

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Hippocampus

Der Hippocampus umfasst die basomedial gelegenen, eingerollten Strukturen des telencephalen Temporallappens und bildet den Hauptteil des Archicortex der Großhirnrinde. Als eine zentrale Schaltstelle des limbischen Systems erhält der Hippocampus zumeist hochgradig vorverarbeitete Informationen aus allen Sinnesmodalitäten und kann durch seine Verbindungen zum Hypothalamus, den Septumkernen und dem Gyrus cinguli das endokrine, viszerale und emotionale Geschehen beeinflussen. Darüber hinaus kommt dem Hippocampus aufgrund seiner Verbindungen zu kognitiven Arealen des Neocortex eine wichtige Bedeutung für höhere Hirnleistungen bei der Gedächtniskonsolidierung zu (Squire *et al.*, 1986). Aber nicht nur aufgrund seiner funktionellen Bedeutung bei Lern- und Gedächtnisprozessen ist der Hippocampus, und insbesondere der Gyrus dentatus, über den primär die Informationen in den Hippocampus einfließen, eine faszinierende und in der neurowissenschaftlichen Forschung intensiv untersuchte Gehirnstruktur. Der Gyrus dentatus des Hippocampus ist eine von insgesamt nur zwei im Gehirn von Säugetieren existierenden Strukturen, in denen adulte Neurogenese stattfindet (Kempermann *et al.*, 1997/2004; Cameron und McKay, 1998; Gage *et al.* 2002; Alvarez-Buylla und Lim, 2004). Während seiner Entwicklung erlangt der Gyrus dentatus die Fähigkeit zur fortgesetzten Neurogenese, indem eine zweite neurogene Nische gebildet wird, aus der v.a. in den ersten vier Wochen nach der Geburt mehr als 80% der Nervenzellen des adulten Gyrus dentatus hervorgehen, und in der auch in der adulten Phase weiterhin Neurogenese stattfindet (Altman und Das, 1965; Schlessinger *et al.*, 1975; Bayer 1980; Altman und Bayer 1990). Die Etablierung dieser zusätzlichen, neurogenen Nische während der frühen postnatalen Entwicklung des Gyrus dentatus wird durch das Zusammenspiel verschiedener Signalmoleküle und Faktoren kontrolliert, die auf molekularer Ebene bisher nur unvollständig verstanden sind (Li *et al.* 2004; Li *et al.*, 2007). Darüber hinaus hat der Hippocampus eine wichtige neuropathologische Bedeutung bei der Entstehung verschiedener Krankheiten, die mit strukturellen Veränderungen des Hippocampus einhergehen, wie beispielsweise bei Epilepsie (Houser 1990; Tauck und Nadler, 1985) oder Demenzerkrankungen (Geddes *et al.*, 1986; Represa *et al.*, 1988). Ein verbessertes Verständnis der molekularen Kontrolle der Entwicklung des Hippocampus ist

eine wesentliche Voraussetzung, erweiterte Erkenntnisse auch über die Physiologie und Entstehung krankhafter Veränderungen des Hippocampus zu erlangen.

