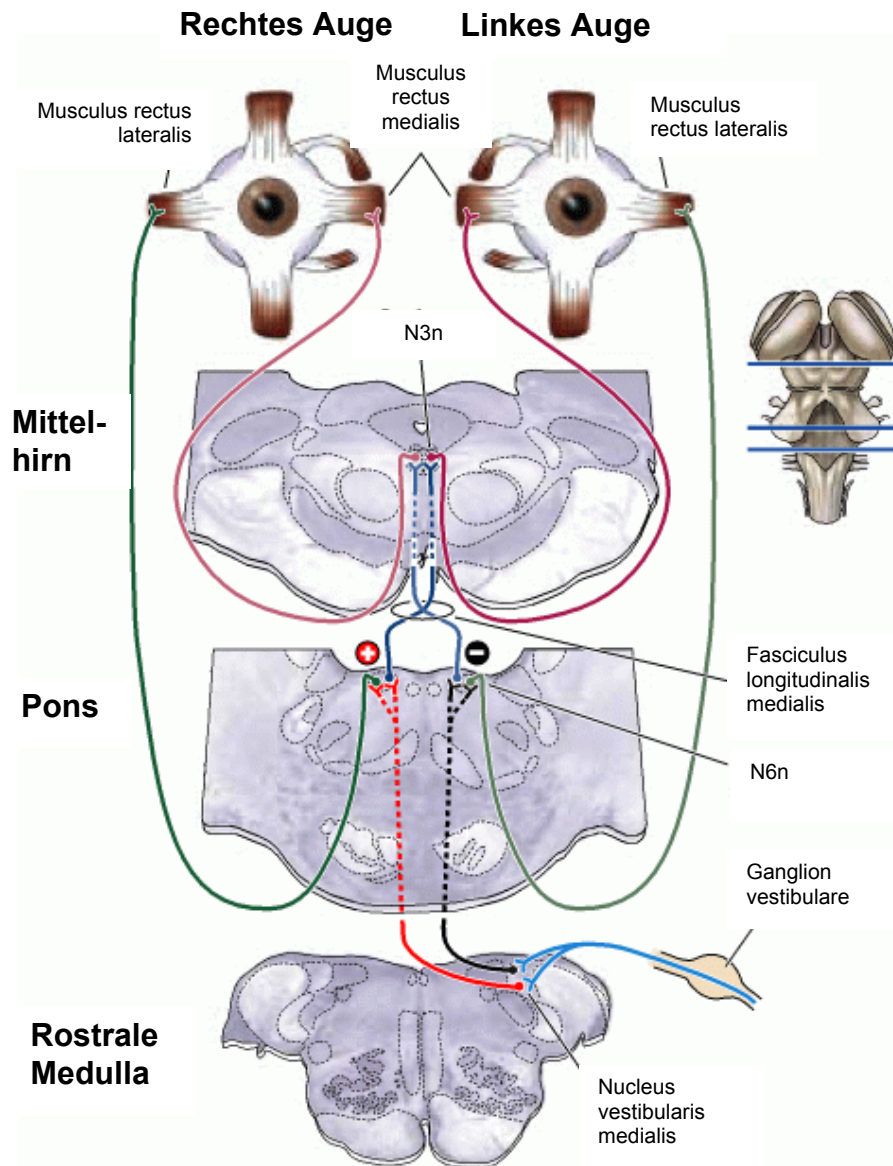


Abbildung 35: Die Basis für den vestibulo-okulären Reflex (VOR) stellen exzitatorische (**rot**) Projektionen des vestibulären Nucleus zu dem kontralateralen Abduzenskern dar, der wiederum mit dem Okulomotoriuskern (N3n) zusammenspielt. So erfordert die horizontale Bewegung beider Augen nach rechts eine Kontraktion des linken Musculus rectus medialis sowie des rechten Musculus rectus lateralis. Die vestibulären Nervenfasern aus dem linken horizontalen Bogengang (**hellblau**) projizieren zu den Nuclei vestibularis medialis und lateralis. Exzitatorische Fasern des Nucleus vestibularis medialis kreuzen zum kontralateralen Abduzenskern. Diesen wiederum verlassen zwei Arten von Axone. Bei der einen handelt es sich um Verbindungen zum Musculus rectus lateralis des rechten Auges (**grün**), bei der anderen um exzitatorische Projektionen, die die Mittellinie kreuzen und im Fasciculus medialis longitudinalis zum linken Okulomotoriuskern projizieren (**dunkelblau**), wo Neurone aktiviert werden, die den Musculus rectus medialis des linken Auges zur Kontraktion bringen (**lila**). Schließlich projizieren auch inhibitorische (**schwarz gestrichelt**) Neurone vom Nucleus vestibularis medialis zum linken Abduzenskern, wo sie direkt den Tonus des linken Musculus rectus lateralis reduzieren und indirekt auch den rechten Musculus rectus medialis relaxieren. So führen Kopfbewegungen nach links zu Augenbewegungen nach rechts. Dieses Prinzip ist in den anderen Achsen ähnlich gestaltet. Die Projektionen des rechten Vestibulariskerns wurden der besseren Übersicht wegen weggelassen. Modifiziert nach Purves 2001.

Ein weiterer Reflexschaltkreis, dessen Kerne Nkx6.1 exprimieren, ist derjenige, der die *Sakkaden* bildet. Sakkaden sind Augenbewegungen, die es ermöglichen, sich bewegende Objekte zu verfolgen. Dazu muß die Bewegungsrichtung der Augen der Amplitude der Objektbewegung angepaßt werden. Dieses wird von zwei neuronalen Schaltkreisen ermöglicht, von denen jeder die entsprechende Bewegung entlang einer bestimmten Achse generiert. Dabei werden horizontale Augenbewegungen in der *paramedianen pontinen Formatio reticularis* (PPRF) gebildet. Dazu passend wird Nkx6.1 zum Zeitpunkt E12,5 in den ventralen Abschnitten der *pontinen Formatio reticularis* exprimiert, innerhalb derer sich die PPRF befindet.

