

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Funktionen des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Bcl11b während der Entwicklung des Hippocampus untersucht. Bcl11b ist während der Entwicklung und im adulten Hippocampus exprimiert. Mit Hilfe histologischer Methoden wurde der Phänotyp von Mäusen mit einer Vorderhirn-spezifischen Mutation von Bcl11b charakterisiert und die Neurogenese und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen des Gyrus dentatus während der frühen postnatalen Entwicklung genauer untersucht. Zur Identifizierung potentieller Zielgene, deren Expression durch Bcl11b reguliert wird, wurde außerdem eine genomweite Expressionsanalyse mit Microarrays durchgeführt.

Der Hippocampus besitzt eine wichtige Funktion bei Lern- und Gedächtnisprozessen. Es wurden daher abschließend Experimente bezüglich des emotionalen und kognitiven Verhaltens Bcl11b mutanter Tiere durchgeführt.

3.1 Bcl11b Expression im Hippocampus

Zur Analyse der Expression von Bcl11b wurden Antikörper gegen das Bcl11b Protein hergestellt (s. 2.2.7). Abbildung 3-1 zeigt die Gen- und Protein-Expression von Bcl11b in verschiedenen Stadien des sich entwickelnden Hippocampus. Das mit dem Antikörper immunhistologisch detektierte Expressionsmuster im Hippocampus stimmt mit dem durch *in situ*-Hybridisierung nachgewiesenem Bcl11b Gen-Expressionsmuster überein.

Pränatal zum Zeitpunkt E15 (Abb.3-1 A, B) ist Bcl11b im Hippocampus breit in den Zellen des Ammonshorn exprimiert. In der sich entwickelnden Anlage des Gyrus dentatus, die zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich aus einwandernden, unreifen Zellen besteht, die aus der Subventrikularzone des Neuroepithels abstammen, ist Bcl11b in wenigen, verstreut im Gyrus dentatus liegenden Zellen exprimiert. Mit zunehmender Reifung der Zellen nimmt auch die Expression von Bcl11b in Zellen des Gyrus dentatus zu. Zum Zeitpunkt E18 (Abb.3-1 C, D) ist Bcl11b hauptsächlich im dorsalen Blatt der sich entwickelnden Körnerzellschicht exprimiert, die Region, in der sich die älteren, in ihrer Reifung fortgeschrittenen Zellen befinden. Im ventralen Blatt des Gyrus dentatus, wo die Reifung der Zellen später einsetzt, sind keine Bcl11b exprimierenden Zellen zu erkennen. Postnatal (Abb.3-1 E-H) zeigt Bcl11b eine starke Expression in der sich jetzt deutlich abgrenzenden Körnerzellschicht des Gyrus dentatus. Im Hilus des Gyrus dentatus sind dagegen keine Bcl11b exprimierenden Zellen zu identifizieren. In der zellarmen Molekularschicht, in der

sich hauptsächlich die Dendriten der Zellen aus der Körnerzellschicht und dem Hilus, sowie terminale axonale Verzweigungen unterschiedlicher Herkunft befinden, sind vereinzelt, einige wenige Bcl11b exprimierende Zellen erkennbar, bei denen es sich um verschiedene Interneurontypen oder sog. MOPP Zellen (molecular layer perforant path-associated cell) handeln könnte, aber auch um nicht-neuronale Zellen. Des Weiteren ist Bcl11b in den Pyramidenzellen der Hippocampusrinde in den Regionen CA1 und CA2, jedoch nicht in CA3 stark exprimiert.

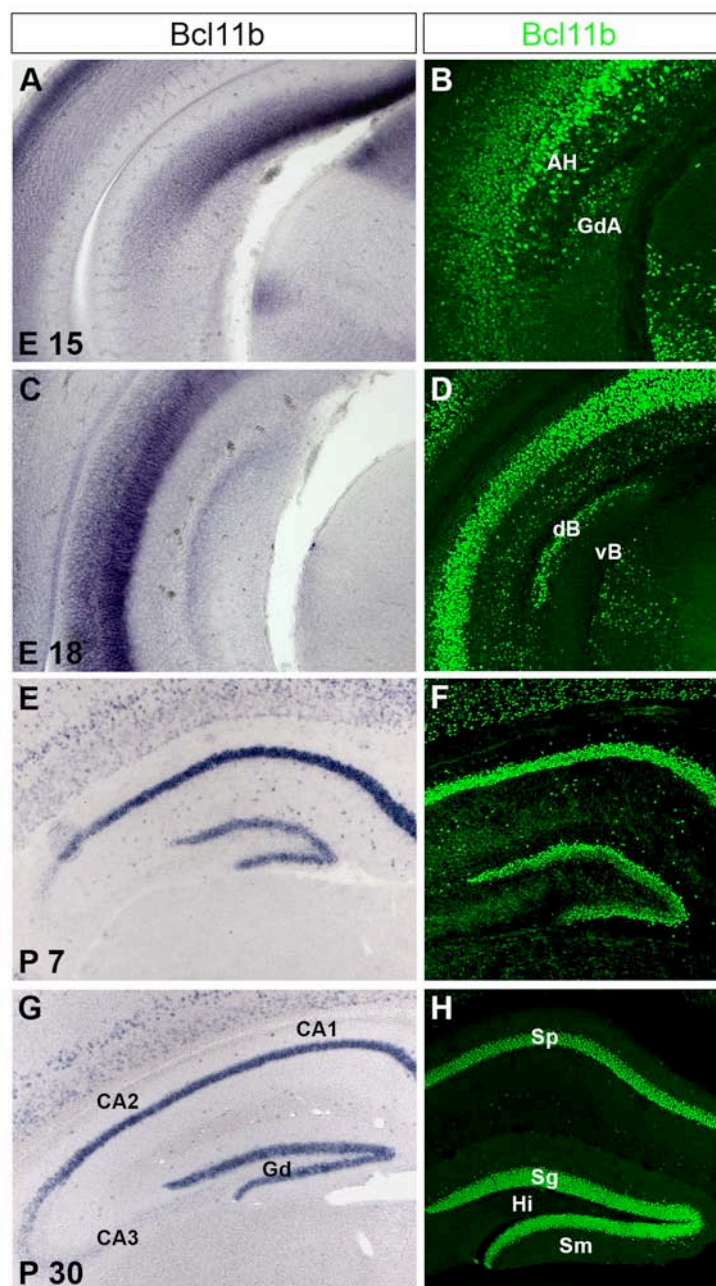


Abb.3-1 Bcl11b Expression im Hippocampus.

(A,C,E,G) *In situ*-Hybridisierung mit Wildtyp Hippocampus Gewebe unterschiedlicher Entwicklungsstadien mit einer Bcl11b Sonde und (B,D,F,H) immunhistologische Analyse mit Antikörpern gegen Bcl11b. (A, B) Zum Zeitpunkt E15 ist Bcl11b in Zellen des Ammonshorn (AH) und in einigen wenigen Zellen innerhalb der sich entwickelnden Anlage des Gyrus dentatus (GdA) exprimiert. Mit zunehmender Reifung der Körnerzellen nimmt auch die Expression von Bcl11b im Gyrus dentatus zu. (C,D) Am Tag E18 ist Bcl11b in Zellen des dorsalen Blattes (dB) des Gyrus dentatus, aber nicht im ventralen Blatt (vB) exprimiert. (E-H) Postnatal zeigt Bcl11b eine sehr breite Expression in Zellen des sich jetzt deutlich abgrenzenden Stratum granulosum (Sg). Im Hilus (Hi) sind keine, im Stratum moleculare (Sm) des Gyrus dentatus einige wenige Bcl11b positive Zellen zu beobachten. Im Ammonshorn wird Bcl11b verstärkt im Stratum pyramidale (Sp) der Regionen CA1 und CA2, jedoch nicht in CA3 exprimiert.

Ein Vergleich der Proteinexpression von Bcl11b mit der des verwandten Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Bcl11a, die eine Sequenzübereinstimmung von 95% in der Peptidsequenz ihrer Zinkfingerdomänen aufweisen (Avram *et al.*, 2002), zeigt für beide Proteine unterschiedliche Expressionsmuster im Hippocampus (Abb.3-2), was die Spezifität der hergestellten Bcl11b Antikörper nachweist: Bcl11a zeigt im Gegensatz zu Bcl11b nur eine schwache Expression im Gyrus dentatus, aber eine starke Expression in der CA3 Region der Hippocampusrinde, in der keine Bcl11b exprimierenden Zellen nachzuweisen sind. Eine überlappende Expression kann für beide Proteine in den Regionen CA1 und CA2 des Ammonshorns nachgewiesen werden.

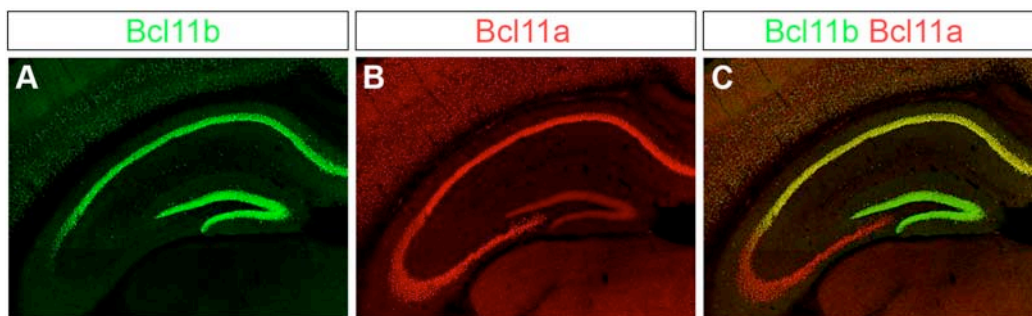


Abb.3-2 Koexpressionsanalyse von Bcl11a und Bcl11b im Hippocampus.

Die immunhistologische Analyse der Proteinexpression von Bcl11a (rot) und Bcl11b (grün) zeigt für die verwandten Transkriptionsfaktoren unterschiedliche Expressionsmuster im Hippocampus am Tag P30. (A) Bcl11b ist stark im Gyrus dentatus und in der CA1 und CA2 Region des Ammonshorns exprimiert, jedoch nicht in CA3. (B) Bcl11a ist im Gegensatz zu Bcl11b nur schwach in Gyrus dentatus, aber stark in allen Regionen des Ammonshorns exprimiert (B). Beide Proteine werden von Pyramidenzellen der CA1 und CA2 Regionen koexprimiert (gelbe Signale, C).

Zur genaueren Charakterisierung der Bcl11b exprimierenden Zellen im Gyrus dentatus wurde die Bcl11b Expression immunhistologisch mit der von verschiedenen Markern verglichen, die während der Entwicklung des Gyrus dentatus von differenzierenden oder reifen Körnerzellen exprimiert werden.

NeuroD ist ein Transkriptionsfaktor, der von neugeborenen, migrierenden und sich differenzierenden, unreifen Neuronen exprimiert wird. Eine nur sehr schwache NeuroD Expression wird in reifen Körnerzellen aufrechterhalten (Pleasure *et al.*, 2000a). Pränatal am Tag 18 exprimieren alle Bcl11b positiven Zellen, die ausschließlich im dorsalen Blatt der sich entwickelnden Gyrus dentatus Anlage lokalisiert sind, auch NeuroD. Bcl11b zeigt dagegen keine Kolokalisation mit NeuroD in den frühen, in die Anlage des Gyrus dentatus einwanderenden Zellen, die vom Neuroepithel abstammen und sich noch außerhalb des Gyrus dentatus auf ihrem Migrationsweg befinden (Abb.3-3 A, D). Postnatal erfolgt die

Neurogenese der Körnerzellen vermehrt aus einem Pool an mitotisch aktiven Vorläuferzellen, die sich zunächst im Hilus, später ab P10 in der sich bildenden Subgranularschicht zwischen Hilus und innerer Körnerzellschicht befinden. Auf diese Weise entsteht innerhalb der Körnerzellschicht ein Gradient an neugeborenen Vorläuferzellen, die sich in der inneren Körnerzellschicht befinden, und älteren, reiferen Zellen, die sich in den äußeren Körnerzellschichten befinden. Postnatal am Tag P7 zeigt eine Subpopulation der Bcl11b positiven Zellen, die sich hauptsächlich in der mittleren Körnerzellschicht befinden, eine starke Koexpression mit NeuroD. Die in ihrer Reifung fortgeschrittenen Bcl11b positiven Zellen in der äußeren Körnerzellschicht koexprimieren nur noch sehr schwach NeuroD. Andererseits finden sich in der inneren Körnerzellschicht sowie am Übergang zum Hilus, vermehrt NeuroD exprimierende Zellen, die kein Bcl11b ausprägen (Abb.3-3 B, E). Am Tag P30 ist eine starke NeuroD Expression auf Zellen der inneren Körnerzellschicht und der Subgranularschicht reduziert. Einige dieser unreifen NeuroD positiven Zellen der inneren Körnerzellschicht koexprimieren Bcl11b (Abb.3-3 C, F).

Doublecortin (Dcx) ist ein weiterer Marker für neugeborene, migrierende und sich differenzierende unreife Neurone und kann sowohl im Zytoplasma der Somata als auch in den neuronalen Zellfortsätzen nachgewiesen werden. Einige der Dcx positiven Zellen in der inneren Körnerzellschicht zeigen eine Koexpression mit Bcl11b (Abb.3-3 G, J).