### **1.1.1 Zytoarchitektur und Konnektivität im Hippocampus**

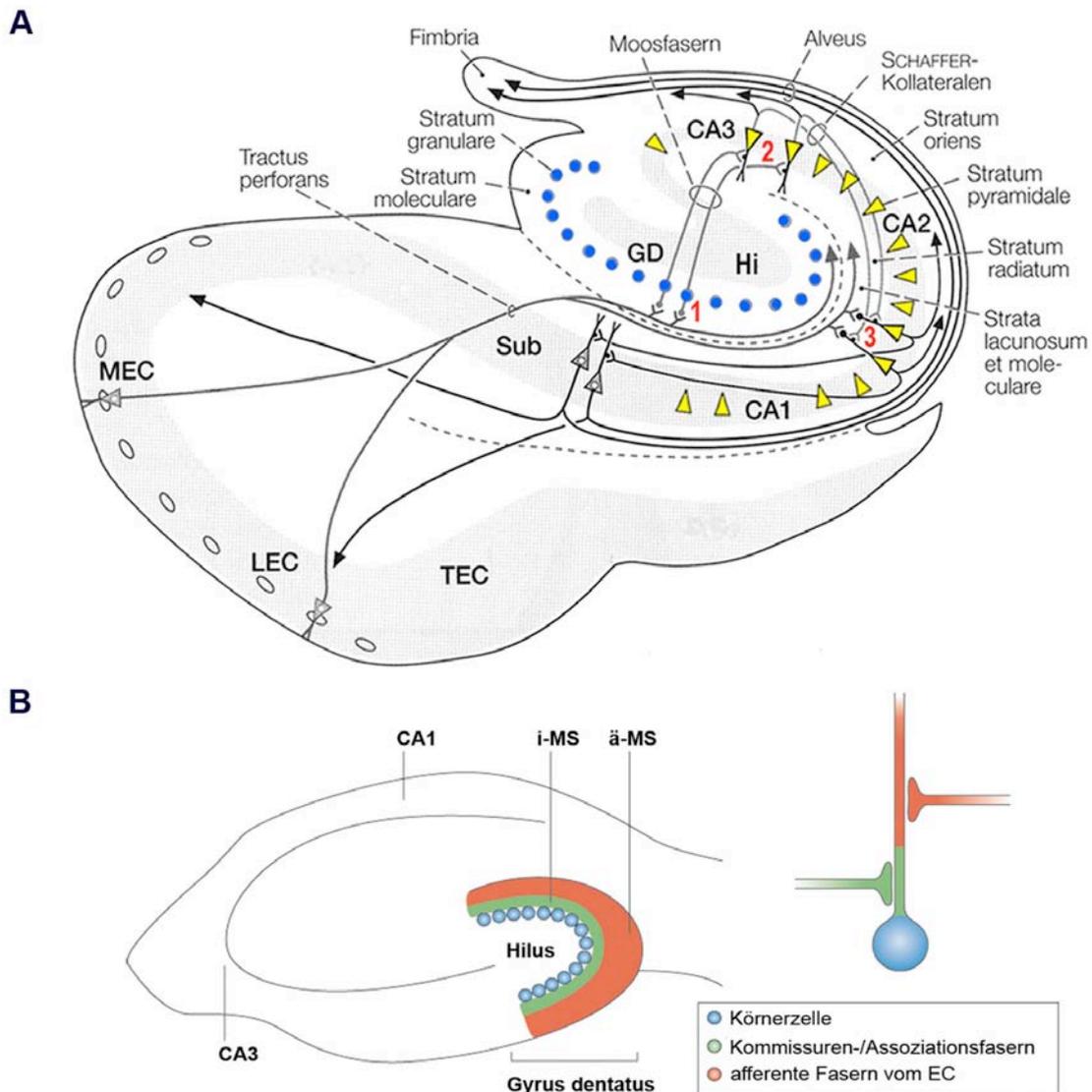
Die Hippocampusformation umfasst die Regionen Fascia dentata (Gyrus dentatus), die Hippocampusrinde bestehend aus den Regionen des Cornu ammonis (Ammonshorn) und das Subiculum. Nach der Nomenklatur von Lorente de Nó (1934) wird die Hippocampusrinde aufgrund ihrer Neuronendichte und neuronalen Verschaltungen weiter in die Sektoren CA1, CA2 und CA3 (Cornu Ammonis) untergliedert. Beim Gyrus dentatus unterscheidet man drei histologische Schichten: das relativ zellarme Stratum moleculare (Molekularschicht), das Stratum granulosum, das von dicht gepackten Körnerzellen gebildet wird und die polymorphe Schicht im Hilus, die einen hohen Anteil an Mooszellen und verschiedene Interneurontypen aufweist. Die zytoarchitektonische Struktur des Hippocampus ist relativ einfach und zwischen verschiedenen Säugetieren gut konserviert. Sie ist durch zwei C-förmige Strukturen gekennzeichnet, die einerseits vom Körnerzellband des Gyrus dentatus, andererseits vom Pyramidenzellband (Stratum pyramidale) der Hippocampusrinde gebildet werden. Die Dendriten dieser zwei Hauptzelltypen des Hippocampus liegen jeweils in den angrenzenden, zellarmen Schichten: die Pyramidenzellen bilden mit ihren apikalen Dendriten das Stratum radiatum sowie das Stratum lacunosum et moleculare und mit ihren basalen Dendriten das Stratum oriens (Abb.1-1A). Die Dendriten der Körnerzellen formen das Stratum moleculare des Gyrus dentatus, welches weiter in eine innere und äußere Schicht untergliedert wird. In der inneren Molekularschicht liegen die proximalen Dendriten der Körnerzellen, in der äußeren deren distalen Dendriten (Abb.1-1B; Amaral und Witter, 1989/95).

Der Hippocampus ist durch verschiedene Faserbahnen mit anderen Hirnregionen über extrinsische Verbindungen und auch zwischen seinen eigenen Regionen über intrinsische Verbindungen synaptisch verknüpft. Die maßgebliche Afferenz in den Hippocampus ist der Tractus perforans: kortikale, glutamaterge Afferenzen aus dem entorhinalen Kortex projizieren durch das Subiculum in die äußere Molekularschicht des Gyrus dentatus, wo sie an den distalen Dendriten der Körnerzellen terminieren. Die proximalen Dendriten der Körnerzellen in der inneren Molekularschicht werden dagegen von glutamatergen Kommissuren- und Assoziationsfasern des Hilus aus dem kontra- bzw. ipsilateralen Hippocampus innerviert (Blackstad 1956/1958; Swanson *et al.*, 1981). Somit entsteht ein

schichtenspezifisches Innervationsmuster der Molekularschicht des Gyrus dentatus (Abb.1-1B). Weitere entorhinale Afferenzen terminieren in den Strata lacunosum et moleculare der CA1 und CA3 Regionen der Hippocampusrinde. Die Axone der Körnerzellen bilden glutamaterge Moosfaserbündel, die über den Hilus in die CA3 Hippocampusrinde projizieren und überwiegend an den apikalen Dendriten der Pyramidenzellen, teilweise aber auch an den Mooszellen im Hilus terminieren. Von den CA3 Pyramidenzellen entspringen wiederum glutamaterge Schaffer-Kollaterale, die den CA2 Sektor durchqueren und die CA1 Pyramidenzellen innervieren. Die Axone der CA1 Pyramidenzellen verlassen den Hippocampus zum Teil durch den Alveus und die Fimbria, andererseits ziehen Kollaterale zu den Pyramidenzellen im Subiculum, deren Axone zusammen mit denen der CA1 und CA3 Pyramidenzellen ein Faserbündel bilden und den Hippocampus über die Fimbria verlassen und zurück zum entorhinalen Kortex ziehen (Abb.1-1A). Somit ergibt sich aus dem Verlauf der überwiegend uni-direktionalen, intrinsischen Erregungsausbreitung im Hippocampus eine tri-synaptische Verschaltungskette, in der (1) glutamaterge Afferenzen aus dem entorhinalen Kortex die Körnerzellen des Gyrus dentatus aktivieren; (2) die Körnerzellen über den Moosfasertrakt CA3 Pyramidenzellen innervieren; (3) CA3 Pyramidenzellen über Schaffer-Kollaterale die CA1 Pyramidenzellen erregen (Amaral und Witter, 1989/1995; Frotscher 1988).

