

Universität Ulm
Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie
Leiter: Prof. Dr. Stefan Britsch

**Funktionelle Analyse
des Zinkfingertranskriptionsfaktors Bcl11b
während der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Lisa Baumann
geb. in Würzburg

Ulm, 2012

Amtierender Dekan Prof. Dr. Thomas Wirth

Erster Berichterstatter Prof. Dr. Stefan Britsch

Zweiter Berichterstatter Prof. Dr. Herbert Schwegler

Tag der Promotion 25. Oktober 2013

I INHALTSVERZEICHNIS

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1. EINLEITUNG	1
1.1 Der Hippocampus	1
1.2 Entwicklung des Gyrus dentatus	4
1.3 Adulte Neurogenese im Gyrus dentatus	5
1.3.1. Stadieneinteilung	5
1.3.2. Adulte Neurogenese im menschlichen Hippocampus	9
1.3.3. Die Funktion adulter Neurogenese	9
1.3.4. Die Regulation adulter Neurogenese	10
1.4 Der Zinkfingertranskriptionsfaktor Bcl11b	12
1.4.1. Die Funktion von Bcl11b während der postnatalen Entwicklung des Hippocampus	13
1.5 Fragestellung	14
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Material	15
2.1.1 Lösungen und Reagenzien	15
2.1.2 Geräte	17
2.1.3 Oligonukleotide	17
2.1.4 Antikörper	18
2.2 Methoden	19
2.2.1 Das <i>Cre/loxP</i> -System	19
2.2.2 Transgene Mauslinien	19
2.2.3 Genotypisierung	21
2.2.4 BrdU Injektionen	23
2.2.5 Präparation von Mausgewebe	24
2.2.6 Histologische Techniken	24
2.2.6.1 Methacrylatschnitte	24
2.2.6.2 Vibratomschnitte	25
2.2.6.3 Gefriergewebeschnitte	26
2.2.6.4 TUNEL	28

2.2.7	Datenanalyse	29
2.2.7.1	Dokumentation histologischer Daten	29
2.2.7.2	Quantifizierung der Zellzahl und der Fläche des Gyrus dentatus	29
2.2.7.3	Statistische Auswertung	30
3.	ERGEBNISSE	31
3.1	Bcl11b-Expression und konditionelle Mutagenese des Bcl11b-Gens im adulten Gyrus dentatus der Maus	32
3.2	Morphologische Analyse des Gyrus dentatus adulter konditioneller Bcl11b-Mutanten	33
3.3	Quantitative Analyse proliferierender Zellen im adulten Gyrus dentatus	35
3.4	Quantitative Analyse apoptotischer Zellen im adulten Gyrus dentatus	38
3.5	Quantitative Analyse der Progenitorzellzahl im adulten Gyrus dentatus	39
3.6	Koexpressionsanalyse von Bcl11b mit Markern für neuronale Progenitorzellen	41
3.7	Analyse des Differenzierungsverhaltens Bcl11b-mutanter, adult entstandener Körnerzellen	42
3.8	Vergleich des Differenzierungsverhaltens adult entstandener Körnerzellen am Tag vier und am Tag 28	48
4.	DISKUSSION	52
4.1	Morphologie und Proliferation	52
4.2	Bcl11b als Regulator neuronaler Differenzierung	56
4.3	Molekulare Mechanismen von Bcl11b bei der adulten Neurogenese	58
4.4	Die Rolle adulter Neurogenese bei Lernvorgängen und Krankheiten	59
4.5	Ausblick	62
5.	ZUSAMMENFASSUNG	64
6.	LITERATURVERZEICHNIS	66
III	ANHANG	VIII
IV	DANKSAGUNG	IX
V	LEBENS LAUF	X

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A Allgemeine Abkürzungen

A	Adenin
α	alpha
β	beta
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
Bcl11b	B-cell leukemia 11b
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BrdU	2-Bromo-5-desoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA	Cornu ammonis
CB	Calbindin
C ₂ H ₂	Cystein ₂ -Histidin ₂
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
COUP	Chicken ovalbumin upstream promotor
Cre	Causes recombination
Ctip2	COUP-TF interacting protein 2
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCC	Deleted in colorectal carcinoma
Dcx	Doublecortin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	Embryonaler Tag
Emx-1	Empty spiracles homeobox 1
Eph	Ephrinrezeptor
FGF-2	Fibroblast growth factor-2
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GD (DG)	Gyrus dentatus (<i>Dentate gyrus</i>)

GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GS	Granularschicht
H ₂ O	Wasser
IMF	Infrapyramidaler Moosfasertrakt
IPC	Intermediate progenitor cell
K	Kontrolle
KGF	Keratinocyte growth factor
M	Mutante
MS	Molekularschicht
NeuroD	Neurogenic differentiation factor 1
NeuN/NN	Neuronal nuclei
NSC	Neural stem cell
NuRD	Nucleosome remodeling and deacetylation
OB	Bulbus olfactorius (<i>Olfactory bulb</i>)
P	Postnatal
PBS	Phosphate buffered saline
PBT-X	PBS mit 0,1% Triton
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
Prox1	Prospero-related homeobox 1 gene
RIT1	Radiation induced tumor suppressor gene 1
RT	Raumtemperatur
SGS	Subgranularschicht
Sox2	Sex determining region Y-box 2
S-Phase	Synthesephase
SVZ	Subventrikularzone
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAPS	Transit-amplifying progenitors
Tbr2	T-box brain 2
TBS	Tris buffered saline
TdT	Terminal desoxynucleotidyl transferase
TF	Transkriptionsfaktor
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling

u. a.	unter anderem
UNC5	Uncoordinated protein
v. a.	vor allem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Wnt	Wingless and integration 1
z. B.	zum Beispiel
Znf	Zinkfinger
ZNS	Zentralnervensystem

B Physikalische Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
d	Tage
g	Gramm
h	Stunden
l	Liter
M	Molar (mol/l)
m	Monate
min	Minuten
mol	Mol
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
sec	Sekunden
Ω	Ohm

C Präfixe physikalischer Einheiten

M	Mega (10^6)
m	Milli (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})

*„In the adult centres, the nerve paths are something fixed, ended and immutable.
Everything may die, nothing may be regenerated.”*

Santiago Ramón y Cajal, 1913

1. Einleitung

1.1 Der Hippocampus

Der Hippocampus übt eine Faszination aus, die auf seiner Vielseitigkeit und Plastizität beruht. In ihm werden nicht nur explizite Gedächtnisinhalte in das Langzeitgedächtnis überführt, er beeinflusst auch emotionale Parameter und Motivation. Weiterhin werden Krankheiten wie Morbus Alzheimer, Schizophrenie oder Depression mit Veränderungen im Hippocampus assoziiert (Mu et al. 2011, Reif et al. 2006, Sahay et al. 2007, Altman et al. 1990). Die außerordentliche Plastizität des Hippocampus beruht nicht nur auf der synaptischen Plastizität sondern auch auf der hier stattfindenden adulten Neurogenese. Der adulten Neurogenese kommt sowohl bei Lern- und Erinnerungsvorgängen als auch bei der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen eine Bedeutung zu (Mu et al. 2011, Sahay et al. 2007, Luu et al. 2012).

Der Hippocampus gehört als Teil des Archikortex zu einem phylogenetisch alten Rindengebiet. Er liegt größtenteils im Temporallappen an der Medialwand des Seitenventrikelunterhorns (*Abb. 1A*). Er besteht aus dem Gyrus dentatus (GD) und dem Cornu ammonis (CA). Das Subiculum wird meist ebenfalls zu der hippocampalen Formation gezählt. Der Hauptteil der Afferenzen des Hippocampus projiziert zum Gyrus dentatus. Meist sind dies vorverarbeitete Informationen aus der Area entorhinalis, jedoch auch direkte afferente Fasern aus dem Gyrus cinguli und dem Thalamus. Der Hippocampus erhält auf diese Weise sensorische Informationen verschiedener Qualitäten. Die Efferenzen verlassen den Hippocampus hauptsächlich über das Subiculum. Einige Faserzüge führen zurück in die Area entorhinalis, der Hauptteil der Efferenzen endet jedoch in den Corpora mammillaria. Von dort erfolgen wiederum Projektionen in den Thalamus und über den Gyrus cinguli zurück in den Hippocampus. Diese als Papez-Neuronenkreis bezeichneten Verbindungen sind an der Überführung expliziter Gedächtnisinhalte aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis beteiligt. Als Teil des limbischen Systems spielt der Hippocampus ebenfalls eine wichtige Rolle bei endokrinen, viszeralen und emotionalen Vorgängen.

Der histologische Aufbau des Archikortex ist dreischichtig. Er besteht aus einer zellulären mittleren Schicht, dem Stratum pyramidale im Cornu ammonis bzw. dem Stratum granulosum (Körnerzellschicht) im Gyrus dentatus, und zwei zellarmen Schichten, dem Stratum moleculare oberhalb und der polymorphen Schicht unterhalb der Zellschicht. Die

polymorphe Schicht entspricht im Gyrus dentatus dem Hilus und enthält v. a. GABA(Gamma-Aminobuttersäure)erge Interneurone.

Eine etwa zwei Nuclei breite Schicht zwischen Hilus und Granularschicht entspricht der Subgranularschicht (SGS). In dieser befinden sich die Stammzellen, die das morphologische Korrelat adulter Neurogenese bilden (*Abb. 1C*). Das Ammonshorn ist anhand der Morphologie der zellulären Schicht und den neuronalen Verschaltungen in drei Sektoren eingeteilt, CA1, CA2 und CA3 (Lorente de Nó 1934).

Die klassische exzitatorische Verschaltungskette im Hippocampus wird durch drei synaptische Verbindungen gebildet. Zunächst innervieren glutamaterge Afferenzen z. B. aus dem entorhinalen Kortex über den Tractus perforans die distalen Dendriten der Körnerzellen in der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus. Dieser projiziert über den Moosfasertrakt zu den Pyramidenzellen der wesentlich kleineren Region CA3. Dadurch wird der Moosfasertrakt zu einem strukturellen Flaschenhals (Kempermann 2008, Treves et al. 1994). Die Pyramidenzellen der CA3-Region erregen über die Schaffer-Kollateralen die Pyramidenzellen in CA1. Deren Axone senden wiederum Efferenzen zurück in den entorhinalen Kortex [*Abb. 1C* (Amaral et al. 1989)]. Reguliert werden die exzitatorischen Pyramidenzellen und Körnerzellen durch GABAerge Interneurone, welche sich in den zellarmen Schichten befinden (Freund et al. 1996, Soriano et al. 1989).

Neben dieser klassischen Verschaltungskette bestehen weitere intrinsische Verbindungen zwischen den verschiedenen Regionen des Hippocampus. Hier erhalten die proximalen Dendriten der Körnerzellen in der inneren Molekularschicht Afferenzen von Assoziations- und Kommissurenfasern aus dem ipsi- bzw. kontralateralen Hippocampus (Swanson et al. 1981).

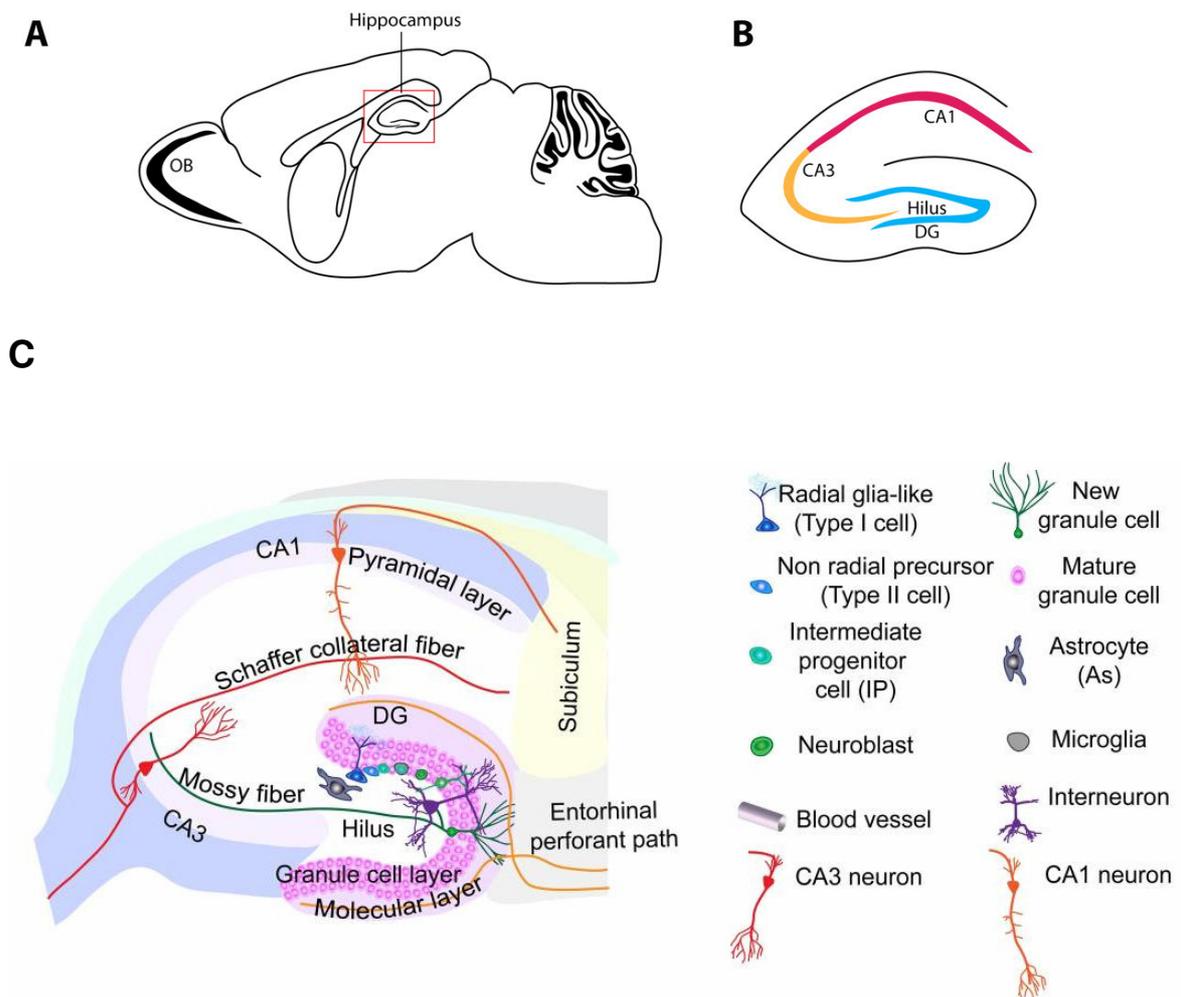


Abb. 1: Hippocampus mit Verschaltungskette und adulten Neurogenese

A: Sagittaler Schnitt durch ein Nagetiergehirn; der Hippocampus befindet sich an der medialen Wand des Seitenventrikelunterhorns und ist rot umrahmt. OB: Bulbus olfactorius (*Olfactory bulb*); **B:** Vergrößerte, schematische Darstellung des Hippocampus mit der CA1(Cornu ammonis)- und CA3-Region, dem Hilus und der Körnerzellschicht (*Granule cell layer*) des Gyrus dentatus (*Dentate gyrus*, DG). **C:** Hippocampale Verschaltungskette und adulte Neurogenese im Gyrus dentatus; über den Tractus perforans (*Entorhinal perforant path*) erreichen afferente Fasern die distalen Dendriten der Körnerzellen in der äußeren Molekularschicht (*Molecular layer*) des Gyrus dentatus. Dieser projiziert über den Moosfasertrakt (*Mossy fiber*) zu den Pyramidenzellen der CA3-Region. Die Pyramidenzellen der CA3-Region erregen über die Schaffer-Kollateralen (*Schaffer collateral fiber*) die Pyramidenzellen in CA1. Deren Axone senden wiederum über das Subiculum Efferenzen zurück in den entorhinalen Kortex. Kurzübersicht über die hippocampale adulte Neurogenese mit den einzelnen Entwicklungsstadien einer neu entstehenden Körnerzelle aus der radiären Gliazelle über die Progenitorzellstadien bis zum reifen, integrierten Neuron; modifiziert nach Hsieh et al. 2012 und Ming et al. 2011.

1.2 Entwicklung des Gyrus dentatus

Die Entwicklung des Gyrus dentatus beginnt pränatal, wenn Zellen, die vom Neuroepithel abstammen, in die Anlage des Gyrus dentatus einwandern. Dabei bildet sich in der entstehenden Körnerzellschicht ein Gradient mit den ältesten Zellen im dorsalen und den jüngsten im ventralen Blatt. Postnatal wandern weiter proliferierende Progenitorzellen ein, die im mitotischen Zustand im Hilus verbleiben und so die von Altman und Bayer beschriebene tertiäre Matrix bilden (Altman et al. 1990). Aus dieser gehen postnatal mehr als 80 % der adulten Körnerzellen hervor. Im Laufe der zweiten postnatalen Woche kommt es zu einer Umorganisation, bei der sich die Position der Progenitorzellen aus dem Hilus in die Subgranularschicht zwischen Hilus und Körnerzellschicht verschiebt (Abb. 2). In dieser so entstandenen neurogenen Nische findet nun zeitlebens Neurogenese statt (Li et al. 2005, Li et al. 2007).

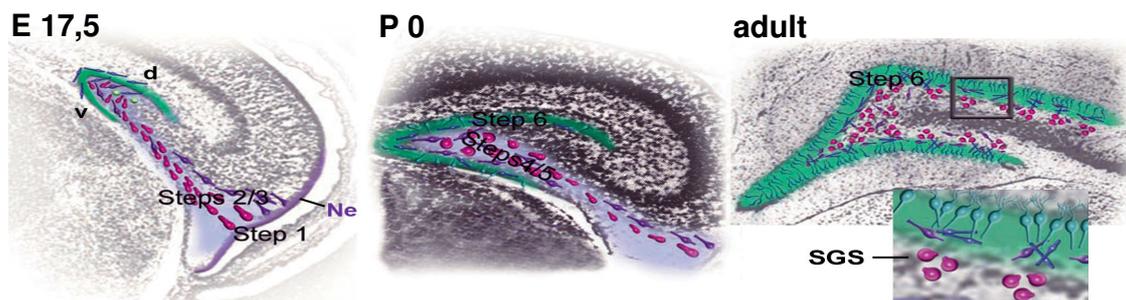


Abb. 2: Entwicklung des Gyrus dentatus und Entstehung der neurogenen Nische

E 17,5 (Embryonaler Tag 17,5): Pränatal wandern erste Körnerzellen, die vom Neuroepithel (Ne) abstammen, in die Anlage des Gyrus dentatus ein. Es bilden sich ein ventrales (v) und ein dorsales (d) Blatt. **P 0** (Zeitpunkt der Geburt): Postnatal wandern weiter proliferierende Progenitorzellen ein und verbleiben in mitotischem Zustand im Hilus. **adult**: In der Subgranularschicht (SGS) findet zeitlebens Neurogenese statt; modifiziert nach Li et al. 2005.

1.3 Adulte Neurogenese im Gyrus dentatus

Der Gyrus dentatus ist eine von nur zwei Regionen im Gehirn von Säugern, in denen adulte Neurogenese stattfindet. Die Existenz adulter Neurogenese war jedoch schon immer umstritten. Lange Zeit herrschte in der Neurowissenschaft das Dogma, dass Neurogenese nur pränatal und in frühen postnatalen Stadien möglich ist.

Allerdings beschrieb Ezra Allen bereits 1912 mitotische Zellen in den Wänden der Seitenventrikel ausgewachsener Ratten und erbrachte damit erste Hinweise für adulte Neurogenese (Allen 1912). 50 Jahre später zeigten Joseph Altman und seine Kollegen mithilfe radioaktiv markierten Thymidins, dass im Gyrus dentatus erwachsener Ratten neue Zellen entstehen (Altman 1963, Altman et al. 1965). Es konnte jedoch nicht sicher gezeigt werden, dass es sich um Neurone handelt; weshalb diese Ergebnisse ebenso wie die Michael Kaplans und Fernando Nottebohms zunächst nicht allgemein anerkannt wurden (Kaplan et al. 1977, Goldman et al. 1983). Erst Anfang der 1990er-Jahre, als es möglich wurde, mitotische Zellen mit 5-Bromo-3'-Desoxyuridin (BrdU) zu markieren, welches immunhistochemisch detektiert wird und mit neuronalen Markern kombiniert werden kann, gelang es, zu beweisen, dass es sich tatsächlich um Nervenzellen handelt (Gould et al. 1992, Cameron et al. 1993). Nach dem darauf-folgenden Paradigmenwechsel wurde anerkannt, dass im adulten Gehirn weiterhin Neurogenese stattfindet. Bisher sind zwei umschriebene Regionen des Säugergehirns bekannt, in denen diese erfolgt: die Subventrikularzone (SVZ) der Seitenventrikel und die Subgranularschicht des Gyrus dentatus. Während die neu entstandenen Zellen aus der SVZ über den sogenannten „rostral migratory stream“ in den Bulbus olfactorius wandern, um sich dort zu Neuronen auszudifferenzieren, wandern die jungen Nervenzellen aus der SGS nur wenige Mikrometer in die Körnerzellschicht hinein und integrieren sich funktionell in das bestehende Körnerzellnetzwerk (*Abb. 2, 3*).

1.3.1 Stadieneinteilung

Adulte Neurogenese kann durch drei großen Schritte charakterisiert werden: Proliferation, Differenzierung und Überleben (Kempermann et al. 2004). Zur Beschreibung des kontinuierlichen Prozesses von der neugeborenen zur reifen Körnerzelle haben sich in der Literatur verschiedene Stadieneinteilungen der adulten Neurogenese etabliert. Im Folgenden werden die sechs Stadien dargestellt, von denen in dieser Arbeit ausgegangen

wird und die anhand von Markerprofilen und Zellmorphologie definiert sind [Kempermann et al. 2004 (*Abb. 3*)].

Das erste Stadium entspricht der adulten Stammzelle oder Typ-1-Zelle. Es handelt sich hierbei um eine Zelle ähnlich einer radiären Gliazelle. Sie exprimiert GFAP (Glial fibrillary acidic protein) und erinnert in einigen Eigenschaften an Astrozyten, da sie beispielsweise vaskuläre Endfüße und ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften hat (Hsieh 2012). Kürzlich wurde eine zweite Klasse von Typ-1-Zellen beschrieben, die horizontale Stammzelle (Lugert et al. 2010). Die Typ-1-Zelle exprimiert neben GFAP außerdem Nestin und Sox2, einen Transkriptionsfaktor (TF) aus der Familie der sex determining region of Y-box (Wegner 1999). Sox2 inhibiert während der embryonalen Entwicklung die Differenzierung neuronaler Progenitorzellen und erhält somit deren Progenitorzeleigenschaften aufrecht (Graham et al. 2003). In adulten Tieren wird die Expression von Sox2 in proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen sowie in proliferierenden Astroglia in den neurogenen Nischen beobachtet. Das Fehlen von Sox2 führt u. a. zu einer reduzierten Anzahl an Progenitorzellen in den neurogenen Nischen des adulten Gehirns (Komitova et al. 2004, Ferri et al. 2004). Die Typ-1-Zelle teilt sich selten, kann im Falle einer Teilung aber verschiedene Wege einschlagen. Eine Möglichkeit ist die asymmetrische Teilung, wobei sowohl Gliazellen als auch Neurone entstehen können (Bonaguidi et al. 2011).

Die neuronale Tochterzelle der Typ-1-Zelle wird als Typ-2-Zelle bezeichnet. Diese Zellen sind schnell proliferierende Vorläuferzellen, GFAP-negativ und entweder Doublecortin[Dcx, ein Mikrotubulus assoziiertes Protein (Francis et al. 1999, Gleeson et al. 1999)]-negativ oder positiv. Dementsprechend werden sie unterteilt in Typ-2a(Dcx-) und Typ-2b(Dcx+)-Zellen. Die Expression des Neurogenic differentiation factor 1 (NeuroD) ist ähnlich der von Dcx. Bei NeuroD handelt es sich um einen „basic helix-loop-helix“ Transkriptionsfaktor, der als intrinsischer Faktor essentiell ist für die Spezifizierung, Differenzierung und das Überleben der neugeborenen Vorläuferzellen zu Körnerzellen des Gyrus dentatus während der embryonalen und postnatalen Neurogenese. Mäuse, die kein NeuroD exprimieren, bilden keinen Gyrus dentatus aus (Miyata et al. 1999, Liu et al. 2000, Gao et al. 2009). Beide Typ-2-Progenitorzellen sind Sox2- und T-box brain gene 2(Tbr2)-positiv. Tbr2 ist Teil einer Transkriptionsfaktorkaskade, die während der Neokortexentwicklung die Produktion glutamaterger Neurone reguliert (Englund et al. 2005). Auch während der adulten Neurogenese im Hippocampus fügt sich Tbr2 in eine sehr ähnliche Kaskade ein, die mit dem Übergang von primären zu intermediären

Progenitorzellstadien assoziiert ist und schließlich zur Bildung neuer glutamaterger Neurone führt. Die Zahl der Typ-2-Zellen, also der Tbr2-positiven Zellen, ändert sich durch neurogene Stimuli und kann als direkter Indikator adulter Neurogenese genutzt werden (Hodge et al. 2008).