Die Expression von Nkx6.1 in den an diesen Reflexschaltkreisen beteiligten Kernen läßt vermuten, daß Nkx6.1 eine Rolle bei der Bildung von Faserbündeln im Sinne der Axonwegfindung haben könnte. Denn wie in 3.1.1 gezeigt wurde, führt ein Fehlen von Nkx6.1 zu einem defekten axonalen Wachstum (Muller, Jabs et al. 2003). Um dieses zu überprüfen, müßte nun als nächstes die Nkx6.1^{-/-}-Mutante auf Defekte des mlf untersucht werden. Dies ist übersichtsartig durch Versilberungsmethoden möglich, die den Ausfall ganzer Faserbündel darlegen könnten. Als spezifischere Methode bieten sich Immunfluoreszenz-Färbungen mit Antikörpern gegen *Neurofilament* oder der Einsatz von *β-tubulin* an, welches das axonale Cytoskelett anfärbt. Alternativ kann Dil in die beteiligten Kerne injiziert werden, welches dann im Axon zu den Zielneuronen wandert. Damit läßt sich am besten zeigen, ob die Axone ihre entsprechenden Ziele auch tatsächlich erreichen.

4.12 Nkx6.1 wird in der Glia des Sehstils (zukünftiger Nervus opticus) exprimiert

Nkx6.1-Expression ist im Sehstiel (optic stalk) in der Maus und im Huhn zu finden. Dies kann durch zweierlei Möglichkeiten erklärt werden. Die erste besteht darin, daß Nkx6.1 mRNA in den Axonen der retinalen Ganglienzellen (rGZ) entsprechend der anterograden Richtung des Vesikeltransportes fortgeleitet wird. Ein solcher Mechanismus ist für Nkx6.1 mRNA jedoch noch nicht beschrieben worden. Gegen diese Annahme spricht zudem, daß die Nkx6.1-Expression in der Maus bei allen untersuchten Stadien kurz vor den *Chiasma opticum* endet. Die Axone müßten jedoch zu späteren Stadien das Chiasma überschritten haben und in die nachfolgenden Areale der Sehbahn hineingewachsen sein. Es wäre nicht plausibel, wenn die axonale Diffusion oder der Transport von Nkx6.1 am Chiasma enden

würde.

