

Leibniz-Institut für Altersforschung
Fritz-Lipmann-Institut e.V. (FLI)

Analysen zur Regulation der cerebellaren Bergmann Glia-Differenzierung durch Thyroidhormone

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biochemikerin

Sigrun Horn

geboren am 21.03.1973 in Schmalkalden

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2005 bis Oktober 2008 am Leibniz-Institut für Altersforschung / Fritz-Lipmann-Institut e.V. (FLI) unter der Betreuung von Dr. Heike Heuer angefertigt.

Gutachter der Arbeit:

Dr. habil. Christoph Kaether, FLI Jena

Prof. Dr. Stephan Baader, Universität Bonn

Prof. Dr. Walter Müller, Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Disputation: 15. Januar 2009

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur erstellt habe. Weiterhin erkläre ich, dass die in der Arbeit enthaltenen Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernder Bildbearbeitung unterzogen wurden.

Ich versichere, dass diese Dissertation nicht als Diplomarbeit oder ähnliches verwendet und abgesehen von den am Ende angegebenen Teilveröffentlichungen nicht publiziert wurde. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena ist mir bekannt.

Jena, den 14.10.2008

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.

Sir Isaac Newton
(Mathematiker, Physiker, Astronom, 1643-1727)

Kurzzusammenfassung

Thyroidhormone spielen eine bedeutende Rolle für die Gehirnentwicklung. Das wird besonders bei Patienten sichtbar, die unter unbehandelter kongenitaler Hypothyreose leiden. Neben Symptomen wie Wachstumsstörung, Spastizität und geistiger Retardierung zeigen diese Patienten eine verringerte grob- und feinmotorische Koordination, da ein perinataler Mangel an Thyroidhormonen u.a. auch zu schweren Entwicklungsstörungen des Cerebellums, dem Kontrollzentrum für Motorik, führt. Ein Hauptmerkmal der kongenitalen Hypothyreose ist die auffällige Reduzierung der dendritischen Differenzierung der Purkinjezelle, dem Hauptneuron im Kleinhirnkortex.

Die Dendriten der Purkinjezellen sind strukturell und funktionell sehr eng mit den Radialfasern der Bergmann Glia und deren seitlichen Fortsätzen assoziiert. Aus diesem Grund ist zu erwarten, dass es unter hypothyroiden Bedingungen ebenfalls zu einer beeinträchtigten Bergmann Glia-Differenzierung kommt. Aber über die Bedeutung von Thyroidhormonen für die korrekte Entwicklung und Funktion der Bergmann Gliazellen sind bis jetzt nur unzureichende Informationen verfügbar.

Ein ideales Tiermodell, um die Wirkung von Schilddrüsenhormonen im Cerebellum untersuchen zu können, stellen Pax8^{-/-} Mäuse dar. Sie werden ohne funktionelle Schilddrüse geboren und entwickeln sich daher postnatal komplett unter athyroiden Bedingungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde immunhistochemisch die Differenzierung der Bergmann Gliazellen im Cerebellum von Pax8^{-/-} und entsprechenden Wildtypmäusen untersucht. Zur besseren Visualisierung der Gliazellmorphologie wird GFP im Gehirn dieser Mäuse unter einem gliaspezifischen Promotor exprimiert. Mit diesem Modell konnte erstmalig gezeigt werden, dass in der Pax8^{-/-} Maus eine deutliche Reduzierung der Ausbildung der lateralen Bergmann Glia-Fortsätze zu beobachten war, während sowohl die Anzahl der Bergmann Gliazellen als auch die Ausbildung ihrer GFAP-positiven Radialfasern unter hypothyroiden Bedingungen nicht beeinflusst waren. Das weist darauf hin, dass die Reifung und Differenzierung dieser spezialisierten Astrozyten, genau wie die Purkinjezellen, ebenfalls von einer ausreichenden postnatalen Versorgung mit Thyroidhormonen abhängig sind.

Da in der Vergangenheit Studien zur Thyroidhormon-abhängigen Differenzierung des Cerebellums meist auf die Neurone fokussiert waren, sind molekulare Mechanismen, durch die Thyroidhormone auf das Zellzytoskelett und damit auf die Ausbildung der seitlichen Bergmann Glia-Fortsätze wirken, bis heute weitgehend unbekannt. Aus diesem Grund wurden verschiedene Mitglieder der Genfamilien der Septine und der borg näher analysiert. Beide Genfamilien sind in Signalwege involviert, die auf die Umstrukturierung des Zytoskeletts von Zellen einwirken können. Bei den Analysen konnte je ein Familienmitglied identifiziert werden, das eine von Thyroidhormonen abhängige Expression im Cerebellum aufwies: Septin-4, ein Bergmann Glia-spezifisches Zytoskelettprotein und borg4 (*binder of Rho GTPases 4*), ein in Bergmann Gliazellen exprimierter putativer Regulator der Organisation von Septinfilamenten. Für diese beiden Genprodukte wurden nähere Expressionsstudien im Mauserebellum durchgeführt.

Hierbei konnte für beide Kandidatengene eine beachtliche Reduzierung der mRNA- und Protein-Menge im Pax8^{-/-} Kleinhirn festgestellt werden. Die Substitution der

Tiere mit Thyroxin normalisierte das Expressionsniveau beider Gene auf das der Wildtypmaus. Eine entscheidende Beteiligung an der Thyroidhormon-abhängigen Expression von Septin-4 und borg4 im Cerebellum wurde für den Thyroidhormon-Rezeptor $\alpha 1$ nachgewiesen. Darüber hinaus konnte mittels Immunopräzipitation und Immunzytochemie zum ersten Mal dokumentiert werden, dass Septin-4 und borg4 *in-vitro* miteinander interagieren.

Weiterhin wurde eine direkte Assoziation von Septin-4 mit dem Aktinzytoskelett der Bergmann Gliazellen durch Membranfraktionierung und Immunzytochemie gezeigt. Ein anderes sehr interessantes und neues Resultat dieser Arbeit demonstriert, dass borg4, das nicht direkt mit Aktinfilamenten interagiert, aber eine überlappende Lokalisierung mit α -Tubulin zeigt, in der Lage ist, regulatorisch auf die Zellmorphologie einzuwirken. Sowohl transformierte Zellen als auch primäre cerebellare Astrozyten, die transient mit borg4 transfiziert wurden, bildeten spezifisch lange, dünne Zellausläufer aus.

Septin-4 und borg4 sind Mitglieder von Genfamilien, die in Signalkaskaden involviert sind, welche regulatorisch die Umstrukturierung des Zellzytoskeletts beeinflussen. Beide Genprodukte werden in Abhängigkeit von Schilddrüsenhormonen in Bergmann Gliazellen exprimiert und interagieren sowohl miteinander als auch mit dem Zytoskelett. Das lässt den Schluss zu, dass bei der, im Rahmen dieser Arbeit, gezeigten Thyroidhormon-abhängigen Bergmann Glia-Differenzierung im Cerebellum dem borg4/Septin-4 Signalweg im Zusammenspiel mit anderen regulatorischen Proteinen eine wesentliche Funktion zukommt.

Abstract

Thyroid hormones play an important role during brain development. This becomes most evident in patients suffering from untreated congenital hypothyroidism. In addition to symptoms such as spasticity, retarded growth and mental retardation, patients exhibit reduced gross and fine motor skills. A prominent hallmark of congenital hypothyroidism is a striking reduction of dendritic growth and branching of Purkinje cells, the principle neurons of the cerebellar cortex. Since Purkinje cell dendrites are structurally and functionally closely associated with Bergmann glia radial fibers and side processes one would expect an impaired Bergmann glia differentiation under hypothyroid conditions as well. Yet, information as to the importance of thyroid hormones for proper Bergmann glia development and function are still rather limited.

For studying thyroid hormone action in the cerebellum, Pax8^{-/-} mice represent an ideal animal model since these mice are born without a functional thyroid gland and are therefore completely athyroid during their postnatal life. For analyzing Bergmann glia morphology under athyroid conditions Pax8^{-/-} mice were intercrossed with transgenic animals expressing eGFP under a glia specific promoter.

While the number of Bergmann glia cells as well as the formation of their GFAP-positive fibers were not affected by the absence of thyroid hormones, a striking reduction in the formation of the lateral Bergmann glia processes was observed in Pax8^{-/-} mice compared to control mice indicating that the maturation and differentiation of these specialized astrocytes, just like the Purkinje cells, depends on proper thyroid hormone supply as well.

In order to elucidate the molecular mechanisms by which thyroid hormone regulates the formation of the Bergmann glia lamellate processes we analyzed the expression profile of septin and borg family members as components that are putatively involved in cytoskeleton remodeling. In these studies a member of each family was identified, which showed a thyroid hormone dependent expression specifically in Bergmann glia cells: septin-4 a Bergmann glia specific cytoskeleton protein and borg4 (binder of Rho GTPases 4), which act as a putative regulator of septin assembly.

Further analysis revealed that in the Pax8^{-/-} cerebellum the transcript and protein levels of both gene products were considerably down regulated while thyroid hormone treatment of these animals restored normal septin-4 and borg4 expression levels. In addition it could be shown that this response is mediated via the thyroid hormone receptor TR α 1. Moreover, immunoprecipitation studies and immunocytochemical analysis revealed that septin-4 and borg4 interact with each other *in-vitro* and by membrane fractionation and immunocytochemistry a direct association of septin-4 with the Bergmann glia cytoskeleton could be demonstrated. Borg4 did not directly interact with actin but exhibited an overlapping localization with α -tubulin. Most intriguingly over-expression of borg4 in primary cerebellar astrocytes resulted in pronounced alterations of the cellular shape and led to the formation of long filopodia like extensions, indicating that borg4 indeed is important for thyroid hormone induced cytoskeleton remodeling.

In summary: septin-4 and borg4 are members of gene families which are involved in signaling cascades influencing regulatory processes for reorganization of the cell

cytoskeleton. Both gene products are thyroid hormone dependently expressed in Bergmann glia cells and can interact with each other and the cytoskeleton. We therefore speculate that a septin-4 / borg4 signaling pathway may play a significant role in the thyroid hormone dependent development and differentiation of Bergmann glia cells.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
1.1 Das endokrine System	1
1.2 Thyroidhormone	2
1.3 Kongenitale Hypothyreose	4
1.4 Die Pax8 ^{-/-} Maus als perfektes Tiermodell für die kongenitale Hypothyreose	4
1.5 Thyroidhormone und das Gehirn	5
1.6 Das Cerebellum	7
1.6.1 Purkinjenzellen und Bergmann Gliazellen	7
1.6.2 Thyroidhormone und das Cerebellum	9
1.7 Thyroidhormon-Rezeptoren	10
1.8 Putative Zielgene der Thyroidhormon-Wirkung im Cerebellum	12
1.8.1 Septine	12
1.8.2 Der Glutamattransporter GLAST als putativer Interaktionspartner von Septinen	13
1.8.3 borg (<i>binder of Rho GTPases</i>) als putative Interaktionspartner von Septinen	13
1.9 Zielstellung der Arbeit	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Versuchstiere	16
2.2 Zellkultur	17
2.2.1 Transformierte Zelllinien	18
2.2.2 Primärzellkultur	18
2.2.3 Transfektion	19
2.2.4 Zellmorphologie-Quantifizierung transfizierter Zellen	19
2.3 Plasmide	19
2.4 <i>In-Situ</i> Hybridisierung	20
2.5 Quantitative Real-Time-PCR	22
2.6 Herstellung eines anti-borg4 Antikörpers	22
2.7 Proteinanalyse	23
2.7.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese / Western-Blot	23
2.7.2 Dephosphorylierung borg4	24
2.7.3 Immunopräzipitation / Koimmunopräzipitation	24
2.7.4 Membranfraktionierung	25
2.8 Immunzytochemie	25
2.9 Immunhistochemie	26
2.9.1 Vibratonschnitte	26

2.9.2 Kryostatschnitte	26
2.10 TUNEL-Apoptose-Assay	27
2.11 Organotypische Schnittkulturen	28
2.12 Mikroskopie	28
2.13 Statistische Analyse	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die Kleinhirnentwicklung der Maus	29
3.1.1 Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die Differenzierung der Purkinjezellen	29
3.1.2 Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die Entwicklung der Bergmann Gliazellen	30
3.1.3 Thyroidhormone wirken direkt auf kultivierte Astrozyten . . .	37
3.2 Analyse von Bergmann Glia-spezifischen Genen	40
3.2.1 Analysen zur mRNA-Expression der Zytoskelettproteine GFAP, Septin-2 und Septin-4 im eu- und athyroiden Cerebellum . . .	40
3.2.2 Analysen zur Bestimmung des Expressionsmusters von borg-Proteinen im Cerebellum der Maus	42
3.2.3 Thyroidhormon-abhängige Expression von borg4 im Cerebellum	44
3.2.4 mRNA-Expressionsanalyse des Glutamatttransporters GLAST im eu- und athyroiden Cerebellum	45
3.3 Regulation Bergmann Glia-spezifischer Gene auf Proteinebene	46
3.3.1 Herstellung eines spezifisch gegen borg4 gerichteten Antikörpers	46
3.3.2 Mengenanalyse Bergmann Glia-spezifischer Proteine im sich entwickelnden eu- und athyroiden Cerebellum der Maus	48
3.3.3 Phosphorylierung von borg4	49
3.4 Die TH-abhängige Expression von Septin-4 und borg4 wird hauptsächlich durch TR α 1 vermittelt	49
3.5 Analysen zur subzellulären Lokalisation und funktionellen Relevanz von Septin-4 und borg4	56
3.5.1 Nachweis der Interaktion von Septin-4 und borg4 <i>in-vitro</i> mittels Immunzytochemie und Koimmunopräzipitation	56
3.6 Interaktion von Septin-4 und borg4 mit dem Zytoskelett	58
3.6.1 Studien zur funktionellen Relevanz von Septin-4 und borg4 in organotypischen Schnittkulturen und primären cerebellaren Astrozyten	62
4 Diskussion	69
4.1 Thyroidhormone als essentielle Regulatoren der Bergmann Glia- und Purkinjezell-Differenzierung im Cerebellum	69
4.2 Regulation Bergmann Glia-spezifischer Gene und Proteine durch Thyroidhormone	73
4.2.1 GFAP	73
4.2.2 Septine	74
4.2.3 borg	75

4.2.4	GLAST	76
4.2.5	Thyroidhormon-Rezeptoren und TH-abhängige Regulation Bergmann Glia-spezifischer Gene	78
4.3	Interaktionen und Funktion der Bergmann Glia-spezifischen Proteine	
	Septin-4 und borg4	80
4.3.1	Septin-4 und borg4: Interaktion <i>in-vitro</i>	80
4.3.2	Septin-4 und borg4: Interaktion mit dem Zytoskelett	80
4.3.3	Einfluss von Septin-4 und borg4 auf die Zellmorphologie	82
4.4	Zusammenfassung und Perspektiven	83
	Literaturverzeichnis	85
	Danksagung	97
	Publikationen, Poster und Vorträge	98

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung / Symbol	Bedeutung
AK	Antikörper
Akt	Serin/Threonin Protein Kinase / Proteinkinase B
AS	Antiserum
BG	Bergmann Glia
bp	base pairs
BCA	Bicinchoninic acid
BH	Borg Homologie
BME	Basal Medium Eagle
borg	binder of Rho GTPases
BSA	Bovines Serum Albumin
BW	Body Weight
Cdc42	Cell division cycle 42
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
cpm	Radioaktivität: counts per minute
CRIB	Cdc42, Rac Interactive Binding
CTP	Cytidintriphosphat
D	Deiodinase
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiotreitol
E	embryonaler Zeitpunkt; Tage nach Befruchtung
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FCS	Fetal Calf Serum
g	Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
GABA	Gamma-aminobutyric Acid
GDP	Guanosindiphosphat
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
(e)GFP	(enhanced) Grün Fluoreszierendes Protein
GLAST	glutamate-aspartate transporter
GTP	Guanosintriphosphat
h	Zeit: Stunde(n)
HRP	Horse Radish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunopräzipitation
ISH	<i>In-Situ</i> Hybridisierung
Jnk	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	kilo Dalton, Masse: $1 \text{ Da} = 1,66054 \times 10^{-24} \text{ g}$

KO	Knock Out
mAK	monoklonaler Antikörper
min	Zeit: Minute(n)
mRNA	messenger Ribonucleic acid
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid
Nct	Nicestrin
P	postnataler Zeitpunkt; Tage nach Geburt
pAK	polyklonaler Antikörper
Pax	paired box gene
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol 3 -Kinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PZ	Purkinjezelle(n)
RIH	Release Inhibiting Hormon
RNA	Ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase- PCR
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Sept	Septin
SFM	Serum Freies Medium
SSC	Sodium chloride-Sodium Citrate
T2	3,3'-Diiodthyronin
T3	3,5,3'-Triiodthyronin
rT3	reverses Triiodthyronin / 3,3',5'-Triiodthyronin
T4	Thyroxin / 3,5,3',5'-Tetraiodthyronin
TBP	Thyroxin-Binde-Protein
TBS(-T)	Tris Buffered Saline (mit Tween)
TEA	Triethanolamin
TH	Thyroidhormon(e)
TR	Thyroidhormon-Rezeptor
TRE	Thyroidhormon-responsives Element
TRH	Thyreotropin Releasing Hormon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	Thyroidea Stimulierendes Hormon
U	Enzymmenge, die 1 mol Substrat pro min umsetzt
UTP	Uridintriphosphat
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

1.1	Das Endokrine System: Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse	2
1.2	Aktivierung / Inaktivierung von Thyroidhormonen durch Deiodinasen	3
1.3	Die Pax8 ^{-/-} Maus als Modellsystem für kongenitale Hypothyreose . .	5
1.4	Thyroidhormone und Gehirnentwicklung	6
1.5	Interaktion von Purkinje- und Bergmann Gliazellen im Cerebellum .	8
1.6	Kleinhirnentwicklung der Maus	9
1.7	Thyroidhormon-Rezeptor Isoformen	10
3.1	Eu- und athyroide Purkinjezell-Differenzierung <i>in-vivo</i> / <i>in-vitro</i> . . .	30
3.2	Die Pax8 ^{-/-} /S100 β -GFP Maus als Modellsystem für athyroide Bergmann Glia-Entwicklung	31
3.3	Interaktionen von Bergmann Glia-, Purkinje- und Körnerzellen	32
3.4	Bergmann Glia-Differenzierung <i>in-vivo</i> P6	33
3.5	Bergmann Glia-Differenzierung <i>in-vivo</i> P12	34
3.6	Bergmann Glia-Differenzierung <i>in-vivo</i> P21	35
3.7	TUNEL-Apoptose-Assay cerebellarer Zellen	36
3.8	Thyroidhormon-Wirkung auf Astrozyten <i>in-vitro</i>	38
3.9	Validierung der erhöhten GLAST-Immunoreaktivität	38
3.10	Interaktion von Purkinjezellen und Astrozyten <i>in-vitro</i>	39
3.11	GFAP- / Septin-2-Transkriptmengen im eu- und athyroiden Kleinhirn	41
3.12	Thyroidhormon-abhängige Expression von Septin-4	42
3.13	Verteilung von borg1-5 im Cerebellum der Maus	43
3.14	Thyroidhormon-abhängige Expression von borg4	45
3.15	GLAST-Transkriptmengen im eu- und athyroiden Kleinhirn	46
3.16	Spezifitätskontrolle des anti-borg4 Antikörpers	47
3.17	Proteinmengenvergleich im eu- und athyroiden Cerebellum	50
3.18	Phosphorylierung von borg4	50
3.19	Regulation der Thyroidhormon-abhängigen Expression von Septin-4 und borg4 durch TR α 1 - ISH	51
3.20	Regulation der Thyroidhormon-abhängigen Expression von Septin-4 und borg4 durch TR α 1 - Real-Time-PCR	53
3.21	Einfluss der TH-Rezeptoren auf die Bergmann Glia-Morphologie . . .	54
3.22	GFAP im eu- und athyroiden Cerebellum	55
3.23	Kolokalisierung von Septin-4 und borg4	57
3.24	Koimmunopräzipitation von Septin-4 mit borg4	58
3.25	Septin-4 und borg4: Interaktion mit dem Zytoskelett	59
3.26	Einfluss von borg4 auf die Verteilung von Septin-4	60
3.27	Membranfraktionierung von Cerebellum-Homogenaten	61
3.28	Kultivierung cerebellarer Schnitte	63
3.29	Toxizität der ektopischen Septin-4 Expression	64
3.30	Einfluss von borg4 auf die Zellmorphologie transfizierter COS-7 Zellen	66
3.31	Einfluss von borg4 auf die Zellmorphologie transfizierter Astrozyten .	67
3.32	Zellmorphologie-Quantifizierung borg4-transfizierter Zellen	68

Tabellenverzeichnis

2.1	Genotypisierungsprimer	17
2.2	Transformierte Zelllinien	18
2.3	Klonierte Expressions-Plasmide für die Transfektion	19
2.4	Klonierte Plasmide für die <i>in-vitro</i> Transkription / ISH	21
2.5	Primer für die quantitative Real-Time-PCR	22
2.6	Primärantikörper für Western-Blot	24
2.7	Primärantikörper für Immunfärbungen	27

1.1 Das endokrine System

Das endokrine System (Hormonsystem) besteht aus verschiedenen Drüsen, die chemische Botenstoffe, die Hormone, produzieren. Diese Hormone können auf die Drüsenzellen selbst (autokrin), auf direkt benachbarte Zellen (parakrin) oder auf weiter entfernt liegende Zielzellen (endokrin) wirken. Im letzten Fall erfolgt der Transport der chemischen Botenstoffe zu den Zielzellen durch den Blutkreislauf. Die Hormonwirkung wird über spezielle Rezeptoren in den Zielzellen vermittelt [1]. Das Hormonsystem reguliert im Körper höherer Organismen entscheidende zelluläre Funktionen wie Wachstum, Differenzierung und Stoffwechsel. Die Kontrolle dieses Systems erfordert daher einen fein abgestimmten Regelkreis, der aus Hypothalamus, Hypophyse und endokrinen Drüsen wie der Schilddrüse, den Hoden, den Ovarien oder der Nebennierenrinde besteht [1].

Ein solches Regulationssystem ist am Beispiel der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse in Abbildung 1.1 dargestellt.

Sowohl die Biosynthese als auch die Sekretion von Thyroidhormonen werden durch das hypothalamisch-hypophysäre System reguliert. Der Hypothalamus als übergeordnetes Steuerzentrum setzt nach Stimulation Thyreoliberin (TRH, Thyreotropin-Releasing Hormon) frei, das zur Adenohypophyse transportiert wird und dort an TRH-Rezeptoren der thyreotropen Zellen bindet. Diese wiederum setzen das glandotrope Hormon Thyreotropin (Thyroidea stimulierendes Hormon, TSH) frei. Thyreotropin stimuliert dann sowohl die Sekretion von Thyroidhormonen als auch das Wachstum und die Differenzierung der Schilddrüse. Die aus der Schilddrüse abgegebenen Hormone 3,5,3'-Triiodthyronin (T3) und 3,5,3',5'-Tetraiodthyronin (Thyroxin, T4) gelangen durch den Blutkreislauf zu den Zielgeweben [1, 3].

Gleichzeitig existieren im hypothalamisch-hypophysären Regelkreis aber auch negative Rückkopplungsmechanismen, die die genaue Regulation des Systems steuern. Schilddrüsenhormone wirken im Überschuss hemmend auf Hypophysenvorderlappen und Hypothalamus. Der Hypothalamus schüttet Somatostatin als inhibitorisches RIH (Release Inhibiting Hormon) aus, das als Antagonist zum Thyreotropin wirkt [1, 3].

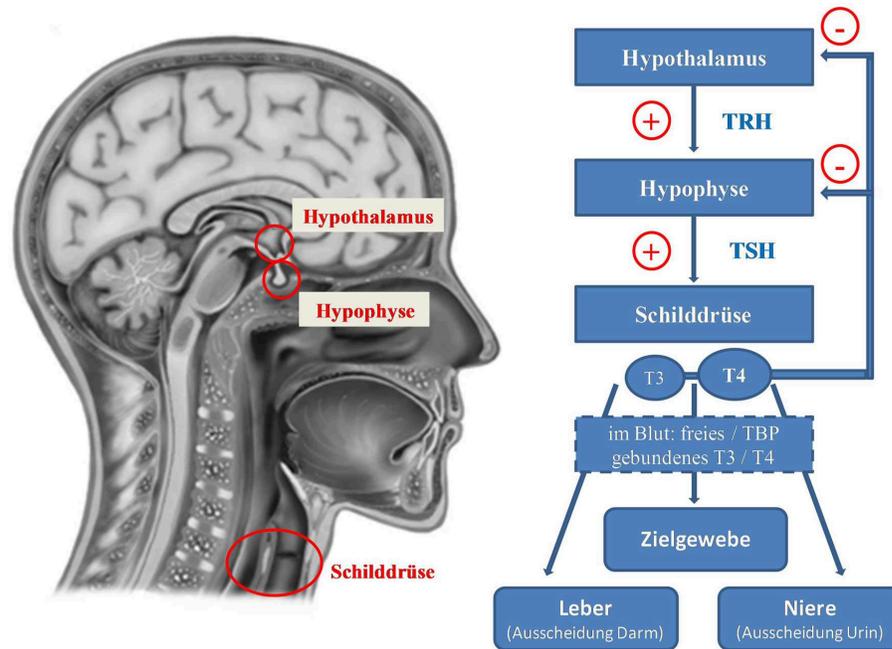


Abbildung 1.1: Die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse reguliert Produktion und Wirkung von Schilddrüsenhormonen: Der Hypothalamus setzt Thyreoliberin (TRH) frei, das die Synthese von Thyreotropin (TSH) in der Hypophyse stimuliert. TSH induziert die Sekretion von Thyroidhormonen (TH) aus der Schilddrüse. Freie oder mit Thyroxin-Binde-Proteinen (TBP) assoziierte Hormone gelangen über den Blutkreislauf zu den Zielgeweben. Ein TH-Überschuss führt zur regulatorischen Inhibition von Hypothalamus und Hypophyse. (Bild verändert nach [2])

1.2 Thyroidhormone

Thyroidhormone (TH) sind Derivate der Aminosäure Tyrosin mit kovalent gebundenem Iod. Beide Formen, das Prohormon Thyroxin (T₄) und das wirksamere Triiodthyronin (T₃), werden in den Follikelzellen der Schilddrüse synthetisiert. Dazu wird Iodid über einen Na⁺/I⁻ Symporter aktiv in die Schilddrüse transportiert, durch eine Thyroid-Peroxidase in Gegenwart von Wasserstoffperoxid oxidiert, und an die, an Thyreoglobulin gebundenen, Tyrosinreste gekoppelt. Nach diesem Prinzip entstehen im Follikellumen zunächst Monoiod- bzw. Diiod-Tyrosine. Diese werden nach Bedarf enzymatisch ebenfalls durch die Thyroid-Peroxidase zu T₄ oder T₃ verbunden und die verschiedenen, an Thyreoglobulin gebundenen, Iodothyronin-Derivate als Kolloid im Lumen der Follikelzellen gespeichert. Nach der Kolloid-Endozytose erfolgt in den Lysosomen der Thyreozyten die Abspaltung der Schilddrüsenhormone T₃ und T₄ vom Trägerprotein. Die Thyroidhormone werden in den Blutkreislauf abgegeben, wobei Thyroxin beim Menschen im mehr als 40-fachen Überschuss sezerniert wird (90 nM T₄ vs. 2 nM T₃). Nur eine sehr geringe Menge an Serum T₃/T₄ zirkuliert frei im Blut, der größte Anteil ist an Transportproteine wie Thyroxin-Binde-Protein (TBP) oder Albumin gebunden [3]. In die Zielzellen aufgenommenes Thyroxin muss

zuerst in die aktive Form 3,5,3'-Triiodthyronin (T3) umgewandelt werden. Das erfolgt über enzymatische 5'-Deiodierung des äußeren Ringes durch Deiodinasen. Drei verschiedene Iodthyronin Deiodinasen, Typ I, II und III (D1, D2 und D3), sind bis heute bekannt, die die Wirkung von Schilddrüsenhormonen durch Aktivierung bzw. Inaktivierung der Hormone in den Zielzellen regulieren. D1 katalysiert hierbei entweder die Deiodierung des äußeren oder des inneren Ringes der Iodthyronine, D2 nur die 5'-Deiodierung des äußeren Ringes und D3 nur die 5-Deiodierung des inneren Ringes. Hierbei entstehen das aktive Hormon T3, das metabolisch inaktive reverse T3 (rT3, 3,3',5'-Triiodthyronin) oder das inaktive T2 (3,3'-Diiodthyronin), welches rasch weiter abgebaut wird. Die grundsätzlichen Deiodinasereaktionen sind in Abbildung 1.2 dargestellt. Deiodinasen werden gewebespezifisch exprimiert. D1 kommt vor allem in peripheren Geweben wie Leber und Nieren vor, D2 in Gehirn, Hypophyse, Plazenta und braunem Fettgewebe und D3 im Gehirn, der Haut und in der Plazenta [4, 5].