Die Erregungsausbreitung innerhalb des Hippocampus über die exzitatorischen, glutamatergen Prinzipalneurone wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher inhibitorischer Interneurontypen reguliert. Die Somata der verschiedenen Interneurontypen sind im Gegensatz zu den Hauptzellen des Hippocampus nicht in spezifischen Schichten angeordnet, wenn auch ihre Axone schichtenspezifisch in den verschiedenen Kompartimenten der Prinzipalneurone terminieren. Innerhalb des Gyrus dentatus innervieren beispielsweise Korbzellen die Somata der Körnerzellen, während die axonalen Kandelaberzellen speziell am Axon-Initialsegment der Körnerzellen terminieren (Freund und Buzàki, 1996; Ribak und Seress, 1983; Soriano und Frotscher 1989).

Die meisten, wenn nicht alle Interneurone des Hippocampus benutzen GABA als primären Transmitter und kontrollieren die Entladungen der Prinzipalneurone durch Mechanismen der Rückwärts- und Forwärtshemmung. Eine Einteilung in verschiedene Subtypen erfolgt nach unterschiedlichen Kriterien, die ihre Morphologie, Verteilung, Physiologie oder auch die Expression verschiedener Neuropeptide oder Calcium-bindender Proteine einbezieht (Freund und Buzàki, 1996; Houser 2007).



**Abb.1-1 Der Hippocampus**

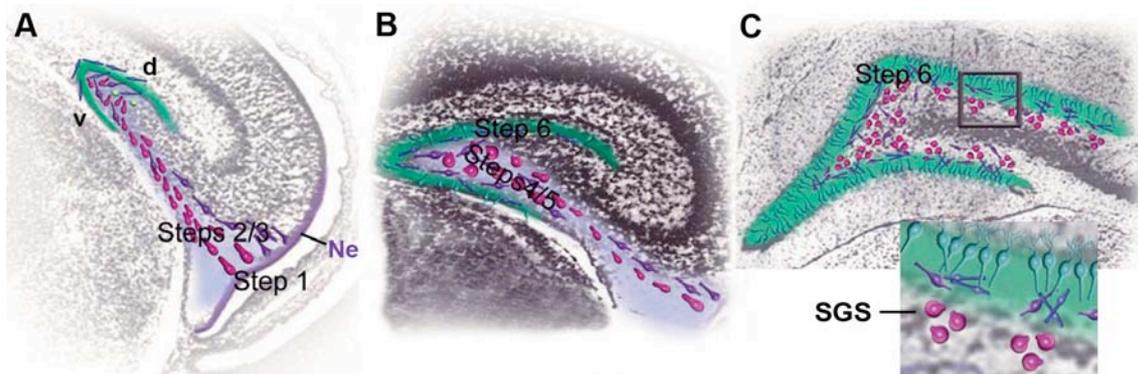
(A) Schematische Darstellung der Hauptverbindungswege des Hippocampus, der durch eine unidirektionale und tri-synaptische, intrinsische Verschaltungskette charakterisiert ist: **1.** Glutamaterge Afferenzen aus dem entorhinalen Kortex innervieren die Körnerzellen (blaue Punkte, bilden das Stratum granulosum) des Gyrus dentatus (GD). **2.** Die Axone der Körnerzellen aktivieren über den Moosfaser-Trakt CA3 Pyramidenzellen des Ammonshorns (gelbe Dreiecke, bilden das Stratum pyramidale). **3.** CA3 Pyramidenzellen erregen über Schaffer-Kollateralen CA1 Pyramidenzellen. Die im Alveus gebündelten Axone der Pyramidenzellen verlassen als Efferenz den Hippocampus über die Fimbria (Hi: Hilus, Sub: Subiculum). Abbildung modifiziert nach: Benninghoff, Drenckhahn: Anatomie, Band 2.

(B) Schichtenspezifischer Aufbau und Innervation des Gyrus dentatus. Afferente Fasern vom entorhinalen Kortex innervieren die Körnerzellen des Gyrus dentatus, indem sie an deren distalen Dendriten terminieren, die die äußere Molekularschicht (ä-MS, rot) bilden. Gleichzeitig werden die Körnerzellen von Kommissuren- und Assoziationsfasern aus dem kontra- und ipsilateralen Hippocampus erregt, die hingegen synaptische Kontakte mit den proximalen Dendritensegmenten in der inneren Molekularschicht (i-MS, grün) bilden. Abbildung modifiziert nach: Förster *et al.*, 2006.