Zweitens kann Nkx6.1 Expression im Sehnerv dadurch erklärt werden, daß es in den Vorläufern der Glia des Augenstiels exprimiert wird. Eine direkte Beteiligung von Nkx6.1 bei der Bildung von Astroglia ist bisher noch nicht beschrieben worden. Jedoch gibt es Hinweise darauf, daß dieses plausibel erscheint. So ist bekannt, daß Nkx6.1 die Entwicklung von Oligodendrozyten im sich entwickelnden Rückenmark durch die Regulation der Olig-Genexpression kontrolliert (Sussman et al., 2002; Liu et al., 2003). Zwar findet sich auch im Nervus Opticus eine Glia in Form von speziellen Astrozyten, jedoch unterscheidet sie sich von derjenigen des Rückenmarks, die aus Oligodendrozyten besteht. Da aber bekannt ist, daß Shh in den retinalen Ganglienzellen des Auges exprimiert ist und Shh ebenfalls das Expressionsmuster von Nkx6.1 im Rückenmark bestimmt, kann davon ausgegangen werden, daß auch im Auge prinzipiell molekulare Interaktionsmöglichkeiten zwischen diesen Partnern bestehen könnten. Gerade im Hinblick auf die Beteiligung von Nkx6.1 bei der Entwicklung der Oligodendrozyten im Rückenmark und seiner hiermit nachgewiesenen Expression im Sehnerv, besteht somit die Möglichkeit, daß Nkx6.1 im Zusammenspiel mit Shh ein entscheidender Faktor bei der Bildung der Glia im Sehnerv sein könnte. So wäre es naheliegend, die Nkx6.1^{-/-}-Mutante auf eine veränderte Expression astroglia-spezifischer Marker wie der Olig-Gene zu untersuchen.

Da die Nkx6.1 Expression ausschließlich auf Ebene der RNS mittels einer *in situ* Hybridisierung untersucht worden ist, läßt sich nicht zweifelsfrei feststellen, ob in den untersuchten Kernen das Nkx6.1 Protein auch tatsächlich als funktioneller Transkriptionsfaktor vorliegt. Dieses Problem besteht jedoch generell bei hier gewählten Methode der *in situ* Hybridisierung.

Vergleicht man jedoch die Ergebnisse der Antikörperfärbungen gegen Nkx6.1 mit den Resultaten der *in situ* Hybridisierung so zeigt sich, daß in frühen Entwicklungsstadien beide Methoden ähnliche Ergebnisse liefern.

Trotzdem bietet nur die Überprüfung der hier identifizierten Regionen mit Antikörperfärbungen gegen Nkx6.1 den letztendlichen Beweis für das Vorhandensein des Transkriptionsfaktors. Dieses ist jedoch deutlich aufwendiger und teurer.

4.13 Zusammenfassung/Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Nkx6.1 auch in den postmitotischen Neuronen zahlreicher motorischer Hirnnervenkerne der Maus exprimiert wird. Ebenso findet sich Nkx6.1 in den kaudalen Raphe Kernen, in weiten Bereichen der Formatio reticularis und in den vestibulären Kernen. In diesem Zusammenhang wäre eine mögliche Beteiligung von Nkx6.1 bei der Entstehung von Reflexschaltkreisen wie dem vestibulo-okulären Reflex (VOR) besonders interessant, indem Nkx6.1 auch hier, analog zu seiner Rolle in den bm Neuronen, die Bildung der korrekten axonalen Projektionen vermittelt könnte. Um dieses zu beweisen bietet sich eine eingehende Untersuchung der Projektionsgebiete derjenigen Neuronen an, die über den mlf miteinander verschaltet sind. Hier könnte der Einsatz von „carbocyanine dye tracing“ (Dil) dezidiert Fehler bei der Axonprojektion der Nkx6.1^{-/-}-Mutanten aufzeigen.

Zusätzlich läßt sich feststellen, daß die gefundenen Muster der Nkx6.1-Expression in den motorischen Kernen der Maus und im Huhn ähnlich sind. Jedoch scheint sich die Rolle von Nkx6.1 im Falle der serotonergen Neurone zwischen beiden Spezies deutlich zu unterscheiden. Darüber hinaus wird Nkx6.1 weder mit noradrenergen, dopaminergen oder auch speziell cholinergen Neuronen koexprimiert. Ob Nkx6.1 mit adrenergen, LHRH produzierenden und Substanz P immunoreaktiven Neuronen koexprimiert wird und ob es eine Rolle bei deren späteren Entwicklung spielt, müßte mit Hilfe von Koimmunofärbungen untersucht werden.

