

Dissertation

ANITA JOHN
November, 2008

Funktionelle Analyse des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Bcl11a während der Entwicklung des Rückenmarks in der Maus

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

ANITA JOHN
aus Ludwigsfelde

November, 2008

Die Dissertation wurde von Februar 2005 bis Oktober 2008 unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Britsch an den folgenden Instituten angefertigt:

Februar 2005-Januar 2007:

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch

Februar 2007-Januar 2008:

Zentrum Anatomie, Georg-August-Universität Göttingen

Februar 2008-Oktober 2008:

Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie, Universität Ulm

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Britsch

2. Gutachter: Prof. Dr. Fritz Rathjen

Disputation am: 18.02.2009

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
1.1	Das Rückenmark	6
1.2	Die Entwicklung des Rückenmarks	7
1.2.1	Die Differenzierung der Neurone des dorsalen Horns	7
1.2.2	Die neuronale Morphogenese und ihre Regulation	9
1.3	Etablierung neuronaler Konnektivität im Rückenmark	11
1.4	Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Bcl11a	13
1.5	Zielsetzung der Arbeit	15
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Material	17
2.1.1	Laboraausstattung	17
2.1.2	Mausstämme	17
2.1.3	Bakterienstämme	18
2.1.4	Plasmidvektoren	18
2.1.5	RNA-Sonden für die <i>in situ</i> -Hybridisierungen	18
2.1.6	Oligonukleotide	18
2.1.7	Antikörper	19
2.2	Methoden	20
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	20
2.2.1.1	Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten	20
2.2.1.2	Isolation von genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Biopsien	20
2.2.1.3	PCR	21
2.2.1.4	Microarray-Expressionsanalyse	21
2.2.1.4.1	RNA-Isolation und Aufreinigung	21
2.2.1.4.2	cDNA-Synthese	22
2.2.1.4.3	<i>In vitro</i> -Transkription und Biotin-Markierung von cRNA	22
2.2.1.4.4	Microarray-Hybridisierung	23
2.2.2	Bakterien- und Zellkultur	23
2.2.2.1	Bakterientransformation	23
2.2.2.2	Kultur primärer neuronaler Zellen	23
2.2.2.2.1	Kultur dorsaler Neurone des Rückenmarkes	24
2.2.2.2.2	Kultur und Transfektion neuronaler Zellen des Hippocampus	24
2.2.3	Präparation von embryonalem und postnatalem Mausgewebe	24
2.2.4	Histologische Methoden	25
2.2.4.1	Herstellung von Gewebeschnitten	25
2.2.4.1.1	Vibratonschnitte	25
2.2.4.1.2	Gefrierschnitte	26
2.2.4.2	Golgi-Färbung von dorsalem Rückenmarksgewebe	26
2.2.4.3	Dil-Markierung von primären sensorischen Neuronen	27
2.2.4.4	<i>In situ</i> -Hybridisierungsmethoden	27
2.2.4.4.1	<i>In-vitro</i> -Transkription und DIG-Markierung von RNA-Sonden	27
2.2.4.4.2	<i>In situ</i> -Hybridisierungen auf Gefrierschnitten	28
2.2.4.5	Immunhistologie und Immunzytologie	29
2.2.4.5.1	Immunhistologie auf Gefrierschnitten und TUNEL-Analyse	29
2.2.4.5.2	Immunzytologie von neuronalen Primärzellkulturen	30
2.2.5	Datenanalyse	30
2.2.5.1	Dokumentation histologischer Daten	30
2.2.5.2	Bestimmung der Zellzahlen	30
2.2.5.3	Quantifizierung mit Hilfe der Sholl-Analyse	31
2.2.5.4	Statistik und Expressionsanalyse von Microarrays	31

3	ERGEBNISSE	33
3.1	Analyse der Expression von <i>Bcl11a</i> während der Entwicklung des Rückenmarks.....	33
3.2	Konditionelle Mutagenese des <i>Bcl11a</i> -Lokus in der Maus.....	36
3.3	Analyse der neuronalen Differenzierung im dorsalen Horn von <i>Bcl11a</i> -Mutanten	38
3.4	Die neuronale Morphogenese in den <i>Bcl11a</i> -Mutanten	43
3.4.1	Primärzellkulturen dorsaler spinaler Neurone	45
3.4.2	Primärzellkulturen hippocampaler Neurone	47
3.4.3	Rescue <i>Bcl11a</i> -mutanter hippocampaler Neurone.....	51
3.4.4	Transfektion von <i>Bcl11a</i> in hippocampale Wildtypneurone	53
3.4.5	Untersuchung der Morphologie der Pyramidenzellen <i>in vivo</i>	54
3.5	Projektionen primärer sensorischer Neurone in das dorsale Horn	56
3.5.1	Die Projektionen primärer sensorischer Neurone in <i>Brn4</i> -Cre-rekombinierten Tieren	57
3.5.2	Axonale Projektionen und die neuronale Architektur in <i>Ht-PA</i> -Cre-rekombinierten Tieren	60
3.6	Identifizierung transkriptioneller Zielgene von <i>Bcl11a</i>	61
4	DISKUSSION	65
4.1	Neuronale Differenzierung im dorsalen Horn.....	65
4.2	<i>Bcl11a</i> ist essentiell für die neuronale Morphogenese.....	66
4.3	<i>Bcl11a</i> ist wichtig für die Etablierung von neuronalen Schaltkreisen	69
4.4	Molekulare Mechanismen der <i>Bcl11a</i> -Funktion	73
4.5	Konservierte Funktionen von <i>Bcl11a</i> im Nervensystem und im lymphatischen System	75
4.6	Ist <i>Bcl11a</i> evolutionär konserviert?	77
4.7	Ausblick	79
5	ZUSAMMENFASSUNG	83
6	SUMMARY	85
7	LITERATUR	87
8	ANHANG	101

1 Einleitung

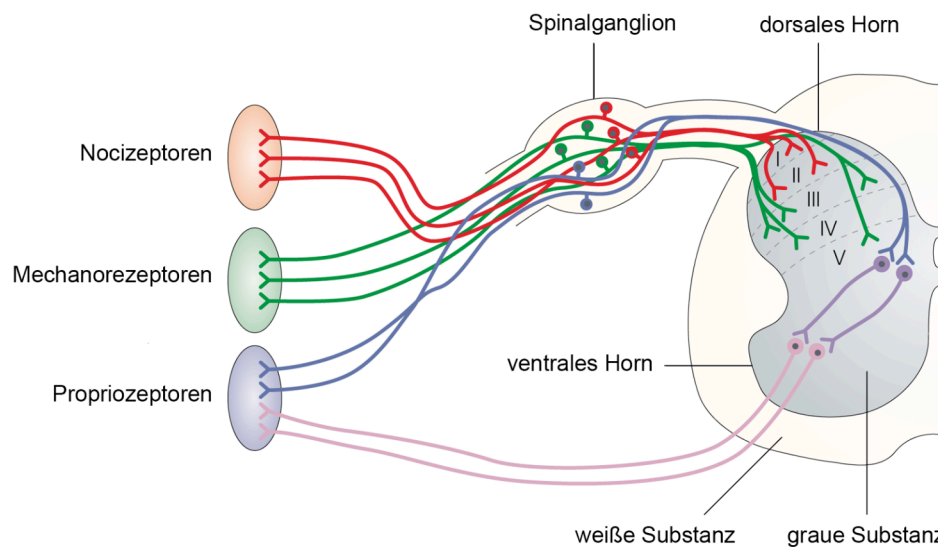
Die Grundbausteine des Nervensystems sind einzelne Neurone, die in der Lage sind funktionelle Einheiten untereinander auszubilden. Dadurch werden neuronale Schaltkreise etabliert, die fundamental für die Aufnahme, Verarbeitung und Weiterleitung von Informationen im Nervensystem sind. So befinden sich zum Beispiel im Gehirn von Säugern Milliarden von Neuronen, die über Billionen von Synapsen in verschiedensten Schaltkreisen integriert sind. Für ein grundlegendes Verständnis der Arbeitsweise des Nervensystems ist daher neben der Untersuchung individueller Neurone, vor allem die Analyse der Entstehung neuronaler Schaltkreise essentiell (Luo *et al.* 2008).

Damit die Informationsübertragung zwischen zwei Neuronen erfolgen kann, ist eine korrekte Differenzierung beider Neurone erforderlich. Dabei bildet das Zielneuron unter anderem die richtigen Neurotransmitter-Rezeptoren aus, etabliert einen für seinen Neuronentyp spezifischen Dendritenbaum und sezerniert extrazelluläre Signalmoleküle. Diese Signalmoleküle können das Axon des Partnerneurons an die Dendriten des Zielneurons heranführen. Gleichzeitig ist es nötig, dass das Axon des Partnerneurons, welches Informationen an das Zielneuron liefert, gezielt auswächst und mit den Dendriten des Zielneurons richtig verschaltet. Das Partnerneuron bildet dabei zusätzlich charakteristische Neurotransmitter aus, die von den Neurotransmitter-Rezeptoren des Zielneurons erkannt werden können. Alle diese Differenzierungsschritte werden durch zahlreiche extrinsische und intrinsische Faktoren reguliert und sind in verschiedenen Modellsystemen in *Drosophila* und in Säugern untersucht (Krylova *et al.* 2002; di Sanguinetto *et al.* 2008; Vrieseling & Arber 2006; Jan & Jan 2003; Huber *et al.* 2003; Parrish *et al.* 2007; Polleux *et al.* 2007). Ein gut charakterisiertes einfaches Modellsystem ist das dorsale Horn des Rückenmarks (Sanes & Yamagata 1999). Hier konnten bereits wichtige Aspekte der frühen Differenzierung von Neuronen, das heißt die Entstehung verschiedener Neuronentypen aus neuronalen Vorläuferzellen, aufgeklärt werden (Casparly & Anderson 2003; Helms & Johnson 2003; Jessell 2000). Die molekularen und zellulären Mechanismen der späteren Differenzierung dieser Neurone, zum Beispiel die neuronale Morphogenese, sind bisher jedoch noch nicht vollständig verstanden.

1.1 Das Rückenmark

Das Rückenmark ist eine zentrale Schaltstelle für den Empfang und die Verarbeitung somato- und viszerosensorischer Informationen im Nervensystem. Es besteht aus der grauen und der weißen Substanz, wobei die weiße Substanz die graue mantelartig umhüllt (siehe Abb. 1.1).

In der grauen Substanz befinden sich die Somata der verschiedenen Neuronentypen des Rückenmarks. Sie wird in unterschiedliche Säulen aufgeteilt, die sich entlang des gesamten Rückenmarks erstrecken und als Hintersäule (das dorsale Horn), Vordersäule (das ventrale Horn) und Zwischensäule bezeichnet werden. Die weiße Substanz besteht aus gebündelten Nervenfasern, sogenannten Bahnen, die vorwiegend in Längsrichtung des Rückenmarks verlaufen. Die aufsteigenden Bahnen leiten dem Gehirn sensorische Informationen aus dem Körper zur Verarbeitung zu, während absteigende Bahnen aus dem Gehirn unter anderem die Motorik der Skelettmuskulatur steuern. Das dorsale Horn des Rückenmarks empfängt dabei sensorische Informationen von der Peripherie und leitet sie an verschiedene Regionen im Gehirn oder an das ventrale Horn weiter (Benninghoff & Drenckhahn 2004b; Gillespie & Walker 2001; Julius & Basbaum 2001). Im ausgereiften dorsalen Horn sind die Neurone ihrer Funktion entsprechend strukturell hochorganisiert in fünf diskreten Laminae angeordnet (Rexed 1952; Abb. 1.1). In jeder Lamina befindet sich eine charakteristische Kombination von Neuronen, die durch ihre Morphologie, ihre Projektionen und zum Teil auch durch ihre Genexpression von den Neuronen der anderen Laminae unterschieden werden kann (Caspary & Anderson 2003; Rexed 1952). Jede Lamina erhält spezifischen sensorischen Input von bestimmten primären sensorischen Neuronen, deren Somata sich in den Spinalganglien befinden und die ihre zentralen Axone in das dorsale Horn senden. So projizieren zum Beispiel die Axone von nocizeptiven Neuronen, welche Schmerz- und Temperaturreize aus der Peripherie übertragen, in die Laminae I und II und werden dort mit den dorsalen Neuronen direkt verschaltet (Caspary & Anderson 2003; Julius & Basbaum 2001).



modifiziert nach Caspary et al., 2003

Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Rückenmarks.

Das Rückenmark setzt sich aus der weißen und der grauen Substanz zusammen. Die graue Substanz besitzt ein dorsales und ein ventrales Horn, in ihr befinden sich die Somata der Rückenmarksneurone. Die Neurone im dorsalen Horn sind in diskreten Laminae (I-V) angeordnet und mit primären sensorischen Neuronen aus den Spinalganglien verschaltet. Entsprechend der Informationen, die sie übertragen werden die primären sensorischen Neurone in Nocizeptoren, Mechanorezeptoren und Propriozeptoren eingeteilt. Sie projizieren in spezifische Laminae im dorsalen Horn. Die dorsalen Neurone empfangen die sensorischen Informationen, verarbeiten sie und leiten sie über die gebündelten Nervenfasern der weißen Substanz an das Gehirn bzw. direkt an Neurone im ventralen Horn weiter.

1.2 Die Entwicklung des Rückenmarks

1.2.1 Die Differenzierung der Neurone des dorsalen Horns

Die neuronale Differenzierung im dorsalen Horn kann in mehrere Abschnitte eingeteilt werden. Während der frühen Differenzierung verlassen neuronale Vorläuferzellen die Ventrikulärzone, differenzieren zu neuronalen Zellen und besiedeln das dorsale Horn (Caspary & Anderson 2003; Jessell 2000). Die sich anschließende spätere Differenzierung dieser Neurone ist unter anderem durch die Ausbildung eines spezifischen Neurotransmitter-Phänotyps und einer charakteristischen neuronalen Morphologie gekennzeichnet (Hausser *et al.* 2000; Horton & Ehlers 2003; Kandel *et al.* 2000). Die Neurone können dabei auch die Fähigkeit erlangen, axonale Wegfindungsproteine zu produzieren und zu sezernieren (Messersmith *et al.* 1995; Yoshida *et al.* 2006). Die endgültige Ausreifung der dorsalen Neurone setzt sich postnatal fort (Fitzgerald 2005;

Fitzgerald & Jennings 1999). Im Folgenden werde ich auf wichtige Aspekte der frühen und der späten neuronalen Differenzierung näher eingehen.

Die frühe neuronale Differenzierung beginnt im Neuralrohr am Entwicklungstag 9,5 der Maus (Casparly & Anderson 2003). Dabei exprimieren die neuronalen Vorläuferzellen in der Ventrikulärzone Markerproteine, die charakteristisch für ihre dorsoventrale Position sind. Dazu gehören unter anderem Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren der Pax-Familie und die *basic helix-loop-helix* (bHLH)-Transkriptionsfaktoren Math1, Ngn1, Ngn2 und Mash1 (Briscoe & Ericson 2001; Gowan *et al.* 2001; Lee & Jessell 1999). Die positionelle Identität wird den Vorläuferzellen durch morphogene Signale zugewiesen. Diese Morphogene sind Signalmoleküle der BMP- und Wnt-Familie, die von der Deckplatte des Neuralrohrs sezerniert werden und einen Konzentrationsgradienten entlang der dorsoventralen Achse des Neuralrohrs bilden (Casparly & Anderson 2003; Helms & Johnson 2003). Während einer ersten Phase der Neurogenese, zwischen den Entwicklungstagen 10,0 und 11,5 verlassen die neuronalen Vorläuferzellen die Ventrikulärzone, differenzieren sich dabei zu neuronalen Zellen und wandern in die Mantelzone ein, die in der weiteren Entwicklung die graue Substanz bildet. Dieser Differenzierungsprozess ergibt 6 Typen von dorsalen spinalen Neuronen (dI1-6), die generell in die Klassen A und B eingeteilt werden können (Gowan *et al.* 2001; Gross *et al.* 2002; Muller *et al.* 2002). Die zweite neurogene Phase (E11,5 - E14,0) ist durch die Entstehung der Neurone des oberflächlichen dorsalen Horns aus den Klasse-B-Neuronen geprägt, welche die Mehrzahl der Neurone des dorsalen Rückenmarks bilden. Der Transkriptionsfaktor Lbx1 ist in den früh geborenen Neuronentypen dI4-6 und in den spät geborenen Neuronen exprimiert und essentiell für die Determinierung des Klasse-B-Zellschicksals. Der Transkriptionsfaktor Lmx1b wird von dI5-Neuronen und einem Teil der Klasse-B-Neuronen exprimiert und für die Differenzierung der Neurone des oberflächlichen dorsalen Horns benötigt (Gross *et al.* 2002; Muller *et al.* 2002).

Während der weiteren späteren Differenzierung entstehen zwei Hauptklassen von Neuronen, die GABAergen inhibitorischen und die glutamatergen exzitatorischen Neurone (Cheng *et al.* 2004). Die Entscheidung zwischen einem GABAergen oder glutamatergen Zellschicksal wird von den Transkriptionsfaktoren Lbx1, Tlx3 und Tlx1 kontrolliert (Cheng *et al.* 2004; Cheng *et al.* 2005). Neben GABA und Glutamat gibt es im dorsalen Horn eine Vielzahl von weiteren Transmittermolekülen und Rezeptoren, die Informationsübertragungen ermöglichen (Baccei & Fitzgerald 2004; Todd *et al.* 2000).

Dazu gehören unter anderem der Rezeptor des Gastrin-freisetzenden Peptids GRPR und das Neuropeptid Galanin (Sun & Chen 2007; Zhang *et al.* 1998). Sun und Kollegen konnten zeigen, dass GRPR im dorsalen Horn von Mäusen die Empfindung des Juckreizes vermittelt (Sun & Chen 2007). Mäuse, die Galanin überexprimieren sind weniger schmerzempfindlich gegenüber Hitze und zeigen eine reduzierte spinale Sensibilisierung bei wiederholter Stimulation durch primäre sensorische Spinalganglienneurone (Wiesenfeld-Hallin *et al.* 2005).

1.2.2 Die neuronale Morphogenese und ihre Regulation

Als neuronale Morphogenese wird ein Prozess bezeichnet, bei dem aus unreifen Neuronen ausgereifte Nervenzellen entstehen, die ein weit verzweigtes Netzwerk bestehend aus Dendriten und Axonen besitzen. Dendriten und Axone sind zwei verschiedene Typen von Fortsätzen, die beim Vorgang der Polarisierung aus den ursprünglich gleichen Fortsätzen eines Neurons entstehen (Arimura & Kaibuchi 2007; Dotti *et al.* 1988). Die strukturgebenden Elemente von Neuronen sind, als Bestandteile des Zytoskeletts, das Aktin und die Mikrotubuli. Axone und Dendriten unterscheiden sich in der Ausrichtung der Mikrotubuli und der Art ihrer Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs), welche diese stabilisieren (Arimura & Kaibuchi 2007). Das charakteristische MAP der Axone ist das tau-Protein, während das bevorzugte MAP der Dendriten das MAP2-Protein ist (Caceres *et al.* 1984; Ding *et al.* 2004).

Während der Morphogenese von Neuronen spielen intrazelluläre und extrazelluläre Prozesse eine wichtige Rolle (da Silva & Dotti 2002; Jan & Jan 2003; Parrish *et al.* 2007). Wesentliche Grundlage des Auswachsens von neuronalen Fortsätzen, die in ihrem unreifen Zustand als Neuriten bezeichnet werden, ist eine Erhöhung der Dynamik ihrer Aktin-Filamente. Gleichzeitig führt die Polymerisation der Mikrotubuli und das Einfügen neuer Membranbestandteile zur Stabilisierung von Neuriten und kontrolliert deren Wachstumsgeschwindigkeit (da Silva & Dotti 2002; Dotti *et al.* 1988; Sheetz *et al.* 1992; Zakharenko & Popov 1998). Das Wachstum oder auch die Verkürzung der Neuriten und des heranwachsenden Axons erfolgen durch motile Wachstumskegel, die sich jeweils an der Spitze der Fortsätze befinden (Dent & Gertler 2003). Am besten untersucht sind die Wachstumskegel von Axonen. Sie bestehen aus einer Kernregion mit Zellorganellen und Mikrotubuli und aus einer peripheren Region, die Lamellipodien mit quervernetzten Aktin-

Filamenten und Filopodien mit gebündelten Aktin-Filamenten enthält (Dent & Gertler 2003). Die Filopodien vermitteln das Auswachsen des Wachstumskegels und erkunden dabei wie Messfühler die Umgebung (Goldberg & Burmeister 1989; Zheng *et al.* 1994). Die Verlängerung des Axons erfolgt durch das Anheften von neuen Aktinmolekülen an die Aktin-Filamente in der Spitze der Filopodien. Durch den Aufbau und Transport von Mikrotubuli in die neu gebildeten Filopodien hinein, werden diese stabilisiert (Hall 1998; Huber *et al.* 2003; Luo 2000, 2002). Ein Neuron muss also die Geschwindigkeit der Dynamik seiner Aktin-Filamente und Mikrotubuli präzise kontrollieren, um das Auswachsen von Dendriten und Axonen zu ermöglichen (Dent & Gertler 2003).

Die Dynamik ihres Zytoskeletts kontrollieren Neurone unter anderem durch ein komplexes Repertoire an Aktin- und Mikrotubuli-bindenden Proteinen (Baas & Black 1990; Gordon-Weeks 2000; Gunning *et al.* 1998). Zu den Aktin-bindenden Proteinen gehört zum Beispiel Profilin, welches das Anfügen neuer Aktinmoleküle an Aktin-Filamente fördert (Cooper & Schafer 2000). Die Regulation dieser Proteine erfolgt innerhalb multimolekularer Proteinkomplexe durch die Aktivität von Rho GTPasen (da Silva & Dotti 2002). Wichtige Mitglieder dieser Familie sind RhoA, Rac und Cdc42. Während des Auswachsens von Dendriten und Axonen führt die Aktivität von RhoA mit Hilfe spezieller Aktin-stabilisierender Proteine zu einem verringerten Auswachsen bestimmter Fortsätze. Rac und Cdc42 erhöhen dagegen das Wachstum eines Fortsatzes durch die Interaktion mit Proteinen, welche die Dynamik der Aktin-Filamente erhöhen (Bradke & Dotti 1999; Luo *et al.* 1994; Ottlinger & Lin 1988). Dieses gegenseitige Gleichgewicht der Aktivitäten von RhoA und Rac/Cdc42 führt zum Wachstum von Axonen und Dendriten und ist auch an der Remodulierung von Dendriten beteiligt (Jalink *et al.* 1993; Li *et al.* 2000; Nakayama *et al.* 2000). Rho GTPasen werden in ihrer Aktivität durch andere Proteine kontrolliert. So konnte für Rac in hippocampalen Neuronen eine Aktivierung durch den PAR-Proteinkomplex nachgewiesen werden, der vermutlich über die Modulierung der Aktivitäten der Proteine STEF oder TIAM1 und Cdc42 verläuft (Nishimura *et al.* 2005).

Sich entwickelnde Neurone antworten auch auf extrazelluläre Signalmoleküle, die das Auswachsen von Dendriten und Axonen stimulieren oder inhibieren können. Zu diesen Molekülen gehören unter anderem Neurotrophine, Ephrine, Wnt-Proteine, Semaphorine, Netrin und Slit (Dickson & Senti 2002; Jan & Jan 2003; Parrish *et al.* 2007). Einige dieser Signalmoleküle haben auch Funktionen in der Wegfindung von Axonen (vgl. Kapitel 1.3).

Untersuchungen in *Drosophila* zeigen, dass Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle während der Entwicklung von Dendriten und Axonen spielen (Brenman *et al.* 2001; Parrish *et al.* 2007). So reguliert der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *sequoia* die Morphogenese der Mehrzahl der Neurone des Peripheren- und Zentralnervensystems in *Drosophila* (Brenman *et al.* 2001). Weitere Transkriptionsfaktoren konnten vor allem für die Regulation der Dendritenentwicklung identifiziert werden (Parrish *et al.* 2006). Dazu gehören die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren *hamlet* und *spalt* (Cantera *et al.* 2002; Moore *et al.* 2002).

In Säugern sind bisher nur wenige Transkriptionsfaktoren bekannt, denen eine direkte Funktion bei der Regulation der Morphogenese von Neuronen zugeschrieben werden kann. Hier regulieren NeuroD, CREST und CREB aktivitätsabhängig die Entwicklung von Dendriten (Aizawa *et al.* 2004; Gaudilliere *et al.* 2004; Redmond *et al.* 2002). Neuronale Aktivität kann das Wachstum von Dendriten beeinflussen und wird durch Ca^{2+} -Signale im Neuron vermittelt (Parrish *et al.* 2007; Wong & Ghosh 2002). CREST, CREB und NeuroD werden durch den Einstrom von Ca^{2+} in das Neuron aktiviert und fördern die Dendritenentwicklung. Diese Aktivierung wird bei CREB und NeuroD durch die Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen IV bzw. II vermittelt. Es wird diskutiert, dass CREB das Dendritenwachstum durch Kontrolle der Expression von BDNF und Wnt-2 reguliert (Shieh *et al.* 1998; Wayman *et al.* 2006). Einige Aspekte der Regulation der neuronalen Morphogenese auf Proteinebene durch intrazelluläre Signalkaskaden oder mittels extrazellulärer Signalmoleküle konnten also bereits aufgeklärt werden. Die Regulation der Morphogenese auf transkriptioneller Ebene, insbesondere in Säugern, ist bisher jedoch noch nicht vollständig verstanden.

1.3 Etablierung neuronaler Konnektivität im Rückenmark

Die korrekte Differenzierung spinaler Neurone und primärer sensorischer Neurone sowie deren funktionelle Verschaltungen miteinander sind Voraussetzung für die Etablierung von neuronaler Konnektivität im Rückenmark (Sanes & Yamagata 1999).

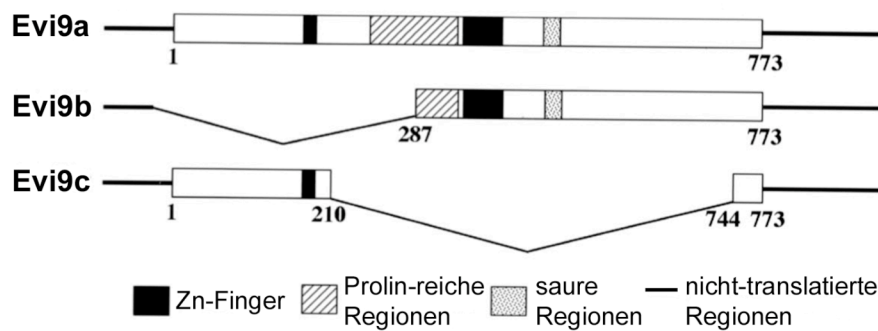
Im ventralen Rückenmark sind einige Prozesse, die zur Ausbildung von neuronalen Schaltkreisen führen, bereits gut untersucht. Neben anderen Faktoren kontrollieren Transkriptionsfaktoren der Hox-Familie die Ausbildung von verschiedenen Motoneuronen-Populationen. Sie regulieren dabei weitere Transkriptionsfaktoren, welche

an der terminalen Differenzierung der Motoneurone, den Projektionen ihrer Axone sowie an deren Muskel-Innervation beteiligt sind (di Sanguinetto *et al.* 2008). Einer dieser Transkriptionsfaktoren ist Pea3 (di Sanguinetto *et al.* 2008; Haase *et al.* 2002; Vrieseling & Arber 2006). Pea3 ist in verschiedenen Populationen von Motoneuronen essentiell für die Ausbildung einer korrekten Dendritenmorphologie und die funktionelle Verschaltung der Motoneurone mit den Axonen bestimmter Typen von propriozeptiven Neuronen (Vrieseling & Arber 2006; vgl. Kapitel 4.2). Das Wnt-Protein Wnt-3 wird von bestimmten Motoneuronen zu einem Zeitpunkt exprimiert, wenn diese spezifische synaptische Verschaltungen mit sensorischen Neuronen aus den Spinalganglien etablieren. Wnt-3 inhibiert dabei das Längenwachstum der Axone sensorischer Neurone, induziert eine Vergrößerung der axonalen Wachstumskegel und fördert dadurch die terminale axonale Reifung und die präzise Verschaltung der Neurone miteinander (Krylova *et al.* 2002). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Wnt-3a die Ausrichtung der Mikrotubuli in den Wachstumskegeln von Spinalganglienneuronen kontrolliert (Purro *et al.* 2008). Während der Entwicklung des Rückenmarks sind die Semaphorine Sema6C und Sema6D im oberflächlichen dorsalen Horn exprimiert. Sie verhindern das Einwachsen der Axone propriozeptiver sensorischer Neurone in das oberflächliche dorsale Horn, indem sie an die PlexinA1-Rezeptoren der propriozeptiven Axone binden. Durch die dynamische Expression beider Semaphorine entsteht ein Bereich im dorsalen Horn, in dem Sema6C und Sema6D nicht exprimiert sind. Durch diesen Korridor hindurch wachsen die propriozeptiven Axone in das ventrale Horn hinein und sind damit in der Lage, korrekte Verschaltungen mit den sich dort befindenden Motoneuronen zu etablieren (Yoshida *et al.* 2006). Sema3A und Sema3F kontrollieren das Einwachsen und die korrekten Projektionen der Axone von Motoneuronen aus dem ventralen Rückenmark in die Gliedmaßen (Huber *et al.* 2005). Das Klasse-5-Semaphorin Sema5A, ein integrales Membranprotein, hat induzierende und inhibierende Effekte auf sich entwickelnde Axone des Fasciculus retroflexus, eines Fasertraktes des Zwischenhirns. Sema5A interagiert dabei direkt mit bestimmten Proteoglycanen, die sich in der Extrazellulärmatrix befinden und ein Umschalten zwischen den gegensätzlichen Sema5A-Funktionen ermöglichen (Kantor *et al.* 2004). In den letzten Jahren konnte eine weitere Proteinfamilie identifiziert werden, die am Prozess der axonalen Wegfindung beteiligt ist. Es handelt sich um die Familie der sezernierten Frizzled-verwandten Proteine (SFRP), die ursprünglich als Antagonisten von Wnt-Proteinen identifiziert wurden (Kawano & Kypta 2003). Sie wirken jedoch auch

durch Wnt-unabhängige Mechanismen, zum Beispiel bei der Differenzierung von Zellen der Retina (Esteve *et al.* 2003). Für SFRP1 konnte gezeigt werden, dass es Wnt-unabhängig *in vitro* in retinalen Zellkulturen des Hühnchens das Auswachsen von Neuriten fördert und in retinalen Ganglienzellen (RGC) von *Xenopus leavis in vitro* und *in vivo* konzentrationsabhängig das Wachstum und die Ausrichtung von Axonen kontrolliert. Es kann dabei fördernd oder inhibierend auf die Axone einwirken, diese Funktionen sind abhängig von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix (Rodriguez *et al.* 2005).

1.4 Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Bcl11a

Der *Bcl11a* (*B cell leukemia 11A*)-Lokus wurde ursprünglich in der Gruppe von Neal G. Copeland als eine neue retrovirale Integrationsstelle identifiziert. Dies bedeutet, dass eine retrovirale Insertion im *Bcl11a*-Lokus die Expression des *Bcl11a*-Transkripts erhöht und in Mäusen des Stammes BXH2 Leukämien induzieren kann. *Bcl11a* ist damit ein Proto-Onkogen und wird auch als *Evi9*, für *ecotropic viral integration site 9*, bezeichnet (Li *et al.* 1999). *Bcl11a* ist ein Transkriptionsfaktor mit Zinkfingermotiven des Typs C₂H₂ (Cystein₂-Histidin₂) und gehört zur Familie Krüppel-ähnlicher Zinkfingerproteine (Nakamura *et al.* 2000). Diese Zinkfinger motive sind die häufigsten DNA-Bindungsmotive in eukaryotischen Transkriptionsfaktoren (Iuchi 2001; Klug 1999; Laity *et al.* 2001). In der Maus gibt es drei Isoformen von *Bcl11a*: *Evi9a*, *Evi9b* und *Evi9c* (siehe Abb. 1.2 und Abb. 3.2). *Evi9a* repräsentiert das größte *Bcl11a*-Transkript, es besteht aus 773 Aminosäuren, enthält 3 Zinkfinger motive und eine Prolin-reiche Region. In 3'-Richtung des dritten Zinkfinger motivs befindet sich eine Region mit einem hohen Anteil saurer Aminosäuren. *Bcl11a* könnte daher unter bestimmten intrazellulären Bedingungen als transkriptioneller Aktivator fungieren (Mitchell & Tjian 1989; Nakamura *et al.* 2000). *Evi9b* ist 487 AS groß, dem Protein fehlen das erste Zinkfinger motiv und ein Teil der Prolin-reichen Region. Das kleinste *Bcl11a*-Protein wird durch *Evi9c* repräsentiert, es ist 239 AS groß und enthält nur das erste Zinkfinger motiv. Die einzelnen *Bcl11a*-Isoformen unterscheiden sich in ihrer gewebsspezifischen und subzellulären Lokalisation (vgl. Kapitel 4.7). So ist *Evi9a* vorrangig im Großhirn exprimiert, während *Evi9b* vor allem im Kleinhirn vorkommt. *In vitro*-Untersuchungen zeigen, dass *Evi9a* und *Evi9b*, nicht jedoch *Evi9c*, mit dem Proto-Onkogen *BCL6* interagieren können (Nakamura *et al.* 2000).



modifiziert nach Nakamura et al., 2000

Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Isoformen Evi9a, Evi9b und Evi9c von Bcl11a.

Die Isoform Evi9a ist mit 773 AS (1-773) die größte Isoform. Evi9b wird von einem alternativen Startcodon translatiert und repräsentiert AS 287 bis AS 773. Die Isoform Evi9c stellt eine Fusion aus dem N-terminalen Bereich (AS 1-210) und dem C-terminalen Ende (AS 744-773) von Evi9a dar. Die Legende bezeichnet die wichtigsten Proteindomänen aller drei Isoformen. Die Zinkfingerdomänen 2 und 3 sind in dieser Abbildung zusammengefasst.

Avram und Kollegen identifizierten Bcl11a als einen transkriptionellen Repressor, der einerseits mit Mitgliedern der COUP-TF-Familie interagiert, andererseits aber auch autonom als Repressor fungieren kann. Aufgrund der Interaktion mit COUP-TFs wird Bcl11a auch als CTIP1 (*COUP-TF-interacting protein 1*) bezeichnet (Avram *et al.* 2000; Avram *et al.* 2002). Diese durch Bcl11a vermittelte transkriptionelle Repression ist vermutlich unabhängig von Histondeacetylasen der Klassen I und II (Avram *et al.* 2000). In Chromatin-Koimmunopräzipitations-Assays konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression von Bcl11a in Säugerzellen zur Deacetylierung der Histone H3 und H4 und damit zur transkriptionellen Repression führt. Diese Repression kann mittels Zugabe von Nikotinamid, einem Inhibitor von Klasse III Histondeacetylasen, aufgehoben werden. Eine solche Deacetylase ist SIRT1 deren direkte Bindung an Bcl11a und deren Bcl11a-abhängiger Transport zu Promotorregionen in Säugerzellen nachgewiesen werden konnten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass SIRT1 ein wichtiger Mediator der Bcl11a-vermittelten transkriptionellen Repression ist (Senawong *et al.* 2005).

Die Analyse einer Mausmutante mit Nullmutation des *Bcl11a*-Gens, die perinatal letal ist, ergab, dass Bcl11a essentiell für die Bildung der B-Zellen des lymphatischen Systems ist. Gleichzeitig spielt Bcl11a eine wichtige Rolle bei der Differenzierung bestimmter Typen von T-Zellen (Liu *et al.* 2003b). Das humane Ortholog BCL11A ist ebenfalls ein Proto-Onkogen, dessen Expression durch chromosomale Translokationen aktiviert werden kann und das dadurch in der Lage ist, in reifen B-Zellen Lymphome auszulösen (Martin-Subero

et al. 2002; Satterwhite *et al.* 2001). Weitere Bcl11a-Homologe wurden im Hühnchen, in *Xenopus* und in der Ratte identifiziert (Kuo & Hsueh 2007; Satterwhite *et al.* 2001).