## 1.2 Morphogenese des Gyrus dentatus

Die ersten Körnerzellen des Gyrus dentatus gehen aus einer speziellen Region der Subventrikularzone des Neuroepithels in unmittelbarer Nachbarschaft zum „cortical hem“ (eine caudal-mediale Region des Neuroepithels) hervor, die nach Altman und Bayer (1990) als sekundäre Matrix bezeichnet wird und aus einer Ansammlung proliferierender Zellen besteht. In der Anlage des Gyrus dentatus befinden sich zu diesem Zeitpunkt neben unreifen Interneuronen, sog. Cajal-Retzius Zellen und Radial-Glia Zellen, die eine Art primäres „hufeisenförmiges“ Gerüst aus Radial-Glia-Fasern bilden (Soriano *et al.*, 1986; Rickmann *et al.*, 1987, Alcantara *et al.*, 1998; Del Rio *et al.*, 1997). Die Zellen (mitotische Vorläuferzellen und postmitotische unreife Neurone) aus dem Neuroepithel wandern entlang dieser Radial-Glia-Fasern in die Anlage des Gyrus dentatus ein (1. Migrationswelle) und positionieren sich im dorsalen (suprapyramidalen) Blatt des Gyrus dentatus, wo sie beginnen, sich zu reifen Körnerzellen zu differenzieren (Abb.1-2 A). Postnatal siedeln sich einwandernde Vorläuferzellen verstärkt auch innerhalb der späteren Hilusregion an (2. Migrationswelle). Im Gegensatz zu den pränatal eingewanderten Zellen der 1. Migrationswelle, behalten die Zellen der 2. Migrationswelle ihre Fähigkeit neue neuronale Vorläuferzellen zu bilden, wenn sie den Gyrus dentatus erreicht haben. Diese zusätzliche, neu gebildete neurogene Nische im Hilus des Gyrus dentatus wird nach Altman und Bayer als tertiäre Matrix bezeichnet. Mehr als 80% der Körnerzellen des adulten Gyrus dentatus werden aus dieser tertiären Matrix postnatal in den ersten 4 Wochen gebildet, die eine eigene Radial-Glia Matrix entwickelt mit radial orientierten Fasern, entlang derer die neugeborenen Zellen aus dem Hilus in die sich ausbildende Körnerzellschicht wandern und sich hier zu reifen Körnerzellen differenzieren. Etwa am Tag P10 kommt es zu einer Reorganisation der tertiären Matrix sowie der Radial-Glia Zellen, die Position der proliferierenden Vorläuferzellen verschiebt sich aus dem Hilus in die sich bildende Subgranularschicht, die an der Grenze zwischen innerster Körnerzellschicht und Hilus lokalisiert ist. In dieser Subgranularschicht werden kontinuierlich bis in die adulte Phase hinein weitere Zellen in abnehmender Anzahl geboren, die die kurze Distanz in die Körnerzellschicht hineinwandern und in die sich ausbildenden neuronalen Verschaltungen funktionell integriert werden (Abb.1-2 B, C). Während der Morphogenese der Körnerzellen führt die radiale Migration der Zellen zu einem neurogenen Gradienten, so dass sich die „älteren“, in ihrer Reifung fortgeschrittenen Zellen im dorsalen (suprapyramidalen) Blatt der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus

befinden, während im ventralen (infrapyramidalen) Blatt die „jüngeren“ Zellen positioniert sind, die überwiegend erst postnatal aus der tertiären Matrix hervorgegangen sind (Nowakowski und Rakic, 1981; Eckenhoff und Rakic, 1984; Altmann und Bayer 1990).



**Abb.1-2 Schematische Darstellung der Morphogenese des Gyrus dentatus.**

Die Morphogenese des Gyrus dentatus umfasst folgende Entwicklungsschritte: (A) Bildung eines Pools an proliferierenden Vorläuferzellen (sekundäre Matrix, lila), die vom Neuroepithel (Ne) abstammen (Step 1). Innerhalb der Anlage des Gyrus dentatus wird von Cajal-Retzius und Radial-Glia Zellen ein primäres Radial-Glia-Faser-Gerüst ausgebildet (Step 2). Entlang dieser Radial-Glia Fasern wandern pränatal die ersten mitotischen und postmitotischen Zellen in die Anlage des Gyrus dentatus ein (1. Migrationswelle: E14.5-P5), wo sie sich zunächst im dorsalen (d) Blatt des Gyrus dentatus ansiedeln und hier zu reifen Körnerzellen ausdifferenzieren (Step 3). (B) Postnatal siedeln sich einwandernde, mitotische Progenitorzellen des Neurepithels verstärkt auch in der Hilusregion an (2. Migrationswelle). Diese Zellen im Hilus verbleiben im mitotischen Zustand, bilden somit eine sekundäre neurogene Nische (tertiäre Matrix, pink) innerhalb des Gyrus dentatus. Aus dieser gehen postnatal weitere Körnerzellen in hoher Anzahl hervor, die in die sich bildende Körnerzellschicht wandern und sich zu reifen Körnerzellen differenzieren (P0-P10; Step 4/5). (C) Spätesten am Tag P10 kommt es zu einer Reorganisation der tertiären Matrix: die Position mitotischer Progenitorzellen verschiebt sich aus der Hilusregion in die Subgranularschicht (SGS) zwischen Hilus und innerster Körnerzellschicht, wo weiterhin bis in die adulte Phase hinein Neurogenese in abnehmender Anzahl stattfindet (Step 6). Abbildung modifiziert nach: Li und Pleasure, 2004.