Nkx6.1 wird auch während der Entwicklung des Sehstils zum Nervus opticus exprimiert, jedoch ist seine Rolle hierbei unklar. Koimmunofärbungen und verschiedene Modelle mit Doppelmutanten aus Nkx6.1 und Olig-Genen würden hierzu weitere Erkenntnisse liefern können.

Im Hinblick auf zukünftige medizinische Anwendungen, die die Regeneration von geschädigten Hirnnervenkernen, beispielsweise mittels Transplantation, zum Ziel haben, ist das Wissen über die ablaufenden Mechanismen in postmitotischen Neuronen genauso wichtig, wie das Wissen um die Spezifizierung deren Vorläuferzellen. Denn ein Neuron kann nur dann funktionieren, wenn es die benötigten axonalen Verknüpfungen zu seinen Interaktionspartnern ausgebildet hat. Da nachgewiesen wurde, daß Nkx6.1 mindestens an der Axonprojektion der bm Neurone beteiligt ist, wird auch das funktionell homologe Gen beim Menschen eine Rolle bei der gezielten Regeneration von Nervengewebe durch die Medizin spielen können.

5. Literaturverzeichnis

- Altman, J. and Bayer, S. A.** (1980). Development of the brain stem in the rat. III. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons of the vestibular and auditory nuclei of the upper medulla. *J Comp Neurol* **194**, 877-904.
- Awatramani, R., Beesley, J., Yang, H., Jiang, H., Cambi, F., Grinspan, J., Garbern, J. and Kamholz, J.** (2000). Gtx, an oligodendrocyte-specific homeodomain protein, has repressor activity. *J Neurosci Res* **61**, 376-87.
- Basbaum, A. I. and Fields, H. L.** (1984). Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* **7**, 309-38.
- Boenninghaus H.G.** (1996) Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, 10. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Briscoe, J., Sussel, L., Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T. M., Rubenstein, J. L. and Ericson, J.** (1999). Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* **398**, 622-7.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M. and Ericson, J.** (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **101**, 435-45.
- Briscoe, J. and Ericson, J.** (2001). Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 43-9.
- Cai, J., St Amand, T., Yin, H., Guo, H., Li, G., Zhang, Y., Chen, Y. and Qiu, M.** (1999). Expression and regulation of the chicken Nkx-6.2 homeobox gene suggest its possible involvement in the ventral neural patterning and cell fate specification. *Dev Dyn* **216**, 459-68.
- Carpenter, E. M., Goddard, J. M., Chisaka, O., Manley, N. R. and Capecchi, M. R.** (1993). Loss of Hox-A1 (Hox-1.6) function results in the reorganization of the murine hindbrain. *Development* **118**, 1063-75.
- Chen, Y. H., Huang, L., Russo, A.F., Solursh, M.** (1992). Retinoic acid is enriched in Hensen's node in the early chicken embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10056-9.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H. and Beachy, P. A.** (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-13.
- Craven, S. E., Lim, K. C., Ye, W., Engel, J. D., de Sauvage, F. and Rosenthal, A.** (2004). Gata2 specifies serotonergic neurons downstream of sonic hedgehog. *Development* **131**, 1165-73.
- Dakubo, G. D., Wang, Y. P., Mazerolle, C., Campsall, K., McMahon, A. P. and Wallace, V. A.** (2003). Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog signaling is required for optic disc and stalk neuroepithelial cell development. *Development* **130**, 2967-80.
- Edvinsson, L., Degueurce, A., Duverger, D., MacKenzie, E. T. and Scatton, B.** (1983). Central serotonergic nerves project to the pial vessels of the brain. *Nature* **306**, 55-7.
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H. and Jessell, T. M.** (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* **87**, 661-73.

- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T. M. and Briscoe, J.** (1997). Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* **90**, 169-80.
- Gavalas, A., Davenne, M., Lumsden, A., Chambon, P. and Rijli, F. M.** (1997). Role of Hoxa-2 in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. *Development* **124**, 3693-702.
- Gilbert, S. F.** (2003) *Developmental Biology*, 7th ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts
- Gilland, E. and Baker, R.** (1993). Conservation of neuroepithelial and mesodermal segments in the embryonic vertebrate head. *Acta Anat (Basel)* **148**, 110-23.
- Guthrie, S. and Lumsden, A.** (1991). Formation and regeneration of rhombomere boundaries in the developing chick hindbrain. *Development* **112**, 221-9.
- Hogan, B. L. M., Thaller, C., Eichele, G.** (1992). Evidence that Hensen's node is a site of retinoic acid synthesis. *Nature* **359**, 237-241.
- Jacobowitz David M., Abbott Louise C.** (1997) *Chemoarchitectonic atlas of the developing mouse brain*. CRC press
- Kahle, W.** (2001) *Taschenatlas der Anatomie*, 7. vollständig überarbeitete Auflage, Bd III: Nervensystem und Sinnesorgane. Thieme Verlag, Stuttgart New York
- Kandel, E. J.; Schwartz, J. H.** (2000) *Principles of Neural Science* 4th ed McGraw-Hill Education
- Lee, S. K. a. P., S.L.** (2001). Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat Neurosci* **4**, 1183-18.
- Liu, R., Cai, J., Hu, X., Tan, M., Qi, Y., German, M., Rubenstein, J., Sander, M. and Qiu, M.** (2003). Region-specific and stage-dependent regulation of Olig gene expression and oligodendrogenesis by Nkx6.1 homeodomain transcription factor. *Development* **130**, 6221-31.
- Loewy, A. D. and Neil, J. J.** (1981). The role of descending monoaminergic systems in central control of blood pressure. *Fed Proc* **40**, 2778-85.
- Lu, Q. R., Sun, T., Zhu, Z., Ma, N., Garcia, M., Stiles, C.D., Rowitch, D.H.** (2002). Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/ oligodendrocyte connection. *Cell* **109**, 75-86.
- Lumsden, A. and Krumlauf, R.** (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274**, 1109-15.
- Marquardt, T., Pfaff, S. L.** (2001). Cracking the transcriptional code for cell specification in the neural tube. *Cell* **106**, 651-654.
- Mellerick, D. M. and Nirenberg, M.** (1995). Dorsal-ventral patterning genes restrict NK-2 homeobox gene expression to the ventral half of the central nervous system of Drosophila embryos. *Dev Biol* **171**, 306-16.
- Muhr, J., Andersson, E., Persson, M., Jessell, T. M. and Ericson, J.** (2001). Groucho-mediated transcriptional repression establishes progenitor cell pattern and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **104**, 861-73.
- Muller, M., Jabs, N., Lorke, D. E., Fritzsche, B. and Sander, M.** (2003). Nkx6.1 controls migration and axon pathfinding of cranial branchio-motoneurons. *Development* **130**, 5815-26.
- Müller M.** (2003) *Die Funktion des Transkriptionsfaktors Nkx6.1 bei der Entwicklung von Motoneuronen im Hirnstamm*. Biol. Dissertation. Universität Hamburg