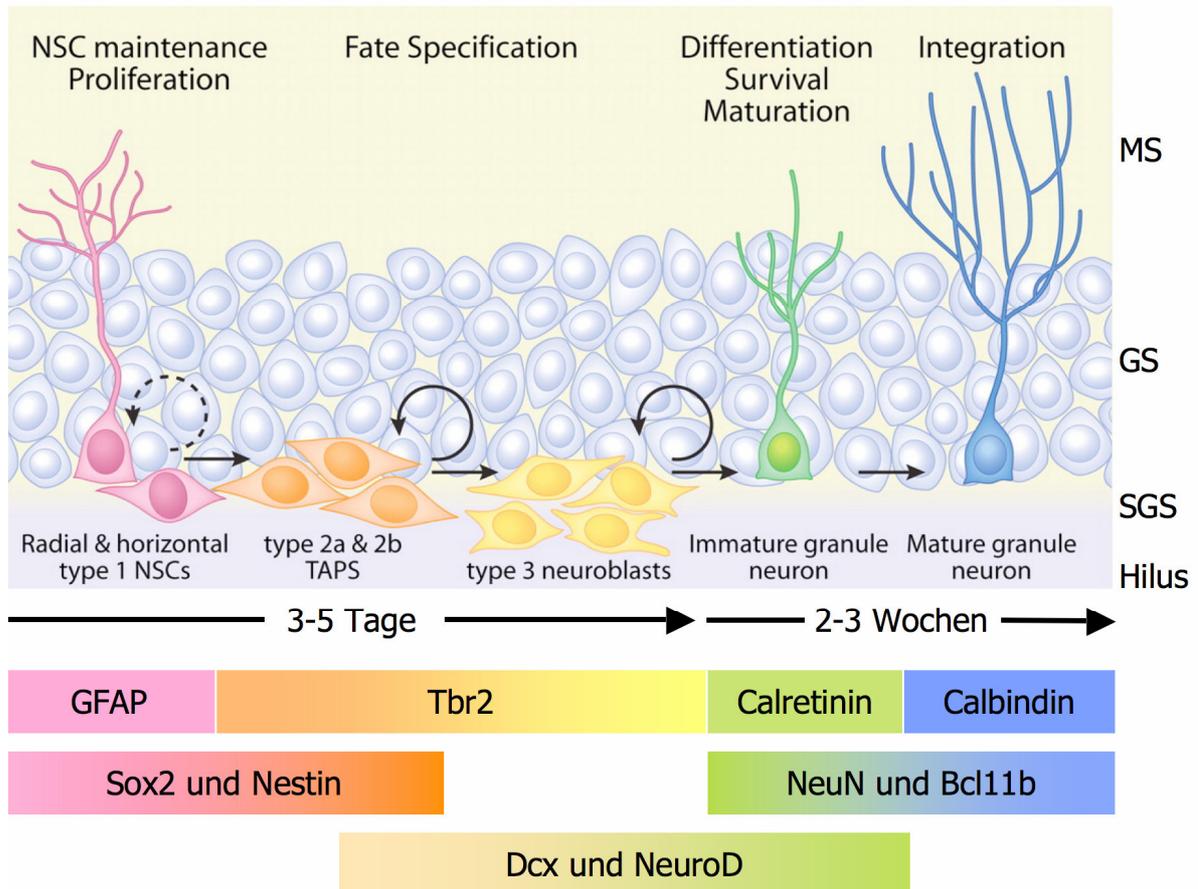


Abb. 3: Schematische Darstellung hippocampaler adulter Neurogenese und neuronaler Differenzierungsmarker
 Darstellung hippocampaler Neurogenese im Gyrus dentatus mit der Molekularschicht (MS), der Granularschicht (GS), der Subgranularschicht (SGS) und dem Hilus. Die Entstehung einer reifen Körnerzelle durch adulte Neurogenese nimmt in etwa vier Wochen in Anspruch. In dieser Zeit entwickelt sich aus einer Stammzelle [*type 1 NSC (Neural stem cell)*] über mehrere proliferierende Vorläuferstadien [*type 2a & b TAPS (Transit-amplifying progenitors)*, *type 3 neuroblasts*] eine zunächst unreife Körnerzelle (*Immature granule neuron*) und schließlich ein ausdifferenziertes, integriertes Neuron (*Mature granule neuron*). In jedem Stadium haben die Zellen ein typisches Markerprofil. GFAP (Glial fibrillary acidic protein) wird exprimiert von Stammzellen, Sox2 (Sex determining region of Y-box 2) und Nestin von der Typ-1-Stammzelle bis zur Typ-2b-Progenitorzelle, Tbr2 (T-box brain 2) von der Typ-2a bis zur Typ-3-Progenitorzelle, NeuroD (Neurogenic differentiation factor 1) und Dcx (Doublecortin) von der Typ-2b-Progenitorzelle bis zum postmitotischen unreifen Neuron; NeuN (Neuronal nuclei) und Bcl11b (B-cell leukemia 11b) ab dem unreifen postmitotischen Stadium, Calretinin transient in unreifen postmitotischen Körnerzellen und Calbindin in reifen Körnerzellen; modifiziert nach Hsieh 2012.

Im vierten Differenzierungsstadium, in den Typ-3-Zellen also, deren Differenzierung zu Neuronen bereits weiter fortgeschritten ist, ist Tbr2 nur noch teilweise vorhanden und herunterreguliert (Hodge et al. 2008). Die Typ-3-Zelle unterscheidet sich von der Typ-2a- und Typ-2b-Zelle hauptsächlich in der Reaktion auf physiologische Stimuli, die die Neurogenese anregen (Kronenberg et al. 2003).

Die Expression von Dcx und NeuroD persistiert in der nächsten Stufe der Differenzierung. Die Typ-4-Zelle ist eine postmitotische unreife Körnerzelle, die durch die Expression von NeuN (Neuronal nuclei) und Calretinin, einem intrazellulären, calciumbindenden Protein, gekennzeichnet ist. Während Calretinin nur transient in der postmitotischen Phase, in der Axone und Dendriten gebildet werden (Brandt et al. 2003), exprimiert wird, kann NeuN als Marker für alle postmitotischen Körnerzellen angesehen werden (Kempermann et al. 2004, Brandt et al. 2003). Ähnlich wie NeuN wird Bcl11b (B-cell leukemia 11b) in allen postmitotischen Körnerzellen exprimiert (Simon et al. 2012). Bereits drei Tage nach der ursprünglichen Teilung der Typ-1-Zelle erreichen die meisten Zellen dieses frühe postmitotische Stadium. In diesem Stadium wird das Axon gebildet, welches über den Moosfasertrakt Verknüpfungen mit der CA3-Region herstellt. Gleichzeitig werden Dendriten in die Molekularschicht des Gyrus dentatus ausgesandt. Die neu entstandenen Nervenzellen werden in dieser Phase entweder rekrutiert und funktionell integriert oder sie werden apoptotisch (Biebl et al. 2000).

Alle Zellen, die überleben und das Typ-5-Stadium erreichen, bleiben nun erhalten (Kempermann et al. 2004). Dieser sechste Schritt der Differenzierung beginnt etwa zwei bis drei Wochen nachdem die Zellen postmitotisch wurden und ist gekennzeichnet durch die Expression von Calbindin (CB). Dieses calciumbindende Protein kann als Marker für terminal differenzierte Körnerzellen, in denen Calbindin zusammen mit NeuN exprimiert wird, eingesetzt werden. Die Typ-5-Zellen sind damit jedoch noch nicht komplett ausgereift, sondern müssen in den folgenden ein bis zwei Monaten ihren Platz im hippocampalen Netzwerk finden. Sie knüpfen Verbindungen zu den lokalen Interneuronen und bilden Synapsen aus, um an den distalen Dendriten Afferenzen aus dem entorhinalen Kortex zu empfangen und um über den Moosfasertrakt Efferenzen in die CA3-Region zu senden (Kempermann et al. 2004). Nach acht Wochen sind die adult entstandenen Körnerzellen nicht mehr von den während der Entwicklung entstandenen Körnerzellen zu unterscheiden (Laplagne et al. 2006, Laplagne et al. 2007).

Insgesamt wird der Großteil der neuen Zellen aus dem durch Mitose der Progenitorzellen entstandenen Pool apoptotisch. Nur etwa 4/5 der ursprünglich entstanden Zellen erreichen das Typ-5-Stadium (Kempermann et al. 2004).

1.3.2 Adulte Neurogenese im menschlichen Hippokampus

Adulte Neurogenese findet sich in den meisten bisher untersuchten Säugetierarten, u. a. in Mäusen, Ratten und Primaten (Altman et al. 1965, Kornack et al. 1999, Gould et al. 1999, Kempermann et al. 1997a). Kann aber adulte Neurogenese auch beim Menschen beobachtet werden? Die erste Studie, die sich mit dieser Frage befasste, untersuchte den Gyrus dentatus von fünf Krebspatienten, denen im Rahmen der Diagnostik ihrer Erkrankung BrdU injiziert worden war. Tatsächlich konnten BrdU-positive Nervenzellen nachgewiesen werden, was auf das Vorkommen adulter Neurogenese auch beim Menschen schließen lässt (Eriksson et al. 1998). Eine weitere postmortale Studie menschlicher Gehirne verschiedener Altersstufen zeigt, dass die Zahl der neu gebildeten Nervenzellen mit dem Alter abnimmt (Knoth et al. 2010). Dieses Phänomen wird auch in Mäusen und Ratten beobachtet (Ben Abdallah et al. 2010, McDonald et al. 2005).

1.3.3 Die Funktion adulter Neurogenese

Die zentrale Rolle des Hippocampus bei der Konsolidierung expliziter Gedächtnisinhalte (Squire et al. 2004), die kontinuierliche Inkorporation neuer Neurone in den Gyrus dentatus des adulten Hippocampus und die gesteigerte Neurogenese bei Lernprozessen (Kronenberg et al. 2003) werfen Fragen hinsichtlich der Funktion der durch adulte Neurogenese entstandenen Neurone bei Gedächtnis- und Lernprozessen auf. In verschiedenen theoretischen und verhaltensexperimentellen Modellen werden insbesondere zwei Funktionen diskutiert. Zum einen sollen junge adult geborene Neurone dazu beitragen, ähnliche, zeitlich getrennte Ereignisse zu unterscheiden („pattern separation“), zum anderen sollen alte adult geborene Neurone, genau wie die während der Entwicklung des Gyrus dentatus entstandenen Neurone, ein schnelles Abrufen bereits gespeicherten Wissens bei erneutem Erleben einer ähnlichen Situation ermöglichen [„pattern completion“ (Aimone et al. 2011, Nakashiba et al. 2012)]. Diese unterschiedlichen Funktionen hängen wahrscheinlich u. a. mit den besonderen elektrophysiologischen Eigenschaften der jungen adult geborenen Körnerzellen zusammen. Diese sind im Vergleich zu den alten adult geborenen Neuronen und den während der Entwicklung des Gyrus dentatus entstandenen Neuronen leichter erregbar und haben eine größere

synaptische Plastizität (Ge et al. 2007), so dass bei einem neuen Ereignis bevorzugt junge Neurone über den Moosfasertrakt Synapsen mit den Pyramidenzellen der CA3-Region formen. Auf diese Weise sind mehr neue als ältere Körnerzellen an der Kodierung genau dieses Ereignisses beteiligt und eine Unterscheidung zu vergangenen ähnlichen Ereignissen wird möglich (Nakashiba et al. 2012).

1.3.4 Die Regulation adulter Neurogenese

Adulte Neurogenese folgt nicht wie die Entwicklung des Nervensystems einem strengen, zeitlich und örtlich festgelegten Plan. Vielmehr hängt die Entstehung neuer Neurone von verschiedenen äußeren Faktoren ab. So nehmen zahlreiche Umweltfaktoren, Krankheiten und physiologische Prozesse Einfluss auf die adulte Neurogenese. Physiologische Stimuli, wie Bewegung, eine komplexe Umgebung oder Lernprozesse, aber auch pathologische Einflüsse, wie epileptische Anfälle oder Ischämie, erhöhen die Neurogeneserate (van Praag et al. 1999, van Praag et al. 2000, Parent et al. 2002). Negativen Einfluss haben dagegen Stress, Depression und in besonders hohem Maß das Altern. In Mäusen erreicht die hippocampale Neurogeneserate im Alter von sechs Monaten ein stabiles niedriges Niveau von noch etwa 8–9 % der Neurogeneserate, die bei Mäusen im Alter von einem Monat beobachtet wird (Ben Abdallah et al. 2010, Duman 2004).

Neurogenese ist im adulten Gehirn nur möglich durch die besonderen Bedingungen, die in den neurogenen Nischen vorzufinden sind. Diese entstehen durch das Zusammenspiel verschiedener Zellen, u. a. der Gliazellen, der Endothelzellen, der adulten Neurone und der Progenitorzellen, die selbst aktiv an der Aufrechterhaltung der neurogenen Nische beteiligt sind (Wurmser et al. 2004, Ming et al. 2011). Hier kommt es zu komplexen Wechselwirkungen zwischen extrinsischen und intrinsischen Faktoren. Neurotransmitter, Hormone, Wachstums-, Transkriptions-, epigenetische Faktoren und andere, beeinflussen in unterschiedlichem Ausmaß die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften, die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben der neu entstandenen Zellen (Ming et al. 2011). Ein Beispiel für einen extrinsischen Regulator der Proliferation adulter Progenitorzellen sind vaskuläre Zellen. In der SGS des Gyrus dentatus wurde gezeigt, dass sich teilende Progenitorzellen häufig eng benachbart sind mit Kapillargefäßen (Palmer et al. 2000). Auf diese Weise können auch Faktoren aus dem Blut, wie Hormone, leicht mit den Progenitorzellen in Kontakt treten. Weitere extrinsische Regulatoren sind die Wachstumsfaktoren Vascular endothelial growth factor (VEGF) und Fibroblast growth factor-2 (FGF-2). Für beide wurde eine Steigerung der Proliferationsrate adulter neuronaler

Progenitorzellen gezeigt und für VEGF zusätzlich ein positiver Effekt auf das Überleben der neu entstandenen Zellen nachgewiesen (Jin et al. 2002, Schanzer et al. 2004). Auch neurotrophe Faktoren, wie z. B. der Brain derived neurotrophic factor (BDNF), nehmen Einfluss auf die adulte Neurogenese. BDNF ist daran beteiligt, den positiven Effekt einer komplexen Umgebung auf die adulte Neurogenese zu vermitteln und fördert die Ausreifung adult geborener Neurone (Rossi et al. 2006, Waterhouse et al. 2012). Der Wnt (Wingless and integration 1)/ β -Catenin-Signalweg fördert ebenfalls die Proliferation und die neuronale Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen im Gyrus dentatus (Lie et al. 2005, Qu et al. 2010).

Während sich die extrinsischen Signale in der embryonalen und adulten Neurogenese unterscheiden können, ist der Ablauf der Neurogenese sehr ähnlich und viele der intrinsischen Signalwege sind konserviert (Ming et al. 2011). Zu den intrazellulären Mechanismen gehören u. a. Zellzyklusregulatoren, Transkriptions- und epigenetische Faktoren (Hsieh 2012, Sun et al. 2011). Die sequentielle Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren stellt die korrekte Entwicklung der Neurone während der adulten Neurogenese sicher. Sox2 beispielsweise spielt nicht nur eine Schlüsselrolle während der Entwicklung des Nervensystems (Graham et al. 2003, Favaro et al. 2009), sondern ist auch an der Aufrechterhaltung der Progenitorzeleigenschaften in adulten neuronalen Stammzellen beteiligt (Favaro et al. 2009). In jedem Stadium der neuronalen Differenzierung ändert sich auch das Transkriptionsfaktorprofil. So wird z. B. NeuroD in Typ-2b-Zellen bis zu unreifen Körnerzellen exprimiert und ist wichtig für die Differenzierung und das Überleben der neuronalen Progenitorzellen (Liu et al. 2000). Auch Prox1 (Prospero-related homeobox 1 gene) wird ab der Typ-2b-Zelle, aber dann weiterhin in reifen Körnerzellen exprimiert und reguliert das Überleben und die Reifung der Körnerzellen. Prox1 ist aber auch durch nicht zellautonome Mechanismen an der Aufrechterhaltung der Progenitorzellpopulation beteiligt (Lavado et al. 2010, Karalay et al. 2011). Sowohl NeuroD als auch Prox1 sind dabei auf den Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg angewiesen (Karalay et al. 2011, Kuwabara et al. 2009). Viele der Faktoren, die der phasenspezifischen Kontrolle der adulten Neurogenese zugrunde liegen, sind jedoch noch unbekannt.

1.4 Der Zinkfingertranskriptionsfaktor Bcl11b

Ein weiterer, für die Regulation der adulten Neurogenese interessanter, intrinsischer Faktor ist der Zinkfingertranskriptionsfaktor Bcl11b. Er wird in allen postmitotischen unreifen und reifen Körnerzellen des Gyrus dentatus exprimiert. Es handelt sich bei Bcl11b um einen hoch konservierten C₂H₂(Cystein₂-Histidin₂)-Zinkfingertranskriptionsfaktor aus der Familie der Krüppel-like Transkriptionsfaktoren. Erstmals beschrieben wurde Bcl11b als Chicken ovalbumin upstream promotor transcription factor(COUP-TF)-interacting protein 2 [Ctip2 (Avram et al. 2000)] und als Radiation induced tumor suppressor gene 1 [RIT1 (Wakabayashi et al. 2003a)]. Bcl11b ist durch sechs, für die DNS(Desoxyribunukleinsäure)-Bindung essentielle Zinkfingerdomänen charakterisiert. Die Zinkfinger bestehen aus einer konservierten ββα-Struktur und erlangen ihre Stabilität durch ein zentrales Zink-Ion. Die DNS-Bindung der Zinkfinger wird vermittelt durch Aminosäuren auf der Oberfläche der α-Helix (Wolfe et al. 2000). Dabei interagiert Bcl11b meist mit Proteinen oder Proteinkomplexen, wie beispielsweise dem COUP-TF- oder dem Nucleosome remodeling and deacetylation (NuRD)-Komplex und bewirkt oft eine negative Regulation der Transkription (Avram et al. 2000, Topark-Ngarm et al. 2006). Die Expression von Bcl11b ist nicht auf ein einzelnes Organsystem beschränkt, sondern findet sich z. B. in Neuronen, T-Zellen und Keratinozyten (Leid et al. 2004, Liu et al. 2010, Liang et al. 2012). Im Zentralnervensystem (ZNS) wird Bcl11b sowohl während der Entwicklung als auch postnatal in verschiedenen Regionen exprimiert: im Hippocampus, in den tieferen Schichten des Kortex, im Striatum, im Bulbus olfactorius, in den Basalganglien, im dorsalen Rückenmark, im Cerebellum und in der Amygdala (Leid et al. 2004). Bcl11b steuert beispielsweise die Entwicklung des Tractus corticospinalis (Arlotta et al. 2005) und wird für die Integrität der Zellarchitektur und die Differenzierung der sogenannten „medium spiny neurons“ des Striatums benötigt (Arlotta et al. 2008). Es wird außerdem diskutiert, ob der Funktionsverlust von Bcl11b im Striatum an der Entstehung der Huntington Krankheit beteiligt ist (Desplats et al. 2008). Insgesamt deuten diese Daten auf eine kritische Rolle von Bcl11b in den zellulären Prozessen Proliferation, Überleben und Differenzierung hin. Es besteht jedoch noch Unklarheit über die exakten molekularen Mechanismen, über die Bcl11b im ZNS seine Funktionen vermittelt.

1.4.1 Die Funktion von Bcl11b während der postnatalen Entwicklung des Hippocampus

Eine weitere essentielle Funktion hat Bcl11b im ZNS bei der strukturellen und funktionellen postnatalen Entwicklung des Gyrus dentatus in Mäusen (Simon et al. 2012). Mäuse mit einer vorderhirnspezifischen konditionellen Bcl11b-Mutation zeigen ab dem Zeitpunkt P(Postnataler Tag)7 bis zum zuletzt untersuchten Zeitpunkt P30 einen hypoplastischen Gyrus dentatus mit reduzierter Körnerzellzahl. Dies ist zurückzuführen auf eine herabgesetzte Progenitorzellproliferation in der tertiären Matrix und eine vermehrte Apoptose der postmitotischen Körnerzellen. Weiterhin führt die Abwesenheit von Bcl11b im sich entwickelnden Gyrus dentatus zu einer beeinträchtigten Differenzierung der neuronalen Progenitorzellen. Ebenfalls abhängig von Bcl11b ist die funktionelle Integration der postnatal entstehenden Körnerzellen in die hippocampale Verschaltungskette. In den Bcl11b Mutanten ist zum einen die Anzahl der dendritischen Dornen der Körnerzellen reduziert, zum anderen ist die Ausbildung des Moosfasertrakts gestört (Simon et al. 2012). Dies deutet darauf hin, dass sowohl der synaptische Input der Körnerzellen als auch ihre Projektionen auf Pyramidenzellen in der CA3-Region durch Bcl11b beeinflusst werden. Diese Beeinträchtigungen der hippocampalen Verschaltungskette resultieren in einer eingeschränkten räumlichen Lernfähigkeit (Simon et al. 2012). Als direktes Targetgen von Bcl11b konnte Desmoplakin identifiziert werden. Desmoplakinmutante Mäuse zeigen einige übereinstimmende Merkmale mit den Bcl11b-mutanten Mäusen, so dass hier desmoplakinabhängige Funktionen anzunehmen sind. Zusätzlich sind weitere, bisher nicht bekannte, Targetgene wahrscheinlich, da einige Merkmale der Bcl11b-Mutanten in den Desmoplakin-Mutanten nicht rekapituliert werden (Simon et al. 2012).

Die Expression von Bcl11b wird im Gyrus dentatus, einem Gebiet in dem zeitlebens Neurogenese stattfindet, nach abgeschlossener postnataler Entwicklung aufrecht erhalten. Eine essentielle Funktion von Bcl11b auch während adulter Neurogenese ist damit wahrscheinlich.

1.5 Fragestellung

Bcl11b kodiert für einen hochkonservierten Zinkfingertranskriptionsfaktor, der zeitlebens in postmitotischen Körnerzellen des Gyrus dentatus in Mäusen exprimiert wird. Seine essentielle Funktion für die postnatale Entwicklung des Hippocampus ist beschrieben [siehe 1.4.1 (Simon et al. 2012)]. Die fortbestehende Expression von Bcl11b nach der vollendeten Entwicklung des Gyrus dentatus und die Rekapitulation vieler intrinsischer Signaltransduktionswege der Entwicklung des Nervensystems bei adulter Neurogenese (Ming et al. 2011), ließen die Fragestellung der vorliegenden Arbeit entstehen:

Welche Funktion hat Bcl11b während der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus von Mäusen?

Zur Beantwortung dieser Frage sollte an adulten Mäusen mit einer konditionellen Mutation des Bcl11b-Gens im Vorderhirn mittels morphologischer und immunhistochemischer Methoden der Phänotyp der Bcl11b-Mutation während der adulten Neurogenese bestimmt werden. Hierbei sollten verschiedene Aspekte der Entwicklung eines adult geborenen hippocampalen Neurons in Mutanten und Kontrolltieren vergleichend analysiert werden. Betrachtet werden sollten dabei im Besonderen die Proliferation und Anzahl der Progenitorzellen, das Differenzierungsverhalten und das Überleben der neu entstandenen Neurone.

Bisher ist die transkriptionelle Steuerung der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus nur unvollständig aufgeklärt. Ich erwarte, dass meine Untersuchungen zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen, die der adulten Neurogenese zugrunde liegen, beitragen werden. Die Deregulation adulter Neurogenese hat wahrscheinlich Anteil an der Pathophysiologie neurodegenerativer Krankheiten, wie z. B. Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer (Mu et al. 2011, Winner et al. 2011). Die Aufklärung der molekularen Steuerungsmechanismen adulter Neurogenese im Hippocampus könnte daher auch zu einem besseren Verständnis wichtiger Erkrankungen des ZNS beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Lösungen und Reagenzien

Das Wasser für alle Lösungen und Reagenzien wurde über eine Milli-Q Plus (Millipore)-Anlage aufgereinigt und bis zu einem Widerstand von 18,2 M Ω /cm entionisiert. Einige der Lösungen wurden steril filtriert. Die Chemikalien wurden von folgenden Unternehmen bezogen: Invitrogen, Darmstadt; Merck, Darmstadt; Sigma-Aldrich, Steinheim. Tabelle 1 zeigt alle verwendeten Lösungen und Reagenzien.

Tab. 1: Verwendete Lösungen und Reagenzien

Name	Zusammensetzung
BrdU-Injektionslösung	10 mg BrdU/ml 0,007 M NaOH in 0,9 % NaCl
Borat-Puffer	0,1 M Borat in Milli-Q H ₂ O, pH 8,5
DAPI (4', 6-Diamidin-2-phenylindol)	0,001 % in PBS
Kresylviolett-Färbelösung	0,02 % Kresylviolett in 2 M Walpole-Puffer
Lysis-Puffer (Ohr-/Schwanzgewebe)	100 mM Tris, pH 8.5 200 mM NaCl 5 mM EDTA 0,2 % SDS 100 μ g/ml Proteinase K

Fortsetzung Tab. 1: Verwendete Lösungen und Reagenzien

PBS	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ auf 1 l mit Milli-Q H ₂ O
PBT-X	0,1 % Triton-X100 in PBS
Phosphat-Puffer	0,2 M NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄
TBS	150 mM NaCl 100 mM Tris-HCl, pH 7,4 2 mM KCl
TBSplus	0,1 % Triton 3 % Pferdeserum in TBS
Tris	1 M NH ₂ C(CH ₂ OH) in Milli-Q H ₂ O, pH 8,0
Walpole-Puffer	0,2 M Essigsäure 0,2 M Natriumacetat, pH 4,45

2.1.2 Geräte

Die nachfolgende Tabelle zeigt die in dieser Arbeit eingesetzten Geräte.

Tab. 2: Eingesetzte Geräte

Beschreibung	Gerät	Firma
Wasseraufreinigung	Milli-Q Plus Water System	Millipore, Molsheim, Frankreich
PCR Cycler	T3000 Thermocycler	Biometra, Foster City, CA
Schüttelinkubator	Infors HT Multitron	INFORS AG, Bottmingen
Rotationsmikrotom	Microm HM 355 S	Microm, Walldorf
Mikrotom mit vibrierender Klinge (Vibratom)	Microm HM 650 V	Microm, Walldorf
Mikrotom-Kryostat	Microm Cryo-Star HM 560 M	Microm, Walldorf
Fluoreszenzmikroskop	Leica CTR 6000	Leica Microsystems, Heerbrugg
Kamera am Fluoreszenzmikroskop	Leica DFC425 C Kamera	Leica Microsystems, Heerbrugg
Konfokales Mikroskop	Leica Mikroskop SP5	Leica Microsystems, Heerbrugg

2.1.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, München, bezogen.

Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' – 3')
Bcl11b-flox 1	TGAGTCAATAAACCTGGGCGAC
Bcl11b-flox 2	GGAATCCTTGGAGTCACTTGTGC
EmxCre 1	GTATTTGGTTTAGAGTTTGGC
EmxCre 2	GGGGGACATGAGAGGATGC

2.1.4 Antikörper

In Tabelle 4 sind die verwendeten Primär-Antikörper, welche die genannten Antigene der Maus binden und die Spezies, in welcher der Antikörper gebildet wurde, aufgelistet. Weiterhin sind die verwendeten Verdünnungen für die Immunhistochemie auf Gefriergewebeschnitten, bei BrdU für Gefriergewebe-/Vibratonschnitte und die Bezugsquelle angegeben. Der Bcl11b-Antikörper wurde in unserem Institut von Heike Brylka generiert. Dieser Antikörper erkennt 173 Aminosäuren (AS 462 – 634), die sich downstream der funktionellen Zinkfinger motive befinden. Beide Regionen sind im mutanten Protein deletiert (Simon et al. 2012).