Es gibt in Bezug auf bestimmte Transkriptionsfaktorfamilien eine bemerkenswerte Parallelität in der Entwicklung des lymphatischen Systems und des Nervensystems. So sind die Transkriptionsfaktoren der Pax-, Tlx- und Runx-Familie nicht nur wichtig für die Entwicklung des lymphatischen Systems, sondern erfüllen auch essentielle Funktionen während der Entwicklung des Nervensystems (Cheng *et al.* 2004; Marmigere & Ernfors 2007; Nutt *et al.* 1997; Owens *et al.* 2006; Taniuchi *et al.* 2002; Urbanek *et al.* 1994). Auch Bcl11a ist im lymphatischen System und in bestimmten Regionen des Nervensystems exprimiert (Leid *et al.* 2004; Nakamura *et al.* 2000). Bcl11a könnte daher neben seinen Funktionen im lymphatischen System auch während der Entwicklung des Nervensystems eine wesentliche Rolle spielen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Etablierung von neuronalen Schaltkreisen im Rückenmark ist abhängig von verschiedenen Differenzierungsprozessen der spinalen Neurone. Ein verbessertes Verständnis der molekularen Grundlagen dieser Prozesse kann wertvolle Erkenntnisse darüber liefern, wie die Informationsverarbeitung im Rückenmark erfolgt. Vor allem die frühe neuronale Differenzierung im dorsalen Horn ist gut untersucht. Die spätere Differenzierung der Neurone ist dagegen noch nicht vollständig verstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit soll mit Hilfe einer konditionellen Mausmutante die Funktion des Transkriptionsfaktors Bcl11a während der neuronalen Differenzierung im dorsalen Horn analysiert werden. Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass Transkriptionsfaktoren mit Funktionen im lymphatischen System auch essentielle Funktionen während der Entwicklung des Nervensystems haben (Cheng *et al.* 2004; Marmigere & Ernfors 2007; Nutt *et al.* 1997; Owens *et al.* 2006; Taniuchi *et al.* 2002; Urbanek *et al.* 1994). Bcl11a hat wichtige Funktionen im lymphatischen System und ist auch im Nervensystem exprimiert (Leid *et al.* 2004; Liu *et al.* 2003b). Damit ist Bcl11a ein interessanter Kandidat, der parallel zu seinen Funktionen im lymphatischen System zusätzlich wichtige neuronale Entwicklungsschritte regulieren könnte. Ziel der Arbeit ist es, die neuronalen Differenzierungsprozesse im dorsalen Horn zu analysieren, für die Bcl11a benötigt werden könnte. Dabei soll auch ein möglicher Einfluss von Bcl11a auf die Etablierung neuronaler

Verschaltungen untersucht werden. Die Suche nach transkriptionellen Zielgenen von Bcl11a soll Hinweise auf mögliche Mechanismen der Bcl11a-Funktion im Nervensystem liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborausstattung

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Enzyme sind in Tab. A 1 im Anhang oder im Text mit Angabe des Herstellers aufgeführt. Tab. A 2 enthält die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Medien. Sonstige Lösungen und Medien wurden gemäß Sambrook und Russell (Sambrook & Russell 2001) hergestellt. Verwendete Geräte und genutzte Labor- sowie Einmalware sind im Text mit der Angabe des Herstellers aufgeführt oder Standardausstattung von biologischen Laboren. Die verwendeten Standardenzyme wurden von New England Biolabs bezogen. Die Experimente wurden im Labor von Prof. Dr. Carmen Birchmeier in der Nachwuchsgruppe von Dr. Stefan Britsch am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch (MDC) begonnen und im Labor von Prof. Dr. Stefan Britsch am Zentrum Anatomie der Universität Göttingen und dem Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie der Universität Ulm fortgeführt.

2.1.2 Mausstämme

Der Mausstamm mit dem konditionellen knockout-Allel *Bcl11a*^{lox/lox} wurde freundlicherweise von Neal G. Copeland (Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore) zur Verfügung gestellt. Bei diesen Tieren ist im *Bcl11a*-Locus am 3'-Ende von Exon 1 eine Neomycin-Resistenzkassette eingefügt (Liu *et al.* 2003a). Die Resistenzkassette und das Exon 1 sind von Erkennungssequenzen für Cre-Rekombinasen, *loxP*-Sequenzen genannt, flankiert. Das resultierende Allel wird als *Bcl11a*^{lox/lox} bezeichnet. Um Tiere mit einem rekombinierten, mutanten *Bcl11a*-Allel zu erhalten, wurden die *Bcl11a*^{lox/lox}-Tiere mit transgenen Mäusen gekreuzt, die folgende Cre-Rekombinasen exprimieren: *Deleter-Cre* (Schwenk *et al.* 1995), *Brn4-Cre* (Wine-Lee *et al.* 2004), *Emx1*^{IREScree} (Gorski *et al.* 2002) und *Ht-PA-Cre* (Pietri *et al.* 2003). Zur Analyse der Projektionen hippocampaler Neurone in *Bcl11a*^{lox/lox}-Tieren wurde als Reporterprotein Thy1-YFP, Linie H (Feng *et al.* 2000) eingekreuzt.

Für die Primärzellkulturen wurden Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6J vom MDC bzw. vom Uniklinikum Göttingen bezogen.

2.1.3 Bakterienstämme

Tab. 2-1: Verwendete Bakterienstämme. Der Name, der Genotyp und die Bezugsquelle sind aufgeführt.

Name	Genotyp	Bezugsquelle
Escherichia coli XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ $endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ [F' <i>proAB lacIqZ</i> Δ M15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene
Escherichia coli DH10B	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ$ Δ M15 $\Delta lacX74 recA1 endA1 araD139$ $\Delta(ara, leu)7697 galU galK \lambda-$ rpsL nupG	Invitrogen

2.1.4 Plasmidvektoren

Tab. 2-2: Verwendete Plasmidvektoren.

Name	Insert	Bezugsquelle/ Referenz
pBluescript SK II(+)	-	Stratagene
pBluescript KS II(+)	-	Stratagene
pCS2+MT	-, Expressionsvektor mit 5x Myc-Tag	Stephen Hughes, National Cancer Institute
pCS2-Evi9b	CDS von Evi9b, Isoform b von Bcl11a, siehe pCS2+MT	diese Arbeit

2.1.5 RNA-Sonden für die *in situ*-Hybridisierungen

Tab. 2-3: Verwendete Riboproben. Angegeben sind der Name, der Vektor, das Restriktionsenzym, die RNA-Polymerase für die antisense-Transkription und die Bezugsquelle.

Riboprobe	Vektor	Antisense-Transkription	Bezugsquelle/ Referenz
Bcl11a	pGEM-T Easy	: SpeI, T7	H. Brylka, Labor Prof. S. Britsch
Drg11	unbekannt	: XhoI, T3	H. Wildner, Labor C. Birchmeier
Frzb	pCMV-SPORT6	: EcoRV, T7	diese Arbeit
GAD67	pBluescript SK II(+)	: NotI, T7	T. Müller, Labor C. Birchmeier
Gria2	pYX-Asc	: SalI, T7	M. Sieber, Labor C. Birchmeier
GRPR	unbekannt	: EcoRI, T7	D. Bröhl, Labor C. Birchmeier
Sema5a	pBluescript KS II(+)	: XbaI, T3	R. Matsuoka, Labor A. Kolodkin
3830431G21	pT7T3-PacI	: EcoRI, T3	diese Arbeit

2.1.6 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Biotex (Berlin) und MWG-Biotech (Martinsried) bezogen.

Tab. 2-4: Verwendete Oligonukleotide. Der Name, die Sequenz und der Verwendungszweck sind angegeben.

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck
Bcl11a-G1-UP	TAG CTC CTG CTA GCC AGG TTT CTT	Genotypisierungsprimer
Bcl11a-G1-LP	CGA GGC TTG CAG AAA CAG AAA GAT	<i>Bcl11a</i> ^{flox/flox} -Allel
Bcl11a-G3-UP	CCA GGG GAT CCG GGG TCT CG	Genotypisierungsprimer

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck
Bcl11a-G3-LP	CGC GCT CCG TCC TCT GTC TGT TTG	<i>Bcl11a</i> ^{<i>Δlox/Δlox</i>} -Allel
Cre new 1	GAA CGC ACT GAT TTC GAC CA	Genotypisierungsprimer <i>Brn4-Cre</i> -Allel
Cre new 2	AAC CAG CGT TTT CGT TCT GC	
Deleter 1	CGC CAT CCA CGC TGT TTT GAC C	Genotypisierungsprimer <i>Del-Cre</i> -Allel
Deleter 2	CAG CCC GGA CCG ACG ATG AAG	
Emx 1	GTA TTT GGT TTA GAG TTT GGC	Genotypisierungsprimer <i>Emx</i> ^{<i>IR^{EScre}</i>} -Allel
Emx 2	GGG GGA CAT GAG AGG ATG TCA C	
Ht-PA-UP	TGT CTC CTC TTC TTT CTC TTA	Genotypisierungsprimer <i>Ht-PA-Cre</i> -Allel
Ht-PA-LP	CGC CTG AAG ATA TAG AAG ATA	
YFP-Wt-Fw	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	Genotypisierungsprimer Wildtyp-Allel <i>thy1-YFP</i>
YFP-Wt-Rv	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC A	
YFP-Mut-Fw	AAG TTC ATC TGC ACC ACC G	Genotypisierungsprimer mutantes Allel <i>thy1-YFP</i>
YFP-Mut-Rv	TCC TTG AAG AAG ATG GTG CG	
Evi9b-UP-CSpS	GAT ATG AAT TCA ATG GCC CTG GCC ACC CAT CA	Amplifikation CDS Evi9b
Evi9b-LP-CS	GAT ATT CTA GAG CTC AGA ACT TAA GGG TTC TTG	

2.1.7 Antikörper

In Tab. 2-5 sind die verwendeten polyklonalen Primärantikörper aufgelistet, welche die genannten murinen Antigene binden. Die benutzten Sekundärantikörper für die Fluoreszenzimmunhistologie waren anti-Maus-, anti-Kaninchen-, anti-Huhn-, anti-Ziege- oder anti-Meerschweinchen-IgG-Antikörper, jeweils gekoppelt an Cy2, Cy3 oder Cy5 (Dianova, Hamburg). Cy3 und Cy5 wurden 1:500 und Cy2 1:400 eingesetzt.

Tab. 2-5: Verwendete Primär-Antikörper. Die eingesetzte Verdünnung für die Immunhistologie und die Bezugsquelle der Antikörper sind angegeben.

Antigen	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Aquaporin	Kaninchen	1:1000	Chemicon
Bcl11a	Kaninchen	1:5000	H. Brylka, Labor Prof. Britsch
Bcl11a	Meerschweinchen	1:5000	H. Brylka, Labor Prof. Britsch
Ebfl	Kaninchen	1:6000	H. Wildner, Labor Prof. Birchmeier
Lbx1	Meerschweinchen	1:10000	T. Müller, Labor Prof. Birchmeier
Lmx1b	Kaninchen	1:10000	T. Müller, Labor Prof. Birchmeier
MAP2	Kaninchen	1:2000	Chemicon
MAP2	Maus	1:500	Sigma-Aldrich
Myc	Huhn	1:500	Abcam
Myc	Kaninchen	1:5000	Abcam
NeuN	Maus	1:1000	Chemicon
Parvalbumin, PV28	Kaninchen	1:2000	Swant
Pax2	Kaninchen	1:500	Zymed
Sox2	Ziege	1:100	Chemicon
Tau-1	Maus	1:300	Chemicon
Tau-5	Maus	1:5000	Chemicon
TOTO	-	1:10000	Invitrogen
TrkA	Kaninchen	1:2000	L. Reichardt, San Francisco
Tyr-Tubulin	Maus	1:1000	Sigma-Aldrich

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden nach Sambrook und Russell (Sambrook & Russell 2001) durchgeführt und sind hier nicht näher erläutert. DNA-Sequenzierungen wurden von Karin Gottschling am MDC in Berlin bzw. von MWG-Biotech in Martinsried durchgeführt.

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

Die Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Mini-Prep) erfolgte nach der Boiling-Prep-Methode. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 50 µl 1xTE gelöst und bei 4 °C gelagert. Die Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab erfolgte mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) oder dem NucleoBond PC-500 Kit (Machery-Nagel, Düren) gemäß Herstellerangaben. Die DNA wurde dabei in 100-300 µl 1xTE gelöst und bei -20 °C gelagert. Es folgte die photometrische Konzentrationsbestimmung und Gelelektrophorese.

Die präparative Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) oder dem NucleoSpin-Extract II-Kit (Machery-Nagel) gemäß Herstellerangaben. Die DNA wurde abschließend mit 10-25 µl 1xTE eluiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.2 Isolation von genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Biopsien

Die Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Biopsien für PCR-Analysen erfolgte aus Schwanzspitzen frisch präparierter Embryonen und Ohrloch- oder Schwanzbiopsien von Mäusen. Das Gewebe wurde mindestens 2 h oder üN in 50 µl Schwanzpuffer mit 20-40 µg/ml Proteinase K bei 55 °C verdaut. Die Proteinase K wurde danach 10 min bei 95 °C hitzeinaktiviert und der Gewebeverdau 1:3-1:6 mit MilliQ-H₂O aus einer Ultrafiltrationsanlage (Milli-Q UF Plus; Millipore) verdünnt.

2.2.1.3 PCR

Die PCR wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung und die Genotypisierung eingesetzt. Dafür wurden PCR-Standardmethoden (Sambrook & Russell 2001) angewendet und PCR-Maschinen von Biometra (Göttingen) benutzt. Verwendet wurden die folgenden Polymerasen mit den entsprechenden Puffern gemäß Herstellerangaben: Taq (Invitrogen) und PfuUltra (Stratagene). Für die präparative PCR wurde das Amplifikationsprodukt elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend isoliert (vgl. 2.2.1.1).

Die Routine-Genotypisierung wurde mit DNA durchgeführt, die aus embryonalem Gewebe oder Biopsien extrahiert worden war (vgl. 2.2.1.2). Ein Reaktionsansatz enthielt 1-2 µl des hitzeinaktivierten Lysates, 2 µl dNTPs (2,5 mM je Nukleotid; Invitrogen), 2 µl 10x Puffer (Invitrogen), 1 µl Primer 1 (10 µM *Bcl11a*-G1-UP), 1 µl Primer 2 (10 µM *Bcl11a*-G1-LP), 0,6 µl 50 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0,2 µl Taq und MilliQ-H₂O auf 20 µl. Das PCR Programm umfasste 2 min 94 °C, 35x den Zyklus 30 s 95 °C, 30 s 63 °C und 1 min 72 °C, schließlich folgten 7 min 72 °C und danach 4 °C.

2.2.1.4 Microarray-Expressionsanalyse

2.2.1.4.1 RNA-Isolation und Aufreinigung

Für die Microarray-Expressionsanalyse zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurde die RNA aus dem zervikalen dorsalen Rückenmark von *Bcl11a^{flox/+}/Brn4-Cre-* (Kontrollen) und *Bcl11a^{flox/flox}/Brn4-Cre-* (Mutanten) Mausembryonen isoliert. Die Präparation des zervikalen Rückenmarkes erfolgte E16,5 in kaltem PBS_{DEPC}. Das Gewebe wurde unmittelbar danach in jeweils 100 µl Trizol (Invitrogen) bei -80 °C gelagert. Nach der Genotypisierung mittels PCR wurden jeweils das Gewebe von Kontroll- und *Bcl11a*-mutanten Tieren in 1,5 ml Trizol gepoolt und homogenisiert. Die Suspension wurde 5 min bei RT inkubiert, 0,2 ml Chloroform/ml Trizol dazugegeben und 15 sec geschüttelt. Nach erneuter Inkubation von 3 min bei RT erfolgte 15 min Zentrifugation bei 12000xg und 4 °C. Die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält wurde abgenommen und 2 µl Polyacrylträger (MRC; Fermentas) dazugegeben. Danach folgte die Fällung der RNA mit 0,5 ml Isopropanol/ml Trizol, 10 min Inkubation bei RT und 10 min Zentrifugation bei 12000xg und 4 °C. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml Ethanol/ml Trizol gewaschen, 5 min getrocknet und in 35 µl H₂O_{DEPC} gelöst. Die Ansätze von *Bcl11a*-mutanten und

Kontrolltieren wurden jeweils gepoolt und auf 100 µl mit H₂O_{DEPC} aufgefüllt. Die Aufreinigung der RNA erfolgte mittels RNesay MiniElute clean up Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA und die Qualitätskontrolle mit Hilfe der Gelelektrophorese folgten.

2.2.1.4.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese für die *in vitro*-Transkription und Biotin-Markierung von cRNA wurde mit dem One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden je 3 unabhängige Ansätze der RNA von Kontroll- und *Bcl11a*-mutanten Tieren mit 5 µg RNA/Ansatz hergestellt. Die Erststrangsynthese wurde mit Superscript III RNaseH⁻ im PCR-Block für 1 h bei 42 °C durchgeführt. Die Zweitstrangsynthese erfolgte anschließend im PCR-Block für 2 h bei 16 °C. Die synthetisierte cDNA konnte bei -20 °C üN gelagert werden.

Für die Aufreinigung der cDNA wurde 1 Volumen (162 µl) PCI zum cDNA-Ansatz gegeben, gut mit der Pipette vermischt und in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß mit Phase Lock (Eppendorf) gegeben. Nach Zentrifugation für 2 min bei 12000xg wurde die wässrige Phase, in der sich die cDNA befindet abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der cDNA erfolgte mit 0,5 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen -20 °C-kaltem 99,8 % Ethanol. Anschließend wurde die cDNA 20 min bei 12000xg pelletiert, insgesamt viermal mit 500 µl -20 °C-kaltem 80 % Ethanol gewaschen, dabei jeweils 5 min bei 12000xg zentrifugiert, luftgetrocknet und in 12 µl H₂O_{DEPC} für 1 h gelöst. Zur Qualitätskontrolle wurde 1 µl der aufgereinigten cDNA im 1 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Der gesamte cDNA-Ansatz wurde anschließend für die Synthese Biotin-markierter cRNA eingesetzt.

2.2.1.4.3 *In vitro*-Transkription und Biotin-Markierung von cRNA

Die *in vitro*-Transkription und Biotin-Markierung der cRNA erfolgte mit dem GeneChip IVT labeling Kit (Affymetrix) nach Herstellerangaben. Ein Ansatz enthielt den Gesamtansatz cDNA (10 µl), 2 µl 10x IVT Labeling Buffer, 6 µl IVT Labeling NTP Mix und 2 µl IVT Labeling Enzyme Mix. Die Reaktion wurde bei 37 °C im PCR-Block üN durchgeführt. Die Biotin-markierte cRNA wurde anschließend mit dem GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix) aufgereinigt, dabei nach der Ethanolzugabe zweimal auf die Säule geladen und abschließend zweimal mit 12 µl RNase-freiem Wasser (Affymetrix-Kit) eluiert. Dann wurden die Konzentration und die Fragmentgrößen der markierten

cRNA photometrisch bzw. elektrophoretisch bestimmt und 20 µg cRNA in 32 µl RNase-freiem Wasser für die Hybridisierung von Microarrays eingesetzt.

2.2.1.4.4 Microarray-Hybridisierung

Die Biotin-markierte cRNA wurde gemäß Herstellerangaben auf Affymetrix MOE430 2.0 Microarrays hybridisiert. Pro Genotyp wurden je drei Microarrays hybridisiert. Die Hybridisierung der cRNA und die Aufzeichnung der Hybridisierungsergebnisse wurden als Dienstleistung von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Hübner (Experimentelle Genetik von Herz-Kreislaufkrankungen, MDC) durchgeführt. Die Expressionsrohdaten, bestehend aus den Hybridisierungsintensitäten, wurden im Rahmen dieser Arbeit weiter bearbeitet und analysiert (vgl. 2.2.5.4).

2.2.2 Bakterien- und Zellkultur

2.2.2.1 Bakterientransformation

Die Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA und Ligationsansätzen erfolgte durch Hitzeschock von chemisch-kompetenten Zellen des Bakterienstamms *E. coli* XL1-Blue MRF' gemäß Sambrook und Russell (Sambrook & Russell 2001). Dabei wurden 50 ng Plasmidvektor zu 100 µl chemisch-kompetenten Zellen gegeben, kurz gemischt und 20 min bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgten ein Hitzeschock bei 42 °C für 1,5 min, wiederum 2 min Inkubation bei 4 °C und die Zugabe von 900 µl LB-Medium. Die Zellen wurden dann zwecks Ausbildung der Antibiotikaresistenz für 10 min (bei Verwendung von Ampicillin) oder für 1 h (bei Verwendung von Kanamycin) bei 37 °C inkubiert und anschließend auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten ausplattiert. Das Wachstum der Bakterien erfolgte üN bei 37 °C.

2.2.2.2 Kultur primärer neuronaler Zellen

Die neuronalen Zellkulturen wurden nach einem modifizierten Protokoll gemäß Banker und Goslin etabliert (Banker & Goslin 1998). Zur Vorbereitung wurde die benötigte Anzahl Deckgläschen mehrere Stunden zuerst mit 70 % Ethanol, danach mit MilliQ-H₂O und 99,8 % Ethanol in einer Petrischale gereinigt. Anschließend erfolgte das Abflammen der Deckgläschen am Gasbrenner und die Beschichtung mit PLL in 100 mM Boratpuffer, pH 8,5 in 12-well-Zellkulturschalen. Nach der Beschichtung wurden die Plättchen mit 1xPBS gespült und Aussaatmedium dazugegeben. Des Weiteren wurden Pasteurpipetten

am Gasbrenner poliert und zusammen mit der Präparationsschale für 1 h bei 180 °C sterilisiert.

2.2.2.2.1 Kultur dorsaler Neurone des Rückenmarkes

Für die Primärzellkulturen der dorsalen Neurone wurde das gesamte dorsale Rückenmark E18,5 von *Bcl11a^{lox/+}/Brn4-Cre*-Tieren (Kontrollen) und *Bcl11a^{lox/lox}/Brn4-Cre*-Tieren (Mutanten) präpariert. Das Gewebe wurde anschließend mit HBSS gewaschen und mit Trypsin bei 37 °C verdaut. Nach der Triturierung (Vereinzelung) der Zellen mit einer polierten Pasteurpipette wurden diese in einer Neubauer Zählkammer gezählt und zu einer Zelldichte von 60000-80000 Zellen/well auf die beschichteten Glasplättchen ausgesät. Die Zellen wurden in Wachstumsmedium kultiviert. Insgesamt verblieben die Zellkulturen 14 Tage (DIV14) bei 37 °C, 5 % CO₂. Die Quantifizierung erfolgte wie unter 2.2.5.3 beschrieben.

2.2.2.2.2 Kultur und Transfektion neuronaler Zellen des Hippocampus

Für die Kultur hippocampaler Neurone wurden die Hippocampi von *Bcl11a^{lox/+}/Emx1-Cre*-Tieren (Kontrollen) und *Bcl11a^{lox/lox}/Emx1-Cre*-Tieren (Mutanten) P1 präpariert. Der Verdau des Gewebes und die Triturierung der Zellen erfolgten wie unter 2.2.2.2.1 für die dorsalen Neurone beschrieben. Für morphologische Untersuchungen wurden die isolierten neuronalen Zellen in einer Zelldichte von 70000 Zellen/well in einer 12-well-Zellkulturschale ausgesät und 4-5 Tage bzw. 14 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert. Für Transfektionen erfolgte die Aussaat in einer Zelldichte von 150000 Zellen/well. Die Zellen wurden 7 Tage (DIV7) kultiviert, dann transfiziert und nach 2 weiteren Tagen (DIV7+2) des Wachstums bei 37 °C immunzytologisch analysiert (vgl. 2.2.4.5.2).

Die Transfektionen wurden mit dem Effectene[®] Transfection Reagent Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Sholl-Analyse (vgl. 2.2.5.3). Für die Transfektionen wurde der Expressionsvektor pCS-Evi9b konstruiert, der als Fusionsprotein die Isoform Evi9b von Bcl11a mit einem N-terminalen 6-fachen Myc-Tag enthält.

2.2.3 Präparation von embryonalem und postnatalem Mausgewebe

Für die Präparation von embryonalem Mausgewebe wurden *Bcl11a^{lox/lox}*-Tiere mit *Bcl11a^{lox/+}/Brn4*-Tieren verpaart, um *Bcl11a^{lox/lox}/Brn4-Cre*-Tiere (Mutanten) zu

erhalten. Zur Abschätzung des Alters der Embryonen wurde am Tag des Vaginalpfropfens beim Weibchen 12:00 Uhr als 0,5 d nach Koitus der Embryonalentwicklung (E0.5) angenommen. Schwangere Weibchen wurden durch Rückgraddislokation getötet, E14,5-18,5 Embryonen dem Uterus entnommen, schnell in eiskaltes 1xPBS überführt, dekapitiert und das Rückenmark präpariert. Für die Präparation von E18,5 Embryonen wurde dem trächtigen Muttertier E16,5 unter die Bauchdecke Delvosteron (Intervet) zur Tragzeitverlängerung gespritzt, dadurch konnte das Muttertier gezielt E18,5 geöffnet werden. Dies war nötig, da die *Bcl11a^{flox/flox}/Brn4-Cre*-Tiere kurz nach der Geburt sterben. Zur Präparation von postnatalem Mausgewebe wurden *Bcl11a^{flox/+}/Emx1-Cre*-Tiere untereinander verpaart und *Bcl11a^{flox/flox}/Emx1-Cre*-Tiere (Mutanten) erhalten. Die *Bcl11a^{flox/flox}/Emx1-Cre*-Tiere sind lebensfähig und wurden P1 nach Inkubation auf Eis dekapitiert und die Hippocampi präpariert. Für die Präparation von P15 und adultem Vorderhirn wurden die Tiere mit 4 % PFA perfundiert.

Während der Präparation erfolgte eine genaue Bestimmung des Entwicklungsstadiums der Embryonen anhand der Größe und anatomischer Kriterien (Edinburgh Mouse Atlas Project; <http://genex.hgu.mrc.ac.uk>). Weitere Verwendung fanden nur die Tiere eines Wurfs mit gleicher Größe und gleichem Entwicklungsstadium.

In Abhängigkeit von der weiteren Verwendung wurde das Gewebe anschließend mit 4 % PFA nachfixiert.

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Gewebeschnitten

2.2.4.1.1 Vibratomschnitte

Vibratomschnitte wurde für die Golgi-Färbung von E18,5 Embryonen (vgl. 2.2.4.2 und 2.2.3), für die DiI-Färbung primärer sensorischer Neurone (vgl. 2.2.4.3) von E16,5 Embryonen und zur Visualisierung der Projektionen adulter hippocampaler Neurone verwendet. Nach der Fixierung (Visualisierung der Projektionen: 2,5 h Nachfixierung nach Perfusion) bzw. nach der DiI-Färbung wurde das Gewebe dreimal mit 1xPBS gespült und dann in einer Peel-A-Way Einbettform (Thermo) in 4 % low-melt Agarose (erwärmt bei 55 °C) eingebettet. Die Vibratomschnitte wurden in eisgekühltem 1xPBS mit einem Vibratom (Leica VT1000S; Leica) angefertigt. Die Schnittdicke betrug für die Golgi-Färbung 100 µm, für die DiI-Färbung 80 µm und für die Projektionen hippocampaler Neurone 70 µm.

Die Schnitte wurden auf Objektträger (Roth) aufgezogen, kurz getrocknet und schließlich mit Immunomount und Deckgläschen eindeckt. Die Schnitte wurden bei 4 °C gelagert.

2.2.4.1.2 Gefrierschnitte

Zur Herstellung von Gefriergewebeschnitten wurden frisch präparierte embryonale Gewebestücke (vgl. 2.2.3) 1,5-2 h (E14,5-18,5) bei 4 °C in 4 % PFA fixiert. P15 Jungtiere wurden perfundiert, das Vorderhirn präpariert und anschließend 2,5 h bei 4 °C in 4 % PFA nachfixiert. Das Gewebe wurde anschließend dreimal in eiskaltem 1xPBS gespült und in 20 % Saccharose bei 4 °C für 8 h kryoprotectiert. Die Präparate wurden dann kurz in Tissue-Tek O.C.T Compound (Sakura) geschwenkt, in eine Peel-A-Way Einbettform (Thermo) mit Tissue-Tek überführt und ausgerichtet. Die Einbettform wurde anschließend in einer Mischung aus Ethanol und Trockeneis eingefroren und bei -70°C gelagert. Die Gefrierschnitte wurden mit einem Kryostaten (Microm HM560 Cryo-Star) angefertigt; die Schnittdicke betrug 14 bzw. 18 µm (14 µm für die Immunhistologie, 18 µm für die *in situ*-Hybridisierung). Die Schnitte wurden auf Adhäsions-Objektträger (Histobond, Marienfeld) aufgezogen, bei 37°C getrocknet (mindestens 30 min für die Immunhistologie, mindestens 1 h für die *in situ*-Hybridisierung) und luftdicht verpackt bei -70°C gelagert.

2.2.4.2 Golgi-Färbung von dorsalem Rückenmarksgewebe

Die Golgi-Färbungen wurden nach einem modifizierten Protokoll durchgeführt (Heimrich & Frotscher 1991). Zervikales Rückenmark wurde von *Bcl11a^{flox/+}/Brn4-Cre*-Tieren und *Bcl11a^{flox/flox}/Brn4-Cre*-Tieren E18,5 präpariert und 2 d in Golgi-Fixativ bei 4 °C fixiert. Das Gewebe wurde dann in 0,1 M Phosphatpuffer gespült und in 4 % low-melt Agarose in einer Peel-A-Way Einbettform (Thermo) eingebettet. Am Vibratom (Leica VT1000S; Leica) wurden 100 µm-Gewebsschnitte hergestellt und diese abwechselnd mit Parafilm zu Türmen gestapelt. Jeder Turm enthielt 10 Schnitte und wurde vollständig von 4 % low-melt Agarose umgeben. Mit den entstandenen Blöcken wurde die Golgi-Färbung mit Hilfe des FD Rapid GolgiStain Kit (FD NeuroTechnologies) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden die Blöcke zunächst in einer 1:1 Mischung der Lösungen A und B für 6 Tage im Dunkeln bei RT inkubiert, die Lösung wurde einmal täglich gewechselt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Blöcke in Lösung C im Dunkeln bei 4 °C mit ein- bis zweimaligem Lösungswechsel. Die Blöcke wurden danach in Lösung C in Petrischalen auseinander geschnitten und die Gewebsschnitte auf Objektträger

aufgezogen. Nach der Trocknung der Gewebsschnitte bei RT im Dunkeln erfolgte die Färbung und anschließende Entwässerung nach Herstellerangaben. Die gefärbten Gewebsschnitte wurden abschließend mit Entellan eingedeckelt und konnten mehrere Wochen im Dunkeln bei 4 °C gelagert werden.

2.2.4.3 DiI-Markierung von primären sensorischen Neuronen

Für die anterograde Markierung von primären sensorischen Axonen wurden Segmente des Wirbelkörpers mit dem Rückenmark und den dorsalen Wurzelganglien *in loco* von *Bcl11a^{fllox/+}/Brn4-Cre-* und *Bcl11a^{fllox/fllox}/Brn4-Cre-*Tieren präpariert. Das Gewebe wurde anschließend in 4% PFA üN fixiert und DiI-Kristalle (Molecular Probes) direkt auf die DRGs jeweils auf der gleichen axialen Ebene platziert. Das mit DiI beladene Gewebe wurde dann bis zu 5 Tage bei 37° C inkubiert. Anschließend erfolgte das Einbetten des DiI-markierten Gewebes in 4 % low-melt Agarose und die Herstellung von 80 µm-Gewebsschnitten am Vibratom (Leica VT1000S; Leica).

2.2.4.4 *In situ*-Hybridisierungsmethoden

2.2.4.4.1 *In-vitro*-Transkription und DIG-Markierung von RNA-Sonden

Zur Herstellung einer RNA-Sonde für die *in situ*-Hybridisierung wurde Plasmid-DNA (vgl. Tab. 2-3) für die *in vitro*-Transkription und DIG-Markierung linearisiert. Die Linearisierung erfolgte mit 20-30 µg Plasmid-DNA in einem 120 µl Reaktionsansatz mit 40 U des entsprechenden Enzyms bei 37 °C üN. Vor der Aufreinigung der linearisierten DNA wurden 5 µl des Restriktionsansatzes für die gelelektrophoretische Analyse aufgehoben. Zum restlichen Restriktionsansatz wurde das gleiche Volumen PCI dazugegeben, kurz gut gemischt und anschließend wässrige und organische Phase durch Zentrifugation für 5 min bei 140000 rpm (Tischzentrifuge, Eppendorf) getrennt. Die linearisierte DNA befand sich nun in der oberen wässrigen Phase und wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 3 M Natriumazetat (insgesamt 10 % des Gesamtansatzes) und des 2,5-fachen Volumens 99,8 % Ethanol. Zur Pelletierung der DNA wurde der Fällungsansatz dann 30 min bei 4 °C und 140000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol für 5 min gewaschen mit anschließender Zentrifugation für 5 min bei RT und 14000 rpm. Nach wenigen Minuten Trocknung erfolgte das Lösen des DNA-Pellets in 10-20 µl 1xTE für 30

min bei 37 °C. Zur Kontrolle der Linearisierung wurde 1 µl der aufgereinigten Linearisierung zusammen mit zirkulärem Plasmid und dem Linearisierungsansatz vor der Aufreinigung gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Lagerung des linearisierten Plasmids erfolgte bei -20 °C.

Für die *in vitro*-Transkription und DIG-Markierung von RNA-Sonden wurden, wenn nicht anders angegeben, Reagenzien und Enzyme von Roche verwendet. Ein Reaktionsansatz enthielt 1-2 µl linearisiertes und aufgereinigtes Plasmid als Matrize, 2 µl 10x Transkriptionspuffer, 2 µl DIG-Labeling-Mix, 1 µl RNase-Inhibitor (RNaseOUT; Invitrogen), 1 µl der passenden RNA-Polymerase (T7, T3, SP6), wurde auf 20 µl mit H₂O_{DEPC} aufgefüllt, für 2 h bei 37°C inkubiert und auf Eis abgestoppt. Die Säulenaufreinigung der DIG-markierten RNA-Sonde erfolgte mit dem RNeasy MinElute Cleanup-Kit (Qiagen) oder dem NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel) gemäß Herstellerangaben. Die DIG-markierte RNA-Sonde wurde zweimal mit je 25 µl H₂O_{DEPC} eluiert, mit 50 µl Formamid vermischt, gelelektrophoretisch kontrolliert und für die *in situ*-Hybridisierung (vgl. 2.2.4.4.2) eingesetzt oder bei -70°C gelagert.

2.2.4.4.2 *In situ*-Hybridisierungen auf Gefrierschnitten

Alle Glasbehälter und Messuren für den ersten Tag der *in situ*-Hybridisierung wurden einen Tag vorher für 1 h bei 180 °C sterilisiert. Am ersten Tag der *in situ*-Hybridisierung wurden die Schnitte (vgl. 2.2.4.1.2) 1-2 h bei RT aufgetaut, mit einem Fettstift umrandet, dann in eine Glasküvette überführt, 20 min in 4 % PFA in PBS_{DEPC} bei 4 °C refixiert und dreimal 5 min mit PBS_{DEPC} gewaschen. Sodann wurde 10 min in Azetylierungspuffer azetyliert und dreimal 5 min mit PBS_{DEPC} gewaschen. Die Schnitte wurden schließlich 2 h in 800 µl Hybridisierungslösung in einer Feuchtkammer bei RT prähybridisiert. Vor der Hybridisierung wurden 1,5 µl der DIG-markierten RNA-Sonde 10 min in 150 µl Hybridisierungslösung bei 80 °C denaturiert und die Lösung danach schnell bei 4 °C inkubiert. Die Prähybridisierungslösung wurde schließlich von den Schnitten entfernt und die Hybridisierungslösung mit Sonde aufgetragen. Die Objektträger wurden nun mit einem sauberen Deckgläschen bedeckt und üN in einer Feuchtkammer (mit 5x SSC/50 % Formamid in H₂O_{DEPC}) bei 70°C hybridisiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger in eine Glasküvette überführt und die Deckgläschen innerhalb von 5 min in 5xSSC in MilliQ-H₂O bei RT abgelöst. Es wurde danach zweimal 30 min mit 0,2xSSC in MilliQ-H₂O bei 70 °C stringent gewaschen. Anschließend wurde 5 min mit 0,2xSSC in MilliQ-H₂O bei RT gewaschen und 5 min in

B1-Puffer umgepuffert. Vor der Inkubation mit dem anti-DIG-Antikörper, an den AP gekoppelt war, wurden die Schnitte 1 h in 1 ml B1-Puffer mit 10 % Ziegen Serum (Blockierungslösung) in einer Feuchtkammer bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Blockierungslösung entfernt und die Schnitte $\times 10^4$ in 800 μ l 1:2500 anti-DIG-Antikörper (Fab fragment, Roche) in B1-Puffer mit 10 % Ziegen Serum bei 4 °C inkubiert.

Am dritten Tag wurden die Objektträger wieder in Glasküvetten überführt, dreimal 10 min mit B1-Puffer bei RT gewaschen und 5 min in 1xNTMT-Puffer bei RT umgepuffert. Anschließend wurden die Schnitte in die Färbelösung mit je 0,1 μ l/ml NBT und BCIP in 2xNTMT-Puffer gegeben und mehrere Tage lichtgeschützt bei 4 °C inkubiert bis die gewünschte Färbungsintensität erreicht war. Die Lösung wurde dabei täglich gewechselt. Zum Schluss wurde dreimal mit MilliQ-H₂O gewaschen und die Objektträger mit Immunomount und Deckgläschen eingedeckelt und im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.4.5 Immunhistologie und Immunzytologie

2.2.4.5.1 Immunhistologie auf Gefrierschnitten und TUNEL-Analyse

Für die Immunhistologie wurden die Gefrierschnitte luftdicht bei RT 1 h aufgetaut und mit einem Fettrand umgeben. Durch zweimaliges Spülen für je 10 Minuten mit PBTx wurde das Tissue-Tek entfernt und die Schnitte anschließend für 1 h in Blockierungslösung in einer Feuchtkammer bei RT inkubiert. Es folgte die Inkubation mit Primärantikörpern (vgl. Tab. 2-5) $\times 10^4$ bei 4 °C in Blockierungslösung mit 5 % Pferdeserum. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal 10 Minuten mit Blockierungslösung mit 5 % Pferdeserum gewaschen und danach mit den Sekundärantikörpern (vgl. 2.1.7) für 1 h in Blockierungslösung mit 5 % Pferdeserum bei RT im Dunkeln inkubiert. Das Entfernen von überschüssigem Sekundärantikörper und Blockierungslösung erfolgte anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBTx. Die gefärbten Schnitte wurden abschließend mit Immunomount eingedeckt und im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

Für den Nachweis apoptotischer Zellen im Gewebe wurde fragmentierte DNA auf Gefrierschnitten mittels TUNEL-Färbung mit dem ApopTag Plus In situ Fluorescein Detection Kit (Chemicon) gemäß Herstellerangaben detektiert. Dabei wurden von jedem zu analysierenden Genotyp jeweils 3 Tiere und mindestens 3 verschiedene Gefrierschnitte ausgewertet.