- Novitch, B., Chen, A.I., Jessel, T.M.** (2001). Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. *Neuron* **31**, 773-89.
- Osumi, N., Hirota, A., Ohuchi, H., Nakafuku, M., Imura, T., Kuratani, S., Fujiwara, M., Noji, S. and Eto, K.** (1997). Pax-6 is involved in the specification of hindbrain motor neuron subtype. *Development* **124**, 2961-72.
- Pabst, O., Herbrand, H., Takuma, N. and Arnold, H. H.** (2000). NKX2 gene expression in neuroectoderm but not in mesodermally derived structures depends on sonic hedgehog in mouse embryos. *Dev Genes Evol* **210**, 47-50.
- Papalopulu, N. Lovell-Badge, R. , Krumlauf, R.** (1991) The Expression of murine Hox-2 genes is dependent on the differentiation pathway of and displays colinear sensitivity to retinoic acid in F9 and Xenopus embryos. *Nucleic Acids Res* **19**, 5497-5506.
- Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C. and Brunet, J. F.** (1997). Expression and interactions of the two closely related homeobox genes Phox2a and Phox2b during neurogenesis. *Development* **124**, 4065-75.
- Pattyn, A., Hirsch, M., Goridis, C. and Brunet, J. F.** (2000). Control of hindbrain motor neuron differentiation by the homeobox gene Phox2b. *Development* **127**, 1349-58.
- Pattyn, A., Vallstedt, A., Dias, J. M., Samad, O. A., Krumlauf, R., Rijli, F. M., Brunet, J. F. and Ericson, J.** (2003a). Coordinated temporal and spatial control of motor neuron and serotonergic neuron generation from a common pool of CNS progenitors. *Genes Dev* **17**, 729-37.
- Pattyn, A., Vallstedt, A., Dias, J. M., Sander, M. and Ericson, J.** (2003b). Complementary roles for Nkx6 and Nkx2 class proteins in the establishment of motoneuron identity in the hindbrain. *Development* **130**, 4149-59.
- Pei, Y. F. and Rhodin, J. A.** (1970). The prenatal development of the mouse eye. *Anat Rec* **168**, 105-25.
- Pierani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C. and Jessell, T. M.** (1999). A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* **97**, 903-15.
- Pierani, A., Moran-Rivard, L., Sunshine, M. J., Littman, D. R., Goulding, M. and Jessell, T. M.** (2001). Control of interneuron fate in the developing spinal cord by the progenitor homeodomain protein Dbx1. *Neuron* **29**, 367-84.
- Puelles, E., Rubenstein, J. L. and Puelles, L.** (2001). Chicken Nkx6.1 expression at advanced stages of development identifies distinct brain nuclei derived from the basal plate. *Mech Dev* **102**, 279-82.
- Puizillout, J. J., Gaudin-Chazal, G., Sayadi, A. and Vigier, D.** (1981). Serotonergic mechanisms and sleep. *J Physiol (Paris)* **77**, 415-24.
- Purves, Dale; Augustine, George J.; Fitzpatrick, David; Katz, Lawrence C.; LaMantia, Anthony-Samuel; McNamara, James O.; Williams, S. Mark. Sunderland (MA)** (2001) Sinauer Associates, Inc. ; Neuroscience, 2nd ed
- Qiu, M., Shimamura, K., Sussel, L., Chen, S. and Rubenstein, J. L.** (1998). Control of anteroposterior and dorsoventral domains of Nkx-6.1 gene expression relative to other Nkx genes during vertebrate CNS development. *Mech Dev* **72**, 77-88.
- Rubenstein, J. L. and Beachy, P. A.** (1998). Patterning of the embryonic forebrain. *Curr Opin Neurobiol* **8**, 18-26.