Tab. 4: Verwendete primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Bcl11b	Kaninchen	1:500	H. Brylka, MDC Berlin
Bcl11b	Meerschweinchen	1:500	H. Brylka, MDC Berlin
BrdU	Ratte	1:1000/1:500	Abcam, Cambridge (UK)
Calbindin	Kaninchen	1:2000	Swant, Bellinzona (Schweiz)
NeuN	Maus	1:1000	Chemicon, Hampshire (UK)
NeuroD	Ziege	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
Sox2	Kaninchen	1:500	Millipore,
Tbr2	Kaninchen	1:500	Abcam, Cambridge (UK)

Alle sekundären Antikörper (Dianova, Hamburg) für die Fluoreszenzimmunhistochemie wurden im Esel generiert. Es wurden anti-Kaninchen, anti-Meerschweinchen, anti-Ratte, anti-Maus, anti-Ziege IgG-Antikörper, jeweils gekoppelt an Cy2, Cy3 oder Cy5, eingesetzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Das *Cre/loxP*-System

Der Einfluss von *Bcl11b* auf die postnatale Entwicklung des Hippocampus in Mäusen wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt (Simon et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde *Bcl11b* im Zusammenhang mit adulter Neurogenese im Hippocampus sechs Monate alter Mäuse untersucht. Da Mäuse mit einer Null-Mutation des *Bcl11b*-Gens jedoch kurz nach der Geburt sterben (Wakabayashi et al. 2003b), wurde das *Cre/loxP*-System eingesetzt (Gu et al. 1994). Das *Cre/loxP*-System ermöglicht eine vorderhirnspezifische Deletion von *Bcl11b* und führt so zu lebensfähigen Mutanten. Das System beruht auf zwei Komponenten. Eine Komponente sind spezifische *LoxP*-Sequenzen, die den zu deletierenden Genlocus flankieren. Der konditionelle Knockoutvektor wird durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen in die DNS eingefügt. Die modifizierten embryonalen Stammzellen werden anschließend in Blastozyten injiziert, um konditionelle Knockout-Mäuse zu generieren. Die zweite Komponente ist die *Cre*(Causes recombination)-Rekombinase, welche die Rekombination zwischen zwei *LoxP*-Sequenzen katalysiert (Abb. 4). Die Expression der *Cre*-Rekombinase steht unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, so dass nur in den Zellen dieses Gewebes die DNS-Sequenz zwischen den *LoxP*-Sequenzen deletiert wird.

2.2.2 Transgene Mauslinien

***Bcl11b*-flox-Mäuse** (Pentao Liu, Neal Copeland, Nancy Jenkins, Frederick, USA): Bei diesen *Bcl11b*-flox-Mäusen sind im *Bcl11b*-Genlocus die Exons vier bis sechs von zwei *loxP*-Sequenzen flankiert sowie eine Neomycin-Resistenzkassette im 3' UTR inseriert. Die Exons vier bis sechs kodieren die für die Funktion des Transkriptionsfaktors *Bcl11b* essentiellen Zinkfingerdomänen zwei bis sechs. Die Generierung dieser Mäuse erfolgte durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen. Diese geflochten Mäuse zeigen keine Auffälligkeiten, da die Genfunktion nicht beeinflusst wird (Li et al. 2010).

***Emx-1 Cre*-Mäuse** (Jessica Gorski, Kevin R. Jones, Colorado, USA): Die Expression des *Cre*-Rekombinasegens steht bei diesen Knock-in-Mäusen unter Kontrolle des vorderhirnspezifischen *Emx-1*(Empty spiracles homeobox 1)-Promotors (Gorski et al. 2002). *Emx-1* wird in kortikalen Neuronen des Vorderhirns und in mitotischen

Vorläuferzellen sowie in postmitotischen Nervenzellen des Hippocampus exprimiert (Gorski et al. 2002).

Für die Generierung konditioneller *Bcl11b*-Mutanten wurden *Bcl11b^{flox/flox}*-Mäuse mit *Emx-1 Cre*-Mäusen verpaart. Die aus dieser Verpaarung hervorgehenden *Bcl11b^{flox/+}*; *Emx-1 Cre*-Tiere wurden wiederum untereinander verpaart. Die daraus hervorgehenden *Bcl11b^{flox/+}*; *Emx-1 Cre*- und *Bcl11b^{+/+}*; *Emx-1 Cre*-Tiere wurden als Kontrollen verwendet, um potentielle, durch die Anwesenheit der *Cre*-Rekombinase hervorgerufene, unspezifische Veränderungen zu kontrollieren. Die *Bcl11b^{flox/flox}*; *Emx-1 Cre*-Tiere werden im Folgenden als Mutanten bezeichnet. Diese Tiere sind lebensfähig, etwa 30 % sterben jedoch mit ca. fünf Wochen aus bisher nicht näher untersuchten Gründen. Die Mutanten fallen oft durch eine Wachstumsretardierung und hyperaktives Verhalten auf.

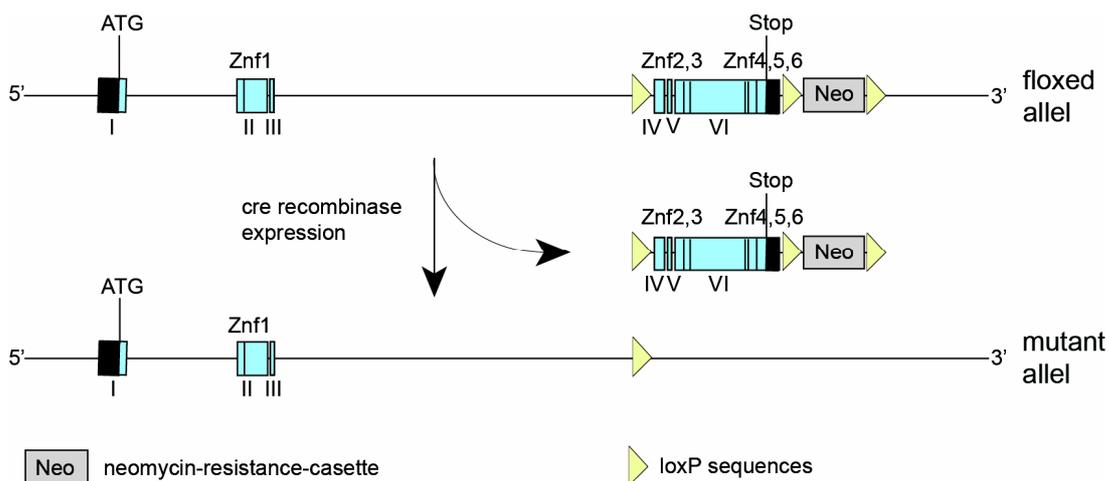


Abb. 4: Mutagenese des *Bcl11b*-Gens

Schematische Darstellung des *Bcl11b*(B-cell leukemia 11b)-Genlocus von *Bcl11b*-flox-Mäusen; mithilfe des *Cre/LoxP*-Systems wurde eine konditionelle Mutation in den *Bcl11b*-Genlocus dieser Mäuse eingeführt. Zusätzlich wurde eine Neomycin-Resistenzkassette in das 3'UTR inseriert. Die von den LoxP-Sequenzen flankierten Exons IV–VI kodieren die für die Funktion des Transkriptionsfaktors *Bcl11b* essentiellen Zinkfinger (Znf) Domänen zwei bis sechs (Zinkfinger in den Exons sind durch senkrechte Striche dargestellt). Die Expression einer *Cre*(Causes recombination)-Rekombinase induziert die Mutation durch die Deletion der Exons IV–VI.

2.2.3 Genotypisierung

Der Genotyp der Versuchstiere wurde mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) bestimmt. Die PCR ist ein In-vitro-Amplifikationsverfahren definierter DNS-Sequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen (Saiki et al. 1985). Sie ist ein zyklisch verlaufender Prozess, der auf der Wiederholung drei aufeinander folgender Reaktionsschritte beruht:

Denaturierung:	Aufschmelzen des DNS-Doppelstranges bei 94 °C
Primeranlagerung:	spezifische Bindung zweier gegenläufiger Oligonukleotid-Primer an den kodierenden bzw. den nicht-kodierenden Strang bei 45-60 °C
Synthese:	Synthese des fehlenden, komplementären Einzelstranges durch eine hitzestabile DNS-Polymerase bei 70–72°C

Im Idealfall wird in jedem Zyklus der durch die Oligonukleotide flankierte DNS-Abschnitt verdoppelt, was zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung dieser Sequenz führt.

Die Gewinnung der DNS erfolgte aus dem Ohrblattgewebe der Versuchstiere. Dieses fiel bei der zur dauerhaften individuellen Kennzeichnung eingesetzten Ohrlochung an den ca. drei Wochen alten Mäusen an (Ren et al. 2001). Die Ohrlöcher wurden im Lysis-Puffer für 2 h bei 55 °C verdaut. Anschließend wurde die im Lysis-Puffer enthaltene Proteinase K für 10 min bei 97 °C inaktiviert. Nach der Zugabe von 250 µl H₂O wurde dieses hitzeinaktivierte Lysat als Template bei der PCR eingesetzt.

Die PCR wurde gemäß Standardmethoden (Sambrook et al. 2001) im PCR Cycler (T3000 Thermocycler, Biometra, Foster City, CA) durchgeführt.

PCR-Ansatz für die Bcl11b-Genotypisierung:

dNTPs (5 mM)	1 µl
10 x PCR-Puffer	2 µl
MgCl ₂ (1,5 mM)	0,6 µl
Bcl11b Primer1 (10 µM)	1 µl
Bcl11b Primer 2 (10 µM)	1 µl
Taq Polymerase	0,2 µl
Template DNS	1 µl
Milli-Q H ₂ O	add 20 µl

Bcl11b-PCR-Programm:

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1 x	94 °C	2 min

Denaturierung		94 °C	15 sec
Primeranlagerung	30 x	63 °C	30 sec
Synthese		70 °C	1 min

Zuletzt wurde die Probe auf 4 °C heruntergekühlt.

PCR-Ansatz für die Emx1 Cre-Genotypisierung:

dNTPs (5 mM)	1,5 µl
10 x PCR-Puffer	3 µl
MgCl ₂ (1,2 mM)	0,9 µl
Primer EmxCre1	1 µl
Primer EmxCre 2	1 µl
Taq Polymerase	0,2 µl
Template DNS	1 µl
Milli-Q H ₂ O	add 30 µl

Emx1 Cre-PCR-Programm:

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1 x	94 °C	3 min

Denaturierung		94 °C	30 sec
Primeranlagerung	35 x	58 °C	30 sec
Synthese		72 °C	1,5 min

Zuletzt wurde die Probe auf 4 °C heruntergekühlt.

2.2.4 BrdU-Injektionen

Der Nachweis proliferierender Zellen erfolgte mithilfe von BrdU-Injektionen. BrdU ist ein Thymidin(T)-Analogon, das während der S-Phase (Synthesephase) des Zellzyklus in die DNS integriert wird. Mittels eines BrdU Antikörpers kann dies immunhistologisch in den Zellkernen der Zellen, die in einem Zeitraum von etwa 15 min nach der Injektion die S-Phase durchlaufen haben, sowie in den Abkömmlingen dieser Zellen, nachgewiesen werden (Cooper-Kuhn et al. 2002). In Anlehnung an etablierte Protokolle (Kempermann et al. 2003, Mathews et al. 2010) wurden sechs Monate alte Tiere an drei aufeinander folgenden Tagen mit 100 µg BrdU/g Körpergewicht intraperitoneal injiziert und die Gehirne vier bzw. 28 Tage nach der ersten Injektion präpariert. Dieses Vorgehen erlaubte die Analyse dreier unterschiedlicher Aspekte der adulten Neurogenese:

- 1) Die **Proliferation** der Progenitorzellen durch die Quantifizierung BrdU-positiver Zellen am Tag vier. Die BrdU-markierten Zellen haben sich einen bis vier Tage vor der Präparation geteilt und befinden sich größtenteils noch im mitotischen Stadium (Kempermann et al. 2004). So lässt sich im Vergleich von Kontrolle und Mutante die proliferative Aktivität der Progenitorzellen beurteilen.
- 2) Das **Überleben** der mit BrdU markierten Zellen durch die Quantifizierung BrdU-positiver Zellen am Tag 28. Zu diesem Zeitpunkt ist eine stabile Anzahl an BrdU-positiven Zellen zu erwarten, die sich auch zu späteren Zeitpunkten nicht mehr ändert (Kempermann et al. 2004).
- 3) Die **Differenzierung** der mit BrdU markierten Zellen am Tag vier und am Tag 28 durch die Kolo-kalisation neuronaler Differenzierungsmarker in BrdU-positiven Zellen. Zugleich erlaubt der Vergleich der Differenzierungsstadien zu den zwei Zeitpunkten ein „fate mapping“ der BrdU-positiven Zellen. Das heißt, es kann bestimmt werden, wie die Entwicklung der adult entstandenen Nervenzellen voranschreitet.

2.2.5 Präparation von Mausgewebe

Die Gewinnung des Gewebes sechs Monate alter Tiere erfolgte bei Weiterverarbeitung des Gewebes zu Vibratom- oder Plastikschnitten nach Vorfixierung des Gewebes. Nach dem Töten der Tiere mit Chloroform wurde der Thorax eröffnet, der linke Ventrikel mit einem Butterfly punktiert und der rechte Vorhof mit einer spitzen Pinzette inzidiert. Mithilfe einer Gilson® MINIPULS 3 Pumpe wurde das Blut mit ca. 15 ml eiskaltem PBS (Phosphate buffered saline), bei einer Laufgeschwindigkeit von 4 ml/min, aus dem großen Kreislauf gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung mit 15 ml eiskalter 4%iger PFA(Paraformaldehyd)-Lösung (4 % PFA in PBS) und eine weitere Spülung mit 10 ml PBS. Danach wurden die Tiere dekapitiert und das Gehirn wurde präpariert. Bei der Verwendung des Gewebes für Gefrierschnitte wurden die Tiere nicht vorfixiert, sondern direkt präpariert. Alle Tierversuche fanden in Übereinstimmung mit nationalen und internationalen Vorschriften zum Tierschutz statt und wurden von einer lokalen Ethikkommission geprüft und genehmigt.

2.2.6 Histologische Techniken

2.2.6.1 Methacrylatschnitte

Herstellung

Für die Bestimmung der Körnerzellzahl und der Fläche des Gyrus dentatus sechs Monate alter Tiere wurden die präparierten Gewebestücke in Hydroxyethylmethacrylat (Technovit 7100, kaltpolymerisierender Kunststoff; Heraeus-Kulzer, Wertheim) eingebettet. Die Präparate wurden über Nacht in 4 % PFA fixiert und anschließend ca. fünf Tage in 1 % PFA belassen. Sie wurden dann drei Tage in PBS gewaschen, wobei nach etwa der Hälfte der Zeit ein PBS Wechsel erfolgte. Anschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert: 4 h in 25 % Ethanol in Milli-Q H₂O, über Nacht in 50 % Ethanol, 8 h in 75 % Ethanol, über Nacht in 95% Ethanol, zwei Tage in 100 % Ethanol mit einem Lösungswechsel nach einem Tag. Danach erfolgte die Präinfiltration des Gewebes mit 100 % Ethanol und Technovit 7100 Basislösung im Verhältnis 1:1 bei 4 °C für einen Tag, bevor es mindestens zwei Tage in Vorbereitungslösung (100 ml Technovit 7100 Basislösung mit 1 g Härter I) bei Raumtemperatur (RT) infiltriert wurde. Die Präparate wurden dann in Vorbereitungslösung und Härter II im Verhältnis 15:1 eingebettet. Nach der vollständigen Auspolymerisation des Kunststoffs, die nach mehreren

Tagen eintrat, wurden die Präparate mit Technovit 3040 auf Histoblöcke fixiert und bis zum Schneiden bei RT aufbewahrt. Mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM355S, Walldorf) wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden in einem warmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger (Menzel-Gläser, Menzel, Braunschweig) aufgezogen und über Nacht auf einem Heizblock bei 37 °C getrocknet. Die so hergestellten Methacrylatschnitte wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Kresylviolett-färbung

Die Kresylviolett-färbung der Methacrylatschnitte erfolgte für 10 min bei RT in Kresylviolett-Färbelösung (0,02% Kresylviolett in 0,2 M Walpole-Puffer) auf einem Schüttler. Anschließend wurden die Objektträger einmal in Milli-Q H₂O getaucht und dann dreimal 5 min in Milli-Q H₂O auf einem Schüttler gewaschen. Um die Färbung zu differenzieren wurden sie für 10 sec in 70 % Ethanol gewaschen und gleich darauf dreimal in H₂O getaucht. Nachdem die Objektträger ein letztes Mal 6 min in H₂O auf einem Schüttler gewaschen worden waren, wurden sie über Nacht bei RT getrocknet und am nächsten Tag mit Entellan Neu (Merck, Darmstadt) mit Deckgläschen eingedeckelt.

2.2.6.2 Vibratomschnitte

Herstellung

Vibratomschnitte wurden für die Quantifizierung der proliferierenden und der überlebenden BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus adulter Mäuse angefertigt.

Bei der Herstellung von Vibratomschnitten wurden die vorfixierten Gehirne für 4 h in 4 % PFA bei 4 °C weiter fixiert, in 2 % PFA überführt und über Nacht bei 4 °C belassen. Das Gewebe wurde dann dreimal 5 min mit PBS gespült und in 4 % Low-melt-Agarose (Agarose Low Melt 3, AppliChem, Darmstadt) in PBS in Peel-A-Way-Förmchen eingebettet und bei 4 °C bis zum Schneiden aufbewahrt. Mit dem Vibratom (Microm HM650V, Microm Walldorf) wurden 40 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden als „free-floating“ Schnitte in 24 Well-Platten in PBS auf Eis gesammelt und bei 4 °C bis zur Färbung gelagert.

BrdU-Färbung

Die BrdU-Färbung erfolgte auf jedem sechsten Vibratomschnitt dieser Gehirne. Die Schnitte wurden mithilfe eines Pinsels in ein Sieb in einer 12-Well-Platte mit je 2 ml TBS (Tris buffered saline) pro Vertiefung überführt. Die Schnitte wurden zweimal bei RT für

10 min auf dem Schüttler gewaschen und dann für 30 min bei 37 °C in 2 M HCl in einem Schüttelinkubator (Infors HT Multitron, INFORS AG, Bottmingen) mit einer Rotation von 70 rpm (revolutions per minute) inkubiert. Danach wurden sie für 10 min in 0,1 M Borat-Puffer gegeben. Anschließend wurden die Schnitte sechsmal 10 min bei RT in TBS gewaschen und für 30 min in je 2 ml TBSplus geblockt. Dann wurden die Schnitte mit einem Pinsel aus den Sieben entnommen und in Platten mit je 250 µl primärem Antikörper in TBSplus überführt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am zweiten Tag wurden die Vibratomschnitte zurück in die Siebe gegeben und zweimal 5 min in TBS gewaschen. Nach erneutem Blocken für 15 min in TBSplus wurden die Schnitte wieder mit dem Pinsel aus den Sieben genommen und im Dunkeln für 4 h auf dem Schwenktisch bei RT in 250 µl des 1:250 in TBSplus verdünntem sekundären Antikörper inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend mit dem Pinsel in die Siebe gegeben und sechsmal 10 min mit TBS gewaschen. Vor dem Aufziehen der Schnitte auf Objektträger wurden sie in Phosphat-Puffer mit Triton gewaschen, kurz bei RT getrocknet und mit Immu Mount (Thermo Scientific) und Deckgläschen eingedeckelt.

2.2.6.3 Gefriergewebeschnitte

Herstellung

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurde nicht perfundiertes Gewebe eingesetzt. Die Gehirne wurden erst nach der Präparation für 2 h in 4 % PFA bei 4 °C fixiert, anschließend dreimal 10 min in PBS gewaschen und zur Kryoprotektion über Nacht in 30 % D(+)-Saccharose (Roth, Karlsruhe) in 0,1 % Phosphat-Puffer bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gewebe kurz in Polyfreeze Tissue Freezing Medium (Polysciences, Warrington, PA) geschwenkt und danach in eine Peel-A-Way-Einbettform mit Tissue Freezing Medium überführt und ausgerichtet. Die Präparate wurden dann auf einer Metallbrücke, die in flüssigem Stickstoff stand, eingefroren und bei –80°C gelagert.

Die Gefrierschnitte wurden mit einem Kryostaten (Microm HM560 Cryo-Star; Microm Walldorf) bei einer Blocktemperatur von –18 bis –23°C und mit einer Schnittdicke von 16 µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf Adhäsionsobjektträger (Menzel-Gläser Superfrost Plus; Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) aufgezogen, bei RT getrocknet und bei –80°C gelagert.

Immunfluoreszenzfärbung

Immunfluoreszenzfärbungen auf Gefriergewebeschnitten wurden angewandt zum „fate mapping“ BrdU-positiver Zellen, zur Quantifizierung von Progenitorzellen und um die Koexpression von Bcl11b mit Progenitorzellmarkern zu untersuchen.

Die Gefriergewebeschnitte wurden am ersten Tag 30 min bei RT getrocknet und mit Liquid Blocker (Super Pap Pen, Daido Sangyo Co., Tokyo, Japan) umrandet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 5 min auf dem Schüttler wurden sie 5 min mit 4 % PFA fixiert. Dann folgten noch einmal drei Waschschritte für 5 min mit PBS auf dem Schüttler und 20 min Inkubation in 2,4 M HCl bei 37°C im Wasserbad. Nach erneutem dreimaligen Waschen für je 5 min mit PBS auf dem Schüttler wurden die Schnitte mit 500 µl 10 % Pferdeserum in 0,1 % PBT-X pro Objektträger für 1 h bei RT geblockt. Darauf folgte die Inkubation mit dem primären BrdU Antikörper in je 200 µl 5 % Pferdeserum in 0,1 % PBT-X pro Objektträger bei 4 °C über Nacht.

Am zweiten Tag wurden die Schnitte dreimal 5 min mit PBS bei RT auf dem Schüttler gewaschen und danach im Dunkeln für 1 h bei RT mit 200 µl des 1:250 in 5 % Pferdeserum in 0,1 % PBT-X verdünnten sekundären anti-Ratte-Antikörpers pro Objektträger inkubiert. Die Schnitte wurden dann zweimal 10 min mit 0,1 % PBT-X gewaschen und für 1 h bei RT mit 500 µl 10 % Pferdeserum in 0,1 % PBT-X geblockt. Über Nacht folgte bei 4 °C die Inkubation mit jeweils zwei weiteren primären Antikörpern (Sox2 und NeuN oder Tbr2 und NeuroD oder Calbindin und NeuN) in je 200 µl 5 % Pferdeserum in 0,1 % PBT-X pro Objektträger.

Am dritten Tag wurden die Schnitte zweimal 10 min in PBT-X auf dem Schüttler bei RT gewaschen und anschließend für eine Stunde bei RT mit 200 µl des sekundären Antikörpers in 5 % Pferdeserum in 0,1 % PBT-X pro Objektträger inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 % PBT-X für 5 min auf dem Schüttler wurden die Schnitte bei RT leicht getrocknet und mit Immu Mount (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) eingedeckelt.

Bei den immunhistochemischen Färbungen gegen Bcl11b und die Progenitorzellmarker Sox2 und Tbr2 ohne BrdU wurden die Schnitte nach dem Trocknen und Umranden mit Liquid Blocker am ersten Tag zweimal 10 min mit 0,1 % PBT-X gewaschen, dann geblockt und wie am Tag zwei der Dreifachfärbung über Nacht bei 4 °C mit den primären Antikörpern (Bcl11b und Sox2, Bcl11b und Tbr2) inkubiert.

Das Vorgehen am zweiten Tag entspricht dem dritten Tag der Dreifachfärbung.

2.2.6.4 TUNEL

Die Detektion von Apoptose erfolgte auf Gefriergewebeschnitten mit dem Apop Tag Fluorescein *In Situ* Apoptosis Detection Kit S7110 (Chemicon International, Temecula, CA). Die Grundlage dieser Methode ist eine TUNEL[TdT(terminal desoxynucleotidyl transferase)-mediated dUTP(Desoxyuridintriphosphat)-biotin nick end labelling]-Färbung (Gavrieli et al. 1992), bei der freie 3'-OH-Termini, die bei der Fragmentierung der DNS während der Apoptose entstehen, mit modifizierten Nukleotiden enzymatisch nachgewiesen werden. Normale oder proliferierende Zellen werden durch das Kit nicht angefärbt, da in diesen Zellkernen kaum freie 3'-OH-Enden vorliegen. Zur besseren Orientierung auf den Gefriergewebeschnitten wurden die Zellkerne mit DAPI (4', 6-Diamidin-2-phenylindol), einem fluoreszierendem Farbstoff, der mit AT(Adenin/Thymidin)-reichen Regionen der DNS interkaliert (Kapusinski 1995), gegengefärbt.

Die Gefriergewebeschnitte wurden mit 0,1 % Triton und 0,1 % Zitrat in PBS bedeckt und in einer feuchten Kammer für 15 min bei RT inkubiert, wodurch die Zellen permeabilisiert wurden. Nach zweimaligem Waschen für 5 min in PBS wurden die Schnitte in einer vorgekühlten Mischung aus Ethanol und Essigsäure im Verhältnis 2:1 für 5 min bei -20 °C nachfixiert. Anschließend wurden die Objektträger zweimal 5 min in PBS gewaschen. Nach vorsichtigem Abschütteln des PBS von den Objektträgern wurden sofort 75 µl Äquilibriumspuffer pro Objektträger direkt auf die Schnitte aufgebracht. Nach mindestens 10 sec Inkubation bei RT wurde der Äquilibriumspuffer wieder abgenommen und pro Objektträger je 100 µl TdT-Enzym in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration (70 % Reaktionspuffer und 30 % TdT-Enzym) auf die Schnitte aufgetragen und diese in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 1 h inkubiert. Danach wurden die Gefriergewebeschnitte in der vom Hersteller angegebenen Konzentration Stoppen/Waschen-Puffer (3 % Stoppen/Waschen Puffer in H₂O) für 15 sec geschwenkt und für weitere 10 min bei RT stehen gelassen. Es folgten drei einminütige Waschgänge in PBS. Daraufhin wurden 100 µl raumtemperiertes Anti-Digoxigenin-Konjugat (57 % in Blockierungslösung) pro Objektträger auf die Schnitte aufgebracht und diese für 30 min bei RT in einer dunklen Kammer inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen in PBS für je 2 min folgte die Inkubation mit DAPI in PBS im Verhältnis 1:1000 für 7 min bei RT. Schließlich wurden die Objektträger dreimal 2 min in PBS gewaschen, bei RT so weit getrocknet, dass die Schnitte noch feucht waren, und mit Immu Mount und Deckgläschen eingedeckelt.

2.2.7 Datenanalyse

2.2.7.1 Dokumentation histologischer Daten

Die Dokumentation der Körnerzellzahl, der BrdU-positiven Zellen, der Progenitorzellen, der apoptotischen Zellen sowie der Fläche des Gyrus dentatus erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Leica CTR 6000 (Leica Microsystems, Heerbrugg). Es war ausgestattet mit der Leica DFC425 C Kamera mit einer Apertur von 1,5 und der Leica Application Suite V3 Software. Die Kolokalisation der Zwei- und Dreifachfärbungen wurde am konfokalen Leica Mikroskop SP5 und mit der Leica Application Suite Software bestimmt. Das Konfokalmikroskop ermöglicht es, optisch mikroskopische Schnitte mit hoher Auflösung in dreidimensionalen Strukturen, z. B. in Gewebeschnitten, zu erzeugen. Von den relevanten Zellen wurden z-Stapel mit einer optischen Dicke von 4–6 µm mit einem 63-x-Öl-Immersions-Objektiv aufgenommen. Der Abstand der einzelnen optisch erzeugten mikroskopischen Schnitte betrug dabei jeweils etwa 1 µm in der z-Ebene. Eine Kolokalisation wurde angenommen, wenn Fluoreszenz in mehreren z-Ebenen der gleichen Zelle in zwei oder drei Kanälen in vorhanden war. In Adobe Photoshop CS2 Vers. 9.0 (Adobe, München) wurden lediglich Helligkeit und Kontrast angepasst und Ausschnitte der generierten Bilder zu den dargestellten Abbildungen zusammengefügt.

