

Aus dem Institut für Zell- und Neurobiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Molekulare Expressionsmuster bei der Ausbildung
kommissuraler Verbindungen des Großhirns und ihre Störungen
nach *Sip1*-Knockout**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Madhuri Monique Rudolph
aus Berlin

Datum der Promotion: 10. März 2017

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	1
ABSTRACT	4
1. English.....	4
2. Deutsch.....	5
EINLEITUNG.....	7
1. Struktur des Neocortex.....	7
2. Entwicklung des Neocortex	8
3. Differenzierung der Vorläuferzellen	10
4. Satb2 und Ctip2 als Zellmarker corticaler Schichten.....	12
5. Neocorticale Projektionen	12
6. Mechanismen der Axonwegfindung	13
7. Struktur und Funktion des Corpus callosum	15
8. Entwicklung des Corpus callosum	15
9. Sip1 als Transkriptionsfaktor	17
10. Die Rolle von <i>Sip1</i> in der Entwicklung des ZNS.....	18
11. Sip1 als Regulator des corticalen Feedback-Mechanismus	19
12. Sip1 als Regulator bei der Axonwegfindung und Corpus callosum-Formation	20
13. <i>Sip1</i> und das Mowat-Wilson-Syndrom	20
14. Zielsetzung dieser Arbeit	21
METHODIK.....	22
1. Mausmutanten	22
2. Genotypisierung	22
3. Gewebepräparation und -verarbeitung	23
4. Nissl-Färbung	24
5. Immunhistochemie	25
6. Liste der primären Antikörper.....	25
7. Bildgewinnung und -analyse	26
8. Plasmidklonierung.....	26
9. Liste der verwendeten Plasmide.....	30
10. In-Utero-Elektroporation.....	31
11. In-situ-Hybridisierung.....	32
ERGEBNISSE.....	35

1. Bedeutung des <i>Sip1</i> in der Bildung des Corpus callosum.....	35
1.1 Die Entwicklung kommissuraler Faserverbindungen ist beim konditionalen <i>Sip1</i> Knockout dramatisch verzögert und reduziert.	35
1.2 Die Entwicklung von Gliapopulationen der Mittellinie ist im konditionalen <i>Sip1</i> Knockout verzögert und reduziert.	39
1.3 <i>Nrp1</i> zeigt im konditionalen <i>Sip1</i> Knockout ein stark verändertes Expressionsmuster	42
1.4 Überexpression von <i>Nrp1</i> in cingulären Neuronen beeinflusst die callosale Axonwegfindung nicht.	44
1.5 Die Expression von <i>Sema3c</i> ist in der Mittellinie des konditionalen <i>Sip1</i> Knockouts reduziert, im Bereich des subcallosalen Slings fehlt sie komplett	46
1.6 Die verminderte Expression von <i>Sema3c</i> ist ein Effekt von nicht-zellautonomen Veränderungen im konditionalen <i>Sip1</i> -Knockout.....	48
1.7 Andere in der Axonwegfindung chemotaktisch aktive Moleküle zeigen im konditionalen <i>Sip1</i> Knockout ein verändertes Expressionslevel.....	50
2. Bedeutung des <i>Sip1</i> in der Architektur des Neocortex	53
2.1 <i>Wnt5a</i> ist im konditionalen <i>Sip1</i> Knockout in den oberen Cortexschichten hochreguliert.....	53
2.2 Überexpression von <i>Wnt5a</i> in corticalen Neuronen verursacht keine Veränderungen der corticalen Architektur im Sinne einer Verschiebung hin zu oberflächlichen Schichten	55
2.3 <i>Ldb3</i> zeigt keine spezifische Hochregulation.....	57
2.4 Expressionsmuster von <i>Ripk4</i> und <i>Elovl7</i> konnten nicht aufgezeigt werden.....	58
DISKUSSION	59
1. Callosale Axone überqueren im konditionalen <i>Sip1</i> Knockout nicht die Mittellinie.	59
2. Eine verzögerte und unvollständige Fusion der Mittellinie kann zur Agenesie des Corpus callosum bei <i>Sip1</i> -Deletion führen.	61
3. Die reduzierte und zum Teil ausbleibende Entwicklung glialer Populationen kann zur Agenesie des Corpus callosum bei <i>Sip1</i> -Deletion führen.	62
4. Der <i>Sip1</i> Knockout weist ein Fehlen der <i>Sema3c</i> -Expression im Bereich des subcallosalen Slings auf	64
5. <i>Nrp1</i> ist möglicherweise ein downstream target von <i>Sip1</i> , das entscheidend zur Agenesie des Corpus callosum bei <i>Sip1</i> -Deletion beiträgt.	65
6. <i>NfiA</i> , <i>NfiB</i> , <i>Nrp2</i> und <i>Slit1</i> werden nicht oder unspezifisch durch <i>Sip1</i> reguliert.	67

7. Wnt5a bewirkt wahrscheinlich nicht die durch <i>Sip1</i> -Deletion verursachten, charakteristischen Veränderungen der corticalen Architektur.	68
8. Limitationen des <i>Sip1</i> Knockout-Modells.....	69
9. Neue Erkenntnisse und Ausblick	70
LITERATURVERZEICHNIS	71
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	87
LEBENS LAUF	88
DANKSAGUNG.....	89

ABSTRACT

1. English

The transcription factor Sip1 (Smad-interacting protein 1) is involved in the genesis of Mowat-Wilson syndrome in humans. By analyzing a neocortex-specific conditional knockout mouse, it has been shown that Sip1 regulates the cell fate switch of cortical progenitors as a transcriptional repressor. Among many deficits the knockout shows an agenesis of the corpus callosum, but the mechanisms of this development have been unidentified. In this work possible downstream targets and mechanisms of Sip1, causing an agenesis of the corpus callosum and an altered cortical architecture in the conditional knockout, have been investigated.

Using immunohistochemistry and in situ hybridisation we show that Sip1 controls the formation of GFAP⁺ glial midline structures. These cell populations express guiding molecules, that attract or repel callosal axons, thereby playing an integral role in the formation of the corpus callosum. The midline fails to fuse in the mutant, probably due to the lack of Midline Zipper Glia, constituting another hindrance for crossing axons. Using in situ hybridisation we found a dramatically altered expression of Neuropilin1 (Nrp1) in the knockout. Nrp1 was therefore identified to be a possible downstream target of Sip1 causing altered growth of pioneering callosal axons. Prior investigations by our group suggested, that Sema3c might be a relevant downstream target of Sip1 and that its expression was completely lost in the mutant due to cell-intrinsic effects. We show however that Sema3c is downregulated in the knockout due to cell-extrinsic effects. Wnt5a has been suggested to be a downstream target of Sip1 causing an altered cortical architecture. By overexpressing Wnt5a in cortical cells using in utero electroporation we did not find any significant evidence, that Wnt5a controls cortical cell fate switch and architecture.

Sip1 influences the formation of glial midline structures, the midline fusion and the expression of midline guidance cues thereby controlling corpus callosum formation through various mechanisms. By our analysis we could exclude several possible candidates for direct and defining downstream targets (Sema3c, Wnt5a and others) and found another candidate (Nrp1) to be further investigated.

2. Deutsch

Mutationen im Transkriptionsfaktor Sip1 (Smad-interacting protein 1) können beim Menschen das Mowat-Wilson-Syndrom auslösen. Durch Analyse einer Neocortex-spezifischen konditionalen Sip1 Knockout-Maus wurde gezeigt, dass Sip1 die Corticogenese als Transkriptionsrepressor reguliert. Neben einer Vielzahl von Störungen weist der Sip1 Knockout eine Agenesie des Corpus callosum auf, wobei die Mechanismen, die zu dieser gestörten Entwicklung führen, noch ungeklärt sind. In dieser Arbeit wurden mögliche downstream-Signalkaskaden und -Mechanismen von Sip1 untersucht, die die Agenesie des Corpus callosum sowie die veränderte corticale Architektur im konditionalen Sip1 Knockout herbeiführen könnten.

Durch Immunhistochemie und In-Situ-Hybridisierung konnten wir zeigen, dass Sip1 die Bildung GFAP-positiver Mittellinienglia kontrolliert. Diese glialen Zellpopulationen exprimieren Signalmoleküle, die als Chemoattractanten oder -repellent auf callosale Axone wirken, und spielen damit eine integrale Rolle in der Bildung des Corpus callosum. Die Fusion der Mittellinie bleibt (wahrscheinlich aufgrund der Reduktion der Midline Zipper Glia) im Gehirn des Knockouts aus, was ein weiteres Hindernis für kreuzende Axone darstellt. Mittels In-Situ-Hybridisierung konnten wir eine dramatisch veränderte Expression von Neuropilin1 (Nrp1) im Knockout feststellen. Nrp1 wurde somit als neues mögliches downstream target von Sip1 identifiziert, das ein verändertes Wachstumsverhalten von Pionieraxonen hervorrufen könnte. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe legten nahe, dass Sema3c ein relevantes downstream target von Sip1 sein könnte, da die Expression von Sema3c durch zellintrinsische Effekte im Knockout komplett ausbleibe. Wir konnten dies jedoch widerlegen, indem wir zeigten, dass Sema3c durch zellextrinsische Effekte herabreguliert ist. Weiterhin galt Wnt5a als Kandidat für mögliche downstream targets von Sip1, die die Corticogenese kontrollieren. Indem wir Wnt5a in corticalen Zellen durch In-utero-Elektroporation überexprimierten, konnten wir jedoch keine signifikanten Hinweise darauf finden, dass Wnt5a die Corticogenese und die corticale Architektur steuert.

Sip1 beeinflusst also die Bildung glialer Strukturen der Mittellinie, die Fusion der Mittellinie sowie die Expression vieler callosal relevanter Signalmoleküle und kontrolliert so die Bildung des Corpus callosum. Durch unsere Analysen konnten wir einige Kandidaten für entscheidende und direkte downstream targets von Sip1 ausschließen (Sema3c, Wnt5a und

andere) und einen anderen Kandidaten (Nrp1) identifizieren, der weiter untersucht werden sollte.

EINLEITUNG

Der Neocortex der Säugetiere wird als biologisches Substrat kognitiver Fähigkeiten angesehen (1). Er ist der evolutionsgeschichtlich jüngste Teil des Cortex und ist verantwortlich für die Verarbeitung von sensorischen Reizen verschiedener Modalitäten, die Steuerung motorischer Aktionen sowie für höhere kognitive Funktionen. So bildet der Neocortex im Menschen das Zentrum für abstraktes Denken, Sprache und andere kognitive Funktionen, die uns von weniger entwickelten Spezies unterscheiden. Deshalb wird der Neocortex oft als krönende Errungenschaft der Evolution angesehen (2).

Die Betrachtung der Entwicklung des Neocortex ist nicht nur essentiell für ein genaues Verständnis dieser Cortexfunktionen sondern auch für die Aufschlüsselung der Ätiologie und möglicherweise Therapie vieler Entwicklungsstörungen des Gehirns (3).

1. Struktur des Neocortex

Es lassen sich prinzipiell zwei Typen von Neuronen unterscheiden: Interneurone und Projektionsneurone. Interneurone sind meist hemmender Natur und ihre Axone verbinden lokal Neurone miteinander. Sie entstammen der subpallialen (ventralen) Zone des Telencephalon und migrieren dann in den Neocortex (4, 5, 6). Projektionsneurone sind exzitatorisch und reichen mit ihren Axonen weit in andere Zonen des Cortex oder gar in andere Bereiche des Zentralnervensystems hinein. Sie stammen von Vorläuferzellen der pallialen (dorsalen) proliferativen Zone ab (7, 8). Diese Typen von Neuronen können weiterhin in viele verschiedene Subtypen unterschieden werden.

Histologisch lassen sich im Neocortex sechs Schichten unterscheiden, in denen sich die Neurone bezüglich Morphologie und Funktion zum großen Teil gleichen (9):

- Die **Lamina VI** (Stratum multiforme) ist die innerste Schicht des Neocortex und besteht aus corticothalamischen Projektionsneuronen, die den Cortex mit Nuclei des Thalamus verbinden.
- Richtung Pia schließt sich die **Lamina V** (Stratum pyramidale internum) an, die von den Pyramidenzellen gebildet wird. Diese weisen eine typische Morphologie mit großem pyramidalen Zellkörper, mehreren Dendriten und einem langen basalen Axon auf. Die Pyramidenzellen sind die efferenten Zellen des Großhirns. Sie lassen sich je nach Projektionsziel in zwei Gruppen unterteilen: Corticofugale und callosale Projektionsneurone. Die **corticofugalen Neuronen der Lamina V** exprimieren unter anderem den Zellmarker Ctip2 und projizieren mit ihren Axonen aus dem Cortex zu

subcorticalen Strukturen. Darunter bilden die corticospinalen Neuronen eine große Gruppe. Diese projizieren ins Rückenmark und leiten somit Informationen aus dem Gehirn zu subcerebralen Strukturen weiter. Corticofugale Neurone der Lamina V projizieren auch zu den Colliculi superiores, zu Kernen der Pons und zum Striatum. Die **callosalen Projektionsneurone der Lamina V** dagegen bilden corticocorticale Verbindungen, indem sie durch das Corpus callosum die beiden Hemisphären miteinander verbinden. Die callosalen Neurone exprimieren kein Ctip2, aber den Zellmarker Satb2, der wie Ctip2 als Transkriptionsfaktor fungiert.

Lamina VI und V bilden zusammen die **tiefen Schichten des Neocortex**.

- **Lamina IV** (Stratum granulosum internum) wird von den sogenannten Körnerzellen gebildet, die einen runden Zelleib und viele bedornete Dendriten aufweisen. Diese stellen die afferenten Zellen des Cortex dar, da sie vor allem Informationen aus dem Thalamus erhalten.
- In **Lamina III** (Stratum pyrimidale externum) und **Lamina II** (Stratum granulosum externum) befinden sich kleinere Pyramiden- und Körnerzellen. Diese projizieren intracortical entweder innerhalb einer Hemisphäre oder aber zu Cortexarealen der kontralateralen Hemisphäre. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Übertragung und Integration von Informationen verschiedener Cortexareale. Beide werden als **oberflächliche Schichten des Neocortex** zusammengefasst.
- Die **Lamina I** (Stratum moleculare) ist eine zellarme Schicht, die die apikalen Dendriten der neocorticalen Neurone und die Cajal-Retzius-Zellen beinhaltet. Letztere entstammen außercorticalen Vorläuferzellen und produzieren unter anderem Reelin, das eine wichtige Rolle in der Corticogenese spielt.

2. Entwicklung des Neocortex

Neocorticale Projektionsneurone entstammen einer Vorläuferzellpopulation aus radialen Gliazellen, die dorsal an die Seitenventrikel angrenzen und so die sogenannte Ventrikuläre Zone bilden (10, 11, 12). Sie entstammen einer frühen Population neuroepithelialer Zellen, die vorher die Ventrikuläre Zone besiedeln und mit Beginn der Corticogenese die radialen Gliazellen entstehen lassen. Diese radialen Gliazellen behalten einige epitheliale Eigenschaften bei, wie eine starke basoapikale Polarität und die Expression epithelialer Marker wie Nestin. Gleichzeitig gewinnen sie astrogliale Eigenschaften, so exprimieren sie beispielsweise das Saure Gliafaserprotein (GFAP). Die radialen Gliazellen, die auch als apikale Vorläuferzellen bezeichnet werden, können durch symmetrische Zellteilung zwei

weitere Vorläufer hervorbringen. Durch asymmetrische Teilung dagegen bringen sie eine Vorläuferzelle und ein Neuron hervor (13, 14, 15). Dabei ragt die radiale Glia von der ventrikulären bis zur pialen Oberfläche und bildet so ein Gerüst für nach pial migrierende Neurone (16, 17). Aus der radialen Glia entstehen aber nicht nur Neurone, Oligodendrozyten und Astrozyten des Cortex, sondern auch eine weitere Vorläuferpopulation: die basalen Vorläufer. Sie bilden die Subventrikuläre Zone und unterscheiden sich von den apikalen Vorläufern durch das Fehlen eines apikalen Fortsatzes (18, 19, 20). Diese basalen Vorläufer lassen hauptsächlich Neurone durch symmetrische Teilung entstehen und erhöhen so die Zahl der generierten Neurone pro radiale Gliazelle (14, 21, 22, 23, 24). Obwohl gezeigt wurde, dass basale Vorläuferzellen die Fähigkeit besitzen, alle Schichten des Cortex zu produzieren, wird davon ausgegangen, dass sie hauptsächlich zur Produktion der oberflächlichen Schichten beitragen (21, 25, 26, 27).

Vorläuferzellen produzieren sequentiell die verschiedenen Schichten des Neocortex. Dabei werden zuerst die inneren Schichten gebildet, danach die äußeren. So müssen jüngere Neurone vorbei an vorher geborenen Neuronen migrieren, um zu ihrer Position in den äußeren Schichten zu gelangen. Dieser Prozess wird unter dem Stichwort „inside first – outside last“ zusammengefasst (28, 29). Neurone der Lamina VI, der innersten Schicht, werden in der Maus zwischen E11.5 und E13.5 gebildet, der Höhepunkt der Produktion befindet sich um E12.5. Lamina V wird zwischen E12.5 und E14.5 gebildet, mit einem Höhepunkt um E13.5. Die Produktion der Lamina IV findet zwischen E13.5 und E14.5 statt, danach folgt die Genese der Laminae II und III zwischen E14.5 und E16.5, mit einem Höhepunkt um E15.5. Die Cajal-Retzius-Zellen der Lamina I entstammen nicht den corticalen Vorläuferzellen. Einen Überblick über die Corticogenese gibt Abb. 1.

So ist es doch erstaunlich, wie in Bezug auf Morphologie und Funktion so heterogene Neuronengruppen aus einer relativ homogenen Vorläuferpopulation hervorgehen können. Die Vorläuferzellen müssen für diese sequentielle Produktion unterschiedlicher Populationen schrittweise von einem zum jeweils nächsten Differenzierungsweg der folgenden Population wechseln.

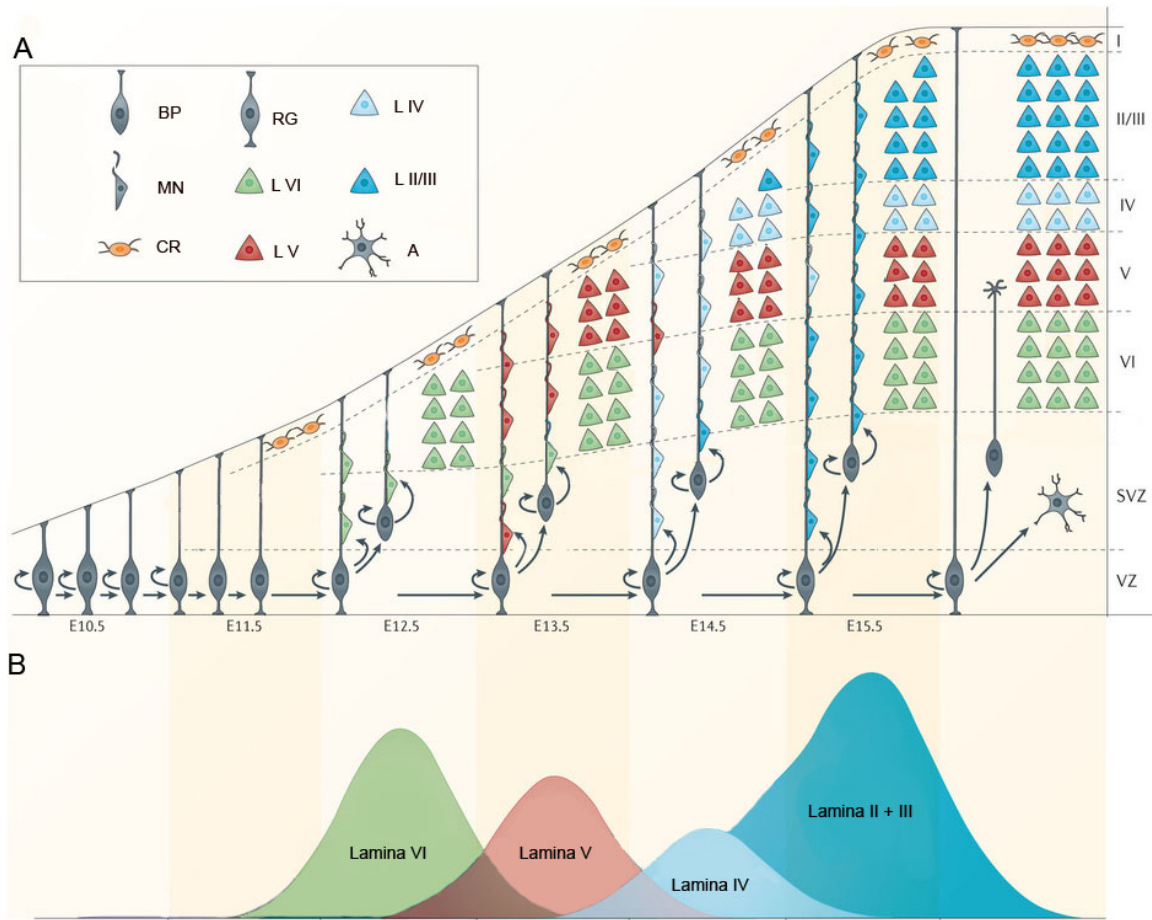


Abb. 1. Neocorticale Neurone werden nach dem „inside first-outside last“-Schema durch Vorläuferzellen in der (Sub-)Ventrikulären Zone produziert. Dieses Schema, vereinfacht nach Greig et al., 2013 (9), zeigt die sequentielle Produktion der verschiedenen Schichten neocorticaler Neurone und ihre Migration zu ihren jeweiligen finalen Positionen. **(A)** Die radiale Glia (RG) in der Ventrikulären Zone (VZ) beginnt um den Tag E11.5 corticale Projektionsneurone zu bilden. Gleichzeitig werden basale Vorläuferzellen (BP) gebildet, die die Subventrikuläre Zone (SVZ) bilden. Nach Abschluss der Neurogenese folgt die Gliogenese, bei der Astrozyten (A) und Oligodendrozyten gebildet werden. Cajal-Retzius-Zellen (CR) entstammen nicht-corticalen Zellen und migrieren in die Lamina I. Andere Neurone dagegen werden in der Ventrikulären oder Subventrikulären Zone gebildet und migrieren dann entlang der Fortsätze der radialen Glia zu ihrer jeweiligen laminaren Position. Migrierendes Neuron = MN. **(B)** Neurone unterschiedlicher Schichten werden in sequentiellen Wellen produziert. Die Höhe der Wellen ist proportional zur ungefähren Anzahl der pro Tag geborenen Neurone des jeweiligen Subtyps.

3. Differenzierung der Vorläuferzellen

Wie läuft diese sequentielle Produktion verschiedener Neuronenpopulationen aus den Vorläuferzellen also ab? *In-Vitro*-Experimente haben gezeigt, dass isolierte corticale

Vorläuferzellen in der Lage sind, die sequentielle Produktion der Neuronenpopulationen so zu rekapitulieren, wie sie für die *in-vivo*-Corticogenese typisch ist (30). Dies spricht dafür, dass der Prozess der Corticogenese in die Vorläuferzelle einprogrammiert ist. Ein weit verbreitetes Modell der Differenzierung der Vorläuferzellen besagt, dass alle Projektionsneurone aus einer Linie von Vorläufern stammen, die im Zuge der fortschreitenden Entwicklung schrittweise ihre Multipotenz verlieren. Nach Abschluss der Produktion eines Neuronensubtyps wird die Vorläuferzelle also in ihrer Kompetenz, unterschiedliche Zelltypen zu produzieren, beschränkt. So zeigten Transplantationsexperimente, dass späte Vorläuferzellen, die in einen jüngeren Cortex implantiert wurden, nicht in der Lage sind, die für ihre neue Umgebung angemessenen Neuronensubtypen zu produzieren. Andererseits können frühe Vorläuferzellen, die in einen älteren Cortex implantiert wurden, zuverlässig die für die neue Umgebung angemessenen Neuronensubtypen produzieren (31). Diese Experimente unterstützen einerseits das Modell des progressiven Potenzverlusts, andererseits machen sie deutlich, dass die Umgebung den Potenzverlust beschleunigen kann. Nach diesem Modell ist der Differenzierungsweg der Vorläuferzelle also selbstprogrammiert, wird dabei aber stark von der Umgebung beeinflusst.

Ein alternatives Modell der Differenzierung der Vorläuferzelle legt nahe, dass unterschiedliche, bereits differenzierte Linien von Vorläuferzellen jeweils bestimmte Neuronensubtypen produzieren. So wurde vor Kurzem gezeigt, dass Cux2-positive Vorläuferzellen in der frühen Corticogenese hauptsächlich proliferative Teilungen durchgehen, um dann in der späten Phase durch neurogene Teilungen die oberflächlichen Schichten des Cortex zu generieren (32). Auf Basis dieser und weiterer Experimente werden je nach Kontext die beiden hier präsentierten Modellen benutzt. Weitergehende Untersuchungen sind notwendig, um in dieser Frage Klarheit über die genaue Differenzierungsweise der Vorläuferzellen zu geben.

Untersuchungen unserer und anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass postmitotische Neuronen über einen negativen Feedback-Mechanismus die Produktion weiterer Neuronen desgleichen Typs hemmen (33). Dieser Mechanismus konnte beim Wechsel von Neuro- zu Gliogenese bestätigt werden. Dies legt aber auch nahe, dass ein ähnlicher Mechanismus bei der sequentiellen Produktion der Neuronenschichten aktiv sein könnte. So würden postmitotische Neuronen einer Schicht die Vorläuferzelle durch ein negatives Signal an der weiteren Produktion dieser Schicht hemmen, sodass die Vorläuferzelle die nächste Schicht zu produzieren anfängt. Dies würde die Überproduktion von Neuronen eines Subtyps verhindern und den Differenzierungswechsel zum richtigen Zeitpunkt ermöglichen. Bisher konnte die

Existenz dieses Feedback-Mechanismus bei der Neurogenese der verschiedenen Schichten jedoch nicht formal bewiesen werden.

4. Satb2 und Ctip2 als Zellmarker corticaler Schichten

Die Transkriptionsfaktoren Satb2 und Ctip2 werden in bestimmten neuronalen Subtypen exprimiert und können deshalb als Marker der corticalen Schichten fungieren. Satb2 gilt als Marker oberflächlicher Schichten (34). Die Expression von Satb2 beginnt am Tag E13.5 in den oberflächlichen Schichten, die Mehrheit Satb2-positiver Zellen wird dann zwischen E14.5 und E15.5 produziert. Ctip2 wird in frühen Entwicklungsstadien von vielen corticalen Zellen exprimiert, später in der Entwicklung ist die Expression von Ctip2 auf Neuronen der Lamina V, die ins Rückenmark oder ins Tectum projizieren, eingegrenzt (34).

5. Neocorticale Projektionen

Während neuronale Subtypen zu ihren jeweiligen Positionen im Cortex migrieren, projizieren sie ihre Axone zu verschiedenen Zielregionen. Diese Faserbündel bilden die weiße Substanz des ZNS. Fasern können grob in zwei Gruppen eingeteilt werden: Corticofugale und corticocorticale Projektionen. Corticofugale Projektionsneurone senden ihre Axone weg vom Cortex zu subcorticalen oder gar subcerebralen Strukturen. So bilden sie den corticothalamischen Trakt, der Nervenfasern zum Thalamus führt, und den corticospinalen Trakt, der Nervenfasern ins Rückenmark leitet. Vom corticospinalen Trakt zweigen während der Entwicklung einzelne Faserbündel zu Zielregionen im Hirnstamm ab. Die Gruppe der corticocorticalen Projektionen verbindet einerseits intrahemisphärisch verschiedene Cortexareale miteinander, andererseits werden Kommissuren gebildet, die zur kontralateralen Hemisphäre ziehen (Abb. 2). Diese werden aus Axonen von Neuronen der Schichten II und III, zum kleineren Teil auch der Schicht V gespeist. Zu den neocorticalen Kommissuren gehören der Balken oder das Corpus callosum und die Commissura anterior. Weiterhin bilden Axone der hippocampalen Neurone die Commissura hippocampi, die die Hippocampi beider Hirnhemisphären miteinander verbindet. Eine weitere nicht-neocorticale Projektion bildet der thalamocorticale Trakt, der vom Thalamus in den Neocortex projiziert.

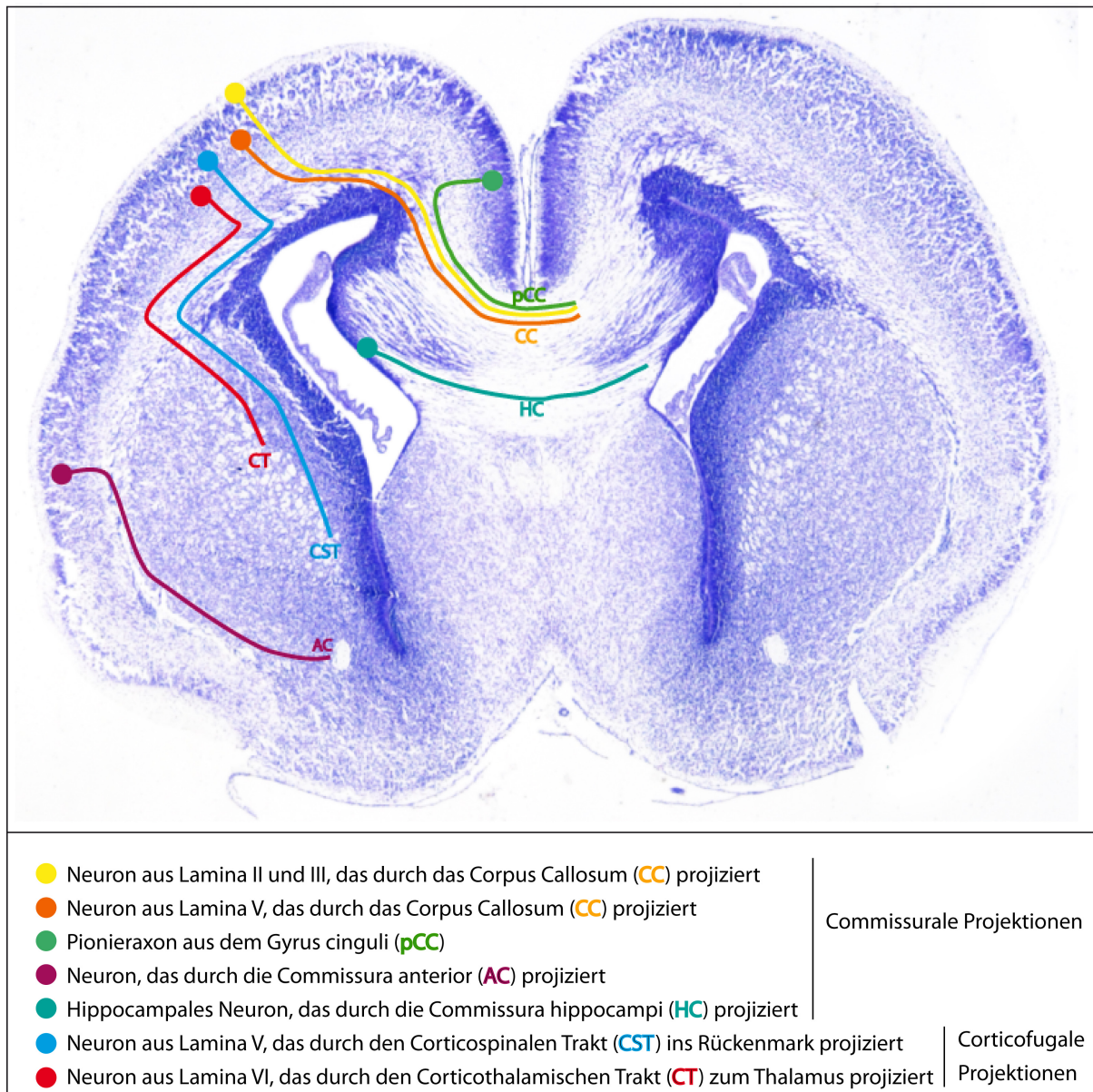


Abb. 2. Wichtige Projektionen des Cortex

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der wichtigsten corticalen Projektionswege. Das Corpus callosum (CC), die Commissura hippocampi (HC) und die Commissura anterior (AC) bilden die commissuralen Projektionen, die die beiden Hemisphären miteinander verbinden. Der corticothalamische Trakt und der corticospinale Trakt gehören dagegen zu den corticofugalen Projektionen, die die corticalen Neuronen mit subcorticalen Strukturen verbinden.

