

**Aus der
AG Zell- und Neurobiologie
des Instituts für Anatomie
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Mitte**

**Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Molekulare Faktoren der Entwicklung des Gyrus dentatus bei der Maus

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Nadine Krämer
Tierärztin aus Mainz**

Berlin 2008

Journal-Nr.: 3190

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Martens
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. T. Skutella
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Fink

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Mice, hippocampus, embryonic development, neurons, migration, genes;
Genes, Homeobox (MeSH); gene expression; Gene Expression Regulation,
Developmental (MeSH); transcription factors, neuroglia, polymerase chain
reaction, DNA microarrays, in-situ hybridization

Tag der Promotion: 21.04.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im
Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-479-3

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des
Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche
Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung
elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk
berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen
im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären
und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior
written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mbv 2008

Nordendstr. 75 - 13156 Berlin – 030-45494866

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen und Literaturübersicht	4
2.1	Aufbau und Entwicklung des Gyrus dentatus	4
2.2	An den Gyrus dentatus angrenzende Strukturen	7
2.3	<i>Emx2</i> , ein modellhafter Transkriptionsfaktor der Telenzephalonenentwicklung ..	8
2.4	Die <i>Emx2</i> ^{-/-} Mutante	12
2.4.1	Das Mutante Genkonstrukt	12
2.4.2	Defekte in der <i>Emx2</i> ^{-/-} Mutante	13
2.5	Weitere Komponenten der Entwicklungskaskade des Gyrus dentatus und entsprechende Mutanten	14
2.6	Stand der Forschung (Zusammenfassung)	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	16
3.2	Reagenzien, Reaktions-Kits und Chemikalien	17
3.2.1	Rezepte	18
3.3	Tierzucht und Gewinnung von embryonalem Hirngewebe	21
3.4	Genomische DNA-Extraktion	22
3.5	Konzentrationsbestimmung mittels Photometer	23
3.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	23
3.6.1	Genotypisierung mittels PCR	24
3.7	Gelelektrophorese	25
3.8	Mikroarray Analyse	26
3.8.1	Präparation des Hippocampus inklusive der Gyrus dentatus Anlage	26
3.8.2	RNA Isolierung	26
3.8.3	Präparation der antisenseRNA (cRNA oder aRNA)	27
3.8.3.1	Erst-Strang cDNA Synthese	27

3.8.3.2	Zweit-Strang cDNA Synthese	28
3.8.3.3	cDNA Aufreinigung	28
3.8.3.4	In vitro Transkription zur Synthese der aRNA	29
3.8.3.5	aRNA Aufreinigung	29
3.8.4	Fragmentierung der aRNA	30
3.8.5	Hybridisierung und Scannen der Affymetrix GeneChips	30
3.8.6	Array-Daten-Analyse	31
3.8.7	Hierarchische Gruppierung der Mikroarray Daten	31
3.9	Herstellung der Riboproben für die In Situ Hybridisierung	33
3.9.1	RNA Isolierung	33
3.9.2	Reverse Transkription	33
3.9.3	Primer-Design und PCR	34
3.9.4	RNA-Transkription (DIG Labeling)	36
3.10	Kryostat-Schnitte	37
3.11	In Situ Hybridisierung	37
3.11.1	Prähybridisierung und Hybridisierung	38
3.11.2	Posthybridisierung und Antikörperinkubation	38
3.11.3	Waschschritte nach der Antikörperinkubation und Färberaktion	39
3.12	Immunhistochemie	39
3.13	BrdU-Injektionen	40
3.14	TUNEL-Färbung (Nachweis von Zelltod)	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Resultate der In Situ Hybridisierungen	41
4.1.1	<i>Emx2</i> -Expression in der Gyrus dentatus Anlage	41
4.1.2	Untersuchung bekannter Gene im Entwicklungsverlauf	42
4.1.2.1	Der <i>Emx2</i> ^{-/-} Phänotyp ist nicht die Folge einer Entwicklungs- verzögerung	43
4.1.2.2	Die Proliferation in der <i>Emx2</i> ^{-/-} Gyrus dentatus Anlage ist verändert	45
4.1.2.3	Differenzierung (präneurale Genkaskade der bHLH Gene)	46
4.1.2.4	Migration	58
4.1.2.5	Entwicklung der Marginalzonen und Bedeutung der darin vorkommenden <i>Reln</i> -exprimierenden Zellen	66

4.2	Mikroarray Resultate	85
4.3	Bestätigung der Mikroarray Resultate	87
4.3.1	Gene, die an Zellmigration sowie Axonenwachstum und –Guidance beteiligt sind	89
4.3.2	<i>Aes-Grg5</i> , <i>Hipk2</i> und die Notch- und Wnt-Pfade	93
4.3.3	In andere Aspekte der Gehirnentwicklung involvierte Gene	93
4.3.4	Marker Gene für differenzierte Neuronen-Typen	97
4.3.5	Vaskuläre / endotheliale Gene in der äußeren Marginalzone	98
4.3.6	Cajal-Retzius Zell-Marker in der äußeren Marginalzone	99
4.3.7	Glia-Marker in der äußeren Marginalzone	101
5	Diskussion	104
5.1	Bekannte Gene im Entwicklungsverlauf	104
5.1.1	Differenzierung der neuronalen und glialen Vorläufer	104
5.1.2	Gestörte Migration in der <i>Emx2</i> ^{-/-} Mutante	107
5.1.3	Entwicklung der Marginalzonen und Bedeutung der <i>Reln</i> -exprimierenden Zellen	109
5.2	Mikroarray-Analyse	113
5.2.1	Faktoren der Zellmigration sowie von axonalem Wachstum und axonaler Wegfindung	113
5.2.2	<i>Aes-Grg5</i> , <i>Hipk2</i> und die Beteiligung der Notch- und Wnt-Pfade	114
5.2.3	Andere Aspekte der Gehirnentwicklung	116
5.2.4	Marker der äußeren Marginalzone	117
5.2.5	Weiterführende Experimente	120
6	Zusammenfassung	121
7	Summary	123
8	Literaturverzeichnis	125
9	Anhang	145

Publikationen

Danksagung

Selbständigkeitserklärung

Abkürzungsverzeichnis

Soweit es keine deutsche Entsprechung gab, wurde bei der Verwendung von Abkürzungen zum Teil auf die in der Literatur geläufige angelsächsische oder lateinische Version zurückgegriffen. In Klammern findet sich die deutsche Übersetzung.

Abb.	Abbildung
aRNA	antisense RNA (Synonym: cRNA)
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CA	Cornu ammonis (Ammonshorn)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
cRNA	komplementäre RNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DG	dentate gyrus (Gyrus dentatus)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMZ	dentate marginal zone (Marginalzone des Gyrus dentatus)
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	expressed sequence tags
g	Gramm; Erdbeschleunigung
HCl	Salzsäure

Abkürzungsverzeichnis

HE	heterozygot (+/-)
H ₂ O	Wasser
IAA	Isoamylalkohol
IMZ	innere Marginalzone
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	Knockout (-/- Mutante)
M	Molar (mol/l)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar (mmol/l)
mRNA	messenger ribonucleic acid
MWB	Maleat-Waschpuffer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar (µmol/l)
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NBT	4-Nitro blue tetrazolium chloride
NE	Neuroepithel
ng	Nanogramm
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
nm	Nanometer
OD	Extinktion
OMZ	outer marginal zone (äußere Marginalzone)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
pH	Wasserstoffionenkonzentration
®	amtlich registriertes Warenzeichen
RNA	ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)

RT	Reverse Transkription
sec	Sekunden
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Sodium Lauryl Sulfat)
SGB	supragranuläres Bündel
s-Score	durchschnittliche statistische Signifikanz
ssDNA	single-strand DNA (einzelsträngige DNA)
SVZ	subventrikuläre Zone
TE	Tris-EDTA
™	Trademark (unregistriertes Warenzeichen)
Tris	<i>tris</i> -(Hydroxymethyl)aminomethan
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die Entwicklung des Gyrus dentatus ist aus zahlreichen Gründen innerhalb der Neurobiologie ein hochinteressantes Thema. Der Gyrus dentatus ist als Teil der Hippocampus-Formation ein präzise definierter Bereich des Telenzephalons, dessen Morphologie, Entwicklung und Funktion bereits eingehend untersucht worden sind (Caviness, 1973; Stanfield and Cowan, 1979; Stanfield et al., 1979; Altman und Bayer, 1990a,b). Er bietet somit ein gutes Modell bei Fragen bezüglich der Kortextentwicklung, insbesondere der Neurogenese, neuronalen Migration, Arealisierung, axonalen Wegfindung und neuronalen Plastizität, die sich in diesem System hervorragend untersuchen lassen. Das makroskopisch erkennbare Charakteristikum des Gyrus dentatus ist seine Körnerzellschicht. Die Besonderheit in seiner Entwicklung stellen migrierende Vorläuferzellen dar, die sowohl postmitotische, unreife Körnerzellen, welche zur Körnerzellschicht wandern, als auch weitere mitotische Vorläufer produzieren, die eine sekundäre und tertiäre Matrix bilden (Altman und Bayer, 1990a). Zusätzlich bringen die neuronalen Vorläuferzellen des Gyrus dentatus auch noch postnatal und im Adulten funktionelle Neurone hervor (Altman und Das, 1965; Stanfield und Trice, 1988; van Praag et al., 2002) und sie können die Neuronen-Produktion auf bestimmte Reize hin reaktivieren (Kempermann et al., 1998).

Das Ziel dieser Arbeit war, molekulare Faktoren zu identifizieren und deren Funktionen zu analysieren, die maßgeblich an der Entwicklung des Gyrus dentatus beteiligt sind und somit für dessen ordnungsgemäßen Aufbau essentiell sind. Ein Schlüssel-Regulator der hippocampalen Entwicklung ist der Transkriptionsfaktor *Emx2*, ein Homöobox Gen beim Vertebraten, das mit dem Drosophila gap Gen *ems* verwandt ist (Simeone et al., 1992a,b), im Neuroepithel des Telenzephalons, einschließlich des Gyrus dentatus exprimiert wird (Simeone et al., 1992a,b; Gulisano et al., 1996; Mallamaci et al., 1998) und dessen genaue Funktion noch nicht vollständig geklärt ist (Gangemi et al., 2001; Heins et al., 2001; Galli et al., 2002; Hamasaki et al., 2004; Shimogori et al., 2004). In der *Emx2*^{-/-} Mutante fehlt ein morphologisch erkennbarer Gyrus dentatus. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich, dass das Neuroepithel, die subventrikuläre Zone und ein Migrationsweg vorhanden sind, jedoch abnorme Veränderungen aufweisen. Das Neuroepithel erscheint durch die anormal große Menge sich teilender Zellen verdickt, erzeugt aber nur eine reduzierte Anzahl der speziellen migrierenden Vorläufer des Gyrus dentatus (Oldekamp et al., 2004). Der Migrationsweg ist verkümmert, da diese Vorläufer offensichtlich in ihrer Migration am Übergang zwischen radialer und tangentialer

Migrationsstraße geblockt werden (Tole et al., 2000; Oldekamp et al., 2004). Die Körnerzellschicht hingegen fehlt bei der *Emx2*^{-/-} Mutante gänzlich (Pellegrini et al., 1996; Yoshida et al., 1997). Die wenigen Körnerzellen, die produziert werden, sind nicht vollständig differenziert (Savaskan et al., 2002). Ebenso fehlt die Einfaltung zur Bildung der hippocampalen Fissur, die einen halben Gyrus (den Gyrus dentatus) erzeugt und dem Hippocampus seine charakteristische Erscheinung verleiht. Die in engem Kontakt mit der sich entwickelnden Fissur stehende Marginalzone (äußere Marginalzone oder OMZ), die für die hippocampale Entwicklung äußerst wichtig ist, da aus ihr das Stratum lacunosum-moleculare, eine spezifische Schicht der CA (Cornu ammonis) Region, entsteht (Soriano et al., 1994), scheint in der *Emx2*^{-/-} Mutante ebenfalls verändert zu sein (Oldekamp et al., 2004).

Welche Rolle *Emx2* in der frühen dorsalen telenzephalen Regionalisierung spielt, beginnt bereits aufgeklärt zu werden (Theil et al., 2002; Fukuchi-Shimogori und Grove, 2003; Shimogori et al., 2004). Jedoch sind die unmittelbaren Ursachen des *Emx2*^{-/-} hippocampalen Phänotyps ebenso wenig bekannt wie die spezifischen hippocampalen Entwicklungsprozesse unter der Regulation von *Emx2*, so sind bisher beispielsweise noch keine down-stream Gene von *Emx2* charakterisiert worden.

In dieser Arbeit wurden zunächst aus der Literatur bekannte Gene mittels In Situ Hybridisierungen im Entwicklungsverlauf des Gyrus dentatus untersucht, um mehr über die präzisen Wege zu erfahren, über die das *Emx2*-Defizit zu dem Gyrus dentatus spezifischen Phänotyp führt. Analysiert wurden dabei die für die Entwicklung grundsätzlich essentiellen Funktionskreise der Proliferation, Differenzierung und Migration bei der *Emx2*^{-/-} Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die Expressionsmuster der bHLH (basic-helix-loop-helix) Gene waren in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, da die pro-neurogenetischen, anti-neurogenetischen und mit der Differenzierung in Zusammenhang stehenden Faktoren dieser Genfamilie eine Kaskade bilden, welche für die Produktion neuronaler Vorläuferzellen und deren Differenzierung zu reifen Neuronen notwendig ist (Cau et al., 1997, 2000; Perron et al., 1999; Torii et al., 1999; Cai et al., 2000; Pleasure et al., 2000; Bertrand et al., 2002; Schuurmans und Guillemot, 2002). Weiterhin wurden Faktoren der glialen Differenzierung untersucht, um die Entwicklung und den Zustand des für die Migration wichtigen Gerüsts der Radialen Glia beurteilen zu können. Die Entwicklung der hippocampalen Fissur und der mit ihr in Verbindung stehenden Marginalzonen (äußere Marginalzone (OMZ) und Marginalzone des Gyrus dentatus (DMZ)), sowie der Zustand der in diesem Areal zahlreich vertretenen *reelin* (*Reln*)-exprimierenden Neurone, von denen einige - wie in der neokortikalen

Marginalzone - Cajal-Retzius Zellen sind (Soriano et al., 1994; Soriano und Del Rio, 2005), wurde ebenfalls mit Hilfe von In Situ Hybridisierungen verschiedener Marker-Gene genauer analysiert.

Schließlich wurde durch Screening von DNA Mikroarrays nach weiteren Genen gesucht, die eine zentrale Bedeutung in der Entwicklung des Gyrus dentatus haben könnten und somit quantitative Unterschiede in der Expression zwischen Wildtyp und *Emx2*^{-/-} Hippocampus aufweisen. Die hierbei gewonnenen Daten wurden mittels Bioinformatik auf ihre biologische Relevanz hin überprüft, entsprechend geordnet und zum Teil durch In Situ Hybridisierungen bestätigt.

2 Grundlagen und Literaturübersicht

2.1 Aufbau und Entwicklung des Gyrus dentatus

Der Gyrus dentatus ist neben Hippocampus proper (unterteilt in die Regionen CA1, CA2 und CA3) und Subikulum Teil der Hippocampusformation, die zum dreischichtig aufgebauten Allokortex des Telenzephalons gehört und besteht aus 1) Molekularschicht (molecular layer, Stratum moleculare, Lamina molecularis), 2) Körnerzellschicht (dentate granule cell layer, Stratum granulosum, Lamina granularis) und 3) polymorpher Schicht (Hilus, CA4-Region, Lamina plexiformis). Die Molekularschicht ist relativ zellarm und wird unterteilt in äußere (OML, outer molecular layer) und innere (IML, inner molecular layer) Molekularschicht. Sie enthält die Dendriten der Körnerzellen, Interneurone und die axonalen Terminierungen hauptsächlich der entorhinalen, kommissuralen und septalen Projektionen in diese Schicht. Die Körnerzellschicht besteht aus den für den Gyrus dentatus typischen Körnerzellen, die mit ihren Axonen den Moosfasertrakt, eine Verbindung zu den Pyramidenzellen von CA3, bilden.

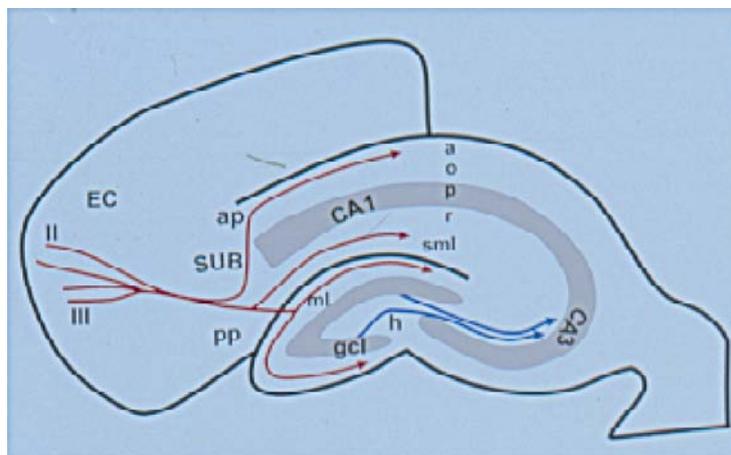


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Hippocampusformation (Skutella und Nitsch, 2001)

Die Afferenzen aus dem entorhinalen Kortex (rot dargestellt) erreichen den Hippocampus über den Tractus perforans und den Tractus alveolaris. Die Axone der Körnerzellen bilden die Moosfasern (blau dargestellt), die auf die CA3-Region projizieren.

Abkürzungen: a, Alveus; ap, Tractus alveolaris; CA, Cornu ammonis (Ammon's Horn); EC, entorhinaler Kortex; gcl, granular cell layer (Körnerzellschicht); h, Hilus; ml, molecular layer (Molekularschicht); o, Stratum oriens; p, Stratum pyramidale; pp, Tractus perforans; r, Stratum radiatum; sml, Stratum lacunosum-moleculare; SUB, Subikulum

Der Gyrus dentatus besitzt ein eigenes, unmittelbar der Fimbria anliegendes Neuroepithel, das eine spezifische Subdomäne des kortikalen Neuroepithels mit einem eigenen Bauplan darstellt und ein spezifisches Expressionsprofil aufweist, wodurch es schon frühzeitig vom Neuroepithel des übrigen Hippocampus abgegrenzt werden kann. Aus der subventrikulären Zone des Neuroepithels wandern mitotische, körnerzell-generierende Vorläuferzellen in die Gyrus dentatus Anlage ein. Die Wanderung beginnt bei der Maus am Embryonaltag 14.5 (E14.5) und erreicht ihren Höhepunkt bei E18.5 (Bagri et al., 2002). Die migrierenden Vorläuferzellen etablieren eine weitere ektopische proliferative Zone im späteren Hilus des Gyrus dentatus, die tertiäre Matrix, welche im Adulten zeitlebens die Körnerzellproduktion aufrecht erhält (Pleasure et al., 2000). Ähnlich wie in anderen kortikalen Regionen wird die spätere Topographie des Gyrus dentatus zunächst von Cajal-Retzius Zellen und radialen Gliazellen besetzt, die an der Wanderung der Vorläuferzellen und der späteren Morphogenese beteiligt sind (Pleasure et al., 2000). Postnatal siedeln sich diese Vorläuferzellen in der subgranulären Zone direkt unter der neu entstandenen Körnerzellschicht an. Entsprechend lassen sich folgende Zonen des Gyrus dentatus unterscheiden:

- 1) Neuroepithel (ventrikuläre Zone, primäre Matrix)
- 2) Subventrikuläre Zone
- 3) Radiale Migrationsstraße
- 4) Tangentiale Migrationsstraße
- 5) Tertiäre Matrix (Hilus und subgranuläre Zone)
- 6) Körnerzellschicht (mit ventralem und dorsalem Blatt)

Neuroepithel und subventrikuläre Zone werden unter dem Begriff „germinative Zone“ zusammengefasst. Als sekundäre Matrix werden die subventrikuläre Zone sowie die Migrationsstraßen bezeichnet.

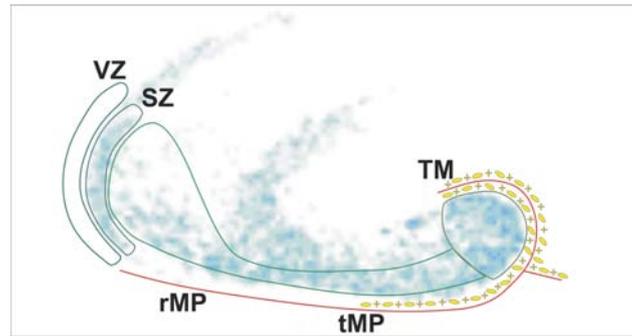


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zonen des sich entwickelnden Gyrus dentatus

Abkürzungen: rMP, radiale Migrationsstraße; SZ, subventrikuläre Zone; TM, tertiäre Matrix; tMP, tangentielle Migrationsstraße; VZ, ventrikuläre Zone; rot: Hirnhaut und hippocampale Fissur; gelb: Cajal-Retzius Zellen.

Die Notch Rezeptoren und ihre Liganden: Schrittweise Markierer der Entwicklung des Gyrus dentatus

Notch Rezeptoren und deren Liganden gehören zu den Molekülen, die allgemein an der kortikalen Differenzierung beteiligt sind (Lee, 1997). Diese Moleküle kontrollieren den zeitlichen Ablauf der Neurogenese. Die den Notch Rezeptoren nachgeschalteten Proteine schließen eine Anzahl von Molekülen mit gemeinsamen Motiven ein, die eine grundlegende transkriptionelle Regulationsdomäne und HLH-Protein Interaktionsdomäne beinhalten. Diese Proteine werden als basic helix-loop-helix- Proteine (bHLH) bezeichnet. Zu dieser Familie gehören einerseits anti-neurogenetische Mitglieder, u.a. das Homologon zu *Drosophila hairy* und enhancer of split (*Hes1* und *Hes5*) und extramacrochaete (*Id1*, *Id2*, *Id3*, *Id4*). Die *Hes* Gene werden im Anschluß an eine *Notch* Aktivierung hochreguliert und blockieren die Differenzierung der Vorläuferzellen in ein neuronales Stadium. Die pro-neurogenetischen bHLH Gene umfassen Homologe von *Drosophila atonal* und werden in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe, als Gruppe der neuronalen Determinationsgene bezeichnet, ist an der Einleitung des neuronalen Differenzierungsprozesses beteiligt und schließt Gene, wie z.B. *Neurogenin1* (*Ngn*) und *Ngn2* ein. Die zweite Gruppe umfasst neuronale Differenzierungsgene und beinhaltet andere atonale Homologe, wie *NeuroD/BETA2*, *NeuroD2/NDRF*, *Math2/Nex1* und *Math3*. Man vermutet, dass diese Gruppe spätere Ereignisse in der neuronalen Differenzierung reguliert.

Pleasure et al. (2000) haben ein Modell einer sequentiellen Expression von Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung des Gyrus dentatus aufgestellt. Danach ist zunächst das Neuroepithel des Gyrus dentatus durch die Expression der Gene *Id2*, *Id3*, *Hes5*

und *Mash1* charakterisiert. In Reihenfolge der Expression und Topographie werden im Körnerzellen generierenden Neuroepithel des Gyrus dentatus zunächst die Gene *Ngn2*, *Hes5*, *Id2* und *Id3* exprimiert. Im Anschluß ist in der subventrikulären Zone die Expression von *Mash1*, *Mash3*, *Notch1* und weiterhin *Hes5*, *Id2*, *Id3* zu beobachten. Es ist bekannt, dass *Mash1* in mitotischen Vorläuferzellen des Nervensystems exprimiert wird. Nachdem die Zellen die subventrikuläre Zone verlassen haben, exprimieren die ersten Körnerzellen *NeuroD*. Dabei ist nach Pleasure et al. unklar, ob die *NeuroD*-positiven Zellen direkt aus dem Neuroepithel oder über ein Vorläuferzellstadium entstehen. Es ist davon auszugehen, dass die an der Migration in Richtung späterem Gyrus dentatus beteiligten Zellen aus einer Mischung aus Vorläuferzellen und neugeborenen Neuronen mit unterschiedlichen molekularen Profilen bestehen. Im Migrationsweg werden nach Pleasure et al. die Gene *Mash1*, *Notch1* und *NeuroD*, in der tertiären Matrix und in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus hingegen *Prox1*, *NeuroD* und *NeuroD2* exprimiert. D.h. Zellen die ihren Zielort erreicht haben, exprimieren den körnerzellspezifischen Marker *Prox1*, ein weiteres Homöoboxprotein, homolog zu dem Drosophila Gen *prospero*. Zellen, die einen Vorläuferstatus beibehalten haben, exprimieren weiterhin *Mash1* und bilden die tertiäre Matrix nachdem sie die Gyrus dentatus Anlage erreicht haben. In dieser tertiären Matrix werden fortlaufend weitere Körnerzellen aus *Mash1* positiven Vorläuferzellen innerhalb der subgranulären Zone gebildet. Diese neugeborenen Körnerzellen migrieren dann radial in den inneren Abschnitt der Körnerzellschicht, wobei sie ebenfalls zunächst *NeuroD*, dann *NeuroD2* und zuletzt *Prox1* exprimieren. Dieses allgemeine Expressionsmuster wird im adulten System beibehalten (Kempermann, 2006).

2.2 An den Gyrus dentatus angrenzende Strukturen

Die dem Gyrus dentatus benachbarten Strukturen, insbesondere die hippocampale Fissur und die Marginalzonen, sind aufgrund der bestehenden Wechselwirkungen für dessen normgerechte Entwicklung von großer Bedeutung und werden daher an dieser Stelle ebenfalls kurz dargestellt.

Während die hippocampale Fissur in adulten Gehirnen lediglich als eine „virtuelle Linie“ angesehen werden kann (Sievers et al., 1992), ist sie in embryonalen Gehirnen tatsächlich ein echter Spalt, der von spezifischen Glia-Zellen und deren Fortsätzen sowie von Blutgefäßen besetzt ist (Rickmann et al., 1987; Sievers et al., 1992). Während der Entwicklung besteht der

Bereich um die hippocampale Fissur herum aus einem zentralen Gerüst aus radialer Glia (Rickmann et al., 1987; Sievers et al., 1992) und zwei angesetzten Marginalzonen – der äußeren Marginalzone (outer marginal zone, OMZ) und der Marginalzone des Gyrus dentatus (dentate marginal zone, DMZ). Diese werden umgeben von der inneren Marginalzone (IMZ) (Abb. 3). Die IMZ, OMZ und DMZ entstehen als Spezialisierungen der telencephalen Marginalzone und jede von ihnen wird von spezifischen neuronalen Populationen besiedelt und differenziert sich in eine eigene hippocampale Schicht, Stratum radiatum, Stratum lacunosum-moleculare bzw. Molekularschicht des Gyrus dentatus (Soriano et al., 1994). Jede dieser Schichten hat spezialisierte Zytoarchitektur, Konnektivität und Funktionen (Amaral und Witter, 1995).

Die Fimbria ist ein der Hippocampusformation medial anliegendes Faserbündel, welches in den Fornix hippocampi, das wichtigste efferente Bündel des Hippocampus, übergeht.

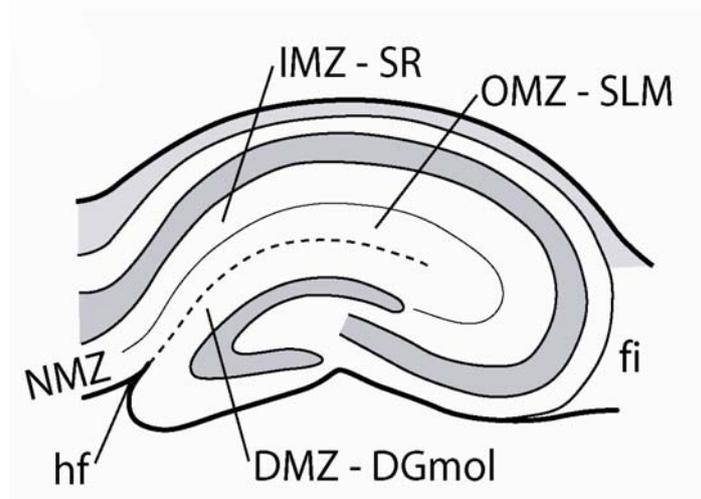


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Marginalzonen um die sich entwickelnde Fissur

Abkürzungen: DGmol, Molekularschicht des Gyrus dentatus; DMZ, Marginalzone des Gyrus dentatus; fi, Fimbria; hf, hippocampale Fissur; IMZ, innere Marginalzone; NMZ, neokortikale Marginalzone; OMZ, äußere Marginalzone; SLM, Stratum lacunosum-moleculare; SR, Stratum radiatum

2.3 *Emx2*, ein modellhafter Transkriptionsfaktor der Telenzephalonenwicklung

Die Maus *Emx*-Gen-Familie besteht aus zwei Mitgliedern, *Emx1* und *Emx2*. Diese Homöoboxgene sind homolog zum *Drosophila Ems* (empty spiracles) Kopfgene (Simeone et al., 1992). Dieses Gen ist für die Segmentierung des *Drosophila* Gehirns verantwortlich. Zwei

Ems-homologe Gene wurden im Menschen¹, in *Xenopus*, im Zebrafisch, und im Wassermolch entdeckt. Im Nervensystem wird *Emx2* angrenzend und überlappend zur Expression von *Emx1* im frühen dorsomedialen Telenzephalon im Bereich der pallio-choroidalen Grenze in proliferierenden Neuroblasten exprimiert. Bei der Maus sind zum Zeitpunkt E14.5 starke Hybridisierungssignale im primären proliferativen Neuroepithel, in der subventrikulären Zone und im Migrationsweg des Gyrus dentatus nachweisbar. An E15.5 sind immunhistochemische Signale des Emx2-Proteins in Zellen der Gyrus dentatus Anlage ausgehend vom Neuroepithel bis zur Marginalzone, in der Cajal-Retzius Zellen liegen, lokalisiert (Cecchi und Boncinelli, 2000). Bei E18.5 sind neben den erwähnten Strukturen die tertiäre Matrix, die Körnerzellschicht und die Marginalzone markiert (Pellegrini et al., 1996). Am postnatalen Tag 5 (P5) beschränkt sich die Expression von *Emx2* auf vereinzelte Zellen in der Körnerzellschicht und der subgranulären Zone (Cecchi und Boncinelli, 2000).

Entstehung kortikaler Areale

Das dorsomediale Telenzephalon schließt das dorsale Pallium (Isokortex) und das mediale Pallium (Hippocampus proper oder Cornu ammonis und den Gyrus dentatus) ein. Diese morphologisch und funktional unterschiedlichen Regionen des Kortex werden während der Entwicklung über eine Reihe von Teilschritten, die mit der Ausbildung der offenen undifferenzierten Neuralplatte beginnen, determiniert und differenziert.

Am Anfang dieses Prozesses werden Signalmoleküle von Zentren der Musterbildung des Telenzephalons sekretiert (Übersichtsartikel von Rubenstein and Beachy, 1998), welche positionelle Informationen liefern und das regionale Wachstum in der Kortexanlage regulieren. Die Interpretation dieser Signale durch die Kortexanlage lässt eine Spezies-spezifische Protokarte entstehen (Grove und Fukuchi-Shimogori, 2003). Bisher ist bei folgenden Molekülen eine Beteiligung an der Musterbildung bekannt: „bone morphogenetic proteins“ (BMPs), „growth differentiation factors“ (GDF), sowie „fibroblast growth factor“ (FGF), „sonic hedgehog“ (SHH), „epidermal growth factor“ (EGF) und „wingless-type MMTV integration site family“ (WNT) Proteine (Furuta et al., 1997; Tole et al., 1997; Grove und Tole, 1999; Grove und Fukuchi-Shimogori, 2003). Als Zentren der Musterbildung

¹ Bei Schizephalien bestehen Mutationen im *Emx2* Gen. Es handelt sich dabei um eine Typ II Schizenzephalie mit einer holohemisphärischen Spalte im zerebralen Kortex, die mit Liquor gefüllt ist. Die Patienten sind mental retardiert, zeigen Krampfanfälle und Spastik, sind häufig unfähig zu gehen oder zu sprechen und sind blind. (Faiella et al., 1997, Brunelli et al., 1996).

werden bisher der anteriore Pol der Kortexanlage, das Hem und das sogenannte Anti-Hem angesehen (Grove und Fukuchi-Shimogori, 2003).

Diese Signale aktivieren oder unterdrücken die Expression von Transkriptionsfaktoren, welche die weitere Abfolge der kortikalen Regionalisierung u.a. über Kontrolle von Zellproliferation (Rakic, 1995), Lamination, Ausbildung radialer Glia und den topographisch begrenzt entstehenden neuronalen Komponenten jedes bestimmten Areals regulieren.

Bisher sind eine Reihe von regulatorischen Genen isoliert und charakterisiert worden, die eine Funktion bei Aufbau und Aufrechterhaltung der Identität anteriorer Hirnareale besitzen (Übersichtsartikel von Shimamura and Rubenstein, 1997). Einige von diesen Genen sind Homöoboxgene, die wiederum zu verschiedenen Genfamilien gehören. Die zwei *Emx* Gene (Simeone et al., 1992a) bestimmen während der Telenzephalonenwicklung ein bestimmtes Gebiet aufgrund ihrer begrenzten Expression im dorsalen Vorderhirn. *Emx2* wird im dorsalen und ventralen Neuroektoderm des sich bildenden Vorderhirns mit einer posterioren Abgrenzung innerhalb des Dachs des Dienzephalons exprimiert. In dieser Arbeit ist dabei die Expression von *Emx2* im medialen pallialen Neuroepithel, aus dem der Hippocampus proper und der Gyrus dentatus entstehen, von besonderem Interesse.

***Emx2* in der Entwicklung des Gyrus dentatus**

Aufgrund von Experimenten mit segment-spezifischen Markergenen des Hippocampus stellten Tole et al. (1997, 2000) die Hypothese auf, dass *Emx2* für normales Wachstum und Reifung des Hippocampus und des angrenzenden medialen Neokortex, aber nicht für die Spezifizierung von Zellen der verschiedenen hippocampalen Segmente verantwortlich ist. Dies betrifft auch die Gyrus dentatus Region. Die Gyrus dentatus Zellen sind in ihrer entsprechenden anatomischen Lage (Neuroepithel-Migrationsweg) vorhanden, formen aber keinen morphologisch erkennbaren Gyrus dentatus. Die kortikale Neurogenese ist bei Mäusen normalerweise um E16.5 abgeschlossen (Angevine, 1965). Bei *Emx2* Mutanten hingegen nimmt zu diesem Zeitpunkt die markierte ventrikuläre Zone noch einen großen Teil der Gesamtdicke des embryonalen Kortex ein, ähnlich wie bei Kontrolltieren etwa 2 bis 3 Tage früher. Dies könnte bedeuten, dass es in *Emx2* Mutanten zu einer Verzögerung der kortikalen Neurogenese kommt oder die Zellen den Zellzyklus nicht zeitgemäß verlassen, um aus der ventrikulären Zone auswandern zu können. Übereinstimmend damit ist das Auftreten einer anderen hippocampalen Region (CA3) in *Emx2*^{-/-} Mutanten ebenfalls zeitlich verzögert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass *Emx2* nicht für die Bestimmung (Determination) des Gyrus dentatus unentbehrlich ist, aber für dessen Differenzierung.

***Emx2* in der Entwicklung der Afferenzen zum Gyrus dentatus**

Die Afferenzen zum Gyrus dentatus terminieren laminaspezifisch. Die Lamination scheint unabhängig von der Entwicklung der finalen Zielzellen bzw. der Entwicklung ihrer Dendriten zu sein. Entorhinale Fasern finden z.B. ihr laminäres Zielgebiet in der äußeren Molekularschicht auch nach Zerstörung der Körnerzellen des Gyrus dentatus durch Bestrahlung, nach veränderter Körnerzellmigration in der „Shaking Rat Kawakami“ oder nach veränderter Körnerzelldifferenzierung in der *NeuroD*^{-/-} transgenen Maus (Schwab et al., 2000).

Die Marginalzonen von Hippocampus und Gyrus dentatus werden während der Entwicklung vorübergehend von Cajal-Retzius Zellen besetzt und differenzieren sich in Stratum lacunosum-moleculare bzw. die äußere Molekularschicht des Gyrus dentatus, beides Terminationsgebiete entorhinaler Projektionen in den Hippocampus. Von del Rio et al. (1996) konnte gezeigt werden, dass transient im Entwicklungsprozess des Gyrus dentatus vorkommende Neurone, Cajal-Retzius Zellen, positionelle Informationen für einwachsende entorhinale Neurone, aber nicht für kommissurale Neurone besitzen. Nach Ausschaltung dieser Neurone mit Hilfe von spezifischen Neurotoxinen konnte das spezifische Terminieren von entorhinalen Afferenzen in der äußere Molekularschicht des Gyrus dentatus in der Gewebeschnitt-cokultur verändert werden. Es ist davon auszugehen, dass Cajal-Retzius Zellen zusätzliche attraktive Wegfindungsfaktoren exprimieren könnten.

Emx2 ist somit aufgrund seiner Beteiligung an der Differenzierung der Cajal-Retzius Zellen für eine korrekte Termination der entorhinalen Axone unentbehrlich.

***Emx2* und Cajal-Retzius Zellen im Isokortex**

Emx2 wird nicht nur von proliferierenden kortikalen Zellen, sondern auch von Cajal-Retzius Zellen der marginalen Zone exprimiert (Mallamaci et al., 1998; Pellegrini et al., 1996; Yoshida et al., 1997). Cajal-Retzius Zellen sind eine transient auftretende Zellpopulation, die eine Funktion in der Koordination der Migration von kortikalen Neuronen entlang der radialen Glia u.a. über das *Reelin* Gen besitzen (Marin-Padilla, 1998). Im Kortex existieren mindestens zwei Populationen von Cajal-Retzius Zellen, die sich aufgrund ihres zeitlichen Auftretens differenzieren lassen. Die später auftretenden Cajal-Retzius Zellen fehlen im

Kortex des *Emx2* Knockouts (Mallamaci et al., 2000b). Dies hat zur Folge, dass die späte Entwicklung von radialer Glia beeinflusst wird und damit später geborene Zellen der neuronalen Platte während ihrer Migration nicht durch die früher geborenen hindurchwandern („inside-out layering“), sodass die kortikale Laminierung gestört ist (Mallamaci et al., 2000b). Des weiteren konnte von Bagri et al. (2002) gezeigt werden, dass das Zytokin SDF-1, welches von Cajal-Retzius Zellen exprimiert wird, als chemoattraktiver Faktor die Migration von Körnerzellvorläufern vom Neuroepithel in die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus beeinflusst. CXCR4, der Rezeptor für SDF-1 wird von den migrierenden Körnerzellvorläufern exprimiert. In *CXCR4*^{-/-} Mutanten ist der Gyrus dentatus verkleinert und bildet nicht seine typische Hufeisenform aus. Die Anzahl der sich teilenden Zellen in der Migrationsstrasse und im Gyrus dentatus sind hier vermindert und die Zellen scheinen sich zu früh zu differenzieren. Somit besiedeln nicht genügend Vorläuferzellen den sich entwickelnden Gyrus dentatus, um seine normale Ausbildung zu gewährleisten (Lu et al. 2002).

2.4 Die *Emx2*^{-/-} Mutante

2.4.1 Das Mutante Genkonstrukt

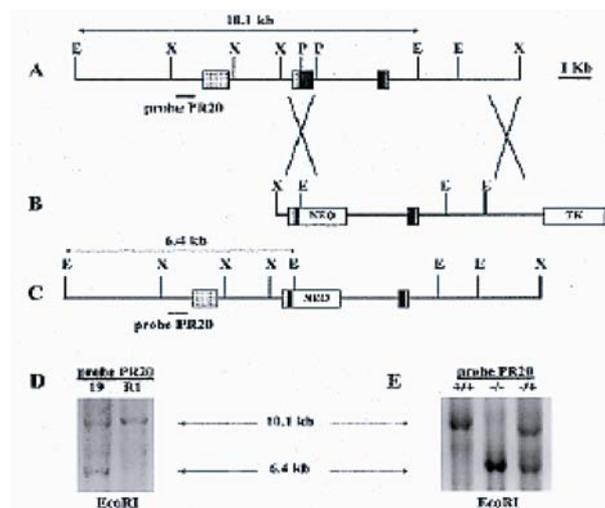


Abbildung 4: Gewinnung von *Emx2* Mutanten Mäusen (Pellegrini et al., 1996)

(A) *Emx2*-Genkarte. Exons werden durch helle Kästchen dargestellt. Die schwarzen Kästchen repräsentieren das 5' und 3' Ende der Homöobox. (B) Bei dem Zielkonstrukt handelt es sich um einen Austausch-Vektor, der ein

Neomycin Resistenz Gen (NEO) trägt. Dieser ersetzt die zweite und einen Teil der dritten Helix der Homöobox. Das Thymidinkinase-Gen (TK) wurde an einem Ende des Konstrukts eingefügt. (C) Das mutierte Allel nach der Rekombination. E, *EcoRI*; P, *PvuII* (weitere *PvuII* Schnittstellen sind nicht dargestellt); X, *XhoI*. (D, E) Southern blot Analyse der R1-ES Clone DNA (D) und der F₂-Generation DNA (E), genotypisiert mit der PR20 Sonde nach *EcoRI* Verdau. In D wird die Wildtyp Bande (10,1 kb) in der Eltern R1-ES Zelllinie dargestellt, sowie die Banden von Wildtyp und mutiertem Allel (6,4 kb) im Klon Nummer 19. (E) Resultate der F₂-Generation, Wildtyp (+/+), homozygot (-/-), heterozygot (+/-)

2.4.2 Defekte in der *Emx2*^{-/-} Mutante

In *Emx2*^{-/-} Mutanten fehlt ein morphologisch identifizierbarer Gyrus dentatus (Pellegrini et al. 1996; Yoshida et al. 1997). Bei näherer Betrachtung ist histologisch bei E14.5 bis E18.5 *Emx2*^{-/-} Mutanten zu erkennen, dass die ventrikuläre Zone, aus der Hippocampus und Gyrus dentatus entstehen, vermindert ist, sich jedoch eine subventrikuläre Zone, ein Migrationsweg und eine rudimentäre tertiäre Proliferationszone entwickeln. Letztendlich ist die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus bei der Mutante vollkommen abwesend. Da homozygote Embryos perinatal aufgrund erheblicher Veränderungen des Urogenitalsystems (Fehlen der Nieren, Ureter, Gonaden und des Genitaltraktes) (siehe auch Miyamoto et al., 1997) sterben, die vollständige Entwicklung des Gyrus dentatus jedoch erst postnatal abgeschlossen ist, war es bisher nicht möglich, die komplette Entwicklung des Gyrus dentatus in vivo zu untersuchen.

Von Tole et al. (2000) wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Mutante Gyrus dentatus zwar korrekt spezifiziert ist, aber unter einem Entwicklungsproblem leidet, das den gesamten medialen Kortex betrifft. Dem entsprechend zeigt zum Beispiel die CA Region (Cornu Ammonis, Ammonshorn) des *Emx2*^{-/-} Hippocampus eine reduzierte und möglicherweise unreife hippocampale Platte. Es gibt Hinweise dafür, dass dieses Problem ein Defekt in der kortikalen positionellen Informations-Signal-Kaskade sein könnte, vermittelt durch Fgf8 (Fukuchi-Shimogori und Grove, 2001; Shimogori et al., 2004) und möglicherweise ebenfalls durch Wnt Proteine (Muzio et al., 2002a; Ligon et al., 2003).

Übereinstimmend damit wurde bereits vielfach von Defekten in der neokortikalen Regionalisierung bei der *Emx2*^{-/-} Mutante berichtet (Bishop et al., 2000, 2002; Mallamaci et al., 2000a,b; Fukuchi-Shimogori und Grove, 2001, 2003; Muzio et al., 2002a,b; Muzio und Mallamaci, 2003).

„Postnatale“ Entwicklung des Gyrus dentatus in der *Emx2*^{-/-} Mutante in organotypischer Schnittkultur

Da *Emx2*^{-/-} Mutanten perinatal aufgrund eines urogenitalen Defektes sterben, haben Savaskan et al. (2002) die postnatale Entwicklung mit Hilfe von organotypischen Schnittkulturen simuliert und damit gezeigt, dass bei *Emx2*^{-/-} Mutanten 1) die neuronale Differenzierung der Körnerzellen und 2) der Aufbau von lamina-spezifischen Projektionen in späten embryonalen Stadien gestört sind.

2.5 Weitere Komponenten der Entwicklungskaskade des Gyrus dentatus und entsprechende Mutanten

1) ***Gli3***. *Gli1-3* kodieren für konservierte Zinkfinger-Transkriptionsregulatoren, wobei *Gli3* als wesentlicher Regulator für die Entwicklung des dorsalen Telenzephalons verantwortlich ist (Theil et al., 1999). In *Xt^J/ Xt^J* Mäusen fehlt der komplette Hippocampus mit Ammonshorn, Gyrus dentatus und der Plexus choroideus der Seitenventrikel. Weiterhin kommt es zu einem Expressionsverlust der *Emx1* und *Emx2* Gene.

2) ***Wnt3a***. Dieses Gen, das sehr früh (ab E9.75) und ausschließlich im kortikalen Hem exprimiert wird (Grove et al., 1998; Lee et al., 2000), ist für die Entwicklung des Hippocampus wichtig. In *Wnt3a* Mutanten besteht eine Entwicklungsstörung mit einem deutlichen mediolateralen und longitudinalen Gradienten. Am medialen Rand der Hippocampusformation fehlt der Gyrus dentatus. CA3, CA1 und Subiculum hingegen fehlen rostral und sind caudal stark reduziert

3) ***Lhx5***. Im *Lhx5* Knockout werden die Vorläuferzellen für die hippocampale Anlage spezifiziert, treten aber nicht aus dem Zellzyklus aus und differenzieren sich. Die gestörte Migration dieser Zellen führt zu einem Fehlen von Körnerzellen des Gyrus dentatus (Zhao et al., 1999). *Lhx5*^{-/-} Mutanten zeigen ein verbreitertes hippocampales Neuroepithel mit mehr proliferierenden Zellen bei E18.5 als im Wildtyp. Fimbria und hippocampale Kommissuren fehlen.

4) ***Lef1***. *Lef1* und andere Gene der LEF1/TCF Familie von Transkriptionsfaktoren sind nukleäre Vermittler der *Wnt* Signalkaskade. *Lef1* wird im sich entwickelnden Hippocampus exprimiert. LEF1-defizienten Embryonen fehlen Körnerzellen des Gyrus dentatus (Galceran et al., 2000).

5) **NeuroD**. Die weitere Differenzierung der Vorläuferzellen ist von der *NeuroD* Expression abhängig. Ohne dieses Gen wird keine initiale Körnerzellschicht aufgebaut. Im *NeuroD* Knockout fehlt der Gyrus dentatus (Miyata et al., 1999).

6) **Reelin und andere Faktoren radialer glialer Migration**. In *Reelin* Mutanten sind die Körnerzellen des Gyrus dentatus zwar morphologisch ausgebildet, formen jedoch keine dicht gepackte Körnerzellschicht und zeigen eine Malpositionierung im Hilusgebiet (Drakew et al., 2002). Die scharfe Grenze zwischen Hilus und Körnerzellschicht fehlt in diesen Mäusen. *ApoER2/VLDR* Mutanten besitzen einen ähnlichen Phänotyp. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass *Reelin*, *disabled1* und *$\beta 1$ Integrin* an dem Ausbau von radialer Glia ausgehend vom Hilus in die Marginalzone des Gyrus dentatus beteiligt sind (Forster et al., 2002). Auch Mutanten der Gene von *Cdk5* (Ohshima et al., 1996), *P35* (Chae et al., 1997) und *Pafah1b1/Lis1* (Hirotsune et al., 1998) zeigen einen ähnlichen Phänotyp mit gestörter neuronaler Zellmigration und einer daraus resultierenden ektopischen Positionierung von Zellen im Ammonshorn und im Gyrus dentatus.

2.6 Stand der Forschung (Zusammenfassung)

Emx2 wirkt auf den Gyrus dentatus nach dessen Determinierung und besitzt nach der Literatur u. a. einen Einfluss auf die Differenzierung der Körner- und Cajal-Retzius Zellen. Es ist davon auszugehen, dass die Differenzierung des Gyrus dentatus eine große Anzahl von Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen einschließt. Ein Vergleich der Entwicklungsphasen des *Emx2* Knockouts und des entsprechenden Wildtypen macht es absehbar, dass viele dieser Moleküle Teile eines komplexen regulatorischen Netzwerkes sind, welches mit der Expression von *Emx2* ermöglicht wird.

Einige Bestandteile dieses regulatorischen Netzwerkes sind bekannt. Die morphologische und funktionale Einordnung dieser Faktoren sind jedoch bisher ungeklärt und Gegenstand dieser Arbeit.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Affymetrix Fluidics Station	Affymetrix, Santa Clara, Californien, USA
Affymetrix Mouse Genome U74v2 (Set Chip A)	Affymetrix, Santa Clara, Californien, USA
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5417 R (gekühlt)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Tubes 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
GenePaint Platform	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Hybridisierungssofen	Hybaid, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA
Kryostat	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
McIlwain Tissue Chopper	Campden Instruments, Lafayette, Indiana, USA
Objektträger (Superfrost® Plus)	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
OCT Tissue Tek™ Einbettmedium	Miles Inc., Elkhart, Indiana, USA
PCR Sprint Thermal Cycler	ThermoHybaid, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA
PCR Express Thermal Cycler	ThermoHybaid Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA
Phase Lock Gel® (PLG) Tubes (2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Photometer	Amersham Pharmacia, New Jersey, USA
Pipetten (Biomaster 4830, Reference, Research)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Scanner, konfokal	Hewlett-Packard, Palo Alto, CA
Stereomikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tungsten Nadeln
 Fine Science Tools GmbH, Heidelberg,
 Deutschland

3.2 Reagenzien, Reaktions-Kits und Chemikalien

1 kb DNA Ladder Marker	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Amplitaq DNA Polymerase (inkl. Puffer und dNTPs)	Applied Biosystems, Foster City, Californien, USA
Anti-BrdU M0744	Dakocytomation, Erembodegen, Belgien
Anti-DIG-POD	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Anti-GFAP	Dakocytomation, Erembodegen, Belgien
Anti-nestin MAB353	Chemicon, Temecula, Californien, USA
Anti-reelin MAB5366	Chemicon, Temecula, Californien, USA
Apoptag Kit	Chemicon, Temecula, Californien, USA
Biotinilierte Ziegen anti-Streptavidin Antikörper	Vector Laboratories, Burlingame, Californien, USA
Biotin Labeled Ribonucleotides	ENZO Diagnostics, Farmingdale, New York, USA
Blocking Reagenz	PerkinElmer Lifesciences, Boston, Massachusetts, USA
BrdU	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England
Diaminobenzidin	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Extravidin	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Färbelösungen (BCIP, NBT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Fluoreszierende sekundäre Antikörper	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Hybridisierungspuffer	Ambion, Austin, Texas, USA
Isofluran	Baxter, Erlangen, Deutschland
MessageAmp™ aRNA Kit	Ambion, Austin, Texas, USA
Monoclonal anti-Ki-67	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Neutravidin-AP-Konjugat	Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA
Rabbit polyclonal anti-calretinin	Chemicon, Temecula, Californien, USA
RNA Transcription Kit	Stratagene, La Jolla, Californien, USA
RNeasy [®] Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Streptavidin-Phycoerythrin	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Superscript [™] II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Carlsbad, Californien, USA
Trizol	Invitrogen, Carlsbad, Californien, USA
Tyramid-Biotin in Tyramid Puffer	PerkinElmer Lifesciences, Boston, Massachusetts, USA
Ziegen IgG	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland

Die zur Herstellung der Sonden verwendeten Primer wurden bei TIB Molbiol, Berlin, Deutschland bestellt.