2.2.4.5.2 Immunzytologie von neuronalen Primärzellkulturen

Für die Immunzytologie wurden am ersten Tag die Primärzellkulturen zunächst in 12-well-Zellkulturschalen zweimal für 15 Minuten mit 1xPBS gewaschen und dann für 1 h mit Blockierungslösung bei RT inkubiert. Die Deckgläschen mit den Primärzellkulturen wurden anschließend über Kopf mit den Primärantikörpern (vgl. Tab. 2-5) in Blockierungslösung mit 5 % Pferdeserum auf Parafilm in einer Feuchtkammer üN bei 4 °C inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Zellkulturen in 12-well-Zellkulturschalen zweimal mit 1xPBS gewaschen und wiederum über Kopf mit den Sekundärantikörpern (vgl. 2.1.7) in Blockierungslösung mit 5 % Pferdeserum auf Parafilm in einer Feuchtkammer für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Primärzellkulturen zweimal mit 1xPBS in 12-well-Zellkulturschalen gewaschen und über Kopf mit Immunomount auf Objektträger gelegt. Die Immunzytologien konnten bei 4 °C im Dunkeln gelagert werden.

2.2.5 Datenanalyse

2.2.5.1 Dokumentation histologischer Daten

Die Dokumentation histologischer Daten erfolgte mittels Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie. Die Lichtmikroskopie von Schnitten erfolgte an einem aufrechten Mikroskop (Axiophot; Zeiss) ausgestattet mit Kamera (AxioCam HRC; Zeiss) und der Axiovision AC Software Version (Vers.) 4.5 (Zeiss). Die Lichtmikroskopie von gefärbtem Gewebe erfolgte an einem Stereomikroskop (Leica MZ16; Leica) ausgestattet mit Kamera (AxioCam; Zeiss) und der Axiovision Software. Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an einem Laser Scanning Mikroskop (LSM 5 Pascal; Zeiss) mit der LSM 5 Pascal Software Vers. 3.2 (Zeiss). Die generierten Bilder wurden mit Photoshop Version 8 (Adobe) bearbeitet.

2.2.5.2 Bestimmung der Zellzahlen

Vom zervikalen dorsalen Rückenmark und den DRGs von je 3 *Bcl11a*^{fllox/+}/*Brn4-Cre*- und 3 *Bcl11a*^{fllox/fllox}/*Brn4-Cre*-Tieren wurden jeweils auf gleicher axialer Ebene serielle 14 µm-Schnitte hergestellt. Die Bildaufnahme erfolgte von jedem 4. Schnitt einer immunhistologisch gefärbten Serie. Insgesamt wurden 3 Schnitte pro Tier halbautomatisch mit Hilfe der Software ImageJ Vers. 1.371 (National Institute of Health, USA) ausgezählt.

2.2.5.3 Quantifizierung mit Hilfe der Sholl-Analyse

Für die Sholl-Analyse (Sholl 1955) der Primärzellkulturen des Rückenmarks und des Hippocampus wurde auf skalierte Bilder von individuellen Neuronen ein Raster mit konzentrischen Kreisen gelegt und die Schnittpunkte der Neuriten oder Dendriten mit den Kreisen gezählt. Für Primärzellkulturen des Rückenmarks wurden die Schnittpunkte im Abstand von 2,5 μm bestimmt, für hippocampale Zellkulturen im Abstand von 6,6 μm (DIV 14), 8,8 μm (DIV 4,5 und Transfektion zur Überexpression im Wildtyp) und 10 μm (Transfektion zum Rescue). Das Soma eines jeden Neurons stellte dabei den Nullpunkt des Rasters, also die Mitte aller Kreise dar. Es wurden jeweils Primärzellkulturen von je drei individuellen *Bcl11a*-mutanten Tieren und Kontrolltieren und je 6-10 Neurone pro Zellkultur ausgezählt.

Die Bestimmung der Axonlängen von DIV 4,5-Kulturen erfolgte durch Messung der Gesamtlänge eines Axons jeweils auf skalierten Bildern von individuellen Neuronen mit anschließender Umrechnung unter Einbeziehung des Größenstandards der Bilder.

2.2.5.4 Statistik und Expressionsanalyse von Microarrays

Die ermittelten Zellzahlen und die Zahlen aus der Sholl-Analyse wurden mit Excel Version 11 (Microsoft) statistisch ausgewertet, dabei Mittelwerte gebildet und zusammen mit dem Standardfehler dargestellt. Die Berechnung der Signifikanz von beobachteten Differenzen erfolgte mit einem T-Test für eine zweiseitige Verteilung und eine ungleiche Varianz zweier Proben. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn der *p*-Wert < 0,05 war.

Die Expressionsanalyse wurde zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene im dorsalen Rückenmark von *Bcl11a*^{fllox/+}/*Brn4-Cre*- und *Bcl11a*^{fllox/fllox}/*Brn4-Cre*-Tieren verwendet. Die Rohdaten der Microarray-Hybridisierung (vgl. 2.2.1.4.4) wurden dafür mit der Basisinstallation der Software Bioconductor (Gentleman *et al.* 2004) ausgewertet, welche die R-Umgebung für statistische Berechnungen (R Development Core Team, 2005) nutzt. Die Qualität der Microarray-Hybridisierung wurde mit dem Bioconductor-Modul affyPLM untersucht und die Daten dann mit dem gcrma-Modul (Zhijian *et al.* 2004) normalisiert. Sonden mit geringer Varianz der Expression über alle Microarrays wurden herausgefiltert und differentiell exprimierte Gene mit dem limma-Modul (Smyth 2005) identifiziert. Dieses Modul implementiert die empirische Bayes-Methode und dient der

Fehlerkorrektur, vor allem dem Ausschluss falschpositiver Transkripte. Gene wurden als differentiell exprimiert angenommen, wenn $p < 0,05$ für den Unterschied des Expressionsniveaus war. Unterschiede im Expressionsniveau von $p \leq 0,0001$ wurden als hoch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte ich die Funktionen des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Bcl11a während der Entwicklung des Rückenmarks. Ich verwendete dafür eine konditionelle Mutation des *Bcl11a*-Lokus. Die Darstellung der Ergebnisse gliedert sich, wie im Folgenden beschrieben:

- Charakterisierung der Expression von Bcl11a im dorsalen Rückenmark sowie Beschreibung der konditionellen Mutagenese von Bcl11a (siehe Kapitel 3.1 und 3.2)
- Analyse der Differenzierung der Neurone des dorsalen Horns in den *Bcl11a*-Mutanten (siehe Kapitel 3.3 und 3.4)
- Charakterisierung der Projektionen primärer sensorischer Neurone aus den Spinalganglien in das dorsale Horn der *Bcl11a*-Mutanten (siehe Kapitel 3.5)
- Identifizierung transkriptioneller Zielgene von Bcl11a mit Hilfe von Microarray-Analysen (siehe Kapitel 3.6)

3.1 Analyse der Expression von Bcl11a während der Entwicklung des Rückenmarks

Die Expression von Bcl11a habe ich auf transkriptioneller Ebene durch *in situ*-Hybridisierungen mit einer *Bcl11a*-RNA-Sonde und auf Proteinebene in immunhistologischen Analysen mit einem Bcl11a-Antikörper untersucht (Abb. 3.1). Am Entwicklungstag 11,5 konnte ich die Expression von Bcl11a in den Spinalganglien und in der Mehrzahl der Zellen des dorsalen Rückenmarks sowie in Gruppen ventral gelegener Zellen im Rückenmark detektieren. Zu diesem Zeitpunkt exprimiert die Mehrheit der postmitotischen Neurone der Mantelzone Bcl11a (Abb. 3.1 Klammern in A). Mit Hilfe eines Antiköpers gegen Sox2 können immunhistologisch die proliferierenden Neuroblasten der Ventrikulärzone des Rückenmarks identifiziert werden (Wakamatsu *et al.* 2004). Während die Mehrheit der Neuroblasten am Entwicklungstag 11,5 kein Bcl11a exprimiert, zeigen einige Neuroblasten Koexpression von Bcl11a und Sox2. In den sich entwickelnden Spinalganglien ist Sox2 am Entwicklungstag 11,5 in Satellitengliazellen detektierbar (Wakamatsu *et al.* 2004). E11,5 koexprimieren einige Neuralleistenzellen Bcl11a und Sox2. Die Mehrheit der Bcl11a-positiven Zellen exprimiert zu diesem Zeitpunkt kein Sox2

(Abb. 3.1 F). Die Koexpression von *Bcl11a* und *Sox2* am Entwicklungstag 11,5 könnte auf einer möglichen Kreuzreaktivität des *Sox2*-Antikörpers mit *Sox10* beruhen. *Sox2* und *Sox10* gehören zur SRY-Familie der Sox-Transkriptionsfaktoren (Schepers *et al.* 2002). *Sox10* ist nicht nur in Gliazellen sondern auch in undifferenzierten Neuralleistenzellen exprimiert (Cheng *et al.* 2000). Die Ergebnisse weisen also darauf hin, dass E11,5 einige wenige undifferenzierte Neuralleistenzellen in den Spinalganglien und wenige Neuroblasten in der Ventrikulärzone *Bcl11a* exprimieren. An den Entwicklungstagen 12,5 und 13,5 ist die Expression von *Bcl11a* in der Mehrzahl der postmitotischen Neurone des dorsalen Rückenmarks nachweisbar, während im ventralen Rückenmark nur einzelne Zellen *Bcl11a* exprimieren (Abb. 3.1 B, C). In den Spinalganglien konnte ich E12,5 keine Koexpression von *Bcl11a* und *Sox2* detektieren (Abb. 3.1 G). *Bcl11a* ist daher in den primären sensorischen Neuronen der Spinalganglien, nicht aber in Satellitengliazellen exprimiert. Mit fortschreitender Entwicklung, E16,5-E18,5, ist *Bcl11a* breit im dorsalen Horn des Rückenmarks exprimiert, nur ein kleiner Teil der ventralen Neurone zeigt Expression von *Bcl11a* (Abb. 3.1 D, E, H). Am Entwicklungstag 18,5 findet sich eine verstärkte Expression des *Bcl11a*-Proteins im oberflächlichen dorsalen Horn (Abb. 3.1 H Pfeilkopf) sowie im Bereich der Stilling-Clarke-Säule (Benninghoff & Drenckhahn 2004a; Abb. 3.1 H Pfeil). Die *in situ*-Hybridisierungen und immunhistologischen Analysen zeigen, dass das *Bcl11a*-RNA-Transkript und das *Bcl11a*-Protein während der Entwicklung von Rückenmark und Spinalganglien in identischen Mustern exprimiert sind. Unterschiedliche Subpopulationen dorsaler Neurone lassen sich mit Hilfe der Expression der Transkriptionsfaktoren *Lbx1* und *Lmx1b* darstellen. Diese Transkriptionsfaktoren spielen während der frühen Differenzierung der Neurone des dorsalen Rückenmarks eine entscheidende Rolle. *Lbx1* spezifiziert die Differenzierung der Mehrheit der Neurone des dorsalen Horns (Gross *et al.* 2002; Muller *et al.* 2002). *Lmx1b* kontrolliert die Differenzierung und Migration der Neurone des oberflächlichen dorsalen Horns (Ding *et al.* 2004). Um zu analysieren, ob *Bcl11a* in einer der durch die Expression von *Lbx1* und *Lmx1b* definierten Subpopulationen dorsaler Neurone exprimiert ist, führte ich Koexpressionsanalysen von *Bcl11a* mit *Lbx1* bzw. *Lmx1b* am Entwicklungstag 18,5 durch (Abb. 3.1 I, J, K). *Bcl11a* ist zu diesem Zeitpunkt breit im dorsalen Horn exprimiert und nur wenige dorsale Neurone koexprimieren *Lbx1* und *Bcl11a*. Dagegen koexprimiert die Mehrzahl der *Lmx1b*-positiven Neurone des oberflächlichen dorsalen Horns *Bcl11a*. Die

Bcl11a-positiven Neurone können somit weder der Lbx1-Zellpopulation noch der Lmx1b-Zellpopulation spezifisch zugeordnet werden.

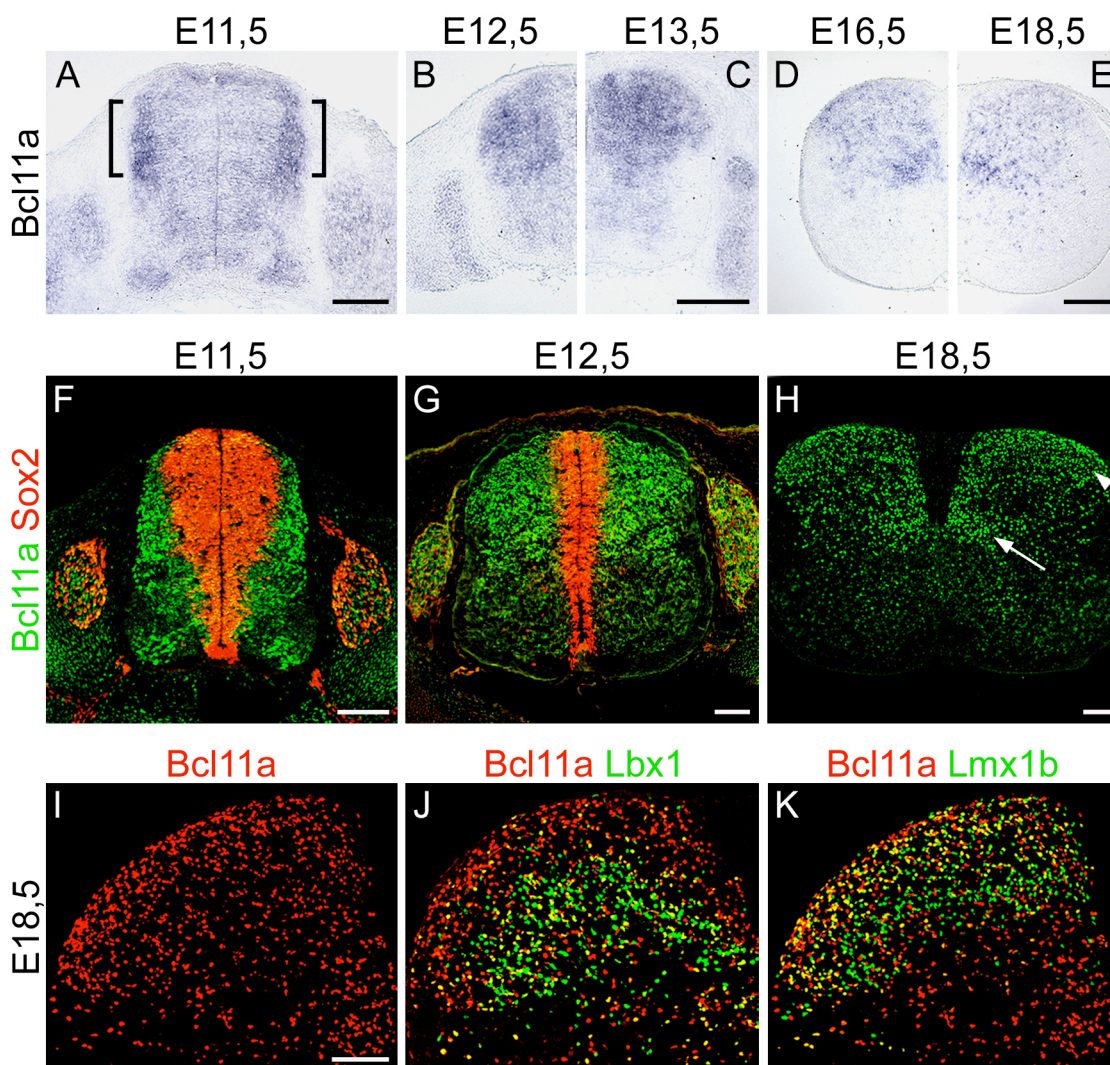


Abb. 3.1: Expression von Bcl11a während der Entwicklung des Rückenmarks.

(A-E) *In situ*-Hybridisierungen mit einer *Bcl11a*-RNA-Sonde an den Entwicklungstagen 11,5; 12,5; 13,5; 16,5 und 18,5. E11,5 ist *Bcl11a* in den Spinalganglien und im gesamten Rückenmark, dort vor allem in der Mantelzone, exprimiert (Klammern in A). (B-E) Mit fortschreitender Entwicklung, E12,5-18,5 ist *Bcl11a* in den postmitotischen Neuronen des dorsalen Horns exprimiert. (F, G) Immunhistologische Analysen mit Antikörpern gegen *Bcl11a* (grün) und *Sox2* (rot). *Sox2* ist in proliferierenden Neuroblasten der Ventrikulärzone im Rückenmark und in den Satellitengliaszellen der Spinalganglien exprimiert. Die Mehrheit der *Bcl11a*-positiven Zellen zeigt keine Koexpression von *Bcl11a* und *Sox2*. (H) E18,5 ist *Bcl11a* verstärkt im oberflächlichen dorsalen Horn (Pfeilkopf in H) und in den Neuronen der Stillman-Clarke-Säule (Pfeil in H) exprimiert. (I-K) Immunhistologische Analysen des dorsalen Horns E18,5 mit Antikörpern gegen *Bcl11a* (rot), *Lbx1* (J, grün) und *Lmx1b* (K, grün). (J) Die Mehrheit der *Bcl11a*-positiven Neurone exprimiert kein *Lbx1*. (K) Im oberflächlichen dorsalen Horn koexprimiert die Mehrheit der *Lmx1b*-exprimierenden Neurone *Bcl11a*. Größenstandard: 100 μm .

3.2 Konditionelle Mutagenese des *Bcl11a*-Lokus in der Maus

In der Arbeitsgruppe von Neal G. Copeland (Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore) wurde erstmals eine konventionelle Nullmutation des *Bcl11a*-Lokus in der Maus hergestellt. In den homozygot *Bcl11a*-mutanten Tieren ist Exon 1 deletiert. Diese Tiere sterben kurz nach der Geburt. Analysen am Entwicklungstag 18,5 zeigten, dass in homozygot *Bcl11a*-mutanten Tieren keine B-Lymphozyten gebildet werden und die Entwicklung der T-Lymphozyten gestört ist (Liu *et al.* 2003b).

In Microarray-Hybridisierungen, durchgeführt von S. Britsch (Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie, Universität Ulm), und in meinen eigenen Expressionsanalysen (vgl. Kapitel 3.1) konnte gezeigt werden, dass *Bcl11a* differentiell im dorsalen Rückenmark exprimiert ist. Die Funktionen von *Bcl11a* während der Entwicklung des Rückenmarks sind bisher nicht untersucht. Da die Ausreifung der Neurone des dorsalen Horns mit der Geburt nicht abgeschlossen ist, sondern auch postnatal erfolgt, verwendete ich, um die postnatale Letalität der konventionellen *Bcl11a*-Mutation zu überwinden, eine konditionelle Mutation des *Bcl11a*-Lokus (*Bcl11a^{flox/flox}*). Die *Bcl11a^{flox/flox}*-Tiere wurden mir von Neal G. Copeland zur Verfügung gestellt. Bei diesen Tieren ist Exon 1 zusammen mit einer Neomycin-Resistenzkassette von *loxP*-Sequenzen, den Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinasen, flankiert (Abb. 3.2 A). Bei Verpaarung der *Bcl11a^{flox/flox}*-Tiere mit Tieren, die eine Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors exprimieren, werden Exon 1 und die Neomycin-Resistenzkassette durch die Cre-Rekombinaseaktivität entfernt. Dadurch ist eine konditionelle Mutagenese des *Bcl11a*-Lokus möglich.

Zunächst überprüfte ich, ob mit dem konditionellen Mutationsansatz die Deletion von *Bcl11a* möglich ist. Dafür verpaarte ich die *Bcl11a^{flox/flox}*-Tiere mit Tieren, die eine Deleter-Cre-Rekombinase exprimieren. Diese Rekombinase ist in Keimzellen aktiv und wird früh während der Entwicklung exprimiert (Schwenk *et al.* 1995). Wie die immunhistologische Analyse am Entwicklungstag 15,5 in Abb. 3.2 E zeigt, konnte ich keine Expression von *Bcl11a* im Rückenmark und in den Spinalganglien der mutanten Tiere, hier als *Bcl11a^{Aflox/Aflox}/Del-Cre*-Tiere bezeichnet, detektieren. Die *Bcl11a^{Aflox/Aflox}/Del-Cre*-Tiere starben, ebenso wie die konventionellen *Bcl11a*-mutanten Tiere, direkt nach der Geburt. Eine Deletion von *Bcl11a* mit Hilfe dieses konditionellen Mutationsansatzes ist somit möglich. Wie in den Expressionsanalysen in Kapitel 3.1

dargestellt, ist *Bcl11a* in den Neuronen des Rückenmarks und der Spinalganglien exprimiert. In den Spinalganglien befinden sich primäre sensorische Neurone, die ihre Axone ins Rückenmark senden. Dort gehen sie funktionelle Verbindungen mit den Neuronen des Rückenmarks ein. Diese Verschaltung der Neurone miteinander dient dem Empfang und der Prozessierung von sensorischen Informationen. Während der Etablierung dieser Verschaltungen beeinflussen sich die Neurone des Rückenmarks und der Spinalganglien in ihrer Entwicklung gegenseitig (Fitzgerald 1987; Ozaki & Snider 1997; Sanes & Yamagata 1999; Vrieseling & Arber 2006).

Wird *Bcl11a* in den Neuronen des Rückenmarks und der Spinalganglien gleichzeitig deletiert, so kann der beobachtete Phänotyp im Rückenmark aufgrund der oben beschriebenen funktionellen Beziehungen nicht direkt auf eine *Bcl11a*-Funktion im Rückenmark zurückgeführt werden. Stattdessen ist der Einfluss der *Bcl11a*-Expression in den Neuronen der Spinalganglien zu berücksichtigen. Um die Funktionen von *Bcl11a* im Rückenmark und in den Spinalganglien voneinander abgrenzen zu können und die *Bcl11a*-Funktion spezifisch im Rückenmark zu analysieren, verpaarte ich die *Bcl11a^{flox/flox}*-Tiere mit transgenen Tieren, welche die *Brn4-Cre*-Rekombinase exprimieren. Diese Rekombinase ist im Neuralrohr und den daraus hervorgehenden Zellen aktiv (Wine-Lee *et al.* 2004). Sie zeigt keine Aktivität im peripheren Nervensystem, zu dem die Spinalganglien gehören. Mit diesem Ansatz versuchte ich auch lebende *Bcl11a*-mutante Tiere zu erhalten. Die *Bcl11a^{flox/flox}/Brn4-Cre*-Tiere sterben jedoch ebenfalls kurz nach der Geburt. Die mutanten Tiere sind zum Teil etwas kleiner als die Kontrolltiere und werden kurz nach der Geburt cyanotisch. Sie könnten daher an einem zentralen Atmungsdefekt sterben, da *Bcl11a* auch in Neuronen des Hirnstamms exprimiert ist (Qian *et al.* 2001; persönliche Mitteilung S. Britsch). In den *Bcl11a^{flox/flox}/Brn4-Cre*-Tieren konnte ich keine *Bcl11a*-Expression im Rückenmark detektieren. Die Expression von *Bcl11a* in den Spinalganglien dagegen ist im Vergleich zu den Kontrolltieren unverändert (Abb. 3.2 B, C).

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Phänotyp in den *Bcl11a^{flox/flox}/Brn4-Cre*-Tieren spezifisch auf einer Funktion von *Bcl11a* im Rückenmark beruht, verwendete ich die *Ht-PA-Cre*-Rekombinase. Diese Rekombinase ist in Neuralleistenzellen und ihren Derivaten, also im peripheren Nervensystem, aktiv (Pietri *et al.* 2003). Damit sollte eine Deletion von *Bcl11a* ausschließlich in den Spinalganglien erzielt werden. In *Bcl11a^{flox/flox}/Ht-PA-Cre*-Tieren konnte ich keine Expression von *Bcl11a* in den Spinalganglien detektieren (Abb.

3.2 D). Die *Bcl11a*-Expression im Rückenmark ist in diesen Tieren, im Vergleich zu den Kontrolltieren jedoch reduziert (Abb. 3.2 B, D), obwohl eine Aktivität der Ht-PA-Cre-Rekombinase im Neuralrohr bisher nicht beschrieben ist (Pietri *et al.* 2003). Diese Aktivität im Neuralrohr ist jedoch, verglichen mit der Ht-PA-Cre-Aktivität in den Spinalganglien, deutlich geringer. Kontrolltiere in allen Experimenten sind, wenn nicht anders beschrieben, jeweils *Bcl11a^{flox/+}/Cre*-Tiere.

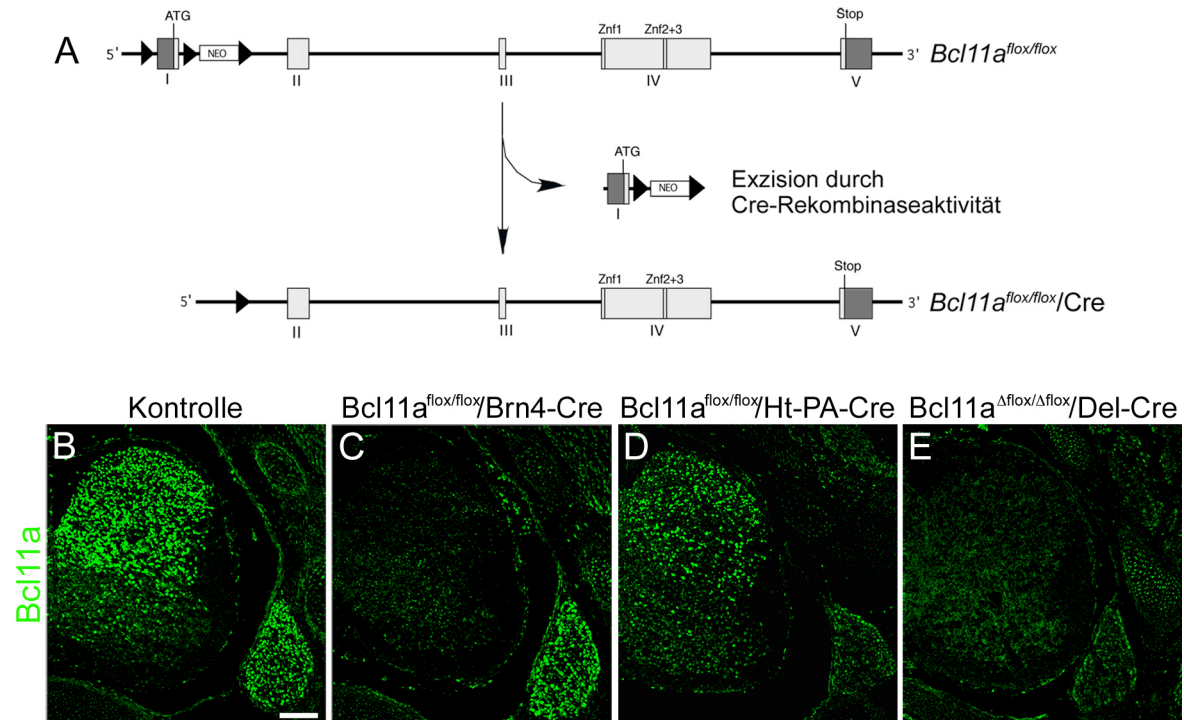


Abb. 3.2: Strategie zur konditionellen Mutagenese des *Bcl11a*-Lokus.

(A) Schematische Darstellung der genomischen Struktur des *Bcl11a^{flox/flox}*-Lokus und des mutierten *Bcl11a*-Allels (*Bcl11a^{flox/flox}/Cre*) nach der Cre-vermittelten Deletion von Exon 1 und der Neomycin-Resistenzkassette. Die Exons 1-5 (I-V) des *Bcl11a*-Lokus sind mit dem ATG-Startcodon, den drei Zinkfingerdomänen (Znf1-3) und dem Stopcodon dargestellt. Die *Bcl11a*-kodierende Sequenz ist hellgrau, die *loxP*-Sequenzen schwarz und die Neomycin-Resistenzkassette weiß eingezeichnet. (B-E) Immunhistologische Analysen mit einem *Bcl11a*-Antikörper (grün) auf Gewebsschnitten des Rückenmarks und der Spinalganglien von Kontroll- und *Bcl11a*-mutanten Tieren E15,5. Die *Brn4*-Cre-Rekombinase deletiert *Bcl11a* im Rückenmark und nicht in den Spinalganglien (C). Die Ht-PA-Cre-Rekombinase deletiert *Bcl11a* in den Spinalganglien (D). Bei Verwendung der Deleter-Cre-Rekombinase konnte keine Expression von *Bcl11a* im Rückenmark und in den Spinalganglien detektiert werden (E). Größenstandard: 100 μ m.

3.3 Analyse der neuronalen Differenzierung im dorsalen Horn von *Bcl11a*-Mutanten

Das dorsale Horn des Rückenmarks empfängt und verarbeitet sensorische Informationen. Dabei projizieren unterschiedliche primäre sensorische Neurone auf verschiedene Typen

von Neuronen im dorsalen Horn, die in charakteristischen Laminae angeordnet sind. Diese Anordnung der Neurone ist im adulten Rückenmark gut untersucht (Christensen & Perl 1970; Rexed 1952). Obwohl die vollständige Reifung der dorsalen Neurone postnatal erfolgt, können diese bereits während der Entwicklung des Rückenmarks primordialen Laminae zugeordnet werden. Diese Zuordnung ist unter anderem durch die kombinierte Expression der Transkriptionsfaktoren Lbx1 und Lmx1b möglich (Muller *et al.* 2002). Ich untersuchte nun in den *Bcl11a^{fllox/fllox}/Brn4-Cre*-Tieren die Proteinexpression von Lbx1 und Lmx1b sowie die Anordnung der primordialen Laminae. Die Analyse führte ich am Entwicklungstag 18,5 durch. Dies ist der späteste mögliche Zeitpunkt in der Entwicklung der *Bcl11a^{fllox/fllox}/Brn4-Cre*-Tiere, da diese kurz nach der Geburt sterben.

In den Kontrolltieren exprimieren die Neurone des oberflächlichen dorsalen Horns Lmx1b, ventral dazu befinden sich Lbx1-positive Neurone. Zwischen diesen beiden Laminae liegt ein Bereich, in dem die Neurone Lmx1b und Lbx1 koexprimieren (Abb. 3.3 A, C, E). Diese neuronale Architektur ist in den *Bcl11a^{fllox/fllox}/Brn4-Cre*-Tieren gestört. Die durch die kombinierte Expression von Lbx1 und Lmx1b definierten Laminae sind in den *Bcl11a*-Mutanten zwar vorhanden, die Somata der dorsalen Neurone liegen jedoch im Vergleich zu den Kontrolltieren dichter beieinander und sind in Richtung des oberflächlichen dorsalen Horns verschoben (Abb. 3.3 B, D, F). Eine verdichtete Anordnung der Somata der dorsalen Neurone in den *Bcl11a*-Mutanten beobachtete ich auch bei der Verwendung des Ebfl-Antikörpers (siehe Abb. 3.4 B).

Eine Ursache dieser gestörten neuronalen Architektur in den *Bcl11a*-mutanten Tieren könnten Veränderungen in der Anzahl der dorsalen Neurone sein, welche die Lbx1- und Lmx1b-Zellpopulationen bilden. Ich bestimmte daher die Anzahl der Neurone, die zu den einzelnen Zellpopulationen gehören sowie die Zahl der Neurone, die Lbx1 und Lmx1b koexprimieren. Die Quantifizierung ergab keine signifikanten Unterschiede in der Zellzahl der untersuchten Zellpopulationen zwischen Kontroll- und *Bcl11a*-mutanten Tieren (Abb. 3.3 G). Eine andere Ursache der gestörten neuronalen Architektur in den *Bcl11a*-Mutanten könnte in dem Verlust von Zellen im dorsalen Horn liegen. Es wurde daher die Gesamtzellzahl mit dem fluoreszierenden Kernfarbstoff TOTO und die Anzahl der dorsalen Neurone mit einem Antikörper gegen das pan-neurale Antigen NeuN bestimmt. Ich konnte keine signifikanten Änderungen in der Gesamtzellzahl und der Anzahl der Neurone in den *Bcl11a*-Mutanten, verglichen mit den Kontrolltieren, detektieren (Abb. 3.3 G). Zusätzlich untersuchte ich in einer TUNEL-Analyse, ob Zellen im dorsalen Horn des

Rückenmarks durch Apoptose eliminiert werden. Am Entwicklungstag 18,0 sowie früher in der Entwicklung, im Stadium 16,5, ergab die Quantifizierung keine signifikanten Veränderungen in der Anzahl der apoptotischen Zellen zwischen Kontroll- und *Bcl11a*-mutanten Tieren (Abb. 3.3 H). In den *Bcl11a*-mutanten Tieren ist die Anzahl der apoptotischen Zellen an beiden Entwicklungstagen allerdings tendenziell erhöht, was möglicherweise auf einen beginnenden Zelltod in der weiteren Entwicklung hindeutet. Die Veränderungen in der neuronalen Architektur in den *Bcl11a*-Mutanten haben ihre Ursache jedoch nicht im Verlust von Zellen des dorsalen Horns.

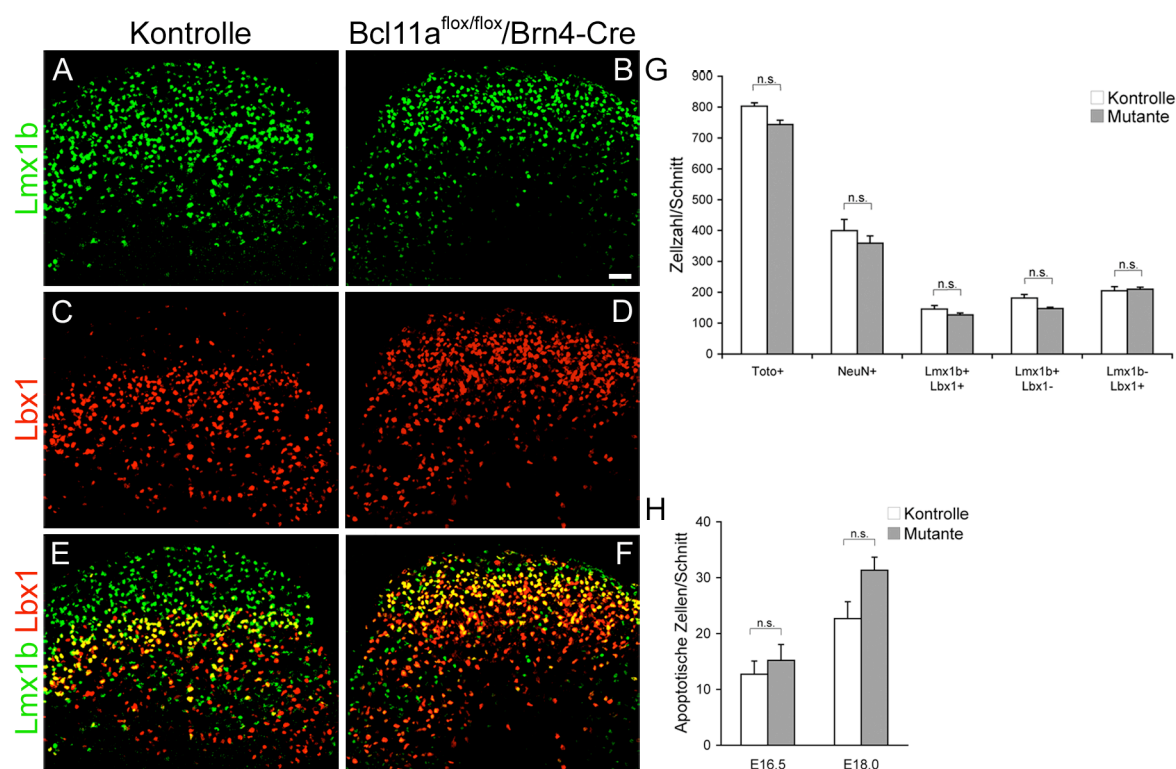


Abb. 3.3: Analyse der neuronalen Architektur des dorsalen Horns von *Bcl11a*-Mutanten.

(A-F) Immunhistologische Analyse des dorsalen Horns von Kontroll- und *Bcl11a*^{flx/flx}/*Brn4-Cre*-Tieren E18,5 mit Antikörpern gegen Lmx1b (grün) und Lbx1 (rot). (A) In den Kontrolltieren befinden sich im oberflächlichen dorsalen Horn Lmx1b-positive Neurone, ventral dazu liegen Lbx1-positive Neurone. Zwischen diesen beiden Zellpopulationen ist ein Bereich mit Neuronen, die Lbx1 und Lmx1b koexprimieren (gelbe Zellkerne in E). Diese neuronale Architektur des dorsalen Horns ist in den *Bcl11a*-Mutanten gestört. Die Somata der dorsalen Neurone liegen dichter beieinander und sind in Richtung des oberflächlichen dorsalen Horns verschoben (B, D, F). Größenstandard: 40 μ m. (G) Bestimmung der Gesamtzellzahl mit Hilfe des fluoreszierenden Kernfarbstoffes TOTO (TOTO+), der Anzahl der Neurone (NeuN+) und der Anzahl der Neurone, die Lmx1b und Lbx1 koexprimieren (Lmx1b+Lbx1+), die Lmx1b aber nicht Lbx1 exprimieren (Lmx1b+Lbx1-) und die Lbx1 nicht aber Lmx1b exprimieren (Lmx1b-Lbx1+). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und *Bcl11a*-mutanten Tieren festgestellt werden (weiße bzw. graue Balken). (H) TUNEL-Analyse E16,5 und 18,0. Die Anzahl der apoptotischen Zellen ist in den *Bcl11a*-Mutanten nicht signifikant erhöht. n.s. nicht signifikant.