6. Mechanismen der Axonwegfindung

Welche Mechanismen führen also dazu, dass Projektionsneurone ihre Axone zielgerichtet zu weit entfernten Zielpunkten senden können? Die Axonwegfindung ist ein hoch präziser und gerichteter Prozess, der sich in verschiedene Phasen aufteilen lässt: Zunächst durchqueren die wachsenden Axone weite Distanzen, um zu ihrer Zielregion zu gelangen. Dabei passieren sie

mehrere Weggabelungen, bleiben aber fehlerfrei auf ihrer Route. Nach Erreichen der Zielregion nehmen die Axone Kontakt mit den Zielneuronengruppen auf und bilden erste Synapsen. Dieses Muster von Synapsen wird schließlich verfeinert, indem die Axone sich zurückziehen und wieder auswachsen, um die genauen Zielzellen zu erreichen (35). Dabei wird die Spitze des wachsenden Axons, der Wachstumskegel, durch mindestens vier verschiedene Mechanismen gesteuert: Kontaktattraktion und -repulsion und Chemoattraktion und -repulsion (36). Diese aktivitätsunabhängige Steuerung spielt vor allem in der ersten Phase der Axonavigation eine dominierende Rolle, später bei der Verfeinerung der neuronalen Synapsen dominieren andere aktivitätsabhängige Mechanismen. Aktivitätsabhängige Mechanismen der Remodellierung neuronaler Konnektivität bleiben auch nach Abschluss der Entwicklung aktiv und sind verantwortlich für die lebenslange neuronale Plastizität des Gehirns (37).

In dieser Arbeit soll es jedoch um die aktivitätsunabhängigen Mechanismen gehen. Diese werden durch eine Vielzahl an Molekülen gesteuert, sezernierte Botenstoffe einerseits und membranständige Rezeptoren auf den Axonen andererseits. Durch Rezeptor-Liganden-Interaktion kann entweder eine Attraktion oder eine Repulsion des Wachstumskegels resultieren. Die Kombination verschiedener Rezeptor-Liganden-Paare und damit der verschiedenen auf den Wachstumskegel wirkenden Signale kontrolliert letztendlich die Wachstumsrichtung des Axons. Auch die Lokalisierung und Polarisierung der Rezeptoren im Neuron bestimmt wesentlich die spätere Wachstumsachse (38). Die wichtigsten Rezeptor-Liganden-Paare, die in der Axonwegfindung aktiv sind, sind Netrine mit ihren Rezeptoren UNC-40/DCC und UNC-5, Slits mit ihren Rezeptoren Robo/SAX-3, Semaphorine mit ihren Plexin- und Neuropilinrezeptoren und Ephrine mit ihren Ephrinrezeptoren (38).

Als unterstützender Mechanismus der Axonwegfindung fungieren weiterhin die sogenannten Pionieraxone. Diese bahnen früh in der Entwicklung den Weg für folgenden Axone, indem sie als erste Neurone ihre Axone den entsprechenden Weg durchqueren lassen (39). Dabei weisen sie ein langsames Wachstum und eine komplexe Struktur und Dynamik des Wachstumskegels auf. Folgende Neurone gliedern ihre Axone an die Pionieraxone an und weisen ein wesentlich schnelleres Wachstum und eine weniger komplexe Struktur des Wachstumskegels auf (40).

Einen anderen unterstützenden Mechanismus stellen die Wegweiser-Strukturen („guideposts“) dar (41). Dabei handelt es sich meist um gliale Strukturen, die auf dem Axonweg ein Zwischenziel darstellen, indem sie Chemoattractanten bzw. -repellentien sezernieren, auf die der Wachstumskegel reagiert.

7. Struktur und Funktion des Corpus callosum

Die größte verbindende Struktur des Gehirns ist das Corpus callosum, das mit über 190 Millionen Axonen die beiden Hemisphären miteinander verbindet (42). Das Corpus callosum verbindet sowohl homotope als auch heterotope Regionen der Hemisphären, sodass Informationen beider Hirnhälften integriert, aber auch inhibiert werden können.

Die Funktion des Corpus callosum konnte anfänglich anhand von Patienten mit Split Brain erforscht werden, bei denen aufgrund von ausgeprägter Epilepsie eine Callosotomie durchgeführt worden war. Aber auch eine Reihe genetischer Störungen verursacht im Menschen Syndrome, die mit einer Agenesie des Corpus callosum einhergehen. Diese bezeichnet das komplette oder partielle Fehlen des Corpus callosum. Die Funktion und Bildung des Corpus callosum konnte anhand dieser Patientenkohorte untersucht werden. Unterschiedlichste Mutationen konnten hierbei identifiziert werden, was zeigt, dass Störungen in verschiedenen Mechanismen neuronaler Entwicklung in einer fehlerhaften Bildung des Corpus callosum resultieren können (43). Obwohl die Funktion des interhemisphärischen Transfers bei diesen Patienten teilweise von der Commissura anterior übernommen werden kann, präsentieren sich die Patienten mit einer Reihe Verhaltens- und neuropsychiatrischer Störungen. So zeigen sie Schwierigkeiten im abstrakten Denken und Problemlösen, erschwertes Verständnis komplexer Sprachstrukturen wie Sprichwörter oder Humor, Störungen der sozialen Kompetenz und fehlende Introspektion (43).

8. Entwicklung des Corpus callosum

Das Corpus callosum erscheint in der Maus am Tag E17 (44). Die Zellkörper callosaler Neuronen befinden sich bei der Maus hauptsächlich in Lamina II und III, teilweise auch in Lamina V.

Bereits am Tag E15.5 bahnen erste Pionieraxone aus dem Gyrus cinguli den Weg für folgende callosale Projektionsneurone (45). Diese Pionieraxone exprimieren den Neuropilinrezeptor 1 auf ihrer Oberfläche (46).

Verschiedene GFAP-positive Gliapopulationen der sich entwickelnden Mittellinie spielen ebenfalls eine wesentliche Rolle bei der Bildung des Corpus callosum (Abb. 3). Eine davon stellt die Keilglia (Glial Wedge, GW) dar. Dabei handelt sich um eine bilaterale keilförmige Population von radialen Gliazellen, die ventral vom Corpus callosum und medial von den Seitenventrikeln angeordnet ist. Sie befindet sich an der corticoseptalen Grenze und verhindert das Eintreten callosaler Axone durch das Septum. Nach Überqueren der Mittellinie werden die Axone zusätzlich durch Repellentien, die die Keilglia sezerniert, in die

contralaterale Hemisphäre gedrängt (47, 48). Axonwegfindungsmechanismen werden im Falle der Keilglia über Slit-Robo- und Wnt-Ryk-Interaktionen übermittelt (47, 48, 49).

Eine weitere Gliapopulation der Mittellinie, die Midline Zipper Glia, ist weiter ventral im Bereich der septalen Mittellinie lokalisiert. Ihre Funktion besteht in der Fusion der Mittellinie. Diese stellt dorsal eine morphologische Voraussetzung für das Kreuzen callosaler Neurone dar. Zwischen E14.5 und E15.5 fusioniert die ventrale Mittellinie, während die dorsale Mittellinie noch durch Bindegewebe getrennt ist. Für die Fusion der dorsalen Mittellinie fusionieren die Basallaminae, während das Bindegewebe rückgebildet und durch Nervengewebe ersetzt wird. So wird die Mittellinie wie bei einem Reißverschluss von ventral nach dorsal verschlossen, was den Namen der Midline Zipper Glia, die diesen Prozess reguliert, erklärt (50).

Eine dritte Gliapopulation der Mittellinie ist das Indusium griseum, das dorsal dem Corpus callosum anliegt. Es wird angenommen, dass sich das Indusium griseum aus der Midline Zipper Glia entwickelt. Die Glia des Indusium griseums exprimiert wie auch die Keilglia Slit-2 und hat so eine repulsive Wirkung auf Robo-1 und 2 exprimierende Axone. Es wird angenommen, dass diese Glia die typische U-förmige Wendung der callosalen Axone reguliert (51).

Eine andere Struktur, die wesentlich zur Bildung des Corpus callosum beiträgt, wird durch die Neurone des subcallosalen Slings gebildet (Abb. 3). Dieser ist dorsal der Keilglia und ventral des Corpus callosum lokalisiert. Die Zellen des subcallosalen Slings exprimieren in der Maus neuronale Marker wie NeuN und Calretinin und werden deshalb als Neurone klassifiziert (52). Beim Menschen besteht ein Großteil des subcallosalen Slings dagegen aus Glia. Obwohl die ersten Axone vor der Bildung des subcallosalen Slings, der in der Maus am Tag E15.5 aus der dorsalen Subventrikulären Zone entsteht, bereits kreuzen, konnte gezeigt werden, dass bei experimentellem Ausschalten des Slings die Bildung des Corpus callosum ausbleibt (50). Daher wird davon ausgegangen, dass auch diese Zellpopulation einen wesentlichen Beitrag zum Kreuzen der callosalen Axone leistet. So exprimieren die Sling-Neurone Sema3c, das als Chemoattractant auf Nrp1-exprimierende Pionieraxone wirkt.

Weiterhin konnten zusätzliche Neurone innerhalb des Corpus callosum identifiziert werden, die eine Rolle bei der Axonwegfindung eine Rolle spielen könnten (53)

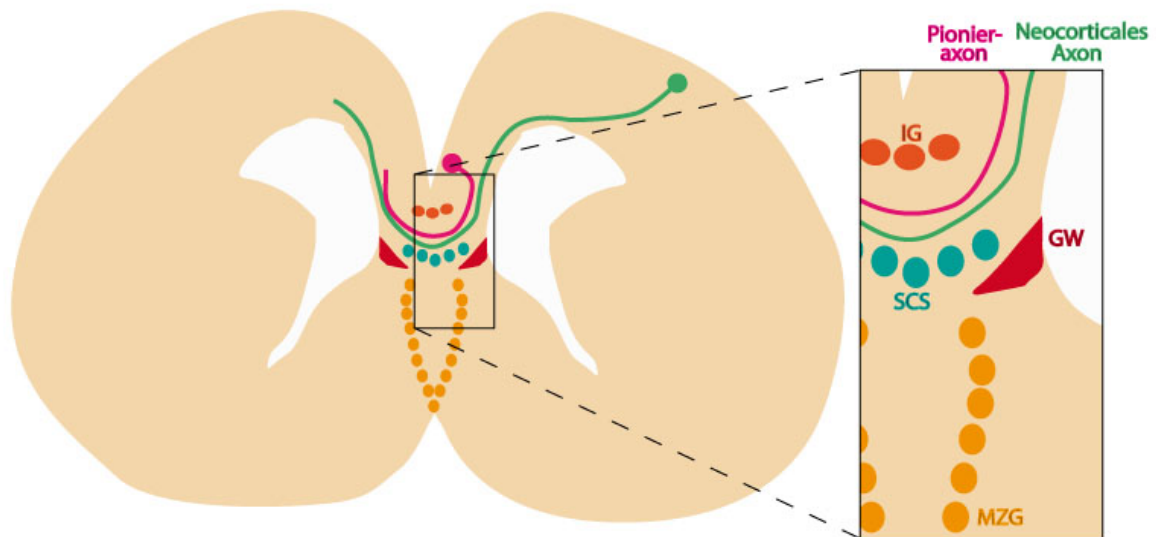


Abb. 3. Gliale und neuronale Strukturen der Mittellinie tragen zur Bildung des Corpus callosum bei.

Abbildung nach Paul et al. 2007 (43). Gliale Strukturen der Mittellinie, wie die Keilglia (Glial Wedge, GW), das Indusium griseum (IG) und die Midline Zipper Glia (MZG), tragen entscheidend zur Corpus callosum-Formation bei. Pionieraxone, die als erste Axone den Weg für folgende callosale Axone bahnen, tragen den Rezeptor Nrp1 und entstammen dem Gyrus cinguli. Die Neuronen des subcallosalen Slings tragen ebenfalls zur Bildung des Corpus callosum bei, zum Beispiel durch Sekretion von Sema3c.

9. Sip1 als Transkriptionsfaktor

Sip1 oder smad-interacting-protein-1 (auch ZFHX1b oder ZEB2) ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, der zur Gruppe der Zink Finger Homöobox 1 (ZFHX1)-Proteine gehört. Diese Proteine zeichnen sich durch zwei Cluster aus multiplen Zinkfingern aus: eines am N-Terminus, das andere am C-Terminus des Proteins. Verbunden werden diese Cluster durch eine Homöodomän-artige-Sequenz. Eine Homöodomäne, die auf DNA-Ebene durch die Homöobox codiert wird, zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, an DNA zu binden. Im Falle von Sip1 wird diese Fähigkeit durch die flankierenden Zinkfinger augmentiert. Es konnte gezeigt werden, dass Sip1 mithilfe der Zinkfingerdomänen an eine zweiteilige 5'-CACCT(G)-Sequenz im Promotor des Zielgens bindet und so die Transkription reguliert (54). Zusammen mit δ EF1 oder delta-crystallin enhancer binding factor 1 (auch ZEB1 oder Zfhx1a) bildet Sip1 die einzigen beiden Vertreter der ZFHX1-Proteine (55). Sip1 bindet an SMAD-Proteine, die als intrazelluläre Mediatoren fungieren, indem sie extrazelluläre Signale an den Nucleus weiterleiten (56). Dies geschieht durch Aktivierung des TGF β -Signalwegs. Dabei binden

extrazelluläre Proteine der TGF β -Familie an einen membranständigen TypII-Rezeptor. Dieser Rezeptor-Ligand-Komplex aktiviert dann einen TypI-Rezeptor und bildet zusammen mit diesem einen heteromeren Komplex (57). Bei beiden Rezeptoren handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen. Durch Aktivierung der Kinasen werden rezeptorregulierte (R-) SMAD-Proteine aktiviert, die schließlich über den Mediator co-SMAD einerseits direkt mit DNA interagieren können andererseits die intranukleäre Bindung von Sip1 an SMAD-Proteine ermöglichen (56, 58). Es konnte gezeigt werden, dass Sip1 den BMP- und TGF β -Signalweg reguliert, indem die Transkription wichtiger Zielgene dieser Signalwege reprimiert wird. Bindung des Corepressors CtBP (C-terminales Bindungsprotein) unterstützt diese Repression (58). Auch konnte eine Interaktion mit dem NuRD-Komplex gezeigt werden, die die Genrepression reguliert (59). Weiterhin interagiert Sip1 mit den Coaktivatoren p300 und pCAF (60). Obwohl Sip1 hauptsächlich als Transkriptionsrepressor fungiert (58), besitzt es auch die Fähigkeit Gene in bestimmten Kontexten zu aktivieren, auch in Abwesenheit der SMAD-Proteine (61). Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass Sip1 eine komplexe regulative Funktion auf die Transkription verschiedener Gene hat.

10. Die Rolle von *Sip1* in der Entwicklung des ZNS

In der sich entwickelnden Maus sind die höchsten Konzentrationen von Sip1 im Zentralen Nervensystem, aber auch in anderen Geweben wie Leber, Darm, Auge, Skelettmuskel und Thymus zu finden (62). Eine Expression von *Sip1* konnte in der Maus bereits in frühen Stadien um E8.5 gezeigt werden. Diese ist in der Neuralplatte und im paraxialen Mesoderm lokalisiert (63). Die komplette Deletion von *Sip1* in homozygoten Knockout-Mäusen führt zu multiplen Defekten ab Tag E8.5. Die Mäuse zeigen Neuralrohrdefekte, durchlaufen nicht die Wendung von der S- zur C-Form, zeigen eine dramatische Wachstumsretardierung um E9.5 und sterben kurz darauf. Heterozygote Knockout-Mäuse zeigen dagegen keine Abweichungen vom Wildtyp. Analyse der homozygoten Knockout-Embryonen zeigte, dass Sip1 eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Neuroepithels, der Neuralplatte sowie der vagalen und kranialen Neuralleistenzellen spielt (64).

Aufgrund des frühen Todes der Knockout-Mäuse wurde eine konditionale Mausmutante gezüchtet. Diese wurde entweder mit Nex-Cre oder Emx1-Cre gekreuzt, sodass Sip1 ausschließlich in der Großhirnrinde ausgeschaltet wurde. Folgen dieser Deletion sind unter anderem Mikrocephalus, Verlust des Hippokampus, geringfügiger Hydrocephalus und Verlust des Corpus callosum (65).

Weitergehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an dieser konditionalen Knockout-Maus ergaben, dass Sip1 eine essentielle Rolle in der Bildung des Hippocampus spielt, indem es den Wnt-Signalweg reguliert. Deletion von Sip1 verursacht vermehrte Apoptose und verminderte Proliferation der Zellen im Hippocampus (65). Sip1 spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Myelinisierung von Nervenfasern im ZNS (66). Weiterhin ist Sip1 stark in der Retina und in der Linsenplakode exprimiert. Deletion von Sip1 resultiert hier in einer dramatischen Entwicklungsstörung der Linse (61). Zudem wurde eine wichtige Rolle von Sip1 in der Entwicklung von Interneuronen belegt (67).

11. Sip1 als Regulator des corticalen Feedback-Mechanismus

Expressionsanalysen ergaben, dass *Sip1* am Tag E12.5 in postmitotischen Zellen des sich entwickelnden Telencephalon exprimiert wird, während es in der Ventrikulären Zone gar nicht oder nur schwach exprimiert wird (65). Mit wachsender Anzahl postmitotischer Zellen steigt entsprechend die Intensität der *Sip1*-Expression. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe deckten die Funktion von Sip1 im corticalen Feedback-Mechanismus auf. *Sip1*-Deletion im konditionalen Knockout führt zu einer Reduktion der tiefen kortikalen Neuronenschichten und einer Verdickung oberflächlicher Schichten. Ursache hierfür ist ein vorzeitiger Shift von der Produktion tiefer Schichten zur Produktion oberflächlicher Schichten von Neuronen. So werden Neuronen oberflächlicher Schichten auf Kosten der tiefen Schichten gebildet. Später in der Entwicklung folgt ein vorzeitiges Ende der Neurogenese und ein vorzeitiger Beginn der Gliogenese (33). Auf Grundlage dessen wurde die Hypothese aufgestellt, dass Sip1 in corticalen post-mitotischen Neuronen ein Feedback-Signal zu den Vorläuferzellen kontrolliert, das die Differenzierung letzterer verändert. Bei *Sip1*-Deletion sind diese Signale vorzeitig aktiv, was zu einem vorzeitigem Differenzierungswechsel der Vorläuferzellen führt. Diese Hypothese konnte teilweise bestätigt werden. So konnte gezeigt werden, dass Sip1 die Expression von *Fgf9* reguliert, das von postmitotischen Neuronen exprimiert wird und die Vorläuferzellen zum Switch von Neuro- zu Gliogenese anregt. Außerdem wurde gezeigt, dass Sip1 die Expression des Neurotrophins *Ntf3* inhibiert. Durch Sip1-Deletion resultiert eine Überexprimierung von *Ntf3*, das Signale an die Vorläuferzellen weitergibt und einen Shift von apikalen zu basalen Vorläuferzellen und damit die Produktion von Neuronen oberflächlicher Schichten bewirkt (68). Deletion von *Ntf3* kann den Phänotyp des Sip1-Knockouts jedoch nicht komplementieren, was die Existenz weiterer Signalwege nahelegt. Es wird deshalb angenommen, dass Sip1 als postmitotischer Transkriptionsrepressor den corticalen Feedback-Mechanismus über verschiedene Mechanismen kontrolliert.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den downstream-Signalweg dieser Wirkung von Sip1 weitergehend zu untersuchen.

12. Sip1 als Regulator bei der Axonwegfindung und Corpus callosum-Formation

Wie vorher beschrieben sind in der Axonwegfindung verschiedene komplexe Mechanismen aktiv, die die Expression von Liganden, Rezeptoren und anderen Proteinen erfordern. Für die korrekte Steuerung des Axons muss die Expression dieser Moleküle streng reguliert werden, damit sie am richtigen Ort und zum richtigen Zeitpunkt sowohl in den Neuronen als auch in der Umgebung exprimiert werden können. Hier spielen Transkriptionsfaktoren eine wesentliche Rolle. So ist zum Beispiel der Transkriptionsfaktor *Satb2* essentiell für die Bildung des Corpus callosum (69). Auch Sip1 spielt anscheinend eine wichtige Rolle: Im konditionalen Sip1-Knockout bleibt die Bildung des Corpus callosum und der Commissura anterior aus. Auch corticofugale Projektionen, wie die corticospinalen Bahnen, sind betroffen. Einzig der corticothalamische Trakt bleibt unbetroffen (70). Es konnte gezeigt werden, dass Sip1 die Formation des Corpus callosum kontrolliert: Deletion von *Sip1* bewirkt im *Sip1* Knockout eine veränderte kortikale Mittellinie, die kreuzende Axone behindert. Aber auch zell-autonome Mosaikdeletion einzelner Neurone bewirkt ein Ausbleiben der Bildung callsoal kreuzender Axone. Ein identifiziertes downstream target ist das Protein Ninein (70). Ninein bindet Mikrotubuli, verankert und positioniert diese und könnte eine wichtige Rolle im Wachstum des Axonwachstumkegels spielen (70).

13. *Sip1* und das Mowat-Wilson-Syndrom

Das Mowat-Wilson-Syndrom ist eine seltene genetische Krankheit, die durch geistige und körperliche Retardierung sowie zerebrale Krampfanfälle gekennzeichnet ist (71). Klinisch zeigt sich das Syndrom sehr vielgestaltig, so kann es mit einem Morbus Hirschsprung, mit Ventrikelseptumdefekten, Mikrozephalie, Agenesie des Corpus callosum, Epilepsie, Strabismus, Hypospadie und anderen Symptomen einhergehen (72). Typisch ist meist auch eine Gesichtsdysmorphie, wobei eine Progenie mit offen stehendem Mund, ein okulärer Hypertelorismus, eine breite Nasenwurzel sowie ein verkürztes Philtrum auffallen. 2001 fanden zwei unabhängige Gruppen die Ursache dieser Krankheit in der Mutation oder Deletion des *Sip1*-Gens (73, 74).

Betroffene Kinder tragen eine heterozygote Mutation, diese wird autosomal dominant vererbt. Inzwischen wurde eine Vielzahl von klinischen Fallstudien mit entsprechenden Genanalysen

veröffentlicht, die die kausale Rolle von *Sip1*-Mutationen in der Ätiologie des Mowat-Wilson-Syndroms bestätigen (75, 76, 77, 78, 79). So wird die klinische Relevanz der Erforschung der Funktion von *Sip1* deutlich.

14. Zielsetzung dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten die morphologischen Veränderungen der Mittellinie im konditionalen *Sip1* Knockout in Bezug auf frühe Entwicklungsstadien untersucht werden. Bisher lagen entsprechende Daten lediglich für E18 oder später vor (70). Gleiches gilt für Daten bezüglich glialer Populationen der Mittellinie. Außerdem sollte die Expression verschiedener Proteine, die in der Corpus callosum-Bildung eine Rolle spielen, im *Sip1*-Knockout auf Änderungen getestet werden und so downstream targets von Sip1, die möglicherweise zur Agenesie des Corpus callosum beitragen könnten, aufgedeckt werden. Weiterhin sollten mögliche downstream targets von Sip1, die die Veränderungen in der Schichtung des Neocortex hervorrufen, gefunden bzw. ausgeschlossen werden.

METHODIK

1. Mausmutanten

Die Experimente, die Arbeiten mit Mäusen einschlossen, wurden nach den Richtlinien des Landesamts für Gesundheit und Soziales, Berlin durchgeführt und die gesetzmäßige Zulässigkeit wurde überprüft. Geschlechtsreife Tiere wurden verpaart. Sobald ein morgendlicher vaginaler Plug auftrat, wurden die Tiere getrennt. Dieser Tag wurde als Embryonaler Tag E 0.5 betrachtet. Für die Experimente an Wildtyp-Mäusen wurden Tiere des Stammes „NMRI“ verpaart und ihre Embryonen (weibliche und männliche) verwendet.

Die konditionalen *Sip1* Knockout-Mäuse wurden von Higashi et al. generiert (80). Diese tragen ein von Lox-P-Stellen flankiertes Exon 7 des *Sip1* Allels. Nach durch Cre-Rekombinase vermittelter Exzision dieses Exons wird das resultierende Protein inaktiv. Um konditionale Knockouts zu generieren, bei denen *Sip1* in den postmitotischen Zellen des Neocortex inaktiv ist, wurden *Sip1^{fl/fl}* Mäuse mit *Nex^{Cre}* Mäusen verpaart (81). In *Nex^{Cre}* Mäusen ist die Cre-Rekombinase abhängig vom *Nex*-Promotor exprimiert. Der *Nex*-Promotor ist hauptsächlich in Zellen des Neokortex aktiv, was die Expression von Cre in genau dieser Zellpopulation ermöglicht. Dagegen bleibt das Sip1-Protein in anderen Zellen des Organismus intakt. Mäuse dieser Kreuzung, die den Genotyp *Sip1^{fl/wt} Nex^{Cre}* trugen, wurden als Elterntiere verpaart, um die konditionalen Knockouts mit dem Genotyp *Sip1^{fl/fl} Nex^{Cre}* zu generieren. Die Genotypen *Sip1^{fl/wt} Nex^{wt/wt}*, *Sip1^{fl/fl} Nex^{wt/wt}*, *Sip1^{fl/wt} Nex^{Cre}*, zeigen keinen Unterschied zum Phänotyp des Wildtyps und wurden deshalb als Kontrollen verwendet.

2. Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Mäuse und Mausembryonen wurden Schwanzbiopsien entnommen, die in 300µl Lyse-Puffer (100mM Tris-HCl pH 8,5; 5mM EDTA; 200mM NaCl; 0,2% SDS; 100µg/ml Proteinase K) bei 55°C für mind. 2h oder über Nacht unter Schütteln inkubiert wurden. Nach Lyse des Gewebes erfolgte bei adulten Schwanzbiopsien die Zentrifugation bei 9000 rpm für 5 Minuten. Zum Überstand wurden dann 300µl Isopropanol zugefügt, kräftig gemischt und bei 13 000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Die hierdurch gefällte DNA wurde vom Überstand befreit, in 80% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 100-200µl sterilem, destilliertem Wasser resuspendiert.

Die Genotypisierung der gewonnenen DNA erfolgte mittels PCR in folgendem Reaktionsansatz:

4µl 5x Buffer (Promega)
 0.4µl 10mM dNTPs (Invitrogen)
 0.4µl 10nmol/ml Forward Primer
 0.4µl 10nmol/ml Reverse Primer
 0.5U GoTAQ Polymerase (Promega)
 1µl Template DNA, 0.1µg/µl
 mit ddH₂O auf ein gesamtes Volumen von 20 µl

Für die PCR des geflochten bzw. Wildtyp-Sip1-Allels und des Cre-Allels wurden folgende Primer und Reaktionen verwendet:

	Sip1-Allel	Cre-Allel
Forward Primer	5' TGGACAGGAACTTGCATATGCT 3'	5' TCGATGCAACGAGTGATGAG 3'
Reverse Primer	5' GTGGACTCTACATTCTAGATGC 3'	5' TTCGGCTATACGTAACAGGG 3'
Amplifikationsprogramm	Denaturierung: 94°C- 10'' Annealing: 59°C- 20'' Elongation: 72°C- 40'' 31 Zyklen	Denaturierung: 94°C- 10'' Annealing: 55°C- 30'' Elongation: 72°C- 40'' 30 Zyklen
DNA-Produkt	Für das Wildtyp-Allel ergibt sich ein DNA-Produkt von ~450bp Länge, für das geflochte Allel ~600bp.	Falls mind. ein Cre-Allel vorhanden ist, ergibt sich ein DNA-Produkt von ~500bp Länge.

Das Reaktionsgemisch wurde nach der Amplifikation gelelektrophoretisch in einem 1%igen Agarose-Gel, das mit 0.01% SERVA DNA Stain G versetzt wurde, aufgetrennt, sodass die DNA-Banden ausgewertet werden konnten.

3. Gewebepräparation und -verarbeitung

Zur Gewebegewinnung für In-Situ-Hybridisationen wurden alle verwendeten Lösungen mit 1ml DEPC/l versetzt, bei 37°C mit offenem Deckel unter einem Abzug inkubiert und autoklaviert. Die trächtigen Weibchen wurden am gewünschten Gestationstag mit Avertin betäubt und per zervikaler Dislokation euthanisiert. Die Embryonen wurden aus dem Uterus in eiskaltes PBS präpariert und die Gehirne isoliert. Diese wurden dann in 4% PFA in PBS für 2-4 Stunden (E14.5-E16.5) oder 4-8 Stunden (E16.5-E18.5) fixiert. Nach zweimaligem

Waschen in 1xPBS wurden die Gehirne entweder für Kryoschnitte oder Paraffinschnitte aufbereitet:

Für Kryoschnitte wurde das Gewebe zunächst jeweils 5-8 Stunden in 15%, dann 30% Saccharose bei 4°C inkubiert. Das Gewebe wurde solange in der jeweiligen Saccharoselösung inkubiert, bis es an den Boden des Nöpfchen gesunken war. Diese Equilibrierung in 30%iger Saccharose diente zur Kryoprotektion. Daraufhin wurden die Gehirne einmal in O.C.T. (TissueTek) gewaschen und in eine mit O.C.T. gefüllte Einbettform platziert, die dann auf Trockeneis gefroren und bei -80°C (für In Situ Hybridisationen) bzw. -20°C (für Immunhistochemie) gelagert wurde. Die gefrorenen Blöcke wurden mit einem Leica Kryotom in ca. 15-20µm dicke Schnitte geschnitten und auf Superfrost Plus Objektträgern (Menzel-Gläser) aufgebracht.

Für Paraffinschnitte wurden die Gehirne nach der Fixierung über Nacht bei 4°C in PBS inkubiert und durchliefen anschließend eine Ethanolreihe zur schrittweisen Dehydratation nach folgendem Schema: Das Gewebe wurde für jeweils mindestens 2 Stunden in 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% und 100%igem Ethanol getaucht, gefolgt von einer 2-3 stündigen Inkubation in Isopropanol. Anschließend wurde das Gewebe für 6 Stunden in Toluol inkubiert. Darauf folgten zwei Paraplast-Wachs-Inkubationen für jeweils mind. 6 Stunden oder über Nacht bei 60°C. Die Gehirne wurden dann in Paraplast-Wachs eingebettet und über Nacht bei 4°C bis zur vollständigen Festigung gekühlt. Die entstandenen Paraplastblöcke wurden mit einem Leica Mikrotom in 5-10µm dicke Schnitte geschnitten und auf silanbeschichteten Objektträgern (Marienfeld Histobond) aufgebracht.

4. Nissl-Färbung

Für Nissl-Färbungen wurden Paraffinschnitte verwendet. Dazu wurden die Schnitte zunächst zweimal für 10 Minuten in Xylol entwacht und durch eine in der Konzentration absteigende Ethanolreihe (100%, 90%, 70%, 50%) für jeweils 2 Minuten rehydriert. Das Gewebe wurde für 2 Minuten in doppelt destilliertem Wasser gewaschen und für 15 Minuten in 50%igem Kaliumdisulfit, das vorher zur besseren Lösung erwärmt und gerührt wurde, getaucht. Nach zwei jeweils einminütigen Waschgängen in Wasser folgte die Färbung in Kresylviolett (1,5% in Essigsäure-Acetat-Puffer) für 20-30 Minuten. Darauf folgten zwei jeweils einminütige Waschgänge in Acetatpuffer (10mM Natriumacetat, 10mM Essigsäure in H₂O). Die Schnitte wurden dann kurz (für ca. 10 Sekunden oder je nach gewünschter Farbtintensität) in Differenzierungspuffer (0,14% Essigsäure) getaucht. Nach Waschen in Wasser wurde das Gewebe dann wieder dehydriert, indem es 2 Minuten in 70% Ethanol und zweimal für jeweils

2 Minuten in 100% Ethanol inkubiert wurde. Es folgte eine Inkubation in Xylol für 10 Minuten und die Befestigung mit dem hydrophoben Medium Eukitt und einer Deckplatte.

5. Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie auf Paraffinschnitten wurden die Schnitte zunächst in Xylol entwachst und durch eine in der Konzentration absteigende Ethanolreihe (100%-30%) für jeweils 2 Minuten rehydriert. Nach 10 minütigem Waschen in PBS folgte die hitzevermittelte Antigendemaskierung. Dazu wurden die Schnitte in einer Mikrowelle in vorerhitzter 0,96%iger Antigendemaskierungslösung (Antigen Unmasking Solution, Vector Labs) für 3 Minuten gekocht. Die Lösung wurde dann auf 50°C heruntergekühlt, wieder für 3 Minuten gekocht und abschließend auf Raumtemperatur heruntergekühlt.

Für Kryoschnitte war diese Vorbehandlung nicht notwendig, die Schnitte wurden vor der Färbung lediglich auf Raumtemperatur erwärmt und getrocknet.

Vorbereitete Paraffin- oder Kryoschnitte wurden nach 10 minütigem Waschen in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blocklösung (2% Bovines Serum Albumin, 0,3% TritonX-100 in PBS) zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen des Gewebes inkubiert. Die primären Antikörper wurden in dieser Blocklösung gelöst, auf das Gewebe aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden die Objektträger viermal für 2, 3, 5 und 10 Minuten in PBS gewaschen und dann für eine Stunde bei Raumtemperatur in Alexa Fluor- oder Dylight Fluor - markierten sekundären Antikörpern (1:500 in Blocklösung, Molecular Probes oder Jackson Immunoresearch) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS für jeweils 10 Minuten wurden die Schnitte für 10 Minuten in Hoechst Dye 33342 (SIGMA, 1:500) oder DRAQ5 (1:1000, Ebiosciences) inkubiert und mit DAKO Cytomation-Medium und einer Deckplatte befestigt.

6. Liste der primären Antikörper

Folgende primäre Antikörper wurden verwendet:

Antigen	Spezies	Verdünnung	Firma
Ctip2	Ratte	1:250	Abcam
GFAP	Mouse	1:500	Sigma
GFP	Ziege	1:500	Rockland
GFP	Huhn	1:1000	Abcam
L1	Ratte	1:300	Millipore
Satb2	Hase	1:1000/1:300	Im Labor hergestellt

Die mit DyLight (Jackson Immunoresearch) oder Alexa (Molecular probes) markierten sekundären Antikörper wurden bei einer Verdünnung von 1:500 verwendet.

7. Bildgewinnung und -analyse

Fluoreszenz-Bilder des mit Immunhistochemie behandelten Gewebes wurden nach Befestigung und Trocknen der Objektträger mit einem Konfokalen System (Leica Confocal System-SL) für hohe Auflösungen oder einem Olympus BX51-Mikroskop für Übersichtsaufnahmen aufgenommen. Hellfeld-Bilder von In-Situ-Hybridisierungen wurden nach Befestigung der Objektträger mit einem Olympus BX60-Mikroskop aufgenommen. Zur digitalen Bildanalyse wurde ImageJ und Adobe Photoshop verwendet. Statistische Analysen wurden mittels Excel und Graphpad Prism durchgeführt. Es wurde jeweils die Varianz berechnet und der zweiseitige Studentsche T-Test für die statistische Signifikanz berechnet. Die Daten wurden als Box Plot mit Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt.

8. Plasmidklonierung

Zur Herstellung von RNA-antisense-Proben für die In-Situ-Hybridisierung wurden 600-900bp lange Sequenzen der kodierenden Regionen innerhalb des jeweiligen Gens ausgesucht. Diese Länge weist zumeist eine spezifische Bindungsfähigkeit bei erhaltener Penetrationsfähigkeit auf. Für eine möglichst gleichmäßige, effektive Bindung wurden Sequenzen mit einem GC-Anteil von möglichst 40-60% ausgesucht. Entsprechende Primer wurden designt, um den jeweiligen Abschnitt durch PCR zu vervielfältigen. Folgende Primer, die von SMB Services in Molecular Biology GmbH hergestellt wurden, wurden dabei verwendet:

Name der Sonde	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
Elov17 Probe	5' ATGGCGTTCAGTGATCTTA CATCGA3'	5' TTAGTGGCGCTTGCTTTT GCAATTT3'
Elov17 Probe 2	5' TTGCCTTTCAAACCAATCA GAGGTC3'	5' GGACATAACACCCCTTGT TTATTTG3'
GFAP Isoform 1 Probe	5' GGTCC TAGTCGACA ACTGG GTACCA3'	5' ATAGTCGTTAGCTTCGTG CTTGGCT3'
Ldb3 Probe	5' ATGTCTTACAGTGTGACTC TGACTG3'	5' CTTGACCTTCGCAGAGCC TCTTCAT3'
Ldb3 Probe 2	5' CCCAGCCAACCGAGGCAA TATAAC3'	5' AGATTCTGAAGGGCCCC ACTGTAG3'

NfiA Probe	5 ' ACTGAAGAAGTCTGAGAAG TCTGGTT3 '	5 ' TGAGAAATTACGACAGTC CCTAAAGTA3 '
NfiB Probe	5 ' TCAATGTATCAGAGCTTGT GAGAGTAT3 '	5 ' TTAAGGGAATTAGTGACT GTAAGTGCT3 '
Nrp1 Probe	5 ' ACAGAGAAGCCAACCATTA TAGACA3 '	5 ' GATTTACCTTCAAAAAT AACCTGA3 '
Nrp2 Probe	5 ' TTACTATTATTTTGCCTTC AGCTTTC3 '	5 ' CATCTTTGGAATTCAGCC GACCTCC3 '
Ripk4 Probe	5 ' GCATGAACTTCCTGCATTG CATGTC3 '	5 ' GCATGAACTTCCTGCATT GCATGTC3 '
Ripk4 Probe 2	5 ' AGGGCAGGCATTCACAGAC TGTGGA3 '	5 ' ATATGGCTCTGACATTTT AGCTGAG3 '
Sema3c Probe	5 ' GAACAGCTTCAAACAGACC ATAGCC3 '	5 ' GGCTGTAACAGTTCTGCT TCTGTTG3 '
Slit1 Probe	5 ' ACTTCACCAAGACACAGAT GAAG3 '	5 ' ACCTCCTCAGCAAACGAA GTC3 '
Wnt5a Isoform 2 Probe	5 ' ATGTCTTCCAAGTTCTTCC TAATGG3 '	5 ' ATCCCCTCTGAGGTCTTG TTGCACA3 '

Folgende Primer wurden zur cDNA-Herstellung von Genen voller Länge für die Klonierung in Expressionsvektoren verwendet:

Gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
Sip1 fragment 1	5 ' TCGATATCGCCGCCACCATGA AGCAGCCGATCATGGCGGATG3 '	5 ' GAAAGCTTCCCGGGCCCTAT TCCCCTGC3 '
Sip1 fragment 2	5 ' GCAGGGGAATAGGGCCCGGA AGCTTTC3 '	5 ' TAGCGCCGCCTACAGATCC TCTTCTGAGATGAGTTTTTGTT CACCACCTTCCATGCCATCTTC CATATTGTCT3 '
Wnt5a	5 ' TCGAATTCGCCGCCACCATGA AGAAGCCCATTTGGAATATTAA3 '	5 ' ATGCGCCGCCTATTTGCAC ACGAACTGATCCACA3 '

Als DNA-Template für die PCRs wurde E16.5 Telencephalon-spezifische cDNA verwendet, die von Dr. Srinivas Parthasarathy, Institut für Zell- und Neurobiologie, Charité Berlin zur Verfügung gestellt wurde. Als Enzym wurde entweder GoTaq-Polymerase (Promega) oder Phusion-Polymerase (NEB) in folgendem Reaktionsansatz verwendet:

	GoTaq	Phusion
Reaktions- ansatz	4µl 5x GoTaq-Puffer 0,4µl 10 mM dNTP 0,4µl 10nmol/ml Forward Primer 0,4µl 10nmol/ml Reverse Primer 0,5µl cDNA-Template (0,1µg/µl) 1U GoTaq mit ddH2O auf ein Gesamt- volumen von 20µl	10µl 5x Phusion-Puffer 1µl 10mM dNTP 2,5µl 10nmol/ml Forward Primer 2,5µl 10nmol/ml Reverse Primer 1µl cDNA-Template (0,1µg/µl) 1U Phusion-Polymerase mit ddH2O auf ein Gesamt- volumen von 50µl
Amplifikations- programm	Denaturierung: 94°C- 15'' Annealing: 42-65°C- 30'' Elongation: 72°C- 60'' 35 Zyklen	Denaturierung: 98°C- 15'' kein Annealing (two-step cycling) Elongation: 72°C- 60'' 35 Zyklen

Für das Amplifikationsprogramm wurde eine Annealingtemperatur gewählt, die jeweils möglichst nahe der Schmelztemperaturen des Primers mit der niedrigeren Schmelztemperatur lag. Die Schmelztemperaturen wurden mithilfe des BioMath Calculator von Promega.com errechnet.

Die GoTaq-Polymerase generiert im Gegensatz zur Phusion-Polymerase einen Desoxyadenosin-‘A’-Überhang am 3’-Ende des Amplikons. Deshalb wurden nur Amplikons, die durch die Phusion-Polymerase synthetisiert wurden, nach folgendem Protokoll mit einem Desoxyadenosin-‘A’-Überhang versehen (A-Tailing):

4µl 5x GoTaq-Puffer
0,5µl 10mM dNTP
15µl PCR-Produkt
2,5U GoTaq
mit ddH2O auf ein Gesamtvolumen von 20µl

Folgendes Programm wurde für das A-Tailing verwendet: 95°C- 60s, 55°C- 30s, 72°C- 1h.

Die mit Desoxyadenosin-‘A’-Überhängen versehenen Amplikons wurden durch TA-Ligation nach folgendem Protokoll in einen pGEMT Vektor (Promega) ligiert:

5µl 2x Ligationspuffer
17ng PCR-Produkt

100ng pGEMT

0.5U T4-DNA-Ligase

mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 10µl

Der Ligationsansatz wurde für eine Stunde bei 37°C oder für eine höhere Effizienz über Nacht bei 4°C inkubiert.

Das ligierte Plasmid wurde in kompetente Bakterien transformiert, indem 50-100µl DH5α, XL-10G oder XL-10blue kompetente Bakterien auf 5µl des Ligationsgemischs gegeben und für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert wurden. Die Zellen wurden dann für 45-50 Sekunden bei 42°C hitzegeschockt und sofort für 2 Minuten auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden daraufhin in 1ml LB-Nährmedium ohne Antibiotikum bei 37°C und unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Pellet in 100µl LB resuspendiert und auf LB-Agarplatten ausplattiert wurde, die mit Ampicillin und IPTG/X-gal zur Blau-Weiß-Selektion vorbehandelt waren. Auf dem pGEMT-Vektor befindet sich eine Sequenz, die für das α-Peptid des Enzyms β-Galaktosidase codiert, sodass der farblose Stoff X-Gal in Galaktose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol gespalten wird, wobei letzteres durch den Sauerstoff der Luft zum tiefblauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert wird. Bei Insertion der gewünschten Sequenz in den Vektor wird das Leseraster für das β-Galaktosidase-Gen verschoben, wodurch diese nicht mehr synthetisiert werden kann. Somit bleibt die tiefblaue Färbung aus, die Kolonie erscheint weiß. Die Agarplatten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert, sodass am nächsten Tag die weißen Kolonien selektiert und in 5ml LB mit Ampicillin kultiviert werden konnten. Es folgte eine Plasmidextraktion mithilfe des Mini-Prep-Kits von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers. Die richtige Insertion der gewünschten DNA-Sequenz sowie ihre Orientierung wurden mittels passender Testverdauungen durch spezifische Restriktionsenzyme (New England Biolabs) und anschließender gelelektrophoretischer Auswertung verifiziert. Entsprechende Klone wurden selektiert und in Glycerin bei -80°C gelagert.

Zur Klonierung von Expressionsvektoren für die In-Utero Elektroporation wurde das Insert vom pGEMT-Vektor entfernt und in einen pCAG- (Addgene) oder pCAG-eGFP- (zur Herstellung von Fusionsproteinen mit eGFP) oder pCAGIG-Vektor (Addgene, ein mit IRES-GFP versehener Vektor) kloniert. Dazu wurde zunächst mit entsprechenden Restriktionsenzymen das Insert aus dem pGEMT-Vektor geschnitten. Hier kamen je nach Vektordesign Sticky-End- und Blunt-End-Klonierungen zum Einsatz. Bei Blunt-End-Klonierungen wurde nach der Restriktion die entsprechende Schnittstelle durch T4-DNA-Polymerase gebluntet:

4µl NEB CutSmart Puffer
 4µl 1mM dNTP
 31µl Template
 5U T4-DNA-Polymerase
 mit ddH2O auf ein Gesamtvolumen von 40µl

Das Gemisch wurde für 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 2µl 0.2 molarem EDTA und Erhitzung auf 75°C für 20 Minuten gestoppt wurde. Das Gemisch mit der geschnittenen und evtl. gebluteten DNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, sodass das Insert mit entsprechender Basenlänge identifiziert, aus dem Gel geschnitten und durch Gelextraktion mittels Qiagen-Kit isoliert werden konnte. Das Insert wurde dann in den vorher durch entsprechende Restriktionsenzyme geschnittenen und evtl. gebluteten Expressionsvektor mittels T4-DNA- Ligase wie oben beschrieben ligiert. Es folgte eine Transformation des Ligats wie oben beschrieben, allerdings ohne IPTG/X-Gal. Positive Klone und ihre Orientierung wurden durch Testverdauungen selektiert und in Glycerin bei -80°C gelagert. Die Plasmide wurden zusätzlich durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Zur Herstellung hoher Konzentrationen der Plasmide im µg/µl-Bereich wurde Plasmid-DNA mittels Maxi-Prep-Kit von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers aus Bakterienkulturen extrahiert.

9. Liste der verwendeten Plasmide

Folgende Plasmide wurden nach oben beschriebenem Schema konstruiert und in dieser Arbeit verwendet:

Plasmid-Name	Promotor	exprimiertes Protein bzw. RNA-Sonde	Herkunft
<i>pCAG-eGFP</i>	CAG	eGFP	im Labor generiert
pCAGIG	CAG	GFP	Addgene
<i>pCAG Nrp1-eGFP</i>	CAG	Nrp1-eGFP-Fusionsprotein	selbst generiert, wobei das Insert aus dem Plasmid mNrp1-pEGFPN1 kloniert wurde, das von Dr. Donatella Valdembri, Institut für Krebsforschung und -behandlung, Universität Turin hergestellt wurde

<i>pCAG-Sip1</i>	CAG	Sip1	Im Labor generiert
<i>pCAGIG-Wnt5a</i>	CAG	Wnt5a und GFP	selbst generiert
<i>pGEMT-Elovl7 Probe</i>	T7, Sp6	RNA-Sonde	selbst generiert
<i>pGEMT-Elovl7 Probe 2</i>	T7, Sp6	RNA-Sonde	selbst generiert
<i>pGEMT-GFAP Probe</i>	T7, Sp6	RNA-Sonde	selbst generiert
<i>pGEMT-ldb3 Probe</i>	T7, Sp6	RNA-Sonde	selbst generiert
<i>pGEMT-ldb3 Probe 2</i>	T7, Sp6	RNA-Sonde	selbst generiert
<i>pGEMT-NfiA Probe</i>	T7, Sp6	RNA-Sonde	im Labor generiert
<i>pGEMT-NfiB Probe</i>	T7, Sp6	RNA-Sonde	im Labor generiert
<i>pGEMT-Nrp1 Probe</i>	T7, Sp6	RNA-Sonde	im Labor generiert
<i>pGEMT-Nrp2 Probe</i>	T7, Sp6	RNA-Sonde	im Labor generiert
<i>pGEMT-Ripk4 Probe</i>	T7, Sp6	RNA-Sonde	selbst generiert
<i>pGEMT-Ripk4 Probe 2</i>	T7, Sp6	RNA-Sonde	selbst generiert
<i>pGEMT-Sema3c Probe</i>	T7, Sp6	RNA-Sonde	im Labor generiert
<i>pGEMT-Slit1 Probe</i>	T7, Sp6	RNA-Sonde	im Labor generiert
<i>pGEMT-Wnt5a Probe</i>	T7, Sp6	RNA-Sonde	selbst generiert

Die Vektoren pCAG-eGFP und pCAG-Sip1 wurden von Dr. Srinivas Parthasarathy, Institut für Neuro- und Zellbiologie, Charité Berlin konstruiert und zur Verfügung gestellt. Die pGEMT-Vektoren für die RNA-Sonden von NfiA, NfiB, Nrp1, Nrp2, Sema3c und Slit1 wurden von Kuo Yan, Institut für Zell- und Neurobiologie, Charité- Berlin konstruiert und zur Verfügung gestellt.

10. In-Utero-Elektroporation

Experimente, die In-Utero-Elektroporationen einschlossen, wurden behördlich genehmigt (Aktenzeichen G0079/11 mit Erweiterungen, Erstfassung am 13.07.2011 genehmigt). Die In-Utero-Elektroporation wurde wie durch Saito et al. beschrieben durchgeführt (82). Am gewünschten Gestationstag wurde die trächtige Maus durch Isofluran-Inhalation anästhesiert und für die Dauer des Eingriffs auf einem Wärmepad gelagert. Das Analgetikum Tamgesic (Wirkstoff: Buprenorphin) wurde subkutan gespritzt. Haare im Abdominalbereich wurden mit einer herkömmlichen Rasierklinge entfernt, der Bereich wurde drei Mal mit 70%igem Ethanol, dann mit einer Jodlösung desinfiziert. Mit einem etwa 3cm langem Schnitt wurde die Haut im Abdominalbereich entlang der Mittellinie und im nächsten Schritt die Bauchwand

eröffnet. Der gesamte Uterus mit den Embryonen wurde mit stumpfen Pinzetten vorsichtig aus dem Bauchraum gezogen, ohne Blutgefäße oder Organe zu verletzen. Der Uterus wurde kontinuierlich mit einer 37°C warmen Lösung aus Penicillin (1000 Einheiten/ml) und Streptomycin (1000µg/ml) in PBS beträufelt, um Infektionen und ein Austrocknen oder -kühlen der Embryos zu verhindern. Die jeweilige Plasmidlösung wurde in der Konzentration von 1µg/ml mit 5% Fast Green zur besseren Sichtbarkeit der Lösung versetzt und mittels Picospritzer (WPI) in einen Seitenventrikel der Embryonen injiziert. Die Plasmidlösung wurde solange injiziert, bis die blaue Lösung in den Seitenventrikeln deutlich sichtbar wurde. Es folgte die Elektroporation, bei der mithilfe von Elektroden 6 elektrische Pulse mit jeweils 35V, 50ms Dauer und 950ms Intervall in die gewünschte Orientierung abgegeben wurden. Der Vorgang wurde einzeln für jeden zu elektroporierenden Embryo wiederholt. Anschließend wurde der Uterus zurück in die Bauchhöhle verlagert, die dann drei Mal mit der Penicillin-Streptomycin-Lösung gespült wurde. Die Bauchwand wurde mit ca. 8 chirurgischen Einzelknopfnähten verschlossen. Anschließend wurde die Haut von der Muskelfaszie gelöst und mit ca. 4 chirurgischen Klammern verschlossen. Nach Beenden der Anästhesie wurde die Maus gewärmt und getrocknet und nach dem Aufwachen zurück in den Käfig gelassen und beobachtet.

11. In-situ-Hybridisierung

Zur Herstellung der RNA-Sonden für die In-Situ Hybridisierung wurden PCR-Fragmente des Zielgens in einen pGEMT-Vektor kloniert (siehe 8. Plasmide), sodass die Sequenz von dem T7-Promotor auf der einen und von dem Sp6-Promotor auf der anderen Seite flankiert wurde. Dies ermöglicht sowohl die Transkription einer antisense als auch einer sense RNA-Sonde, wobei in dieser Arbeit antisense Proben hergestellt wurden. Je nach Orientierung des Inserts wurde der Vektor mit einem Restriktionsenzym (New England Biolabs) linearisiert, das an dem Ende der DNA-Sequenz schneidet, das dem gewünschten Promotor gegenüberliegt. Die Linearisierung wurde über Nacht bei 37°C nach folgendem Protokoll durchgeführt:

10µl 10x Puffer (NEB)
25µl Plasmid-DNA (entsprechen 2-5µg Plasmid-DNA)
1-2U Restriktionsenzym (NEB)
mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 100µl

Die Linearisierung wurde mittels Gelelektrophorese verifiziert, sodass die linearisierte DNA aus dem Gel geschnitten und durch Gel-Extraktion mittels Qiagen-Kit isoliert werden konnte.

Puffer und Lösungen für die darauffolgende Transkription wurden vorher mit 1ml DEPC/1l versetzt, über Nacht bei 37°C unter Schütteln und mit offenem Deckel inkubiert und dann autoklaviert, um Ribonukleasen zu inaktivieren. Die In-Vitro Transkription verlief nach folgendem Protokoll:

- 2µl 10X Transkriptionspuffer (Roche)
- 2µl T7/Sp6-RNA-Polymerase, 20U/µl (Roche)
- 2µl DIG RNA labeling mix, 10mM (Roche)
- 1µg Linearisiertes Plasmid
- 0,5µl RNase Inhibitor, 20-40U/µl (Roche)

mit DEPC-H₂O auf ein gesamtes Volumen von 20µl

Der Transkriptionsansatz wurde für 2,5-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Es wurden 2,5µl DNase (10U/µl) und 2,5µl DNase-Puffer hinzugefügt und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden 2µl 0,2 molares EDTA-DEPC hinzugefügt. Es folgte die RNA Fällung mittels Zugabe von 3µl 4 molarem LiCl-DEPC und 85µl kaltem 100%igen Ethanol. Das Gemisch wurde bei -20°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gemisch für 20 Minuten bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zum Pellet 120µl kaltes 70%iges Ethanol hinzugefügt, worauf wiederum eine 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 13 000 rpm folgte. Daraufhin wurde das Ethanol entfernt und das Pellet an der Luft getrocknet, bis es transparent wurde. Die RNA wurde dann bei 50°C für 10 Minuten in 20µl DEPC-H₂O und 1µl RNase-Inhibitor unter vorsichtigem 2-3 maligen Auf- und Abpipettieren resuspendiert. 1µl dieser Lösung wurde zur gelelektrophoretischen Verifizierung der Sondenlänge und -qualität entnommen. Bei zufriedenstellender Dichte und Größe der RNA-Bande wurde die RNA-Sonde in 180µl Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 5x SSC pH7.0, 2.5M EDTA, 0.1% Tween-20, 0.15% CHAPS, 0.1mg/ml Heparin, 100µg/ml Hefe-tRNA, 50µg/ml Lachssperma-DNA und 1x Denhardt-Lösung) gelöst und bei -20°C gelagert.

12-15µm dicke Kryogewebsschnitte wurden für die In-Situ-Hybridisierung verwendet. Alle Lösungen, die am ersten Tag des Hybridisierungsprotokolls verwendet wurden, waren mit DEPC behandelt, um RNA-Abbau durch RNasen zu verhindern. Die Kryoschnitte wurden, nachdem sie für 20-30 Minuten an der Luft getrocknet und auf Raumtemperatur gebracht waren, in 4% PFA/PBS-DEPC für 15 Minuten fixiert und dann für jeweils 5 Minuten in PBS-DEPC gewaschen. Es folgte eine Teilverdauung durch Proteinase-K in der Konzentration 20µg/ml für 2-3 Minuten in auf 37°C erwärmten Proteinase K-Puffer (30mM Tris pH 8,0, 10mM EDTA pH 8, 0.5% SDS) zur Permeabilisierung der Zellen für die RNA-Sonden. Die

Proteinase K Wirkung wurde durch 5 minütiges Waschen in 0.2% Glycin in PBS-DEPC beendet. Die Schnitte wurden wiederum zwei Mal für jeweils 5 Minuten in PBS-DEPC gewaschen und in 4% PFA/0.2% Glutaraldehyd in PBS-DEPC für 20 Minuten bei Raumtemperatur postfixiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS-DEPC für jeweils 5 Minuten wurden die Schnitte für 2 Stunden bei 70°C in Hybridisierungspuffer inkubiert. Nach dieser Prehybridisierung wurden die Schnitte mit der antisense Sonde für 16-20 Stunden bei 70°C inkubiert. Dabei wurden vor der Anwendung pro Objektträger 10-20µl der vorbereiteten Sonde in 150µl Hybridisierungspuffer gelöst, für 3 Minuten bei 90°C denaturiert und bis zur Anwendung auf Eis gelagert .

Am nächsten Tag wurden die Schnitte in 2X SSC pH4.5 (20x SSC = 3M NaCl, 300mM Trinatriumcitrat) und in RNase-Puffer (0.5M NaCl, 10mM Tris pH 7.5) für jeweils 5 Minuten gewaschen und für 30 Minuten bei 37°C mit RNase behandelt (20µg/ml in RNase-Puffer). Es folgten ein Waschgang in 2X SSC pH 4.5 für 5 Minuten, drei Waschgänge von jeweils 30 minütiger Dauer in 2X SSC pH4.5/ 50% Formamid bei 65°C und zwei Waschgänge in KTBT (50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 10mM KCl, 1% Triton X-100) für jeweils 10 Minuten. Dann wurde das Gewebe für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 20% Schafserum in KTBT geblockt. Daraufhin wurde ein mit Alkalischer Phosphatase konjugierter Anti-Digoxigenin Antikörper (Schaf, Roche, 1:1000 in 20% Schafserum/KTBT) aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte drei Mal für 5 Minuten und drei Mal für 30 Minuten in KTBT, anschließend drei Mal für 5 Minuten in NTMT (100mM Tris pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 0.05% Tween-20) gewaschen. Die Farbreaktion wurde durch Hinzufügen vom Substrat der Alkalischen Phosphatase NBT/BCIP (Roche, 1:50 in NTMT) gestartet. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die Reaktion durch Waschen in PBST (PBS + 0.1% Triton X-100) gestoppt. Es folgte eine Fixierung in 4% PFA für 10 Minuten und erneutes Waschen in PBS. Daraufhin wurde das Gewebe durch eine in der Konzentration aufsteigende Ethanolreihe dehydriert und mit Eukitt-Medium befestigt.

ERGEBNISSE

1. Bedeutung des *Sip1* in der Bildung des Corpus callosum

1.1 Die Entwicklung kommissuraler Faserverbindungen ist beim konditionalen *Sip1* Knockout dramatisch verzögert und reduziert.

Im konditionalen *Sip1* Knockout wurde bereits eine Agenesie des Corpus callosum sowie ein Fehlen der Commissura anterior beschrieben (70). In dieser Arbeit wurde die genaue Morphologie und zeitliche Entwicklung dieser Veränderungen mittels Nissl-Färbungen in den Stadien E14.5, E16.5 und E18.5 weitergehend untersucht.

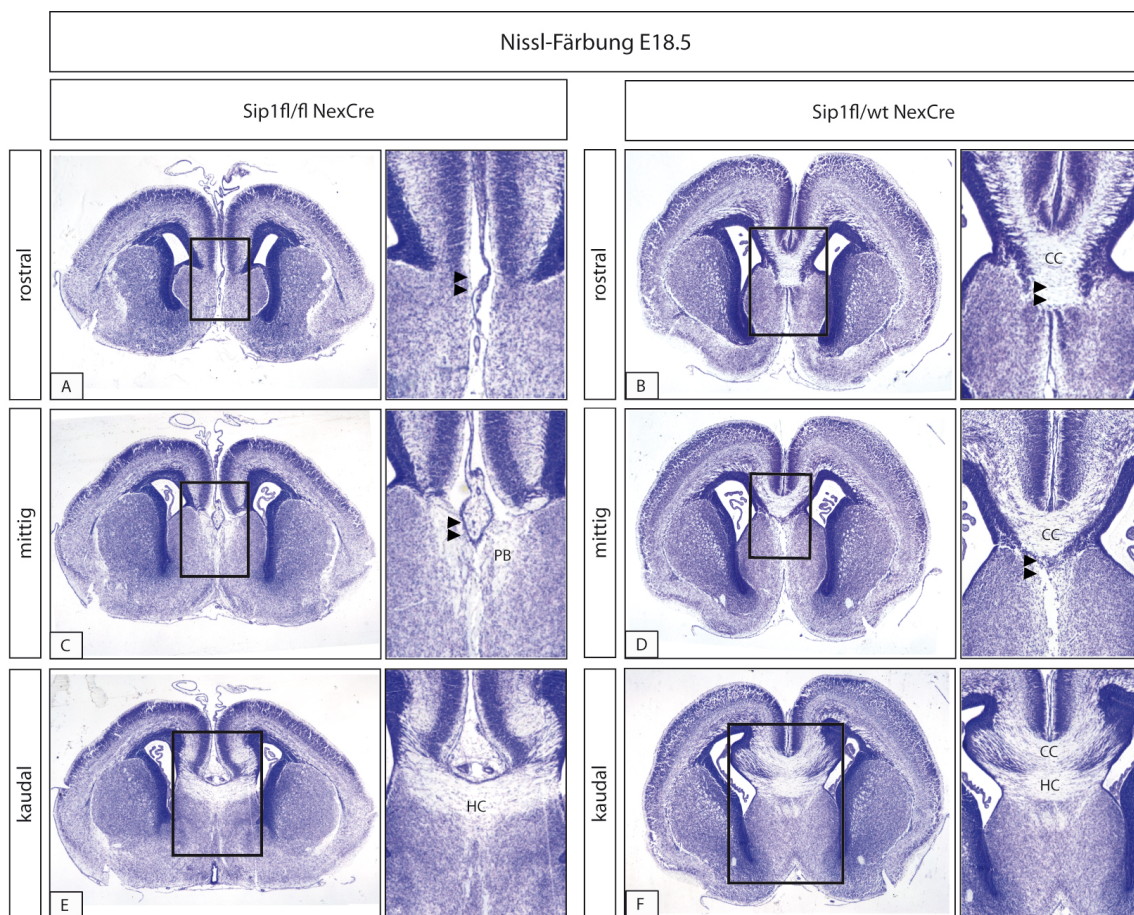


Abb. 4. Kortikale Projektionen sind im konditionalen *Sip1* Knockout im Stadium E18.5 dramatisch verändert.

Histologische Analysen des Sip1^{fl/fl} Nex^{Cre}-Mutanten mittels Nissl-Färbung auf Paraffinschnitten im Stadium E18.5 zeigen das Fehlen des Corpus callosum (CC) sowie eine fehlende kortikale Fusion der Mittellinie (Pfeile). Die callosalen Axone des Knockouts wenden sich von der Mittellinie nach ventral ab und bilden Probst'sche Bündel (PB). Auch das Fehlen der Neurone des subcallosalen Slings ist sichtbar (C-D, Pfeile). Die Commissura hippocampi (HC) zeigt sich dagegen unverändert. Die Bilder höherer Vergrößerung korrespondieren mit den markierten Bereichen der Übersichtsaufnahmen.

Morphologische Betrachtungen des $Sip1^{fl/fl} Nex^{Cre}$ -Mutanten im Stadium E18.5 zeigten eine Agenesie des Corpus callosum auf gesamter rostrokaudaler Länge, während der Wildtyp im Stadium E18.5 bereits ein deutliches Corpus callosum zeigt (Abb. 4A-F). Einige Fasern der callosalen Neurone waren noch sichtbar, sie erreichten aber die kontralaterale Hemisphäre nicht, sondern wichen nach Erreichen der Mittellinie als Probst'sche Bündel nach ventral ab, die aber nur auf geringer rostrokaudaler Ausdehnung zu sehen waren (Abb. 4C). Demnach war die Anzahl der callosalen Fasern ebenfalls erniedrigt. Die dorsale Fusion der Mittellinie blieb im Knockout aus (Abb. 4C-D, Pfeile). Der subcallosale Sling, der durch Zellkörper von spezialisierten Neuronen gebildet wird, fehlte im Knockout (Abb. 4C-D). Die Commissura hippocampi zeigte sich im Knockout unverändert (Abb. 4E). Die Commissura anterior konnte nicht beurteilt werden, entsprechende Faserbündel lateral in den Hemisphären waren sowohl im Knockout als auch im Wildtyp zu erkennen.