Diese ungewöhnliche und einzigartige Entwicklung des Gyrus dentatus, die die Etablierung einer sekundären neurogenen Nische im Hilus und später in der Subgranularschicht beinhaltet, in der die Proliferation von undifferenzierten Vorläuferzellen aufrecht erhalten bleibt, setzt eine spezifische und zeitlich aufeinander abgestimmte Expression verschiedener Entwicklungskontrollgene voraus, welche einerseits die fortgesetzte Proliferation der mitotischen Vorläuferzellen, andererseits die Migration und die weitere Differenzierung der neugeborenen unreifen Zellen zu funktionellen Neuronen steuern. Interessanterweise zeigt sich für eine wachsende Zahl dieser Signalmoleküle, dass sie ihre Funktionen nicht nur während der Entwicklung,

sondern auch während der aufrechtgehaltenen Neurogenese im adulten Gyrus dentatus ausüben (Pozniak und Pleasure, 2006).

Die frühen, initialen pränatalen Entwicklungsprozesse des Gyrus dentatus, die die Bildung einer neurogenen Nische an proliferierenden Vorläuferzellen aus einer speziellen Region des Neuroepithels (sekundäre Matrix) sowie die folgende Migration dieser Vorläuferzellen in die Anlage des Gyrus dentatus beinhalten, werden durch verschiedene morphogene Faktoren gesteuert, die überwiegend vom „cortical hem“ exprimiert werden. Diese Faktoren umfassen Mitglieder des Wnt-Signalwegs, wie Wnt3a oder Lef1 (Lee *et al.*, 2000; Galceran *et al.*, 2000, Zhou *et al.*, 2004a), Sonic Hedgehog (Machold *et al.*, 2003; Ahn und Joyner, 2005), der BMP Familie (Furuta *et al.*, 1997) sowie verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise die Homeobox-Gene Emx2 (Pellegrini *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 1997), Lhx2 (Bulchand *et al.*, 2001; Porter *et al.*, 1997) und Lhx5 (Zhao *et al.*, 1999). Für Wnt-Signale und Sonic Hedgehog konnten essentielle Funktionen auch während der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus nachgewiesen werden (Pozniak und Pleasure 2006; Lai *et al.*, 2003, Ahn und Joyner, 2005; Lie *et al.*, 2005).

Darüber hinaus stammen die meisten Cajal-Retzius Neurone vom cortical hem ab (Bielle *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006), die durch die Sekretion des Glycoproteins Reelin bei der Ausbildung des primären Radial-Glia-Fasergerüsts des Gyrus dentatus eine wichtige Rolle spielen. Dieses Fasergerüst ist essentiell für die Migration und korrekte Positionierung der unreifen Neurone im Gyrus dentatus. Reelin wird auch postnatal für die korrekte Reorganisation des Radial-Glia-Fasergerüsts nach Bildung der tertiären Matrix im Hilus bzw. in der Subgranularschicht benötigt. Bei Mutanten mit Defekten in der Reelin-Signalkaskade sind die Körnerzellen im Gyrus dentatus falsch positioniert. Anstatt eine kompakte Körnerzellschicht zu bilden, findet sich eine Körnerzelldispersion, bei der die Körnerzellen über den gesamten Gyrus dentatus verteilt sind (Stanfield *et al.*, 1979; Zhao *et al.*, 2004; Frotscher *et al.*, 2003).

Die terminale Differenzierung der unreifen Neurone zu funktionellen Körnerzellen erfolgt überwiegend während der postnatalen Entwicklung des Gyrus dentatus und umfasst die Ausbildung der axonalen Projektionen der Körnerzellen in Richtung der CA3 Region der Hippocampusrinde, die Dendritogenese in der Molekularschicht und die Ausbildung der synaptischen Verschaltungen. Die ersten funktionell ausgereiften Körnerzellen, die aus dem Neuroepithel stammen, sind ca. eine Woche nach der Geburt im dorsalen Blatt des Gyrus dentatus nachweisbar. Als weitgehend „abgeschlossen“ gilt die Entwicklung der

Körnerzellschicht vier Wochen nach der Geburt, wenngleich in der Subgranularschicht weiterhin adulte Neurogenese stattfindet (Jones *et al.*, 2003).

Ein Transkriptionsfaktor, der für die Spezifizierung und weitere Reifung der neugeborenen Vorläuferzellen zu Körnerzellen benötigt wird, ist NeuroD, ein „basic helix-loop-helix“-Protein. In NeuroD Mutanten wird keine Körnerzellschicht ausgebildet. Während die Bildung der ersten Population an Vorläuferzellen aus dem Neuroepithel und deren Migration zur Anlage des Gyrus dentatus weitgehend normal verläuft, ist die weitere terminale Differenzierung dieser unreifen Neurone, nachdem sie die Anlage des Gyrus dentatus erreicht haben, gestört. Darüber hinaus ist auch die Proliferation der einwandernden mitotischen Vorläuferzellen und die Bildung der tertiären Matrix beeinträchtigt, was zu einem vermehrtem Zelltod und einem fehlgebildeten Gyrus dentatus führt. Da nur eine kleine Subpopulation der mitotisch aktiven Vorläuferzellen NeuroD exprimieren, vermutet man, dass es sich bei der beeinträchtigten Proliferation der Vorläuferzellen um einen nicht-zellautonomen, sekundären Effekt der NeuroD Mutation handelt, der durch das Fehlen einer intakten Körnerzellschicht verursacht sein könnte (Liu *et al.*, 2000; Miyata *et al.*, 1999).