- Rudnick, A., Ling, T. Y., Odagiri, H., Rutter, W. J. and German, M. S. (1994). Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12203-7.
- Sander, M., Paydar, S., Ericson, J., Briscoe, J., Berber, E., German, M., Jessell, T. M. and Rubenstein, J. L. (2000a). Ventral neural patterning by Nkx homeobox genes: Nkx6.1 controls somatic motor neuron and ventral interneuron fates. *Genes Dev* **14**, 2134-9.
- Sander, M., Sussel, L., Connors, J., Scheel, D., Kalamaras, J., Dela Cruz, F., Schwitzgebel, V., Hayes-Jordan, A. and German, M. (2000b). Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* **127**, 5533-40.
- Scott, M. P., Tamkun, J. W. and Hartzell, G. W. I. (1989). The structure and function of the homeodomain. *Biochim. Biophys. Acta* **989**, 25-48.
- Scott, M. P. (1992). Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell* **71**, 551-553.
- Stockmeier, C. A. (1997). Neurobiology of serotonin in depression and suicide. *Ann N Y Acad Sci* **836**, 220-32.
- Sussman, C. R., Davies, J. E. and Miller, R. H. (2002). Extracellular and intracellular regulation of oligodendrocyte development: roles of Sonic hedgehog and expression of E proteins. *Glia* **40**, 55-64.
- Takahashi, M. and Osumi, N. (2002). Pax6 regulates specification of ventral neurone subtypes in the hindbrain by establishing progenitor domains. *Development* **129**, 1327-38.
- Vallstedt, A., Muhr, J., Pattyn, A., Pierani, A., Mendelsohn, M., Sander, M., Jessell, T. M. and Ericson, J. (2001). Different levels of repressor activity assign redundant and specific roles to Nkx6 genes in motor neuron and interneuron specification. *Neuron* **31**, 743-55.
- van Doorninck, J. H., van Der Wees, J., Karis, A., Goedknecht, E., Engel, J. D., Coesmans, M., Rutteman, M., Grosveld, F. and De Zeeuw, C. I. (1999). GATA-3 is involved in the development of serotonergic neurons in the caudal raphe nuclei. *J Neurosci* **19**, RC12.
- van Praag, H. M. and Korf, J. (1974). Serotonin metabolism in depression: clinical application of the probenecid test. *Int Pharmacopsychiatry* **9**, 35-51.
- Wallace, V. A. and Raff, M. C. (1999). A role for Sonic hedgehog in axon-to-astrocyte signalling in the rodent optic nerve. *Development* **126**, 2901-9.
- Waskiewicz, A. J., Rikhof, H. A. and Moens, C. B. (2002). Eliminating zebrafish pbx proteins reveals a hindbrain ground state. *Dev Cell* **3**, 723-33.
- Wessendorf, M. W., Proudfit, H. K. and Anderson, E. G. (1981). The identification of serotonergic neurons in the nucleus raphe magnus by conduction velocity. *Brain Res* **214**, 168-73.
- Wiklund, L. and Bjorklund, A. (1980). Mechanisms of regrowth in the bulbospinal serotonin system following 5,6-dihydroxytryptamine induced axotomy. II. Fluorescence histochemical observations. *Brain Res* **191**, 109-27.
- Zhou, Q., Anderson, D.J. (2002). The bHLH transcription factors Olig1 and Olig2 couple neuronal and glia subtype specification. *Cell* **109**, 61-73.

Danksagung

Ich danke dem Direktor des ZMNH, Prof T. Jensch, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut durchführen zu dürfen.

Ebenfalls danke ich Prof. D. Lorke vielmals für die Hinweise zur Analyse der histologischen Schnitte.

Ganz besonderer Dank geht an meine Doktormutter Maïke Sander für die wissenschaftliche Betreuung und die Idee zu diesem zweiten Projekt.

Für die vielen praktischen Labortipps sowie für die Einleitung zum ersten Projekt, möchte ich Kirsten Kuhlbrodt danken.

Myriam Müller war mir eine große Hilfe bei der Einweisung in die hier verwendeten Methoden.

Auch Shelly Nelson und Oleg Lioubinski waren mir stets behilflich.

Schließlich möchte ich noch meinen Eltern Irene und Alice Bise für die großartige moralische und finanzielle Unterstützung danken.

Lebenslauf

Name	Normund Jabs	Adresse	Neubertstraße 21
Geburtsdatum	18. August 1975		01307 Dresden
Geburtsort	Riga (Lettland)		
Familienstand	ledig	E-Mail	normund@gmx.de

Praktisches Jahr

1. Terial Innere	McGill University, General Jewish Hospital, Montreal, Kanada II. Medizin, Allgemeines Krankenhaus Barmbek, Hamburg
2. Terial Augenheilkunde	Augenabteilung, Allgemeines Krankenhaus Barmbek, Hamburg
3. Terial Chirurgie	I. Chirurgie, Allgemeines Krankenhaus Barmbek, Hamburg

Famulaturen

2/2003	Neurologie am Urban Krankenhaus, Berlin
9/2001	Strahlendiagnostik am Albers-Schönberg-Institut, AK St. Georg
8/2001	Zentrum für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf und Halschirurgie des AK St. Georg
2/2001-4/2001	Augenklinik und Poliklinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf

Doktorarbeit

2001-2004	Thema: „Expressionsanalyse des Transkriptionsfaktors Nkx6.1“ am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) publiziert in Development 130, 5815-26.
-----------	---

Ausbildung

1996-2004	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
1995-1996	Rettungssanitäter während des Zivildienstes beim Roten Kreuz
1986-1995	Gymnasium Meiendorf
1982-1986	Grundschule

Abschlüsse

2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1998	Physikum
1995	Abitur

Normund Jabs

Dresden, den 23. Januar 2005

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: *Normund Jabs*
Normund Jabs