Zur zeitlichen Differenzierung dieser vom Wildtyp abweichenden morphologischen Entwicklung wurden die Knockouts in früheren Stadien betrachtet:

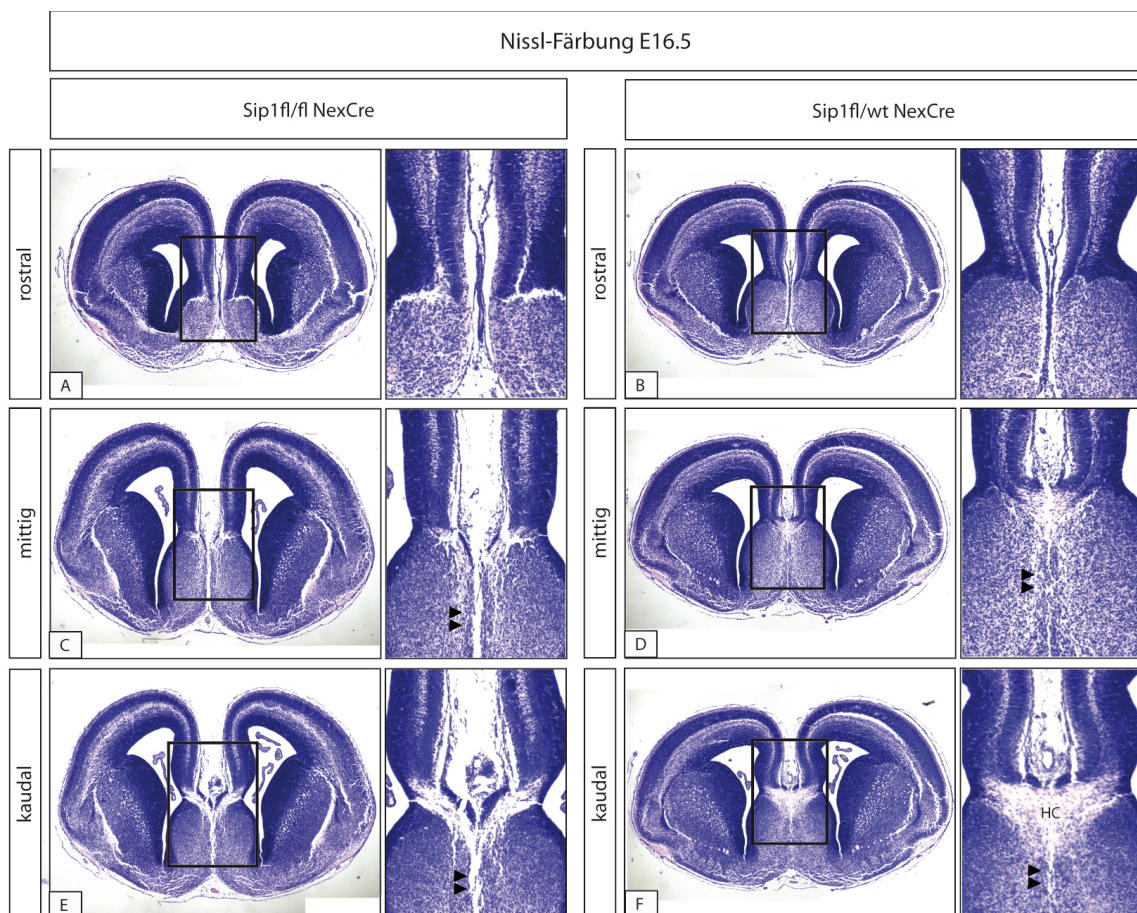


Abb. 5. Abweichungen der Mittellinienmorphologie des konditionalen *Sip1* Knockouts zeigen sich bereits im Stadium E16.5.

Morphologische Betrachtungen $Sip1^{fl/fl} Nex^{Cre}$ -Mutanten im Stadium E16.5 mittels Nissl-Färbung auf Paraffinschnitten zeigen eine unvollständige Ausbildung der Commissura hippocampi (HC) sowie

eine fehlende Fusion der Mittellinie auf ganzer Länge (Pfeile). Während im Wildtyp bereits Pionieraxone des Corpus callosum kreuzen (D), sind solche im Knockout nicht sichtbar (C). Die Bilder höherer Vergrößerung korrespondieren mit den markierten Bereichen der Übersichtsaufnahmen.

Abweichungen der Morphologie des Knockouts zeigten sich bereits im Stadium E16.5, also schon vor dem Erscheinen des Corpus callosum beim Wildtyp im Stadium E17.5 (44). Kreuzende Pionieraxone des Corpus callosum waren im Wildtyp zu erkennen (Abb. 5D), während solche im Knockout nicht erkennbar waren (Abb. 5C). Die Commissura hippocampi war beim Wildtyp bereits deutlich ausgebildet, während die korrespondierenden Fasern beim Knockout noch nicht die Mittellinie überquert hatten, die Ausbildung der Commissura hippocampi tritt im Knockout also verzögert auf (Abb. 5E-F). Die Fusion der Mittellinie blieb im Stadium E16.5 auf ganzer ventrodorsaler Länge aus, zeigte sich also ebenfalls verzögert gegenüber dem Wildtyp, der bereits eine fortgeschrittene Fusion aufwies (Abb. 5C-F, Pfeile). Ob einzelne Fasern im Knockout die Mittellinie kreuzen oder nicht, konnte in den Nissl-Färbungen dieses Stadiums nicht mit Sicherheit beurteilt werden. Mittels immunhistochemischer Anfärbung des Axonmarkers L1 konnte aber gezeigt werden, dass die Axone auch im Stadium E16.5 die Mittellinie nicht kreuzen (Abb. 6, Pfeile).

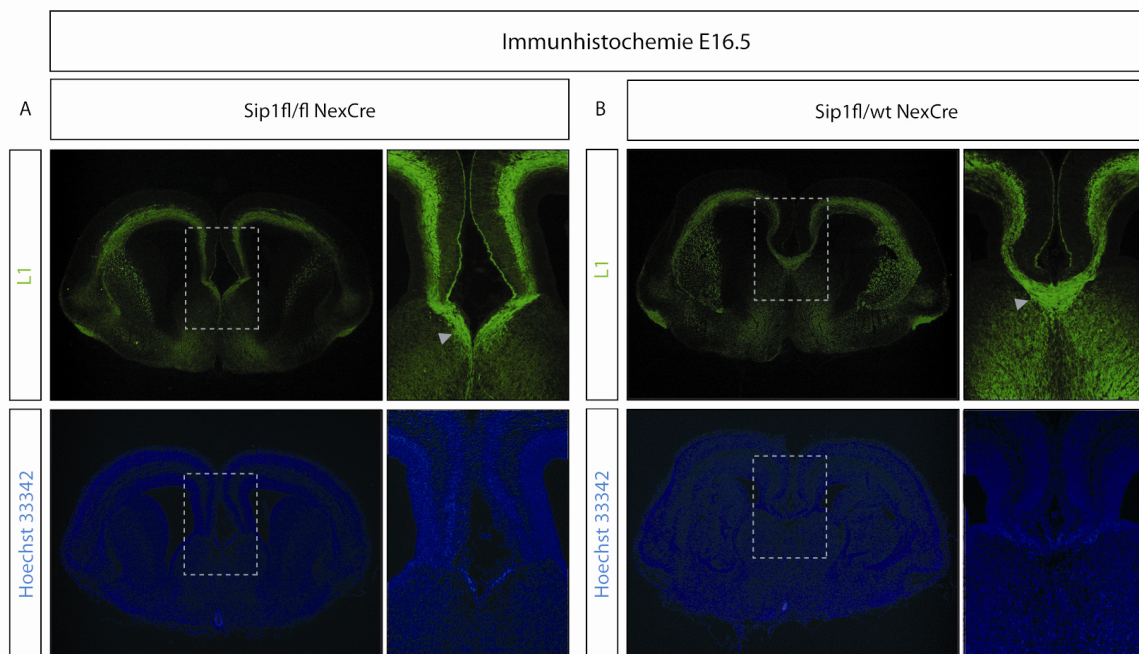


Abb. 6. Kreuzende Pionieraxone fehlen im Stadium E16.5 im konditionalen *Sip1* Knockout.

(A) Immunhistochemische Anfärbung des Axonmarkers L1 auf Kryoschnitten des Stadiums E16.5 zeigen im Knockout keine über die Mittellinie kreuzende Pionieraxone, stattdessen wachsen die

Axone nach ventral entlang der nicht-fusionierten Mittellinie (Pfeil). **(B)** Im Wildtyp werden entsprechend kreuzende Pionieraxone sichtbar (Pfeil).

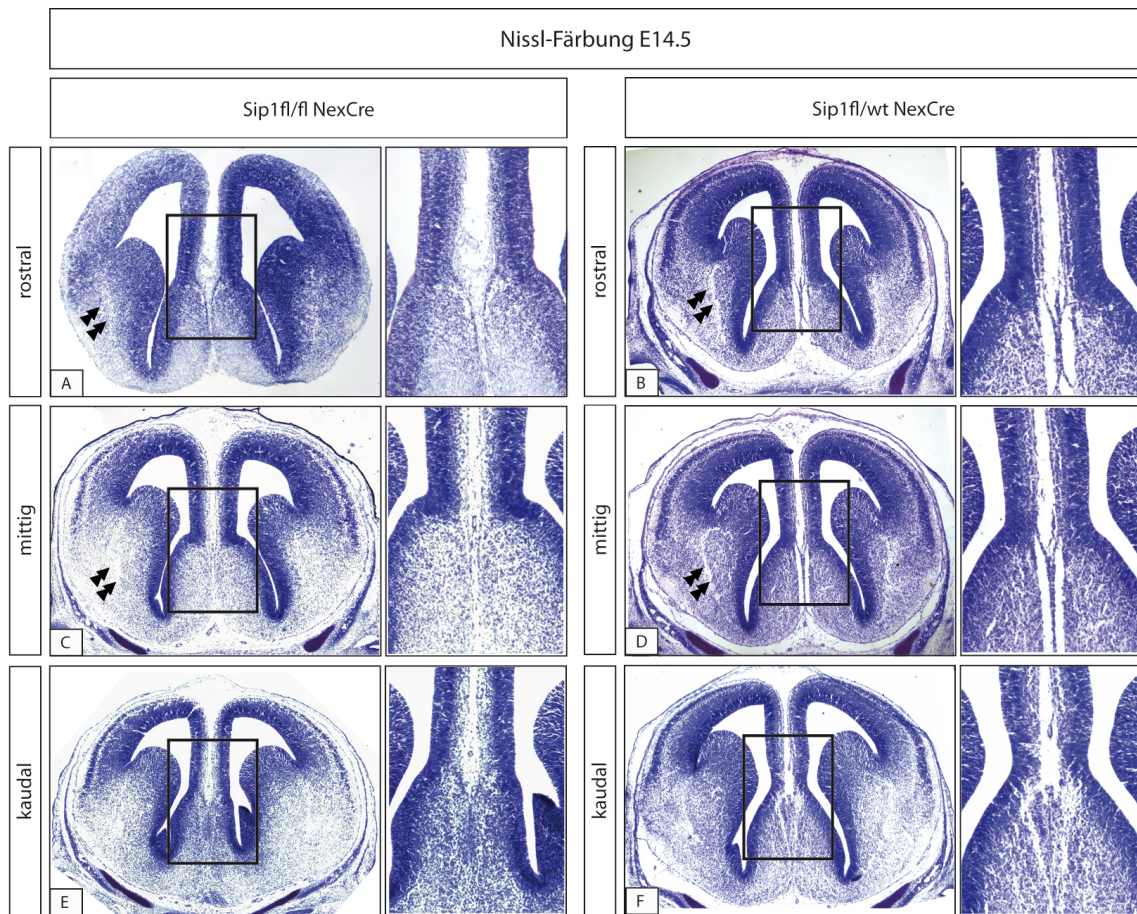


Abb. 7. Die Morphologie des konditionalen *Sip1* Knockouts im Stadium E14.5 zeigt mit Ausnahme einer fehlenden Commissura anterior keine dramatischen Veränderungen.

Analyse des Stadiums E14.5 mittels Nissl-Färbung auf Paraffin- und Kryoschnitten zeigen eine dem Wildtyp sehr ähnliche Morphologie des *Sip1^{fl/fl} Nex^{Cre}*-Mutanten. Eine Ausnahme stellen die fehlenden oder deutlich reduzierten Fasern, die zur Commissura anterior projizieren, dar (Pfeile). Die Bilder höherer Vergrößerung korrespondieren mit den markierten Bereichen der Übersichtsaufnahmen.

Im Stadium E14.5 zeigten sich im Wildtyp wie im Knockout weder Corpus callosum noch Commissura hippocampi (Abb. 7A-F). Fasern, die zur Commissura anterior projizieren, waren im Wildtyp deutlich zu erkennen, korrespondierende Fasern im Knockout fehlten oder waren deutlich reduziert (Abb. 7A-F, Pfeile).

1.2 Die Entwicklung von Gliapopulationen der Mittellinie ist im konditionalen *Sip1* Knockout verzögert und reduziert.

Es wurde bereits gezeigt, dass Gliapopulationen der Mittellinie eine wichtige Rolle für die Wegfindung callosaler Axone spielen. Durch Sekretion verschiedener Liganden, die an Rezeptoren der Axone binden, beeinflussen sie die Richtung des Axonwachstums (47, 48, 50, 83). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten eine Reduktion der Gliapopulationen der Mittellinie des konditionalen *Sip1* Knockouts im Stadium E17.5 (70). Um die genaue Entwicklung der Gliapopulationen im Knockout zu untersuchen, wurden Paraffinschnitte der Stadien E14.5, E16.5 und E18.5 untersucht. Dazu wurden GFAP-positive Zellen mittels Immunhistochemie angefärbt.

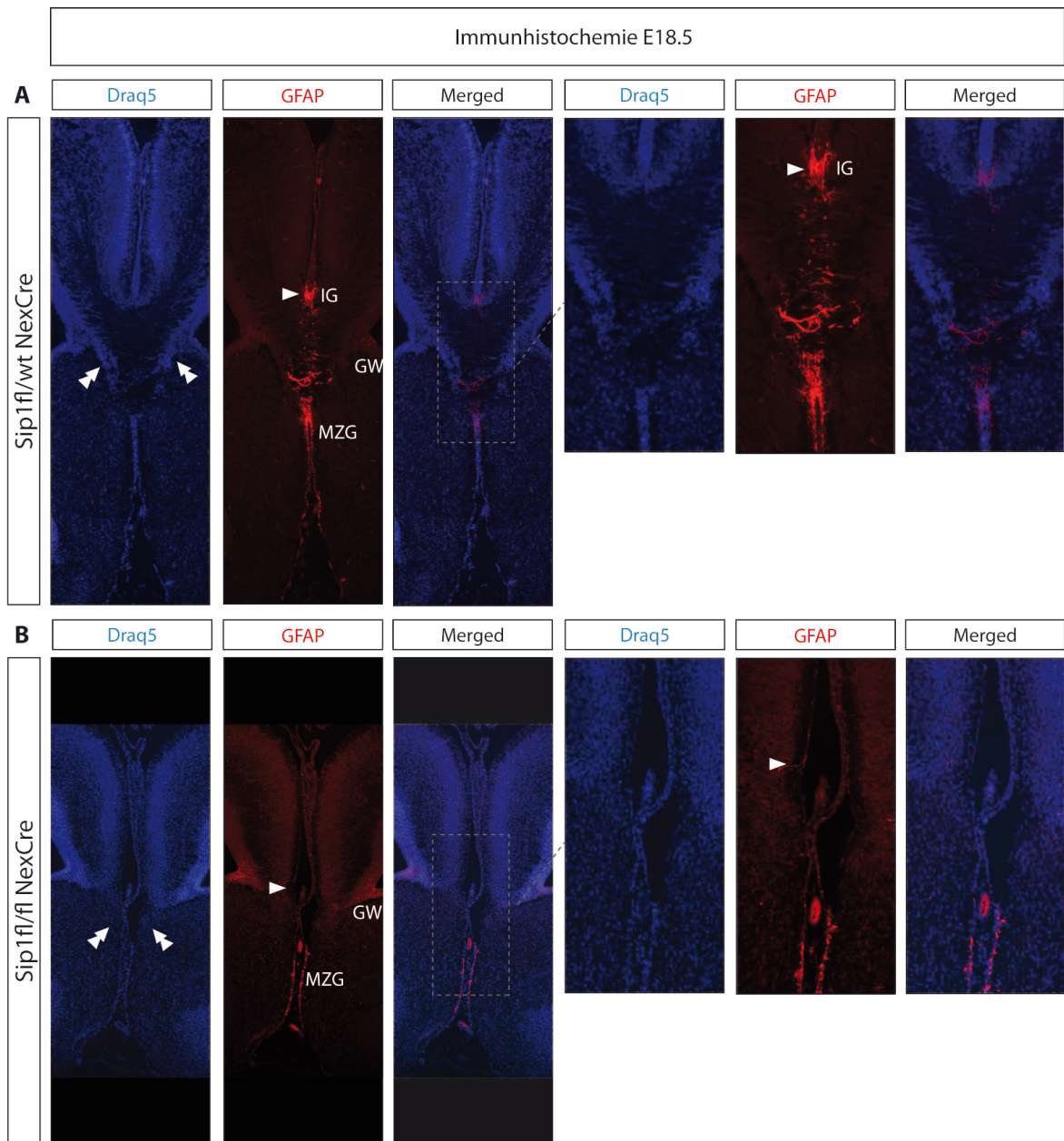


Abb. 8. Glia des Indusium griseum sowie Neuronen des subcallosalen Slings fehlen im konditionalen *Sip1* Knockout, die Midline Zipper Glia zeigt sich als reduziert

(A) Immunhistochemie des Proteins GFAP sowie Färbung mittels Kernfarbstoff Draq5 auf Paraffinschnitten des Stadiums E18.5 zeigen im Wildtyp die GFAP-positiven Gliapopulationen des Indusium griseum (IG), der Midline Zipper Glia (MZG) und des Glial Wedge (GW). Die Zellkörper der Neurone, die den subcallosalen Sling bilden, sind in der Kernfärbung ebenfalls deutlich zu erkennen (Doppelpfeile). (B) Im konditionalen *Sip1* Knockout fehlt die Glia des Indusium griseum komplett (Pfeil). Die Mittellinie ist nicht fusioniert und auch die Neurone des subcallosalen Slings fehlen (Doppelpfeile). Die Midline Zipper Glia (MZG) weist eine deutlich geringere Färbung auf. Die Bilder höherer Vergrößerung korrespondieren mit den markierten Bereichen der Übersichtsaufnahmen.

Im Stadium E18.5 konnten die Gliapopulationen durch den Antikörper markiert werden (Abb. 8A). Im Wildtyp war die GFAP-positive Glia, die dorsal des Corpus callosum das Indusium griseum (IG) bildet, deutlich zu erkennen. Ventral des Corpus callosum konnten die GFAP-positiven Zellen der Midline Zipper Glia (MZG) nachgewiesen werden. Gliazellen, die lateral des Corpus callosum und medial der Ventrikel den sogenannten Glial Wedge (GW) oder die Keilglia bilden, wurden ebenfalls durch den Antikörper nachgewiesen. In der Kernfärbung mit Draq5 wurden die Neurone des subcallosalen Slings erkennbar (Doppelpfeile).

Im Gegensatz zum Wildtyp war die Glia des Indusium griseum im konditionalen *Sip1* Knockout nicht nachweisbar (Abb. 8B, Pfeil). Die Keilglia sowie die Midline Zipper Glia waren dagegen nachweisbar, wobei letztere stark reduziert war. Der fehlende subcallosale Sling (Doppelpfeile) sowie die ausbleibende Fusion der Mittellinie wurden in der Kernfärbung mit Draq5 wiederum deutlich.

Um die Unterschiede der Gliapopulationen zu überprüfen und die genaue Lokalisation der GFAP-produzierenden Zellen darzustellen, wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels In-Situ-Hybridisierung die GFAP-Expression auf mRNA-Ebene untersucht. Dazu wurde eine GFAP-RNA-Sonde hergestellt. Das Fehlen des Indusium griseum konnte hierdurch bestätigt werden (Abb. 9, Pfeile). Die Midline Zipper Glia zeigte sich wie in der Immunhistochemie als reduziert, die Keilglia zeigte sich im Knockout unverändert (Abb. 9).

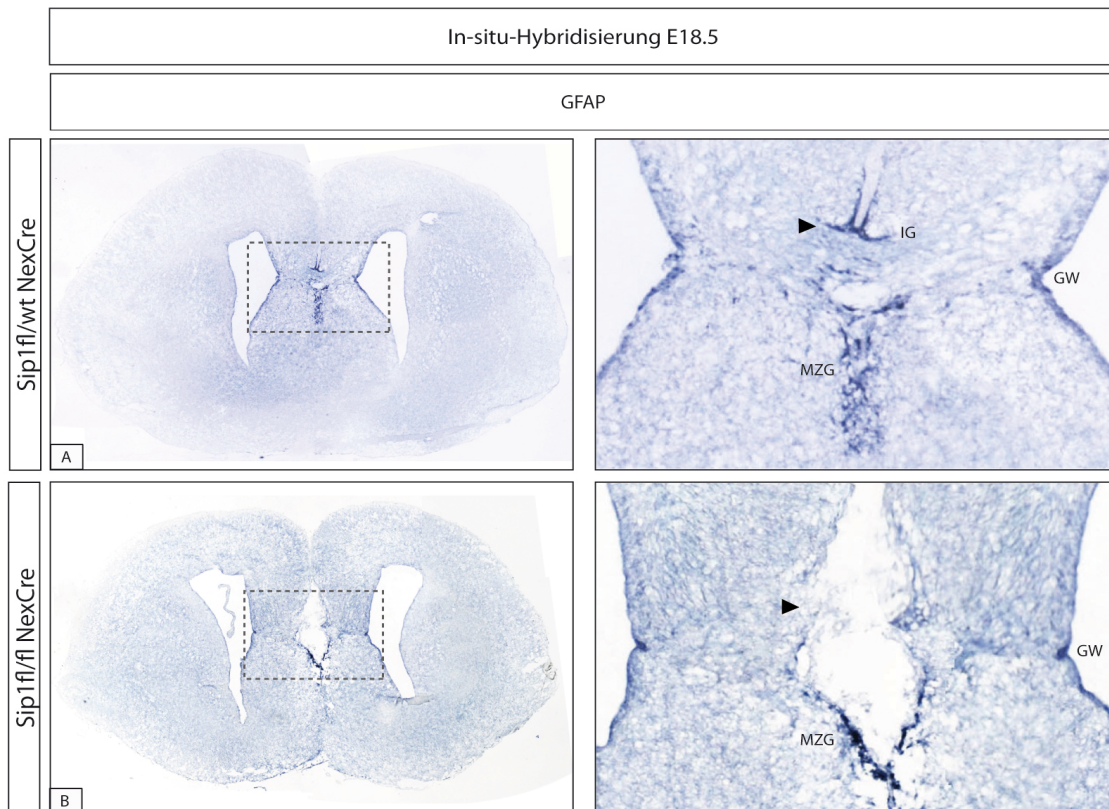


Abb. 9. In-situ-Hybridisierung bestätigt das komplette Fehlen der Glia des Indusium griseum im *Sip1* Knockout

(A) In-Situ-Hybridisierung mittels *GFAP*-RNA-Sonde auf Kryoschnitten des Stadiums E18.5 zeigt die *GFAP*-positiven Gliapopulationen des Wildtyps. (B) Beim konditionalen *Sip1* Knockout wird deutlich, dass die Expression von *GFAP* im Bereich des Indusium griseum (IG) vollständig ausbleibt (Pfeil). Die Midline Zipper Glia (MZG) zeigen sich im Knockout als reduziert. Die Keilglia (GW) zeigt im Knockout ein ähnliches Signal wie im Wildtyp. Die Bilder höherer Vergrößerung korrespondieren mit den markierten Bereichen der Übersichtsaufnahmen.

In-situ-Hybridisierungen auf Gewebe der Stadien E14.5 und E16.5 ergaben keine Signale. Eine mehrfach durchgeführte erneute Transkription der RNA-Sonde sowie Kontrolle der Qualität der Sonde (Abb. 10) führten zu keinem zuverlässigen Signal.

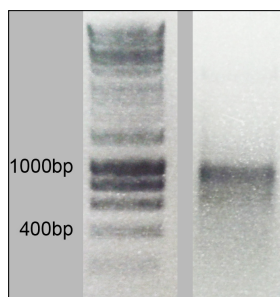


Abb. 10. *GFAP*-Sonde zeigt gute Qualität in der Gelelektrophorese

Die Qualität der *GFAP*-Sonde wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Die Länge der RNA sowie die Dichte der Bande geben keine Anzeichen auf eine Degradation der RNA. Als Referenz wurde hier eine DNA-Leiter verwendet, die eine grobe Einschätzung der Länge der RNA-Sonde zulässt.

Immunhistochemische Anfärbungen mittels GFAP-Antikörper ergaben auf Gewebe des Stadiums E14.5 ebenfalls kein Signal. Allerdings konnte im Stadium E16.5 eine schwache Fluoreszenz, verursacht durch geringe GFAP-Expression, sowohl im Knockout als auch im Wildtyp gezeigt werden. Das Signal korrespondierte mit frühen Populationen der Midline Zipper Glia. Im Wildtyp zeigte sich die Midline Zipper Glia beider Hemisphären parallel und dicht aneinander anliegend (Abb. 11A). Im Knockout dagegen erschien die Midline Zipper Glia, die hier entlang der auseinanderklaffenden Mittellinie lokalisiert war, kleiner und signalschwächer (Abb. 11B). Die Keilglia war im Knockout wie im Wildtyp mit ähnlicher Signalintensität nachweisbar.

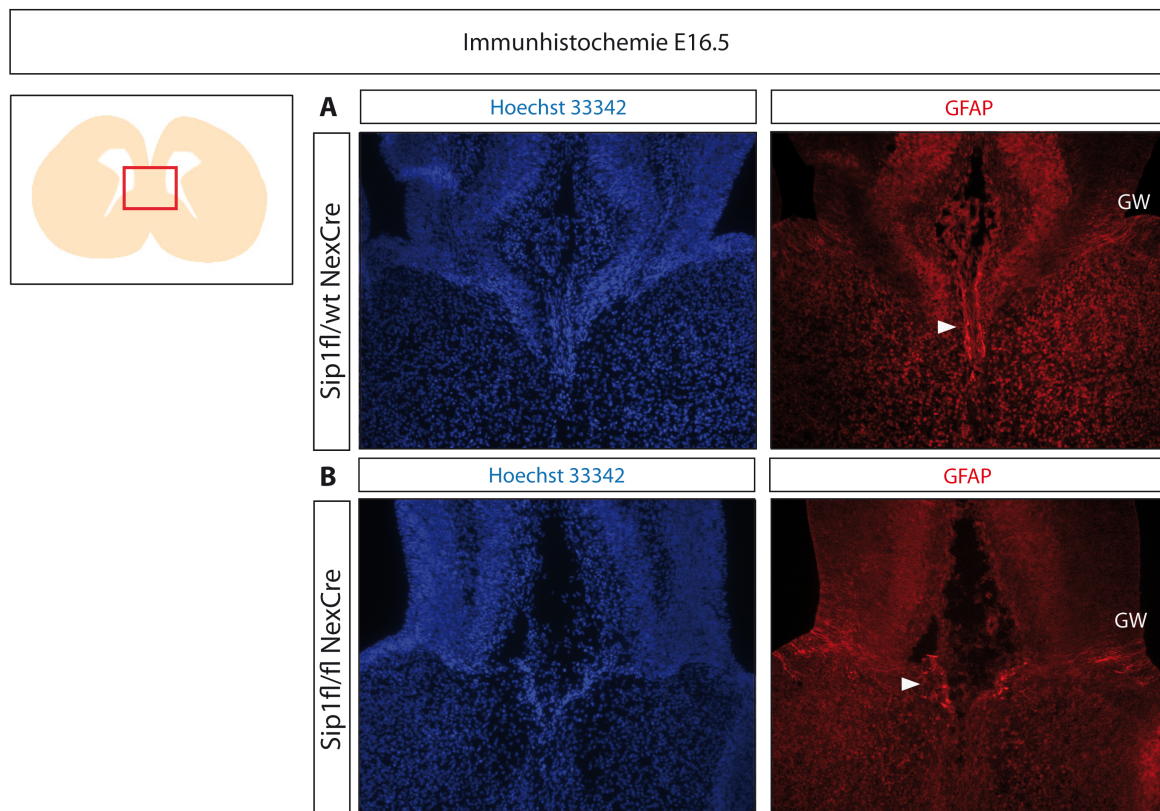


Abb. 11. Die Midline Zipper Glia des konditionalen *Sip1* Knockouts zeigt sich im Stadium E16.5 als vermindert.

(A) Immunhistochemische Anfärbung des glialen Proteins GFAP auf Kryoschnitten des Stadiums E16.5 zeigen im Wildtyp die Midline Zipper Glia (Pfeil) und die Keilglia. (B) Im Knockout zeigt sich eine signalähnliche Keilglia, während die Midline Zipper Glia deutlich reduziert ist (Pfeil).

1.3 *Nrp1* zeigt im konditionalen *Sip1* Knockout ein stark verändertes Expressionsmuster

Es wurde bereits gezeigt, dass *Neuropilin1* (*Nrp1*) eine wichtige Rolle in der Bildung des Corpus callosum zeigt (123). Erste Pionierneurone kreuzen im Stadium E15.5 mit ihren Axonen die Mittellinie und bahnen so den Weg für die Bildung des Corpus callosum (45).

Diese Pionierneurone wie auch andere callosal projizierende Neurone exprimieren auf ihren Axonen den Nrp1-Rezeptor, der unter anderem den Attractant Sema3C bindet. Sema3c wird im Neuronalen Sling sezerniert und unterstützt so die axonale Wegfindung über die Mittellinie hinweg (84). Um die Expression von Nrp1 im Stadium E16.5 im konditionalen *Sip1* Knockout zu untersuchen, wurden In-Situ-Hybridisierungen mit einer entsprechenden RNA-Sonde durchgeführt.

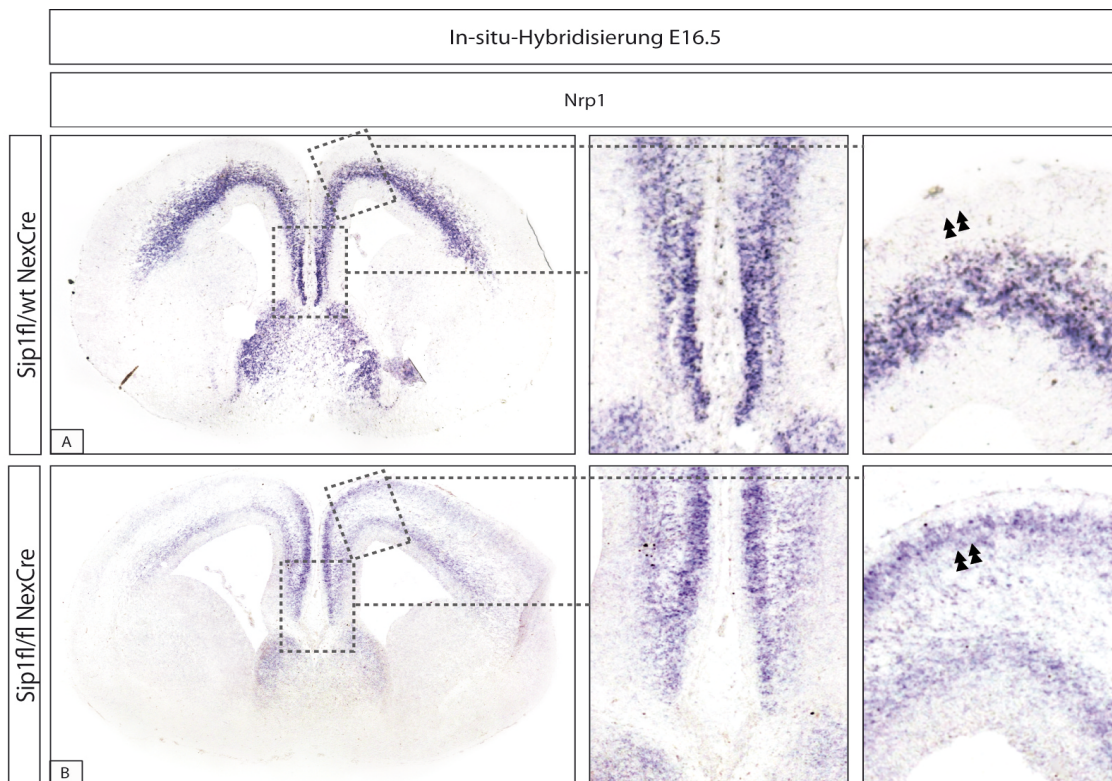


Abb. 12. Die Expression von *Nrp1* ist im konditionalen *Sip1* Knockout im Stadium E16.5 erniedrigt und zeigt ein stark differentes Expressionsmuster

(A) In-Situ-Hybridisierung im Stadium E16.5 zeigen im Wildtyp eine starke Expression von *Nrp1* in tieferen bis mittleren Schichten des Cortex sowie in den höheren Schichten des Gyrus cinguli. (B) Im konditionalen *Sip1* Knockout dagegen zeigt sich ein insgesamt schwächeres Signal, das mit einer herabregulierten Expression korreliert. Weiterhin zeigt sich im Knockout eine deutliche Expression in höheren Schichten des Cortex, eine entsprechende Korrelation ist im Wildtyp nicht vorhanden (hier in der Vergrößerung der Mantelkante zu sehen, Pfeile).