Ein weiterer Marker, der von neugeborenen, migrierenden und differenzierenden Neuronen exprimiert wird, ist Doublecortin (Dcx), ein Mikrotubulus-assoziiertes Protein (Francis *et al.*, 1999; Gleeson *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu NeuroD wird Dcx erst im postnatalen Gyrus dentatus in den Somata und auswachsenden Zellfortsätzen von unreifen Körnerzellen exprimiert und ist ein etablierter immunhistologischer Marker zur Analyse der Dendritenentwicklung der Körnerzellen (Kempermann *et al.*, 2004; Shapiro *et al.*, 2007; Bohlen und Halbach, 2007). Mutationen im Dcx Gen verursachen Migrationsdefekte, die eine gestörte Schichtenausbildung in der Hippocampusrinde zur Folge haben (Corbo *et al.*, 2002). Darüber hinaus übt Dcx auch wichtige Funktionen bei der Entwicklung der Dendriten hippocampaler Neurone aus (Cohen *et al.*, 2006).

Eine wichtige Bedeutung für die korrekte Dendritenentwicklung der unreifen Körnerzellen besitzt auch das Armadillo Protein  $\beta$ -Catenin. Dieses Signalmolekül steuert einerseits die Transkription von „downstream“-Zielgenen des Wnt-Signalwegs in mitotischen Progenitorzellen, deren Signale wiederum das Verhalten der mitotischen Progenitorzellen im postnatalen Gyrus dentatus beeinflussen (Lie *et al.*, 2005). Andererseits hat  $\beta$ -Catenin auch eine adhäsive Funktion bei der Ausbildung von Zellkontakten, die auch wichtig für die Stabilität von zytoskeletalen Elementen (wie z.B. Aktinfilamenten) sind. Die konditionelle Deletion von  $\beta$ -Catenin in postmitotischen, unreifen Körnerzellen

beeinträchtigt deren Dendritenentwicklung und verhindert die weitere Reifung dieser unreifen Neurone zu funktionellen Körnerzellen. Es wird vermutet, dass dieser Effekt wahrscheinlich weniger auf der Funktion von  $\beta$ -Catenin im Zellkern bei der Steuerung der Expression von Zielgenen der Wnt-Signalkaskade beruht, sondern eher auf seiner zytoplasmatischen, adhäsiven Funktion, die Einfluss auf das Mikrotubulus- und Aktinfilamentsystem haben könnte (Gao *et al.*, 2007).

Reife, ausdifferenzierte Körnerzellen sind schließlich durch die Expression des Calcium-bindenden Proteins Calbindin (Baimbridge, 1992) und des neuronalen Markers NeuN charakterisiert. Im Gegensatz zu Calbindin wird NeuN aber auch schon früher während der Differenzierungsphase von postmitotischen, unreifen Neuronen ausgeprägt (Kempermann *et al.*, 2004).

Aktive Neurogenese erfolgt in nur zwei Regionen des adulten Säugerhirns, in der Subgranularschicht (SGS) des Gyrus dentatus sowie in der Subventrikularzone (SVZ) des lateralen Ventrikels. Interessanterweise zeigte sich, dass die neurogenen Progenitorzellen der SGS und SVZ molekulare und strukturelle Merkmale von Astrozyten besitzen (Seri *et al.*, 2001), deren neurogenes Verhalten nicht nur durch intrinsische genetische Signale der Progenitorzellen gesteuert wird, sondern auch abhängig ist von extrinsischen Signalen aus der Umgebung (z.B. Neurotransmitter, Hormone, Wachstumsfaktoren, elektrische Aktivität). Auch pathologische Bedingungen, wie Gehirnverletzungen, Epilepsie oder neurodegenerative Krankheiten verändern das Verhalten der Progenitorzellen und beeinflussen die adulte Neurogenese (Ming und Song, 2005; Lledo *et al.*, 2006). Die funktionelle Bedeutung der adulten Neurogenese ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt. Eine zunehmende Anzahl an Verhaltensstudien an Nagetieren zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen der fortgesetzten Neurogenese im adulten Gyrus dentatus und der Hippocampusfunktion bei Lern- und Gedächtnisprozessen auf. Auf der einen Seite stimuliert der Aufenthalt von Nagetieren in einer komplexeren Umgebung, körperliche Aktivität, sowie spezifisches Lernen die adulte Neurogenese in diesen Mäusen (Kempermann *et al.*, 1997a; van Praag *et al.*, 1999; Gould *et al.*, 1997). Andererseits führt eine beeinträchtigte adulte Neurogenese zu Defiziten im Lernverhalten der Mäuse (Snyder *et al.*, 2005; Shors *et al.*, 2001).