2.2.7.2 Quantifizierung der Zellzahl und der Fläche des Gyrus dentatus

Für die Quantifizierung der Zellzahlen und der Fläche des Gyrus dentatus wurden Schnitte durch den Gyrus dentatus jedes Tiers, die jeweils auf einer ähnlichen Höhe der frontalen Ebenen verlaufen benötigt. Die Vibratom- und Gefriergewebeschnitte wurden mit dem Allen Brain Atlas (Seattle (WA): Allen Institute for Brain Science) verglichen und es wurden für Kontrollen und Mutanten vergleichbare Schnitte des rostralen, medialen und kaudalen Anteils des Gyrus dentatus ausgewählt. Es wurden jeweils mindestens drei Kontrollen und drei Mutanten ausgewertet.

Bei je drei der kresylviolettgefärbten Methacrylatschnitte pro Tier wurde mit dem 5-x-Objektiv eine Übersicht des Hippocampus aufgenommen und die Fläche des Gyrus dentatus mit ImageJ (ImageJ 1.43r, National Institute of Health, USA) ausgemessen. In die Messung ging die Fläche des Hilus, der Körnerzell- und der Molekularschicht ein. Mit dem 20-x-Objektiv wurde auf je drei Schnitten pro Kontrolle bzw. Mutante in fünf bis sieben Einzelaufnahmen des Gyrus dentatus eine Ansicht des Körnerzellbandes erfasst. Diese Aufnahmen wurden anschließend mit Adobe Photoshop 9.0 zu einem Bild

zusammengefügt und mit dem ImageJ Cell Counter wurden die Körnerzellen ausgezählt. Das Körnerzellband wurde unterteilt in dorsales und ventrales Blatt, was dem supra- bzw. infrapyramidalen Gyrus dentatus entspricht. Anschließend wurden die Körnerzellzahlen pro Schnitt der Kontroll- und mutanten Tiere vergleichend analysiert.

Die BrdU-positiven Zellen wurden an je zwölf Vibratomschnitten ausgezählt. Dies entspricht etwa jedem sechsten Schnitt der rostrocaudalen Ausdehnung des Gyrus dentatus. Es wurden eine Subgranular- und eine Granularzellschicht unterschieden. Die Subgranularschicht wurde definiert als eine Zone von der Breite zweier Nuclei zwischen Granularschicht und Hilus (Kempermann et al. 2003).

Die Progenitorzellzahl wurde auf je drei Gefriergewebeschnitten pro Tier entlang der rostrocaudalen Ausdehnung des Gyrus dentatus bestimmt. Es wurden alle Tbr2- und Sox2-positiven Zellen gezählt, die sich in der Subgranularschicht und in der inneren Körnerzellschicht befanden (Kempermann et al. 2003).

Die Quantifizierung der apoptotischen Zellen erfolgte auf je drei Objektträgern mit je acht Schnitten pro Tier. Der Abstand zwischen den Schnitten auf einem Objektträger betrug je 80 μm .

Für die quantitative Analyse der Kolo-kalisation von BrdU mit den neuronalen Markern Sox2, NeuN, Tbr2, NeuroD und Calbindin wurden bei je drei Kontrollen und Mutanten mindestens 30 BrdU-positive Zellen pro Tier unter dem konfokalen Mikroskop ausgewählt und hinsichtlich der Immunreaktivität mit den entsprechenden Markern untersucht.

Die Kolo-kalisation der Progenitorzellmarker mit Bcl11b wurde in je 30 Tbr2- bzw. Sox2-positiven Zellen in drei Kontrolltieren untersucht.

2.2.7.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Darstellung von Zellzahlen und -proportionen erfolgte mit Excel Vers. 11.2 (Microsoft, Unterschleißheim). Die Signifikanz der Daten wurde mit dem t-Test für eine zweiseitige Verteilung und eine ungleiche Varianz zweier Proben berechnet, wobei ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant angenommen wurde.

3. Ergebnisse

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Britsch konnte bereits gezeigt werden, dass Bcl11b eine essentielle Rolle bei der postnatalen Entwicklung des Hippokampus spielt (Simon et al. 2012). Bcl11b wird in allen postmitotischen Körnerzellen, auch im adulten Gyrus dentatus exprimiert. Die Subgranularschicht des Gyrus dentatus stellt eine neurogene Nische dar, in der zeitlebens Neurogenese stattfindet. Im Rahmen dieser Arbeit habe ich die Funktionen des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Bcl11b während der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus untersucht. Mit Hilfe histologischer Methoden wurde der Phänotyp adulter Mäuse mit einer vorderhirnspezifischen Mutation von Bcl11b charakterisiert und die Neurogenese und Differenzierung der neu entstandenen Nervenzellen genauer untersucht.

3.1 Bcl11b-Expression und konditionelle Mutagenese des Bcl11b-Gens im adulten Gyrus dentatus der Maus

Das Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss von Bcl11b auf die adulte Neurogenese im Gyrus dentatus der Maus zu beschreiben. In einem ersten Schritt musste dabei die Expression von Bcl11b im Gyrus dentatus adulter Mäuse nachgewiesen werden. Dies erfolgte an Vibratomschnitten des Gyrus dentatus sechs Monate alter Mäuse mit Hilfe eines Antikörpers gegen das Bcl11b-Protein, welcher spezifisch die Aminosäuren 462–634, die sich downstream der Zinkfinger motive befinden, bindet (siehe 2.1.4). Der Antikörper wurde durch Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Immunreaktivität ist in der gesamten Körnerzellschicht sowie vereinzelt in Zellen der Molekularschicht, nicht jedoch im Hilus, des Gyrus dentatus vorhanden (Abb. 5A).

Um die *Emx-1Cre* induzierte Deletion der Bcl11b flox Allele in den $Bcl11b^{flox/flox}; Emx-1 Cre$ -Mäusen zu überprüfen (siehe 2.2.1 und 2.2.2), analysierte ich die Bcl11b-Proteinexpression im Gyrus dentatus sechs Monate alter Mutanten mit dem oben beschriebenen Bcl11b-Antikörper. In der Mutante ist kein Signal in der Körnerzellschicht, im Hilus und in der Molekularschicht detektierbar (Abb. 5B).

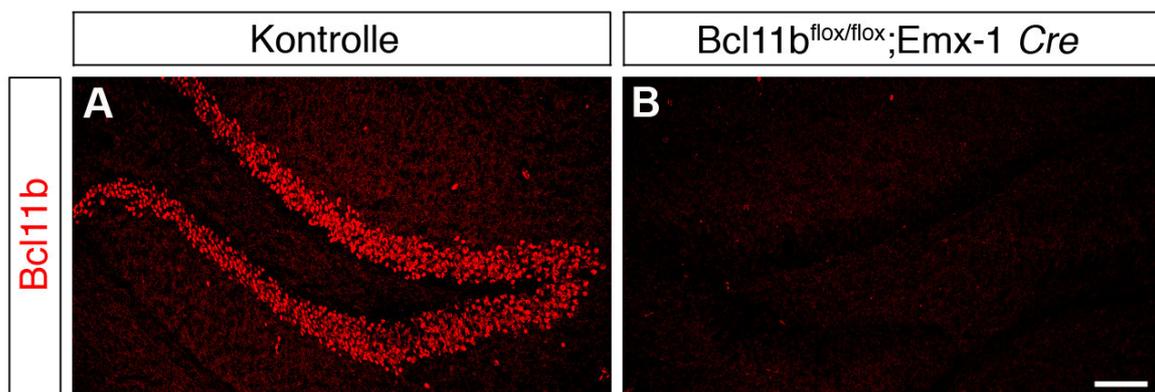


Abb. 5: Bcl11b-Expression und konditionelle Mutation im Gyrus dentatus

Immunhistochemische Färbung gegen Bcl11b (B-cell leukemia 11b) auf Gefriergewebeschnitten sechs Monate alter Kontrolltiere und konditioneller Bcl11b-Mutanten (Messbalken in B: 75 μ m). **A:** In den Kontrolltieren ist das Bcl11b-Protein in den Körnerzellen des Gyrus dentatus und einzelnen Zellen der Molekularschicht nachweisbar. **B:** In den Mutanten liegt im Gyrus dentatus keine Immunreaktivität gegen das Bcl11b-Protein vor. *Emx-1*: Empty spiracles homeobox 1; *Cre*: Causes recombination;

3.2 Morphologische Analyse des Gyrus dentatus adulter konditioneller

Bcl11b-Mutanten

Den Phänotyp der Bcl11b-Mutation habe ich histologisch anhand kresylviolettgefärbter Plastikschnitte des rostralen, medialen und kaudalen Anteils des Gyrus dentatus sechs Monate alter Kontrolltiere und Mutanten bestimmt (*Abb. 6A-H*). Es wurden je drei Schnitte pro Tier ausgewertet.

Die Fläche ist in den Mutanten reduziert verglichen mit gleich alten Kontrolltieren (*Abb. 6A, B, G*). Die Quantifizierung des Größenunterschieds ergab eine signifikante Flächenreduktion des Gyrus dentatus der Mutante um 50 % ($p < 0,005$).

Bei der Erhebung der Körnerzellzahl wurde in dorsales und ventrales Blatt des Gyrus dentatus unterschieden. Die Mittelwerte pro Schnitt betragen im ventralen Blatt in den mutanten Tieren 226 ± 27 Zellen, bei den Kontrolltieren waren es durchschnittlich 607 ± 47 Zellen (*Abb. 6E, F, H*). Die Reduktion der Körnerzellzahl im ventralen Blatt der mutanten Tiere ist hochsignifikant ($p < 0,0001$). Auch im dorsalen Blatt ließen sich weniger Körnerzellen nachweisen. Die Mittelwerte betragen 505 ± 75 Zellen in der Mutante und 719 ± 152 Zellen in der Kontrolle, der Unterschied ist hier jedoch nicht statistisch signifikant ($p < 0,1$; *Abb. 6C, D, H*). Werden ventrales und dorsales Blatt zusammen betrachtet, ergibt sich eine signifikante Reduktion der Körnerzellzahl um 45 % ($p < 0,01$) in den Bcl11b-mutanten Tieren (*Abb. 6H*).

Es stellte sich nun die Frage, wodurch die Reduktion der Fläche des Gyrus dentatus und der Körnerzellzahl bedingt ist. In Betracht zu ziehen waren unter anderem eine Veränderung der Anzahl oder der Proliferationsrate der Progenitorzellen sowie eine Steigerung der Apoptose im Gyrus dentatus. Diese Möglichkeiten habe ich im Folgenden untersucht.

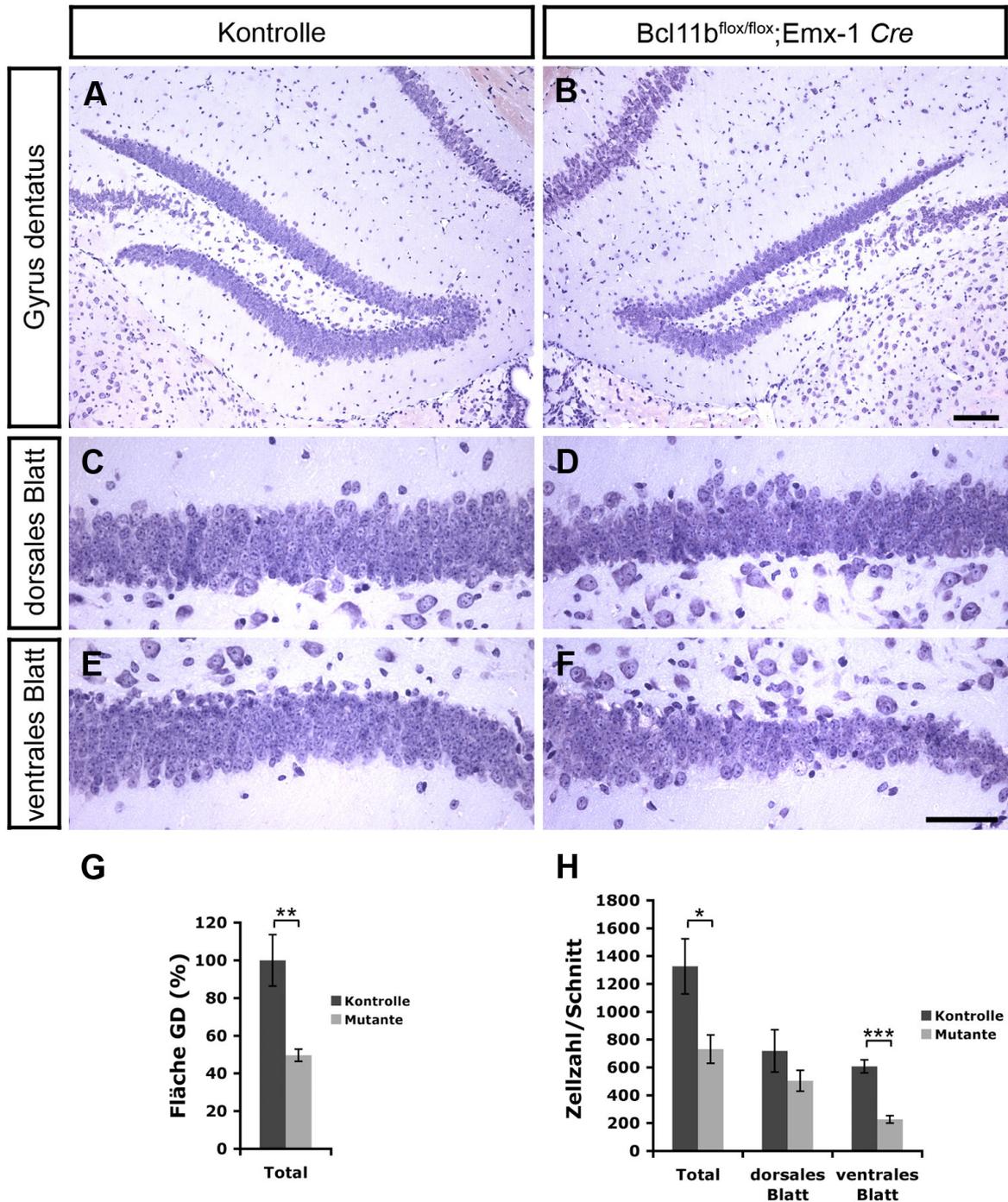


Abb. 6: Analyse der Körnerzellzahl und Fläche des Gyrus dentatus

A-F: Kresylviolett-färbung auf koronaren Hippocampus-schnitten sechs Monate alter Kontrolltiere und *Bcl11b*(B-cell leukemia 11b)-Mutanten (Messbalken in B: 100 μ m, Messbalken in F: 25 μ m). **A, B, H:** In den Mutanten ist die Fläche des Gyrus dentatus (GD) um 50 % reduziert (**, $p < 0,005$; $n_{\text{Mutante}} = 3$, $n_{\text{Kontrolle}} = 4$). **C, D, E, F:** Ausschnitt aus dem dorsalen und ventralen Blatt der Körnerzellschicht; **G:** Die Körnerzellzahl ist in der Mutante um 40 % reduziert. Der Unterschied ist im ventralen Blatt stärker ausgeprägt als im dorsalen Blatt (*, $p < 0,01$; ***, $p < 0,0001$; $n_{\text{Mutante}} = 3$, $n_{\text{Kontrolle}} = 4$). *Emx-1*: Empty spiracles homeobox 1; *Cre*: Causes recombination;

3.3 Quantitative Analyse proliferierender Zellen im adulten Gyrus dentatus

Die quantitative Analyse der proliferierenden Zellen in der neurogenen Nische des adulten Gyrus dentatus erfolgte mit Hilfe von BrdU pulse labelling (siehe 2.2.4). Bei BrdU handelt es sich um ein Thymidin-Analogon, das in die DNS sich teilender Zellen integriert wird. Der Einbau wird durch einen BrdU-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Die sechs Monate alten Tiere wurden an drei aufeinander folgenden Tagen je einmal mit BrdU intraperitoneal injiziert und zu zwei verschiedenen Zeitpunkten präpariert: vier Tage nach der ersten BrdU Injektion (6m 4d) oder 28 Tage nach der ersten BrdU Injektion (6m 28d). Die Auswertung erfolgte an jedem sechsten Schnitt der rostrokaudalen Ausdehnung des Hippokampus.

Um den Effekt von *Bcl11b* auf die Proliferation der Progenitorzellen in der neurogenen Nische sechs Monate alter Tiere beurteilen zu können, wurden die Tiere am Tag nach der dritten BrdU-Injektion präpariert (6m 4d). Die BrdU positiven Zellen repräsentieren dabei Zellen, die sich vor 24 bis 72 Stunden geteilt und BrdU in ihre DNS integriert haben sowie deren Tochterzellen.

In der Mutante befanden sich zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich 18 % ($p < 0,05$) weniger BrdU-positive Zellen als in den Kontrolltieren (Mittelwerte BrdU-positiver Zellen pro 40 μm dickem Vibratomschnitt: $15,9 \pm 1,3$ Zellen in der Kontrolle und $13,1 \pm 0,1$ Zellen in der Mutante; *Abb. 7A, B, G*).

In den Kontrolltieren waren etwa 85 % der BrdU-positiven Zellen in der Subgranularschicht, die restlichen 15 % in der Granularschicht. In den mutanten Tieren war mit etwa 70 % ein signifikant kleinerer Anteil der BrdU-positiven Zellen in der Subgranularschicht vorhanden ($p < 0,005$). 30 % der BrdU-positiven Zellen befanden sich in der Mutante in der Granularschicht (*Abb. 7E*).

Die Reduktion der BrdU-positiven Zellen in den *Bcl11b*-Mutanten in diesen frühen Proliferationsstadien könnte zum einen auf einen kleineren Progenitorzellpool zurückzuführen sein, zum anderen auf eine verminderte Teilungsrate der Vorläuferzellen.

Als nächstes wurden BrdU-positive Zellen 28 Tage nach der ersten BrdU-Injektion analysiert (6m 28d). Hierdurch können Zellen detektiert werden, die sich zum Zeitpunkt der Injektion geteilt hatten und vier Wochen überlebt haben. Die BrdU-positiven Zellen sind 26 bis 28 Tage alt oder entsprechen später entstandenen Tochterzellen.

Es wurden ca. 40 % ($p < 0,05$) weniger BrdU-positive Zellen in Bcl11b-Mutanten nachgewiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Mittelwerte betragen pro 40 μm dickem Vibratomschnitt in der Kontrolle $4,4 \pm 1,0$ gegenüber $2,7 \pm 0,3$ BrdU-positiven Zellen in der Mutante (*Abb. 7C, D, G*).

Am Untersuchungstag 28 war kein signifikanter Unterschied der Verteilung der BrdU-positiven Zellen in die Subgranular- und Granularschicht zwischen Kontrolle und Mutante zu beobachten (*Abb. 7F*).

In den Kontrolltieren wurden am Tag vier durchschnittlich $15,9 \pm 1,3$ BrdU-positive Zellen pro Schnitt nachgewiesen, im Vergleich zu $4,4 \pm 1,0$ BrdU-positiven Zellen pro Schnitt am Tag 28. Dies entspricht einer Abnahme von 72 % BrdU-positiver Zellen von Tag vier zu Tag 28 in den Kontrolltieren. In den mutanten Tieren ist eine Abnahme der BrdU-positiven Zellen um 79 % zu verzeichnen. Es konnten am Tag vier im Durchschnitt $13,1 \pm 0,1$ BrdU positive Zellen pro Schnitt nachgewiesen werden, im Vergleich zu $2,7 \pm 0,3$ BrdU positiven Zellen pro Schnitt am Tag 28 (*Abb. 7G*).

Die reduzierte Zahl an BrdU-positiven Zellen am Tag 28 könnte – wie auch am Tag vier – entweder auf eine geringere Anzahl an Progenitorzellen oder auf eine geringere Teilungsrate derselben zurückzuführen sein. Desweiteren ist eine erhöhte Apoptoserate der Progenitor- und/oder neu entstandenen Nervenzellen in Betracht zu ziehen. Diese Möglichkeiten wurden daher als nächstes untersucht.

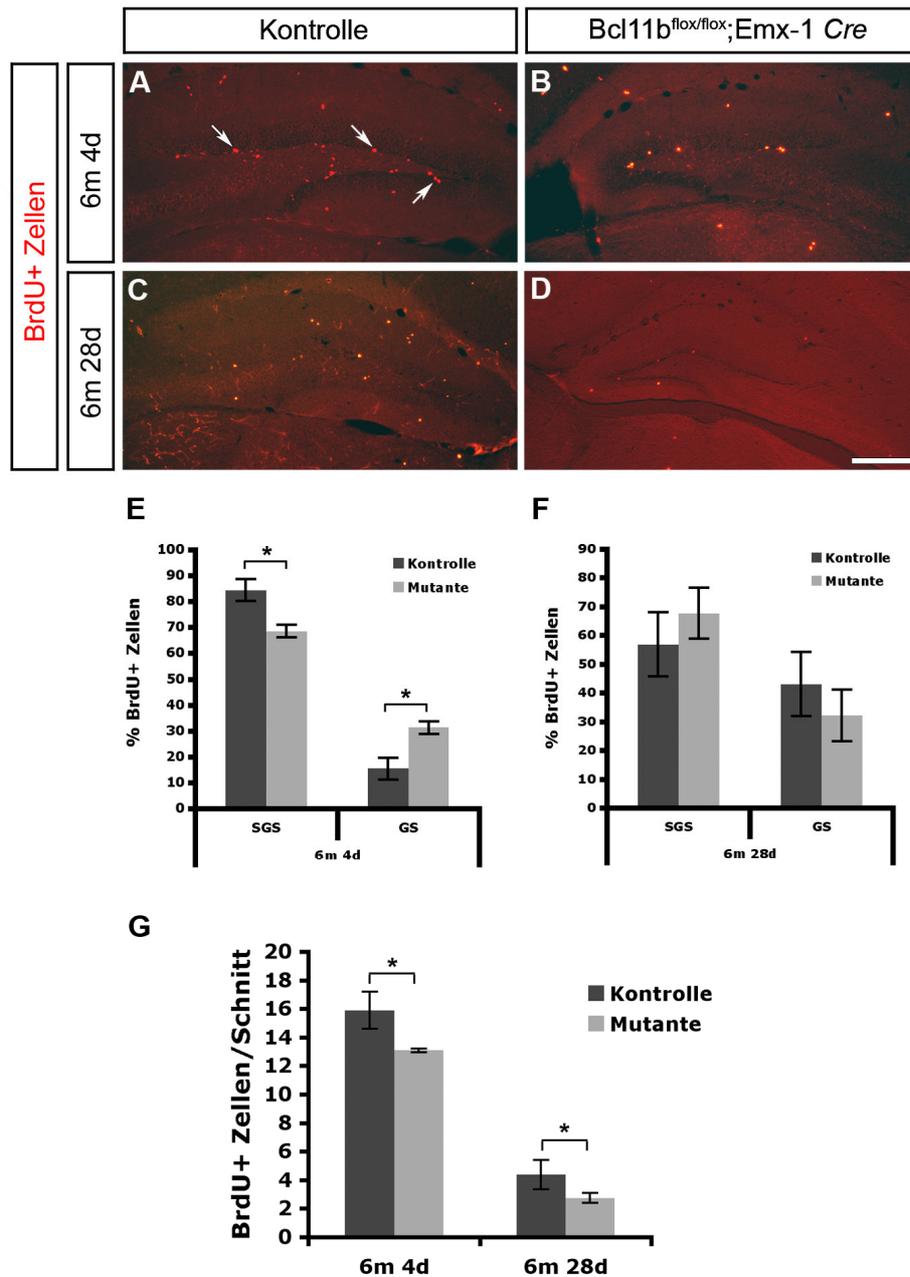


Abb. 7: Proliferation im Gyrus dentatus sechs Monate alter Mäuse

A-D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen koronarer Schnitte durch den Hippocampus sechs Monate alter, mit BrdU (2-Bromo-5-desoxyuridin) injizierter Kontrolltiere und konditioneller *Bcl11b*(B-cell leukemia 11b)-Mutanten (Messbalken in D: 150 μ m). **A, B, E:** Vier Tage nach der ersten BrdU-Injektion zeigt sich eine Umverteilung der BrdU-positiven Zellen von der Subgranularschicht in die Granularschicht in der Mutante (*, $p < 0,005$; $n_{\text{Kontrolle}} = 4$, $n_{\text{Mutante}} = 3$). **C, D, F:** Am Tag 28 ist diese Umverteilung nicht mehr vorhanden ($n_{\text{Kontrolle}} = 3$, $n_{\text{Mutante}} = 4$). **G:** Die Zahl der BrdU-positiven Zellen ist sowohl am Tag 4 als auch am Tag 28 in der Mutante signifikant reduziert (*, $p < 0,05$). 6m 4d: sechs Monate alte Mäuse, die vier Tage nach der ersten BrdU-Injektion präpariert wurden. 6m 28d: sechs Monate alte Mäuse, die 28 Tage nach der ersten BrdU-Injektion präpariert wurden. *Emx-1*: Empty spiracles homeobox 1; *Cre*: Causes recombination;

3.4 Quantitative Analyse apoptotischer Zellen im adulten Gyrus dentatus

Zur Bestimmung apoptotischer Zellen im Gyrus dentatus wurden TUNEL Assays durchgeführt. Zur besseren Orientierung auf den Gefriergewebeschnitten wurden die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt. In den sechs Monate alten Tieren fanden sich pro Schnitt nur bis zu drei apoptotische Zellen in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (Abb. 8). Dabei konnte kein Unterschied in der Anzahl der TUNEL-positiven Zellen zwischen den Kontrolltieren ($1,26 \pm 0,17$ TUNEL+ Zellen) und den mutanten Tieren ($1,24 \pm 0,41$ TUNEL+ Zellen) beobachtet werden.

Dies deutet darauf hin, dass Bcl11b bei Mäusen im Alter von sechs Monaten keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptose der Körnerzellen im Gyrus dentatus ausübt. Es stellte sich weiterhin die Frage, welcher Mechanismus für die Flächen- und Körnerzellreduktion und die geringere Anzahl an BrdU-positiven Zellen verantwortlich ist.