Der neuronale Marker NeuN wird sowohl von postmitotischen, unreifen als auch reifen Körnerzellen exprimiert, Calbindin dagegen ist ausschließlich ein Marker für reife Körnerzellen im Gyrus dentatus (Baimbridge, 1992). Alle Körnerzellen, die diese späten Marker NeuN bzw. Calbindin ausprägen sind auch Bcl11b positiv. Mit zunehmender Reifung der Körnerzellschicht nimmt die Anzahl an Bcl11b/NeuN bzw. Calbindin koexprimierenden Zellen zu. Während zum Zeitpunkt P7 hauptsächlich die Bcl11b exprimierenden Zellen der äußersten Körnerzellschicht NeuN/Calbindin koexprimieren (Abb.3-3 H, I), prägen zum Zeitpunkt P30 fast alle Bcl11b positiven Zellen in der gesamten Breite der Körnerzellschicht auch NeuN bzw. Calbindin aus (Abb.3-3 K, L).

Zusammenfassend zeigt die Expressionsanalyse, dass Bcl11b sowohl von einigen unreifen, sich differenzierenden Zellen exprimiert wird, als auch in allen reifen Körnerzellen nachgewiesen werden kann. Bcl11b wird nicht von den frühen, migrierenden Vorläuferzellen außerhalb des Gyrus dentatus exprimiert, sondern erst mit zunehmender Differenzierung der Zellen im Gyrus dentatus fangen diese an, Bcl11b auszuprägen.

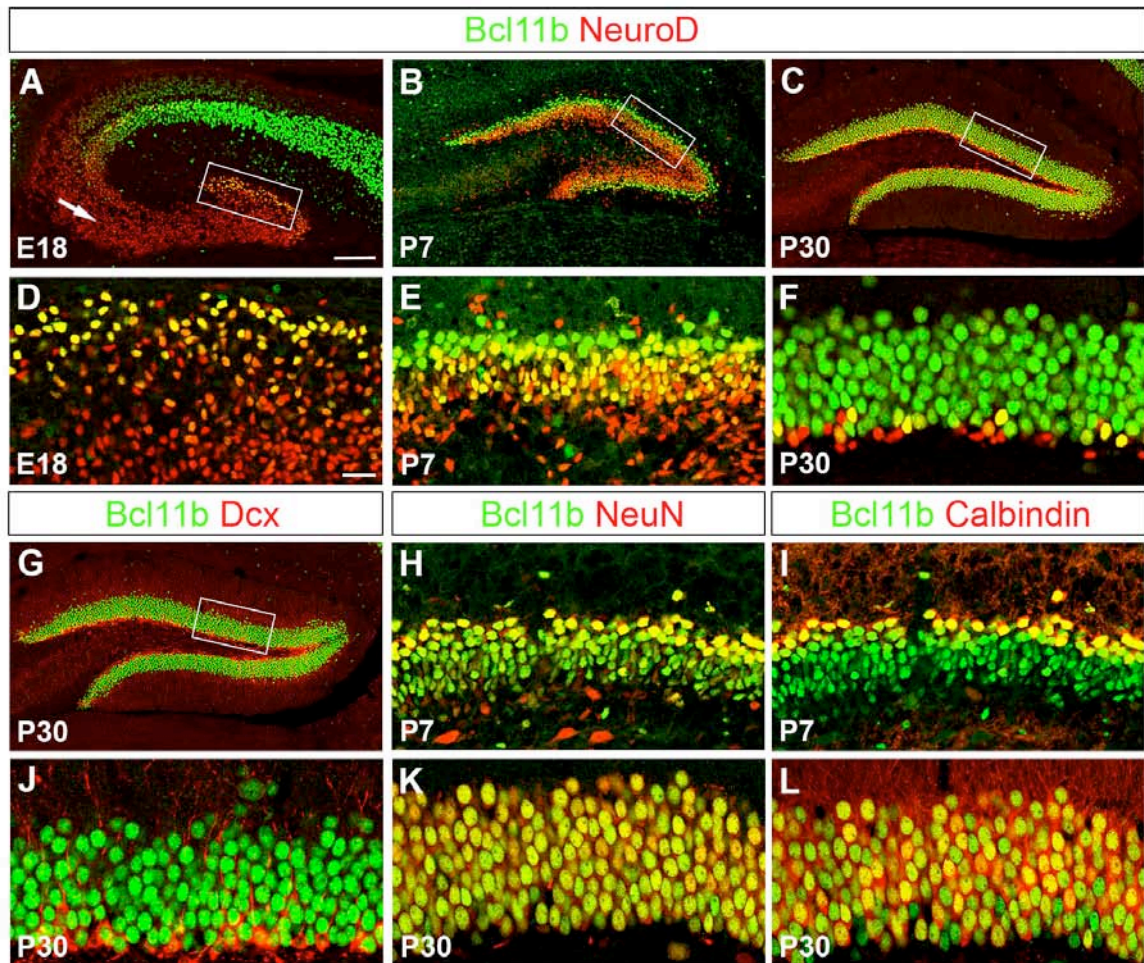


Abb.3-3 Bcl11b wird sowohl von differenzierenden, unreifen als auch reifen Körnerzellen exprimiert.

(A-F) Immunhistologische Analyse der Expression von Bcl11b (grün) und NeuroD (rot) im Gyrus dentatus von Wildtyp Mäusen der Entwicklungsstadien E18, P7 und P30. Die Überlagerung der grünen und roten Signale ergibt ein gelbes Signal. (A,D) Am Tag E18 exprimieren alle Bcl11b positiven Zellen im dorsalen Blatt der sich entwickelnden Anlage des Gyrus dentatus NeuroD. Es zeigt sich keine Koexpression in den aus der Subventrikularschicht in den Gyrus dentatus einwandernden, frühen NeuroD positiven Zellen (Pfeil, A). (B,E) Am Tag P7 sind koexprimierende Zellen hauptsächlich in der mittleren Region der Körnerzellschicht zu beobachten. (C, F) Am Tag P30 koexprimieren noch einige der jetzt in ihrer Anzahl reduzierten NeuroD positiven Zellen der inneren Körnerzellschicht Bcl11b. (G, J) Expression von Bcl11b (grün) und Doublecortin (Dcx; rot) im Gyrus dentatus von Wildtyp Mäusen am Tag P30. Einige der Dcx positiven Zellen in der innersten Körnerzellschicht exprimieren auch Bcl11b. (H, K) Antikörperfärbung gegen Bcl11b (grün) und dem neuronalen Marker NeuN (rot) bzw. (I, L) und Calbindin (rot) in der Körnerzellschicht am Tag P7 und P30. Alle Zellen, die Calbindin und/oder NeuN exprimieren sind auch Bcl11b positiv. Balken: 100 μ m (A), 20 μ m (D).

3.2 Konditionelle Mutagenese von Bcl11b im Vorderhirn der Maus

Mäuse mit Null-Mutationen von Bcl11b sterben unmittelbar nach der Geburt (Wakabayashi *et al.*, 2003a). Um die Funktionen von Bcl11b auch während der postnatalen Entwicklung des Hippocampus untersuchen zu können, wurden Mäuse mit einer konditionellen Mutation von Bcl11b im Vorderhirn eingesetzt, die von Pentao Liu im Labor von Neal Copeland (Frederick, USA) hergestellt und mir im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt wurden.

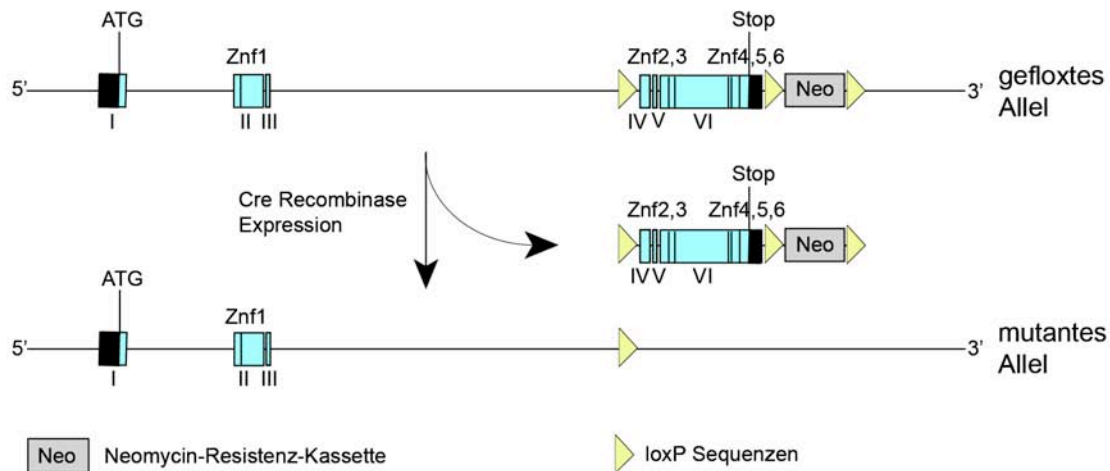


Abb.3-4 Mutagenese des Bcl11b Gens.

Schematische Darstellung des Bcl11b Gen-Locus von Bcl11b flox Mäusen. Mit Hilfe des Cre/LoxP Systems wurde eine konditionelle Mutation in den Bcl11b Locus dieser Mäuse eingeführt. Die von den loxP Sequenzen flankierten Exons IV-VI kodieren die für die Funktion des Transkriptionsfaktors Bcl11b essentiellen Zinkfinger Domänen 2-6 (Znf, in den Exons durch senkrechte Striche dargestellt). Die Expression einer Cre Rekombinase induziert eine Rekombination und Deletion der von den loxP Sequenzen flankierten Exons.

Abbildung 3-4 zeigt den Gen-Locus von Bcl11b flox Mäusen. Bei diesen Mäusen sind im Bcl11b-Allel die Exons 4-6 von loxP Sequenzen flankiert (gefloxtes Allel) und im 3' UTR ist eine Neomycin-Kassette inseriert. Homozygot gefloxtes Bcl11b Mäuse weisen phänotypisch keine Auffälligkeiten auf. Erst durch die gleichzeitige Expression der Cre Rekombinase in diesen Mäusen erfolgt eine Rekombination und Deletion der von den loxP Sequenzen flankierten Exons.

Zur Erzeugung einer Vorderhirn-spezifischen Mutation von Bcl11b wurden Bcl11b flox/flox Mäuse mit Emx-1Cre Mäusen verpaart, bei denen die Cre Rekombinase unter der Kontrolle des Promotors des Emx-1 Gens exprimiert wird. Die Emx-1 Expression ist auf kortikale Regionen des Telencephalon beschränkt, wo sie sowohl in mitotischen Vorläuferzellen als auch in postmitotischen Zellen erfolgt (Gorski *et al.*, 2002).

Zur Charakterisierung der *Emx-1Cre* Expression wurden *Emx-1Cre* Mäuse mit der Reporter Maus Linie R26R (Soriano, 1999) verpaart. In diesen Mäusen wird bei einer Cre induzierten Rekombination β -Galaktosidase exprimiert. Die β -Galaktosidase Färbung in Abbildung 3-5 zeigt, dass durch *Emx-1Cre* eine gewebespezifische Rekombination sowohl im Neocortex als auch im gesamten Hippocampus induziert wird.

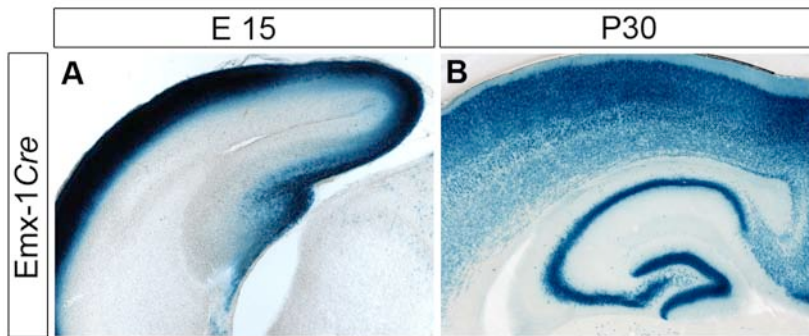


Abb.3-5 *lacZ* Expression nach *Emx-1Cre* induzierter Rekombination im Telencephalon.

β -Galaktosidase Färbung von Gehirnen von *Emx-1Cre*; R26R Mäusen der Stadien E15 und P30. In R26R Mäusen bewirkt die Cre-induzierte Rekombination die Expression der von *lacZ* kodierten β -Galaktosidase. (A) *Emx-1Cre* ist pränatal zum Zeitpunkt E15 im Neocortex und in Zellen der sich entwickelnden Anlage des Gyrus dentatus exprimiert. (B) Auch postnatal (P30) erfolgt eine *Emx-1Cre* induzierte Rekombination im Neocortex sowie in Zellen der Hippocampusrinde und im Gyrus dentatus.

Aus der Verpaarung von *Bcl11b* flox/+; *Emx-1Cre* Tieren gehen homozygote *Bcl11b* flox/flox; *Emx-1Cre* Tiere hervor. *Bcl11b* flox/flox; *Emx-1Cre* Tiere (nachfolgend als *Bcl11b* Mutanten bezeichnet) sind lebensfähig. Fast alle Mutanten zeigen deutliche, wenn auch unterschiedlich stark ausgeprägte Wachstumsdefizite im Vergleich zu Kontrolltieren. Die meisten mutanten Mäuse erreichen das adulte Alter, ca. 30% der mutanten Tiere sterben 4-5 Wochen nach der Geburt, deren Ursachen aber nicht bekannt und nicht weiter untersucht worden sind. Darüber hinaus kann man bei den Mutanten eine auffällige Hyperaktivität beobachten.