Die Untersuchungen ergaben ein deutlich verändertes Expressionsmuster des Knockouts im Vergleich zur Kontrolle. Im Wildtyp war eine starke neokortikale Expression in den tieferen bis mittleren Cortexschichten zu erkennen, außerdem war besonders am ventralen Ende des Gyrus cinguli ein zweites Expressionsmaximum in den höheren Cortexschichten zu sehen (Abb. 12A). Im Knockout war die Expression insgesamt schwächer, auffällig war ein

zusätzliches deutliches Signal in den höheren Schichten des Neocortex (Abb. 12B, Pfeile). Auch im Bereich des Gyrus cinguli gab es zwei topographisch deutlicher abgegrenzte Expressionsmaxima, eines korrelierend zum Wildtyp in den höheren Schichten des Cortex, das andere diffuser und tiefer als im Wildtyp.

1.4 Überexpression von *Nrp1* in cingulären Neuronen beeinflusst die callosale Axonwegfindung nicht.

Um den Effekt dieser Abweichungen der *Nrp1*-Expression, die im konditionalen *Sip1* Knockout gezeigt werden konnten, isoliert zu untersuchen, wurde das Expressionsplasmid *pCAG-Nrp1* konstruiert und zusammen mit *pCAG-eGFP* in Wildtyp-Mäuse des Stammes NMRI mittels In-Utero-Elektroporation eingebracht. Die Embryonen wurden im Stadium E13.5 in der kortikalen Mittellinie und in der Mantelkante elektroporiert, was den beiden Regionen entspricht, die in der In-Situ-Hybridisierung ein differentes Expressionsmuster aufwiesen. Dies führte zu einer erhöhten Expression von *Nrp1* in den elektroporierten Zellen, die durch das zusätzlich elektroporierte *eGFP* von nicht-elektroporierten Zellen fluoreszenzmikroskopisch unterschieden werden konnten. Als Kontrolle wurden jeweils Embryonen des gleichen Wurfes nur mit *pCAG-eGFP* elektroporiert. Nach erfolgter Elektroporation wurden die Embryonen im Stadium E18.5 entnommen. Auf Kryoschnitten wurden dann GFP und der Axonmarker L1 immunhistochemisch angefärbt. Das Wachstumsverhalten der elektroporierten callosal projizierenden Neurone konnte so untersucht werden (Abb. 13A).

Das Verhältnis der Fläche der grün fluoreszierenden callosalen Neurone zur Fläche des gesamten Corpus callosum im jeweiligen Anschnitt wurde als Maß für die erfolgreiche Axonwegfindung callosaler Neurone aus dem Gyrus cinguli gewertet. Dieses Verhältnis wurde zur elektroporierten Cortexfläche ins Verhältnis gesetzt. Beim Vergleich der *Nrp1*-elektroporierten Gehirne zu den Kontrollgehirnen fiel allerdings kein signifikanter Unterschied dieses Verhältnisses auf (Abb. 13B). Bei der Elektroporation von *Nrp1* wurde der relative fluoreszente Anteil des Corpus callosum mit 0.3165 ± 0.02428 gemessen. Im Vergleich zur GFP-Elektroporation mit 0.3328 ± 0.02327 ergab dies keinen signifikanten Unterschied (p-Wert=0.8905, n=3). Auch wurden keine verstärkten Abweichungen der Axone vom Weg zur Mittellinie sichtbar. So kann zunächst davon ausgegangen werden, dass die Überexpression von *Nrp1* in cingulären Neuronen die callosale Axonwegfindung nicht beeinflusst.

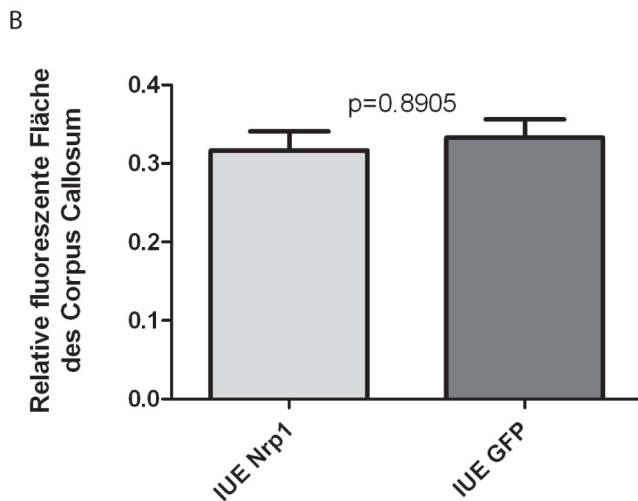
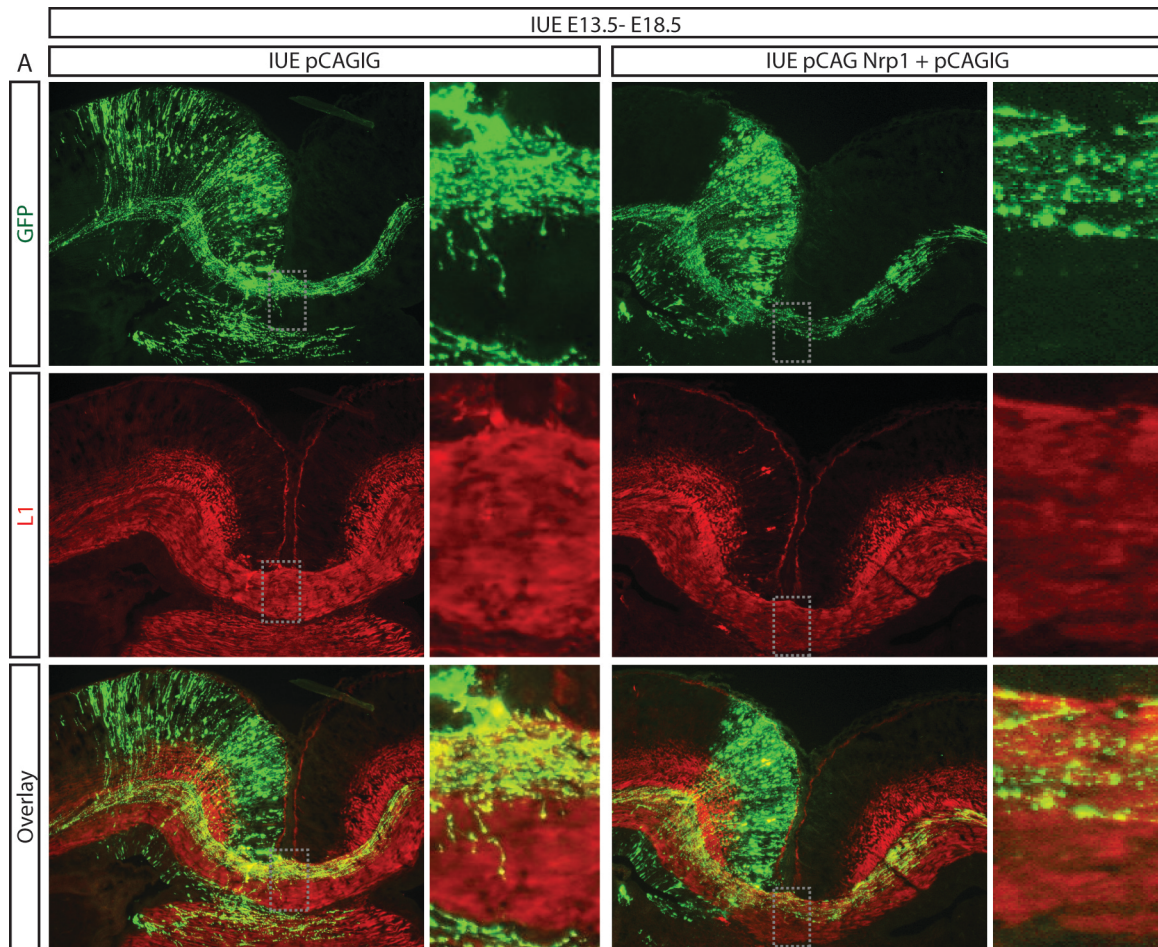


Abb. 13. In-Utero Elektroporation von Nrp1 bewirkt keine Veränderung der callosalen Projektion elektroporierter Neurone.

(A) Mittels In-Utero-Elektroporation im Stadium E13.5 wurde Nrp1 zusammen mit GFP in cingulären Wildtyp-Neuronen überexprimiert. Im Stadium E18.5 wurden die Embryonen entnommen. Axone der elektroporierten, callosal projizierenden Neurone wurden durch Antikörperfärbung auf GFP, das Corpus callosum durch Antikörperfärbung auf L1 sichtbar gemacht. Als Kontrolle fungierten Embryonen, die mit einem GFP-Plasmid elektroporiert wurden. Deutlich wird, dass die mit Nrp1 elektroporierten Neurone ein ähnliches Kreuzungsverhalten der Axone zeigen wie die der Kontrolle.

(B) Quantifiziert werden konnte dies, indem die grün fluoreszierende Fläche des Corpus callosum relativ zum gesamten Anschnitt des (durch den α L1-Antikörper rot fluoreszierenden) Corpus callosum gemessen wurde. In mit *Nrp1* und *GFP* elektroporierten Gehirnen wurde der relative grün fluoreszente Anteil des Corpus callosum mit 0.3165 ± 0.02428 gemessen. Im Vergleich dazu wurde in mit *GFP* elektroporierten Kontrollgehirnen der Anteil mit 0.3328 ± 0.02327 gemessen. Dies ergibt einen p-Wert von 0.8905 bei $n=3$ und damit keinen signifikanten Unterschied.

1.5 Die Expression von Sema3c ist in der Mittellinie des konditionalen *Sip1* Knockouts reduziert, im Bereich des subcallosalen Slings fehlt sie komplett

Sema3c ist als Chemoattractant des Nrp1-Rezeptor entscheidend an der Axonwegfindung der callosalen Neurone beteiligt (84). Es wird unter anderem von den Neuronen des subcallosalen Slings sezerniert.

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben ein komplettes Ausbleiben der Expression von Sema3c des konditionalen *Sip1* Knockouts (70). Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit zuverlässig widerlegt werden. Mittels In-Situ-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass Sema3c im Stadium E16.5 sowohl im Wildtyp als auch im Knockout kortikal exprimiert wurde, allerdings deutlich herabreguliert. Eine Expression im Bereich des neuronalen Slings fehlte komplett (Abb. 14).

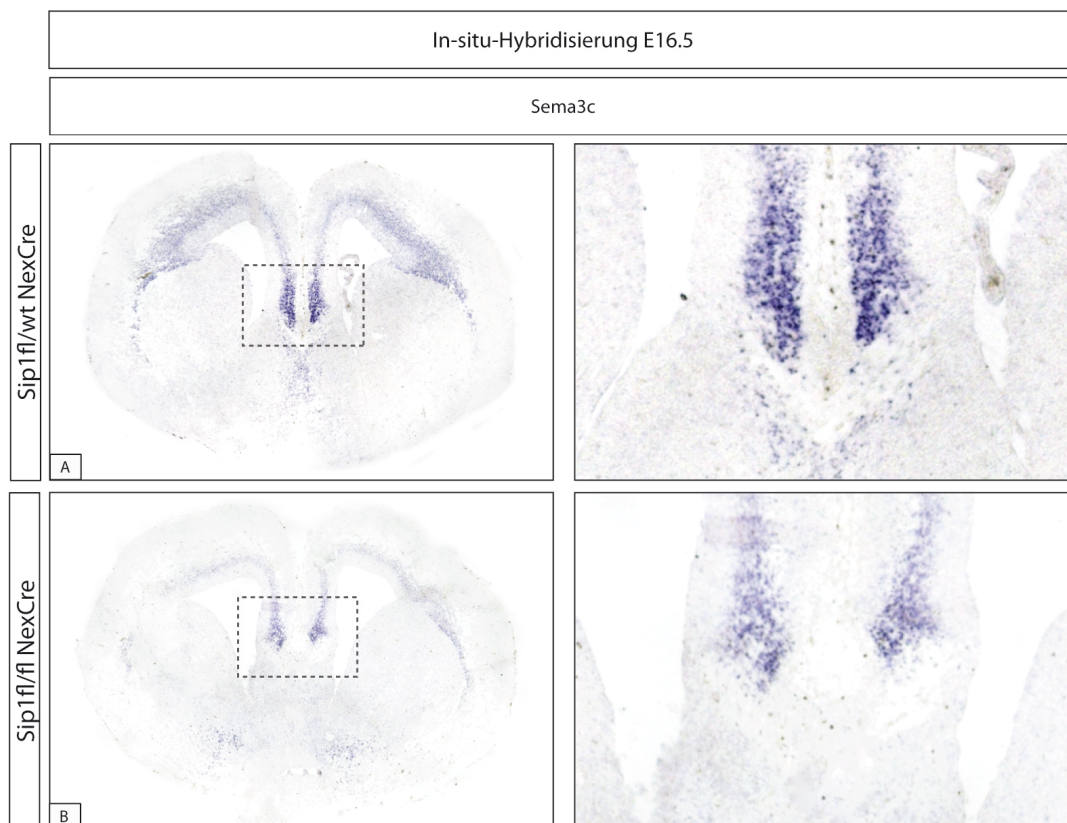


Abb. 14. Die Expression von *Sema3c* ist im konditionalen *Sip1* Knockout im Stadium E16.5 reduziert, im Bereich des subcallosalen Slings wird *Sema3c* im Knockout nicht exprimiert.

(A) In-Situ-Hybridisierung im Stadium E16.5 zeigen im Wildtyp eine starke Expression von *Sema3c* im ventralen Ende des Gyrus cinguli. Eine mäßige Expression findet sich im subcallosalen Sling und in tieferen Schichten des Neocortex. (B) Im Knockout wird *Sema3c* mit Ausnahme des neuronalen Slings in den gleichen Regionen exprimiert, das Signal ist allerdings deutlich abgeschwächt, was auf eine verminderte Expression schließen lässt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Expressionsmuster von *Sema3c* im weiteren Verlauf der Corpus callosum-Bildung von dem des Wildtyps abweicht. Dies wurde durch In-Situ-Hybridisierung von *Sema3c* im Stadium E18.5 untersucht. Dabei zeigte sich im Wildtyp eine Fusion der *Sema3c*-positiven Populationen beider Hemisphären und eine zweigeschichtete Expression von *Sema3c* ober- und unterhalb des Corpus callosum (Abb. 15A). Im Knockout blieb die Fusion dagegen aus und es fand sich keine Schichtung (Abb. 15B). Diese Abweichung kann durch morphologische Unterschiede, insbesondere das Ausbleiben der Fusion der Mittellinie, hervorgerufen sein.

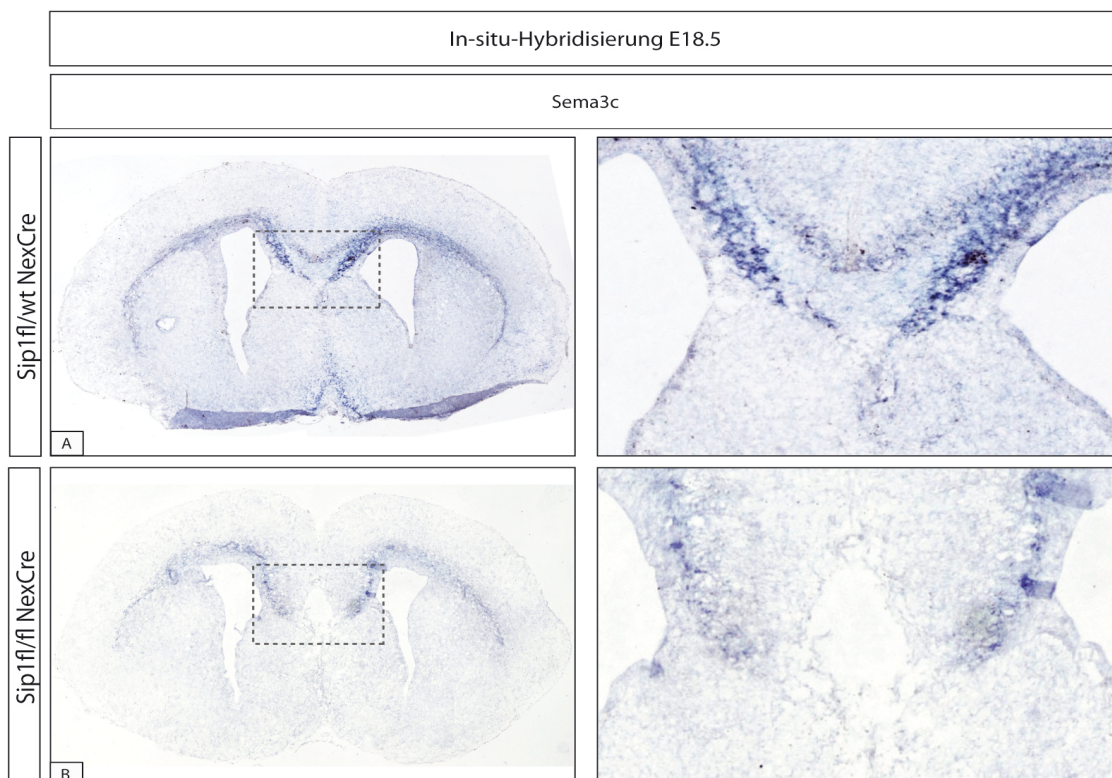


Abb. 15. Das Expressionsmuster von *Sema3c* im konditionalen *Sip1* Knockout weicht im Stadium E18.5 von dem des Wildtyps ab

(A) In-Situ-Hybridisierung im Stadium E18.5 zeigen im Wildtyp eine Population *Sema3c*-positiver Neurone über dem Corpus callosum und eine unter dem Corpus callosum. (B) Im Knockout zeigt sich

keine derartige Schichtung und keine Fusion der *Sema3c*-positiven Populationen beider Hemisphären. Die Expression ist insgesamt vermindert.

1.6 Die verminderte Expression von Sema3c ist ein Effekt von nicht-zellautonomen Veränderungen im konditionalen *Sip1*-Knockout

Um weitergehend zu untersuchen, ob die reduzierte Expression von *Sema3c* im konditionalen *Sip1* Knockout eine Folge des zellintrinsic Verlusts von *Sip1* oder eine Folge von zellextrinsischen Veränderungen war, wurde ein *Sip1*-Expressionsplasmid zusammen mit einem *GFP*-Plasmid in die kortikale Mittellinie von *Sip1^{fl/fl} Nex^{Cre}* Embryonen im Stadium E13.5 elektroporiert. Dies ermöglichte eine spezifische Mosaik-Expression von *Sip1* in den elektroporierten Zellen, während die umgebenden Zellen im Knockout aufgrund der Deletion weiterhin kein *Sip1* enthielten und somit das zellextrinsische Milieu unverändert blieb. Die elektroporierten Embryonen wurden im Stadium E16.5 entnommen, als Kontrolle fungierten *Sip1^{fl/wt} Nex^{Cre}* Embryonen desselben Wurfes. Alternierende Kryoschnitte wurden immunhistochemisch auf GFP gefärbt, während die jeweils benachbarten Schnitte für In-Situ-Hybridisierungen auf *Sema3c* prozessiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die durch Elektroporation ermöglichte zellintrinsic Expression von *Sip1* keine sichtbaren Veränderungen der *Sema3c*-Expression im Knockout verursachte (Abb. 16A). Auch in der Wildtyp-Kontrolle, in der die Elektroporation eine Überexpression von *Sip1* in den elektroporierten Zellen verursachte, zeigte sich keine Veränderung der *Sema3c*-Expression (Abb. 16B). Dies lässt darauf schließen, dass die reduzierte Expression von *Sema3c* im Knockout ein nicht-zellautonomer Effekt der *Sip1*-Deletion ist.

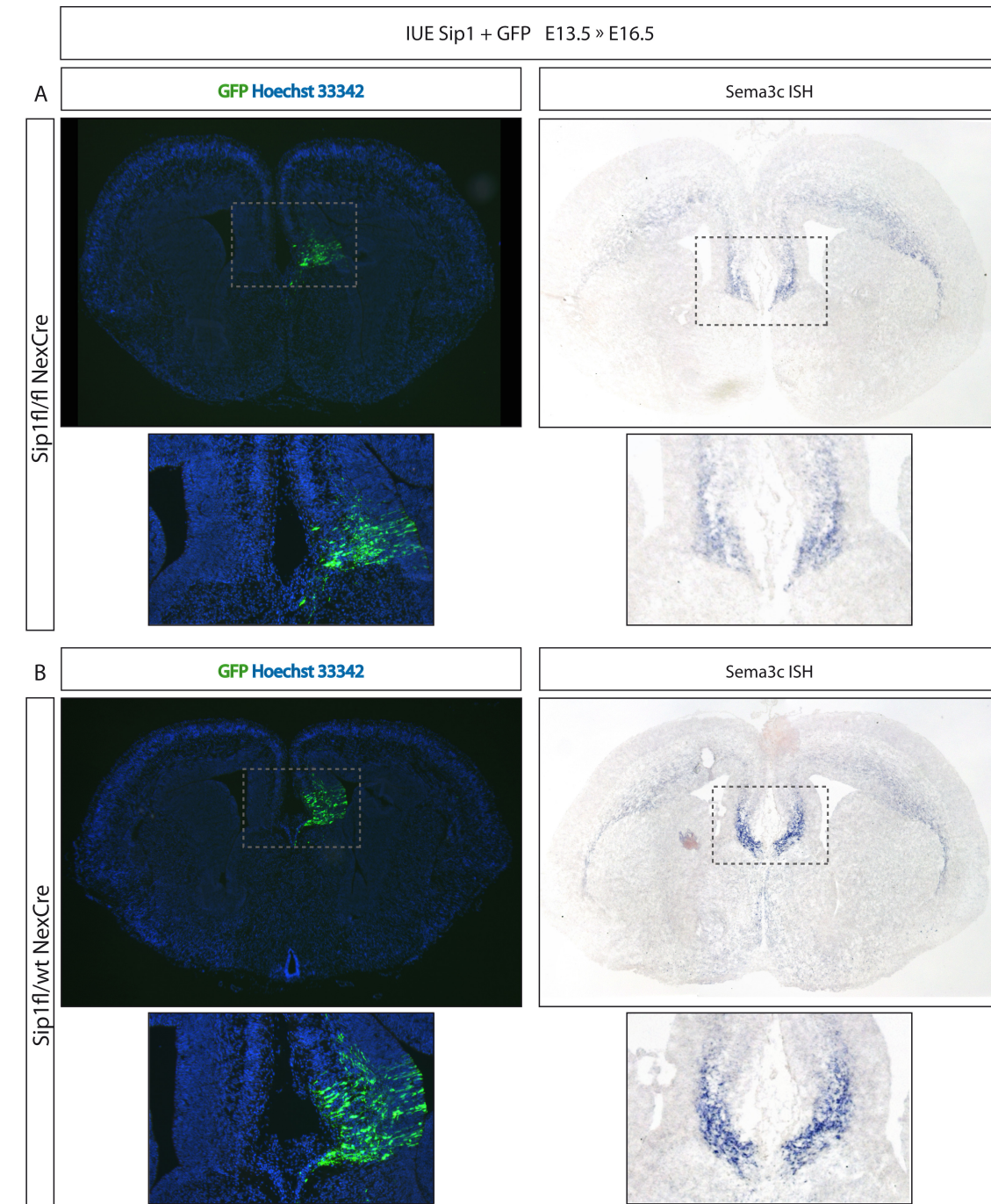


Abb. 16. Die reduzierte Expression von Sema3c ist ein nicht-zellautonomer Effekt der *Sip1*-Deletion

(A) In-utero-Elektroporation (IUE) von einem Sip1-Expressionsplasmid zusammen mit einem GFP-Plasmid in die kortikale Mittellinie von Sip1^{fl/fl}Nex^{Cre}-Embryonen verursacht keine sichtbaren Veränderungen der Sema3c-Expression. (B) IUE derselben Plasmide und damit Überexpression von Sip1 in Sip1^{fl/wt}Nex^{Cre}-Embryonen verursacht ebenso keine sichtbaren Veränderungen der Sema3c-Expression.

1.7 Andere in der Axonwegfindung chemotaktisch aktive Moleküle zeigen im konditionalen *Sip1* Knockout ein verändertes Expressionslevel

Die Expression weiterer ausgewählter Proteine, die in der Bildung des Corpus callosum eine wichtige Rolle spielen, wurde im Knockout mittels In-Situ-Hybridisierung untersucht.

Callosal projizierende Neurone exprimieren die Robo-Rezeptoren, deren Liganden die Familie der Slit-Proteine sind. Diese wirken chemorepellent und werden in den Gliapopulationen der Mittellinie exprimiert. Die Slit-Robo-Interaktion verhindert das Kreuzen von longitudinalen Axonen sowie das Zurückkreuzen von kommissuralen Axonen. Außerdem spielt sie eine wichtige Rolle bei der Wegfindung der Pionieraxone des Gyrus cinguli (47). Da im konditionalen *Sip1* Knockout sowohl Veränderungen der Gliapopulationen als auch des Gyrus cinguli nachgewiesen werden konnten, ergab sich die Frage, ob die Expression der Slit-Familie ebenfalls verändert war. In-Situ-Hybridisierungen von *Slit2* und *Slit3* ergaben keine zuverlässigen Signale, allerdings konnte gezeigt werden, dass die kortikale Expression von *Slit1* im Stadium E16.5 beim Knockout deutlich reduziert war (Abb. 17). Der Mangel dieses chemotaktisch aktiven Proteins könnte zusätzlich zu den obigen Veränderungen zur Agenesie des Corpus callosum beitragen.

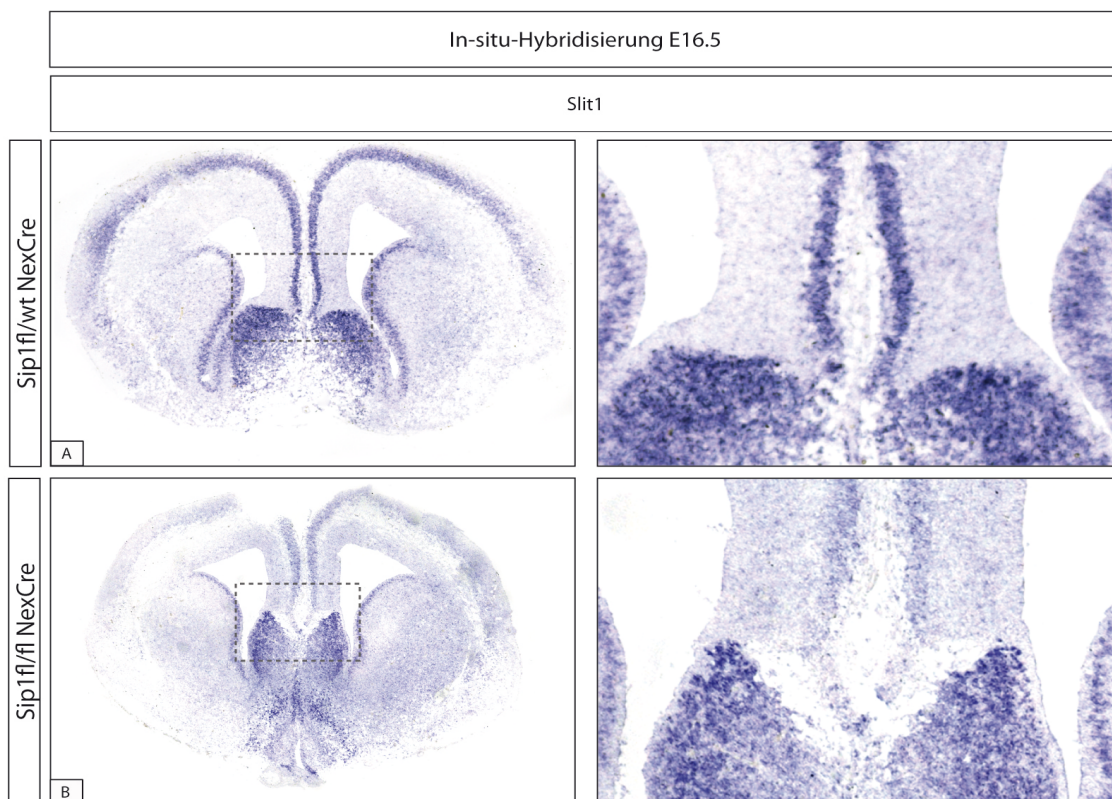


Abb. 17. Die Expression von *Slit1* ist in der Mittellinie des konditionalen *Sip1* Knockouts im Stadium E 16.5 deutlich reduziert.

(A) In-Situ-Hybridisierung mittels *Slit1*-Sonde zeigt eine deutliche Expression von *Slit1* in den oberen Schichten des Cortex im Wildtyp. (B) Im Knockout zeigt sich eine deutliche Reduktion der kortikalen Expression von *Slit1* bei gleichem Expressionsmuster.

Der Rezeptor Nrp2 gehört wie Nrp1 zur Neuropilin-Familie und beeinflusst durch Bindung an Semaphorine, wie Sema3c und Sema3f, die Axonwegfindung. Da eine deutliche Reduktion der Sema3c-Expression im konditionalen *Sip1* Knockout festgestellt wurde, untersuchten wir auch die Expression des Nrp2-Rezeptors. Auch hier konnte eine sichtbar verminderte kortikale Expression gezeigt werden, das Expressionsmuster war wiederum unverändert (Abb. 18).

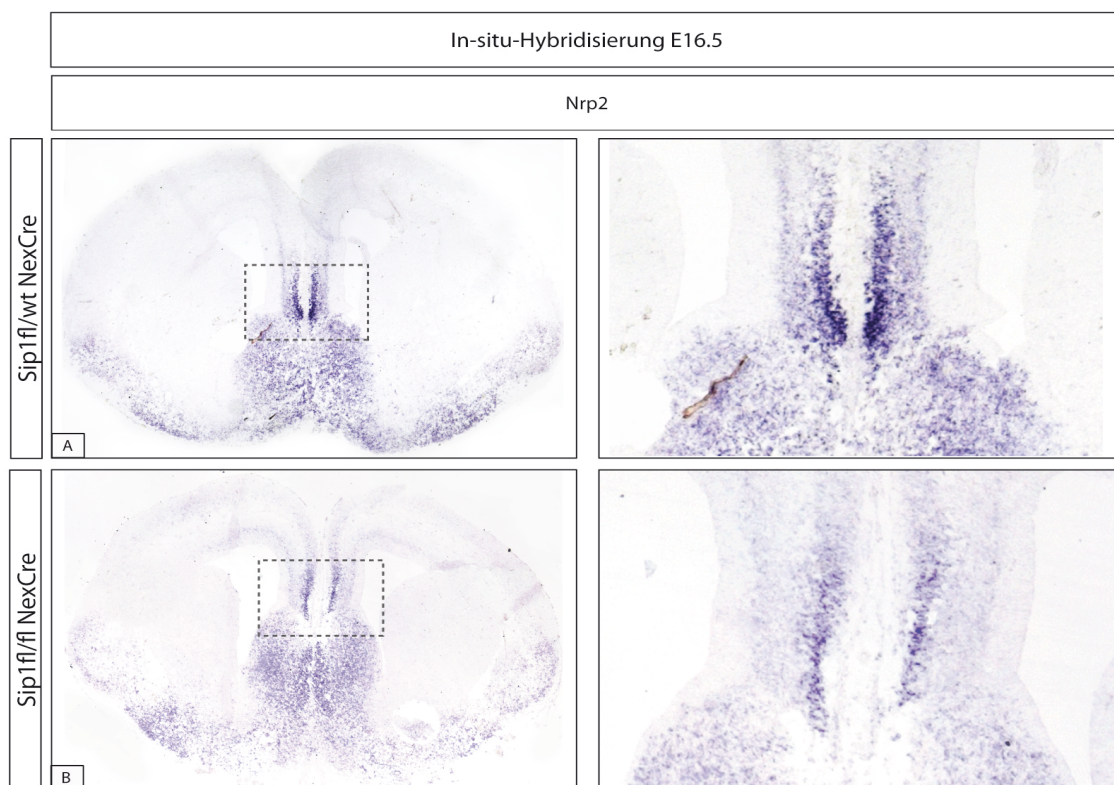


Abb. 18. Die Expression von *Nrp2* ist in der Mittellinie des konditionalen *Sip1* Knockouts im Stadium E16.5 deutlich reduziert.