Alle weiteren Chemikalien wurden über Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland und NeoLab, Heidelberg, Deutschland bezogen.

3.2.1 Rezepte

Die wässrigen Lösungen wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit Aqua bidest. angesetzt.

Fragmentierungs-Puffer

40 mM	Tris-Acetat, pH 8,1
100 mM	Kaliumacetat
30 mM	Magnesiumacetat

H₂O-DEPC

1 g	DEPC
1000 ml	H ₂ O

Wasser und DEPC-Kügelchen mit einem Rührmagneten in eine Flasche geben und diese über Nacht auf einen magnetischen Heizrührer (RT) stellen. Anschließend 2x autoklavieren.

Lysispuffer

8950 µl	H ₂ O
100 µl	1 M Tris, pH 8
200 µl	5 M NaCl
500 µl	0,5 M EDTA, pH 8
250 µl	20% SDS
64 µl	Proteinase K (Konzentration der Stocklösung: 15,6 mg/ml; entspricht 0,1 mg Proteinase K/ml Lysispuffer)

MWB (Maleat-Waschpuffer)

100 mM	Maleat
150 mM	NaCl
0,05%	Tween 20
pH 7,5	

NTE

0,05%	Tween 20
5 mM	EDTA
10 mM	Tris
500 mM	NaCl
pH 7,6	

PBS

8,00 g	NaCl
0,20 g	KCl
1,44 g	Na ₂ HPO ₄
0,24 g	KH ₂ PO ₄
ad 1000 ml	H ₂ O
pH 7,4	

Proteinase K-Puffer

0,05% Tween-20
50 mM Tris
5 mM EDTA, pH 8,0
2 µg/ml Proteinase K

20 x SSC

3 M NaCl
0,3 M NaCitrat
pH 7,0

50 x TAE-Puffer

242,0 g Tris base
57,1 ml Eisessig
100,0 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0
ad 1000 ml H₂O

TE-Puffer

1,210 g (10 mM) Tris
0,372 g (1 mM) EDTA
ad 1000 ml H₂O
pH 8,0

Substanzen in eine Flasche geben und mit 500 ml aqua bidest. auffüllen.

Mit HCl (2 M) auf pH 8,0 titrieren und mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

TNB Blocking-Puffer

0,05% Tween 20
100 mM Tris
150 mM NaCl
0,5% Blocking-Reagenz
pH 7,6

TNT

0,05% Tween 20
100 mM Tris
150 mM NaCl
pH 7,6

3.3 Tierzucht und Gewinnung von embryonalem Hirngewebe

Weibliche *Emx2*^{+/-} Mäuse des Stammes C129Sv/J-C57B16 (Pellegrini et al., 1996) wurden über Nacht mit männlichen *Emx2*^{+/-} Mäusen des gleichen Stammes verpaart und am folgenden Morgen um 9.00 Uhr auf das Vorhandensein eines Vaginal-Pfropfs untersucht. 12 Uhr dieses Tages entspricht dem Embryonaltag 0.5 (E0.5).

Zur Gewinnung von embryonalem Hirngewebe wurden die trächtigen Weibchen am gewünschten Embryonaltag mit Isofluran anaesthetisiert und mittels Genickbruch getötet. Die Embryonen wurden entnommen, mittels PCR genotypisiert und entsprechend des jeweiligen Experiments weiter präpariert. Die Durchführung der Experimente erfolgte gemäß den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes (BGB1 S.1105, ber. S. 181, Abschnitt 2 (§2+3), 5 (§7-9) und 8 (§119)).

Die Analysen wurden, abgesehen von Untersuchungen des Entwicklungsverlaufs, bei E18.5 durchgeführt, da *Emx2* Mutanten über dieses Alter hinaus nicht lebensfähig sind (Pellegrini et al., 1996; Yoshida et al., 1997) und dies somit der Zeitpunkt ist, an dem der Gyrus dentatus dieser Mäuse die weitest mögliche Entwicklung zeigt. Alle Bereiche der Gyrus dentatus Anlage sind bei E18.5 bereits vorhanden. Die verschiedenen Stufen der Entwicklung, angefangen bei der Proliferation der Stammzellen über Bildung des Grundgerüsts durch die Radiale Glia, Migration der Vorläuferzellen, Differenzierung der Körnerzellen bis hin zur Positionierung der Cajal-Retzius Zellen während der Bildung der hippocampalen Fissur können zu diesem Zeitpunkt bereits beobachtet werden. Weiterhin lassen sich die verschiedenen Areale des Hippocampus durch spezifische Marker identifizieren. Außerdem gibt es für diesen Zeitpunkt bereits Beschreibungen des Phänotyps der hippocampalen Formation bei *Emx2* Mutanten durch verschiedene Autoren (Pellegrini et al., 1996; Tole et al., 2000; Yoshida et al., 1997).

Für die Betrachtung des Entwicklungsverlaufs wurden zusätzlich die Zeitpunkte E14.5 und E15.5 ausgewählt. Die Expression von bHLH Markern im Telenzephalon wurde schon von anderen Autoren zum Zeitpunkt E14.5 bei der Maus (Ma et al., 1997) und zum äquivalenten Zeitpunkt E16.0 bei der Ratte (Lindsell et al., 1996; Pleasure et al., 2000) beschrieben, womit dies für Analysen das Alter der Wahl ist. E15.5 erwies sich jedoch als interessanter, da Probleme in der Migration gefunden wurden und die ersten migrierenden Zellen in der Gyrus dentatus Anlage zu diesem Zeitpunkt beobachtet werden konnten.

3.4 Genomische DNA-Extraktion

Zur Gewinnung genomischer DNA wurde zunächst jeweils eine Schwanzspitze zusammen mit 200 µl Lysispuffer in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube gegeben und mit einem Stößel zerstampft. Um das Gewebe effektiv zu zerkleinern, wurde das Tube kurz in flüssigen Stickstoff getaucht und die Schwanzspitze nochmals zermörsert. Es wurden weitere 600 µl Lysispuffer hinzugegeben. Anschließend wurde das Tube gevortext und über Nacht in einem Thermomixer bei ca. 950 rpm und 50°C belassen.

Am folgenden Tag wurde der Inhalt in ein 2 ml Eppendorf-Tube pipettiert und 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) hinzugegeben. Das Tube wurde 30-60 sec gevortext und bei 4300 rpm und Raumtemperatur 10 min zentrifugiert. Die Oberphase wurde sehr vorsichtig abpipettiert und in zwei 2 ml Tubes verteilt. Anschließend wurden ½ Volumen 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung und 2 Volumen 100%iger Ethanol hinzugegeben. Das Ganze wurde durch Hin- und Herkippen der Tubes gut gemischt und danach bei 4300 rpm und 4°C für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die im Tube verbliebenen Pellets mit je 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, indem sie gut gemischt und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C nochmals 2 min zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde abpipettiert, die Pellets luftgetrocknet und schließlich in insgesamt 30 µl TE-Puffer gelöst.

Für den weiteren Gebrauch wurde photometrisch die DNA-Konzentration bestimmt.

3.5 Konzentrationsbestimmung mittels Photometer

Die Bestimmung der Konzentrationen von DNA und RNA erfolgte durch Messung der Extinktion bei 260 nm (OD_{260}) in einem Photometer gegen den jeweils verwendeten Puffer als Referenz. Die Schichtdicke der Lösung in der Küvette betrug 1 cm.

Die Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c = OD_{260} \cdot f \cdot 1/\epsilon \cdot 1/x$$

c: Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

OD_{260} : Extinktion bei 260 nm

f: Verdünnungsfaktor

ϵ : Extinktionskoeffizient

ϵ_{dsDNA} : Extinktionskoeffizient für doppelsträngige DNA (dsDNA)

$$\epsilon_{\text{dsDNA}} = 20 \mu\text{l} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

ϵ_{RNA} : Extinktionskoeffizient für RNA

$$\epsilon_{\text{RNA}} = 25 \mu\text{l} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

x: Schichtdicke

$$x = 1 \text{ cm}$$

Somit gilt für die Konzentrationen von dsDNA und RNA:

$$c_{\text{dsDNA}} = OD_{260} \cdot f \cdot 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

$$c_{\text{RNA}} = OD_{260} \cdot f \cdot 0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} diente als Maß für die Reinheit der Lösung, die für DNA-Lösungen bei Werten zwischen 1,6 und 1,8 und für RNA-Lösungen bei Werten zwischen 1,8 und 2,0 als proteinarm bezeichnet wird.

3.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR lassen sich bestimmte Bereiche einer beliebigen DNA als Template gezielt vervielfältigen (Mullis et al., 1986). Das Prinzip der PCR basiert auf der Trennung des DNA-

Doppelstranges (dsDNA) in zwei Einzelstränge (ssDNA) durch Hitze (Denaturierung), der darauf folgenden Anlagerung sequenzspezifischer Oligonukleotide, sogenannter Primer, an die freien 5'-Enden der beiden ssDNA (Annealing) und der anschließenden Aktivität einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase, die in Gegenwart freier Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTP) die Primer verlängert (Elongation) und den zu den ssDNA komplementären Strang synthetisiert. Bei diesem Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation, werden unterschiedliche Temperaturen durchlaufen. Während die Denaturierung der dsDNA bei Temperaturen von über 90°C erfolgt, wird die Annealing-Temperatur durch die Schmelztemperatur (T_m Wert) der Primer bestimmt. Diese ist wiederum abhängig von deren Länge und G-C-Gehalt. Der letzte Schritt, die Elongation, erfolgt bei einer Temperatur zwischen 68°C und 72°C. Mit jedem Durchlaufen eines Zyklus wird die Anzahl der DNA-Moleküle exponentiell amplifiziert (2^n bei n Zyklen). Die neusynthetisierte DNA dient in dem nachfolgenden Zyklus selbst wieder als Template. Neben der Template-DNA, den spezifischen Primern und der hitzebeständigen Polymerase enthält der Reaktionsansatz für optimale Reaktionsbedingungen einen geeigneten Puffer, $MgCl_2$, dNTP und in einigen Ansätzen auch DMSO. Die Magnesium-Ionen haben einen positiven Einfluss auf die Denaturierung der dsDNA, das Primer-Annealing, die Produktspezifität und -ausbeute und sind außerdem ein Kofaktor für die meisten DNA-Polymerasen. Das DMSO steigert die Spezifität und erleichtert die Amplifizierung G-C-reicher Sequenzen.

3.6.1 Genotypisierung mittels PCR

Für die Genotypisierung, d.h. die Feststellung, ob es sich um einen Wildtyp (WT), einen Knockout (KO) oder einen heterozygoten (HE) Embryo handelt, wurden je 300 ng der aus den Schwanzspitzen gewonnenen genomischen DNA in folgenden PCR-Ansatz gegeben.

PCR-Ansatz:

2,5 μ l 10x Puffer (mit $MgCl_2$)

0,5 μ l 10 mM dNTP

0,5 μ l Amplitaq DNA-Polymerase

2,0 μ l 10 μ M Primer GAB 42

2,0 μ l 10 μ M Primer GAB 45 bzw. GAB 66

x μ l Template DNA (300 ng)
ad 25 μ l H₂O

Sequenzen der Primer:

GAB 42: GAA CGA CAC AAG TCC CGA GAG TTT C

GAB 45: CTC ATA TTG CCC TAA CAA AGC TGA GC

GAB 66: CAC GAG ACT AGT GAG ACG TGC TAC

Für jedes Tier wurden zwei Ansätze bereitet. Der forward Primer GAB 42 wurde je einmal mit dem für den WT spezifischen reversen Primer GAB 45 und mit dem für den KO spezifischen reversen Primer GAB 66 kombiniert. Somit ließen sich die Tiere nach der Gelelektrophorese anhand folgender Banden unterscheiden:

WT: 350 bp

KO: 450 bp

HE: 350 und 450 bp

PCR-Programm:

Vordenaturierung:	94°C 2 min	
Denaturierung:	94°C 30 sec	} 40x
Primer-Annealing:	65°C 30 sec	
Elongation:	72°C 30 sec	
Elongation:	72°C 5 min	
Lagerung:	4°C auf Dauer	

3.7 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung, Reinigung und Identifizierung von DNA-Fragmenten wurden 1%ige Agarosegele gegossen. Die Agarose wurde durch kurzes Aufkochen in 1 x TAE-Puffer, welcher auch als Laufpuffer diente, gelöst. In die noch flüssige Agarose-Lösung wurde Ethidiumbromid gegeben (1% Stocklösung: verdünnt 1:40000). Das Gel polymerisierte bei Raumtemperatur. Die DNA-Proben wurden mit 6 x Lade-Puffer (25% (w/v) Bromphenolblau;

25% (w/v) Xylen Cyanol; 30% (w/v) Glycerin) versetzt. Als Marker diente ein 1 kb DNA *Ladder* Marker von NEB. Die angelegte Spannung betrug 100 V.

3.8 Mikroarray Analyse

3.8.1 Präparation des Hippocampus inklusive der Gyrus dentatus Anlage

Die trächtigen Mäuse wurden durch Genickbruch getötet, die Embryonen anschließend schnell heraus präpariert und enthauptet. Der Schädel wurde eröffnet und das Gehirn entnommen. Die weitere Präparation erfolgte zügig in eiskaltem PBS.

Der Hippocampus inklusive der Gyrus dentatus Anlage wurde unter einem Stereomikroskop mikroseziert und unverzüglich in Trizol auf Trockeneis gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Von jedem Fetus wurde eine Gewebeprobe für die Genotypisierung bei -20°C aufbewahrt.

Anschließend wurden pro Genotyp (WT und *Emx2*^{-/-} Mutante) je 10 Proben für die RNA Extraktion gepoolt, um einerseits eine für die Array Hybridisierung ausreichende cRNA-Konzentration zu erhalten und andererseits die individuelle Variabilität der Genexpression zu reduzieren.

3.8.2 RNA Isolierung

Die gesamtRNA wurde mittels der Trizol-Methode präpariert. Hierfür wurde das Gewebe in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube in 500µl Trizol homogenisiert und 5 min bei Raumtemperatur belassen. Es wurden 100 µl Chloroform hinzu pipettiert. Das Tube wurde 15 sec geschüttelt, 3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und 15 min bei 4°C und 10.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase in ein neues Tube pipettiert und 250 µl 4°C kalter Isopropylalkohol hinzugegeben. Das Ganze wurde wieder 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach 10 min bei 4°C und 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das verbliebene Pellet mit 500 µl 70%igem 4°C kaltem Ethanol gemischt und nochmals 5 min bei 4°C und 10.000 rpm zentrifugiert. Vorsichtig wurde der Überstand abpipettiert, das Pellet luftgetrocknet und schließlich in 10 µl H₂O-DEPC resuspendiert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Photometer.

Bis zur weiteren Verwendung wurde die gesamtRNA bei -80°C gelagert.

3.8.3 Präparation der antisenseRNA (cRNA oder aRNA)

Die cRNA wurde mittels des MessageAmp™ aRNA Kits hergestellt. Im Einzelnen umfasst die Prozedur folgende Schritte:

1. Erst-Strang cDNA Synthese
2. Zweit-Strang cDNA Synthese
3. cDNA Aufreinigung
4. In vitro Transkription zur Synthese der aRNA
5. aRNA Aufreinigung

3.8.3.1 Erst-Strang cDNA Synthese

Jeweils 5 µg WT- und KO-gesamtRNA (Quotienten aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ betragen 1,86 bzw. 1,80; Sollwert 1,7-2,1) wurden mit je 1 µl T7 Oligo(dT) Primer in je einem 1,5 ml Eppendorf-Tube gemischt, mit Nuclease-freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt und 10 min bei 70°C inkubiert. Das Gemisch wurde kurz runterzentrifugiert und die Tubes dann auf Eis gestellt.

In einem weiteren Tube wurde bei Raumtemperatur der 2-fache Master Mix für die reverse Transkription zusammenpipettiert:

- 4 µl 10x First Strand Buffer
- 2 µl Ribonuclease Inhibitor
- 8 µl dNTP Mix

Das ganze wurde gemischt, kurz runterzentrifugiert und ebenso wie der vorbereitete RNA-Primer-Mix 2 min auf 42°C aufgewärmt.

Die folgenden Pipettier-Schritte wurden zügig durchgeführt, um die Temperatur von 42°C möglichst konstant zu halten. Zunächst wurden je 7 µl des Master Mix zum WT- und KO-RNA-Mix gegeben, gemischt und anschließend je 1 µl Superscript™ II Reverse Transcriptase hinzupipettiert. Das ganze wurde nochmals gut gemischt, 2 Stunden bei 42°C inkubiert, danach kurz runterzentrifugiert und auf Eis gestellt.

3.8.3.2 Zweit-Strang cDNA Synthese

Zu den Produkten aus der Erst-Strang Synthese wurden bei Raumtemperatur in folgender Reihenfolge jeweils hinzugegeben:

- 63 μ l H₂O
- 10 μ l 10x Second Strand Buffer
- 4 μ l dNTP Mix
- 2 μ l DNA Polymerase
- 1 μ l RNase H

Die Substanzen wurden gemischt, kurz runterzentrifugiert und 2 Stunden bei 16°C inkubiert. Direkt anschließend erfolgte die Aufreinigung.

3.8.3.3 cDNA Aufreinigung

Hierfür wurden Phase Lock Gel[®] (PLG) Tubes (2,0 ml) verwendet, welche zuerst 20-30 sec bei mindestens 12.000g vorzentrifugiert wurden. Je 100 μ l cDNA-Lösung (aus Schritt 2) und Phenol/Chloroform/IAA wurden durch vortexen gut gemischt und anschließend in die PLG Tubes gegeben. Diese wurden 2 min bei 12.000g zentrifugiert. Die Oberphase wurde in ein neues 2 ml Eppendorf-Tube gegeben, mit 50 μ l 7,5M Ammoniumacetat und 300 μ l 100%igem Ethanol (-20°C) gevortext und 20 min bei 12.000g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 2x mit 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen, d.h. 500 μ l Ethanol wurden hinzugegeben und das ganze 5 min bei 12.000g und Raumtemperatur zentrifugiert. Zuletzt wurde das Pellet luftgetrocknet und in 10 μ l H₂O gelöst.

Zur Kontrolle der Menge und Reinheit wurden nach diesem Schritt je 1 μ l cDNA von WT und KO auf einem 1,2%igem Agarose Gel überprüft und photometrisch die Konzentrationen bestimmt. Der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ lag hier jeweils bei 2,0.

Der Rest wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.8.3.4 In vitro Transkription zur Synthese der aRNA

In je ein 1,5 ml Eppendorf-Tube für WT und KO wurden folgende Substanzen pipettiert, gemischt und anschließend 9 Stunden bei 37°C in einem Heißluft-Hybridisierungssofen inkubiert:

- 8 µl cDNA (aus Schritt 3)
- 2 µl T7 10x Reaction Buffer
- 2 µl Enzyme Mix
- 4 µl 10x Biotin Labeled Ribonucleotides (ENZO Diagnostics)
- 4 µl H₂O

Nach der 9-stündigen Inkubationszeit wurden je 2 µl DNase I hinzugegeben. Das ganze wurde gemischt, nochmals 30 min bei 37°C belassen und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.8.3.5 aRNA Aufreinigung

Vor Beginn wurde von jeder Probe 1 µl für die spätere Kontrolle auf einem Agarose-Gel entnommen.

Die Aufreinigung der aRNA erfolgte mittels des RNeasy[®] Kits nach dem RNeasy Mini Protokoll für RNA-Aufreinigung:

Das Probenvolumen wurde zunächst mit RNase-freiem Wasser auf 100 µl eingestellt. 350 µl Buffer RLT wurden dazu gegeben und gründlich gemischt. 250 µl 100%iger Ethanol wurden hinzu pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Eine RNeasy[®] Mini-Säule wurde in einem 2 ml Collection-Tube platziert und die Probe anschließend hinein gegeben. Das Gefäß wurde verschlossen, für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert und das Collection-Tube samt Durchfluss danach verworfen. Die RNeasy[®] Säule wurde in ein neues 2 ml Collection-Tube gestellt und 500 µl Buffer RPE wurden auf die Säule pipettiert. Das Gefäß wurde wieder verschlossen, für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert und anschließend der Durchfluss verworfen. Es wurden erneut 500 µl Buffer RPE auf die Säule gegeben und diese zum Trocknen der RNeasy[®] Silicagel-Membran für 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Collection-Tube wurde mitsamt dem Durchfluss verworfen, die Säule in ein neues 2 ml

Eppendorf-Tube gegeben und noch mal 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das Eppendorf-Tube wurde verworfen. Anschließend wurde die RNeasy[®] Säule für die Elution in ein neues 1,5 ml Collection-Tube gegeben. 30 µl RNase-freies Wasser wurden direkt auf die RNeasy[®] Silicagel-Membran pipettiert. Das Gefäß wurde verschlossen und für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Elutions-Schritt wurde ein zweites Mal durchgeführt, wobei das Eluat separat in einem neuen 1.5 ml Eppendorf-Tube aufgefangen wurde.

Zur Kontrolle wurden die Konzentrationen mittels Photometer bestimmt und je 1 µl der Proben vor und nach der Aufreinigung auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Die Gesamtausbeute betrug etwa 48 µg WT- und 43 µg KO-RNA. Der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ lag bei 2,1 bzw. 2,2.

3.8.4 Fragmentierung der aRNA

Für die Hybridisierung wurde die aRNA auf eine durchschnittliche Größe von 50-100 Basen fragmentiert:

Pro Reaktion wurden jeweils 20 µg aRNA eingesetzt. Die RNA-Lösung wurde in ein PCR-Tube pipettiert. Es wurden 4 µl 5x Fragmentierungs-Puffer hinzugegeben und mit H₂O-DEPC auf 20 µl aufgefüllt. Die Endkonzentration der RNA im Fragmentierungsmix betrug somit 1 µg/µl.

Das ganze wurde für 30 min bei 94°C in einen Thermalcycler mit geheiztem Deckel gegeben und anschließend auf Eis gestellt.

Zur Überprüfung der Fragmentierung wurde 1 µl auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Der Rest wurde bei -80°C aufbewahrt.

3.8.5 Hybridisierung und Scannen der Affymetrix GeneChips

Die Hybridisierung und das Scannen der Arrays sowie deren computerisierte Analyse wurden in Kooperation mit Dr. Stefan Britsch, AG Prof. Carmen Birchmeyer am MDC in Berlin Buch durchgeführt.

Die Biotin-markierten cRNA Proben wurden auf dem Affymetrix Mouse Genome U74v2 Set Chip A analysiert. Dieser repräsentiert alle Sequenzen (~6000) in der Mouse UniGene Datenbank, die bereits funktionell charakterisiert wurden und etwa weitere 6000 EST Clusters. Die Hybridisierung und das Scannen der Arrays wurde entsprechend der Standard

Affymetrix Protokolle und wie bereits beschrieben (Lockhart et al.,1996) durchgeführt. In Kürze: Aliquots der fragmentierten cRNA (10 µg in einem 200 µl Master Mix) wurden auf den U74v2 GeneChip Arrays 16 Stunden bei 45°C in einem Hybridisierungs-Ofen unter konstanter Rotation (60 rpm) hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Arrays auf einer Affymetrix Fluidics Station gewaschen und mit Streptavidin-Phycoerythrin gefärbt. Die Hybridisierungs-Signale wurden amplifiziert durch die Inkubation der Arrays bei 25°C mit 3 µg/ml biotinierten Ziegen anti-Streptavidin Antikörpern in Anwesenheit von 0,1 mg/ml normalen Ziegen IgG in Staining Puffer. Die Arrays wurden dann erneut mit Streptavidin-Phycoerythrin gefärbt, mit nichtstringentem Puffer gewaschen und mittels eines konfokalen Scanners gescannt.

3.8.6 Array-Daten-Analyse

Die vorläufige Verarbeitung der Mikroarray Daten, welche die Berechnung der mittleren Expressionsintensitäts-Differenz beinhaltet, wurde mit Hilfe der Microarray Suite Software (MAS, Ver. 4) (Affymetrix) durchgeführt. Alle Arrays wurden gegen den Wert für die mittlere totale Hybridisierungs-Intensität des jeweiligen Probe-Sets korrigiert. Die Scaling Faktoren der Arrays lagen zwischen 1,4 und 1,8.

Für jeden Genotyp wurde eine Doppel-Analyse durchgeführt mit RNA, die von 10 gepoolten Hippocampus Proben extrahiert wurde.

Das Ziel dieser Analysen war es, Gene zu finden, die während der Differenzierung des Hippocampus direkt oder indirekt von *Emx2* reguliert werden. Um diese Gene zu identifizieren, wurde ein Vergleich der durchschnittlichen statistischen Signifikanz (s-Scores) zwischen der Stärke der Gen-Expression im Hippocampus bei Wildtyp und *Emx2* Mutante zum Zeitpunkt E18.5 durchgeführt.

3.8.7 Hierarchische Gruppierung der Mikroarray Daten

Die erste Auswahl der Gene erfolgte durch zwei paarweise Vergleiche zwischen zwei *Emx2*^{-/-} und zwei Wildtyp Proben. Um relevante unterschiedlich exprimierte Gene zu identifizieren, wurden alle Gene, die in diesen zwei Daten-Sets mit mehr als 1,5 Unterschied in der Expression bewertet wurden, in die weitere Betrachtung mit einbezogen.

Cluster- und Hauptkomponentenanalysen wurden durchgeführt, um die gesamten Veränderungen in der Gen Expression zu beschreiben.

Aus diesen Daten wurden anschließend repräsentative Gene mit interessanten Daten bezüglich ihrer Funktion (Ontologie) ausgewählt, bei denen die Verminderung in der Mutante am größten und signifikantesten war (insgesamt 49 Gene).

Für diese Kandidaten-Gene wurden nicht-radioaktive Sonden hergestellt und In Situ Hybridisierungen auf Schnitten von Wildtyp und *Emx2*^{-/-} Hippocampus bei E18.5 durchgeführt.

Die Resultate dieser In Sitis bestätigten 25 der ursprünglichen Kandidaten.

Um die biologischen Prozesse und Signal-Netzwerke, die von *Emx2* reguliert werden, ausfindig zu machen, wurde auf diese Kandidaten Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity® Systems, Redwood City, Californien, www.ingenuity.com) angewandt, eine analytische Methode, die experimentelle Daten objektiv auf ihren Zusammenhang mit bekannten Genomweiten Interaktionen untersucht, um signifikante funktionelle Einheiten zu identifizieren. Diese Methode ist dafür geeignet, Daten aus High-Throughput Plattformen wie dem Mikroarray Expressions-Profil zu analysieren. Die Software-Anwendung durchsucht eine umfangreiche Datenbank, welche bekannte Zusammenhänge der Säugetier Gen-Produkte beinhaltet (solche wie Protein-Protein-, Protein-Nukleinsäure- und Protein-kleinmolekulare-Interaktionen), nach potentiellen Verbindungen zwischen den zu untersuchenden Genen (hier: Gene, die im fetalen Hippocampus von Wildtyp bzw. *Emx2* Mutante unterschiedlich exprimiert werden) und allen anderen Gen-Produkten, um eine Reihe von Netzwerken zu erstellen. Ingenuity Pathway Analysis ordnet jedem Netzwerk ein biologisches Thema zu (z.B. Genexpression, Funktionen in der Entwicklung, neuronales System) basierend auf den Funktionen der beteiligten Gene, wobei der „Fischer’s exact test“ verwendet wird, um den p-value zu berechnen, welcher die Wahrscheinlichkeit wiedergibt, dass die Zuordnung der jeweiligen biologischen Funktion und/oder Erkrankung zu diesem Datensatz nur zufällig ist, d.h. je niedriger der p-value, desto höher die Signifikanz (in diesem Fall sollte $p < 0,05$ sein). Diese biologischen Themen wurden mittels der Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) Software Anwendung, die Gene anhand ihrer Ontologie eingruppiert, nochmals überprüft. Zur Berechnung der EASE scores wurden 10.000 Wiederholungen durchgeführt. In einem speziellen Netzwerk signifikant ($p < 0,05$) überrepräsentativ auftretende Gen-Klassen weisen auf eine biologische Relevanz hin.

3.9 Herstellung der Riboproben für die In situ Hybridisierung

3.9.1 RNA Isolierung

Die gesamtRNA wurde mittels der Trizol-Methode präpariert (s. Abschnitt 3.8.2). Die RNA wurde aus Mausgehirn (P0, P7) sowie aus dem gesamten Embryo (E10.5, E14.5) isoliert. Für die anschließende cDNA-Synthese wurde die RNA 1:1 (auf Basis der Masse) gemischt.

3.9.2 Reverse Transkription

Für die cDNA Synthese wurde SuperScript™ II Reverse Transkriptase von Invitrogen verwendet. Zunächst wurden folgende Substanzen in einem PCR-Tube zusammen pipettiert, 10 min bei 70°C im Thermalcycler inkubiert, wodurch die RNA denaturiert wurde und die Anlagerung der Primer erfolgen konnte, und anschließend auf Eis gestellt:

RNA	1 µl (800 ng/µl)
Oligo (dT) Primer	1 µl
H ₂ O	10 µl

Es wurde ein Mix aus folgenden Substanzen vorbereitet, zum ersten Ansatz gegeben und mit diesem gemischt:

5 x 1st Strand Buffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
10 mM dNTP-Mix	1 µl

Dieses Gemisch wurde im Thermalcycler 2 min auf 42°C vorgewärmt, bevor 1 µl SuperScript™ II Reverse Transkriptase hinzu pipettiert und alles 50 min bei 42°C inkubiert wurde. Zum Beenden der Reaktion wurde für 15 min auf 70°C erhitzt. 1 µl RNaseH wurde dazu pipettiert und 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der Konzentration wurde 1 µl entnommen und der Rest bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.9.3 Primer-Design und PCR

Als Template dienten bei der Herstellung der Riboproben mit T7- und SP6-Promotoren versehene PCR-Produkte. Hierfür wurden zunächst mit Hilfe der DNASIS[®] Software (DNASIS[®] Version 2.6) (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.) für die jeweiligen Kandidaten-Gene PCR Primer in der Weise konstruiert, dass die Primer am 5'-Ende zusätzlich die für die spätere Riboprobenherstellung notwendige T7 (TAATACGACTCACTATAGGG)- bzw. SP6 (ATTTAGGTGACACTATAG)-Promotor Sequenz tragen.

Weiterhin sollte ein Primer einen GC-Gehalt zwischen 40% und 60% haben und am Ende, an dem sich die Polymerase anlagert, ein GC oder ein CG tragen. Die Sequenz sollte keine Wiederholungen und keine Homologien zu anderen Genen im Genom, sowie keine Haarnadel- oder dimere Strukturen aufweisen.

Der spezifische Teil der Primer, d.h. ohne Promotor-Sequenz, war durchschnittlich 24 bp lang. Die Schmelztemperatur, bezogen auf den spezifischen Teil, sollte zwischen 55 und 60°C liegen. Die Schmelztemperatur wurde folgendermaßen berechnet:

$$T_m = 69,3 + (0,41 \times \text{GC } \%) - 650/n$$

n: Länge des Oligonukleotids

Die Primer wurden von MWG Biotech synthetisiert.

Sie wurden in folgenden PCR-Ansatz gegeben:

2,0 µl cDNA
1,2 µl 10 µM Primer SP6 fwd
1,2 µl 10 µM Primer T7 rev
21,4 µl H₂O
3,0 µl 10x Puffer
0,6 µl dNTPs
0,6 µl Amplitaq DNA Polymerase

Aufgrund der zusätzlichen, zur cDNA nicht komplementären Promotor Sequenz wurde die PCR in zwei Phasen mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen durchgeführt. In der ersten Phase wurde eine niedrige Temperatur gewählt, um weniger spezifische Bindungen zu ermöglichen. Die höhere Temperatur in der zweiten Phase erlaubte ausschließlich spezifische Bindungen an die in der ersten Phase synthetisierten Produkte inklusive T7- und SP6-Promotor Sequenz, so dass in dieser Phase die Vervielfältigung des gewünschten Produkts stattfand.

PCR-Programm:

Vordenaturierung:	94°C 2 min	
Denaturierung:	94°C 30 sec	} 15x
Primer-Annealing:	64°C 1 min	
Elongation:	72°C 1 min	
Denaturierung:	94°C 30 sec	} 25x
Primer-Annealing:	70°C 1 min	
Elongation:	72°C 1 min	
Elongation:	72°C 7 min	
Lagerung:	4°C auf Dauer	

Um optimale Ergebnisse zu erzielen, wurde dieses Programm für einige Faktoren leicht variiert. Bei zu geringer Ausbeute wurde das aufgereinigte PCR-Produkt durch eine weitere PCR hochamplifiziert.

Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung erfolgte mittels Phenol/Chloroform Extraktion und anschließender Ethanol Präzipitation.

Hierfür wurde nach Ablauf der PCR ein äquivalentes Volumen Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1) in den Ansatz gegeben, gevortext und 10 min bei 4300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde sehr vorsichtig abpipettiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. 1/5 Volumen 10 M Ammoniumacetat und 3 Volumen 100 %iger Ethanol wurden hinzugegeben. Das Ganze wurde gemischt und bei -20°C über Nacht stehen gelassen. Am folgenden Tag wurde das Tube 30 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 10 µl H₂O gelöst.

3.9.4 RNA-Transkription (DIG Labeling)

Es wurde das RNA Transcription Kit von Stratagene benutzt. Als Template diente 1 µg DNA, die auf die oben beschriebene Weise (siehe Abschnitt 3.9.3) hergestellt wurde.

4,0 µl 5 x transcription buffer
2,0 µl 10 mM rATP
2,0 µl 10 mM rCTP
2,0 µl 10 mM rGTP
1,3 µl 10 mM rUTP
0,7 µl 250 nmol DIG-UTP
2,0 µl 0,75 M DTT
1,0 µl 40 U/µl RNasin
0,5 µl 50 U/µl RNA Polymerase (T7 or SP6)
1,0 µg Template
add 20 µl H₂O-DEPC

Der Reaktions-Ansatz wurde bei 37°C für 150 min inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen und die restliche DNA zu entfernen, wurde 1 µl des folgenden Gemisches zugegeben.

16,4 µl H₂O-DEPC
1,6 µl MgCl₂ (0,3 M)
2,0 µl DNase (10 U/µl)

Es wurde für weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die RNA mit 72 µl NH₄Ac (4 M, autoklaviert) und 470 µl 100 %igem Ethanol 30 min bei -80°C präzipitiert und anschließend 20 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde durch erneutes Zentrifugieren mit 640 µl 70%igem Ethanol gewaschen und dann 6 min im Vakuum getrocknet. Die präzipitierte RNA wurde unter 20-minütigem Schütteln bei 1150 rpm und

Raumtemperatur in 25 µl H₂O-DEPC gelöst. Jeweils 2 µl RNA wurden für die Analyse auf einem Agarosegel bzw. die Konzentrationsmessung im Photometer verwendet.

3.10 Kryostat-Schnitte

Die Embryonen bzw. deren Köpfe/Gehirne wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, in OCT Tissue Tek™ eingebettet und bei -80°C gelagert. Zur Herstellung von Kryoschnitten wurden die Blöcke einige Stunden vor dem Schneiden bei -20°C gelagert. Die Schichtdicke der Schnitte betrug 20-25 µm. Geschnitten wurde in einem Kryostaten der Firma Leica bei einer durchschnittlichen Temperatur von ca. -17°C. Die Schnitte wurden mit Objektträgern (Superfrost® Plus) aufgenommen, 20 min in 4%iger PFA-Lösung fixiert und anschließend 2 x 2 min mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Zur Acetylierung wurden die Schnitte 2 x 5 min in Triethanolamin mit 0,1 % Essigsäure getaucht. Die Essigsäure war zuvor unter Schutzgas (N₂) aliquotiert worden. Nach erneutem Waschen in PBS und 0,9%iger NaCl-Lösung wurden die Schnitte mit Hilfe einer Ethanolreihe in aufsteigender Konzentration (30%, 50%, 70%, 80%, 95%, 2x 100% Ethanollösung, je 2 min) entwässert. Die Schnitte wurden luftgetrocknet und bis zur Hybridisierung bei -80°C gelagert.

3.11 In situ Hybridisierung

Die In situ Detektion der mRNAs mit Digoxigenin-markierten antisense Riboproben wurde im Wesentlichen durchgeführt wie bereits beschrieben (Wilkinson und Nieto, 1993). Das verwendete Protokoll beinhaltete zusätzlich einen Schritt zur Verstärkung des Signals (Tyramid Signal Amplifikation), der eine bis zu 100-fache Erhöhung der Empfindlichkeit der Detektion ermöglicht (Adams, 1992; Yang et al., 1999). Es wurde eine GenePaint Plattform verwendet, durch die Prähybridisierung, Hybridisierung, Posthybridisierung und die Reaktionsschritte der Farb-Detektion automatisch durchgeführt wurden (Herzig et al., 2001). Hierfür wurden die Gewebeschnitte in Durchflussskammern eingesetzt und diese wiederum in die GenePaint Plattform gestellt. Auf diese Weise konnten bis zu 95 Objektträger gleichzeitig bearbeitet werden. Ein detailliertes Protokoll wurde bereits veröffentlicht (Yaylaoglu et al., 2005).

Die für diese Arbeiten notwendigen Geräte und Materialien wurden im Max-Planck Institut für experimentelle Endokrinologie in Hannover bei Dr. Alvarez-Bolado (Abt. Prof. Eichele) zur Verfügung gestellt.

Im Einzelnen wurden folgende Arbeitsschritte in der GenePaint Plattform durchlaufen:

1. Prähybridisierung
2. Hybridisierung
3. Posthybridisierung
4. Antikörperinkubation
5. Waschen
6. Farb-Detektion

3.11.1 Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Gewebeschnitte wurden zunächst 7 x 6 min mit 0,6% Wasserstoffperoxid in Methanol behandelt und anschließend 8 x mit PBT (0,05% Tween-20 in PBS) gespült. Es folgte eine zweimalige Behandlung mit 0,05% Tween-20 in 0,2 M HCl-Lösung für jeweils 4 min, nach der die Schnitte erneut 8 x mit PBT gewaschen wurden. Dann wurden sie 2 x 7,5 min mit Proteinase K-Puffer behandelt und wieder 8 x mit PBT gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe 2 x 10 min mit 4%igem PFA in PBT fixiert und 8 x mit PBT gespült.

Nach der Präinkubation in Hybridisierungspuffer für 50 min bei 60°C wurden die Schnitte 5 h bei 62°C in Hybridisierungspuffer, der die RNA-Sonde in einer Konzentration von 150 ng/ml enthielt, inkubiert.

3.11.2 Posthybridisierung und Antikörperinkubation

Nach der Hybridisierung wurde unspezifisch gebundene Sonde durch jeweils 5 Inkubationen für 6 min bei 65°C mit Waschlösungen steigender Stringenz entfernt:

1. 5 x SSC
2. 1 x SSC
3. 0.5 x SSC und
4. 0.1 x SSC, jeweils in 50% Formamid.

Danach wurden die Schnitte mit 250 µl NTE gewaschen, gefolgt von zwei Inkubationsschritten in 20 mM Iodoacetamid in NTE für je 5 min bei Raumtemperatur und dreimaliges Spülen mit NTE. Die Gewebeschnitte wurden dann 2 x 30 min in Hitze-inaktiviertem Schafserum in TNT-Puffer inkubiert. Anschließend wurde 8 x mit NTE gespült. Nach zwei Inkubationen für 30 min in TNB Blocking-Puffer wurden die Schnitte 2 x 45 min mit Roche Anti-Dig-POD (1:500 verdünnt in TNB Blocking-Puffer) versetzt und 8 x 5 min mit TNT-Lösung gewaschen. Anschließend folgte eine zweimalige Inkubation von je 30 min bei Raumtemperatur mit Tyramid-Biotin in Tyramid Puffer. Nach 8 Waschschritten in Maleat-Waschpuffer wurden die Schnitte 2 x 30 min mit Neutravidin-AP-Konjugat inkubiert (1:600 Verdünnung in MWB mit 1% Blocking-Reagenz).

3.11.3 Waschschrritte nach der Antikörperinkubation und Färbereaktion

Ungebundener Antikörper wurde durch 8 Waschschrritte mit MWB entfernt. Anschließend wurden die Schnitte durch zweimalige Behandlung mit TNT und einmalige Inkubation in TMN und 0,3 µg/ml Levamisol äquilibriert. Zur Färbung wurden die Kammern 3 x 20 min in Färbelösung gegeben (BCIP, 1:250; NBT, 1:200, 0,6 µg/ml Levamisol in TMN). Bei Bedarf wurde die Färbereaktion verlängert. Anschließend wurden sie 4 x mit 0,05% Tween-20 gespült, gefolgt von zwei Inkubationen in TNT. Die gefärbten Schnitte wurden mit 4% PFA / 0,5% Glutardialdehyd in PBT für 20 min fixiert. Nach jeweils vier Waschschrritten in PBT und Wasser wurden die Objektträger aus den Durchflussskammern entnommen und über Nacht getrocknet. Zur Analyse und Lagerung wurden sie mit einem Eindeckmedium auf Wasserbasis eingedeckelt.

3.12 Immunhistochemie

Die Embryonen wurden in 4% Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und auf 20 µm geschnitten. Die folgenden primären Antikörper wurden benutzt: Monoclonal anti-Ki-67, Verdünnung 1:20; Rabbit polyclonal anti-calretinin, Verdünnung 1:500; anti-GFAP (Dako Z0334), Verdünnung 1:1000; anti-nestin MAB353 (Antikörper „Rat-401“ aus Hockfield und McKay, 1985), Verdünnung 1:5; anti-reelin MAB5366, Verdünnung 1:250 und anti-BrdU M0744, Verdünnung 1:100. Die Reaktionen wurden sichtbar gemacht mit biotinierten sekundären Antikörpern, Extravidin 1:100 und Diaminobenzidin oder mit fluoreszierenden

sekundären Antikörpern. Vor der Verwendung des anti-Ki-67 Antikörpers wurden die Schnitte 15 Minuten in 0,1%iges Tween-20 in PBS gegeben und dann zur Antigendemaskierung wie folgt behandelt: 5 min in 0,1 M Citrat-Puffer in der Mikrowelle erhitzt, anschließend schnell auf Eis abgekühlt. Diese beiden Schritte wurden drei Mal jeweils unter Verwendung frischen Citrat-Puffers wiederholt.

3.13 BrdU-Injektionen

Den trächtigen Mäusen wurde um 12:00, 15:00 und 18:00 Uhr des entsprechenden Trächtigkeitstages (E10.5, E11.5, E12.5, E13.5 oder E14.5) intraperitoneal 50 µg BrdU /g Körpergewicht injiziert (Takahashi et al., 1993). Die Embryonen wurden bei E12.5 und E14.5 (nach Injektion bei E10.5) oder bei E18.5 entnommen. Für die Analyse der Reelin-BrdU Doppel-Markierung wurden pro Injektionsalter je zwei Wildtyp und *Emx2*^{-/-} Gehirne verwendet.

3.14 TUNEL-Färbung (Nachweis von Zelltod)

Es wurde der Apoptag Kit von Chemicon verwendet. Die in Formaldehyd fixierten und Paraffin eingebetteten Schnitte wurden entsprechend der Anweisungen des Hersteller-Protokolls behandelt.

4 Ergebnisse

4.1 Resultate der In Situ Hybridisierungen

4.1.1 *Emx2*-Expression in der Gyrus dentatus Anlage

Die Expression von *Emx2* wurde bei der Wildtyp Maus zum Zeitpunkt E18.5 analysiert, um festzustellen, in welchen Untereinheiten des Gyrus dentatus ein veränderter Phänotyp der *Emx2*^{-/-} Mutante zu erwarten sein würde. Die verwendete Sonde reproduzierte die bereits in mehreren Publikationen beschriebene neokortikale Verteilung von *Emx2* (ohne Abb.) (Simeone et al., 1992a,b; Gulisano et al., 1996; Mallamaci et al., 1998; Cecchi, 2002). Weiterhin wurde *Emx2* in jeder Untereinheit der Gyrus dentatus Anlage exprimiert (Abb. 5A). Der distale Teil der Anlage zeigte eine große Anzahl stark gelabelter Zellen, die der charakteristischen Form des dorsalen und ventralen Gyrus dentatus Blattes folgten, welches sich in diesem Alter zu differenzieren beginnt (Stanfield and Cowan, 1979). Eine nähere Betrachtung dieses Bereichs zeigte, dass *Emx2* in Zellen der hippocampalen Fissur exprimiert wurde, was vermuten lässt, dass es sich bei diesen Zellen nicht um Körnerzellen handelt. Über die hippocampale Fissur steht das dorsale Blatt zu diesem Zeitpunkt in Verbindung mit der kortikalen Marginalzone, die von *Emx2*- und *Calretinin*-exprimierenden Cajal-Retzius Zellen besiedelt wird (Glezer et al., 1992; Mallamaci et al., 1998). Eine Färbung mit anti-*Calretinin* Antikörper (Abb. 6B) zeigte, dass die meisten der *Emx2*-exprimierenden Zellen am dorsalen Rand der Anlage Cajal-Retzius Zellen der hippocampalen Fissur waren, während die unmittelbar ventral der Fissur gelegene Schicht der *Calretinin*-positiven sich differenzierenden Körnerzellen *Emx2* weniger stark exprimierte (vergleiche Abb. 5A und 5B). Die Zytoarchitektur darstellende Nissl-Färbung bestätigte, dass das sich differenzierende dorsale Blatt eng an der längeren und dickeren hippocampalen Fissur anliegt, die reich an überwiegend locker verteilten Zellen ist (Abb. 5C).

Emx2 wurde zum Zeitpunkt E18.5 in unterschiedlichen Intensitäten von Zellpopulationen in jeder Subregion der Gyrus dentatus Anlage exprimiert. Die stärkste Expression war in der radialen und tangentialen Migrationsstraße, sowie in der tertiären Matrix zu finden (ähnlich der sehr starken Expression in der hippocampalen Fissur), während die sich differenzierenden Körnerzellen sowie die ventrikuläre und subventrikuläre Zone nur eine schwache Expression aufwiesen.

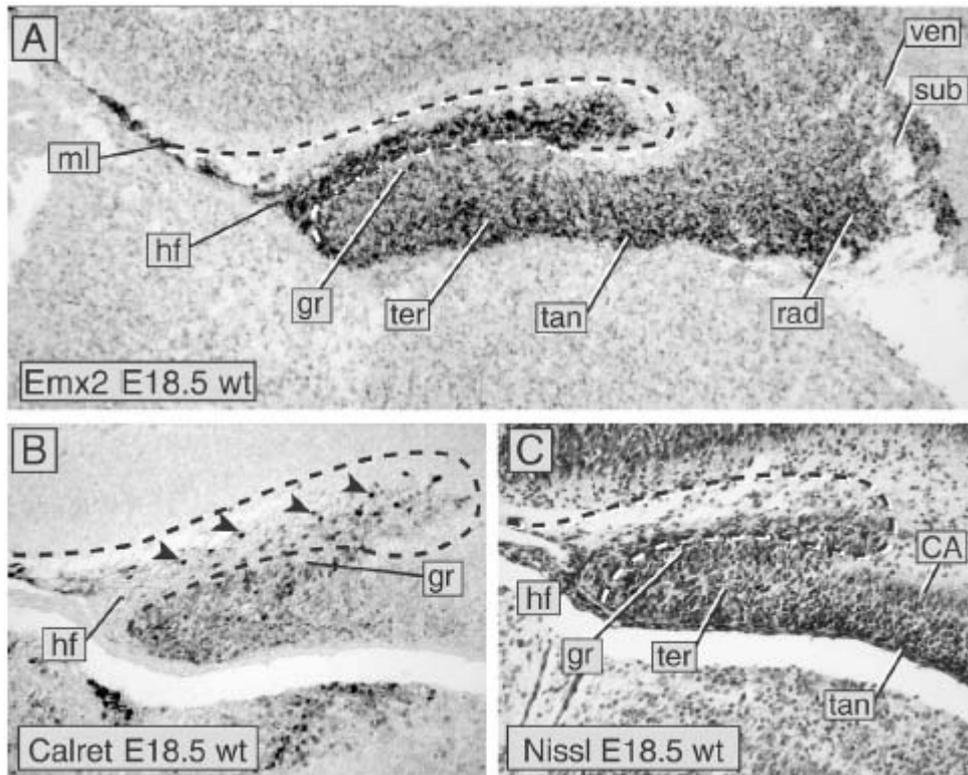


Abbildung 5: *Emx2* wird bei E18.5 in allen Bereichen der Gyrus dentatus Anlage in unterschiedlichen Stärken exprimiert.

(A) *Emx2*-Expression in den Subregionen der sich entwickelnden Gyrus dentatus Anlage: Schwache Expression in der ventrikulären und subventrikulären Zone (ven, sub), starke Expression in der radialen und tangentialen Migrationsstraße (rad, tan) und der tertiären Matrix (ter), schwache Expression in der sich entwickelnden Körnerzellschicht (gr). Der am weitesten distal gelegene, sehr stark markierte Teil entspricht der Region des beginnenden Stratum lacunosum-moleculare und der hippocampalen Fissur (Bereich innerhalb der gestrichelten Linie in A-C). (B) Verstreute *Calretinin*-exprimierende Zellen (Pfeilspitzen) zeichnen die hippocampale Fissur (hf) aus; eine kompakte Anordnung *Calretinin*-exprimierender Zellen charakterisiert die sich differenzierende Körnerzellschicht. (C) Die Cresyl-violett Färbung eines coronalen Schnittes des Wildtyp E18.5 Gyrus dentatus zeigt die hippocampale Fissur und die sich differenzierende Körnerzellschicht.

Abkürzungen: CA, Ammon's Horn; gr, Körnerzellschicht; hf, hippocampale Fissur; ml, Marginalzone des Kortex; rad, radiale Migrationsstraße; sub, subventrikuläre Schicht; tan, tangentiale Migrationsstraße; ter, tertiäre Matrix; ven, ventrikuläre Schicht.

4.1.2 Untersuchung bekannter Gene im Entwicklungsverlauf

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der In Situ Hybridisierungen bezüglich bereits bekannter und größtenteils umfangreich untersuchter Gene im Entwicklungsverlauf dargestellt. Durch Beurteilung der Expression dieser Gene im Verlauf der Entwicklung in der

Emx2^{-/-} Mutante im Vergleich zum Wildtyp lassen sich aufgrund der bekannten Funktionen Rückschlüsse ziehen auf mögliche Veränderungen und/oder Defekte in verschiedenen Funktionskreisen wie Proliferation, Differenzierung und Migration bei der Mutante, in deren Konsequenz letztendlich der *Emx2*^{-/-} Phänotyp resultieren könnte.