Schilddrüsenhormone haben einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung und Physiologie höherer Organismen. Sie wirken auf fast alle Gewebe im Körper und sind für Metabolismus, Thermogenese, Wachstum und Differenzierung verantwortlich. Ein Zielorgan, welches sowohl während der Entwicklung als auch im adulten Zustand stark durch Thyroidhormone beeinflusst wird, ist das Gehirn [6, 7].

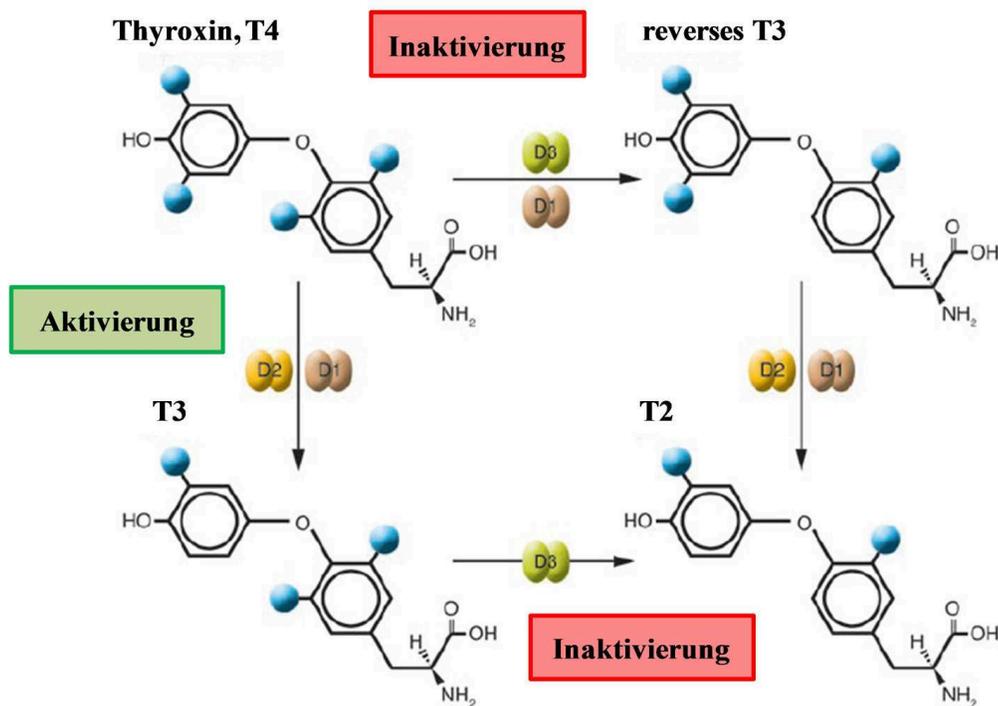


Abbildung 1.2: Die drei verschiedenen Deiodinasen D1, D2 und D3 katalysieren die Deiodierung des äußeren oder inneren Ringes und aktivieren bzw. inaktivieren damit Thyroidhormone. (Bild verändert nach [4])

1.3 Kongenitale Hypothyreose

Wie wichtig Schilddrüsenhormone besonders für die Entwicklung sind, wird bei Kindern sichtbar, die unter einer angeborenen (kongenitalen) Hypothyreose leiden. Mit einem Fall pro 3000 - 4000 Lebendgeburten zählt diese Erkrankung zu den häufigsten endokrinen Funktionsstörungen beim Menschen. Kongenitale Hypothyreose tritt meistens sporadisch auf und ist durch geringe Mengen an Serum-Schilddrüsenhormonen und erhöhten Mengen an Thyreotropin gekennzeichnet. Sie resultiert bei 85 % aller Fälle aus einer Dysgenese der Schilddrüse und bei 10 % aus einer fehlerhaften Hormonsynthese. Nur etwa 2 % aller betroffenen Personen sind für diese Erkrankung familiär erblich vorbelastet. [8, 9, 10].

Kongenitale Hypothyreose führt unbehandelt zu Kretinismus, der sich durch geistige Behinderung, Unfruchtbarkeit, Kleinwuchs, Kropfbildung, Knochenverformungen, Lähmungen, Haltungsschäden, Taubstummheit, Schielen oder Fettsucht auszeichnen kann. Die rechtzeitige Thyroidhormon-Ersatz-Therapie nach der Geburt kann dies verhindern. Weltweit werden deshalb seit Ende der 70er-Jahre Neugeborene in der ersten Lebenswoche auf eine fehlende oder gestörte Funktion der Schilddrüse untersucht [11, 12].

Eine angeborene Hypothyreose erfordert eine lebenslange Behandlung mit dem Schilddrüsenhormon Thyroxin. Wird diese Therapie innerhalb der ersten zehn Lebenstage in der richtigen Dosierung begonnen und lebenslang beibehalten, so verläuft die geistige und körperliche Entwicklung vollkommen normal und unauffällig [12].

1.4 Die Pax8^{-/-} Maus als perfektes Tiermodell für die kongenitale Hypothyreose

Die meisten Fälle von kongenitaler Hypothyreose resultieren aus einer Dysgenese der Schilddrüse. Diese Dysgenese entsteht aber nur sehr selten aus einer genetischen Mutation. Da Pax-Gene im Allgemeinen essentiell für die Organogenese sind und bekannt war, dass speziell Pax8 während der Entwicklung der Schilddrüse exprimiert wird [13], wurde von Mansouri et al. [14] eine Pax8 *loss-of-function* Mausmutante etabliert und analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Pax8 hauptsächlich für die Ausbildung der Thyroidhormon-synthetisierenden Follikelzellen in der Schilddrüse verantwortlich ist [14]. Aufgrund dieser Erkenntnis wurden anschließend auch Patienten mit einer Punktmutation in der DNA-bindenden Domäne des PAX8 Gens beschrieben [15].

Die bis heute bekannten neun verschiedenen Pax-Gene spielen allgemein eine entscheidende Rolle in der embryonalen Ausbildung von Geweben und Organen. Sie wirken als Transkriptionsfaktoren und besitzen alle die namensgebende und stark konservierte *paired box* DNA-Bindedomäne [16, 17, 18]. Pax8 aktiviert Gene, die für die Ausbildung der Follikelzellen in der Schilddrüse essentiell sind. Diese Zellpopulation, und somit eine funktionelle Schilddrüse, fehlen in der Pax8^{-/-} (KO) Maus komplett. Das führt dazu, dass diese Tiere nach der Geburt athyroid sind. Die präna-

tal durch die Plazenta der Mutter sichergestellte Hormonzufuhr wird postnatal nicht durch die eigene Produktion von Thyroidhormonen ersetzt. Im Serum dieser Tiere ist daher kein Thyroxin nachweisbar [14, 19].

Die Pax8^{-/-} Maus (siehe Abbildung 1.3) stellt ein perfektes Modellsystem für kongenitale Hypothyreose dar. Sie bietet im Vergleich zu Tieren mit operativ bzw. chemisch induziertem Hypothyroidismus, der mit schweren Nebenwirkungen einhergeht, experimentelle Vorteile. So werden durch die operative Entfernung der Schilddrüse zum Beispiel auch die Calcitonin-produzierenden C-Zellen beseitigt, die in den Pax8^{-/-} Mäusen funktionell voll erhalten sind [14]. Ein durch Chemikalien wie Propylthiouracil (PTU), einem Thyreostatika, das die Thyreoperoxidase kompetitiv hemmt, induzierter Hypothyroidismus setzt eine oft experimentell nachteilige Langzeitbehandlung der Versuchstiere voraus.

Pax8^{-/-} Mäuse zeigen einen markanten Phänotyp: Sie sterben spätestens nach der Entwöhnung von der Mutter, sind viel kleiner und leichter als ihre Geschwister, sind taub und haben einen ataxischen Phänotyp [20, 21]. Die Ataxie deutet darauf hin, dass das Fehlen der Schilddrüsenhormone in diesen Tieren zu neurologischen Ausfällen führt.

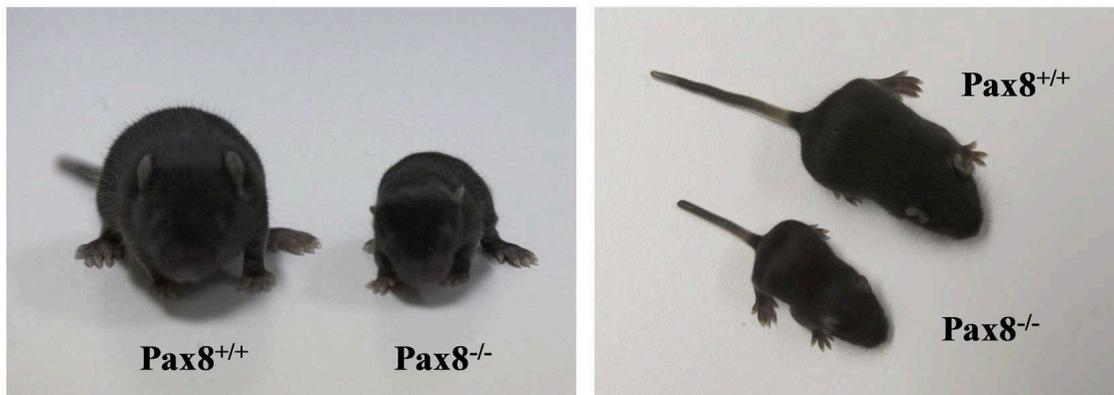


Abbildung 1.3: Gegenüberstellung einer Pax8^{+/+} Maus und ihres Pax8^{-/-} Geschwister-tieres zum Zeitpunkt P12. Pax8^{-/-} Mäuse sind kleiner und leichter als ihre Geschwister, sind taub und haben einen ataxischen Phänotyp.

1.5 Thyroidhormone und das Gehirn

Eines der wichtigsten Zielorgane der Thyroidhormon-Wirkung ist sowohl das sich entwickelnde als auch das adulte Gehirn. Hypothyroidismus während der fötalen und postnatalen Entwicklung führt zu mentaler Retardierung und neurologischen Schädigungen, im Erwachsenenalter zu psychiatrischen Auffälligkeiten wie starken Depressionen [6, 24].

Im sehr frühen Entwicklungsstadium wird der Maus-Fötus über die Plazenta mit mütterlichem Thyroxin versorgt und dieses im Gehirn durch Deiodinase TypII (D2) in T3 umgewandelt. Die fötale Schilddrüse beginnt am Tag 17 nach der Befruchtung Schilddrüsenhormone zu synthetisieren. Die T3-Menge steigt danach stetig an und

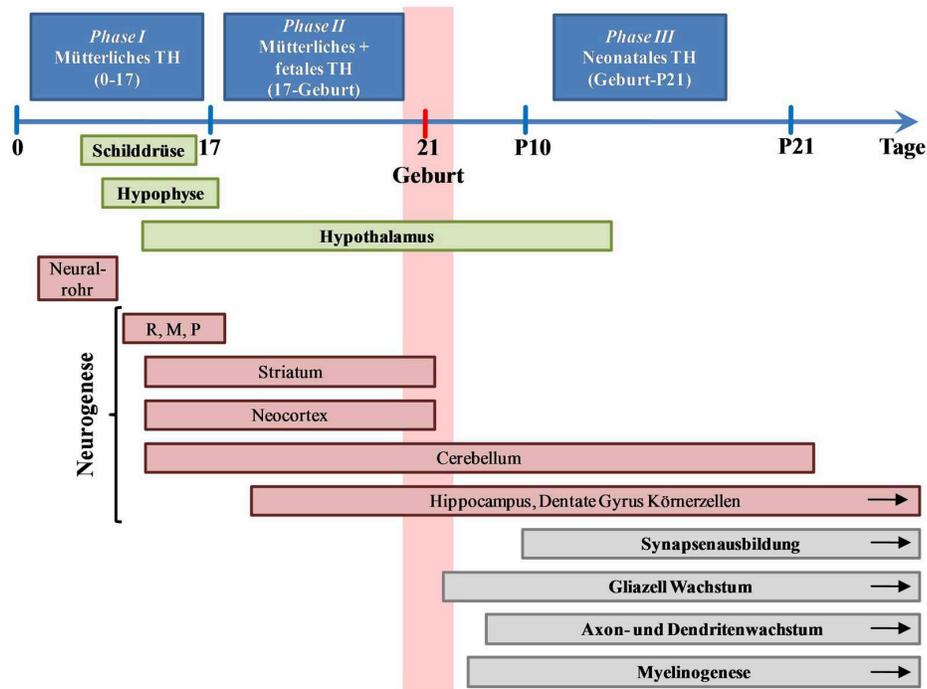


Abbildung 1.4: Zeitlicher Ablauf der neuronalen Entwicklung in der Ratte in Beziehung zum Thyroidhormon-Status; **grün:** Entwicklung der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse, **rot:** Neurogenese von ausgewählten Gehirnarealen (R: Rückenmark, M: Medulla, P: Pons), **grau:** neuronale Differenzierung; Tag 0: Befruchtung, P: Tage nach der Geburt; Schema verändert nach [22, 23]

erreicht zum Zeitpunkt P15 das höchste Niveau [25, 26]. Thyroidhormone selbst haben keinen Einfluss auf die Anlage, die Bildung und die Polarität des Neuralrohres (späteres ZNS). Sie sind aber für spätere Prozesse wie Zellmigration, Schichtenausbildung, Differenzierung und Synaptogenese unabdingbar [27].

Ist eine ausreichende Versorgung des Gehirns mit Thyroidhormonen zu bestimmten Zeitpunkten nicht gewährleistet, treten schwere neurologische Schädigungen auf. Wird der Fötus durch die Mutter unzureichend mit Schilddrüsenhormonen versorgt, kommt es zum irreversiblen neurologischen Kretinismus, während postnatale Thyroidhormon-Defizienz zu kongenitaler Hypothyreose führt, deren Symptomatik durch rechtzeitige Thyroidhormon-Ersatztherapie reversibel ist [27, 28].

Ein Teil des Gehirns, das pränatal angelegt wird, aber bei Nagern erst postnatal ausdifferenziert, ist das Cerebellum (Kleinhirn). In dieser Periode nach der Geburt ist das Kleinhirn besonders stark von einer ausreichenden Versorgung mit Thyroidhormonen abhängig und daher ein geeignetes Modell, um athyroide neuronale Zelldifferenzierung zu analysieren.

1.6 Das Cerebellum

Obwohl das lateinische Wort Cerebellum so viel wie “kleines Gehirn“ bedeutet, besteht es aus mehr Neuronen (80 - 85 %) als der gesamte Rest des Gehirns. Es befindet sich dorsal auf den Hirnstamm aufgelagert und ist mit diesem durch drei Kleinhirnstiele, die die Afferenzen in und die Efferenzen aus dem Kleinhirn enthalten, verbunden [29, 30].

Das Cerebellum untergliedert sich in die stark gefaltete nervenzellhaltige Rinde (Kortex) und die innen liegende weiße Substanz, das Mark. Die Kleinhirnrinde besteht aus drei charakteristischen Schichten: der Molekularschicht (*Stratum moleculare*) ganz außen, der Purkinjezellschicht (*Stratum purkinjense*) in der Mitte und der Körnerschicht (*Stratum granulosum*) im Inneren. Im Kleinhirn unterscheidet man fünf verschiedene Typen von Neuronen: Purkinjezellen, Körnerzellen, Sternzellen, Korbzellen und Golgizellen. Zusätzlich gibt es zwei Arten afferenter Fasern, Moos- und Kletterfasern. Beide Fasertypen und die Körnerzellen sind exzitatorisch. Als Neurotransmitter dient hier Glutamat. Die restlichen Neurone wirken mit ihrem Neurotransmitter GABA inhibitorisch [29, 31, 32, 33]. Ein weiterer bedeutender Zelltyp, der besonders mit den beiden Neuronentypen Purkinjezellen und Körnerzellen interagiert, ist die Bergmann Glia, ein unipolarer cerebellarer Astrozyt.

Die Funktion des Kleinhirns besteht in der Kontrolle der motorischen Steuerung. Es ist zuständig für Koordination und Feinabstimmung, verarbeitet sensorische Reize (Ziel- und Blickmotorik) und spielt eine Rolle bei zahlreichen kognitiven Prozessen [29, 30, 31, 33].

Die Entwicklung des Kleinhirns ist ein sehr fein abgestimmter und hoch koordinierter Prozess, der bei Nagern hauptsächlich postnatal, in den ersten drei Wochen nach der Geburt, abläuft (siehe Abbildung 1.6 A). Bei allen diesen Entwicklungsvorgängen spielt die enge Verflechtung und Zusammenarbeit zwischen Neuronen (Purkinje- und Körnerzellen) und Gliazellen (Bergmann Glia) eine wichtige Rolle.

1.6.1 Purkinjezellen und Bergmann Gliazellen

Eines der größten Neurone im Gehirn ist die Purkinjezelle, das wichtigste Neuron im Kleinhirn. Die Somata der Purkinjezellen bilden die Purkinjezellschicht und ihr weit verzweigter Dendritenbaum erstreckt sich in die Molekularschicht hinein. An den Dendriten befinden sich unzählige synaptische Endigungen, so genannte *spines*. Die Purkinjezelle ist das einzige efferente Neuron im Cerebellum. Sein Axon innerviert und inhibiert Kleinhirnkerne im Mark [31].

Bergmann Gliazellen sind cerebellare Astrozyten, die erstmalig 1875 beschrieben wurden [34]. Ihre Zellkörper sind in der Purkinjezellschicht um die Somata der Purkinjezellen herum angeordnet, ihre Radialfasern, an denen sich zahlreiche seitliche Fortsätze befinden, erstrecken sich unipolar in die Molekularschicht und enden an der Hirnhaut. Die kleinen seitlichen Bergmann Glia-Fortsätze umschließen komplett den Dendritenbaum der Purkinjezellen, besonders um synaptische Bereiche herum, und bilden so, wie in Abbildung 1.5 gezeigt, ein dichtes Netzwerk mit den Neuronen [35]. Durchschnittlich ist eine Purkinjezelle im Kleinhirnkortex von ca. acht Bergmann Gliazellen umgeben [36].

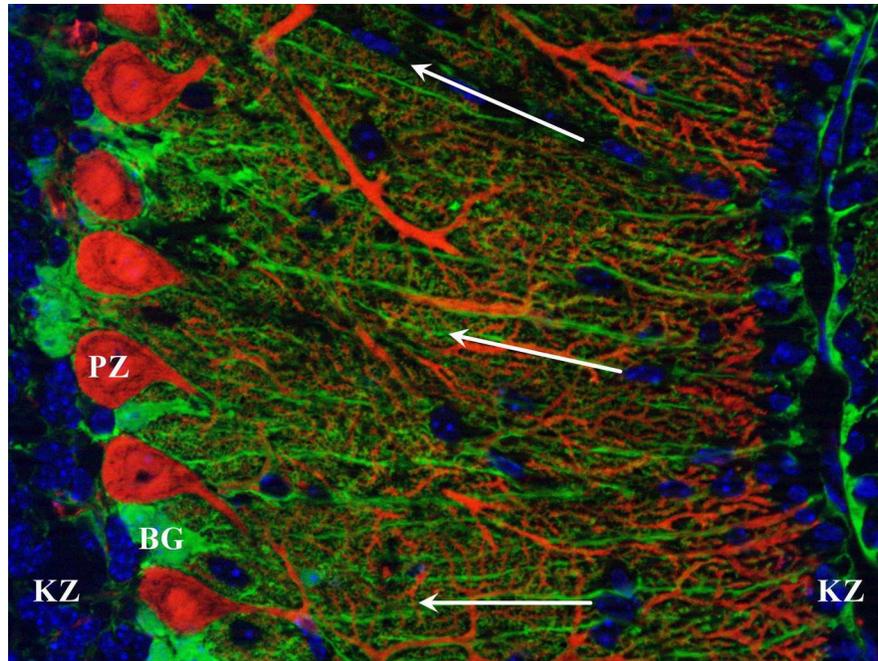


Abbildung 1.5: Purkinje- (PZ, rot) und Bergmann Gliazellen (BG, grün) bilden im Cerebellum ein dichtes Netzwerk. Während der Kleinhirnentwicklung migrieren die Körnerzellen (KZ, blau) in enger Verbindung mit den Bergmann Glia-Radialfasern aus der externen in die interne Körnerzellschicht (Pfeil).

Anfänglich wurden Bergmann Gliazellen nur passive Stützfunktionen für Purkinjezellen [33] und migrierende Körnerzellen zugeschrieben. Doch in den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Bergmann Glia essentiell für die Purkinjezelle ist. Die experimentelle Entfernung dieser charakteristischen Gliazellen im Kleinhirn führt zu Desorganisation und Absterben der Purkinjezellen [37, 38, 39]. Des Weiteren üben Bergmann Gliazellen viele bedeutende Funktionen sowohl im sich entwickelnden als auch im adulten Cerebellum aus: Sie vermitteln aktiv die Migration der Körnerzellen [40, 41], beeinflussen die Organisation der Purkinjezellendriten [42, 43], sind an Synapsenbildung beteiligt [43], koordinieren den metabolischen Austausch mit den Purkinjezellen [44] und exprimieren Transporter, um Neurotransmitter wie z.B. Glutamat aus dem synaptischen Spalt aufzunehmen und damit die Erregbarkeit der Nervenzellen zu erhalten [41, 44].

Bergmann Gliazellen exprimieren eine Reihe von Adhäsions- und Signalmolekülen, die für die engen Interaktionen mit Purkinjezellen oder anderen cerebellaren Neuronen, wie den Körnerzellen, von großer Bedeutung sind. Der Notch-Signalweg zählt hierbei zu den bedeutendsten Mediatoren der Neuron-Glia-Wechselwirkung während der Entwicklung des ZNS. Purkinjezellendriten bilden das Transmembranprotein DNER, das mit Notch, welches in den Bergmann Glia-Radialfasern exprimiert wird, interagiert. Diese Interaktion induziert die Differenzierung der Bergmann Gliazellen im embryonalen Kleinhirn [45]. Für andere Bergmann Glia-spezifische Adhäsionsmoleküle wie Cytactin und SC1 konnte eine essentielle Bedeutung für die Migration

der Körnerzellen im sich entwickelnden postnatalen Kleinhirn nachgewiesen werden [46, 47, 48, 49, 50, 51].

1.6.2 Thyroidhormone und das Cerebellum

Bedeutende externe Faktoren, die die Entwicklung des Kleinhirns entscheidend beeinflussen, sind Thyroidhormone. Als zelluläre Ziele werden in der Literatur besonders die Neuronen beschrieben. So regulieren Schilddrüsenhormone die Migration der Körnerzellen und die Differenzierung der Purkinjezellen und deren dendritischer *spines* [6, 52].

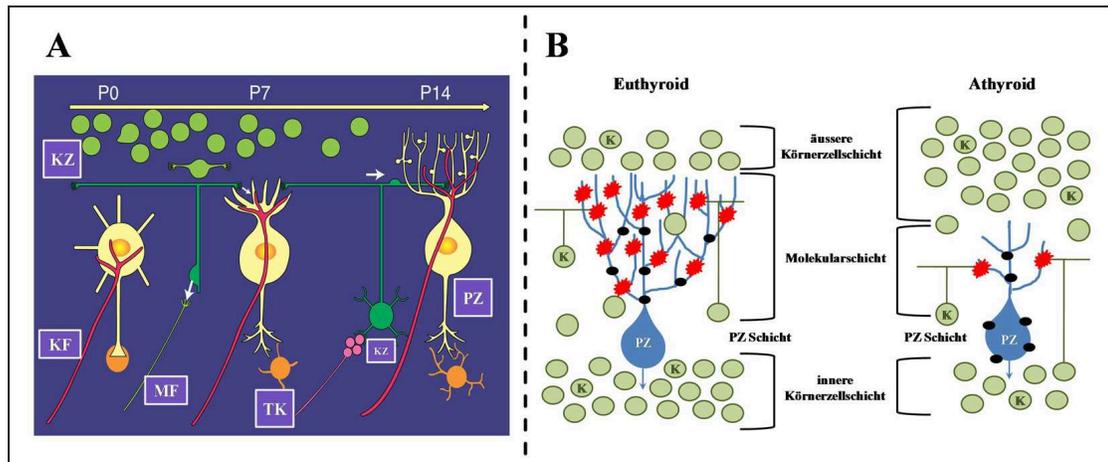


Abbildung 1.6: **A:** Die Kleinhirnentwicklung der Maus erfolgt hauptsächlich postnatal (P0-P21) und umfasst die Dendritogenese und Differenzierung der Purkinjezellen (PZ), die Differenzierung und Migration der Körnerzellen (KZ) sowie die Synaptogenese der Neuronen mit Kletterfasern (KF), Moosfasern (MF) und Kleinhirnkernen (TK) (Bild verändert nach C.A. Mason, Columbia University, NY, USA). **B:** Auswirkungen von perinatalem Hypothyroidismus auf die Kleinhirnentwicklung: Thyroidhormone beeinflussen sehr stark die Dendritogenese der Purkinjezellen (blau), die Migration der Körnerzellen (K, grün) und die Synaptogenese (rot mit Parallelfasern, schwarz mit Kletterfasern). Bild verändert nach [53]

Wie im restlichen Gehirn wird T4 im Cerebellum durch Astrozyten aufgenommen und dort durch 5'-Deiodierung (D2) enzymatisch in T3 umgewandelt. T3 wird dann über aktive Transporter wie MCT8 (Monocarboxylat-Transporter 8) in die Nervenzellen aufgenommen und bindet im Zellkern an spezielle neuronale Thyroidhormon-Rezeptoren [54]. Fehlt T3 im sich entwickelnden Kleinhirn, kommt es zu verschiedenen morphologischen Abnormalitäten. Diese sind in Abbildung 1.6 B schematisch dargestellt. Die Körnerzellen proliferieren später und migrieren nur verzögert von der äußeren in die innere Körnerzellschicht. Die Purkinjezellen sind in Wachstum und Differenzierung stark retardiert. Sie bilden nur einen verkümmerten Dendritenbaum mit einer geringeren Anzahl dendritischer *spines* aus. Die Synaptogenese zwischen den Parallelfasern der Körnerzellen und den Purkinjezellendriten ist daher ebenfalls gestört. Es werden weniger Synapsen ausgebildet. Stimulierende Synapsen zwischen

den Kletterfasern und den Zellsomata der Purkinjezellen bleiben länger erhalten, während synaptische Verbindungen zwischen Kletterfasern und den Dendriten der Purkinjezellen fehlen. Die Synaptogenese zwischen Moosfasern und Dendriten der Körnerzellen in der inneren Körnerzellschicht ist ebenfalls vermindert (in Abbildung 1.6 B nicht dargestellt) [7, 55].