In den *Bcl11a^{flox/flox}/Brn4-Cre*-Tieren exprimieren die dorsalen Neurone also *Lmx1b* und *Lbx1* und auch die Anzahl der Neurone, welche die *Lmx1b*- und *Lbx1*-Zellpopulationen bilden ist in Kontroll- und *Bcl11a*-mutanten Tieren nicht signifikant verändert (siehe Abb. 3.3 G). Dies deutet darauf hin, dass die frühe Differenzierung der Neurone im dorsalen Horn der *Bcl11a*-Mutanten nicht gestört ist.

Für die Kommunikation der Neurone untereinander ist die Abgabe und Aufnahme von Neurotransmittern eine entscheidende Voraussetzung. Während ihrer späteren Differenzierung erhalten die Neurone im dorsalen Horn daher ein ihrer Funktion entsprechendes charakteristisches Repertoire von Neurotransmittern und deren Rezeptoren. Es entstehen dabei zwei Hauptklassen von Neuronen, einerseits die GABAergen inhibitorischen Neurone und andererseits die glutamatergen exzitatorischen Neurone (Cheng *et al.* 2004). Im Folgenden untersuchte ich, ob die Ausbildung dieser beiden neuronalen Hauptklassen in den *Bcl11a*-mutanten Tieren beeinträchtigt ist. Als Marker für die GABAerge Differenzierung verwendete ich den Transkriptionsfaktor *Pax2* und *Gad67*, ein Enzym der GABA-Synthese. *Pax2* ist wichtig für die GABAerge Differenzierung im dorsalen Horn (Cheng *et al.* 2004). Die Transkriptionsfaktoren *Drg11* und *Ebf1* verwendete ich als Marker für die glutamaterge Differenzierung. Für die Expression von *Drg11* werden die Transkriptionsfaktoren *Tlx3*, *Tlx1* und *Lmx1b* benötigt. *Tlx3* und *Tlx1* sind an der Festlegung des glutamatergen Zellschicksals beteiligt (Cheng *et al.* 2004; Ding *et al.* 2004; Qian *et al.* 2002). *Lmx1b*, dessen Expression ebenfalls von *Tlx3* und *Tlx1* beeinflusst wird, reguliert zusätzlich die Expression des Transkriptionsfaktors *Ebf1* (Ding *et al.* 2004). Die Proteinexpression von *Ebf1* und die Expression des *Drg11*-RNA-Transkripts sind in den *Bcl11a*-mutanten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht verändert. In den mutanten Tieren deutet eine Verschiebung der *Ebf1*-positiven dorsalen Neurone in Richtung des oberflächlichen dorsalen Horns wiederum eine gestörte neuronale Architektur an (Abb. 3.4 A-D). Die Proteinexpression von *Pax2* und die Expression des *Gad67*-RNA-Transkripts sind ebenfalls unverändert in den *Bcl11a^{flox/flox}/Brn4-Cre*-Tieren (Abb. 3.4 E-H). Die Festlegung des glutamatergen und GABAergen Zellschicksals der dorsalen Neurone ist in den *Bcl11a*-Mutanten im Vergleich zu den Kontrolltieren also nicht offensichtlich beeinträchtigt.

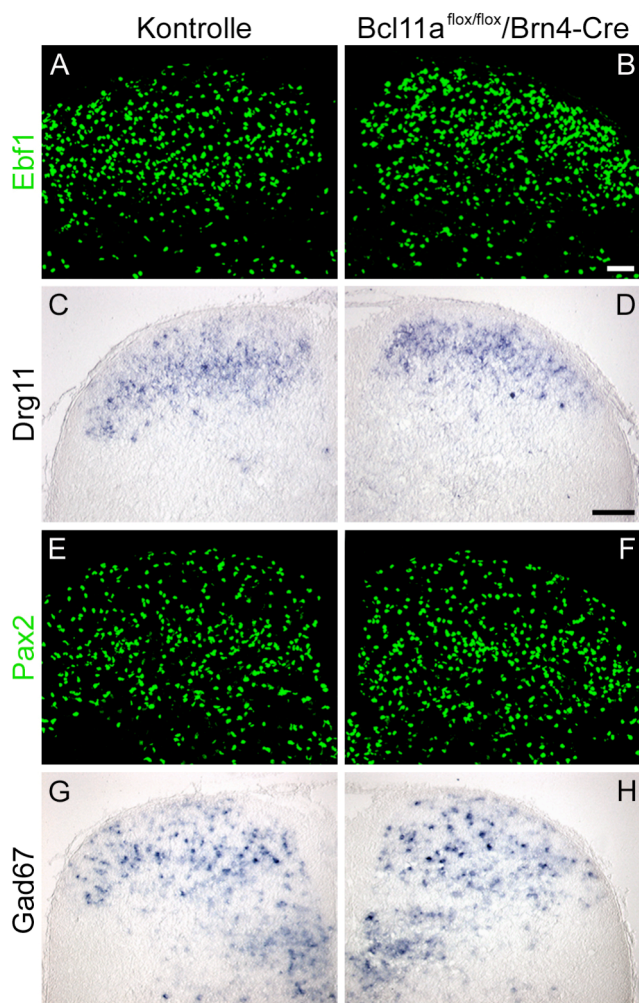


Abb. 3.4: Die glutamaterge und die GABAerge Differenzierung der Neurone des dorsalen Horns in den *Bcl11a*-Mutanten .

(A-D) Immunhistologische Analyse der glutamatergen Differenzierung dorsaler spinaler Neurone mit einem Antikörper gegen Ebf1 (grün, A, B) und *in situ*-Hybridisierung mit einer *Drg11*-RNA-Sonde (C, D). Die Expression von Ebf1 und *Drg11* ist unverändert in *Bcl11a*-mutanten und Kontrolltieren. In den Mutanten sind die Ebf1-positiven Neurone in Richtung des dorsalen Horns verschoben (B). (B, D) Größenstandard: 50 μm . (E-H) Analyse der GABAergen Differenzierung mit einem Antikörper gegen Pax2 und einer *Gad67*-RNA-Sonde. Es konnten keine Unterschiede in der Expression von Pax2 und *Gad67* detektiert werden.

Ein Teil der Neurone des dorsalen Horns exprimiert während ihrer späteren Differenzierung den Rezeptor für das Gastrin-freisetzende Peptid GRPR und den ionotropen Glutamaterezeptor GluR2, kodiert durch das Gen *Gria2*. GRPR ist in Lamina I exprimiert und vermittelt die Empfindung des Juckreizes im Rückenmark (Sun & Chen 2007). GluR2 wird von exzitatorischen glutamatergen Neuronen der Laminae I bis III exprimiert (Kerr *et al.* 1998). Mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungen analysierte ich die Expression von *GRPR* und *Gria2* in Kontroll- und *Bcl11a*^{flox/flox}/*Brn4-Cre*-Tieren am Entwicklungstag 16,5 (Abb. 3.5). In den *Bcl11a*-Mutanten konnte ich im dorsalen Horn keine Expression von GRPR detektieren (Abb. 3.5 B). Die Expression von *Gria2* ist in den mutanten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich reduziert (Abb. 3.5 C, D). Dies deutet darauf hin, dass in den *Bcl11a*-Mutanten die spätere Differenzierung derjenigen dorsalen Neurone, welche die Neurotransmitter-Rezeptoren GRPR und GluR2 exprimieren gestört ist.

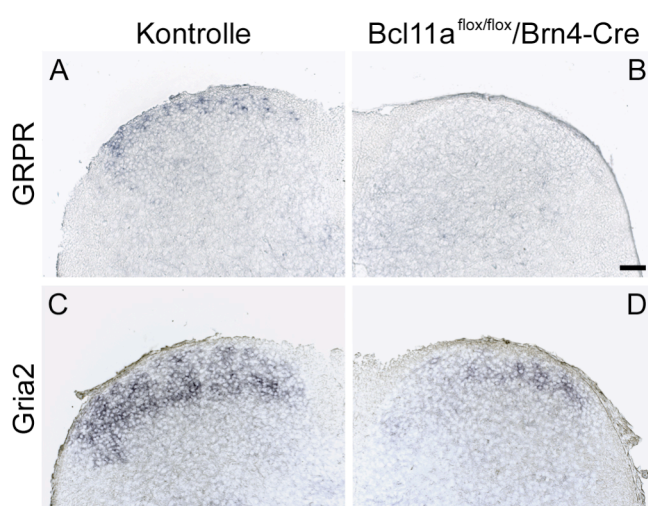


Abb. 3.5: Expression der Neurotransmitter-Rezeptoren *GRPR* und *Gria2* im dorsalen Horn von *Bcl11a*-Mutanten.

In situ-Hybridisierungen mit RNA-Sonden zur Identifizierung der Rezeptoren *GRPR* und *GluR2* (*Gria2*) E16,5. In den *Bcl11a*-Mutanten ist keine Expression von *GRPR* im dorsalen Horn nachweisbar. Die Expression von *Gria2* ist in den mutanten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich reduziert. Größenstandard: 100 μm .

3.4 Die neuronale Morphogenese in den *Bcl11a*-Mutanten

Neben der Ausbildung von Neurotransmitter-Rezeptoren ist die Morphogenese der dorsalen Neurone ein weiterer wichtiger Aspekt der späteren Differenzierung. Während ihrer Reifung bilden die Neurone des dorsalen Horns ein komplexes Netzwerk von Axonen und Dendriten aus, das eine Grundlage der Informationsübertragung im Rückenmark darstellt. Veränderungen in diesem Reifungsprozess können zu Änderungen in der Morphologie der Neurone führen.

Zur Analyse der Morphologie der dorsalen Neurone führte ich immunhistologische Färbungen mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein MAP2 durch. Dieses Protein kommt bevorzugt in den Dendriten von Neuronen vor (Caceres *et al.* 1984; Ding *et al.* 2004). Um die Gestalt dieser Neurone unabhängig von der Expression bestimmter Markerproteine direkt darstellen zu können, verwendete ich Golgi-Imprägnierungen. Diese Analysen wurden an Del-Cre-rekombinierten Tieren und an Brn4-Cre-rekombinierten Tieren durchgeführt. Ich beobachtete in beiden Fällen den gleichen Phänotyp. Im Folgenden sind die Ergebnisse für die Del-Cre-rekombinierten Tiere dargestellt. In den immunhistologischen Analysen am Entwicklungstag 18,5 verwendete ich zur Lokalisierung der Neurone des dorsalen Horns einen anti-Lmx1b-Antikörper. Die Proteinexpression von MAP2 ist in den *Bcl11a*-Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen reduziert. Diese Reduktion ist am deutlichsten im oberflächlichen dorsalen Horn zu erkennen (Abb. 3.6 A-D). Die Darstellung der Morphologie der dorsalen Neurone mit Hilfe von Golgi-Imprägnierungen am Entwicklungstag 18,5 zeigt, dass in den *Bcl11a*-

Mutanten die Gestalt der Neurone gestört ist. In den Kontrolltieren besitzen die Neurone lange Fortsätze mit komplexen Verzweigungen. Im Gegensatz dazu sind die Fortsätze der Neurone in den *Bcl11a*-mutanten Tieren deutlich verkürzt und weniger komplex verzweigt (Abb. 3.6 E 1-6, F 1-6).

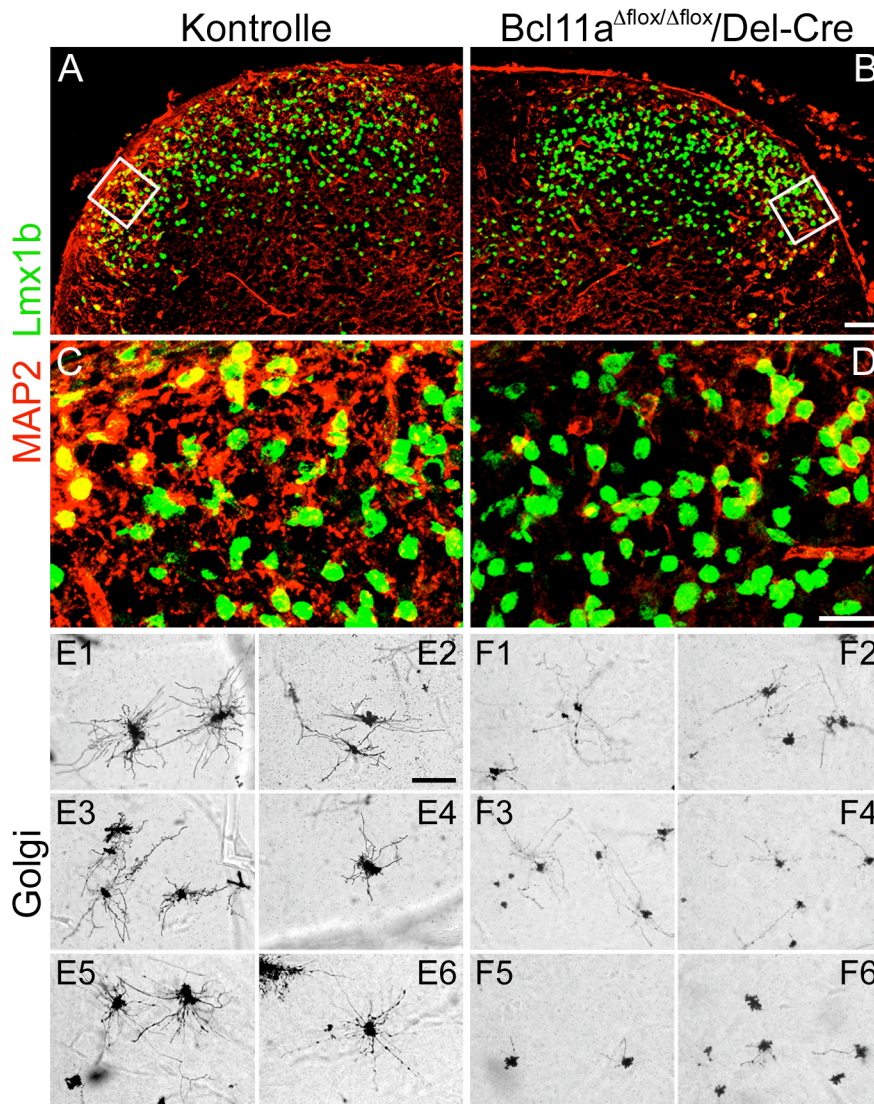


Abb. 3.6: Die Morphologie der Neurone des dorsalen Horns ist in den *Bcl11a*-Mutanten am Entwicklungstag 18,5 gestört.

(A-D) Immunhistologische Analysen des dorsalen Horns von Kontroll- (A, C) und *Bcl11a*-mutanten- (B, D) Tieren mit Antikörpern gegen Lmx1b (grün) und MAP2 (rot). (B) Größenstandard: 50 μm . (D) Größenstandard: 20 μm . C und D stellen jeweils Ausschnitte von A und B dar. Lmx1b identifiziert hier die Neurone des dorsalen Horns. Die Expression des Dendritenmarkers MAP2 ist in den *Bcl11a*-mutanten Tieren reduziert (B, D). (E, F) Golgi-Imprägnierungen von dorsalem Rückenmarksgewebe aus Kontroll- und *Bcl11a*-mutanten Tieren. Im Vergleich zu den Kontrollen sind die Fortsätze der dorsalen Neurone in den Mutanten verkürzt und weniger stark verzweigt. Größenstandard: 60 μm .

Die beeinträchtigte Morphologie in den *Bcl11a*-mutanten Tieren könnte ein indirekter Effekt sein, der auf die Umgebung zurückzuführen ist, in der die dorsalen Neurone sich befinden. Diese Umgebung stellen im dorsalen Horn neben anderen Neuronen auch die Extrazellulärmatrix und andere Zelltypen wie zum Beispiel Gliazellen dar, welche die Morphogenese der Neurone durch die Sezernierung von Signalmolekülen beeinflussen können (Arimura & Kaibuchi 2007; Yuste & Bonhoeffer 2004). Um derartige Effekte zu minimieren, etablierte ich Primärzellkulturen dorsaler spinaler Neurone mit geringer Zelldichte. Bei dieser Methode werden individuelle Neurone aus dem dorsalen Rückenmark isoliert. Die Neurone verlieren während der Isolation ihre Fortsätze und differenzieren in Kultur neu aus. Dadurch ist eine direkte Analyse der Morphogenese dieser Neurone unter kontrollierten äußeren Bedingungen möglich (Banker & Goslin 1998).

3.4.1 Primärzellkulturen dorsaler spinaler Neurone

Für die Etablierung von Primärzellkulturen der Neurone des dorsalen Horns präparierte ich dorsales Rückenmarksgewebe von Kontroll- und *Bcl11a^{flox/flox}/Brn4-Cre*-Tieren am Entwicklungstag 18,5. Die Zellen wurden bei gleicher Zelldichte 14 Tage kultiviert (DIV14) und anschließend immunzytologisch untersucht. Die Identifizierung der dorsalen Neurone erfolgte dabei mit einem Antikörper gegen *Lmx1b*, der im Zellkern lokalisiert ist (siehe Abb. 3.7 A, B). Die Darstellung der Morphologie erfolgte mit einem Antikörper gegen Tubulin (siehe Abb. 3.7 A-D). Tubulin ist Hauptbestandteil der Mikrotubuli, die wichtige zytoskeletale Komponenten von Neuronen darstellen und sich daher im gesamten Neuron befinden. Die Länge und Verzweigungen der neuronalen Fortsätze wurden quantitativ mit Hilfe der Sholl-Analyse ausgewertet (Sholl 1955). Bei dieser Methode wird um den Mittelpunkt des Somas eines Neurons eine Serie von konzentrischen Kreisen mit definiertem Abstand gelegt. Die Bestimmung der Länge und der Anzahl der Verzweigungen der neuronalen Fortsätze erfolgt dann durch Auszählen der Schnittpunkte eines jeden Fortsatzes mit den konzentrischen Kreisen. Die neuronalen Fortsätze werden auch als Neuriten bezeichnet, wenn sie noch nicht zu Axonen und Dendriten ausgereift sind (Dotti *et al.* 1988). In den Fortsätzen der kultivierten dorsalen Neurone konnte ich keine spezifische Expression von MAP2 und dem axonalen Markerprotein tau (vgl. Kapitel 3.4.2) detektieren. Dies deutet darauf hin, dass die Neurone nur unzureichend differenzieren. Im Folgenden bezeichne ich die neuronalen Fortsätze dieser Neurone daher

als Neuriten. Wie in Abb. 3.7 A-D dargestellt, sind die Neuriten in den *Bcl11a*-mutanten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen qualitativ verkürzt und weniger stark verzweigt. Die Quantifizierung ergab eine signifikante Reduktion der Länge und des Verzweigungsgrades der Neuriten in den Neuronen der *Bcl11a*-mutanten Zellkulturen (Abb. 3.7 E). Da die Analysen in Zellkulturen mit geringer Zelldichte durchgeführt wurden, geben diese Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass die gestörte Morphologie der dorsalen Neurone in den *Bcl11a*-Mutanten möglicherweise ein direkter Effekt der Deletion von *Bcl11a* sein könnte.

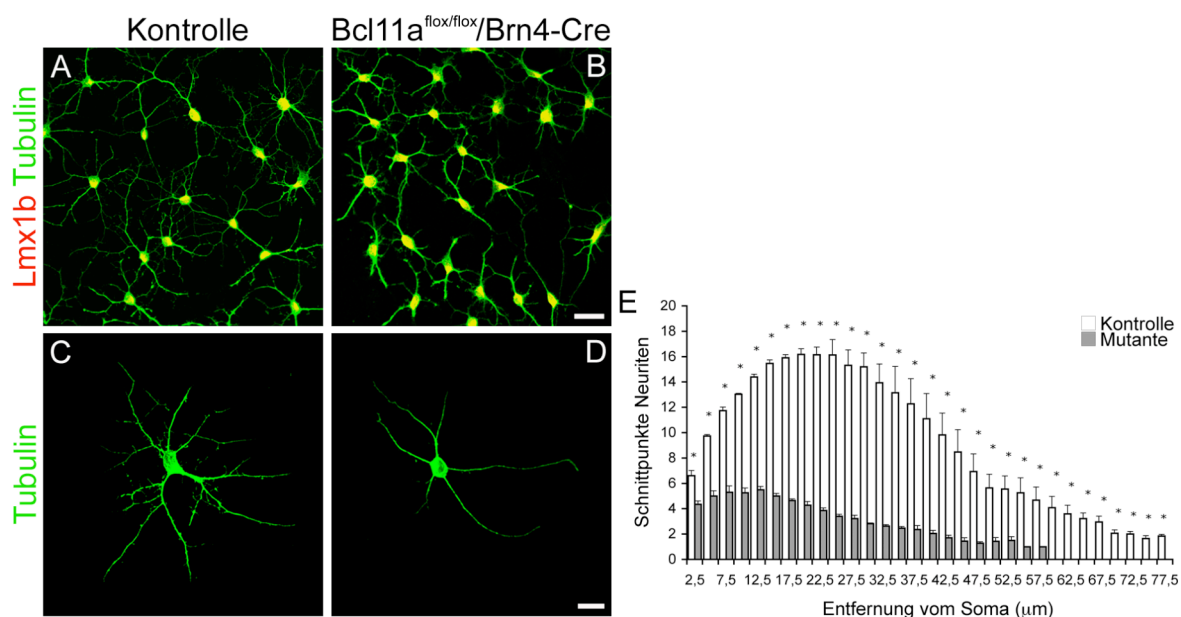


Abb. 3.7: In DIV14 *Bcl11a*-mutanten Primärzellkulturen sind die Neuriten der dorsalen Neurone im Vergleich zu den Neuriten der Kontrollneurone in ihrer Länge und ihrem Verzweigungsgrad signifikant reduziert.

(A-D) Immunzytologische Analysen von Primärzellkulturen dorsaler spinaler Neurone isoliert aus Kontrolltieren (A, C) und *Bcl11a*-mutanten Tieren (B, D). A und B sind Übersichtsaufnahmen, während in C und D jeweils ein Neuron detailliert dargestellt ist. (A, B) Die dorsalen Neurone wurden mit dem kernlokalisierten anti-Lmx1b-Antikörper (rot) identifiziert. (A-D) Die Darstellung der Morphologie der Neurone erfolgte mit einem Antikörper gegen Tubulin (grün). Die Anzahl der mit Hilfe von Tubulin dargestellten Neuriten ist in den *Bcl11a*-mutanten Neuronen im Vergleich zu den Kontrollneuronen reduziert. (B) Größenstandard: 80 μm . (D) Größenstandard: 40 μm . (E) Quantitative Auswertung der mit dem anti-Tubulin-Antikörper dargestellten Neuronenmorphologie durch Sholl-Analyse. Es wurden die Neuritenlänge (x-Achse) und die Anzahl der Schnittpunkte der Neuriten, also ihr Verzweigungsgrad, (y-Achse) bestimmt. Die *Bcl11a*-mutanten Neurone haben im Vergleich zu den Kontrollneuronen signifikant verkürzte Neuriten mit reduziertem Verzweigungsgrad. * $P < 0,05$.

Es ist bekannt, dass Rückenmarksneurone, isoliert an den Entwicklungstagen 11-14, in Primärzellkulturen kultiviert werden können. Die Kultivierung von Neuronen, die ab dem Entwicklungstag 17 isoliert werden ist dagegen äußerst schwierig (Peacock *et al.* 1973).

Ich habe hier erfolgreich Primärzellkulturen von Neuronen des dorsalen Horns am Entwicklungstag 18,5 etabliert. Diese Neurone differenzierten jedoch nur unzureichend, weshalb die Primärzellkulturen der dorsalen spinalen Neurone für eine detaillierte Untersuchung der Entwicklung von Axonen und Dendriten ungeeignet waren.

Ein gut etabliertes Zellkultursystem stellen hippocampale Primärzellkulturen dar. Hippocampale Neurone lassen sich leichter isolieren und kultivieren als dorsale spinale Neurone und differenzieren *in vitro* ähnlich wie *in vivo* (Banker & Goslin 1998). Zusätzlich ist *Bcl11a* in diesen Neuronen *in vivo* und *in vitro* exprimiert (vgl. Abb. 3.12 A und Abb. 3.8 A, C). Daher verwendete ich für die weitere Analyse der neuronalen Morphogenese das System der Primärzellkulturen hippocampaler Neurone.

3.4.2 Primärzellkulturen hippocampaler Neurone

Für die hippocampalen Primärzellkulturen wurden aus den Hippocampi von Kontroll- und *Bcl11a*-mutanten Tieren am postnatalen Tag 1 (P1) die neuronalen Zellen isoliert und in Kultur genommen. Ich verwendete für diese Analysen zur Deletion von *Bcl11a* eine Mauslinie, welche die *Emx1-Cre*-Rekombinase exprimiert. Diese Rekombinase ist im Vorderhirn und damit auch im Hippocampus aktiv (Gorski *et al.* 2002). Die *Bcl11a^{fllox/fllox}/Emx1-Cre*-Tiere sind, im Gegensatz zu den *Bcl11a^{fllox/fllox}/Brn4-Cre*-Tieren, lebensfähig, wodurch postnatale Analysen in *Bcl11a*-mutanten Tieren ermöglicht werden. Die *Bcl11a^{fllox/fllox}/Emx1-Cre*-Tiere besitzen einen Hippocampus (Näheres siehe Kapitel 3.4.5).

Die Morphogenese hippocampaler Neurone in Primärzellkulturen erfolgt in verschiedenen Entwicklungsstadien. Dabei entwickeln sich die Axone bereits nach einer Kulturdauer von einem halben Tag, während die Reifung der Dendriten erst nach einer Woche in Kultur stattfindet (Arimura & Kaibuchi 2007; Dotti *et al.* 1988). Ich untersuchte daher die Morphologie der Dendriten in 14 Tage kultivierten hippocampalen Neuronen (DIV14, siehe Abb. 3.8). Eine quantitative Analyse der Axone ist zu diesem Zeitpunkt schwierig, da die Neurone bereits weit ausdifferenziert sind und die Axone ein komplexes Netzwerk bilden. Für die Bestimmung der Länge der Axone verwendete ich deshalb jüngere 4,5 Tage kultivierte hippocampale Neurone (DIV4,5). Hier erfolgte auch wieder eine Analyse der Dendritenmorphologie (siehe Abb. 3.9). In diesen Untersuchungen stellte ich Defizite in der Morphogenese der Dendriten und Axone in den *Bcl11a*-mutanten hippocampalen

Neuronen fest. Ich versuchte daher anschließend, in den *Bcl11a*-mutanten Neuronen durch ein Rescue-Experiment diese morphologischen Defizite zu reduzieren (siehe Kapitel 3.4.3). Im Folgenden analysierte ich, ob Bcl11a ausreichend ist, um die Morphogenese in hippocampalen Neuronen zu induzieren. Dafür transfizierte ich Bcl11a in Primärzellkulturen hippocampaler Wildtypneurone (siehe Kapitel 3.4.4). Zusätzlich zu den *in vitro*-Analysen untersuchte ich die Morphologie der Dendriten der Pyramidenzellen des Hippocampus *in vivo* (siehe Kapitel 3.4.5).

Nach Isolation und Aussaat der Zellen wurden diese zunächst 14 Tage kultiviert und anschließend immunzytologisch mit einem Antikörper gegen Bcl11a sowie mit dem anti-MAP2-Antikörper als Markerprotein für Dendriten analysiert. Die Axone wurden mit Antikörpern gegen das Mikrotubuli-assoziierte Protein tau dargestellt, das an den Mikrotubuli der Axone angereichert ist (Dotti *et al.* 1987). In den hippocampalen Neuronen der Kontrolltiere konnte ich die Expression von Bcl11a in den Zellkernen der Neurone detektieren (Abb. 3.8 A). In den *Bcl11a*-mutanten Neuronen konnte ich dagegen keine Expression von Bcl11a detektieren (Abb. 3.8 B). Im Vergleich zu den Kontrollen sind die Dendriten in den mutanten Primärzellkulturen verkürzt und zeigen weniger komplexe Verzweigungen. Eine quantitative Sholl-Analyse bestätigte diese Beobachtung; die Dendriten der *Bcl11a*-mutanten Neurone sind verkürzt mit einem signifikant reduzierten Verzweigungsgrad (Abb. 3.8 E). Zusätzlich zu den Veränderungen in der Dendritenmorphologie ist auch das Netzwerk der Axone in den *Bcl11a*-mutanten Neuronen im Vergleich zu den Kontrollneuronen stark reduziert (Abb. 3.8 C, D).

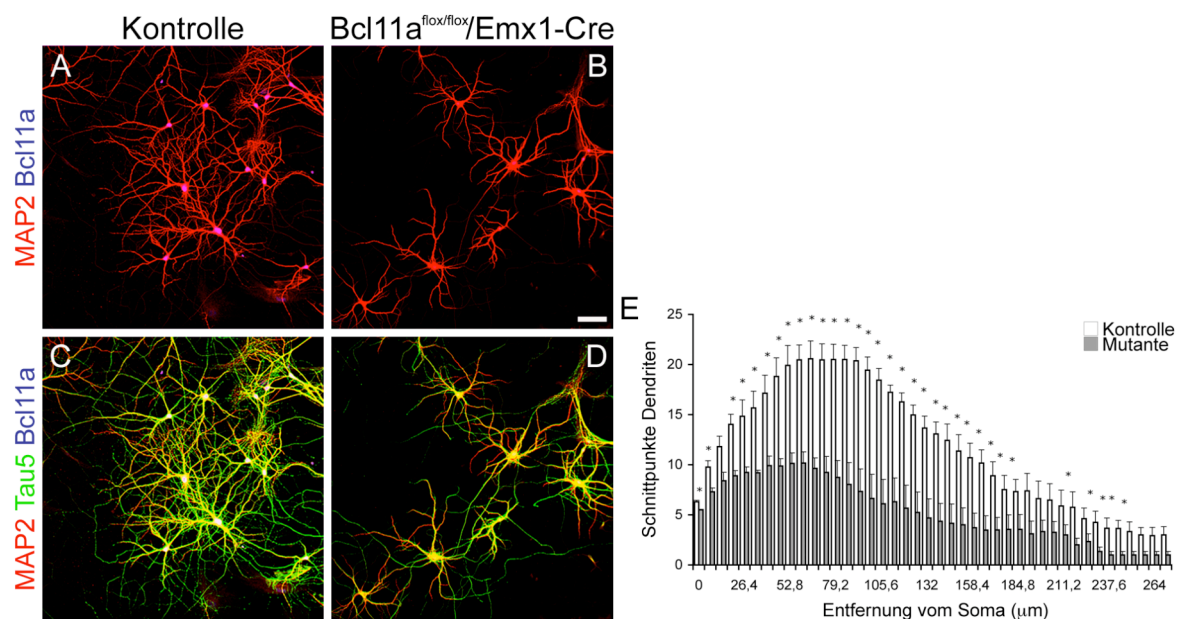


Abb. 3.8: DIV14 ist die Morphologie von Dendriten und Axonen der Neurone in den *Bcl11a*-mutanten hippocampalen Primärzellkulturen gestört.

(A-D) Immunzytologische Analysen von DIV14 Primärzellkulturen von Kontroll- (A, C) und *Bcl11a*-mutanten (B, D) hippocampalen Neuronen mit Antikörpern gegen Bcl11a (blau), MAP2 (rot) und gegen das Markerprotein für Axone Tau5 (grün). (B, D) Eine Expression von Bcl11a ist in den Neuronen der *Bcl11a*-mutanten Primärzellkulturen nicht nachweisbar. (A-B) Die Länge und der Verzweigungsgrad der Dendriten sind in den mutanten Primärzellkulturen im Vergleich zu den Primärzellkulturen der Kontrollen vermindert. (E) Die quantitative Auswertung mittels Sholl-Analyse ergab eine signifikante Reduktion der Dendritenverzweigungen in den *Bcl11a*-mutanten Neuronen. (C-D) Die *Bcl11a*-mutanten Neurone zeigen im Vergleich zu den Kontrollneuronen ein weniger komplexes Netzwerk von Axonen. (B) Größenstandard: 40 μm. * $P < 0,05$.

Für die quantitative Auswertung der Axonlängen verwendete ich jüngere, 4,5 Tage kultivierte, Primärzellkulturen (Abb. 3.9 A, B). Zu diesem Entwicklungszeitpunkt sind die Axone der Neurone kürzer und weniger komplex verzweigt als die Axone von Neuronen aus DIV14-Primärzellkulturen. Dies vereinfacht die Bestimmung der Axonlänge. Die Kulturen wurden wiederum mit Antikörpern gegen Bcl11a und MAP2 immunzytologisch analysiert. In den Zellkernen der *Bcl11a*-mutanten Neuronen konnte ich, wie bereits in den DIV14-Primärzellkulturen gezeigt, keine Expression von Bcl11a detektieren (Abb. 3.9 B). Für die Messung der Länge der Axone wurden diese mit einem anti-Tau1-Antikörper dargestellt. Der anti-Tau1-Antikörper wurde eingesetzt, da er im Vergleich zum anti-Tau5-Antikörper eine höhere Spezifität für Axone besitzt. Die Neurone aus *Bcl11a*-mutanten Primärzellkulturen haben im Vergleich zu den Kontrollneuronen signifikant verkürzte Axone (Abb. 3.9 C). Die quantitative Auswertung der Dendritenmorphologie mit Hilfe der Sholl-Analyse ergab zu diesem frühen Entwicklungszeitpunkt mehrheitlich keine

signifikanten Unterschiede zwischen den Neuronen der *Bcl11a*-mutanten Kulturen und den Neuronen aus den Kontrollkulturen (Abb. 3.9 D).

Die Ergebnisse der immunhistologischen Analyse zum Zeitpunkt DIV4,5 deuten darauf hin, dass in den *Bcl11a*-mutanten hippocampalen Neuronen die frühe Ausbildung von Dendriten und Axonen und die damit verbundene Etablierung der neuronalen Polarität nicht beeinträchtigt sind.

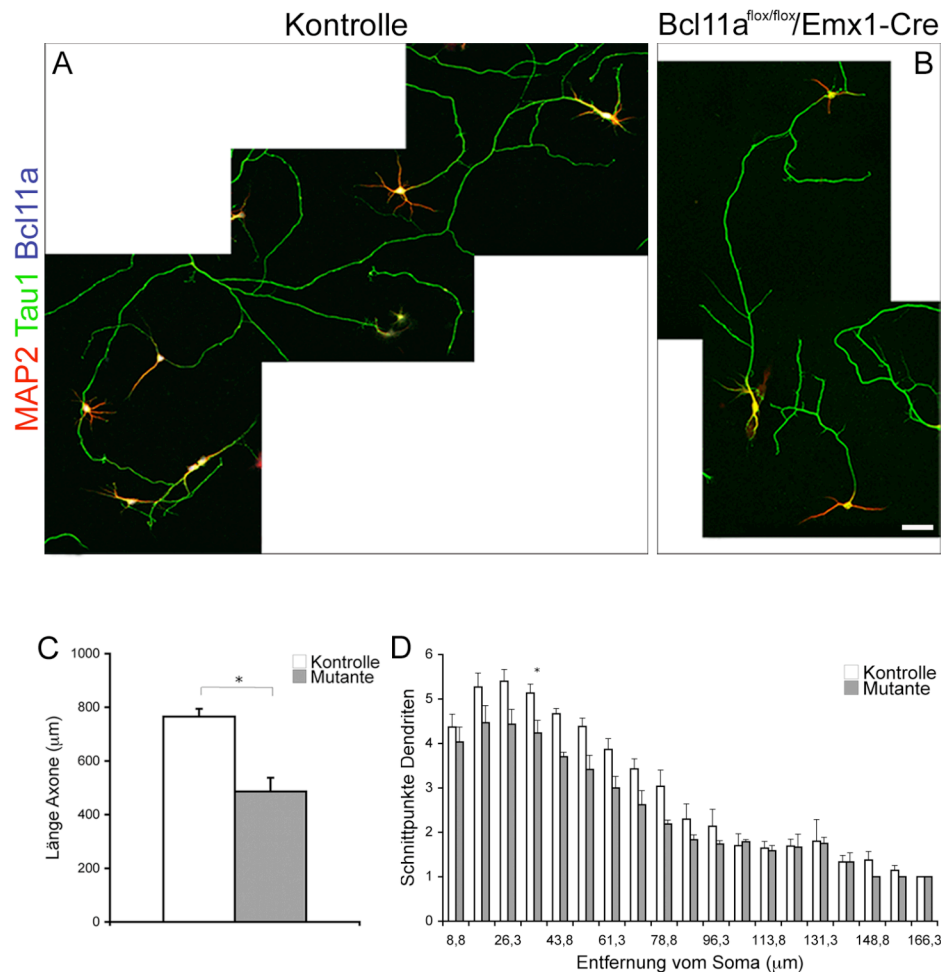


Abb. 3.9: Untersuchung der Axonlänge und Dendritenmorphologie in DIV4,5-Primärzellkulturen von *Bcl11a*-mutanten Neuronen und Kontrollneuronen.

(A-B) Immunzytologische Analysen von hippocampalen Neuronen *Bcl11a*-mutanter Tiere (B) und von Kontrolltieren (A) mit Antikörpern gegen Bcl11a (blau), MAP2 (rot) für die Darstellung der Dendriten und Tau1 (grün) für die Abbildung der Axone. (B) Größenstandard: 20 µm. (C) Quantitative Bestimmung der Länge von Axonen *Bcl11a*-mutanter Neurone und von Neuronen aus Kontrolltieren. Die *Bcl11a*-mutanten Neurone haben signifikant verkürzte Axone im Vergleich zu den Kontrollneuronen. (D) Sholl-Analyse zur Auswertung des Verzweigungsgrades und der Länge der Dendriten. Es konnten mehrheitlich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Dendritenmorphologie von Neuronen aus Kontroll-Primärzellkulturen und *Bcl11a*-mutanten Primärzellkulturen festgestellt werden. * $P < 0,05$.