4.1.2.1 Der *Emx2*^{-/-} Phänotyp ist nicht die Folge einer Entwicklungsverzögerung

Zunächst wurde die Frage erörtert, ob der *Emx2*^{-/-} Phänotyp möglicherweise nur durch eine generelle Verzögerung in der Entwicklung dieser Mutante entsteht, da ein Gyrus dentatus Neuroepithel und ein Teil der Anlage in der *Emx2*^{-/-} Mutante bei E18.5 gefunden wurden, während der Gyrus dentatus nicht vorhanden war, was vermuten ließ, die Anlage sei funktionell normal, aber unreif. Da der Gyrus dentatus sich großteils postnatal entwickelt und die Mutanten um die Geburt herum sterben (Pellegrini et al., 1996; Yoshida et al., 1997), würde eine relativ kurze Verzögerung in der Entwicklung in einem Mutanten Fetus ohne Gyrus dentatus resultieren. Diese Hypothese sollte überprüft werden, indem die Expression von *Prox1* während der normalen Entwicklung beim Wildtyp mit der bei E18.5 Mutanten verglichen wurde. *Prox1* ist ein Homöobox Transkriptionsfaktor (Oliver et al., 1993), der speziell von Körnerzellen des Gyrus dentatus exprimiert wird (Elliot et al., 2001). Im Wildtyp Gyrus dentatus wurde *Prox1* bei E15.5 von wenigen Zellen in allen Subregionen exprimiert (Abb. 6A). Später verschwand die Expression nach und nach von den proximalen Ebenen und begann sich in den distalen Ebenen anzusammeln (Abb. 6B). Bei E17.5 und später war die germinative (ventrikuläre und subventrikuläre) Zone nicht mehr markiert, sondern *Prox1* wurde intensiv in der tangentialen Migrationsstraße und in der tertiären Matrix exprimiert (Abb. 6C, D). Im Gegensatz dazu zeigten *Emx2*^{-/-} Mutanten bei E18.5 abnorm starke Expression von *Prox1* in der ventrikulären und subventrikulären Zone, sowie eine Ansammlung von markierten Zellen in der tangentialen Migrationsstraße (Abb. 6E). Ein diesem Expressionsmuster ähnliches Bild ist zu keinem Zeitpunkt beim Wildtyp zu finden. Die tertiäre Matrix, deren Bildung man im Wildtyp bereits drei Tage früher beobachten konnte (Abb. 6A), war in der Mutante nicht vorhanden. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass das Fehlen des Gyrus dentatus in der *Emx2*^{-/-} Mutante nicht ausschließlich als das Ergebnis einer Verzögerung in der Entwicklung betrachtet werden kann. Darüber hinaus waren Veränderungen des Gyrus dentatus Neuroepithels und das Versagen, eine tertiäre Matrix zu bilden, spezifische und charakteristische Merkmale des Mutanten Phänotyps.

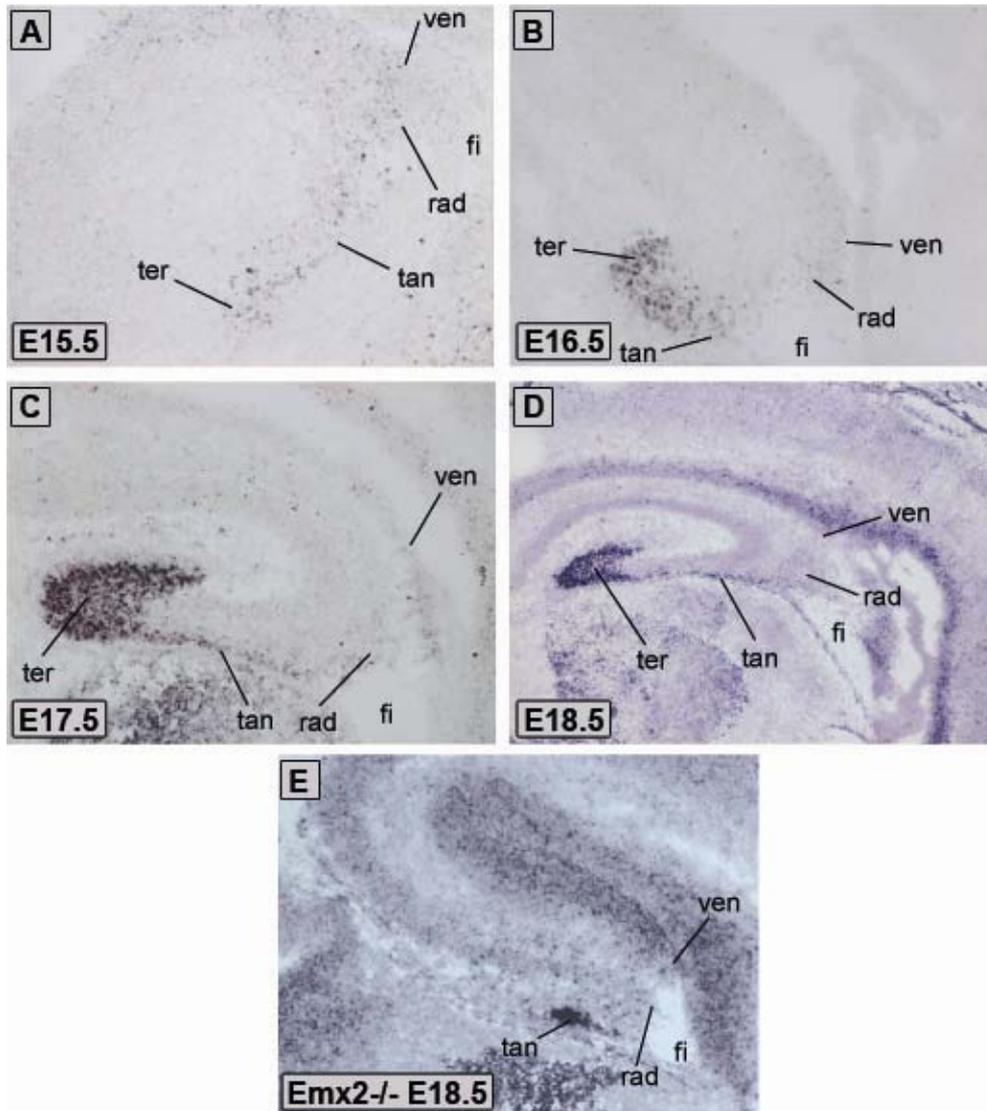


Abbildung 6: Die *Prox1*-Expression in der *Emx2*^{-/-} Mutante imitiert zu keinem Zeitpunkt die Wildtyp Expression

(A-D) Expression von *Prox1* im Entwicklungsverlauf beim Wildtyp. (A) Bei E15.5 ist in allen Bereichen der Gyrus dentatus Anlage eine schwache Expression vorhanden. (B) Zum Zeitpunkt E16.5 verlagert sich die zunehmende Expression in die distalen Abschnitte (tangentiale Migrationsstraße (tan) und tertiäre Matrix (ter)). (C, D) Die tertiäre Matrix (ter) und die sich bildende Körnerzellschicht weisen bei E17.5 und E18.5 intensive *Prox1*-Expression auf; Zellen in der tangentialen Migrationsstraße (tan) exprimieren ebenfalls *Prox1*; in den germinativen Schichten (ven) ist keine Expression vorhanden.

(E) *Prox1*-Expression im *Emx2*^{-/-} Gyrus dentatus zum Zeitpunkt E18.5 mit starker Expression in der ventrikulären Zone (ven) und Ansammlung von markierten Zellen in der tangentialen Migrationsstraße (tan).

Abkürzungen: fi, Fimbria; rad, radiale Migrationsstraße; tan, tangentiale Migrationsstraße; ter, tertiäre Matrix; ven, ventrikuläre Zone.

4.1.2.2 Die Proliferation in der *Emx2*^{-/-} Gyrus dentatus Anlage ist verändert

Im Wildtyp wurde Ki-67, der als Marker für mitotische Zellen bekannt ist, nicht nur von Zellen in der ventrikulären Zone (primäre Matrix) exprimiert, sondern auch von solchen in der subventrikulären Zone und der Migrationsstraße (sekundäre Matrix), in der tertiären Matrix und in der hippocampalen Fissur (Abb. 7A). In der Mutanten Gyrus dentatus Anlage hingegen sind die proliferierenden Zellen drastisch reduziert (Abb. 7B). Bei genauerer Betrachtung (Abb. 7C) zeigt sich, dass die Ki-67 Markierung hauptsächlich in der ventrikulären Zone vorhanden ist. Nur wenige markierte Zellen sind in der subventrikulären Zone, in der Migrationsstraße (Pfeilspitzen in Abb. 7C) und in der mutmaßlichen Fissur (Pfeile in Abb. 7C) zu sehen, was auf die Existenz einer sehr reduzierten sekundären Matrix hindeutet und in Kontrast steht zu der großen Anzahl proliferativer Zellen in den entsprechenden Regionen beim Wildtyp (Abb. 7A).

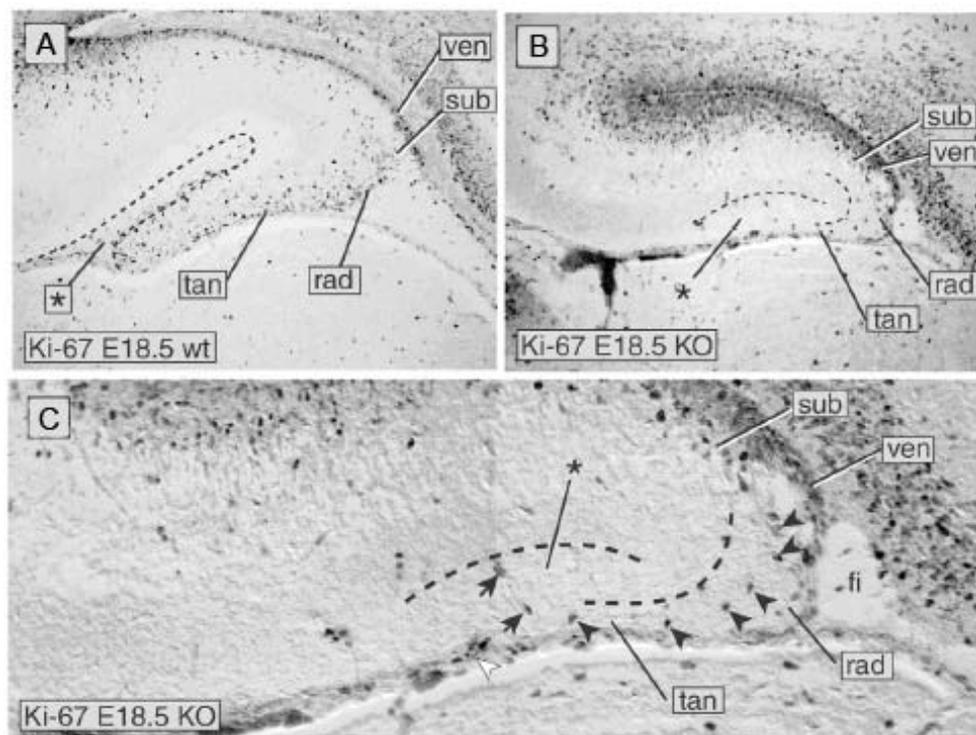


Abbildung 7: Verminderte Proliferation in der Mutanten Gyrus dentatus Anlage

(A, B) Darstellung proliferierender Zellen mittels Ki-67-Expression beim Wildtyp (A) und bei der Mutante (B) zum Zeitpunkt E18.5. Beim Wildtyp Gyrus dentatus (A) können proliferierende Zellen in jeder Subregion gefunden werden, inklusive der hippocampalen Fissur (Bereich innerhalb der gestrichelten Linie beim Wildtyp bzw. Sternchen beim *Emx2*^{-/-}). Proliferierende Zellen sind in der Mutante (B) hauptsächlich in der ventrikulären

und subventrikulären Zone vorhanden sowie einige verstreute auch in der radialen und tangentialen Migrationsstraße. Ein zellularer Bereich (Sternchen) entspricht der mutmaßlichen hippocampalen Fissur. (C) Eine Vergrößerung von (B) zeigt vereinzelte proliferierende Zellen in der Migrationsstraße (Pfeilspitzen) und im Bereich der unvollständigen hippocampalen Fissur (Pfeile), die an einem Abschnitt der Pia anliegt, der eine erhöhte Proliferation aufweist (weiße Pfeilspitze).

Abkürzungen: fi, Fimbria; rad, radiale Migrationsstraße; Sternchen, Bereich der hippocampalen Fissur; sub, subventrikuläre Schicht; tan, tangentiale Migrationsstraße; ter, tertiäre Matrix; ven, ventrikuläre

4.1.2.3 Differenzierung (präneurale Genkaskade der bHLH Gene)

Verzögerte und vorübergehende Expression von *Mash1* im Gyrus dentatus der *Emx2*^{-/-} Mutante

Es ist gezeigt worden, dass die migrierenden Vorläuferzellen des Gyrus dentatus die Transkriptionsfaktoren *Mash1* und *Notch1* und zumindest einige dieser Zellen zusätzlich *Delta1*, *Id3* und *Hes5* exprimieren (Pleasure et al., 2000). Die Expression von *Mash1* im Mutanten Gyrus dentatus wurde nun untersucht, da praktisch keine migrierenden Vorläuferzellen vorhanden zu sein schienen. Bei E14.5 bildete die *Mash1*-Expression einen abgegrenzten Bereich im Neuroepithel der Gyrus dentatus Anlage (Abb. 8A), wie von Pleasure et al. (2000) beschrieben. *Mash1* wurde in der Mutanten Hippocampus-Anlage zu diesem Zeitpunkt überhaupt nicht exprimiert (Abb. 8B), obgleich eine normale Expression auf denselben Schnitten in solchen Strukturen zu sehen war, die nicht *Emx2* exprimieren, wie den Basalganglien (BG in Abb. 8B). Zum Zeitpunkt E15.5 war die *Mash1*-Expression auf das unmittelbar an die Fimbria angrenzende Neuroepithel und wenige radial migrierende Zellen, die die sekundäre Matrix zu formen beginnen, begrenzt (Abb. 8C). In der Mutante gab es einen kleinen abgegrenzten Bereich *Mash1*-exprimierenden Neuroepithels ganz am Ende der Anlage (Pfeilspitze in Abb. 8D, entspricht vermutlich dem an die Fimbria angrenzenden Neuroepithel des Wildtyps), aber es wurden keine Zellen gefunden, die von dort migrierten. Bei E18.5 war im Wildtyp eine *Mash1*-Expression in der radialen und tangentialen Migrationsstraße (Pfeile in Abb. 8E) sichtbar. Die Region der Fissur (Sternchen in Abb. 8E) war ebenfalls markiert. Zu diesem Zeitpunkt war in keinem Bereich der Mutanten Gyrus dentatus Anlage eine *Mash1*-Expression mehr zu finden (Abb. 8F) mit Ausnahme der mutmaßlichen Region der Fissur, die einheitlich markiert war (Sternchen in Abb. 8F).

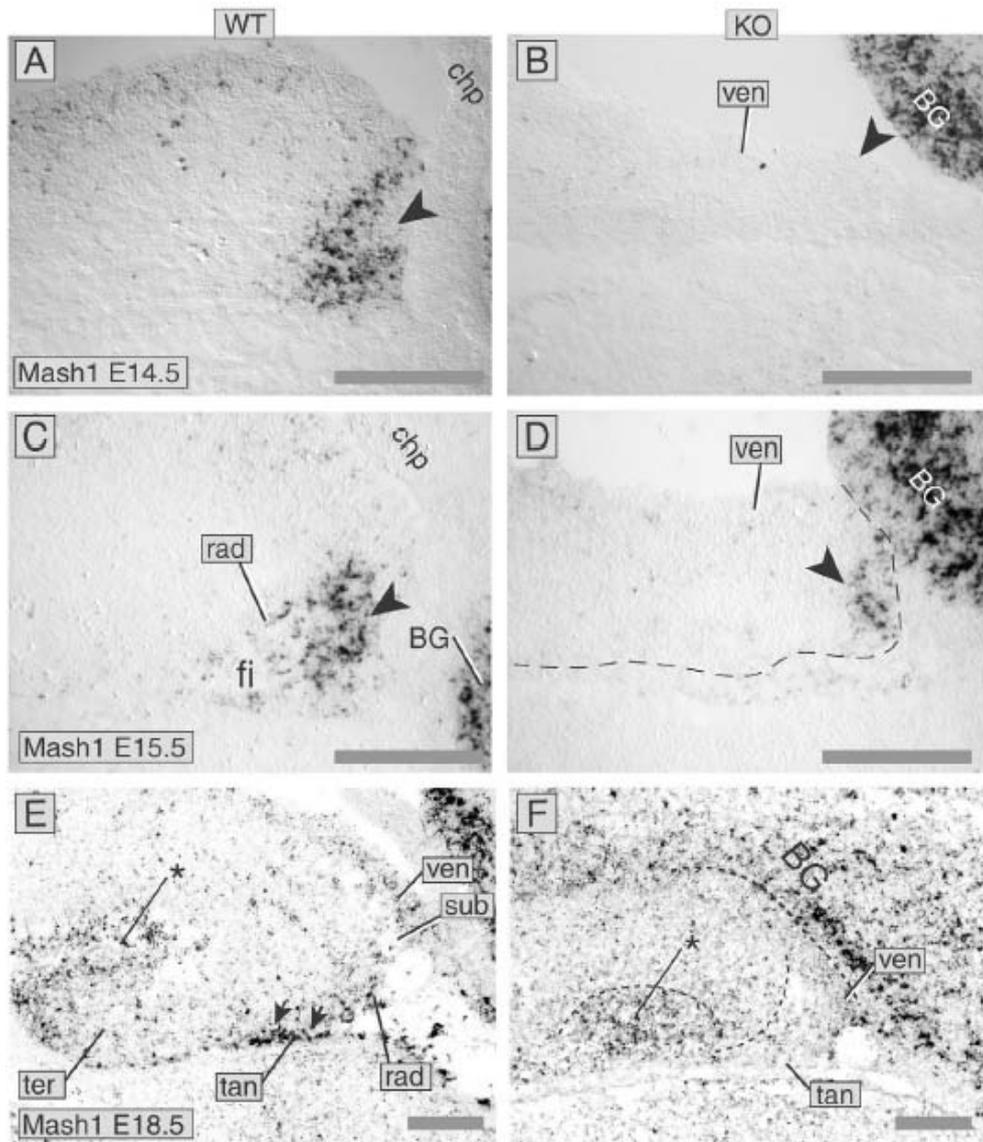


Abbildung 8: Die Expression des proneuralen Gens *Mash1* verschwindet im *Emx2*-defizitären Gyrus dentatus.

(A, B) Bei E14.5 bildet die *Mash1*-Expression einen abgegrenzten Bereich im Neuroepithel des Wildtyp (A) Gyrus dentatus (Pfeilspitze). In der Mutante (B) konnte zu diesem Zeitpunkt in der entsprechenden Region (Pfeilspitze) keine Expression nachgewiesen werden. (C, D) Im Wildtyp E15.5 Gyrus dentatus (C) wird *Mash1* im an die Fimbria angrenzenden Neuroepithel (Pfeilspitze) exprimiert; wenige markierte Zellen haben begonnen zu wandern (rad). In der Mutante (D) war ein kleinerer, aber korrekt lokalisierter Bereich von *Mash1*-Expression sichtbar (Pfeilspitze). (E, F) Beim Wildtyp wird *Mash1* zum Zeitpunkt E18.5 von Zellen in der Migrationsstraße (Pfeile) und in der hippocampalen Fissur (Sternchen) exprimiert. Im Mutanten Gyrus dentatus (F) existiert kein Hybridisierungssignal für *Mash1*. Der mutmaßliche Bereich der Fissur (Sternchen) weist eine schwache Expression auf.

Abkürzungen: BG, Basalganglion; chp, Plexus choroideus; fi, Fimbria; rad, radiale Migrationsstraße; Sternchen, Bereich der hippocampalen Fissur; sub, subventrikuläre Zone; tan, tangentiale Migrationsstraße; ter, tertiäre Matrix; ven, ventrikuläre Schicht. Maßstab = 200 μ m

***Notch1* und *Delta1* sind im Gyrus dentatus der *Emx2*^{-/-} Mutante abnorm auf die germinativen Zonen beschränkt**

Notch1 wird spezifisch in migrierenden Vorläuferzellen des Gyrus dentatus exprimiert (Pleasure et al., 2000). Eine beginnende *Notch1*-Expression konnte im Wildtyp Neuroepithel frühestens bei E14.5 nachgewiesen werden (Abb. 9A), was mit bisher veröffentlichten Daten übereinstimmt (Lindsell et al., 1996; Pleasure et al., 2000). Zu diesem Zeitpunkt war kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen erkennbar (Abb. 9A, B). Bei E15.5 jedoch gab es beim Wildtyp eine *Notch1*-Expression in der ventrikulären Zone des Hippocampus inklusive der des Gyrus dentatus. Das Signal war besonders stark nahe dem Ventrikel und verringerte sich in Richtung der subventrikulären Schicht (Abb. 9C). Markierte Zellen waren sowohl in der radialen als auch in der tangentialen Migrationsstraße sichtbar. Wenige, zwischen dem Gyrus dentatus und dem Neuroepithel der CA-Region verteilte Zellen, waren ebenfalls markiert (Pfeilspitzen in Abb. 9C). Die Mutante hingegen wies eine Expression in den germinativen Schichten des Hippocampus und nur sehr schwache Signale im Neuroepithel des Gyrus dentatus auf (Pfeilspitze in Abb. 9D). Bei E18.5 wurde *Notch1* im Wildtyp in allen Bereichen des Gyrus dentatus homogen exprimiert, von der ventrikulären Zone bis zur tertiären Matrix (Abb. 9E). In der *Emx2*^{-/-} Mutante war zu diesem Zeitpunkt eine kleine aber klar erkennbare Fimbria sichtbar. Das an die Fimbria angrenzende Neuroepithel exprimiert kein *Notch1*. Im Rest der *Emx2*^{-/-} hippocampalen Anlage war die *Notch1*-Expression auf die ventrikuläre Zone begrenzt, während in der Migrationsstraße keine Hybridisierungssignale gefunden werden konnten (Abb. 9F).

Der Notch Ligand *Delta1* wurde von einzeln erkennbaren Zellen in der germinativen Schicht beim E14.5 alten Wildtyp exprimiert (Abb. 9G), besonders im an die Fimbria angrenzenden Neuroepithel (Pleasure et al., 2000). In der Mutante zeigte die gleiche Region nur wenige markierte Zellen (Abb. 9H). *Delta1* wurde bei E15.5 im Wildtyp noch von wenigen Zellen in der germinativen Schicht einschließlich des „fimbrierten“ Neuroepithels exprimiert, nicht aber von migrierenden Zellen (Abb. 9I). Bei der Mutante zeigt die Anlage des Gyrus dentatus zu dieser Zeit sehr wenige bis keine *Delta1*-exprimierenden Zellen (Abb. 9J). Bei E18.5 gab es im Wildtyp Signale in der radialen und tangentialen Migrationsstraße, sowie in der

tertiären Matrix (Abb. 9K), was darauf hindeutet, dass *Delta1* eine Untergruppe migrierender Vorläuferzellen markieren könnte. Im Gyrus dentatus der Mutante war *Delta1* abnorm auf die ventrikuläre Zone begrenzt (Abb. 9L).

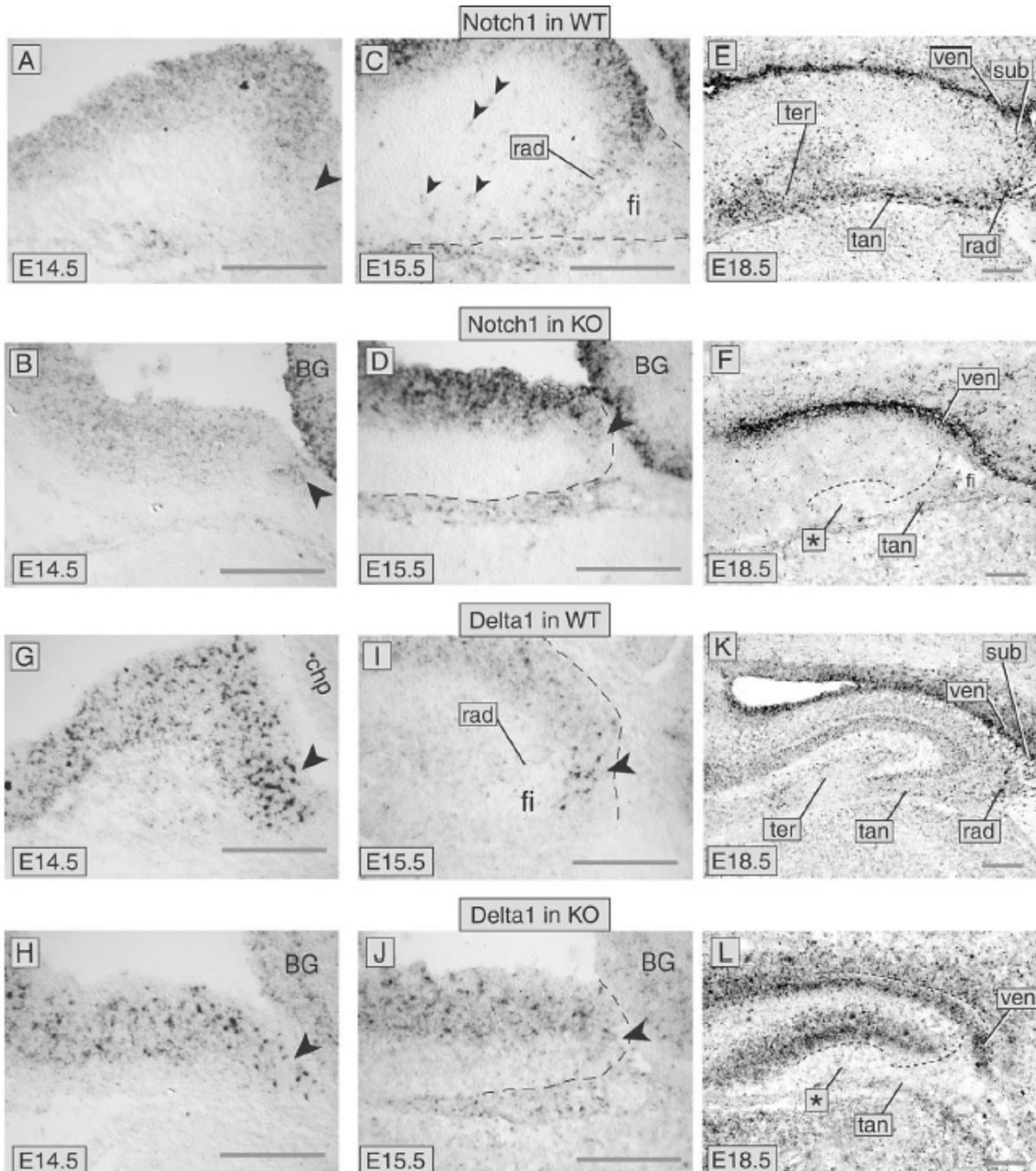


Abbildung 9: Die Expression von *Notch1* und *Delta1* ist im Gyrus dentatus der *Emx2*^{-/-} Mutante abnorm auf die ventrikuläre und subventrikuläre Zone beschränkt.

(A, B) Bei E14.5 weist das Neuroepithel des Gyrus dentatus sowohl im Wildtyp (A) als auch in der Mutante (B) eine schwache *Notch1*-Expression auf (Pfeilspitzen). (C, D) Bei E15.5 zeigt sich im Wildtyp Gyrus dentatus (C)

eine intensive *Notch1*-Expression in der ventrikulären und eine weniger intensive in der subventrikulären Schicht; zahlreiche markierte Zellen bilden eine radiale Migrationsstraße (rad); isolierte markierte Zellen tauchen ebenfalls auf (Pfeilspitzen). In der Mutante (D) exprimiert die germinative Schicht des Gyrus dentatus ebenfalls *Notch1* (Pfeilspitze), aber es sind keine markierten wandernden Zellen zu sehen. (E, F) Zahlreiche *Notch1*-exprimierende Zellen sind bei E18.5 in der Migrationsstraße des Wildtyps vorhanden (E). In der *Emx2* Mutante wird *Notch1* nur im Neuroepithel exprimiert (F). (G, H) *Delta1* wird von einer großen Anzahl einzeln erkennbarer Zellen im Neuroepithel des E14.5 Wildtyp Gyrus dentatus exprimiert (Pfeilspitze in G), während in der Mutante nur wenige Zellen *Delta1* exprimieren (Pfeilspitze in H). (I, J) Zum Zeitpunkt E15.5 ist die *Delta1*-Expression sowohl im Wildtyp (I) als auch im Mutanten (J) Gyrus dentatus Neuroepithel reduziert. (K, L) *Delta1*-exprimierende Zellen sind in der Migrationsstraße des E18.5 Wildtyps zu finden (K). In der Mutante sind bei E18.5 (L) keine markierten wandernden Zellen vorhanden, sondern die Expression ist auf die germinativen Schichten begrenzt.

Abkürzungen: BG, Basalganglion; chp, Plexus choroideus; rad, radiale Migrationsstraße; Sternchen, Bereich der hippocampalen Fissur in der Mutanten; sub, subventrikuläre Schicht; tan, tangentielle Migrationsstraße; ter, tertiäre Matrix; ven, ventrikuläre Schicht. Maßstab = 200 μ m

***Id3*, *Hes5* und *Ngn2* sind im Gyrus dentatus der *Emx2*^{-/-} Mutante abnorm auf die germinativen Zonen beschränkt**

Zum Zeitpunkt E14.5 wurde *Id3* im Wildtyp Gyrus dentatus nicht exprimiert (Abb. 10A), die Mutante hingegen wies im Neuroepithel einen *Id3*-exprimierenden Abschnitt auf (Abb. 10B). Jedoch ist bereits von einer *Id3*-Expression im Gyrus dentatus der Ratte (Pleasure et al., 2000) zu einem Entwicklungszeitpunkt (E16- E17) berichtet worden, welcher in etwa vergleichbar ist mit E14.5 bei der Maus. Die frühzeitige Expression von *Id3* im *Emx2*-defizitären Gyrus dentatus wurde immer wieder gefunden. Bei E15.5 wurde *Id3* in den germinativen Schichten des Wildtyp Hippocampus exprimiert, besonders im an die Fimbria angrenzenden Neuroepithel (Abb. 10C). Weiterhin waren wenige markierte Zellen zu sehen, die die radiale Migrationsstraße entlang zu wandern begannen (Abb. 10C). In der Mutante war eine dementsprechende *Id3*-Expression im Neuroepithel erkennbar, aber keine markierten migrierenden Zellen (Abb. 10D). Im E18.5 Wildtyp wurde *Id3* intensiv in der ventrikulären Schicht ebenso wie in Zellen entlang des Migrationswegs exprimiert (Abb. 10E). Die Intensität der *Id3*-Expression und die Anzahl der Zellen, die dieses Gen exprimierten, nahm nach distal zu und erreichte ein Maximum in der tertiären Matrix (Abb. 10E). In der *Emx2*^{-/-} Mutante waren keine *Id3*-exprimierenden Zellen in der Migrationsstraße zu sehen, während der gut definierte Bereich der *Id3*-Expression in den germinativen Schichten breiter und intensiver gefärbt erschien als im Wildtyp (Abb. 10F).

Hes5 wurde bereits zum Zeitpunkt E14.5 im Wildtyp und in der Mutante exprimiert (Abb. 10G, H). Über eine frühe Expression im Neuroepithel des Gyrus dentatus beim Wildtyp wurde bereits berichtet (Pleasure et al., 2000). Reichlich markierte Zellen bildeten einen breiten radialen Migrationsstrom im Wildtyp bei E15.5 (Abb. 10I). In der Mutante konnten zum gleichen Zeitpunkt keine *Hes5*-exprimierenden migrierenden Zellen beobachtet werden (Abb. 10J). Bei E18.5 wurde *Hes5* in der ventrikulären Zone, der Migrationsstraße und der tertiären Matrix exprimiert (Abb. 10K). Die Expressionsintensität nahm nicht wie bei *Id3* nach distal zu, sondern war gleichbleibend. Im Gyrus dentatus der Mutante war *Hes5* bei E18.5 auf die ventrikuläre Zone beschränkt (Abb. 10L).

Ngn2 ist ein proneurales Gen, das im Hippocampus von Maus (Sommer et al., 1996) und Ratte (Pleasure et al., 2000) exprimiert wird. Vergleiche der Expressionen bei E14.5, E15.5 und E18.5 im Wildtyp (Abb. 11A, C, E) und in der Mutante (Abb. 11B, D, F) zeigten, dass *Ngn2* scheinbar korrekt in den ventrikulären und subventrikulären Schichten der Mutante exprimiert wird. Jedoch waren die im Wildtyp ab E15.5 auftretenden markierten migrierenden Zellen in der Mutante sowohl bei E15.5 als auch bei E18.5 nicht vorhanden. Die Tatsache, dass *Ngn2* bei E18.5 im hippocampalen Neuroepithel des Wildtyps intensiv exprimiert wurde und ebenfalls (obgleich in geringerer Intensität) in der Migrationsstraße (Abb. 11E), lässt die Möglichkeit in Erwägung ziehen, *Ngn2* könne ein Marker für eine kleine Untergruppe migrierender Vorläufer sein.

Diese Resultate deuten darauf hin, dass Vorläuferzellen, welche die verschiedenen Stufen der bHLH Gen-Expression durchlaufen, in der Mutantenanlage zwar anwesend, aber abnorm auf die germinativen Schichten beschränkt sind.

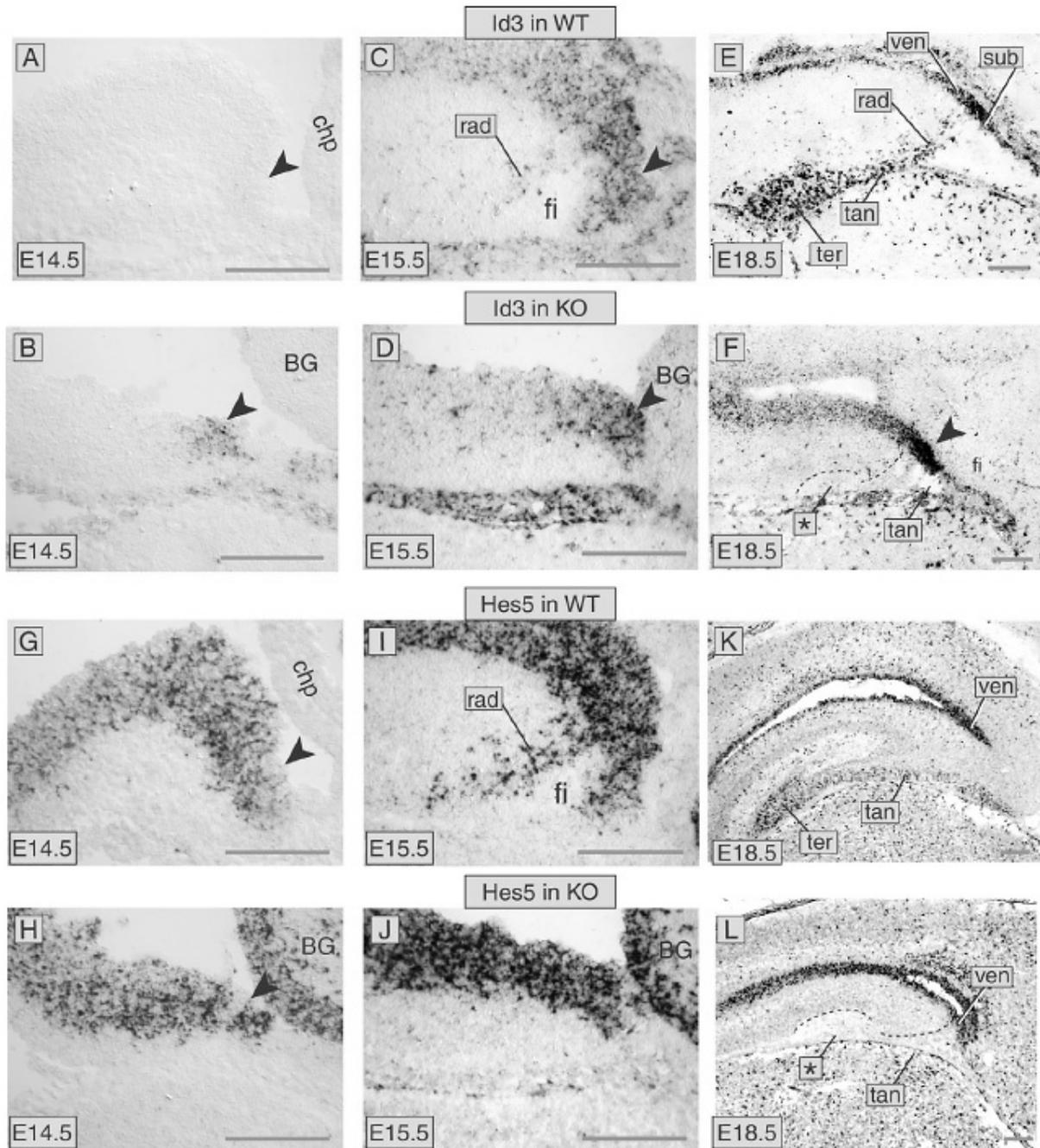


Abbildung 10: *Id3* und *Hes5* sind im Gyrus dentatus der *Emx2*^{-/-} Mutante auf das Neuroepithel begrenzt.

(A, B) *Id3* wird bei E14.5 im Wildtyp Gyrus dentatus nicht exprimiert (Pfeilspitze in A), aber bildet einen abgegrenzten Bereich frühzeitiger Expression im Neuroepithel des *Emx2*-defizienten Gyrus dentatus (Pfeilspitze in B). (C, D) Bei E15.5 wird *Id3* in den germinativen Schichten des Wildtyp Hippocampus exprimiert (C), besonders im Neuroepithel nahe der Fimbria (Pfeilspitze), sowie in wenigen radial migrierenden Zellen (rad). In der Mutante wird *Id3* zu diesem Zeitpunkt exprimiert (Pfeilspitze in D), aber migrierende Zellen sind nicht zu sehen. (E, F) Bei E18.5 wird *Id3* im Wildtyp (E) in allen sich entwickelnden Subregionen des Gyrus dentatus exprimiert. In der Mutante (F) ist *Id3* auf die germinativen Schichten (Pfeilspitze) begrenzt. (G, H) Bei E14.5 wird *Hes5* sowohl im Wildtyp (Pfeilspitze in G) als auch im Mutanten (Pfeilspitze in H) Neuroepithel des Gyrus

dentatus exprimiert. (I, J) *Hes5* wird im Wildtyp bei E15.5 in den germinativen Schichten und in radial migrierenden Zellen exprimiert (I), während es in der Mutante (J) auf das Neuroepithel begrenzt zu sein scheint. (K, L) Zum Zeitpunkt E18.5 ist eine *Hes5*-Expression in allen Bereichen des Wildtyp Gyrus dentatus (K) vorhanden, in der Mutante (L) aber weiterhin auf das Neuroepithel beschränkt.

Abkürzungen: BG, Basalganglion; chp, Plexus choroideus; fi, Fimbria; rad, radiale Migrationsstraße; Sternchen, Bereich der hippocampalen Fissur in der Mutante; sub, subventrikuläre Schicht; tan, tangentielle Migrationsstraße; ter, tertiäre Matrix; ven, ventrikuläre Schicht. Maßstab = 200 μ m

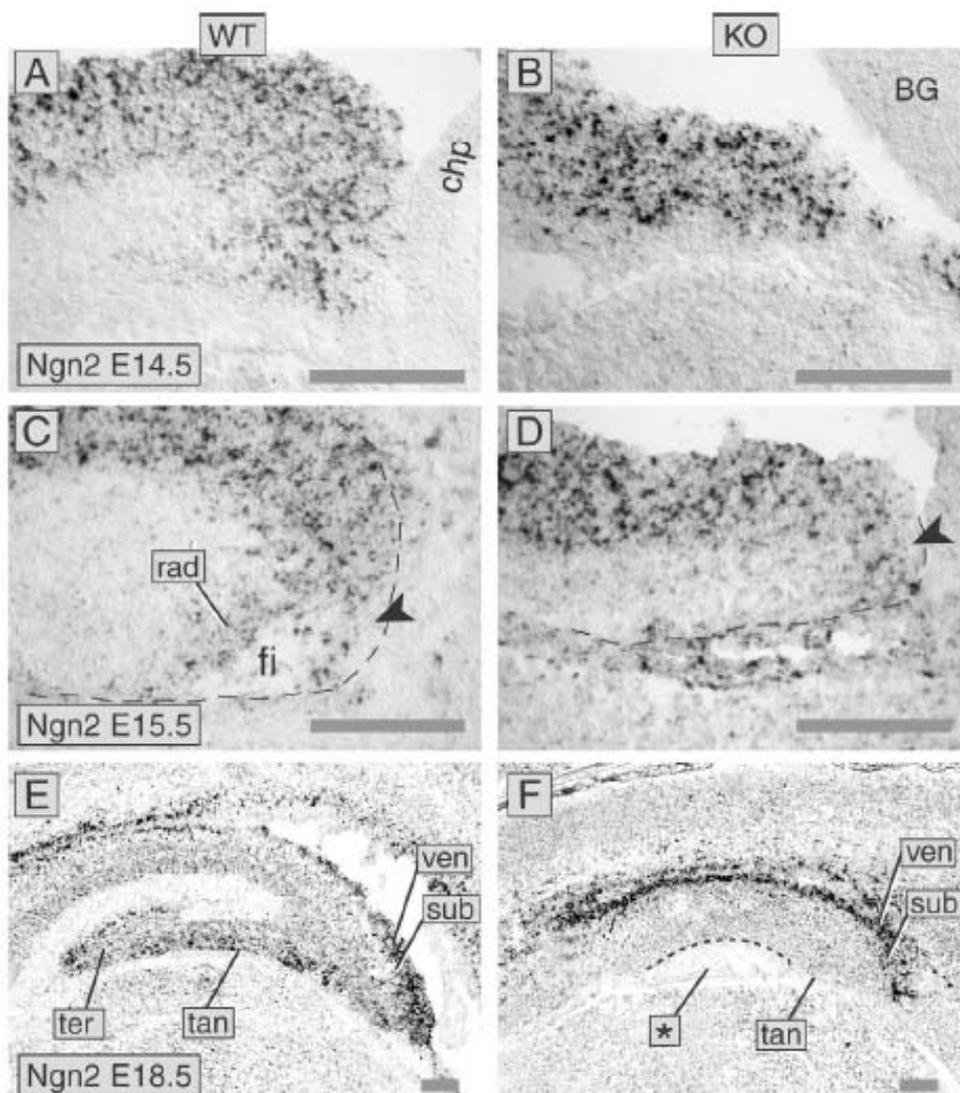


Abbildung 11: Die Expression von *Ngn2* ist im Gyrus dentatus der *Emx2*^{-/-} Mutante verändert.

(A, B) Bei E14.5 weisen die Anlage des Gyrus dentatus von Wildtyp (A) und Mutante (B) eine vergleichbare *Ngn2*-Expression auf. (C, D) Bei E15.5 wird *Ngn2* im Wildtyp (C) Neuroepithel (Pfeilspitze) und in der radialen Migrationsstraße (rad) exprimiert, während in der Mutante (D) eine korrekte Expression im Neuroepithel (Pfeilspitze) vorhanden ist, in der Migrationsstraße aber fehlt. (E, F) *Ngn2* wird bei E18.5 im Wildtyp (E) in den

germinativen Schichten und in der Migrationsstraße exprimiert. In der Mutante (F) weist nur das Neuroepithel eine Expression auf.

Abkürzungen: BG, Basalganglion; chp, Plexus choroideus; fi, Fimbria; rad, radiale Migrationsstraße; Sternchen, Bereich der hippocampalen Fissur in der Mutante; sub, subventrikuläre Schicht; tan, tangentiale Migrationsstraße; ter, tertiäre Matrix; ven, ventrikuläre Schicht. Maßstab = 200 µm

Körnerzellen beenden im *Emx2*^{-/-} Gyrus dentatus ihre Differenzierung nicht vollständig und sammeln sich in der tangentialen Migrationsstraße an

Trotz annähernder Abwesenheit migrierender Vorläufer zeigte die *Prox1*-Expression (Abb. 6E), dass dennoch Körnerzellen in der Mutante produziert wurden. Dies stimmte überein mit bereits früheren Veröffentlichungen (Tole et al., 2000), in denen andere Marker verwendet wurden. Es stellte sich die Frage, ob diese Mutanten Körnerzellen korrekt spezifiziert waren.

Prox1 ist, wie bereits im Abschnitt 4.1.2.1 beschrieben, ein Homöobox Transkriptionsfaktor Gen (Oliver et al., 1993), das spezifisch von Körnerzellen des Gyrus dentatus exprimiert wird (Elliott et al., 2001). Im Wildtyp wurde *Prox1* bei E14.5 im hippocampalen Neuroepithel schwach exprimiert (Abb. 12A), war aber in der gleichaltrigen Mutante vollkommen abwesend (verzögerter Expressionsbeginn; Abb. 12B). Bei E18.5 waren im Wildtyp die germinativen Zonen (ventrikuläre und subventrikuläre Schicht) nicht mehr markiert, sondern *Prox1* wurde intensiv in der tangentialen Migrationsstraße und in der tertiären Matrix exprimiert (Abb. 12C). Im Gegensatz dazu zeigten *Emx2*^{-/-} Mutanten eine abnorm starke Expression von *Prox1* in der ventrikulären und subventrikulären Zone bei E18.5 (Abb. 12D). Außerdem bildeten die *Prox1*-exprimierenden Zellen, die zu diesem Zeitpunkt nicht in der radialen Migrationsstraße der Mutante zu sehen waren, abnorm große, stark exprimierende Gruppen in der tangentialen Migrationsstraße (Abb. 12D), was auf einen Stopp der Migration hindeutet.

NeuroD1 und *NeuroD2* sind bHLH Gene ohne präneurale Funktion (Bertrand et al., 2002). *NeuroD1* wird in postmitotischen, unreifen Neuronen des Gyrus dentatus als ein früher Marker der neuronalen Differenzierung exprimiert. Sobald die Differenzierung zu Körnerzellen des Gyrus dentatus beendet ist (z.B. in der tertiären Matrix und in der frühen Körnerzellschicht), wird zusätzlich *NeuroD2* exprimiert (Pleasure et al., 2000). Im E18.5 Wildtyp Gyrus dentatus zeigte *NeuroD1* eine sehr starke Expression in der subventrikulären Schicht, der Migrationsstraße und der tertiären Matrix (Abb. 12E), während *NeuroD2* schwach in der tertiären Matrix exprimiert wurde (Abb. 12G). In der Mutante wurde *NeuroD1* ebenfalls stark exprimiert, aber war auf die subventrikuläre Zone und die radiale

Migrationsstraße mit minimalem Übergang in die tangential begrenzt (Abb. 12F). *NeuroD2*, der Marker für ausdifferenzierte Zellen, war in der Mutanten Anlage gänzlich abwesend (Abb. 12H). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass der Gyrus dentatus der *Emx2*^{-/-} Mutante in der Lage ist, nur eine geringe Anzahl unreifer Neurone zu produzieren, die sich zu differenzieren beginnen, jedoch keine vollständige Differenzierung erreichen.

Die Ergebnisse bezüglich *NeuroD1*, *NeuroD2* und *Prox1* sind Beweise für eine nicht normgerechte Körnerzellendifferenzierung und einen anormalen Stopp der Migration.

Tabelle 1 fasst die genetische Expression im Gyrus dentatus von Wildtyp und Mutante zusammen.

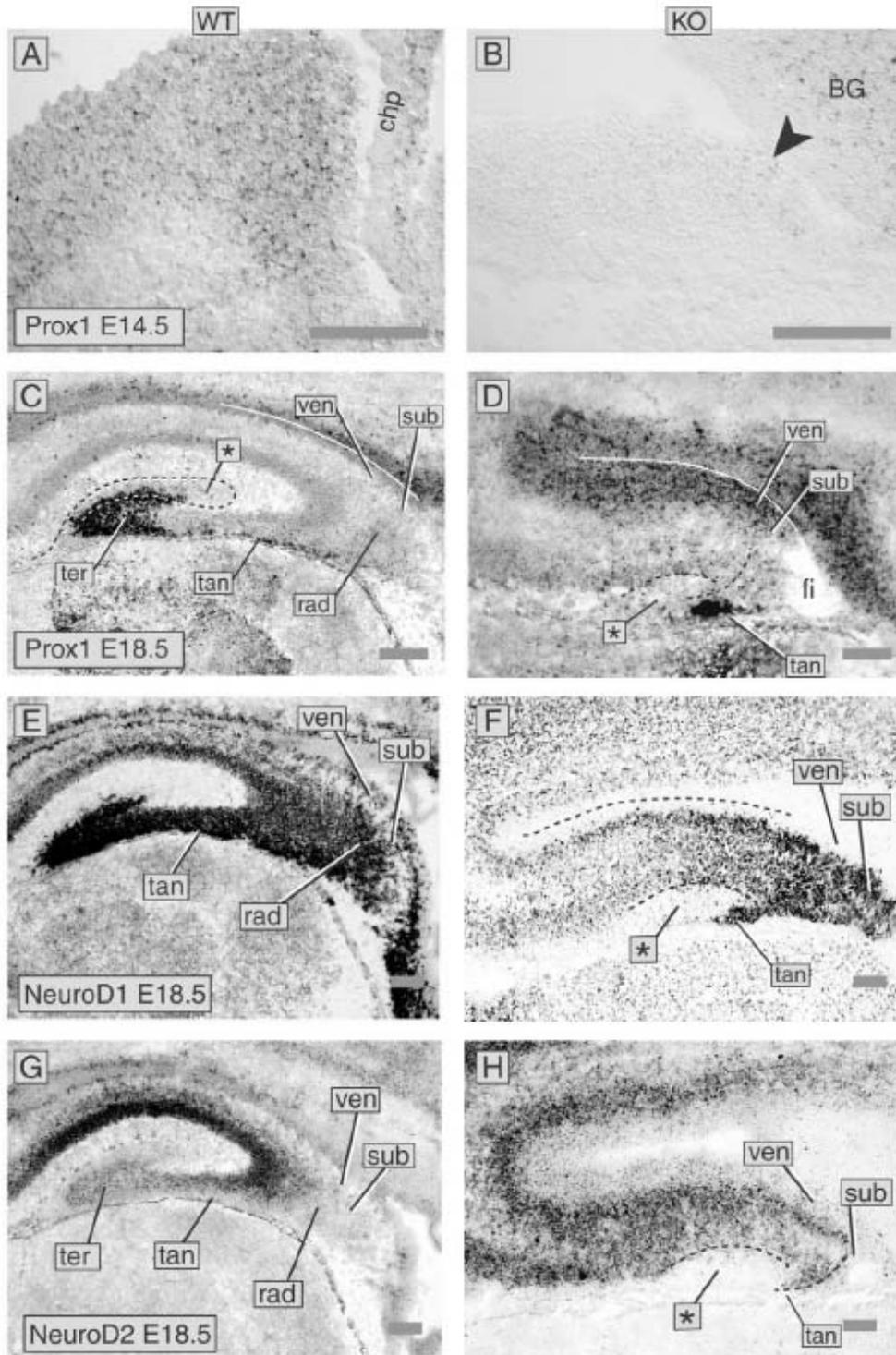


Abbildung 12: Expression der Marker für Körnerzellen verschiedener Differenzierungs-Stadien im Gyrus dentatus der *Emx2*^{-/-} Mutante.