Zur Überprüfung der *Emx-1Cre* induzierten Deletion der *Bcl11b* flox-Allele analysierte ich die *Bcl11b* Protein Expression im Hippocampus von *Bcl11b* Mutanten (Abb.3-6). Die immunhistologische Analyse mit Antikörpern gegen *Bcl11b* zeigt, dass im Vergleich zu den Kontrollen in den Mutanten in den Zellen der Hippocampusrinde und im Gyrus dentatus kein *Bcl11b* Protein mehr nachweisbar ist.

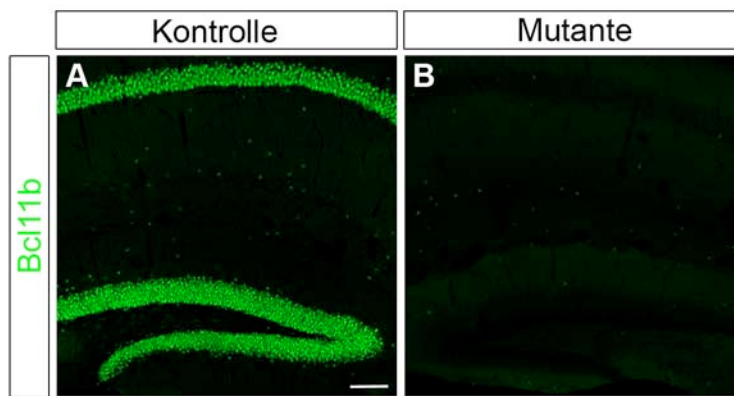


Abb.3-6 Mutation von Bcl11b im Hippocampus.

Immunfärbung im Hippocampus von Bcl11b Mutanten und Kontrolltieren des Stadiums P30 mit Antikörpern gegen Bcl11b. Im Vergleich zu den Kontrolltieren ist in Bcl11b Mutanten in den Pyramidenzellen der Hippocampusrinde und den Körnerzellen des Gyrus dentatus kein Bcl11b Protein mehr nachweisbar. Balken: 100µm

3.3 Histologische Analyse des Hippocampus Bcl11b mutanter Mäuse

Um den Phänotyp der Bcl11b Mutation im Hippocampus zu bestimmen, habe ich zunächst die Entwicklung des Hippocampus in Bcl11b Mutanten histologisch untersucht. Hierfür habe ich die Morphologie und den zellulären Aufbau des Hippocampus von Bcl11b Mutanten und Kontrolltieren verschiedener Entwicklungsstadien mittels Kresylviolett-färbungen vergleichend analysiert.

3.3.1 Bcl11b mutante Tiere zeigen postnatal morphologische Veränderungen im Gyrus dentatus

Pränatal zum Zeitpunkt E18 lassen sich keine morphologisch auffälligen Unterschiede im gesamten Hippocampus, einschließlich der sich entwickelnden Anlage des Gyrus dentatus zwischen Mutanten und Kontrollen beobachten (Abb.3-7 A, B).

Postnatal zum Zeitpunkt P7 ist zwar die grobe Architektur des Hippocampus mit seinem charakteristischen Zellschichtenaufbau normal entwickelt (Abb.3-7 C, D), es lassen sich aber morphologische Veränderungen in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus erkennen (Abb.3-7 E-H). Die Verteilung und Anordnung der Zellen ist verändert. Die Körnerzellsomata sind im Vergleich zur Kontrolle weniger dicht gepackt und lassen keine geordnete, palisadenartige, enge Aneinanderreihung erkennen, sondern liegen weiter auseinander. Die scharfe Abgrenzung der in der Kontrolle als kompaktes Band zu sehenden Körnerzellschicht zum Hilus bzw. zur Molekularschicht ist in den Mutanten unregelmäßig und nicht sehr deutlich zu erkennen. Diese morphologischen Veränderungen in der Verteilung der Körnerzellen zeigen teilweise ähnliche Merkmale, wie sie bei einer Körnerzelldispersion zu beobachten sind. Die Körnerzelldispersion wurde erstmalig bei Patienten mit Temporal-Lappen-Epilepsie in Verbindung mit einer Ammonshornsklerose

beschrieben sowie bei Nagetieren, bei denen durch Kainatsäure-Injektionen künstlich epileptische Anfälle ausgelöst wurden. (Houser, 1990; Cronin *et al.*, 1988; Bouillert *et al.*, 1999). Darüber hinaus kann man in den Mutanten eine veränderte Morphologie der Körnerzellsomata beobachten. Viele der Zellen sind kleiner, runder und dunkler gefärbt als die ovoid-förmigen Zellkörper in den Kontrollen (Abb.3-7 G, H).

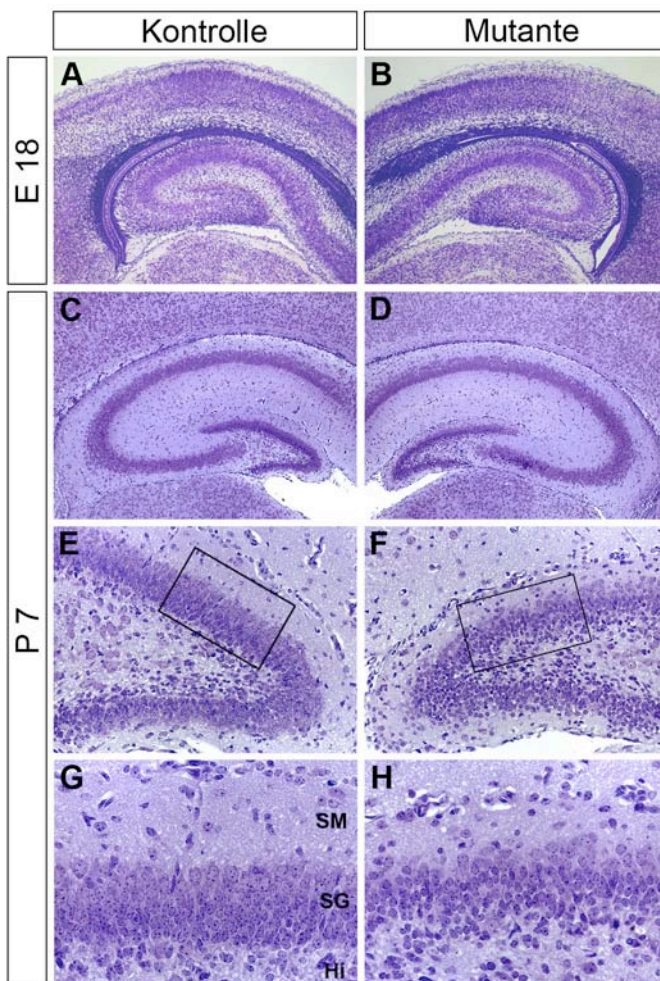


Abb.3-7 Bcl11b Mutanten zeigen postnatal eine veränderte Morphologie in der Körnerzellschicht.

Kresylviolett-färbungen auf koronalen Hippocampusschnitten von Kontrolltieren (A, C, E, G) und Bcl11b Mutanten (B, D, F, H). (A, B) Pränatal am Tag E18 lassen sich keine morphologisch auffälligen Veränderungen im gesamten Hippocampus von Bcl11b mutanten Tieren beobachten. (C-H) Postnatal am Tag P7 ist zwar die grobe Architektur des Hippocampus mit seinen charakteristischen Zellschichten in den Mutanten unverändert, im Gyrus dentatus Bcl11b mutanter Tiere lassen sich aber bei erhöhter Vergrößerung (F, H) Anzeichen einer Körnerzelldispersion erkennen: die Zellsomata im Stratum granulosum (SG) liegen weiter voneinander entfernt, und zeigen nicht wie in der Kontrolle (E,G) eine dichte und in Palisaden angeordnete, enge Aneinanderreihung; die Abgrenzung des Stratum granulosum zum Hilus (Hi) und zum Stratum moleculare (SM) ist unregelmäßig und unscharf im Vergleich zum kompakten Körnerzellband der Kontrolle.

3.3.2 In Bcl11b mutanten Tieren ist die Anzahl der Körnerzellen reduziert und der Gyrus dentatus verkleinert

Die weitere histologische Analyse zeigt, dass die morphologischen Veränderungen der Körnerzellschicht sich auch 30 Tage nach der Geburt in den Mutanten beobachten lassen, zu einem Zeitpunkt, wenn die Entwicklung der Körnerzellschicht weitgehend abgeschlossen sein sollte (Jones *et al.*, 2003). Es ist weiterhin zu erkennen, dass der Gyrus dentatus insgesamt verkleinert ist. Insbesondere die Molekularschicht des ventralen Blattes

ist viel schmaler im Vergleich zur Kontrolle (Abb.3-8 A, B, D, E). Die Quantifizierung dieser Beobachtungen bestätigt, dass die Fläche des Gyrus dentatus um 40% ($p=0,005$) und die Anzahl der Körnerzellen um 33% ($p=0,015$) signifikant in den Mutanten reduziert sind (Abb.3-8 C, F).

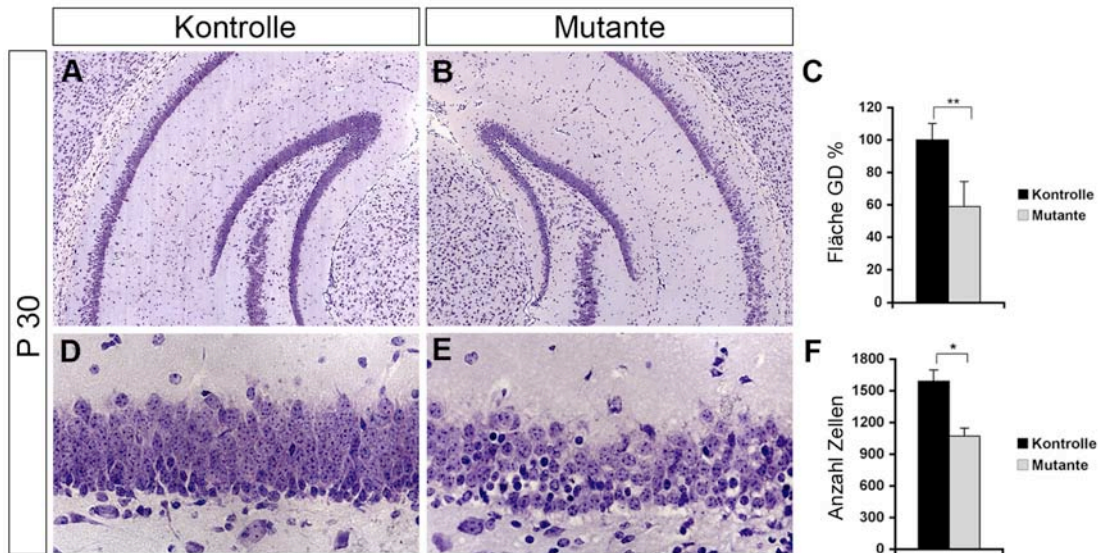


Abb.3-8 Bcl11b Mutanten zeigen eine reduzierte Körnerzellzahl und haben einen verkleinerten Gyrus dentatus.

(A, B, D, E) Kresylviolett-färbungen auf koronalen Hippocampusschnitten von Bcl11b Mutanten (B, E) und Kontrolltieren (A, D) am Tag P30. In den Mutanten ist die Fläche des Gyrus dentatus verkleinert und die Anzahl an Zellen in der Körnerzellschicht reduziert. (C) Quantifizierung der Fläche des Gyrus dentatus (GD; $p=0,005$; $n=3$) bzw. (F) der Zellen in der Körnerzellschicht ($p=0,015$; $n=3$). (D, E) Ausschnitt der ventralen Körnerzellschicht. Die Zellen in den Mutanten sind weniger dicht gepackt als in den Kontrollen und einige zeigen eine veränderte Morphologie. Sie sind kleiner, runder und dunkler gefärbt.

Ursache für die in den Mutanten beobachtete Reduktion der Körnerzellzahl könnte eine gestörte Proliferation der Progenitorzellen oder/und ein vermehrtes Absterben der Körnerzellen sein. Die ersten Zellen wandern pränatal (E14.5) aus der Subventrikularzone des Neuroepithels in die Gyrus dentatus Anlage ein. 85% der Körnerzellen werden allerdings postnatal aus der tertiären Matrix innerhalb des Gyrus dentatus gebildet (Altman und Bayer, 1990). Die histologische Analyse von E18 Tieren zeigt keine deutliche morphologische Veränderung oder auffällige Zellreduktion im Gyrus dentatus. Außerdem ist Bcl11b pränatal nicht in den frühen aus der Subventrikularzone abstammenden, migrierenden Zellen exprimiert, sondern nur in wenigen Zellen innerhalb der sich entwickelnden Anlage des Gyrus dentatus. Erst postnatal nimmt die Expression von

Bcl11b stark zu (s. 3.1). Dies lässt vermuten, dass die reduzierte Körnerzellzahl nicht auf eine gestörte pränatale Proliferation oder Migration der ersten Vorläuferzellen aus dem Neuroepithel zurückzuführen ist, sondern dass die postnatale Bildung weiterer Körnerzellen aus der tertiären Matrix beeinträchtigt sein könnte. Im folgenden habe ich deshalb die Proliferation während der frühen postnatalen Entwicklung des Gyrus dentatus analysiert und weiterhin untersucht, ob in den Mutanten vermehrt Apoptosen zu beobachten sind.

3.4 In Bcl11b mutanten Tieren ist die Proliferation im postnatalen Gyrus dentatus reduziert

Zur Bestimmung der Anzahl mitotischer Vorläuferzellen im Gyrus dentatus verschiedener Entwicklungsstadien (E18, P7, P14) wurde den Mäusen bzw. schwangeren Maus-Weibchen BrdU 2h vor Präparation der Gehirne injiziert. Proliferierende Zellen, bei denen das Thymidin-Analogon während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA integriert wurde, wurden anschließend mittels eines BrdU-Antikörpers immunhistologisch detektiert.