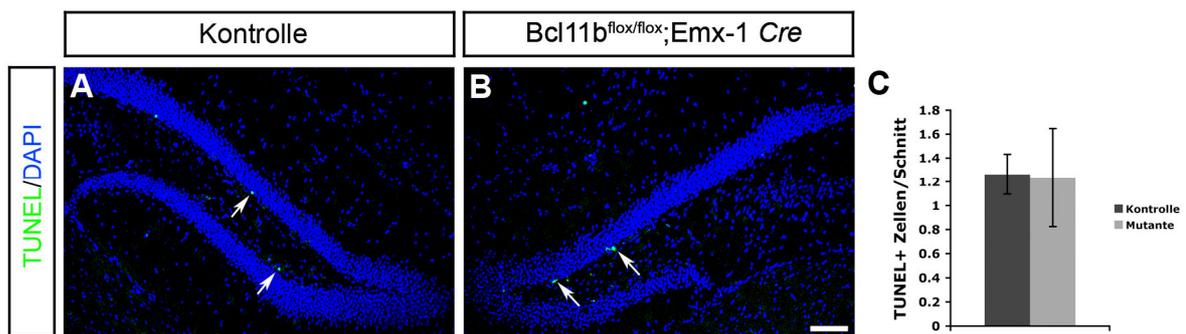


Abb. 8: Detektion apoptotischer Zellen

A, B: TUNEL[TdT(terminal desoxynucleotidyl transferase)-mediated dUTP(Desoxyuridintriphosphat)-biotin nick end labelling]- und DAPI(4',6-Diamidin-2-phenylindol)-Färbung auf koronaren Schnitten durch den kranialen Anteil des Gyrus dentatus (Messbalken in B: 75 μ m). **C:** Graphische Darstellung der Anzahl apoptotischer Zellen in Kontrolle und Mutante (n = 3). Bcl11b: B-cell leukemia 11b; Emx-1: Empty spiracles homeobox 1; Cre: Causes recombination;

3.5 Quantitative Analyse der Progenitorzellzahl im adulten Gyrus dentatus

Für die Analyse der Progenitorzellen in der neurogenen Nische des adulten Gyrus dentatus wurden immunhistologische Färbungen auf Gefriergewebeschnitten gegen das Sox2- und das Tbr2-Protein angefertigt. Die Quantifizierung der Sox2- bzw. Tbr2-positiven Zellen erfolgte auf je drei Gefriergewebeschnitten pro Kontrolle bzw. Mutante (*Abb. 10*).

Die Auswertung der absoluten Zahlen der Sox2- und Tbr2-positiven Zellen, die sich in der Subgranularschicht und inneren Körnerzellschicht befanden, ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und Mutante. Die Mittelwerte waren im Einzelnen 31 ± 6 Sox2-positive Zellen pro Schnitt in der Kontrolle und 28 ± 5 Sox2-positive Zellen in der Mutante ($p < 0,5$; *Abb. 10C-E*). Tbr2-positive Zellen fanden sich im Durchschnitt 7 ± 2 in der Kontrolle und 6 ± 2 in der Mutante ($p < 1$; *Abb. 10 A, B, F*).

Während sich bei der Gesamtzahl Sox2-positiver Zellen kein Unterschied zwischen Kontrolle und Mutante nachweisen ließ, zeigte sich ein verändertes Verteilungsmuster der Sox2-positiven Zellen in Subgranular- und Granularschicht. In der Mutante waren im Vergleich zur Kontrolle signifikant mehr Sox2-positive Zellen in der inneren Granularschicht (GS) zu finden (Sox2-positive Zellen pro Schnitt in der GS: Kontrolle: $5 \pm 0,5$, Mutante: 7 ± 2 , $p < 0,01$). In der Subgranularschicht dagegen befanden sich in der Mutante im Vergleich zur Kontrolle tendenziell weniger Sox2-positive Zellen (Sox2-positive Zellen in der SGS: Kontrolle: 26 ± 5 , Mutante: 21 ± 4 , $p < 0,1$; *Abb. 10E*). In Relation zur Gesamtzahl der Sox2-positiven Zellen in Kontrolle und Mutante befanden sich in den Bcl11b-mutanten Tieren ca. 10 % ($p < 0,0001$) mehr Sox2-positive Zellen in der Granularschicht. Es wäre möglich, dass die neurogene Nische in der Bcl11b-Mutante nicht klar beschränkt ist auf die Subgranularzone oder dass unreife Zellen bereits in die Granularschicht migrieren. Ebenso ist es möglich, dass die sich differenzierenden Zellen zwar das normale Migrationsprogramm durchlaufen, aber der Differenzierungsprozess verzögert ist und sich deshalb vermehrt unreife Zellen im Gyrus dentatus ansammeln. Da die Zahl der Progenitorzellen in adulten Mäusen unverändert ist, könnte ebenfalls eine Reduktion der Teilungsrate vorliegen.

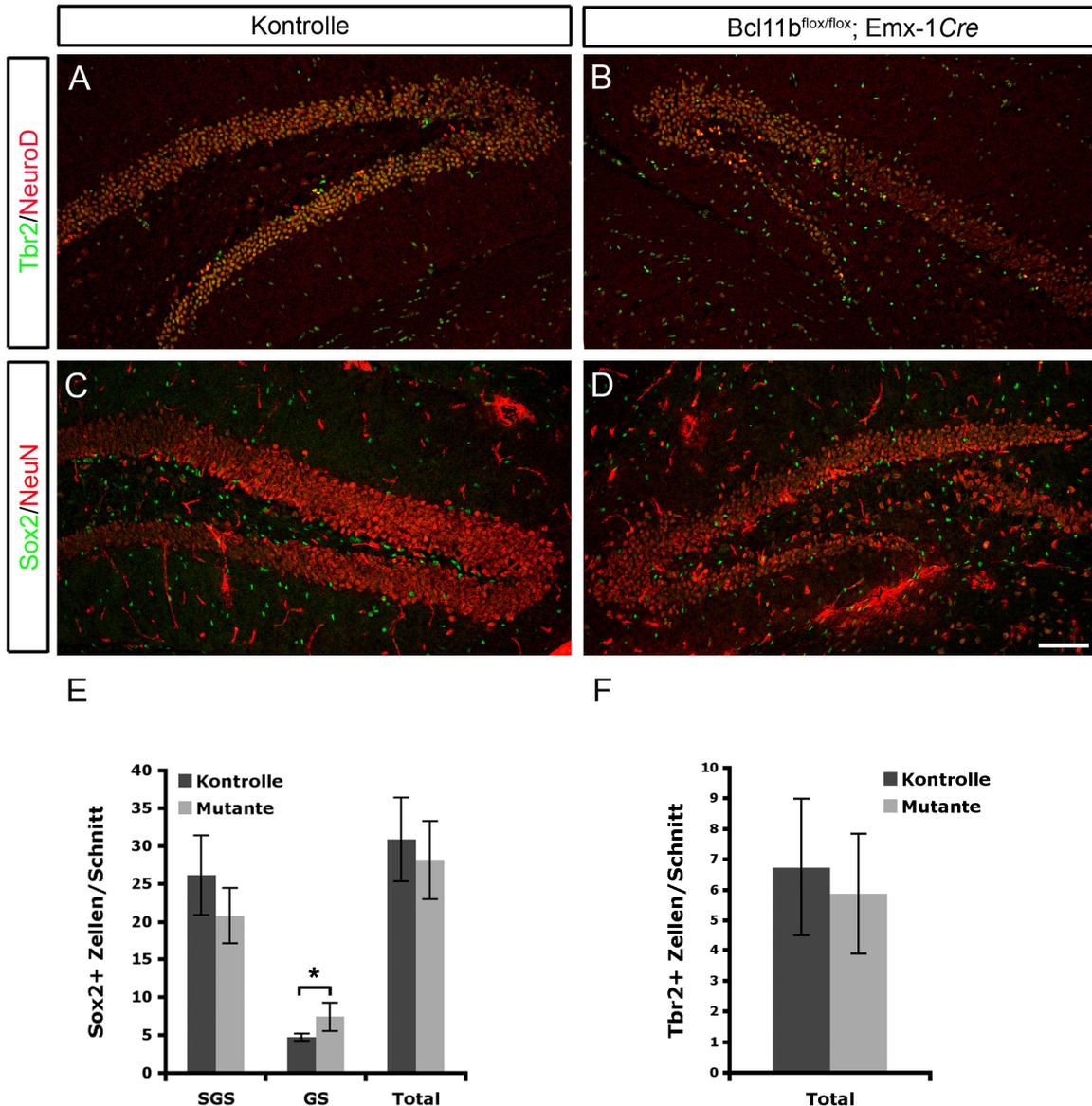


Abb. 9: Detektion Sox2- und Tbr2-positiver Zellen im Gyrus dentatus sechs Monate alter Kontrolltiere und Mutanten

A-D: Immunhistologische Färbungen koronarer Schnitte durch den Gyrus dentatus sechs Monate alter Kontrolltiere und *Bcl11b*(B-cell leukemia 11b)-Mutanten (Messbalken in D: 75 μ m). **A, B, F:** Kofärbung mit Tbr2 (T-box brain 2; grün) und NeuroD (Neurogenic differentiation factor 1; rot); es zeigt sich kein Unterschied in der Anzahl Tbr2-positiver Zellen zwischen Kontrolle und Mutante ($n = 5$). **C, D, E:** Kofärbung mit Sox2 (Sex determining region of Y-box; grün) und NeuN (Neuronal nuclei; rot); es besteht kein Unterschied in der Anzahl der Sox2-positiven Zellen zwischen Kontrolle und Mutante. Es sind in der Mutante signifikant mehr Sox2-positive Zellen in der Granularschicht (GS) zu finden als in der Kontrolle (*, $p < 0,01$; $n = 6$). In der Mutante ist die Zahl der Sox2-positiven Zellen in der Subgranularschicht (SGS) geringer als in der Kontrolle. Total: SGS und GS zusammen, *Emx-1*: Empty spiracles homeobox 1, *Cre*: Causes recombination;

3.6 Koexpressionsanalyse von Bcl11b mit Markern für neuronale Progenitorzellen

Als nächstes wurde untersucht, ob der Einfluss von Bcl11b auf die Anzahl und Verteilung der Progenitorzellen auf einen direkten Effekt von Bcl11b zurückzuführen ist. Dafür wurde in den Kontrolltieren eine immunhistologische Koexpressionsanalyse von Bcl11b mit den neuronalen Progenitorzellmarkern Sox2 und Tbr2 durchgeführt. Es zeigte sich keine Überlappung der Expression von Bcl11b mit der Expression von Sox2 (Abb. 10B, D) oder Tbr2 (Abb. 10A, C) in den Körnerzellen des Gyrus dentatus. Diese Daten deuten darauf hin, dass Bcl11b nicht in den Progenitorzellen exprimiert wird und damit keinen direkten Einfluss auf die Progenitorzellen ausübt.

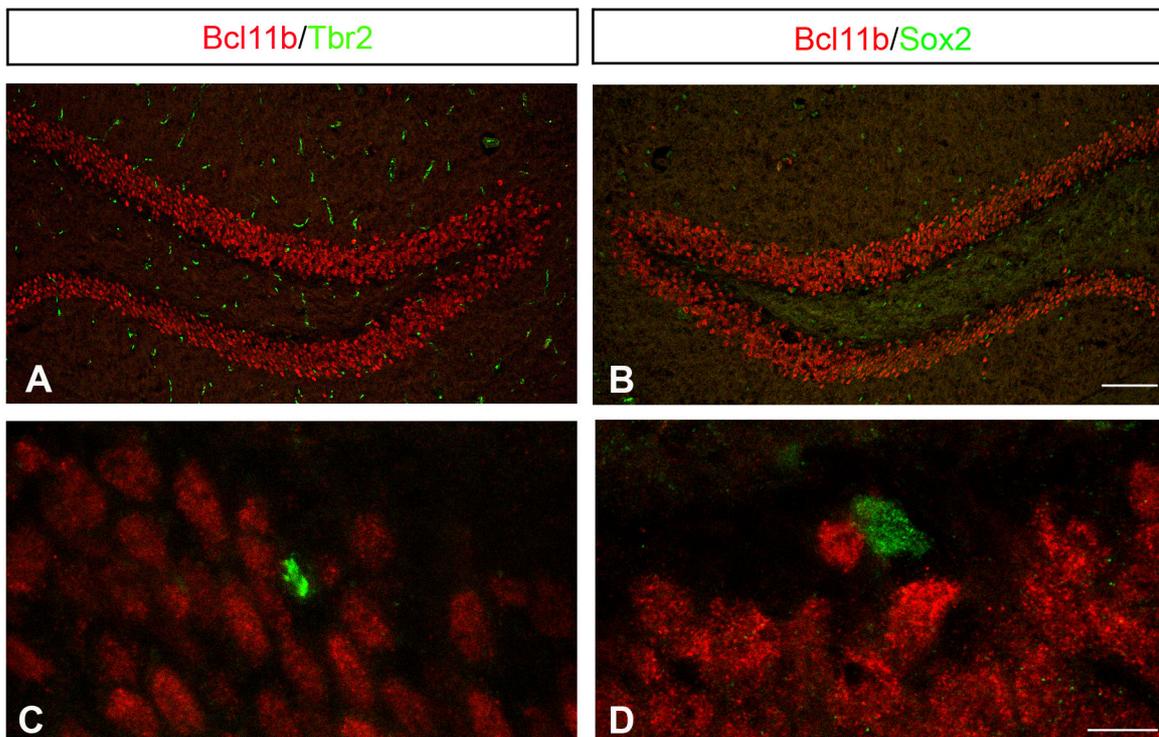


Abb. 10: Koexpressionsanalyse in sechs Monate alten Kontrolltieren von Bcl11b mit Progenitorzellmarkern

Immunhistologische Färbung des Gyrus dentatus sechs Monate alter Kontrolltiere (Messbalken in B: 75 μ m, Messbalken in D: 25 μ m). **A, C:** Übersicht und 63 x Vergrößerung der Körnerzellschicht mit einer Bcl11b(B-cell leukemia 11b, rot)- und Tbr2(T-box brain 2, grün)-Antikörper Färbung. Keine der Tbr2-positiven Zellen zeigt eine Koexpression mit Bcl11b. **B, D:** Auch die Sox2(Sex determining region of Y-box, grün)-positiven Zellen zeigen keine Koexpression mit Bcl11b.

3.7 Analyse des Differenzierungsverhaltens Bcl11b-mutanter, adult entstandener Körnerzellen

Die Reifung der adult entstandenen Nervenzellen wurde mithilfe einer Expressionsanalyse neuronaler Differenzierungsmarker in BrdU-positiven Zellen charakterisiert. Die Entstehung einer reifen Körnerzelle während der adulten Neurogenese dauert in etwa 28 Tage. In dieser Zeit entwickelt sich aus einer Stammzelle über mehrere mitotische Vorläuferstadien eine postmitotische unreife Körnerzelle und schließlich ein ausdifferenziertes Neuron. In jedem Stadium hat dieses Neuron ein typisches Markerprofil (*Abb. 11*; siehe 1.3.1). In dem folgenden Versuchsaufbau wurden sechs Monate alte Bcl11b-Mutanten und Kontrolltiere an drei aufeinander folgenden Tagen je einmal mit BrdU injiziert und am vierten bzw. 28. Tag nach der ersten Injektion präpariert. Anschließend wurde ein „fate mapping“ der BrdU-positiven Zellen, welche sich in unterschiedlichen Reifestadien befanden, vorgenommen. Dafür wurden auf Gefriergewebeschnitten des Gyrus dentatus je 30 bis 50 BrdU-positive Zellen pro Tier zufällig ausgewählt und deren Koexpression von Progenitorzell- und neuronalen Markern bestimmt.

Es wurden verschiedene immunhistologische Dreifach-Fluoreszenzfärbungen eingesetzt, um die folgenden Differenzierungsstadien zu unterscheiden (*Abb. 11*):

BrdU, Sox2 und NeuN (*Abb. 12A*):

- Stammzellen und Typ-2a- und 2b-Progenitorzellen (BrdU+/Sox2+)
- Typ-3-Progenitorzellen (BrdU+)
- postmitotische unreife und reife Körnerzellen (BrdU+/NeuN +).

BrdU, Tbr2 und NeuroD (*Abb. 12B*):

- Typ-2a-Progenitorzellen (BrdU+/Tbr2+)
- Typ-2b- und Typ-3-Progenitorzellen (BrdU+/Tbr2+/NeuroD+)
- unreife postmitotische Körnerzellen (BrdU+/NeuroD+)
- Stammzellen/reife Körnerzellen, was nicht unterschieden werden konnte (BrdU+)

BrdU, NeuN und Calbindin (*Abb. 12C*):

- Stamm- und Progenitorzellen (BrdU+)
- unreife postmitotische Körnerzellen (BrdU+/NeuN+)
- reife postmitotische Körnerzellen (BrdU+/NeuN+/Calbindin+)

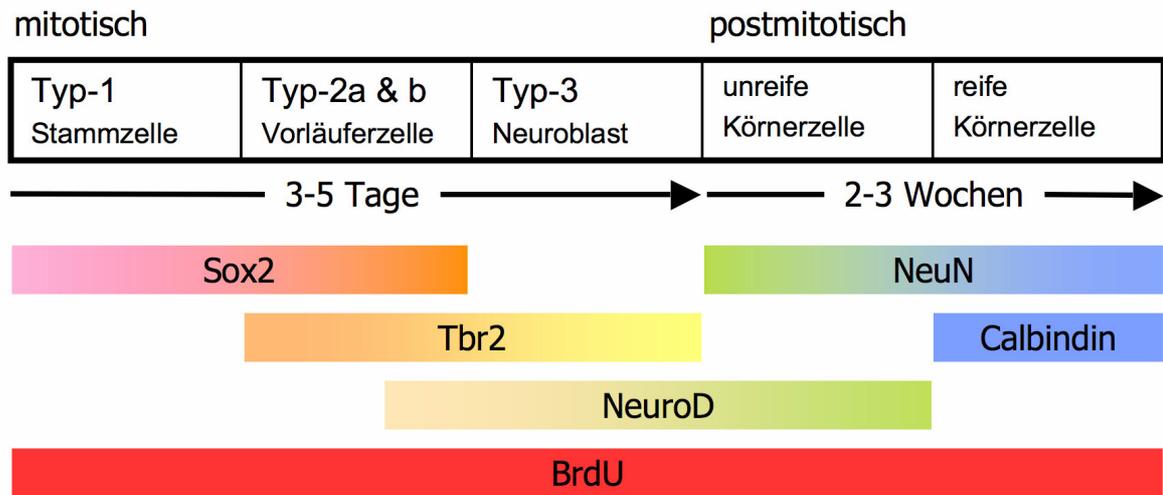


Abb. 11: Schematische Darstellung neuronaler Differenzierungsmarker

Die Entstehung einer reifen Körnerzelle durch adulte Neurogenese nimmt in etwa vier Wochen in Anspruch. In dieser Zeit entwickelt sich aus einer Stammzelle über mehrere proliferierende Vorläuferstadien ein ausdifferenziertes Neuron. Jedes Entwicklungsstadium ist durch ein spezifisches Markerprofil charakterisiert. BrdU (2-Bromo-5-desoxyuridin) wird in die DNS sich teilender Zellen integriert und markiert die durch adulte Neurogenese entstandenen Körnerzellen, welche im Laufe ihres Reifungsprozesses die folgenden neuronalen Marker exprimieren: Sox2: Sex determining region of Y-box 2 von der Typ-1-Stammzellen bis zur Typ-2b-Progenitorzelle; Tbr2: T-box brain 2 von der Typ-2a- bis zur Typ-3-Progenitorzelle; NeuroD: Neurogenic differentiation factor 1 ab der Typ-2b-Progenitorzelle bis zum postmitotischen unreifen Neuron; NeuN: Neuronal nuclei ab dem unreifen postmitotischen Stadium; Calbindin: in reifen Körnerzellen (siehe 1.3.1).

3.7.1 Analyse des Differenzierungsverhaltens BrdU-positiver Zellen am Tag vier

Zuerst wurde das Differenzierungsverhalten BrdU-positiver Zellen vier Tage nach der ersten BrdU-Injektion analysiert (*Abb. 12D – F*). Die BrdU-positiven Zellen hatten sich 24 bis 72 Stunden vor diesem Zeitpunkt geteilt und BrdU in ihre DNS integriert oder sind Tochterzellen dieser Zellen. Viele BrdU-positive Zellen befinden sich zu diesem Zeitpunkt noch in einem frühen Zustand der Differenzierung.

Die Koexpressionsanalyse mit BrdU, Tbr2 und NeuroD erlaubte die Unterscheidung vier verschiedener Markerkombinationen in Kontrolle (K) und Mutante (M). Der Anteil der BrdU- und NeuroD-positiven Zellen (unreife postmitotische Körnerzellen, K: $8 \pm 2 \%$, M: $1 \pm 1 \%$; $p < 0,01$) sowie der nur BrdU-positiven Zellen (Stammzellen/reife Körnerzellen, K: $39 \pm 1 \%$, M: $22 \pm 9 \%$; $p < 0,05$) an allen ausgewerteten BrdU-positiven Zellen war in der Mutante signifikant reduziert. Dagegen war der Anteil der BrdU-, Tbr2- und NeuroD-positiven Zellen (Typ-2b- und Typ-3-Progenitorzellen) signifikant erhöht (K: $23 \pm 4 \%$, M: $42 \pm 9 \%$; $p < 0,05$). Der Anteil der BrdU- und Tbr2-positiven Zellen (Typ-2a-Progenitorzellen) war in Kontrolle und Mutante in etwa gleich (K: $30 \pm 5 \%$, M: $35 \pm 13 \%$; $p < 1$; *Abb. 12B, E*). In dieser Kofärbung zeigte sich, dass in den Bcl11b-Mutanten im Vergleich zu den Kontrolltieren die Typ-2b- und Typ-3-Progenitorzellen einen signifikant größeren Anteil der BrdU-positiven Zellen ausmachten, postmitotische unreife BrdU-positive Zellen dagegen zu diesem Zeitpunkt kaum zu finden waren.

Die Koexpressionsanalyse postmitotischer neuronaler Differenzierungsmarker und die Unterscheidung in unreife und reife Körnerzellen wurde durchgeführt mit NeuN und Calbindin (*Abb. 12C*). Weder der Anteil der BrdU-positiven Zellen, die Calbindin- und NeuN- negativ waren (Stamm- und Progenitorzellen, K: $34 \pm 8 \%$, M: $49 \pm 15 \%$; $p < 0,5$) noch der Anteil der BrdU- und NeuN- positiven Zellen (unreife postmitotische Körnerzellen, K: $51 \pm 5 \%$; M: $42 \pm 11 \%$; $p < 0,5$) oder der BrdU-, NeuN- und Calbindin-positiven Zellen (reife postmitotische Körnerzellen, K: $15 \pm 3 \%$, M: $9 \pm 4 \%$; $p < 0,5$) an allen BrdU-positiven Zellen zeigte eine signifikante Veränderung zwischen Kontrolle und Mutante (*Abb. 12F*). Die BrdU-positiven Zellen entsprachen in der Mutante etwa zu gleichen Anteilen mitotischen Zellen und postmitotischen unreifen Körnerzellen. In der Kontrolle waren, im Vergleich mit der Mutante ohne statistische Signifikanz, mehr postmitotische Zellen zu beobachten.

Die letzte untersuchte Kofärbung bestand aus BrdU, Sox2 und NeuN (*Abb. 12A, D*). Die BrdU- und Sox2-positiven Zellen (Stammzellen/Typ-2a- und 2b-Progenitorzellen) hatten einen Anteil von $59 \pm 18 \%$ an allen ausgewerteten BrdU-positiven Zellen in der Kontrolle und von $65 \pm 16 \%$ in der Mutante ($p < 1,0$). Auch der Anteil der BrdU- und NeuN-positiven Zellen (postmitotische unreife und reife Körnerzellen, K: $25 \pm 16 \%$, M: $18 \pm 4 \%$, $p < 1,0$) sowie der BrdU-positiven Zellen, die keinen der beiden Marker exprimierten (Typ-3-Progenitorzellen, K: $17 \pm 2 \%$, M: $17 \pm 12 \%$, $p < 1,0$) war bei Kontrolle und Mutante ähnlich. Insgesamt ließ sich in dieser Koexpressionsanalyse kein Unterschied zwischen Kontrolle und Mutante bei den drei zu differenzierenden Untergruppen, Stammzellen/Typ-2a- und 2b-Progenitorzellen, Typ3-Progenitorzellen und postmitotischen Körnerzellen feststellen.

Zusammenfassend ließ sich in allen Koexpressionsanalysen in den *Bcl11b*-mutanten Tieren vier Tage nach der ersten BrdU-Injektion beobachten, dass der Anteil der mitotischen Progenitorzellen der 30–50 pro Tier ausgewerteten BrdU-positiven Zellen größer, der Anteil der postmitotischen Zellen dagegen kleiner war als in den Kontrolltieren.

3.7.2 Analyse des Differenzierungsverhaltens BrdU-positiver Zellen am Tag 28

Als Nächstes erfolgte die Analyse des Reifestadiums BrdU-positiver Zellen 28 Tage nach der ersten BrdU-Injektion. Die BrdU-positiven Zellen haben sich 26 bis 28 Tage vor der Präparation geteilt und BrdU in ihre DNS integriert oder sind Tochterzellen dieser Zellen (*Abb. 12G – I*). Die Entwicklung einer reifen Körnerzelle nimmt etwa 28 Tage in Anspruch (siehe 1.3.1). Daher kann erwartet werden, dass ein Großteil der BrdU-positiven Zellen bereits ausgereiften Körnerzellen entspricht.

Bei der Koexpressionsanalyse BrdU-positiver Zellen mit *Tbr2* und *NeuroD* war in der Mutante der Anteil BrdU- und *NeuroD*-positiver Zellen stark und signifikant erhöht (K: $1 \pm 2 \%$, M: $10 \pm 0 \%$; $p < 0,005$, *Abb. 12B, H*). Diese Zellen sind postmitotisch, aber noch nicht zu reifen Körnerzellen ausdifferenziert. Der Anteil der nur BrdU-positiven Zellen, die hier Stammzellen oder reife Körnerzellen darstellen, war signifikant reduziert (K: $94 \pm 2 \%$, M: $72 \pm 11 \%$; $p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle. Bei den Typ-2a-Progenitorzellen, welche hier durch BrdU-Zellen, die *Tbr2*-positiv waren, repräsentiert wurden, ergab sich kein signifikanter Unterschied (K: $4 \pm 2 \%$, M: $1 \pm 2 \%$; $p < 0,5$).

Typ-2b- und Typ-3-Progenitorzellen, dies waren die BrdU-positiven Zellen, die Tbr2 und NeuroD koexprimierten, konnten zu diesem Zeitpunkt nur in der Mutante gefunden werden (K: 0 ± 0 %, M: 17 ± 12 %; $p < 0,1$; *Abb. 12B, H*).

Die Koexpressionsanalyse der postmitotischen neuronalen Differenzierungsmarker NeuN und Calbindin in BrdU-positiven Zellen (*Abb. 12C*) ergab eine signifikante Zunahme des Anteils der BrdU- und NeuN-positiven Zellen und somit der unreifen postmitotischen Körnerzellen in der Mutante (K: 37 ± 12 %, M: 54 ± 2 %; $p < 0,05$). Die Analyse der reifen postmitotischen BrdU-positiven Körnerzellen zeigte dagegen eine massive, hochsignifikante Reduktion des Anteils der BrdU-, NeuN- und Calbindin-positiven Zellen in der Mutante (K: 43 ± 6 %, M: 6 ± 2 %; $p < 0,0005$). BrdU-positive Zellen, die keinen der beiden neuronalen Marker exprimierten, repräsentieren Stamm- und Progenitorzellen. Ihr Anteil ist bei Kontrolle und Bcl11b-Mutante nicht signifikant verändert (K: 30 ± 10 %, M: 40 ± 3 %; $p < 0,5$; *Abb. 12I*).