1.7 Thyroidhormon-Rezeptoren

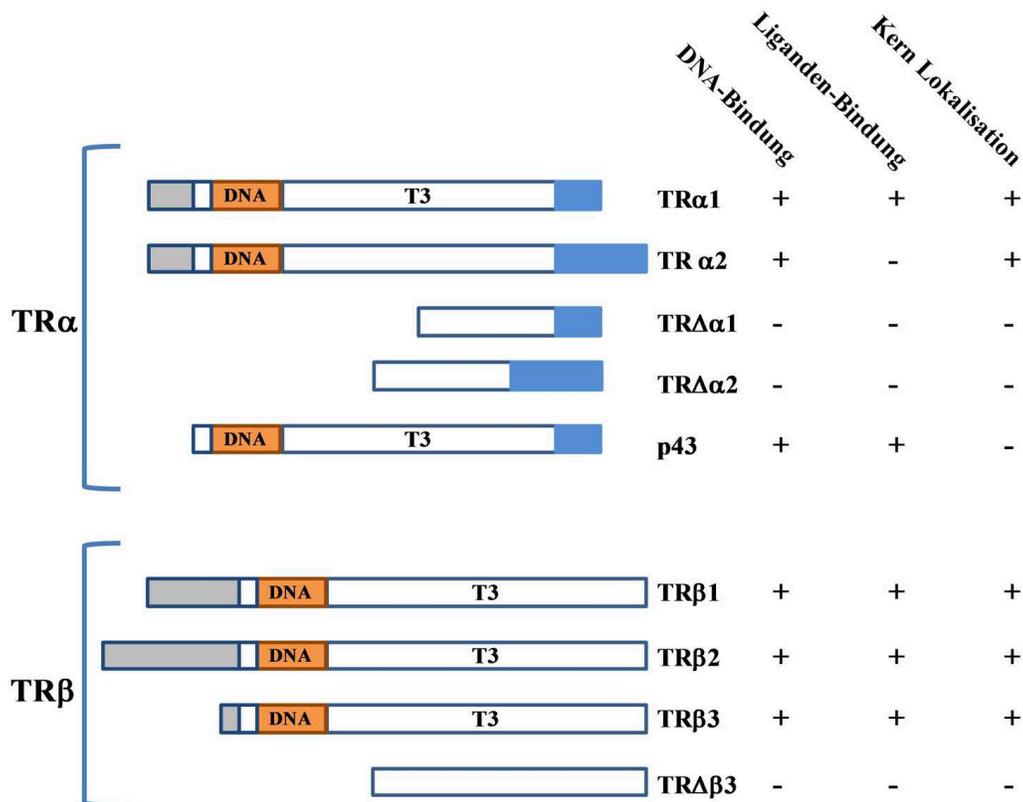


Abbildung 1.7: Verschiedene Isoformen der Thyroidhormon-Rezeptoren entstehen durch alternatives Splicen aus den beiden Genen TR α und TR β . Nicht alle Isoformen besitzen eine DNA-bindende (orange) und eine Hormon-bindende (T3) Domäne. (Bild verändert nach [56])

Die zelluläre Wirkung des aktiven Schilddrüsenhormons T3 wird durch die zwei im Zellkern lokalisierten Rezeptor-Typen TR α und TR β vermittelt, die hauptsächlich als hormoninduzierbare Transkriptionsfaktoren wirken. Aus den durch die beiden Gene TR α und TR β kodierten mRNAs entstehen durch alternatives *Splicen* und unterschiedliche Promotornutzung neun verschiedene Thyroidhormon-Rezeptor Isoformen (siehe Abbildung 1.7). Nur vier dieser Isoformen, und zwar TR α 1, TR β 1, TR β 2 und TR β 3 sind funktionelle Rezeptoren, die eine DNA-bindende und eine Hormon-bindende Domäne besitzen. Vier weitere Isoformen (TR α 2, TR $\Delta\alpha$ 1, TR $\Delta\alpha$ 2, TR $\Delta\beta$ 3) haben antagonistische Eigenschaften und sind nicht in der Lage,

T3 zu binden. Bei der p43 Isoform handelt es sich um ein mitochondriales Protein [56, 57, 58, 59].

Thyroidhormon-Rezeptoren werden organ- und entwicklungspezifisch exprimiert. Im Gehirn konnten bisher alle TR-Isoformen, jedoch vor allem der TR α 1 Rezeptor mit einer 70-80 %-igen Dominanz, nachgewiesen werden [60]. TR α 1 wird im Kleinhirn ubiquitär in Purkinje-, Körner- und Bergmann Gliazellen exprimiert, während TR β 1 hauptsächlich in Purkinjezellen vorkommt [61, 62].

Thyroidhormon-Rezeptoren haben sowohl auf genomischer als auch auf nicht genomischer Ebene Einfluss auf zelluläre Prozesse. Genomisch binden TRs ohne Ligand als Heterodimere im Komplex mit Retinsäurerezeptoren der Familie RXR an speziellen Sequenzen, so genannte TREs (Thyroidhormon-responsive Elemente) der DNA [59]. Diese Bindung beeinflusst die Transkription von Genen. In der Regel führen die Bindung des ligandenfreien Rezeptors (Aporezeptor) zur Repression und die Bindung des T3-Rezeptor-Komplexes zur Aktivierung der Transkription. Auf nicht genomischer, transkriptional unabhängiger Ebene, sind ligandengebundene Thyroidhormon-Rezeptoren in der Lage, mit dem PI3-Kinase/Akt Signalweg oder dem Aktinzytoskelett zu interagieren [63, 64].

Um die spezifischen Funktionen der einzelnen TR Isoformen zu analysieren, wurden verschiedene Mausmutanten generiert. So konnte allgemein gezeigt werden, dass TR α eine entscheidende Rolle für die Regulation der Körpertemperatur und für die Herzfunktion spielt, während TR β an der Entwicklung von Innenohr und Retina, an der Regulation der Leberfunktion und der negativen Rückkopplung der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse beteiligt ist [56]. Für Experimente in dieser Arbeit wurden u.a. TR α 1^{-/-} und TR β ^{-/-} Mäuse verwendet.

TR α 1^{-/-} Mäuse exprimieren die TR Isoformen TR α 1 und TR $\Delta\alpha$ 1 nicht. Sie sind lebensfähig, verhaltensunauffällig und fruchtbar, aber leicht hypothyroid und haben einen erniedrigten Puls und erniedrigte Körpertemperatur [65]. Im Gegensatz dazu haben Mäuse, die für TR α 1 und TR α 2 defizient sind, einen mit der Pax8 KO Maus vergleichbaren Phänotyp: Sie sind stark hypothyroid, wachstumsretardiert, ihr Verdauungssystem ist nicht korrekt ausgebildet und sie sterben nach der Entwöhnung von der Mutter [66].

In TR β ^{-/-} Mäusen, die die TR Isoformen TR β 1 und TR β 2 nicht exprimieren, wurden erhöhte Mengen an T4, T3 und TSH nachgewiesen. Diese Tiere sind taub und bilden einen Kropf aus. Das deutet darauf hin, dass TR β regulatorische Funktion in der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse ausübt und in die Entwicklung des auditorischen Systems involviert ist. TR β ^{-/-} Mäuse spiegeln den Phänotyp des humanen RTH-Syndroms (Resistenz gegenüber Thyroidhormon) wider [67, 68].

Die durch Kreuzung aus den beiden zuvor beschriebenen Mausmutanten entstandenen TR α 1^{-/-}-TR β ^{-/-} Mäuse sind lebensfähig und haben einen Phänotyp, der bei den für die einzelnen Rezeptoren defizienten Mäusen nicht beobachtet wurde: Sie synthetisieren Thyroxin, T3 und TSH in extremem Überschuss und haben dadurch eine hyperaktive Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse. Diese Mäuse bilden einen ausgeprägten Kropf aus, ihr Wachstum und die Knochenentwicklung sind retardiert und die Weibchen sind infertil [58]. Bei dieser Doppelmutante wird deutlich, dass die Defizienz der Rezeptoren nicht die gleichen katastrophalen Auswirkungen

auf den Körper hat, wie die Abwesenheit von Schilddrüsenhormonen (Hypothyroidismus). Das zeigt, dass die Aporezeptorwirkung der ligandenfreien Rezeptoren entscheidend für die, unter hypothyroiden Bedingungen, beobachteten Defekte ist [69]. Studien mit verschiedenen TR-defizienten Mausmutanten haben gezeigt, dass die Thyroidhormon-Wirkung im Körper über ein Netzwerk von speziellen und gemeinsamen TR-vermittelten Signalwegen erfolgt, bei denen die einzelnen Isoformen kooperativ involviert sind oder austauschbar ähnliche Funktionen ausüben können. Die Spezifität einzelner Isoformen für physiologische Funktionen kann durch organ- und entwicklungsspezifische Expression bestimmt sein [59].

1.8 Putative Zielgene der Thyroidhormon-Wirkung im Cerebellum

Obwohl gezeigt werden konnte, dass Schilddrüsenhormone essentiell für das sich entwickelnde und das adulte Gehirn sind, konnten bis heute nur wenige durch Thyroidhormone regulierte Gene, die für die Cerebellumentwicklung verantwortlich sind, identifiziert werden. Hierzu zählen vor allem Faktoren wie Neurotrophine, IGF-I (*Insulin-like growth factor I*) oder Reelin, deren Expression in Neuronen unter hypothyroiden Bedingungen erniedrigt ist. Aber keiner dieser Faktoren ist wirklich kritisch für die normale Kleinhirnentwicklung [70]. Thyroidhormon-abhängig regulierte Gene oder Signalkaskaden, die das Zytoskelett und damit die Differenzierung und Morphologie der cerebellaren Gliazellen beeinflussen, sind ebenfalls kaum bekannt. Durch Bernal et al. [60, 71] konnte lediglich gezeigt werden, dass das u.a. in der Bergmann Glia exprimierte GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) bei Hypothyroidismus erniedrigt ist und daraus eine verzögerte Astrozytendifferenzierung resultiert.

Neben GFAP und den genannten neuronalen Faktoren kommen als putative Zielgene der Thyroidhormon-Wirkung im Cerebellum nur solche Proteine in Frage, die bei Zytoskelettveränderungen eine Rolle spielen und dadurch auf die Morphologie neuronaler Zellen einwirken können. Eine Genfamilie, die diese Kriterien erfüllt, sind die Septine.

1.8.1 Septine

Die Septine, GTP-bindende Proteine, bilden eine eigene Klasse von Zytoskelettproteinen. Sie wurden zuerst in knospender Hefe entdeckt. Dort bilden Septine ringförmige Filamentstrukturen, die die Tochter- von der Mutterzelle separieren [72, 73]. Septine kommen, außer in Pflanzen, in fast allen höheren Eukaryoten vor und in Säugern wurden bis heute 13 verschiedene Septingene identifiziert. Durch alternative Translationsstartpunkte auf den dazugehörigen mRNAs und *Splicen* entsteht eine höhere Anzahl von Septin-Proteinen, die teilweise gewebespezifisch vorkommen [74, 75].

Alle Säugetier-Septine besitzen eine hoch konservierte polybasische und eine GTP-bindende Proteindomäne. Nach ihrer Aminosäuresequenz und der zusätzlichen Existenz von prolinreichen und α -helikalen *coiled-coil* Domänen am N- und C-Terminus werden Septine in vier Gruppen eingeteilt: Die SEPT2 (Septin-1, 2, 4 und

5), die SEPT3 (Septin-3, 9 und 12), die SEPT7 (Septin-7 und 13) und die SEPT6 (Septin-6, 8, 10, 11) Gruppe [74, 75, 76]. Septine polymerisieren *in-vitro* zu hetero-oligomeren Filamenten, die aus mindestens drei verschiedenen Septin-Homomeren bestehen [75, 77].

Septine kommen in fast allen Körperzellen vor und sind dort als Gerüstproteine an Umstrukturierungen des Zytoskeletts sowie an Vesikeltransport und -fusion beteiligt und bilden Diffusionsbarrieren aus [78]. Sie interagieren sowohl mit Zellmembranen als auch mit Aktin- und Mikrotubulifilamenten [74]. Im Nervensystem konnten Septine an präsynaptischen Membranen (Sept3, Sept7), in synaptischen Vesikeln (Sept5, Sept6) und in Astrogliafortsätzen (Sept4, Sept7) nachgewiesen werden [79, 80, 81]. Xie et al. [82] und Tada et al. [83] konnten 2007 zeigen, dass ein ringförmiger Septin-5/7/11 Komplex die Entwicklung von dendritischen *spines* hippocampaler Neuronen aktiviert und stabilisiert und eine erniedrigte Septin-Expression in diesen Zellen das Wachstum und die Verzweigung von Dendriten negativ beeinflusst. Verschiedene Septine werden in der Neuropathologie im Zusammenhang mit Alzheimer- (Sept1, 2 und 4) und Parkinson-Erkrankungen (Sept4) sowie Gehirntumoren (Sept2) und dem Down Syndrom (Sept5) beschrieben [84, 85, 86].

1.8.2 Der Glutamattransporter GLAST als putativer Interaktionspartner von Septinen

Da Glutamat der bedeutendste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn ist, muss dieser, um eine weitere effiziente Signalleitung zu gewährleisten, nach der synaptischen Übertragung des Nervenimpulses sofort aus dem synaptischen Spalt entfernt werden. Diese Funktion wird hauptsächlich durch Gliazellen realisiert, die zwei von fünf bekannten Glutamattransportern exprimieren: GLAST und GLT-1 [87]. Verbleibt Glutamat dauerhaft im synaptischen Spalt, werden Neurone wie z.B. die Purkinjezellen im Cerebellum, durch Neurotoxizität stark geschädigt [39, 88].

Kinoshita et al. [89] konnten zeigen, dass Septin-2 mit dem Glutamattransporter GLAST kolokalisiert ist und dass beide Proteine interagieren. Im Mausgehirn kommt Septin-2, zusammen mit Septin-4, 7 und GLAST hauptsächlich in Bergmann Gliafortsätzen der cerebellaren Molekularschicht vor. Septin-2 bindet GLAST in Abhängigkeit von GTP und stabilisiert den Transporter in der Zellmembran. Eine konstitutive Septin-2/GDP-Mutation führte zur Internalisierung von GLAST und hatte eine verminderte Glutamataufnahme zur Folge.

1.8.3 borg (*binder of Rho GTPases*) als putative Interaktionspartner von Septinen

Der molekulare Mechanismus der Regulation der Septinassemblierung konnte bis heute nicht aufgeklärt werden. Es wurde aber, neben GLAST, eine Proteinfamilie identifiziert, die in der Lage ist, an Septinfilamenten zu binden und mit ihnen zu interagieren: Borg-Proteine [90].

Die aus fünf Mitgliedern (borg1-5) bestehende Proteinfamilie der borg wurde 1999 von Joberty et al. [91] als Effektorproteine der Rho GTPasen TC10 und Cdc42 durch

einen Hefe *two-hybrid screen* gefunden und beschrieben. Borg-Proteine besitzen eine konservierte Domänenstruktur, deren auffälligste Komponenten eine CRIB- (*Cdc42, Rac interactive binding*) und drei verschiedene Borg-Homologiedomänen (BH1-3) darstellen. Eine intakte CRIB-Domäne ist für die Bindung der Rho GTPasen notwendig. Funktionell induzieren borg, als nachgeschaltete Effektorproteine von Cdc42, die Umstrukturierung von Aktinfilamenten und damit des Zytoskeletts in der Zelle. Das konnte in, mit verschiedenen borg-Konstrukten überexprimierten, NIH-3T3 Zellen gezeigt werden. Diese Zellen bilden lange dünne Ausläufer, Lamellipodien und Pseudopodien aus, und zeigten ein vermindertes Vorkommen von Aktin-Stressfasern. Außerdem inhibiert borg3 unabhängig von einer Interaktion mit Cdc42 die Aktivität der Jnk-Kinase [91, 92, 93].

Weiterhin ist bekannt, dass borg-Proteine die Organisation von Septinfilamenten in Säugerzellen durch Bindung beeinflussen. Borg3 bindet über seine BH3-Domäne spezifisch Septin-2/6/7 Heterooligomere. In, mit borg1 und borg3 überexprimierten Zellen, konnte gezeigt werden, dass diese borg zur zusätzlichen Aggregation von normalen Heterooligomeren beitragen und der Effekt durch eine borg-Cdc42 Interaktion revidierbar ist [90, 94].

1.9 Zielstellung der Arbeit

Thyroidhormone spielen bei der Kleinhirnentwicklung eine entscheidende Rolle. Das wird besonders bei Kindern sichtbar, die unter kongenitaler Hypothyreose leiden. Diese Erkrankung führt ohne rechtzeitig begonnene Thyroidhormon-Ersatztherapie zu schwerster körperlicher und geistiger Behinderung. Als Grund der cerebellaren Störungen unter athyroiden Bedingungen werden seit Jahren wachstumsretardierte und wenig ausdifferenzierte Purkinjezellen mit missgebildeten Dendritenbäumen diskutiert. Bisher konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass Thyroidhormone *in-vivo* direkt auf die Morphologie und Funktionalität dieser Nervenzellen einwirken. Bis heute ist nur wenig darüber bekannt, ob Bergmann Gliazellen, die funktionell und strukturell auffälligste Gliapopulation im Kleinhirn, ebenfalls unter hypothyroiden Bedingungen abnormale morphologische Veränderungen zeigen.

Bergmann Gliazellen stehen nicht nur in enger struktureller und funktioneller Beziehung zu den Purkinjezellen, sie sind auch für deren Überleben essentiell. Deshalb sollte als erster Schwerpunkt in dieser Promotionsarbeit geklärt werden, ob Bergmann Gliazellen ebenfalls eine von Thyroidhormonen abhängige Differenzierung zeigen. Könnte dieser Zelltyp eventuell als primäres Ziel von Thyroidhormonen in der Kleinhirnentwicklung beeinflusst werden? Sind die Purkinjezellen nur sekundär retardiert, weil die Bergmann Gliazellen, als ihre engsten Interaktionspartner, unter athyroiden Bedingungen morphologisch beeinträchtigt sind und daraus eine ungenügende Interaktion und Unterstützung während der Dendritenausbildung resultiert?

Weiterhin gibt es nur unzureichende Erkenntnisse darüber, welche molekularen Mechanismen der von Schilddrüsenhormonen abhängigen Zellentwicklung im Kleinhirn zu Grunde liegen. Durch Thyroidhormone regulierte Gene, Proteine und Signalkaskaden, die Differenzierungsprozesse der Neurone und Gliazellen im Cerebellum steuern und beeinflussen, sind bis heute noch weitgehend unbekannt. Als zweiter

Schwerpunkt dieser Arbeit sollten daher die beiden Genfamilien der Septine und der borg näher analysiert werden, die in Signalkaskaden involviert sind, welche die Umstrukturierung des Zellzytoskeletts beeinflussen und regulieren. Zu klärende Fragestellungen waren hierbei die zelluläre Lokalisation und die Thyroidhormon-abhängige Expression verschiedener Familienmitglieder im Cerebellum der Maus. Für die bei diesen Analysen erstmalig identifizierten, Bergmann Glia-spezifisch und Thyroidhormon-abhängig exprimierten, Familienmitglieder Septin-4 und borg4 sollten vertiefende zelluläre und funktionelle Studien durchgeführt werden. Der Hauptfokus lag dabei auf der Problematik, welchen Einfluss diese Genprodukte auf die Zytoskelettassemblierung haben und welche Rolle sie dadurch für die Differenzierung der Bergmann Gliazellen spielen.

2

Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen (22 °C Raumtemperatur, 12 h Tag-Nacht-Zyklus, Wasser und Futter *ad libitum*) in einem darauf spezialisierten, spezifisch pathogenfreien Tierhaus des Fritz-Lipmann-Institutes (FLI) gehalten. Die Tierzucht, Substitutionsexperimente und das Töten der Tiere erfolgte mit Genehmigung und in Übereinstimmung mit den Vorgaben und Prinzipien des Thüringer Landesamtes für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (TLLV Thüringen, Erfurt, Deutschland).

Pax8^{+/-} Mäuse [14] mit C57BL/N6 Hintergrund wurden unserer Arbeitsgruppe von A. Mansouri und P. Gruss (Göttingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Pax8^{-/-} und Pax8^{+/+} (Wildtyp) Tiere stammen aus Verpaarungen von heterozygoten Elterntieren ab.

Männliche GFP-transgene Mäuse (GFAP-GFP [95] und S100 β -GFP [96]) wurden von der Firma Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) käuflich erworben und mit weiblichen heterozygoten Pax8 Tieren verpaart. Aus der Tochtergeneration wurden danach männliche und weibliche Pax8^{+/-}, GFP-transgene Tiere in die Verpaarung genommen.

TR α 1^{-/-} [65] und TR β ^{-/-} Mäuse [67] stammen ebenfalls von der Firma Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA).

TR α 1^{-/-}-Pax8^{-/-}, TR β ^{-/-}-Pax8^{-/-}, TR α 1^{-/-}/S100 β -GFP und TR β ^{-/-}/S100 β -GFP Tiere sowie die dazugehörigen Wildtyp-Geschwister wurden durch Kreuzverpaarung aus den zuvor beschriebenen Maus-Stämmen gezüchtet. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mittels Standard-PCR, mit den in Tabelle 2.1 aufgelisteten spezifischen Primern.

Die Substitution der Versuchstiere mit Thyroxin (T4) wurde täglich als subkutane Injektion mit einer physiologischen Dosis (20 ng/g BW) zwischen P7 und P11, oder einer einmaligen pharmakologischen Dosis (200 ng/g BW) am Tag P11 durchgeführt. Zum Zeitpunkt P12 wurden das Gehirn und andere Gewebeproben für *In-situ* Hybridisierung (ISH) und Real-Time-PCR entnommen und entsprechend aufgearbeitet.

Tabelle 2.1: Genotypisierungsprimer

Gen	Genotypisierungs-Primer 5'- 3'	PCR-Produkt
Pax8	Pax1: GGATGTGGAATGTGTGCGAGG Pax2: GCTAAGAGAAGGTGGATGAGAG Pax3: GATGCTGCCAGTCTCGTAG	WT: 390 bp KO: 370 bp
GFAP-GFP	for: ACTCCTTCATAAAGCCCTCG rev: AAGTCGATGCCCTTCAGCTC	tg: 498 bp
S100 β -GFP	for: ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT rev: TCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGC	tg: 641 bp
TR α 1	1311: GGAGTCGACCGAGAAGAGTCAGGA 1312: GTATGGGAGCTGCATCTATCCAAG 1313: CACTGCATTCTAGTTGTGGT	WT: 358 bp KO: 600 bp
TR β	1095: GCACAGGGAGGAAGTAGGCTGTTCT 1096: CCCTGGAGGCCAAAGTCAATG 1097: GTGCCAGCGGGGCTGCTAAAG	WT: 700 bp KO: 600 bp

Für ISH wurde das Gehirn auf Trockeneis in 2-Methylbutan schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Für Real-Time-PCR wurde das Cerebellum entnommen, in RNAlater (Ambion) bei -20 °C gelagert und später daraus RNA isoliert.

Versuchstiere wurden generell durch Dekapitation am Tag P6, P12 oder P21 getötet. Postnatale Zeitpunkte entsprechen der Anzahl an Tagen nach der Geburt. Um Gehirn-Vibratonschnitte anfertigen zu können, wurde die narkotisierte Maus zuerst mit PBS und dann mit 4 % PFA perfundiert. Danach wurde das Gehirn entnommen, über Nacht in 4 % PFA durchfixiert und bis zum Schneiden in Lager-Puffer (1x PBS, 0,1 % BSA, 0,04 % NaN₃) bei 4 °C aufbewahrt.

2.2 Zellkultur

Alle Zellen wurden unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Sämtliche Zellkulturarbeiten erfolgten unter steriler Atmosphäre in einer Laminarbox.

Alle transformierten Zelllinien wurden in DMEM-Medium (Gibco, #21969) mit 1 % Glutamax (Gibco, #35050), 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Alle 4 Tage wurden die Zellen aus der Kulturflasche (Cellstar) mit 1x PBS, 2 mM Na₂EDTA, 1 % BSA abgelöst und im Verhältnis 1:10 aufgeteilt.

Die Kultivierung primärer cerebellarer Mischzellkulturen erfolgte entweder in serumfreiem Medium (SFM) oder serumhaltigem Medium (HSM), das jeweils frisch hergestellt und steril filtriert wurde. SFM bestand aus BME-Medium (Gibco, #41010),

1 % BSA (Sigma, #A8806), 1 % Glutamax (Gibco, #35050), 1 % I-1884 (Sigma), 1 % Penizillin/Streptomycin, Glucose und NaCl. HSM bestand aus BME-Medium, 10 % hitzeinaktiviertem Pferdeserum (Gibco, #26050), 1 % Glutamax (Gibco, #35050), 1 % Penizillin/Streptomycin, Glucose und NaCl. Alle Zellkulturgefäße und Deckgläschen wurden mit Poly-D-Lysin (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4 °C, über Nacht) vorbeschichtet.

2.2.1 Transformierte Zelllinien

Für Protein-Kolokalisierungsstudien und Stimulationsexperimente wurden verschiedene transformierte Zelllinien verwendet. Diese sind in Tabelle 2.2 aufgelistet und näher charakterisiert.

Tabelle 2.2: Transformierte Zelllinien

Zelllinie	Spezifizierung	Charakteristika
HEK-293	Ad5 transformierte humane, embryonale Nierenzellen	fibroblastenähnliche, adhärenente Monolayer
COS-7	SV-40 transformierte Nierenzellen der grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	fibroblastenähnliche, adhärenente Monolayer
NIH-3T3	Schweizer Maus-Embryozellen	Fibroblasten, adhärenente Monolayer

2.2.2 Primärzellkultur

Zur Herstellung gemischter cerebellarer Zellkulturen [62] wurden neugeborene Mäuse (P0, P1) durch Dekapitation getötet, die Cerebella in kaltem CMF-PBS (Kalzium- und Magnesium-freiem PBS) herauspräpariert und, um Kontaminationen durch Fibroblasten zu vermeiden, von Hirnhaut und Blutgefäßen befreit. Die gesammelten Kleinhirne wurden danach 3 min bei Raumtemperatur mit 1 % Trypsin in CMF-PBS inkubiert, um die Zell-Zell-Kontakte zu lösen. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Trypsin abgesaugt, durch eine 0,05 %-ige DNase Lösung in BME-Medium (Gibco, #41010) ersetzt und das Gewebe nacheinander durch drei Glaspipetten mit absteigendem Enddurchmesser homogenisiert. Das Homogenat wurde abzentrifugiert (3 min, RT, 210 x g), der Überstand verworfen und das Zellpellet in CMF-PBS resuspendiert. Danach erfolgte eine erneute Homogenisierung durch die drei Glaspipetten. Die Zellsuspension wurde anschließend durch ein Nylonnetz mit 40 μm Poren filtriert, um die vereinzelt Zellen von Verunreinigungen und Gewebeklumpen zu separieren. Der Durchfluss wurde erneut zentrifugiert und das nun erhaltene Zellpellet in SFM durch die Glaspipetten resuspendiert und danach auf einer Zellkulturschale für 15 min im Zellkulturschrank inkubiert. Bei diesem Inkubationsschritt heften sich Fibroblasten an der unbehandelten Oberfläche der Schale an, während die neuronalen Primärzellen frei im Medium schwimmen. Das Medium mit diesen

Zellen wurde abgenommen, die Zellen gezählt und in der gewünschten Zelldichte in einem vorbeschichteten Zellkulturgefäß neu ausgesät.

2.2.3 Transfektion

Für Kolokalisierungsstudien und Koimmunopräzipitation wurden sowohl transformierte Zelllinien als auch primäre cerebellare Astrozyten mit verschiedenen Plasmid-DNAs (siehe Tabelle 2.3) transfiziert. Hierfür wurden entweder das FuGENE® HD Transfection Reagent (Roche) oder das Cell Line Nucleofector™ Kit R (amaxa) für NIH-3T3 Zellen verwendet. In allen Fällen erfolgten die Experimente streng nach Herstellerprotokoll. Bei Einsatz des Roche-Kits wurde mit dem Verhältnis 1 µg DNA zu 3 µl Transfektionsreagenz gearbeitet. Für die amaxa-Transfektionen wurden pro Probe 2 µg Plasmid-DNA eingesetzt und die Elektroporation mit dem Programm A-024 (NIH-3T3) durchgeführt.

Tabelle 2.3: Klonierte Expressions-Plasmide für die Transfektion

cDNA	Fragment	Plasmid	NCBI-Nr.	Markierung
borg1	nt 398 - 1055	pEGFP-C1	NM 026772	GFP
borg2	nt 283 - 935	pEGFP-C1	NM 026514	GFP
borg3	nt 180 - 816	pEGFP-C1	NM 021454	GFP
borg4	nt 676 - 1759	pEGFP-C1	NM 020006	GFP
borg4	nt 676 - 1759	pcDNA3.1/Zeo	NM 020006	-
borg5	nt 1524 - 2146	pEGFP-C1	NM 027219	GFP
Septin-4	nt 36 - 1472	pcDNA4/myc-His A	NM 011129	Myc

2.2.4 Zellmorphologie-Quantifizierung transfizierter Zellen

Um die Auswirkung der ektopischen Expression eines Zielproteins auf die Morphologie der transfizierten Zellen quantifizieren zu können, wurden mikroskopische Aufnahmen der entsprechenden Zellen angefertigt und der Zellumfang bzw. die -fläche über das Programm “NIH-Image“ am Computer ermittelt und vergleichend mit Kontrollzellen analysiert.

2.3 Plasmide

Für Transfektions-Experimente und *In-vitro* Transkription (bei der ISH) wurden bestimmte PCR-Fragmente (Zielgene) in kommerzielle Vektor-Systeme inkloniert. Dabei wurde immer nach den Vorgaben und Protokollen der Plasmid-Hersteller gearbeitet.