In den hippocampalen Neuronen der *Bcl11a*-mutanten Tiere ist *in vitro* die frühe Morphogenese der Dendriten zum Zeitpunkt DIV4,5 nicht beeinträchtigt. Während ihrer weiteren Reifung zeigen die Dendriten der *Bcl11a*-mutanten Neurone jedoch Störungen, sie sind zum Zeitpunkt DIV14 verglichen mit den Dendriten von Neuronen aus Kontrolltieren verkürzt und weniger stark verzweigt. Die Axone der *Bcl11a*-mutanten hippocampalen Neurone sind bereits zum Zeitpunkt DIV4,5 kürzer als die Axone der Kontrollneurone. Während ihrer fortschreitenden Morphogenese bilden die *Bcl11a*-mutanten Neurone ein weniger komplexes axonales Netzwerk als die Neurone der Kontrollkulturen.

Diese Unterschiede im dendritischen und axonalen Phänotyp der *Bcl11a*-mutanten Neurone können möglicherweise auf die zeitlich versetzte Entwicklung der Dendriten und Axone von Neuronen in den Primärzellkulturen zurückgeführt werden. Während in hippocampalen Primärzellkulturen das Auswachsen einzelner Neuriten zu Axonen bereits nach einem halben Tag in Kultur erfolgt, entwickeln sich die restlichen Neuriten erst im Laufe der ersten Woche in Kultur zu Dendriten (Dotti *et al.* 1988). Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass *Bcl11a* *in vitro* essentiell für die Morphogenese von Dendriten und Axonen hippocampaler Neurone ist.

Ich versuchte nun in einem Rescue-Experiment durch Transfektion von *Bcl11a* in *Bcl11a*-mutante hippocampale Primärzellkulturen die Defizite in der neuronalen Morphogenese in den mutanten Tieren zu vermindern.

3.4.3 Rescue *Bcl11a*-mutanter hippocampaler Neurone

Für die Transfektionsexperimente klonierte ich die Isoform Evi9b von *Bcl11a* in den Expressionsvektor pCS2+MT, welcher einen sechsfachen Myc-Tag enthält. Im entstandenen Fusionsprotein befindet sich der Myc-Tag am N-terminalen Ende von Evi9b und ermöglicht die Detektion des Proteins in der Zelle mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen den Myc-Tag gerichtet ist. Für das Rescue-Experiment transfizierte ich DIV7 den Vektor pCS-Evi9b in *Bcl11a*-mutante hippocampale Neurone und den Leervektor pCS2+MT in hippocampale Neurone, isoliert aus Kontrolltieren. Nach zwei weiteren Tagen in Kultur (DIV7+2) wurden die transfizierten Neurone immunzytologisch mit einem anti-Myc-Antikörper dargestellt (Abb. 3.10 A, B). Zur quantitativen Auswertung wurde die Sholl-Analyse verwendet.

In den *Bcl11a*-mutanten Neuronen, die mit pCS-Evi9b transfiziert waren, konnte ich keine morphologischen Unterschiede gegenüber den Kontrollneuronen feststellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden. Die quantitative Auswertung mittels der Sholl-Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich Länge und Verzweigungsgrad der Neuriten von transfizierten Neuronen aus *Bcl11a*-mutanten und Kontroll-Primärzellkulturen (Abb. 3.10 C). Die Anzahl der Verzweigungen der Neurone in den Kontroll-Primärzellkulturen, transfiziert mit dem Leervektor pCS2+MT, entspricht außerdem der Anzahl der Verzweigungen der Neurone in den Wildtyp-Primärzellkulturen aus Kapitel 3.4.4, die ebenfalls mit dem Leervektor pCS2+MT transfiziert wurden (Abb. 3.11 C). Dies deutet darauf hin, dass der Leervektor allein keinen begünstigenden Einfluss auf die Morphogenese hippocampaler Neurone hat.

Nach der Transfektion von Evi9b zeigen die *Bcl11a*-mutanten Neurone im Vergleich zu den Kontrollneuronen keine offensichtlichen morphologischen Defizite mehr, ein Rescue des *Bcl11a*-mutanten Phänotyps ist also möglich. Diese Daten weisen daraufhin, dass *Bcl11a* *in vitro* für die neuronale Morphogenese benötigt wird.

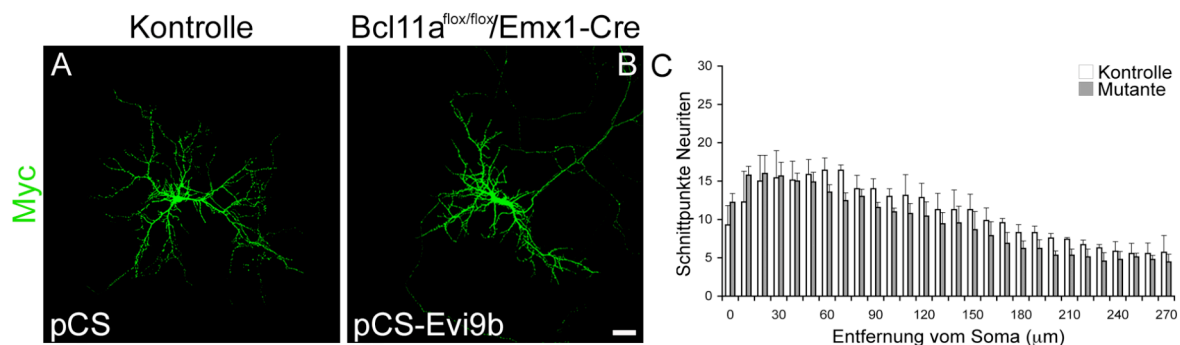


Abb. 3.10: Transfektion von *Bcl11a* in *Bcl11a*-mutante hippocampale Primärzellkulturen. (A-B) Transfektion von (A) hippocampalen Kontrollneuronen mit dem Leervektor pCS2+MT und (B) hippocampalen *Bcl11a*-mutanten Neuronen mit dem Vektor pCS-Evi9b sowie anschließende immunzytologische Analyse der transfizierten Neurone mit einem anti-Myc-Antikörper (grün). Ich konnte keine Unterschiede in der Morphologie der *Bcl11a*-mutanten Neurone im Vergleich zu den Kontrollneuronen detektieren. (B) Größenstandard: 40 µm. (C) Auch die quantitative Auswertung mit Hilfe der Sholl-Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den *Bcl11a*-mutanten Neuronen, transfiziert mit Evi9b, und den Kontrollneuronen, transfiziert mit dem Leervektor.

Im Folgenden untersuchte ich, ob Bcl11a an sich *in vitro* ausreichend ist, um die neuronale Morphogenese in hippocampalen Neuronen zu induzieren. Ich führte dafür Überexpressionsexperimente durch, indem ich Bcl11a in Primärzellkulturen hippocampaler Wildtypneurone transfizierte.

3.4.4 Transfektion von Bcl11a in hippocampale Wildtypneurone

Die Primärzellkulturen hippocampaler Wildtypneurone wurden DIV7 mit dem Vektor pCS-Evi9b bzw. mit dem Leervektor pCS2+MT transfiziert. Die immunzytologische Analyse der transfizierten Neurone mit dem anti-Myc-Antikörper erfolgte wiederum nach zwei weiteren Tagen der Zellen in Kultur (DIV7+2; Abb. 3.11 A, B).

Die Überexpression von Bcl11a in Wildtypneuronen führt zu einer Umkehrung des in den *Bcl11a*-Mutanten beobachteten Phänotyps. Ich detektierte in den mit dem Vektor pCS-Evi9b transfizierten Kulturen Neurone mit einem höheren Verzweigungsgrad ihrer Neuriten. Zusätzlich besaßen diese Neurone im Vergleich zu den Neuronen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden längere Neuriten. Die Quantifizierung mit Hilfe der Sholl-Analyse ergab jedoch nicht für jeden Messpunkt eine signifikante Erhöhung des Verzweigungsgrades der Neuriten der Neurone, die mit Evi9b transfiziert wurden (Näheres dazu siehe Kapitel 4.2).

Aus den Ergebnissen der Experimente zur Überexpression von Bcl11a lässt sich schließen, dass Bcl11a *in vitro* ausreichend ist, um ein verstärktes Auswachsen und einen höheren Verzweigungsgrad der Neuriten in den transfizierten hippocampalen Neuronen zu induzieren.

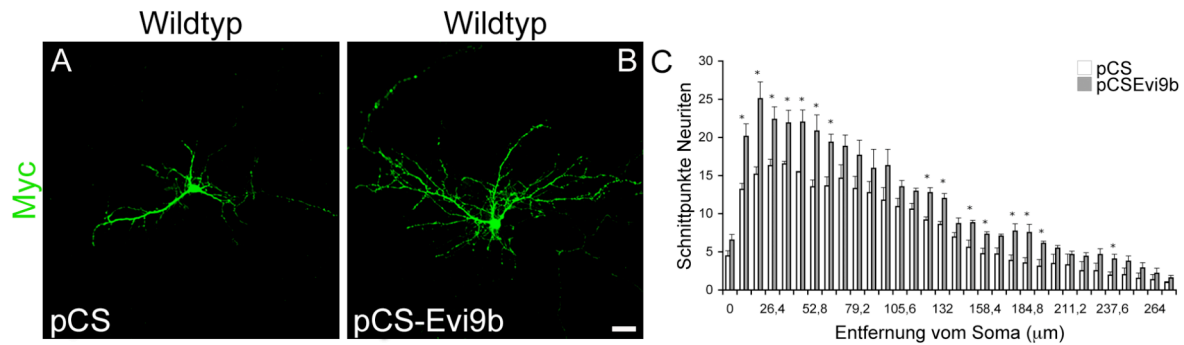


Abb. 3.11: Überexpression von Bcl11a in Primärzellkulturen hippocampaler Wildtypneurone.

(A-B) In hippocampalen Primärzellkulturen von Wildtypneuronen wurde DIV7 (A) der Leervektor pCS2+MT und (B) der Vektor pCS-Evi9b transfiziert. Die Detektion der transfizierten Neurone erfolgte DIV7+2 mit einem Antikörper gegen den Myc-Tag (grün). Die mit dem Vektor pCS-Evi9b transfizierten Neurone haben längeren Neuriten mit einem höheren Verzweigungsgrad verglichen mit Neuronen, welche mit dem Leervektor transfiziert wurden. (B) Größenstandard: 40 µm. (C) Sholl-Analyse zur quantitativen Auswertung von Länge und Verzweigungsgrad der Neuriten. * $P < 0,05$.

Bcl11a ist *in vivo* in den Pyramidenzellen des Hippocampus und *in vitro* in hippocampalen Neuronen exprimiert (siehe Abb. 3.12 A; Abb. 3.8 A). Meine bisherigen Ergebnisse zeigen, dass in *Bcl11a*-mutanten hippocampalen Primärzellkulturen, die in ihrer Mehrzahl Pyramidenzellen darstellen (Banker & Goslin 1998), die Morphologie der Neurone gestört ist. Ich untersuchte daher im Folgenden, ob auch *in vivo* die Morphologie der Pyramidenzellen des Hippocampus in den *Bcl11a*-mutanten Tieren verändert ist.

3.4.5 Untersuchung der Morphologie der Pyramidenzellen *in vivo*

Im Vergleich zu den Kontrolltieren ist der Hippocampus in *Bcl11a*^{fllox/fllox}/*Emx1-Cre*-Tieren verkleinert (Abb. 3.12 A, B). Histologische Untersuchungen zeigten, dass die Anordnung der prinzipiellen Neuronentypen des *Bcl11a*-mutanten Hippocampus, der Pyramidenzellen in der Hippocampusrinde und der Körnerzellen im Gyrus dentatus, grob der Architektur des Hippocampus in den Kontrolltieren entspricht (nicht gezeigt). Abb. 3.12 A und B zeigt *in situ*-Hybridisierungen mit einer *Bcl11a*-RNA-Sonde auf koronalen Gewebsschnitten des Hippocampus und Neocortex von (A) Kontrolltieren und (B) *Bcl11a*-mutanten Tieren im Alter P15. In den Kontrolltieren konnte ich die Expression von *Bcl11a* im Hippocampus und im Neocortex detektieren. Diese Expression ist in den *Bcl11a*-mutanten Tieren im Neocortex nicht mehr nachweisbar. In den Pyramidenzellen der CA1- CA2- und CA3-Region des Hippocampus von *Bcl11a*-mutanten Tieren ist ein schwaches *Bcl11a*-Signal

detektierbar, das auf Hintergrundsignal der *Bcl11a*-RNA-Sonde zurückgeführt werden könnte.

Für die selektive Darstellung der Pyramidenzellmorphologie des Hippocampus *in vivo* wurde der *thyl-YFP*-Reportermausstamm der Linie H (Feng *et al.* 2000) in *Bcl11a^{flox/+}/Emx1-Cre-* und *Bcl11a^{flox/flox}/Emx1-Cre-*Tiere eingekreuzt. Diese Tiere exprimieren ein fluoreszierendes YFP-Protein unter der Kontrolle des *thyl*-Promotors. Thyl1 ist ein Immunglobulin, das von Projektionsneuronen des Zentralnervensystems exprimiert wird (Gordon *et al.* 1987). Die Linie H des *thyl-YFP*-Reportermausstamms exprimiert YFP in den Pyramidenzellen des Hippocampus. In Abb. 3.12 C und D sind die YFP-exprimierenden Pyramidenzellen der CA3-Region des Hippocampus von (C) Kontrolltieren und (D) *Bcl11a*-mutanten Tieren im Alter von einem Jahr dargestellt. In den Kontrolltieren haben die Pyramidenzellen basale und apikale Dendriten, die sich ins Stratum oriens (so) bzw. ins Stratum radiatum (sr) und Stratum lacunosum/moleculare (slm) ausdehnen. Die apikalen Dendriten sind in den *Bcl11a*-mutanten Tieren im Vergleich dazu verkürzt und in ihrer Komplexität extrem reduziert. Zusätzlich liegen einige Pyramidenzellen mit ihren Somata außerhalb des Stratum pyramidale (sp, siehe Pfeil in D). Das Stratum radiatum ist in den Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen verkleinert. Eine klare Abgrenzung von Stratum radiatum und Stratum lacunosum/moleculare konnte ich nicht beobachten.

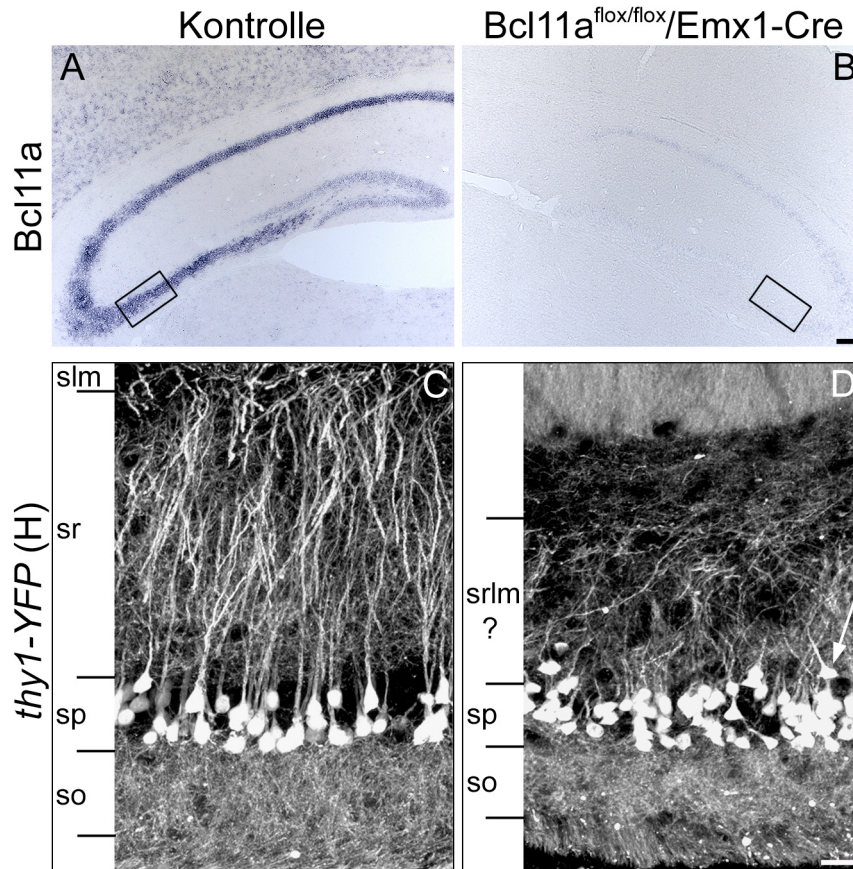


Abb. 3.12: Expression von *Bcl11a* in Hippocampus und Neocortex sowie Analyse der Dendritenmorphologie der Pyramidenzellen der CA3-Region des Hippocampus.

(A-B) *In situ*-Hybridisierungen mit einer *Bcl11a*-RNA-Sonde auf Gewebsschnitten des Vorderhirns von (B) *Bcl11a*-mutanten- und (A) Kontrolltieren P15. Die Expression von *Bcl11a* konnte ich in den Kontrolltieren im Neocortex und im Hippocampus detektieren. In den mutanten Tieren ist keine Expression von *Bcl11a* im Neocortex nachweisbar. In den Pyramidenzellen der CA1-, CA2- und CA3-Region des Hippocampus detektierte ich ein schwaches *Bcl11a*-Signal. Die Rechtecke in A und B markieren den Bereich der CA3-Region des Hippocampus, der in C und D dargestellt ist. (B) Größenstandard: 100 μm . (C-D) Pyramidenzellen der CA3-Region des Hippocampus von einjährigen *Bcl11a*-mutanten- und Kontrolltieren, dargestellt durch Expression eines *thyl-YFP*-Reporterproteins. Die apikalen Dendriten in den *Bcl11a*-Mutanten sind im Vergleich zu den Kontrollen verkürzt und in ihrer Komplexität reduziert. Die Somata einiger Pyramidenzellen liegen außerhalb des Stratum pyramidale (siehe Pfeil in D). Das Stratum radiatum ist in den Mutanten verkleinert, eine klare Abgrenzung von Stratum radiatum und Stratum lacunosum/moleculare konnte ich nicht nachweisen. so: Stratum oriens; sp: Stratum pyramidale; sr: Stratum radiatum; slm: Stratum lacunosum/moleculare. (D) Größenstandard: 50 μm .

3.5 Projektionen primärer sensorischer Neurone in das dorsale Horn

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen bisher, dass in den *Bcl11a*-mutanten Tieren die spätere Differenzierung der Neurone des dorsalen Horns in Bezug auf die Expression der Neurotransmitter-Rezeptoren GRPR und GluR2 und die korrekte Ausbildung der

Morphologie beeinträchtigt sind. Dorsale spinale Neurone sind die postsynaptischen Zielneurone primärer sensorischer Neurone, deren Somata in den Spinalganglien liegen und die ihre zentralen Axone in das dorsale Horn senden. Dort bilden die Axone synaptische Verschaltungen mit dorsalen spinalen Neuronen aus. Diese funktionellen Verbindungen sind eine Grundlage für die Übertragung und die Prozessierung der sensorischen Informationen durch das Rückenmark. Voraussetzung für eine Verschaltung ist neben anderen Faktoren die korrekte Ausbildung der Dendriten in den postsynaptischen Zielneuronen. Eine weitere Aufgabe der dorsalen Neurone ist die Sezernierung von axonalen Wegfindungsmolekülen, welche die Projektionen der Axone primärer sensorischer Neurone ins dorsale Horn beeinflussen (Ding *et al.* 2004; Messersmith *et al.* 1995; Yoshida *et al.* 2006). Die Defizite in der späteren Differenzierung der *Bcl11a*-mutanten dorsalen Neurone können damit Veränderungen im Projektionsverhalten der primären sensorischen Neurone hervorrufen. Ich untersuchte daher im Folgenden dieses Projektionsverhalten in den *Bcl11a*-mutanten Tieren.

Ich analysierte zunächst die Projektionen in Kontroll- und *Bcl11a^{flox/flox}/Brn4-Cre*-Tieren (siehe Kapitel 3.5.1). Anschließend untersuchte ich in einem weiteren Experiment, ob das beobachtete Projektionsverhalten in den *Brn4-Cre*-rekombinierten *Bcl11a*-Mutanten spezifisch auf die Funktion von *Bcl11a* im Rückenmark zurückgeführt werden kann und unabhängig von der *Bcl11a*-Expression in den Spinalganglien ist. Hierzu verwendete ich *Ht-PA-Cre*-rekombinierte Tiere (siehe Kapitel 3.2). Ich analysierte in diesen Tieren zusätzlich die neuronale Architektur des dorsalen Horns (siehe Kapitel 3.5.2).

3.5.1 Die Projektionen primärer sensorischer Neurone in *Brn4-Cre*-rekombinierten Tieren

Um die Projektionen der primären sensorischen Neurone darzustellen, wurden Kristalle des fluoreszierenden Farbstoffes DiI am Entwicklungstag 16,5 auf den Spinalganglien platziert. Während einer mehrtägigen Inkubation diffundiert der Farbstoff entlang der Axone der primären sensorischen Neurone von den Spinalganglien in das dorsale Horn. Die Gewebsschnitte des dorsalen Rückenmarks wurden anschließend anhand der DiI-Fluoreszenz ausgewertet. Wie in Abb. 3.13 A und B dargestellt, findet sich im dorsalen Horn der *Bcl11a*-mutanten Tiere eine Reduktion der ipsilateralen (Pfeil in A und B) und kommissuralen (Pfeilkopf in A und B) Projektionen der primären sensorischen Neurone. Gleichzeitig ist die Faserdichte der Axone dieser Neurone vor allem im oberflächlichen

dorsalen Horn reduziert. In diesem Bereich des dorsalen Horns terminieren überwiegend nocizeptive Fasern, die sich mit Antikörpern gegen TrkA und Aquaporin-1 darstellen lassen. TrkA, ein Neurotrophin-Rezeptor, und Aquaporin-1, ein membranständiger Wasserkanal, werden von kleinkalibrigen Neuronen, zu denen auch die nocizeptiven Neurone gehören, exprimiert (Oshio *et al.* 2004; Snider & McMahon 1998). Am Entwicklungstag 18,5 beobachtete ich im Vergleich zu den Kontrolltieren einen fast vollständigen Verlust der TrkA- und Aquaporin-1-positiven Fasern im dorsalen Horn der *Bcl11a*-Mutanten (Abb. 3.13 C-F). Demgegenüber konnte ich keine offensichtlichen Defizite im Projektionsverhalten der Parvalbumin-positiven, propriozeptiven Fasern detektieren (Abb. 3.13 G, H). Ich konnte darüber hinaus beobachten, dass in den *Bcl11a*-Mutanten die zentralen Axone aus den Spinalganglien auswachsen und auch an das dorsale Horn herantreten (Abb. 3.13 B, J, L). In diesen Analysen konnte ich keine Hinweise auf aberrante axonale Projektionen im *Bcl11a*-mutanten dorsalen Horn finden (Abb. 3.13 B, H).

Der Verlust eines Teils der nocizeptiven Fasern in den *Bcl11a*-mutanten Tieren könnte die Folge neuronaler Degeneration in den Spinalganglien sein. Es ist ebenfalls möglich, dass die nocizeptiven sensorischen Neurone in den *Bcl11a*-Mutanten eine andere neuronale Identität annehmen und zum Beispiel zu propriozeptiven Neuronen differenzieren. Daher wurde die Anzahl der TrkA- und Parvalbumin-positiven Neurone in den Spinalganglien von Kontrolltieren und *Bcl11a*-mutanten Tieren bestimmt. Ich konnte keine Unterschiede in der Anzahl dieser Neurone zwischen Kontrollen und *Bcl11a*-Mutanten feststellen (Abb. 3.13 I-N). Zusätzlich ergab eine TUNEL-Analyse in den Spinalganglien von Kontrolltieren und *Bcl11a*-mutanten Tieren keine signifikanten Unterschiede in der Zahl der apoptotischen Zellen (persönliche Mitteilung H. Brylka). Dies deutet darauf hin, dass die Projektionsdefizite der nocizeptiven Fasern in den *Bcl11a*-Mutanten ihre Ursache nicht in der neuronalen Degeneration oder in Änderungen der neuronalen Identität haben.

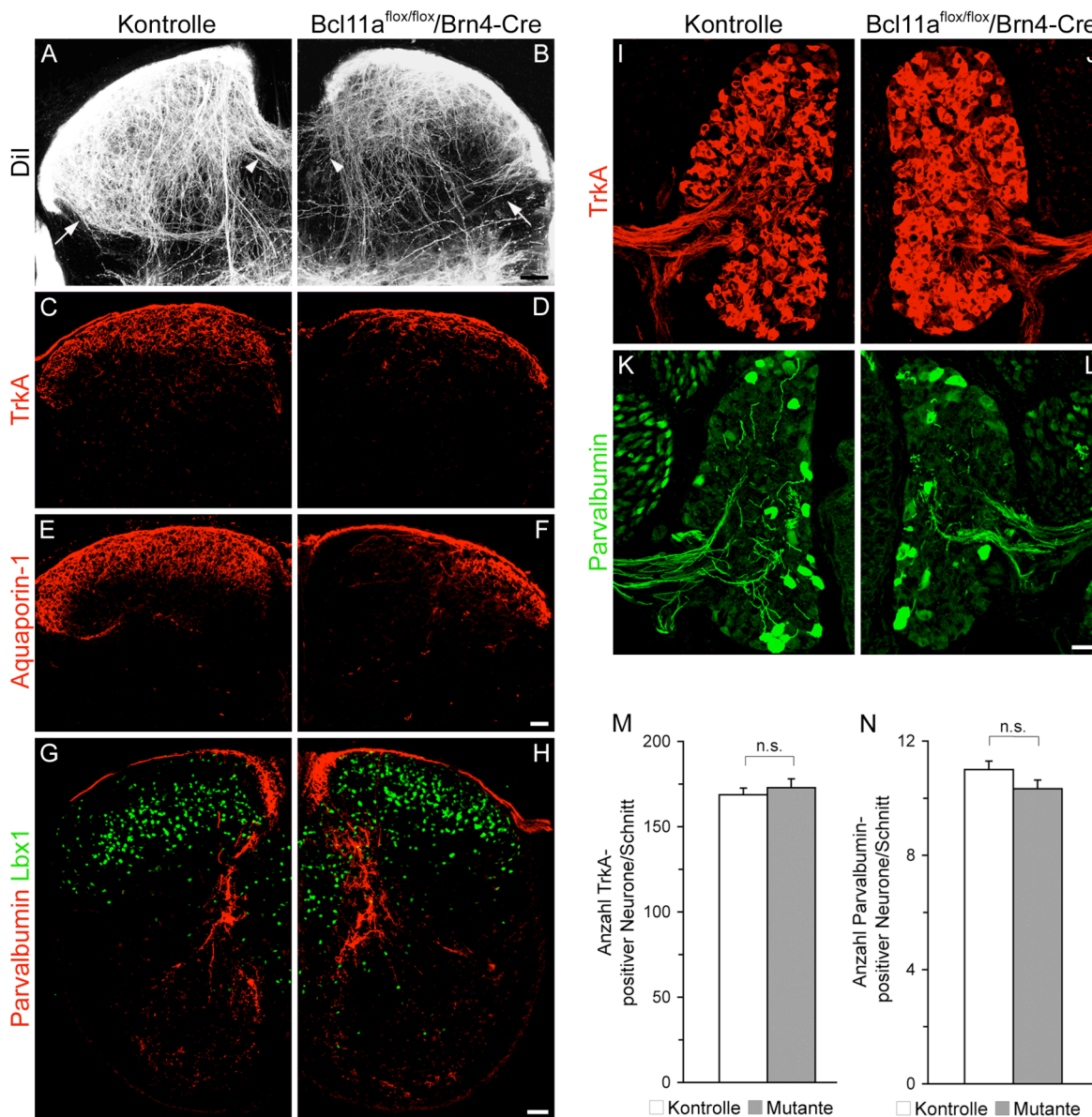


Abb. 3.13: Analyse der axonalen Projektionen primärer sensorischer Neurone in das dorsale Horn.

(A-B) Darstellung der Projektionen primärer sensorischer Neurone mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Dil E16,5. In den *Bcl11a*-Mutanten (B) zeigen die Axone im Vergleich zu den Kontrollen (A) Defizite in ihren ipsilateralen (Pfeil in A und B) und kommissuralen (Pfeilkopf in A und B) Projektionen. Die Faserdichte ist im oberflächlichen dorsalen Horn der *Bcl11a*-mutanten Tiere geringer. (B) Größenstandard: 50 μ m. (C-F) Untersuchung der Projektionen von Axonen nocizeptiver Neurone mit Hilfe von Antikörpern gegen die Markerproteine TrkA (rot in C, D) und Aquaporin-1 (rot in E, F) E18,5. Ich konnte in den *Bcl11a*-Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen eine Reduktion dieser Fasern detektieren. (F) Größenstandard: 40 μ m. (G-H) Die Projektionen von propriozeptiven Fasern, dargestellt mit einem Antikörper gegen Parvalbumin (rot), sind nicht offensichtlich beeinträchtigt in den *Bcl11a*-Mutanten. (H) Größenstandard: 50 μ m. (I-N) Analyse der Expression von TrkA und Parvalbumin in den Spinalganglien von Kontroll- (I, K) und *Bcl11a*-mutanten (J, L) Tieren mit quantitativer Bestimmung (M, N). Es konnten keine Unterschiede in der Zellzahl von TrkA- und Parvalbumin-positiven Neuronen festgestellt werden. n.s.: nicht signifikant. (L) Größenstandard: 40 μ m.

3.5.2 Axonale Projektionen und die neuronale Architektur in Ht-PA-Cre-rekombinierten Tieren

Zur Untersuchung der Projektionen primärer sensorischer Neurone in Ht-PA-Cre-rekombinierten Tieren detektierte ich die kleinkalibrigen, darunter nocizeptiven, Fasern wiederum mit einem Antikörper gegen Aquaporin-1 am Entwicklungstag 18,5. In der Literatur ist beschrieben, dass die Ht-PA-Cre-Rekombinase nur in den Spinalganglien aktiv ist und keine Aktivität im Neuralrohr zeigt (Pietri *et al.* 2003). Ich konnte in immunhistologischen Analysen der Ht-PA-Cre-rekombinierten *Bcl11a*-Mutanten die Expression von *Bcl11a* im dorsalen Horn, nicht aber in den Spinalganglien detektieren (siehe Abb. 3.2 D). Es lässt sich damit also überprüfen, ob die beobachteten Projektionsdefizite im dorsalen Horn der *Brn4*-Cre-rekombinierten *Bcl11a*-Mutanten unabhängig von der *Bcl11a*-Expression in den Spinalganglien sind. In den Ht-PA-Cre-rekombinierten *Bcl11a*-Mutanten konnte ich eine annähernd normale Expression von Aquaporin-1 im dorsalen Horn nachweisen (vgl. Abb. 3.14 B). Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass die Projektionsdefizite, die ich in den *Brn4*-Cre-rekombinierten *Bcl11a*-Mutanten beobachten konnte unabhängig von der *Bcl11a*-Expression in den Spinalganglien sind. Sie können damit auf die Deletion von *Bcl11a* im Rückenmark zurückgeführt werden. In den Ht-PA-Cre-rekombinierten *Bcl11a*-Mutanten lassen sich die Projektionen der Aquaporin-1-positiven Fasern im Vergleich zu den Kontrolltieren jedoch nicht vollständig wiederherstellen (vgl. Abb. 3.14 A und B). Eine Ursache hierfür könnte eine schwache Aktivität der Ht-PA-Cre-Rekombinase im Neuralrohr sein, die an der verminderten Expression von *Bcl11a* im dorsalen Horn zu erkennen ist und bisher nicht beschrieben wurde (vgl. Abb. 3.2 B, D; Pietri *et al.* 2003).

Die neuronale Architektur im dorsalen Horn der Ht-PA-Cre-rekombinierten Tiere analysierte ich anhand der Expression der Transkriptionsfaktoren *Lmx1b* und *Lbx1*. Ich konnte keine Unterschiede in der Verteilung der *Lmx1b*- und *Lbx1*-positiven Zellpopulationen zwischen *Bcl11a*^{fl^{ox}/+}/*Ht-PA-Cre*-Tieren (Kontrollen) und *Bcl11a*^{fl^{ox}/fl^{ox}}/*Ht-PA-Cre*-Tieren (Mutanten) feststellen (Abb. 3.14 C-H). Die neuronale Architektur ist in den *Bcl11a*^{fl^{ox}/fl^{ox}}/*Ht-PA-Cre*-Tieren also in Bezug auf die Expression von *Lbx1* und *Lmx1b* nicht verändert. Im dorsalen Horn der Ht-PA-Cre-rekombinierten *Bcl11a*-Mutanten exprimieren im Vergleich zu den Kontrolltieren weniger Neurone *Bcl11a* (Abb. 3.2 B, D). Dies deutet darauf hin, dass in den *Bcl11a*^{fl^{ox}/fl^{ox}}/*Ht-PA-Cre*-Tieren die Expression von *Bcl11a* durch einige dorsale Neurone bereits ausreichend ist, um die

neuronale Architektur wiederherzustellen. Daher könnte die Positionierung von Neuronen im dorsalen Horn auf einer nicht-zellautonomen Funktion von *Bcl11a* beruhen.

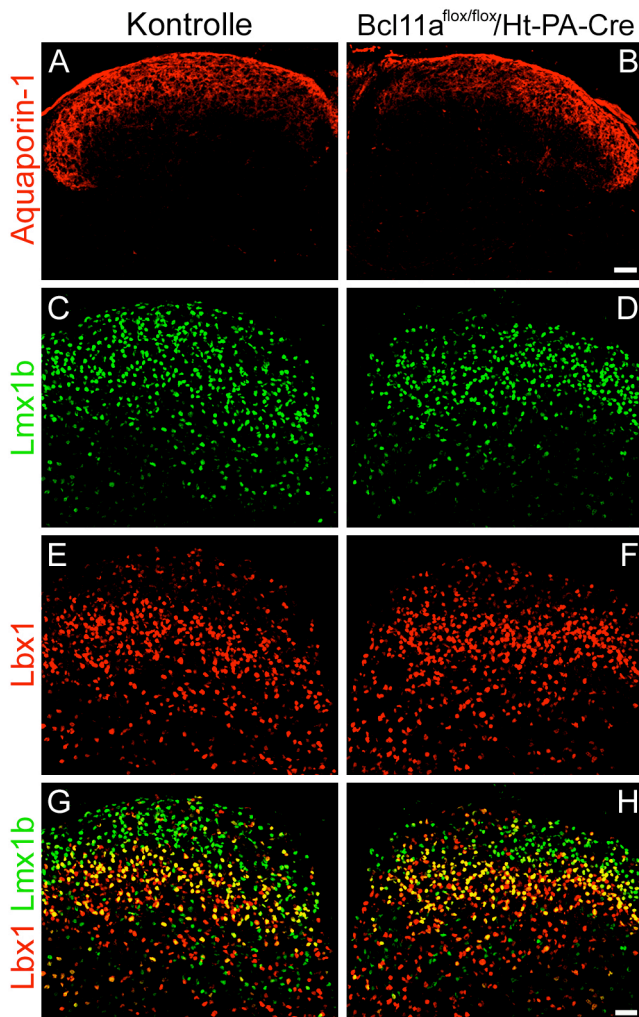


Abb. 3.14: Untersuchung der axonalen Projektionen von primären sensorischen Neuronen und der neuronalen Architektur in Ht-PA-Cre-rekombinierten *Bcl11a*-Mutanten.

(A-B) Immunhistologische Analyse der Projektionen kleinkalibriger Fasern mit einem Antikörper gegen Aquaporin-1 (rot). In den Ht-PA-Cre-rekombinierten *Bcl11a*-Mutanten konnte ich im Vergleich zu den Kontrollen eine annähernd normale Aquaporin-1-Proteinexpression im dorsalen Horn detektieren.

(C-H) Analyse der neuronalen Architektur mit Hilfe von Antikörpern gegen *Lmx1b* (grün) und *Lbx1* (rot). Ich konnte keine Unterschiede in der Verteilung der *Lmx1b*- und *Lbx1*-positiven Zellpopulationen zwischen Kontrolltieren und Ht-PA-Cre-rekombinierten *Bcl11a*-Mutanten nachweisen. (B, H) Größenstandard: 40 µm.

3.6 Identifizierung transkriptioneller Zielgene von *Bcl11a*

Ich versuchte, mögliche molekulare und zelluläre Mechanismen der Funktion von *Bcl11a* während der Entwicklung des Rückenmarks aufzuklären. Dabei verwendete ich für die Suche nach transkriptionellen Zielgenen von *Bcl11a* die Methode der genomweiten Genexpressionsanalyse mit Hilfe von Microarray-Hybridisierungen.

Für die Genexpressionsanalysen isolierte ich totale RNA aus dem dorsalen Rückenmark von Kontroll- und *Bcl11a*^{flox/flox}/*Brn4-Cre*-Tieren am Entwicklungstag 16,5. Aus der RNA synthetisierte ich Biotin-markierte cRNA, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Hübner (Experimentelle Genetik von Herz-Kreislaufkrankungen, MDC, Berlin-Buch) auf Affymetrix MOE430 2.0 Microarrays hybridisiert wurde.

Der Vergleich der Expressionsintensitäten von Kontroll- und *Bcl11a*-mutanten Tieren ergab drei funktionelle Gruppen von differentiell exprimierten Genen, die in Tab. 3-1 zusammengefasst sind. Das Transkriptionsniveau dieser Gene war im dorsalen Rückenmark der *Bcl11a*-mutanten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren hoch signifikant reduziert ($p \leq 0,0001$). Als interne Kontrolle verwendete ich das Transkript von *Bcl11a*. Es zeigt in den mutanten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren ein 13,5-fach reduziertes Expressionsniveau.