### 1.3 Funktion des Hippocampus bei Lern- und Gedächtnisprozessen

Die ersten Hinweise einer Funktion des Hippocampus bei Lern- und Gedächtnisprozessen lieferte die Analyse des oft zitierten Amnesiepatienten H.M., der nach einer bilateralen Entfernung des Hippocampus und der angrenzenden medialen Temporallappenstrukturen nicht mehr in der Lage war, neue, bewusste Gedächtnisinhalte zu bilden, während die alten Erinnerungen erhalten blieben (Scoville und Milner, 1957). Spätere Studien zeigten, dass auch Läsionen, die ausschließlich auf Regionen des Hippocampus begrenzt waren, bei den betroffenen Patienten entsprechende Defizite bei der Bildung von deklarativen Gedächtnisinhalten verursachten (Zola-Morgan *et al.*, 1986; Vargha-Khadem *et al.*, 1997). Das deklarative (explizite oder „bewusste“) Gedächtnis speichert Tatsachen und Ereignisse und ist dem prozeduralen (impliziten) Gedächtnis gegenüber zu stellen, welches Fertigkeiten, bestimmte Verhaltensweisen und Erwartungen speichert und das Ergebnis von Konditionierungsvorgängen und „Priming“ ist, die das Verhalten ohne Einschaltung des Bewusstseins beeinflussen. Beide Gedächtnisarten werden dem Langzeitgedächtnis („reference memory“) zugeordnet. Deklarative Gedächtnisinhalte werden im Neocortex gespeichert, prozedurale in subcorticalen Bereichen (Kleinhirn, Basalganglien, Amygdala) (Milner *et al.*, 1998; Squire 1986). Durch neuropsychologische und elektrophysiologische Untersuchungen an Amnesiepatienten mit hippocampalen Läsionen sowie an Tier-Modellen wurden verschiedene Theorien bezüglich der genauen Funktion des Hippocampus bei Gedächtnisprozessen entwickelt. Bei allen hat der Hippocampus eine essentielle Funktion bei der Gedächtniskonsolidierung und somit bei Lernprozessen, d.h. bei der Überführung von neuen Informationen aus dem Kurzzeitgedächtnis (Arbeitsgedächtnis) in das deklarative (Langzeit-) Gedächtnis (Squire, 1986; Nadel und Moscovitch, 1997). Verhaltensexperimente an Nagetieren mit hippocampalen Läsionen zeigten eine weitere bedeutende Funktion des Hippocampus bei räumlichen Lern- und Gedächtnisprozessen auf (Aggleton *et al.*, 1986; Duva *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 1982; O’Keefe und Nadel 1978). In diesem Zusammenhang hat besonders die von O’Keefe und Nadel aufgestellte Theorie „The hippocampus as a cognitive map“ (1978) eine große Bedeutung erlangt. Nach dieser Theorie liegt die primäre Funktion des Hippocampus in der Konstruierung und Speicherung einer „inneren“ kognitiven Karte von der Umgebung, in der sich das Individuum aufhält, in der die Positionen von Objekten aus der Umgebung gespeichert werden und die der Orientierung im Raum dient. Diese Theorie basiert auf elektrophysiologischen Beobachtungen einer stark erhöhten Aktivität spezifischer

hippocampaler Neurone (Pyramidenzellen der CA1 und CA3 Region) in der Ratte, wenn sich diese in einer bestimmten Position ihrer Umgebung aufhält (O'Keefe und Dostrovsky, 1971; Fox und Ranck, 1975). Die Aktivität dieser hippocampalen Neurone, die als Ortszellen („place cells“) bezeichnet werden, ist direkt für die Aufnahme und auch permanente Speicherung der räumlichen Information aus der Umgebung verantwortlich.

Eine in der Verhaltensforschung erfolgreich etablierte Methode zur Analyse der Funktion des Hippocampus bei Lern- und Gedächtnisprozessen ist das Radiallabyrinth Experiment („radial-arm maze“), in dem das räumliche Lernverhalten von Nagetieren untersucht wird. Diese Experimente zeigten, dass das Verhalten der Tiere in unterschiedlichen „radial maze“ Experimenten oft nur unzureichend mit der „cognitive map“ Theorie zu erklären ist. Olton *et al.* (1979) stellte die Hypothese auf, dass der Hippocampus hauptsächlich die Funktion eines Arbeitsgedächtnisses („working-memory“) hat, indem Informationen, unabhängig davon, ob es sich um räumliche oder nicht-räumliche handelt, transient gespeichert werden. Beide Theorien haben nach wie vor eine große Bedeutung in der Verhaltensforschung und je nach experimentellem Aufbau lassen sich die unterschiedlichen Aspekte der Funktionen des Hippocampus bei Lern- und Gedächtnisprozessen (räumliches/nicht-räumliches Lernen, Arbeitsgedächtnis, Gedächtniskonsolidierung bzw. Langzeitgedächtnis) in „maze“ Experimenten untersuchen (Bolhuis *et al.*, 1986; Nadel und McDonald, 1980; Schwegler *et al.*, 1990).

## 1.4 Der Transkriptionsfaktor Bcl11b

Bcl11b kodiert für einen hoch konservierten C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (Cystein<sub>2</sub>-Histidin<sub>2</sub>) Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der durch sechs, für die DNA-Bindung essentielle Zinkfingerdomänen charakterisiert ist. Bcl11b wurde ursprünglich als ein Protein identifiziert, welches direkt mit Mitgliedern der COUP-TF Familie (chicken ovalbumin upstream promotor transcription factor) von sog. orphan nuclear receptors interagiert, welche in Folge die Transkription hemmen. Bcl11b wird daher auch als Ctip2 (COU**P**-TF interacting protein 2) bezeichnet (Avram *et al.*, 2000). Mitglieder der COUP-TF Familie haben bedeutende Funktionen bei der Regulation der Zell Migration im basalen Telencephalon sowie bei der Bildung der kommissuralen Projektionen, indem sie das axonale Wachstum steuern (Tripodi *et al.*, 2004; Armentano *et al.*, 2006).

Bcl11b kann aber auch direkt DNA Sequenzen spezifisch binden und somit unabhängig von COUP-TFs die Transkription regulieren (Avram *et al.*, 2002). Bcl11b zeigt eine hohe

Sequenzübereinstimmung (95% in der Peptidsequenz der Zinkfingerdomänen) zum verwandten Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Bcl11a (Ctip1). In transienten Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass beide Proteine dieselbe Konsensus DNA-Sequenz binden und die Transkription von Reportergenen hemmen können (Avram *et al.*, 2002).

