

5. Summary

In my PhD thesis, I characterize the function of *Tshz1* in the developing mouse CNS. The three mouse homologues of the *Drosophila* gene *Teashirt* (*tsh*) were found to be strongly expressed in the postnatal dorsal spinal cord by genome-wide expression analysis, which suggested a possible function in the central nervous system. In *Drosophila*, *Teashirt* was shown to have a homeotic function in defining head-trunk identity and to play an important role in the transmission of Wingless/Wnt signals. The murine homologues, *Tshz1*, *Tshz2* and *Tshz3* encode for zinc-finger proteins that are expressed in the dorsal spinal cord and forebrain from early embryonic life to adulthood.

To perform the functional analysis, I knocked out *Tshz1* and *Tshz2* from the mouse genome, disrupting the sequences with insertion of a membrane GFP reporter cassette. Because *Tshz1* mutation led to postnatal lethality, I knocked out conditionally *Tshz1* sequences in ES cells to make possible future analysis in the adult nervous system. Genome-wide analysis of E15.5 dorsal spinal cords showed minimal variations in intensity of gene expression in the mutant compared to the control, suggesting functional redundancy of the three *Tshzs*, which are expressed in similar patterns during spinal cord development.

In the olfactory bulb, the three *Tshzs* are expressed in complementary non-overlapping patterns from early gestational stages to adulthood. *Tshz1* is expressed in the dorso-lateral ganglionic eminence/sub-ventricular zone of the forebrain, and outer granule cell layer of the olfactory bulb during embryonic and postnatal life. During adulthood, expression is maintained and expanded to the whole granule cell and glomerular cell layer. Analysis of the *Tshz1*^{GFP/GFP} mouse in early postnatal stages revealed that deletion of *Tshz1* leads to loss of markers for mature granule cells, such as GABA, TH, GAD67 and NeuN. Cells expressing the GFP reporter remained aggregated close to the core of the bulb, losing the ability to distribute radially to the external granule cell layer. Genome-wide expression analysis of P0 mutant and control olfactory bulb showed that *Tshz1* is necessary for the transcription of the guidance molecule Semaphorin3c and of Cypin, a putative mediator of the cellular response to Semaphorin signaling. This provides a possible mechanism for the role

of *Tshz1* in the regulation of granule cell maturation and radial migration during embryonic life.

Zusammenfassung

Ich habe in meiner Promotionsschrift die Funktion des *Tshz1*-Gens während der Entwicklung des Zentralnervensystems der Maus charakterisiert. Das Mausgenom kodiert drei zum *Teashirt (tsh)*- Gen der Fruchtfliege homologe Gene. Alle drei Gene werden im Rückenmarkshinterhorn postnataler Mäuse exprimiert, was auf eine mögliche Funktion dieser Gene im Zentralnervensystem hindeutet. In der Fruchtfliege besitzt *Teashirt* eine homöotische Funktion; es an der Determinierung des Rumpfes und an der Übertragung von Wnt/wingless-Signalen beteiligt. Die Mausgene *Tshz1*, *Tshz2* und *Tshz3* kodieren für Zink-Finger-Proteine und werden im dorsalen Rückenmark und Vorderhirn während der Embryonalentwicklung und im Erwachsenenstadium exprimiert.

Zur funktionellen Analyse der *Teashirt*-Gene in der Maus habe ich die Gene *Tshz1* und *Tshz2* in der Keimbahn der Maus mutiert, indem ich die kodierenden Sequenzen durch GFP (green fluorescent protein)-Sequenzen ersetzt habe. Da die *Tshz1*-Mutation zu neonataler Letalität führte, erzeugte ich einen Mausstamm, der ein konditionelles Allel des *Tshz1*-Gens trägt. Dies soll in späteren Experimenten die funktionelle Analyse in postnatalen Stadien erlauben. Genom-weite Expressionsanalyse des dorsalen Rückenmarks von Tag 15,5-Embryonen zeigte kaum Veränderungen des Expressionsmusters in *Tshz1*-mutanten Embryonen. Dies könnte auf eine funktionelle Redundanz der drei in diesem Gewebe überlappend exprimierten *Tshz*-Gene hindeuten.

Im Riechkolben werden die drei *Tshz*-Gene in komplementären, nicht überlappenden Mustern während der Embryonalentwicklung und im erwachsenen Organismus exprimiert. *Tshz1* wird während der Embryonalentwicklung in der Subventrikularschicht der „Lateral ganglionic eminence und der äußeren Körnerzellschicht des Riechkolbens exprimiert. Im Erwachsenenstadium bleibt die *Tshz1*-Expression aufrechterhalten und erstreckt sich über die gesamte

Körnerzellschicht und die Glomeruli-Schicht. Die Analyse neugeborener homozygot mutanter *Tshz1*^{GFP/GFP} Mäuse zeigte den Verlust von Körnerzell-Differenzierungsmarkern wie GABA, Tyrosinhydroxylase, Glutamatdecarboxylase 67 und NeuN. GFP-positive Zellen bildeten Aggregate nahe des Zentrums des Riechkolbens und verteilten sich nicht radial gleichmäßig in der äußeren Körnerzellschicht, wie es in Kontrolltieren beobachtet wurde. Eine Genom-weite Expressionsanalyse des Riechkolbens neugeborener Mäuse zeigte den Verlust der Expression der Semaphorin3c- und Cypin-kodierenden Gene in *Tshz1*-mutanten Mäusen. Semaphorin3c ist ein Signal, das Axonwachstum und Zellwanderung leitet; Cypin ist ein Protein, das möglicherweise Semaphorinsignale intrazellulär vermittelt. Diese Entdeckung könnte ein Hinweis auf den molekularen Mechanismus sein, durch den *Tshz1* die Reifung und Wanderung der Körnerzellen des Riechkolbens reguliert.