Die Kofärbung mit BrdU, Sox2 und NeuN schließlich zeigte auch am Tag 28 keinen signifikanten Unterschied der abgrenzbaren Reifestadien zwischen Kontrolltieren und Bcl11b-Mutanten (*Abb. 12A, G*). Tendenziell jedoch war in der Mutante der Anteil der BrdU- und Sox2-positiven Zellen, welche Stammzellen und Typ-2a&b-Progenitorzellen repräsentieren, größer als in den Kontrolltieren (K: 28 ± 3 %, M: 43 ± 14 %; $p < 0,5$). Dagegen war der Anteil der postmitotischen unreifen und reifen Körnerzellen, BrdU- und NeuN-positiven Zellen, in den mutanten Tieren etwas geringer als in den Kontrollen (K: 56 ± 9 %, M: 43 ± 15 %; $p < 0,5$). Der Anteil der Typ-3-Progenitorzellen – sie entsprechen den BrdU-positiven Zellen, die keinen der beiden neuronalen Marker exprimieren – zeigte keine Tendenz (K: 16 ± 6 %, M: 14 ± 7 %; $p < 1$).

Auch vier Wochen nach der ersten BrdU-Injektion war in allen Koexpressionsanalysen in den Mutanten der Anteil der BrdU-positiven Zellen, die sich in Progenitorzellstadien befanden oder postmitotischen, aber unreifen, Körnerzellen entsprachen im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Reife, BrdU-positive Körnerzellen waren in den mutanten Tieren dagegen kaum vorhanden.

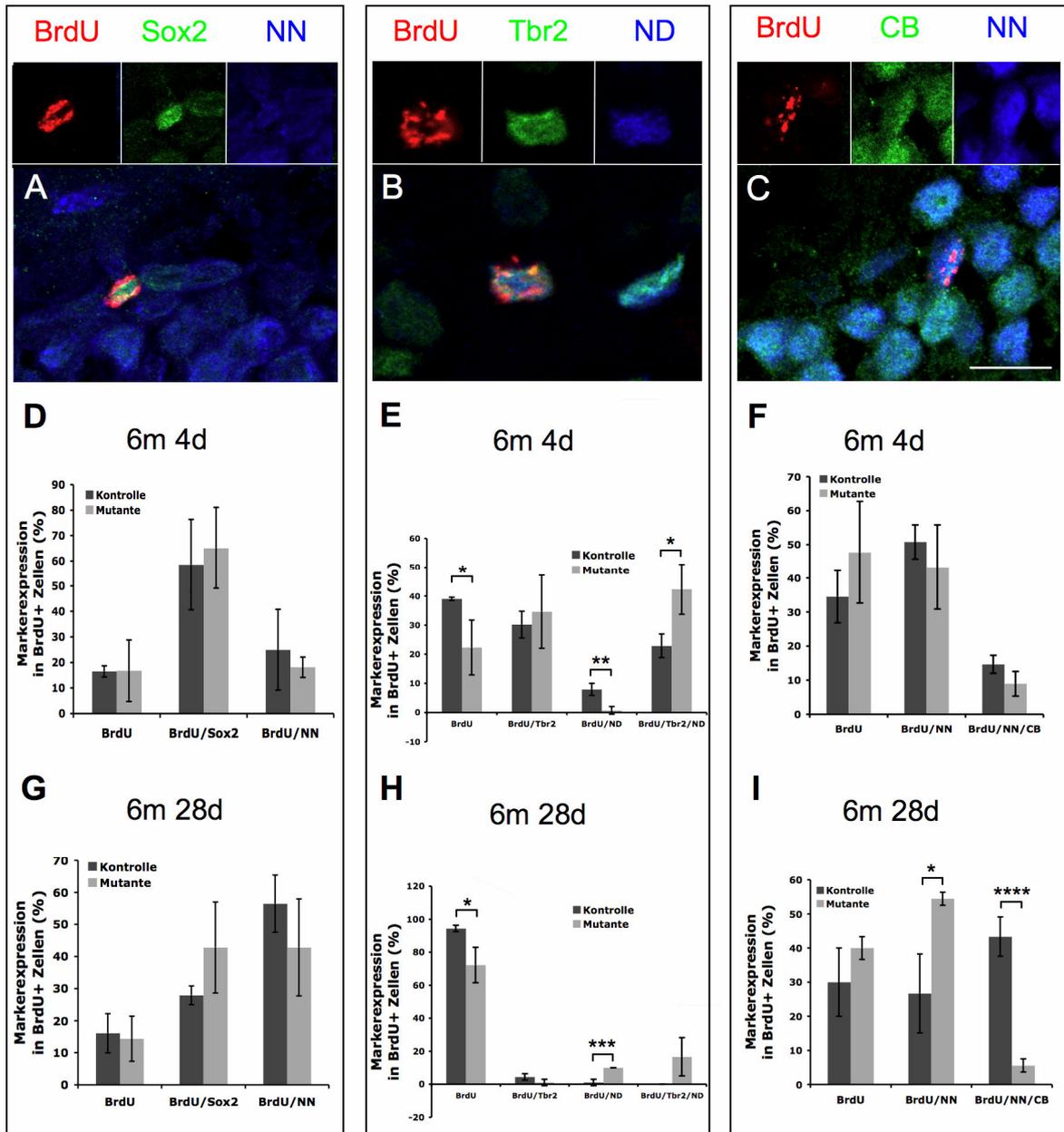


Abb. 12: Koexpressionsanalyse BrdU-positiver Zellen in sechs Monate alten *Bcl11b*(B-cell leukemia 11b)-Mutanten und Kontrolltieren

Die Tiere (n=3) wurden an drei aufeinander folgenden Tagen je einmal mit BrdU (2-Bromo-5-desoxyuridin) injiziert und vier (6m 4d) bzw. 28 Tage (6m 28d) nach der ersten Injektion präpariert. **A, B, C:** Konfokale Aufnahmen BrdU-positiver Zellen (rot) im Gyrus dentatus, die auf Koexpression mit den neuronalen Differenzierungsmarkern Sox2 (Sex determining region of Y-box; grün)/NN (Neuronal nuclei, NeuN; blau) oder Tbr2 (T-box brain 2; grün)/ND (Neurogenic differentiation factor 1; blau) oder CB (Calbindin; grün)/NN (blau) untersucht wurden. Vergrößerung: 63 x, (Messbalken in C: 7,5 μ m); **D - I:** Es wurden pro Tier mindestens 30 BrdU-positive Zellen ausgewertet. Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der Kolokalisation in Bezug auf die je Färbung ausgewerteten BrdU-positiven Zellen am Tag vier und 28 (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$, ****, $p < 0,0005$). **A, D, G:** BrdU/Sox2: Stammzellen und Typ-2a&b-Progenitorzellen, BrdU: Typ-3-Progenitorzellen, BrdU/NN: postmitotische Körnerzellen; **B, E, H:** BrdU: Stammzellen/reife Körnerzellen, BrdU/Tbr2: Typ-2a-Progenitorzellen, BrdU/Tbr2/ND: Typ-2b&3-Progenitorzellen, BrdU/ND: unreife postmitotische Körnerzellen; **C, F, I:** BrdU: Stamm- und Progenitorzellen, BrdU/NN: unreife postmitotische Körnerzellen, BrdU/NN/CB: reife postmitotische Körnerzellen;

3.8 Vergleich des Differenzierungsverhaltens adult entstandener Körnerzellen am Tag vier und am Tag 28

Der Vergleich der Koexpressionsanalysen BrdU-positiver Zellen mit Stammzell-, Progenitorzell- und neuronalen Markern zwischen den zwei Zeitpunkten vier und 28 Tage nach der ersten BrdU-Injektion ermöglicht eine Charakterisierung der fortschreitenden Differenzierung der BrdU-positiven Zellen („fate mapping“). Während die BrdU-positiven Zellen am Tag vier v. a. Progenitorzellmarker exprimieren, sind am Tag 28 überwiegend neuronale Marker für postmitotische unreife und reife Körnerzellen zu erwarten. Ein direkter Vergleich der zwei Zeitpunkte zwischen Mutanten und Kontrolltieren kann Hinweise darauf geben, ob Unterschiede im Differenzierungsverhalten bestehen.

3.8.1 BrdU, Sox2 und NeuN (Abb. 13A)

Die Kofärbung mit Sox2 und NeuN zeigt, dass von allen ausgewerteten BrdU-positiven Zellen der Anteil der mitotischen Zellen (BrdU+, BrdU+/Sox2+) in der Kontrolle vom Tag vier zum Tag 28 im Mittel um 32 Prozentpunkte abnimmt. In der Mutante ist der Rückgang der mitotischen Zellen mit 25 Prozentpunkten geringer. Dies sind im Einzelnen die Stammzellen und Typ-2a- und Typ-2b-Progenitorzellen (BrdU+/ Sox2+: K: 4d: $59 \pm 18 \%$ \rightarrow 28d: $28 \pm 3 \%$; M: 4d: $65 \pm 16 \%$ \rightarrow 28d: $43 \pm 14 \%$) und die Typ-3-Progenitorzellen (BrdU+: K: 4d: $17 \pm 2 \%$ \rightarrow 28d: $16 \pm 6 \%$, M: 4d: $17 \pm 12 \%$ 28d: $14 \pm 7 \%$). Entsprechend nimmt der Anteil der postmitotischen Körnerzellen (BrdU+/NeuN+) im Vergleich von Tag vier zu Tag 28 in der Kontrolle um 32 Prozentpunkte und in der Mutante um 25 Prozentpunkte zu (K: 4d: $25 \pm 16 \%$ \rightarrow 28d: $56 \pm 9 \%$, M: 4d: $18 \pm 4 \%$ \rightarrow 28d: $43 \pm 15 \%$).

3.8.2 BrdU, Tbr2 und NeuroD (Abb. 13B)

Die Analyse der BrdU-positiven Zellen mit den neuronalen Differenzierungsmarkern Tbr2 und NeuroD zeigt die Bedeutung von Bcl11b für den Übergang der durch adulte Neurogenese entstandenen Körnerzellen in das postmitotische Stadium deutlicher. Vier Tage nach der ersten BrdU-Injektion konnten in der Mutante im Vergleich zur Kontrolle signifikant weniger postmitotische Neurone nachgewiesen werden (BrdU+/NeuroD+; $p < 0,01$). Diese nehmen bis zum späten Präparationszeitpunkt in der Mutante um neun Prozentpunkte zu. Dies deutet auf einen verzögerten Eintritt in das postmitotische Stadium hin. In der Kontrolle dagegen konnten am Tag 28 kaum noch unreife postmitotische

Neurone gefunden werden (K: 4d: $8 \pm 2 \%$ \rightarrow 28d: $0 \pm 2 \%$, M: 4d: $1 \pm 1 \%$ \rightarrow 28d: $10 \pm 0 \%$). Ebenso ließen sich in der Kontrolle am Tag 28 nur noch vereinzelt Typ-2a-Progenitorzellen (BrdU+/Tbr2+) und keine Typ-2b- und Typ-3-Progenitorzellen (BrdU+/Tbr2+/NeuroD+) nachweisen. Der Anteil dieser unreifen Zellen nahm ab zugunsten des Anteils der nur BrdU-positiven Zellen, welche hier wahrscheinlich v. a. postmitotische reife Körnerzellen darstellen, der von Tag vier auf Tag 28 um 55 Prozentpunkte auf 94 % anstieg. In der Mutante erhöhte sich der Anteil der nur BrdU-positiven Zellen um 50 Prozentpunkte auf 72 % (BrdU+: K: 4d: $39 \pm 1 \%$ \rightarrow 28d: $94 \pm 2 \%$, M: 4d: $22 \pm 9 \%$ \rightarrow 28d: $72 \pm 11 \%$). Der Anteil der Typ-2a-, Typ-2b- und Typ-3-Progenitorzellen an allen ausgewerteten BrdU-positiven Zellen nimmt in der Mutante vom frühen zum späten Zeitpunkt zwar um 59 Prozentpunkte ab, aber es befinden sich noch immer 18 % der BrdU-positiven Zellen am Tag 28 in diesen Vorläuferstadien, im Gegensatz dazu sind es nur 4 % in der Kontrolle (BrdU+/Tbr2+: K: 4d: $30 \pm 5 \%$, \rightarrow 28d: $4 \pm 2 \%$; M: 4d: $35 \pm 13 \%$, \rightarrow 28d: $1 \pm 2 \%$; BrdU+/Tbr2+/NeuroD+: K: 4d: $23 \pm 4 \%$ \rightarrow 28d: $0 \pm 0 \%$, M: 4d: $42 \pm 9 \%$ \rightarrow 28d: $17 \pm 12 \%$).

3.8.3 BrdU, NeuN und Calbindin (Abb. 13C)

Die Expressionanalyse der späten neuronalen Differenzierungsmarker im Vergleich zwischen Tag vier und Tag 28 zeigt, dass Bcl11b an der Ausreifung der postmitotischen Körnerzellen beteiligt ist. Während in den Kontrolltieren der Anteil der reifen postmitotischen Körnerzellen (BrdU+/NeuN+/Calbindin+) vom Tag vier zum Tag 28 verdreifacht wird, stagniert dieser in der Mutante (K: 4d: $15 \pm 3 \%$ \rightarrow 28d: $43 \pm 6 \%$, M: 4d: $9 \pm 4 \%$ \rightarrow 28d: $6 \pm 2 \%$). Als Zeichen der fortschreitenden Differenzierung ist bei den Bcl11b-mutanten Tieren ein geringer Anstieg des Anteils der unreifen postmitotischen BrdU- und NeuN-positiven Körnerzellen zu beobachten. In den Kontrolltieren dagegen nimmt dieser Anteil zugunsten der ausdifferenzierten Neurone ab (K: 4d: $51 \pm 5 \%$ \rightarrow 28d: $37 \pm 12 \%$, M: 4d: $42 \pm 11 \%$ \rightarrow 28d: $54 \pm 2 \%$). Der Anteil der mitotischen Zellen (BrdU+) geht in den mutanten Tieren entsprechend der Zunahme postmitotisch unreifer Neurone (BrdU+/NeuN+) zurück. In den Kontrolltieren ist der Anteil der mitotischen Zellen (BrdU+) an allen BrdU-positiven Zellen zu beiden Zeitpunkten in etwa gleich (K: 4d: $34 \pm 8 \%$ \rightarrow 28d: $30 \pm 10 \%$, M: 4d: $49 \pm 15 \%$ \rightarrow 28d: $40 \pm 3 \%$).

Zusammenfassend (Abb.13) kann gesagt werden, dass von den 30–50 pro Tier ausgewerteten BrdU-positiven Zellen in den mutanten Tieren vom Tag vier zum Tag 28

zwar eine fortschreitende Differenzierung zu beobachten ist, im Vergleich zu den Kontrolltieren jedoch bleiben die adult entstandenen Neurone in der Bcl11b-Mutante in ihrer Entwicklung zurück. Sie verbleiben bis zum Tag 28 vermehrt in mitotischen Stadien, treten später ins postmitotische Stadium ein und differenzieren sich bis zum Tag 28 kaum zu reifen Körnerzellen aus.

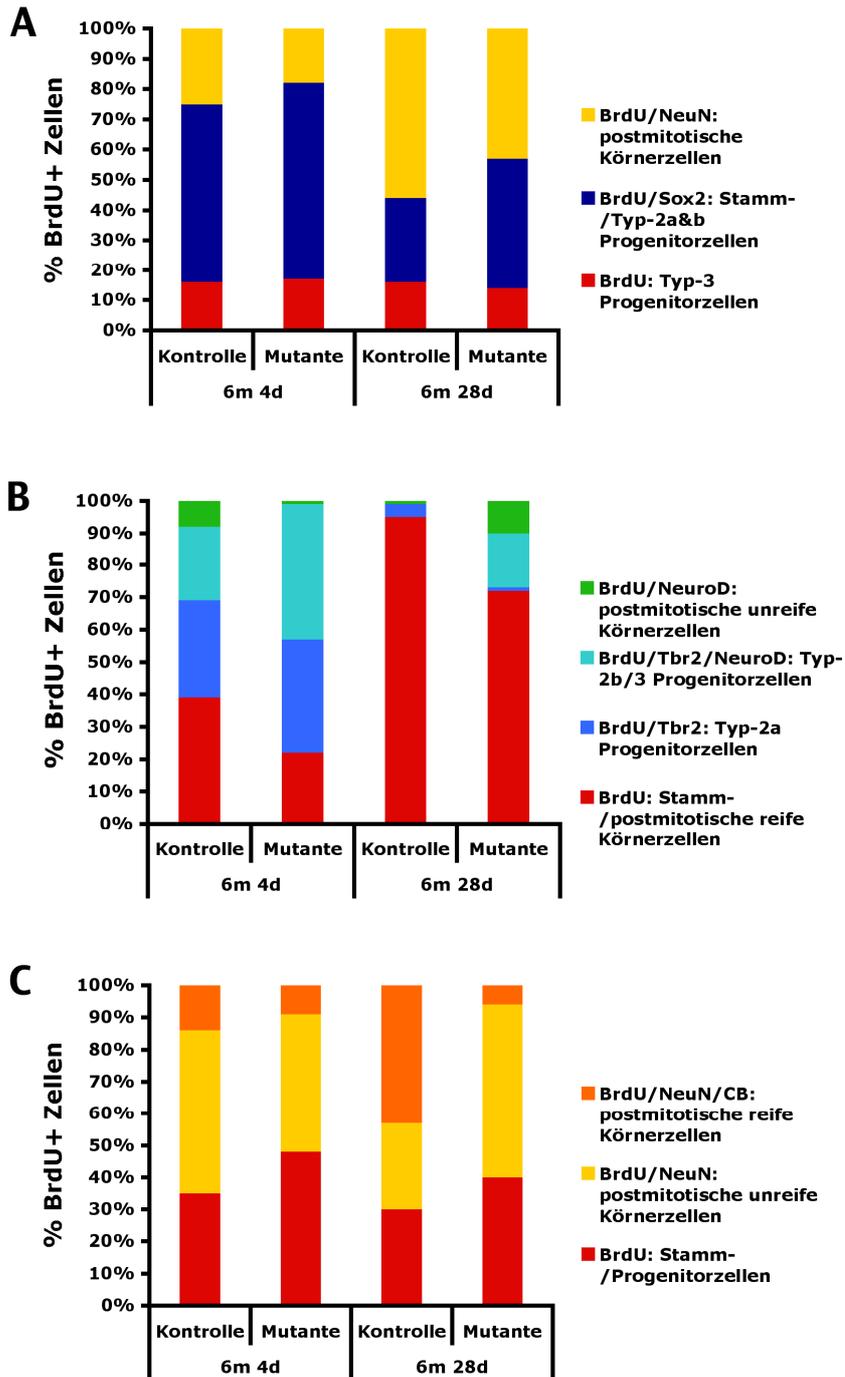


Abb. 13: Graphische Darstellung der Analyse der Differenzierungsstadien adult geborener Neurone im Gyrus dentatus sechs Monate alter Mäuse

Analyse von Dreifachfärbungen BrdU(2-Bromo-5-desoxyuridin)-positiver Zellen in Kontrolle und Mutante vier und 28 Tage nach der ersten BrdU-Injektion. Für jeden neuronalen Marker wird der Anteil der immunoreaktiven Zellen an allen pro Tier ausgewerteten BrdU-positiven Zellen in Prozent angegeben. **A:** BrdU, Sox2 (Sex determining region of Y-box) und NeuN (Neuronal nuclei); Differenzierung zwischen mitotischen und postmitotischen Zellen; **B:** BrdU, Tbr2 (T-box brain 2) und NeuroD (Neurogenic differentiation factor 1); Differenzierung zwischen Typ-2a/Typ-2b- und Typ-3-Progenitorzellen, und unreifen postmitotischen Körnerzellen; **C:** BrdU, NeuN und Calbindin (CB); Differenzierung zwischen mitotischen Zellen, unreifen und reifen postmitotischen Körnerzellen.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde anhand eines konditionellen Mausmodells die funktionelle Analyse des Zinkfingertranskriptionsfaktors *Bcl11b* während der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus durchgeführt. Die Analyse erfolgte mithilfe histologischer Methoden an sechs Monate alten Mäusen mit einer vorderhirnspezifischen Deletion des *Bcl11b*-Gens.

Die adulte Neurogenese ist ein komplexer und dynamischer Prozess, der durch das Zusammenwirken einer Vielzahl von Faktoren gesteuert wird, welche an der Proliferation der Progenitorzellen und der Differenzierung, Integration und dem Überleben der neu entstandenen Neurone beteiligt sind (Eisch et al. 2008). Ich konnte zeigen, dass *Bcl11b* essentiell ist, sowohl für die Proliferation der Progenitorzellen als auch für die Differenzierung der durch adulte Neurogenese entstandenen Nervenzellen. Die *Bcl11b* mutanten Tiere zeigen einen kleineren Gyrus dentatus, eine geringere Körnerzellzahl, eine Reduktion der Proliferation sowie eine Beeinträchtigung der Differenzierung der neu entstandenen Neurone.

4.1 Morphologie und Proliferation

Die Morphogenese der Körnerzellschicht während der Entwicklung des Gyrus dentatus beginnt pränatal, wenn mitotische Progenitorzellen aus dem Neuroepithel in die Anlage des Gyrus dentatus einwandern. Postnatal etabliert sich mit der tertiären Matrix ein Pool mitotischer Progenitorzellen, aus dem über 80 % der Körnerzellen hervorgehen. Vier Wochen postnatal ist die Morphogenese des Gyrus dentatus weitgehend abgeschlossen (Altman et al. 1990, Altman et al. 1965). Es verbleiben jedoch Stammzellen in der Subgranularschicht, so dass durch adulte Neurogenese zeitlebens neue Körnerzellen in die bereits bestehende Körnerzellschicht integriert werden können. Diese machen etwa 5 % der gesamten Körnerzellzahl aus (Altman et al. 1965, Nakashiba et al. 2012, Imayoshi et al. 2008). In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Mäuse mit einer vorderhirnspezifischen Mutation des *Bcl11b*-Gens nach abgeschlossener postnataler Entwicklung des Gyrus dentatus, zum Zeitpunkt P30, eine signifikante Reduktion der Körnerzellzahl um 33 % und der Fläche des Gyrus dentatus um 40 % im Vergleich zu Kontrolltieren aufweisen. Diese Reduktion ist zurückzuführen auf eine Depletion des Progenitorzellpools und eine erhöhte Apoptoserate im Körnerzellband des sich entwickelnden Gyrus dentatus (Simon et al. 2012). Ich konnte zeigen, dass in den sechs

Monate alten Bcl11b-Mutanten eine Reduktion der Körnerzellzahl um 40 % und der Fläche des Gyrus dentatus um 50 % auftritt. Dies entspricht einer progredienten Reduktion um ca. 10 % und könnte ein Hinweis darauf sein, dass Bcl11b auch während der adulten Neurogenese eine wichtige Rolle spielt. Zur Beurteilung der Proliferation im adulten Gyrus dentatus wurden BrdU-positive Zellen am Tag vier und 28 nach der ersten von insgesamt drei BrdU-Injektionen im Gyrus dentatus sechs Monate alter Mäuse ausgezählt. Zu beiden Zeitpunkten zeigte sich eine signifikant reduzierte Anzahl BrdU-positiver Zellen in den Bcl11b-mutanten Tieren. Die BrdU-positiven Zellen vier Tage nach der ersten BrdU-Injektion entsprechen Stammzellen, mitotischen Vorläuferzellen und vereinzelt postmitotischen Neuronen. Obwohl Astrozyten in gleichem Maße aus den multipotenten Stammzellen der Subgranularschicht entstehen, werden sie durch BrdU nur selten markiert (Bonaguidi et al. 2011). Das kann zum einen darin begründet sein, dass Astroglia direkt aus Radialglia-ähnlichen Zellen entstehen, ohne dass diese sich vorher teilen und damit kein BrdU in ihre DNS integrieren können. Zum anderen entsteht aus einer Stammzelle nach asymmetrischer Teilung meist nur eine Astroglia-Zelle, während bei der neurogenen asymmetrischen Teilung weitere Mitosen der Progenitorzellen (IPC, intermediate progenitor cell) folgen, wodurch BrdU an alle Tochterzellen weitergegeben wird (Bonaguidi et al. 2011). Angesichts der nur gelegentlichen Mitose der Typ-1-Zellen ist weiterhin zu vermuten, dass BrdU direkt in IPCs integriert wird und nur selten in Typ-1-Zellen. Es ist somit davon auszugehen, dass es sich bei der durch den Funktionsverlust von Bcl11b reduzierten Anzahl BrdU-positiver Zellen hauptsächlich um Zellen mit neuronalem Schicksal handelt.

Um zu prüfen, ob eine reduzierte Anzahl an Progenitorzellen für die verringerte Proliferation verantwortlich ist, habe ich die Anzahl der Sox2- und Tbr2-positiven Zellen in den sechs Monate alten Tieren bestimmt. Es zeigte sich bei den adulten Tieren zwischen Kontrolle und Mutante kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Progenitorzellen. Zu den Stammzellen kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, da Sox2 zwar Stammzellen markiert, gleichzeitig aber auch Typ-2-Progenitorzellen (Komitova et al. 2004) und Tbr2 ein Marker für Typ-2- und Typ-3-Progenitorzellen ist (Hodge et al. 2008). Auch bei anderen Stammzellmarkern besteht das Problem, dass nicht nur Stammzellen, sondern auch Progenitorzellen markiert werden, wie z. B. bei GFAP oder Nestin. GFAP wird zusätzlich von reifen Astrozyten exprimiert. Um in zukünftigen Experimenten die Stammzellzahl zu bestimmen, besteht jedoch die Möglichkeit, anhand der Kombination

aus Zellmorphologie und der Expression von z. B. GFAP radiäre Gliazellen zu identifizieren, die den Typ-1-Progenitorzellen entsprechen.