(A) In-Situ-Hybridisierung des Wildtyps im Stadium E16.5 zeigen eine starke Expression von Nrp2 in der kortikalen Mittellinie. (B) Im Knockout zeigt sich die Expression als deutlich vermindert.

Der Transkriptionsfaktor NfiA spielt eine wichtige Rolle in der Formation der Glia der Mittellinie und somit in der Bildung des Corpus callosum (85). *NfiA* wird im Wildtyp in allen drei bei der Formation des Corpus callosum beteiligten Gliapopulationen (Midline Zipper Glia, Keilglia und Indusium griseum) exprimiert. Da diese Gliapopulationen im konditionalen *Sip1*-Knockout verändert sind, untersuchten wir die Expression von NfiA mittels In-Situ-

Hybridisierung. Es zeigte sich eine dem Wildtyp ähnliche Expression im Gyrus cinguli, während die Expression entlang der Mittellinie leicht reduziert war (Abb. 19).

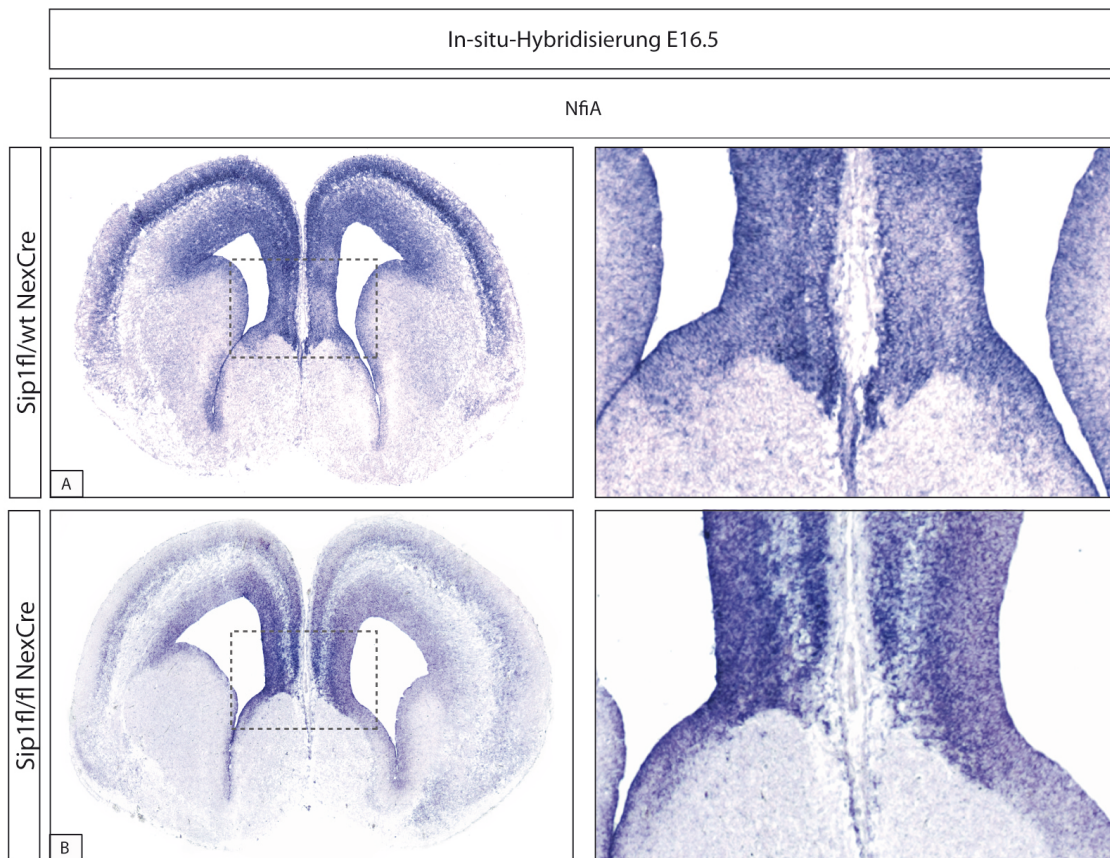


Abb. 19. Die Expression von *NfiA* zeigt in der Mittellinie des konditionalen *Sip1* Knockouts im Stadium E16.5 eine leichte Reduktion im Vergleich zum Wildtyp

(A) In-Situ-Hybridisierung mittels *NfiA*-Sonde zeigen im Wildtyp eine starke Expression im Gyrus cinguli und im Bereich der Mittellinie und des Indusium griseum. (B) Im *Sip1*-Knockout zeigt sich eine ähnliche Expression im Gyrus cinguli, allerdings ist die Expression in der Mittellinie leicht reduziert, im Bereich des Indusium griseum ist keine Expression zu erkennen.

Der Transkriptionsfaktor *NfiB* wird in callosal projizierenden Neuronen exprimiert und reguliert die Formation der Mittellinienglia. Es wurde außerdem suggeriert, dass *NfiB* die Expression von *Nrp1* im Gyrus cinguli reguliert (86). Da wir ein stark differentes Expressionsmuster von *Nrp1* im konditionalen *Sip1* Knockout festgestellt hatten, ergab sich die Frage, ob auch die Expression von *NfiB* verändert war. Entsprechende In-Situ-Hybridisierungen ergaben allerdings keine wesentlichen Veränderungen der Expression im Knockout im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 20).

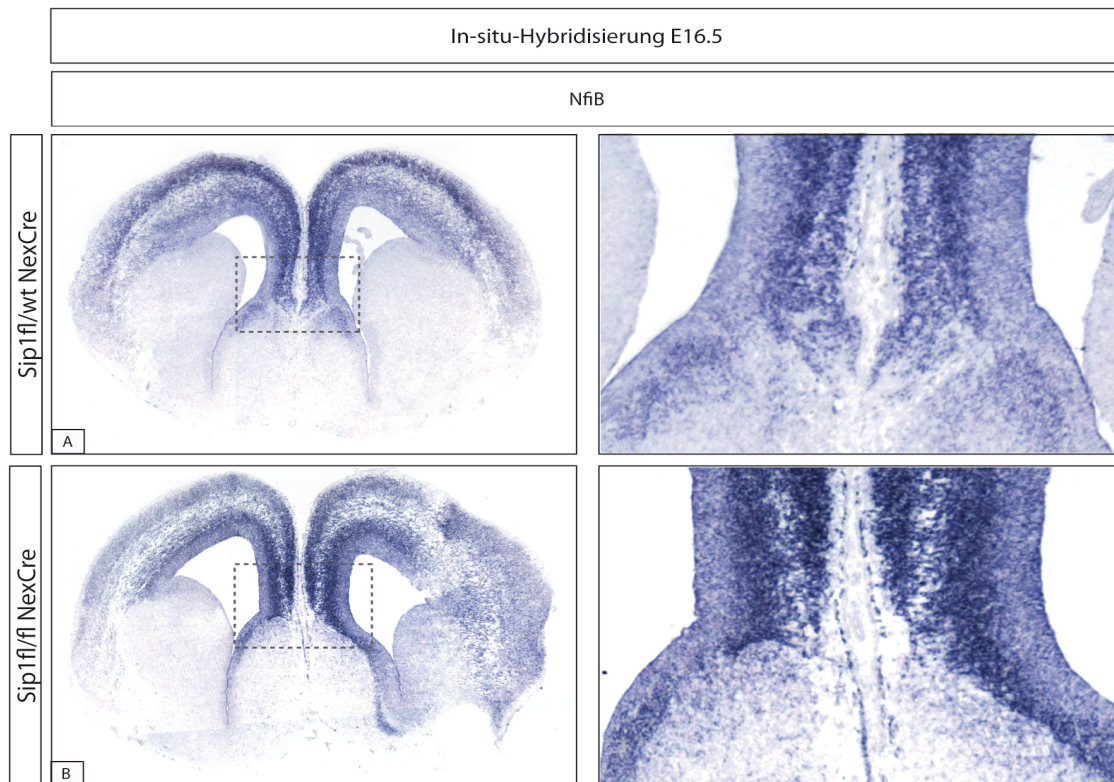


Abb. 20. Die Expression von *NfIB* zeigt in der Mittellinie des konditionalen *Sip1* Knockouts im Stadium E16.5 keine wesentlichen Veränderungen

(A) In-Situ-Hybridisierung mittels *NfIB*-Sonde zeigen im Wildtyp eine starke zweischichtige Expression im Gyrus cinguli mit mäßiger Expression in der Ventrikulären Zone. (B) In *Sip1*^{fl/fl}NexCre^{Cre}-Embryonen des gleichen Stadiums zeigt sich eine ähnliche Expression bezüglich Muster und Intensität.

2. Bedeutung des *Sip1* in der Architektur des Neocortex

2.1 *Wnt5a* ist im konditionalen *Sip1* Knockout in den oberen Cortexschichten hochreguliert

Semiquantitative Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass der konditionale *Sip1* Knockout im Stadium E14.5 eine erhöhte Expression von *Wnt5a*, das für ein sezerniertes Glykoprotein kodiert, aufweist (87). Die Wnt-Genfamilie wirkt über verschiedene Rezeptorvermittelte Signalwege als Regulator der Zelldifferenzierung (88). Es wurde gezeigt, dass *Wnt5a* durch Interaktion mit dem Ryk-Rezeptor das Axonwachstum entscheidend beeinflusst (89, 90). Es sollte nun untersucht werden, ob *Wnt5a* ein downstream-target von *Sip1* ist und damit die corticale Architektur im Sinne einer Verschiebung hin zu oberflächlichen Schichten, wie sie im konditionalen *Sip1* Knockout beobachtet wird, verursacht. Dazu wurde zunächst mittels In-Situ-Hybridisierung untersucht, ob *Wnt5a* im *Sip1* Knockout ein vom

Wildtyp differentes Expressionsmuster aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass *Wnt5a* im Stadium E14.5 eine spezifisch corticale Expression in den oberflächlichen Schichten aufweist, die vor allem in rostralen Schnitten nachzuweisen war. Im Wildtyp dagegen erwies sich die Expression als homogen im neuralen Gewebe. Eine Ausnahme bildet hier der hippocampale Bereich, bei dem sowohl im Wildtyp als auch im Knockout eine verstärkte Expression nachzuweisen war. Da die hippocampale Formation im *Sip1* Knockout zwischen E14.5 und E15.5 eine verminderte Entwicklung und Degeneration des Hippocampus aufzuweisen beginnt (65), war die topographische Ausdehnung der hippocampalen *Wnt5a*-Expression im Knockout entsprechend etwas geringer (Abb. 21).

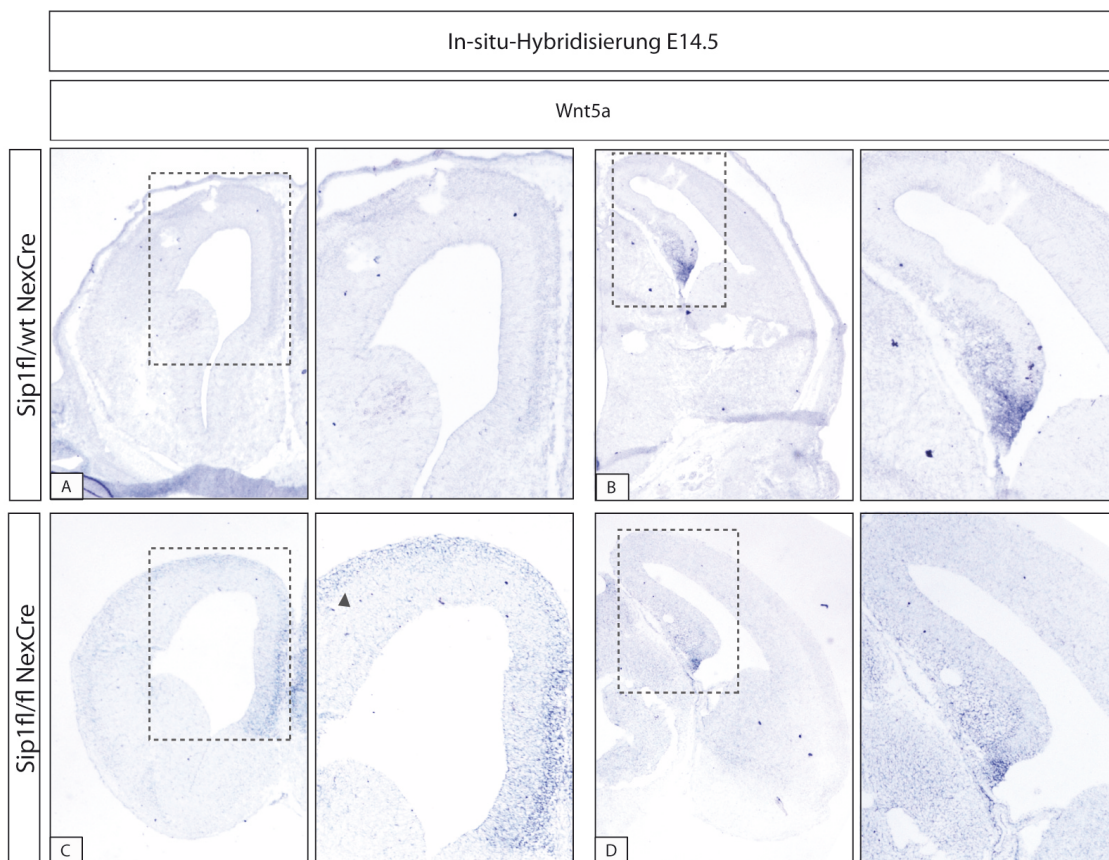


Abb. 21. Die Expression von *Wnt5a* zeigt im konditionalen *Sip1* Knockout rostral eine kortikale Hochregulation.

(A) In-Situ-Hybridisierungen zeigen im Wildtyp des Stadiums E 14.5 keine spezifische Expression von *Wnt5a* in rostralen Schnitten. Die Expression ist homogen im neuralen Gewebe verteilt, es zeigt sich jedoch eine sehr zarte gesteigerte Expression in oberflächlichen Cortexschichten. (B) In kaudalen Schnitten zeigt sich eine starke Expression spezifisch im hippocampalen Bereich. (C) Im konditionalen *Sip1* Knockout zeigt sich eine deutlich gesteigerte Expression in oberflächlichen Cortexschichten rostraler Schnitte. (D) Weiter kaudal zeigt sich eine wie im Wildtyp verstärkte Expression im hippocampalen Bereich. Die topographische Ausdehnung der hippocampal verstärkten

Expression zeigt sich im Knockout als etwas geringer, was durch eine reduzierten Entwicklung und Degradation des Hippocampus zu erklären ist (65).

2.2 Überexpression von *Wnt5a* in corticalen Neuronen verursacht keine Veränderungen der corticalen Architektur im Sinne einer Verschiebung hin zu oberflächlichen Schichten

Um zu untersuchen, ob diese spezifisch corticale Hochregulation der *Wnt5a*-Expression im *Sip1* Knockout den Phänotyp des Knockouts in Bezug auf die kortikale Architektur mitverursacht, wurde die isolierte Wirkung einer Überexpression von *Wnt5a* in corticalen Neuronen *in vivo* betrachtet. Hierzu wurde ein Expressionsplasmid *pCAGIG-Wnt5a* konstruiert und mittels In-Utero-Elektroporation in die sich entwickelnden corticalen Zellen von Wildtypembryonen des Stadiums E13.5, dem Höhepunkt der Produktion der Lamina V, eingebracht. Als Kontrolle wurde das Expressionsplasmid *pCAG-IRES-GFP (pCAGIG)* elektroporiert. Die Embryonen wurden im Stadium E17.5 entnommen und immunhistochemisch zur besseren Sichtbarkeit elektroporierter Zellen auf GFP angefärbt. Zusätzlich wurden immunhistochemische Färbungen auf die Schichtmarker *Ctip2* und *Satb2* durchgeführt, wobei *Ctip2* als Marker für tiefe Cortexschichten und *Satb2* als Marker für oberflächliche Cortexschichten fungiert. Als nukleäre Färbung wurde *Draq5* eingesetzt. So konnte untersucht werden, ob die Überexpression von *Wnt5a* zu einer Veränderung der kortikalen Architektur im Sinne eines veränderten Verhältnisses der Produktion tiefer und oberflächlicher Schichten verursacht. Elektroporierte Areale zeigten einen Anteil von 0.106 ± 0.0523 erfolgreich elektroporierter und damit grün fluoreszierender Zellen. Der Anteil *Ctip2*-positiver Zellen in *Wnt5a*-elektroporierten Arealen unterschied sich mit 0.3378 ± 0.0547 nicht signifikant von *GFP*-elektroporierten Kontrollhirnen, die einen Anteil von 0.3298 ± 0.0628 aufwiesen ($p=0.6704$, $n=3$). Auch der Anteil von *Satb2*-positiven Zellen unterschied sich mit 0.2776 ± 0.0345 nicht signifikant von der Kontrolle mit 0.2813 ± 0.0324 ($p=0.8497$, $n=3$) (Abb. 22).

Das Experiment wurde daraufhin mit einer früheren Elektroporation im Stadium E12.5 wiederholt, da die Produktion tiefer Cortexschichten schon in diesem Stadium beginnt. Es zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen *Wnt5a*-elektroporierten Gehirnen und Kontrollgehirnen. Der Anteil erfolgreich elektroporierter Zellen betrug hier 0.0909 ± 0.0258 . Der Anteil *Ctip2*-positiver Zellen betrug in *Wnt5a*-elektroporierten Arealen im Schnitt 0.3474 ± 0.0267 im Vergleich zu 0.3302 ± 0.0294 bei der Kontrolle ($n=2$), während der Anteil *Satb2*-positiver Zellen in *Wnt5a*-elektroporierten Arealen 0.3105 ± 0.0305

im Vergleich zu 0.3362 ± 0.0281 bei der Kontrolle ebenfalls ähnlich gemessen wurde ($n=2$). Trotz geringer Fallzahl von $n=2$ bei der E12.5-Elektroporation und damit geringer Aussagekraft wurde kein Anlass zur Wiederholung des Experiments und statistischen Auswertung gesehen, da sich keine Anzeichen auf eine Wirkung der *Wnt5a*-Überexpression auf die corticale Architektur zeigten.

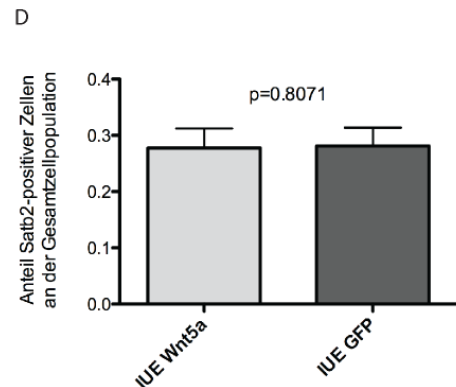
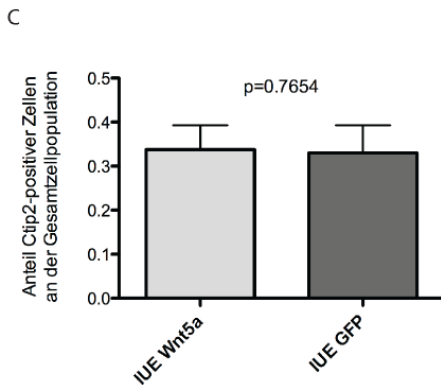
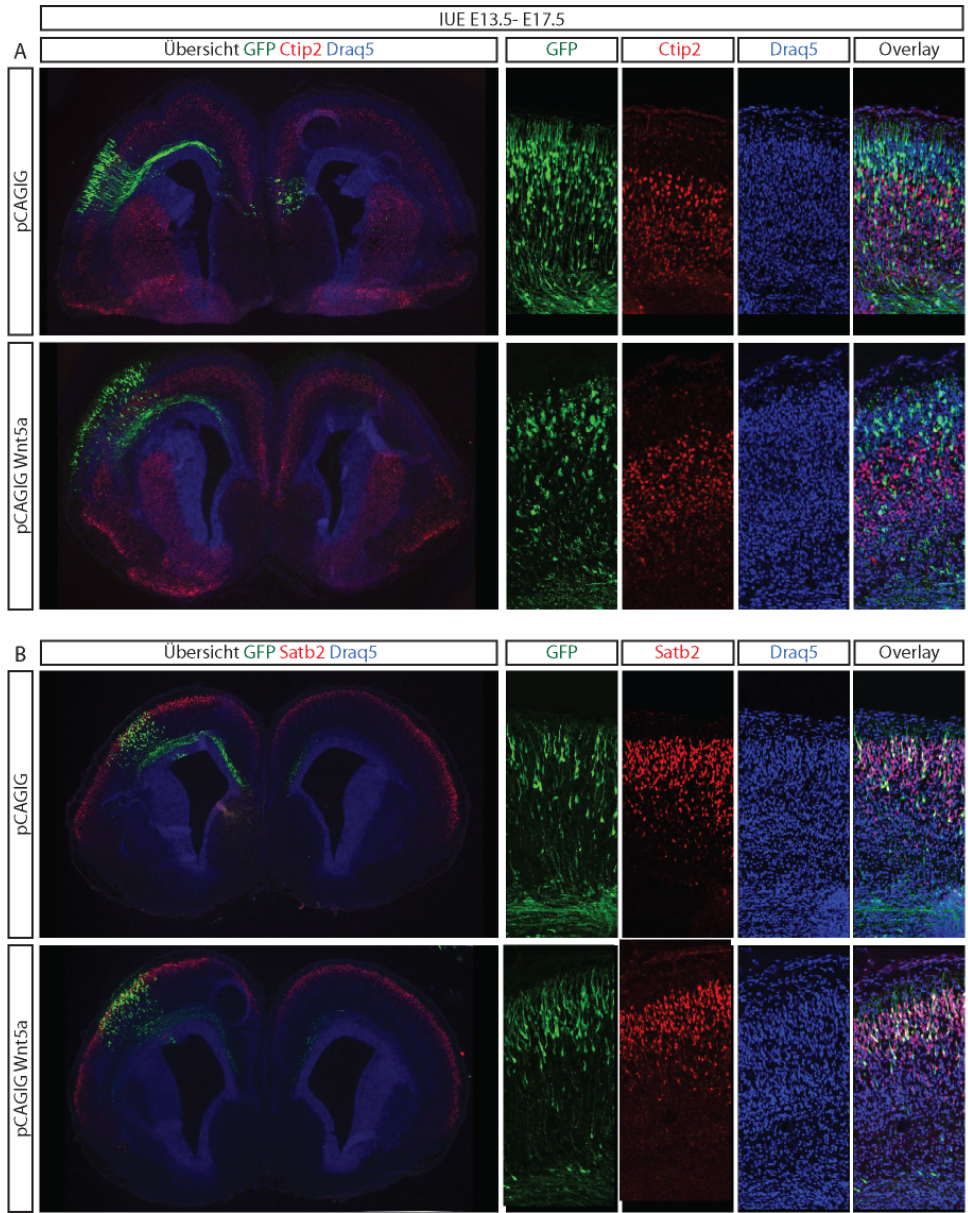


Abb. 22. Überexpression von *Wnt5a* in corticalen Zellen verursacht keine veränderte Produktion oberflächlicher oder tiefer Schichten des Cortex.

(A) Anfärbung auf den Zellmarker Ctip2 zeigt die Verteilung von Neuronen tiefer Schichten nach erfolgter In-Utero-Elektroporation von *Wnt5a* bzw. GFP als Kontrolle. Elektroporierte Zellen exprimieren GFP und werden durch zusätzliche Anfärbung sichtbar. Augenscheinlich ist durch *Wnt5a*-Elektroporation im Vergleich zur GFP-Kontrolle keine Veränderung der Verteilung Ctip2-positiver Zellen zu erkennen. (B) Anfärbung auf den Zellmarker *Satb2* zeigt die Verteilung von Neuronen oberflächlicher Schichten nach In-Utero-Elektroporation von *Wnt5a* bzw. GFP als Kontrolle. Auch hier ist augenscheinlich keine Veränderung der Verteilung rot angefarbter Neuronen zu erkennen. (C) Quantifizierung der Ergebnisse zeigt keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den Anteil tiefer bzw. oberflächlicher Neuronenschichten. Die Anzahl Ctip2- bzw. *Satb2*-positiver Zellen wurde im elektroporierten Bereich jeweils ins Verhältnis zur Anzahl der Gesamtzellpopulation der corticalen Platte gesetzt. Beim Vergleich Ctip2-positiver Zellen ergab sich ein p-Wert von 0.7654 bei $n=3$, also kein signifikanter Unterschied zwischen GFP-Elektroporation und *Wnt5a*-Elektroporation. (D) Auch beim Vergleich *Satb2*-positiver Zellen konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, hier ergab sich ein p-Wert von 0.8071 bei $n=3$. Elektroporierte Areale zeigten einen Anteil von 0.106 ± 0.0523 erfolgreich elektroporierter Zellen.

2.3 *Ldb3* zeigt keine spezifische Hochregulation

Semiquantitative PCR-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben weiterhin gezeigt, dass der konditionale *Sip1* Knockout im Stadium E14.5 eine erhöhte Expression von *Ldb3* aufweist (87). *Ldb3* kodiert für ein Protein der Lim-Domain-Bindungsproteine. Diese binden an die Lim-Homöodomäne-Proteine, die als Transkriptionsfaktoren die Genexpression in der Entwicklung regulieren. Eine RNA-Sonde wurde für *Ldb3* generiert, zeigte aber in mehrfach durchgeführten In-Situ-Hybridisierungen weder im Wildtyp noch im Knockout ein spezifisch kortikales Signal. Konstruierung einer weiteren *Ldb3*-Sonde ergab gleiche Ergebnisse. Die Funktion der RNA-Sonden konnte durch ein hochspezifisches außercerebrales Signal gezeigt werden (Abb. 23). Innerhalb neuronalen Gewebes dagegen zeigte sich konsequent ein homogen schwaches Signal.

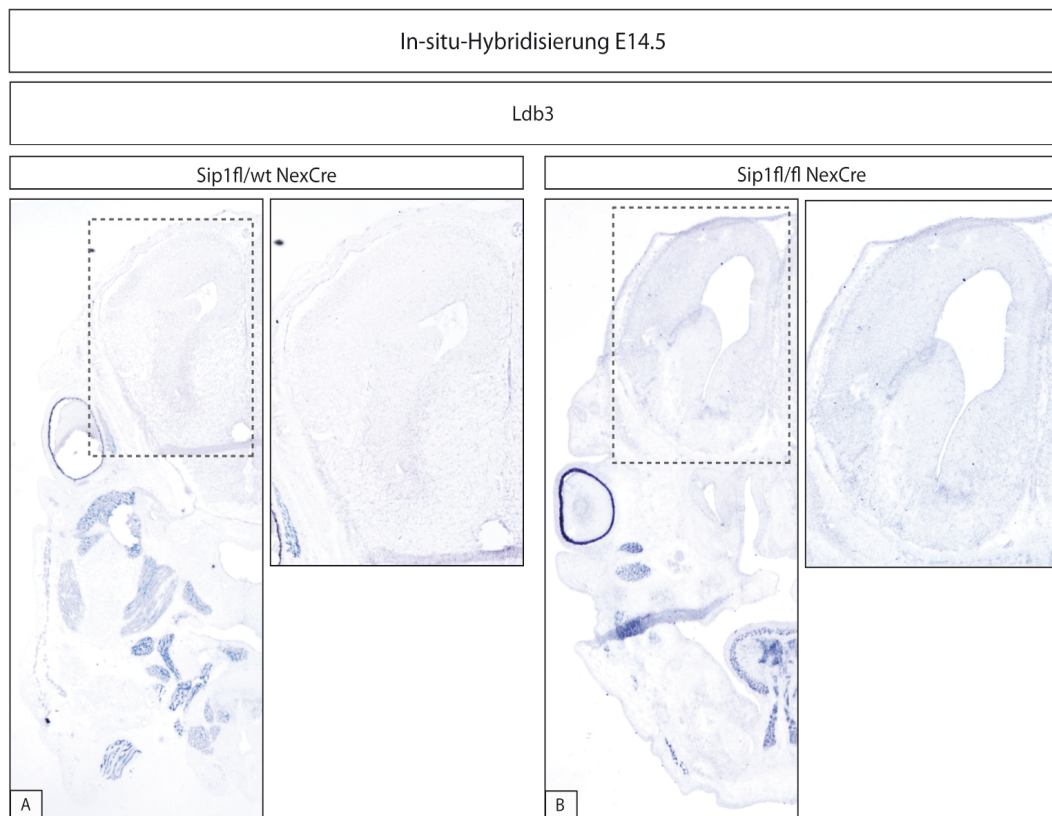


Abb. 23. *Ldb3* zeigt im Stadium E14.5 weder im Wildtyp noch im konditionalen *Sip1* Knockout ein spezifisch corticales Signal.

(A) Im Wildtyp zeigt sich im neuronalen Gewebe ein homogen schwaches Signal der *Ldb3*-RNA-Sonde. Deutliche Expression wird dagegen in außercerebralen Strukturen sichtbar. (B) Auch im Konditionalen *Sip1* Knockout zeigt sich eine spezifische Expression lediglich in außercerebralen Strukturen.

2.4 Expressionsmuster von *Ripk4* und *Elovl7* konnten nicht aufgezeigt werden

Für *Ripk4* und *Elovl7* ergaben semiquantitative Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ebenfalls eine Hochregulation im Cortex des konditionalen *Sip1* Knockouts (87). Trotz Konstruierung jeweils zweier unterschiedlicher RNA-Sonden konnten keine konklusiven Ergebnisse per In-Situ-Hybridisierung erzielt werden. Die Signale blieben schwach und unspezifisch. Schlüsse auf die Expressionsmuster von *Ripk4* und *Elovl7* im *Sip1* Knockout konnten deshalb nicht gezogen werden.

DISKUSSION

Da die Funktionalität des Nervensystem wesentlich auf der Komplexität neuronaler Verbindungen beruht, trägt die Erforschung der Entstehung dieser Verbindungen dem allgemeinen Verständnis der Funktionalität des Gehirns entscheidend bei (3). Im Lauf der Evolution sind die Anzahl neocorticaler Neurone und die Verbindungen unter diesen immer vielzähliger und komplexer geworden. Diese Zunahme an neuronalen Schaltkreisen stellt einen wichtigen Grund für die zunehmenden kognitiven Fähigkeiten höher entwickelter Spezies dar.

Der Prozess der Axonwegfindung stellt dabei einen integralen Teil der Entwicklung neuronaler Verbindungen dar. Während dieses Prozesses wächst das Axon in eine exakt definierte Richtung und passiert dabei Wegweiser-Regionen, um schließlich bestimmte neuronale Verbindungen herzustellen. Dieser komplexe Prozess wird sowohl durch zellextrinsische als auch zellintrinsische Effekte gesteuert und beeinflusst.

Weiterhin stellt die Spezialisierung von Neuronen zu Subtypen eine wichtige Rolle in der Ausbildung funktionaler neuronaler Verschaltungen dar. Jeder Subtyp erfüllt dabei eine spezifische Funktion und projiziert in bestimmte Regionen. Neuronale Subtypen werden in der Entwicklung des Gehirns in hochspezifischen Zeitfenstern und Quantitäten gebildet und wandern dann zielgenau an ihre spezifischen finalen Positionen. Auch dieser Prozess wird durch mannigfaltige zellextrinsische und zellintrinsische Mechanismen gesteuert.