(A, B) *Prox1* wird bei E14.5 schwach im Neuroepithel des Wildtyps (A) exprimiert und ist in der Mutante nicht vorhanden (Pfeilspitze in B). (C, D) Bei E18.5 wird *Prox1* im Wildtyp (C) in der tangentialen Migrationsstraße und in der tertiären Matrix exprimiert; die hippocampale Fissur, markiert durch die gestrichelte Linie, enthält keine *Prox1*-exprimierenden Zellen. In der Mutante (D) ist eine anormale Expression von *Prox1* in der

ventrikulären und subventrikulären Zone vorhanden; markierte Zellen sammeln sich in der tangentialen Migrationsstraße an. (E, F) Bei E18.5 ist in allen Abschnitten des Wildtyp Gyrus dentatus (E) eine starke *NeuroD1*-Expression zu erkennen. In der Mutante (F) befinden sich *NeuroD1*-exprimierende Zellen vorwiegend in der radialen und der beginnenden tangentialen Migrationsstraße. (G, H) Im E18.5 Gyrus dentatus des Wildtyps (G) wird *NeuroD2* nur in der tertiären Matrix exprimiert. Im Gyrus dentatus der Mutante (H) fehlt die *NeuroD2* –Expression vollkommen. Eine starke Expression weist bei beiden die CA-Region des Hippocampus auf.

Abkürzungen: BG, Basalganglion; chp, Plexus choroideus; fi, Fimbria; hf, hippocampale Fissur; rad, radiale Migrationsstraße; Sternchen, Bereich der hippocampalen Fissur; sub, subventrikuläre Schicht; tan, tangentiale Migrationsstraße; ter, tertiäre Matrix; ven, ventrikuläre Schicht. Maßstab = 200 µm

Gen	Wildtyp					<i>Emx2</i> ^{-/-} Mutante			
	ter	tan	rad	subven	ven	tan	rad	subven	ven
<i>Mash1</i>	-	++	-	+	+	-	-	-	-
<i>Notch1</i>	++	++	++	++	+	-	-	++	++
<i>Delta1</i>	(+)	(+)	+	+	+	-	-	+	+
<i>Ngn2</i>	-	++	+	++	++	-	-	++	++
<i>Id3</i>	++	++	++	++	++	-	-	-	+++
<i>Hes5</i>	++	+	+	+	++	-	-	-	++
<i>Tenascin C</i>	+++	+++	+++	+++	+++		+	+++	+++
<i>Prox1</i>	+++	++	-	-	-	+++	-	++	++
<i>NeuroD1</i>	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	-
<i>NeuroD2</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 1: Beschränkung der Marker auf die proximale Seite der Mutanten Gyrus dentatus Anlage (bei E18.5)

- keine, (+) sehr geringe, + geringe, ++ mittlere und +++ starke Expression

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass die Kaskade der bHLH Gene auch in der *Emx2*^{-/-} Mutante durchlaufen wird. Es werden alle Faktoren exprimiert; das proneurale Gen *Mash1* tritt nur vorübergehend in Erscheinung. Eine Differenzierung der Zellen des Gyrus dentatus findet folglich statt, wird jedoch nicht vollständig abgeschlossen. Deutlich wird, dass die Migration nicht normgerecht erfolgt, da alle exprimierten Faktoren auf die proximale Seite der Mutanten Gyrus dentatus Anlage beschränkt bleiben. Dies wurde im Folgenden näher untersucht.

4.1.2.4 Migration

Die Migration von proliferierenden Zellen und von Neuronen im Gyrus dentatus der *Emx2*^{-/-} Mutante sind unterschiedlich betroffen

In der Gyrus dentatus Anlage gibt es sowohl migrierende unreife Neurone (postmitotisch) als auch migrierende proliferierende (mitotische) Zellen, die die sogenannte „sekundäre Matrix“ bilden (Altman and Bayer, 1990b). Mit Hilfe des die proliferierenden Zellen markierenden Gens Ki-67 wurde bereits gezeigt, dass die Proliferation im *Emx2*^{-/-} Gyrus dentatus stark vermindert und überwiegend auf die ventrikuläre Zone begrenzt ist (s. 4.1.2.2 sowie Abb. 13D, E), was der großen Anzahl proliferativer Zellen, die in allen Subregionen des Wildtyp Gyrus dentatus vorhanden sind (Abb. 13B), gegenüber steht.

Nun wurde ein Antikörper gegen Calretinin, ein Marker für neuronale Differenzierung, verwendet, um die postmitotischen Zellen und deren Migration beurteilen zu können. Im Wildtyp wurden Calretinin-positive Zellen am distalen Ende der tangentialen Migrationsstraße sowie in der tertiären Matrix gefunden (Abb. 13F). In der Mutante war die Anzahl der Calretinin-positiven Zellen drastisch reduziert. Die wenigen positiven Zellen waren in der tangentialen Migrationsstraße zu finden (Abb. 13G).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass das Fehlen von *Emx2* im Gyrus dentatus die mitotischen und postmitotischen wandernden Subpopulationen unterschiedlich beeinflusst: Während die proliferierenden Zellen hauptsächlich in der ventrikulären Zone oder deren unmittelbaren Umgebung festgehalten wurden, waren zumindest einige unreife Neurone fähig, einen Teil des Weges in Richtung der mutmaßlichen Lage der Körnerzellschicht zu wandern, bevor sie in der tangentialen Migrationsstraße gestoppt wurden.

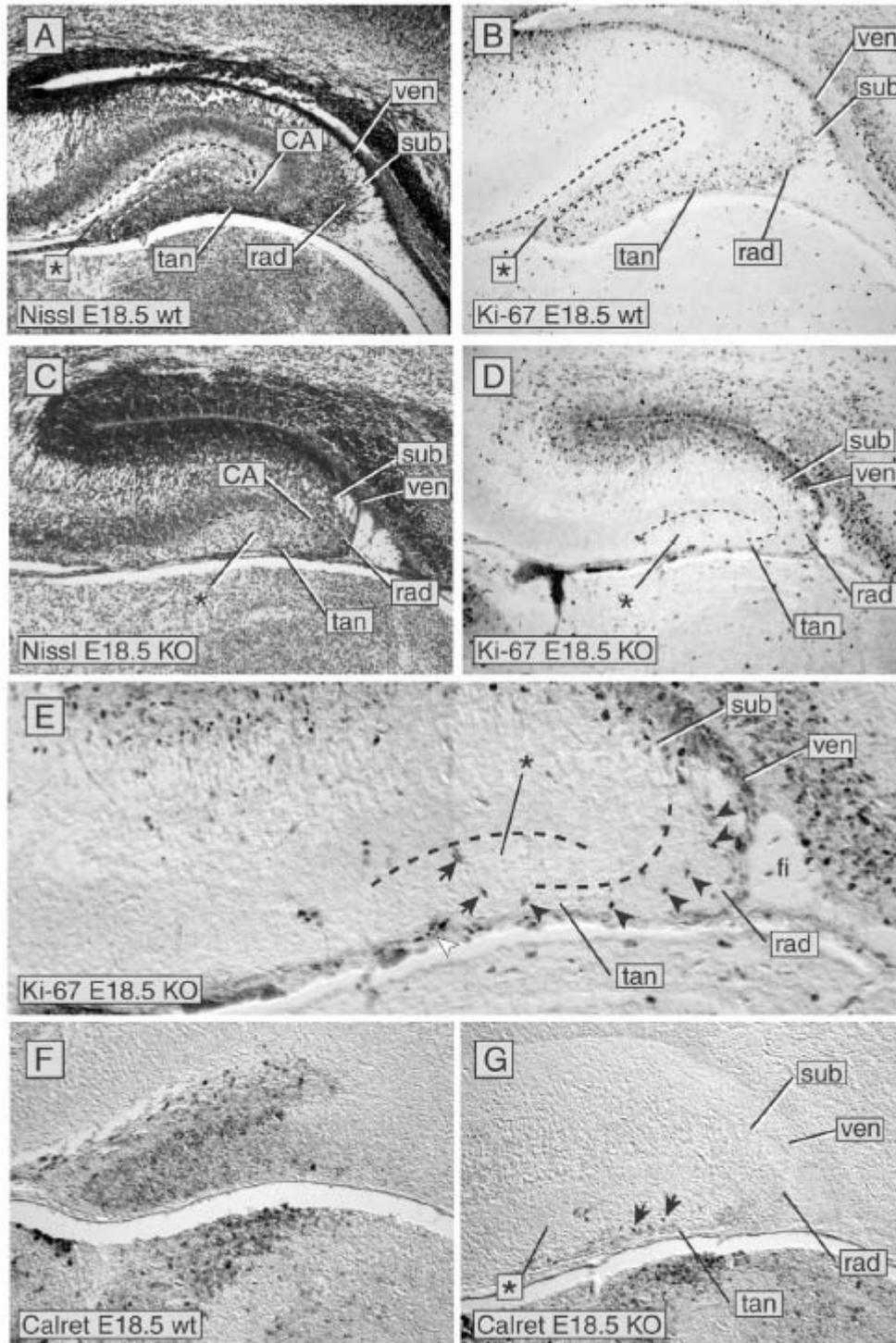


Abbildung 13: Proliferierende Zellen und Neurone werden im Gyrus dentatus der *Emx2*^{-/-} Mutante an unterschiedlichen Punkten gestoppt.

(A, B) Ein Vergleich zwischen Nissl-gefärbtem (A) und anti-Ki-67-markiertem (B) Wildtyp Gyrus dentatus zeigt, dass proliferierende Zellen in jeder Subregion gefunden werden können, inklusive der hippocampalen Fissur (Bereich innerhalb der gestrichelten Linie beim Wildtyp bzw. Sternchen beim *Emx2*^{-/-}). (C, D) Die Nissl-gefärbte Mutante Anlage (C) ist ein hakenförmiger Bereich, der von der ventrikulären und subventrikulären

Zone, der radialen Migrationsstraße und einer sehr verkürzten tangentialen Migrationsstraße gebildet wird. Ein zellularer Bereich (Sternchen in C, D, E, G) entspricht der mutmaßlichen hippocampalen Fissur. Proliferierende Zellen (D) sind in der Mutante hauptsächlich in der ventrikulären und subventrikulären Zone vorhanden sowie einige verstreute auch in der radialen und tangentialen Migrationsstraße. (E) Eine Vergrößerung von (D) zeigt vereinzelte proliferierende Zellen in der Migrationsstraße (Pfeilspitzen) und im Bereich der unvollständigen hippocampalen Fissur (Pfeile), die an einem Abschnitt der Pia anliegt, der eine erhöhte Proliferation aufweist (weiße Pfeilspitze). (F, G) Neuronale Zellen (markiert mittels anti-Calretinin Antikörpern) im Wildtyp (F) und *Emx2*^{-/-} (G) E18.5 Gyrus dentatus. Die zahlreichen markierten Zellen im Wildtyp (F) stehen im Kontrast zu den wenigen Calretinin-positiven neuronalen Zellen in der Mutante (G), die nur entlang der tangentialen Migrationsstraße vorhanden sind.

Abkürzungen: fi, Fimbria; rad, radiale Migrationsstraße; Sternchen, Bereich der hippocampalen Fissur; sub, subventrikuläre Schicht; tan, tangentiale Migrationsstraße; ter, tertiäre Matrix; ven, ventrikuläre

Die Expression von Astroglia-Vorläufer Marker *Tenascin C* und *GFAP* sind beide im Gyrus dentatus der *Emx2*^{-/-} Mutante eingeschränkt

Die bis zu diesem Punkt aufgeführten Resultate deuten darauf hin, dass der Hauptdefekt im Gyrus dentatus der *Emx2*^{-/-} Mutante vielleicht nicht in der Fähigkeit der Vorläufer, bHLH Gene zu exprimieren, liegt, sondern in ihrer Fähigkeit zu migrieren. Radiale Glia Zellen sind ein Schlüsselement in der Histogenese des Gyrus dentatus. Ihre Fortsätze bilden ein Gerüst, an dem die sich entwickelnden Zellen des Gyrus dentatus entlang wandern. Später wandern viele von ihnen nach distal, entwickeln sich zu Astrozyten und tragen zum Aufbau der Körnerzellschicht bei (Eckenhoff and Rakic, 1984; Rickmann et al., 1987).

Um diese Annahme zu prüfen, wurde der Zustand von Astrozyten und deren Vorläufern im sich entwickelnden Gyrus dentatus bei Wildtyp und Mutante analysiert. *Tenascin C* (Chiquet and Fambrough, 1984; Chiquet-Ehrismann et al., 1986), ein von der Glia produziertes extrazelluläres Matrixprotein (Bartsch et al., 1992a,b), ist ein Marker für migrierende Astroglia-Vorläufer des Gyrus dentatus (Bartsch et al., 1992a,b; Yuasa, 2001a,b). *Tenascin C* wurde spezifisch im Neuroepithel des Wildtyp Gyrus dentatus bei E14.5 exprimiert (Abb. 14A), aber noch nicht in der Mutante, wo der Beginn der Expression eine Verzögerung aufweist (Abb. 14B). Bei E18.5 konnte im Wildtyp Gyrus dentatus (Abb. 14C) eine starke Expression von *Tenascin C* in der ventrikulären und subventrikulären Schicht beobachtet werden und in unterschiedlichen Intensitäten auch in der übrigen Gyrus dentatus Anlage. In der Mutante wurde *Tenascin C* jedoch nur in der germinativen Zone und in sehr wenigen Zellen der radialen Migrationsstraße exprimiert (Abb. 14D). Folglich sind in der *Emx2*^{-/-}

Mutante die migrierenden Astroglia-Vorläufer hauptsächlich auf die germinativen Schichten begrenzt, was mit den Ergebnissen bezüglich der bHLH Gene übereinstimmt.

GFAP (Glial fibrillary acidic protein) ist ein von radialer Glia und Astrozyten reich exprimiertes Protein (Eckenhoff and Rakic, 1984). Im Neuroepithel und in der sekundären Matrix ist es co-lokalisiert mit Tenascin C (Yuasa, 2001a). Die Expression von *GFAP* konnte im E18.5 Wildtyp Gehirn in jeder Subregion des Gyrus dentatus nachgewiesen werden (Abb. 14E), während die Expression in der Mutante auf das Neuroepithel beschränkt war (Abb. 14F). Der immunzytochemische Nachweis von GFAP im Hippocampus von Wildtyp und Mutante bei E18.5 (Abb. 14G, H) stimmte mit den In Situ Ergebnissen überein. Während der Wildtyp Hippocampus eine kräftige GFAP Immunreaktivität (Abb. 14G) zeigte, war das GFAP Gerüst in der Mutante deutlich defekt (Abb. 14H) und nur sehr wenige GFAP-enhaltende Zellen wurden distal der radialen Migrationsstraße gefunden (Pfeilspitze in Abb. 14H).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Glia-Vorläuferzellen in der *Emx2*^{-/-} Mutante zwar vorhanden, aber nicht fähig sind, zu wandern und sich zu reifen Glia Zellen zu differenzieren, weshalb kein regelgerechtes Glia-Gerüst in der Migrationsstraße und der tertiären Matrix gebildet werden kann.

Damit zeigt sich, dass *Emx2* sowohl für die Migration von neuronalen als auch von glialen Vorläufern notwendig ist.

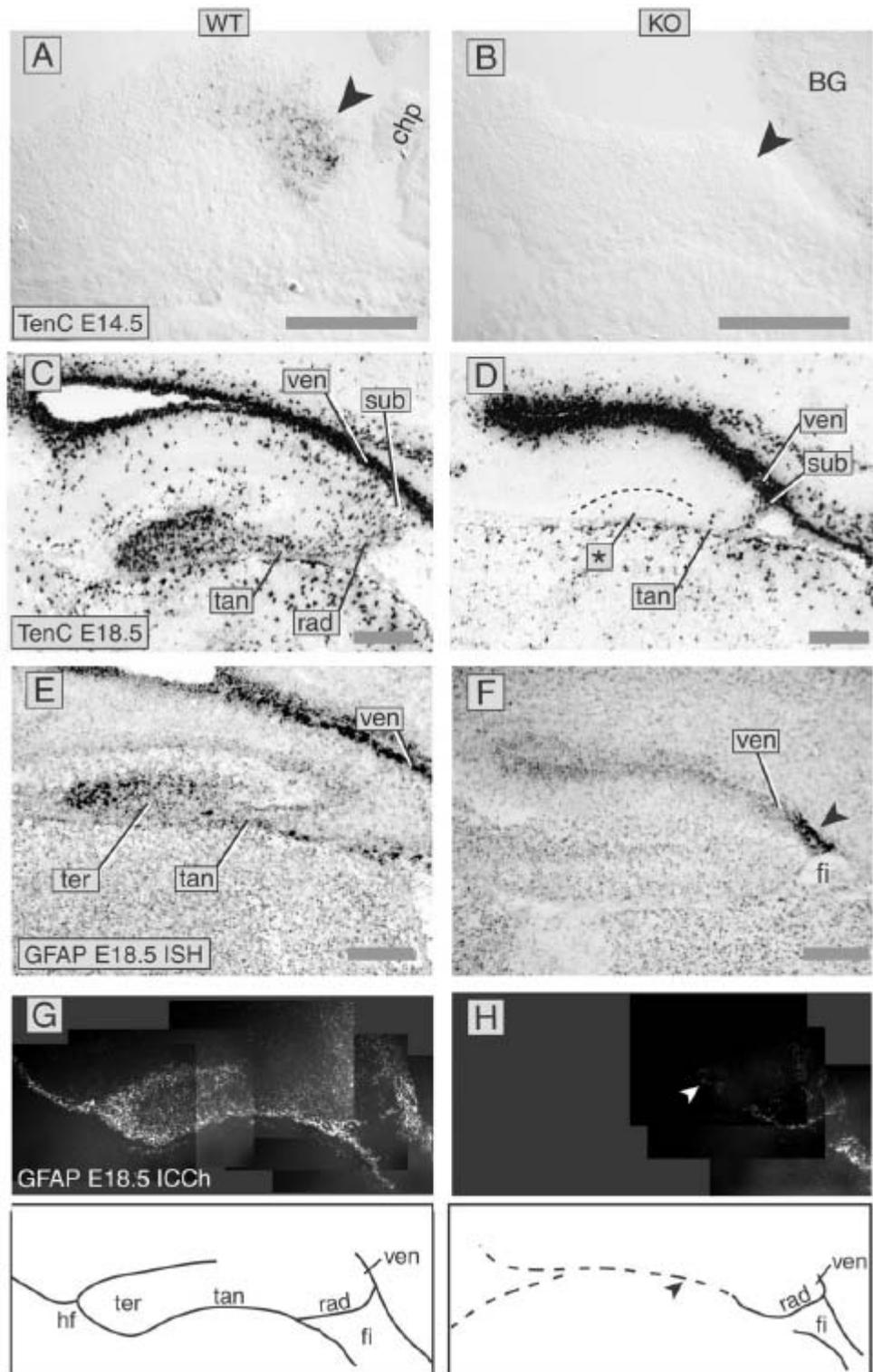


Abbildung 14: Astrozyten und deren Vorläufer weisen im Gyrus dentatus der *Emx2*^{-/-} Mutante eine gestörte Migration auf.

(A, B) Bei E14.5 wird *Tenascin C* im Neuroepithel des Gyrus dentatus beim Wildtyp (Pfeilspitze in A), nicht aber in der Mutante (Pfeilspitze in B) exprimiert. (C, D) Bei E18.5 wird *Tenascin C* in allen Bereichen des Wildtyp Gyrus dentatus (C) exprimiert, in der Mutante (D) ist es vorwiegend auf die germinativen Schichten

begrenzt (und verstreute Zellen in der radialen Migrationsstraße). (E, F) *GFAP* wird zum Zeitpunkt E18.5 in allen Bereichen des Wildtyp Gyrus dentatus exprimiert (E), aber ist in der Mutante auf die ventrikuläre Schicht begrenzt (Pfeilspitze in F). (G, H) Das GFAP Protein kommt im Wildtyp Gyrus dentatus reichlich (G), in der Mutante nur spärlich (H) vor. Die Pfeilspitzen in (H) und in der Skizze zeigen die Lage des Astrozyten, der die größte Entfernung zum Neuroepithel aufweist.

Abkürzungen: BG, Basalganglion; chp, Plexus choroideus; fi, Fimbria; hf, hippocampale Fissur; rad, radiale Migrationsstraße; Sternchen, Bereich der hippocampalen Fissur in der Mutante; sub, subventrikuläre Schicht; tan, tangentielle Migrationsstraße; ter, tertiäre Matrix; ven, ventrikuläre Schicht. Maßstab = 200 μm

Im Bereich der hippocampalen Fissur fehlt bei der *Emx2*^{-/-} Mutante das Gerüst der Radialen Glia

Im *Emx2*^{-/-} Gyrus dentatus ist das die Radiale Glia markierende Protein GFAP (glial fibrillary acidic protein) stark reduziert, was auf Veränderungen im Glia-Gerüst hindeutet (diese Arbeit und Oldekamp et al., 2004). Der Zustand der Fasern der Radialen Glia im Gyrus dentatus dieser Mutante wurde hier im Detail untersucht. Der Nachweis von Nestin, einem spezifisch in Radialen Glia Zellen exprimierten intermediären Filament (Hockfield und McKay, 1985), wurde bereits zur Markierung der Radialen Glia im Kortex und Hippocampus von fötalen Gehirnen benutzt (Super et al., 2000; Alcantara et al., 2006). Die Ergebnisse mit anti-Nestin Antikörpern zeigten, dass die Migrationsstraße im Wildtyp bei E18.5 kräftig und breit ist und sich ihre zwei Teile, der radiale und der tangentielle, leicht identifizieren lassen. Der tangentielle Abschnitt verläuft parallel zur Pia und grenzt an die tertiäre Matrix (Abb. 15A, C). In der Mutante jedoch war die Nestin-positive Migrationsstraße, die im Neuroepithel beginnt, abnorm schmal und kurz (Abb. 15B). Bei starker Vergrößerung (Abb. 15D) zeigte die Mutante eine ausgedünnte radiale und eine sehr stark verkürzte tangentielle Migrationsstraße, die als solche kaum zu erkennen war, da sie bereits an der Pia endete (Pfeilspitze in Abb. 15D). Die Antikörper Detektion von GFAP zusammen mit Ki-67 offenbarte beim Wildtyp das supragranuläre Bündel (SGB) in der Fissur sowie zahlreiche an GFAP-positiven Fortsätzen entlang wandernde Vorläuferzellen (Abb. 16A) wie bereits beschrieben (Eckenhoff und Rakic, 1984; Rickmann et al., 1987; Eckenhoff und Rakic, 1988; Altman und Bayer, 1990a, b). In der Mutante unterstützten die unvollkommenen Fasern der Radialen Glia (Pfeil in Abb. 16B) die Migration von nur wenigen Vorläuferzellen (Pfeilspitzen in Abb. 16B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Fasern der Radialen Glia im *Emx2*^{-/-} Gehirn in ihrer Anzahl extrem reduziert sind und eine stark veränderte Morphologie aufweisen. Die subpiaie Migration von Astrozyten-Vorläufern spielt eine Rolle in der Formation der sich normal

entwickelnden Fissur (Sievers et al., 1992). Auch bei der Mutante konnten im Bereich unter der Pia GFAP- und Ki-67-positive Zellen gefunden werden, jedoch in sehr geringer Anzahl (Abb. 16C).

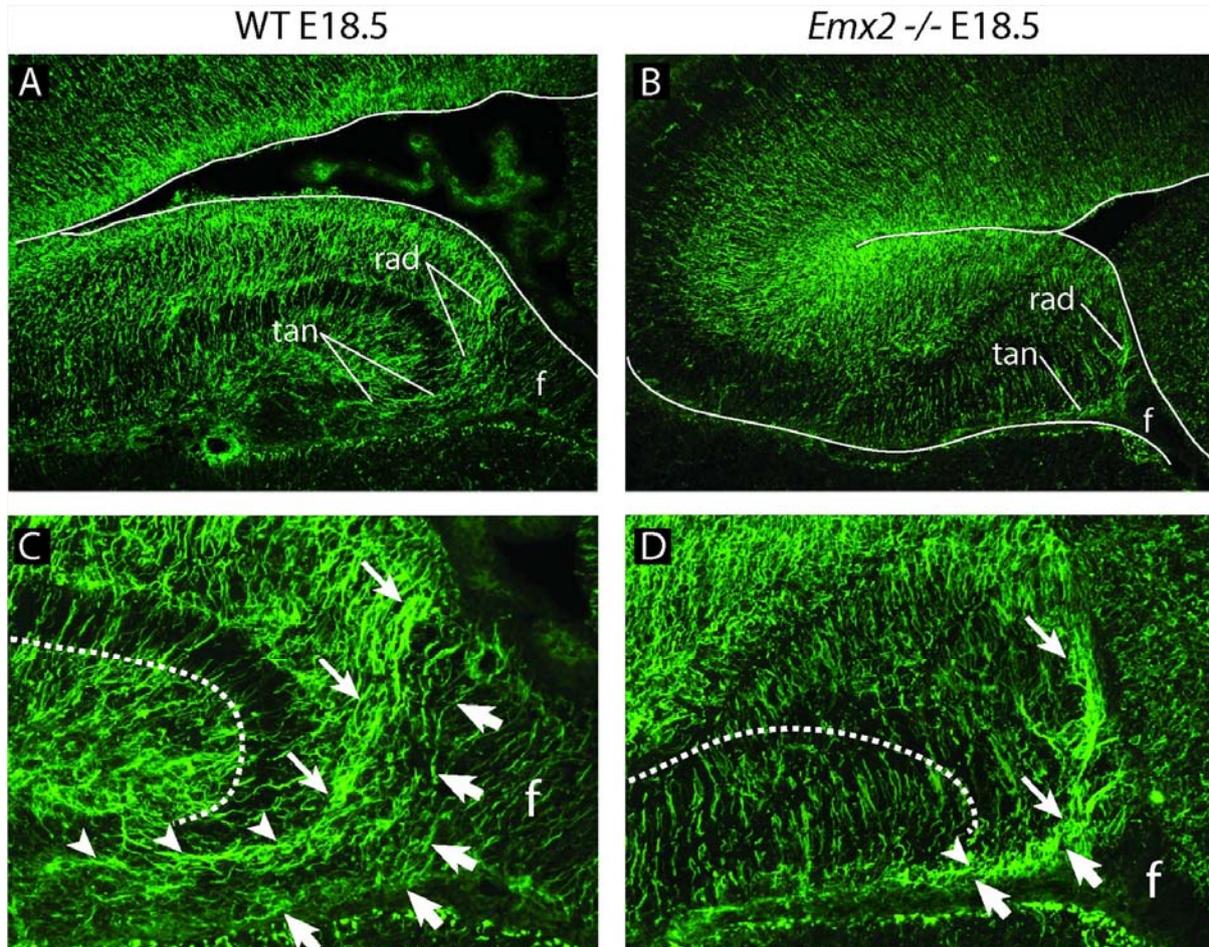


Abbildung 15: Abnorme Nestin-Expression im *Emx2*^{-/-} Hippocampus

Anti-Nestin Antikörper Färbung auf sagittalen Schnitten von E18.5 Wildtyp (A, C) und *Emx2*^{-/-} (B, D) Hippocampus. C und D zeigen Vergrößerungen von A bzw. B. (A) Nestin-positive Fasern bilden im Wildtyp Hippocampus die radiale und tangential Migrationsstraße, die vom Neuroepithel bis zur Körnerzellschicht des Gyrus dentatus führt. (B) Im *Emx2*^{-/-} Gyrus dentatus sind die Nestin-positiven Fasern nur spärlich vorhanden und bilden eine verkürzte radiale und tangential Migrationsstraße. (C) Die Vergrößerung von (A) zeigt die radiale Migrationsstraße (dünne Pfeile), gefolgt von der tangential (Pfeilspitzen); die dicken Pfeile geben die latero-caudale Grenze der Migrationsstraße an; die Fimbria weist zahlreiche parallel verlaufende Nestin-positive Fasern auf. (D) Die Vergrößerung von (B) zeigt die abnorm kurze Nestin-positive Migrationsstraße in der Mutante (dünne Pfeile, radial; Pfeilspitze, tangential); die dicken Pfeile verdeutlichen, wie abnorm schmal die Migrationsstraße ist; die Fimbria enthält keine Nestin-positiven parallelen Fasern.

Abkürzungen: f, Fimbria; rad, radiale Migrationsstraße; tan, tangential Migrationsstraße

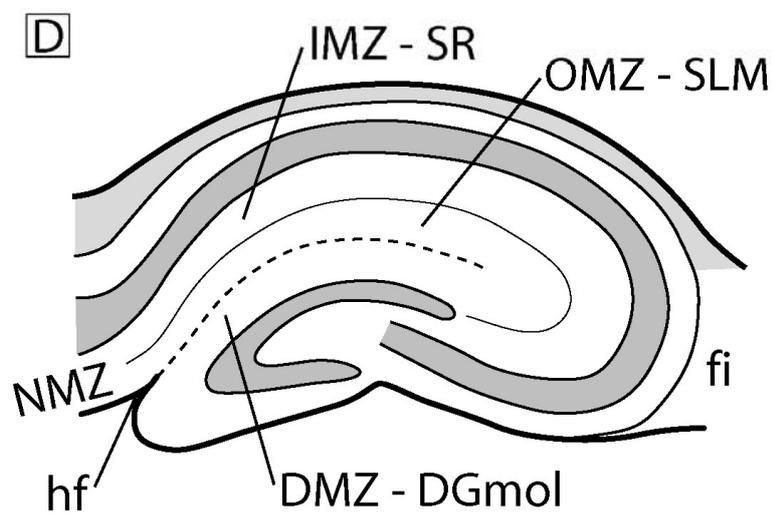
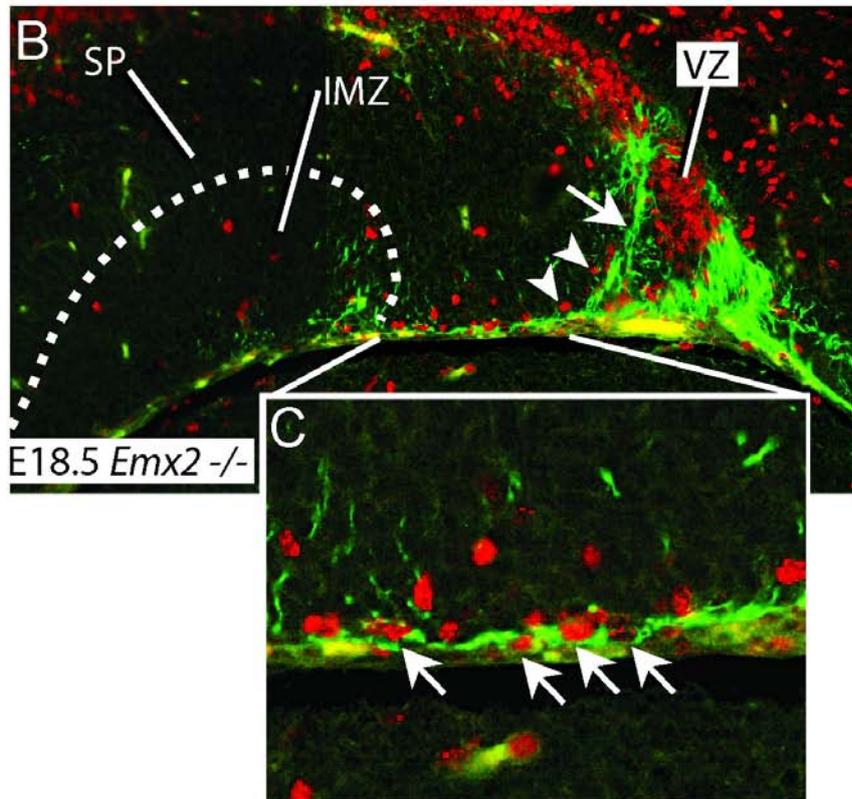
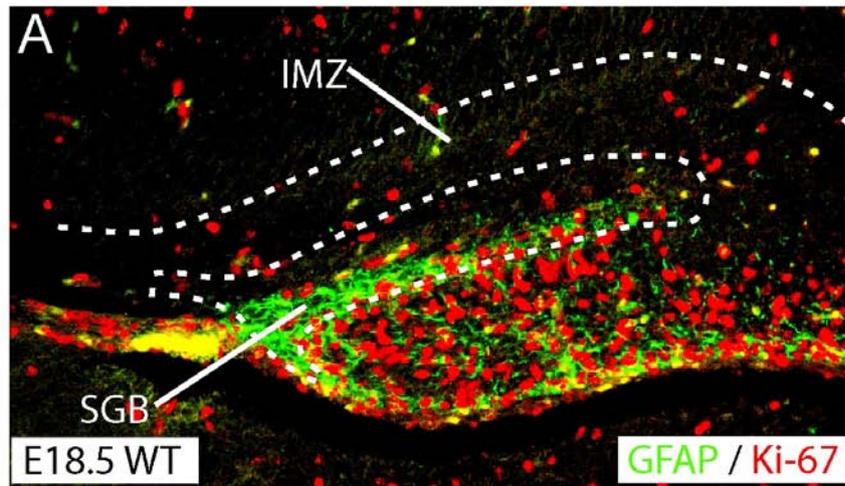


Abbildung 16: Abnorme GFAP Expression im *Emx2*^{-/-} Hippocampus

(A-C) Antikörpernachweis von GFAP (grün) und Ki-67 (rot) bei E18.5 Wildtyp (A) und *Emx2*^{-/-} (B, C) Hippocampus. (B) Nur wenige Vorläufer (Pfeilspitzen) wandern in der Mutante in der Migrationsstraße der Gyrus dentatus Anlage an den Fortsätzen der radialen Glia (Pfeil) entlang. (C) Ein vergrößerter Ausschnitt aus (B) zeigt ein paar subpial migrierende GFAP-positive Zellen (Pfeile) in der Mutante.

(D) Schematische Darstellung der Marginalzonen um die sich entwickelnde Fissur

Abkürzungen: DGmol, Molekularschicht des Gyrus dentatus; DMZ, Marginalzone des Gyrus dentatus; fi, Fimbria; hf, hippocampale Fissur; IMZ, innere Marginalzone; NMZ, neokortikale Marginalzone; OMZ, äußere Marginalzone; SGB, supragranuläres Bündel; SLM, Stratum lacunosum-moleculare; SR, Stratum radiatum

4.1.2.5 Entwicklung der Marginalzonen und Bedeutung der darin vorkommenden *Reln*-exprimierenden Zellen

***Emx2* ist speziell für die Entwicklung von OMZ und DMZ, nicht aber IMZ verantwortlich**

Als nächstes wurde der Zustand der Marginalzonen um die sich entwickelnde Fissur (Abb. 16D) in der Mutante untersucht. *Lhx6* ist ein LIM-Homöobox Gen (Grigoriou et al., 1998), das von einer aus dem Basalganglion stammenden Subpopulation von Zellen, welche tangential in die kortikale Marginalzone wandern (Lavdas et al., 1999), exprimiert wird. Im Wildtyp erreichten *Lhx6*-exprimierende Zellen die hippocampale Anlage zum Zeitpunkt E15.5 (ohne Abb.). Bei E18.5 wurde *Lhx6* in der IMZ gefunden, nicht aber im Bereich um die hippocampale Fissur (OMZ und DMZ) (Abb. 17A). Bei der gleichaltrigen *Emx2*^{-/-} Mutante war *Lhx6* ebenfalls in der IMZ vorhanden (Abb. 17B, C). Die neokortikale Marginalzone zeigte *Lhx6*-exprimierende Zellen und konnte bis zu dem Punkt verfolgt werden (Pfeil in Abb. 17C), an dem sie sich in *Lhx6*-exprimierende IMZ und nicht-*Lhx6*-exprimierende OMZ und DMZ teilt. Die *Lhx6*-Expression in der Mutante, fungierend als eine “Negativ-Färbung”, definiert die Mutante OMZ und DMZ als ein schmales Band von Zellen zwischen der IMZ (dorsal) und der Pia (ventral). Die Trennung zwischen beiden wurde in der Mutante bemerkenswert gut eingehalten (Abb. 17C). Diese Resultate deuten darauf hin, dass die Marginalzonen um den Bereich der hippocampalen Fissur bei der *Emx2*^{-/-} Mutante korrekt spezifiziert und lokalisiert sind und dass zumindest die IMZ von den entsprechenden Zellen besiedelt ist. Jedoch sind die OMZ und DMZ in der Mutante nicht fähig, ihre normale Größe zu erreichen, sondern sind atrophisch.

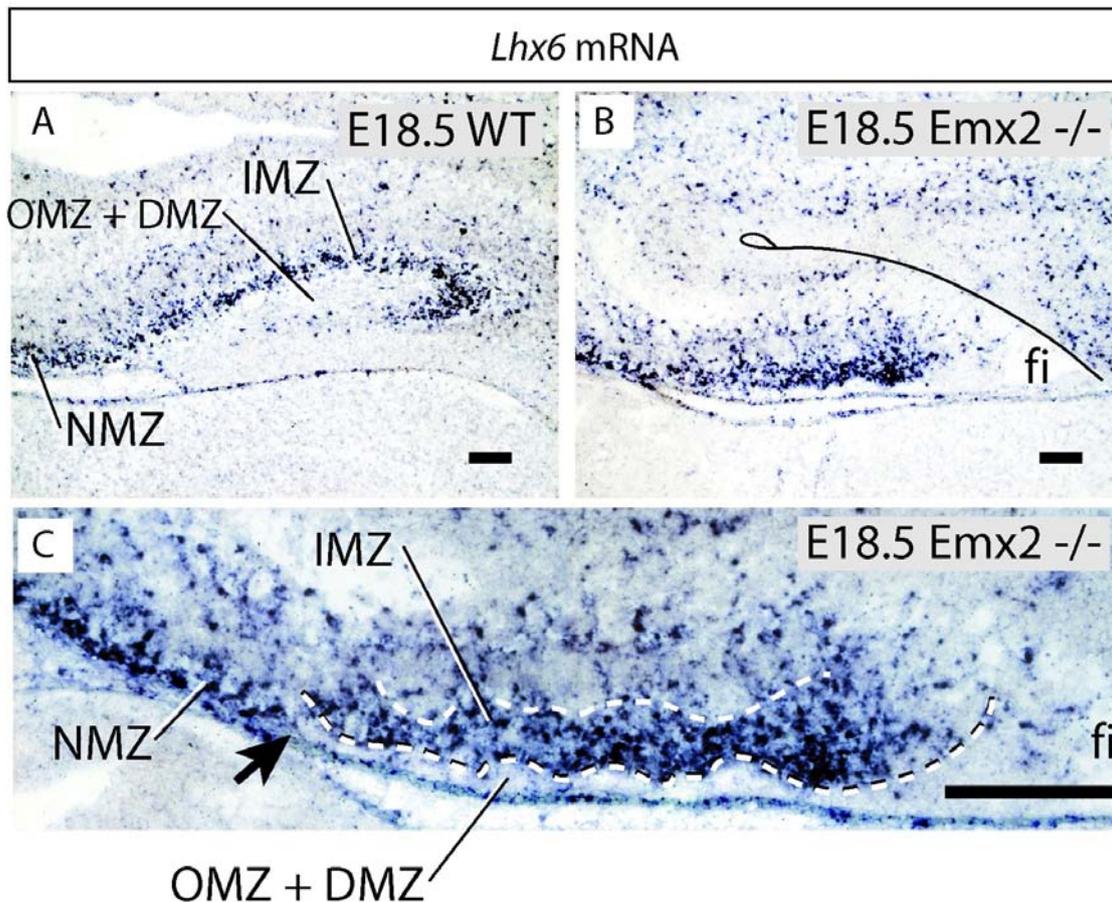


Abbildung 17: Atrophischer Bereich der hippocampalen Fissur im *Emx2*^{-/-} Hippocampus

(A) Bei E18.5 sind *Lhx6*-exprimierende Zellen im Wildtyp Hippocampus in der IMZ verteilt, nicht aber in der OMZ + DMZ. (B) Im E18.5 *Emx2*^{-/-} Hippocampus ist ebenfalls in der IMZ eine *Lhx6*-Expression nachweisbar. (C) Die Vergrößerung von (B) zeigt, dass die *Lhx6*-Expression in der IMZ (zwischen den gestrichelten Linien) im *Emx2*^{-/-} Hippocampus als „Negativ-Färbung“ zur Darstellung von OMZ + DMZ fungiert, welche keine *Lhx6*-Expression aufweisen und stark verkümmert erscheinen. Der Pfeil zeigt den Übergang, an dem sich die NMZ in IMZ und OMZ + DMZ teilt.

Abkürzungen: DMZ, Marginalzone des Gyrus dentatus; fi, Fimbria; IMZ, innere Marginalzone; NMZ, neokortikale Marginalzone; OMZ, äußere Marginalzone. Maßstäbe = 100 μ m

***Reln*-exprimierende Zellen im sich entwickelnden Bereich der hippocampalen Fissur in der *Emx2*^{-/-} Mutante**

Als nächstes sollten die Zellen der OMZ + DMZ analysiert werden. Eine sehr bedeutende Zellgruppe in diesen Schichten ist diejenige, welche von den *Reln*-exprimierenden Zellen gebildet wird (Alcantara et al., 1998). Im Wildtyp konnten charakteristisch große Mengen von *Reln*-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden (Abb. 18A), während der *Emx2*^{-/-} Gyrus

dentatus (Abb. 18B) eine sehr verminderte Anzahl dieser Zellen aufwies, die an der Grenze zur Pia im mutmaßlichen Bereich der hippocampalen Fissur (wo die hippocampale Anlage sich leicht einfaltet) lokalisiert waren. Einige *Reln*-exprimierende Zellen wanderten dorsal in die IMZ, wie auch im Wildtyp beobachtet wurde (Abb. 18A, B).

Weiterhin wurde die Expression des LIM-Homöobox Gens *Lhx5* analysiert, ein Marker der *Reln*-exprimierenden Zellen der Marginalzone (Yamazaki et al., 2004), der im sich entwickelnden Hippocampus exprimiert wird (Bertuzzi et al., 1996; Sheng et al., 1997; Hobert und Westphal, 2000). Die Gehirne von *Lhx5*^{-/-} Mutanten Mäusen zeigen den gleichen hippocampalen Phänotyp wie *Emx2*^{-/-} Mutanten mit Verlust des Bereichs um die Fissur, des Gyrus dentatus und der *Reln*-exprimierenden Zellen in der Marginalzone (Zhao et al., 1999). *Lhx5* mRNA wurde im Wildtyp in der neokortikalen Marginalzone (ohne Abb.) und im Hippocampus (Abb. 18C) gefunden, wo reichlich *Lhx5*-exprimierende Zellen in der OMZ + DMZ vorhanden waren. Dieses Expressionsmuster war dem des *Reln* sehr ähnlich mit dem Unterschied, dass nur sehr wenige *Lhx5*-positive Zellen in die Wildtyp IMZ eintraten (vergleiche Abb. 18A und C). In der Mutante war die *Lhx5*-Expression in der neokortikalen Marginalzone verschwunden (ohne Abb.), aber in der reduzierten OMZ + DMZ erhalten (Abb. 18D). Das Expressionsmuster von *Lhx5* in der Mutante (Abb. 18D) war gleich dem von *Reln* (Abb. 18B) mit der einzigen Ausnahme, dass (wie im Wildtyp) nur sehr wenige *Lhx5*-exprimierende Zellen die IMZ betraten (Abb. 18C, D). Die Ergebnisse der Abb. 17 und 18 zeigen, dass sich die Marginalzone an dem Punkt, wo Neokortex und hippocampale Anlage aufeinandertreffen, in zwei Regionen teilt (IMZ und OMZ + DMZ), die *Lhx6* (IMZ; Abb. 17A) bzw. *Lhx5* (OMZ + DMZ; Abb. 18C) exprimieren. OMZ + DMZ sind in der *Emx2*^{-/-} Mutante atrophisch und die Anzahl ihrer *Reln*-exprimierenden Zellen ist stark reduziert.

Reln*-exprimierende Zellen im Bereich der Fissur „exprimieren“ *Emx2

Emx2 ist als Marker für *Reln*-exprimierende Zellen der Marginalzone bekannt (Hevner et al., 2003). Die Tatsache, dass eine gewisse Anzahl *Lhx5*- und *Reln*-exprimierender Zellen in der *Emx2*-defizitären Region der Fissur verbleibt, könnte auf die Existenz einiger *Reln*-exprimierender Zellen in diesem Bereich hinweisen, die nicht *Emx2* exprimieren. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden In Situ Hybridisierungen für *Emx2* mit einer Sonde für die nicht ersetzte 3' UTR Region der *Emx2* mRNA gemacht. Diese Sonde ermöglichte, die Aktivierung der *Emx2*-Transkription (*Emx2*-TA) in homozygoten (*Emx2*^{-/-}) Gehirnen zu detektieren. Bei E18.5 wurde *Emx2* beim Wildtyp in allen Teilen des Gyrus dentatus stark

exprimiert und auch in der OMZ, aber nicht in der IMZ (Abb. 18E). In der Mutante konnte die *Emx2*-TA in einer kleinen Zellgruppe, welche in Größe und Lage der *Reln*- und *Lhx5*-exprimierenden entsprach, festgestellt werden (Abb. 18F). Wenige markierte Zellen lagen innerhalb der IMZ (Pfeilspitzen in Abb. 18F).

Die Markierung der *Reln*-, *Lhx5*- und *Emx2*-Expression in der Mutante (Abb. 18) ergibt eine „Positiv-Färbung“ von OMZ + DMZ, die passend ist zur „Negativ-Färbung“ dieser Schichten durch den IMZ-Marker *Lhx6* (Abb. 17). Weiterhin deuten diese Daten darauf hin, dass die wenigen *Reln*-exprimierenden Zellen, die sich bei der Mutante im Bereich der hippocampalen Fissur befinden, *Emx2* exprimieren (d.h. sie zeigen eine Aktivierung der *Emx2*-Transkription), und dass sie, wie auch immer, nicht das *Emx2* Protein benötigen, um produziert und korrekt lokalisiert zu werden und zumindest einige ihrer spezifischen Marker zu exprimieren.

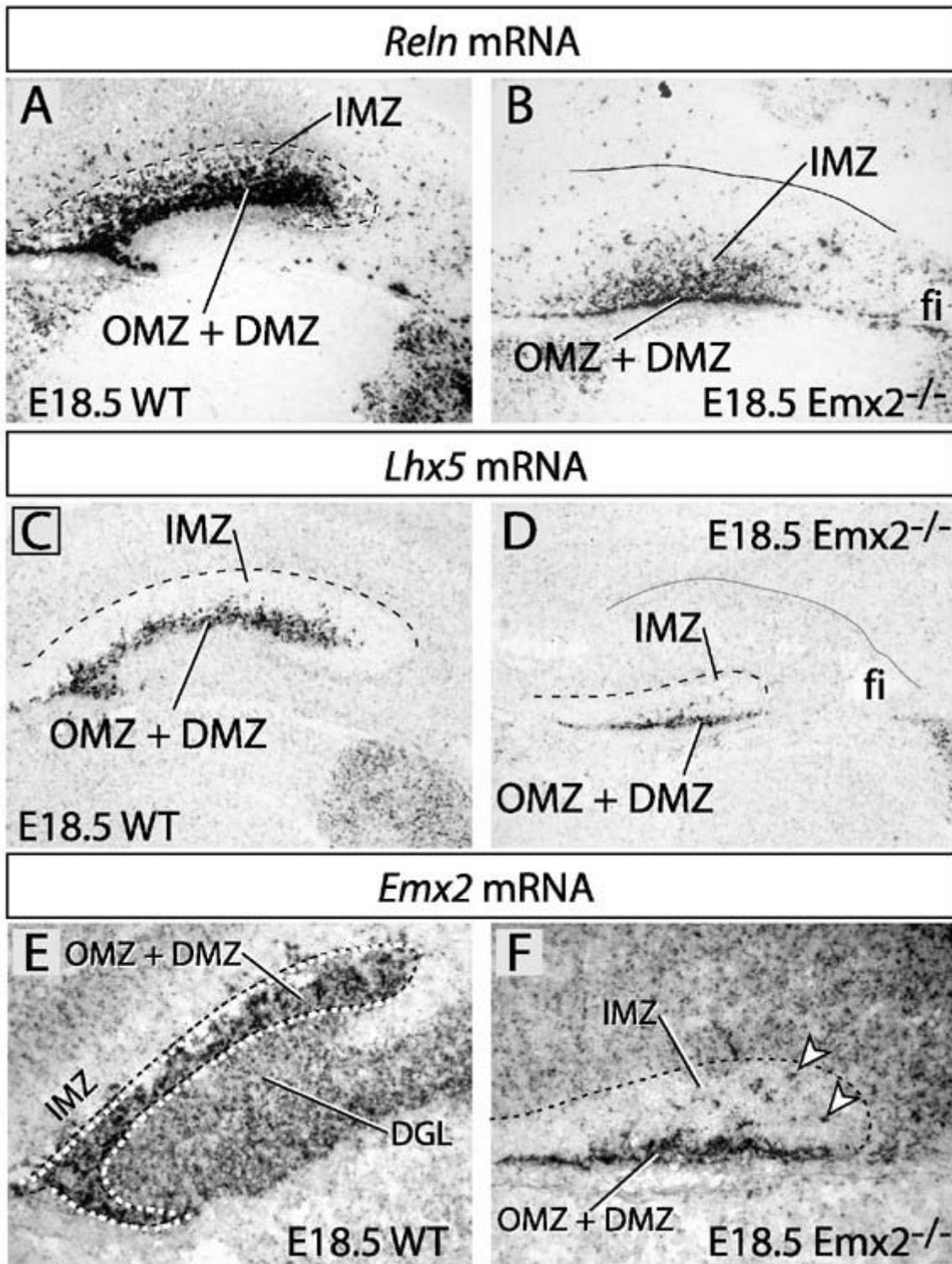


Abbildung 18: *Reelin*-exprimierende Zellen sind im *Emx2*^{-/-} Hippocampus stark vermindert

Expressionsmuster von *Reelin* (A, B), *Lhx5* (C, D) und *Emx2* (E, F) jeweils im E18.5 Hippocampus von Wildtyp (A, C, E) und *Emx2*^{-/-} (B, D, F)

Abkürzungen: DGL, Körnerzellschicht des Gyrus dentatus; DMZ, Marginalzone des Gyrus dentatus; fi, Fimbria; IMZ, innere Marginalzone; OMZ, äußere Marginalzone.

Zur Erläuterung der Pfeilspitzen siehe Text.

Weitere Charakterisierung der *Reln*-exprimierenden Zellen in der *Emx2*^{-/-} hippocampalen Fissur

An diesem Punkt sollte die Population *Reln*-exprimierender Zellen der Fissur, die *Emx2* exprimieren, aber im Gegensatz zu den Übrigen dieses Gen nicht essentiell benötigen, weiter charakterisiert werden. Es wurde versucht, die Zellen der Marginalzone im Neokortex mittels verschiedener Methoden (jede mit ihren Vor- und Nachteilen, siehe Diskussion), zu unterteilen. Mittels In Situ Hybridisierung auf E18.5 Hippocampus-Schnitten von Wildtyp und Mutante wurden schließlich fünf zusätzliche Marker-Gene untersucht.