Die nur tendenziell etwas kleinere Progenitorzellzahl in Zusammenhang mit der deutlich verringerten Proliferation in den sechs Monate alten Bcl11b-mutanten Tieren weisen auf eine reduzierte Teilungsrate der Progenitorzellen bei fehlendem Bcl11b hin. Es wurde bereits gezeigt, dass Bcl11b als positiver Regulator des Zellzyklus wirkt, indem es direkt mit zyklinabhängigen Kinase Inhibitoren, z. B. p21^{WAF1} oder p57KIP2, interagiert (Topark-Ngarm et al. 2006, Cherrier et al. 2009). p57KIP2 spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus und bei der neuronalen Differenzierung. Postnatal wird p57KIP2 in amakrinen Zellen der Retina und in dopaminergen Zellen des Mittelhirns exprimiert (Dyer et al. 2000, Joseph et al. 2003). Bcl11b unterdrückt in Verbindung mit dem NuRD-Komplex direkt die p57KIP2-Expression in Sk-N-MC-Neuroblastomzellen, was zu einer verzögerten Differenzierung der neuronalen Zellen führt. Um den Zellzyklus der Progenitorzellen im Gyrus dentatus durch direkte Interaktion mit p57KIP2 zu beeinflussen, müsste Bcl11b in den Progenitorzellen exprimiert sein. Die Koexpressionsanalyse von Bcl11b mit den Progenitorzellmarkern Sox2 und Tbr2 zeigte allerdings keine Überlappung, so dass hier von einem extrazellulären Einfluss auf die Progenitorzellen über Rückkopplungsmechanismen und extrazelluläre Signale aus den postmitotischen Körnerzellen ausgegangen werden kann. Zur Aufrechterhaltung der neurogenen Nische tragen auch die bereits ausdifferenzierten Körnerzellen bei (Ming et al. 2011). Auch Prox1, ein Transkriptionsfaktor, der bereits ab dem Stadium der Typ-2b-Zelle, aber ebenfalls in reifen Körnerzellen exprimiert wird, ist durch nicht-zellautonome Mechanismen beteiligt an der Aufrechterhaltung der Progenitorzellpopulation im adulten Hippocampus. Fehlt Prox1 werden Tbr2- und Doublecortin-positive Zellen durch Apoptose eliminiert (Lavado et al. 2010). Während hier eine Depletion des Progenitorzellpools die Ursache der fehlenden Neurogenese ist, zeigte sich in den Bcl11b-mutanten Tieren die Anzahl der Progenitorzellen beinahe unverändert. Es war jedoch in den mutanten Tieren eine Umverteilung der BrdU-positiven und der Sox2-positiven Zellen aus der Subgranular- in die Granularschicht zu beobachten. Hier könnte eine verfrühte Migration der Progenitorzellen aus der SGS in die GS bzw. eine verzögerte Reifung der Progenitorzellen zu Grunde liegen. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Deplatzierung der Stammzellen, die sich nicht mehr nur in ihrer neurogenen Nische aufhalten, sondern sich im Sinne einer Körnerzelldispersion in der GS befinden. Im gesamten Gyrus dentatus der Bcl11b-Mutanten ist eine Körnerzelldispersion zu beobachten, von der auch die Stammzellen

betroffen sein könnten. Durch diese Misdistribution befinden sich die Stamm-/Progenitorzellen nicht mehr in ihrer gewohnten neurogenen Nische, was ein Grund für die herabgesetzte Proliferation sein könnte. Eine ähnliche Desorganisation der sogenannten „medium spiny neurons“ zeigt sich im Striatum Bcl11b-mutanter Mäuse (Arlotta et al. 2008).

Am Tag 28 nach der ersten BrdU-Injektion ließ sich ebenfalls eine signifikante Reduktion der BrdU-positiven Zellen in der Bcl11b-Mutante beobachten. Die Zahl der BrdU-positiven Zellen nimmt vom Tag vier zum Tag 28 natürlicherweise stark ab, da nur ein Teil der neu entstandenen Zellen integriert wird und die übrigen Zellen apoptotisch werden. Die Apoptose eines großen Teils neu entstandener Körnerzellen ist ein normaler und wichtiger Regulationsmechanismus während der adulten Neurogenese. Auf diese Weise werden überzählige Neurone eliminiert und nur funktionelle Neurone integriert (Biebl et al. 2000). Vier Wochen nach einer BrdU-Injektion bleibt die Zahl der BrdU-positiven neuronalen Zellen dann konstant (Kempermann et al. 2003). Daher wurde dieser Präparationszeitpunkt gewählt, um zu beurteilen, welcher Anteil der bis zum Tag vier nach der ersten BrdU Injektion entstandenen BrdU-positiven Zellen bis zum Tag 28 überlebt. Die Reduktion der BrdU-positiven Zellen vom Tag vier zum Tag 28 ist in der Bcl11b-Mutante um 7 % größer im Vergleich zu den Kontrolltieren, weshalb ein Anstieg der Apoptose bei fehlendem Einfluss von Bcl11b in Betracht gezogen wurde. Während der postnatalen Entwicklung des Gyrus dentatus ist die Apoptose in den Bcl11b-mutanten Tieren gesteigert (Simon et al. 2012) und auch in leukämischen T-Zellen konnte durch eine herabregulierte Bcl11b Expression Apoptose induziert werden (Huang et al. 2011). In den adulten Tieren konnte ich jedoch keinen Unterschied in der Anzahl der apoptotischen Zellen zwischen Kontrollen und Mutanten nachweisen. Dies könnte bedeuten, dass Bcl11b in den adulten Tieren keinen Einfluss mehr auf die Apoptose im Gyrus dentatus hat. Es sind allerdings in den adulten Tieren nur noch sehr wenige apoptotische Zellen im Gyrus dentatus zu finden. Zwar ist in den Gehirnbereichen mit adulter Neurogenese die Apoptoserate wesentlich höher als in anderen Gehirnbereichen, weshalb angenommen wird, dass die meisten apoptotischen Zellen neu entstandene Neurone sind (Biebl et al. 2000), aber die adulte Neurogenese nimmt mit steigendem Alter immer weiter ab, so dass nicht viele apoptotische Zellen zu erwarten sind (Ben Abdallah et al. 2010). Ein nur diskreter Unterschied der Apoptoserate zwischen Kontrolltieren und Mutanten ist somit schwer nachzuweisen. In den mutanten Tieren fällt zudem eine starke Streuung der Anzahl

apoptotischer Zellen zwischen den einzelnen Tieren auf, so dass interindividuelle Unterschiede eine sichere Interpretation erschweren.

Eine weitere Möglichkeit für die größere Reduktion an BrdU-positiven Zellen in der Bcl11b-Mutante am Tag 28, bei unveränderter Apoptose, lässt sich aus der bereits am Tag vier verminderten Anzahl BrdU-markierter IPCs ableiten. So können sich weniger markierte IPCs erneut teilen und BrdU an ihre Tochterzellen weitergeben. Dadurch ist der Zellpool markierter Zellen, aus dem die überlebenden Zellen nach vier Wochen noch detektiert werden können, kleiner. Dies hat wahrscheinlich nur einen geringen Effekt, denn in Sprague-Dawley Ratten wurde gezeigt, dass die Anzahl BrdU-positiver Zellen im Zeitraum von 24 Stunden bis vier Tage nach einer BrdU-Injektion bereits maximal ist und konstant bleibt (Dayer et al. 2003). Dies ist exakt der Zeitraum, in dem sich die BrdU-positiven Zellen zum Präparationszeitpunkt am Tag vier bewegen. Damit wäre nicht zu erwarten, dass sich die mit BrdU-markierten Zellen erneut teilen.

Insgesamt ist eine Kombination aus einer reduzierten Teilungsrate der Progenitorzellen und einem geringen Anstieg der Apoptose wahrscheinlich, die zu einem etwas erhöhten Verlust an BrdU-positiven Zellen in den Bcl11b mutanten Tieren am Tag 28 nach der ersten BrdU-Injektion führen.

4.2 Bcl11b als Regulator neuronaler Differenzierung

Durch das fate-mapping BrdU-positiver Zellen konnte gezeigt werden, dass der Funktionsverlust von Bcl11b zu einer gestörten Differenzierung der durch adulte Neurogenese entstandenen Körnerzellen führt. Die unterschiedlichen Koexpressionsanalysen deuten sowohl am Tag vier als auch am Tag 28 nach der ersten BrdU-Injektion auf eine Reifungsverzögerung der adult entstandenen Neurone in den Bcl11b-mutanten Tieren hin. Im Vergleich von Kontrolle und Mutante befand sich am Tag vier in den Bcl11b-Mutanten ein größerer Anteil der BrdU-positiven Zellen noch in mitotischen Progenitorzellstadien (Typ-1 bis Typ-3), während in den Kontrolltieren ein größerer Anteil bereits postmitotisch war. Am Tag 28 nach der ersten BrdU-Injektion sollten die BrdU-positiven Zellen hauptsächlich reifen Körnerzellen entsprechen (Kempermann 2004); dies war in den Kontrolltieren zu beobachten. In den Mutanten dagegen entsprach ein großer Anteil der BrdU-positiven Zellen noch Progenitorzellen und unreifen postmitotischen Körnerzellen. Zusammengefasst lässt sich daraus schließen, dass Bcl11b erstens an der Regulation der frühen Differenzierung und dem Übergang in das postmitotische Stadium

beteiligt ist und zweitens an der späten Differenzierung, dem Übergang von der unreifen zur reifen Körnerzelle.

Die Expression von Bcl11b ist auf postmitotische Zellen beschränkt, so dass es sich, zumindest bei der frühen Differenzierung der adult entstandenen Neurone, um einen nicht-zellautonomen Effekt handelt. Möglicherweise gehen von den postmitotischen, Bcl11b exprimierenden Zellen extrazelluläre Signale aus, die auf die umgebenden Zellen wirken und die das Differenzierungsverhalten der adult entstandenen neurogenen Zellen ähnlich wie die Proliferation der Progenitorzellen, beeinflussen.

Der indirekte Mechanismus von Bcl11b auf die Differenzierung der Körnerzellen während der postnatalen Entwicklung des Gyrus dentatus wurde in einem Mosaik-deletionsexperiment deutlich. Dafür wurde Bcl11b in E(Embryonaler Tag)15,5 Mäusen in einzelnen Zellen deletiert, woraufhin die Anzahl der unreifen, NeuroD (als Marker für Typ-2b- und Typ-3-Progenitorzellen und für unreife postmitotische Körnerzellen) positiven Wildtypzellen signifikant anstieg (Simon et al. 2012). Die Deletion von Bcl11b in nur wenigen Zellen ist also ausreichend, um die Differenzierung der umliegenden Wildtypzellen zu verzögern. Auch in Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass Bcl11b die Proliferation und frühe Differenzierung durch nicht-zellautonome Mechanismen reguliert, indem es die Transkription des dermalen Faktors KGF (Keratinocyte growth factor), der parakrin die epidermale Morphogenese beeinflusst, reguliert (Golonzhka et al. 2009). Weitere, zell-autonome Wirkungen, sind jedoch nicht ausgeschlossen und v. a. in der Phase der späten Differenzierung der adult entstandenen Körnerzellen möglich. Auch an der Reifung kortikospinaler Motorneurone, Zellen des Striatums, sowie vomeronasaler sensorischer Neurone ist Bcl11b beteiligt (Arlotta et al. 2005, Arlotta et al. 2008, Enomoto et al. 2011). In striatalen Zellen aus Zellkultur wurde Bcl11b mithilfe von ChIP (Chromatin immunoprecipitation) und Microarray Analysen kürzlich als negativer Regulator des BDNF Signalwegs beschrieben (Tang et al. 2011). Auch während adulter Neurogenese spielt BDNF eine Rolle und fördert u.a. die Ausreifung adult geborener Neurone (Rossi et al. 2006, Waterhouse et al. 2012). Der gleiche Zusammenhang zwischen Bcl11b und BDNF im Hippocampus würde allerdings bedeuten, dass in der Bcl11b-Mutante durch den Wegfall der negativen Regulation von BDNF die Differenzierung der adult entstandenen Neurone eigentlich gut voranschreiten müsste. Bcl11b könnte im Hippocampus jedoch Komplexe mit anderen Kofaktoren als im Striatum bilden, die den BDNF Signalweg entweder positiv oder nicht beeinflussen. Außerhalb des ZNS ist Bcl11b essentiell für die Differenzierung von T-Lymphozyten (Liu et al. 2010, Wakabayashi et al.

2003b). Insgesamt weisen diese Befunde in unterschiedlichen Geweben auf eine konservierte Funktion von Bcl11b bei Differenzierungsvorgängen hin.

4.3 Molekulare Mechanismen von Bcl11b bei der adulten Neurogenese

Über die molekularen Mechanismen durch die Bcl11b die adulte Neurogenese beeinflusst ist bisher wenig bekannt. Ein Gen, das als direktes transkriptionelles Zielgen von Bcl11b in den Körnerzellen des Gyrus dentatus identifiziert werden konnte, ist Desmoplakin (Simon et al. 2012). Desmoplakin wird im Hippocampus ausschließlich in den Körnerzellen des Gyrus dentatus zeitlebens exprimiert (Lein et al. 2004). In Bcl11b-mutanten Mäusen ist die Desmoplakin Expression 14,7-fach reduziert. Desmoplakinmutante Mäuse zeigen in Bezug auf Körnerzellzahl, Fläche des Gyrus dentatus und Körnerzelldispersion einen ähnlichen, wenn auch schwächeren, Phänotyp im Vergleich zur Bcl11b-Mutante. Auch in den desmoplakinmutanten Mäusen ist dies u. a. auf eine verminderte Proliferationsrate der Progenitorzellen und eine verzögerte Differenzierung der während der Entwicklung des Gyrus dentatus entstandenen Körnerzellen zurückzuführen. Unabhängig von Desmoplakin scheint die Wirkung von Bcl11b auf die Apoptose zu sein. Denn in Desmoplakin Mutanten sind weniger apoptotische Zellen zu detektieren, was zum Teil den schwächer ausgeprägten Phänotyp erklären könnte. Ebenso ist der Moosfastertrakt, welcher aus den Axonen der Körnerzellen zur CA3-Region besteht, in den desmoplakinmutanten Mäusen unbeeinträchtigt (Simon et al. 2012).

Die Tatsache, dass Desmoplakin auch in adulten Körnerzellen exprimiert wird und in adulten Mutanten reduziert ist, macht es wahrscheinlich, dass Desmoplakin als direktes Targetgen von Bcl11b auch während der adulten Neurogenese einige der zu beobachtenden Effekte vermittelt. Desmoplakin ist u. a. in Epithelien und Herzmuskelzellen an der Bildung von Desmosomen beteiligt und verbindet als Adaptorprotein den interzellulären desmosomalen Cadherinkomplex mit den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts (Green et al. 1998). Desmosomen sind beteiligt an der interzellulären Signaltransduktion und können dadurch die Zellproliferation, Differenzierung und Morphogenese beeinflussen (Garrod et al. 2008). Weiterhin reguliert Desmoplakin die Organisation der Mikrotubuli in sich differenzierenden Zellen der Epidermis (Lechler et al. 2007), so dass eine ähnliche Funktion während der Differenzierung auch in neuronalen Zellen denkbar wäre. Ob Desmoplakin jedoch in neuronalen Zellen die gleichen Funktionen erfüllt, wie in Zellen anderer Gewebe, wurde bisher nicht untersucht.

An der Regulation adulter Neurogenese sind viele weitere intrinsische und extrinsische Faktoren beteiligt, die unterschiedlichen Einfluss nehmen auf alle Phasen der Neurogenese von der Proliferation der Progenitorzellen über die neuronale Differenzierung bis hin zum Überleben der neu entstandenen Zellen (Eisch et al. 2008). So stellt z. B. die sequentielle Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren die korrekte Entwicklung der Neurone während der adulten Neurogenese sicher. Zwei weitere Transkriptionsfaktoren, die an der Reifung der adult entstandenen neurogenen Zellen beteiligt sind, sind Prox1 und NeuroD (Miyata et al. 1999, Lavado et al. 2010, Schwab et al. 2000). Beide werden durch den Wnt/ β -Catenin Signalweg aktiviert (Karalay et al. 2011, Kuwabara et al. 2009). Eine von Karalay et al. aufgestellte Hypothese besagt, dass in Sox2-positiven, undifferenzierten Zellen durch Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs die Expression von Prox1 und NeuroD induziert wird, woraufhin diese Zellen ihre Stammzell-eigenschaften verlieren und beginnen sich zu differenzieren (Karalay et al. 2011). Auch Bcl11b könnte durch zellautonome und/oder nicht-zellautonome Mechanismen an der Aktivierung oder Repression weiterer für die Differenzierung wichtiger Transkriptionsfaktoren beteiligt sein. In den Bcl11b-Mutanten ist eine Steigerung der NeuroD-positiven Zellen sowohl während der Entwicklung des Hippocampus (Simon et al. 2012) als auch in den adult entstandenen Neuronen (siehe *Abb. 12, 13*) zu beobachten. Diese Zellen sind nicht voll ausgereift, was auf den fehlenden Einfluss von Bcl11b auf die sequentielle Aktivierung der Transkriptionsfaktoren zurückzuführen sein könnte.

4.4 Die Rolle adulter Neurogenese bei Lernvorgängen und Krankheiten

Bereits geringe Unterschiede in der Morphologie des Hippocampus korrelieren positiv mit der Leistung in Verhaltenstests. Dies kann in unterschiedlichen Spezies, u.a. auch beim Menschen beobachtet werden (Schwegler et al. 1993, Healy et al. 1996, Kempermann et al. 1997b, Maguire et al. 2003). Diese Aussage betrifft nicht nur die Größe des Hippocampus selbst, sondern auch die Größe des infrapyramidalen Moosfasertrakts (IMF). Der IMF besteht aus den Axonen der Körnerzellen, die zu den Pyramidenzellen in der CA3-Region projizieren (Crusio et al. 2005). Es konnte bereits gezeigt werden, dass in adulten Bcl11b-mutanten Mäusen die Ausbildung des IMF beeinträchtigt ist. Weiterhin ist die Anzahl der dendritischen Dornen der Körnerzellen in Bcl11b-mutanten Mäusen zum Zeitpunkt P30 reduziert. Auch die Anzahl der sogenannten „thorny excrescences“ der Pyramidenzellendriten in der CA3-Region, die den synaptischen Verbindungen mit den

Moosfasern entsprechen, ist herabgesetzt (Simon et al. 2012). In Verhaltenstests, die v. a. räumliches Lernen testen, zeigt sich ein funktionelles Korrelat zu den morphologischen Veränderungen. Sowohl im Radiallabyrinth als auch im Open Field Test war der Lernerfolg der Mutanten beeinträchtigt (Simon et al. 2012). In diesen Experimenten wurde die Auswirkung des Verlusts von *Bcl11b* auf die postnatale Entwicklung des Gyrus dentatus gezeigt.

Auch adult entstandene Neurone fügen sich in die hippocampale Verschaltungskette ein, indem sie funktionelle Verbindungen über den infra- und suprapyramidalen Moosfasertrakt in die CA3-Region ausbilden (Zhao et al. 2006, Toni et al. 2008, Romer et al. 2011). Sie übernehmen wichtige Funktionen bei der Trennung ähnlicher Ereignisse, indem sie für jedes Ereignis die zeitliche und räumliche Beziehung kodieren und ermöglichen ein schnelles Abrufen bereits gespeicherten Wissens bei erneutem Erleben einer ähnlichen Situation (Nakashiba et al. 2012). In den *Bcl11b*-mutanten Tieren entstehen weniger neue Nervenzellen und diese erreichen nach 28 Tagen zwar das postmitotische Stadium, entsprechen aber größtenteils noch unreifen Körnerzellen. In diesem späten Schritt der Differenzierung von der unreifen zur reifen und funktionell integrierten Körnerzelle werden axonale und dendritische Verbindungen geknüpft, die wichtig sind für die Funktion der adult entstandenen Körnerzelle (Kempermann et al. 2004). Der längere Verbleib der adult entstandenen Neurone im Stadium der unreifen Körnerzelle in den *Bcl11b*-Mutanten könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch hier die Bildung des Moosfasertrakts und der dendritischen Dornen eingeschränkt ist und dass dies negative Auswirkungen auf das räumliche Lernvermögen hat. Wie könnte *Bcl11b* in die Ausbildung des IMF eingebunden sein? Ein aussprossendes Axon wird von anziehenden und abstoßenden Molekülen geleitet, um den Weg in sein Zielgebiet zu finden (Shen et al. 2010). Botenstoffe wie Semaphorine, Netrine oder Ephrine werden dabei von Rezeptoren auf der Membranoberfläche des Wachstumskegels des Axons erkannt. Einige dieser Rezeptoren, wie Plexine, Neuropiline, DCC (deleted in colorectal carcinoma), UNC5 (Uncoordinated protein 5) oder Eph (Ephrinrezeptor), könnten von *Bcl11b* reguliert werden. Fehlt *Bcl11b*, erkennen die aussprossenden Axone der Körnerzellen während der Entwicklung des Hippocampus oder während adulter Neurogenese die Signalmoleküle nicht und können nicht in das Zielgebiet geleitet werden.

Vor dem Hintergrund des konditionellen Mausmodells, in dem bereits die postnatale Entwicklung des Gyrus dentatus verändert ist, ist es schwierig, die Auswirkungen der beeinträchtigten adulten Neurogenese in Verhaltenstests zu beurteilen. Weiterführende

Experimente mit einer induzierbaren konditionellen Mutante, bei der Bcl11b erst nach vollendeter Entwicklung des Hippocampus ausgeschaltet wird, könnten hier besseren Einblick geben in die Rolle von Bcl11b bei der hippocampalen adulten Neurogenese sowohl in Bezug auf die Morphologie als auch auf das Lernverhalten.

Eine Abnahme der Neurogeneserate wird auch im Alter beobachtet und es wird angenommen, dass dies einer der Gründe für die Verschlechterung kognitiver Fähigkeiten ist (Lazarov et al. 2010). Aber nicht nur der als normal angesehene Verlust einiger kognitiver Fähigkeiten im Alter, sondern auch neurodegenerative Krankheiten, wie z. B. Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson (Mu et al. 2011, Winner et al. 2011, Kohl et al. 2012), sowie Depression oder Schizophrenie (Reif et al. 2006, Sahay et al. 2007), werden mit einer Dysregulation der adulten Neurogenese in Zusammenhang gebracht. Die Veränderungen der adulten Neurogenese sind nicht der alleinige Grund für diese Erkrankungen, jedoch wird durch wirksame Therapien mit z. B. Fluoxetin eine Steigerung der Neurogenese beobachtet (Kohl et al. 2012, Lesemann et al. 2012). Ein umfassendes Wissen der der adulten Neurogenese zugrunde liegenden neuronalen Signalwege könnte zu neuen therapeutischen Strategien führen, die die Hirnfunktion aufrecht erhalten.

4.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte der Transkriptionsfaktor Bcl11b als essentieller Faktor bei der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus identifiziert werden. Bcl11b wird sowohl für die Proliferation der Progenitorzellen als auch für die terminale Differenzierung der unreifen Körnerzellen benötigt. Die in dieser Arbeit dargestellten Daten wurden in Mäusen erhoben, bei denen bereits die Entwicklung des Gyrus dentatus durch das Fehlen von Bcl11b beeinträchtigt war. Zukünftige Experimente mit einem induzierbaren konditionellen Bcl11b-Mausmodell könnten es ermöglichen, den Einfluss von Bcl11b auf Phänotyp und Verhalten während der adulten Neurogenese vollständig unabhängig von der Entwicklung des Gyrus dentatus zu betrachten.

Weiterhin bleibt zu klären, über welche molekularen oder zellulären Mechanismen der Transkriptionsfaktor Bcl11b seine Effekte vermittelt. Die bisher vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass es sich u. a. um nicht-zellautonome Mechanismen handelt. Der Vergleich sekretierter Faktoren primärer neuronaler hippocampaler Zellkulturen von Kontroll- und Bcl11b-mutanten Tieren wäre daher von Interesse. Dieser Ansatz würde es erlauben, gezielt sezernierte Signalmoleküle zu identifizieren, die von Bcl11b reguliert werden. Rescue-Experimente mit dem Überstand der Kontroll-Zellkultur in der Bcl11b-mutanten Zellkultur würden es ermöglichen die Funktion der Signalmoleküle zu verifizieren. Auch die Verbindung zu Desmoplakin wirft die Frage nach seiner Funktion bei der adulten Neurogenese auf. Desmoplakin ist mit Mikrotubuli assoziiert, die als Teil des Zytoskeletts die Differenzierung beeinflussen und kann als Bestandteil der Desmosomen intrazelluläre Signalwege modulieren. Bcl11b könnte daher sowohl zellautonome als auch nicht-zellautonome Funktionen ausüben.

Darüber hinaus könnte elektrophysiologisch untersucht werden, welche elektrischen Eigenschaften Bcl11b mutante adult entstandene Neurone besitzen. So könnte die funktionelle Integration in das bereits bestehende Netzwerk beurteilt werden.

Ein ebenfalls wichtiges Experiment wäre die Untersuchung der Folgen einer Überexpression von Bcl11b. Dies könnte z. B. durch ex-utero Elektroporation in adulten hippocampalen Slice-Kulturen erfolgen. Hierdurch könnte untersucht werden, ob eine verstärkte Expression von Bcl11b eine erhöhte Proliferation von Progenitorzellen oder eine schnellere Differenzierung neu entstandener Körnerzellen induziert.

Erkenntnisse über die Regulation der adulten Neurogenese sind auch von besonderer klinischer Relevanz. Für die Beurteilung, Prognose und Therapie psychiatrischer und

neurodegenerativer Erkrankungen, die mit Veränderungen der adulten Neurogenese in Zusammenhang gebracht werden, wird es in Zukunft wichtig sein, adulte Neurogenese auch in vivo beurteilen zu können. Eine Möglichkeit, die momentan diskutiert wird, eröffnet sich hier mit der Magnetresonanztomographie, mit der neuronale Progenitorzellen in vivo sichtbar gemacht werden können (Manganas et al. 2007, Pereira et al. 2007).

Die dieser Arbeit vorangestellte Aussage von Santiago Ramón y Cajal konnte bereits 1963 widerlegt werden. Seitdem wächst das Wissen über die Regulation und Funktion der adulten Neurogenese stetig. Die weitere Charakterisierung der molekularen und zellulären Regulationsmechanismen adulter Neurogenese und neuronaler Stammzellen ist sehr wichtig für das Verständnis verschiedener neurodegenerativer Krankheiten und die Entwicklung von Therapien auch nach traumatischen Ereignissen im ZNS wie Schlaganfällen oder Querschnittslähmungen. In diesen Fällen könnte das Wachstum neuer Neurone z. B. aus neuronalen Stammzellen neue Perspektiven schaffen.

5. Zusammenfassung

Der adulte Hippocampus spielt eine zentrale Rolle bei Lernvorgängen und bei der Ausbildung des räumlichen Gedächtnisses. Biologische Grundlage dieser Eigenschaften ist vor allem seine ausgeprägte Plastizität. Beispielsweise ist der Gyrus dentatus als Teil des Hippocampus eine von nur zwei Regionen des Zentralnervensystems (ZNS), in der adulte Neurogenese stattfindet, also zeitlebens Nervenzellen aus einem persistierenden Stammzellpool neu gebildet und funktionell integriert werden.