In dieser Arbeit wurden die Effekte des Transkriptionsfaktors *Sip1* auf die Axonwegfindung callosaler Neurone untersucht und mögliche Mechanismen dieser Wirkungen aufgedeckt. Weiterhin wurden die Effekte des *Sip1* auf die corticale Architektur untersucht, indem mögliche Mechanismen analysiert wurden, die zur Veränderung der corticalen Architektur bei *Sip1*-Deletion führen.

1. Callosale Axone überqueren im konditionalen *Sip1* Knockout nicht die Mittellinie.

Es konnte gezeigt werden, dass corticale Kommissuren in der Entwicklung des konditionalen *Sip1* Knockouts dramatisch verändert sind (Abb. 24). Das Corpus callosum wird im Knockout nicht ausgebildet. Dabei projizieren callosale Neurone zwar zur Mittellinie, aber kreuzen diese nicht zur kontralateralen Hemisphäre und weichen stattdessen nach ventral ab. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass auch die Commissura anterior im *Sip1*

Knockout fehlt (70). Dabei konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass entsprechende Axone verzögert gebildet werden, aber nicht die Mittellinie kreuzen.

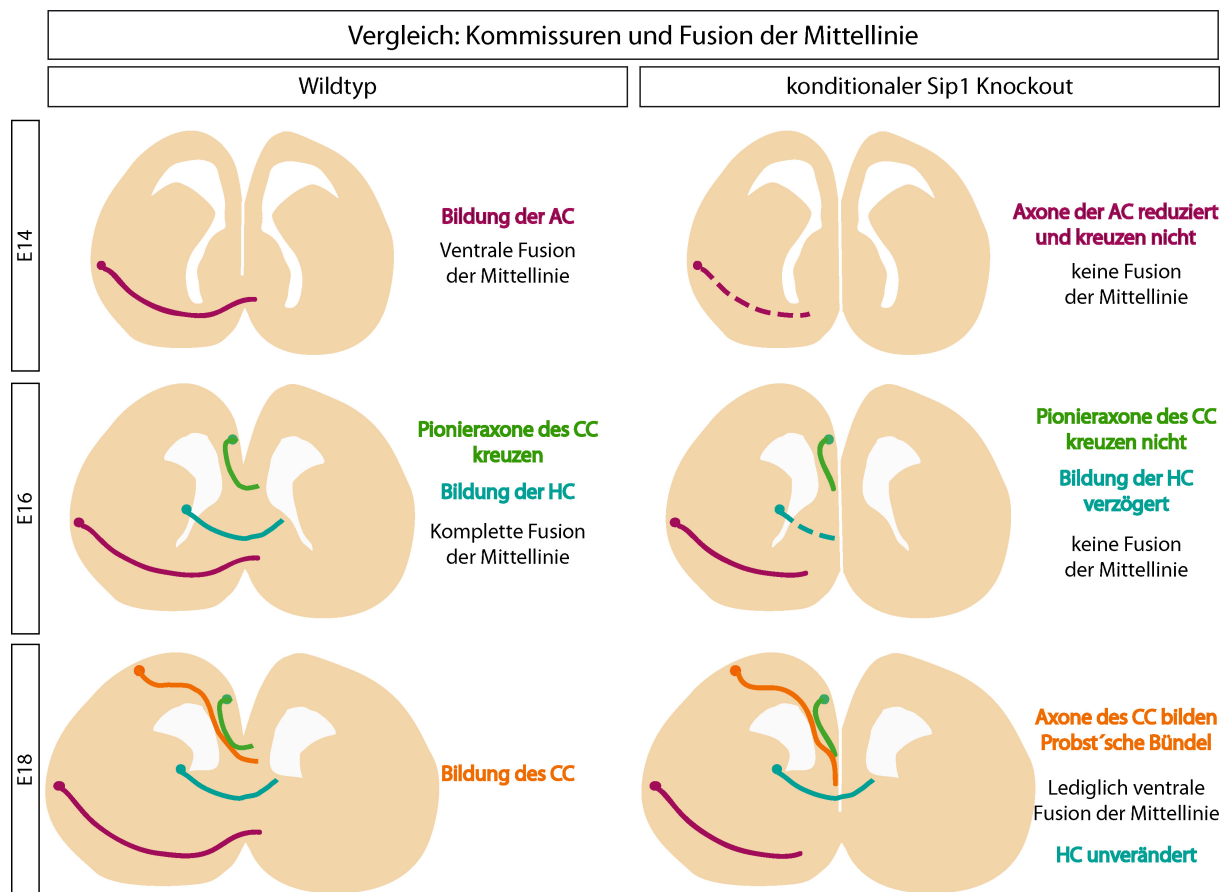


Abb. 24. Die Entwicklung kommissuraler Faserverbindungen ist im konditionalen *Sip1* Knockout stark verändert.

Das Schema zeigt die Entwicklung kommissuraler Faserverbindungen und die Fusion der Mittellinie des Wildtyps und des konditionalen *Sip1* Knockouts im Vergleich. Axone der Commissura anterior (AC) entwickeln sich verzögert und kreuzen nicht die Mittellinie. Auch die Bildung der Commissura hippocampi (HC) erfolgt verzögert, jedoch erfolgt die Ausbildung auch im Knockout in vollem Maße. (In der Abbildung wurden alle Kommissuren zur Vereinfachung in eine Ebene projiziert, allerdings kreuzt die HC in Wirklichkeit dorsal des CC. Im Bereich der HC ist die Mittellinie auch im Knockout fusioniert.) Axone des Corpus callosum (CC) kreuzen im Knockout nicht die Mittellinie und bilden Probst'sche Bündel. Die Fusion der Mittellinie erfolgt im Knockout verzögert und unvollständig, ventral bleibt sie ganz aus.

In Abgrenzung dazu zeigt sich die Commissura hippocampi im *Sip1* Knockout interessanterweise unverändert, wenn auch in der Entwicklung verzögert. Die volle Wirkung von *Sip1* auf die Ausbildung kommissuraler Faserverbindungen ist also auf Neuronen des

Corpus callosum und der Commissura anterior beschränkt, wohingegen hippocampale Neurone unabhängig von Sip1 interhemisphärische Verbindungen ausbilden können, obwohl *Sip1* auch im Hippocampus exprimiert ist (65). Ein Grund hierfür könnte die im Vergleich zum Neocortex diverse histologische Struktur und Entwicklung des hippocampalen Cortex bilden. Der Hippocampus ist entwicklungsgeschichtlich ein älterer Teil des Cortex und gehört zum sogenannten Archicortex (91, 92). Histologisch wird seine Struktur in Abgrenzung zum neocorticalen Isocortex als Allocortex bezeichnet (93, 94). Dieser weist lediglich drei corticale Schichten auf: die Lamina molecularis, die Lamina pyramidalis und die Lamina multiformis. Es liegt also nahe, dass die Mechanismen der Entwicklung des Allocortex von denen des Isocortex verschieden sind und so auch Sip1 eine andere Rolle spielt.

Interessant bleibt hierbei trotzdem, dass auch die Commissura anterior nicht gebildet wird. Axone dieser Kommissur entstammen zwar auch neokortikalen Regionen der Temporallappen, aber auch teilweise der Riechkolben (95, 96). Die Riechkolben gehören zum Olfaktorischen Cortex und zeigen den histologischen Aufbau des Paläocortex, dem entwicklungsgeschichtlich ältesten Teil des Cortex (97, 98). Wenn wir wie oben ausgeführt davon ausgehen, dass Sip1 nur die Bildung von Kommissuren neocorticaler Neurone steuert, so wäre es widersprüchlich, dass die entwicklungsgeschichtlich noch älteren olfaktorischen Neurone ebenfalls nach *Sip1*-Deletion nicht die Mittellinie kreuzen. Eine schlüssigere Erklärung, warum Neurone des Corpus callosum und der Commissura anterior nicht kreuzen, Neurone der Commissura hippocampi aber schon, könnte auf der unvollständigen Fusion der Mittellinie des *Sip1* Knockouts basieren. Dieser Gedanke wird in Punkt 2 näher erläutert.

Als Modell für die Mowat-Wilson-Erkrankung stellt sich der konditionale *Sip1* Knockout als nützlich heraus, da der Phänotyp des Knockouts einige Symptome des vielgestaltigen Syndroms nachahmt (99, 100, 101). Über 40% der Betroffenen des Mowat-Wilson-Syndroms weisen wie der *Sip1* Knockout eine komplette Agenesie des Corpus callosum auf (102, 103, 75). Erforschung der Mechanismen im Knockout tragen deshalb zum besseren Verständnis dieser Krankheit bei.

2. Eine verzögerte und unvollständige Fusion der Mittellinie kann zur Agenesie des Corpus callosum bei *Sip1*-Deletion führen.

Ein Mechanismus, der im *Sip1* Knockout die Agenesie des Corpus callosum verursachen könnte, ist das Ausbleiben der vollständigen Fusion der Mittellinie. Durch morphologische Betrachtungen konnte gezeigt werden, dass im konditionalen *Sip1* Knockout die dorsale Fusion der Mittellinie ausbleibt. Unsere Ergebnisse deuten darauf, dass auch die ventrale

Fusion der Mittellinie im Knockout erst zwischen Tag E16.5 und E18.5 erfolgt, während die ventrale Mittellinie im Wildtyp schon zwischen Tag E14.5 und E15.5 zu fusionieren beginnt. Genau in diesem Sachverhalt ließe sich auch erklären, warum die Commissura anterior neben dem Corpus callosum nicht gebildet wird. Gehen wir davon aus, dass die Fusion der Mittellinie eine integrale Voraussetzung für das Kreuzen kommissuraler Neurone darstellt, so könnte der Grund für die fehlende Commissura anterior darin liegen, dass die ventrale Mittellinie nicht rechtzeitig fusioniert. Die Commissura anterior erscheint im Wildtyp nämlich im Stadium E14.5 (104). Da in diesem Stadium die ventrale Mittellinie im Knockout noch nicht fusioniert ist, könnten entsprechende Fasern nicht kreuzen. Gleiches gälte für die Bildung des Corpus callosum, wobei hier die Fusion der dorsalen Mittellinie komplett ausbleibt und damit ein morphologisches Hindernis für kreuzende Axone gebildet wird. Im Bereich der Commissura hippocampi dagegen fusioniert die Mittellinie auch im Knockout rechtzeitig, sodass die hippocampalen Fasern ungehindert kreuzen können. Die morphologische Barriere, die durch die unvollständige Fusion der Mittellinie besteht, könnte in diesem Sinne einen entscheidenden Faktor für die Agenesie des Corpus Callosum darstellen.

3. Die reduzierte und zum Teil ausbleibende Entwicklung glialer Populationen kann zur Agenesie des Corpus callosum bei *Sip1*-Deletion führen.

Einen Grund für die fehlende Fusion der Mittellinie könnte die beim *Sip1* Knockout beobachtete Reduktion glialer Populationen der Mittellinie darstellen (Abb. 25). Die wesentliche Funktion der Midline Zipper Glia besteht in der Vermittlung der Fusion der beiden Hemisphären. Dabei fusionieren die Basallaminae, anschließend wird das Bindegewebe zwischen den beiden Hemisphären durch neuronales Gewebe ersetzt (105, 47, 106). In dieser Arbeit konnte belegt werden, dass die Midline Zipper Glia durch *Sip1*-Deletion reduziert ist. So zeigten In-Situ-Hybridisierungen und Immunhistochemie, dass die Midline Zipper Glia ab Stadium E18.5 zwar wie im Wildtyp nachweisbar, aber reduziert war (Abb. 8 und 9). Dies könnte der Grund für die fehlende Fusion der Mittellinie sein. Das Indusium griseum fehlte im *Sip1* Knockout komplett. Indusium griseum Glia hat viele phänotypische und molekulare Gemeinsamkeiten mit der Midline Zippe Glia und es wird vermutet, dass diese beiden Populationen aus einer Population hervorgehen und erst durch die Entstehung des Corpus callosum räumlich getrennt werden (107). So gehen wir davon aus, dass diese Gliavorläuferpopulation im *Sip1* Knockout soweit reduziert ist, dass es dorsal des

Corpus callosum nicht zur Bildung des Indusium griseum kommt und die Midline Zipper Glia zwar präsent, aber reduziert ist.

Die Glia des Indusium griseum fungiert wie die Keilglia, als Wegweiser-Struktur für kreuzende callosale Axone (47). Diese Glia sezerniert Proteine der Slit-Familie, die chemorepellent auf Robo-Rezeptoren wirken, die von callosalen Neuronen exprimiert werden (108). Es wurde gezeigt, dass callosale Axone nur in Präsenz dieser glialen Strukturen zur Mittellinie wachsen (47, 109). In der Mittellinie angekommen bilden die glialen Strukturen eine Art Tunnel, von dessen Wänden die Neurone chemotaktisch abgestoßen werden, und so in der richtigen Orientierung zur kontralateralen Hemisphäre gelangen. Es wird also deutlich, dass das Fehlen des Indusium griseum einen weiteren Grund für das ausbleibende Kreuzen callosaler Axone beim *Sip1* Knockout darstellen könnte.

Da *Sip1* nur in postmitotischen Zellpopulationen des Neocortex exprimiert wird, ist die Reduktion der Mittellinienglia kein Effekt von Proliferationsstörungen der Mittellinie, sondern wahrscheinlich Effekt einer Differenzierungsstörung von radialer Glia zu Mittellinienglia. Gegenstand weiterer Forschung könnte hier sein, über welchen genauen Mechanismus *Sip1* die Reduktion der Midline Zipper Glia und der Glia des Indusium griseum vermittelt.

Die Keilglia dagegen ist im *Sip1* Knockout präsent und nicht reduziert. Wir gehen daher davon aus, dass sie in ihrer Entstehung nicht dramatisch von *Sip1* beeinflusst wird.

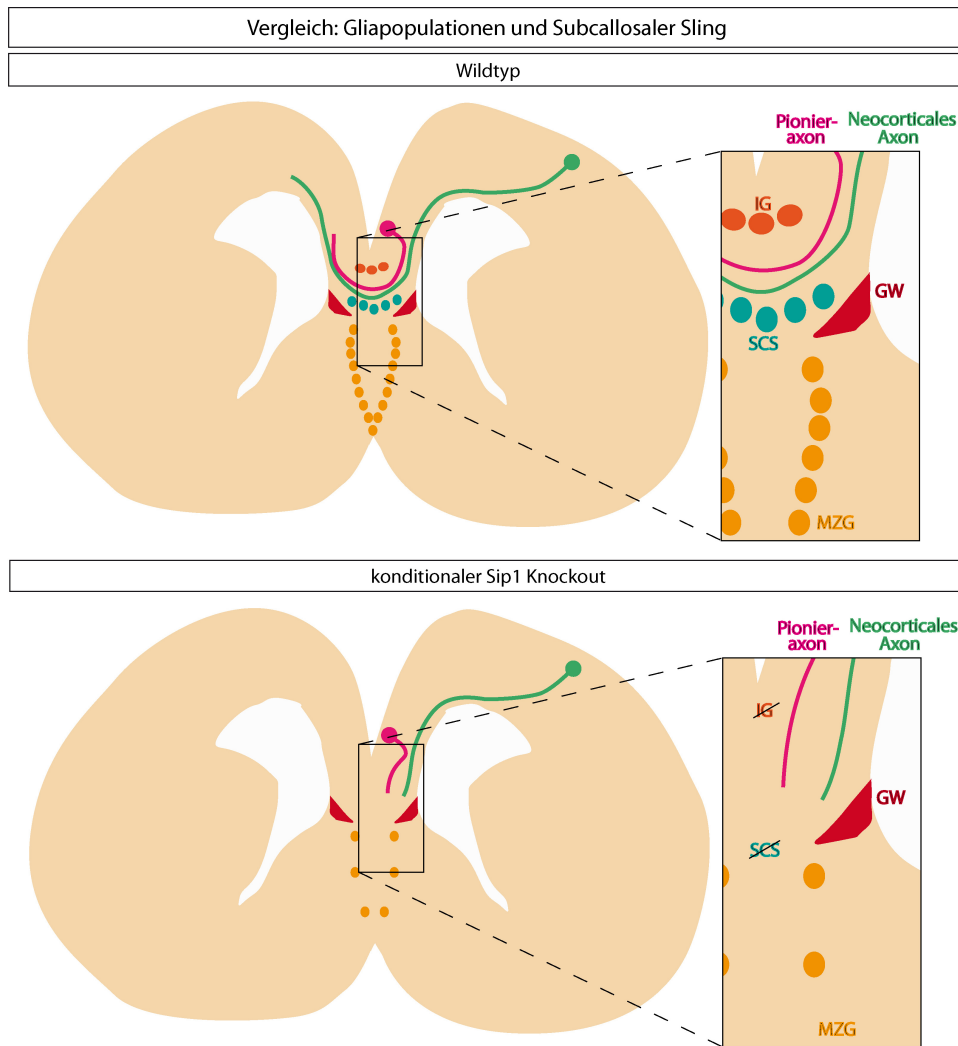


Abb. 25. Gliapopulationen der Mittellinie sind im konditionalen *Sip1* Knockout reduziert.

Der konditionale *Sip1* Knockout zeigt ein komplettes Fehlen des Indusium griseum (IG), auch der subcallosale Sling (SCS) fehlt an der zu erwartenden Position, die Midline Zipper Glia (MZG) ist stark reduziert, die Keilglia zeigt keine Unterschiede.

4. Der *Sip1* Knockout weist ein Fehlen der *Sema3c*-Expression im Bereich des subcallosalen Slings auf

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten bereits ein Fehlen des subcallosalen Slings im *Sip1* Knockout (70). Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 4 und 8). Der subcallosale Sling stellt eine weitere für die Axonwegfindung callosaler Neurone wichtige Wegweiser-Struktur dar (84, 52), indem sie unter anderem *Sema3c* exprimieren, dass als Chemoattractant auf *Nrp1*-exprimierende Pionieraxone wirkt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *Sema3c*-Expression in dem Bereich, in dem man den subcallosalen Sling erwarten würde, komplett ausbleibt (Abb. 14). Dies könnte ein Faktor für

die gestörte Axonwegfindung callosaler Pionieraxone im *Sip1* Knockout sein. Bestätigt werden könnte diese Wirkung, indem man Schnitt-Kulturen des Knockouts gezielt exogenem *Sema3c* aussetzt und daraufhin das Verhalten callosaler Axone untersucht.

Es ist bis dato nicht geklärt, ob die Entstehung der Sling Neuronen unabhängig von und zeitlich vor der Formation des Corpus callosum abläuft oder ob die ersten Pionieraxone die Bildung des subcallosalen Slings mitverursachen. Für die Klärung dieser Frage, könnte der konditionale *Sip1* Knockout ein nützliches Modell darstellen. So könnte man durch gezielte corticale Reexpression von *Sip1* eine Entwicklung von Pionieraxonen innerhalb des Knockouts provozieren. Ausgehend davon könnte man die Entwicklung von Sling Neuronen im Knockout mit der von Sling Neuronen im Reexpressionsexperiment vergleichen. Die Wechselwirkung von Pionieraxonen und Sling Neuronen könnte so genauer charakterisiert werden.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit durch Mosaik-Expressionsexperimente gezeigt werden, dass die reduzierte corticale Expression von *Sema3c* im *Sip1* Knockout ein Resultat zellextrinsischer Effekte ist (Abb. 16).

5. *Nrp1* ist möglicherweise ein downstream target von *Sip1*, das zur Agenesie des Corpus callosum bei *Sip1*-Deletion beiträgt.

In unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das Expressionsmuster von *Nrp1* im *Sip1* Knockout dramatisch von dem des Wildtyps unterscheidet (Abb. 26).

Nrp1 ist ein membranständiges Protein, das in der Zielerkennung von wachsenden Axonen eine wichtige Rolle spielt (110). Dabei bildet das Protein einen Bestandteil eines Rezeptorkomplexes, der mit Semaphorinen der Klasse 3 interagiert (111, 112, 113). Die Interaktionen dieses Rezeptorkomplexes können sowohl chemoattraktiver als auch -repulsiver Natur sein und tragen wesentlich zur Axonwegfindung bei (114, 115, 116, 117). Zusätzlich dazu haben verschiedene Studien gezeigt, dass *Nrp1* auch eine relevante Rolle bei der Migration von Neuronen spielt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass *Nrp1*-*Sema3a*-Interaktionen die laminare Formation des optischen Tektums steuern (118). Auch konnte gezeigt werden, dass Vorläuferzellen corticaler Interneurone während ihrer Migration aus dem basalen Vorderhirn *Nrp1* und *Nrp2* exprimieren. Bei fehlender Neuropilin-Expression bleiben die Zellen im Striatum zurück und schaffen die Migration zum zerebralen Cortex nicht (119). Auch die Positionierung sympathischer Nerven wird durch *Nrp1* gesteuert, hierbei hemmt *Nrp1* die neuronale Migration und bewirkt so, dass sympathische Neuronen in bestimmten Zielregionen kondensieren (120). *Nrp1* wird in der Entwicklung des Mäusecortex

stark in der Intermediären Zone exprimiert, und zwar in dem Stadium, in dem corticale Neurone migrieren und ihre Axone zu wachsen beginnen (121, 110). Dies legt eine Funktion von *Nrp1* bei der Axonwegfindung und bei der Migration von Projektionsneuronen nahe. Tatsächlich konnte durch Experimente an einer *Nrp1* Knockout-Maus und durch Überexpressionsexperimente einer dominant-negativen Form von *Nrp1* gezeigt werden, dass dieses Neuropilin eine essentielle Rolle bei der callosalen Axonwegfindung exzitatorischer Neurone spielt (122). *Nrp1*-Sema-Interaktionen sind dabei essentiell für das Kreuzen von Pionieraxonen aus dem Gyrus cinguli und damit für die Bildung des Corpus callosum (123). Hierbei konnte gezeigt werden, dass Sema3c als Chemoattractant auf *Nrp1*-exprimierende Pionieraxone wirkt (123).

Durch unsere Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Nrp1* durch corticale *Sip1*-Deletion stark verändert ist (Abb. 12). Es liegt also nahe, dass *Sip1* die Expression von *Nrp1* beeinflusst. Interessant ist hierbei jedoch, dass im *Sip1* Knockout die *Nrp1*-Expression nicht nur einfach supprimiert wird. Vielmehr ergibt sich eine Verschiebung der Expression hinzu oberflächlicheren Schichten des Cortex (Abb. 26). Im ventralen Gyrus cinguli nahe der Mittellinie ist die Expression herabreguliert. Weiter dorsal in Richtung Mantelkante und im restlichen Neocortex jedoch findet sich eine deutliche Expression von *Nrp1* in oberflächlichen Schichten des Neocortex, die im Wildtyp nicht zu finden ist.

Da die Wirkung von *Nrp1* je nach Rezeptorkomplex, Liganden und Konzentrationen sehr komplex ist, lässt sich der Effekt dieser veränderten Expression nur schwer erschließen. Um die Effekte dieser Hochregulation von *Nrp1* in oberflächlichen Schichten des Gyrus cinguli und der Mantelkante zu untersuchen, führten wir Überexpressionsexperimente in Wildtypmäusen durch. Dabei elektroporierten wir ein *Nrp1*-Expressionsplasmid gezielt in den Gyrus cinguli und die Mantelkante. Die so hervorgerufene Überexpression zeigte aber keine erkennbaren Effekte in Bezug auf die callosale Axonwegfindung. Dennoch ist ein Effekt dieser Veränderungen des *Nrp1*-Expressionsmusters auf die callosale Axonwegfindung keinesfalls auszuschließen. So wurden in unserem Experiment einerseits nicht spezifisch Neurone oberflächlicher Schichten angezielt, denn es wurde ein pCAG-Promotor für das Expressionsplasmid verwendet, der keine spezifische Aktivität in diesen Schichten besitzt. Hier könnte man für folgende Experimente zum genauen Targeting einen für oberflächliche Neuronen spezifischen Promotor verwenden. Weiterhin könnte es sich hier um komplexe zellextrinsische Effekte handeln, die schwierig durch In-Utero-Elektroporationsexperimente nachzuahmen sind. Dazu müsste eine sehr hohe Elektroporationseffizienz erreicht werden, was zur Zeit eine praktische Hürde darstellt.

Auch der Neuropilin-Ligand *Sema3c* ist im Knockout durch zellextrinsische Effekte herabreguliert und fehlt im Bereich des subcallosalen Slings ganz. Eine Wechselwirkung zwischen veränderter *Sema3c*-Expression und veränderter *Nrp1*-Expression könnte hier präsent sein. Dies könnte einen weiteren Grund für den fehlenden Phänotyp im Überexpressionsexperiment darstellen. Man müsste also eine Überexpression von *Nrp1* in oberflächlichen Schichten kombiniert mit einer fehlenden *Sema3c*-Expression im subcallosalen Sling untersuchen. In Wildtyp-*in-vivo*-Experimenten wäre diese Situation aber schwierig nachzuahmen.

Die veränderte Expression von *Sema3c* und *Nrp1* macht den *Sip1* Knockout in jedem Falle zu einem interessanten Modell, bei dem die Interaktion dieser beiden Moleküle und ihre Beziehung zu *Sip1* näher charakterisiert werden könnte.

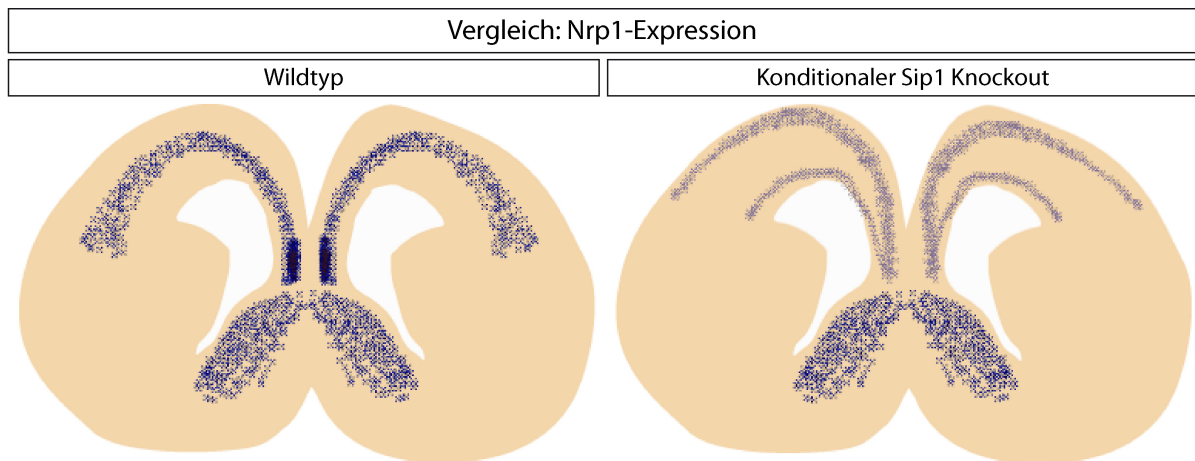


Abb. 26. Die *Nrp1* Expression unterscheidet sich im konditionalen *Sip1* Knockout stark von der im Wildtyp.

Schematisch dargestellt sind hier die Expressionsmuster von *Nrp1* im Wildtyp und im konditionalen *Sip1* Knockout. Insgesamt zeigt sich im Knockout cortical eine schwächere Expression, jedoch zeigen sich laminär zwei Expressionsmaxima, eines in den oberflächlichen Schichten, das andere in tiefen Schichten des Cortex. Im Wildtyp dagegen zeigt sich laminär nur ein Expressionsmaximum in einer mittig gelegenen Schicht. Weiterhin zeigt sich im Wildtyp eine cinguläre Region mit besonders verstärkter Expression, die im Knockout fehlt.

6. *NfiA*, *NfiB*, *Nrp2* und *Slit1* werden nicht oder unspezifisch durch *Sip1* reguliert.

Andere in der Axonwegfindung callosaler Neurone beteiligte Moleküle wurden auf ihre Expression im *Sip1* Knockout untersucht. *NfiA* und *NfiB* sind in Gliapopulationen der Mittellinie exprimiert und regulieren die Bildung letzterer (124). *NfiA* Knockout-Mäuse zeigen einen Verlust der Mittellinienglia und eine gestörte Entwicklung des subcallosalen

Slings (125). *NfiB* Knockouts zeigen ebenfalls eine starke Reduktion von Mittellinienglia, wobei hier die Differenzierung der radialen Glia in reife Glia gestört ist (126). Außerdem wird vermutet, dass *NfiB* die Expression von *Nrp1* in Neuronen des Gyrus cinguli reguliert. Diese Vorkenntnisse gaben Anlass zu untersuchen, ob Sip1 durch Regulation von *NfiA* oder *NfiB* den Phänotyp der Mittellinie reguliert. Für *NfiA* und *NfiB* ergaben sich im Knockout jedoch nur geringfügig veränderte Expressionen, was gegen eine direkte Regulation spricht.

Nrp2 wird wie *Nrp1* in verschiedenen neuronalen Populationen eine wichtige Rolle in der Axonwegfindung (115, 127, 128, 129). Auch *Nrp2* wird in Pionierneuronen des Gyrus cinguli exprimiert und interagiert unter anderem mit *Sema3c*.

Slit1 gehört zur Familie der Slit-Proteine und reguliert über verschiedene Mechanismen die Bildung des Corpus callosum. Einerseits wirkt es chemorepulsiv auf Robo-Rezeptoren, andererseits wird auch eine entscheidende Rolle in der Formation von Gliastrukturen der Mittellinie vermutet (108).

Nrp2 und *Slit1* werden im Knockout im gleichen Expressionsmuster exprimiert, aber mit herabregulierten Expressionslevel. Da sich bei der Regulation dieser Gene also keine entscheidenden Veränderungen nach *Sip1*-Deletion ergaben, gehen wir davon aus, dass es sich hierbei um keine direkten downstream targets des Sip1 handelt.

7. Wnt5a bewirkt wahrscheinlich nicht die durch *Sip1*-Deletion verursachten, charakteristischen Veränderungen der corticalen Architektur.

Da semiquantitative Untersuchungen gezeigt haben, dass *Wnt5a* verstärkt im Cortex des *Sip1* Knockout exprimiert wird, führten wir qualitative In-Situ-Hybridisierungen durch, die eine Hochregulation in oberflächlichen Cortexschichten des Knockouts zeigten (Abb. 21).

Wnt5a gehört zu der Familie der Wnt-Proteine, die in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielen, in adulten Zellen jedoch meist inaktiv sind, wobei sie in Tumorzellen wieder aktiviert vorliegen können (130, 131). Wnt wirkt dabei über verschiedene Signalwege: beim kanonischen Signalweg wird durch Wnt der Abbau von β -Catenin verhindert, wodurch beta-Catenin akkumuliert und schließlich im Nukleus als Coaktivator verschiedener Transkriptionsfaktoren wirkt (132, 133). Der nicht-kanonische planare Zellpolaritäts-Signalweg läuft ohne beta-catenin ab und mündet in einer Modifizierung des Zellskeletts (134). Der nicht-kanonische Wnt/Calcium Signalweg vermittelt über Calciumausstrom aus dem Endoplasmatischen Retikulum die Regulation von Zelladhäsion, Migration und Gewebeteilung (134).

In der Entwicklung des ZNS übernehmen die Wnt-Proteine mittels kanonischer und nicht-kanonischer Signalwege wichtige Funktionen. Untersucht wurde bisher die Rolle der Wnts im Axonwachstum, -wegfindung und -verzweigung (135). Wnt5a reguliert zum Beispiel das callosale Axon- und Dendritenwachstum (136, 137). Auch wurde die stimulierende Wirkung von Wnt5a auf die Synapsenbildung untersucht (138). Eine Rolle von Wnt5a in der Bildung der corticalen Schichten wurde bisher nicht charakterisiert.

Aufgrund der Hochregulation von *Wnt5a* im Cortex des *Sip1* Knockouts ergab sich die Frage, ob Wnt5a als downstream target von Sip1 die Corticogenese reguliert. Durch Überexpression von *Wnt5a* mittel In-utero-Elektroporation im Wildtyp sollte diese mögliche Funktion des Wnt5a isoliert betrachtet werden. Hierbei zeigte sich aber kein veränderter Phänotyp (Abb. 22). Wir gehen deshalb zunächst davon aus, dass Wnt5a die Corticogenese nicht in entscheidender Weise reguliert. Allerdings muss hier die begrenzte Aussagekraft unseres Experiments beachtet werden: Wnt5a ist ein sezerniertes Protein und verursacht somit zellextrinsische Effekte auf umliegende Zellen. Die In-Utero-Elektroporation eignet sich aber vor allem zur Untersuchung zellintrinsischer Effekte. Sollen zellextrinsische Effekte des Wnt5a beurteilt werden, so muss eine so hohe Elektroporationseffizienz erreicht werden, dass die Wnt5a-Konzentration im Extrazellularraum für die jeweiligen Effekte ausreichend gesteigert wird. Ob unsere Elektroporationseffizienz diese Schwelle erreicht, ist nicht gesichert. Daher kann eine zellextrinsische Wirkung des Wnt5a auf die Corticogenese nicht sicher ausgeschlossen werden.