Tab. 3-1: Differentiell exprimierte Gene im dorsalen Rückenmark von *Bcl11a*^{flox/flox}/*Brn4-Cre*-Tieren am Entwicklungstag 16,5. Abkürzungen: FC: *fold change*, Änderung des Transkriptionsniveaus der Genexpression, *p*: *p*-Wert, Signifikanz des FC-Wertes. *** $p \leq 0,0001$

Gen	Name des Transkripts	E16,5	
		FC	<i>p</i>
<i>Bcl11a</i>	B-cell CLL/Lymphoma 11A (Zinkfingerprotein)	-13,5	***
Neurotransmission			
<i>Gal</i>	Galanin	-1,9	***
<i>GRPR</i>	Gastrin releasing peptide receptor	-6,2	***
<i>Gria2</i>	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA2 (alpha 2)	-1,9	***
Axonale Wegfindung			
<i>Sema5A</i>	Semaphorin 5A	-1,9	***
<i>Frzb</i> (SFRP3)	Secreted Frizzled-related protein 3	-2,2	***
Zytoskeletale Dynamik			
<i>Mid1</i>	Midline 1	-2,2	***
<i>CamKII</i> (delta)	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	-1,7	***
3830431G21	similar to D-CLIP-190	-2,0	***
<i>RasGRF1</i>	RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	-1,7	***

Die Gene der ersten funktionellen Gruppe stellen Neurotransmitter und ihre Rezeptoren dar. Es gehören dazu der Neurotransmitter Galanin und die Neurotransmitter-Rezeptoren *GRPR* und *GluR2* (kodiert durch das Gen *Gria2*). Das Neuropeptid Galanin reguliert eine Vielzahl von physiologischen Prozessen im Nervensystem wie z.B. die Nocizeption oder die Energie-Homöostase (Crawley 1999; Liu & Hokfelt 2002). *GRPR*, *GluR2* und Galanin wurden auch in den Kapiteln 1.2.1 und 3.3 vorgestellt. Die reduzierte Expression der Gene konnte in *in situ*-Hybridisierungen bestätigt werden.

Die zweite Gruppe von Genen kodiert für Proteine, welche die axonale Wegfindung von Neuronen steuern können (vgl. Kapitel 1.3). Semaphorin 5A, ein integrales Membranprotein, ist ein bifunktionelles Protein, welches die Wegfindung von Axonen inhibieren oder auch fördern kann (Artigiani *et al.* 2004; Kantor *et al.* 2004). Das Signalmolekül *Frzb* gehört zur Familie der sezernierten Frizzled-verwandten Proteine (SFRP) und kann als Wnt-Antagonist wirken (Hoang *et al.* 1996; Jones & Jomary 2002; Wang *et al.* 1997). Für das nah verwandte Protein SFRP1 konnte gezeigt werden, dass es das Wachstum und die Ausrichtung von Axonen retinaler Ganglienzellen kontrollieren kann. Diese Aktivität ist unabhängig von Wnt-Proteinen (Rodriguez *et al.* 2005).

Zur dritten Gruppe gehören Gene, die an der Steuerung der zytoskeletalen Dynamik einer Zelle beteiligt sind. Midline 1 ist eine Ubiquitin-Ligase, welche die Degradation der Phosphatase PP2Ac kontrolliert. Dadurch wird die Anzahl der Phosphorylierungen und in Folge davon die Aktivität der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs) festgelegt (Schweiger & Schneider 2003). MAPs können Mikrotubuli, die zentrale Bestandteile des Zytoskeletts darstellen, stabilisieren (Arimura & Kaibuchi 2007). CamKII katalysiert in Primärzellkulturen des Cerebellums der Ratte die Phosphorylierung von NeuroD und stimuliert damit die Dendritenmorphogenese (Gaudilliere *et al.* 2004; vgl. Kapitel 1.2.2). Mit dem unbekanntem Transkript *3830431G21* führte ich Datenbankanalysen zur Identifikation von ähnlichen Proteinen mit bekannten Funktionen in der Maus und in anderen Organismen durch. Die BLASTp-Analyse ergab Ähnlichkeiten zum Protein CLIP-190 aus *Drosophila* (Altschul *et al.* 1997). CLIP-190 ist ein Adapterprotein, das an intrazellulären mikrotubulären Transporten beteiligt und damit wichtig für die Morphogenese von Zellen ist (Lantz & Miller 1998; Papoulas *et al.* 2005; vgl. Kapitel 4.2). RasGRF1 aktiviert die Rho-GTPasen Ras und Rac und ist dadurch an der Regulation des Wachstums von Neuronen auf zytoskeletaler Ebene beteiligt (Boguski & McCormick 1993; Bradke & Dotti 1999; Innocenti *et al.* 1999; Jones & Jackson 1998).

Auch in der zweiten und dritten funktionellen Gruppe konnte ich für einige Gene das reduzierte Expressionsniveau aus den Microarray-Hybridisierungen in *in situ*-Hybridisierungen am Entwicklungstag 16,5 auf dorsalem Rückenmarksgewebe verifizieren (Abb. 3.15). Aus der zweiten Gruppe ist die Expression von *Frzb* und *Sema5A* und aus der dritten Gruppe die Expression des Transkripts *3830431G21* in den *Bcl11a*-Mutanten im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich reduziert. Die *in situ*-Hybridisierungen wurden bei Verwendung der *Frzb*- und *3830431G21*-RNA-Sonden am Entwicklungstag 14,5

durchgeführt, da die Expression der Transkripte zu diesem Zeitpunkt höher war als am Entwicklungstag 16,5. E16,5 konnte ich für beide Transkripte ebenfalls eine Reduktion der Expression in den *Bcl11a*-Mutanten detektieren.

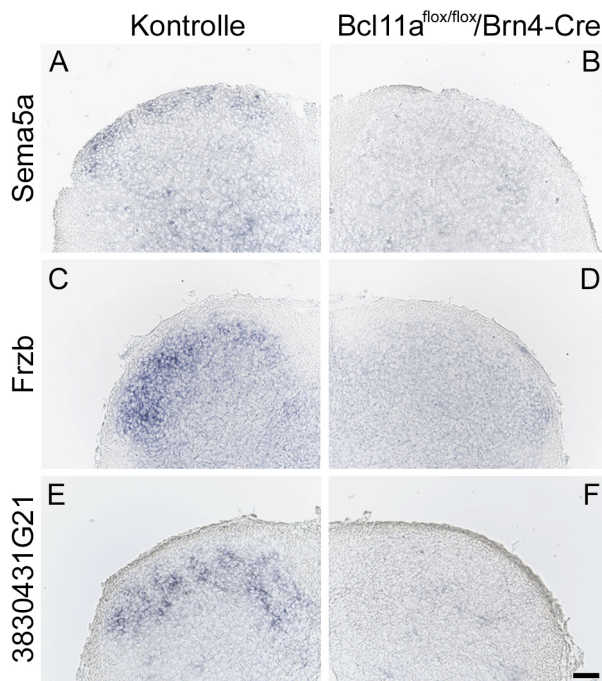


Abb. 3.15: Die Expression von *Sema5A*, *Frzb* und dem Transkript *3830431G21* ist in *Bcl11a*-Mutanten deutlich reduziert.

(A-B) *In situ*-Hybridisierungen E16,5 mit einer *Sema5A*-RNA-Sonde sowie (C-F) *in situ*-Hybridisierungen E14,5 mit RNA-Sonden zur Identifizierung der *Frzb*- und *3830431G21*-Transkripte in dorsalem Rückenmarksgewebe von Kontroll- (A, C, E) und *Bcl11a*-mutanten (B, D, F) Tieren. Bei allen drei RNA-Sonden ist die Expression der Transkripte in den *Bcl11a*-Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen deutlich vermindert. (F) Größenstandard: 100 μ m.

4 Diskussion

Eine Voraussetzung für Informationsübertragungen im Rückenmark ist die korrekte Differenzierung der präsynaptischen sensorischen Neurone in den Spinalganglien und der postsynaptischen Neurone im dorsalen Horn. Während ihrer Differenzierung können die dorsalen Neurone einen spezifischen Neurotransmitter-Phänotyp und eine charakteristische Morphologie ausbilden und werden unter anderem in die Lage versetzt, extrazelluläre Signalmoleküle zu exprimieren. Diese Signalmoleküle können als axonale Wegfindungsproteine das Einwachsen der zentralen Axone primärer sensorischer Neurone in das dorsale Horn hinein steuern. Diese Differenzierungsprozesse führen zu funktionellen Verschaltungen zwischen den spinalen Neuronen und den sensorischen Neuronen.

Diese Arbeit zeigt, dass der Transkriptionsfaktor *Bcl11a* essentiell für die späte Differenzierung der Neurone des dorsalen Horns ist. In den *Bcl11a*-Mutanten sind die Expression der Neurotransmitter-Rezeptoren GRPR und GluR2 im dorsalen Horn sowie die Morphologie der dorsalen Neurone gestört. *In vitro*-Analysen zeigen nicht nur, dass *Bcl11a* für die neuronale Morphogenese benötigt wird, sondern auch, dass *Bcl11a* das Wachstum von Neuriten induzieren kann. Die Projektionen der zentralen Axone primärer sensorischer Neurone in das dorsale Horn hinein sind in den *Bcl11a*-Mutanten beeinträchtigt. Eine genomweite Analyse zur Identifikation transkriptioneller Zielgene von *Bcl11a* ergab drei funktionelle Gruppen von Genen. Zu diesen Gruppen gehören Gene, die für axonale Wegfindungsproteine sowie für Neurotransmitter und deren Rezeptoren kodieren und die an der Steuerung der zytoskeletalen Dynamik einer Zelle beteiligt sind. *Bcl11a* kann somit durch die Regulation verschiedener Prozesse der späten Differenzierung an der Etablierung von neuronalen Schaltkreisen im Rückenmark beteiligt sein und erfüllt damit wesentliche Funktionen während der Entwicklung des Nervensystems.

Im Folgenden werde ich diese verschiedenen Funktionen von *Bcl11a* näher diskutieren.

4.1 Neuronale Differenzierung im dorsalen Horn

Die frühe neuronale Differenzierung der *Bcl11a*-mutanten dorsalen Neurone, analysiert mit Hilfe der Expression der Transkriptionsfaktoren *Lbx1*, *Lmx1b*, *Tlx3*, *Pax2*, *Drg11* und

Ebf1, zeigt keine offenkundigen Defizite. Ebenso ist die Festlegung des glutamatergen und GABAergen Zellschicksals der *Bcl11a*-mutanten Neurone während der späteren Differenzierung nicht offensichtlich beeinträchtigt. *Bcl11a* ist jedoch für die Expression von *GRPR*, *Gria2* (kodiert für GluR2) und *Gal* (kodiert für das Neuropeptid Galanin), die ich als zusätzliche Markergene für die spätere neuronale Differenzierung im dorsalen Horn verwendete, essentiell. Diese Daten weisen darauf hin, dass *Bcl11a* während der späten neuronalen Differenzierung an der Ausbildung eines charakteristischen Neurotransmitter-Phänotyps in den dorsalen Neuronen beteiligt ist.

Es wäre interessant die funktionelle Bedeutung dieser Ergebnisse zu analysieren, da bereits einige Funktionen von GRPR, GluR2 und Galanin im Nervensystem bekannt sind (vgl. Kapitel 1.2.1). So vermittelt der G-Protein-gekoppelte Rezeptor GRPR zum Beispiel die Empfindung des Juckreizes im Rückenmark (Sun & Chen 2007). GluR2 ist eine Untereinheit des ionotropen AMPA-Rezeptors, welcher durch Glutamat aktiviert wird (Hollmann *et al.* 1991). AMPA-Rezeptoren vermitteln die schnelle exzitatorische Signalübertragung zwischen den Afferenzen primärer sensorischer Neurone und den Neuronen des dorsalen Horns (Yoshimura & Jessell 1990). Das Neuropeptid Galanin ist im Rückenmark exprimiert (Zhang *et al.* 1995). Adulte Mäuse mit einer Deletion von Galanin zeigen eine höhere Sensitivität gegenüber akutem mechanischem und thermischem Schmerz. Mäuse, die Galanin überexprimieren, sind dagegen weniger empfindlich gegenüber nocizeptiven Hitzereizen (Blakeman *et al.* 2001; Holmes *et al.* 2003).

4.2 *Bcl11a* ist essentiell für die neuronale Morphogenese

Zahlreiche Aspekte der Steuerung der neuronalen Morphogenese auf Proteinebene zum Beispiel durch intrazelluläre Signalkaskaden oder extrazelluläre Signalmoleküle konnten bereits aufgeklärt werden. Die transkriptionelle Kontrolle dieser Vorgänge ist bisher jedoch noch nicht vollständig verstanden, obwohl auch in der Maus bereits einige Transkriptionsfaktoren mit Funktionen während der Morphogenese identifiziert werden konnten (vgl. Kapitel 1.2.2). So fördert der Transkriptionsfaktor NeuroD in den Körnerzellen des Kleinhirns das Dendritenwachstum. Die Aktivität von NeuroD wird dabei über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors durch die Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CamKII) kontrolliert (Gaudilliere *et al.* 2004). Im ventralen Rückenmark der Maus führt die Deletion des Transkriptionsfaktors *Pea3*, der zur ETS-

Klasse gehört, zu einer veränderten Morphologie der Dendritenbäume von CM (cutaneous maximus)- und LM (latissimus dorsi)-Motoneuronen (Livet *et al.* 2002; Vrieseling & Arber 2006). Die Dendriten dieser Motoneuron-Populationen erstrecken sich im ventralen Rückenmark der Kontrolltiere lateral an der grauen Substanz entlang und wachsen normalerweise nicht in die zentrale graue Substanz ein. In den *Pea3*-Mutanten zeigen die CM- und LM-Motoneurone dagegen eine radiäre Ausrichtung ihrer Dendriten, sie wachsen hier auch in die zentrale graue Substanz des Rückenmarks ein (Vrieseling & Arber 2006).

Im dorsalen Horn *Bcl11a*-mutanter Tiere ist die Morphologie der Neurone *in vivo* und *in vitro* gestört. Die Primärzellkulturen dorsaler Neurone zeigen, dass *Bcl11a* für die korrekte Ausbildung der Gestalt dieser Neurone benötigt wird. Die Darstellung der Dendritenmorphologie der Pyramidenzellen des Hippocampus mit Hilfe eines *thy1-YFP*-Reporterproteins *in vivo* sowie die detaillierte Analyse der Entwicklung von Dendriten und Axonen in hippocampalen Primärzellkulturen *in vitro* weisen auf eine wichtige Funktion von *Bcl11a* während der Morphogenese dieser Neurone hin. Die Transfektion von *Bcl11a* zum einen in *Bcl11a*-mutante hippocampale Neurone und zum anderen in Primärzellkulturen des Wildtyps zeigen, dass *Bcl11a* für die neuronale Morphogenese benötigt wird und in Wildtypneuronen ausreichend ist für die Ausbildung komplexer Neuriten. Der erhöhte Verzweigungsgrad der Neuriten in den Überexpressionsexperimenten ist jedoch nicht für jeden Messpunkt der Sholl-Analyse signifikant. Eine Ursache dafür könnte in der Verwendung der Isoform *Evi9b* von *Bcl11a* liegen. Ich verwendete diese Isoform, weil sie NIH 3T3-Zellen nicht transformieren kann. Die Isoformen *Evi9a* und *Evi9c* dagegen können diese Zellen transformieren, das heißt NIH 3T3-Zellen gewinnen Eigenschaften von Tumorzellen und zeigen zum Beispiel ein erhöhtes Zellwachstum, wenn sie mit *Evi9a* oder *Evi9c* transfiziert werden (Nakamura *et al.* 2000). Durch Verwendung von *Evi9b* können daher unerwünschte Effekte während der Transfektion, die auf der proto-onkogenen Funktion von *Bcl11a* beruhen, weitgehend ausgeschlossen werden. *Evi9b* fehlen jedoch im Vergleich zur längsten bisher bekannten Isoform *Evi9a* 286 Aminosäuren am N-Terminus, die eine weitere Zinkfingerdomäne sowie einen Teil der Prolin-reichen Region repräsentieren (Nakamura *et al.* 2000; siehe Abb. 1.2). Es ist daher möglich, dass die Isoform *Evi9a* die Bildung von Neuriten in höherem Maße induzieren könnte als die Isoform *Evi9b*.

Die Microarray-Analyse zur Identifikation von Genen, deren Expression im dorsalen Horn der *Bcl11a*-mutanten Tieren reduziert ist, ergab neben anderen Transkripten die Gene

Mid1, *CamKII δ* , *RasGRF1* und das bisher nicht charakterisierte Transkript *3830431G21*. Diese Gene sind unter anderem an zytoskeletalen Prozessen beteiligt, die für die neuronale Morphogenese von entscheidender Bedeutung sind. Die Ubiquitin-Ligase Midline 1 bindet an Mikrotubuli und interagiert mit der Phosphatase PP2A, die Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) dephosphorylieren kann (Schweiger & Schneider 2003). Der Phosphorylierungsstatus der MAPs, die Mikrotubuli stabilisieren, hat Einfluss auf deren Aktivität und damit auf die Dynamik von Mikrotubuli (Arimura & Kaibuchi 2007; Dent & Gertler 2003; Mandelkow *et al.* 1995). Ca²⁺-/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen (CamKs) werden in Neuronen durch den Einstrom von Kalzium, zum Beispiel nach der Ankunft eines Aktionspotentials in der Zelle, aktiviert (Burgoyne 2007). Für CamKII konnte bereits eine Funktion während der Dendritogenese nachgewiesen werden (Gaudilliere *et al.* 2004). Die Isoform CamKII β beeinflusst die Dynamik des Zytoskeletts in den Filopodien von Wachstumskegeln hippocampaler Neurone durch Bindung an polymerisiertes Aktin und fördert dadurch die Dendritenmorphogenese (Fink *et al.* 2003; Shen *et al.* 1998).

RasGRF1 gehört zur Klasse der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren und aktiviert die Rho-GTPasen Ras und Rac, die das Wachstum von Neuronen auf zytoskeletaler Ebene steuern (Bradke & Dotti 1999; Innocenti *et al.* 1999; Jones & Jackson 1998; Boguski & McCormick 1993; vgl. Kapitel 1.2.2). RasGRF1 kann auch *in vitro* direkt mit Mikrotubuli interagieren. Die Transfektion von RasGRF1 in Zellen der neuronalen Linie PC12 fördert das Neuritenwachstum (Baldassa *et al.* 2007; Forlani *et al.* 2006).

Die SMART-Analyse zur Identifikation von Proteindomänen in dem durch das Transkript *3830431G21* kodierten unbekanntem Protein ergab unter anderem eine coiled-coil-Region (Letunic *et al.* 2006; Schultz *et al.* 1998). Diese Regionen ermöglichen die Interaktion von Proteinen untereinander (Burkhard *et al.* 2001). Die BLASTp-Analyse des unbekanntem Proteins in der Maus zeigte innerhalb der coiled-coil-Region eine Ähnlichkeit von 24 % zu Myosin. In der BLASTp-Analyse in *Drosophila* identifizierte ich innerhalb der coiled-coil-Region eine 25 %-ige Ähnlichkeit zur Isoform D des Proteins CLIP-190 (Altschul *et al.* 1997). CLIP-190 bildet einen Komplex mit den Proteinen Dynactin, Dynein und Lava lamp. Der Proteinkomplex ist in *Drosophila* essentiell für den Transport von Golgi-Apparaten entlang der Mikrotubuli (Papoulas *et al.* 2005). Während des Wachstums des Embryos dient dieser Prozess der Synthese von neuer Zellmembran an Golgi-Apparaten und dem Transport dieser Zellmembranen zu ihrem Bestimmungsort (Sisson *et al.* 2000).

Zusätzlich interagiert CLIP-190 *in vitro* mit Myosin der Klasse IV und beide Proteine sind in Axonen koexprimiert. Dies deutet darauf hin, dass CLIP-190 eine Rolle im Zusammenspiel von Mikrotubuli und zytoskeletalen Aktin-Filamenten innehat (Lantz & Miller 1998). Auch für die Ausbildung der Axone und Dendriten von Neuronen sind zytoskeletale Reorganisationen und der Transport von Zellmembranen erforderlich (Bradke & Dotti 2000). In *Drosophila* führen Mutationen in den *dar2*-, *dar3*- und *dar6*-Genen zu einer verminderten Versorgung der Dendriten eines Neurons mit neuer Zellmembran aus dem Soma, woraus ein reduziertes Dendritenwachstum resultiert. Die *dar*-Gene kodieren für Regulatorproteine, welche die Produktion und Sezernierung von Zellmembran durch das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat steuern (Ye *et al.* 2007; Ye *et al.* 2006). Das Transkript *3830431G21* könnte daher, zum Beispiel vermittelt über Proteine der Myosin-Familie, ähnliche Funktionen wie CLIP-190 während der Morphogenese von Neuronen in der Maus erfüllen.

Microarray-Analysen durchgeführt von H. Brylka und S. Britsch (Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie, Universität Ulm) am Entwicklungstag 14,5 bestätigten für *Mid1*, *Camk2δ*, *RasGRF1* und das Transkript *3830431G21* das hoch signifikant reduzierte Expressionsniveau im dorsalen Horn von *Bcl11a*-Mutanten. Zusätzlich konnte hier *Pafah1b1* (Lis1) als Gen identifiziert werden, das im *Bcl11a*-mutanten dorsalen Horn reduziert exprimiert ist. Lis1 ist ein Mikrotubuli-bindendes Protein, das die Dynamik der Mikrotubuli beeinflussen kann und als Bestandteil des Dynein/Dynactin-Weges an mikrotubulären Transporten beteiligt ist (Coquelle *et al.* 2002; Sapir *et al.* 1999).

Das reduzierte Expressionsniveau verschiedener zytoskeletaler Gene in den *Bcl11a*-Mutanten deutet darauf hin, dass *Bcl11a* seine Funktionen während der neuronalen Morphogenese durch die Regulation von Genen ausüben könnte, welche die Dynamik des Zytoskeletts von Zellen beeinflussen.

4.3 Bcl11a ist wichtig für die Etablierung von neuronalen Schaltkreisen

Bcl11a spielt eine essentielle Rolle während der späteren Differenzierung der Neurone des dorsalen Horns, einerseits durch Kontrolle der korrekten Expression der Rezeptoren GRPR und GluR2 sowie des Neuropeptids Galanin und andererseits durch die Regulation der Morphogenese der dorsalen Neurone.

In den *Bcl11a*-Mutanten konnte ich zusätzlich Defizite in den Projektionen kleinkalibriger primärer sensorischer Neurone detektieren, zu denen auch die nocizeptiven Neurone gehören. Ähnliche Defizite in den Projektionen nocizeptiver Fasern im Rückenmark zeigen sich in Mausmutanten der Transkriptionsfaktoren *Drg11*, *Lmx1b*, *Rnx/Tlx1* und *Lbx1*, die für die neuronale Differenzierung im dorsalen Horn verantwortlich sind (vgl. Kapitel 1.2.1; Chen *et al.* 2001; Ding *et al.* 2004; Muller *et al.* 2002; Qian *et al.* 2002). Qian und Kollegen diskutieren, dass die Transkriptionsfaktoren *Rnx* und *Tlx1* die Expression des Signalmoleküls *Sema3A* oder die Expression von Proteinen der Slit-Familie steuern, die das Einwachsen nocizeptiver Fasern in das dorsale Horn kontrollieren. Im dorsalen Rückenmark der *Lmx1b*-Mutanten ist die Expression der axonalen Wegfindungsmoleküle *Sema3C*, *Slit1* und *Netrin-1* reduziert. Die Autoren schließen hier auf ein synergistisches Wirken dieser Moleküle auf das Einwachsen von Axonen in das Rückenmark (Ding *et al.* 2004). Die Produktion und Sezernierung von extrazellulären Signalmolekülen durch die Neurone des Rückenmarks kann daher die Projektionen von primären sensorischen Neuronen beeinflussen (Messersmith *et al.* 1995; Yoshida *et al.* 2006).

Ist also, wie in den *Bcl11a*-mutanten Tieren, die Differenzierung der Neurone des dorsalen Horns gestört, so könnte dies zu einer verminderten Sezernierung axonaler Wegfindungsproteine durch die dorsalen Neurone führen. Eine Folge davon wären dann Projektionsdefizite von primären sensorischen Neuronen. Die Projektionsdefizite in den *Bcl11a*-Mutanten könnten daher ihre Ursache in der gestörten späten Differenzierung der dorsalen Neurone haben. Microarray-Analysen und *in situ*-Hybridisierungen zeigten, dass die Expression von *Sema5A* und *Frzb*, zwei extrazellulären Signalmolekülen, im dorsalen Horn der *Bcl11a*-Mutanten reduziert ist. *Sema5A* gehört zur Familie der Semaphorine, die als klassische axonale Wegfindungsproteine wirken (Pasterkamp & Kolodkin 2003). Es kann durch Interaktion mit Heparansulfat-Proteoglykanen, die von den Axonen des Fasciculus retroflexus im Zwischenhirn exprimiert werden, und Bestandteilen der Extrazellulärmatrix instruierend auf die Wegfindung dieser Axone einwirken (Kantor *et al.* 2004). *Frzb* ist ein Mitglied der Familie der sezernierten Frizzled-verwandten Proteine und kann als Wnt-Antagonist wirken (Kawano & Kypta 2003; Wang *et al.* 1997). Wnt-Proteine (Wnts) sind unter anderem Morphogene, die an der Etablierung neuronaler Schaltkreise durch die Regulation verschiedener zellulärer Funktionen, wie zum Beispiel der axonalen Wegfindung, der Dendritogenese und der Dynamik von Mikrotubuli, beteiligt sind (Ciani & Salinas 2005; Salinas 2007; Salinas & Zou 2008). Sie könnten damit als mögliche

Mediatoren der Bcl11a-Funktion während der Ausbildung neuronaler Verschaltungen im Rückenmark wirken. In den Microarray-Analysen konnte ich keine Veränderungen des Expressionsniveaus von Genen der *Wnt*-Familie beobachten. Ein Einfluss von Wnt-Proteinen in diesen Zusammenhängen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da Frzb in seiner Funktion als Wnt-Antagonist Wnt-Signale auf Proteinebene moduliert und Wnts zahlreiche Funktionen während der Etablierung neuronaler Schaltkreise ausüben (Fradkin *et al.* 2005; Kawano & Kypta 2003). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Frzb auch über Wnt-unabhängige Mechanismen wirken kann, zum Beispiel während der Differenzierung von Zellen der Retina und von Osteoblasten (Chung *et al.* 2004; Esteve *et al.* 2003). Funktionen von Frzb in der axonalen Wegfindung sind bisher nicht bekannt. Für das zu Frzb nah verwandte Protein SFRP1 konnte aber bereits gezeigt werden, dass es durch einen Wnt-unabhängigen Mechanismus das Wachstum und die Ausrichtung von Axonen kontrolliert (vgl. Kapitel 1.3; Rodriguez *et al.* 2005). Frzb ist daher ein interessanter Kandidat für ein axonales Wegfindungsprotein, das über Wnt-unabhängige oder Wnt-abhängige Mechanismen im dorsalen Horn des Rückenmarks wirken könnte. Für eine detaillierte Analyse dieser Mechanismen sind hier jedoch weitere funktionelle Untersuchungen nötig.

Die korrekten Projektionen primärer sensorischer Neurone zu ihren Zielneuronen im dorsalen Horn sowie deren Verschaltung miteinander ist Voraussetzung für die Etablierung funktioneller neuronaler Schaltkreise im Rückenmark (Huber *et al.* 2005; Pasterkamp & Kolodkin 2003). Dafür ist nicht nur die Sezernierung von axonalen Wegfindungsproteinen durch die dorsalen Neurone, sondern auch deren korrekte Morphogenese essentiell. Die Art und Weise wie Dendriten verzweigen ist entscheidend dafür, wie der synaptische Input eines Neurons verarbeitet wird (Hausser *et al.* 2000). Ebenso legt auch die Größe und Orientierung von Dendritenbäumen die Anzahl und die Art der präsynaptischen Partner fest, die ein Neuron kontaktieren kann (Vrieseling & Arber 2006; Wong & Ghosh 2002). Für das zu Sema5A verwandte Signalmolekül Sema3A konnte gezeigt werden, dass es in kortikalen Neuronen wichtig für die Reifung der dendritischen Dornen ist (Morita *et al.* 2006). Dies deutet darauf hin, dass auch extrazelluläre Signalmoleküle neben ihrer Funktion als Wegfindungsproteine die Morphologie von Neuronen beeinflussen können.

In einer Kollaboration mit René Jüttner (Arbeitsgruppe Prof. Rathjen, MDC Berlin-Buch) wurden mittels der Patch-Clamp-Methode die synaptischen Verbindungen zwischen den zentralen Axonen der primären sensorischen Neurone und den Neuronen im dorsalen Horn

analysiert. Hierfür präparierte ich zervikales Rückenmarksgewebe von *Bcl11a^{flox/flox}/Brn4-Cre*- und *Bcl11a^{flox/+}/Brn4-Cre*-Tieren am Entwicklungstag 18,5. René Jüttner führte an den Gewebsschnitten elektrophysiologische Untersuchungen durch, indem er an der *dorsal root entry zone* (DREZ), dort wo die zentralen Axone primärer sensorischer Neurone in das dorsale Horn eintreten, eine extrazelluläre elektrische Stimulation durchführte. Die dadurch induzierte postsynaptische Antwort in den dorsalen Neuronen wurde in Form von evozierten exzitatorischen postsynaptischen Strömen (eEPSCs) gemessen. Grundlegende synaptische Eigenschaften, repräsentiert durch die Amplitude, die Abklingzeit und die Anstiegszeit der postsynaptischen Antwort sind unverändert in den *Bcl11a*-mutanten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Ebenso zeigen sich in den durchgeführten Paired-pulse-Experimenten keine Unterschiede bei Kontroll- und *Bcl11a*-mutanten Tieren, was auf unveränderte präsynaptische Eigenschaften hindeutet. In den *Bcl11a*-Mutanten reagierte jedoch im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikant verminderte Anzahl dorsaler Neurone auf die Stimulation der DREZ. Die Erfolgsrate dieser eEPSCs liegt für die *Bcl11a*-Mutanten bei 52,4 % während die Kontrollen eine Erfolgsrate von 76,0 % zeigen. Ähnliche elektrophysiologische Untersuchungen wurden im dorsalen Horn von Mäusen durchgeführt, die eine inaktive Form der Rezeptor-Guanylylcyclase *Nrp2* exprimieren. Diese Tiere zeigen Defizite in den Verzweigungen primärer sensorischer Neurone an der DREZ. In den *Nrp2*-mutanten Tieren antwortete ebenfalls eine signifikant geringere Anzahl dorsaler spinaler Neurone auf eine durch Capsaicin hervorgerufene nocizeptive Stimulation. Die Autoren schließen daraus, dass die Defizite in den axonalen Verzweigungen *Nrp2*-mutanter sensorischer Neurone an der DREZ zu einer verminderten funktionellen Konnektivität im dorsalen Horn führen (Schmidt *et al.* 2007). Die reduzierte eEPSC-Erfolgsrate der mutanten dorsalen Neurone weist ebenfalls auf eine reduzierte neuronale Konnektivität in den *Bcl11a*-Mutanten hin. Im *Bcl11a*-mutanten dorsalen Horn werden also weniger korrekte Verschaltungen zwischen den dorsalen Neuronen und den primären sensorischen Neuronen aus den Spinalganglien gebildet.

Die in den Microarray-Analysen identifizierten Gene lassen sich drei funktionellen Gruppen zuordnen und unterstützen die These, dass *Bcl11a* verschiedene entwicklungsbiologische Prozesse koordinieren könnte. Die erste Gruppe sind *Galanin*, *Gria2* und *GRPR* (siehe Kapitel 4.1). Die zweite Gruppe bilden die Gene *Mid1*, *CamKII δ* , *RasGRF1* und das Transkript *3830431G21* (siehe Kapitel 4.2). Zur dritten Gruppe gehören die extrazellulären Proteine *Sema5A* und *Frzb* (siehe dieses Kapitel).

Bcl11a steuert also direkt oder indirekt einerseits Gene für die Ausbildung eines bestimmten Neurotransmitter-Phänotyps und andererseits Gene für die Regulation der Dynamik des Zytoskeletts eines Neurons während seiner Morphogenese. Zusätzlich kann Bcl11a über bisher unbekannte Mechanismen die Expression von Signalmolekülen, welche für die axonale Wegfindung verantwortlich sind, regulieren. Eine Folge der Deletion von Bcl11a und der damit verbundenen Störungen während der Differenzierung der dorsalen Neurone ist die reduzierte neuronale Konnektivität im Rückenmark. Der Transkriptionsfaktor Bcl11a kann damit während der späten Differenzierung der Neurone des dorsalen Horns die neuronale Morphogenese, die Produktion axonaler Wegfindungsproteine und die Expression bestimmter Neurotransmitter und deren Rezeptoren regulieren. Alle diese entwicklungsbiologischen Schritte sind mit an der Etablierung funktioneller neuronaler Schaltkreise im Rückenmark beteiligt. Im folgenden Kapitel werde ich mögliche molekulare Mechanismen dieser neuen Funktionen von Bcl11a im Nervensystem diskutieren.

4.4 Molekulare Mechanismen der Bcl11a-Funktion

Die Transkription von Genen wird häufig durch Modifikationen und Remodulationen des Chromatins kontrolliert. Grundbestandteile des Chromatins sind DNA und Histon-Proteine, auf welche die DNA aufgewickelt ist. Dies führt zu einer dichten Packung der DNA und ermöglicht die Bildung von Chromatinfasern (Kornberg & Lorch 1999; Luger & Richmond 1998). Chromatinmodifikationen und die Remodulation von Chromatin beinhalten Prozesse der DNA-Methylierung und der Modifikation von Histonen, die den Zugang zu den Promotorregionen von Genen kontrollieren. Histone können durch Acetylierung, Phosphorylierung sowie Methylierung modifiziert werden und bestimmen dadurch die transkriptionelle Aktivität des Chromatins mit (Jenuwein & Allis 2001; Strahl & Allis 2000; Zhang & Reinberg 2001). Es wird diskutiert, dass die Acetylierung und Phosphorylierung von Histonen, die einerseits positiv geladene Aminosäurereste am Histon neutralisieren und andererseits negativ geladene Phosphatgruppen an das Histon anfügen, zu einer Dekondensation der Chromatinfaser führt (Barratt *et al.* 1994; Roth & Allis 1992). Auch die Acetylierung von Histonen allein kann *in vitro* zu einer Auflockerung des Chromatins führen, wodurch die Promotorregionen von Genen auf der DNA zum Beispiel für Transkriptionsfaktoren zugänglich werden und die Genexpression

aktiviert wird (Strahl & Allis 2000; Wolffe & Hayes 1999). Histondeacetylasen haben einen gegenteiligen Effekt und sind damit an der transkriptionellen Repression beteiligt.

Für den zu *Bcl11a* nah verwandten Transkriptionsfaktor *Bcl11b* konnte gezeigt werden, dass er durch Interaktion mit der Histondeacetylase NuRD in Säugerzellen seine transkriptionelle Repressorfunktion ausübt (Cismasiu *et al.* 2005). *Bcl11a* kann mit der Histondeacetylase SIRT1 interagieren und dadurch die Genexpression reprimieren (Senawong *et al.* 2005). In p25-transgenen Mäusen, einem Mausmodell der Alzheimererkrankung, kann SIRT1 das Überleben von hippocampalen Neuronen fördern (Kim *et al.* 2007). Dem neuronalen Zelltod geht häufig eine axonale Degeneration voraus. Akari und Kollegen konnten zeigen, dass die axonale Degeneration nach neuronalen Schädigungen durch eine erhöhte Aktivität von SIRT1 verzögert werden kann (Araki *et al.* 2004; Bedalov & Simon 2004). Die Überexpression von SIRT1 in neuronalen Vorläuferzellen führt zu einer erhöhten neuronalen Differenzierung dieser Zellen (Hisahara *et al.* 2008). *Bcl11a* könnte daher, zum Beispiel vermittelt über SIRT1, die Expression von Genen durch Veränderungen der Chromatin-Struktur beeinflussen.

In Microarray-Analysen am Entwicklungstag 14,5, durchgeführt von H. Brylka und S. Britsch, konnte eine signifikant reduzierte Expression von *Satb1* in den *Bcl11a*-mutanten Tieren festgestellt werden. *Satb1* ist ein DNA-Bindeprotein, das mit verschiedenen Chromatin-Remodulationskomplexen interagieren und diese an die DNA führen kann. Es entstehen dabei Schleifen in der DNA, weil weiter voneinander entfernt liegende Bereiche durch *Satb1* zusammengeführt werden, wodurch *Satb1* die Expression von Genen reguliert (Cai *et al.* 2006; Yasui *et al.* 2002). *Satb2* wirkt als transkriptioneller Repressor des *Bcl11b*-Lokus durch die Rekrutierung eines Chromatin-Remodulationskomplexes (Alcama *et al.* 2008; Britanova *et al.* 2008). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Remodulation des Chromatins ein weiterer möglicher Mechanismus ist, durch den *Bcl11a* direkt oder indirekt, zum Beispiel über *Satb1*, global die Transkription regulieren kann. Dadurch wäre eine gleichzeitige Steuerung von auf der DNA weiter voneinander entfernt liegenden Genen mit unterschiedlichen Funktionen möglich.