Der Vergleich von Bcl11b Mutanten und Kontrolltieren ergab, dass die Anzahl proliferierender Vorläuferzellen innerhalb der Anlage des Gyrus dentatus in Bcl11b Mutanten und Kontrolltieren im Stadium E18 vergleichbar ist (Abb.3-9 A, B, C). Die zu diesem Zeitpunkt detektierten mitotischen Progenitorzellen stammen aus der sekundären Matrix des Neuroepithels ab und viele dieser Zellen befinden sich noch auf ihrem Migrationsweg in die Anlage des Gyrus dentatus.

Postnatal dagegen ist die Anzahl BrdU positiver Zellen im Gyrus dentatus in den Mutanten deutlich reduziert im Vergleich zu Kontrolltieren. Am Tag P7, wenn sich die proliferierenden Vorläuferzellen noch verstärkt im Hilus befinden, lässt sich eine signifikante Reduktion ($p=0,047$) an BrdU positiven Zellen um 25% in den Mutanten dokumentieren (Abb.3-9 D, E, F). Am Tag P14 ist die Anzahl BrdU positiver Zellen in den Mutanten noch deutlicher, um 40% ($p=0,0004$) im Vergleich zu den Kontrollen reduziert (Abb.3-9 G, H, I). Zu diesem Zeitpunkt sind die proliferierenden Vorläuferzellen in den Kontrollen überwiegend in der jetzt entstandenen Subgranularschicht zwischen Hilus und innerster Körnerzellschicht lokalisiert.

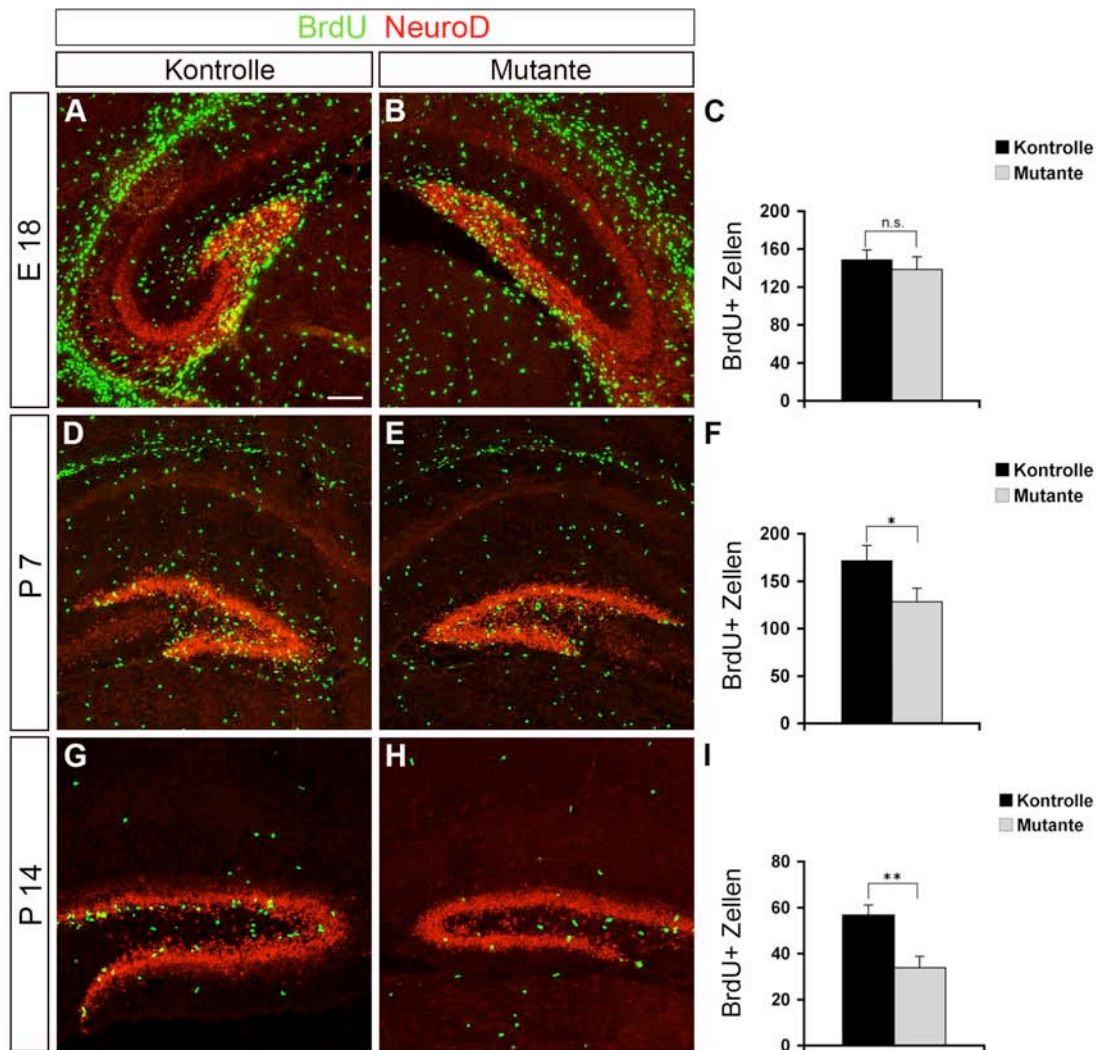


Abb.3-9 Bcl11b beeinflusst die Proliferation im frühen postnatalen Gyrus dentatus.

Immunhistologischer Nachweis BrdU positiver, mitotischer Zellen (grün) und NeuroD exprimierender Zellen (rot) im Gyrus dentatus von Bcl11b Mutanten (B, E, H) und Kontrolltieren (A, D, G). In den Stadien E18, P7 und P14 wurde die Anzahl an BrdU positiven Zellen im Gyrus dentatus 2h nach einem BrdU Puls ermittelt. (A, B, C) Im Stadium E18 konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an BrdU positiven Zellen zwischen Mutanten und Kontrollen bestimmt werden ($p=0,75$; $n=3$). (D, E, F) Am Tag P7 ist die Anzahl an BrdU positiven Zellen im Gyrus dentatus von Bcl11b Mutanten um 25% ($p=0,047$; $n=3$) reduziert im Vergleich zu Kontrolltieren. (G, H, I) Am Tag P14 ist der Unterschied in der Anzahl an BrdU positiven Zellen zwischen Kontrollen und Mutanten noch deutlicher ausgeprägt. Die in den Mutanten ermittelte Anzahl an BrdU positiven Zellen ist um 40% ($p=0,00004$; $n=3$) reduziert gegenüber den Kontrollen. Die BrdU positiven Zellen in den Kontrollen befinden sich zu diesem Zeitpunkt verstärkt in der Subgranularschicht zwischen Hilus und innerer Körnerzellschicht. Balken: 100 μ m.

Die Expressionsanalyse von Bcl11b (3.1) zeigte, dass Bcl11b sowohl von differenzierenden, unreifen Zellen, verstärkt aber von reifen Neuronen des Gyrus dentatus exprimiert wird. Der Vergleich der Lokalisation BrdU positiver Zellen mit der von Bcl11b exprimierenden Zellen zeigt, dass BrdU positive Zellen in den Stadien E18, P7 und P14

kein Bcl11b exprimieren, d.h. Bcl11b nicht in mitotischen Progenitorzellen nachzuweisen ist (Abb.3-10). Daraus lässt sich schließen, dass Bcl11b die Proliferation der Progenitorzellen der postnatalen tertiären Matrix nicht direkt beeinflusst, sondern dass es sich bei der in den Mutanten beobachteten reduzierten Anzahl an mitotisch aktiven Zellen um eine indirekte Funktion von Bcl11b handelt, über die die Proliferation von Vorläuferzellen kontrolliert wird.

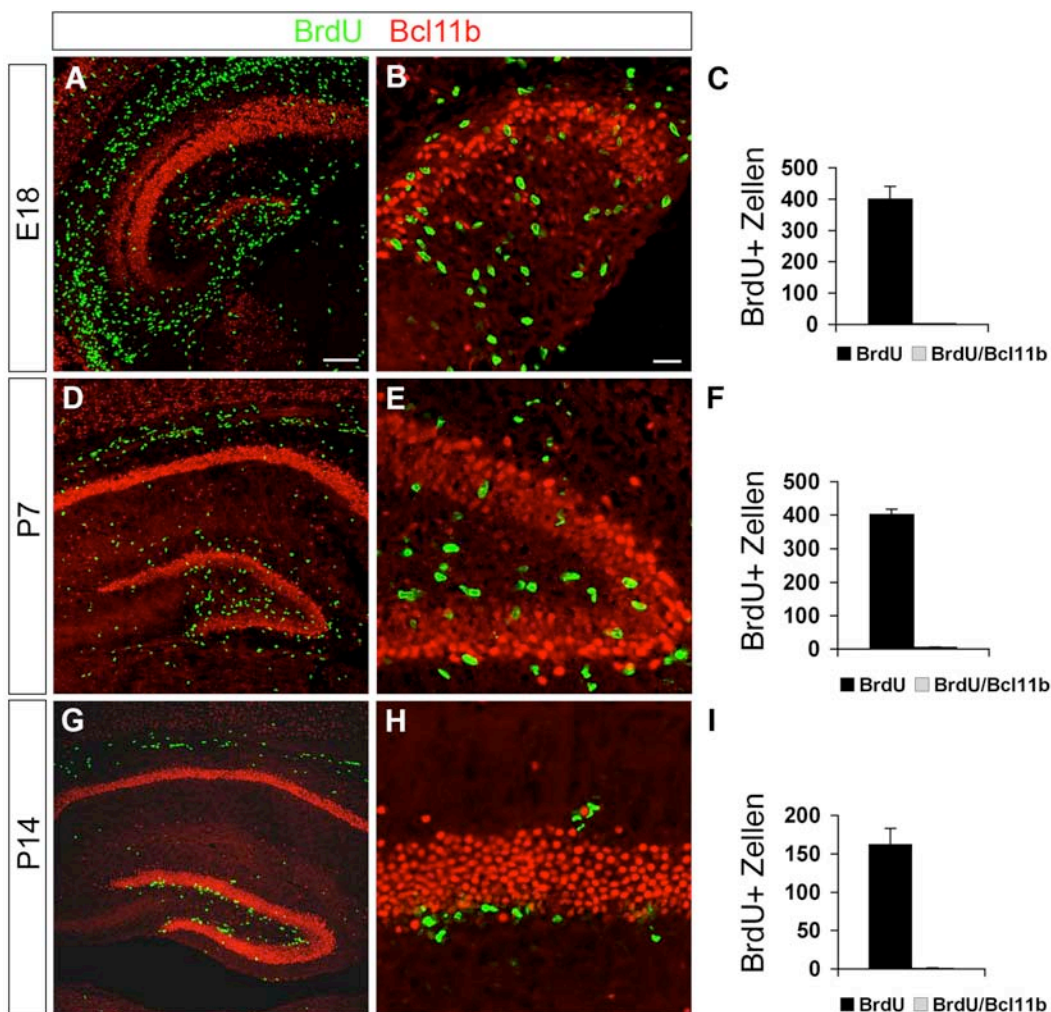


Abb.3-10 Bcl11b wird nicht von BrdU positiven, proliferierenden Progenitorzellen exprimiert.

Immunhistologische Färbungen auf Wildtyp Hippocampusschnitten der Stadien E18 (A, B), P7 (D, E) und P14 (G, H) mit Antikörpern gegen Bcl11b (rot) und BrdU (grün) dokumentieren, dass BrdU positive Zellen in allen untersuchten Stadien kein Bcl11b exprimieren. (C, F, I) Quantifizierung der Expression von Bcl11b in BrdU positiven Zellen im Gyrus dentatus. Die in den Diagrammen dargestellten Zahlen entsprechen der Gesamtanzahl an BrdU bzw. BrdU/Bcl11b positiven Zellen, die innerhalb des Gyrus dentatus auf drei Hippocampusschnitten ausgezählt und aus drei Tieren gemittelt wurden. Balken: 100 μ m (A), 20 μ m (B).

3.5 Nachweis apoptotischer Zellen im Gyrus dentatus

Um zu untersuchen, ob ein erhöhter apoptotischer Zelltod in den Bcl11b Mutanten zu der reduzierten Anzahl an Zellen in der Körnerzellschicht beiträgt, habe ich apoptotische Zellkerne mittels TUNEL-Färbungen nachgewiesen und quantifiziert. In den Kontrollen lassen sich am Tag P14 nur sehr wenige apoptotische Zellen im Gyrus dentatus detektieren. In den Mutanten kann dagegen die doppelte Anzahl an apoptotischen Zellkernen nachgewiesen werden (Abb.3-11). Die apoptotischen Zellen sind in den Mutanten in der gesamten Breite der Körnerzellschicht, v.a. des ventralen Blattes des Gyrus dentatus zu finden. Vereinzelt sind apoptotische Zellen auch in der Subgranularschicht der Mutanten lokalisiert.