Die hierfür benötigten PCR-Fragmente wurden nach Standardprotokoll amplifiziert

und über Säulen des NucleoSpin[®] Extract II-Kits (Macherey-Nagel, Deutschland) aus dem Agarosegel aufgereinigt. Danach erfolgte die Klonierung in den Zielvektor und die Transformation von kompetenten *E. coli* (DH5 α , Invitrogen, Deutschland). Die gewünschte Plasmid-DNA wurde abschließend mit dem NucleoBond[®] PC500 Kit (Macherey-Nagel, Deutschland) oder dem EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Deutschland) aus den Bakterien aufgereinigt. Zur Kontrolle der klonierten Plasmide wurde eine Sequenzierung durchgeführt (MWG Biotech AG, Deutschland).

2.4 In-Situ Hybridisierung

Die bei -80 °C gelagerten Maus-Gehirne wurden mit OCT-Medium (Tissue-Tek, Sakura, Niederlande) auf Halteplatten aufgeklebt, mit einem Kryostat (Leica, Deutschland) geschnitten, die 20 μm dicken Schnitte auf spezielle SuperFrost[®] Plus Objektträger (Menzel, Deutschland) aufgezogen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Die *In-situ* Hybridisierung zum Nachweis von mRNA in Gewebeschnitten wurde entweder mit radioaktiv (³⁵S) oder Digoxigenin (DIG) markierten Sonden nach Heuer et al. [97] durchgeführt.

Bei der Prähybridisierung wurden die luftgetrockneten Schnitte für 1 h in einer 4 %-igen PFA Lösung fixiert und für 10 min in einer 0,4 %-igen Triton X-100 Lösung permeabilisiert. Danach erfolgte eine Acetylierung der Schnitte (TEA-Lösung mit Säureanhydrid, 10 min), um positive Ladungen im Gewebe abzusättigen. Die Schnitte wurden dann abschließend mit Ethanol in aufsteigender Konzentration dehydriert und luftgetrocknet. Alle zwischenzeitlichen Waschschrte erfolgten in PBS.

RNA-Sonden wurden durch *in-vitro* Transkription des zu analysierenden Gens hergestellt [98]. Entsprechende Sequenzabschnitte dieses Gens wurden dazu in ein Plasmid (pGEM[®]-Teasy (Promega, USA) oder pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen, USA)) kloniert, das T7 und SP6 Promotorsequenzen für RNA-Polymerasen aus Bakteriophagen enthält. Mit Hilfe der, den Promotorsequenzen entsprechenden, RNA-Polymerasen wurden mit unmarkierten, (³⁵S)-UTP und (³⁵S)-CTP markierten Nukleotiden (Amersham, GB) (radioaktive ISH) oder mit DIG-UTP markierten Nukleotiden (DIG RNA Labeling Mix, Roche, Deutschland) (nichtradioaktive ISH) einzelsträngige RNA-Sonden synthetisiert. Alle hierfür verwendeten Plasmidkonstrukte sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Die RNA-Sonden wurden in Hybridisierungspuffer (50 % Formamid, 10 % Dextransulfat, 0,6 M NaCl, 10 mM Tris·HCl pH 7.5, 1 x Denhardt's, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Lachs-Sperma-DNA, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ t-RNA, 1 mM EDTA, 10 mM Dithiothreitol) auf eine Endkonzentration von $5 \cdot 10^4$ cpm/ml (radioaktive Sonden) oder 5 ng/ μl (DIG-Sonden) verdünnt, anschließend auf die Gewebeschnitte aufgetropft und die Schnitte bei 58 °C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert.

Die Posthybridisierung der mit RNA-Sonde markierten Schnitte erfolgte durch Waschen in Natriumzitratpuffer (SSC: 0,3 M NaCl, 0,03 M Natriumzitat, pH 7.0) mit abnehmender Salzkonzentration (2x, 1x, 0,5x und 0,2x SSC) sowie einer RNase Behandlung (RNase A (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und RNase T1 (1U/ml)) bei 37 °C.

Tabelle 2.4: Klonierte Plasmide für die in-vitro Transkription / ISH

cDNA	Fragment	Größe	NCBI-Nr.	Plasmid	Promotor/ Orientierung
borg1	nt 398 - 1055	657 bp	NM 026772	pGEM Teasy	T7 (antisense) SP6 (sense)
borg2	nt 283 - 935	652 bp	NM 026514	pGEM Teasy	T7 (sense) SP6 (antisense)
borg3	nt 180 - 816	636 bp	NM 021454	pGEM Teasy	T7 (antisense) SP6 (sense)
borg4	nt 708 - 1326	618 bp	NM 020006	pGEM Teasy	T7 (antisense) SP6 (sense)
borg5	nt 1524 - 2146	622 bp	NM 027219	pGEM Teasy	T7 (antisense) SP6 (sense)
Septin-4	nt 36 - 1472	1436 bp	NM 011129	pGEM Teasy	T7 (antisense) SP6 (sense)
Septin-2	nt 167 - 862	695 bp	NM 010891	pCRII-TOPO	T7 (sense) SP6 (antisense)
GLAST	nt 494 - 1160	666 bp	NM 148938	pGEM Teasy	T7 (sense) SP6 (antisense)
GFAP	nt 105 - 930	825 bp	NM 010277	pGEM Teasy	T7 (antisense) SP6 (sense)

Bei der radioaktiven ISH schloss sich an die Posthybridisierung eine Dehydrierung der Schnitte durch Ethanolbehandlung in aufsteigender Konzentration an. Danach wurden die Schnitte getrocknet, in eine Röntgenkassette einsortiert und ein Biomax MR Film (Kodak, Sigma Aldrich, Deutschland) zur Bestimmung der Signalintensitäten aufgelegt. Um die hybridisierten Schnitte mikroskopisch auswerten zu können, wurden diese in NTB2-Fotoemulsion (Kodak, Integra Biosciences, Deutschland) getaucht und nach dem Trocknen bei 4 °C in speziellen abgedunkelten Boxen gelagert. Die Entwicklung der getauchten Schnitte erfolgte nach 1 - 14 Tagen, je nach der zu detektierenden mRNA, für 5 min in D19-Entwicklerlösung (Kodak, Sigma-Aldrich, Deutschland). Abschließend wurden die Schnitte für 15 min mit Rapid Fix-Fixierer (Kodak, Sigma-Aldrich, Deutschland) fixiert, erneut dehydriert und mit Deckgläschen abgedeckt. Um die Lokalisierung der ISH-Signale zellulär zuzuordnen zu können, wurden manche Schnitte vorher noch mit Kresylviolett gegengefärbt. Bei der DIG-ISH wurden die Schnitte nach der oben beschriebenen Posthybridisierung mit P1 (100 mM Tris·HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) gewaschen und für 45 min in P2 (P1 mit 10 % Magermilchpulver) geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit alkalischer Phosphatase konjugierten, 1:1000 verdünnten anti-Digoxigenin Antikörpern (Roche, Deutschland) über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag wurden die

Schnitte erneut mit P1 und P3 (100 mM Tris·HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5) gewaschen. Danach erfolgte die Färbung der Schnitte durch Inkubation mit Substratlösung (P3 mit 80 µg/ml NBT (Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid) und 45 µg/ml X-Phosphat(5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat)) für 1-4 Stunden bei Raumtemperatur.

2.5 Quantitative Real-Time-PCR

Gesamt-RNA wurde mit dem NucleoSpin® RNAII-Kit (Macherey-Nagel) entweder aus frisch entnommenen oder aus bei -20 °C in RNAlater (Ambion) gelagerten Kleinhirnen isoliert. Die Synthese der cDNA erfolgte mit Hilfe des ThermoScript™ RT-PCR Systems (Invitrogen, Deutschland) mit oligo(dT)₂₀-Primern nach Herstellerprotokoll. Die anschließende quantitative Real-Time-PCR (qPCR) wurde in einem iCycler (BIO-RAD, Deutschland) durchgeführt. Die Amplifikation der Zielgene erfolgte mit dem iQ™ SYBR Green Supermix (BIO-RAD, Deutschland) und den in Tabelle 2.5 aufgelisteten Primern. Die Normalisierung der erhaltenen Messwerte erfolgte über einen Abgleich mit Cyclophilin als Standard.

Tabelle 2.5: Primer für die quantitative Real-Time-PCR

Gen	Primer (5' - 3')	PCR-Produkt
Cyclophilin	GCA AGG ATG GCA AGG ATT GA AGC AAT TCT GCC TGG ATA GC	101 bp
borg4	GAT ACG GTC TCA CTC TAG CC GGG TAG AAT TAC AGG AGC TG	169 bp
Septin-4	CTG GGT AAA TCC ACT CTT GT TAT ATC CAC TGC GTG CTT AG	123 bp
GLAST	TGG TCT AGA GTG AGC CTT GT CTG TCT GAG ATC CTC ATG GT	144 bp
Deiodinase Typ 1	CGT GAC TCC TGA AGA TGA TG CCA ATG CCT ATG GTT CCT AC	199 bp

2.6 Herstellung eines anti-borg4 Antikörpers

Die Immunisierung eines Kaninchens mit dem N-terminal lokalisierten Peptid RGPDRVAAAPPRQPDK der Proteinsequenz von borg4 erfolgte durch die Firma Davids Biotechnologie (Regensburg, Deutschland). Das Antiserum (50 ml) wurde von uns käuflich erworben und zuerst die Gesamt-IgG Fraktion über eine Protein-G-Sepharose Säule isoliert. Die an die Sepharose gebundenen IgGs wurden mit 0,1 M Glyzin (pH 2.8) eluiert, mit 2 M Tris (pH 7.3) neutralisiert und in NaP-Puffer über Nacht dialysiert. Das dialysierte Eluat wurde anschließend zur Isolierung der

borg4 spezifischen Antikörper über eine, mit dem Immunisierungspeptid beladene Sepharose-Säule (Amersham, NHS-aktivierte Sepharose 4 *Fast Flow*) affinitätsgereinigt.

Hierfür zirkulierte die Gesamt-IgG Fraktion mit 8 ml/h drei Tage lang über die Peptidsäule. Danach wurden zuerst die unspezifisch gebundenen Immunglobuline durch Waschen und Eluieren mit Tris- (pH 8.0), Borat- (pH 9.2) und Zitratlösung (pH 4.0) entfernt und danach die gebundene anti-borg4 IgG Fraktion mit 0,1 M Glyzin (pH 2.8) vom Trägermaterial eluiert. Das Eluat wurde sofort mit 2 M Tris (pH 7.3) neutralisiert und über Nacht bei 4 °C in Bindepuffer (20 mM NaP, 0,04 % NaN₃) dialysiert. Mittels ELISA (Reacti-Bind Maleic Anhydride Activated Polystyrene 98-well Plate, Pierce, #15110) wurde die Konzentration (0,9 mg/ml) der Antikörperlösung bestimmt, die Lösung abschließend mit BSA (2 mg/ml) und 0,04 % NaN₃ versetzt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.7 Proteinanalyse

2.7.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese / Western-Blot

Zur Gewinnung von Proteinlysaten wurden Kleinhirngewebe oder abgeerntete Zellen in Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 % Triton X-100, Proteinase-Inhibitor-Mix (Roche, Deutschland)) homogenisiert und für zwei Stunden bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurden alle unlöslichen Zellbestandteile abzentrifugiert (10 min, 16.000 x g, 4 °C). Die Protein-Konzentration der Lysate wurde durch BCA-Messung (BCA™ Protein Assay Kit, Pierce) ermittelt. Gleiche Proteinmengen wurden dann auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und nach Standardprotokoll im elektrischen Feld nach Größe aufgetrennt. Als Größenmarker dienen der PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas, #SM1811) oder der SeeBlue® Plus2 Prestained Standard (Invitrogen, #LC5925)

Durch Tank-Western-Blot (Mini Trans-Blot®, BIO-RAD) wurden die Proteine im elektrischen Feld aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) transferiert. Danach wurde die Membran für 1 h geblockt (5 % Magermilchpulver in 1 x TBS-T) und über Nacht mit dem Primärantikörper bei 4 °C inkubiert. Die in Tabelle 2.6 aufgelisteten Primärantikörper kamen zur Detektion der entsprechenden Proteine auf der Western-Blot-Membran zum Einsatz.

Am Folgetag wurde die Membran mehrmals mit 1 x TBS-T gewaschen und der Primärantikörper anschließend durch einen entsprechenden HRP-gekoppelten, 1:2000 in TBS-T mit 5 % Magermilchpulver verdünnten Sekundärantikörper (DakoCytomation) detektiert. Nach erneutem, mehrmaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran für 1 min mit frisch gemischtem ECL (GE Healthcare, UK, #RPN2106V1/V2) inkubiert. Diese nicht-radioaktive, lichtemittierende Lösung besteht aus einem Luminol-oxidierenden Reagenz und Luminol im Verhältnis 1:1 und dient dem Nachweis von auf einer Membran immobilisierten Proteinen. Die durch die Luminol-Oxidation hervorgerufene Lichtemission wird durch die am Sekundärantikörper gebundene HRP katalysiert und mit einem Super-RX Röntgenfilm (Fuji, Deutschland)

Tabelle 2.6: Primärantikörper für Western-Blot

Antikörper	Donor	Quelle	Verdünnung
anti- β -Aktin (ab8227)	Kaninchen pAK	abcam	1:5000
anti-borg4	Kaninchen pAK	AG Heuer / FLI	1:100
anti-CDC42 (B-8)	Maus mAK	Santa Cruz	1:2000
anti-c-Myc (9E10)	Maus mAK	Santa Cruz	1:1000
anti-GFAP (G-A-5)	Maus mAK	Sigma	1:500
anti-GFP (A11122)	Kaninchen pAK	Molecular Probes	1:1000
anti-GLAST (AS22)	Kaninchen pAK	N.C. Danbolt / Oslo	0,2 μ g/ml
anti-Nicastrin (N1660)	Kaninchen pAK	Sigma	1:4000
anti-Septin-2 (N-12)	Ziege pAK	Santa Cruz	1:200
anti-Septin-4 (H-120)	Kaninchen pAK	Santa Cruz	1:100
anti-Septin-7 (H-120)	Kaninchen pAK	Santa Cruz	1:200

detektiert.

Um ein weiteres Protein auf derselben Membran detektieren zu können, wurde die Membran in einigen Fällen *gestrippt* (Stripp-Puffer: 62,5 mM Tris pH 6.7, 2 % SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol, 30 min, 50 °C).

2.7.2 Dephosphorylierung borg4

Die Protein-Dephosphorylierung erfolgte mit Antarctic Phosphatase (New England BioLabs) im dazugehörigen Reaktionspuffer für 1 h bei 37 °C. Es wurden 15 U Enzym zur Dephosphorylierung von 10 μ g Protein eingesetzt.

2.7.3 Immunopräzipitation / Koimmunopräzipitation

Um nachzuweisen, ob die beiden Proteine Septin-4 und borg4 interagieren, wurden HEK-293 Zellen mit den entsprechenden Expressions-Plasmiden (Sept4-pcDNA/myc-His[®] B und borg4-pEGFP-C1) in einer 10 cm Kulturschale kotransfiziert. Als Kontrollen dienten untransfizierte, mit GFP (pEGFP-C1) oder den einzelnen Expressions-Plasmiden (Sept4-pcDNA/myc-His[®] B oder borg4-pEGFP-C1) transfizierte HEK-293. Nach 12 h wurden die Zellen mit je 5 ml kaltem PBS gewaschen und mit je 1 ml Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 % Triton X-100, complete[®] Proteinase-Inhibitor-Mix (Roche, Deutschland)) geerntet. Die abgeernteten Zellen wurden anschließend für 2 h und bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Die dabei nicht lysierbaren Zellbestandteile wurden dann abzentrifugiert (10 min, 16.000 x g, 4 °C).

Jeweils 1,5 mg getrocknete Protein-A-Sepharose (Sigma-Aldrich, #P3391) wurde

pro Lysat eingewogen, mit je 0.5 ml Lysepuffer 30 min lang resuspendiert und abschließend zweimal mit Lysepuffer gewaschen.

Die Lysate wurden für 1 h mit Protein-A-Sepharose behandelt, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Nach der Inkubationszeit wurde die Sepharose abzentrifugiert und verworfen. Danach wurden 5 μg anti-GFP Antikörper (Molecular Probes, Invitrogen, #A11122) zugegeben und die Lysate damit 4 h lang auf einem Drehrad inkubiert. Nach dieser Zeit wurde zu dem Lysat-Antikörper-Gemisch erneut Protein-A-Sepharose zugegeben und die Inkubation über Nacht fortgesetzt. Am Folgetag wurde die Sepharose viermal mit jeweils 0,5 ml Waschpuffer (Lysepuffer mit 1,5 % Triton X-100) gewaschen und die gebundenen Antikörper und Proteine mit je 30 μl Lämmli Protein-Ladepuffer von dem Trägermaterial eluiert. Die Denaturierung des Eluates erfolgte für 10 min bei 95 °C. Nach Abzentrifugation der Sepharose wurde das Eluat auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen, die Proteine aus dem Gel auf eine Membran geblotet und mit einem anti-c-Myc Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, #sc-40), sowie zur Kontrolle mit dem für die IP verwendeten anti-GFP Antikörper detektiert.

Alle oben beschriebenen Inkubations- und Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C. Das beschriebene Protokoll wurde nach Kinoshita et al. [89] in leicht abgeänderter Form verwendet.

2.7.4 Membranfraktionierung

Um die Lokalisierung von Proteinen in speziellen Zellkompartimenten experimentell zu ermitteln, wurde eine Membranfraktionierung [82] durchgeführt.

Hierfür wurden zwei Kleinhirne zwölf Tage alten Pax8^{+/+} Mäusen in Puffer (10 mM HEPES, 320 mM Saccharose, 5 mM EDTA und Proteinase-Inhibitor-Mix (Roche, Deutschland) homogenisiert und bei 12.000 x g abzentrifugiert. Das Pellet (Kern, Mitochondrien) wurde verworfen und der Überstand in einer Ultrazentrifuge (Beckmann, TLA 100.3) für 1 h bei 120.000 x g zentrifugiert. Nach diesem Schritt befanden sich alle zytosolischen Proteine im Überstand. Das Pellet (Zellmembran, Endoplasmatisches Retikulum, Zytoskelett) wurde mit Homogenisierungspuffer gewaschen und erneut 1 h lang bei 120.000 x g zentrifugiert. Danach erfolgte die Detergenzextraktion der membrangebundenen Proteine mit 1 % Triton-X 100 in PBS (4 °C, 45 min, Drehrad). Bei dem sich final anschließenden Zentrifugationsschritt (1 h, 120.000 x g) verblieben die Membranproteine im Überstand und alle Zytoskelett- und zytoskelettassoziierten Proteine im Pellet. Alle Schritte erfolgten bei 4 °C.

2.8 Immunzytochemie

Um die Verteilung und Lokalisierung von Proteinen in Zellen nachweisen zu können, wurden diese mit einem entsprechenden Antikörper gegen das Zielprotein immunzytochemisch gefärbt. Hierfür wurden die Zellen in 24-well Platten auf Deckgläschen ausgesät und kultiviert. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 4 % Paraformaldehyd für 30 min bei Raumtemperatur. Danach wurde das PFA mit PBS gründlich abgewaschen, die Zellmembranen mit 0,05 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert und mit

10 % Ziegen Serum für 1 h geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 2.7; verdünnt in PBS, 0,05 % Triton, 1 % Ziegen Serum) erfolgte bei 4 °C über Nacht. Der Primärantikörper-Lösung wurde Hoechst 33258 (Molecular Probes, Invitrogen, #H-3569) Farbstoff zugegeben (1:10.000), um die Zellkerne anzufärben. Am Folgetag wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen (15 min, RT, Schüttler). Danach wurde der, ebenfalls in PBS mit 0,05 % Triton und 1 % Ziegen Serum, 1:1000 verdünnte, Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488/555 anti-IgG (Molecular Probes, Invitrogen, USA), 1:1000) zugegeben und im abgedunkelten Gefäß bei RT auf einem Schüttler für 1 h inkubiert. Das nachfolgende Waschen erfolgte, wie oben bereits beschrieben, ebenfalls im abgedunkelten Zustand. Die Deckgläschen wurden aus der 24-well Platte genommen und mit Eindeckelmedium (Gel-Mount # M01, Biomed, USA) auf einen zuvor beschrifteten Objektträger aufgezogen. Nach einer Trocknungszeit von mehreren Stunden konnten die gefärbten Zellen mikroskopisch ausgewertet werden.

2.9 Immunhistochemie

2.9.1 Vibratomschnitte

Die Gehirne perfusionsfixierter Mäuse wurden in 4 %-iger Agarose eingebettet und mit einem Vibratom HM 650 V (Microm, Deutschland) in 50 μ m dicke sagittale Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden mit einem Pinsel in eine, mit PBS gefüllte, 24-well Platte überführt und entweder sofort gefärbt oder bei 4 °C gelagert. Zum Permeabilisieren und Blocken der Schnitte wurde PBS mit 0,2 % Triton X-100 und 10 % Ziegen Serum verwendet. Die Primärantikörper (siehe Tabelle 2.7) und Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488/555 anti-IgG (Molecular Probes, Invitrogen, USA), 1:1000) wurden in PBS mit 0,2 % Triton X-100 und 1 % Ziegen Serum verdünnt. Alle weiteren Schritte des Färbeprotokolls erfolgten identisch, wie zuvor im Kapitel Immunzytochemie beschrieben. Zum Schluss wurden die Schnitte mit einem Pinsel auf einen Objektträger aufgezogen und mit einem Deckgläschen und Einbettmedium (Gel-Mount # M01, Biomed, USA) abgedeckt. Nach einer Trocknungszeit von mehreren Stunden konnten die gefärbten Schnitte mikroskopisch ausgewertet werden.

2.9.2 Kryostatschnitte

Die Gehirne perfusionsfixierter Mäuse wurden in einer 30 %-igen Saccharoselösung bei 4 °C entwässert, mit PBS gewaschen, anschließend auf Trockeneis in 2-Methylbutan schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Zum Schneiden wurde das Gewebe mit Tissue-Tek (Sakura, Niederlande) auf die Kryostat-Halteplatten aufgeklebt und in 20 μ m dicke sagittale Scheiben geschnitten, die auf spezielle SuperFrost® Plus Objektträger (Menzel, Deutschland) aufgezogen wurden. Die Immunfärbung erfolgte wie im Abschnitt 2.9.1 beschrieben. Zur Detektion der Primärantikörper wurden entweder fluoreszenzgekoppelte (Alexa Fluor® 488/555 anti-IgG (Molecular Probes, Invitrogen, USA), 1:1000) oder Biotin-gekoppelte (anti-

Tabelle 2.7: Primärantikörper für Immunfärbungen

Antikörper	Donor	Quelle	Verdünnung
anti-borg4	Kaninchen pAK	AG Heuer / FLI	1:100
anti-Calbindin (C9848)	Maus mAK	Sigma-Aldrich	1:500
anti-Calbindin (CB-38a)	Kaninchen pAK	Swant	1:500
anti-c-Myc (9E10)	Maus mAK	Santa Cruz	1:500
anti-GFAP (6F2)	Maus mAK	Dako	1:100
anti-GFAP (G-A-5)	Maus mAK	Sigma-Aldrich	1:100
anti-GFAP (G9269)	Kaninchen pAK	Sigma-Aldrich	1:500
anti-GFP (A11121)	Maus mAK	Molecular Probes	1:500
anti-GFP (A11122)	Kaninchen pAK	Molecular Probes	1:500
anti-GLAST (AB1782)	Meerschwein pAK	Chemicon	1:500
anti-Septin-4 (H-120)	Kaninchen pAK	Santa Cruz	1:100
anti-Tubulin α (DM1A)	Maus mAK	Sigma-Aldrich	1:200
Rhodamin/ Phalloidin (R415)	Fluoreszentes Phallotoxin	Molecular Probes	1:40

IgG aus Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, USA), 1:100) Sekundärantikörper verwendet. Die Auswertung erfolgte nach Eindeckeln mit wässrigem Einbettmedium (Gel-Mount # M01, Biomedica, USA) und Trocknen mittels Fluoreszenzmikroskopie oder nach enzymatischer Signalkonvertierung von DAB durch den Biotin-Avidin-HRP-Komplex (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, USA), Eindeckeln mit wässrigem Einbettmedium (Gel-Mount # M01, Biomedica, USA) und Trocknen mittels Lichtmikroskopie.

2.10 TUNEL-Apoptose-Assay

Zur Detektion apoptotischer Zellen im Kleinhirn der Maus wurde das *In-Situ* Cell Death Detection Kit, POD der Firma Roche verwendet. Hierfür wurden 20 μm dicke Kryostatschnitte von unbehandelten, tiefgefrorenen Pax8 Wildtyp- bzw. Pax8^{-/-}-Kleinhirnen angefertigt und nach Protokoll des Herstellers fixiert, permeabilisiert und mit dem TUNEL-Reaktionsmix behandelt. Als Positivkontrolle dienten mit 10 U DNaseI, als Negativkontrolle mit TUNEL-Markierungslösung (ohne Transferase) behandelte WT Schnitte. Nach erfolgter fluoreszenzmikroskopischer Auswertung der mit Fluoreszein markierten Zellen wurde ein mit HRP gekoppelter anti-Fluoreszein Antikörper sowie das Peroxidase Substrat DAB (Sigma Fast™ 3,3'-Diaminobenzidine Tabletten Set, Sigma, #D-4168) zugegeben, um das Fluoreszenzsignal in einen chemischen Niederschlag umzuwandeln. Abschließend wurden die

markierten Schnitte mit Deckgläschen abgedeckt und konnten lichtmikroskopisch ausgewertet werden.

2.11 Organotypische Schnittkulturen

Zum Anlegen einer Kleinhirn-Schnittkultur wurden Mäuse durch Dekapitation getötet, das Cerebellum herauspräpariert und mit einem Tissue-Chopper (McIlwain Tissue Chopper TC 752) sagittal in 200 - 400 μm dicke Scheiben geschnitten. Diese Gewebeschnitte mussten dann unter einem Stereomikroskop separiert werden. Fünf bis sechs der separierten Schnitte aus dem mittleren Kleinhirnareal wurden mit dem Ende einer Glaspipette auf Kulturplatteneinsätze (Millicell, #CM, 0,4 μm Poren) überführt. Die Kultivierung dieser Einsätze erfolgte in einer, mit 1,2 ml Neurobasalmedium (Gibco, #21103) je *well* gefüllten, 6-well Platte im Inkubator unter Standardbedingungen. Das Neurobasalmedium wurde je nach Fragestellung mit oder ohne Zusatz von B-27 (Gibco) eingesetzt.

2.12 Mikroskopie

Zur mikroskopischen Auswertung der durchgeführten Experimente wurden entweder ein Mikroskop AX70 mit Kamera DP70 und Software analySIS-B (alles Olympus, Deutschland) oder ein Mikroskop Axiovert 200M Apotome mit zugehöriger Kamera AxioCam MR und Software Axio Vision (alles Carl-Zeiss, Deutschland) verwendet. Um die radioaktiv *in-situ* hybridisierten Gewebeschnitte zu dokumentieren, kam zusätzlich zu dem Olympus AX70 ein externer Dunkel-Feld-Aufsatz zum Einsatz.

2.13 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse der gezeigten Messwerte (Mittelwertvergleich) wurde der Student's t-Test angewendet. Alle angegebenen Werte verstehen sich als Mittelwerte von Parallelmessungen. Der in den Graphiken angegebene Fehlerbalken spiegelt das Vertrauensintervall (SEM (*standard error of the mean*)) des Mittelwertes, basierend auf einer Irrtumswahrscheinlichkeit p von $p=0.05$, wider. Das Signifikanzniveau der Unterschiede in den Mittelwerten ist in den Graphiken durch Sterne gekennzeichnet: $p<0.05$ *, $p<0.01$ **, $p<0.001$ ***.

3.1 Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die Kleinhirnentwicklung der Maus

Um die Entwicklung und Differenzierung der Bergmann Glia und Purkinjezellen im Kleinhirn *in-vivo* dokumentieren zu können, wurden Cerebella von Pax8^{-/-}- und Pax8^{+/+}/S100β-GFP Mäusen analysiert. Da die Pax8^{-/-} (KO) Tiere ohne funktionelle Schilddrüse geboren werden, eignen sie sich hervorragend als athyroides Modellsystem für entwicklungspezifische Studien.