Calretinin (Calb2) ist ein von allen *Reln*-exprimierenden Zellen der Marginalzone bereits früh in der Entwicklung exprimiertes Gen (Takiguchi-Hayashi et al., 2004). Die Expression dieses Gens kann zum Beispiel genutzt werden, um Cajal-Retzius Zellen in Reeler Mutanten, die kein *Reelin* exprimieren, zu identifizieren (Coulin et al., 2001). Wie erwartet, wurde in der Wildtyp Fissur reichlich *Calb2* gefunden (Abb. 19A). In der Mutanten Fissur konnte ebenfalls eine *Calb2*-Expression nachgewiesen werden (Abb. 19B), vom Muster zwar ähnlich, aber nicht exakt übereinstimmend mit dem von *Reln*, *Lhx5* bzw. *Emx2* (Abb. 18B, D, F).

Die Expression des Transkriptionsfaktor-Gens *p73 (Trp73)* zusammen mit *Reln* ist charakteristisch für Cajal-Retzius Zellen (Abraham et al., 2004). Wie erwartet, wurde eine starke Expression von *p73/Trp73* in der hippocampalen Marginalzone des Wildtyps gefunden (Abb. 19C). Ein offensichtlich in der früheren „Hem“ Region (kortiko-choroidale Grenze) entspringender Pfad markierter Zellen war zu erkennen (Pfeilspitzen in Abb. 19C). In der Mutante formten die markierten Zellen eine kompakte, stark exprimierende Gruppe (Pfeil in Abb. 19D) mit der gleichen Lage und dem gleichen Erscheinungsbild wie die Marker *Reln*, *Lhx5* und *Emx2* (Abb. 18B, D, F). Ein Zell-Pfad vom früheren „Hem“ konnte in der Mutante ebenfalls verfolgt werden (Pfeilspitzen in Abb. 19D).

Pcp4 kodiert einen Modulator der Calcium Signal-Kaskade (Slemmon et al., 1996) und wurde kürzlich als Marker für *Reln*-exprimierende Zellen der Marginalzone identifiziert (Yamazaki et al., 2004). Es wurde im Wildtyp im Bereich der sich entwickelnden Fissur nachgewiesen (Abb. 19E), war aber in der hippocampalen Marginalzone der Mutante kaum zu finden bzw. wurde dort nur sehr schwach exprimiert (Abb. 19F).

Smad1 ist ein für die Transduktion des BMP Signalweges essentielles Transkriptionsfaktor Gen (Anglely et al., 2003) und spielt eine Schlüsselrolle in der Angiogenese (Goumans et al., 2003). Es wurde ebenfalls als Marker für *Reln*-exprimierende Zellen der Marginalzone identifiziert (Yamazaki et al., 2004). Entsprechend wurde eine *Smad1*-Expression in der fetalen Fissur des Wildtyps gefunden (Abb. 19G), war jedoch vollkommen abwesend in der Mutante (Abb. 19H).

Cxcl12/SDF-1 schließlich ist ein für die hippocampale Entwicklung (Bagri et al., 2002) und die Angiogenese (Mirshahi et al., 2000; Salcedo und Oppenheim, 2003) essentielles Zytokin-Gen und ein Marker für *Reln*-exprimierende Zellen der Marginalzone (Yamazaki et al., 2004). Die Expression dieses Gens konnte beim Wildtyp Fetus im Bereich der Fissur (Abb. 19I), sowie in vaskulären Strukturen in der Pia (Pfeilspitze in Abb. 19I) gefunden werden. Es war auch in der *Emx2*^{-/-} Pia zu finden (Pfeilspitze in Abb. 19J), nicht aber im Hippocampus, ausgenommen wenige isolierte Zellen (Pfeil in Abb. 19J).

An diesem Punkt lassen die Resultate annehmen, dass die im Mutanten Hippocampus verbleibenden *Reln*-exprimierenden Zellen zu einer Gruppe gehören, die normal *Reln*, *Lhx5*, *Emx2* und *p73/Trp73*, aber nicht *Smad1*, *Pcp4* oder *Cxcl12/SDF-1* exprimiert. Weiterhin führt die Anwesenheit der *p73/Trp73*-Expression in einem im kortiko-choroidalen Grenzbereich beginnenden Zell-Pfad in der Mutante zu der Vermutung, dass diese „überlebenden“ Zellen aus dem Hem entstammen.

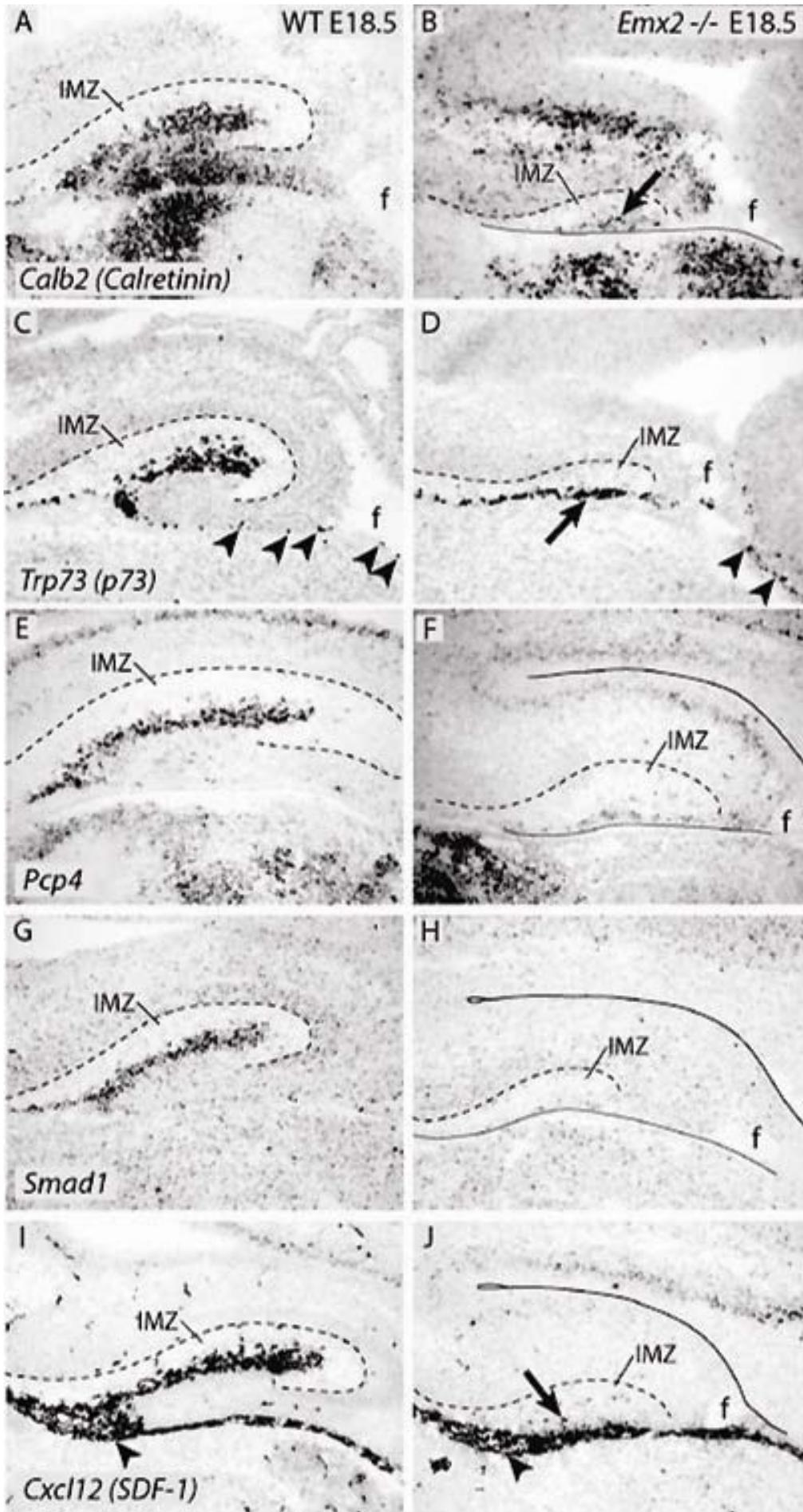


Abbildung 19: Expression verschiedener Marker für *Reln*-exprimierende Zellen der Marginalzone

(A, B) Nachweis der *Calretinin* (*Calb2*) Expression im E18.5 Wildtyp (A) und *Emx2*^{-/-} (B) Hippocampus; in der Mutante ist eine nur sehr spärliche Expression von *Calb2* (Pfeil) sichtbar. (C, D) *Trp73* Expression im Hippocampus von E18.5 Wildtyp (C) und *Emx2*^{-/-} (D); die Pfeilspitzen in (C) und (D) zeigen den aus der kortikochoroidalen Region stammenden Pfad markierter Zellen; in der Mutanten hippocampalen Marginalzone (Pfeil) wird ebenfalls *Trp73* exprimiert. (E, F) *Pcp4*-Expression im E18.5 Wildtyp (E) und *Emx2*^{-/-} (F) Hippocampus. (G, H) *Smad1*-Expression im E18.5 Wildtyp (G) und *Emx2*^{-/-} (H) Hippocampus. (I, J) Expression von *Cxcl12/SDF-1* im E18.5 Wildtyp (I) und *Emx2*^{-/-} (J) Hippocampus; die Pfeilspitzen in (I) und (J) deuten auf die Expression in der Pia; nur wenige markierte Zellen (Pfeil in (J)) sind in der Mutanten hippocampalen Anlage zu finden.

Abkürzungen: f, Fimbria; IMZ, innere Marginalzone.

Entwicklung der *Reln*-exprimierenden Zellen in der *Emx2*^{-/-} hippocampalen Marginalzone

Die Entwicklung der *Reln*-exprimierenden Zellen der Marginalzone des Hippocampus in Wildtyp und Mutante wurde mit anti-Reelin Antikörper untersucht (Abb. 20). Die Verteilung der *Reln*-exprimierenden Zellen war zum Zeitpunkt E12.5 bei Wildtyp und Mutante gleich (Abb. 20A, B). Die hippocampale Anlage zeigte nur wenige an der pialen Seite gelegene *Reln*-exprimierende Zellen (Pfeile in Abb. 20A, B). Bei E14.5 gab es mehr *Reln*-exprimierende Zellen in der hippocampalen Anlage des Wildtyps als in derjenigen der Mutante (Abb. 20C, D). Zu diesem Zeitpunkt zeigte die mediale neokortikale Anlage (Sternchen in Abb. 20D) der Mutante eine abnorme und vorübergehende Ansammlung neokortikaler *Reln*-exprimierender Zellen, wie bereits beschrieben (Mallamaci et al., 2000b). Im Hippocampus (in Abb. 20D durch eine gepunktete Linie vom Neokortex abgegrenzt) trat diese vorübergehende Ansammlung nicht auf. Zum Zeitpunkt E16.0 sammelten sich beim Wildtyp zahlreiche *Reln*-exprimierende Zellen in der sich entwickelnden hippocampalen Fissur an (Abb. 20E). In der Mutante wurden jedoch nur wenige markierte Zellen gefunden. Diese waren an der Stelle in einer Reihe angeordnet, an welcher sich das Pallium leicht einkerbt und zeigten somit die Lage der fehlentwickelten hippocampalen Fissur an (Abb. 20F). Dieser Bereich wies in der Mutante bereits in diesem Alter eine ähnliche Erscheinung wie später bei E18.5 auf (vergleiche Abb. 20F mit Abb. 18B). Um die Reduktion der *Reln*-exprimierenden Zellen in der Mutante zu quantifizieren, wurden diese Zellen in der hippocampalen Marginalzone in allen Schnitten von zwei Wildtyp und zwei Mutanten Gehirnen bei E18.5 gezählt. Die durchschnittliche Anzahl der *Reln*-exprimierenden Zellen in

der hippocampalen Marginalzone der Mutante betrug zu diesem Zeitpunkt weniger als 20% derjenigen im Wildtyp (Abb. 20G).

Dies zeigt, dass *Reln*-exprimierende Zellen in der *Emx2*^{-/-} hippocampalen Anlage von Beginn an spärlich vorhanden sind und abgesehen von einer Gruppe, die das Rudiment der hippocampalen Fissur anzeigt, nach und nach weniger werden.

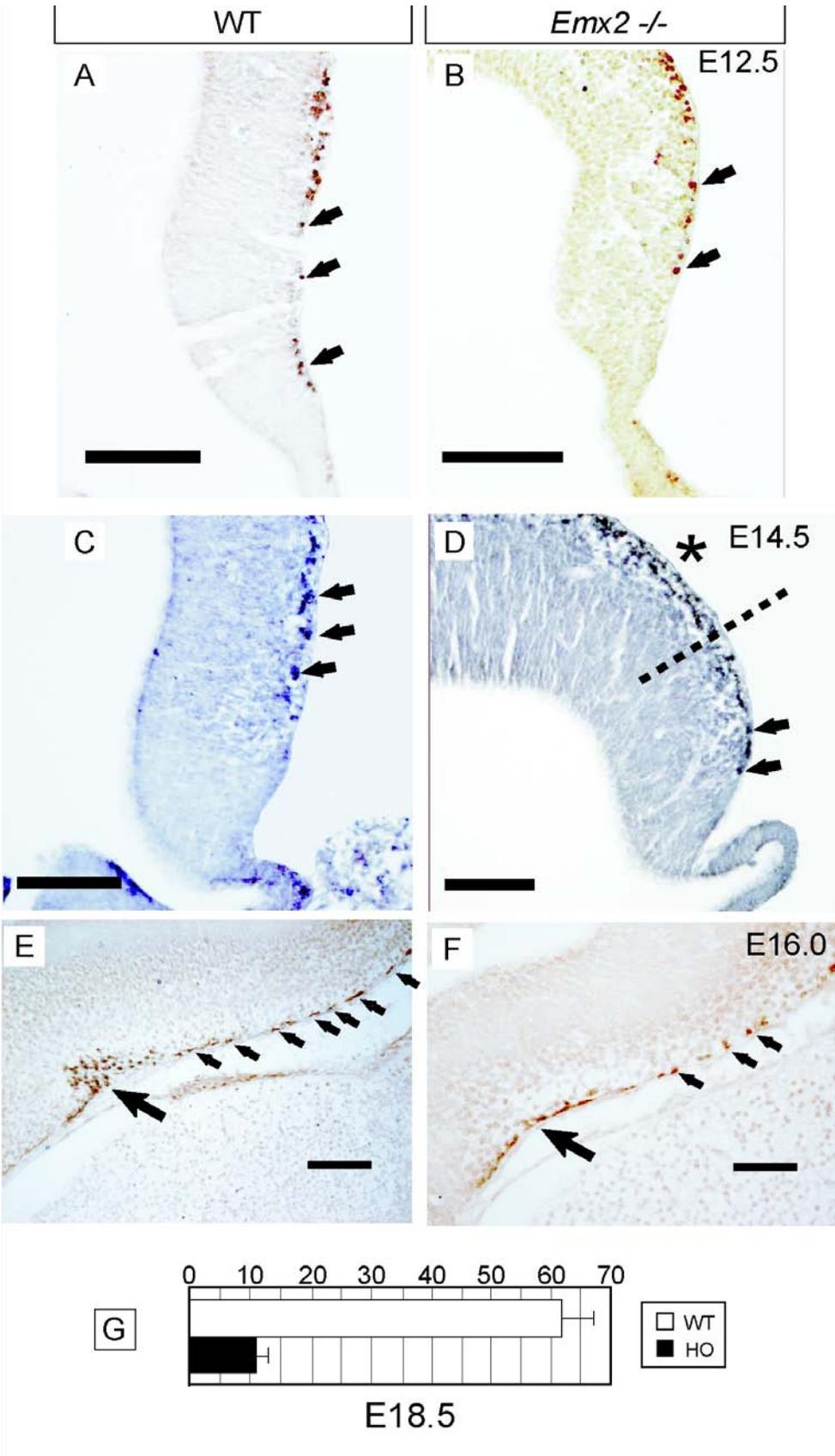


Abbildung 20: Entwicklung der *Reln*-exprimierenden Zellen im *Emx2*^{-/-} Hippocampus

Nachweis von Reelin mittels anti-Reelin Antikörper im Wildtyp (A, C, E) und *Emx2*^{-/-} (B, D, F) im medialen Kortex bei E12.5 (A, B), E14.5 (C, D) und E16.0 (E, F).

(A, B) Bei E12.5 zeigen sowohl Wildtyp (A) als auch Mutante (B) verstreute *Reln*-exprimierende Zellen (Pfeile) in der hippocampalen Anlage. (C, D) Beim E14.5 Hippocampus sind die *Reln*-exprimierenden Zellen (Pfeile) beim Wildtyp (C) in einer Reihe angeordnet, während sie in der Mutante (D) vereinzelt auftreten; die gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen Neokortex und Hippocampus. (E, F) Bei E16.0 sind im Wildtyp Hippocampus (E) in einer Reihe angeordnete *Reln*-exprimierende Zellen (kleine Pfeile) und eine größere, sich im Bereich der entwickelnden Fissur ansammelnde Gruppe (großer Pfeil) zu sehen; in der Mutante (F) gibt es weniger, verteilte *Reln*-exprimierende Zellen (kleine Pfeile), die sich im Bereich der Fissur (großer Pfeil) nicht ansammeln, sondern nahe der Pia verbleibend eine Reihe bilden.

(G) Durchschnittliche Anzahl der *Reln*-exprimierenden Zellen im Bereich der Fissur pro Schnitt bei E18.5 Wildtyp (weißer Balken) bzw. *Emx2*^{-/-} (schwarzer Balken).

***Reln*-exprimierende Zellen der hippocampalen Fissur entstehen in der *Emx2*^{-/-} Mutante zum normalen Zeitpunkt, aber in verminderter Zahl**

An diesem Punkt der Arbeit zeigten die gewonnenen Daten einen Verlust von *Reln*-exprimierenden Zellen in der Marginalzone der *Emx2*^{-/-} Mutante (mit Ausnahme einer spezifischen Subpopulation). Die Frage war, welcher Mechanismus für diesen Verlust verantwortlich sein könnte. Als Ursachen hierfür kamen in Betracht: a) verminderte Proliferation, b) erhöhtes Zellsterben oder c) Abwanderung der Zellen, so dass sie nicht dort gefunden werden können, wo man sie normalerweise erwarten würde. Im Neokortex der *Emx2*^{-/-} Mutante ist ein Verlust von *Reln*-exprimierenden Zellen bekannt (Mallamaci et al., 2000b; Shinozaki et al., 2002), obgleich der Mechanismus noch nicht geklärt ist. Zusätzlich und im Gegensatz zur Situation im Hippocampus, zeigt der *Emx2*^{-/-} Neokortex keine spezifische verbleibende Population von *Reln*-exprimierenden Zellen.

Um die Proliferation der *Reln*-exprimierenden Zellen des Hippocampus in Wildtyp und Mutante zu untersuchen, wurde als Erstes schwangeren Mäusen in unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien BrdU injiziert. Eine vorangegangene Arbeit (Takiguchi-Hayashi et al., 2004) hatte gezeigt, dass *Reln*-exprimierende Zellen der Marginalzone des Kortex von E10.5 bis E13.5 entstehen. Daher wurde BrdU zu diesen Zeitpunkten injiziert. Anschließend wurden Antikörper verwendet, um Reelin (im Zytoplasma) und BrdU (im Zellkern) in *Reln*-exprimierenden Zellen dieser Region bei E18.5 nachzuweisen (Abb. 21A, B). Bei E18.5 enthält der Bereich der hippocampalen Fissur sowohl beim Wildtyp als auch bei der *Emx2*^{-/-} Mutante *Reln*-exprimierende Zellen, die bei E11.5, E12.5 und E13.5 entstanden sind (Abb.

21C). Überraschenderweise konnten zum Zeitpunkt E18.5 keine bei E10.5 entstandenen *Reln*-exprimierenden Zellen gefunden werden. Keine *Reln*-exprimierenden Zellen dieser Region sind bei E14.5 entstanden (ohne Abb.). Übereinstimmend mit den vorherigen Ergebnissen (Abb. 20) war die Gesamtzahl *Reln*-exprimierender Zellen im Bereich der Mutanten Fissur viel geringer als im Wildtyp. Eine Hauptquelle für *Reln*-exprimierende Zellen ist das kortikale Hem (Shinozaki et al., 2002; Takiguchi-Hayashi et al., 2004), eine *Emx2*-exprimierende neuroepitheliale Region, die unmittelbar an den Hippocampus angrenzt. Im Zusammenhang damit lassen die vorliegenden Ergebnisse vermuten, dass eine verminderte Produktion von *Reln*-exprimierenden Zellen im kortikalen Hem der *Emx2*^{-/-} Mutante die Hauptursache für die Abwesenheit dieser Zellen in der Mutanten hippocampalen Anlage ist und liefern somit eine mögliche Antwort auf die Frage nach dem Mechanismus des Verlusts an *Reln*-exprimierenden Zellen im *Emx2*^{-/-} Hippocampus.

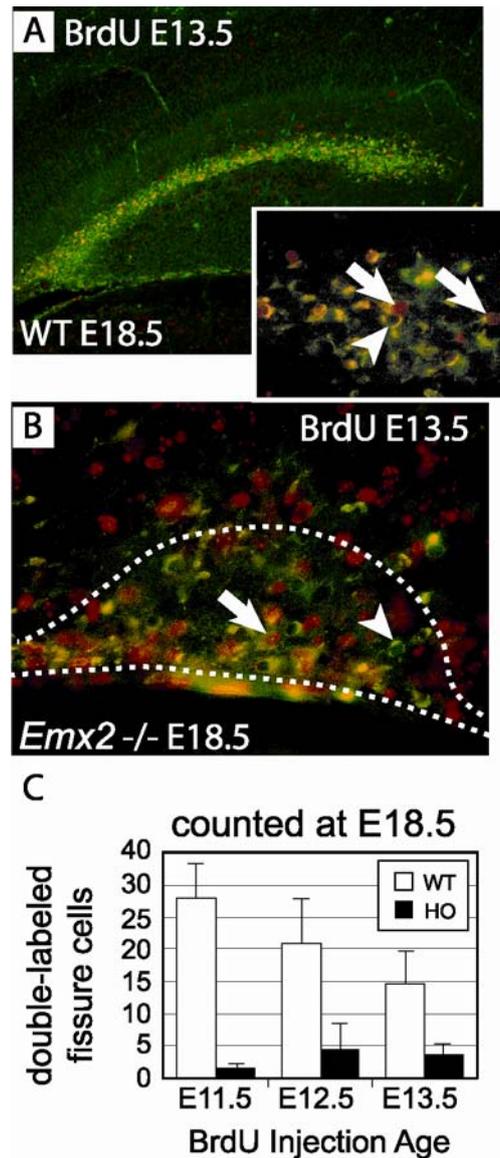


Abbildung 21: Spät entstandene *Reln*-exprimierende Zellen im *Emx2*^{-/-} Hippocampus

(A, B) Beispiele für den Antikörper-Nachweis von BrdU und Reelin im Bereich der hippocampalen Fissur bei E18.5 im Wildtyp (A) und der Mutante (B). (A) zeigt die gesamte Fissur, das eingesetzte Kästchen eine Ausschnittsvergrößerung; Zahlreiche Zellen sind grün markiert für Reelin (Pfeilspitzen), von denen einige einen rot markierten Zellkern für BrdU enthalten (Pfeile). (C) Anzahl der BrdU-Reelin doppelt-gelabelten Zellen, die in der hippocampalen Fissur pro Schnitt (beide Seiten) bei E18.5 gefunden wurden nach BrdU-Injektionen bei E11.5, E12.5 und E13.5; weiße Balken, Wildtyp; schwarze Balken, Mutante; Fehlerbalken: Standardabweichung.

Eine früh entstehende und früh vergängliche Population von *Reln*-exprimierenden Zellen im Wildtyp und *Emx2*^{-/-} Hippocampus

Überraschenderweise und entgegen zuverlässiger Veröffentlichungen, in denen berichtet wurde, dass kortikale *Reln*-exprimierende Neurone von E10.5 an entstehen (Alcantara et al., 1998; Mallamaci et al., 2000b; Takiguchi-Hayashi et al., 2004), wurden in der E18.5 Fissur keine *Reln*-exprimierenden Zellen gefunden, die von E10.5 stammen, weder im Wildtyp noch in der Mutante. Überdies zeigt der Neokortex der Mutante bei E11.5 zahlreiche *Reln*-exprimierende Neurone (Mallamaci et al., 2000b), die vermutlich bei E10.5 entstanden sind. Deshalb und um diese Frage im Detail zu überprüfen, wurde trächtigen Mäusen bei E10.5 BrdU injiziert und die Embryonen wurden bei E12.5 und E14.5 entnommen und untersucht. Doppelt-gelabelte Zellen (BrdU und Reelin) wurden einheitlich im Bereich der Fissur von Wildtyp und Mutante bei E12.5 entdeckt (Abb. 22A, B). Die Zählung BrdU-markierter Neurone bei E12.5 und E14.5 in der gesamten pallialen Marginalzone (präsumptiver Kortex und Hippocampus) ergab eine Abnahme von etwa 60% sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante (Abb. 22E), was auf die „Verdünnung“ in einem schnell wachsenden Gehirn zurückgeführt werden kann. Der Rückgang war jedoch besonders drastisch bei den doppelt-markierten *Reln*-exprimierenden Zellen, die bei E14.5 fast vollständig von der telencephalen Marginalzone verschwinden (Abb. 22F). Schließlich war es nicht möglich, von E10.5 stammende *Reln*-exprimierende Zellen in der hippocampalen Anlage bei E14.5 zu finden, weder im Wildtyp noch in der Mutante (Abb. 22G). Daraus ließ sich schlussfolgern, dass es sowohl im Wildtyp als auch im *Emx2*^{-/-} Gehirn eine früh entstehende und früh vergängliche Population von *Reln*-exprimierenden Zellen gibt. Diese Population entsteht um E10.5 und ist bei E14.5 nicht mehr nachweisbar, entweder weil die Zellen sterben, woanders hinwandern oder die *Reelin*-Expression runterregulieren (siehe Diskussion). Die Tatsache, dass das Verschwinden der *Reln*-exprimierenden Zellen im *Emx2*^{-/-} nur von der mittleren Trächtigkeit an festgestellt werden kann, wurde bereits im Neokortex bemerkt und die Existenz einer vorübergehend auftauchenden Population dieser Zellen im Neokortex wurde angenommen (Mallamaci et al., 2000b).

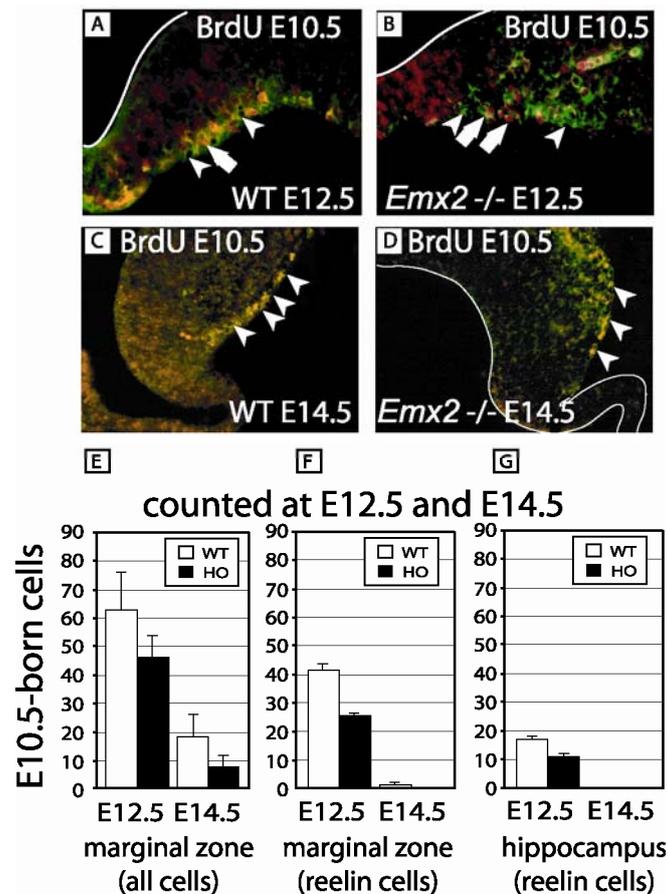


Abbildung 22: Früh entstehende *Reln*-exprimierende Zellen im *Emx2*^{-/-} Hippocampus

(A, B) Nachweis von BrdU (injiziert bei E10.5) und Reelin mittels Antikörper im Hippocampus bei E12.5 in Wildtyp (A) und Mutante (B). Zahlreiche Zellen sind grün markiert für Reelin (Pfeilspitzen), von denen einige einen rot markierten Zellkern für BrdU enthalten (Pfeile). (C, D) Nachweis von BrdU (injiziert bei E10.5) und Reelin mittels Antikörper im Hippocampus bei E14.5 in Wildtyp (C) und Mutante (D). Von den grün (Reelin) markierten Zellen (Pfeilspitzen) weist keine einen roten (BrdU) Zellkern auf. (E, F, G) Anzahl der bei E10.5 entstandenen Zellen (markiert durch BrdU Antikörper) pro Schnitt (beide Seiten) bei E12.5 und E14.5 in Wildtyp und Mutante. (E) Zählung beinhaltet die gesamte Marginalzone oder im Falle E12.5 die äußere Grenze des Palliums. (F) Zählung doppelt-markierter Zellen. (G) Zählung doppelt-markierter Zellen der hippocampalen Anlage. Fehlerbalken: Standardabweichung.

Kein vermehrtes Zellsterben in der *Emx2*^{-/-} Marginalzone

Bei der Suche nach einem Mechanismus für die reduzierte Menge der *Reln*-exprimierenden Zellen in der hippocampalen Marginalzone dieser Mutante wurde in Erwägung gezogen, dass ein vermehrtes Zellsterben neben der verminderten Produktion dazu beitragen könnte, die Anzahl der *Reln*-exprimierenden Zellen zu reduzieren. Um dies zu überprüfen wurden TUNEL Färbungen auf Wildtyp und *Emx2*^{-/-} Gehirn Schnitten zu verschiedenen Zeitpunkten

der Entwicklung gemacht (Abb. 23). Die Analysen bei E14.5 und E16.5 (Abb. 23A bis D) (und ebenso bei E12.5 und E18.5, ohne Abb.) wiesen nur eine geringe Anzahl von Zelltodprofilen in Wildtyp und *Emx2*^{-/-} Hippocampi auf und zeigten keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass die verminderte Produktion als Hauptursache für den Mangel an *Reln*-exprimierenden Zellen im Bereich der *Emx2*^{-/-} hippocampalen Fissur anzusehen ist.

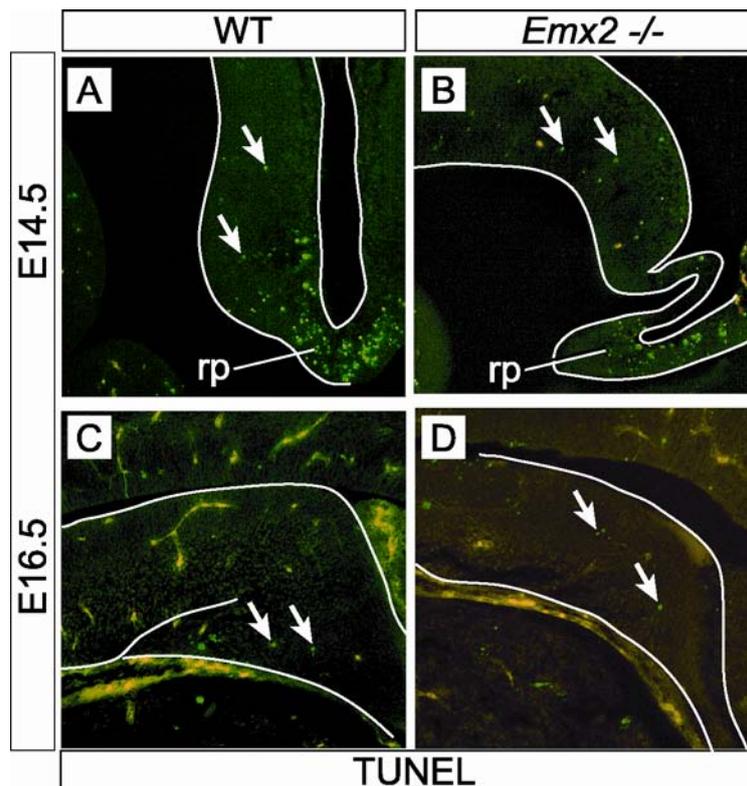


Abbildung 23: Das Zellsterben ist im *Emx2*^{-/-} Hippocampus unverändert

TUNEL-gefärbte Schnitte von Wildtyp (A, C) und *Emx2*^{-/-} Hippocampus bei E14.5 (A, B) und E16.5 (C, D). Die Zellsterberaten sind sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante zu allen untersuchten Zeitpunkten gering. Das Dach des Telenzephalons (rp in A, B) zeigt eine charakteristisch große Anzahl sterbender Zellen. Die Pfeile deuten auf einige typische Bilder von Zelltod.

Sowohl *Pax6* als auch *Emx2* werden für die Entwicklung der *Reln*-exprimierenden Zellen im Bereich der hippocampalen Fissur benötigt

Die vorausgehenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bildung der hippocampalen Fissur und ihre Kolonisation durch *Reln*-exprimierende Zellen spezifische, durch *Emx2* regulierte, Regionalisierungs-Prozesse sind. *Pax6* ist ein Transkriptionsfaktor, der eine

Schlüsselrolle in der Entwicklung spielt und in der pallialen Regionalisierung als Antagonist zu *Emx2* fungiert (Bishop et al., 2000; Bishop et al., 2002). Um herauszufinden, ob *Pax6* bei der Formation der hippocampalen Fissur möglicherweise eine Rolle spielt, wurde die Verteilung von *Reln*-exprimierenden Zellen im Bereich der Fissur bei Feten untersucht, die das *Pax6* Null-Allel *Small eye (Sey)* tragen (Hill et al., 1991). Die *Pax6^{Sey/Sey}* neokortikale Marginalzone ist dicker als im Wildtyp und enthält eine unnormale große Anzahl *Reln*-exprimierender Zellen (Stoykova et al., 2003). Die Zunahme der *Reln*-exprimierenden Zellen in der *Pax6^{Sey/Sey}* neokortikalen Marginalzone konnte bestätigt werden (Abb. 24A, B). Dennoch trat eine Verminderung der *Reln*-exprimierenden Zellen in der *Pax6^{Sey/Sey}* hippocampalen Fissur auf, die mit dem Wildtyp vergleichbar ist (vergleiche Abb. 24C mit D). Die vergrößerte *Pax6^{Sey/Sey}* neokortikale Marginalzone (Pfeilspitzen in Abb. 24D) zeigte eine Einengung, die unmittelbar an den Bereich der hippocampalen Fissur angrenzte (Pfeil in Abb. 24D), d.h. eine Übergangs-Region, in der die neokortikale Marginalzone ihre normale, dem Wildtyp entsprechende Breite in der *Pax6^{Sey/Sey}* Mutante beibehalten hat. Beeindruckenderweise war die Reduktion der *Reln*-exprimierenden Zellen in der *Pax6^{Sey/Sey}* auf die OMZ begrenzt, während die DMZ unbeeinflusst zu sein schien (Abb. 24E, F). Durch Messung der Intensität der *Reln*-Expression in der neokortikalen Marginalzone und der OMZ im Wildtyp und der Mutante (Abb. 24G, H) wurde eine Reduktion der *Reln* mRNA in der *Pax6^{Sey/Sey}* OMZ festgestellt. Diese Ergebnisse zeigen, dass *Pax6* unterschiedliche und gegensätzliche Effekte auf *Reln*-exprimierende Zellen des Neokortex verglichen mit denjenigen der Fissur hat und dass sowohl *Emx2* als auch *Pax6* benötigt werden, um eine OMZ von normaler Größe, die mit einer korrekten Menge von *Reln*-exprimierenden Zellen besetzt ist, entstehen zu lassen.

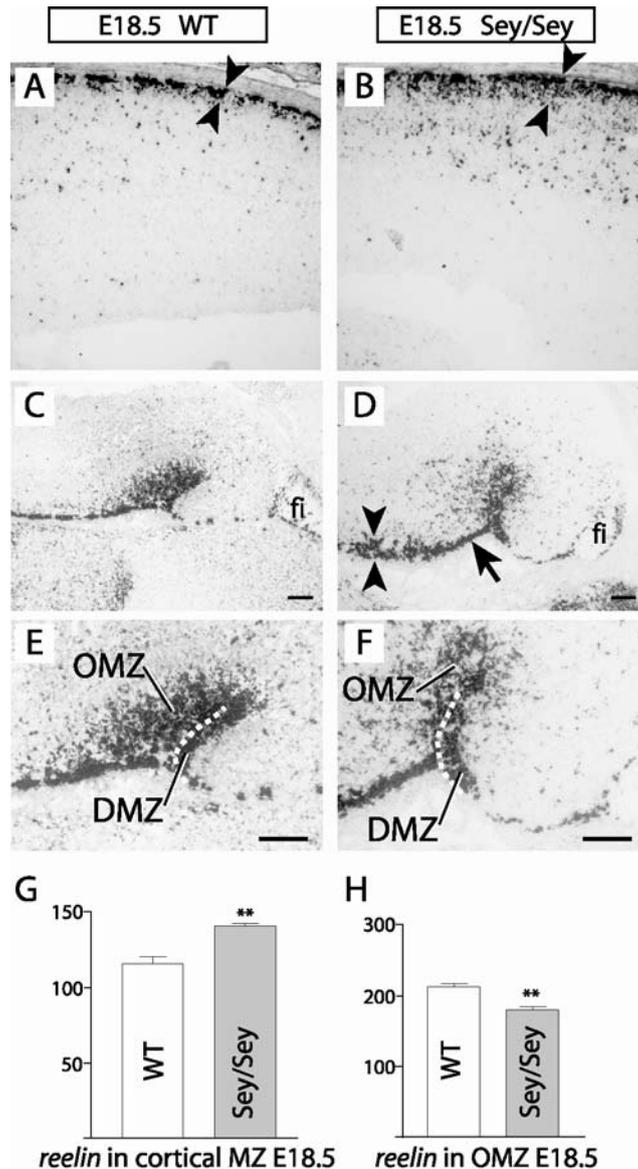


Abbildung 24: Sowohl *Emx2* als auch *Pax6* sind an der Bildung der OMZ beteiligt

(A, B) In Situ Hybridisierung für *Reln* mRNA auf E18.5 Wildtyp (A) und *Pax6*^{Sey/Sey} (B) Neokortex; die Paare der Pfeilspitzen zeigen, dass die Marginalzone der Mutante (B) dicker ist als die des Wildtyps (A). (C, D) *Reln*-Expression auf sagittalen Schnitten von Wildtyp (C) und *Pax6*^{Sey/Sey} (D) Gehirnen; die neokortikale Marginalzone ist in der Mutante verdickt (Pfeilspitzen); unmittelbar an die hippocampale Fissur der Mutante grenzt eine Verengung der Marginalzone an (Pfeil). (E) Vergrößerung von (C), in der die markierte DMZ (rechts) durch eine gepunktete Linie von der markierten OMZ (links) getrennt ist. (F) Vergrößerung von (D), in der erkennbar ist, dass die Verminderung der *Reelin* Expression vorwiegend auf der Seite der OMZ liegt. (G, H) Die densitometrische Analyse der Expressions-Intensität von *Reln* bestätigt eine signifikante Zunahme in der *Pax6*^{Sey/Sey} neokortikalen Marginalzone (G) und eine signifikante Abnahme in der *Pax6*^{Sey/Sey} hippocampalen Fissur (H). Fehlerbalken: Standardabweichung.

Abkürzungen: DMZ, Marginalzone des Gyrus dentatus; fi, Fimbria; OMZ, äußere Marginalzone; WT, Wildtyp. Maßstab = 100 μm .

4.2 Mikroarray Resultate

Von 12.000 full length Genen und ESTs, die mit den Affymetrix Mikroarrays untersucht wurden, erfüllten 192 Gene das anhand des s-Scores gemessene Kriterium der veränderten Genexpression. Eine Analyse der Funktion dieser in Wildtyp und Mutante unterschiedlich stark exprimierten Kandidaten offenbarte hohe signifikante Werte bei Genen, die im Zusammenhang mit Zellmorphologie, embryonaler Zellorganisation und -wanderung, Signaltransduktion und neurologischen Erkrankungen stehen (Abb. 25). Der komplette Datensatz, der weitere Gene mit relevanter Expressions-Änderung enthält, die nicht in diesen Gruppen aufgeführt werden, ist im Anhang (Abb. 1) zu finden.

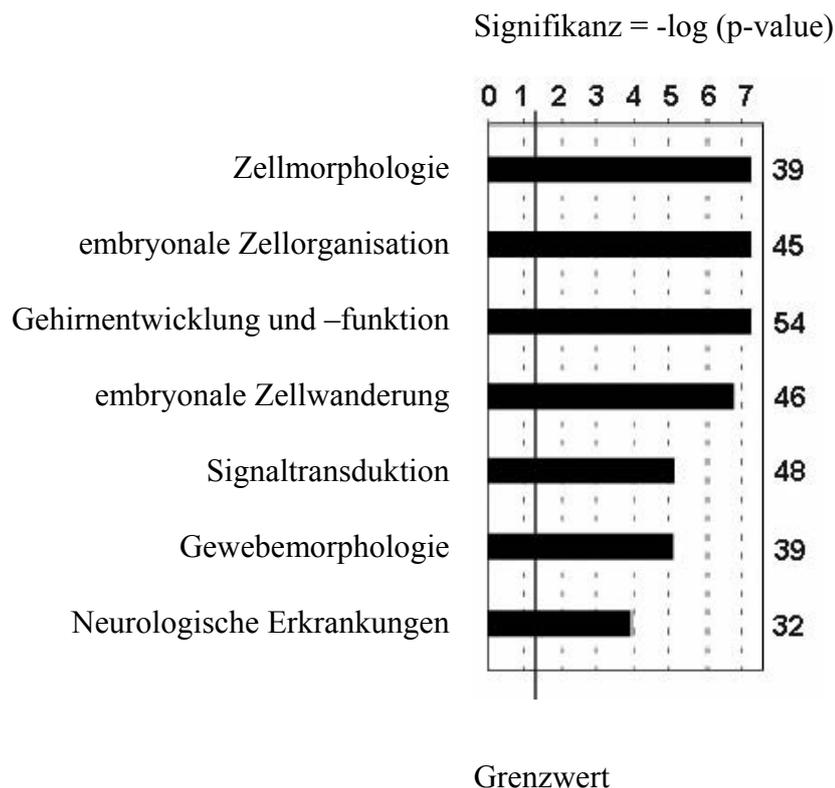


Abbildung 25: Aufteilung der Gene mit signifikant verminderter Expression im *Emx2*^{-/-} Hippocampus in funktionelle Kategorien.

Gene, die jenseits des Signifikanz-Grenzwertes lagen und im Ingenuity Pathways Knowledge Base mit biologischen Funktionen und/oder Erkrankungen in Verbindung gebracht werden konnten, wurden zur weiteren Analyse ausgewählt. Für die Berechnung des p-values wurde der „Fischer’s exact test“ verwendet, welcher die

Ergebnisse

Wahrscheinlichkeit wiedergibt, dass die Zuordnung der jeweiligen biologischen Funktion und/oder Erkrankung zu diesem Datensatz nur zufällig ist, d.h. je niedriger der p-value, desto höher die Signifikanz. Die Werte auf der rechten Seite geben die Anzahl der Gene an, die zu der jeweiligen funktionellen Kategorie gehören (ein Gen kann in mehreren Kategorien erscheinen).

Die beiden folgenden Tabellen enthalten als Ergebnis der Mikroarray Analyse jene Gene, die zunächst anhand von Expressions-Differenz zwischen Wildtyp und *Emx2*^{-/-}, Signifikanz und Funktion ausgewählt wurden und die später zusätzlich durch In Situ Hybridisierungen bestätigt werden konnten (siehe Abschnitt 4.3).

Gen Symbol	Gen Name und Synonyme	Gen Bank Nr.	Funktionelle Daten
<i>An Zellmigration und Axonen-Guidance beteiligte Gene</i>			
<i>Akap12</i>	A kinase anchor protein 12, gravin, SSeCKS, AKAP250	NM_031185	Plexin-vermittelte Semaphorin Repulsion, axonale Wegfindung, Regulation der Proliferation, Regulation des Actin Zytoskeletts
<i>Dpys14</i> (<i>Crmp3</i> , <i>Ulip4</i>)	Dihydropyrimidinase-related protein 4, POP66	NM_011993	Plexin-vermittelte Semaphorin Repulsion, axonale Wegfindung
<i>Cntn1</i>	Contactin 1, F3cam	NM_007727	Adhäsionsmolekül, axonale Wegfindung
<i>Cspg3</i>	Neurocan, chondroitin sulfate proteoglycan 3	NM_007789	Proteoglykan der extrazellulären Matrix, Adhäsionsmolekül, Axonen-Wachstum und -Guidance
<i>Ptprz1</i>	Phosphacan, 3F8 chondroitin sulfate proteoglycan, protein tyrosine phosphatase receptor type Z polypeptide 1	XM_920529	Transmembranrezeptor, Zelladhäsionsmolekül, Axonen-Wachstum und -Guidance
<i>Tnc</i>	Tenascin C	NM_011607	Glykoprotein der extrazellulären Matrix, Marker für radiale Glia, Axonen-Wachstum
<i>Gene, die vermutlich in anderen Bereichen der Entwicklung eine Rolle spielen</i>			
<i>Aes</i> (<i>Crg5</i>)	Amino terminal enhancer-of-split	NM_010347	Transkriptionelle Regulation
<i>Hipk2</i>	Homeodomain interacting protein kinase 2	NM_010433	Transkriptionelle Regulation
<i>Pdlim3</i> (<i>Alp</i>)	PDZ and LIM domain 3, actinin alpha 2 associated LIM protein	NM_016798	Stabilisierung des Aktin Zytoskeletts
<i>ApoE</i>	Apolipoprotein E	NM_009696	Lipidtransport, Regulation der Kalzium-Homöostase, Modulation der Neurotransmission, fördert Überleben und Sprossen von Neuronen
<i>App</i>	Amyloid beta (A4) precursor protein	NM_007471	Synaptisches Transmembranprotein, Synaptogenese, synaptische Funktion
<i>Marker für differenzierte Neurone</i>			
[<i>Gabra2</i>]	Gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 2	NM_008066	Rezeptor, Neurotransmission

Tabelle 2: Ausgewählte Gene mit reduzierter Expression im E18.5 *Emx2*^{-/-} Hippocampus.

Gene, deren Symbol in eckigen Klammern steht, sind in den Abbildungen nicht dargestellt.

Gen Symbol	Gen Name und Synonyme	Gen Bank Nr.	Funktionelle Daten
Endotheliale Marker			
<i>Cldn5</i>	Claudin 5	NM_013805	Membranbestandteil, Tight Junction, vaskuläres Endothel
<i>Dcn</i>	Decorin, dermatan sulphate proteoglycan 2, DSPG2, PG40	NM_007833	Proteoglycan der extrazellulären Matrix, Zell-Adhäsion, Angiogenese, Regulation der TGFbeta Signalgebung, Modulation der Proliferation
<i>Eng</i>	Endoglin, CD105	NM_007932	Endothel, Angiogenese, Regulation der TGFbeta Signalgebung
Cajal-Retzius Zell-Marker			
<i>Pcp4</i>	Purkinje cell protein 4, PEP-19	NM_008791	Kalzium-Signalgebung, Modulation der Calmodulin Aktivität
<i>Smad1</i>	MAD homolog 1	NM_008539	Transkriptionelle Regulation, TGFbeta Signal-Pfad
<i>Cxcl12</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12, SDF-1	NM_001012477	Zytokin, Wachstumsfaktor, Chemotaxis, Zellwanderung, Angiogenese
<i>Cxcr4</i>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	NM_009911	Zytokin Rezeptor, Chemotaxis, Zellwanderung, Angiogenese
<i>Calb2</i>	Calretinin, calbindin 2	NM_007586	Kalziumbindung
<i>Reln</i>	Reelin	NM_011261	Zellmigration
<i>Trp73</i>	P73	NM_011642	Transkriptionsfaktor, Regulator für Apoptose
Glia Marker			
<i>Dio2</i>	Deiodinase-iodothyronine-type II	NM_010050	Astrozyten, katalysiert die Konversion von T4 zu T3 über 5'-Deiodination, Metabolismus der Schilddrüsenhormone
<i>Gfap</i>	Glial fibrillary acidic protein	NM_010277	Marker für Astrozyten und radiale Glia, Zytoskelett

Tabelle 3: Ausgewählte Gene in der äußeren Marginalzone (OMZ) mit reduzierter Expression im E18.5 *Emx2*^{-/-} Hippocampus.

4.3 Bestätigung der Mikroarray Resultate

Die Mikroarray Analyse lieferte eine Kandidatenliste (Anhang Abb. 1), die entsprechend der s-Scores, Clusters und Funktion/Ontologie der Genprodukte geordnet wurde. Anschließend wurden repräsentative Gene mit interessanten Daten bezüglich ihrer Funktion (Ontologie) ausgewählt, bei denen die Verminderung in der Mutante am größten und signifikantesten war

(insgesamt 49 Gene). Für diese wurden nicht-radioaktive Sonden hergestellt und In Situ Hybridisierungen auf Hippocampus-Schnitten von Wildtyp und *Emx2*^{-/-} Mutante bei E18.5 durchgeführt.

Die Resultate dieser In Situ Hybridisierungen bestätigten 24 der ursprünglichen Kandidaten (Tabelle 2 und 3). Diese Gene wurden entsprechend ihrer Funktion und ihres Expressionsmusters eingruppiert in 1) Gene der Entwicklung, 2) Zelltyp-spezifische Gene und 3) OMZ-spezifische Gene. Die Anwendung der Ingenuity Software auf diese Kandidaten entwickelte ein vorläufiges Netzwerk von Pfaden, in welches sie involviert sein könnten (Anhang Abb. 2).

Bei diesen Untersuchungen wurde der *Emx2*-defiziente Hippocampus zum Zeitpunkt der weitest möglich fortgeschrittenen Entwicklungsstufe (E18.5), nach der die Mutanten sterben (Pellegrini et al., 1996; Yoshida et al., 1997), analysiert. Zu diesem Zeitpunkt wird die Mutante hippocampale Anlage von Zellpopulationen gebildet, die eine reduzierte und unvollständig differenzierte CA-Region (Ammonshorn) repräsentieren (Tole et al., 2000) sowie von einigen Gyrus dentatus Vorläuferzellen, deren Migration eingeschränkt ist (Tole et al., 2000; Oldekamp et al., 2004). Daraus folgend beinhalten die Ergebnisse 1) Gene, die von vorhandenen Zellen exprimiert werden (12 Gene, s. Tabelle 2) und 2) Gene, deren Expression möglicherweise deshalb als „reduziert“ festgestellt wurde, weil sie Marker für Zellen sind, die in der Mutante vielleicht gar nicht vorkommen (12 Gene, s. Tabelle 3). Die Gene wurden vorläufig in jeweils drei Gruppen eingeteilt. (Tabelle 2): 1) Gene, die an Zellmigration und Axonen-Guidance beteiligt sind, 2) Gene mit mutmaßlicher Beteiligung an der Hirnentwicklung und 3) Marker für differenzierte Neurone. (Tabelle 3): 1) Endotheliale Marker, 2) Cajal-Retzius Zell-Marker und 3) Glia Marker.