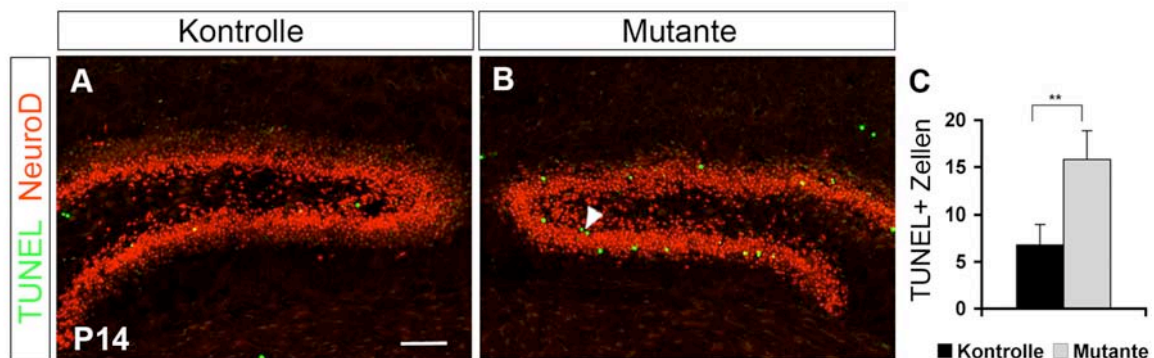


Abb.3-11 Vermehrter apoptotischer Zelltod im Gyrus dentatus von Bcl11b Mutanten.

(A, B) TUNEL-Färbung vom Gyrus dentatus von Bcl11b Mutanten und Kontrolltieren des Stadiums P14 zur Detektierung apoptotischer Zellen (grün). Differenzierende, neuronale Zellen des Gyrus dentatus wurden durch die Verwendung eines Antikörpers gegen NeuroD (rot) sichtbar gemacht. In der Körnerzellschicht der Mutanten kann eine signifikant erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen beobachtet werden, die in der gesamten Breite der Körnerzellschicht zu finden sind, vereinzelt auch in der Subgranularschicht (Pfeilkopf, B). (C) Quantifizierung der TUNEL positiven Zellen in Kontrolltieren und Bcl11b mutanten Tieren ($p=0,003$; $n=3$). Balken: 100 μm .

3.6 Differenzierung der Körnerzellen in Bcl11b Mutanten

Die histologischen Befunde der veränderten Verteilung und Zellmorphologie der Körnerzellen könnten ein Hinweis darauf sein, dass die Differenzierung der Körnerzellen beeinträchtigt ist. Die Reifung neugeborener Vorläuferzellen zu funktionellen Körnerzellen umfasst verschiedene, komplexe Differenzierungsprozesse (Migration der neugeborenen Vorläuferzellen und korrekte Positionierung der Zellen, Wachstum und Zielfindung der Axone und Dendriten der unreifen Körnerzellen, Synaptische Integration), welche durch das Zusammenspiel spezifischer Transkriptions- und Differenzierungsfaktoren gesteuert werden. Im Folgenden wurde die Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen zu reifen Körnerzellen im Gyrus dentatus von Bcl11b Mutanten untersucht. Hierfür wurde die Expression verschiedener, für die Reifung der Zellen charakteristischer Differenzierungsmarker in Bcl11b Mutanten und Kontrolltieren vergleichend analysiert.

3.6.1 Expressionsanalyse früher Differenzierungsmarker

NeuroD (neurogenic differentiation factor 1) ist ein basic-helix-loop-helix Transkriptionsfaktor, der essentiell für die Differenzierung der Körnerzellen im Gyrus dentatus ist (s. 1.2) (Miyata *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000). Er wird verstärkt von neugeborenen, differenzierenden Neuronen exprimiert. Eine nur sehr schwache NeuroD Expression kann noch in reifen Körnerzellen beobachtet werden. Der Vergleich der Expression von NeuroD im Gyrus dentatus von Bcl11b Mutanten und Kontrolltieren des Stadiums P30 zeigt, dass die Anzahl an Zellen, die NeuroD auf hohem Niveau exprimieren, in den Mutanten signifikant um das doppelte erhöht ist. In den Kontrollen ist eine starke Expression dieses Differenzierungsmarkers zu diesem späten Zeitpunkt der Gyrus dentatus Entwicklung auf die Subgranularschicht und auf einige unreife Zellen der innersten Körnerzellschicht beschränkt. In den Mutanten ist die NeuroD exprimierende Zone verbreitert, es lassen sich zusätzliche Zellen noch in den angrenzenden, äußeren Anteilen der Körnerzellschicht, sowie vereinzelt auch in der Hilusregion beobachten, die NeuroD auf einem hohen Niveau exprimieren (Abb.3-12). Während der Entwicklung des Gyrus dentatus erfolgt die Reifung der Körnerzellen innerhalb der Körnerzellschicht entlang eines Gradienten von innen nach außen, dementsprechend nimmt mit zunehmender Entwicklung des Gyrus dentatus auch die Expression von NeuroD von innen nach außen ab (s. 3.1 Abb.3-3). Die aufrechterhaltene starke NeuroD Expression in Zellen der äußeren, an die Subgranular- und innerste Körnerzellschicht angrenzenden Schichten in den

Mutanten, kann daher als ein Zeichen einer nicht abgeschlossenen Differenzierung dieser vermehrten, unreifen Zellen interpretiert werden.

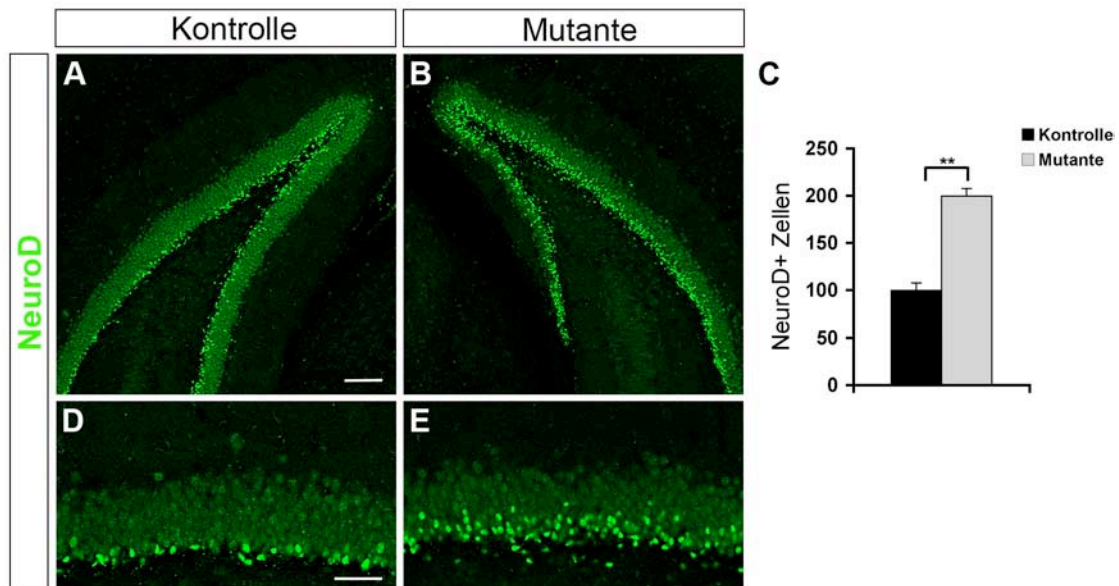


Abb.3-12 In Bcl11b Mutanten ist die Anzahl NeuroD exprimierender Zellen erhöht.

(A, B, D, E) Immunhistologische Analyse der Expression von NeuroD im Gyrus dentatus von Bcl11b mutanten Tieren und Kontrolltieren am Tag P30. Innerhalb der Körnerzellschicht lassen sich zwei unterschiedliche Expressionsniveaus beobachten: unreife Zellen der inneren Zone exprimieren NeuroD auf einem hohen Niveau, in reifen Zellen der äußeren Zone wird eine nur sehr schwache Expression aufrechterhalten. (A, D) In den Kontrolltieren lässt sich eine starke NeuroD Expression in Zellen der Subgranularschicht und der innersten Körnerzellschicht nachweisen. (B, E) In den Mutanten exprimieren zusätzlich Zellen der anliegenden, äußeren Körnerzellschichten NeuroD auf hohem Niveau. (C) Quantifizierung der NeuroD positiven Zellen mit hohem Expressionsniveau im Gyrus dentatus von Kontrolltieren und Bcl11b Mutanten. In den Mutanten ist die Anzahl dieser NeuroD exprimierenden Zellen signifikant ($p=0,0004$; $n=3$) um das Doppelte erhöht im Vergleich zu den Kontrollen. Balken: 100 μm (A); 50 μm (D).

Doublecortin (Dcx) ist ein Mikrotubulus-assoziiertes Protein und wird während der neuronalen Migration in neugeborenen Vorläuferzellen und in den Dendriten und Somata von differenzierenden, unreifen Neuronen exprimiert, wenn die axonale Wegfindung der Moosfasern in die CA3 Region und die Dendritenmorphogenese der Körnerzellen in Richtung Molekularschicht erfolgt. Dcx hat eine essentielle Funktion bei der Migration neuronaler Zellen und wird für die schichtenspezifische Positionierung der verschiedenen Zelltypen in der Hippocampusrinde benötigt (Francis *et al.*, 1999; Corbo *et al.*, 2002). Auch übt Dcx wichtige Funktionen bei der Dendritenentwicklung der hippocampalen Neurone aus (Cohen *et al.*, 2006). Ich beobachte eine deutlich veränderte Verteilung der Dcx exprimierenden Zellen in der Körnerzellschicht von Bcl11b Mutanten gegenüber den Kontrollen. Während in den Kontrolltieren Dcx positive Zellen überwiegend in der

Subgranularschicht und der innersten Körnerzellschicht lokalisiert sind, finden sich in den Mutanten Dcx exprimierende Zellen in der gesamten Körnerzellschicht verstreut (Abb.3-13). Darüber hinaus ist zu erkennen, dass die Dcx exprimierenden Körnerzellendriten in den Mutanten stark verkürzt sind. In den Kontrollen reichen die Dcx exprimierenden Dendriten tief bis zur äußeren Grenze der Molekularschicht des Gyrus dentatus. In den Mutanten kann man Dcx exprimierende Dendriten in der inneren Molekularschicht erkennen, wo sich die proximalen Dendriten der Körnerzellen befinden. In der äußeren Molekularschicht, in der die distalen Dendritenabschnitte der Körnerzellen lokalisiert sind, sind nur sehr wenige Dcx positive Dendriten schwach zu erkennen.

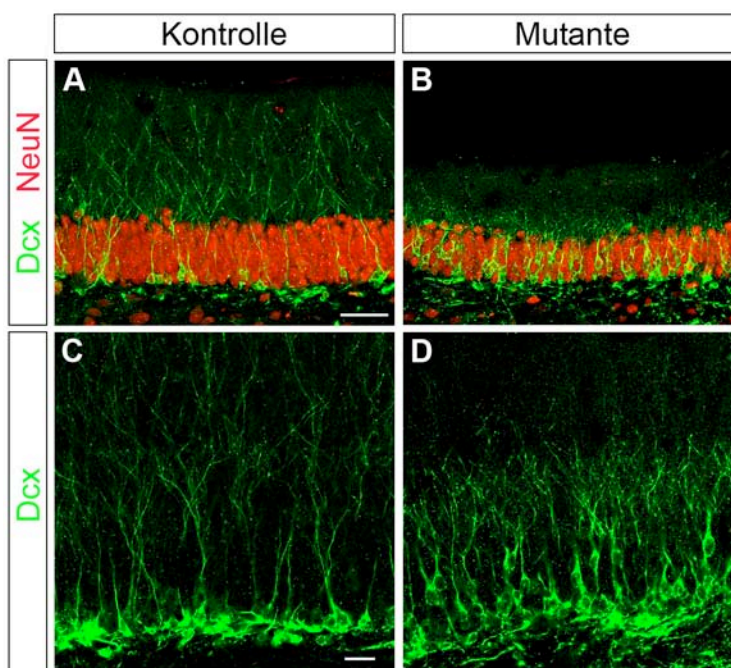


Abb.3-13 Verändertes Expressionsmuster von Dcx in Bcl11b Mutanten.

Immunhistologische Analyse vom Gyrus dentatus am Tag P30 mit Antikörpern gegen Dcx (grün) bzw. gegen Dcx und NeuN (rot). (A, C) In den Kontrollen sind Dcx exprimierende Zellen in der inneren Körnerzellschicht sowie in der Subgranularschicht lokalisiert, die entsprechenden Dcx positiven Dendriten reichen bis zur äußeren Grenze der Molekularschicht. (B, D) In den Mutanten sind Dcx positive Zellen in der gesamten Breite der Körnerzellschicht zu erkennen, die entsprechenden Dendriten sind im Vergleich zu den Kontrollen verkürzt. Balken: 50 µm (A); 20 µm. (C).

3.6.2 Analyse der Dendritenmorphologie der Körnerzellen

Die Befunde der veränderten Dcx Expression im Gyrus dentatus von Bcl11b Mutanten deuten darauf hin, dass die Dendritenentwicklung der Körnerzellen in den Mutanten beeinträchtigt ist. Zur genaueren Untersuchung der Dendritenmorphologie der Körnerzellen wurden daher Golgi-Färbungen von adulten Gehirnen (P56) angefertigt (Abb.3-14). Diese zeigen, dass im Gyrus dentatus der Mutanten nur sehr wenige Zellen in der Körnerzellschicht mit ihren Dendritenbäumen in der Molekularschicht angefärbt wurden. Speziell in der stark verschmälerten Molekularschicht des ventralen Blattes des Gyrus dentatus lassen sich nur schlecht und kümmerlich entwickelte Dendritenbäume in

den Mutanten erkennen. In den Kontrolltieren lassen sich in der viel breiteren Molekularschicht besser entwickelte Dendritenbäume mit längeren Dendriten beobachten.