Für die vorgestellten *in-vitro* Experimente wurden gemischte cerebellare Primärzellkulturen von neugeborenen Mäusen angelegt und diese in serumfreiem Medium, oder in serumfreiem Medium, dem Thyroidhormon (1 nM T3) zugesetzt war, kultiviert. Hierdurch konnten eu- bzw. athyroide Entwicklungsbedingungen simuliert werden.

3.1.1 Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die Differenzierung der Purkinjezellen

Schilddrüsenhormone sind für die korrekte Entwicklung und Ausdifferenzierung von Purkinjezellen essentiell. Dies wird in Abbildung 3.1 sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* gezeigt.

Als *in-vivo* Modell dienten immungefärbte, sagittale Vibratonschnitte der Cerebella einer Wildtypkontrolle und einer Pax8^{-/-} Maus zum Zeitpunkt P12 (Abbildung 3.1, A und B). Die Dendritenbäume der Purkinjezellen zeigten unter den athyroiden Bedingungen der KO Maus (B) die charakteristische und in der Literatur beschriebene [52, 62] Retardierung. Sie waren viel kürzer, unorientierter und weniger verzweigt, verglichen mit der Wildtypkontrolle (A). Der komplette Kortex wirkte weniger organisiert, die Molekularschicht war schmaler und die äußere Körnerzellschicht noch stark ausgeprägt.

Um die Morphologie der Purkinjezellen *in-vitro* analysieren zu können, wurden primäre cerebellare Mischzellkulturen (Neurone und Astrozyten) angelegt und für zwei Wochen in serumfreiem Medium ohne oder mit Thyroidhormon (1 nM T3) kultiviert (Abbildung 3.1, C und D). Nach dieser Periode waren die mit T3 behandelten Purkinjezellen (C) charakteristisch ausdifferenziert. Weit verzweigte Dendritenbäume mit vielen seitlichen Verästelungen und *spines* hatten sich herausge-

bildet. Im Vergleich dazu waren die Purkinjezellen ohne Zugabe von T3 (D) nur eingeschränkt in der Lage, Dendriten auszubilden. Diese waren dann sehr kurz und wirkten verkümmert.

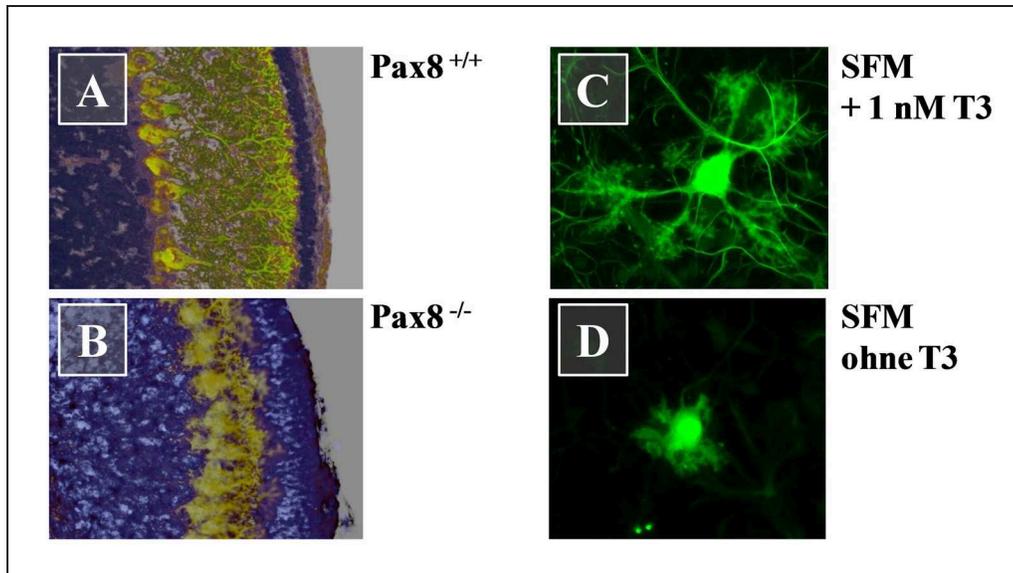


Abbildung 3.1: Purkinjezellen zeigen unter athyroiden Bedingungen eine stark retardierte Entwicklung und Differenzierung *in-vivo* und *in-vitro*. Eu- (oben) und athyroide (unten) Purkinjezell-Differenzierung: Sagittal geschnittenes und immunhistochemisch mit anti-Calbindin als Purkinjezellmarker gefärbtes Wildtyp- (A) und *Pax8*^{-/-}-Cerebellum (B) zum Zeitpunkt P12 (200x, links); Purkinjezellen wurden mit (C) oder ohne T3 (D) in serumfreiem Medium kultiviert (630x, rechts) und immunzytochemisch mit anti-Calbindin gefärbt.

3.1.2 Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die Entwicklung der Bergmann Gliazellen

Um die Fragestellung bearbeiten zu können, ob die Differenzierung der Bergmann Gliazellen im sich entwickelnden Kleinhirn der Maus ebenfalls durch Schilddrüsenhormonmangel beeinträchtigt ist, war eine Visualisierung der kompletten Zellmorphologie dieser Zellen erforderlich. Mit herkömmlich verwendeten gliazspezifischen Immunfärbungen waren nur distinkte Zellkompartimente detektierbar. Dies ist in Abbildung 3.2 (A-C) für den Gliazellmarker GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) dargestellt. GFAP ist ein Intermediärfilamentprotein, das postnatal in Astrozyten exprimiert wird. In Bergmann Gliazellen ist GFAP in den langen, die Molekularschicht durchspannenden Radialfasern lokalisiert.

Immunfärbungen gegen Proteine, die hauptsächlich in den kurzen seitlichen Fortsätzen der Bergmann Glia lokalisiert sind, lieferten nur unzureichende Ergebnisse. Zur Visualisierung der kompletten Bergmann Glia-Morphologie und der Interaktionen zwischen diesen spezialisierten Gliazellen und den Purkinjezellen wurden daher spezielle transgene Mäuse genutzt, die GFP spezifisch unter dem Gliazellpromotor

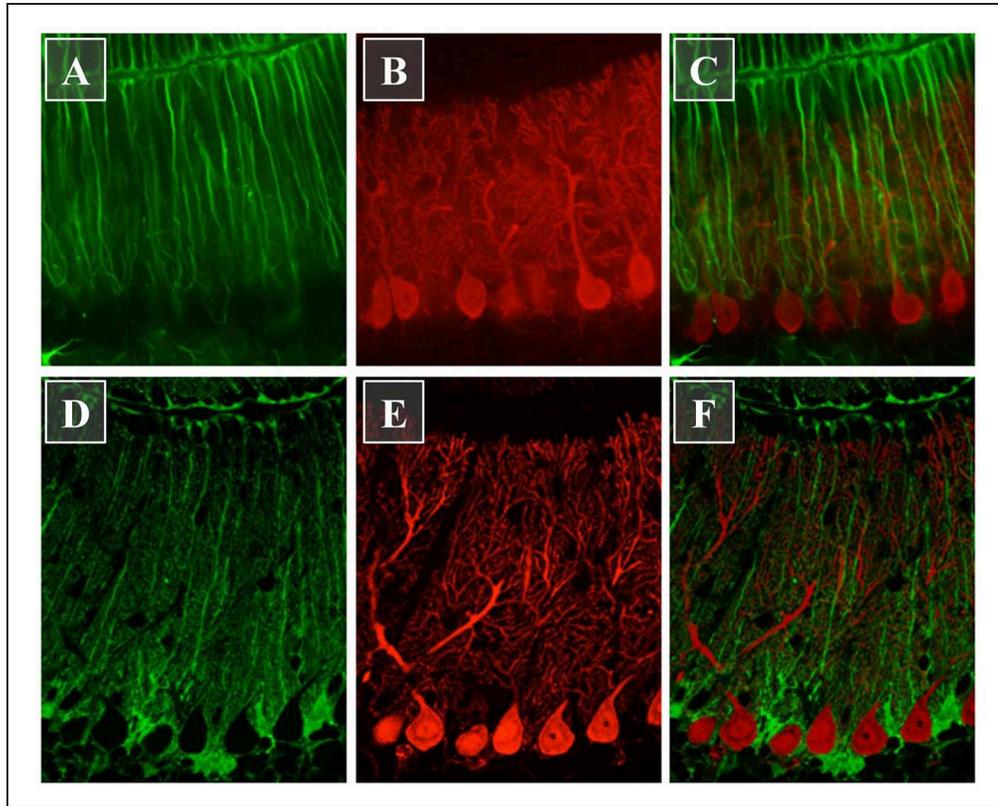


Abbildung 3.2: *Transgene Mäuse, die GFP unter einem gliaspezifischen Promotor exprimieren, dienen als Modellsystem zur Visualisierung der Bergmann Glia-Entwicklung im Cerebellum: immunhistochemischer Vergleich von sagittalen Pax8^{+/+} (oben) und Pax8^{+/+}/S100β-GFP (unten) Cerebella-Schnitten zum Zeitpunkt P12 (400x); Immunfärbung gegen GFAP (A) und GFP (D) in grün, gegen Calbindin (B, E) in rot; Bei dem GFP-transgenen Tier kann die gesamte Bergmann Glia-Morphologie (D) und das Bergmann Glia-Purkinjzell-Netzwerk (F) dargestellt werden, bei der transgen-negativen Pax8^{+/+} Maus nur spezielle Kompartimente der Gliazellen, wie z.B. die Radialfasern (A, C).*

S100β (siehe Abbildung 3.2 D-F) exprimieren [96].

Um eu- und athyroide Bergmann Glia-Entwicklung untersuchen zu können, wurden die GFP-transgenen Mäuse mit heterozygoten Pax8 Mäusen [14] verpaart. Ab der zweiten Tochtergeneration konnten dann in verschiedenen Experimenten Cerebella von Pax8^{+/+}/S100β-GFP und Pax8^{-/-}/S100β-GFP Mäusen miteinander verglichen werden.

Mit diesem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die seitlichen Bergmann Glia-Fortsätze in enger Interaktion mit den Dendriten der Purkinjzellen stehen. Diese Fortsätze umfassen und stabilisieren die Dendriten und bilden so ein sehr engmaschiges Netzwerk aus (siehe Abbildung 3.3 A). Die Radialfasern hingegen stehen im sich entwickelnden Cerebellum in engerem Kontakt zu den Körnerzellen. Diese nutzen die Radialfasern als Führungsschiene für ihre Migration von der äußeren in die innere Körnerzellschicht (siehe Abbildung 3.3 B).

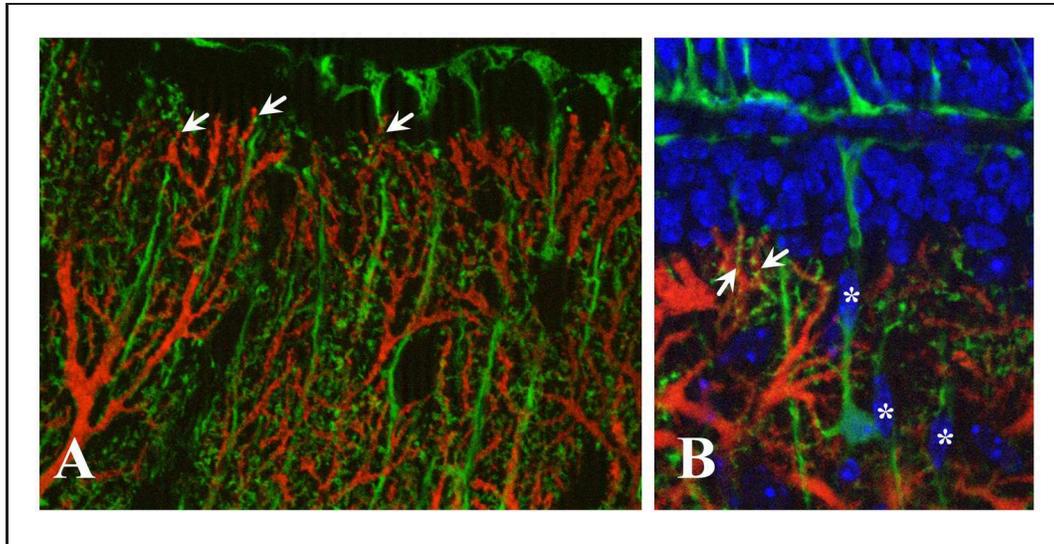


Abbildung 3.3: *Bergmann Glia (grün) und Purkinjezellen (rot) bilden ein eng interagierendes Netzwerk im Kleinhirnkortex aus. Dabei umfassen die seitlichen Bergmann Glia-Fortsätze die Dendriten der Purkinjezellen (Pfeile). Die Körnerzellen (B, blau) migrieren während der Kleinhirnentwicklung in enger Assoziation an den Radialfasern der Bergmann Glia entlang in die innere Körnerzellschicht (B, Sterne).*

Die Tatsache, dass Purkinjezellen unter athyroiden Bedingungen eine retardierte Entwicklung und Differenzierung zeigen, ist lange bekannt und in der Literatur gut beschrieben. Um nachweisen zu können, ob die Bergmann Gliazellen im Cerebellum der Maus zum Zeitpunkt der Geburt bereits komplett ausdifferenziert sind, oder sich ebenfalls postnatal entwickeln, wurden Vibratomschnitte von Pax8^{+/+}/S100 β -GFP und Pax8^{-/-}/S100 β -GFP Mäusen im Alter von 6, 12 und 21 Tagen (P6, P12, P21) angefertigt. Vergleichende immunhistochemische Analysen mit anti-Calbindin als Marker für Purkinjezellen (rot) und anti-GFP zur Visualisierung der Bergmann Gliazellen (grün) sollten zeigen, inwieweit die Morphologie und die Differenzierung dieser Zellen unter athyroiden Bedingungen betroffen sind. Die Ergebnisse für die Tiere zum Zeitpunkt P6 sind in der Abbildung 3.4 dargestellt.

In diesem Entwicklungsstadium beginnt die Ausdifferenzierung der Dendritenbäume der Purkinjezellen. Die analysierten Purkinjezellen der KO Maus (Bild 3.4 rechts) befanden sich noch im Vorläuferstadium, die Dendritenbäume wuchsen nur verzögert. Die Hirnhaut in beiden Tieren war stark angefärbt. Dieses Artefakt kann auf die unzureichende Perfusion der Mäuse zurückgeführt werden. Die Zellkörper der Bergmann Gliazellen lagen noch deutlich unterhalb der Purkinjezellsomata. Die Purkinjezellen migrieren während der weiteren Kleinhirnentwicklung noch nach innen, um dann mit den umgebenden Bergmann Glia-Somata im adulten Zustand die Purkinjezellschicht auszubilden [70].

In der Abbildung 3.4 ist außerdem deutlich zu erkennen, dass die Radialfasern der Bergmann Gliazellen sowohl im KO Tier als auch in der Wildtypkontrolle komplett angelegt und ausgebildet waren, in der KO Maus aber etwas kürzer (Abstand Zell-

somata zur Hirnhaut) erschienen. Diese Beobachtung resultiert wahrscheinlich aus der geringeren Körpergröße und damit auch Gehirngröße der KO Maus. Außerdem konnte hier gezeigt werden, dass sich die kleinen seitlichen Fortsätze an den Bergmann-Glia-Radialfasern erst postnatal entwickeln. Diese bildeten im Kontrolltier, oberhalb der Bergmann-Glia-Zellkörper und im Bereich der sich ausdifferenzierenden Dendriten der Purkinjezellen ein dichtes Netzwerk. Im athyroiden Pax8^{-/-} Tier hingegen fehlten diese kurzen seitlichen Verzweigungen an den meisten Bergmann-Glia-Radialfasern oder waren nur spärlich um den Purkinjezellkörper herum ausgebildet.

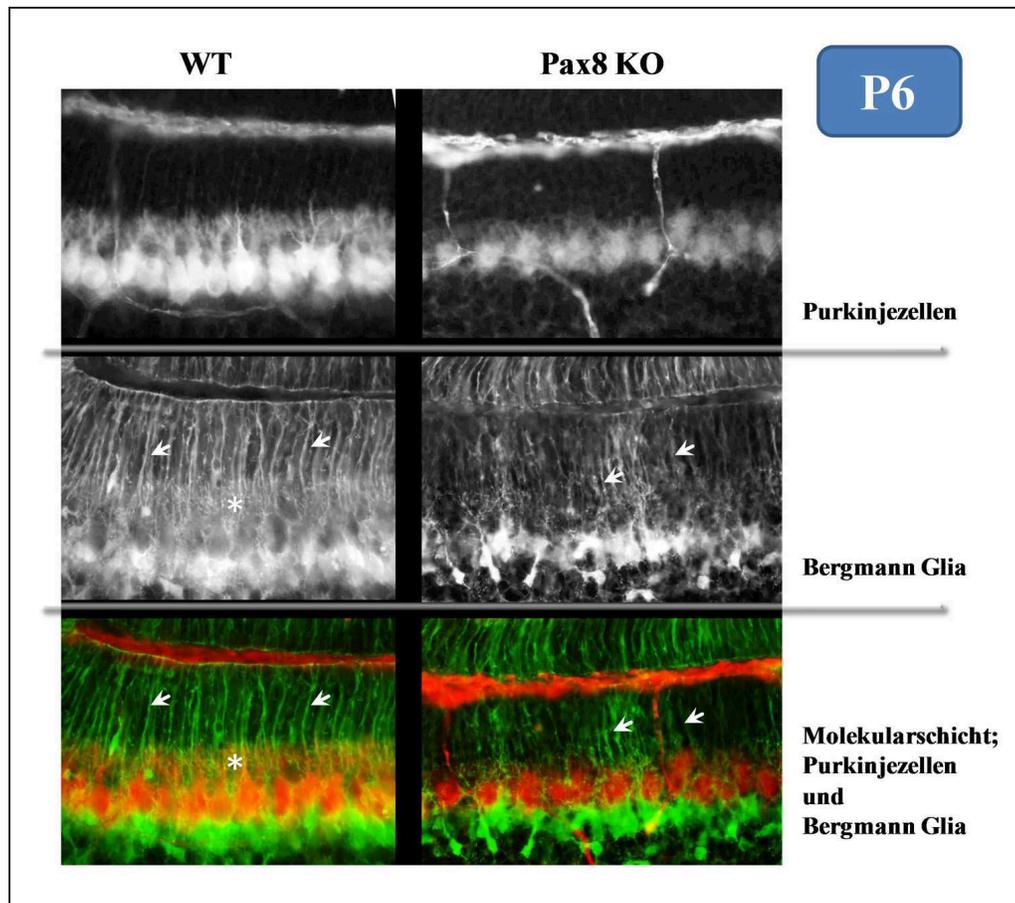


Abbildung 3.4: Differenzierung von Bergmann-Glia- und Purkinjezellen *in-vivo* unter eu- (WT) und athyroiden (Pax8 KO) Bedingungen: Immunhistochemischer Vergleich von sagittal geschnittenen Cerebella zum Zeitpunkt P6 mit anti-Calbindin (PZ, oben) und anti-GFP (BG, Mitte). Die Radialfasern der Bergmann-Gliazellen (Pfeile) sind in WT und KO Tier komplett ausgebildet und unverändert, während eine verzögerte Entwicklung der seitlichen Bergmann-Glia-Fortsätze im KO Tier zu beobachten war. Diese Fortsätze (Stern) und die Dendriten der Purkinjezellen differenzieren synchron aus. Aufnahmen 400x

Die Entwicklung und Differenzierung von Bergmann-Glia- und Purkinjezellen *in-vivo* unter eu- und athyroiden Bedingungen zu den Zeitpunkten P12 und P21 sind

als fortführende Studien in den Abbildungen 3.5 und 3.6 dargestellt.

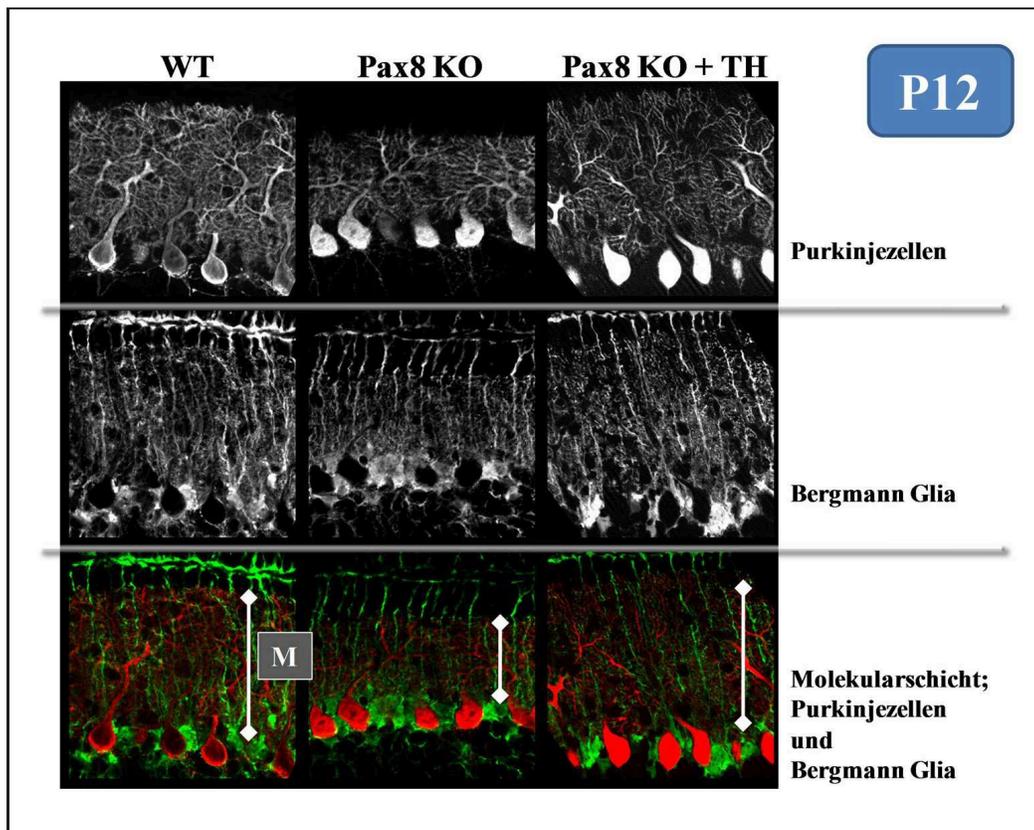


Abbildung 3.5: Differenzierung von Bergmann Glia- und Purkinjezellen *in-vivo* unter eu- (WT) und athyroiden (*Pax8* KO) Bedingungen: Immunhistochemischer Vergleich von sagittalen Kleinhirnschnitten zum Zeitpunkt P12 mit anti-Calbindin (PZ, oben) und anti-GFP (BG, Mitte). Die Purkinje- und Bergmann Gliazellen im *Pax8* KO Cerebellum sind stark retardiert und wenig ausdifferenziert. Das interagierende Bergmann Glia-Purkinjezell-Netzwerk bildet die Molekularschicht (M), die in der *Pax8*^{-/-} Maus schmaler als in der WT-Kontrolle ist. Der WT-Phänotyp ist durch Thyroxin-Substitution der *Pax8*^{-/-} Maus rekonstruierbar (rechtes Panel). Aufnahmen 400x

Am postnatalen Tag P12 zeigten beide Zelltypen unter athyroiden Bedingungen eine retardierte und verzögerte Entwicklung, bei der, verglichen mit der Wildtypkontrolle, bei den Purkinjezellen der Dendritenbaum und bei den Bergmann Gliazellen die seitlichen Verzweigungen an den Radialfasern besonders betroffen waren.

Die Somata beider Zelltypen lagen zu diesem Zeitpunkt in einer Ebene und bildeten die Purkinjezellschicht im cerebellaren Kortex aus. Dabei umschlossen immer mehrere Bergmann Gliazellen ein Neuron. Die Dendriten und die seitlichen Gliafortsätze entwickelten sich synchron und bildeten dabei ein dichtes, interagierendes Netzwerk - die Molekularschicht - aus (siehe Bild 3.5, M). Da die Bergmann Glia- und die Purkinjezellen im *Pax8* KO Tier unter Thyroidhormon-Mangelbedingungen weniger ausdifferenziert waren, war auch die Molekularschicht schmaler als unter euthyroi-

den Bedingungen.

Die seitlichen Fortsätze der Bergmann Glia-Radialfasern waren in der Pax8^{-/-} Maus nur spärlich entwickelt. Um zeigen zu können, dass es sich bei dieser morphologischen Veränderung um einen durch Schilddrüsenhormone induzierten Phänotyp handelte, wurden die KO Tiere ab dem 7. Tag nach der Geburt mit einer physiologischen Thyroxin-Dosis (20 ng/g BW T4) substituiert. Der Entwicklungszustand des mit T4 substituierten Kleinhirns wurde dann zum Zeitpunkt P12 immunhistochemisch analysiert (Bild 3.5, Pax8 KO + TH).

Dabei war sehr deutlich zu erkennen, dass die Bergmann Gliazellen nach der Substitution eine mit der Wildtypkontrolle vergleichbare Morphologie zeigten. Die seitlichen Fortsätze waren dichter und nun auch in den oberen Bereichen der Radialfasern ausgebildet. Da auch die Dendriten der Purkinjezellen nach der T4-Substitution ausdifferenzierter und weiter entwickelt waren als im KO Tier, entsprach die Ausdehnung der Molekularschicht der der Wildtyp-Maus.

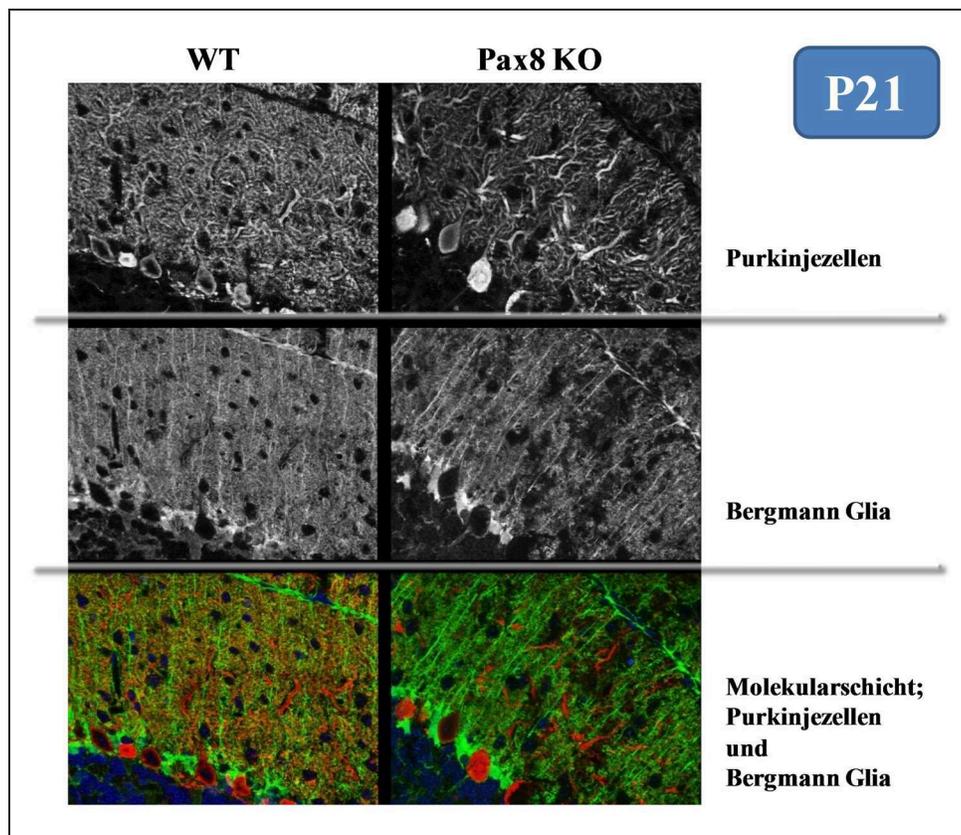


Abbildung 3.6: Differenzierung von Bergmann Glia- und Purkinjezellen *in-vivo* unter eu- (WT) und athyroiden (Pax8 KO) Bedingungen: Immunhistochemischer Vergleich von sagittal geschnittenen Cerebella zum Zeitpunkt P21 mit anti-Calbindin (PZ, oben) und anti-GFP (BG, Mitte). Die kurzen Bergmann Glia-Fortsätze reichen bis zur Pia, sind aber im Pax8 KO Tier nicht so dicht und homogen ausgebildet wie in der WT-Kontrolle. Aufnahmen 400x

Um einen morphologischen Gesamtüberblick über den dreiwöchigen Entwicklungs-

und Differenzierungszeitraum des Kleinhirns der Maus zu bekommen, wurden abschließend die Bergmann Glia- und Purkinjezellen zum Zeitpunkt P21 im euthyroiden (WT) und athyroiden (Pax8 KO) Cerebellum analysiert (siehe Abbildung 3.6). Zu diesem Zeitpunkt durchspannten sowohl die Dendriten der Purkinjezellen als auch die Bergmann Glia-Radialfasern mit den seitlichen Fortsätzen die gesamte Molekularschicht bis zur Pia hin. Die Molekularschicht im athyroiden Cerebellum erschien jedoch etwas schmaler, verglichen mit der Wildtypkontrolle. Auffällig war weiterhin, dass die Dendriten und die Gliafortsätze unter Thyroidhormon-Mangel (Pax8 KO) nicht so dicht und homogen ausgebildet waren wie im Kleinhirn mit euthyroidem Thyroidhormon-Status (WT). Besonders die lamellenartigen Verzweigungen an den Radialfasern der Bergmann Glia wirkten spärlich und verkümmert, während im Wildtyp-Cerebellum ein sehr dichtes und homogenes Neuron-Glia-Netzwerk zu beobachten war.