Die Abbildungen 23 bis 26 zeigen typische In Situ Hybridisierungen von coronalen Schnitten des E18.5 Hippocampus von Wildtyp und Mutante. Auf den Abbildungen des *Emx2*-defizienten Hippocampus wurde die ungefähre Lokalisation der unteren Grenze der hippocampalen Platte (CA Region) mit einer gepunkteten Linie angezeigt. Tabelle 4 und 5 zeigen eine Zusammenfassung der In Situ Ergebnisse für die in Abbildung 27 und 28 gezeigten Gene in jeder Untereinheit der hippocampalen Anlage (vergleiche mit Abb. 26 (Soriano et al., 1994; Super et al., 1998)). Soweit bekannt, wurde keines dieser Gene zuvor mit *Emx2* in Verbindung gebracht. Über eine hippocampale Expression wurde jedoch bei allen bereits berichtet, mit Ausnahme von *Akap12*, *Hipk2* und *Pdlim3*.

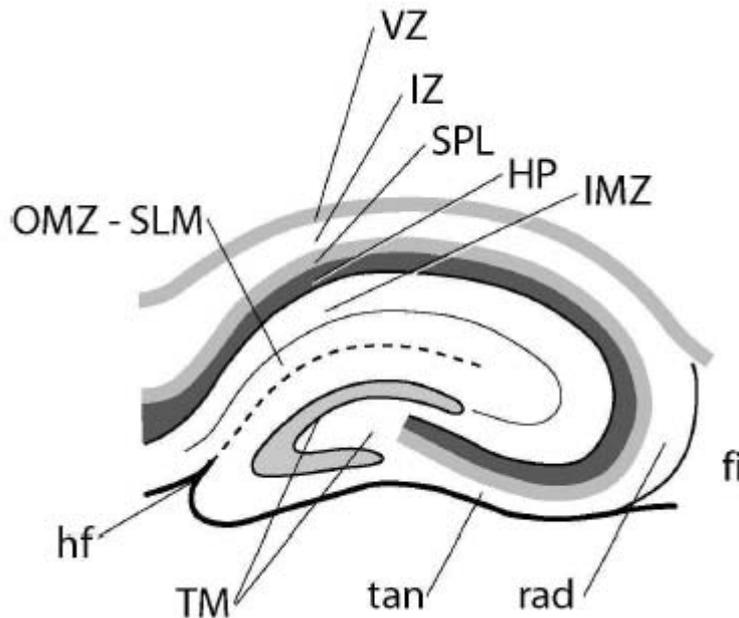


Abbildung 26: Schematische Darstellung des fetalen Hippocampus.

Abkürzungen: fi, Fimbria; hf, hippocampale Fissur; HP, hippocampale Platte; IMZ, innere Marginalzone; IZ, intermediäre Zone; OMZ, äußere Marginalzone; rad, radiale Migrationsstraße der Vorläufer des Gyrus dentatus; SLM, Stratum lacunosum-moleculare; SPL, Subplatte; tan, tangentielle Migrationsstraße der Vorläufer des Gyrus dentatus; TM, tertiäre Matrix; VZ, ventrikuläre Zone (Neuroepithel).

4.3.1 Gene, die an Zellmigration sowie Axonenwachstum und -Guidance beteiligt sind

Die Migration der Gyrus dentatus Vorläuferzellen ist in der *Emx2* Mutante blockiert (s. Abschnitt 4.1.2.4). Obwohl die Entwicklung des Gyrus dentatus der Mutante nicht so weit voran schreitet, dass efferente Axone gebildet werden können, deuten Zellkulturexperimente darauf hin, dass sowohl die hippocampale afferente Aufteilung als auch die Projektionen des Gyrus dentatus verändert sind (Savaskan et al., 2002). Für Wachstum und Wegfindung der Axone werden vielfach die gleichen molekularen Mechanismen wie zur Lenkung wandernder Zellen genutzt (Hatten, 2002). Dies trifft besonders auf die molekularen Migrations- und Guidance-Faktoren der Semaphorin Familie zu (Bagri und Tessier-Lavigne, 2002; Tsai und Miller, 2002; Tamagnone und Comoglio, 2004). Dem entsprechend enthüllte der Mikroarray Vergleich einige Gene mit reduzierter Expression im Mutanten Hippocampus, die mit diesen Prozessen in Verbindung stehen.

Akap12 und Dpysl4

Es wurde bereits berichtet über die Expression von *Akap12* (*AKAP250* oder *gravin* beim Menschen, ebenso *SSeCKS*) im Gyrus dentatus sowie in Teilen von Neokortex und Thalamus (Camus et al., 2001) und im Cerebellum (Gelman et al., 2000; Camus et al., 2001) bei der adulten Maus. Die Expression von *Akap12* in der hippocampalen Platte während der Entwicklung (Abb. 27A) wurde bisher nicht beschrieben. *Dpysl4* (*Crmp3*, *Ulip4*) mRNA ist im Gyrus dentatus der adulten Maus gefunden worden (Quach et al., 2000). Die Ergebnisse zeigten eine Expression im sich entwickelnden Gyrus dentatus sowie in der hippocampalen Platte (CA Region) (Abb. 27C). Weder *Akap12* noch *Dpysl4* zeigten eine Expression im Hippocampus der *Emx2*^{-/-} Mutante bei E18.5 (Abb. 27B, D). Dies ist der erste Bericht über regionale Co-Lokalisation dieser beiden Gene im Hippocampus. Diese Ergebnisse liefern weiterhin den ersten Hinweis dafür, dass beide Gene Teil von Pfaden sein könnten, die mit *Emx2* in Verbindung stehen.

Cspg3-neurocan, Ptprz1-phosphacan und Cntn1

Cspg3 (*neurocan*) und *Ptprz1* (*phosphacan*) kodieren beide Chondroitinsulfat-Proteoglykane, die als Adhäsionsmoleküle in der extrazellulären Matrix des Gehirns fungieren (Rauch et al., 1992; Maurel et al., 1994). Beide Gene wurden in der ventrikulären Zone (Neuroepithel) der CA Region, von im CA verteilten Zellen, von einigen verstreuten Zellen in der Region der hippocampalen Fissur (OMZ) und von wenigen Zellen in der tertiären Matrix des Gyrus dentatus exprimiert (Abb. 27G, I). Zusätzlich wurde *Ptprz1* auch in der ventrikulären Zone des Gyrus dentatus gefunden (Abb. 27I). *Cspg3* zeigte die am stärksten begrenzte Expression, die sich um die CA Region konzentrierte (Subplatte und hippocampale Platte) (Abb. 27G), während *Ptprz1* gleichmäßiger verteilt war und auch in der IZ gefunden werden konnte (Abb. 27I). In der *Emx2*^{-/-} Mutante zeigten beide Gene eine sehr verminderte Expression (Abb. 27H, J), obgleich beide immer noch in der ventrikulären Zone exprimiert wurden. Eine schwache *Cspg3*-Expression konnte zusätzlich in der reduzierten hippocampalen Platte der Mutante gefunden werden (Abb. 27H).

Interessanterweise wurde bei der Mikroarray Analyse ebenfalls eine reduzierte Expression von *Cntn1* (*F3cam*), das für ein Adhäsionsmolekül kodiert, welches als Tenascin C Membranrezeptor fungiert, in der *Emx2*^{-/-} Mutante gefunden. Die In Situ Ergebnisse zeigen die Expression von *Cntn1* in der hippocampalen Platte in der CA Region bei E18.5 (Abb. 27E) in Übereinstimmung mit der Verteilung seines Proteins bezogen auf veröffentlichte

Berichte, bei denen Antikörper benutzt wurden (Rigato et al., 2002). Der *Emx2*-defiziente Hippocampus zeigt keinerlei *Cntn1*-Expression (Abb. 27F).

Die Bedeutung von *Tenascin C* und dessen Expressionsmuster in Wildtyp und *Emx2*^{-/-} wurde bereits beschrieben (siehe Abschnitt 4.1.2.4).

Zusammengefasst hat der *Emx2*^{-/-} Hippocampus ein enormes Defizit in der Expression von Genen, die spezifisch beteiligt sind an der Kontrolle von Migration, Auswachsen der Neuriten und Steuerung der Axone.

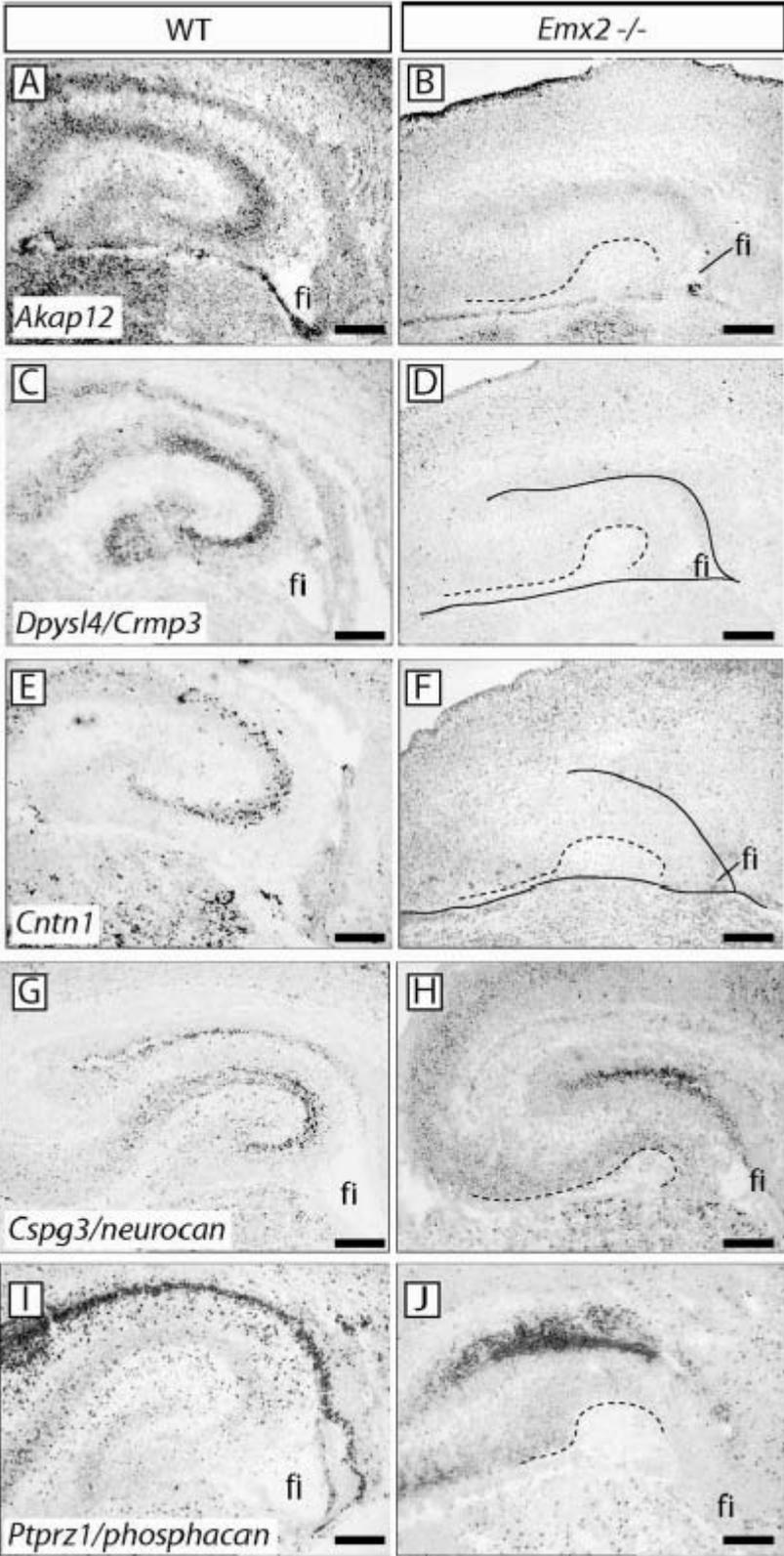


Abbildung 27: Expressionsmuster der in die Entwicklung involvierten Kandidatengene

Expressionsmuster von *Akap12* (A, B), *Dpysl4/Crmp3* (C, D), *Cntn1* (E, F), *Cspg3/neurocan* (G, H) und *Ptprz1/phosphacan* (I, J) auf coronalen Schnitten des Hippocampus bei Wildtyp (A, C, E, G, I) und *Emx2*^{-/-} Mutante (B, D, F, H, J) zum Zeitpunkt E18.5.

4.3.2 Aes-Grg5, Hipk2 und die Notch- und Wnt-Pfade

Aes-Grg5 und Hipk2 sind transkriptionelle Co-Regulatoren mit einer möglichen Funktion im Wnt-Pfad. *Aes-Grg5* (Amino-terminal enhancer-of-split, groucho-related gene 5) mRNA wurde in der tertiären Matrix des Gyrus dentatus in verstreuten Zellen und stärker in der gesamten hippocampalen Platte (Abb. 28A) gefunden. Im Gyrus dentatus wurde *Hipk2* (homeodomain interacting protein kinase 2) ebenfalls in der tertiären Matrix entdeckt (TM in Abb. 28C), aber es zeigte eine zusätzliche Expression in verstreuten Zellen in der ventrikulären Zone (Abb. 28C). In der CA Region wies *Hipk2* eine starke Expression im Neuroepithel auf sowie schwach exprimierende verstreute Zellen in der intermediären Zone, der Subplatte, der hippocampalen Platte und der Pia (Abb. 28C). Weder *Aes-Grg5* noch *Hipk2* konnten im Hippocampus der *Emx2*^{-/-} Mutante nachgewiesen werden (Abb. 28B, D). Über die hippocampale Expression von *Aes-Grg5* ist bereits berichtet worden (Allen und Lobe, 1999), aber meines Wissens ist dies der erste Bericht über *Hipk2*-Expression in dieser Hirnregion.

4.3.3 In andere Aspekte der Gehirnentwicklung involvierte Gene

Dieser Abschnitt behandelt Gene, die eine reduzierte Expression im Hippocampus der *Emx2*^{-/-} Mutante aufweisen und deren Funktionen eine Beteiligung an anderen Entwicklungs-Aspekten mit einer möglichen Beziehung zum *Emx2*^{-/-} Phänotyp vermuten lassen.

Pdlim3 (Alp) gehört zu einer Protein Familie, die zwei Protein-Protein Interaktionsdomänen besitzt (PDZ und LIM) und ist verbunden mit dem Aktin Zytoskelett (Xia et al., 1997). Eine *Pdlim3-Alp*-Expression wurde in der E18.5 Wildtyp Gyrus dentatus Anlage gefunden, besonders in der tangentialen Migrationsstraße (Pfeilspitzen in Abb. 28E) und in der tertiären Matrix (TM in Abb. 28E). Der *Emx2*-defiziente Hippocampus zeigte keine *Pdlim3-Alp*-Expression (Abb. 28F).

Apoe (Apolipoprotein E) kodiert einen Lipid-Transporter, dessen Expression im sich entwickelnden und adulten Gehirn und besonders im Hippocampus dokumentiert worden ist (s. z.B. Lorent et al., 1995). Im E18.5 Wildtyp Hippocampus wurde *Apoe* im Neuroepithel

und von wenigen im CA und Gyrus dentatus verstreuten Zellen exprimiert (Pfeilspitzen in Abb. 28G), sowie von den Zellen der Pia. Im E18.5 *Emx2*^{-/-} Hippocampus wurde die Expression im Neuroepithel und in der Pia beibehalten, aber nur kaum markierte Zellen waren im Rest der hippocampalen Anlage zu sehen (Abb. 28H).

App (*Amyloid Precursor Protein*). Das Produkt dieses Gens ist ein großes, glykosyliertes Transmembranprotein mit einer gründlich erforschten Rolle bei der Ätiologie der Pathogenese von Alzheimer (reviewed in (Tanzi und Bertram, 2005)). Die In Situ Hybridisierungen zeigten, dass *App* im Wildtyp Hippocampus in der hippocampalen Platte, der Subplatte, von einigen verstreuten, gut-markierten Zellen in der inneren Marginalzone (IMZ) und in der tertiären Matrix des Gyrus dentatus exprimiert wird (Abb. 28I). Dies stimmt überein mit Berichten über die *App*-Expression im sich entwickelnden und adulten Hippocampus (Bendotti et al., 1988; Lorent et al., 1995). Es konnten verminderte Mengen *App* mRNA in einem kleinen Bereich der CA Region des *Emx2*^{-/-} Mutanten Hippocampus gefunden werden (Abb. 28J).

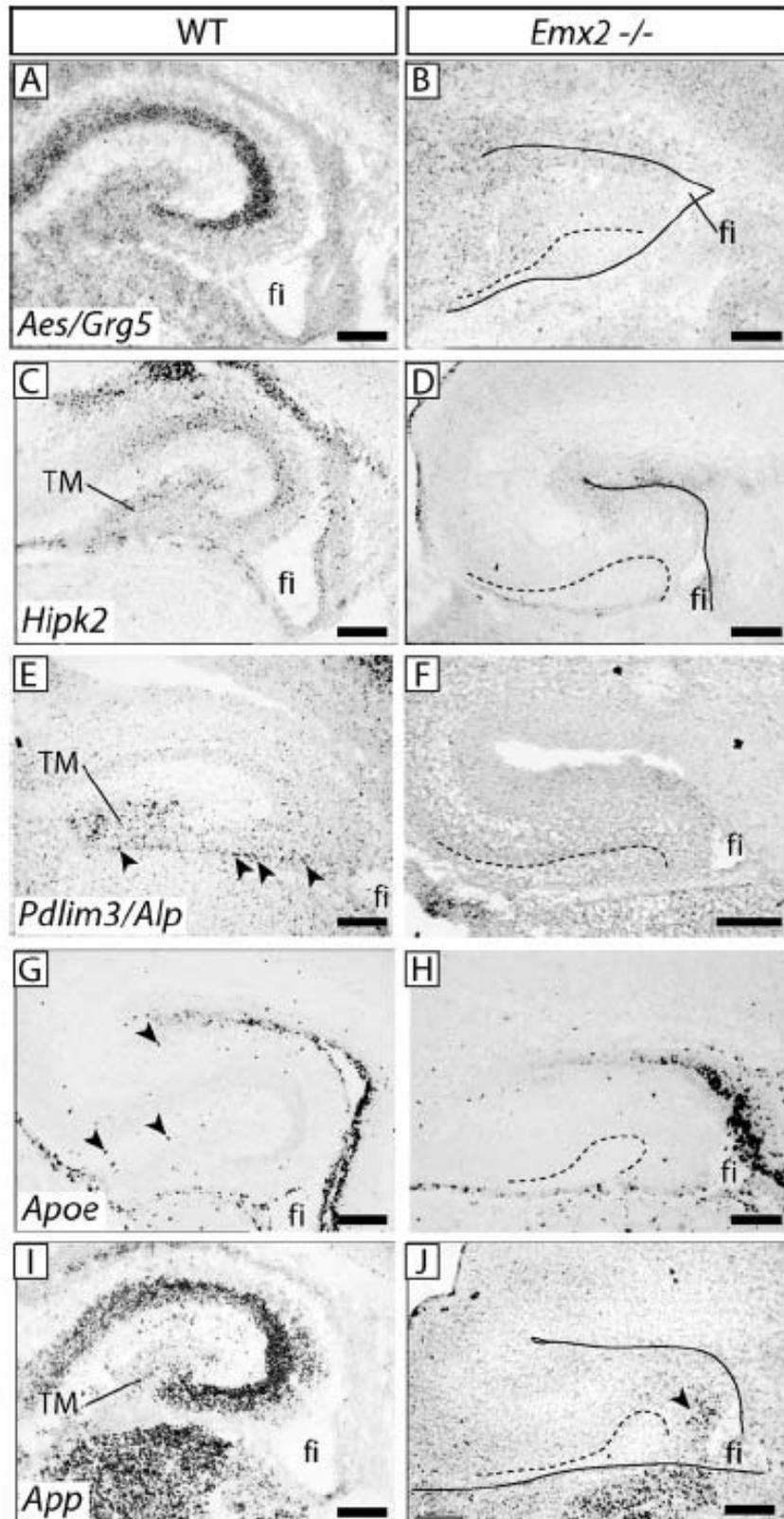


Abbildung 28: Expressionsmuster weiterer Kandidatengene, die an der Entwicklung beteiligt sein könnten

Expressionsmuster von *Aes/Grg5* (A, B), *Hipk2* (C, D), *Pdlim3/Alp* (E, F), *ApoE* (G, H) und *App* (I, J) auf coronalen Schnitten des Hippocampus bei Wildtyp (A, C, E, G, I) und *Emx2^{-/-}* Mutante (B, D, F, H, J) zum Zeitpunkt E18.5.

Abkürzungen: fi, Fimbria; TM, tertiäre Matrix; gepunktete Linie, ungefähre Lokalisation der unteren Grenze der hippocampalen Platte (CA Region); Maßstab = 200µm

Zur Erläuterung der Pfeilspitzen siehe Text-Abschnitt 4.3.3

Gen	DG					CA				
	VZ	SVZ	rad	tan	TM	VZ	IZ	SPL	HP	IMZ
<i>Akap12</i>					v+				r++	
<i>Dpysl4</i>					+++				+++	
<i>Cntn1</i>									+++	
<i>Cspg3</i>						++			+++	
<i>Ptprz1</i>	+++	++			+	+++			++	
<i>Aes</i>					v+				r++	
<i>Hipk2</i>	v+				v+	r++	v+	v+	v+	
<i>Pdlim3</i>				++	++					
<i>ApoE</i>	+++	+++								
<i>App</i>					v++			r++	r+++	v++

Tabelle 4: Expressionsmuster der Kandidatengene im Wildtyp Hippocampus

Abkürzungen: CA, Ammonshorn; DG, Gyrus dentatus; HP, hippocampale Platte; IMZ, innere Marginalzone; IZ, intermediäre Zone; r, regionale Expression, rad, radiale Migrationsstraße; SPL, Subplatte; SVZ, subventrikuläre Zone; tan, tangentielle Migrationsstraße; TM, tertiäre Matrix; v, verstreute Expression; VZ, ventrikuläre Zone.

Gen	DG				CA				
	VZ	SVZ	rad	tan	VZ	IZ	SPL	HP	IMZ
<i>Akap12</i>									
<i>Dpysl4</i>									
<i>Cntn1</i>									
<i>Cspg3</i>	+				++			+	
<i>Ptprz1</i>					+++				
<i>Aes</i>									
<i>Hipk2</i>									
<i>Pdlim3</i>									
<i>ApoE</i>	++								
<i>App</i>								r++	

Tabelle 5: Expressionsmuster der Kandidatengene im Hippocampus der *Emx2*^{-/-} Mutante

Abkürzungen: CA, Ammonshorn; DG, Gyrus dentatus; HP, hippocampale Platte; IMZ, innere Marginalzone; IZ, intermediäre Zone; r, regionale Expression; rad, radiale Migrationsstraße; SPL, Subplatte; SVZ, subventrikuläre Zone; tan, tangentielle Migrationsstraße; VZ, ventrikuläre Zone.

4.3.4 Marker-Gene für differenzierte Neuronen-Typen

Emx2 ist essentiell für das Wachstum und die Reifung des medialen Kortex (Tole et al., 2000). Entsprechend dieser Beobachtung offenbarte die Mikroarray Analyse eine sehr reduzierte Expression einer Untereinheit des GABA (A) Neurotransmitter-Rezeptors *Gabra2* in der Mutante. Obwohl die entgeltige Verteilung der GABA (A) Rezeptor Untereinheiten im Gyrus dentatus nach der Geburt erstellt wird (Laurie et al., 1992; Wisden et al., 1992), kann ihre Expression viel früher beobachtet werden und kann als ein Zeichen funktioneller Reifung betrachtet werden. Die adulte Verteilung der *Gabra2*-Untereinheit ist mittels Antikörper nachgewiesen worden und stimmt überein mit den Regionen, in denen die Dendriten der CA Pyramidenzellen und der Körnerzellen des Gyrus dentatus verteilt sind (Sperk et al., 1997). Die Verteilung der *Gabra2* mRNA während der Entwicklung ist bereits beschrieben worden (Persohn et al., 1992; Wisden et al., 1992). Sie erscheint sehr früh in der Entwicklung zunächst in der pyramidalen Schicht des CA und später, hauptsächlich postnatal, in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (Laurie et al., 1992), was mit den vorliegenden Ergebnissen übereinstimmt (ohne Abb.).

4.3.5 Vaskuläre / Endotheliale Gene in der äußeren Marginalzone

Die charakteristischen großen Blutgefäße in der Region der Fissur (äußere Marginalzone, präsumptives Stratum lacunosum-moleculare) fehlen in der *Emx2*^{-/-} Mutante, was vielleicht auf einen lokalen Defekt in der Angiogenese hinweist. Entsprechend wurde in der Mutante eine verminderte Expression einiger mit der Bildung von Blutgefäßen in Verbindung stehender Gene festgestellt.

Cldn5. Claudin-5 ist eine Endothel-spezifische Komponente von Tight Junctions (Morita et al., 1999). Im Hippocampus wurde *Cldn5* von verstreuten Zellen in der äußeren Marginalzone (Pfeilspitzen in Abb. 29A), in der Pia (Pfeile in Abb. 29A) und im Plexus choroideus exprimiert. Im Hippocampus der *Emx2*^{-/-} Mutante war keine *Cldn5*-Expression nachweisbar (Abb. 29B), obwohl sie in der Pia weiterhin vorhanden war (Pfeile in Abb. 29B).

Dcn. Decorin ist ein Dermatansulfat Proteoglycan, das von Fibroblasten reichlich sekretiert wird und zum Collagen der extrazellulären Matrix gehört (Krusius und Ruoslahti, 1986). Es wurde reichlich *Dcn* mRNA in Gefäß-Strukturen in der pialen Membran (Pfeil in Abb. 29C) sowie in den Zellen der äußeren Marginalzone (Pfeilspitzen in Abb. 29C) entdeckt. Im Hippocampus der *Emx2*^{-/-} Mutante war keine Expression von *Dcn* in der OMZ zu finden, während jene in der Pia unverändert blieb (Pfeil in Abb. 29D). Decorin wurde bereits in vaskulären Zellen peripherer Nerven und im Endothel des Gehirns gefunden (Hanemann et al., 1993; Kallmann et al., 2002) sowie in Neuronen verschiedener Regionen (Hanemann et al., 1993), inklusive des postnatalen Hippocampus (Kappler et al., 1998). Decorin scheint im Gegensatz zu den anderen Proteoglykanen im Gehirn nicht an der Bildung der Axonenbahnen beteiligt zu sein (Miller et al., 1995; Kappler et al., 1998).

Eng. Endoglin ist ein Haupt-Transmembranglykoprotein des Endothels (Gougos und Letarte, 1990; Ge und Butcher, 1994). Im Hippocampus wurde es in verstreuten Zellen der äußeren Marginalzone (Pfeilspitzen in Abb. 29E), in der Pia (Pfeil in Abb. 29E) und im Plexus choroideus (ohne Abb.) exprimiert. *Eng*-Expression war bei der *Emx2*^{-/-} Mutante im Hippocampus nicht vorhanden (aber in der Pia, Pfeil in Abb. 29F).

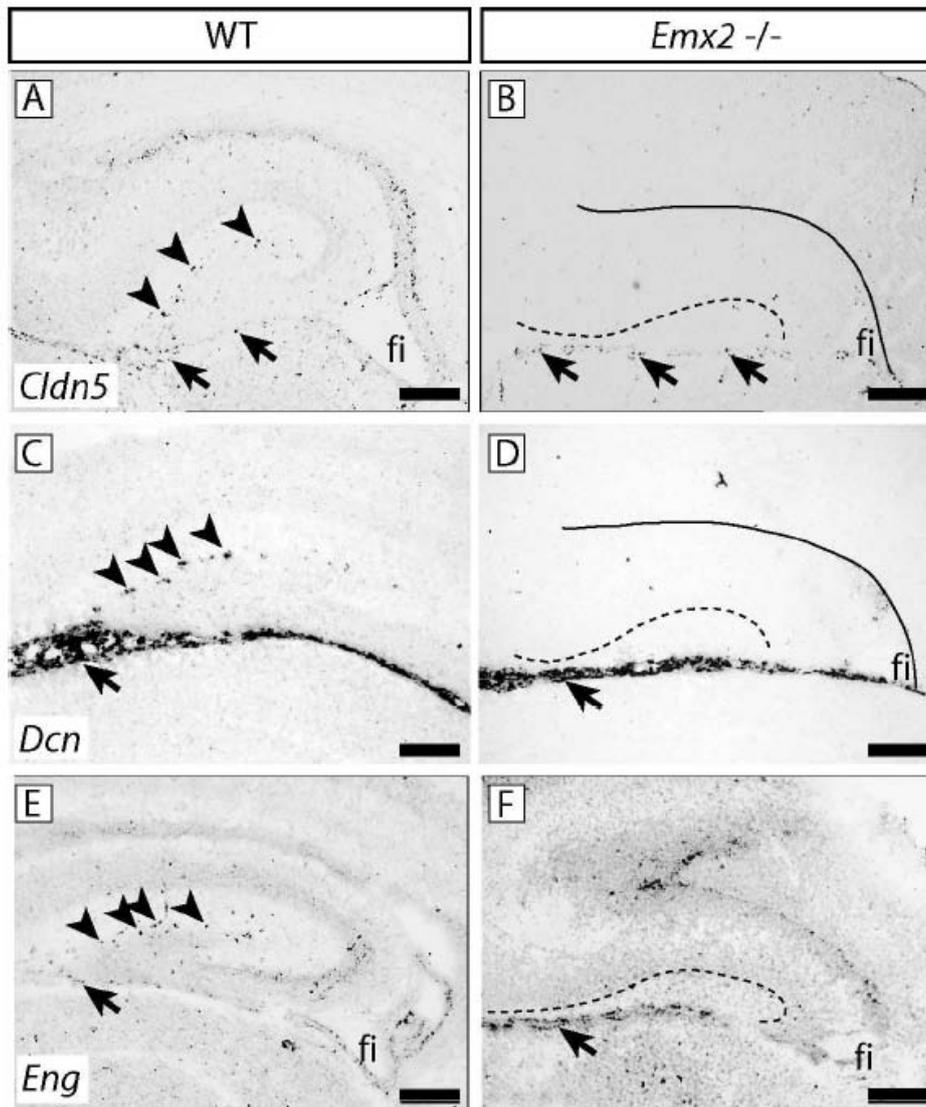


Abbildung 29: Expressionsmuster endothelialer Marker in der äußeren Marginalzone

Expressionsmuster von *Cldn5* (A, B), *Dcn* (C, D) und *Eng* (E, F) auf coronalen Schnitten des Hippocampus bei Wildtyp (A, C, E) und *Emx2*^{-/-} Mutante (B, D, F) zum Zeitpunkt E18.5.

Abkürzungen: fi, Fimbria; gepunktete Linie, ungefähre Lokalisation der unteren Grenze der hippocampalen Platte (CA Region); Maßstab = 200µm

Zur Erläuterung der Pfeile und Pfeilspitzen siehe Text-Abschnitt 4.3.5

4.3.6 Cajal-Retzius Zell-Marker in der äußeren Marginalzone

Die Cajal-Retzius Zellen im Neokortex weisen in der *Emx2*^{-/-} Mutante ernsthafte Veränderungen auf und verschwinden im späteren Verlauf der Entwicklung (Mallamaci et al., 2000b). Die Cajal-Retzius Zellen des sich entwickelnden Hippocampus sammeln sich in der

äußeren Marginalzone an (Alcantara et al., 1998), was in der Mutante nicht normgerecht zu erfolgen scheint. Bei einigen Genen, die in der *Emx2*^{-/-} Mutante mit verminderter Expression gefunden wurden, handelt es sich um Cajal-Retzius Zellmarker.

Pcp4. Das Produkt dieses Gens (Purkinje Zellprotein 4) (Mugnaini et al., 1987; Chen und Orr, 1990) moduliert die Calcium Signaltransduktion durch Regulation der Aktivität der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (Johanson et al., 2000). In einer Untergruppe von Zellen in der hippocampalen germinativen Zone (Pfeilspitze in Abb. 30A, B) wurde eine *Pcp4*-Expression entdeckt und eine sehr intensive in der äußeren Marginalzone (OMZ in Abb. 30A). Die Hauptpopulation von Neuronen der OMZ zu diesem Zeitpunkt wird repräsentiert durch die *reelin* (*Reln*)-exprimierenden Cajal-Retzius Zellen (Alcantara et al., 1998). Damit übereinstimmend ist kürzlich von *Pcp4* als Marker für Cajal-Retzius Zellen berichtet worden (Yamazaki et al., 2004). *Pcp4*-exprimierende Zellen waren in der OMZ der Mutante nicht vorhanden (Abb. 30B). Weiterhin wurden *Pcp4*-Expressionen in speziellen neuronalen Populationen verschiedener Regionen wie dem Cerebellum, dem dorsalen Nucleus cochlearis, dem Bulbus olfactorius (Mugnaini et al., 1987; Ziai et al., 1988) und der Retina (Berrebi et al., 1991) gefunden. Überraschenderweise wird *Pcp4* spezifisch vom Endothel der Hirnarterien exprimiert, nicht aber von anderen Körperarterien (Wada et al., 2002).

Smad1. Die Smads sind Transkriptionsfaktoren, die die Effekte der Transforming growth factor beta (TGF-beta) Familie der Zytokine vermitteln (Heldin et al., 1997; Massague, 1998). Die In Situ Ergebnisse zeigten eine starke *Smad1*-Expression in der OMZ des Hippocampus (Abb. 30C), nicht aber im Hippocampus der *Emx2*^{-/-} Mutante (Abb. 30D). Dies stimmt überein mit früheren Berichten über *Smad1* als Marker von Cajal-Retzius Zellen (Kim und Pleasure, 2003; Yamazaki et al., 2004).

Cxcl12. Dieses Gen kodiert ein Chemokin (SDF-1, stromal derived factor 1), das bei einer Vielzahl von Systemen in die Zellmigration involviert ist (Lapidot und Kollet, 2002; Lazarini et al., 2003). Zusammen mit seinem Rezeptor Cxcr4 (s.u.) spielt es eine Schlüsselrolle in der Angiogenese (Salcedo und Oppenheim, 2003) sowie in der Entwicklung des Gyrus dentatus (Bagri et al., 2002; Lu et al., 2002). Es wurde in Gefäßstrukturen der Pia (Pfeil in Abb. 30E, F) und in der äußeren Marginalzone (OMZ in Abb. 30E) gefunden. In Übereinstimmung mit anderen Veröffentlichungen (Bagri et al., 2002; Lu et al., 2002; Yamazaki et al., 2004) war *Cxcl12* in der Mutanten OMZ nicht vorhanden, in der Pia jedoch erhalten (Pfeil in Abb. 30F).

Cxcr4 kodiert einen Chemokinrezeptor, dessen spezifischer Ligand Cxcl12/SDF-1 ist. Es wurde sowohl in der inneren und äußeren Marginalzone des fetalen Hippocampus als auch in Zellen im Migrationsweg des Gyrus dentatus (Pfeilspitzen in Abb. 30G) gefunden. Dies stimmt überein mit früheren Berichten (Lu et al., 2002; Yamazaki et al., 2004). In der *Emx2*^{-/-} Mutante wies der Gyrus dentatus eine *Cxcr4*-Expression auf (Pfeilspitze in Abb. 30H) und ebenso die innere Marginalzone (IMZ in Abb. 30H).

Vorkommen und Funktion der weiteren Faktoren *Calb2*, *Reln* und *Trp73* wurden bereits näher erläutert (siehe Abschnitt 4.1.2.5).

4.3.7 Glia-Marker in der äußeren Marginalzone

Dio2. Das Enzym Deiodinase Typ 2, welches Thyroxin in das aktive Schilddrüsenhormon Triiodothyronin (T3) deiodiniert, wurde in der äußeren Marginalzone des Wildtyps gefunden (Pfeilspitzen in Abb. 30I), aber nicht im fetalen Hippocampus der *Emx2*^{-/-} Mutante (Abb. 30J).

Gfap. Das Glial fibrillary acidic Protein (GFAP) ist eine für Astrozyten und hippocampale radiale Glia spezifische Komponente des Zytoskeletts. In der sich entwickelnden OMZ ist es ein Marker für die langen Fasern der radialen Glia und die sich teilenden Astrozyten, die das Gerüst der sich einfaltenden Fissuren-Region bilden (Eckenhoff und Rakic, 1984; Rickmann et al., 1987; Sievers et al., 1992). Die Ergebnisse der In Situ Hybridisierung zeigen ebenso wie die Mikroarray Daten eine bedeutsame Verminderung der *Gfap* mRNA (s. Abb. 14) im *Emx2*^{-/-} Hippocampus, was zusätzlich durch die mittels Antikörpern nachgewiesene Abnahme des GFAP Proteins im Hippocampus der *Emx2*^{-/-} Mutante (s. Abb. 14) bestätigt wird. In Abschnitt 4.1.2.4 wurde im Zusammenhang mit der Zellwanderung und dem dafür essentiellen Gerüst der radialen Glia bereits ausführlich auf GFAP eingegangen.

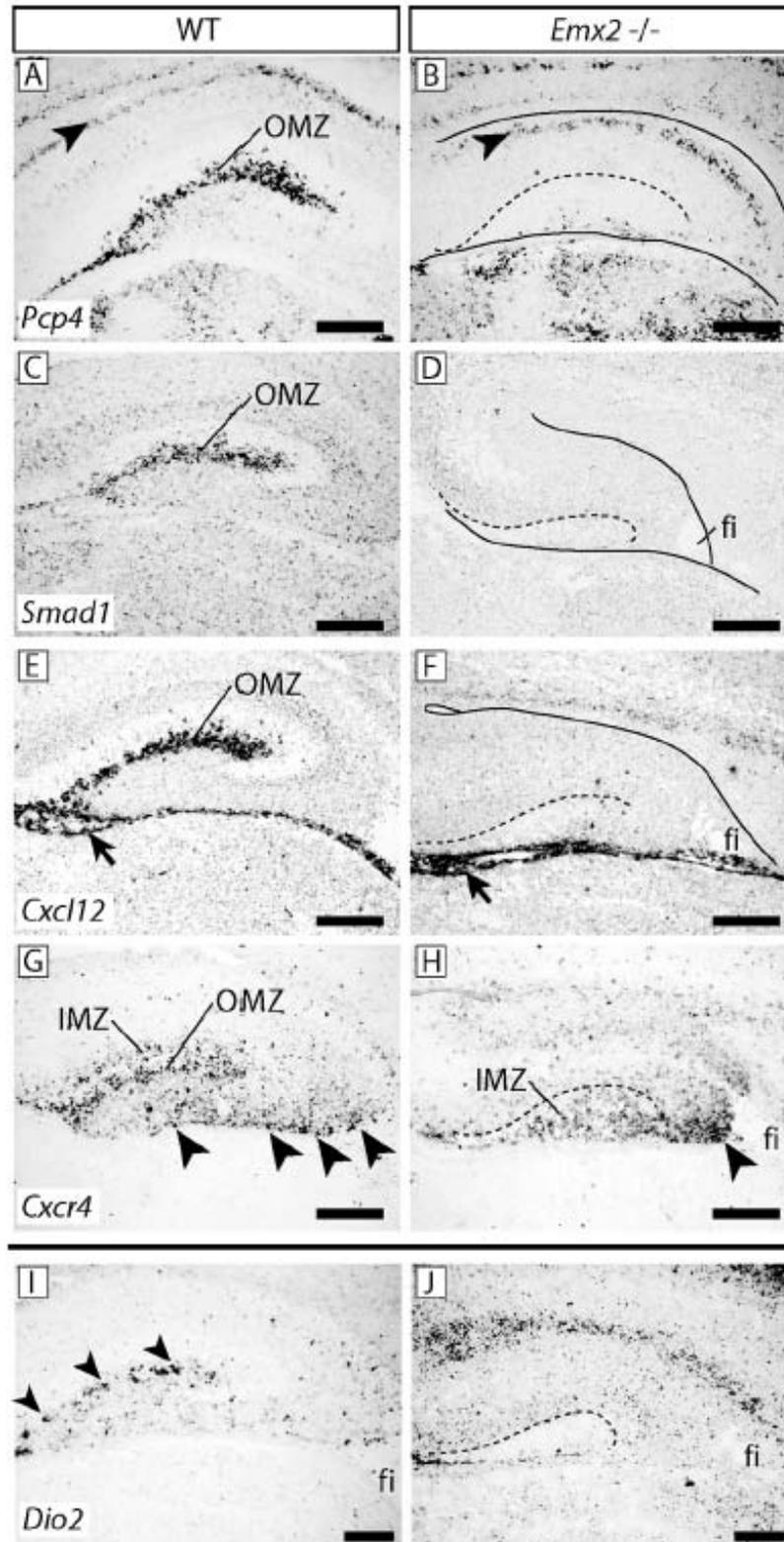


Abbildung 30: Expressionsmuster neuronaler und glialer Marker in der äußeren Marginalzone

Expressionsmuster der Marker für Cajal-Retzius Zellen *Pcp4* (A, B), *Smad1* (C, D), *Cxcl12* (E, F), *Cxcr4* (G, H) und des Glia-Markers *Dio2* (I, J) auf coronalen Schnitten von Wildtyp (A, C, E, G, I) und *Emx2*^{-/-} (B, D, F, H, J) Hippocampus bei E18.5;

Abkürzungen: fi, Fimbria; IMZ, innere Marginalzone; OMZ, äußere Marginalzone; gepunktete Linie, ungefähre Lokalisation der unteren Grenze der hippocampalen Platte (CA Region); Maßstab = 200µm
Zur Erläuterung der Pfeile und Pfeilspitzen siehe Text-Abschnitte 4.3.6 und 4.3.7

5 Diskussion

5.1 Bekannte Gene im Entwicklungsverlauf

Warum bei der *Emx2*^{-/-} Mutanten Maus die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus fehlt (Pellegrini et al., 1996; Yoshida et al., 1997), ist bisher noch nicht vollständig geklärt.

Angesichts des umfangreichen Expressionsmusters von *Emx2* im Pallium und des Gyrus dentatus spezifischen Phänotyps in der *Emx2*^{-/-} Mutante ist die Hypothese nicht haltbar, dass dieses Gen eine einzelne Funktion hat, die für die Phänotypen sowohl von Neokortex als auch von Gyrus dentatus verantwortlich ist und dass es sich beim *Emx2*^{-/-} hippocampalen Phänotyp lediglich um den Teil eines grundsätzlichen Defekts des Neokortex handelt (Tole et al., 2000). Ein Ziel dieser Arbeit war, die Wege zu charakterisieren, über die ein generelles Problem in der kortikalen Reifung zum Fehlen der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus in der *Emx2*^{-/-} Mutante führen kann.

Mittels Analyse der Expression von Genen der proneuralen Kaskade sowie anderer Marker im Mutanten Gyrus dentatus wurden Veränderungen in den Vorläuferzellen, den Körnerzellen und im Glia-Gerüst aufgedeckt: 1) Bemerkenswerterweise werden *Notch1*, *Delta1* und die Gene der bHLH Kaskade von den Mutanten neuroepithelialen Vorläuferzellen fast ohne Veränderung exprimiert. 2) Jedoch ist die sekundäre Matrix (Altman und Bayer, 1990a) im Mutanten Gyrus dentatus drastisch reduziert. 3) Die wenigen Körnerzellen, die in der Mutante gebildet werden, sind nicht korrekt differenziert (exprimieren kein *NeuroD2*) und sind nicht fähig, über die tangentialen Migrationsstraße, in der sie sich anzusammeln scheinen, hinaus zu wandern. 4) Das *GFAP*-exprimierende Gerüst der radialen Glia existiert im Mutanten Gyrus dentatus fast nicht, was vermuten lässt, dass Probleme in der Migration ein wichtiger Teil des Phänotyps sind.

5.1.1 Differenzierung der neuronalen und glialen Vorläufer

Expression von Markern der Vorläuferzellen im *Emx2*-defizienten Gyrus dentatus

Die gewonnenen Daten bezüglich der *Tenascin C* und bHLH Gen-Expression im sich entwickelnden Gyrus dentatus der Wildtyp Maus stimmen mit denen aus anderen Veröffentlichungen überein (Lindsell et al., 1996; Sommer et al., 1996; Ma et al., 1997; Pleasure et al., 2000; Yuasa, 2001a). Eine zentrale Entdeckung in der Mutante ist, dass das

Emx2-defiziente Gyrus dentatus Neuroepithel fähig ist, die bHLH Gen Kaskade auf eine mit dem Wildtyp fast vollständig übereinstimmende Weise zu exprimieren, was vermuten lässt, dass die grundlegende genetische Kontrolle der Neurogenese im Gyrus dentatus auch in Abwesenheit von *Emx2* beibehalten wird. Gefunden wurden in der Mutante eher leichtere Veränderungen in den spatiotemporalen Expressionsmustern, wie ein verspäteter Beginn und vorzeitiger Abschluss der Expression des proneuralen Gens *Mash1*, eine frühzeitige Expression von *Id3*, einem antineuralen Gen (Benezra et al., 1990; Ellis et al., 1990; Garrell und Modolell, 1990) und eine einheitlich reduzierte Anzahl der *Delta1*-exprimierenden Zellen. Zusätzlich scheint die Expression von *Tenascin C* ebenfalls verzögert zu sein. Diese Veränderungen könnten auf eine bestimmte Fehlregulation in den frühen Schritten der neurogenetischen Kaskade hinweisen, die vielleicht letztendlich mit der Unfähigkeit, eine sekundäre Matrix bilden zu können, in Zusammenhang steht.

Drastische Reduktion der sekundären Matrix in der *Emx2*^{-/-} Mutante

Von etwa E14.5 bis E15.5 wandert eine Gruppe sich teilender Vorläuferzellen, die im Gyrus dentatus Neuroepithel entstanden sind, weg von der ventrikulären Zone und errichtet ein mitotisches Zentrum, die sekundäre germinative Matrix (Altman und Bayer, 1990a), die zunächst die subventrikuläre Zone und im weiteren Verlauf der Entwicklung eine Migrationsstraße aus mitotischen Zellen, welche letztendlich die Körnerzellen produzieren, bildet (Altman und Bayer, 1990a, b). Durch Markierung mit *Notch1*, *Delta1* und bHLH Gen-Sonden war es möglich, die Bildung der sekundären Matrix im Wildtyp Gyrus dentatus bei E15.5 zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt sind wandernde Zellen, die *Ngn2* oder *Hes5* exprimieren, am meisten vertreten, während *Notch1*-exprimierende wandernde Zellen und besonders solche, die *Mash1* oder *Id3* exprimieren, selten erscheinen. Fast keine Zellen exprimieren *Delta1*. Die unterschiedlichen Mengen der radial wandernden Zellen, die mit jeder dieser Sonden markiert wurden, deuten auf die Existenz verschiedener Subpopulationen der migrierenden Vorläufer hin (Pleasure et al., 2000).

Im Gegensatz dazu ist im *Emx2*^{-/-} Gyrus dentatus die sekundäre Matrix extrem vermindert, was anhand der sehr geringen Anzahl proliferierender Zellen in der Mutanten Migrationsstraße, der Tatsache, dass die Marker für migrierende Vorläufer *Id3*, *Notch1*, *Hes5*, *Delta1* und *Ngn2* von den frühesten Stufen an auf das Neuroepithel begrenzt bleiben und dem frühzeitigen Verlust des Markers für migrierende Vorläufer *Mash1* beurteilt werden kann. Jedoch zeigt die Färbung mit dem anti-Ki-67 Antikörper eine sehr geringe Anzahl von Zellen,

die eine subventrikuläre Schicht in der Mutante bilden, was darauf hindeutet, dass in der Abwesenheit von *Emx2* immer noch eine verkümmerte sekundäre Matrix gebildet werden kann. Da das Neuroepithel (primäre Matrix) des Gyrus dentatus die Körnerzellen nur über die sekundäre Matrix entstehen lässt (Altman und Bayer, 1990a), ist die nahezu vollständige Abwesenheit einer sekundären Matrix der Grund für die dramatische Reduktion der Anzahl der Körnerzellen in der Mutante.

Im *Emx2*^{-/-} Mutanten Gyrus dentatus existieren nur wenige und unvollständig differenzierte Körnerzellen

Eine fehlende Migration könnte die Funktion der Vorläufer beeinträchtigen, indem sie z.B. daran gehindert werden, mit Signalmolekülen in Kontakt zu treten, die normalerweise in der Migrationsstraße zu finden wären. In vitro wurde gezeigt, dass Körnerzellen in dieser Mutante nicht korrekt differenziert sind (Savaskan et al., 2002). Es wurde eine verzögerte Expression des Körnerzellmarkers *Prox1* gefunden (diese Arbeit und Oldekamp et al., 2004). Das Fehlen von *NeuroD2*, einem Marker für gerade differenzierte Körnerzellen, bestätigt, dass diese Neurone nicht die Enddifferenzierung erreichen. Aus den vorliegenden Daten ist nicht ersichtlich, ob es sich bei den Differenzierungsproblemen um einen primären Defekt der Körnerzellen handelt oder ob diese sekundär auf Differenzierungsprobleme in den Vorläuferzellen folgen. Beeindruckend ist, dass die wenigen Körnerzellen (und Astrozyten), die in der Mutante gebildet werden, im Gegensatz zu den proliferierenden Vorläufern in der Lage sind, bis zur tangentialen Migrationsstraße zu wandern. Möglicherweise haben sie einen anderen Substrat-Bedarf als die Vorläuferzellen.

Es gibt Beweise, dass *Emx2* seine Funktionen im Telenzephalon durch Antagonisierung der Fgf8 (Fukuchi-Shimogori und Grove, 2001, 2003) und Wnt (Ligon et al., 2003) Signalsysteme ausübt. Von Shimogori et al. (2004) konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der in *Emx2*^{-/-} Gehirnen vorhandenen Überexpression von Fgf8 die fehlende *Wnt*-Expression im Hem zumindest teilweise wiederherstellt, wodurch auch wieder Körnerzellen im Gyrus dentatus produziert werden.

5.1.2 Gestörte Migration in der *Emx2*^{-/-} Mutante

***Emx2*-Funktion im Telenzephalon und im Gyrus dentatus**

Auf zellulärer Ebene verändert das Defizit von *Emx2* im Telenzephalon das positionelle Informationsgitternetz (Bishop et al., 2000, 2002) zumindest teilweise durch Veränderung der tangentialen und radialen neuronalen Migration (Mallamaci et al., 2000b; Shinozaki et al., 2002; Ligon et al., 2003). Damit übereinstimmend ist bekannt, dass die Entwicklung der radialen Glia Zellen in *Emx2*^{-/-} Mutanten verändert ist (Mallamaci et al., 2000b). Sowohl die positionelle Information als auch die Migration sind wichtig für Aufbau und Ausführung der kortikalen Protokarte (Rakic, 1991; Muzio et al., 2002a; Muzio und Mallamaci, 2003). Störungen der positionellen Information und neuronalen Migration, die den gesamten medialen Kortex betreffen, könnten dann durch die Veränderung eines Gyrus dentatus spezifischen Prozesses wie die Bildung einer wandernden sekundären Matrix zu einem spezifischen Defekt des Gyrus dentatus führen. Als ein paralleler Prozess könnten abnorme radiale Glia Zellen unfähig sein, selbst zu wandern und die Migration der Vorläuferzellen korrekt zu unterstützen.