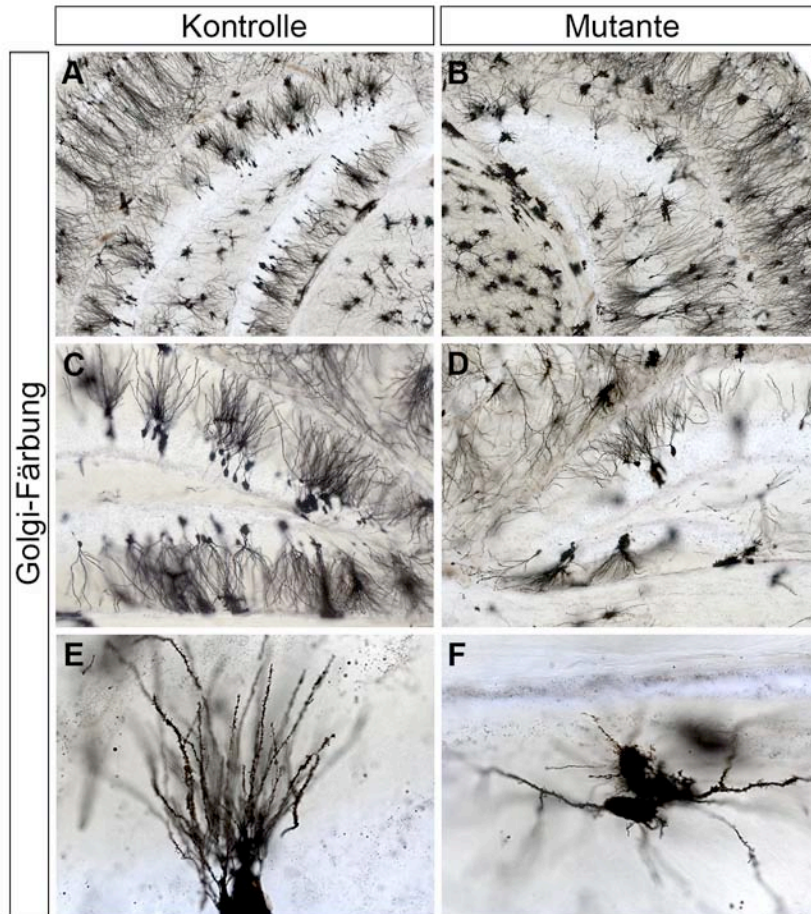


Abb.3-14 Analyse der Dendritenmorphologie hippocampaler Neurone im Gyrus dentatus.

Golgi-Imprägnierungen adulter Hippocampi (P56) von Bcl11b Mutanten (B, D, F) und Kontrolltieren (A, C, E). In den Mutanten konnten im Vergleich zu Kontrolltieren bedeutend weniger Körnerzellen mit entsprechenden Dendritenbäumen in der Molekularschicht morphologisch dargestellt werden. (E, F) Vergrößerung einzelner Neurone mit ihren Dendriten aus dem ventralen Gyrus dentatus. Entsprechend der stark verschmälerten ventralen Molekularschicht lassen sich in den Mutanten nur schlecht entwickelte Dendritenbäume im Vergleich zur Kontrolle erkennen.

3.6.3 Expressionsanalyse später Differenzierungsmarker

Zur Analyse der Expression von neuronalen Markern, die von reifen, ausdifferenzierten Zellen im Gyrus dentatus exprimiert werden, habe ich die Expression des Calcium-bindenden Proteins Calbindin in Bcl11b Mutanten und Kontrolltieren immunhistologisch untersucht. Des Weiteren habe ich als neuronalen Marker ein Reporter-gen, YFP, welches unter Kontrolle des Promotors des Thy1 Gens exprimiert wird, in die Mutanten und Kontrolltiere eingekreuzt und dessen Expression vergleichend analysiert. Thy1-YFP wird sowohl in den Somata als auch in den Dendriten und axonalen Projektionen von ausschließlich neuronalen Zellen exprimiert (Feng *et al.*, 2000).

Die immunhistologische Analyse zeigt, dass im Vergleich zu den Kontrolltieren die Expression von Calbindin in der Körnerzellschicht und in der Molekularschicht von Bcl11b Mutanten deutlich vermindert ist. Diese reduzierte Expression ist besonders auffällig am Tag P7, wenn nur die in ihrer Reifung fortgeschrittenen Zellen der äußeren Körnerzellschicht anfangen, diesen späten Marker auszuprägen (Abb.3-15 A, B). Später (P30), wenn die Entwicklung der Körnerzellschicht weitgehend abgeschlossen ist, finden sich Calbindin exprimierende Zellen sowohl in den Kontrollen als auch in den Mutanten in der gesamten Breite der Körnerzellschicht. Dennoch sind auch zu diesem späten Zeitpunkt in der Mutante weniger Calbindin positive, d. h. reife Zellen vorhanden bzw. es lassen sich vermehrt Zellen beobachten, die nur NeuN positiv sind, aber nicht Calbindin koexprimieren (Abb.3-15 C-F). Auch die Expression des neuronalen Markers Thy1 ist in den Mutanten im Gyrus dentatus am Tag P30 stark reduziert (Abb.3-15 G, H). In der Körnerzellschicht der Mutanten sind im Vergleich zur Kontrolle bedeutend weniger Zellen in der ganzen Breite der Körnerzellschicht zu erkennen, die diesen neuronalen Marker exprimieren. Und auch die entsprechende Thy1-YFP Expression in den Dendriten der Körnerzellen in der Molekularschicht ist deutlich vermindert. In der inneren Molekularschicht ist noch ein relativ starkes, vergleichbares Fluoreszenzsignal nachzuweisen, bei dem es sich wahrscheinlich um die axonalen Verzweigungen der Kommissuren- und Assoziationsfasern aus dem Hilus des kontra- und ipsilateralen Hippocampus handelt. In der äußeren Molekularschicht ist die Expression von Thy1-YFP dagegen stark erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle.

In Übereinstimmung mit der veränderten Expression von Doublecortin und NeuroD zeigt diese Expressionsanalyse, dass die Differenzierung der Körnerzellen nicht nur verzögert ist, sondern dass einige Zellen wahrscheinlich in einer späten Differenzierungsphase arretiert bleiben.

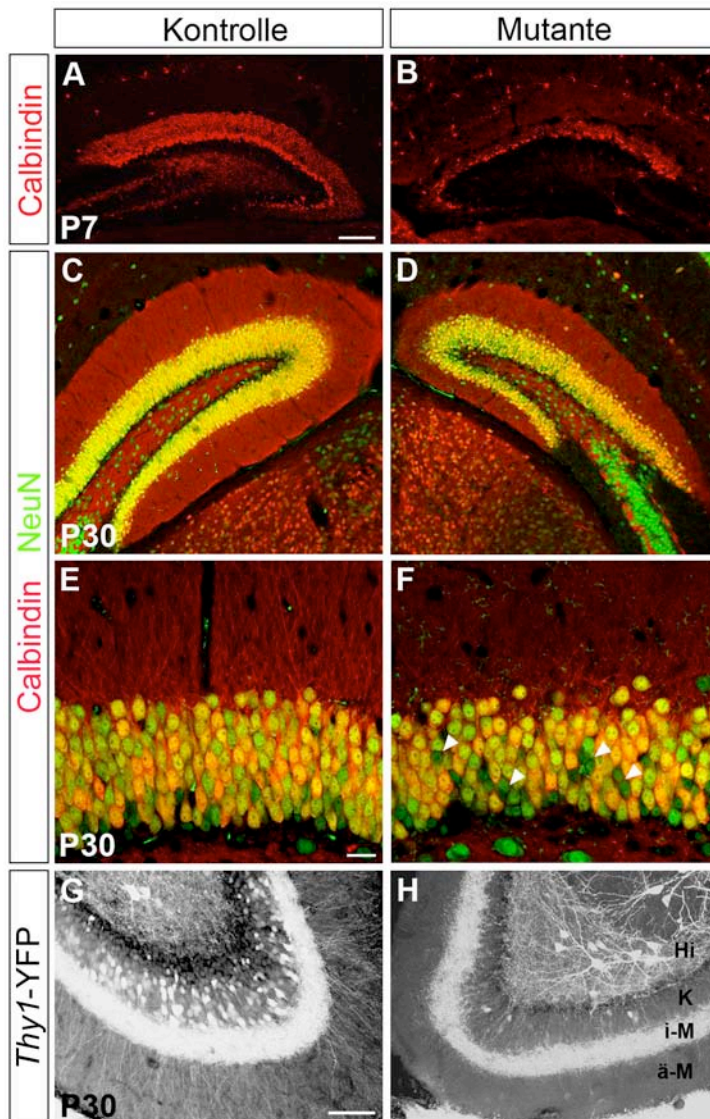


Abb.3-15 In Bcl11b Mutanten ist die Differenzierung der Körnerzellen beeinträchtigt.

(A-F) Immunhistologische Analyse der Expression von Calbindin (rot) am Tag P7 bzw. von Calbindin und NeuN (grün) am Tag P30 im Gyrus dentatus. Zu beiden Zeitpunkten kann man eine reduzierte Expression dieses Markers für reife Zellen im Gyrus dentatus von Bcl11b Mutanten im Vergleich zur Kontrolle beobachten. (A, B) Am Tag P7 ist die Expression von Calbindin auf die äußeren Schichten der Körnerzellschicht beschränkt. (C-F) Am Tag P30 hat sich die Expression auf die gesamte Breite der Körnerzellschicht ausgedehnt. In der Kontrolle koexprimieren fast alle NeuN positiven Zellen auch Calbindin (gelb), in den Mutanten sind vermehrt Körnerzellen zu erkennen, die nur NeuN, aber kein Calbindin koexprimieren (weiße Pfeilköpfe). (G, H) Expression von YFP unter der Kontrolle des Promotors des Thy1 Gens im Gyrus dentatus am Tag P30. In der Mutante ist die Expression dieses neuronalen Markers in den Zellen der Körnerzellschicht (K) sowie in der äußeren Molekularschicht (ä-M) vermindert gegenüber der Kontrolle. Balken: 100 μm (A), 50 μm (E), 20 μm (G). Hi: Hilus; i-M: innere Molekularschicht.

3.6.4 Analyse des Radial-Glia-Fasergerüsts im Gyrus dentatus

Die histologischen Untersuchungen zeigen in den Mutanten eine veränderte Verteilung der Zellen der Körnerzellschicht, die in ihrer Ausprägung einer sog. Körnerzelldispersion ähneln. Als Ursache für die Körnerzelldispersion wird in der Literatur ein möglicher Migrationsdefekt diskutiert (Houser *et al.*, 1990; Lurton *et al.*, 1997; Heinrich *et al.*, 2006; Haas *et al.*, 2002). Auch die veränderte Verteilung der Dcx exprimierenden Zellen in der Körnerzellschicht könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Migration der Körnerzellen verändert ist. Migrationsdefekten liegt häufig ein disorganisiertes Radial-Glia-Fasergerüst zu Grunde (Frotscher *et al.*, 2003; Weiss *et al.*, 2003). Radial-Glia ähnliche Zellen finden sich in der Subgranularschicht und bilden lange Fortsätze, die in die Körnerzellschicht hineinreichen und entlang derer die neugeborenen unreifen Körnerzellen aus der tertiären

Matrix in die Körnerzellschicht wandern und sich nach ihrer korrekten Positionierung terminal zu funktionellen reifen Körnerzellen differenzieren (Shapiro *et al.*, 2005; Seki und Arai, 1999). Zur genaueren Untersuchung des Radial-Glia-Fasergerüsts im Gyrus dentatus der Bcl11b Mutanten wurde die Expression des Glia Markers GFAP in Mutanten und Kontrollen des Stadiums P30 vergleichend analysiert. GFAP wird in den Fortsätzen von Astrozyten und Radial-Glia ähnlichen Zellen exprimiert (Bignami und Dahl, 1974; Campbell und Götz, 2002; Weiss *et al.*, 2003). Es können keine auffälligen Unterschiede im Expressionsmuster von GFAP im Gyrus dentatus von Mutanten und Kontrollen beobachtet werden (Abb.3-16). Sowohl in der Kontrolle als auch in den Mutanten lassen sich immunhistologisch vergleichbare, lange GFAP exprimierende Fortsätze nachweisen, die von der Subgranularschicht aus in die Körnerzellschicht hinein orientiert sind.

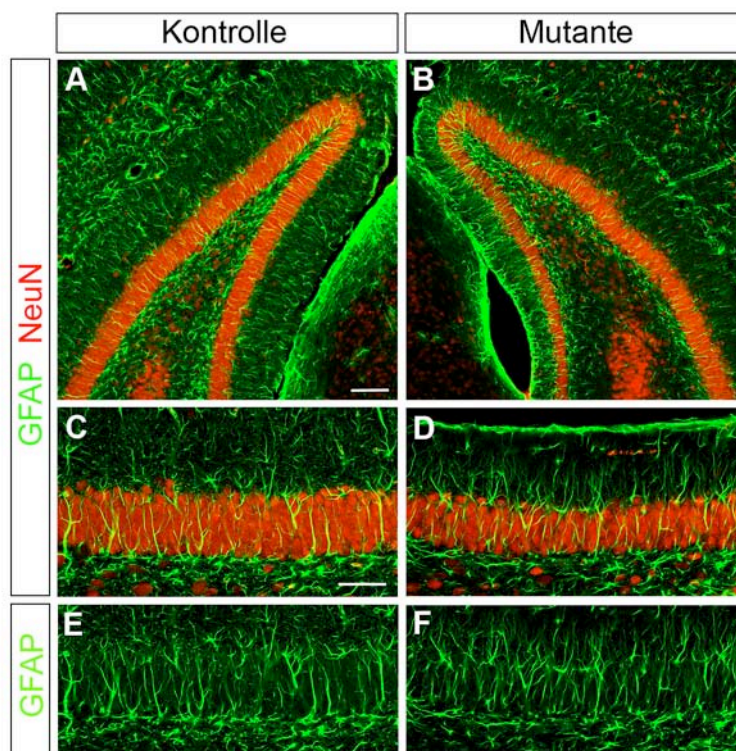


Abb.3-16 Nachweis von Radial-Glia-Fasern in der Körnerzellschicht von Bcl11b Mutanten.