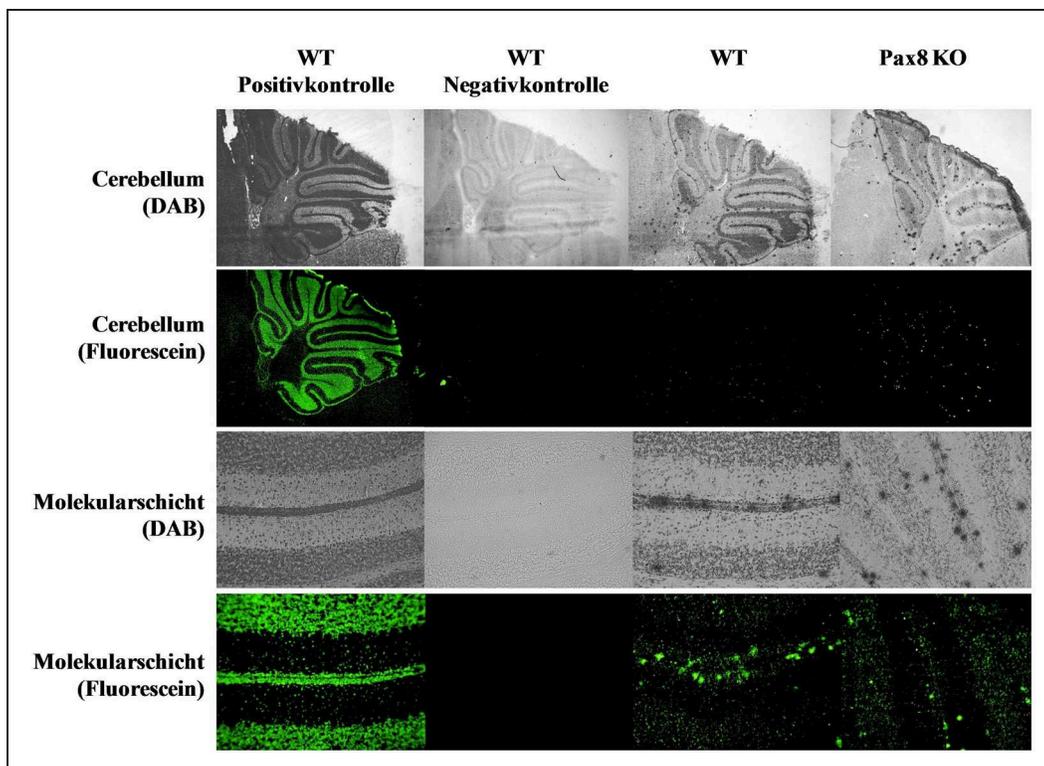


Abbildung 3.7: Bergmann Glia- und Purkinjezellen im hypothyroiden Cerebellum sind nicht apoptotisch. TUNEL-Apoptose-Assay im eu- (WT) und athyroiden (Pax8 KO) Cerebellum der Maus zum Zeitpunkt P12. Sagittale Kryostatschnitte wurden mit TUNEL-Reaktionsmix behandelt und analysiert, die Positivkontrolle wurde vorher mit DNaseI behandelt. Als Negativkontrolle dienten Schnitte, die nur mit Markierungslösung (ohne Transferase) behandelt wurden. DAB: lichtmikroskopische Auswertung nach Signalumwandlung der Fluoreszenz (Fluorescein) in einen chemischen Niederschlag. Cerebellum: 40x, Molekularschicht 200x vergrößert

Zusammenfassend konnte mit dieser Versuchsreihe gezeigt werden, dass Thyroidhormone nicht nur die Entwicklung und Differenzierung der Purkinjezellen, sondern

auch der Bergmann Gliazellen im postnatalen Cerebellum entscheidend beeinflussen. Die Ausbildung der Bergmann Glia-Radialfasern war unter athyroiden Bedingungen nicht betroffen, da sich diese schon pränatal herausbildeten. Die kurzen seitlichen Fortsätze der Radialfasern wurden allerdings erst postnatal ausgebildet und stellten damit ein Ziel der Thyroidhormon-Wirkung dar. Unter athyroiden Bedingungen konnte daher eine retardierte und verzögerte Ausdifferenzierung dieser Fortsätze beobachtet werden. Nach Substitution der KO Maus mit einer physiologischen Dosis T4 waren die morphologischen Veränderungen komplett revidierbar.

Um sicherzustellen, dass der beobachtete Phänotyp der athyroiden Pax8 KO Maus nicht auf das Absterben der Bergmann Glia- bzw. der Purkinjezellen zurückzuführen war, wurde die Apoptoserate im Cerebellum von KO Tieren und Wildtypkontrollen mit einem TUNEL-Assay experimentell ermittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

Weder im Kleinhirn von 12 Tage alten (siehe Abbildung 3.7), noch von 21 Tage alten (Ergebnis nicht gezeigt) Pax8 WT oder KO Mäusen konnten durch Apoptose induzierte DNA-Doppelstrangbrüche detektiert werden. Schwache Signale lieferten lediglich einige Körnerzellen in der Molekular- und der Körnerzellschicht. Mit der, mit DNaseI behandelten Positivkontrolle konnte eine Apoptose in allen Zellpopulationen des Kleinhirns induziert und nachgewiesen werden, während mit der Negativkontrolle (nur Markierungslösung, keine Transferaseaktivität), wie erwartet, keine Zellfärbung erreicht werden konnte. Dieses Experiment zeigte eindeutig, dass weder das Absterben der Bergmann Gliazellen, noch das der Purkinjezellen für den unter athyroiden Bedingungen retardierten Phänotyp des Cerebellums verantwortlich ist.

3.1.3 Thyroidhormone wirken direkt auf kultivierte Astrozyten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass nicht nur die Entwicklung der Purkinjezellen, sondern auch die der Bergmann Gliazellen stark durch Schilddrüsenhormone beeinflusst wird, stellte sich die Frage, welche Zellpopulation im Cerebellum das Primärziel der im vorigen Kapitel beschriebenen Wirkung von Thyroidhormonen ist. Um diese Problematik experimentell bearbeiten zu können, wurden primäre cerebellare Mischzellkulturen angelegt und für zwei Wochen in serumfreiem Medium (SFM) mit oder ohne Schilddrüsenhormon (1 nM T3) kultiviert. Die Entwicklung der Astrozyten wurde in Bereichen dokumentiert, die frei von neuronalen Zellen waren. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

Die Astrozyten wurden nach der Kultivierung immunzytochemisch mit anti-GFAP, als Gliazellmarker und anti-GLAST gefärbt. GLAST ist der bedeutendste Glutamattransporter im Cerebellum, der membranständig in Astrozyten, vor allem in Bergmann Gliazellen, exprimiert wird [87]. Daher eignet sich eine GLAST-Immunfärbung hervorragend zur Visualisierung der Zelloberfläche und damit der gesamten Gliazellmorphologie.

Astrozyten, die ohne T3 kultiviert wurden, zeichneten sich durch eine langgestreckte Morphologie aus. Die GLAST-Immunreaktivität war schwach und nur in schmalen Bereichen um die GFAP-positiven Areale herum detektierbar. Nach der Zugabe

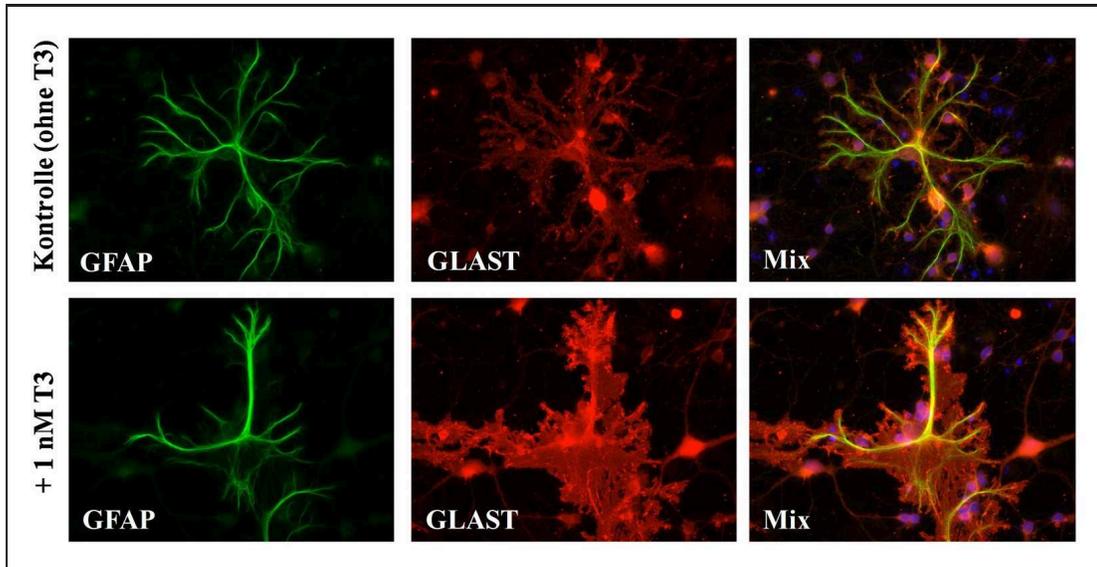


Abbildung 3.8: Primäre cerebellare Astrozyten wurden für 14 Tage in serumfreiem Medium (SFM) ohne (oben) und mit 1 nM T3 (unten) kultiviert und anschließend immunzytochemisch mit anti-GFAP (grün) und anti-GLAST (rot) analysiert. Die Zellmorphologie der Astrozyten änderte sich nach Zugabe von T3 ins Medium drastisch: Die Zelloberfläche war expandiert und die GLAST-Immunoreaktivität stark erhöht. Mikroskopische Aufnahmen: 400x, 170 ms Belichtung

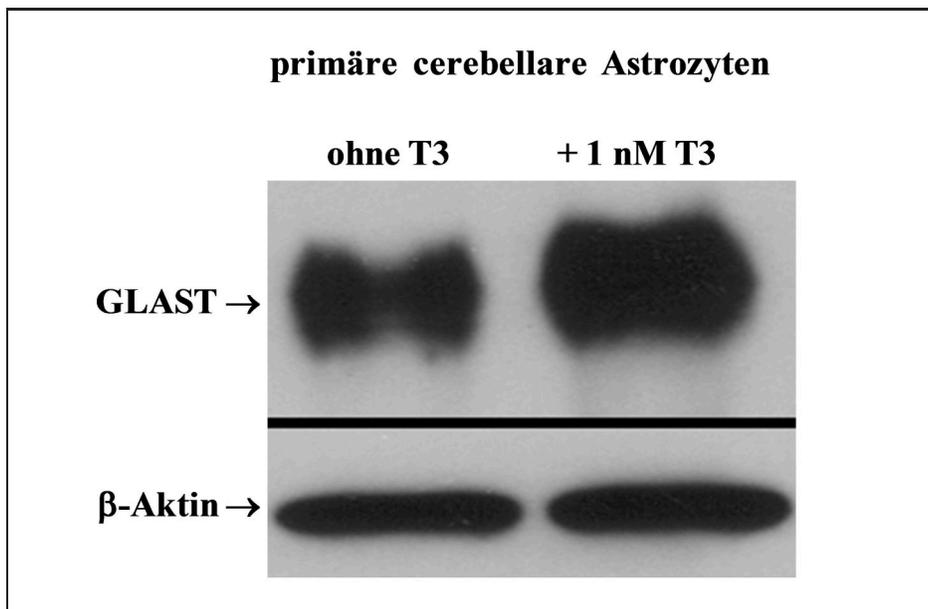


Abbildung 3.9: Validierung der erhöhten GLAST-Immunoreaktivität mittels Western-Blot: Primäre cerebellare Astrozytenkulturen wurden für 1 Woche ohne T3 bzw. unter Zugabe von 1 nM T3 in serumfreiem Medium kultiviert. In den mit T3 stimulierten Zellen konnte eine erhöhte Menge an GLAST detektiert werden, β-Aktin diente hierbei als Ladekontrolle.

von T3 stieg die GLAST-Immunreaktivität stark an. Die Zelloberfläche war expandiert und damit großflächiger färbbar. Die Zellmorphologie der mit T3 behandelten Astrozyten hatte sich auffällig verändert, wobei allerdings kein Unterschied in der GFAP-Färbung zu erkennen war. Die Behandlung mit T3 hatte somit keinen nennenswerten Einfluss auf die Radialfasern der Gliazellen. Dieses Experiment zeigte, dass Schilddrüsenhormone einen Einfluss auf die Entwicklung von kultivierten Astrozyten haben. Eine Wechselwirkung über direkte Zell-Zell-Kontakte zu den Purkinjezellen war hierbei für die beobachtete dramatische Änderung der Gliazellmorphologie nicht erforderlich.

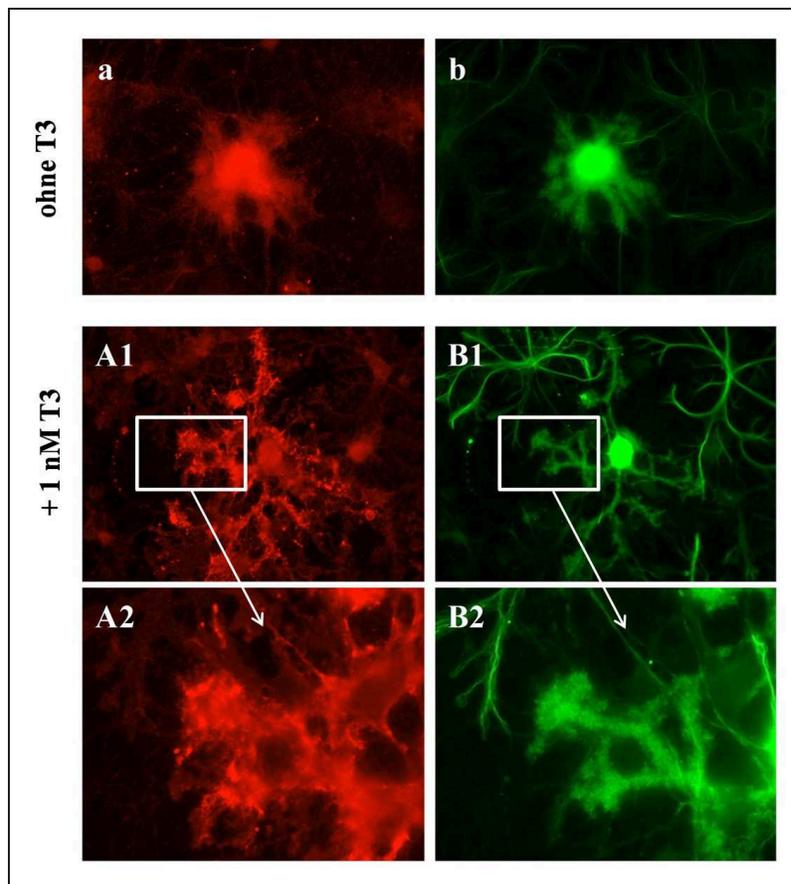


Abbildung 3.10: *Interaktion von Purkinjezellen und Astrozyten in einer primären cerebellaren Mischzellkultur, die für 14 Tage in SFM ohne (a, b; 630x) oder mit 1 nM T3 (A1, B1; 630x) kultiviert wurde. Immunzytochemie mit anti-Calbindin/GFAP (grün) und anti-GLAST (rot). Die Purkinjezellen (B1, Mitte) wachsen auf den Astrozyten (A1). In den Kontaktbereichen zwischen Astrozyten und Purkinjezellen ist eine erhöhte GLAST-Immunreaktivität detektierbar. Vergrößerung (weißer Rahmen) einer dendritischen Verzweigung in Kontakt mit einer Gliazelle (A2 und B2, 1000x).*

Die stark erhöhte GLAST-Immunreaktivität konnte, wie in Abbildung 3.9 dargestellt, auch mittels Western-Blot gezeigt und damit verifiziert werden. Aus der Stimulation der primären cerebellaren Astrozyten mit dem Schilddrüsenhormon T3

resultierte folglich eine Erhöhung der GLAST-Proteinmenge.

Wurden Bereiche der Zellkultur analysiert, in denen die Astrozyten Kontakt mit einer Purkinjezelle hatten, konnte festgestellt werden, dass dort die Immunreaktivität von GLAST besonders hoch war. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Die Färbungen gegen GLAST und Calbindin, als Marker für Purkinjezellen, waren sowohl in den unbehandelten als auch in den mit T3 behandelten Zellen überlappend. Betrachtete man eine dendritische Endigung bei höherer Vergrößerung wurde sichtbar, dass die Glutamattransporter vor allem um die dendritischen *spines* herum lokalisiert waren und diese regelrecht umschlossen. Das spricht für die essentielle Bedeutung dieses Transporters in der Synapsenausbildung und für das Überleben der Purkinjezelle. Bei den ohne T3 kultivierten Purkinjezellen war GLAST vorwiegend um den Zellkörper herum detektierbar, da ausdifferenzierte Dendriten fehlten.

3.2 Analyse von Bergmann Glia-spezifischen Genen

Wie im vorigen Kapitel gezeigt werden konnte, sind Thyroidhormone für die korrekte Entwicklung und Differenzierung der Bergmann Glia und Purkinjezellen im Kleinhirn essentiell. Um die molekularen Mechanismen zu verstehen, die zur Thyroidhormon-induzierten Differenzierung der Bergmann Gliazellen führen, wurden Bergmann Glia-spezifische Gene bzw. Genfamilien näher untersucht, die dafür bekannt sind, aktiv am Umbau des Zellzytoskeletts, in Prozessen neuronaler Entwicklung oder speziellen pathologischen Veränderungen involviert zu sein. In diesem Zusammenhang wurden GFAP, Septine, borg (*binder of Rho GTPases*) und GLAST näher analysiert.

3.2.1 Analysen zur mRNA-Expression der Zytoskelettproteine GFAP, Septin-2 und Septin-4 im eu- und athyroiden Cerebellum

GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) ist ein Intermediärfilamentprotein, das postnatal in Astrozyten exprimiert wird. Es ist für die Zellstabilität und -morphologie verantwortlich. In Bergmann Gliazellen bildet GFAP das Hauptgerüst der Radialfasern. Im sich entwickelnden Cerebellum erreicht die GFAP-Expression nach ca. zwei Wochen ein Maximum und nimmt danach ab.

Septine bilden eine eigene Klasse der Zytoskelettproteine. Einige Familienmitglieder werden funktionell im Zusammenhang mit Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen neuronaler Zellen, sowie Neurodegeneration diskutiert. Septin-2 z.B. konnte als enger Interaktionspartner des Glutamattransporters GLAST in Bergmann Gliazellen nachgewiesen werden [89].

Um zeigen zu können, ob GFAP und Septin-2 als putative Kandidaten für die Thyroidhormon-abhängige Bergmann Glia-Differenzierung in Frage kommen, wurde das Expressionsniveau beider Gene mittels *In-situ* Hybridisierung (ISH) im eu- und athyroiden Cerebellum bestimmt. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Abbildung 3.11 dargestellt.

Beide Gene wurden in den Bergmann Gliazellen zum Zeitpunkt P12 exprimiert. In

der athyroiden Pax8^{-/-} Maus war, verglichen mit einer euthyroiden Wildtypkontrolle, eine erhöhte GFAP und eine unveränderte Septin-2 mRNA-Menge nachweisbar.

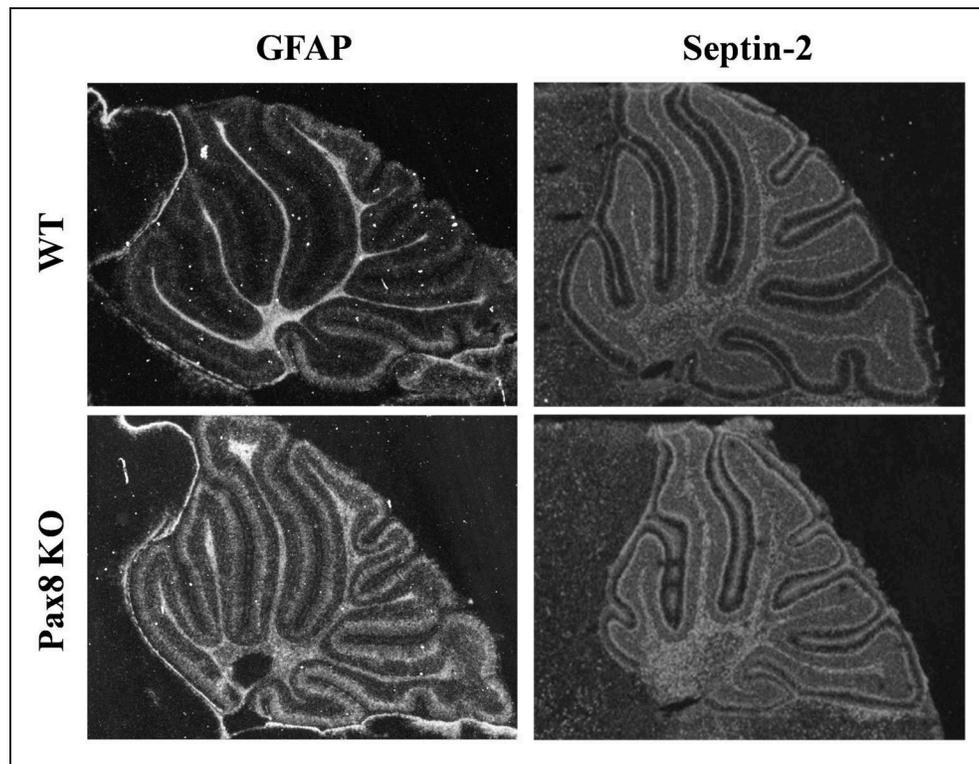


Abbildung 3.11: Im athyroiden Cerebellum der Pax8 KO Maus war zum Zeitpunkt P12 eine erhöhte GFAP- und eine unveränderte Septin-2-Expression nachweisbar. Die Detektion von GFAP- (*links*) und Septin-2- (*rechts*) mRNA erfolgte mittels radioaktiver *In-situ* Hybridisierung im euthyroiden (WT) und athyroiden (Pax8 KO) Kleinhirn der Maus.

Septin-4 wird überwiegend in Gliazellen exprimiert. Im normal ausdifferenzierten Kleinhirn konnte die mRNA von Septin-4 mittels radioaktiver *In-situ* Hybridisierung in den Gliazellen der Purkinjzellschicht und in der weißen Substanz nachgewiesen werden. Bei höherer mikroskopischer Vergrößerung wurde deutlich, dass das ISH-Signal hauptsächlich um die Purkinjzellsomata herum lokalisiert ist. Dies deutete auf eine Expression von Septin-4 in den Bergmann Gliazellen hin (siehe Abbildung 3.12 A, C). Wurde im Vergleich zur Wildtypkontrolle ein athyroides Cerebellum einer zwölf Tage alten Pax8^{-/-} Maus analysiert, konnte festgestellt werden, dass die Septin-4 mRNA Menge in der Purkinjzellschicht stark erniedrigt war (siehe Abbildung 3.12 B), während die Transkriptspiegel in der weißen Substanz unverändert erschienen.

Um dieses Ergebnis zu validieren, wurde die Septin-4 mRNA-Menge in Wildtyp-relativ zu Pax8 KO-Tieren mittels quantitativer Real-Time-PCR bestimmt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Septin-4 Expression in athyroiden Cerebella verglichen mit den Wildtypkontrollen um ca. 50 % erniedrigt war (3.12, rechts).

Um nachzuweisen, dass dieses Bergmann Glia-spezifische Gen tatsächlich abhängig

vom Schilddrüsenhormon-Status der Mäuse reguliert wird, wurden Pax8^{-/-} Tiere ab dem 7. Lebenstag mit einer täglichen physiologischen Dosis von 20 ng Thyroxin pro Gramm Lebendgewicht substituiert. Die Cerebella der substituierten Mäuse wurden am 12. Lebenstag entnommen und bezüglich der Septin-4 Expression mittels ISH und Real-Time-PCR erneut analysiert. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Abbildung 3.12 D und 3.12 (rechter Kasten) dargestellt.

Das Expressionsniveau von Septin-4 stieg nach der T4-Substitution auf den Wert der Wildtypkontrolle an. Das konnte mit der *In-situ* Hybridisierung als semiquantitative Methode festgestellt und mit der quantitativen Real-Time-PCR verifiziert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Septin-4 Expression in den Bergmann Gliazellen des Kleinhirns positiv durch Thyroidhormone reguliert wird.