Kürzlich konnten Kuwata und Kollegen zeigen, dass BCL11A *in vitro* SUMOyliert wird und die Proteine SUMO1 und UBC9 in nukleäre Strukturen rekrutieren kann (Kuwata & Nakamura 2008). Bei der SUMOylierung wird ein *small ubiquitin-like-modifier* (SUMO)-Protein über verschiedene Enzymreaktionen, für die UBC9 essentiell ist, an Proteine gebunden. Diese Proteinmodifikation kann auf vielfältige Art und Weise die Aktivität von

Proteinen beeinflussen (Geiss-Friedlander & Melchior 2007). Zahlreiche Transkriptionsfaktoren werden SUMOyliert, was zur Rekrutierung von anderen Proteinen, Veränderungen in der Chromatin-Struktur und damit zur Repression oder Aktivierung der Genexpression führt (Gill 2005; Hay 2005). SATB1 interagiert *in vitro* mit der SUMOylierten Form des Tumorsuppressor-Proteins PML und reguliert dadurch die Ausbildung von Chromatin-Schleifen sowie die Expression von Genen (Kumar *et al.* 2007). Die transkriptionelle Aktivität von Bcl11a könnte also einerseits durch SUMOylierung reguliert werden. Andererseits ist es möglich, dass Bcl11a durch seine Mitwirkung bei der Rekrutierung von Enzymen des SUMOylierungs-Apparates an der Modifikation anderer Proteinen beteiligt ist und dadurch globale Genexpressionsprozesse steuert (Kuwata & Nakamura 2008).

4.5 Konservierte Funktionen von Bcl11a im Nervensystem und im lymphatischen System

Es sind einige Transkriptionsfaktor-Familien bekannt, deren Mitglieder nicht nur Funktionen in der Entwicklung des lymphatischen Systems haben, sondern auch eine Rolle während der Entwicklung des Nervensystems spielen. Dazu gehören Transkriptionsfaktoren aus der Pax-, der Tlx- und der Runx-Familie. Pax5 wird im lymphatischen System für die frühe Entwicklung der B-Zellen über das pro-B-Zellstadium hinaus benötigt und legt dabei den Differenzierungsweg dieser lymphopoetischen Vorläuferzellen zu reifen B-Zellen fest (Nutt *et al.* 1999; Nutt *et al.* 1997; Urbanek *et al.* 1994). Gleichzeitig wird diskutiert, dass Pax5 im Nervensystem für die Proliferation bestimmter neuronaler Vorläuferzellen im sich entwickelnden Mittelhirn benötigt wird und dort auch an der Entstehung dopaminergener Neurone beteiligt ist (Simon *et al.* 2003). Der Transkriptionsfaktor Tlx1 vermittelt die frühe T-Zell-Differenzierung (Owens *et al.* 2006). Gleichzeitig führt die konstitutive Expression von Tlx1 im Knochenmark und in fetalen Leberzellen der Maus zu Defekten in der Hämatopoese: Es entstehen nicht-hämatopoetische Zellen und die Differenzierung von erythroiden und granulozytären Zellen wird inhibiert (Dixon *et al.* 2007). Im Nervensystem sind Tlx1 und Tlx3 essentiell für die Determinierung des glutamatergen Zellschicksals dorsaler Rückenmarksneurone (Cheng *et al.* 2004; Cheng *et al.* 2005). Runx3 fördert im lymphatischen System die Differenzierung von CD8⁺-T-Zellen, indem es als *gene silencing*-Faktor die Expression

von CD4 in CD8⁺-T-Zellen verhindert und dadurch die Differenzierung dieser T-Zellen zu CD4⁺-T-Zellen inhibiert (Bosselut 2004; Taniuchi *et al.* 2002; Woolf *et al.* 2003). In den Spinalganglien des peripheren Nervensystems ist Runx3 an der Entstehung der TrkC-positiven propriozeptiven Neurone beteiligt und wird in der weiteren Entwicklung für deren korrekte axonale Projektionen benötigt (Chen *et al.* 2006; Marmigere & Ernfors 2007).

Es gibt also eine bemerkenswerte Parallelität in der Regulation der Entwicklung des lymphatischen Systems und des Nervensystems. Auch Bcl11a hat hier duale Funktionen in beiden Systemen: Einerseits reguliert Bcl11a verschiedene Aspekte der neuronalen Differenzierung im Nervensystem und ist andererseits essentiell für die Entwicklung der B- und T-Zellen des lymphatischen Systems (siehe diese Arbeit; Liu *et al.* 2003b). Dieser dualen Funktion von Bcl11a könnten ähnliche Mechanismen zugrunde liegen. Liu und Kollegen zeigen in konventionellen *Bcl11a*-Mausmutanten, dass Bcl11a essentiell für die Entwicklung der B-Zellen des lymphatischen Systems ist (Liu *et al.* 2003b). Gleichzeitig ist die Anzahl bestimmter Typen von T-Zellen in den *Bcl11a*-Mutanten verändert und Mäuse, denen *Bcl11a*-mutante fetale Leberzellen transplantiert werden entwickeln T-Zell-Leukämien. Im Gegensatz dazu fördern Notch1-vermittelte Signale die Entwicklung von T-Zellen und inhibieren die B-Zell-Entwicklung (Liu *et al.* 2003b; Pear *et al.* 1996; Pui *et al.* 1999). Liu und Kollegen vermuten daher, dass eine genetische Interaktion zwischen Bcl11a und Notch1-Signalen vorliegen könnte und stellen in quantitativen *real-time* PCR-Analysen einen signifikanten Anstieg der Notch1-mRNA im durch *Bcl11a*-Mutation erzeugten T-Zell-Leukämiegewebe fest. Bcl11a übt seine Funktionen während der Entwicklung des lymphatischen Systems also möglicherweise durch Regulation von Notch1 aus (Liu *et al.* 2003b). Der Rezeptor Notch1 hat auch im Zentralnervensystem zahlreiche Funktionen. Notch1-Signale inhibieren zum Beispiel im Neuralrohr und im adulten Rückenmark die Neurogenese und halten dadurch neuronale Vorläuferzellen in einem undifferenzierten Zustand (de la Pompa *et al.* 1997; Yamamoto *et al.* 2001). Der Einfluss von Notch1-Signalen auf die Morphogenese von Neuronen wird jedoch zum Teil kontrovers diskutiert. Einerseits zeigen einige Arbeiten, dass die Transfektion von verschiedenen Notch1-Konstrukten in hippocampale und kortikale Primärzellkulturen das Neuritenwachstum inhibiert (Berezovska *et al.* 1999; Sestan *et al.* 1999). Andererseits können Notch1-Signale in kortikalen Neuronen der Ratte *in vitro* sowie in reifenden Körnerzellen der Maus *in vivo* die Dendritenentwicklung fördern (Breunig *et al.* 2007;

Redmond *et al.* 2000). Die Wirkung von Bcl11a im Nervensystem könnte damit eine Signalübertragung über Notch1 einschließen. Ich konnte weder in meinen Microarray-Analysen noch in *in situ*-Hybridisierungen eine signifikant reduzierte Expression von Notch1 im *Bcl11a*-mutanten dorsalen Horn detektieren. Eine Beteiligung von Notch1-vermittelten Signalen an der Bcl11a-Funktion im Nervensystem kann aber nicht ausgeschlossen werden, da die Aktivität von Notch1 zum Beispiel auch durch post-translationale Modifikationen reguliert wird (Haines & Irvine 2003; Louvi & Artavanis-Tsakonas 2006).

Weitere interessante Kandidaten für ähnliche Mechanismen der Bcl11a-Funktion im Nervensystem und im lymphatischen System sind die Wnt-Proteine. Sie haben essentielle Funktionen während der Embryogenese und sind im Nervensystem unter anderem wichtig für die axonale Wegfindung und die Morphogenese von Neuronen (Ciani & Salinas 2005; Logan & Nusse 2004; Salinas & Zou 2008; vgl. Kapitel 4.3). Im lymphatischen System induzieren Wnt-Signale die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen und B-Lymphozyten und beeinflussen auch das Überleben unreifer T-Lymphozyten (Ioannidis *et al.* 2001; Reya *et al.* 2003; Reya *et al.* 2000; Scheller *et al.* 2006). In meiner Arbeit konnte ich bisher keinen direkten Nachweis für eine Beteiligung von Wnt-Signalen an der Bcl11a-Funktion im Nervensystem finden. Es gibt jedoch Hinweise, dass Bcl11a und Wnt-Signale an ähnlichen Signaltransduktionswegen beteiligt sein könnten. So ist zum Beispiel in Lungengewebe, in dem der kanonische Wnt-Signalweg konstitutiv aktiviert wurde, die Genexpression von *Bcl11a* signifikant erhöht (Okubo & Hogan 2004). Ebenso findet sich eine erhöhte Bcl11a-Expression in Gewebe von Brustdrüsentumoren aus MMTV-*Wnt1*-transgenen Mäusen, die *Wnt-1* unter der Kontrolle der Enhancer-Elemente des *mouse mammary tumor virus* (MMTV) exprimieren (Huang *et al.* 2005).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Bcl11a seine Funktionen im lymphatischen System und im Nervensystem entweder über die Regulation verschiedener Signalwege ausübt oder über die Kontrolle bisher unbekannter Modulatoren an ähnlichen Signalprozessen in beiden Systemen beteiligt ist.

4.6 Ist Bcl11a evolutionär konserviert?

In *Drosophila* sind einige Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren bekannt, welche die Morphogenese von Neuronen steuern. Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *sequoia*

reguliert zum Beispiel die Morphogenese von Dendriten und Axonen (vgl. Kapitel 1.2.2). Eine Microarray-Analyse zur Identifikation potentieller Zielgene von *sequoia* ergab neben anderen Transkripten auch neue Gene mit Homologien zu den bekannten axonalen Wegfindungsproteinen slit/kekkon-1 und neuropillin-2 (Brenman *et al.* 2001). *Sequoia* reguliert damit direkt oder indirekt zum Teil ähnliche Gene wie Bcl11a im Nervensystem der Maus. *Drosophila*-Mutanten des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *spalt* zeigen *in vitro* Defekte in der Zelladhäsion und in den Verzweigungen von Neuriten (Cantera *et al.* 2002). In *spalt*-Mutanten ist die Expression des Zelladhäsionsproteins N-Cadherin reduziert und das zytoskeletale Markerprotein Tubulin ist *in vitro* ungleichmäßig in den Axonen verteilt. Cantera und Kollegen vermuten daher, dass *spalt* direkt oder indirekt durch die Regulation von Zelladhäsion und zytoskeletalen Prozessen die Morphogenese der Neurone kontrolliert. Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *hamlet* ist in den ES (externen sensorischen)-Neuronen des peripheren Nervensystems von *Drosophila* exprimiert und bestimmt die Dendritenmorphologie dieser Neurone. In *hamlet*-Mutanten nehmen die ES-Neurone das Zellschicksal von MD (multiple Dendriten)-Neuronen an und haben anstatt eines unverzweigten Dendriten die weit verzweigten Dendritenbäume der MD-Neurone. *Hamlet* wirkt daher ähnlich wie ein molekularer Schalter zwischen dem Zellschicksal von ES- und MD-Neuronen (Moore *et al.* 2002). In einem RNA-Interferenzscreen in *Drosophila* konnte für zahlreiche Transkriptionsfaktoren gezeigt werden, dass diese Funktionen während der Morphogenese von Dendriten ausüben. Hier konnte auch der Transkriptionsfaktor Tramtrack identifiziert werden, der ähnlich wie Bcl11a transkriptionelle Repression über die Deacetylierung von Histonen vermittelt (Parrish *et al.* 2006).

Ich führte Datenbankanalysen durch, um in *Drosophila* potentielle Homologe des Bcl11a-Proteins zu identifizieren. Die Suche nach Bcl11a-homologen Proteinsequenzen mit Hilfe der BLASTp-Analyse ergab das unbekannte Protein CG9650 als am nächsten verwandtes Protein zu Bcl11a in der Maus (Altschul *et al.* 1997). Von CG9650 gibt es in *Drosophila* sechs Isoformen (CG9650 A-F), die alle ungefähr 30 % Homologie zu den Zinkfingerdomänen 2 und 3 des Bcl11a-Proteins zeigen. Die Isoformen E und C zeigen zusätzlich Homologien zur Zinkfingerdomäne 1 des Bcl11a-Proteins. In einem Screen in *Drosophila* zur Identifikation potentieller Gene, die an der Entwicklung des Zentralnervensystems beteiligt sind, konnte auch das CG9650-Transkript identifiziert werden. CG9650 ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der Funktionen während der

axonalen Wegfindung von kommissuralen Fasern hat (McGovern *et al.* 2003). Auch der in der Maus zu Bcl11a nah verwandte Transkriptionsfaktor Bcl11b zeigt in BLASTp-Analysen innerhalb der Zinkfingerdomänen 2 bis 6 Homologien zu den sechs Isoformen von CG9650. Bcl11b ist im Nervensystem wichtig für die korrekten axonalen Projektionen von cortikospinalen Motoneuronen und wird im lymphatischen System für die Differenzierung und das Überleben von bestimmten Typen von T-Lymphozyten benötigt (Arlotta *et al.* 2005; Wakabayashi *et al.* 2003). Diese Daten deuten darauf hin, dass in *Drosophila* nur ein Gen, CG9650, vorliegt, während sich in höheren Organismen, wie zum Beispiel der Maus, zwei Gene, Bcl11a und Bcl11b, herausgebildet haben.

Zu Bcl11a homologe Proteine konnten unter anderem auch in der Ratte und beim Menschen identifiziert werden (Kuo & Hsueh 2007; Satterwhite *et al.* 2001). In der Ratte und der Maus zeigen die einzelnen Bcl11a-Isoformen Unterschiede in ihrer gewebsspezifischen und subzellulären Lokalisation (Kuo & Hsueh 2007; Nakamura *et al.* 2000; vgl. Kapitel 1.4 und 4.7). Das humane Ortholog BCL11A ist ebenfalls ein Proto-Onkogen (vgl. Kapitel 1.4). Die längste bisher bekannte Isoform BCL11A-XL ist, wie Bcl11a in der Maus, ein transkriptioneller Repressor und assoziiert mit dem Proto-Onkogen BCL6 (Liu *et al.* 2006). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Bcl11a evolutionär konservierte Funktionen nicht nur im Nervensystem, sondern auch im lymphatischen System haben könnte.

4.7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Bcl11a essentiell für die späte Differenzierung der Neurone des dorsalen Horns ist. Meine Ergebnisse weisen daraufhin, dass Bcl11a an der Etablierung von funktionellen neuronalen Schaltkreisen beteiligt ist. Ich konnte Gene identifizieren, deren Expression in den *Bcl11a*-Mutanten reduziert ist und welche die Funktionen von Bcl11a vermitteln könnten. Die detaillierten zellulären und molekularen Wirkungsmechanismen von Bcl11a konnten in dieser Arbeit jedoch nicht aufgeklärt werden.

Es wäre daher zunächst interessant, die funktionelle Bedeutung der bisher identifizierten potentiellen Zielgene von Bcl11a zu untersuchen. So könnten zum Beispiel in Mausmutanten der extrazellulären Signalmoleküle Sema5A und Frzb die Projektionen primärer sensorischer Neurone in das dorsale Horn hinein analysiert werden. Ich habe

bereits mit immunhistologischen Analysen des dorsalen Horns von Frzb-Mausmutanten, die mir von Frank P. Luyten (University Hospitals Leuven, Belgium) zur Verfügung gestellt wurden, begonnen (Lories *et al.* 2007). In Sema5A-Mausmutanten sind diese Analysen schwierig, da die mutanten Tiere bereits zwischen den Entwicklungstagen 11,5 und 12,5 sterben (Fiore *et al.* 2005). Im Vordergrund der weiteren Arbeiten sollte die Aufklärung der Mechanismen der Bcl11a-Funktion stehen. Hier kann die Suche nach neuen Interaktionspartnern von Bcl11a oder eine Analyse der Funktionen der verschiedenen Bcl11a-Isoformen wertvolle Hinweise liefern. Bcl11a erhöht durch Interaktion mit Mitgliedern der COUP-TF-Familie deren Repressoraktivität (Avram *et al.* 2000; Avram *et al.* 2002). Mögliche neue Interaktionspartner können Satb1 sowie Proteine des SUMOylierungs-Apparates oder Histon-modifizierende Proteine sein.

In der Maus entstehen durch alternatives Spleißen der prä-mRNA drei Isoformen von Bcl11a, die sich in ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden (vgl. Kapitel 1.4). Während Evi9a und Evi9b im Zellkern exprimiert sind, ist Evi9c im Cytoplasma lokalisiert (Nakamura *et al.* 2000). In der Ratte konnten 4 verschiedene Isoformen von Bcl11A identifiziert werden. Die Isoformen Bcl11A-L/Evi9a und Bcl11A-S/Evi9c befinden sich hier nicht nur im Zellkern, sondern sind auch im Cytoplasma lokalisiert. Die Koexpression von Bcl11A-L und -S mit Synaptophysin in hippocampalen Neuronen deutet darauf hin, dass Bcl11A auch in Synapsen lokalisiert ist. Es ist bekannt, dass Transkriptionsfaktoren nicht nur im Zellkern, sondern auch im Zytoplasma aktiv sein können. Der Transkriptionsfaktor Olig2 zum Beispiel reguliert im Zellkern die Entwicklung von Oligodendrozyten (Zhou *et al.* 2001). Zusätzlich ist die Expression von Olig2 im Zytoplasma *in vitro* essentiell für die Differenzierung von neuronalen Mausstammzellen des Telenzephalons zu Astrozyten (Setoguchi & Kondo 2004). Auch Bcl11a könnte daher einen Teil seiner biologischen Funktionen isoformspezifisch über transkriptionsunabhängige Mechanismen ausüben, die den Austausch von Signalen zwischen Kern und Zytoplasma mit einschließen. Meine eigenen Daten zeigen bereits, dass die Isoform Evi9b *in vitro* für die neuronale Morphogenese benötigt wird und in Wildtypneuronen Neuritenwachstum induzieren kann.

Die Identifikation von neuen Interaktionspartnern ist zum Beispiel durch Verwendung des *yeast-two-hybrid*-Systems möglich. Die subzelluläre und gewebsspezifische Lokalisation der unterschiedlichen Bcl11a-Isoformen kann durch Herstellung isoformspezifischer Antikörper und RNA-Sonden für die *in situ*-Hybridisierung analysiert werden. Eine

detaillierte Untersuchung der Funktion der einzelnen Bcl11a-Isoformen ermöglichen isoformspezifische Mausmutanten. Zusätzlich liefert die Suche nach möglichen DNA-Bindungsstellen der Bcl11a-Isoformen mittels der *ChIP-on-chip*-Methode wichtige Informationen über Interaktionen mit der DNA *in vivo*. Die Aufklärung der detaillierten Mechanismen der Bcl11a-Funktion im Nervensystem kann wertvolle Kenntnisse darüber liefern, wie verschiedene neuronale Differenzierungsprozesse durch Bcl11a reguliert werden können und auf welche Art und Weise dadurch neuronale Schaltkreise entstehen. Zusätzlich könnten neue Erkenntnisse über mögliche konservierte Mechanismen von Bcl11a im Nervensystem und im lymphatischen System gewonnen werden.

5 Zusammenfassung

Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Bcl11a (Evi9, CTIP1) ist im lymphatischen System und im Nervensystem exprimiert. Im lymphatischen System ist Bcl11a essentiell für die Reifung von B-Zellen und die Differenzierung bestimmter Typen von T-Zellen. Demgegenüber war die Funktion von Bcl11a während der Entwicklung des Nervensystems bisher nur wenig verstanden. In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass Bcl11a essentiell für die neuronale Differenzierung ist. Die konditionelle Deletion von Bcl11a in der Maus zeigt, dass Bcl11a für die späte Differenzierung der dorsalen Neurone des Rückenmarks benötigt wird. Im dorsalen Horn der *Bcl11a*-Mutanten ist die Expression bestimmter Neurotransmitter-Rezeptoren reduziert und die Morphologie der dorsalen Neurone gestört. *In vitro*-Analysen in Primärzellkulturen zeigen, dass Bcl11a nicht nur für die neuronale Morphogenese benötigt wird, sondern auch ausreichend ist, um ein vermehrtes Auswachsen von Neuriten zu induzieren. Bcl11a ist im dorsalen Horn wichtig für das Einwachsen von Axonen nocizeptiver Neurone und beeinflusst deren Fähigkeit, korrekte synaptische Verschaltungen im Rückenmark zu etablieren. In einer genomweiten Analyse zur Identifikation transkriptioneller Zielgene von Bcl11a, konnten Gene identifiziert werden, welche die Dynamik des Zytoskeletts regulieren, an der Neurotransmission beteiligt sind und etablierte Funktionen während der axonalen Wegfindung von Neuronen haben.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse zum ersten Mal, dass Bcl11a wesentliche Funktionen während der Entwicklung des Nervensystems ausübt. Meine Untersuchungen deuten darauf hin, dass Bcl11a verschiedene entwicklungsbiologische Prozesse orchestriert, die zur Etablierung von funktionellen neuronalen Schaltkreisen führen.

6 Summary

There is emerging evidence that transcription factors, which are functionally involved in the development of the lymphatic system, also control important steps in neuronal differentiation. The zinc finger transcription factor Bcl11a (Evi9, CTIP1) is expressed in the nervous system as well as in lymphatic tissues. Previously it was shown that Bcl11a is essential for normal lymphoid development. Bcl11a null mice lack mature B-cells and the development of several types of T-cells is impaired. This work demonstrates that Bcl11a is essential for neuronal development as well. Conditional ablation in mice revealed that Bcl11a is required for the late differentiation of dorsal spinal neurons. In the dorsal horn Bcl11a mutant mice show reduced expression of neurotransmitter receptors. Furthermore the morphology of mutant dorsal spinal neurons is disturbed. Detailed analysis in primary cell cultures demonstrated that Bcl11a is not only required but also sufficient to promote neuronal morphogenesis. Moreover, nociceptive neurons depend on Bcl11a expression in postsynaptic spinal target neurons to be able to grow into the dorsal horn and to provide synaptic input. In a genome-wide screen for transcriptional targets down-regulated in Bcl11a mutant spinal neurons I identified genes linked to neurotransmission, the regulation of cytoskeletal dynamics, as well as secreted factors with established functions in axonal guidance.

Taken together, the genetic analysis of Bcl11a mutants reveals, for the first time, essential functions of this factor in the development of the central nervous system. These data suggest that Bcl11a orchestrates different developmental processes, which lead to the establishment of functional neuronal circuits.

7 Literatur

- Aizawa, H., Hu, S.C., Bobb, K., Balakrishnan, K., Ince, G., Gurevich, I., Cowan, M. & Ghosh, A. (2004) Dendrite development regulated by CREST, a calcium-regulated transcriptional activator. *Science (New York, N.Y)* **303**, 197-202.
- Alcamo, E.A., Chirivella, L., Dautzenberg, M., Dobрева, G., Farinas, I., Grosschedl, R. & McConnell, S.K. (2008) *Satb2* regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Neuron* **57**, 364-377.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* **25**, 3389-3402.
- Araki, T., Sasaki, Y. & Milbrandt, J. (2004) Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science (New York, N.Y)* **305**, 1010-1013.
- Arimura, N. & Kaibuchi, K. (2007) Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nature reviews* **8**, 194-205.
- Arlotta, P., Molyneaux, B.J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R. & Macklis, J.D. (2005) Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* **45**, 207-221.
- Artigiani, S., Conrotto, P., Fazzari, P., Gilestro, G.F., Barberis, D., Giordano, S., Comoglio, P.M. & Tamagnone, L. (2004) Plexin-B3 is a functional receptor for semaphorin 5A. *EMBO reports* **5**, 710-714.
- Avram, D., Fields, A., Senawong, T., Topark-Ngarm, A. & Leid, M. (2002) COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor)-interacting protein 1 (CTIP1) is a sequence-specific DNA binding protein. *The Biochemical journal* **368**, 555-563.
- Avram, D., Fields, A., Pretty On Top, K., Nevriy, D.J., Ishmael, J.E. & Leid, M. (2000) Isolation of a novel family of C(2)H(2) zinc finger proteins implicated in transcriptional repression mediated by chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) orphan nuclear receptors. *The Journal of biological chemistry* **275**, 10315-10322.
- Baas, P.W. & Black, M.M. (1990) Individual microtubules in the axon consist of domains that differ in both composition and stability. *The Journal of cell biology* **111**, 495-509.
- Baccei, M.L. & Fitzgerald, M. (2004) Development of GABAergic and glycinergic transmission in the neonatal rat dorsal horn. *J Neurosci* **24**, 4749-4757.
- Baldassa, S., Gnesutta, N., Fascio, U., Sturani, E. & Zippel, R. (2007) SCLIP, a microtubule-destabilizing factor, interacts with RasGRF1 and inhibits its ability to promote Rac activation and neurite outgrowth. *The Journal of biological chemistry* **282**, 2333-2345.
- Banker, G. & Goslin, K. (1998) Culturing Nerve Cells. In. *MIT Press, Cambridge*, S. 19-24, S. 37-78.
- Barratt, M.J., Hazzalin, C.A., Cano, E. & Mahadevan, L.C. (1994) Mitogen-stimulated phosphorylation of histone H3 is targeted to a small hyperacetylation-sensitive fraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 4781-4785.
- Bedalov, A. & Simon, J.A. (2004) Neuroscience. NAD to the rescue. *Science (New York, N.Y)* **305**, 954-955.

- Benninghoff, A. & Drenckhahn, D. (2004a) Anatomie; Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. *Urban & Fischer Band 2*, S. 321.
- Benninghoff, A. & Drenckhahn, D. (2004b) Anatomie; Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. *Urban & Fischer Band 2*, S. 238-240.
- Berezovska, O., Frosch, M., McLean, P., Knowles, R., Koo, E., Kang, D., Shen, J., Lu, F.M., Lux, S.E., Tonegawa, S., *et al.* (1999) The Alzheimer-related gene presenilin 1 facilitates notch 1 in primary mammalian neurons. *Brain Res Mol Brain Res* **69**, 273-280.
- Blakeman, K.H., Holmberg, K., Hao, J.X., Xu, X.J., Kahl, U., Lendahl, U., Bartfai, T., Wiesenfeld-Hallin, Z. & Hokfelt, T. (2001) Mice over-expressing galanin have elevated heat nociceptive threshold. *Neuroreport* **12**, 423-425.
- Boguski, M.S. & McCormick, F. (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**, 643-654.
- Bosselut, R. (2004) CD4/CD8-lineage differentiation in the thymus: from nuclear effectors to membrane signals. *Nat Rev Immunol* **4**, 529-540.
- Bradke, F. & Dotti, C.G. (1999) The role of local actin instability in axon formation. *Science (New York, N.Y)* **283**, 1931-1934.
- Bradke, F. & Dotti, C.G. (2000) Changes in membrane trafficking and actin dynamics during axon formation in cultured hippocampal neurons. *Microscopy research and technique* **48**, 3-11.
- Brenman, J.E., Gao, F.B., Jan, L.Y. & Jan, Y.N. (2001) Sequoia, a tramtrack-related zinc finger protein, functions as a pan-neural regulator for dendrite and axon morphogenesis in *Drosophila*. *Developmental cell* **1**, 667-677.
- Breunig, J.J., Silbereis, J., Vaccarino, F.M., Sestan, N. & Rakic, P. (2007) Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 20558-20563.
- Briscoe, J. & Ericson, J. (2001) Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Current opinion in neurobiology* **11**, 43-49.
- Britanova, O., de Juan Romero, C., Cheung, A., Kwan, K.Y., Schwark, M., Gyorgy, A., Vogel, T., Akopov, S., Mitkovski, M., Agoston, D., *et al.* (2008) *Satb2* is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex. *Neuron* **57**, 378-392.
- Burgoyne, R.D. (2007) Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca²⁺ signalling. *Nature reviews* **8**, 182-193.
- Burkhard, P., Stetefeld, J. & Strelkov, S.V. (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends in cell biology* **11**, 82-88.
- Caceres, A., Binder, L.I., Payne, M.R., Bender, P., Rebhun, L. & Steward, O. (1984) Differential subcellular localization of tubulin and the microtubule-associated protein MAP2 in brain tissue as revealed by immunocytochemistry with monoclonal hybridoma antibodies. *J Neurosci* **4**, 394-410.
- Cai, S., Lee, C.C. & Kohwi-Shigematsu, T. (2006) SATB1 packages densely looped, transcriptionally active chromatin for coordinated expression of cytokine genes. *Nature genetics* **38**, 1278-1288.
- Cantera, R., Luer, K., Rusten, T.E., Barrio, R., Kafatos, F.C. & Technau, G.M. (2002) Mutations in *spalt* cause a severe but reversible neurodegenerative phenotype in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development (Cambridge, England)* **129**, 5577-5586.

- Caspary, T. & Anderson, K.V. (2003) Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nature reviews* **4**, 289-297.
- Chen, C.L., Broom, D.C., Liu, Y., de Nooij, J.C., Li, Z., Cen, C., Samad, O.A., Jessell, T.M., Woolf, C.J. & Ma, Q. (2006) Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. *Neuron* **49**, 365-377.
- Chen, Z.F., Rebelo, S., White, F., Malmberg, A.B., Baba, H., Lima, D., Woolf, C.J., Basbaum, A.I. & Anderson, D.J. (2001) The paired homeodomain protein DRG11 is required for the projection of cutaneous sensory afferent fibers to the dorsal spinal cord. *Neuron* **31**, 59-73.
- Cheng, L., Samad, O.A., Xu, Y., Mizuguchi, R., Luo, P., Shirasawa, S., Goulding, M. & Ma, Q. (2005) Lbx1 and Tlx3 are opposing switches in determining GABAergic versus glutamatergic transmitter phenotypes. *Nat Neurosci* **8**, 1510-1515.
- Cheng, L., Arata, A., Mizuguchi, R., Qian, Y., Karunaratne, A., Gray, P.A., Arata, S., Shirasawa, S., Bouchard, M., Luo, P., *et al.* (2004) Tlx3 and Tlx1 are post-mitotic selector genes determining glutamatergic over GABAergic cell fates. *Nat Neurosci* **7**, 510-517.
- Cheng, Y., Cheung, M., Abu-Elmagd, M.M., Orme, A. & Scotting, P.J. (2000) Chick sox10, a transcription factor expressed in both early neural crest cells and central nervous system. *Brain research* **121**, 233-241.
- Christensen, B.N. & Perl, E.R. (1970) Spinal neurons specifically excited by noxious or thermal stimuli: marginal zone of the dorsal horn. *Journal of neurophysiology* **33**, 293-307.
- Chung, Y.S., Baylink, D.J., Srivastava, A.K., Amaar, Y., Tapia, B., Kasukawa, Y. & Mohan, S. (2004) Effects of secreted frizzled-related protein 3 on osteoblasts in vitro. *J Bone Miner Res* **19**, 1395-1402.
- Ciani, L. & Salinas, P.C. (2005) WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nature reviews* **6**, 351-362.
- Cismasiu, V.B., Adamo, K., Gecewicz, J., Duque, J., Lin, Q. & Avram, D. (2005) BCL11B functionally associates with the NuRD complex in T lymphocytes to repress targeted promoter. *Oncogene* **24**, 6753-6764.
- Cooper, J.A. & Schafer, D.A. (2000) Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Current opinion in cell biology* **12**, 97-103.
- Coquelle, F.M., Caspi, M., Cordelieres, F.P., Dompierre, J.P., Dujardin, D.L., Koifman, C., Martin, P., Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A., Galjart, N., *et al.* (2002) LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway. *Molecular and cellular biology* **22**, 3089-3102.
- Crawley, J.N. (1999) The role of galanin in feeding behavior. *Neuropeptides* **33**, 369-375.
- da Silva, J.S. & Dotti, C.G. (2002) Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritegenesis. *Nature reviews* **3**, 694-704.
- de la Pompa, J.L., Wakeham, A., Correia, K.M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R.J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T.W., Rossant, J., *et al.* (1997) Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development (Cambridge, England)* **124**, 1139-1148.
- Dent, E.W. & Gertler, F.B. (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* **40**, 209-227.
- di Sanguinetto, S.A., Dasen, J.S. & Arber, S. (2008) Transcriptional mechanisms controlling motor neuron diversity and connectivity. *Current opinion in neurobiology* **18**, 36-43.

- Dickson, B.J. & Senti, K.A. (2002) Axon guidance: growth cones make an unexpected turn. *Curr Biol* **12**, R218-220.
- Ding, Y.Q., Yin, J., Kania, A., Zhao, Z.Q., Johnson, R.L. & Chen, Z.F. (2004) Lmx1b controls the differentiation and migration of the superficial dorsal horn neurons of the spinal cord. *Development (Cambridge, England)* **131**, 3693-3703.
- Dixon, D.N., Izon, D.J., Dagger, S., Callow, M.J., Taplin, R.H., Kees, U.R. & Greene, W.K. (2007) TLX1/HOX11 transcription factor inhibits differentiation and promotes a non-haemopoietic phenotype in murine bone marrow cells. *British journal of haematology* **138**, 54-67.
- Dotti, C.G., Banker, G.A. & Binder, L.I. (1987) The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience* **23**, 121-130.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A. & Banker, G.A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* **8**, 1454-1468.
- Esteve, P., Trousse, F., Rodriguez, J. & Bovolenta, P. (2003) SFRP1 modulates retina cell differentiation through a beta-catenin-independent mechanism. *Journal of cell science* **116**, 2471-2481.
- Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W. & Sanes, J.R. (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* **28**, 41-51.
- Fink, C.C., Bayer, K.U., Myers, J.W., Ferrell, J.E., Jr., Schulman, H. & Meyer, T. (2003) Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII. *Neuron* **39**, 283-297.
- Fiore, R., Rahim, B., Christoffels, V.M., Moorman, A.F. & Puschel, A.W. (2005) Inactivation of the Sema5a gene results in embryonic lethality and defective remodeling of the cranial vascular system. *Molecular and cellular biology* **25**, 2310-2319.
- Fitzgerald, M. (1987) Spontaneous and evoked activity of fetal primary afferents in vivo. *Nature* **326**, 603-605.
- Fitzgerald, M. (2005) The development of nociceptive circuits. *Nature reviews* **6**, 507-520.
- Fitzgerald, M. & Jennings, E. (1999) The postnatal development of spinal sensory processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 7719-7722.
- Forlani, G., Baldassa, S., Lavagni, P., Sturani, E. & Zippel, R. (2006) The guanine nucleotide exchange factor RasGRF1 directly binds microtubules via DHPH2-mediated interaction. *The FEBS journal* **273**, 2127-2138.
- Fradkin, L.G., Garriga, G., Salinas, P.C., Thomas, J.B., Yu, X. & Zou, Y. (2005) Wnt signaling in neural circuit development. *J Neurosci* **25**, 10376-10378.
- Gaudilliere, B., Konishi, Y., de la Iglesia, N., Yao, G. & Bonni, A. (2004) A CaMKII-NeuroD signaling pathway specifies dendritic morphogenesis. *Neuron* **41**, 229-241.
- Geiss-Friedlander, R. & Melchior, F. (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 947-956.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., et al. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology* **5**, R80.
- Gill, G. (2005) Something about SUMO inhibits transcription. *Current opinion in genetics & development* **15**, 536-541.

- Gillespie, P.G. & Walker, R.G. (2001) Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature* **413**, 194-202.
- Goldberg, D.J. & Burmeister, D.W. (1989) Looking into growth cones. *Trends in neurosciences* **12**, 503-506.
- Gordon, J.W., Chesa, P.G., Nishimura, H., Rettig, W.J., Maccari, J.E., Endo, T., Seravalli, E., Seki, T. & Silver, J. (1987) Regulation of Thy-1 gene expression in transgenic mice. *Cell* **50**, 445-452.
- Gordon-Weeks, P.R. (2000) Neuronal Growth Cones. *Cambridge, UK: Cambridge University Press* **37**.
- Gorski, J.A., Talley, T., Qiu, M., Puelles, L., Rubenstein, J.L. & Jones, K.R. (2002) Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the *Emx1*-expressing lineage. *J Neurosci* **22**, 6309-6314.
- Gowan, K., Helms, A.W., Hunsaker, T.L., Collisson, T., Ebert, P.J., Odom, R. & Johnson, J.E. (2001) Crossinhibitory activities of *Ngn1* and *Math1* allow specification of distinct dorsal interneurons. *Neuron* **31**, 219-232.
- Gross, M.K., Dottori, M. & Goulding, M. (2002) *Lbx1* specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord. *Neuron* **34**, 535-549.
- Gunning, P., Hardeman, E., Jeffrey, P. & Weinberger, R. (1998) Creating intracellular structural domains: spatial segregation of actin and tropomyosin isoforms in neurons. *Bioessays* **20**, 892-900.
- Haase, G., Dessaud, E., Garces, A., de Bovis, B., Birling, M., Filippi, P., Schmalbruch, H., Arber, S. & deLapeyriere, O. (2002) GDNF acts through PEA3 to regulate cell body positioning and muscle innervation of specific motor neuron pools. *Neuron* **35**, 893-905.
- Haines, N. & Irvine, K.D. (2003) Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 786-797.
- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science (New York, N.Y)* **279**, 509-514.
- Hausser, M., Spruston, N. & Stuart, G.J. (2000) Diversity and dynamics of dendritic signaling. *Science (New York, N.Y)* **290**, 739-744.
- Hay, R.T. (2005) SUMO: a history of modification. *Molecular cell* **18**, 1-12.
- Heimrich, B. & Frotscher, M. (1991) Differentiation of dentate granule cells in slice cultures of rat hippocampus: a Golgi/electron microscopic study. *Brain Res* **538**, 263-268.
- Helms, A.W. & Johnson, J.E. (2003) Specification of dorsal spinal cord interneurons. *Current opinion in neurobiology* **13**, 42-49.
- Hisahara, S., Chiba, S., Matsumoto, H., Tanno, M., Yagi, H., Shimohama, S., Sato, M. & Horio, Y. (2008) Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 15599-15604.
- Hoang, B., Moos, M., Jr., Vukicevic, S. & Luyten, F.P. (1996) Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to *Drosophila* frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. *The Journal of biological chemistry* **271**, 26131-26137.
- Hollmann, M., Hartley, M. & Heinemann, S. (1991) Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science (New York, N.Y)* **252**, 851-853.