Immunhistologische Analyse der GFAP Expression (grün) im Gyrus dentatus von Bcl11b Mutanten (B, D, F) und Kontrollieren (A, C, E) des Stadiums P30. Neuronale Zellen wurden mit Antikörpern gegen NeuN (rot) detektiert (A-D). Es lassen sich sowohl in den Kontrollen als auch in den Mutanten Radial-Glia ähnliche Fortsätze nachweisen, die von der Subgranularschicht ausgehend in die Körnerzellschicht hinein orientiert sind (C-F). Balken: 100µm (A); 50 µm (C).

3.6.5 In Bcl11b Mutanten ist die Anzahl Parvalbumin exprimierender Interneurone reduziert

Das Calcium-bindende Protein Parvalbumin wird im Hippocampus von einer Subpopulation GABAerger Interneurone exprimiert. Hierbei handelt es sich um sog. Korbzellen und Kandelaber-Zellen („axo-axonic cells“). Die Axone der Korbzellen terminieren an den Somata und apikalen Dendriten, die Kandelaber-Zellen am Axonhügel

der Körnerzellen und üben einen inhibitorischen Einfluß auf deren Aktivität aus (Kosaka *et al.*, 1987; Ribak *et al.*, 1990). Parvalbumin positive Zellen sind im Gyrus dentatus hauptsächlich in der Körnerzellschicht nahe der Grenze zum Hilus lokalisiert oder in den äußeren Schichten am Übergang zur Molekularschicht. Einige Parvalbumin positive Zellen finden sich auch in der Molekularschicht und im Hilus.

Im Vergleich zur Kontrolle lassen sich im Gyrus dentatus von Bcl11b mutanten Tieren mit Antikörpern gegen Parvalbumin in der Körnerzellschicht signifikant ($p=0,001$) weniger Parvalbumin exprimierende Zellen detektieren und auch die entsprechende Expression von Parvalbumin in den die Körnerzellsomata umgebenden Axonen ist deutlich vermindert (Abb.3-17 A, B, D-F). Da Bcl11b keine Koexpression mit Parvalbumin in Zellen des Gyrus dentatus zeigt und nicht in den von den Körnerzellen durch ihre Größe gut unterscheidbaren Korbzellen nachweisbar ist (Abb.3-17 C), muss es sich hier um einen indirekten Einfluss handeln, den die Bcl11b Mutation auf die Expression von Parvalbumin in Interneuronen bzw. auf die Entwicklung dieser Interneurontypen ausübt.

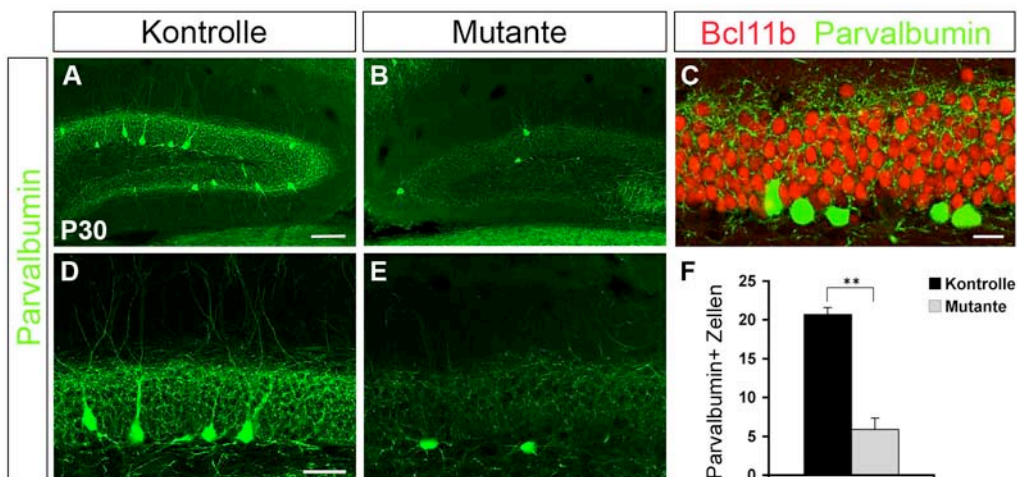


Abb.3-17 In Bcl11b Mutanten ist die Anzahl Parvalbumin exprimierender Interneurone im Gyrus dentatus reduziert.

(A, B, D, E) Immunhistologische Analyse der Expression von Parvalbumin im Gyrus dentatus von Bcl11b Mutanten und Kontrolltieren am Tag P30. In Bcl11b Mutanten (B, E) ist die Anzahl Parvalbumin exprimierender Interneurone in der Körnerzellschicht gegenüber den Kontrollen (A, D) signifikant vermindert. (F) Quantifizierung der Anzahl Parvalbumin positiver Zellen in der Körnerzellschicht von Mutanten und Kontrollen ($p=0,001$; $n=3$). (C) Immunfärbung mit Antikörpern gegen Bcl11b (rot) und Parvalbumin (grün) in der Körnerzellschicht von Wildtypertieren zeigt keine Koexpression von Bcl11b mit Parvalbumin in dieser Subpopulation GABAerger Interneurone. Balken: 100 μm (A), 50 μm (D), 20 μm (C).

3.7 Identifizierung differentiell exprimierter Gene im Hippocampus Bcl11b mutanter Mäuse

Zur weiteren Analyse der Funktionen des Transkriptionsfaktors Bcl11b während der Entwicklung des Hippocampus führte ich eine genomweite Expressionsanalyse mittels Affymetrix Microarrays durch. Ziel dieses Experiments war die Identifizierung von Genen, die eine deregulierte Expression im Hippocampus der Bcl11b mutanten Mäuse zeigen. Bekannte Funktionen differentiell exprimierter Gene im Hippocampus der Mutanten könnten möglicherweise Aufschluss über die zellulären und molekularen Mechanismen geben, die den morphologischen Veränderungen der Bcl11b Mutation im Gyrus dentatus zu Grunde liegen.

Ich verwendete für diese Analyse Hippocampusgewebe aus Mutanten und Kontrolltieren des Stadiums P7. Bei der Auswertung der Daten wurden Gene mit geringer Expressionsvarianz herausgefiltert (s. 1.2.12.3). Der Vergleich der Expressionsintensitäten von Kontrolltieren und Bcl11b Mutanten ergab neben dem erwarteten Bcl11b Gen ($p=1\cdot 10^{-7}$, Faktor der Veränderung der Genexpression -28,25) nur ein weiteres stark differentiell exprimiertes Gen, dessen Transkriptionsniveau im Hippocampus der Mutanten hochsignifikant ($p=3\cdot 10^{-7}$) um den Faktor 12 reduziert war. Bei diesem Gen handelt es sich um Desmoplakin (Dsp), das für ein Protein der Plakin Familie kodiert und von dem zwei verschiedene Isoformen existieren (Sonnenberg und Liem, 2007).

Durch *in situ*-Hybridisierung mit einer Dsp-spezifischen Sonde für beide Isoformen konnte eine stark reduzierte Expression von Dsp im Hippocampus der Mutanten verifiziert werden. Im Hippocampus von Kontrolltieren ist Desmoplakin ausschließlich in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus exprimiert. Zum Zeitpunkt P10 lässt sich Dsp in den äußeren Schichten, im Stadium P30 in der gesamten Breite der Körnerzellschicht nachweisen. In den Mutanten konnte dagegen kein Dsp-spezifisches Transkript detektiert werden (Abb.3-18).

Desmoplakin ist eine wichtige Komponente von desmosomalen Zellkontakten, die v.a. essentiell für die Integrität und Stabilität von Geweben sind, die einer starken mechanischen Beanspruchung ausgesetzt sind, wie beispielsweise Epithelien der Haut und Herzmuskelgewebe (Getsios *et al.*, 2004). Über spezifische Funktionen von Desmoplakin im Nervengewebe ist bisher nichts bekannt.

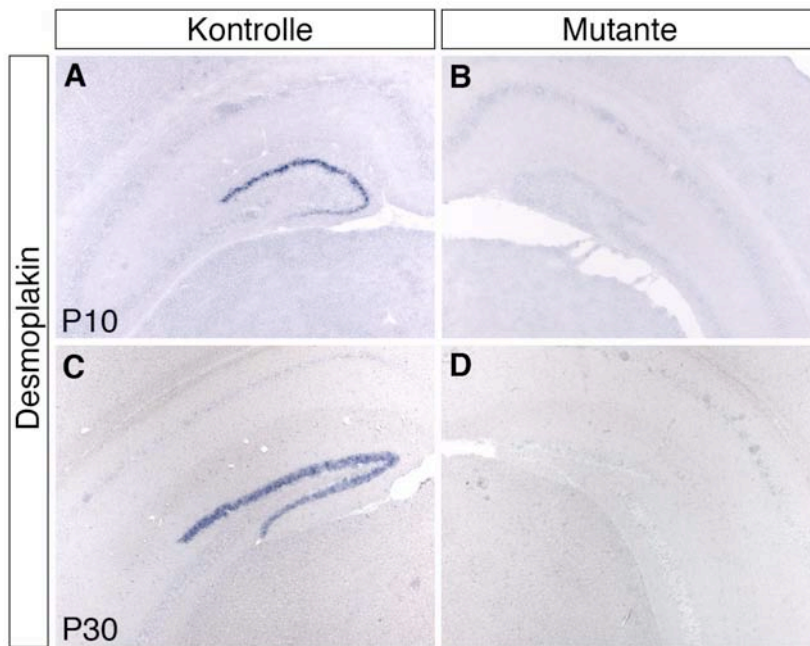


Abb.3-18 Expression von Desmoplakin im Gyrus dentatus.

In situ-Hybridisierungen auf Hippocampusgewebe von Bcl11b mutanten Tieren (B, D) und Kontrolltieren (A, C) der Stadien P10 (A, B) und P30 (C, D) mit einer Dsp-spezifischen Sonde. In Kontrolltieren ist Dsp ausschließlich in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus exprimiert. In den Mutanten lässt sich zu beiden Zeitpunkten keine Dsp Expression in der Körnerzellschicht detektieren.

3.8 Verhaltensanalyse Bcl11b mutanter Mäuse

Der Hippocampus hat eine wichtige Funktion bei Lern- und Gedächtnisprozessen (s. 1.3).

Um zu untersuchen, ob die in den Mutanten beobachtete gestörte Entwicklung des Gyrus dentatus einen Einfluss auf das emotionale und kognitive Lernverhalten der Mäuse hat, habe ich das Verhalten Bcl11b mutanter Tiere im Open Field, im Elevated Plus Labyrinth und im Radiallabyrinth untersucht (s. 2.2.11).

3.8.1 Verhalten Bcl11b mutanter Mäuse im Open Field-Test

Im Open Field wurde das spontane Erkundungsverhalten (Exploration) der Mäuse untersucht. Die wichtigste Intention des Erkundungsverhaltens ist das Sammeln von räumlichen Informationen aus einer neuen Umgebung. Mit der Zeit sollte die Aufnahme und Verarbeitung dieser neuen Informationen zu einer Änderung im Erkundungsverhalten führen, was als Habituation (Gewöhnung) bezeichnet wird. Der Hippocampus hat eine wichtige Funktion bei dieser Informationsverarbeitung- und -speicherung (O'Keefe und Nadel, 1978). Im intakten Hippocampus führt eine korrekte Informationsverarbeitung zu einer beschleunigten Gewöhnung, was durch Studien bestätigt wurde, bei denen Tiere mit hippocampalen Läsionen sich nicht an eine neue Umgebung gewöhnten (Corey, 1978). Es wurden folgende Verhaltensweisen bei den Mäusen im Open Field beobachtet und

protokolliert: lokomotorische Aktivität (Anzahl an überlaufenden Linien), Leaning (Aufrichten, wobei die Vorderpfoten die Wand berühren) und Rearing (Aufrichten auf die Hinterbeine im freien Feld, wobei die Vorderpfoten keine Oberflächen berühren).

Bcl11b mutante Mäuse zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren im Open Field kaum Tendenzen einer Habituation. Es konnte eine extrem gesteigerte, hochsignifikante lokomotorische Aktivität und ein deutlich erhöhtes Leaning beobachtet werden (Abb.3-19 A, B). Diese Hyperaktivität blieb unverändert während des gesamten Beobachtungszeitraums. Die Verhaltensweise Rearing war im Vergleich zu den Kontrollen selten zu beobachten, auch nicht zum Ende des Beobachtungszeitraums (Abb.3-19 C). Bei den Kontrollen konnte man dagegen eine Habituation beobachten: mit der Zeit nahm ihre lokomotorische Aktivität ab, sie wurden ruhiger und haben angefangen sich auch im freien Feld öfters und auch länger aufzurichten. Aufrichten im freien Feld ist eine potentielle Gefahr für die Tiere, es macht sie angreifbar gegenüber Feinden, so dass man davon ausgehen kann, dass erst mit zunehmender Kenntnis der neuen Umgebung diese Verhaltensweise häufiger zu beobachten ist.