Bcl11b wird sowohl während der Entwicklung als auch postnatal in verschiedenen Regionen des ZNS exprimiert: im Hippocampus, in den tieferen Schichten des Kortex, im Striatum, im Bulbus olfactorius, in den Basalganglien, im dorsalen Rückenmark, im Cerebellum und in der Amygdala. Außerhalb des Nervensystems wird Bcl11b hauptsächlich im Thymus exprimiert (Leid *et al.*, 2004).

Bcl11b Null-Mutanten sterben kurz nach der Geburt, die Ursachen sind nicht bekannt. Auch über die spezifischen Funktionen, die der Transkriptionsfaktor Bcl11b während der Entwicklung und postnatal in den verschiedenen Regionen des ZNS ausübt, ist bisher relativ wenig bekannt. Im Neocortex ist Bcl11b essentiell für die Differenzierung von Pyramidenzellen der tieferen Kortexschichten (Lamina V). Bcl11b steuert die Entwicklung der subkortikalen axonalen Projektionen von Neuronen (CSMN, corticospinal motor neurons), die über den Tractus corticospinalis zum Rückenmark projizieren (Arlotta *et al.*, 2005). In Neuronen höherer Kortexschichten (Lamina III), deren Axone kortiko-kortikale Verbindungen z.B. über den Corpus callosum zur kontralateralen Hemisphäre bilden, wird die Expression von Bcl11b durch den Transkriptionsfaktor Satb2 gehemmt. In Satb2 Mutanten induziert die ektopische Expression von Bcl11b in Neuronen der Lamina III eine fehlerhafte Differenzierung zu Projektionsfasern des Tractus corticospinalis und hemmt die Entwicklung von kortiko-kortikalen Projektionen (Alcamo *et al.*, 2008; Britanova *et al.*, 2008). Des Weiteren wird Bcl11b für die Integrität der Zellarchitektur des Striatums benötigt und ist essentiell für die Differenzierung bestimmter Neuronentypen (MSN, medium spiny neurons) des Striatums (Arlotta *et al.*, 2008). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Funktionsverlust von Bcl11b im Striatum wahrscheinlich zur Pathologie der Huntington Krankheit beiträgt. Bcl11b ist vermutlich an der transkriptionellen Regulation von Genen des Striatums involviert, die eine deregulierte Expression in dieser neurodegenerativen Krankheit zeigen (Desplats *et al.*, 2008). Über spezifische Funktionen von Bcl11b während der Entwicklung des Hippocampus ist bisher nichts publiziert.

Darüber hinaus besitzt Bcl11b auch eine essentielle Funktion bei der Lymphozytopoese. Die phänotypische Analyse von Bcl11b knock-out Mäusen zeigte, dass das Zinkfingerprotein für die Differenzierung und das Überleben bestimmter Subpopulationen

von T-Lymphozyten benötigt wird (Wakabayashi *et al.*, 2003a). Außerdem wird für Bcl11b im Immunsystem die Funktion eines Tumorsuppressors diskutiert. Eine gestörte Expression von Bcl11b ist mit der Entwicklung von lymphatischen Krebserkrankungen sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen assoziiert (Wakabayashi *et al.*, 2003b; Kamimura *et al.*, 2007).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bcl11b kodiert für einen hochkonservierten Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der während der Entwicklung und postnatal in verschiedenen Regionen des ZNS exprimiert wird. Über seine Funktionen im Hippocampus ist bisher nichts bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der Funktion von Bcl11b während der Entwicklung des Hippocampus mit Hilfe von Mäusen, in denen Bcl11b konditionell im Vorderhirn deletiert wird. Mittels morphologischer und immunhistologischer Methoden soll der Phänotyp der Bcl11b Mutation im Hippocampus dieser Mäuse während der Entwicklung untersucht werden. Hierbei sollen verschiedene Aspekte der Entwicklung hippocampaler Neurone in Bcl11b Mutanten und Kontrolltieren vergleichend analysiert werden, wie zum Beispiel die Proliferation der Vorläuferzellen, die Differenzierung und das Überleben der neuronalen Zellen.

Ferner soll eine genomweite Expressionsanalyse von Bcl11b-defizientem und Wildtyp-Gewebe genutzt werden, um differentiell exprimierte Gene im Hippocampus der Mutanten zu identifizieren. Ziel dieses Experiments ist die Identifizierung von potentiellen Targetgenen von Bcl11b, deren Expression durch diesen Transkriptionsfaktor reguliert wird und die möglicherweise zur Aufklärung der molekularen Mechanismen von Bcl11b im Hippocampus beitragen.

Da der Hippocampus wichtige Funktionen bei Lern- und Gedächtnisprozessen besitzt, soll des Weiteren durch verschiedene Verhaltensexperimente untersucht werden, ob der Funktionsverlust von Bcl11b im Hippocampus das emotionale und kognitive Verhalten der Mäuse beeinflusst.

Ich erwarte, dass meine Untersuchungen zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen, die der Entwicklung und adulten Biologie des Hippocampus zugrunde liegen, beitragen werden. Ich hoffe, dass die verbesserte Kenntnis der genauen Funktionen des Hippocampus auch zu einem erweiterten Verständnis von Krankheiten führt, die mit strukturellen und/oder funktionellen Schädigungen des Hippocampus einhergehen.