8. Limitationen des *Sip1* Knockout-Modells

Bei der Betrachtung des *Sip1* Knockouts als Modell zur Untersuchung des Corpus callosum ergeben sich einige offensichtliche Limitationen. Durch die fehlende Fusion der Mittellinie im Bereich des Corpus callosum ergibt sich eine physische Barriere für kreuzende Axone. So bleibt die Möglichkeit begrenzt, Veränderungen der callosal projizierenden Neurone mit der Bildung des Corpus callosum zu korrelieren. Es ist beispielsweise möglich, dass diese Neurone im Knockout - trotz veränderter Genexpression - zu einer intakten Axonwegfindung fähig sind, letztendlich aber aufgrund der rein morphologischen Barriere, die das Septum zwischen den Hemisphären darstellt, nicht kreuzen können. Insofern bleibt die Korrelation von in callosal projizierenden Neuronen festgestellten Veränderungen zur Bildung des Corpus callosum vorerst spekulativ. Fokus der Untersuchung ist hier jedoch, welche Veränderungen zur ausbleibenden Fusion der Mittellinie führen.

9. Neue Erkenntnisse und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sip1 eine integrale Funktion in der Ausbildung der Mittellinienglia einnimmt, die wiederum für die Ausbildung kommissuraler Faserverbindungen essentiell ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Sip1 die Ausbildung des subcallosalen Slings, der Sema3c exprimiert, beeinflusst.

Ein neues mögliches downstream target des Sip1 wurde im Nrp1 identifiziert. Weitergehende Experimente sind hier notwendig, um die Regulation zu bestätigen und zu charakterisieren.

Bei der Untersuchung des Mechanismus, der zur Veränderung der corticalen Architektur im *Sip1* Knockout führt, konnte Wnt5a zunächst als Bestandteil dieses Mechanismus ausgeschlossen werden. Hier sind weitergehende Experimente notwendig, um andere im Knockout hochregulierte Kandidaten auf ihre Funktion in der Corticogenese hin zu untersuchen.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Rakic P. Evolution of the neocortex: Perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci* 2009;10(10):724-735.
- 2 Hill RS, Walsh CA. Molecular Insights into human brain evolution. *Nature* 2005;437:64-67.
- 3 Geschwind DH, Rakic P. Cortical Evolution: Judge the Brain by Its Cover. *Neuron* 2013;80(3):633-647.
- 4 Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 2001;128:3759–3771.
- 5 Cobos I, Puelles L, Martinez S. The avian telencephalic subpallium originates inhibitory neurons that invade tangentially the pallium (dorsal ventricular ridge and cortical areas). *Dev Biol* 2001;239:30–45.
- 6 Wonders CP, Anderson SA. The origin and specification of cortical interneurons. *Nature Rev Neurosci* 2006;7:687–696.
- 7 Gorski JA, Talley T, Qiu M, Puelles L, Rubenstein JL, Jones KR. Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J Neurosci* 2002;22:6309–6314.
- 8 Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JRL, Macklis JD. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature Rev Neurosci* 2007;8:427–437.
- 9 Greig LC, Woodworth MB, Galazo MJ, Padmanabhan H, Macklis JD. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci* 2013;14(11):755-69.
- 10 Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 2004;41(6):881-90.

11 Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* 2002;22(8):3161-73.

12 Noctor SC, Palmer SL, McLaughlin DF, Juliano SL. Disruption of layers 3 and 4 during development results in altered thalamocortical projections in ferret somatosensory cortex. *J Neurosci* 2001;21(9):3184-95.

13 Miyata T, Kawaguchi A, Okano H, Ogawa M. Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 2001;31:727–741.

14 Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 2004;7:136–144.

15 Götz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:777–788.

16 Rakic P. Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cereb Cortex* 2003;13:541–549.

17 Rakic P. Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res* 1971;33:471–476.

18 Hansen DV, Lui JH, Parker PRL, Kriegstein AR. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 2010;464:554–561.

19 Fietz SA, Kelava I, Vogt J, Wilsch-Bräuninger M, Stenzel D, Fish JL, Corbeil D, Riehn A, Distler W, Nitsch R, Huttner WB. OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nature Neurosci* 2010;13:690–699 .

20 Wang X, Tsai JW, LaMonica B, Kriegstein AR. A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nature Neurosci* 2011;14:555–561.

- 21 Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:3196–3201.
- 22 Wu SX, Goebbels S, Nakamura K, Nakamura K, Kometani K, Minato N, Kaneko T, Nave KA, Tamamaki N. Pyramidal neurons of upper cortical layers generated by NEX-positive progenitor cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(47):17172-7.
- 23 Sessa A, Mao CA, Hadjantonakis AK, Klein WH, Broccoli V. Tbr2 directs conversion of radial glia into basal precursors and guides neuronal amplification by indirect neurogenesis in the developing neocortex. *Neuron* 2008;60:56–69.
- 24 Kowalczyk T, Pontious A, Englund C, Daza RA, Bedogni F, Hodge R, Attardo A, Bell C, Huttner WB, Hevner RF. Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cereb Cortex* 2009;19:2439–2450.
- 25 Tarabykin V, Stoykova A, Usman N, Gruss P. Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression. *Development* 2001;128:1983–1993.
- 26 Zimmer C, Tiveron M-C, Bodmer R, Cremer H. Dynamics of Cux2 expression suggests that an early pool of SVZ precursors is fated to become upper cortical layer neurons. *Cereb Cortex* 2004a;14:1408–1420.
- 27 Arnold SJ, Huang G-J, Cheung AFP, Era T, Nishikawa S-I, Bikoff EK, Molnár Z, Robertson EJ, Groszer M. The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone. *Genes Dev* 2008;22:2479–2484.
- 28 Angevine JB, Sidman RL. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 1961;192:766–768.

- 29 Rakic P. Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 1974;183:425–427.
- 30 Shen Q, Wang Y, Dimos JT, Fasano CA, Phoenix TN, Lemischka IR, Ivanova NB, Stifani S, Morrisey EE, Temple S. The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat Neurosci* 2006;9:743–751.
- 31 McConnell SK. Fates of visual cortical neurons in the ferret after isochronic and heterochronic transplantation. *J Neurosci* 1988;8:945–974.
- 32 Franco SJ, Gil-Sanz C, Martinez-Garay I, Espinosa A, Harkins-Perry SR, Ramos C, Muller U. Fate-restricted neural progenitors in the mammalian cerebral cortex. *Science* 2012a;(80-)337:746–749.
- 33 Seuntjens E, Nityanandam A, Miquelajauregui A, Debruyne J, Stryjewska A, Goebbels S, Nave K-A, Huylebroeck D, Tarabykin V. Sip1 regulates sequential fate decisions by feedback signaling from postmitotic neurons to progenitors. *Nat Neurosci* 2009a;12:1373–1380.
- 34 Britanova O, de Juan Romero C, Cheung A, Kwan KY, Schwark M, Gyorgy A, Vogel T, Akopov S, Mitkovski M, Agoston D, Sestan N, Molnár Z, Tarabykin V. *Satb2* is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex. *Neuron* 2008;57(3):378-92.
- 35 Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS. Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 1993;10:409–426.
- 36 Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science* 1996;274(5290):1123-33.
- 37 Bailey CH, Chen M. Structural plasticity at identified synapses during long-term memory in *Aplysia*. *J Neurobiol.* 1989;20(5):356-72.
- 38 Killeen MT, Sybingco SS. Netrin, Slit and Wnt receptors allow axons to choose the axis of migration. *Dev Biol.* 2008;323(2):143-51.

- 39 McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ. Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science*. 1989;245(4921):978-82.
- 40 Bak M, Fraser SE. Axon fasciculation and differences in midline kinetics between pioneer and follower axons within commissural fascicles. *Development*. 2003;130(20):4999-5008.
- 41 Colón-Ramos DA, Shen K. Cellular conductors: glial cells as guideposts during neural circuit development. *PLoS Biol*. 2008;6(4):e112.
- 42 Tomasch J. Nerve fibre calibre and nutrition. *Acta Anat (Basel)* 1959;36(4):358-66.
- 43 Paul LK, Brown WS, Adolphs R, Tyszka JM, Richards LJ, Mukherjee P, Sherr EH. Agenesis of the Corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(4):287-99.
- 44 Ashwell KW, Waite PM, Marotte L. Ontogeny of the projection tracts and commissural fibres in the forebrain of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*): timing in comparison with other mammals. *Brain Behav Evol* 1996;47(1):8-22.
- 45 Rash BG, Richards LJ. A role for cingulate pioneering axons in the development of the Corpus callosum. *J Comp Neurol*. 2001;434(2):147-57.
- 46 Ren T, Anderson A, Shen WB, Huang H, Plachez C, Zhang J, Mori S, Kinsman SL, Richards LJ. Imaging, anatomical, and molecular analysis of callosal formation in the developing human fetal brain. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2006;288(2):191-204.
- 47 Shu T, Richards LJ. Cortical axon guidance by the glial wedge during the development of the Corpus callosum. *J Neurosci*. 2001 Apr 15;21(8):2749-58.
- 48 Shu T, Sundaresan V, McCarthy MM, Richards LJ. Slit2 guides both precrossing and postcrossing callosal axons at the midline in vivo. *J Neurosci*. 2003;23(22):8176-84.

- 49 Keeble TR, Cooper HM. Ryk: a novel Wnt receptor regulating axon pathfinding. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(12):2011-7.
- 50 Silver J, Ogawa MY. Postnatally induced formation of the Corpus callosum in acallosal mice on glia-coated cellulose bridges. *Science* 1983;220:1067–1069.
- 51 Shu T, Richards LJ. Cortical axon guidance by the glial wedge during the development of the Corpus callosum. *J Neurosci* 2001;21(8):2749–58.
- 52 Shu T, Li Y, Keller A, Richards LJ. The glial sling is a migratory population of developing neurons. *Development* 2003;130, 2929–2937.
- 53 Riederer BM, Berbel P, Innocenti GM. Neurons in the Corpus callosum of the cat during postnatal development. *Eur J Neurosci* 2004;19:2039–2046.
- 54 Remacle JE, Kraft H, Lerchner W, Wuytens G, Collart C, Verschueren K, Smith JC, Huylebroeck D. New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites. *EMBO J* 1999;18(18):5073-84.
- 55 van Grunsven LA, Schellens A, Huylebroeck D, Verschueren K. SIP1 (Smad interacting protein 1) and deltaEF1 (delta-crystallin enhancer binding factor) are structurally similar transcriptional repressors. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A Suppl 1(Pt 1):S40-7.
- 56 Verschueren K, Remacle JE, Collart C, Kraft H, Baker BS, Tylzanowski P, Nelles L, Wuytens G, Su MT, Bodmer R, Smith JC, Huylebroeck D. SIP1, novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCTsequences in candidate target genes. *J Biol Chem* 1999;274(29):20489-98.
- 57 Wrana JL, Attisano L, Cárcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massagué J. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 1999;71(6):1003-14.

- 58 Postigo AA, Depp JL, Taylor JJ, Kroll KL. Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEBproteins. *EMBO J* 2003;22(10):2453-62.
- 59 Verstappen G, van Grunsven LA, Michiels C, Van de Putte T, Souopgui J, Van Damme J, Bellefroid E, Vandekerckhove J, Huylebroeck D. Atypical Mowat-Wilson patient confirms the importance of the novel association between ZFHx1B/SIP1 and NuRD corepressor complex. *Hum Mol Genet* 2008;17(8):1175-83.
- 60 Van Grunsven LA, Taelman V, Michiels C, Opdecamp K, Huylebroeck D, Bellefroid EJ. deltaEF1 and SIP1 are differentially expressed and have overlapping activities during *Xenopus* embryogenesis. *Dev Dyn* 2006;235(6):1491-500.
- 61 Yoshimoto A, Saigou Y, Higashi Y, Kondoh H. Regulation of ocular lens development by Smad-interacting protein 1 involving Foxe3 activation. *Development* 2005;132(20):4437-48.
- 62 Bassez G, Camand OJ, Cacheux V, Kobetz A, Dastot-Le Moal F, Marchant D, Catala M, Abitbol M, Goossens M. Pleiotropic and diverse expression of ZFHx1B gene transcripts during mouse and human developmentsupports the various clinical manifestations of the "Mowat-Wilson" syndrome. *Neurobiol Dis* 2004;15(2):240-50.
- 63 Maruhashi M, Van De Putte T, Huylebroeck D, Kondoh H, Higashi Y. Involvement of SIP1 in positioning of somite boundaries in the mouse embryo. *Dev Dyn* 2005;234(2):332-8.
- 64 Van de Putte T, Maruhashi M, Francis A, Nelles L, Kondoh H, Huylebroeck D, Higashi Y. Mice lacking ZFHx1B, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease-mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet* 2003;72(2):465-70.
- 65 Miquelajauregui A, Van de Putte T, Polyakov A, Nityanandam A, Boppana S, Seuntjens E, Karabinos A, Higashi Y, Huylebroeck D, Tarabykin V. Smad-interacting protein-1 (*Zfhx1b*) acts upstream of Wnt signaling in the mouse hippocampus and controls its formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(31):12919-24.

66 Weng Q, Chen Y, Wang H, Xu X, Yang B, He Q, Shou W, Chen Y, Higashi Y, van den Berghe V, Seuntjens E, Kernie SG, Bukshpun P, Sherr EH, Huylebroeck D, Lu QR. Dual-mode modulation of Smad signaling by Smad-interacting protein Sip1 is required for myelination in the central nervous system. *Neuron* 2012;73(4):713-28.

67 Van den Berghe V, Stappers E, Vandesande B, Dimidschstein J, Kroes R, Francis A, Conidi A, Lesage F, Dries R, Cazzola S, Berx G, Kessaris N, Vanderhaeghen P, van Ijcken W, Grosveld FG, Goossens S, Haigh JJ, Fishell G, Goffinet A, Aerts S, Huylebroeck D, Seuntjens E. Directed migration of cortical interneurons depends on the cell-autonomous action of Sip1. *Neuron* 2013;77(1):70-82.

68 Parthasarathy S, Srivatsa S, Nityanandam A, Tarabykin V. Ntf3 acts downstream of Sip1 in cortical postmitotic neurons to control progenitor cell fate through feedback signaling. *Development* 2014;141(17):3324-30.

69 Alcamo EA, Chirivella L, Dautzenberg M, Dobрева G, Fariñas I, Grosschedl R, McConnell SK. Satb2 regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Neuron* 2008;57(3):364-77.

70 Srivatsa S. Transcriptional control of the establishment of neocortical projections in the mammalian telencephalon. Doctoral Thesis 2015, Georg-August-Universität Göttingen. Dauerhaft zu finden unter: <http://hdl.handle.net/11858/00-1735-0000-0023-997F-F>

71 Mowat DR, Croaker GD, Cass DT, Kerr BA, Chaitow J, Adès LC, Chia NL, Wilson MJ. Hirschsprung disease, microcephaly, mental retardation, and characteristic facial features: delineation of a new syndrome and identification of a locus at chromosome 2q22-q23. *J Med Genet* 1998;35(8):617-23.

72 Cordelli DM, Garavelli L, Savasta S, Guerra A, Pellicciari A, Giordano L, Bonetti S, Cecconi I, Wischmeijer A, Seri M, Rosato S, Gelmini C, Della Giustina E, Ferrari AR, Zanotta N, Epifanio R, Grioni D, Malbora B, Mammi I, Mari F, Buoni S, Mostardini R, Grosso S, Pantaleoni C, Doz M, Poch-Olivé ML, Rivieri F, Sorge G, Simonte G, Licata F, Tarani L, Terazzi E, Mazzanti L, Cerruti Mainardi P, Boni A, Faravelli F, Grasso

M, Bianchi P, Zollino M, Franzoni E. Epilepsy in Mowat-Wilson syndrome: delineation of the electroclinical phenotype. *Am J Med Genet A* 2013;161A(2):273-84.

73 Cacheux V, Dastot-Le Moal F, Kääriäinen H, Bondurand N, Rintala R, Boissier B, Wilson M, Mowat D, Goossens M. Loss-of-function mutations in SIP1 Smad interacting protein 1 result in a syndromic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 2001;10(14):1503-10.

74 Wakamatsu N, Yamada Y, Yamada K, Ono T, Nomura N, Taniguchi H, Kitoh H, Mutoh N, Yamanaka T, Mushiake K, Kato K, Sonta S, Nagaya M. Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease. *Nat Genet* 2001;27(4):369-70.

75 Dastot-Le Moal F, Wilson M, Mowat D, Collot N, Niel F, Goossens M. ZFHX1B mutations in patients with Mowat-Wilson syndrome. *Hum Mutat* 2007;28(4):313-21.

76 Yamada K, Yamada Y, Nomura N, Miura K, Wakako R, Hayakawa C, Matsumoto A, Kumagai T, Yoshimura I, Miyazaki S, Kato K, Sonta S, Ono H, Yamanaka T, Nagaya M, Wakamatsu N. Nonsense and frameshift mutations in ZFHX1B, encoding Smad-interacting protein 1, cause a complex developmental disorder with a great variety of clinical features. *Am J Hum Genet*. 2001;69(6):1178-85.

77 Ishihara N, Yamada K, Yamada Y, Miura K, Kato J, Kuwabara N, Hara Y, Kobayashi Y, Hoshino K, Nomura Y, Mimaki M, Ohya K, Matsushima M, Nitta H, Tanaka K, Segawa M, Ohki T, Ezoe T, Kumagai T, Onuma A, Kuroda T, Yoneda M, Yamanaka T, Saeki M, Segawa M, Saji T, Nagaya M, Wakamatsu N. Clinical and molecular analysis of Mowat-Wilson syndrome associated with ZFHX1B mutations and deletions at 2q22-q24.1. *J Med Genet* 2004;41(5):387-93.

78 Zweier C, Temple IK, Beemer F, Zackai E, Lerman-Sagie T, Weschke B, Anderson CE, Rauch A. Characterisation of deletions of the ZFHX1B region and genotype-phenotype analysis in Mowat-Wilson syndrome. *J Med Genet* 2003;40(8):601-5.

79 Garavelli L, Donadio A, Zanacca C, Banchini G, Della Giustina E, Bertani G, Albertini G, Del Rossi C, Zweier C, Rauch A, Zollino M, Neri G. Hirschsprung disease, mental

retardation, characteristic facial features, and mutation in the gene ZFH1B (SIP1): confirmation of the Mowat-Wilson syndrome. *Am J Med Genet A* 2003;116A(4):385-8.

80 Higashi Y, Maruhashi M, Nelles L, Van de Putte T, Verschueren K, Miyoshi T, Yoshimoto A, Kondoh H, Huylebroeck D. Generation of the floxed allele of the SIP1 (Smad-interacting protein 1) gene for Cre-mediated conditional knockout in the mouse. *Genesis* 2002;32(2):82-4.

81 Goebbels S, Bormuth I, Bode U, Hermanson O, Schwab MH, Nave KA. Genetic targeting of principal neurons in neocortex and hippocampus of NEX-Cre mice. *Genesis* 2006;44(12):611-21.

82 Saito T. In vivo electroporation in the embryonic mouse central nervous system. *Nat Protoc* 2006;1(3):1552-8.

83 Richards LJ, Plachez C, Ren T. Mechanisms regulating the development of the Corpus callosum and its agenesis in mouse and human. *Clin Genet* 2004;66(4):276–89.

84 Niquille M, Garel S, Mann F, Hornung JP, Otsmane B, Chevalley S, Parras C, Guillemot F, Gaspar P, Yanagawa Y, Lebrand C. Transient neuronal populations are required to guide callosal axons: a role for semaphorin 3C. *PLoS Biol.* 2009 Oct;7(10):e1000230.

85 Shu T, Butz KG, Plachez C, Gronostajski RM, Richards LJ. Abnormal development of forebrain midline glia and commissural projections in Nfia knock-out mice. *J Neurosci* 2003;23(1):203-12.

86 Piper M, Moldrich RX, Lindwall C, Little E, Barry G, Mason S, Sunn N, Kurniawan ND, Gronostajski RM, Richards LJ. Multiple non-cell-autonomous defects underlie neocortical callosal dysgenesis in Nfib-deficient mice. *Neural Dev.* 2009;4:43.

87 Kuscher, GM. Identifizierung und Charakterisierung von Sip1 Zielgenen. Diplomarbeit 2009, Georg-August-Universität Göttingen.

- 88 Lange C, Mix E, Rateitschak K, Rolfs A. Wnt signal pathways and neural stem cell differentiation. *Neurodegener Dis* 2006;3(1-2):76-86.
- 89 Li L, Hutchins BI, Kalil K. Wnt5a induces simultaneous cortical axon outgrowth and repulsive axon guidance through distinct signaling mechanisms. *J Neurosci* 2009;29(18):5873-83.
- 90 Clark CE, Richards LJ, Stacker SA, Cooper HM. Wnt5a induces Ryk-dependent and -independent effects on callosal axon and dendrite growth. *Growth Factors* 2014;32(1):11-7.
- 91 Braak H. On the structure of the human archicortex. I. The cornu ammonis. A Golgi and pigmentarchitectonic study. *Cell Tissue Res* 1974;152(3):349-83.
- 92 Suárez R, Gobius I, Richards LJ. Evolution and development of interhemispheric connections in the vertebrate forebrain. *Front Hum Neurosci* 2014;8:497.
- 93 Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie. Thieme-Verlag, 4. vollständig überarbeitete Auflage, 2012. ISBN: 9783131292445.
- 94 Nieuwenhuys R. The myeloarchitectonic studies on the human cerebral cortex of the Vogt-Vogt school, and their significance for the interpretation of functional neuroimaging data. *Brain Struct Funct* 2013;218(2):303-52.
- 95 Sturrock RR. Neurons in the mouse anterior commissure. A light microscopic, electron microscopic and autoradiographic study. *J Anat* 1977;123(Pt 3):751-62.
- 96 Di Virgilio G, Clarke S, Pizzolato G, Schaffner T. Cortical regions contributing to the anterior commissure in man. *Exp Brain Res*. 1999;124(1):1-7.
- 97 Suzuki Y, Kiyokage E, Sohn J, Hioki H, Toida K. Structural basis for serotonergic regulation of neural circuits in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* 2015;523(2):262-80.
- 98 Brunjes PC, Collins LN, Osterberg SK, Phillips AM. The mouse olfactory peduncle. 3. Development of neurons, glia, and centrifugal afferents. *Front Neuroanat* 2014;8:44.

- 99 Cacheux V, Dastot-Le Moal F, Kääriäinen H, Bondurand N, Rintala R, Boissier B, Wilson M, Mowat D, Goossens M. Loss-of-function mutations in SIP1 Smad interacting protein 1 result in a syndromic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 2001;10(14):1503-10.
- 100 Garavelli L, Mainardi PC. Mowat-Wilson syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:42.
- 101 Edwards TJ, Sherr EH, Barkovich AJ, Richards LJ. Clinical, genetic and imaging findings identify new causes for Corpus callosum development syndromes. *Brain* 2014;137(Pt 6):1579-613.
- 102 Mowat DR, Wilson MJ, Goossens M. Mowat-Wilson syndrome. *J Med Genet* 2003;40(5):305-10.
- 103 Wilson M, Mowat D, Dastot-Le Moal F, Cacheux V, Kääriäinen H, Cass D, Donnai D, Clayton-Smith J, Townshend S, Curry C, Gattas M, Braddock S, Kerr B, Aftimos S, Zehnirith H, Barrey C, Goossens M. Further delineation of the phenotype associated with heterozygous mutations in ZFH1B. *Am J Med Genet A* 2003;119A(3):257-65.
- 104 Ashwell KW, Waite PM, Marotte L. Ontogeny of the projection tracts and commissural fibres in the forebrain of the tammar wallaby(*Macropus eugenii*): timing in comparison with other mammals. *Brain Behav Evol* 1996;47(1):8-22.
- 105 Richards LJ, Plachez C, Ren T. Mechanisms regulating the development of the Corpus callosum and its agenesis in mouse and human. *Clin Genet* 2004;66(4):276-89.
- 106 Silver J, Edwards MA, Levitt P. Immunocytochemical demonstration of early appearing astroglial structures that form boundaries and pathways along axon tracts in the fetal brain. *J Comp Neurol* 1993;328(3):415-36.
- 107 Shu T, Puche AC, Richards LJ. Development of midline glial populations at the corticoseptal boundary. *J Neurobiol* 2003;57(1):81-94.
- 108 Unni DK, Piper M, Moldrich RX, Gobius I, Liu S, Fothergill T, Donahoo AL, Baisden JM, Cooper HM, Richards LJ. Multiple Slits regulate the development of midline glial populations and the Corpus callosum. *Dev Biol* 2012;365(1):36-49.

109 Chinn GA, Hirokawa KE, Chuang TM, Urbina C, Patel F, Fong J, Funatsu N, Monuki ES. Agenesis of the Corpus callosum Due to Defective Glial Wedge Formation in Lhx2 Mutant Mice. *Cereb Cortex* 2014.

110 Takagi S, Kasuya Y, Shimizu M, Matsuura T, Tsuboi M, Kawakami A, Fujisawa H. Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system. *Dev Biol* 1995;170(1):207-22.

111 He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 1997;90(4):739-51.

112 Kolodkin AL, LeVengood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 1997;90(4):753-62.

113 Gu C, Rodriguez ER, Reimert DV, Shu T, Fritsch B, Richards LJ, Kolodkin AL, Ginty DD. Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev Cell* 2003;5(1):45-57.

114 Kolodkin AL, Ginty DD. Steering clear of semaphorins: neuropilins sound the retreat. *Neuron* 1997;19(6):1159-62.

115 Maden CH, Gomes J, Schwarz Q, Davidson K, Tinker A, Ruhrberg C. NRP1 and NRP2 cooperate to regulate gangliogenesis, axon guidance and target innervation in the sympathetic nervous system. *Dev Biol* 2012;369(2):277-85.

116 Takahashi T, Fournier A, Nakamura F, Wang LH, Murakami Y, Kalb RG, Fujisawa H, Strittmatter SM. Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 1999;99(1):59-69.

117 Takahashi T, Nakamura F, Jin Z, Kalb RG, Strittmatter SM. Semaphorins A and E act as antagonists of neuropilin-1 and agonists of neuropilin-2 receptors. *Nat Neurosci* 1998;1(6):487-93.

118 Watanabe Y, Sakuma C2, Yaginuma H2. NRP1-mediated Sema3A signals coordinate laminar formation in the developing chick optic tectum. *Development* 2014;141(18):3572-82.

119 Tamamaki N, Fujimori K, Nojyo Y, Kaneko T, Takauji R. Evidence that Sema3A and Sema3F regulate the migration of GABAergic neurons in the developing neocortex. *J Comp Neurol* 2003;455(2):238-48.

120 Kawasaki T, Bekku Y, Suto F, Kitsukawa T, Taniguchi M, Nagatsu I, Nagatsu T, Itoh K, Yagi T, Fujisawa H. Requirement of neuropilin 1-mediated Sema3A signals in patterning of the sympathetic nervous system. *Development* 2002;129(3):671-80.

121 Bagnard D, Lohrum M, Uziel D, Püschel AW, Bolz J. Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* 1998;125(24):5043-53.

122 Hatanaka Y, Matsumoto T, Yanagawa Y, Fujisawa H, Murakami F, Masu M. Distinct roles of neuropilin 1 signaling for radial and tangential extension of callosal axons. *J Comp Neurol* 2009;514(3):215-25.

123 Piper M, Plachez C, Zalucki O, Fothergill T, Goudreau G, Erzurumlu R, Gu C, Richards LJ. Neuropilin 1-Sema signaling regulates crossing of cingulate pioneering axons during development of the Corpus callosum. *Cereb Cortex* 2009;19 Suppl 1:i11-21.

124 Plachez C, Lindwall C, Sunn N, Piper M, Moldrich RX, Campbell CE, Osinski JM, Gronostajski RM, Richards LJ. Nuclear factor I gene expression in the developing forebrain. *J Comp Neurol* 2008;508(3):385-401.

125 Shu T, Butz KG, Plachez C, Gronostajski RM, Richards LJ. Abnormal development of forebrain midline glia and commissural projections in Nfia knock-out mice. *J Neurosci* 2003;23(1):203-12.

126 Piper M, Moldrich RX, Lindwall C, Little E, Barry G, Mason S, Sunn N, Kurniawan ND, Gronostajski RM, Richards LJ. Multiple non-cell-autonomous defects underlie neocortical callosal dysgenesis in Nfib-deficient mice. *Neural Dev* 2009;4:43

- 127 Torigoe M, Yamauchi K, Tamada A, Matsuda I, Aiba A, Castellani V, Murakami F. Role of neuropilin-2 in the ipsilateral growth of midbrain dopaminergic axons. *Eur J Neurosci* 2013;37(10):1573-83.
- 128 Lumb R, Wiszniak S, Kabbara S, Scherer M, Harvey N, Schwarz Q. Neuropilins define distinct populations of neural crest cells. *Neural Dev* 2014;9(1):24.
- 129 Raimondi C, Ruhrberg C. Neuropilin signalling in vessels, neurons and tumours. *Semin Cell Dev Biol* 2013;24(3):172-8.
- 130 Sugimura R, Li L. Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2010;90(4):243-56.
- 131 Prgomet Z, Axelsson L, Lindberg P, Andersson T. Migration and invasion of oral squamous carcinoma cells is promoted by WNT5A, a regulator of cancer progression. *J Oral Pathol Med* 2014.
- 132 Rao TP, Kühl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res* 2010;106(12):1798-806.
- 133 Kestler HA, Kühl M. From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008;363(1495):1333-47.
- 134 Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 2008;4(2):68-75.
- 135 Kalil K, Li L, Hutchins BI. Signaling mechanisms in cortical axon growth, guidance, and branching. *Front Neuroanat.* 2011;5:62.
- 136 Clark CE, Richards LJ, Stacker SA, Cooper HM. Wnt5a induces Ryk-dependent and -independent effects on callosal axon and dendrite growth. *Growth Factors* 2014;32(1):11-7.
- 137 Hutchins BI, Li L, Kalil K. Wnt-induced calcium signaling mediates axon growth and guidance in the developing Corpus callosum. *Sci Signal* 2012;5(206):pt1.

138 Varela-Nallar L, Alfaro IE, Serrano FG, Parodi J, Inestrosa NC. Wingless-type family member 5A (Wnt-5a) stimulates synaptic differentiation and function of glutamatergic synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(49):21164-9.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Madhuri M. Rudolph, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Molekulare Expressionsmuster bei der Ausbildung kommissuraler Verbindungen des Großhirns und ihre Störungen nach *Sipl*-Knockout“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

DANKSAGUNG

Ein großes Dankeschön möchte ich meinem Doktorvater Prof. Victor Tarabykin aussprechen, der mir kontinuierliche Unterstützung und die wertvolle Chance an diesem Projekt zu arbeiten bot. Vielen Dank!

Nichts von dieser Arbeit wäre wohl möglich gewesen, hätte Dr. Srinivas Parthasarathy mich nicht mit unendlicher Geduld als Schülerin angenommen. Von seinen Fähigkeiten und Erfahrungen zu lernen, schätze ich als sehr wertvoll ein. Auch Dr. Swathi Srivatsa möchte ich danken für die kontinuierliche Unterstützung und gute Zusammenarbeit. Ein großes Dankeschön auch an alle Mitglieder des Instituts für Zell- und Neurobiologie, besonders an Kuo Yan und Dr. Ingo Bormuth für die fachliche und administrative Unterstützung sowie Magda Krejczy und Roman Wunderlich für ihre praktische Unterstützung.

Außerordentlich dankbar bin ich auch der Studienstiftung des Deutschen Volkes, die mir die finanzielle Unterstützung für dieses Projekt gewährleistet hat.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihren wertvollen Rat und Zuspruch danken.