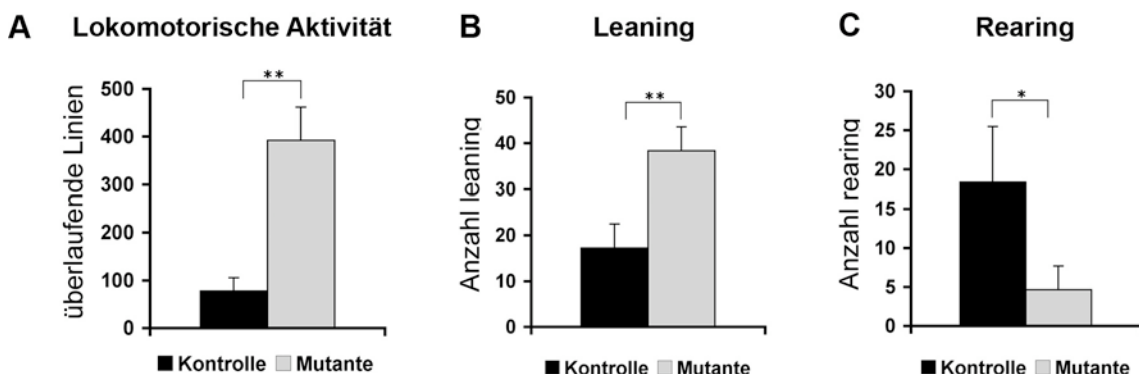


Abb.3-19 Erkundungsverhalten von Bcl11b Mutanten und Kontrolltieren im Open Field-Test.

Bcl11b mutante Mäuse zeigten im Open Field-Test wenig Tendenzen einer Habituation: (A) Die lokomotorische Aktivität Bcl11b mutanter Mäuse war signifikant und stark erhöht gegenüber den Kontrolltieren ($p=0,00001$). (B) Die Verhaltensweise „Leaning“ (Aufrichten an der Wand) war ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen ($p=0,0005$). (C) Aufrichten im freien Feld („Rearing“) war im Vergleich zu den Kontrolltieren bei den Mutanten seltener zu beobachten ($p=0,01$). Beobachtungszeitraum: 10 min.; $n=8$.

3.8.2 Verhalten Bcl11b mutanter Mäuse im Elevated Plus Labyrinth

Das Elevated Plus Labyrinth ist ein etabliertes Verhaltensexperiment, bei dem das Erkundungsverhalten von Nagetieren in Abhängigkeit von ihrem Angstverhalten untersucht wird. Nagetiere mit gesteigertem Angstverhalten vermeiden verstärkt die Erkundung der ungeschützten Arme im Elevated Plus Labyrinth (Roggers und Dalvi, 1997; Pellow *et al.*, 1985; Yilmazer-Hanke *et al.*, 2003). Das spontane emotionale Verhalten von jeweils neun mutanten Mäusen und Kontrolltieren im Alter von 10-11 Wochen wurde für je 10 min. im Elevated Plus Labyrinth beobachtet. Hierbei wurden die Anzahl der Betretungen der offenen und geschlossenen Arme sowie die jeweilige Aufenthaltsdauer protokolliert. Wie im Open Field Experiment konnte bei den Mutanten eine gesteigerte lokomotorische Gesamtaktivität dokumentiert werden, die Anzahl der gesamten Armbetretungen, d.h. der offenen und geschlossenen Arme, war signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht (Abb.3-20). Es konnten hingegen keine statistisch signifikanten Unterschiede sowohl in der absoluten Anzahl der Betretungen der offenen oder geschlossenen Arme als auch in Relation zu der ermittelten Gesamtaktivität zwischen Kontrollen und Mutanten beobachtet werden. Sowohl die Mutanten als auch die Kontrollen bevorzugten den Aufenthalt in den geschützten Armen gegenüber den offenen Armen, wenn auch bei den Mutanten eine Tendenz zu erkennen war, öfters die offenen Arme aufzusuchen als die Kontrollen.

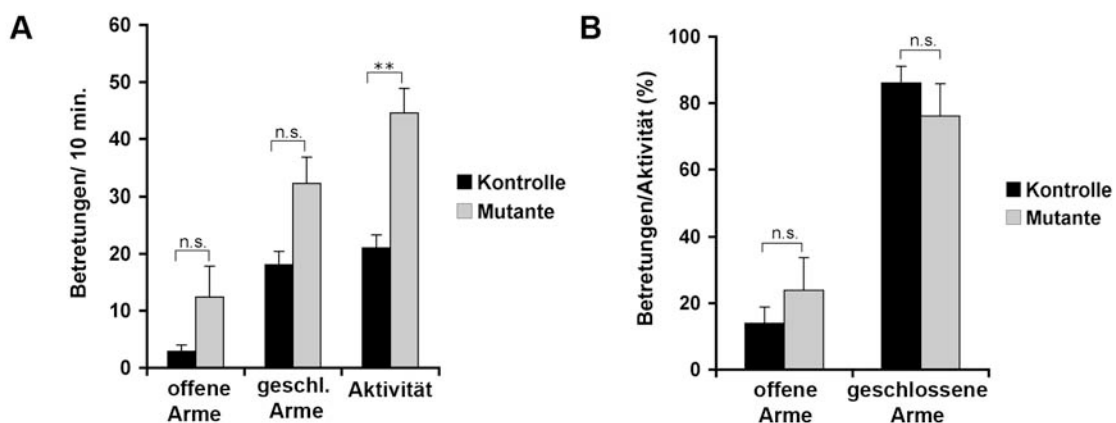


Abb.3-20 Bcl11b Mutanten zeigen kein gesteigertes Angstverhalten im Elevated Plus Labyrinth.

(A) Anzahl der Betretungen der offenen und/oder geschlossenen Arme im Elevated Plus Labyrinth durch adulte Bcl11b Mutanten und Kontrolltiere. Es konnte eine signifikant erhöhte lokomotorische Aktivität (= Anzahl der Betretungen offener und geschlossener Arme) bei Bcl11b Mutanten gegenüber Kontrolltieren beobachtet werden ($p=0,0002$). (B) Anzahl der Betretungen der offenen oder geschlossenen Arme relativ zur Gesamtaktivität der Tiere in Prozent. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Betretungen der offenen oder geschlossenen Arme zwischen Mutanten und Kontrollen dokumentiert werden. Beobachtungszeitraum: 10 min., $n=9$.

3.8.3 Räumliches Lernverhalten Bcl11b mutanter Mäuse im Radiallabyrinth

Im 8-Arm-Radiallabyrinth („radial maze“) können verschiedene Hippocampus-abhängige Lern- und Gedächtnisprozesse wie z.B. räumliches Lernen, Arbeitsgedächtnis („working memory“) oder auch Gedächtniskonsolidierung bei Nagetieren untersucht werden (Bolhuis *et al.*, 1986; Schwegler *et al.*, 1990; Nadel und McDonald, 1980; Olton *et al.*, 1979). Im Gegensatz zum „Morris Water maze“ zeigen die Tiere in dieser „trockenen“ Version des für Lernexperimente etablierten „Maze-Experiments“ ein reduziertes Stressverhalten, so dass Stressfaktoren weitgehend ausgeschlossen werden können.

Es wurden 9 Bcl11b mutante, weibliche Mäuse und entsprechende Kontrolltiere im Alter von 10-11 Wochen für fünf Tage im 8-Arm-Radiallabyrinth auf räumliches Lernen trainiert (s. 2.2.11.2). Hierbei wurde zur Beurteilung der räumlichen Lernfähigkeit bzw. des Arbeitsgedächtnisses die Anzahl an begangenen („working-memory“-)Fehlern herangezogen. Als Fehler wurde die Betretung eines Armes gewertet, der von den Mäusen schon betreten oder wenn das versteckte Futter nicht gefressen wurde. Um diese Aufgabe gut zu erfüllen, d.h. alle Futterbelohnungen zu finden und zu fressen, mit einer minimalen Anzahl an falsch betretenen Armen, muss das Tier kontinuierlich die Informationen, welche Arme schon besucht wurden, in seinem Arbeitsgedächtnis speichern. Um den Mäusen die Orientierung im Raum zu erleichtern, wurden ihnen Markierungen außerhalb des Labyrinths gezeigt. Als weiteres Kriterium für die räumliche Lernfähigkeit kann auch die Anzahl an neu besuchten Armen („new entries“) bei den ersten acht Betretungen gewertet werden. Hierbei wäre dann ein Ergebnis von 8 die bestmögliche Wertung. Eine zufällige Auswahl an Armbetretungen führt statistisch gesehen zu einem Ergebnis von ca. 5,3, so dass hier die mögliche Variabilität relativ begrenzt ist.

Bcl11b mutante Tiere zeigten in diesem Versuch an allen 5 Trainingstagen eine signifikant erhöhte Fehlerrate im Vergleich zu den Kontrollen, wobei sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Mutanten ab dem dritten Tag ein deutlicher Lerneffekt beim Aufsuchen der Futterbelohnungen gegenüber den ersten zwei Tagen zu beobachten war (Abb.3-21 C). Zur weiteren Auswertung des Experiments wurden daher die Ergebnisse der letzten drei Tage verwendet. Diese dokumentieren eine deutlich eingeschränkte Lernfähigkeit für die Mutanten gegenüber den Kontrolltieren: die durchschnittliche Anzahl an Fehlern lag bei den Mutanten bei 17,1, bei den Kontrollen bei 2,5 und ist somit fast um das 7-fache erhöht ($p=0,000001$) (Abb.3-21 A). Bei fast allen Mutanten ließ sich keine offensichtliche Strategie beim Einsammeln der Futterpellets erkennen. Viele zeigten die Tendenz, wahllos

v.a. gegenüberliegende Arme aufzusuchen. Die durchschnittliche Anzahl an neu betretenen Armen liegt mit 5,1 bei den Mutanten noch unter dem errechneten Wert für zufällige Betretungen (Abb.3-21 B). Die Aktivität der einzelnen mutanten Mäuse war in diesem Versuch sehr unterschiedlich. Einige Mäuse zeigten eine sehr hohe lokomotorische Aktivität, andere waren eher zögerlich und ängstlich. Insgesamt ließ sich zwischen Mutanten und Kontrollen kein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Aktivität beobachten. Bei den Kontrollen konnte meistens eine Strategie beim Einsammeln der Belohnungen beobachtet werden, indem die Mäuse benachbart liegende Arme nacheinander abgelaufen sind, manchmal ohne einen einzigen Fehler zu machen. Bei den Mutanten liegt der niedrigste durchschnittliche Fehlerwert bei 11, und ist damit noch höher als der höchste durchschnittliche Fehlerwert der Kontrollen, der bei 4,5 liegt.

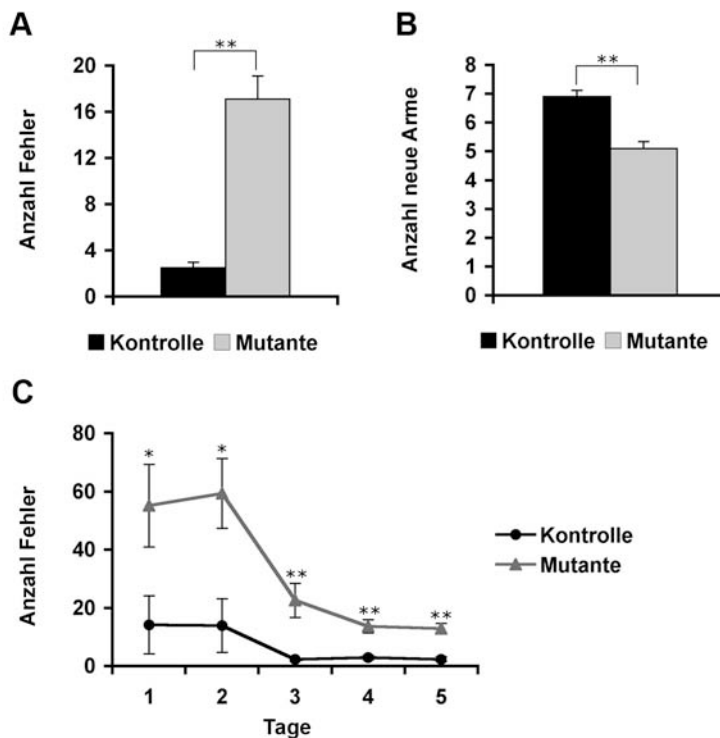


Abb.3-21 Bcl11b Mutanten zeigen Defizite beim räumlichen Lernen im Radiallabyrinth.

(A) Die durchschnittliche Anzahl an begangenen „working-memory“-Fehlern (Anzahl an fehlerhaft doppelt besuchter Arme) der letzten drei Trainingstage lag bei den Mutanten bei 17,1, bei den Kontrollen bei 2,5 und war somit um fast das 7-fache hochsignifikant erhöht ($p=0,000001$). (B) Die durchschnittliche Anzahl an neu besuchten Armen innerhalb der ersten 8 Eintritte (Tag 3-5) lag bei den Kontrollen bei einem Wert von 6,9, bei den Mutanten bei 5,1 ($p=0,00001$). (C) Die Entwicklungskurve des räumlichen Lernverhaltens der Tiere zeigt sowohl für die Mutanten als auch für die Kontrollen einen deutlichen Lerneffekt zwischen dem zweiten und dritten Trainingstag. An allen 5 Trainingstagen war die durchschnittliche Fehlerrate der Mutanten signifikant höher als bei den Kontrolltieren (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$) $n=9$.