Bisher ist nur unvollständig untersucht, welche molekularen Steuerungsmechanismen der adulten Neubildung von Nervenzellen im Gyrus dentatus, ihrer Differenzierung und der Ausbildung spezifischer Verschaltungen zugrunde liegen. Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass neben extrazellulären Signalmolekülen die Aktivität von Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle spielt. In Vorarbeiten unserer eigenen Arbeitsgruppe konnte erstmals gezeigt werden, dass der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Bcl11b/Ctip2 [B-cell leukemia 11b/COUP(chicken ovalbumin upstream promotor)-transcription factor interacting protein 2] essentielle Funktionen bei der postnatalen Entwicklung des Gyrus dentatus besitzt: die Deletion von Bcl11b/Ctip2 in der Maus führt unter anderem zu schweren Defekten bei der postnatalen Neurogenese, bei der Differenzierung und dem Überleben neugebildeter Nervenzellen und bei deren funktioneller Integration sowie zu hochgradig eingeschränktem räumlichen Lernvermögen beim mutanten Tier. Während die postnatale Entwicklung des Gyrus dentatus mit ca. acht Wochen abgeschlossen ist, bleibt Bcl11b/Ctip2 über diesen Zeitpunkt hinaus zeitlebens im Gyrus dentatus exprimiert. Hieraus ergab sich die Frage, ob Bcl11b/Ctip2 im adulten Hippocampus Funktionen besitzt und, falls ja, um welche es sich dabei handelt. Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Funktionen von Bcl11b während der adulten Neurogenese des Gyrus dentatus zu bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Gyrus dentatus sechs Monate alter Mäuse mit vorderhirnspezifischer Deletion des Bcl11b/Ctip2-Gens und von Kontrolltieren vergleichend untersucht: Der Funktionsverlust von Bcl11b/Ctip2 führt zu einer signifikanten Verkleinerung des Gyrus dentatus und einer Reduktion der Körnerzellzahl im adulten Tier. Mittels BrdU-Markierungen sowie der Analyse von Apoptose- und Progenitorzellmarkern konnte nachgewiesen werden, dass die Reduktion von Körnerzellneuronen auf einer Abnahme der Proliferationsrate Bcl11b/Ctip2-mutanter Progenitorzellen beruht. Demgegenüber sind die Größe des Progenitorpools sowie das

zelluläre Überleben im mutanten Gyrus dentatus unverändert. Durch die Kombination von BrdU-Markierungen mit der Koexpressionsanalyse phasenspezifischer Differenzierungsmarker (fate mapping) wurde außerdem das Differenzierungsverhalten adult geborener Neurone im Gyrus dentatus analysiert. Die Befunde deuten darauf hin, dass Bcl11b/Ctip2 zum einen an der Regulation der frühen Differenzierung adult entstandener Neurone und dem Übergang in das postmitotische Stadium beteiligt ist, zum anderen an der späten Differenzierung, die durch den Übergang von der unreifen zur reifen Körnerzelle gekennzeichnet ist.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit im Mausmodell erstmals nachgewiesen werden, dass der Transkriptionsfaktor Bcl11b/Ctip2 essentielle Funktionen bei der adulten Neurogenese im Hippocampus besitzt.

In Zukunft dürfte es z. B. interessant sein zu untersuchen, welchen Einfluss der Verlust von Bcl11b/Ctip2 auf die Funktionen des adulten Hippocampus, d. h. auf das Lernverhalten und auf die synaptische Plastizität besitzt. Dies könnte z. B. mit Hilfe einer induzierbaren konditionellen Mutation von Bcl11b/Ctip2 in der Maus selektiv weiter untersucht werden.

Mit zunehmendem Alter nimmt adulte Neurogenese im Gyrus dentatus kontinuierlich ab. Störungen der adulten Neurogenese werden außerdem bei neuropsychiatrischen Erkrankungen (z. B. Morbus Alzheimer, Schizophrenie) beobachtet. Die exakte Bestimmung der Funktionen von Bcl11b/Ctip2 im adulten Hippocampus kann daher perspektivisch auch zu einem besseren Verständnis von Alterungsprozessen und wichtiger Erkrankungen des ZNS beitragen.

6. Literaturverzeichnis

1. Aimone J B, Deng W, Gage F H: Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron*, 70: 589-596 (2011)
2. Allen E: The cessation of the mitosis in the central nervous system of the albino rat. *J. Comp. Neurol.*, 22: 547-568 (1912)
3. Altman J: Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat.Rec.*, 145: 573-591 (1963)
4. Altman J, Bayer S A: Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J.Comp.Neurol.*, 301: 365-381 (1990)
5. Altman J, Das G D: Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J.Comp.Neurol.*, 124: 319-335 (1965)
6. Amaral D G, Witter M P: The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31: 571-591 (1989)
7. Arlotta P, Molyneaux B J, Chen J, Inoue J, Kominami R, Macklis J D: Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron*, 45: 207-221 (2005)
8. Arlotta P, Molyneaux B J, Jabaudon D, Yoshida Y, Macklis J D: Ctip2 controls the differentiation of medium spiny neurons and the establishment of the cellular architecture of the striatum. *J.Neurosci.*, 28: 622-632 (2008)
9. Avram D, Fields A, Pretty On Top K, Nevriy D J, Ishmael J E, Leid M: Isolation of a novel family of C(2)H(2) zinc finger proteins implicated in transcriptional repression mediated by chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) orphan nuclear receptors. *J.Biol.Chem.*, 275: 10315-10322 (2000)
10. Ben Abdallah N M, Slomianka L, Vyssotski A L, Lipp H P: Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice. *Neurobiol.Aging*, 31: 151-161 (2010)
11. Biebl M, Cooper C M, Winkler J, Kuhn H G: Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci.Lett.*, 291: 17-20 (2000)
12. Bonaguidi M A, Wheeler M A, Shapiro J S, Stadel R P, Sun G J, Ming G L, Song H: In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*, 145: 1142-1155 (2011)
13. Brandt M D, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der Behrens W, Kempermann G: Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol.Cell.Neurosci.*, 24: 603-613 (2003)

14. Cameron H A, Woolley C S, McEwen B S, Gould E: Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, 56: 337-344 (1993)
15. Cherrier T, Suzanne S, Redel L, Calao M, Marban C, Samah B, Mukerjee R, Schwartz C, Gras G, Sawaya B E, Zeichner S L, Aunis D, Van Lint C, Rohr O: p21(WAF1) gene promoter is epigenetically silenced by CTIP2 and SUV39H1. *Oncogene*, 28: 3380-3389 (2009)
16. Cooper-Kuhn C M, Kuhn H G: Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain. *Brain Res.Dev.Brain Res.*, 134: 13-21 (2002)
17. Crusio W E, Schwegler H: Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice. *Behav.Brain Funct.*, 1: 3 (2005)
18. Dayer A G, Ford A A, Cleaver K M, Yassaee M, Cameron H A: Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J.Comp.Neurol.*, 460: 563-572 (2003)
19. Desplats P A, Lambert J R, Thomas E A: Functional roles for the striatal-enriched transcription factor, Bcl11b, in the control of striatal gene expression and transcriptional dysregulation in Huntington's disease. *Neurobiol.Dis.*, 31: 298-308 (2008)
20. Duman R S: Neural plasticity: consequences of stress and actions of antidepressant treatment. *Dialogues Clin.Neurosci.*, 6: 157-169 (2004)
21. Dyer M A, Cepko C L: p57(Kip2) regulates progenitor cell proliferation and amacrine interneuron development in the mouse retina. *Development*, 127: 3593-3605 (2000)
22. Eisch A J, Cameron H A, Encinas J M, Meltzer L A, Ming G L, Overstreet-Wadiche L S: Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: hope or hype? *J.Neurosci.*, 28: 11785-11791 (2008)
23. Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza R A, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner R F: Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J.Neurosci.*, 25: 247-251 (2005)
24. Enomoto T, Ohmoto M, Iwata T, Uno A, Saitou M, Yamaguchi T, Kominami R, Matsumoto I, Hirota J: Bcl11b/Ctip2 controls the differentiation of vomeronasal sensory neurons in mice. *J.Neurosci.*, 31: 10159-10173 (2011)
25. Eriksson P S, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn A M, Nordborg C, Peterson D A, Gage F H: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat.Med.*, 4: 1313-1317 (1998)
26. Favaro R, Valotta M, Ferri A L, Latorre E, Mariani J, Giachino C, Lancini C, Tosetti V, Ottolenghi S, Taylor V, Nicolis S K: Hippocampal development and neural stem

- cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nat.Neurosci.*, 12: 1248-1256 (2009)
27. Ferri A L, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, Ottolenghi S, Pandolfi P P, Sala M, DeBiasi S, Nicolis S K: Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*, 131: 3805-3819 (2004)
28. Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet M C, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell S K, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J: Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, 23: 247-256 (1999)
29. Freund T F, Buzsaki G: Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6: 347-470 (1996)
30. Gao Z, Ure K, Ables J L, Lagace D C, Nave K A, Goebbels S, Eisch A J, Hsieh J: Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat.Neurosci.*, 12: 1090-1092 (2009)
31. Garrod D, Chidgey M: Desmosome structure, composition and function. *Biochim.Biophys.Acta*, 1778: 572-587 (2008)
32. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S A: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J.Cell Biol.*, 119: 493-501 (1992)
33. Ge S, Yang C H, Hsu K S, Ming G L, Song H: A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*, 54: 559-566 (2007)
34. Gleeson J G, Lin P T, Flanagan L A, Walsh C A: Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, 23: 257-271 (1999)
35. Goldman S A, Nottebohm F: Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 80: 2390-2394 (1983)
36. Golonzhka O, Liang X, Messaddeq N, Bornert J M, Campbell A L, Metzger D, Chambon P, Ganguli-Indra G, Leid M, Indra A K: Dual role of COUP-TF-interacting protein 2 in epidermal homeostasis and permeability barrier formation. *J.Invest.Dermatol.*, 129: 1459-1470 (2009)
37. Gorski J A, Talley T, Qiu M, Puelles L, Rubenstein J L, Jones K R: Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J.Neurosci.*, 22: 6309-6314 (2002)
38. Gould E, Cameron H A, Daniels D C, Woolley C S, McEwen B S: Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J.Neurosci.*, 12: 3642-3650 (1992)

39. Gould E, Reeves A J, Fallah M, Tanapat P, Gross C G, Fuchs E: Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96: 5263-5267 (1999)
40. Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L: SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*, 39: 749-765 (2003)
41. Green K J, Kowalczyk A P, Bornslaeger E A, Palka H L, Norvell S M: Desmosomes: integrators of mechanical integrity in tissues. *Biol.Bull.*, 194: 374-6; discussion 376-7 (1998)
42. Gu H, Marth J D, Orban P C, Mossmann H, Rajewsky K: Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, 265: 103-106 (1994)
43. Healy S D, Gwinner E, Krebs J R: Hippocampal volume in migratory and non-migratory warblers: effects of age and experience. *Behav.Brain Res.*, 81: 61-68 (1996)
44. Hodge R D, Kowalczyk T D, Wolf S A, Encinas J M, Rippey C, Enikolopov G, Kempermann G, Hevner R F: Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: *Tbr2* expression and coordinate regulation of neuronal output. *J.Neurosci.*, 28: 3707-3717 (2008)
45. Hsieh J: Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes Dev.*, 26: 1010-1021 (2012)
46. Huang X, Chen S, Shen Q, Chen S, Yang L, Grabarczyk P, Przybylski G K, Schmidt C A, Li Y: Down regulation of *BCL11B* expression inhibits proliferation and induces apoptosis in malignant T cells by *BCL11B*-935-siRNA. *Hematology*, 16: 236-242 (2011)
47. Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R: Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat.Neurosci.*, 11: 1153-1161 (2008)
48. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao X O, Xie L, Greenberg D A: Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99: 11946-11950 (2002)
49. Joseph B, Wallen-Mackenzie A, Benoit G, Murata T, Joodmardi E, Okret S, Perlmann T: p57(Kip2) cooperates with *Nurr1* in developing dopamine cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100: 15619-15624 (2003)
50. Kaplan M S, Hinds J W: Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 197: 1092-1094 (1977)
51. Kapuscinski J: DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech.Histochem.*, 70: 220-233 (1995)
52. Karalay O, Doberauer K, Vadodaria K C, Knobloch M, Berti L, Miquelajauregui A, Schwark M, Jagasia R, Taketo M M, Tarabykin V, Lie D C, Jessberger S: Prospero-

- related homeobox 1 gene (*Prox1*) is regulated by canonical Wnt signaling and has a stage-specific role in adult hippocampal neurogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 108: 5807-5812 (2011)
53. Kempermann G: The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? *Trends Neurosci.*, 31: 163-169 (2008)
54. Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage F H: Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*, 130: 391-399 (2003)
55. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G: Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.*, 27: 447-452 (2004)
56. Kempermann G, Kuhn H G, Gage F H: Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 94: 10409-10414 (1997a)
57. Kempermann G, Kuhn H G, Gage F H: More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386: 493-495 (1997b)
58. Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer R P, Horvat V, Volk B, Kempermann G: Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One*, 5: e8809 (2010)
59. Kohl Z, Winner B, Ubhi K, Rockenstein E, Mante M, Munch M, Barlow C, Carter T, Masliah E, Winkler J: Fluoxetine rescues impaired hippocampal neurogenesis in a transgenic A53T synuclein mouse model. *Eur.J.Neurosci.*, 35: 10-19 (2012)
60. Komitova M, Eriksson P S: Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neurosci.Lett.*, 369: 24-27 (2004)
61. Kornack D R, Rakic P: Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96: 5768-5773 (1999)
62. Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt M D, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G: Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J.Comp.Neurol.*, 467: 455-463 (2003)
63. Kuwabara T, Hsieh J, Muotri A, Yeo G, Warashina M, Lie D C, Moore L, Nakashima K, Asashima M, Gage F H: Wnt-mediated activation of *NeuroD1* and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat.Neurosci.*, 12: 1097-1105 (2009)
64. Laplagne D A, Esposito M S, Piatti V C, Morgenstern N A, Zhao C, van Praag H, Gage F H, Schinder A F: Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol.*, 4: e409 (2006)
65. Laplagne D A, Kamienkowski J E, Esposito M S, Piatti V C, Zhao C, Gage F H, Schinder A F: Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *Eur.J.Neurosci.*, 25: 2973-2981 (2007)

66. Lavado A, Lagutin O V, Chow L M, Baker S J, Oliver G: Prox1 is required for granule cell maturation and intermediate progenitor maintenance during brain neurogenesis. *PLoS Biol.*, 8: e1000460 (2010)
67. Lazarov O, Mattson M P, Peterson D A, Pimplikar S W, van Praag H: When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci.*, 33: 569-579 (2010)
68. Lechler T, Fuchs E: Desmoplakin: an unexpected regulator of microtubule organization in the epidermis. *J.Cell Biol.*, 176: 147-154 (2007)
69. Leid M, Ishmael J E, Avram D, Shepherd D, Fraulob V, Dolle P: CTIP1 and CTIP2 are differentially expressed during mouse embryogenesis. *Gene Expr.Patterns*, 4: 733-739 (2004)
70. Lein E S, Zhao X, Gage F H: Defining a molecular atlas of the hippocampus using DNA microarrays and high-throughput in situ hybridization. *J.Neurosci.*, 24: 3879-3889 (2004)
71. Lesemann A, Reinel C, Huhnchen P, Pilhatsch M, Hellweg R, Klaissle P, Winter C, Steiner B: MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depression-like behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice. *Brain Res.*, 1457: 51-69 (2012)
72. Li G, Pleasure S J: Genetic regulation of dentate gyrus morphogenesis. *Prog.Brain Res.*, 163: 143-152 (2007)
73. Li G, Pleasure S J: Morphogenesis of the dentate gyrus: what we are learning from mouse mutants. *Dev.Neurosci.*, 27: 93-99 (2005)
74. Li P, Burke S, Wang J, Chen X, Ortiz M, Lee S C, Lu D, Campos L, Goulding D, Ng B L, Dougan G, Huntly B, Gottgens B, Jenkins N A, Copeland N G, Colucci F, Liu P: Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion. *Science*, 329: 85-89 (2010)
75. Liang X, Bhattacharya S, Bajaj G, Guha G, Wang Z, Jang H S, Leid M, Indra A K, Ganguli-Indra G: Delayed cutaneous wound healing and aberrant expression of hair follicle stem cell markers in mice selectively lacking Ctip2 in epidermis. *PLoS One*, 7: e29999 (2012)
76. Lie D C, Colamarino S A, Song H J, Desire L, Mira H, Consiglio A, Lein E S, Jessberger S, Lansford H, Dearie A R, Gage F H: Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, 437: 1370-1375 (2005)
77. Liu M, Pleasure S J, Collins A E, Noebels J L, Naya F J, Tsai M J, Lowenstein D H: Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 97: 865-870 (2000)
78. Liu P, Li P, Burke S: Critical roles of Bcl11b in T-cell development and maintenance of T-cell identity. *Immunol.Rev.*, 238: 138-149 (2010)

79. Lorente de N6 R: Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.*, 46: 113-177 (1934)
80. Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Gotz M, Haas C A, Kempermann G, Taylor V, Giachino C: Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell.Stem Cell.*, 6: 445-456 (2010)
81. Luu P, Sill O C, Gao L, Becker S, Wojtowicz J M, Smith D M: The role of adult hippocampal neurogenesis in reducing interference. *Behav.Neurosci.*, 126: 381-391 (2012)
82. Maguire E A, Spiers H J, Good C D, Hartley T, Frackowiak R S, Burgess N: Navigation expertise and the human hippocampus: a structural brain imaging analysis. *Hippocampus*, 13: 250-259 (2003)
83. Manganas L N, Zhang X, Li Y, Hazel R D, Smith S D, Wagshul M E, Henn F, Benveniste H, Djuric P M, Enikolopov G, Maletic-Savatic M: Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science*, 318: 980-985 (2007)
84. Mathews E A, Morgenstern N A, Piatti V C, Zhao C, Jessberger S, Schinder A F, Gage F H: A distinctive layering pattern of mouse dentate granule cells is generated by developmental and adult neurogenesis. *J.Comp.Neurol.*, 518: 4479-4490 (2010)
85. McDonald H Y, Wojtowicz J M: Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. *Neurosci.Lett.*, 385: 70-75 (2005)
86. Ming G L, Song H: Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70: 687-702 (2011)
87. Miyata T, Maeda T, Lee J E: NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev.*, 13: 1647-1652 (1999)
88. Mu Y, Gage F H: Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol.Neurodegener*, 6: 85 (2011)
89. Nakashiba T, Cushman J D, Pelkey K A, Renaudineau S, Buhl D L, McHugh T J, Rodriguez Barrera V, Chittajallu R, Iwamoto K S, McBain C J, Fanselow M S, Tonegawa S: Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell*, 149: 188-201 (2012)
90. Palmer T D, Willhoite A R, Gage F H: Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J.Comp.Neurol.*, 425: 479-494 (2000)
91. Parent J M, Lowenstein D H: Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? *Prog.Brain Res.*, 135: 121-131 (2002)
92. Pereira A C, Huddlestone D E, Brickman A M, Sosunov A A, Hen R, McKhann G M, Sloan R, Gage F H, Brown T R, Small S A: An in vivo correlate of exercise-induced

- neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 104: 5638-5643 (2007)
93. Qu Q, Sun G, Li W, Yang S, Ye P, Zhao C, Yu R T, Gage F H, Evans R M, Shi Y: Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/beta-catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal. *Nat.Cell Biol.*, 12: 31-40; sup pp 1-9 (2010)
94. Reif A, Fritzen S, Finger M, Strobel A, Lauer M, Schmitt A, Lesch K P: Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol.Psychiatry*, 11: 514-522 (2006)
95. Ren S, Li M, Cai H, Hudgins S, Furth P A: A simplified method to prepare PCR template DNA for screening of transgenic and knockout mice. *Contemp.Top.Lab.Anim.Sci.*, 40: 27-30 (2001)
96. Romer B, Krebs J, Overall R W, Fabel K, Babu H, Overstreet-Wadiche L, Brandt M D, Williams R W, Jessberger S, Kempermann G: Adult hippocampal neurogenesis and plasticity in the infrapyramidal bundle of the mossy fiber projection: I. Co-regulation by activity. *Front.Neurosci.*, 5: 107 (2011)
97. Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri M E, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, Caleo M: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur.J.Neurosci.*, 24: 1850-1856 (2006)
98. Sahay A, Hen R: Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat.Neurosci.*, 10: 1110-1115 (2007)
99. Saiki R K, Scharf S, Faloona F, Mullis K B, Horn G T, Erlich H A, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354 (1985)
100. Sambrook J, Russell D W: *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 11803-2500 (2001)
101. Schanzer A, Wachs F P, Wilhelm D, Acker T, Cooper-Kuhn C, Beck H, Winkler J, Aigner L, Plate K H, Kuhn H G: Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol.*, 14: 237-248 (2004)
102. Schwab M H, Bartholomae A, Heimrich B, Feldmeyer D, Druffel-Augustin S, Goebbels S, Naya F J, Zhao S, Frotscher M, Tsai M J, Nave K A: Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/Neuro D) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus. *J.Neurosci.*, 20: 3714-3724 (2000)
103. Schwegler H, Mueller G G, Crusio W E, Szemes L, Seress L: Hippocampal morphology and spatially related behavior in Long-Evans and CFY rats. *Hippocampus*, 3: 1-7 (1993)
104. Seattle (WA): Allen Institute for Brain Science: Available: http://mouse.brain-map.org/experiment/thumbnails/100048576?image_type=atlas [27.03.2009]

105. Shen K, Cowan C W: Guidance Molecules in Synapse Formation and Plasticity. Cold Spring Harb Perspect.Biol., 2: (2010)
106. Simon R, Brylka H, Schwegler H, Venkataramanappa S, Andratschke J, Wiegrefe C, Liu P, Fuchs E, Jenkins N A, Copeland N G, Birchmeier C, Britsch S: A dual function of Bcl11b/Ctip2 in hippocampal neurogenesis. EMBO J., (2012)
107. Soriano E, Frotscher M: A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. Brain Res., 503: 170-174 (1989)
108. Squire L R, Stark C E, Clark R E: The medial temporal lobe. Annu.Rev.Neurosci., 27: 279-306 (2004)
109. Sun J, Sun J, Ming G L, Song H: Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult mammalian brain. Eur.J.Neurosci., 33: 1087-1093 (2011)
110. Swanson L W, Sawchenko P E, Cowan W M: Evidence for collateral projections by neurons in Ammon's horn, the dentate gyrus, and the subiculum: a multiple retrograde labeling study in the rat. J.Neurosci., 1: 548-559 (1981)
111. Tang B, Di Lena P, Schaffer L, Head S R, Baldi P, Thomas E A: Genome-wide identification of Bcl11b gene targets reveals role in brain-derived neurotrophic factor signaling. PLoS One, 6: e23691 (2011)
112. Toni N, Laplagne D A, Zhao C, Lombardi G, Ribak C E, Gage F H, Schinder A F: Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. Nat.Neurosci., 11: 901-907 (2008)
113. Topark-Ngarm A, Golonzhka O, Peterson V J, Barrett B, Jr, Martinez B, Crofoot K, Filtz T M, Leid M: CTIP2 associates with the NuRD complex on the promoter of p57KIP2, a newly identified CTIP2 target gene. J.Biol.Chem., 281: 32272-32283 (2006)
114. Treves A, Rolls E T: Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. Hippocampus, 4: 374-391 (1994)
115. van Praag H, Kempermann G, Gage F H: Neural consequences of environmental enrichment. Nat.Rev.Neurosci., 1: 191-198 (2000)
116. van Praag H, Kempermann G, Gage F H: Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. Nat.Neurosci., 2: 266-270 (1999)
117. Wakabayashi Y, Inoue J, Takahashi Y, Matsuki A, Kosugi-Okano H, Shinbo T, Mishima Y, Niwa O, Kominami R: Homozygous deletions and point mutations of the Rit1/Bcl11b gene in gamma-ray induced mouse thymic lymphomas. Biochem.Biophys.Res.Comm., 301: 598-603 (2003a)
118. Wakabayashi Y, Watanabe H, Inoue J, Takeda N, Sakata J, Mishima Y, Hitomi J, Yamamoto T, Utsuyama M, Niwa O, Aizawa S, Kominami R: Bcl11b is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes. Nat.Immunol., 4: 533-539 (2003b)

119. Waterhouse E G, An J J, Orefice L L, Baydyuk M, Liao G Y, Zheng K, Lu B, Xu B: BDNF Promotes Differentiation and Maturation of Adult-born Neurons through GABAergic Transmission. *J.Neurosci.*, 32: 14318-14330 (2012)
120. Wegner M: From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res.*, 27: 1409-1420 (1999)
121. Winner B, Kohl Z, Gage F H: Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur.J.Neurosci.*, 33: 1139-1151 (2011)
122. Wolfe S A, Nekludova L, Pabo C O: DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.*, 29: 183-212 (2000)
123. Wurmser A E, Palmer T D, Gage F H: Neuroscience. Cellular interactions in the stem cell niche. *Science*, 304: 1253-1255 (2004)
124. Zhao C, Teng E M, Summers R G, Jr, Ming G L, Gage F H: Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J.Neurosci.*, 26: 3-11 (2006)

III ANHANG

Abbildungsverzeichnis

A Abbildungen

Abb. 1	Hippocampus mit Verschaltungskette und adulter Neurogenese	3
Abb. 2	Entwicklung des Gyrus dentatus und Entstehung der neurogenen Nische	4
Abb. 3	Schematische Darstellung hippocampaler adulter Neurogenese und neuronaler Differenzierungsmarker	7
Abb. 4	Mutagenese des Bcl11b-Gens	20
Abb. 5	Bcl11b-Expression und konditionelle Mutation im Gyrus dentatus	32
Abb. 6	Analyse der Körnerzellzahl und Fläche des Gyrus dentatus	34
Abb. 7	Proliferation im Gyrus dentatus sechs Monate alter Mäuse	37
Abb. 8	Detektion apoptotischer Zellen	38
Abb. 9	Detektion Sox2- und Tbr2-positiver Zellen im Gyrus dentatus sechs Monate alter Kontrolltiere und Mutanten	40
Abb. 10	Koexpressionsanalyse in sechs Monate alten Kontrolltieren von Bcl11b mit Progenitorzellmarkern	41
Abb. 11	Schematische Darstellung neuronaler Differenzierungsmarker	43
Abb. 12	Koexpressionsanalyse BrdU-positiver Zellen in sechs Monate alten Bcl11b-Mutanten und Kontrolltieren	47
Abb. 13	Graphische Darstellung der Analyse der Differenzierungsstadien adult geborener Neurone im Gyrus dentatus sechs Monate alter Mäuse	51

B Tabellen

Tab. 1	Verwendete Lösungen und Reagenzien	15
Tab. 2	Eingesetzte Geräte	17
Tab. 3	Verwendete Oligonukleotide	17
Tab. 4	Verwendete primäre Antikörper	18

IV DANKSAGUNG

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben –

Prof. Dr. Stefan Britsch für die interessante Fragestellung, die Betreuung und die sorgfältigen Korrekturen meiner Doktorarbeit,

Dr. Ruth Simon für die Betreuung und enge Begleitung des Projekts in allen Phasen sowie für die Einarbeitung in Labormethoden und kulinarische Aufmunterungen,

Jacqueline Andratschke, Sachi Takenaka, Nicola Martin und Anne Lehner für die Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten und die schöne Zeit im Labor,

Herbert Schwegler, der sich bereit erklärt hat, das Zweitgutachten zu übernehmen,

meinen Eltern und Großeltern, die mich während meines gesamten Studiums unterstützt und mir immer wieder das normale Leben gezeigt haben,

und allen anderen, die mich in dieser Zeit begleitet haben!

V LEBENSLAUF

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.