Das Glia Gerüst im *Emx2*-defizienten Gyrus dentatus

Das Neuroepithel produziert nicht nur sekundäre Vorläuferzellen, sondern versorgt sie auch mit dem ersten Substrat, an dem sie entlang wandern können, den Fortsätzen der radialen Glia (Eckenhoff und Rakic, 1984; Rickmann et al., 1987). Jede Veränderung, die in der Lage ist, die Fähigkeit des Neuroepithels, eine sekundäre Matrix zu generieren, zu beeinträchtigen, könnte ebenso die Störung dieses Schlüsselements der Histogenese zur Folge haben. Die langen Fortsätze der radialen Glia enthalten GFAP und werden von den Vorläufern als Migrations-Substrat genutzt (Rickmann et al., 1987). *Tenascin C*-exprimierende Astrozytenvorläufer nutzen den gleichen Weg, um die spätere Region der Körnerzellschicht, zu deren Histogenese sie beitragen, zu erreichen (Yuasa, 2001a, b). Abnorme radiale Glia Zellen und veränderte neuronale Migration im *Emx2*^{-/-} Mutanten Kortex sind tatsächlich schon beschrieben worden (Mallamaci et al., 2000b; Shinozaki et al., 2002).

Übereinstimmend damit zeigen die Ergebnisse eine dramatische Verminderung des radialen Glia Gerüsts im Mutanten Gyrus dentatus. Den GFAP immunhistochemischen Untersuchungen zufolge ist das radiale Glia Gerüst in der *Emx2*^{-/-} Mutante beeinträchtigt und die Anzahl der Astrozyten vermindert, obwohl die In Situ Hybridisierung zeigt, dass *GFAP*-

exprimierende Vorläufer im Mutanten Neuroepithel existieren. Hypothetisch wäre es möglich, dass es sich um ein initiales Versagen der neuroepithelialen Zellen, die richtige Anzahl korrekt differenzierter radialer Fortsätze zu produzieren, handelt. In Folge dessen wären die Astrozyten-Vorläufer nicht in der Lage, die Region der Körnerzellschicht zu erreichen und es würde zu einem histogenetischen Versagen letzterer führen.

Glia-Gerüst und *Reln*-exprimierende Zellen im Bereich der Fissur

Die radialen Glia Zellen der ventrikulären Schicht des Gyrus dentatus bilden zwei Systeme von Fortsätzen, das suprafimbrierte und das supragranuläre (Rickmann et al., 1987; Sievers et al., 1992; Yuasa, 2001a). Das suprafimbrierte folgt einer geraden Strecke unmittelbar angrenzend an die Fimbria hin zur Pia (radiale Migrationsstraße, Abb. 17A, C) und wendet sich dann in die Richtung der zukünftigen Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (tangentele Migrationsstraße, Abb. 17A, C). Das supragranuläre Bündel verläuft in Richtung der sich entwickelnden Fissur, deren Gerüst es bildet. Als eine dritte gliale Komponente wandern teilungsfähige *GFAP*-exprimierende Astrozyten tangential unter der Pia entlang, betreten die sich entwickelnde Fissur, breiten sich entlang deren Gerüst aus und bilden zwei bis drei Zellreihen (Sievers et al., 1992). Die Ergebnisse hier zeigen, dass die verschiedenen glialen Komponenten im *Emx2*^{-/-} Gyrus dentatus unterschiedlich betroffen sind. Die langen radialen Glia-Fortsätze, die das Gerüst der Fissur bilden (supragranuläres Bündel, SGB) fehlen komplett (vergleiche Abb. 18A und B), die suprafimbrierten Fortsätze, die die Migrationsstraßen bilden, sind vorhanden, aber in Anzahl und Länge drastisch reduziert (Abb. 17B, D; Abb. 18B). Schließlich sind einige der subpial wandernden sich teilenden Astrozyten in der Mutante vorhanden, obgleich sie nicht in der Lage sind, die Region der Fissur zu bilden bzw. zu kolonisieren, sondern nahe der Pia verbleiben (Abb. 18C).

Die Analysen bestärken die Vermutung, dass trophische Interaktionen zwischen den verschiedenen Elementen der Fissur existieren. *Reeler* Mutanten sind fähig, eine hippocampale Fissur zu entwickeln (Hamburgh, 1963), obwohl *reelin* für die ordentliche Entwicklung der radialen Glia des Kortex und des Cerebellums notwendig ist (Soriano et al., 1997; Hartfuss et al., 2003). Da *Emx2* sowohl von *Reln*-exprimierenden Zellen als auch vom Gyrus dentatus Neuroepithel exprimiert wird, sind im *Emx2*^{-/-} Gehirn möglicherweise beide Elemente verändert. Diese Defekte könnten sich dann zu einem schwerwiegenderen addieren.

5.1.3 Entwicklung der Marginalzonen und Bedeutung der *Reln*-exprimierenden Zellen

In einem weiteren Schritt wurden die Anomalien in der Entwicklung der *Emx2*^{-/-} hippocampalen Marginalzonen untersucht. Besonders in Augenschein genommen wurde die Beteiligung von *Emx2* an der hippocampalen Faltung (Bildung der Fissur) und an der Entwicklung der äußeren Marginalzone (OMZ; Vorläufer des Stratum lacunosum-moleculare). Die Ergebnisse beinhalten: 1) *Emx2* ist für die Entwicklung des radialen Glia Gerüsts der hippocampalen Fissur notwendig; 2) die unmittelbar an die Region der *Emx2*^{-/-} hippocampalen Fissur angrenzende Marginalzone (OMZ) ist atrophisch und auf eine verkümmerte Größe reduziert – man kann sagen, dass in der Mutante ein Stratum lacunosum-moleculare fehlt; 3) die *Reln*-exprimierenden Zellen, die die OMZ besetzen sollten (sowie auch die DMZ) und bei denen es sich unter anderen hauptsächlich um Cajal-Retzius Zellen handelt, sind im *Emx2*^{-/-} aufgrund einer verminderten Produktion stark reduziert; 4) es wurde eine Subpopulation von hippocampalen *Reln*-exprimierenden Zellen identifiziert, die möglicherweise im Hem entsteht, eine spezifische Kombination von Markern exprimiert und für die *Emx2* nicht essentiell benötigt wird; 5) die Funktionen von *Emx2* und *Pax6* in der Bildung des späteren Stratum lacunosum-moleculare ähneln einander, obwohl sie sich in der neokortikalen Marginalzone gegenseitig funktionell antagonisieren.

Letztendlich exprimieren alle im *Emx2*^{-/-} Phänotyp betroffenen Strukturen, die hier beschrieben wurden (Bereich der Fissur, *Reln*-exprimierende Zellen, Gyrus dentatus Neuroepithel, neokortikales Hem) *Emx2* (gegenwärtige Arbeit und Oldekamp et al., 2004), was vermuten lässt, dass es sich bei diesen Mutanten Phänotypen zu einem großen Grad um primäre Defekte handeln könnte.

***Reln*-exprimierende Zellen und die Faltung des Hippocampus**

Die OMZ und DMZ des *Emx2*^{-/-} sind in ihrer Größe extrem reduziert (Abb. 13). Weder Berichte von anderen Autoren noch eigene Untersuchungen (ohne Abb.) haben eine vergleichbare Atrophie in der *Emx2*^{-/-} neokortikalen Marginalzone gefunden. Dies lässt vermuten, dass *Reln*-exprimierende Zellen spezifische trophische Effekte auf das Wachstum der Marginalzonen um den Bereich der Fissur herum haben. Da das korrekte Wachstum dieser Marginalzonen zur Faltung des Hippocampus führen würde, kann diese Beobachtung vielleicht in Zusammenhang mit anderen Mutanten Phänotypen gebracht werden, wie den *Lhx5* (Zhao et al., 1999) und *p73* Mutanten (Meyer et al., 2004), die durch eine Verminderung

der *Reln*-exprimierenden Zellen zusammen mit der fehlenden Faltung des Hippocampus charakterisiert sind. Dies bestärkt bestehende Vermutungen, dass *Reln*-exprimierende Zellen bei der kortikalen Faltung eine Rolle spielen, wobei aber möglicherweise andere Moleküle als *reelin* beteiligt sind (Alcantara et al., 2006).

Eine spezifische Subpopulation von *Reln*-exprimierenden Zellen im Hippocampus benötigt kein *Emx2*

Die Marginalzone enthält eine morphologisch heterogene Population an *Reln*-exprimierenden Zellen, die unter Verwendung der Golgi Methode (Marin-Padilla, 1998) und mittels Antikörper gegen calbindin und calretinin (reviewed in (Soriano und Del Rio, 2005)) subklassifiziert worden ist. Erst kürzlich hat die Detektion der Gen-Expression mittels In Situ Hybridisierung enthüllt, dass verschiedene Gruppen von *Reln*-exprimierenden Zellen der Marginalzone zu einem bestimmten Grad spezifische Marker exprimieren, was vielleicht ihre verschiedenen Herkunftsorte im Telenzephalon erkennen lässt (Lavdas et al., 1999; Hevner et al., 2003; Yamazaki et al., 2004). Hier wurden sieben Marker Gene verwendet, von denen bekannt ist, dass sie zumindest in einigen *Reln*-exprimierenden Zellen der Marginalzone exprimiert werden, um die Gruppe von im Hippocampus lokalisierten *Reln*-exprimierenden Zellen zu charakterisieren, die als einzige in der *Emx2*^{-/-} Mutante erhalten bleibt. Diese Zellen exprimieren tatsächlich *Reln* und *Emx2*, sowie *Lhx5* und *p73* (*Trp73*) (Abb. 19-21). Wenige von ihnen scheinen schwach *Calb2* (*calretinin*) und *Cxcl12/SDF-1* zu exprimieren (Abb. 21B, J). Keine von ihnen exprimiert *Pcp4* oder *Smad1* (Abb. 21F, H). *Cxcr4* codiert den Rezeptor für das Zytokin *Cxcl12/SDF-1* und wird ebenfalls in der hippocampalen Fissur exprimiert (Lu et al., 2002; Yamazaki et al., 2004). Jedoch deuten die gewonnenen Daten (ohne Abb.) darauf hin, dass es auch sehr reichlich in der IMZ exprimiert wird, was die Beurteilung im Mutanten Hippocampus schwierig macht.

Mechanismus des Verschwindens der *Reln*-exprimierenden Zellen der hippocampalen Fissur in der *Emx2*^{-/-} Mutante

Mehrere Mechanismen können für die Abwesenheit einer bestimmten Zellpopulation von jenem Ort, wo sie normalerweise erwartet werden würde, verantwortlich sein: Verminderte Proliferation, vermehrter Zelltod, abnorme Migration oder eine Kombination davon. Den Resultaten zufolge scheint die Verminderung der *Reln*-exprimierenden Zellen in der *Emx2*^{-/-} hippocampalen Marginalzone durch eine verminderte Produktion zu entstehen. Die meisten,

wenn auch nicht alle *Reln*-exprimierenden Zellen der Marginalzone des medialen Kortex (inklusive des Hippocampus), stammen aus dem unmittelbar angrenzenden kortikalen Hem (Shinozaki et al., 2002; Takiguchi-Hayashi et al., 2004; Yoshida et al., 2006), einer *Emx2*-exprimierenden neuroepithelialen Region, die im *Emx2*^{-/-} Gehirn in ihrer Größe stark vermindert ist (Shinozaki et al., 2002; Shinozaki et al., 2004). Übereinstimmend damit deutet die Verteilung von reelin im sich entwickelnden Hippocampus (Abb. 16) zusammen mit den Entstehungszeitpunkt-Labelings (Abb. 17) auf eine erhebliche Reduktion der Produktion *Reln*-exprimierender Zellen in *Emx2*^{-/-} Gehirnen hin. Der zweite wichtige Mechanismus, der zu einer Reduktion der Anzahl an *Reln*-exprimierenden Zellen beitragen könnte, wäre ein erhöhter Zelltod. Die Ergebnisse des TUNEL Labelings (Abb. 19) auf Wildtyp Gehirnen stimmen mit Berichten überein, dass der Zelltod während der Entwicklung im Wildtyp Nager Pallium überwiegend postnatal auftritt (Ferrer et al., 1990; Gould et al., 1991) und dass pränataler Zelltod in der Wildtyp Marginalzone vernachlässigbar ist (Thomaidou et al., 1997). Zusätzlich wurden keine Veränderung in *Emx2*^{-/-} Gehirnen gefunden, so dass Zelltod als Mechanismus des Verschwindens ausgeschlossen werden kann. Schließlich könnten die *Reln*-exprimierenden Zellen der *Emx2*^{-/-} Mutante vom Telenzephalon zu einem anderen Ort abwandern. Jedoch hat der *Emx2*^{-/-} Kortex nachweislich tangentielle Migrationsdefekte (Shinozaki et al., 2002), was Migration als Erklärung ausschließt.

Eine früh vorübergehende Population von *Reln*-exprimierenden Zellen im Wildtyp Pallium

Kortikale *Reln*-exprimierende Zellen tauchen vorübergehend auf und verschwinden früh postnatal wieder (Derer und Derer, 1990). Unerwarteter Weise wurden in Wildtyp wie auch in *Emx2*^{-/-} Gehirnen eine Population von *Reln*-exprimierenden Zellen gefunden, die bei E10.5 entstehen und innerhalb der nächsten drei Tage zu verschwinden scheinen (Abb. 18). Analysen von *Reln*-exprimierenden Zellen im *Emx2*^{-/-} Neokortex (Mallamaci et al., 2000b) enthüllten eine Diskrepanz zwischen aktueller histologischer Detektion von reelin-Zellen in der Mutante bei E11.5 und BrdU + reelin Zell-Zählung bei E19.5, die zeigte, dass bei E12.5 entstandene Zellen nicht vorhanden waren. Mallamaci et al. (2000b) löste diese Diskrepanz durch Postulierung der Existenz von zwei verschiedenen Populationen *Reln*-exprimierender Zellen: Eine früh vorübergehende, nicht von *Emx2* abhängige und eine späte Population, die um die Geburt noch nachweisbar und abhängig von *Emx2* ist. In der vorliegenden Arbeit wurde BrdU sogar viel früher bei E10.5 und bei E11.5 injiziert und die daraus gewonnenen

Daten bezüglich Hippocampus (und Neokortex) erlauben, diese Vermutung zu bestätigen. In diesem Fall kann ihr Verschwinden nicht einer verminderten Proliferation zugeschrieben werden und die Daten bezüglich der TUNEL Methode schließen Zelltod als Mechanismus aus. Interessanterweise sind diese früh vergänglichen *Reln*-exprimierenden Zellen auch im *Emx2*^{-/-} Gehirn fähig, zu wandern und die palliale Marginalzone zu besetzen, was vermuten lässt, dass sie, im Gegensatz zu den später entstehenden, *Emx2* nicht benötigen, um tangential wandern zu können. Demzufolge könnte ihr Verschwinden bedeuten, dass sie aus dem Pallium auswandern. Alternativ dazu wäre es möglich, dass sie als Teil ihrer normalen Differenzierung die *Reln*-Expression runterregulieren.

Unterschiedliche Entwicklung von neokortikalen und hippocampalen *Reln*-exprimierenden Zellen

In *Emx2*^{-/-} Gehirnen behält die neokortikale Marginalzone ihre normale Dicke bei und neokortikale *Reln*-exprimierende Zellen sammeln sich vorübergehend an und verschwinden dann komplett (Mallamaci et al., 2000b). Die vorliegenden Resultate deuten jedoch darauf hin, dass die Region um die sich entwickelnde Mutante Fissur atrophische Marginalzonen aufweist, aber keine abnorme Ansammlung oder komplettes Verschwinden von *Reln*-exprimierenden Zellen. Übereinstimmend mit der Beobachtung dieser unterschiedlichen Phänotypen wurde von unterschiedlichem Überleben neokortikaler und hippocampaler *Reln*-exprimierender Zellen bereits berichtet (Del Rio et al., 1996; Drakew et al., 1998; Abraham und Meyer, 2003). Es wurde gezeigt, dass *Pax6*^{Sey/Sey} unterschiedliche Effekte auf neokortikale bzw. hippocampale *Reln*-exprimierende Zellen der Marginalzone ausübt (stark vermehrt im Neokortex gegenüber leicht vermindert in der Fissur) (diese Arbeit und Zhao et al., 2006). Interessant ist, während *Pax6* und *Emx2* bei der neokortikalen Regionalisierung Antagonisten sind (Bishop et al., 2000, 2002; Shinozaki et al., 2002) und gegensätzliche Effekte auf neokortikale *Reln*-exprimierende Zellen der Marginalzone haben (Stoykova et al., 2003), führen beide Mutationen in der sich entwickelnden hippocampalen Fissur zu einer verminderten Anzahl an *Reln*-exprimierenden Zellen (obgleich der Einfluss von *Pax6* weniger dramatisch ist und auf die OMZ begrenzt zu sein scheint). Die *Reln*-exprimierenden Zellen der hippocampalen und neokortikalen Marginalzonen haben unterschiedliche, spezifische Aufgaben in der Bildung Ebenen-spezifischer hippocampaler Verbindungen einerseits (Del Rio et al., 1997) und in der neokortikalen Organisation andererseits (Alcantara et al., 2006). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Entwicklung der *Reln*-exprimierenden Zellen im

Neokortex und im Hippocampus entsprechend dieser funktionellen Verschiedenheit auch unterschiedlichen molekularen Regulationen unterliegt.

5.2 Mikroarray-Analyse

5.2.1 Faktoren der Zellmigration sowie von axonalem Wachstum und axonaler Wegfindung

Die Migration ist im *Emx2*^{-/-} Gyrus dentatus nachweislich gestört. Entsprechend lieferte die Mikroarray-Analyse einige Faktoren, die mit dem Prozess der Zellmigration in Verbindung stehen und die darüber hinaus eine Rolle bei Axonenwachstum und axonaler Wegfindung spielen.

Akap12 und Dpysl4

Die „A-kinase-anchoring-proteins“ (Akaps) binden an G-Protein-gebundene Membran-Rezeptoren und ermöglichen dadurch spezifische und begrenzte Interaktionen des Rezeptors mit verschiedenen Proteinkinasen, Proteinphosphatasen und Elementen des Zytoskeletts. Die Spezifität der downstream Signalkaskade wird dadurch erreicht, dass nur solche PKA Moleküle durch eine lokale Erhöhung der cAMP Konzentration aktiviert werden, die in der Nähe eines Akap gebunden sind (Malbon et al., 2004).

Die cAMP Signalgebung, welche notwendig ist, um wachsende Axone zu steuern (Nishiyama et al., 2003), erreicht den Wachstumshügel des Zytoskeletts durch Collapsing Response Mediator Proteine (Crmps, zu denen *Dpysl4/Crmp3* gehört) (Liu und Strittmatter, 2001). Kürzlich ist gezeigt worden, dass das Drosophila *Akap* Homologon *nervy* die Plexin-vermittelte „Collapsing Response“ auf Semaphorin durch Anbindung des Semaphorin-Rezeptors Plexin an PKA neutralisiert, was wiederum *Crmp* Gene inhibiert (Terman und Kolodkin, 2004). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die *Akap12* und *Dpysl4/Crmp3* Expression eine regionale Co-Lokalisation in der CA Region zeigen, d.h. es ist möglich, dass sie auch auf zellulärer Ebene co-lokalisiert sind. Die Semaphorine (eine Genfamilie axonaler Guidance-Moleküle) und ihre Rezeptoren (die Neuropiline und Plexine) sind essentiell für die korrekte Formation der hippocampalen Verbindungen (Chedotal et al., 1998; Steup et al., 1999; Chen et al., 2000; Steup et al., 2000; Cheng et al., 2001; Bagri et al., 2003; Sahay et al., 2003). Ihre Expression in dieser Region stimmt mit der einiger Mitglieder

der *Crmp* Familie überein (Quach et al., 2000; Bretin et al., 2005). Es wäre somit möglich, dass durch das Fehlen von Akap12 und Dpysl4 in der *Emx2*^{-/-} Mutante die ordentliche Vermittlung der Semaphorin-Antwort gestört ist.

Cspg3-neurocan, Ptprz1-phosphacan und Cntn1

Cspg3- und Ptprz1-Proteine sind schon früher mittels Antikörper im Hippocampus der Ratte und der Maus nachgewiesen worden (Wilson und Snow, 2000; Okamoto et al., 2001; Bruckner et al., 2003). *Cspg3* wird spezifisch, durch den Entwicklungsverlauf reguliert, von Neuronen und ebenso Astrozyten exprimiert (Oohira et al., 1994), während *Ptprz1* hauptsächlich von Astrozyten exprimiert wird (Snyder et al., 1996). Da beide extrazelluläre Matrixproteine kodieren, zeigen die Antikörper eine breitere Verteilung im Hippocampus, die sich tatsächlich über alle Regionen und Schichten erstreckt. Dies stimmt im Prinzip mit den vorliegenden Ergebnissen überein, da die verteilten Zellen, die gefunden wurden, gut positioniert sind, um die Proteine über den gesamten Hippocampus zu sekretieren. Neurocan und Phosphacan sind an der axonalen Steuerung und Faszikulation während der Bildung des hippocampalen Axontraktes beteiligt (Wilson and Snow, 2000) und spielen beim hippocampalen „Plastizitäts-Phänomen“ eine Rolle (Kurazono et al., 2001; Heck et al., 2004). Neurocan und Phosphacan binden das extrazelluläre Matrixprotein Tenascin-C und sind starke Inhibitoren für das Auswachsen der Neuriten (Margolis et al., 1996). Die Mikroarray-Studie bestätigt quantitativ das Ergebnis der In Situ Hybridisierungen, die eine reduzierte *Tenascin-C*-Expression im *Emx2*-defizienten Hippocampus zeigen (diese Arbeit und (Oldekamp et al., 2004)). Die Effekte des Tenascin-C auf das hippocampale Axonenwachstum wird durch das zur Immunglobulin Superfamilie gehörende Adhäsionsmolekül F3cam (auch als Contactin1 oder Cntn1 bekannt), das als Tenascin-C Membranrezeptor fungiert (Rigato et al., 2002) und dessen Expression im *Emx2*^{-/-} Hippocampus nicht vorhanden ist, vermittelt.

5.2.2 *Aes-Grg5, Hipk2* und die Beteiligung der Notch- und Wnt-Pfade

Die Notch- und Wnt-Pfade haben regelnde Funktionen während der glialen und neuronalen Differenzierung und sind somit wichtige Elemente der hippocampalen Entwicklung. Die Mikroarray-Analyse lieferte u.a. zwei Faktoren, *Aes-Grg5* und *Hipk2*, die im *Emx2*^{-/-} Hippocampus runterreguliert sind und mit diesen Pfaden in Verbindung stehen.

Aes-Grg5 gehört zu einer Familie, die transkriptionelle Co-Repressoren kodiert und durch das Säugetier-Homologon des Drosophila Gens enhancer-of-split (*groucho*) repräsentiert wird (Gasperowicz und Otto, 2005). *Aes-Grg5* interagiert einerseits mit *Six3* und *Six6* und spielt eine Rolle in der Augen-Entwicklung bei Vertebraten (Zhu et al., 2002) und im Körperwachstum (Wang et al., 2002). Weiterhin überträgt *Aes-Grg5* transkriptionelle Repressions-Funktionen auf *Lef/Tcf* und *Hes* Proteine, welche wiederum Mediatoren in den Pfaden von *Wnt* bzw. *Notch* sind (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Fisher und Caudy, 1998; Eastman und Grosschedl, 1999).

Hipk2, welches in Retina, Muskel und neuralen Geweben exprimiert wird (Pierantoni et al., 2002), ist eine als transkriptioneller Co-Repressor von Homöoproteinen fungierende nukleäre Serin/Threonin Kinase (Kim et al., 1998; 1999) (s. auch Anhang Abb. 2).

Der Notch-Pfad

Der gliogene und antineurogene Einfluss von *Notch* wird durch *Hes* Proteine ausgeübt, welche basic helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren sind. In der *Emx2*^{-/-} Mutante treten kleinere Veränderungen der bHLH Gen-Expression im Neuroepithel des Gyrus dentatus auf (diese Arbeit und (Oldekamp et al., 2004)). Die Runterregulierung von *Aes-Grg5* könnte ferner Anormalitäten im neurogenen Potential des *Emx2*-defizienten Neuroepithels widerspiegeln. Zusätzlich ist *GFAP*, ein Marker für radiale Glia und Astrozyten, der downstream im *Notch*-Pfad steht, in der Mutante ebenfalls reduziert (diese Studie und (Oldekamp et al., 2004)).

Der Wnt-Pfad

Einige *Wnt* Gene werden im kortikalen Hem in unmittelbarer Umgebung des sich entwickelnden Hippocampus exprimiert (Grove et al., 1998). Diese *Wnt*-Signalgebung wird für die hippocampale Formation essentiell benötigt (Galceran et al., 2000; Lee et al., 2000; Zhou et al., 2004). *Emx2* ist notwendig, um die *Wnt*-Expression aufrecht zu erhalten (und um dabei die *Wnt1*-Expression im Telenzephalon zu unterdrücken) (Ligon et al., 2003; reviewed in (Shimogori et al., 2004)). Die *Wnt*-Signalgebung wiederum stimuliert die *Emx2*-Transkription in einer positiven Feedback-Schleife (Theil et al., 2002; Muzio et al., 2005). *Hipk2* agiert downstream des *Wnt*-Pfades, um die Balance zwischen Apoptose und Proliferation in einigen Systemen zu kontrollieren (Hofmann et al., 2002; Harada et al., 2003; Kanei-Ishii et al., 2004). Interessanterweise werden *Hipk2* und *groucho* Proteine von einigen

Transkriptions-Repressoren herangezogen, um Co-Repressor-Komplexe zu bilden (Choi et al., 1999). Da *Aes-Grg5* zu den Vertebraten *groucho* Homologen gehört und regional in der hippocampalen Platte und in einem geringeren Ausmaß in der tertiären Matrix des Gyrus dentatus mit *Hipk2* co-lokalisiert ist (Abb. 4A, C), ist es möglich, dass sie funktionell in der hippocampalen Entwicklung kooperieren.

5.2.3 Andere Aspekte der Gehirnentwicklung

Mit Hilfe der Mikroarray-Analyse wurden noch weitere Faktoren gefunden, die im *Emx2*^{-/-} Hippocampus signifikant reduziert waren und in der kortikalen Entwicklung eine Rolle spielen, sich aber nicht den vorhergehenden Aspekten zuordnen lassen und daher im Folgenden diskutiert werden.

Über *Pdlim3-Alp* Expression in Skelett-, Herz- und glatter Muskulatur wurde bereits berichtet, nicht jedoch über dessen Expression im Gehirn. Dieses Gen ist möglicherweise an der Entwicklung beteiligt, da es sehr intensiv und speziell während der Muskeldifferenzierung hochreguliert wird (Pomies et al., 1999). Das verwandte Gen *Pdlim4* wird in hippocampalen Neuronen exprimiert, wo es die wichtige Funktion besitzt, AMPA Rezeptoren an das Aktin Zytoskelett zu binden (Schulz et al., 2004).

Die zerstreute Verteilung der *ApoE*-exprimierenden Zellen lässt vermuten, es könne sich um Astrozyten handeln. Damit übereinstimmend wurde *ApoE*-Expression früher hauptsächlich in Astrozyten gefunden (Oropeza et al., 1987; Poirer et al., 1991; Mouchel et al., 1995; Ong et al., 1997). Im Hippocampus wurde *ApoE* in der CA Region und im Gyrus dentatus, nicht aber in der Körner- oder Pyramidenzellschicht gefunden, was mit der glialen Expression übereinstimmt (Lorent et al., 1995). In Astrozyten übt *ApoE* eine Schlüsselrolle in der Kontrolle von Gehirn-Metabolismus, „Plastizitäts-Phänomen“ und Aussprosseln der Neuriten aus (reviewed in (Gee und Keller, 2005)). Die Funktionen von *ApoE* in der Gehirnentwicklung sind noch nicht geklärt. Es ist jedoch interessant, dass der *ApoE* Rezeptor *ApoE2* (*Lrp8*) ebenfalls als Rezeptor für das extrazelluläre Matrixprotein Reelin fungiert (Hiesberger et al., 1999; Trommsdorff et al., 1999), welches für die hippocampale (Del Rio et al., 1997; Nakajima et al., 1997) und kortikale (D’Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al., 1995) Entwicklung notwendig ist.

App ist essentiell für die Entwicklung, da Mäuse mit einem Defizit an *App* (und an dem funktionell überflüssigen *Aplp2* (amyloid beta Precursor-like Protein 2)) eine hohe postnatale

Sterblichkeit aufweisen, obwohl sie keine offensichtlichen Gehirnveränderungen zeigen (von Koch et al., 1997; Heber et al., 2000). Jedoch ist die exakte Funktion von *App* noch nicht vollkommen geklärt, obwohl es Beweise gibt, die auf verschiedene Rollen bei der Entwicklung hindeuten: Die sekretierte extrazelluläre Domäne von *App* könnte einen Wachstumsfaktor oder neurotrophen Faktor kodieren, der die Produktion und das Überleben der Neurone fördert (Whitson et al., 1989; Ohsawa et al., 1999; Rossjohn et al., 1999) und es könnte die Verlängerung und Verzweigung der Neuriten induzieren (Whitson et al., 1990; Jin et al., 1994). Andere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die abgespaltene intrazelluläre Domäne von *App* ein transkriptioneller Aktivator sein könnte (Cao und Sudhof, 2001, 2004). Schließlich spielt *App* eine Rolle in der Synaptogenese und der synaptischen Funktion der neuromuskulären Verbindung (Wang et al., 2005).

5.2.4 Marker der äußeren Marginalzone

Aus der äußeren Marginalzone (OMZ) des fetalen Hippocampus entwickelt sich das Stratum lacunosum-moleculare. Es hat eine sehr charakteristische Morphologie mit reichlich großen Blutgefäßen, die auf den histologischen Schnitten als „Löcher“ erscheinen und der Region ihren Namen im Adulten verleihen (lacunosum bedeutet „mit Löchern“). Die OMZ umgibt durch den morphogenetischen Prozess der Faltung des Hippocampus die hippocampale Fissur, deren Überrest im Adulten lediglich eine virtuelle Linie ist. Durch diesen Vorgang wird die typische Erscheinung des Hippocampus auf Schnitten erzeugt. Die OMZ hat drei zelluläre Hauptkomponenten: 1) Neurone, 2) Astrozyten-Gerüst und 3) Blutgefäße (Rickmann et al., 1987; Sievers et al., 1992). Bemerkenswerterweise scheint eine Gruppe von OMZ Markern für diese drei Komponenten in der Mutante sehr reduziert oder nicht vorhanden zu sein, was auf eine Veränderung in der OMZ hindeutet und ihrer abnormen Erscheinung auf Nissl-gefärbten Schnitten entspricht (Oldekamp et al., 2004). In den nächsten Abschnitten werden diese Marker Gene diskutiert, was hilfreich sein wird, um die morphogenetischen Prozesse des Hippocampus und ihre Regulierung zu verstehen.

Endothel-spezifische Gene fehlen in der *Emx2*^{-/-} OMZ

Die Mikroarray Analyse lieferte einige endotheliale Gene, deren Expression in der *Emx2*^{-/-} Mutante signifikant reduziert war. Diese Ergebnisse konnten durch In Situ Hybridisierungen bestätigt werden, die interessanterweise zeigten, dass in der Mutante alle untersuchten

Faktoren zwar in der OMZ gänzlich fehlten, in der angrenzenden Pia jedoch unverändert exprimiert wurden.

Glia-Marker in der OMZ

Wesentlich beim Phänotyp der *Emx2*^{-/-} Mutante ist ein Defekt in der Migration der Vorläuferzellen des Gyrus dentatus, die folglich nicht in der Lage sind, die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus zu bilden (Pellegrini et al., 1996; Yoshida et al., 1997; Tole et al., 2000). Diese Migration findet entlang von Fortsätzen der radialen Glia statt, die *Tnc* (*Tenascin C*) und *Gfap* exprimieren, zwei Gene, deren Expression im Mutanten Hippocampus reduziert ist (diese Arbeit und (Oldekamp et al., 2004), was wiederum durch die Mikroarray Analyse bestätigt wurde. Für die Ausreifung der Fortsätze der radialen Glia wird reelin benötigt, welches von Cajal-Retzius Zellen der äußeren Marginalzone sekretiert wird (Forster et al., 2002), die wiederum in der Mutante verändert sein könnten (s.o.). Der morphogenetische Prozess der Faltung des Hippocampus, der in der *Emx2*^{-/-} Mutante fehlt, könnte ebenfalls von der Unversehrtheit des *Gfap*-exprimierenden Glia-Gerüsts abhängig sein (Eckenhoff und Rakic, 1984; Rickmann et al., 1987; Sievers et al., 1992).

Über die hormonelle Kontrolle bzw. die Bedeutung der Deiodinase Typ 2 im Zusammenhang mit der Entwicklung des Gyrus dentatus ist bisher wenig bekannt. Obwohl *Dio2* bereits in einigen Neuronen während der frühen Entwicklung nachgewiesen worden ist (Gereben et al., 2004), scheint es hauptsächlich von Astrozyten und Tanizyten exprimiert zu werden (Guadano-Ferraz et al., 1997) und könnte folglich ein Marker der sich teilenden Astrozyten sein, die die sich entwickelnde hippocampale Fissur säumen (Sievers et al., 1992). Es wird in der frühen Differenzierung der Neurosphen runterreguliert (Gurok et al., 2004). Die gegenwärtigen Befunde erlauben jedoch keine endgültige Identifikation der Zellen, die dieses Gen im Gyrus dentatus der fetalen Maus exprimieren. Co-Lokalisations-Untersuchungen mit GFAP (Astrozytenmarker) und mit reelin (Cajal-Retzius Zellmarker) werden notwendig sein, um diese Frage zu klären.

Endotheliale und Cajal-Retzius Marker Gene – die Angiogenese Verbindung?

Zum Teil ist das Versagen der *Emx2*^{-/-} Mutante, den Hippocampus zu falten, sicherlich mit dem fehlenden Wachstum der CA Region und der fehlenden Migration der neuronalen und glialen Vorläuferzellen des Gyrus dentatus zu begründen. Die fehlende Vaskularisierung der äußeren Marginalzone kann jedoch nicht durch diese Mechanismen erklärt werden. Mäuse,

die eine Nullmutation des Transkriptionsfaktor Gens *p73* (*Trp73*) tragen, zeigen ebenfalls ein Fehlen von hippocampalen Cajal-Retzius Zellen und die Unfähigkeit, eine hippocampale Fissur zu bilden (Meyer et al., 2004). Interessanterweise werden viele dieser OMZ Marker Gene ebenfalls in der angrenzenden Pia exprimiert (*Cldn5*, *Dcn*, *Eng* und *Cxcl12*). Ähnliche Fälle sind veröffentlicht worden: Der BMP-Antagonist Dan wird in der Pia, sein Ligand GDF-5 von Cajal-Retzius Zellen exprimiert (Kim und Pleasure, 2003). Der Einfluss der Pia auf die Entwicklung von Cajal-Retzius Zellen (Super et al., 1997) und Gyrus dentatus (Hartmann et al., 1992) ist bekannt. Die vorliegenden Daten weisen auf einen möglichen Einfluss der Cajal-Retzius Zellen auf die Angiogenese hin, vielleicht durch Sekretion eines angiogenetischen Faktors, der aussprossende Blutgefäße (oder wandernde endotheliale Vorläufer) von der Pia anzieht. Dem entsprechend weist die Datenanalyse mit Hilfe der Ingenuity Pathways Knowledge Base Software auf eine Anzahl interessanter Pfade hin, die die Blutgefäßbildung mit einigen der Kandidatengene verbinden (siehe auch Anhang Abb. 2). Die offensichtlichsten Kandidaten, Chemokin *Cxcl12* (SDF-1) und sein Rezeptor *Cxcr4*, beide in der äußeren Marginalzone nachgewiesen und beide bestätigte Cajal-Retzius Zell-Marker (Yamazaki et al., 2004), sind notwendig für die Angiogenese (Salcedo und Oppenheim, 2003). Zusätzlich könnte der BMP-Pfad involviert sein. Bone morphogenetic Proteine (BMPs) sind Mitglieder der TGF-beta Superfamilie der Zytokine, die eine entscheidende Rolle während der Säugetier-Entwicklung spielen (reviewed in (Heldin et al., 1997). *Emx2* agiert zumindest zum Teil durch die Aktivierung der BMP Signalgebung (reviewed in (Shimogori et al., 2004), für die *Smad1* (ebenso *Smad5* und *Smad8*) als intrazellulärer Mediator fungiert. Die OMZ exprimiert intensiv *Smad1*. Die BMP Signalgebung durch *Smad1* ist wiederum notwendig für die Entwicklung der Blutgefäße (Goumans und Mummery, 2000; Lebrin et al., 2005).

Schließlich wird die TGF-beta Signalgebung für die erste Stufe der Gefäßentwicklung, die Vasculogenese benötigt, bei der das erste kapillare Netzwerk bestehend aus untereinander verbundenen endothelialen Röhren einheitlicher Größe gebildet wird (Dickson et al., 1995). Die Transkription von *Smad1*, *Cxcr4* und *Cldn5* wird durch TGF-beta Signalisierung während der Blutgefäßbildung reguliert (Ota et al., 2002). Die TGF-beta Signalwirkung inhibiert die Expression von *Cldn5*, das eine Endothel-spezifische Komponente der Tight junctions kodiert (Ota et al., 2002; Watabe et al., 2003).

Endoglin (CD105), ein zusätzlicher TGF-beta Rezeptor, ist ein auf allen endothelialen Zelltypen exprimiertes Transmembran-Glykoprotein (Gougos und Letarte, 1990; Lebrin et al.,

2004) und notwendig für die Angiogenese (Li et al., 1999). Zusätzlich kann das Proteoglykan Decorin (Dcn), das eine Rolle in der Regulation der Angiogenese spielt (Davies Cde et al., 2001; Grant et al., 2002; Sulochana et al., 2005), TGF-beta (induziert selbst die Decorin Synthese) binden und inhibieren (Yamaguchi et al., 1990).

5.2.5 Weiterführende Experimente

Mit Hilfe der Mikroarray-Analyse konnten einige Gene identifiziert und mit *Emx2* in Verbindung gebracht werden, deren Zusammenhang mit letzterem bisher zumindest teilweise noch nicht bekannt war. Eine weiterführende Auswertung dieser Daten sowie die Bestätigung der daraus resultierenden Ergebnisse durch In Situ Hybridisierungen und/oder immunhistochemische Nachweise werden es ermöglichen, noch weitere Faktoren dieses komplexen Netzwerkes aufzudecken.

Schließlich könnten Transfektionsexperimente in der organotypischen Schnittkultur oder in Utero hilfreich sein, um die beteiligten Gene in einer Hierarchie (Aktivierungskaskade) anzuordnen und deren Funktionen in Rescue- bzw. Ausschaltungsexperimenten zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Der Gyrus dentatus bietet ein gutes Modell zur Untersuchung diverser, die Kortextentwicklung betreffender Fragestellungen, insbesondere solche bezüglich Neurogenese, neuronaler Migration, Arealisierung, axonaler Wegfindung und neuronaler Plastizität. Weiterhin besitzt er die außergewöhnliche Fähigkeit, lebenslang funktionelle Neurone aus neuronalen Vorläuferzellen zu bilden, was ihn zu einem attraktiven Forschungsobjekt für mögliche neuronale Regenerationsprozesse im Kortex macht. Das Ziel dieser Arbeit war, molekulare Faktoren der Gyrus dentatus Entwicklung zu identifizieren und ihre Funktionen zu analysieren. Gegenstand der Experimente war ein Vergleich der Expressionsmuster von *Emx2*^{-/-} Mutante gegen Wildtyp Maus, da der Transkriptionsfaktor *Emx2* als Schlüssel-Regulator der hippocampalen Entwicklung fungiert und sein Fehlen eine sehr spezifische Veränderung dieser verursacht, was unter anderem zur Folge hat, dass ein morphologisch erkennbarer Gyrus dentatus in dieser Mutante nicht vorhanden ist.

Es wurden bekannte Gene, deren Funktionen in der Literatur bereits umfangreich beschrieben worden sind, mit Hilfe von In Situ Hybridisierungen im Entwicklungsverlauf untersucht. Von besonderem Interesse war hierbei die Analyse der verschiedenen Funktionskreise wie Proliferation, Differenzierung und Migration sowie der strukturellen Veränderungen des Gyrus dentatus und der an diesen angrenzenden Strukturen (hippocampale Fissur und Marginalzonen). Zudem wurden Kandidatengene, die bisher nicht mit *Emx2* in Zusammenhang gebracht worden sind, durch Screening von Mikroarrays ermittelt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die proneurale Kaskade der bHLH Gene im *Emx2*^{-/-} Mutanten Gyrus dentatus zwar vorhanden, aber abnorm auf die germinative Zone beschränkt ist, migrierende Vorläufer der Neurone und der Glia fast völlig fehlen, das Gerüst der radialen Glia defekt ist und die geringe Anzahl der Astrozyten und Körnerzellen, die produziert werden, nicht fähig sind, bis zu ihrem eigentlichen Ziel zu wandern. Zudem erfolgt keine vollständige Ausdifferenzierung der Körnerzellen.

Auch im Bereich der sich entwickelnden Fissur fehlt bei der *Emx2*^{-/-} Mutante das Gerüst der radialen Glia, die innere Marginalzone (IMZ) scheint normal entwickelt zu sein, die äußere Marginalzone (OMZ) und die Marginalzone des Gyrus dentatus (DMZ) hingegen sind atrophisch. Die Reln-exprimierenden Zellen dieser Zonen fehlen, mit Ausnahme einer spezifischen Subpopulation, die mit Hilfe zusätzlicher Marker charakterisiert wurde, vermutlich aus dem „Hem“ stammt und *Emx2* offensichtlich nicht benötigt.

Die Mikroarray Analyse lieferte eine Gruppe von Genen, deren Expression im *Emx2*^{-/-} Hippocampus reduziert ist und die zum großen Teil bisher noch nicht mit *Emx2* in Verbindung gebracht wurden. Einige der Kandidaten sind Gene der Gehirnentwicklung oder solche, die an der funktionellen Reifung beteiligt sind und werden in der hippocampalen Platte und/oder dem sich entwickelnden Gyrus dentatus exprimiert. Eine zweite Gruppe von Kandidaten markiert neuronale, gliale oder vaskuläre Strukturen in der OMZ und repräsentiert wahrscheinlich Marker für Zellpopulationen, die in der *Emx2*^{-/-} Mutante spezifisch fehlen. Die Abwesenheit dieser Gene in der *Emx2*^{-/-} Mutante weist auf Veränderungen in verschiedenen Pfaden und Prozessen hin, insbesondere im Notch- und Chemokin-Pfad, in Prozessen der Zellmigration, der axonalen Wegfindung und der Angiogenese; zudem wird ein Zusammenhang zwischen der hippocampalen Morphogenese und der Pia sowie der Cajal-Retzius Zellen aufgezeigt.

Developmental molecular factors of the dentate gyrus in mice

7 Summary

The dentate gyrus provides a good model for diverse areas of research concerning the cortical development, especially neurogenesis, neuronal migration, regionalization, axonal guidance and neuronal plasticity. Furthermore, the dentate gyrus has the special ability to produce functional neurons out of neuronal precursors the whole life long. Therefore it is an interesting object of research for potential neuronal processes of regeneration in the cortex. The aim of this study was to identify molecular factors of dentate gyrus development and to analyse their functions. The subject of the experiments was a comparison of expression patterns from *Emx2*^{-/-} mutant versus wildtype mouse, because the transcription factor *Emx2* plays a key role in hippocampal development. Thus, mice deficient in this factor show very specific developmental alterations in the hippocampus, which leads to the absence of a morphologically visible dentate gyrus in these *Emx2*^{-/-} mutants.

First some known genes, whose functions had already been described in literature extensively, were analysed during development by in situ hybridisation. Thereby investigating the different functional circuits like proliferation, differentiation and migration as well as the structural alterations of the dentate gyrus and the adjacent hippocampal fissure and marginal zone were of particular interest. Furthermore some candidate genes, for which a putative relation to *Emx2* had not been described previously, were identified by screening microarrays. The results show that, in the *Emx2*^{-/-} mutant dentate gyrus, the proneural cascade of bHLH genes is present, but abnormally confined to the germinal layer, the neuronal and glial migrating precursors are nearly absent, the glial scaffold is defective, the few produced astrocytes and granule cells are not able to migrate to their proper destination and in addition the granule cells are deficiently differentiated.

The glial scaffolding is also lacking in the *Emx2*^{-/-} mutant developing hippocampal fissure. The inner marginal zone (IMZ) seems to be developed properly, in contrast the outer marginal zone (OMZ) as well as the dentate marginal zone (DMZ) is atrophic. Most of the *Reln*-expressing cells that should occupy the OMZ and DMZ are missing, except a specific subpopulation, characterized by using additional markers, probably born in the hem and for which *Emx2* is not essentially required.

The microarray analysis reveals a group of genes whose expression is reduced in the *Emx2*^{-/-} hippocampus. For most of them a putative relation to *Emx2* pathways had not been recognized previously. Some candidates are development genes or are involved in functional maturation and show expression in the hippocampal plate and/or developing dentate gyrus. A second group of candidates labels neuronal, glial or vascular structures in the OMZ and likely represent markers for cell populations specifically absent in the mutant. The lack of these genes points at different pathways and processes altered in the *Emx2*^{-/-} mutant, particularly the *Notch* and chemokine pathways, the processes of cell migration, axonal guidance and angiogenesis, also a relation of hippocampal morphogenesis with pia and Cajal-Retzius cells is shown.

8 Literaturverzeichnis

- Abraham H., Meyer G. (2003) Reelin-expressing neurons in the postnatal and adult human hippocampal formation. *Hippocampus* 13:715–727.
- Abraham H., Perez-Garcia C.G., Meyer G. (2004) p73 and reelin in Cajal-Retzius cells of the developing human hippocampal formation. *Cereb. Cortex* 14:484–495.
- Adams J.C. (1992) Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J. Histochem. Cytochem.* 40:1457–1463.
- Alcantara S., Pozas E., Ibanez C.F., Soriano E. (2006) BDNF-modulated spatial organization of Cajal-Retzius and GABAergic neurons in the marginal zone plays a role in the development of cortical organization. *Cereb. Cortex* 16:487–499.
- Alcantara S., Ruiz M., D’Arcangelo G., Ezan F., de Lecea L., Curran T., Sotelo C., Soriano E. (1998) Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J. Neurosci.* 18:7779–7799.
- Allen T., Lobe C.G. (1999) A comparison of Notch, Hes and Grg expression during murine embryonic and post-natal development. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 45:687-708.
- Altman J., Bayer S.A. (1990a) Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J. Comp. Neurol.* 301:325–342.
- Altman J., Bayer S.A. (1990b) Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.* 301:365–381.
- Altman J, Das G.D. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124:319–335.
- Amaral D.G., Witter M.P. (1995) Hippocampal formation. In Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*, 2nd Edn. Academic Press, San Diego 443–493.
- Angevine J.B. Jr. (1965) Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse. *Exp. Neurol. Suppl.* 2:1-70.
- Angley C., Kumar M., Dinsio K.J., Hall A.K., Siegel R.E. (2003) Signaling by bone morphogenetic proteins and Smad1 modulates the postnatal differentiation of cerebellar cells. *J. Neurosci.* 23:260–268.
- Artavanis-Tsakonas S., Matsuno K., Fortini M.E. (1995) Notch signaling. *Science* 268:225-232.
- Bagri A., Cheng H.J., Yaron A., Pleasure S.J., Tessier-Lavigne M. (2003) Stereotyped pruning of long hippocampal axon branches triggered by retraction inducers of the semaphoring family. *Cell.* 113:285-299.

- Bagri A., Gurney T., He X., Zou Y.R., Littman D.R., Tessier-Lavigne M., Pleasure S.J. (2002) The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. *Development* 129:4249–4260.
- Bagri A, Tessier-Lavigne M (2002) Neuropilins as Semaphorin receptors: in vivo functions in neuronal cell migration and axon guidance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515:13-31.
- Bartsch S., Bartsch U., Dorries U., Faissner A., Weller A., Ekblom P., Schachner M. (1992a) Expression of tenascin in the developing and adult cerebellar cortex. *J. Neurosci.* 12:736–749.
- Bartsch U., Bartsch S., Dorries U., Schachner M. (1992b) Immunohistological localization of tenascin in the developing and lesioned adult mouse optic nerve. *Eur. J. Neurosci.* 4:338–352.
- Bendotti C., Forloni G.L., Morgan R.A., O'Hara B.F., Oster-Granite M.L., Reeves R.H., Gearhart J.D., Coyle J.T. (1988) Neuroanatomical localization and quantification of amyloid precursor protein mRNA by in situ hybridization in the brains of normal, aneuploid, and lesioned mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:3628-3632.
- Benezra R., Davis R.L., Lockshon D., Turner D.L., Weintraub H. (1990) The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell.* 61:49–59.
- Berrebi A.S., Oberdick J., Sangameswaran L., Christakos S., Morgan J.I., Mugnaini E. (1991) Cerebellar Purkinje cell markers are expressed in retinal bipolar neurons. *J. Comp. Neurol.* 308:630-649.
- Bertrand N., Castro D.S., Guillemot F. (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* 3:517–530.
- Bertuzzi S., Sheng H.Z., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Taira M., Dawid I.B., Westphal H. (1996) Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the mouse LIM/homeobox gene *Lhx5*. *Genomics* 36:234–239.
- Bishop K.M., Goudreau G., O'Leary D.D. (2000) Regulation of area identity in the mammalian neocortex by *Emx2* and *Pax6*. *Science* 288:344– 349.
- Bishop K.M., Rubenstein J.L., O'Leary D.D. (2002) Distinct actions of *Emx1*, *Emx2*, and *Pax6* in regulating the specification of areas in the developing neocortex. *J. Neurosci.* 22:7627–7638.
- Bretin S., Reibel S., Charrier E., Maus-Moatti M., Auvergnon N., Thevenoux A., Glowinski J., Rogemond V., Premont J., Honnorat J., Gauchy C. (2005) Differential expression of CRMP1, CRMP2A, CRMP2B, and CRMP5 in axons or dendrites of distinct neurons in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 486:1-17.
- Bruckner G., Grosche J., Hartlage-Rubsamen M., Schmidt S., Schachner M. (2003) Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. *J. Chem. Neuroanat.* 26:37-50.