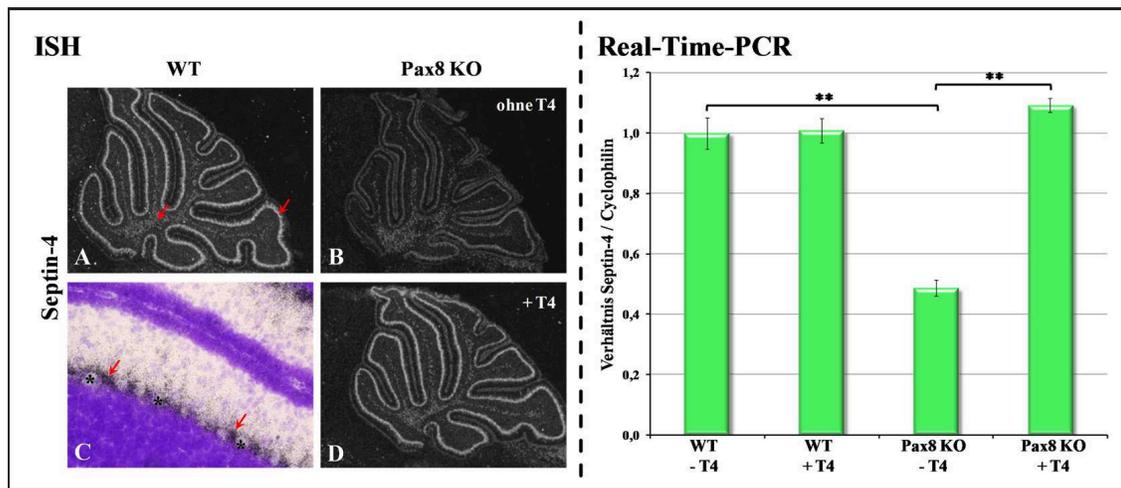


Abbildung 3.12: links: Detektion von Sept4-mRNA durch radioaktive ISH im Cerebellum der Maus zum Zeitpunkt P12. **A:** Hohe ISH-Signalintensitäten konnten in der Purkinjezellschicht und der weißen Substanz (rote Pfeile) des euthyroiden Kleinhirns (WT) nachgewiesen werden, während die Signalstärke im athyroiden Kleinhirn (Pax8 KO) stark erniedrigt war (**B**). **C:** In zusätzlich mit Kresylviolett gefärbten Schnitten ist das Sept4-ISH-Signal (rote Pfeile) um die Purkinjezellsomata (Stern) herum in den Bergmann Gliazellen nachweisbar; **D:** Die erniedrigten Sept4-Transkriptspiegel erreichen nach TH-Substitution das Wildtypniveau. (A, B, D: 40x, C: 400x) rechts: Validierung der TH-abhängigen Sept4-Expression durch quantitative Real-Time-PCR. Alle Daten entsprechen Mittelwerten ± SEMs. Signifikanz nach einseitigem Student's t-test (**) $p < 0.01$

3.2.2 Analysen zur Bestimmung des Expressionsmusters von borg-Proteinen im Cerebellum der Maus

Borg-Proteine (*binder of Rho GTPases*) sind die einzigen bislang bekannten Regulatoren der Septinassemblierung. Ob Mitglieder der borg-Genfamilie im Cerebellum der Maus exprimiert werden, war bisher nicht bekannt. Aus diesem Grund wurde

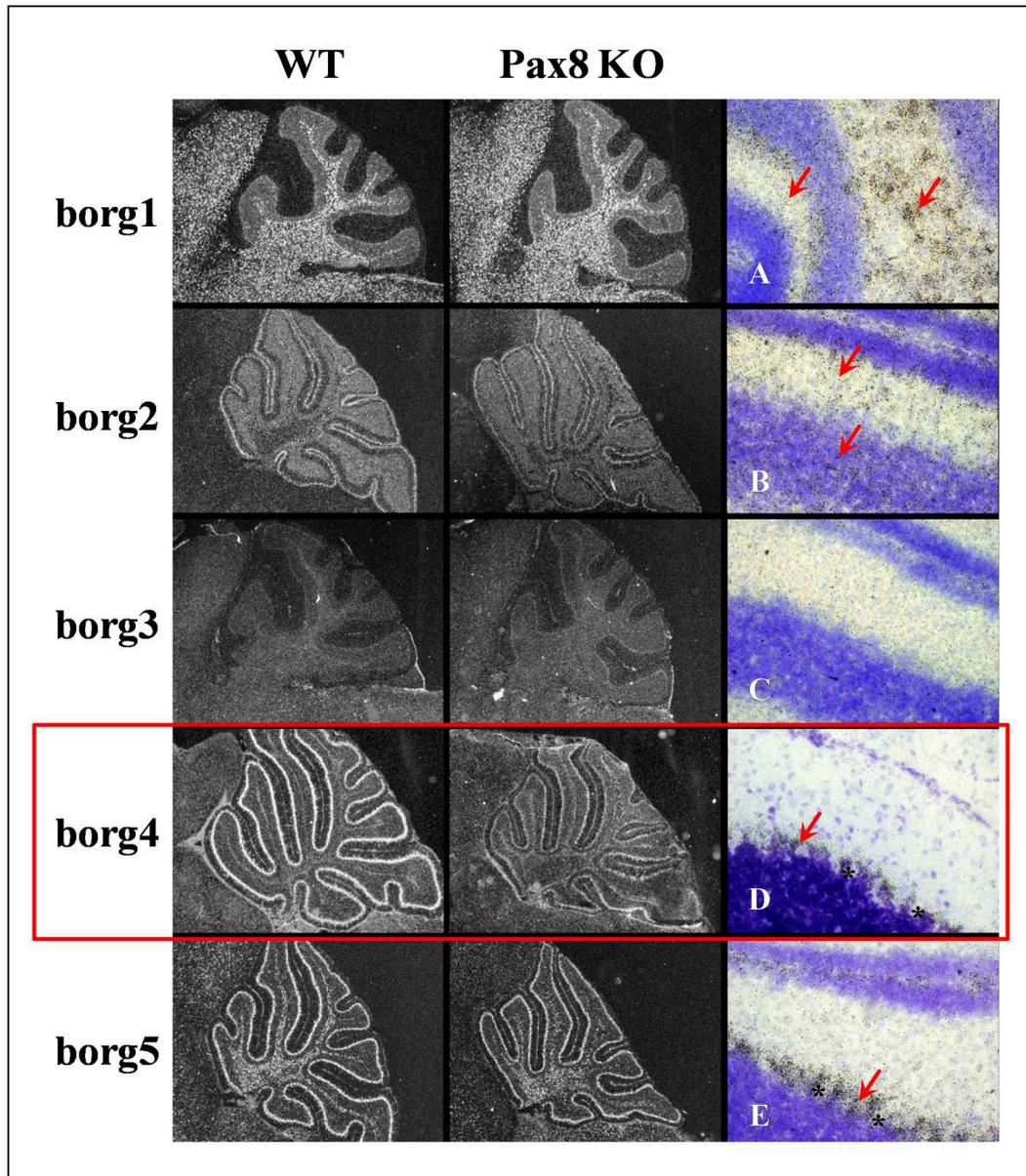


Abbildung 3.13: Bestimmung des Expressionsmusters von borg1-5 im Cerebellum einer eu- (WT) und einer athyroiden Maus (Pax8 KO) zum Zeitpunkt P12 mittels In-situ Hybridisierung: Die zelluläre Lokalisation der einzelnen borg wurde durch zusätzliche Kresylviolett-färbung, 400-fache Vergrößerung und Dokumentation im Hellfeld bestimmt (A-E, rechts). Borg1, 2, 4 und 5 wurden im Kleinhirn detektiert, borg4 und 5 in Bergmann Gliazellen. Die spezifischen ISH-Signale (rote Pfeile) für borg4 und borg5 waren um die Purkinjezellsomata (Sterne) herum lokalisiert. Nur borg4 zeigte eine TH-abhängige Expression (roter Kasten). Darstellung der ISH-Signale im Dunkelfeld (links, Mitte, 40x).

für alle fünf Familienmitglieder eine Expressionsanalyse im Kleinhirn mittels radioaktiver *In-situ* Hybridisierung (ISH) durchgeführt. Parallel zu Nachweis und Lokalisationsbestimmung der borg-mRNA wurden die Expressionsmengen in eu- (WT) und athyroiden (Pax8 KO) Mäusen zum Zeitpunkt P12 miteinander verglichen. Das Ergebnis dieser Studie ist in Abbildung 3.13 dargestellt.

Borg1 war als starkes ISH-Signal in den Gliazellen der weißen Substanz des Kleinhirns detektierbar. Borg2 konnte als schwaches ISH-Signal in der äußeren und inneren Körnerzellschicht nachgewiesen werden. Deshalb konnte davon ausgegangen werden, dass borg2 im Kleinhirn überwiegend von Körnerzellen exprimiert wird. Es waren jedoch für beide Gene keine unterschiedlichen ISH-Signalintensitäten in den beiden verschiedenen Versuchstieren feststellbar. Der Nachweis einer Expression von borg3 war durch ISH weder im eu- noch im athyroiden Cerebellum zu diesem Zeitpunkt möglich.

Borg4 und borg5 wurden in hohem Maße in der Purkinjezellschicht exprimiert. Die jeweiligen ISH-Signale waren um die Zellkörper der Purkinjezellen herum lokalisiert. Das zeigte, dass sowohl borg4 als auch borg5 in Bergmann Gliazellen vorkommen. Borg5 war zusätzlich auch in Gliazellen der weißen Substanz nachweisbar. Die Menge an borg4-mRNA war im athyroiden Tier stark erniedrigt, während keine Unterschiede in den ISH-Signalintensitäten für borg5 im Pax8 KO Tier oder in der Wildtypkontrolle feststellbar waren. Zusammenfassend konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass borg4 ein Bergmann Glia-spezifisches Gen ist, dessen Expression durch Thyroidhormone reguliert wird. Damit wurde borg4, neben Septin-4, in weiteren Studien als putatives Kandidatengen analysiert, das in der Thyroidhormon-abhängigen Differenzierung und Entwicklung von Bergmann Gliazellen involviert sein könnte.

3.2.3 Thyroidhormon-abhängige Expression von borg4 im Cerebellum

Wie experimentell durch radioaktive *In-situ* Hybridisierung (ISH) gezeigt wurde, konnte eine Expression von borg4 in Abhängigkeit vom Schilddrüsenhormon-Status in Bergmann Gliazellen nachgewiesen werden. Durch quantitative Real-Time-PCR wurde dieses Ergebnis bestätigt und in den athyroiden Mäusen eine um ca. 60 % erniedrigte borg4-Expression ermittelt (siehe Abbildung 3.14, rechts). Um nachzuweisen, dass die erniedrigte mRNA-Menge im Pax8^{-/-} Cerebellum wirklich mit dem athyroiden Zustand der Mäuse in Verbindung stand, wurden Pax8 KO Tiere, wie in Abschnitt 3.2.1 zuvor beschrieben, mit Thyroxin (20 ng/g BW T4) substituiert. Die borg4-Transkriptspiegel in den Cerebella der so behandelten Mäuse wurden danach semiquantitativ mittels ISH und quantitativ mittels Real-Time-PCR bestimmt. Die Resultate dieser Analysen sind in Abbildung 3.14 dargestellt.

In diesem Experiment konnte mit beiden Methoden gezeigt werden, dass der borg4-Transkriptspiegel nach der Substitution mit einer physiologischen T4-Dosis wieder anstieg und das Niveau der Wildtypkontrolle erreichte. Die Expression von borg4 wird also, genau wie die von Septin-4, positiv durch Thyroidhormone reguliert.

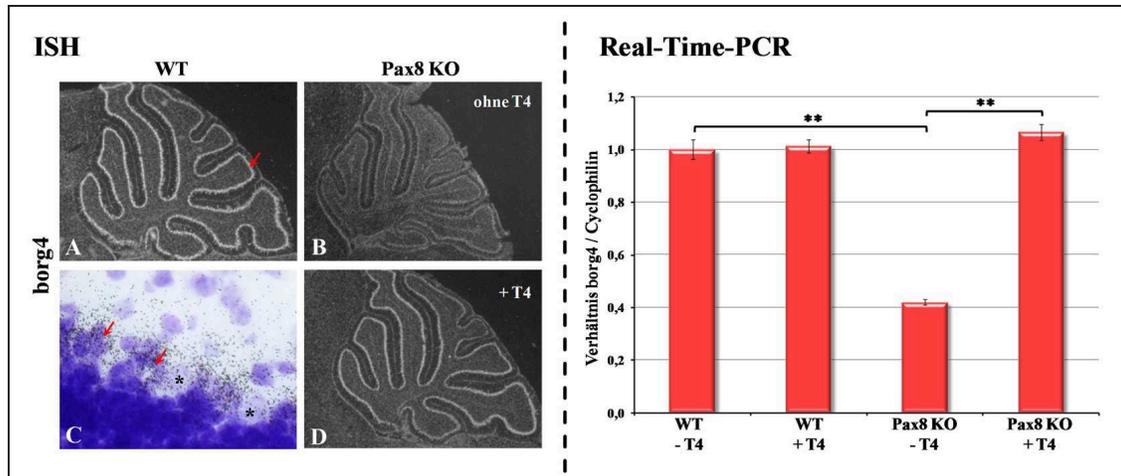


Abbildung 3.14: links: Detektion von *borg4*-mRNA durch radioaktive ISH im Cerebellum der Maus zum Zeitpunkt P12. **A:** Hohe ISH-Signalintensitäten konnten in der Purkinjezellschicht (roter Pfeil) des euthyroiden Kleinhirns (WT) nachgewiesen werden, während die Signalstärke im athyroiden Kleinhirn (*Pax8* KO) stark erniedrigt war (**B**). **C:** In zusätzlich mit Kresylviolett gefärbten Schnitten ist das ISH-Signal für *borg4* (rote Pfeile) um die Purkinjezellsomata (Stern) herum in den Bergmann Gliazellen nachweisbar. **D:** Die erniedrigten *borg4*-Transkriptspiegel erreichen nach TH-Substitution das Wildtypniveau. (A, B, D: 40x, C: 400x) rechts: Validierung der TH-abhängigen *borg4* Expression durch quantitative Real-Time-PCR. Alle Daten entsprechen Mittelwerten \pm SEMs. Signifikanz nach einseitigem Student's t-test (**) $p < 0.01$

3.2.4 mRNA-Expressionsanalyse des Glutamattransporters GLAST im eu- und athyroiden Cerebellum

Ein weiteres Gen, das im Cerebellum hauptsächlich in Bergmann Gliazellen exprimiert wird, das in der Lage ist, mit Septinen zu interagieren und das pathologisch oft im Zusammenhang mit Purkinjezell-Degeneration diskutiert wird, ist der Glutamattransporter GLAST. GLAST entfernt den Neurotransmitter Glutamat aus dem synaptischen Spalt und schützt so die Neurone vor Neurotoxizität. Der experimentelle Nachweis, dass GLAST hauptsächlich in den Bergmann Gliazellen des Mauserebellums exprimiert wird, ist in Abbildung 3.15, C dargestellt. Im Gegensatz zu den Zellkulturexperimenten aus Abschnitt 3.1.3 konnten keine unterschiedlichen Transkriptmengen von GLAST im Cerebellum der *Pax8* KO Maus, verglichen mit einem Wildtyp-Cerebellum, nachgewiesen werden (3.15, A und B). Dieses Ergebnis wurde durch quantitative Real-Time-PCR bestätigt (Bild 3.15, rechts) und deutete darauf hin, dass dieser gliaspezifische Glutamattransporter auf mRNA-Ebene im Kleinhirn der Maus unabhängig von Thyroidhormonen exprimiert wird.

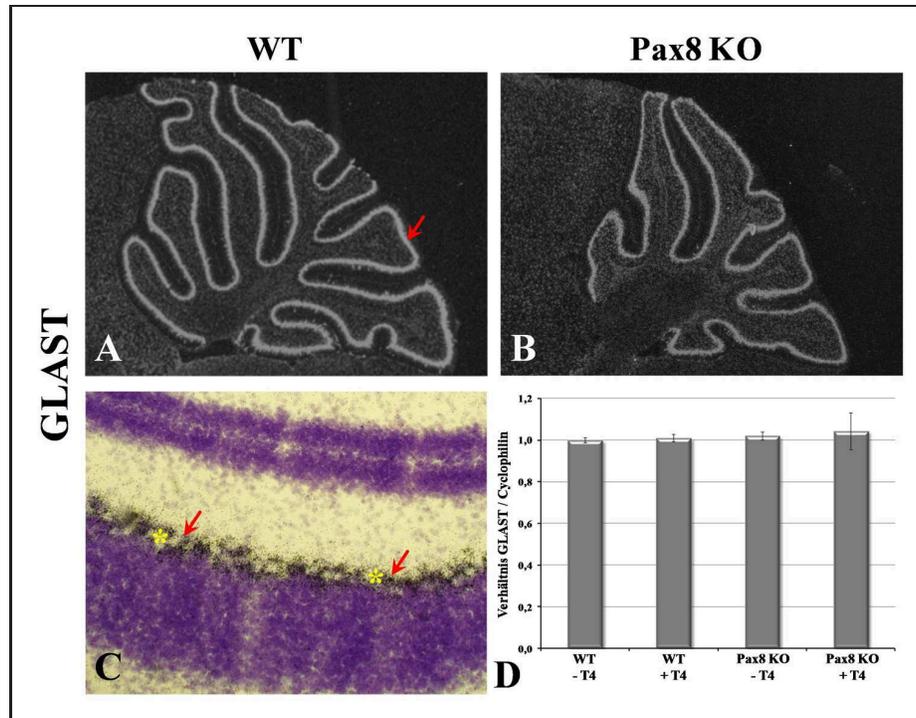


Abbildung 3.15: *A, B:* Nachweis von *GLAST*-mRNA durch radioaktive ISH im eu- (*WT*) und athyroiden (*Pax8 KO*) Cerebellum der Maus zum Zeitpunkt P12. Unveränderte ISH-Signalintensitäten konnten in der Purkinjezellschicht (roter Pfeil) beider Tiere nachgewiesen werden. *C:* In zusätzlich mit Kresylviolett gefärbten Schnitten ist das ISH-Signal für *GLAST* (rote Pfeile) um die Purkinjezellsomata (Stern) herum in den Bergmann Gliazellen nachweisbar. (*A, B:* 40x, *C:* 400x) *D:* Die Validierung der ISH-Ergebnisse erfolgte durch quantitative Real-Time-PCR. Alle Daten entsprechen Mittelwerten \pm SEMs.

3.3 Regulation Bergmann Glia-spezifischer Gene auf Proteinebene

Im vorigen Kapitel konnte durch Analysen zur mRNA-Expression von Septin-4 und borg4, zwei Bergmann Glia-spezifischen Genen im Kleinhirn der Maus, erstmalig gezeigt werden, dass die Transkriptspiegel beider Gene positiv durch Thyroidhormone reguliert werden. In nachfolgenden Experimenten sollte die Expression beider Kandidaten auch auf Proteinebene näher analysiert werden. Von besonderem Interesse war hierbei, ob ebenfalls Unterschiede zwischen den Proteinmengen von Septin-4 und borg4 in eu- und athyroiden Cerebella detektierbar waren.

3.3.1 Herstellung eines spezifisch gegen borg4 gerichteten Antikörpers

Da spezifisch gegen borg4 gerichtete Antikörper nicht verfügbar waren, wurde in unserem Auftrag ein Kaninchen mit einem Peptid immunisiert, dessen 16 Ami-

nosäuren umfassende Sequenz einem N-terminalen Bereich des borg4 Proteins entsprach. Das erhaltene polyklonale borg4-Antiserum wurde nachfolgend gegen das Peptid affinitätsgereinigt. Die Spezifität des aufgereinigten, gegen borg4 gerichteten Antikörpers in immunzytochemischen Färbungen und im Western-Blot wurde abschließend experimentell kontrolliert. Das Ergebnis dieser Spezifitätskontrolle ist für beide Anwendungen in der Abbildung 3.16 dargestellt.

In einem ersten Experiment sollte gezeigt werden, dass der aufgereinigte anti-borg4 Antikörper in der Lage ist, in Zellen, die mit einem für borg4-GFP kodierendem Plasmid transfiziert wurden, das Fusionsprotein spezifisch zu detektieren. Zum Vergleich wurden die Zellen parallel mit dem ursprünglichen borg4-Antiserum und zur Kontrolle mit einem gegen GFP gerichteten Antikörper gefärbt (Abbildung 3.16, links). Wie im Bild 3.16 A deutlich zu sehen ist, färbte das Antiserum alle Zellen auf dem Deckgläschen unspezifisch an, obwohl sich in diesem Bildausschnitt mit dem anti-GFP Kontrollantikörper nur drei Zellen nachweisen ließen, die das borg4-GFP Fusionsprotein exprimierten. Der aufgereinigte, gegen borg4 gerichtete Antikörper hingegen erkannte spezifisch nur die Zellen auf dem Deckgläschen, in denen das Fusionsprotein exprimiert wurde und die darum auch durch den gegen GFP gerichteten Kontrollantikörper erkannt wurden (3.16 B).

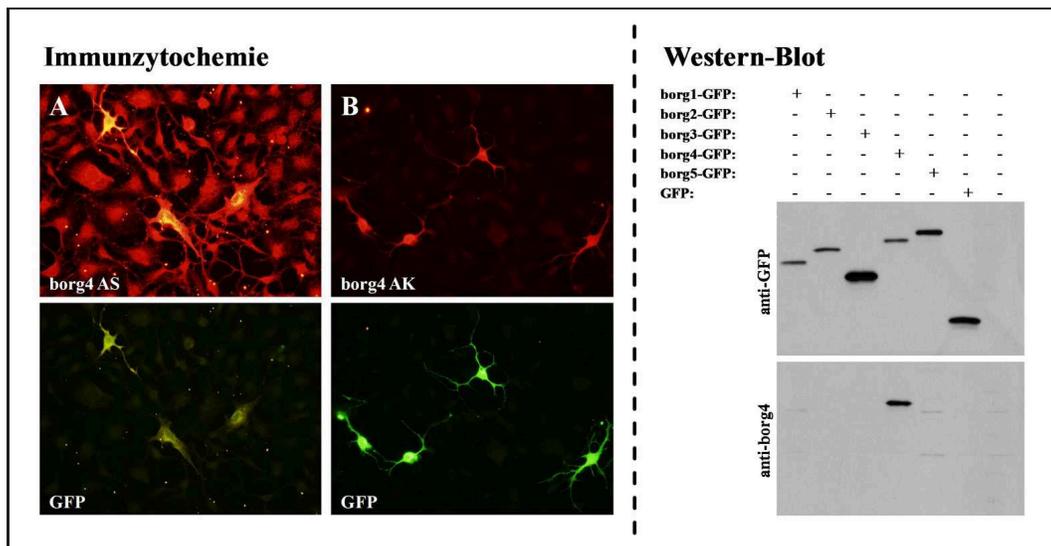


Abbildung 3.16: *Links:* Spezifitätskontrolle des aufgereinigten anti-borg4 Antikörpers (AK): Vergleich der immunzytochemischen Färbungen von borg4-GFP transfizierten Zellen mit dem borg4-Antiserum (A), dem aufgereinigten anti-borg4 AK (B) und mit anti-GFP als Kontrolle der Transfektion. Das Antiserum (AS) färbte unspezifisch alle Zellen, der anti-borg4 AK nur GFP-positive, transfizierte Zellen an. *Rechts:* Western-Blot von Zelllysaten untransfizierter, GFP- oder borg1-5-GFP-transfizierter Zellen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit dem anti-borg4 AK, der spezifisch nur borg4-GFP erkannte und keine Kreuzreaktivität zu den anderen vier borg-Proteinen zeigte. Der Kontrollantikörper anti-GFP detektierte alle Konstrukte.

In einem nächsten Schritt sollte gezeigt werden, dass der anti-borg4 Antikörper keine Kreuzreaktivität zu den anderen vier Mitgliedern der borg Proteinfamilie zeigte. Hierfür wurden Zellen jeweils mit verschiedenen Plasmiden transfiziert, die für die fünf verschiedenen borg-GFP Fusionsproteine kodierten. Als Kontrolle dienten untransfizierte oder nur mit GFP transfizierte Zellen. Die verschiedenen Zelllysate wurden anschließend im Western-Blot mit dem aufgereinigten borg4-Antikörper und zur Kontrolle mit anti-GFP analysiert (Abbildung 3.16, rechts). Während durch den GFP-Antikörper alle Fusionsproteine und das reine GFP auf der Membran detektiert werden konnten, eignete sich der anti-borg4 Antikörper spezifisch zum Nachweis für das borg4-GFP Fusionsprotein. Die anderen vier borg-GFP Fusionsproteine wurden nicht erkannt.

Zusammenfassend konnte hiermit gezeigt werden, dass die Aufreinigung des borg4-Antikörpers aus dem polyklonalen Antiserum erfolgreich war und dadurch ein spezifisches Werkzeug zum Nachweis von borg4 auf Proteinebene gewonnen wurde.

3.3.2 Mengenanalyse Bergmann Glia-spezifischer Proteine im sich entwickelnden eu- und athyroiden Cerebellum der Maus

In diesem Abschnitt der Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob sich die stark erniedrigten Transkriptmengen von Septin-4 und borg4 im athyroiden Cerebellum auch auf Proteinebene widerspiegeln. Hierfür wurden Kleinhirn-Proteinlysate von Pax8^{-/-} Mäusen und entsprechenden Wildtypkontrollen zum Zeitpunkt P6, P12 und P21 mittels Western-Blot analysiert. Dabei sollten die Mengen von verschiedenen Bergmann Glia-spezifischen Proteinen miteinander verglichen werden. Das Ergebnis dieser Studie ist in Abbildung 3.17 dargestellt.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Proteinmengen von Septin-4 und borg4 im Mauscerebellum mit steigendem Alter (P6, P12 und P21) sowohl im Cerebellum des Wildtyp- als auch in dem des KO Tieres anstiegen. Wurden aber dem Alter entsprechende euthyroide und athyroide Mäuse miteinander verglichen, konnte in jedem Fall gezeigt werden, dass beide Proteine auch auf Proteinebene reguliert waren. Die Proteinmengen waren in den athyroiden Kleinhirnen erniedrigt. Dies traf für andere Bergmann Glia- (GLAST, Septin-2) bzw. gliaspezifische (GFAP) Proteine nicht zu. GLAST war besonders deutlich zum Zeitpunkt P12 in den Cerebella nachweisbar und schien im Pax8^{-/-} Tier sogar etwas hochreguliert zu sein. Dieses Ergebnis stand im Widerspruch zu den, durch die *In-situ* Hybridisierung und die quantitative Real-Time-PCR erhaltenen und zuvor beschriebenen Ergebnisse (siehe Abbildung 3.15). Septin-2 kam in Wildtyp- und KO-Tieren in unveränderter Menge vor, wobei eine erhöhte Septin-2 Proteinmenge zum Zeitpunkt P21 detektierbar war. GFAP zeigte in den Wildtypkontrollen die erwartete Mengenverteilung: Dieses Protein war in großer Menge in Gliazellen des sich entwickelnden Cerebellums (P6 und P12) vorhanden und wurde mit steigendem Alter (P21) herunter reguliert. In den athyroiden Kleinhirnen spiegelte die GFAP-Verteilung in den unterschiedlich alten Tieren die verzögerte Entwicklung wider. Die Menge an GFAP am Tag 12 und 21 war höher als in der Wildtypkontrolle und wurde erst später herunter reguliert.

Als Ladekontrolle für dieses Experiment diene β -Aktin.

3.3.3 Phosphorylierung von borg4

Bei der Detektion von borg4 aus Cerebellumlysaten der Maus wurde auf den Western-Blot-Membranen reproduzierbar eine Doppelbande im Größenbereich des Proteins nachgewiesen. Um festzustellen, ob es sich bei der oberen Bande um die phosphorylierte Form von borg4 handeln könnte, wurde ein Dephosphorylierungsexperiment durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.18 dargestellt.

Ein Aliquot Kleinhirnlysate einer zwölf Tage alten Wildtypmaus wurde mit *Antarctic Phosphatase* behandelt und zusammen mit dem unbehandelten Aliquot mittels Western-Blot und einer anschließenden immunochemischen Detektion von borg4 analysiert. Als Ladekontrolle diene hierbei ektopisch exprimiertes Protein aus einem HEK-293 Zelllysate. Wie in Abbildung 3.18 deutlich zu sehen ist und durch die roten Pfeile zusätzlich markiert wurde, hatte das borg4-Protein aus der unbehandelten Probe ein höheres Molekulargewicht als das aus der mit Phosphatase behandelten Probe. Die untere Bande, bei der es sich um das spezifische Signal für borg4 handelte, verschob sich nach unten, während die obere Bande unverändert erhalten blieb. Bei dieser oberen Bande könnte es sich daher um eine andere Proteinmodifikation oder um ein unspezifisches Signal handeln. Da die auf das Gel aufgeladene Proteinmenge der Kontrolle viel höher war als in den ersten beiden Bahnen (Cerebellumlysate), lief das überexprimierte borg4 langsamer im Gel als das endogen im Kleinhirn detektierbare borg4. Die Proteinbande befand sich deshalb etwas über dem endogen im Cerebellum exprimierten Protein.

Zusammenfassend konnte bei diesem Experiment festgestellt werden, dass borg4 im Kleinhirn phosphoryliert wird. Das könnte einen Hinweis auf einen möglichen Regulationsmechanismus darstellen.

3.4 Die TH-abhängige Expression von Septin-4 und borg4 wird hauptsächlich durch TR α 1 vermittelt

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Expression von Septin-4 und borg4 im Cerebellum der Maus positiv durch Schilddrüsenhormone beeinflusst wird, stellte sich die Frage, durch welchen Thyroidhormon-Rezeptor diese Regulation vermittelt wird. Um die Fragestellung experimentell beantworten zu können, wurden TR α 1- und TR β -defiziente Mäuse mit Pax8 Tieren verkreuzt. Dadurch sollte gezeigt werden, wie sich die Transkriptmengen der Kandidatengene in TR-defizienten, verglichen mit athyroiden TR-defizienten, Cerebella verhalten und wie sich eine Substitution der athyroiden TR-defizienten Versuchstiere auf die Transkriptmengen auswirkt. Hierfür wurde jeweils eine Versuchstiergruppe doppelt mutierter Mäuse mit einer physiologischen T4-Menge substituiert (Substitution wie in 3.2.1 beschrieben) und die Transkriptspiegel von Septin-4 und borg4 mittels radioaktiver *In-situ* Hybridisierung (ISH) in sagittalen Kleinhirnschnitten verschiedener Mausgenotypen (WT, TR α 1 $^{-/-}$, TR β $^{-/-}$, Pax8 $^{-/-}$ TR α 1 $^{-/-}$ und Pax8 $^{-/-}$ TR β $^{-/-}$) zum Zeitpunkt P12 ermittelt.