- Holmes, F.E., Bacon, A., Pope, R.J., Vanderplank, P.A., Kerr, N.C., Sukumaran, M., Pachnis, V. & Wynick, D. (2003) Transgenic overexpression of galanin in the dorsal root ganglia modulates pain-related behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 6180-6185.
- Horton, A.C. & Ehlers, M.D. (2003) Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* **40**, 277-295.
- Huang, S., Li, Y., Chen, Y., Podsypanina, K., Chamorro, M., Olshen, A.B., Desai, K.V., Tann, A., Petersen, D., Green, J.E., *et al.* (2005) Changes in gene expression during the development of mammary tumors in MMTV-Wnt-1 transgenic mice. *Genome biology* **6**, R84.
- Huber, A.B., Kolodkin, A.L., Ginty, D.D. & Cloutier, J.F. (2003) Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annual review of neuroscience* **26**, 509-563.
- Huber, A.B., Kania, A., Tran, T.S., Gu, C., De Marco Garcia, N., Lieberam, I., Johnson, D., Jessell, T.M., Ginty, D.D. & Kolodkin, A.L. (2005) Distinct roles for secreted semaphorin signaling in spinal motor axon guidance. *Neuron* **48**, 949-964.
- Innocenti, M., Zippel, R., Brambilla, R. & Sturani, E. (1999) CDC25(Mm)/Ras-GRF1 regulates both Ras and Rac signaling pathways. *FEBS letters* **460**, 357-362.
- Ioannidis, V., Beermann, F., Clevers, H. & Held, W. (2001) The beta-catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival. *Nature immunology* **2**, 691-697.
- Iuchi, S. (2001) Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell Mol Life Sci* **58**, 625-635.
- Jalink, K., Eichholtz, T., Postma, F.R., van Corven, E.J. & Moolenaar, W.H. (1993) Lysophosphatidic acid induces neuronal shape changes via a novel, receptor-mediated signaling pathway: similarity to thrombin action. *Cell Growth Differ* **4**, 247-255.
- Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (2003) The control of dendrite development. *Neuron* **40**, 229-242.
- Jenuwein, T. & Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science (New York, N.Y)* **293**, 1074-1080.
- Jessell, T.M. (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* **1**, 20-29.
- Jones, M.K. & Jackson, J.H. (1998) Ras-GRF activates Ha-Ras, but not N-Ras or K-Ras 4B, protein in vivo. *The Journal of biological chemistry* **273**, 1782-1787.
- Jones, S.E. & Jomary, C. (2002) Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* **24**, 811-820.
- Julius, D. & Basbaum, A.I. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**, 203-210.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. & Jessell, T.M. (2000) Principles of neural science. *McGraw-Hill*, pp. 1051-1052.
- Kantor, D.B., Chivatakarn, O., Peer, K.L., Oster, S.F., Inatani, M., Hansen, M.J., Flanagan, J.G., Yamaguchi, Y., Sretavan, D.W., Giger, R.J., *et al.* (2004) Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Neuron* **44**, 961-975.
- Kawano, Y. & Kypta, R. (2003) Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of cell science* **116**, 2627-2634.
- Kerr, R.C., Maxwell, D.J. & Todd, A.J. (1998) GluR1 and GluR2/3 subunits of the AMPA-type glutamate receptor are associated with particular types of neurone in laminae

- I-III of the spinal dorsal horn of the rat. *The European journal of neuroscience* **10**, 324-333.
- Kim, D., Nguyen, M.D., Dobbin, M.M., Fischer, A., Sananbenesi, F., Rodgers, J.T., Delalle, I., Baur, J.A., Sui, G., Armour, S.M., *et al.* (2007) SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *The EMBO journal* **26**, 3169-3179.
- Klug, A. (1999) Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. *Journal of molecular biology* **293**, 215-218.
- Kornberg, R.D. & Lorch, Y. (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**, 285-294.
- Krylova, O., Herreros, J., Cleverley, K.E., Ehler, E., Henriquez, J.P., Hughes, S.M. & Salinas, P.C. (2002) WNT-3, expressed by motoneurons, regulates terminal arborization of neurotrophin-3-responsive spinal sensory neurons. *Neuron* **35**, 1043-1056.
- Kumar, P.P., Bischof, O., Purbey, P.K., Notani, D., Urlaub, H., Dejean, A. & Galande, S. (2007) Functional interaction between PML and SATB1 regulates chromatin-loop architecture and transcription of the MHC class I locus. *Nature cell biology* **9**, 45-56.
- Kuo, T.Y. & Hsueh, Y.P. (2007) Expression of zinc finger transcription factor Bcl11A/Evi9/CTIP1 in rat brain. *Journal of neuroscience research* **85**, 1628-1636.
- Kuwata, T. & Nakamura, T. (2008) BCL11A is a SUMOylated protein and recruits SUMO-conjugation enzymes in its nuclear body. *Genes Cells*.
- Laity, J.H., Lee, B.M. & Wright, P.E. (2001) Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current opinion in structural biology* **11**, 39-46.
- Lantz, V.A. & Miller, K.G. (1998) A class VI unconventional myosin is associated with a homologue of a microtubule-binding protein, cytoplasmic linker protein-170, in neurons and at the posterior pole of Drosophila embryos. *The Journal of cell biology* **140**, 897-910.
- Lee, K.J. & Jessell, T.M. (1999) The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annual review of neuroscience* **22**, 261-294.
- Leid, M., Ishmael, J.E., Avram, D., Shepherd, D., Fraulob, V. & Dolle, P. (2004) CTIP1 and CTIP2 are differentially expressed during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns* **4**, 733-739.
- Letunic, I., Copley, R.R., Pils, B., Pinkert, S., Schultz, J. & Bork, P. (2006) SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic acids research* **34**, D257-260.
- Li, J., Shen, H., Himmel, K.L., Dupuy, A.J., Largaespada, D.A., Nakamura, T., Shaughnessy, J.D., Jr., Jenkins, N.A. & Copeland, N.G. (1999) Leukaemia disease genes: large-scale cloning and pathway predictions. *Nature genetics* **23**, 348-353.
- Li, Z., Van Aelst, L. & Cline, H.T. (2000) Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in Xenopus central neurons in vivo. *Nat Neurosci* **3**, 217-225.
- Liu, H., Ippolito, G.C., Wall, J.K., Niu, T., Probst, L., Lee, B.S., Pulford, K., Banham, A.H., Stockwin, L., Shaffer, A.L., *et al.* (2006) Functional studies of BCL11A: characterization of the conserved BCL11A-XL splice variant and its interaction with BCL6 in nuclear paraspeckles of germinal center B cells. *Molecular cancer* **5**, 18.
- Liu, H.X. & Hokfelt, T. (2002) The participation of galanin in pain processing at the spinal level. *Trends in pharmacological sciences* **23**, 468-474.
- Liu, P., Jenkins, N.A. & Copeland, N.G. (2003a) A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome research* **13**, 476-484.

- Liu, P., Keller, J.R., Ortiz, M., Tessarollo, L., Rachel, R.A., Nakamura, T., Jenkins, N.A. & Copeland, N.G. (2003b) Bcl11a is essential for normal lymphoid development. *Nature immunology* **4**, 525-532.
- Livet, J., Sigrist, M., Stroebel, S., De Paola, V., Price, S.R., Henderson, C.E., Jessell, T.M. & Arber, S. (2002) ETS gene Pea3 controls the central position and terminal arborization of specific motor neuron pools. *Neuron* **35**, 877-892.
- Logan, C.Y. & Nusse, R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* **20**, 781-810.
- Lories, R.J., Peeters, J., Bakker, A., Tylzanowski, P., Derese, I., Schrooten, J., Thomas, J.T. & Luyten, F.P. (2007) Articular cartilage and biomechanical properties of the long bones in Frzb-knockout mice. *Arthritis and rheumatism* **56**, 4095-4103.
- Louvi, A. & Artavanis-Tsakonas, S. (2006) Notch signalling in vertebrate neural development. *Nature reviews* **7**, 93-102.
- Luger, K. & Richmond, T.J. (1998) The histone tails of the nucleosome. *Current opinion in genetics & development* **8**, 140-146.
- Luo, L. (2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nature reviews* **1**, 173-180.
- Luo, L. (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annual review of cell and developmental biology* **18**, 601-635.
- Luo, L., Callaway, E.M. & Svoboda, K. (2008) Genetic dissection of neural circuits. *Neuron* **57**, 634-660.
- Luo, L., Liao, Y.J., Jan, L.Y. & Jan, Y.N. (1994) Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: Drosophila Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes & development* **8**, 1787-1802.
- Mandelkow, E.M., Biernat, J., Drewes, G., Gustke, N., Trinczek, B. & Mandelkow, E. (1995) Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiology of aging* **16**, 355-362; discussion 362-353.
- Marmigere, F. & Ernfors, P. (2007) Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nature reviews* **8**, 114-127.
- Martin-Subero, J.I., Gesk, S., Harder, L., Sonoki, T., Tucker, P.W., Schlegelberger, B., Grote, W., Novo, F.J., Calasanz, M.J., Hansmann, M.L., *et al.* (2002) Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **99**, 1474-1477.
- McGovern, V.L., Pacak, C.A., Sewell, S.T., Turski, M.L. & Seeger, M.A. (2003) A targeted gain of function screen in the embryonic CNS of Drosophila. *Mechanisms of development* **120**, 1193-1207.
- Messersmith, E.K., Leonardo, E.D., Shatz, C.J., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S. & Kolodkin, A.L. (1995) Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron* **14**, 949-959.
- Mitchell, P.J. & Tjian, R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science (New York, N.Y)* **245**, 371-378.
- Moore, A.W., Jan, L.Y. & Jan, Y.N. (2002) hamlet, a binary genetic switch between single- and multiple- dendrite neuron morphology. *Science (New York, N.Y)* **297**, 1355-1358.
- Morita, A., Yamashita, N., Sasaki, Y., Uchida, Y., Nakajima, O., Nakamura, F., Yagi, T., Taniguchi, M., Usui, H., Katoh-Semba, R., *et al.* (2006) Regulation of dendritic branching and spine maturation by semaphorin3A-Fyn signaling. *J Neurosci* **26**, 2971-2980.

- Muller, T., Brohmann, H., Pierani, A., Heppenstall, P.A., Lewin, G.R., Jessell, T.M. & Birchmeier, C. (2002) The homeodomain factor *lhx1* distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord. *Neuron* **34**, 551-562.
- Nakamura, T., Yamazaki, Y., Saiki, Y., Moriyama, M., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A. & Copeland, N.G. (2000) Evi9 encodes a novel zinc finger protein that physically interacts with BCL6, a known human B-cell proto-oncogene product. *Molecular and cellular biology* **20**, 3178-3186.
- Nakayama, A.Y., Harms, M.B. & Luo, L. (2000) Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* **20**, 5329-5338.
- Nishimura, T., Yamaguchi, T., Kato, K., Yoshizawa, M., Nabeshima, Y., Ohno, S., Hoshino, M. & Kaibuchi, K. (2005) PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nature cell biology* **7**, 270-277.
- Nutt, S.L., Urbanek, P., Rolink, A. & Busslinger, M. (1997) Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes Dev.* **11**, 476-491.
- Nutt, S.L., Heavey, B., Rolink, A.G. & Busslinger, M. (1999) Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* **401**, 556-562.
- Okubo, T. & Hogan, B.L. (2004) Hyperactive Wnt signaling changes the developmental potential of embryonic lung endoderm. *Journal of biology* **3**, 11.
- Oshio, K., Binder, D.K., Yang, B., Schechter, S., Verkman, A.S. & Manley, G.T. (2004) Expression of aquaporin water channels in mouse spinal cord. *Neuroscience* **127**, 685-693.
- Ottlinger, M.E. & Lin, S. (1988) Clostridium difficile toxin B induces reorganization of actin, vinculin, and talin in cultured cells. *Experimental cell research* **174**, 215-229.
- Owens, B.M., Hawley, T.S., Spain, L.M., Kerkel, K.A. & Hawley, R.G. (2006) TLX1/HOX11-mediated disruption of primary thymocyte differentiation prior to the CD4+CD8+ double-positive stage. *British journal of haematology* **132**, 216-229.
- Ozaki, S. & Snider, W.D. (1997) Initial trajectories of sensory axons toward laminar targets in the developing mouse spinal cord. *The Journal of comparative neurology* **380**, 215-229.
- Papoulas, O., Hays, T.S. & Sisson, J.C. (2005) The golgin Lava lamp mediates dynein-based Golgi movements during Drosophila cellularization. *Nature cell biology* **7**, 612-618.
- Parrish, J.Z., Kim, M.D., Jan, L.Y. & Jan, Y.N. (2006) Genome-wide analyses identify transcription factors required for proper morphogenesis of Drosophila sensory neuron dendrites. *Genes & development* **20**, 820-835.
- Parrish, J.Z., Emoto, K., Kim, M.D. & Jan, Y.N. (2007) Mechanisms that regulate establishment, maintenance, and remodeling of dendritic fields. *Annual review of neuroscience* **30**, 399-423.
- Pasterkamp, R.J. & Kolodkin, A.L. (2003) Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity. *Current opinion in neurobiology* **13**, 79-89.
- Peacock, J.H., Nelson, P.G. & Goldstone, M.W. (1973) Electrophysiologic study of cultured neurons dissociated from spinal cords and dorsal root ganglia of fetal mice. *Developmental biology* **30**, 137-152.
- Pear, W.S., Aster, J.C., Scott, M.L., Hasserjian, R.P., Soffer, B., Sklar, J. & Baltimore, D. (1996) Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *The Journal of experimental medicine* **183**, 2283-2291.

- Pietri, T., Eder, O., Blanche, M., Thiery, J.P. & Dufour, S. (2003) The human tissue plasminogen activator-Cre mouse: a new tool for targeting specifically neural crest cells and their derivatives in vivo. *Developmental biology* **259**, 176-187.
- Polleux, F., Ince-Dunn, G. & Ghosh, A. (2007) Transcriptional regulation of vertebrate axon guidance and synapse formation. *Nature reviews* **8**, 331-340.
- Pui, J.C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Lee, J.Y., Kadesch, T., Hardy, R.R., Aster, J.C., *et al.* (1999) Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* **11**, 299-308.
- Purro, S.A., Ciani, L., Hoyos-Flight, M., Stamatakou, E., Siomou, E. & Salinas, P.C. (2008) Wnt regulates axon behavior through changes in microtubule growth directionality: a new role for adenomatous polyposis coli. *J Neurosci* **28**, 8644-8654.
- Qian, Y., Shirasawa, S., Chen, C.L., Cheng, L. & Ma, Q. (2002) Proper development of relay somatic sensory neurons and D2/D4 interneurons requires homeobox genes Rnx/Tlx-3 and Tlx-1. *Genes & development* **16**, 1220-1233.
- Qian, Y., Fritsch, B., Shirasawa, S., Chen, C.L., Choi, Y. & Ma, Q. (2001) Formation of brainstem (nor)adrenergic centers and first-order relay visceral sensory neurons is dependent on homeodomain protein Rnx/Tlx3. *Genes & development* **15**, 2533-2545.
- Redmond, L., Kashani, A.H. & Ghosh, A. (2002) Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron* **34**, 999-1010.
- Redmond, L., Oh, S.R., Hicks, C., Weinmaster, G. & Ghosh, A. (2000) Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development. *Nat Neurosci* **3**, 30-40.
- Rexed, B. (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *The Journal of comparative neurology* **96**, 414-495.
- Reya, T., O'Riordan, M., Okamura, R., Devaney, E., Willert, K., Nusse, R. & Grosschedl, R. (2000) Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* **13**, 15-24.
- Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R. & Weissman, I.L. (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409-414.
- Rodriguez, J., Esteve, P., Weinl, C., Ruiz, J.M., Fermin, Y., Trousse, F., Dwivedy, A., Holt, C. & Bovolenta, P. (2005) SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nat Neurosci* **8**, 1301-1309.
- Roth, S.Y. & Allis, C.D. (1992) Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? *Trends in biochemical sciences* **17**, 93-98.
- Salinas, P.C. (2007) Modulation of the microtubule cytoskeleton: a role for a divergent canonical Wnt pathway. *Trends in cell biology* **17**, 333-342.
- Salinas, P.C. & Zou, Y. (2008) Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annual review of neuroscience* **31**, 339-358.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Sanes, J.R. & Yamagata, M. (1999) Formation of lamina-specific synaptic connections. *Current opinion in neurobiology* **9**, 79-87.
- Sapir, T., Cahana, A., Seger, R., Nekhai, S. & Reiner, O. (1999) LIS1 is a microtubule-associated phosphoprotein. *European journal of biochemistry / FEBS* **265**, 181-188.

- Satterwhite, E., Sonoki, T., Willis, T.G., Harder, L., Nowak, R., Arriola, E.L., Liu, H., Price, H.P., Gesk, S., Steinemann, D., *et al.* (2001) The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood* **98**, 3413-3420.
- Scheller, M., Huelsken, J., Rosenbauer, F., Taketo, M.M., Birchmeier, W., Tenen, D.G. & Leutz, A. (2006) Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nature immunology* **7**, 1037-1047.
- Schepers, G.E., Teasdale, R.D. & Koopman, P. (2002) Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Developmental cell* **3**, 167-170.
- Schmidt, H., Stonkute, A., Juttner, R., Schaffer, S., Buttgereit, J., Feil, R., Hofmann, F. & Rathjen, F.G. (2007) The receptor guanylyl cyclase Npr2 is essential for sensory axon bifurcation within the spinal cord. *The Journal of cell biology* **179**, 331-340.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5857-5864.
- Schweiger, S. & Schneider, R. (2003) The MID1/PP2A complex: a key to the pathogenesis of Opitz BBB/G syndrome. *Bioessays* **25**, 356-366.
- Schwenk, F., Baron, U. & Rajewsky, K. (1995) A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic acids research* **23**, 5080-5081.
- Senawong, T., Peterson, V.J. & Leid, M. (2005) BCL11A-dependent recruitment of SIRT1 to a promoter template in mammalian cells results in histone deacetylation and transcriptional repression. *Archives of biochemistry and biophysics* **434**, 316-325.
- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S. & Rakic, P. (1999) Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science (New York, N.Y)* **286**, 741-746.
- Setoguchi, T. & Kondo, T. (2004) Nuclear export of OLIG2 in neural stem cells is essential for ciliary neurotrophic factor-induced astrocyte differentiation. *The Journal of cell biology* **166**, 963-968.
- Sheetz, M.P., Wayne, D.B. & Pearlman, A.L. (1992) Extension of filopodia by motor-dependent actin assembly. *Cell motility and the cytoskeleton* **22**, 160-169.
- Shen, K., Teruel, M.N., Subramanian, K. & Meyer, T. (1998) CaMKIIbeta functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKIIalpha/beta heterooligomers to dendritic spines. *Neuron* **21**, 593-606.
- Shieh, P.B., Hu, S.C., Bobb, K., Timmusk, T. & Ghosh, A. (1998) Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* **20**, 727-740.
- Sholl, D.A. (1955) The organization of the visual cortex in the cat. *Journal of anatomy* **89**, 33-46.
- Simon, H.H., Bhatt, L., Gherbassi, D., Sgado, P. & Alberi, L. (2003) Midbrain dopaminergic neurons: determination of their developmental fate by transcription factors. *Annals of the New York Academy of Sciences* **991**, 36-47.
- Sisson, J.C., Field, C., Ventura, R., Royou, A. & Sullivan, W. (2000) Lava lamp, a novel peripheral golgi protein, is required for Drosophila melanogaster cellularization. *The Journal of cell biology* **151**, 905-918.

- Smyth, G.K. (2005) Limma: linear models for microarray data. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*; New York: Springer, S. 397-420.
- Snider, W.D. & McMahon, S.B. (1998) Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* **20**, 629-632.
- Strahl, B.D. & Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- Sun, Y.G. & Chen, Z.F. (2007) A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. *Nature* **448**, 700-703.
- Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M.J., Bae, S.C., Komori, T., Ito, Y. & Littman, D.R. (2002) Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* **111**, 621-633.
- Todd, A.J., McGill, M.M. & Shehab, S.A. (2000) Neurokinin 1 receptor expression by neurons in laminae I, III and IV of the rat spinal dorsal horn that project to the brainstem. *The European journal of neuroscience* **12**, 689-700.
- Urbanek, P., Wang, Z.Q., Fetka, I., Wagner, E.F. & Busslinger, M. (1994) Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* **79**, 901-912.
- Vrieseling, E. & Arber, S. (2006) Target-induced transcriptional control of dendritic patterning and connectivity in motor neurons by the ETS gene Pea3. *Cell* **127**, 1439-1452.
- Wakabayashi, Y., Watanabe, H., Inoue, J., Takeda, N., Sakata, J., Mishima, Y., Hitomi, J., Yamamoto, T., Utsuyama, M., Niwa, O., *et al.* (2003) Bcl11b is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes. *Nature immunology* **4**, 533-539.
- Wakamatsu, Y., Endo, Y., Osumi, N. & Weston, J.A. (2004) Multiple roles of Sox2, an HMG-box transcription factor in avian neural crest development. *Dev Dyn* **229**, 74-86.
- Wang, S., Krinks, M., Lin, K., Luyten, F.P. & Moos, M., Jr. (1997) Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell* **88**, 757-766.
- Wayman, G.A., Impey, S., Marks, D., Saneyoshi, T., Grant, W.F., Derkach, V. & Soderling, T.R. (2006) Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. *Neuron* **50**, 897-909.
- Wiesenfeld-Hallin, Z., Xu, X.J., Crawley, J.N. & Hokfelt, T. (2005) Galanin and spinal nociceptive mechanisms: recent results from transgenic and knock-out models. *Neuropeptides* **39**, 207-210.
- Wine-Lee, L., Ahn, K.J., Richardson, R.D., Mishina, Y., Lyons, K.M. & Crenshaw, E.B., 3rd (2004) Signaling through BMP type 1 receptors is required for development of interneuron cell types in the dorsal spinal cord. *Development (Cambridge, England)* **131**, 5393-5403.
- Wolffe, A.P. & Hayes, J.J. (1999) Chromatin disruption and modification. *Nucleic acids research* **27**, 711-720.
- Wong, R.O. & Ghosh, A. (2002) Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nature reviews* **3**, 803-812.
- Wolf, E., Xiao, C., Fainaru, O., Lotem, J., Rosen, D., Negreanu, V., Bernstein, Y., Goldenberg, D., Brenner, O., Berke, G., *et al.* (2003) Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 7731-7736.

- Yamamoto, S., Nagao, M., Sugimori, M., Kosako, H., Nakatomi, H., Yamamoto, N., Takebayashi, H., Nabeshima, Y., Kitamura, T., Weinmaster, G., *et al.* (2001) Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. *J Neurosci* **21**, 9814-9823.
- Yasui, D., Miyano, M., Cai, S., Varga-Weisz, P. & Kohwi-Shigematsu, T. (2002) SATB1 targets chromatin remodelling to regulate genes over long distances. *Nature* **419**, 641-645.
- Ye, B., Zhang, Y.W., Jan, L.Y. & Jan, Y.N. (2006) The secretory pathway and neuron polarization. *J Neurosci* **26**, 10631-10632.
- Ye, B., Zhang, Y., Song, W., Younger, S.H., Jan, L.Y. & Jan, Y.N. (2007) Growing dendrites and axons differ in their reliance on the secretory pathway. *Cell* **130**, 717-729.
- Yoshida, Y., Han, B., Mendelsohn, M. & Jessell, T.M. (2006) PlexinA1 signaling directs the segregation of proprioceptive sensory axons in the developing spinal cord. *Neuron* **52**, 775-788.
- Yoshimura, M. & Jessell, T. (1990) Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. *The Journal of physiology* **430**, 315-335.
- Yuste, R. & Bonhoeffer, T. (2004) Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature reviews* **5**, 24-34.
- Zakharenko, S. & Popov, S. (1998) Dynamics of axonal microtubules regulate the topology of new membrane insertion into the growing neurites. *The Journal of cell biology* **143**, 1077-1086.
- Zhang, X., Ji, R.R., Nilsson, S., Villar, M., Ubink, R., Ju, G., Wiesenfeld-Hallin, Z. & Hokfelt, T. (1995) Neuropeptide Y and galanin binding sites in rat and monkey lumbar dorsal root ganglia and spinal cord and effect of peripheral axotomy. *The European journal of neuroscience* **7**, 367-380.
- Zhang, X., Xu, Z.O., Shi, T.J., Landry, M., Holmberg, K., Ju, G., Tong, Y.G., Bao, L., Cheng, X.P., Wiesenfeld-Hallin, Z., *et al.* (1998) Regulation of expression of galanin and galanin receptors in dorsal root ganglia and spinal cord after axotomy and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **863**, 402-413.
- Zhang, Y. & Reinberg, D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & development* **15**, 2343-2360.
- Zheng, J.Q., Felder, M., Connor, J.A. & Poo, M.M. (1994) Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature* **368**, 140-144.
- Zhijin, W., Irizarry, R.A., Gentleman, R., Martinez-Murillo, F. & Spencer, F. (2004) A Model Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays. *J. Am. Stat. Assoc.* **99**, 909-917.
- Zhou, Q., Choi, G. & Anderson, D.J. (2001) The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2. *Neuron* **31**, 791-807.

8 Anhang

Im Anhang befinden sich das Abkürzungsverzeichnis, die Tabelle mit den verwendeten Chemikalien, Medien und Enzymen (Tab. A 1) und die Tabelle mit den Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen und Medien (Tab. A 2).

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäuren
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	(engl.: bovine serum albumin) Rinderserumalbumin
cDNA	(engl.: complementary DNA) komplementäre DNA
CDS	(engl.: coding sequence) (Protein-) kodierende (DNA) Sequenz
cRNA	(engl.: complementary RNA) komplementäre RNA
Cy2	Cyanin
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dl	(engl.: dorsal interneurons) dorsale Interneurone; Begriff wird in englischsprachiger Literatur häufig für die Gesamtheit aller Neuronentypen des dorsalen Horns verwendet (Muller 2002)
DIG	Digoxigenin
dIL	(engl.: dorsal interneurons late), späte dorsale Interneurone, siehe Erklärung dl
DIV	(engl.: days <i>in vitro</i>) Anzahl der Tage einer Zellkultur (Altersangabe)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRGs	(engl.: dorsal root ganglia) dorsale Wurzelganglien
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonalstadium (Tag der Embryonalentwicklung nach Vaginalpfropfen)
EST	(engl.: expressed sequence tags) exprimierte Sequenzstellen
EZM	Extrazellulärmatrix
FBS	(engl.: fetal bovine serum) fötales Rinderserum
HBSS	(engl.: Hanks' Balanced Salt Solution) Hanks gepufferte Salzlösung
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria Bertani
MCS	(engl.: multiple cloning site) multiple Klonierungsstellen
MDC	Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch
MEM	Minimum Essential Medium
MilliQ-H ₂ O	Wasser aus Ultrafiltrationsanlage (Name: Millipore)
mRNA	(engl.: messenger RNA) Boten-Ribonukleinsäure
Myc-Tag	Epitop-Tag zur Herstellung von Fusionsproteinen
Na-Ac	Natriumacetat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
Neo	Neomycin
NGF	(engl.: nerve growth factor) Nervenwachstumsfaktor
NLS	nukleäre Lokalisierungssequenz
OD	optische Dichte
P	Postnatalstadium (Tag der postnatalen Entwicklung nach Vaginalpfropfen)
PBS	(engl. phosphate buffered saline) phosphatgepufferte Salzlösung
pBS	pBluescript SK II (+)
PBT _x	PBS-Triton-X 100

PCI	Phenol:Choroform:Isoamylalkohol
PCR	(engl. polymerase chain reaction) Polymerase-Ketten-Reaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly-L-Lysin Hydrobromid
PNS	peripheres Nervensystem
RNA	(engl.: ribonucleic acid) Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	(engl.: rounds per minute) Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	(engl.: sodium dodecylsulfate) Natriumdodecylsulfat
SSC	(engl.: standard saline citrate) Standard-Zitronensäuresalz
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
tRNA	(engl.: transfer RNA) Transfer-Ribonukleinsäure
TUNEL	(engl.: Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) Methode zur Identifikation apoptotischer Zellen
U	(engl.: unit) Einheit der Enzymaktivität
üN	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
Vers.	Version
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
vgl.	vergleiche
YFP	(engl.: yellow fluorescent protein) gelb fluoreszierendes Protein
ZNS	zentrales Nervensystem

Tab. A 1: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien, Medien und Enzyme.

Name	Hersteller
Agar	Roth
Agarose (Elektrophoresequalität)	Invitrogen
Agarose (low-melt 3)	AppliChem
Ammoniumacetat	Roth
Ampicillin	Roth
B-27 (Serumfreies Supplement, 50x)	Invitrogen
Bacto-Hefe-Extrakt	Roth
Bacto-Trypton	Roth
Basislösung Technovit 7100	Heraeus-Kulzer
Borsäure	Merck
BSA	Roth
Chloroform	Merck
D(+)-Glucose (Monohydrat)	Merck
D(+)-Saccharose	Roth
DEPC	Roth
EDTA (Tri-Natrium-Salz)	Roth
Entellan	Merck
Essigsäure	Roth
Essigsäureanhydrid	Merck
Ethanol	Roth
FBS	Sigma-Aldrich
Ficoll	Sigma-Aldrich
Formamid	Roth
Formamid (ultrarein, deionisiert)	Roth
Gelatine	Sigma-Aldrich
Glutaraldehyd (25 %)	Merck
Glycerin	Roth
Hämatoxylin (Hämalaun sauer nach Meyer)	Roth
Härter I	Heraeus-Kulzer

Name	Hersteller
Härter II	Heraeus-Kulzer
HBSS (ohne CaCl ₂ , MgCl ₂ , MgSO ₄ , mit Phenolrot)	Invitrogen
HCl	Roth
Immunomount	Thermo
Isopropanol	Roth
Kanamycin	Sigma-Aldrich
KCl	Merck
Lachsspermien-DNA	Sigma-Aldrich
L-Glutamin, 200 mM (100x)	Invitrogen
MEM mit Earle's-Salzen, L-Glutamin, mit Phenolrot	Invitrogen
Methanol	Roth
MgCl ₂ (Hexahydrat)	Merck
N2-Supplement	Invitrogen
Na ₂ HPO ₄ (Dihydrat)	Roth
NaCl	Roth
NaH ₂ PO ₄ (Dihydrat)	Roth
NaOH	Roth
Natriumacetat	Merck
NBT	Roche
Neurobasal A mit Phenolrot	Invitrogen
NGF 20 µg/ml	Invitrogen?
N-lauroylsarcosine	Sigma-Aldrich
PBS (10x)	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x)	Invitrogen
PFA	Merck
Pferdeserum	PAN Biotech
Phenol	Roth
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1 v/v; 10 mM Tris, pH8, 1mM EDTA)	Invitrogen
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich
Polyvinylpyrrolidon	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Sigma-Aldrich
RNase A	Roche
SDS	Serva
Sigmacote	Sigma-Aldrich
SP6 Polymerase	Roche
T3 Polymerase	Roche
T7 Polymerase	Roche
Taq Polymerase	Invitrogen
Technovit 3040	Heraeus-Kulzer
Technovit 7100 (Hydroxyethylmethacrylat)	Heraeus-Kulzer
Triethanolamin	Sigma-Aldrich
Tri-Natriumcitrat (Dihydrat)	Roth
Tris base	Roth
Triton-X 100	Sigma-Aldrich
Trizol	Invitrogen
tRNA (Hefe)	Invitrogen
Trypsin, (2,5 mM, 10x)	Invitrogen
Tween 20	Roth
Xylol	Roth
Ziegenserum	Bio-Rad

Tab. A 2: In dieser Arbeit verwendete Lösungen und Medien.

Name	Zusammensetzung
Agarose, (low-melt 4 %)	4 g Agarose (low-melt) ad 1xPBS 100 ml autoklavieren
Aussaatmedium (neuronale Primärzellkultur)	750 µl 20 % Glucose 2,5 ml FBS 250 µl 100x Pen/Strep 21,5 ml MEM steril ansetzen, Lagerung: 4 °C
Azetylierungspuffer	4 ml Triethanolamin 0,5 ml HCl (32 oder 37 %) 0,75 ml Essigsäureanhydrid ad 300 ml MilliQ-H ₂ O
B1-Puffer	0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 0,15 M NaCl
Blockierungslösung (Immunhistologie)	10 % bzw. 5 % (v/v) Pferdeserum 0,1 % (v/v) Triton-X 100 in PBS, Lagerung: 4 °C
Blockierungslösung (Immunzytologie)	10 % bzw. 5 % (v/v) Pferdeserum 0,05 % (v/v) Triton-X 100 in PBS, Lagerung: 4 °C
Blockierungslösung (<i>In situ</i> -Hybridisierung auf Kryoschnitten)	10 % (v/v) Ziegen Serum in B1-Puffer, Lagerung: 4 °C
CaCl ₂ (Golgi-Färbung)	0,5 % CaCl ₂ in MilliQ-H ₂ O steril filtrieren
Denhardts-Lösung (50x)	5 g Ficoll 5 g Polyvinylpyrrolidon 5 g BSA ad 500 ml H ₂ O steril filtrieren
EDTA	0,5 M EDTA pH 8,0 mit NaOH einstellen autoklavieren
Eosin-Lösung	0,25 % (w/v) Eosin Y 0,1 M Essigsäure
Fixativ (Golgi-Färbung)	1 % PFA (gelöst in MilliQ-H ₂ O mit NaOH s. Fixativ, 4 % PFA) 0.002 % CaCl ₂ 1 % Glutaraldehyd, kurz vor Fixierung dazugeben in 0.1-0.12 M Natrium-Kaliumphosphatpuffer steril filtrieren, Lagerung: 4 °C
Fixativ, 4 % PFA (Immunhistologie, Histologie, <i>in situ</i> -Hybridisierung)	23,5 ml MilliQ-H ₂ O + 2 g PFA auf 60-70 °C erhitzen und rühren + 50 µl 1 N NaOH zum Lösen dazugeben, dann zu 4 °C stellen + 25 ml 0,2 M Phosphatpuffer + 1,5 ml 5 M NaCl steril filtrieren, Lagerung: 4 °C
H ₂ O _{DEPC}	0,1 % (v/v) DEPC in MilliQ-H ₂ O autoklavieren
Hybridisierungslösung (<i>In situ</i> -Hybridisierung auf Gefrierschnitten, auch Prähybridisierungslösung)	50 ml ultrareines, deionisiertes Formamid 25 ml 20x SSC 10 ml 50x Denhardts Lösung 100 µl 50 mg/ml tRNA (10 min bei 95°C denaturiert) 1 ml 10 mg/ml Lachsspermien-DNA (10 min bei 95 °C denaturiert)

Name	Zusammensetzung
Infiltrationslösung, Histologie	13,9 ml H ₂ O _{DEPC} , Lagerung: -20 °C 100 ml Basislösung Technovit 7100 1g Härter I 10 min lösen Lagerung: 4 °C, dunkel, 4 Wochen
LB-Agar	22 g/l Agar in 1 LB-Medium 500 ml in 1 Literflasche ansetzen autoklavieren, Lagerung: 4 °C Zugabe Ampicillin: 50 µg/ml Zugabe Kanamycin: 50 µg/ml
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefe-Extrakt 10 g NaCl pH 7,5, mit NaOH einstellen ad MilliQ-H ₂ O 1 l autoklavieren, Lagerung: 4 °C Zugabe Ampicillin: 50 µg/ml Zugabe Kanamycin: 25 µg/ml
MgCl ₂ (1 M)	1 M MgCl ₂ ad MilliQ-H ₂ O autoklavieren
NaCl (5 M)	5 M NaCl ad MilliQ-H ₂ O autoklavieren
Natriumazetat	3 M Natriumazetat pH 5,2 steril filtrieren
Natrium-Kaliumphosphatpuffer (0,4 M)	5,3 g NaH ₂ PO ₄ ·x1 H ₂ O 28,0 g K ₂ HPO ₄ , wasserfrei ad MilliQ-H ₂ O 500 ml pH 7,3-7,4 autoklavieren
NTMT (2x)	100 mM NaCl 100 mM Tris·HCl pH 9,5 50 mM MgCl ₂ 0,1 % (v/v) Tween20
PBS (1x)	10xPBS 1:10 verdünnt in MilliQ-H ₂ O autoklavieren, Lagerung: 4 °C
PBS _{DEPC}	0,1 % (v/v) DEPC in 1xPBS, Lagerung: 4 °C
PBTx (Immunhistologie)	0,1 % (v/v) Triton-X 100 in 1xPBS
Phosphatpuffer (0,2 M)	0,2 M NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ pH 7,4 autoklavieren
Polymerisationslösung, Histologie	15 ml Infiltrationslösung 1 ml Härter II gut mischen, nicht vortexen
Präinfiltrationslösung, Histologie	1:1 Ethanol und Basislösung Technovit 7100
Saccharose (20 %)	10 g D(+)-Saccharose ad 0,1 M Phosphatpuffer 50 ml, lösen steril filtrieren, Lagerung: -20 °C
Schwanzpuffer	200 mM NaCl 100 mM Tris·HCl, pH 8,0 5 mM EDTA, pH 8,0 0,2% SDS autoklavieren
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Tri-Natriumcitrat

Name	Zusammensetzung
TE (1x)	pH 7,0 mit HCl autoklavieren 10 mM Tris base, steril 1 mM EDTA, steril, pH 8,0 ad MilliQ-H ₂ O pH 8,0 mit HCl autoklavieren
Tris-HCl	1 M Tris base pH 7,5; 9,5 mit HCl einstellen ad MilliQ-H ₂ O autoklavieren
Vorbereitungslösung	100 ml Technovit 7100 mit 1 g Härter I
Wachstumsmedium (neuronale Primärzellkultur)	500 µl 50x B-27 62,5 µl 200 mM L-Glutamin 250 µl 100x Pen/Strep 12,5 µl NGF 20 µg/ml 250 µl 100x N2-Supplement 23,93 ml Neurobasal A steril ansetzen, Lagerung: 4 °C