- Brunelli S., Faiella A., Capra V., Nigro V., Simeone A., Cama A., Boncinelli E. (1996). Germline mutation in the homeobox gene EMX2 in patients with severe schizencephaly. *Nature Genet.* 12:94-96.
- Cai L., Morrow E.M., Cepko C.L. (2000) Misexpression of basic helix–loop–helix genes in the murine cerebral cortex affects cell fate choices and neuronal survival. *Development* 127:3021–3030.
- Camus A., Mesbah K., Rallu M., Babinet C., Barra J. (2001) Gene trap insertion reveals two open reading frames in the mouse SSeCKS gene: the form predominantly detected in the nervous system is suppressed by the insertion while the other, specific of the testis, remains expressed. *Mech. Dev.* 105:79-91.
- Cao X., Sudhof T.C. (2001) A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293:115-120.
- Cao X., Sudhof T.C. (2004) Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J. Biol. Chem.* 279:24601-24611.
- Cau E., Gradwohl G., Casarosa S., Kageyama R., Guillemot F. (2000) Hes genes regulate sequential stages of neurogenesis in the olfactory epithelium. *Development* 127:2323–2332.
- Cau E., Gradwohl G., Fode C., Guillemot F. (1997) Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development* 124:1611–1621.
- Caviness V.S. Jr. (1973) Time of neuron origin in the hippocampus and dentate gyrus of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *J. Comp. Neurol.* 151:113–120.
- Cecchi C. (2002) Emx2: a gene responsible for cortical development, regionalization and area specification. *Gene* 291:1–9.
- Cecchi C., Boncinelli E. (2000) Emx homeogenes and mouse brain development. *Trends Neurosci.* 23:347-352.
- Chae T., Kwon Y.T., Bronson R., Dikkes P., Li E., Tsai L.H. (1997) Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* 18(1):29-42.
- Chedotal A., Del Rio J.A., Ruiz M., He Z., Borrell V., de Castro F., Ezan F., Goodman C.S., Tessier-Lavigne M., Sotelo C., Soriano E. (1998) Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors. *Development* 125:4313-4323.
- Chen H., Bagri A., Zupicich J.A., Zou Y., Stoeckli E., Pleasure S.J., Lowenstein D.H., Skarnes W.C., Chedotal A., Tessier-Lavigne M. (2000) Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron* 25:43-56.
- Chen S.L., Orr H.T. (1990) Sequence of a murine cDNA, pcp-4, that encodes the homolog of the rat brain-specific antigen PEP-19. *Nucleic Acids Res.* 18:1304.

Cheng H.J., Bagri A., Yaron A., Stein E., Pleasure S.J., Tessier-Lavigne M. (2001) Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron* 32:249-263.

Chiquet M. und Fambrough D.M. (1984) Chick myotendinous antigen. II., A novel extracellular glycoprotein complex consisting of large disulfide-linked subunits. *J. Cell Biol.* 98:1937–1946.

Chiquet-Ehrismann R., Mackie E.J., Pearson C.A., Sakakura T. (1986) Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell.* 47:131–139.

Choi C.Y., Kim Y.H., Kwon H.J., Kim Y. (1999) The homeodomain protein NK-3 recruits Groucho and a histone deacetylase complex to repress transcription. *J. Biol. Chem.* 274:33194-33197.

Coulin C., Drakew A., Frotscher M., Deller T. (2001) Stereological estimates of total neuron numbers in the hippocampus of adult reeler mutant mice: evidence for an increased survival of Cajal-Retzius cells. *J. Comp. Neurol.* 439:19–31.

D'Arcangelo G., Miao G.G., Chen S.C., Soares H.D., Morgan J.I., Curran T. (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374:719-723.

Davies Cde L., Melder R.J., Munn L.L., Mouta-Carreira C., Jain R.K., Boucher Y. (2001) Decorin inhibits endothelial migration and tube-like structure formation: role of thrombospondin-1. *Microvasc. Res.* 62:26-42.

Del Rio J.A., Heimrich B., Borrell V., Forster E., Drakew A., Alcantara S., Nakajima K., Miyata T., Ogawa M., Mikoshiba K., Derer P., Frotscher M., Soriano E. (1997) A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* 385:70–74.

Del Rio J.A., Heimrich B., Super H., Borrell V., Frotscher M., Soriano E. (1996) Differential survival of Cajal-Retzius cells in organotypic cultures of hippocampus and neocortex. *J. Neurosci.* 16:6896–6907.

Derer P., Derer M. (1990) Cajal-Retzius cell ontogenesis and death in mouse brain visualized with horseradish peroxidase and electron microscopy. *Neuroscience* 36:839–856.

Dickson M.C., Martin J.S., Cousins F.M., Kulkarni A.B., Karlsson S., Akhurst R.J. (1995) Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 121:1845-1854.

Drakew A., Deller T., Heimrich B., Gebhardt C., Del Turco D., Tielsch A., Forster E., Herz J., Frotscher M. (2002) Dentate granule cells in reeler mutants and VLDLR and ApoER2 knockout mice. *Exp. Neurol.* 176(1):12-24.

Drakew A., Frotscher M., Deller T., Ogawa M., Heimrich B. (1998) Developmental distribution of a reeler gene-related antigen in the rat hippocampal formation visualized by CR-50 immunocytochemistry. *Neuroscience* 82:1079–1086.

Eastman Q., Grosschedl R. (1999) Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:233-240.

Eckenhoff M.F., Rakic P. (1984) Radial organization of the hippocampal dentate gyrus: a Golgi, ultrastructural, and immunocytochemical analysis in the developing rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 223:1-21.

Eckenhoff M.F., Rakic P. (1988) Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkey. *J. Neurosci.* 8:2729–2747.

Elliott R.C., Khademi S., Pleasure S.J., Parent J.M., Lowenstein D.H. (2001) Differential regulation of basic helix–loop–helix mRNAs in the dentate gyrus following status epilepticus. *Neuroscience* 106:79–88.

Ellis H.M., Spann D.R., Posakony J.W. (1990) Extramacrochaetae, a negative regulator of sensory organ development in *Drosophila*, defines a new class of helix-loop-helix proteins. *Cell.* 61:27–38.

Faiella A., Brunelli S., Granata T., D’Incerti L., Cardini R., Lenti C., Battaglia G., Boncinelli E. (1997). A number of schizencephalic patients including 2 brothers are heterozygous for germline mutations in the homeobox gene EMX2. *Europ. J. Human Genet* 5:186-190.

Ferrer I., Bernet E., Soriano E., del Rio T., Fonseca M. (1990) Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neuroscience* 39:451–458.

Fisher A.L., Caudy M. (1998) Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Genes Dev.* 12:1931-1940.

Forster E., Tielsch A., Saum B., Weiss K.H., Johanssen C., Graus-Porta D., Muller U., Frotscher M. (2002) Reelin, Disabled 1, and beta 1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:13178-13183.

Fukuchi-Shimogori T., Grove E.A. (2001) Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8. *Science* 294:1071–1074.

Fukuchi-Shimogori T., Grove E.A. (2003) Emx2 patterns the neocortex by regulating FGF positional signaling. *Nat. Neurosci.* 6:825–831.

Furuta Y., Piston D.W., Hogan B.L. (1997). Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development* 124:2203-12.

- Galceran J., Miyashita-Lin E.M., Devaney E., Rubenstein J.L., Grosschedl R. (2000) Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development* 127:469-482.
- Galli R., Fiocco R., De Filippis L., Muzio L., Gritti A., Mercurio S., Broccoli V., Pellegrini M., Mallamaci A., Vescovi A.L. (2002) *Emx2* regulates the proliferation of stem cells of the adult mammalian central nervous system. *Development* 129:1633–1644.
- Gangemi R.M., Daga A., Marubbi D., Rosatto N., Capra M.C., Corte G. (2001) *Emx2* in adult neural precursor cells. *Mech. Dev.* 109:323–329.
- Garrell J., Modolell J. (1990) The *Drosophila* extramacrochaetae locus, an antagonist of proneural genes that, like these genes, encodes a helix-loop-helix protein. *Cell*. 61:39–48.
- Gasperowicz M., Otto F. (2005) Mammalian Groucho homologs: redundancy or specificity? *J Cell Biochem.* 95:670-687.
- Ge A.Z., Butcher E.C. (1994) Cloning and expression of a cDNA encoding mouse endoglin, an endothelial cell TGF-beta ligand. *Gene* 138:201-206.
- Gee J.R., Keller J.N. (2005) Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37:1145-1150.
- Gelman I.H., Tombler E., Vargas J. Jr. (2000) A role for SSeCKS, a major protein kinase C substrate with tumour suppressor activity, in cytoskeletal architecture, formation of migratory processes, and cell migration during embryogenesis. *Histochem. J.* 32:13-26.
- Gereben B., Pachucki J., Kollar A., Liposits Z., Fekete C. (2004) Ontogenic redistribution of type 2 deiodinase messenger ribonucleic acid in the brain of chicken. *Endocrinology* 145:3619-3625.
- Glezer I.I., Hof P.R., Morgane P.J. (1992) Calretinin-immunoreactive neurons in the primary visual cortex of dolphin and human brains. *Brain Res.* 595:181–188.
- Gould E., Woolley C.S., McEwen B.S. (1991) Naturally occurring cell death in the developing dentate gyrus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 304:408–418.
- Gougos A., Letarte M. (1990) Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 265:8361-8364.
- Goumans M.J., Lebrin F., Valdimarsdottir G. (2003) Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF-b receptor signalling pathways. *Trends Cardiovasc. Med.* 13:301–307.
- Goumans M.J., Mummery C. (2000) Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int. J. Dev. Biol.* 44:253-265.
- Grant D.S., Yenisey C., Rose R.W., Tootell M., Santra M., Iozzo R.V. (2002) Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis. *Oncogene* 21:4765-4777.

Grigoriou M., Tucker A.S., Sharpe P.T., Pachnis V. (1998) Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development* 125:2063–2074.

Grove E.A., Fukuchi-Shimogori T. (2003) Generating the cerebral cortical area map. *Annu. Rev. Neurosci.* 26:355-380

Grove E.A., Tole S. (1999) Patterning events and specification signals in the developing hippocampus. *Cereb. Cortex* 9:551-561.

Grove E.A., Tole S., Limon J., Yip L., Ragsdale C.W. (1998) The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3- deficient mice. *Development* 125:2315-2325.

Guadano-Ferraz A., Obregon M.J., St Germain D.L., Bernal J. (1997) The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:10391-10396.

Gulisano M., Broccoli V., Pardini C., Boncinelli E. (1996) Emx1 and Emx2 show different patterns of expression during proliferation and differentiation of the developing cerebral cortex in the mouse. *Eur. J. Neurosci.* 8:1037–1050.

Gurok U., Steinhoff C., Lipkowitz B., Ropers H.H., Scharff C., Nuber U.A. (2004) Gene expression changes in the course of neural progenitor cell differentiation. *J. Neurosci.* 24:5982-6002.

Hamasaki T., Leingartner A., Ringstedt T., O'Leary D.D. (2004) EMX2 regulates sizes and positioning of the primary sensory and motor areas in neocortex by direct specification of cortical progenitors. *Neuron* 43:359-372.

Hamburgh M. (1963) Analysis of the postnatal developmental effects of 'Reeler', a neurological mutation in mice. A study in developmental genetics. *Dev. Biol.* 19:165–185.

Hanemann C.O., Kuhn G., Lie A., Gillen C., Bosse F., Spreyer P., Muller H.W. (1993) Expression of decorin mRNA in the nervous system of rat. *J. Histochem. Cytochem.* 41:1383-1391.

Harada J., Kokura K., Kanei-Ishii C., Nomura T., Khan M.M., Kim Y., Ishii S. (2003) Requirement of the co-repressor homeodomain-interacting protein kinase 2 for skimediated inhibition of bone morphogenetic protein-induced transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 278:38998-39005.

Hartmann D., Sievers J., Pehlemann F.W., Berry M. (1992) Destruction of meningeal cells over the medial cerebral hemisphere of newborn hamsters prevents the formation of the infrapyramidal blade of the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 320:33-61.

Hartfuss E., Forster E., Bock H.H., Hack M.A., LePrince P., Luque J.M., Herz J., Frotscher M., Gotz M. (2003) Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. *Development* 130:4597–4609.

Hatten M.E. (2002) New directions in neuronal migration. *Science* 297:1660-1663.

Heber S., Herms J., Gajic V., Hainfellner J., Aguzzi A., Rulicke T., von Kretschmar H., von Koch C., Sisodia S., Tremml P., Lipp H.P., Wolfer D.P., Muller U. (2000) Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J. Neurosci.* 20:7951-7963.

Heck N., Garwood J., Loeffler J.P., Larnet Y., Faissner A. (2004) Differential upregulation of extracellular matrix molecules associated with the appearance of granule cell dispersion and mossy fiber sprouting during epileptogenesis in a murine model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 129:309-324.

Heins N., Cremisi F., Malatesta P., Gangemi R.M., Corte G., Price J., Goudreau G., Gruss P., Gotz M. (2001) *Emx2* promotes symmetric cell divisions and a multipotential fate in precursors from the cerebral cortex. *Mol. Cell Neurosci.* 18:485–502.

Heldin C.H., Miyazono K., ten Dijke P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-471.

Herzig U., Cadenas C., Sieckmann F., Sierralta W., Thaller C., Visel A., Eichele G. (2001) Development of high-throughput tools to unravel the complexity of gene expression patterns in the mammalian brain. *Novartis Found. Symp.* 239:129–146; Discussion 146–159.

Hevner R.F., Neogi T., Englund C., Daza R.A., Fink A. (2003) Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 141:39–53.

Hiesberger T., Trommsdorff M., Howell B.W., Goffinet A., Mumby M.C., Cooper J.A., Herz J. (1999) Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 24:481-489.

Hill R.E., Favor J., Hogan B.L., Ton C.C., Saunders G.F., Hanson I.M., Prosser J., Jordan T., Hastie N.D., van Heyningen V. (1991) Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354:522–525.

Hirotsune S., Fleck M.W., Gambello M.J., Bix G.J., Chen A., Clark G.D., Ledbetter D.H., McBain C.J., Wynshaw-Boris A. (1998) Graded reduction of *Pafah1b1* (*Lis1*) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat. Genet.* 19(4):333-9.

Hobert O., Westphal H. (2000) Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet.* 16:75–83.

Hockfield S., McKay R.D. (1985) Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.* 5:3310–3328.

Hofmann T.G., Moller A., Sirma H., Zentgraf H., Taya Y., Droge W., Will H., Schmitz M.L. (2002) Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat. Cell Biol.* 4:1-10.

Jin L.W., Ninomiya H., Roch J.M., Schubert D., Masliah E., Otero D.A., Saitoh T. (1994) Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. *J. Neurosci.* 14:5461-5470.

Johanson R.A., Sarau H.M., Foley J.J., Slemmon J.R. (2000) Calmodulin-binding peptide PEP-19 modulates activation of calmodulin kinase II In situ. *J. Neurosci.* 20:2860-2866.

Kallmann B.A., Wagner S., Hummel V., Buttman M., Bayas A., Tonn J.C., Rieckmann P. (2002) Characteristic gene expression profile of primary human cerebral endothelial cells. *Faseb. J.* 16:589-591.

Kanei-Ishii C., Ninomiya-Tsuji J., Tanikawa J., Nomura T., Ishitani T., Kishida S., Kokura K., Kurahashi T., Ichikawa-Iwata E., Kim Y., Matsumoto K., Ishii S. (2004) Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. *Genes Dev.* 18:816-829.

Kappler J., Stichel C.C., Gleichmann M., Gillen C., Junghans U., Kresse H., Muller H.W. (1998) Developmental regulation of decorin expression in postnatal rat brain. *Brain Res.* 793:328-332.

Kempermann G., Brandon E.P., Gage F.H. (1998) Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr. Biol.* 8:939-942.

Kim A.S., Pleasure S.J. (2003) Expression of the BMP antagonist Dan during murine forebrain development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 145:159-162.

Kim Y.H., Choi C.Y., Kim Y. (1999) Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:12350-12355.

Kim Y.H., Choi C.Y., Lee S.J., Conti M.A., Kim Y. (1998) Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273:25875-25879.

Krusius T., Ruoslahti E. (1986) Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:7683-7687.

Kurazono S., Okamoto M., Sakiyama J., Mori S., Nakata Y., Fukuoka J., Amano S., Oohira A., Matsui H. (2001) Expression of brain specific chondroitin sulfate proteoglycans, neurocan and phosphacan, in the developing and adult hippocampus of Ihara's epileptic rats. *Brain Res.* 898:36-48.

Lapidot T., Kollet O. (2002) The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immunodeficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia* 16:1992-2003.

Laurie D.J., Wisden W., Seeburg P.H. (1992) The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J. Neurosci.* 12:4151-4172.

Lavdas A.A., Grigoriou M., Pachnis V., Parnavelas J.G. (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 19:7881-7888.

Lazarini F., Tham T.N., Casanova P., Arenzana-Seisdedos F., Dubois-Dalcq M. (2003) Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia* 42:139-148.

Lebrin F., Deckers M., Bertolino P., Ten Dijke P. (2005) TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc. Res.* 65:599-608.

Lebrin F., Goumans M.J., Jonker L., Carvalho R.L., Valdimarsdottir G., Thorikay M., Mummery C., Arthur H.M., ten Dijke P. (2004) Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 23:4018-4028.

Lee J.E. (1997) Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7:13-20.

Lee S.M., Tole S., Grove E., McMahon A.P. (2000) A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development* 127:457-467.

Li D.Y., Sorensen L.K., Brooke B.S., Urness L.D., Davis E.C., Taylor D.G., Boak B.B., Wendel D.P. (1999) Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284:1534-1537.

Ligon K.L., Echelard Y., Assimacopoulos S., Danielian P.S., Kaing S., Grove E.A., McMahon A.P., Rowitch D.H. (2003) Loss of *Emx2* function leads to ectopic expression of *Wnt1* in the developing telencephalon and cortical dysplasia. *Development* 130:2275-2287.

Lindsell C.E., Boulter J., diSibio G., Gossler A., Weinmaster G. (1996) Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development. *Mol Cell Neurosci* 8:14-27.

Liu B.P., Strittmatter S.M. (2001) Semaphorin-mediated axonal guidance via Rho-related G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:619-626.

Lockhart D.J., Dong H., Byrne M.C., Follettie M.T., Gallo M.V., Chee M.S., Mittmann M., Wang C., Kobayashi M., Horton H., Brown E.L. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* 14:1675-1680.

Lorent K., Overbergh L., Moechars D., De Strooper B., Van Leuven .F, Van den Berghe H. (1995) Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase,

alpha-2-macroglobulin and the 40,000 molecular weight receptor-associated protein. *Neuroscience* 65:1009-1025.

Lu M., Grove E.A., Miller R.J. (2002) Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:7090–7095.

Ma Q., Sommer L., Cserjesi P., Anderson D.J. (1997) Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands. *J. Neurosci.* 17:3644–3652.

Malbon C.C., Tao J., Wang H.Y. (2004) AKAPs (A-kinase anchoring proteins) and molecules that compose their G-protein-coupled receptor signalling complexes. *Biochem. J.* 379:1-9.

Mallamaci A., Iannone R., Briata P., Pintonello L., Mercurio S., Boncinelli E., Corte G. (1998) EMX2 protein in the developing mouse brain and olfactory area. *Mech. Dev.* 77:165–172.

Mallamaci A. Muzio L., Chan C.H., Parnavelas J., Boncinelli E. (2000a) Area identity shifts in the early cerebral cortex of Emx2^{-/-} mutant mice. *Nat. Neurosci.* 3:679–686.

Mallamaci A., Mercurio S., Muzio L., Cecchi C., Pardini C.L., Gruss P., Boncinelli E. (2000b) The lack of Emx2 causes impairment of reelin signaling and defects of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 20:1109–1118.

Margolis R.K., Rauch U., Maurel P., Margolis R.U. (1996) Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 3:273-290.

Marin-Padilla M. (1998) Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci.* 21:64–71.

Massague J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67:753-791.

Maurel P., Rauch U., Flad M., Margolis R.K., Margolis R.U. (1994) Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:2512-2516.

Meyer G., Cabrera Socorro A., Perez Garcia C.G., Martinez Millan L., Walker N., Caput D. (2004) Developmental roles of p73 in Cajal-Retzius cells and cortical patterning. *J. Neurosci.* 24:9878–9887.

Miller B., Sheppard A.M., Bicknese A.R., Pearlman A.L. (1995) Chondroitin sulphate proteoglycans in the developing cerebral cortex: the distribution of neurocan distinguishes forming afferent and efferent axonal pathways. *J. Comp. Neurol.* 355:615- 628.

- Mirshahi F., Pourtau J., Li H., Muraine M., Trochon V., Legrand E., Vannier J., Soria J., Vasse M., Soria C. (2000) SDF-1 activity on microvascular endothelial cells: consequences on angiogenesis in in vitro and in vivo models. *Thromb. Res.* 99:587–594.
- Miyamoto N., Yoshida M., Kuratani S., Matsuo I., Aizawa S. (1997) Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development* 124:1653-1664.
- Miyata T., Maeda T., Lee J.E. (1999) *NeuroD* is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev.* 13:647-652.
- Morita K., Sasaki H., Furuse M., Tsukita S. (1999) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell Biol.* 147:185-194.
- Mouchel Y., Lefrancois T., Fages C., Tardy M. (1995) Apolipoprotein E gene expression in astrocytes: developmental pattern and regulation. *Neuroreport* 7:205-208.
- Mugnaini E., Berrebi A.S., Dahl A.L., Morgan J.I. (1987) The polypeptide PEP-19 is a marker for Purkinje neurons in cerebellar cortex and cartwheel neurons in the dorsal cochlear nucleus. *Arch. Ital. Biol.* 126:41-67.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1: 263-73.
- Muzio L., DiBenedetto B., Stoykova A., Boncinelli E., Gruss P., Mallamaci A. (2002a) *Emx2* and *Pax6* control regionalization of the preneuronogenic cortical primordium. *Cereb. Cortex* 12:129–139.
- Muzio L., DiBenedetto B., Stoykova A., Boncinelli E., Gruss P., Mallamaci A. (2002b) Conversion of cerebral cortex into basal ganglia in *Emx2*(-/-) *Pax6*(*Sey/Sey*) double-mutant mice. *Nat. Neurosci.* 5:737–745.
- Muzio L., Mallamaci A. (2003) *Emx1*, *emx2* and *pax6* in specification, regionalization and arealization of the cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 13:641–647.
- Muzio L., Soria J.M., Pannese M., Piccolo S., Mallamaci A. (2005) A mutually stimulating loop involving *emx2* and canonical wnt signalling specifically promotes expansion of occipital cortex and hippocampus. *Cereb. Cortex* 15:2021-2028.
- Nakajima K., Mikoshiba K., Miyata T., Kudo C., Ogawa M. (1997) Disruption of hippocampal development in vivo by CR-50 mAb against reelin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:8196-8201.
- Nishiyama M., Hoshino A., Tsai L., Henley J.R., Goshima Y., Tessier-Lavigne M, Poo M.M., Hong K. (2003) Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature* 423:990-995.

- Ogawa M., Miyata T., Nakajima K., Yagyu K., Seike M., Ikenaka K., Yamamoto H., Mikoshiba K. (1995) The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14:899-912.
- Ohsawa I., Takamura C., Morimoto T., Ishiguro M., Kohsaka S. (1999) Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. *Eur. J. Neurosci.* 11:1907-1913.
- Ohshima T., Ward J.M., Huh C.G., Longenecker G., Veeranna Pant H.C., Brady R.O., Martin L.J., Kulkarni A.B. (1996) Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(20):11173-11178
- Okamoto M., Sakiyama J., Kurazono S., Mori S., Nakata Y., Nakaya N., Oohira A. (2001) Developmentally regulated expression of brain-specific chondroitin sulphate proteoglycans, neurocan and phosphacan, in the postnatal rat hippocampus. *Cell Tissue Res.* 306:217-229.
- Oldekamp J., Kraemer N., Alvarez-Bolado G., Skutella T. (2004) bHLH gene expression in the Emx2-deficient dentate gyrus reveals defective granule cells and absence of migrating precursors. *Cereb. Cortex* 14:1045– 1058.
- Oliver G., Sosa-Pineda B., Geisendorf S., Spana E.P., Doe C.Q., Gruss P. (1993) Prox 1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development. *Mech. Dev.* 44:3–16.
- Ong W.Y., He Y., Suresh S., Patel S.C. (1997) Differential expression of apolipoprotein D and apolipoprotein E in the kainic acid-lesioned rat hippocampus. *Neuroscience* 79:359-367.
- Oohira A., Matsui F., Watanabe E., Kushima Y., Maeda N. (1994) Developmentally regulated expression of a brain specific species of chondroitin sulfate proteoglycan, neurocan, identified with a monoclonal antibody IG2 in the rat cerebrum. *Neuroscience* 60:145-157.
- Oropeza R.L., Wekerle H., Werb Z. (1987) Expression of apolipoprotein E by mouse brain astrocytes and its modulation by interferon-gamma. *Brain Res.* 410:45-51.
- Ota T., Fujii M., Sugizaki T., Ishii M., Miyazawa K., Aburatani H., Miyazono K. (2002) Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 193:299-318.
- Pellegrini M., Mansouri A., Simeone A., Boncinelli E., Gruss P. (1996) Dentate gyrus formation requires Emx2. *Development* 122:3893–3898.
- Perron M., Opdecamp K., Butler K., Harris W.A., Bellefroid E.J. (1999) Xngnr-1 and Xath3 promote ectopic expression of sensory neuron markers in the neurula ectoderm and have distinct inducing properties in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:14996–15001.
- Persohn E., Malherbe P., Richards J.G. (1992) Comparative molecular neuroanatomy of cloned GABAA receptor subunits in the rat CNS. *J. Comp. Neurol.* 326:193-216.

Pierantoni G.M., Bulfone A., Pentimalli F., Fedele M., Iuliano R., Santoro M., Chiariotti L., Ballabio A., Fusco A. (2002) The homeodomain-interacting protein kinase 2 gene is expressed late in embryogenesis and preferentially in retina, muscle, and neural tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290:942-947.

Pleasure S.J., Collins A.E., Lowenstein D.H. (2000) Unique expression patterns of cell fate molecules delineate sequential stages of dentate gyrus development. *J. Neurosci.* 20:6095–6105.

Poirier J., Hess M., May P.C., Finch C.E. (1991) Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 11:97-106.

Pomies P., Macalma T., Beckerle M.C. (1999) Purification and characterization of an alphaactinin- binding PDZ-LIM protein that is up-regulated during muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* 274:29242-29250.

Quach T.T., Mosinger B. Jr., Ricard D., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Stankoff B., Honnorat J., Belin M.F., Kolattukudy P. (2000) Collapsin response mediator protein 3/unc-33-like protein-4 gene: organization, chromosomal mapping and expression in the developing mouse brain. *Gene* 242:175-182.

Rakic P. (1991) Experimental manipulation of cerebral cortical areas in primates. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 331:291–294.

Rakic P. (1995) A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci.* 18:383-388.

Rauch U., Karthikeyan L., Maurel P., Margolis R.U., Margolis R.K. (1992) Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulphate proteoglycan of brain. *J. Biol. Chem.* 267:19536-19547.

Rickmann M., Amaral D.G., Cowan W.M. (1987) Organization of radial glial cells during the development of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 264:449–479.

Rigato F., Garwood J., Calco V., Heck N., Faivre-Sarrailh C., Faissner A. (2002) Tenascin-C promotes neurite outgrowth of embryonic hippocampal neurons through the alternatively spliced fibronectin type III BD domains via activation of the cell adhesion molecule F3/contactin. *J. Neurosci.* 22:6596-6609.

Rossjohn J., Cappai R., Feil S.C., Henry A., McKinstry W.J., Galatis D., Hesse L., Multhaup G., Beyreuther K., Masters C.L., Parker M.W. (1999) Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat. Struct. Biol.* 6:327-331.

Rubenstein J.L., Beachy P.A. (1998) Patterning of the embryonic forebrain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8:18-26.

Sahay A., Molliver M.E., Ginty D.D., Kolodkin A.L. (2003) Semaphorin 3F is critical for development of limbic system circuitry and is required in neurons for selective CNS axon guidance events. *J. Neurosci.* 23:6671-6680.

Salcedo R., Oppenheim J.J. (2003) Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation* 10:359–370.

Savaskan N.E., Alvarez-Bolado G., Glumm R., Nitsch R., Skutella T., Heimrich B. (2002) Impaired postnatal development of hippocampal neurons and axon projections in the *Emx2*-/- mutants. *J. Neurochem.* 83:1196–1207.

Schulz T.W., Nakagawa T., Licznarski P., Pawlak V., Kollerker A., Rozov A., Kim J., Dittgen T., Kohr G., Sheng M., Seeburg P.H., Osten P. (2004) Actin/alpha-actinin-dependent transport of AMPA receptors in dendritic spines: role of the PDZ-LIM protein RIL. *J. Neurosci.* 24:8584-8594.

Schuermans C., Guillemot F. (2002) Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12:26–34.

Schwab M.H., Bartholomae A., Heimrich B., Feldmeyer D., Druffel-Augustin S., Goebbels S., Naya F.J., Zhao S., Frotscher M., Tsai M.J., Nave K.A. (2000) Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/Neuro D) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus. *J. Neurosci.* 20:3714-3724.

Sheng H.Z., Bertuzzi S., Chiang C., Shawlot W., Taira M., Dawid I., Westphal H. (1997) Expression of murine *Lhx5* suggests a role in specifying the forebrain. *Dev. Dyn.* 208:266–277.

Shimamura K., Rubenstein J.L. (1997) Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* 124:2709-2718.

Shimogori T., Banuchi V., Ng H.Y., Strauss J.B., Grove E.A. (2004) Embryonic signaling centers expressing BMP, WNT and FGF proteins interact to pattern the cerebral cortex. *Development* 131:5639-5647.

Shinozaki K., Miyagi T., Yoshida M., Miyata T., Ogawa M., Aizawa S., Suda Y. (2002) Absence of Cajal-Retzius cells and subplate neurons associated with defects of tangential cell migration from ganglionic eminence in *Emx1/2* double mutant cerebral cortex. *Development* 129:3479–3492.

Shinozaki K., Yoshida M., Nakamura M., Aizawa S., Suda Y. (2004) *Emx1* and *Emx2* cooperate in initial phase of archipallium development. *Mech. Dev.* 121:475–489.

Sievers J., Hartmann D., Pehlemann F.W., Berry M. (1992) Development of astroglial cells in the proliferative matrices, the granule cell layer, and the hippocampal fissure of the hamster dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 320:1–32.

Simeone A., Acampora D., Gulisano M., Stornaiuolo A., Boncinelli E. (1992a) Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* 358:687–690.

Simeone A., Gulisano M., Acampora D., Stornaiuolo A., Rambaldi M., Boncinelli E. (1992b) Two vertebrate homeobox genes related to the *Drosophila* empty spiracles gene are expressed in the embryonic cerebral cortex. *EMBO J.* 11:2541–2550.

Skutella T., Nitsch R. (2001) New molecules for hippocampal development. *Trends Neurosci.* 24(2):107-13. Review.

Slemmon J.R., Morgan J.I., Fullerton S.M., Danho W., Hilbush B.S., Wengenack T.M. (1996) Camstatins are peptide antagonists of calmodulin based upon a conserved structural motif in PEP-19, neurogranin, and neuromodulin. *J. Biol. Chem.* 271:15911–15917.

Snyder S.E., Li J., Schauwecker P.E., McNeill T.H., Salton S.R. (1996) Comparison of RPTP zeta/beta, phosphacan, and trkB mRNA expression in the developing and adult rat nervous system and induction of RPTP zeta/beta and phosphacan mRNA following brain injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 40:79-96.

Sommer L., Ma Q., Anderson D.J. (1996) Neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS., *Mol. Cell Neurosci.* 8:221–241.

Soriano E., Alvarado-Mallart R.M., Dumesnil N., Del Rio J.A., Sotelo C. (1997) Cajal-Retzius cells regulate the radial glia phenotype in the adult and developing cerebellum and alter granule cell migration. *Neuron* 18:563– 577.

Soriano E., Del Rio J.A. (2005) The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron* 46:389–394.

Soriano E., Del Rio J.A., Martinez A., Super H. (1994) Organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. I. Immunocytochemical characterization of neuronal populations in the subplate and marginal zone. *J. Comp. Neurol.* 342:571–595.

Sperk G., Schwarzer C., Tsunashima K., Fuchs K., Sieghart W. (1997) GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus I: immunocytochemical distribution of 13 subunits. *Neuroscience* 80:987-1000.

Stanfield B.B., Caviness V.S. Jr, Cowan W.M. (1979) The organization of certain afferents to the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J. Comp. Neurol.* 185:461–483.

Stanfield B.B., Cowan W.M. (1979) The development of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J. Comp. Neurol.* 185:423–459.

Stanfield B.B., Trice J.E. (1988) Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp. Brain Res.* 72:399–406.

Steup A., Lohrum M., Hamscho N., Savaskan N.E., Ninnemann O., Nitsch R., Fujisawa H., Puschel A.W., Skutella T. (2000) Sema3C and netrin-1 differentially affect axon growth in the hippocampal formation. *Mol. Cell Neurosci.* 15:141-155.

Steup A., Ninnemann O., Savaskan N.E., Nitsch R., Puschel A.W., Skutella T. (1999) Semaphorin D acts as a repulsive factor for entorhinal and hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 11:729-734.

Stoykova A., Hatano O., Gruss P., Gotz M. (2003) Increase in reelinpositive cells in the marginal zone of Pax6 mutant mouse cortex. *Cereb. Cortex* 13:560–571.

Sulochana K.N., Fan H., Jois S., Subramanian V., Sun F., Kini R.M., Ge R. (2005) Peptides derived from human decorin leucine-rich repeat 5 inhibit angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 280:27935-27948.

Super H., Del Rio J.A., Martinez A., Perez-Sust P., Soriano E. (2000) Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cereb. Cortex* 10:602–613.

Super H., Martinez A., Soriano E. (1997) Degeneration of Cajal-Retzius cells in the developing cerebral cortex of the mouse after ablation of meningeal cells by 6-hydroxydopamine. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 98:15-20.

Super H., Soriano E., Uylings H.B. (1998) The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 27:40-64.

Takahashi T., Nowakowski R.S., Caviness V.S. Jr (1993) Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. *J. Neurosci.* 13:820–833.

Takiguchi-Hayashi K., Sekiguchi M., Ashigaki S., Takamatsu M., Hasegawa H., Suzuki-Migishima R., Yokoyama M., Nakanishi S., Tanabe Y. (2004) Generation of reelin-positive marginal zone cells from the caudomedial wall of telencephalic vesicles. *J. Neurosci.* 24:2286–2295.

Tamagnone L., Comoglio P.M. (2004) To move or not to move? Semaphorin signalling in cell migration. *EMBO Rep.* 5:356-361.

Tanzi R.E., Bertram L (2005) Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell.* 120:545-555.

Terman J.R., Kolodkin A.L. (2004) Nerve links protein kinase a to plexin-mediated semaphoring repulsion. *Science* 303:1204-1207.

Theil T., Alvarez-Bolado G., Walter A., Ruther U. (1999) Gli3 is required for Emx gene expression during dorsal telencephalon development. *Development* 126:3561-3571.

- Theil T., Aydin S., Koch S., Grotewold L., Ruther U. (2002) Wnt and Bmp signalling cooperatively regulate graded *Emx2* expression in the dorsal telencephalon. *Development* 129:3045-3054.
- Thomaidou D., Mione M.C., Cavanagh J.F., Parnavelas J.G. (1997) Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 17:1075–1085.
- Tole S., Christian C., Grove E. A. (1997) Early specification and autonomous development of cortical fields in the mouse hippocampus. *Development* 124:4959
- Tole S., Goudreau G., Assimacopoulos S., Grove E.A. (2000) *Emx2* is required for growth of the hippocampus but not for hippocampal field specification. *J. Neurosci.* 20:2618–2625.
- Torii M., Matsuzaki F., Osumi N., Kaibuchi K., Nakamura S., Casarosa S., Guillemot F., Nakafuku M. (1999) Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system. *Development* 126:443–456.
- Trommsdorff M., Gotthardt M., Hiesberger T., Shelton J., Stockinger W., Nimpf J., Hammer R.E., Richardson J.A., Herz J. (1999) Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell.* 97:689-701.
- Tsai H.H., Miller R.H. (2002) Glial cell migration directed by axon guidance cues. *Trends Neurosci.* 25:173-175; discussion 175-176.
- van Praag H., Schinder A.F., Christie B.R., Toni N., Palmer T.D., Gage F.H. (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030–1034.
- von Koch C.S., Zheng H., Chen H., Trumbauer M., Thinakaran G., van der Ploeg L.H., Price D.L., Sisodia SS (1997) Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol. Aging* 18:661-669.
- Wada H., Hashimoto K., Wada Y., Kobayashi M., Izumi A., Sugiyama A., Kohro T., Hamakubo T., Kodama T. (2002) Extensive oligonucleotide microarray transcriptome analysis of the rat cerebral artery and arachnoid tissue. *J. Atheroscler. Thromb.* 9:224-232.
- Wang P., Yang G., Mosier D.R., Chang P., Zaidi T., Gong Y.D., Zhao N.M., Dominguez B., Lee K.F., Gan W.B., Zheng H. (2005) Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J. Neurosci.* 25:1219-1225.
- Wang W.F., Wang Y.G., Reginato A.M., Plotkina S., Gridley T., Olsen B.R. (2002) Growth defect in *Grg5* null mice is associated with reduced *Ihh* signaling in growth plates. *Dev. Dyn.* 224:79-89.
- Watabe T., Nishihara A., Mishima K., Yamashita J., Shimizu K., Miyazawa K., Nishikawa S., Miyazono K. (2003) TGF-beta receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J. Cell Biol.* 163:1303-1311.

- Whitson J.S., Selkoe D.J., Cotman C.W. (1989) Amyloid beta protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro. *Science* 243:1488-1490.
- Whitson J.S., Glabe C.G., Shintani E., Abcar A., Cotman C.W. (1990) Beta-amyloid protein promotes neuritic branching in hippocampal cultures. *Neurosci. Lett.* 110:319-324.
- Wilkinson D.G., Nieto M.A. (1993) Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Meth. Enzymol.* 225:361–373.
- Wilson M.T., Snow D.M. (2000) Chondroitin sulfate proteoglycan expression pattern in hippocampal development: potential regulation of axon tract formation. *J. Comp. Neurol.* 424:532-546.
- Wisden W., Laurie D.J., Monyer H., Seeburg P.H. (1992) The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J. Neurosci.* 12:1040-1062.
- Xia H., Winokur S.T., Kuo W.L., Altherr M.R., Brecht D.S. (1997) Actinin-associated LIM protein: identification of a domain interaction between PDZ and spectrin-like repeat motifs. *J. Cell Biol.* 139:507-515.
- Yamaguchi Y., Mann D.M., Ruoslahti E. (1990) Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 346:281-284.
- Yamazaki H., Sekiguchi M., Takamatsu M., Tanabe Y., Nakanishi S. (2004) Distinct ontogenic and regional expressions of newly identified Cajal-Retzius cell-specific genes during neocortigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:14509–14514.
- Yang H., Wanner I.B., Roper S.D., Chaudhari N. (1999) An optimised method for in situ hybridization with signal amplification that allows the detection of rare mRNAs. *J. Histochem. Cytochem.* 47:431–446.
- Yaylaoglu M.B., Titmus A., Visel A., Alvarez-Bolado G., Thaller C., Eichele G. (2005) Comprehensive expression atlas of fibroblast growth factors and their receptors generated by a novel robotic in situ hybridization platform. *Dev. Dyn.* 234:371-386.
- Yoshida M., Assimakopoulos S., Jones K.R., Grove E.A. (2006) Massive loss of Cajal-Retzius cells does not disrupt neocortical layer order. *Development* 133:537–545.
- Yoshida M., Suda Y., Matsuo I., Miyamoto N., Takeda N., Kuratani S., Aizawa S. (1997) Emx1 and Emx2 functions in development of dorsal telencephalon. *Development* 124:101–111.
- Yuasa S. (2001a) Development of astrocytes in the mouse hippocampus as tracked by tenascin-C gene expression. *Arch. Histol. Cytol.* 64:149–158.
- Yuasa S. (2001b) Development of astrocytes in the mouse embryonic cerebrum tracked by tenascin-C gene expression. *Arch. Histol. Cytol.* 64:119–126.

Zhao Y., Kraemer N., Oldekamp J., Cankaya M., Szabo N., Conrad S., Skutella T., Alvarez-Bolado G. (2006) *Emx2* in the developing hippocampal fissure region. *Eur. J. Neurosci.* 23:2895-2907.

Zhao Y., Sheng H.Z., Amini R., Grinberg A., Lee E., Huang S., Taira M., Westphal H. (1999) Control of hippocampal morphogenesis and neuronal differentiation by the LIM homeobox gene *Lhx5*. *Science* 284:1155–1158.

Zhou C.J., Zhao C., Pleasure S.J. (2004) Wnt signaling mutants have decreased dentate granule cell production and radial glial scaffolding abnormalities. *J. Neurosci.* 24:121-126.

Zhu C.C., Dyer M.A., Uchikawa M., Kondoh H., Lagutin O.V., Oliver G. (2002) Six3-mediated auto repression and eye development requires its interaction with members of the Groucho-related family of co-repressors. *Development* 129:2835-2849.

Ziai M.R., Sangameswaran L., Hempstead J.L., Danho W., Morgan J.I. (1988) An immunochemical analysis of the distribution of a brain-specific polypeptide, PEP-19. *J. Neurochem.* 51:1771-1776.

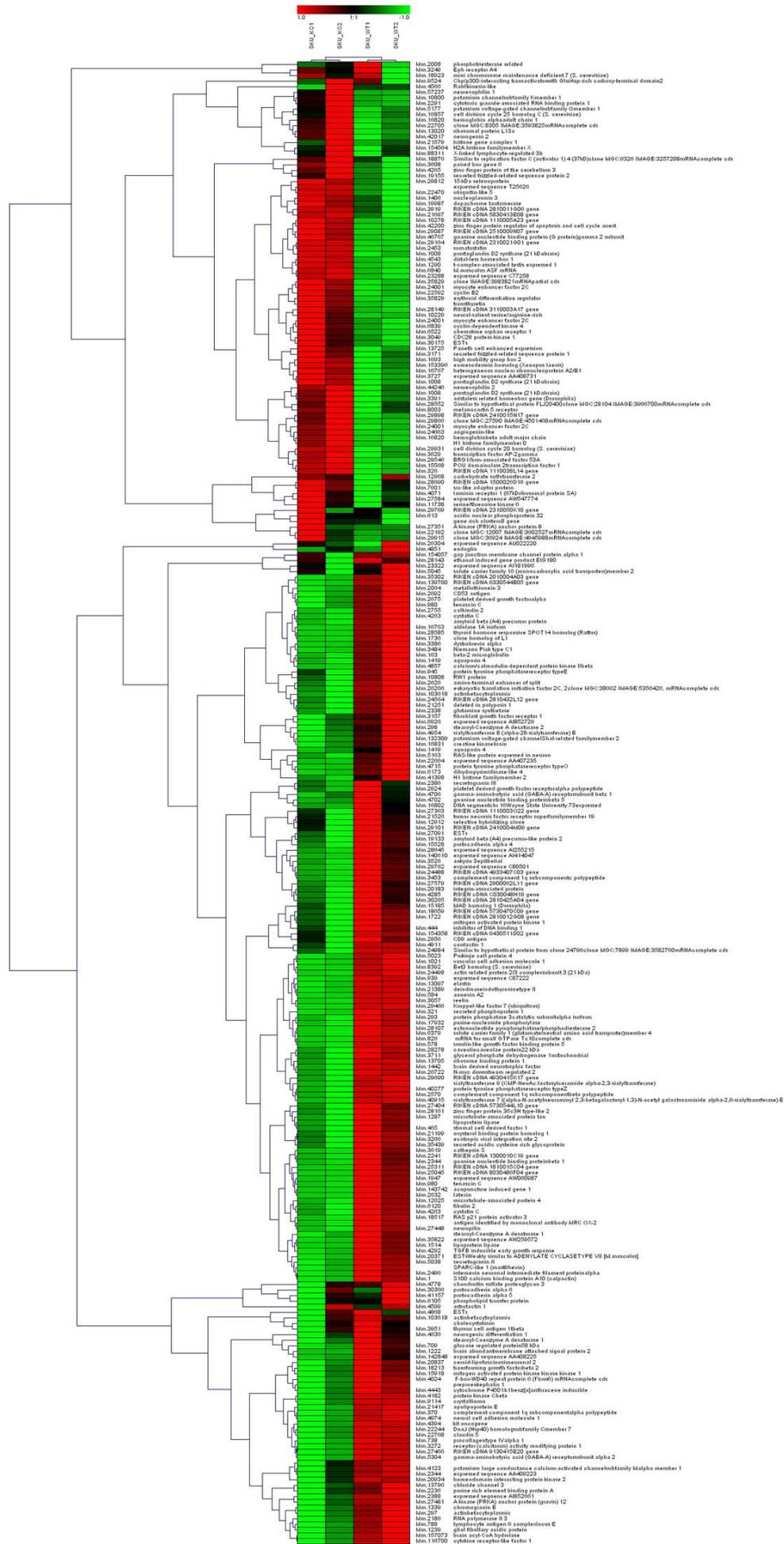


Abbildung 1 (S. 145): Übersicht der Gene mit unterschiedlicher Expressionsintensität im *Emx2*^{-/-} verglichen mit Wildtyp Hippocampus

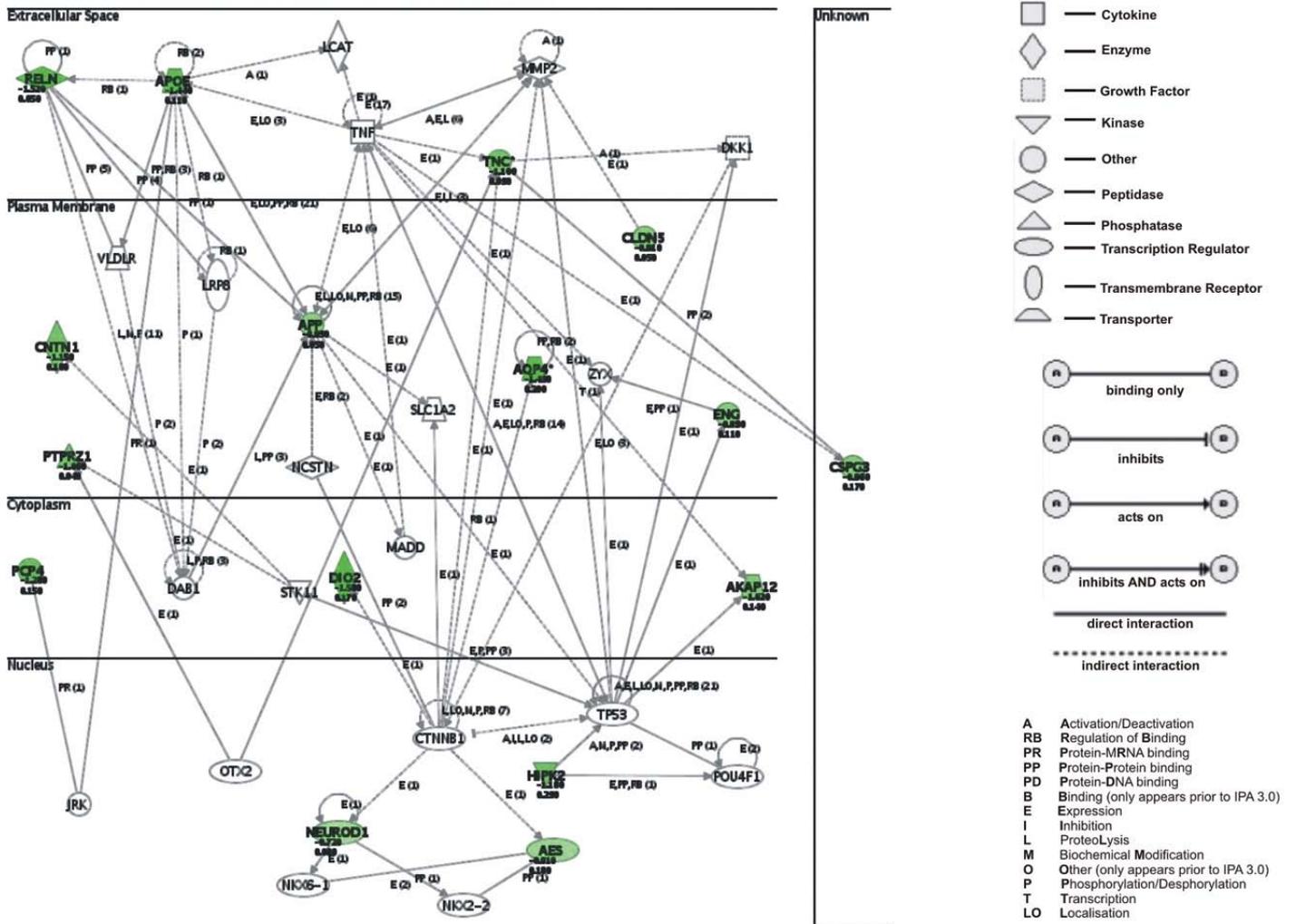


Abbildung 2: Von der Ingenuity Software erstelltes Netzwerk von Pfaden, in das die Kandidatengene involviert sein könnten.

Publikationen

- 1) **Expression pattern of the repulsive guidance molecules RGM A, B and C during mouse development.**
Oldekamp J, Kramer N, Alvarez-Bolado G, Skutella T.

Gene Expression Patterns, 2004, Mai

- 2) **bHLH gene expression in the Emx2-deficient dentate gyrus reveals defective granule cells and absence of migrating precursors.**
Oldekamp J, Kraemer N, Alvarez-Bolado G, Skutella T.

Cerebral Cortex, 2004, Sep

- 3) ***Emx2* in the Developing Hippocampal Fissure Region**
Tianyu Zhao, Nadine Kraemer, Judit Oldekamp, Murat Çankaya, Sabine Conrad, Nora Szabó, Thomas Skutella and Gonzalo Alvarez-Bolado

European Journal of Neuroscience, 2006, Jun

- 4) **Microarray analysis of the fetal hippocampus in the Emx2 mutant**
Thomas Skutella, Sabine Conrad, Michael Bonin, Gonzalo Alvarez-Bolado

Developmental Neuroscience, 2007;29(1-2):28-47

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. T. Skutella möchte ich mich für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie die umfassende Betreuung und Unterstützung des Dissertationsvorhabens ganz herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. H. Martens danke ich für die fachbereichsinterne Betreuung der Arbeit und die immer unkomplizierte und schnelle Hilfe bei Fragen bezüglich Korrektur und Organisation.

Für die überaus gute und konstruktive Zusammenarbeit, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, danke ich Herrn Dr. G. Alvarez-Bolado sowie Frau J. Oldekamp vom Max-Planck Institut in Göttingen.

Der Arbeitsgruppe von Frau Prof. C. Birchmeier, insbesondere Herrn Prof. Dr. S. Britsch danke ich für die Unterstützung bei der Bearbeitung und Auswertung der Arrays und die Bereitstellung der hierfür notwendigen Geräte im Max-Dellbrück Zentrum in Berlin Buch.

Weiterhin richtet sich ein herzliches Dankeschön an alle Kollegen und Kolleginnen für die allzeit freundliche und kompetente Unterstützung bei der Einarbeitung in die Labormethoden.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meiner Familie, insbesondere meiner Mutter aussprechen, die mir während der gesamten Zeit in jeder Hinsicht zur Seite stand und mir geholfen hat, mein Ziel trotz einiger Verzögerungen nie aus den Augen zu verlieren.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit, Molekulare Faktoren der Entwicklung des Gyrus dentatus der Maus, selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 20.12.2007

Nadine Krämer