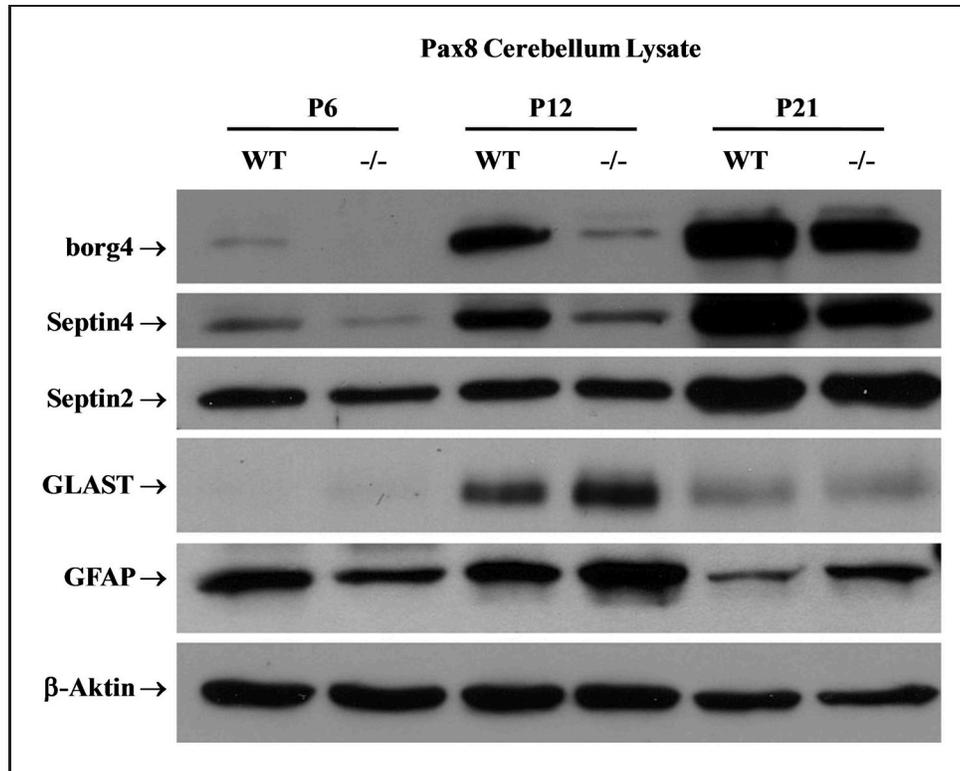


Abbildung 3.17: Proteinmengenvergleich aus Kleinhirnlysaten unterschiedlich alter (P6, P12, P21) Wildtyp (WT) und Pax8^{-/-} Mäusen mittels Western-Blot: Die Septin-4- und borg4-Proteinmengen waren im athyroiden Cerebellum erniedrigt, während GLAST leicht erhöht und Septin-2 unverändert nachweisbar waren. GFAP wird in älteren Tieren herunterreguliert, dieser Prozess ist im Pax8^{-/-} Cerebellum verzögert. Als Ladekontrolle diente β-Aktin.

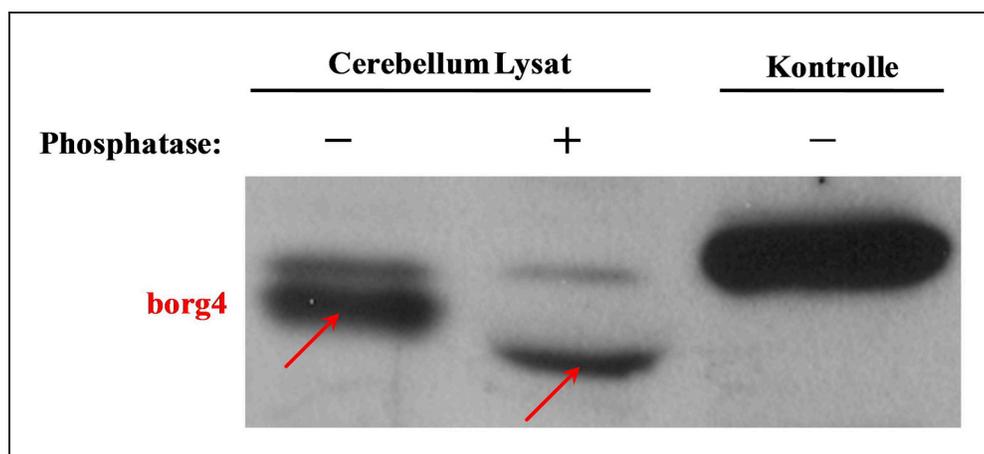


Abbildung 3.18: Borg4-Protein lag im Mauscerebellum phosphoryliert vor. Eine Reduzierung der Proteinmasse konnte durch Dephosphorylierung mit Antarctic Phosphatase erreicht werden. Unbehandeltes, in HEK-293 Zellen überexprimiertes borg4 diente als Laufkontrolle.

Diese Analyse ist in Abbildung 3.19 dargestellt. Da die ISH-Signale für Septin-4 sehr stark waren, musste die radioaktive Septin-4 RNA-Sonde zur Abschwächung der Signalintensitäten mit DIG-markierter Septin-4 RNA-Sonde verdünnt werden. Abschließend wurden alle hybridisierten Schnitte sechs Tage lang mit der Fotoemulsion inkubiert und dann entwickelt.

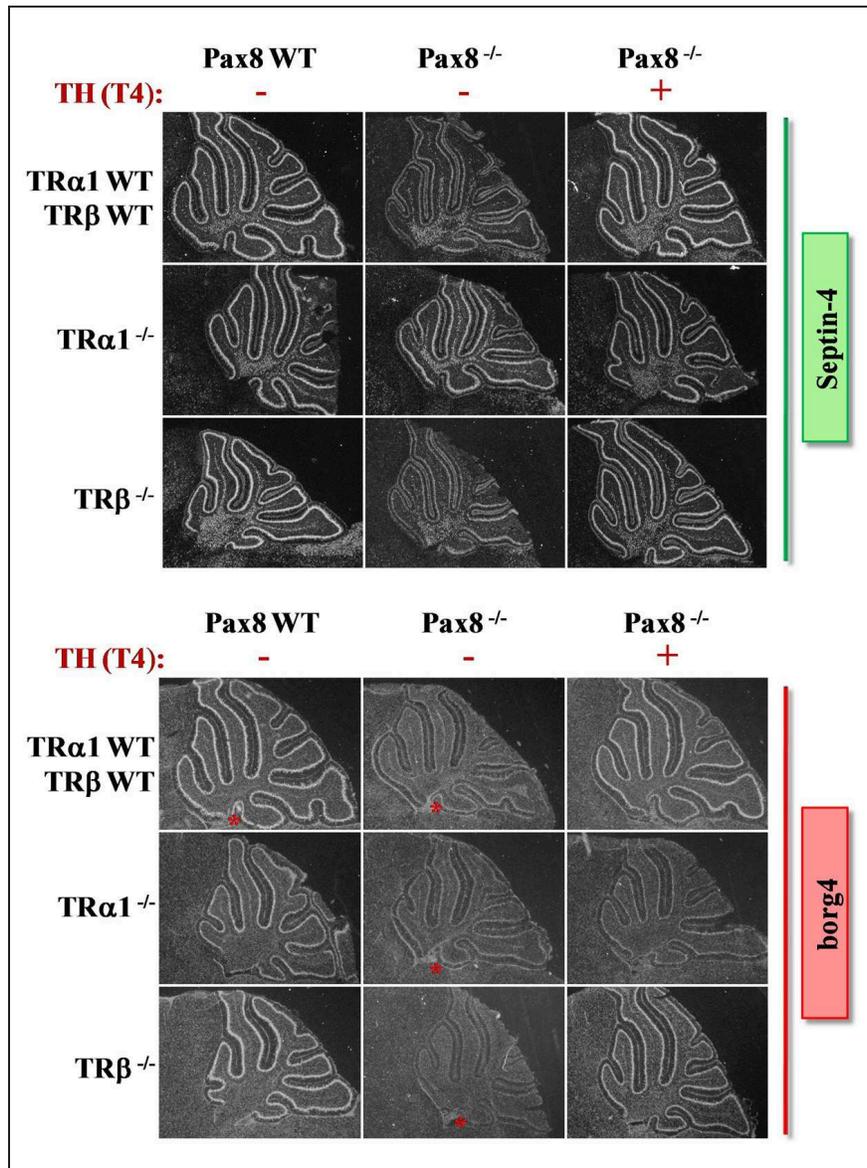


Abbildung 3.19: Die Thyroidhormon-abhängige Expression von Septin-4 und borg4 wird hauptsächlich durch TRα1 vermittelt. Analyse der Transkriptspiegel von Septin-4 und borg4 in eu- und athyroiden TR-defizienten Mäusen zum Zeitpunkt P12 vor und nach Stimulation mit Thyroidhormon (20 ng / g BW T4) mittels radioaktiver ISH. Beide Gene werden in der Purkinjezellschicht des Cerebellums, Septin-4 zusätzlich in Gliazellen der weißen Substanz, borg4 zusätzlich im Choroid Plexus (Sterne) exprimiert. Aufnahmen im Dunkelfeld, 40x

Bei diesem Experiment konnte für Septin-4 und borg4 gezeigt werden (Abb. 3.19, linke Spalte), dass das Fehlen von TR α 1 zu einer Reduzierung der Transkriptsignalintensitäten beider Gene führte, wobei borg4 eine deutlich stärkere Erniedrigung als Septin-4 zeigte. In diesem Fall konnte die in der Pax8^{-/-} Maus beobachtete Reduzierung des Transkriptspiegels erreicht werden (Abb. 3.19, borg4, linke Spalte, Mitte). Die TR β -defizienten Tiere zeigten ein zur Wildtypkontrolle unverändertes Expressionsniveau beider Gene (Abb. 3.19, linke Spalte, unten).

Wurden athyroide TR-defiziente Mäuse analysiert (Abb. 3.19, mittlere Spalte), konnte eine zusätzliche Reduzierung der Transkriptmengen von borg4 und Septin-4 nur für die athyroiden TR β -defiziente Mäuse festgestellt werden. Die mRNA Mengen beider Gene in den athyroiden TR α 1-defizienten Tieren änderten sich nicht, verglichen mit dem euthyroiden Zustand. Eine Substitution der athyroiden TR β -defizienten Mäuse mit Thyroxin resultierte in einem Anstieg der Transkriptmengen beider Gene, während sich die Transkriptmengen in den TR α 1-defizienten Cerebella nicht veränderten (Abb. 3.19, rechte Spalte). Das deutet zusammengenommen darauf hin, dass TR α 1 hauptsächlich an der Induktion und Repression der Transkriptspiegel von Septin-4 und borg4 im Cerebellum der Maus beteiligt ist. Fehlt dieser Rezeptor, wie in den TR α 1^{-/-} Mäusen gezeigt werden konnte, können die Transkriptspiegel beider Gene nicht rekonstruiert werden. Dies ist dagegen in den TR β ^{-/-} Mäusen möglich, da hier TR α 1 in den Zellen unverändert präsent ist.

Zur Validierung der mittels ISH erhaltenen Ergebnisse wurde eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt, deren Messwerte in Abbildung 3.20 als Diagramm dargestellt sind. Alle darin gezeigten Daten entsprechen Mittelwerten \pm Vertrauensintervall (SEM). Die durch diese Real-Time-Messungen gewonnenen Resultate spiegeln die Ergebnisse der radioaktiven ISH weniger eindeutig wider.

Beide TR-defizienten Mausgenotypen zeigten in der Real-Time-PCR-Messung eine signifikante Reduzierung der Septin-4- und borg4-Transkriptspiegel, die in der ISH nur für die TR α 1-defizienten Mäuse zu beobachten war. Die Substitution der TR β -defizienten Tiere führte zwar zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Mengen beider Gene, diese erreichten aber das Wildtypniveau nicht (Abb. 3.20, rechts). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der ISH konnte gezeigt werden, dass eine T4-Substitution hypothyroider TR α 1-defizienter Mäuse keinen Einfluss auf die Transkriptspiegel hatte (Abb. 3.20, Mitte). Weiterhin konnte die bereits vorgestellte Erniedrigung der Septin-4- und borg4-Transkriptmengen in Pax8^{-/-} Mäusen und die nach T4-Substitution erreichte vollständige Rekonstruktion mit diesem Experiment erneut eindeutig bestätigt werden (Abb. 3.20, links).

Obwohl es sich bei der radioaktiven ISH um eine semiquantitative Methode handelt, war sie in diesem Fall besser dazu geeignet, die gemessenen Signalintensitäten bestimmten Zellpopulationen im Cerebellum zuzuordnen, und dabei aussagekräftigere Ergebnisse zu erreichen. Bei der Real-Time-PCR wurde mRNA aus heterogenen Gewebelysaten der ganzen Mauscerebella quantifiziert und dadurch konnten Kontaminationen mit Zellen, welche die zu analysierenden Gene ebenfalls exprimierten (Gliazellen der weißen Substanz (Sept4), Choroid Plexus (borg4)) nicht verhindert werden.

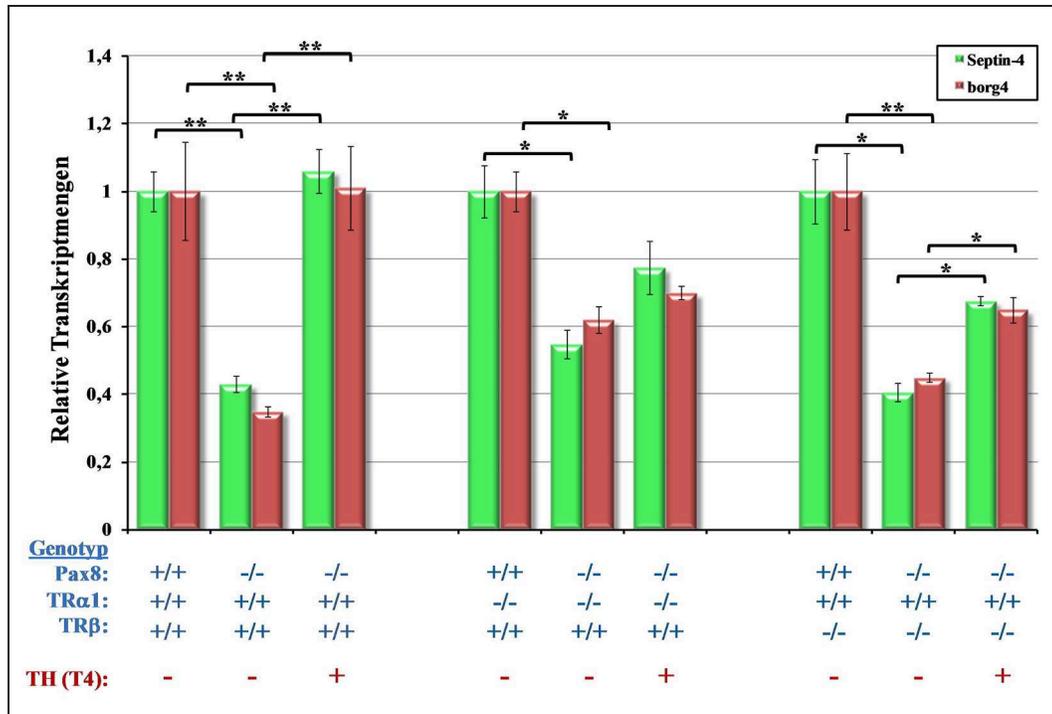


Abbildung 3.20: Die Thyroidhormon-abhängige Expression von Septin-4 und borg4 wird hauptsächlich durch TR α 1 vermittelt. Analyse der Transkriptspiegel von Septin-4 (grün) und borg4 (rot) in eu- und athyroiden TR-defizienten Mäusen zum Zeitpunkt P12 vor und nach Stimulation mit Thyroidhormon (20 ng / g BW T4) mittels quantitativer Real-Time-PCR (n=4). Alle Daten entsprechen Mittelwerten \pm SEMs; Signifikanz nach einseitigem Student's t-test (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$

Aus dem Ergebnis, dass die Thyroidhormon-abhängige Expression von Septin-4 und borg4 hauptsächlich durch TR α 1 vermittelt wird resultierte die fortführende Fragestellung, ob die erniedrigten Septin-4- und borg4-Transkriptspiegel in den TR α 1-defizienten Mäusen mit einer veränderten Bergmann Glia-Morphologie, vergleichbar mit der Situation in den athyroiden Pax8^{-/-} Mäusen, einhergehen. Zur experimentellen Bearbeitung der Problematik wurden heterozygote TR α 1 und, im Vergleich dazu, auch TR β Mäuse mit GFP-transgenen Tieren verkreuzt. Aus der Tochtergeneration konnten dann zum Zeitpunkt P12 Cerebella von TR-defizienten, GFP-transgenen Jungtieren mit denen ihrer Wildtyp-Geschwister immunhistochemisch verglichen werden. Das Hauptaugenmerk lag hierbei auf dem Entwicklungszustand der Bergmann Glia- und Purkinjellen im Kleinhirn dieser Tiere. Das Resultat der Studie ist in Abbildung 3.21 dargestellt.

Weder die GFAP-positiven Radialfasern der Bergmann Gliazellen (Bild 3.21, D-F), noch ihre seitlichen lamellenartigen Fortsätze (A-C), wiesen in den TR-defizienten Mäusen einen Unterschied zu den Wildtypkontrollen auf. Auch die Differenzierung der Purkinjellen (A-F, rot) war durch das Fehlen der einzelnen Rezeptoren nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die Abwesenheit eines Thyroidhormon-Rezeptors nicht dieselben Konsequenzen für die Cerebellument-

wicklung hat wie der Schilddrüsenhormonmangel selbst. Das spiegelte sich auch im Phänotyp der $TR\alpha 1^{-/-}$ bzw. der $TR\beta^{-/-}$ Mäuse wider, die nicht die schweren hypothyroiden Symptome zeigten wie die $Pax8^{-/-}$ Mäuse. Hierbei spielen wahrscheinlich kompensatorische Effekte des zweiten Rezeptors eine große Rolle.

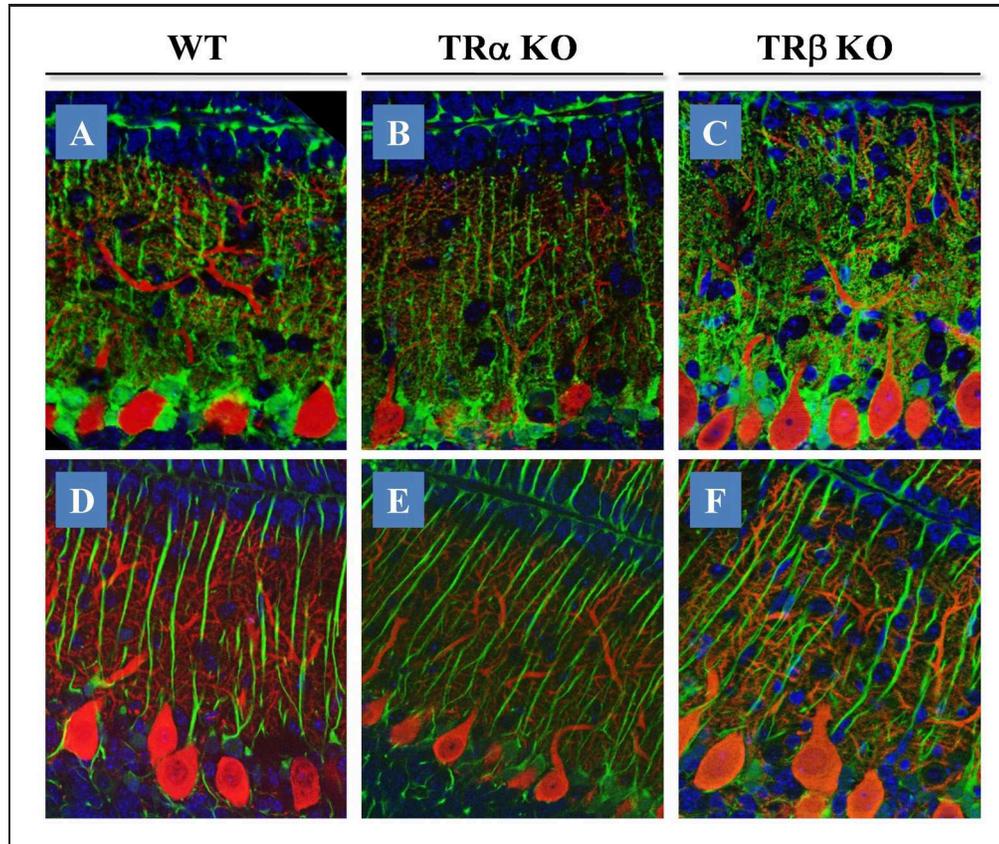


Abbildung 3.21: *Trotz erniedrigter Transkriptmengen von $Septin-4$ und $borg4$ in den $TR\alpha 1^{-/-}$ Mäusen hat das Fehlen des Rezeptors keinen Einfluss auf die Morphologie von Bergmann Glia- und Purkinjezellen. Die Cerebella von $TR\alpha 1^{-/-}$ -GFP, $TR\beta^{-/-}$ -GFP und WT-GFP Tieren zum Zeitpunkt P12 wurden immunhistochemisch mit anti-Calbindin als Purkinjezellmarker (A-F, rot), anti-GFP (A-C, grün) zur Visualisierung der Bergmann Gliazellen und anti-GFAP (D-F, grün) zur Visualisierung der Radialfasern analysiert. Aufnahmen 400x*

Bereits 2002 haben Morte et al. [99] nachgewiesen, dass eine Thyroidhormon-Defizienz im Cerebellum keine Auswirkungen auf die Morphologie der Purkinjezellen hat. Von der selben Arbeitsgruppe wurde dann in späteren Publikationen [60, 71] gezeigt, dass in Abwesenheit von $TR\alpha 1$ die GFAP-Immunoreaktivität der Astrozyten im Cerebellum der Maus reduziert ist, ein Ergebnis, das in der beschriebenen Form im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte.

Deshalb sollte abschließend untersucht werden, ob diese Diskrepanz u.U. auf die Wahl der Primärantikörper für die Immunhistochemie zurückzuführen ist. Für den experimentellen Nachweis wurden perfusionsfixierte Kryostatschnitte des Cerebellum

lums einer Wildtypkontrolle, einer Pax8^{-/-} und einer TRα1^{-/-} Maus immunhistochemisch mit verschiedenen, gegen GFAP gerichteten Antikörpern gefärbt und miteinander verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.22 dargestellt.

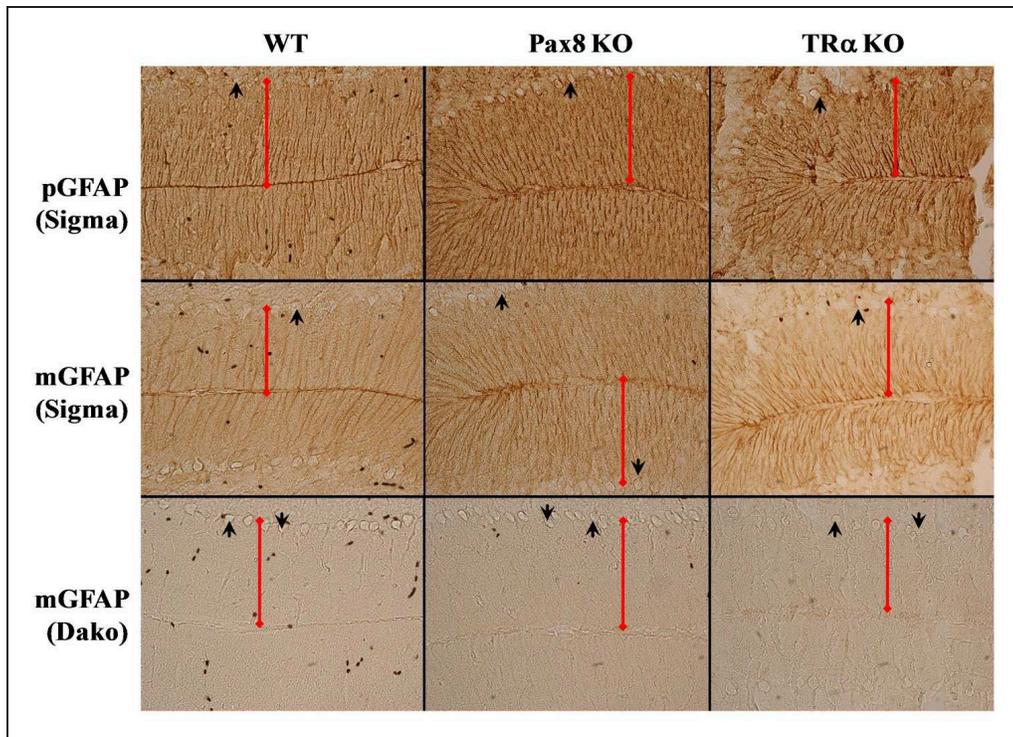


Abbildung 3.22: Nachweis der Thyroidhormon-unabhängigen GFAP-Expression in sagittalen, perfusionsfixierten Kryschnitten des euthyroiden (WT), athyroiden (Pax8 KO) und TRα1^{-/-} (TRα KO) Mauserebellums zum Zeitpunkt P12 durch Immunhistochemie mit verschiedenen, gegen GFAP gerichteten Primärantikörpern. Die Molekularschicht wurde durch roten Balken und die Purkinjezellkörper mit Pfeilen gekennzeichnet. Mit dem, von der Firma Dako erworbenen, anti-GFAP Antikörper konnte in keinem Mausgenotyp eine Färbung nachgewiesen werden.

In allen drei verschiedenen Mausgenotypen konnten sowohl mit dem monoklonalen, aus der Maus stammenden, als auch mit dem polyklonalen, aus dem Kaninchen stammenden, anti-GFAP Antikörpern der Firma Sigma die GFAP-positiven Radialfasern der Bergmann Gliazellen in der Molekularschicht (roter Balken) des Cerebellums detektiert werden. Diese Radialfasern durchspannten die komplette Molekularschicht und waren weder im hypothyroiden, noch im rezeptordefizienten Kleinhirn verändert. Mit dem von Bernal et al. [60] verwendeten monoklonalen anti-GFAP Antikörper der Firma Dako hingegen konnte keine GFAP Färbung detektiert werden, obwohl das Gewebe in sehr gutem Zustand war (Purkinjezellkörper sind deutlich zu erkennen und wurden mit Pfeilen markiert). Dieses Ergebnis war für alle Mausgenotypen (siehe Abbildung 3.22, untere Reihe) und auch für unterschiedlich behandelte (Vibratom, *fresh-frozen*-Kryo, perfusionsfixiert Kryo) und gefärbte (Immunfluoreszenz, HRP-DAB) Gewebe reproduzierbar. Eine Begründung für diese Beobachtung

könnte sein, dass im Material und Methoden-Teil der Publikationen [60, 71] ein falscher Antikörper vermerkt ist. Weiterhin ist es möglich, dass GFAP unter bestimmten Bedingungen phosphoryliert wird und der Antikörper die phosphorylierte Form nicht erkennt, bzw. nur eine bestimmte modifizierte Form von GFAP erkennt.

3.5 Analysen zur subzellulären Lokalisation und funktionellen Relevanz von Septin-4 und borg4

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Septin-4 und borg4 in den Bergmann Gliazellen des Cerebellums in Abhängigkeit von Thyroidhormonen exprimiert werden, stellte sich die Frage, ob beide Proteine auch miteinander im funktionellen Zusammenhang stehen. Hierbei war von besonderem Interesse, welche subzelluläre Lokalisation Septin-4 und borg4 in den Zellen hatten, ob sie in der Lage waren, miteinander und mit Komponenten des Zellzytoskeletts zu interagieren und welche funktionelle Relevanz sich daraus ergab.

3.5.1 Nachweis der Interaktion von Septin-4 und borg4 *in-vitro* mittels Immunzytochemie und Koimmunopräzipitation

Septin-4, das zu einer speziellen Klasse von Zytoskelettproteinen gehört und borg4, das zu einer Familie von Regulatorproteinen gehört, die den Umbau des Zellzytoskeletts beeinflussen, zeigen sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene eine erniedrigte Expression in den Bergmann Gliazellen des athyroiden Kleinhirns. Da weiterhin bekannt ist, dass andere borg-Familienmitglieder wie borg3 in der Lage sind, mit Septinen (Sept7) zu interagieren [90, 91], sollte *in-vitro* mittels Immunzytochemie und Koimmunopräzipitation gezeigt werden, ob Septin-4 und borg4 in verschiedenen Zellen ebenfalls in der Lage sind, miteinander zu interagieren.

Für den immunzytochemischen Nachweis wurden verschiedene Zelllinien (NIH-3T3, COS-7 und primäre cerebellare Astrozyten) mit Plasmiden kotransfiziert, die jeweils eines der Fusionsproteine borg4-GFP oder Sept4-myc kodierten. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, immunzytochemisch mit gegen die Proteine gerichteten Antikörpern gefärbt und die Lokalisation der Signale mikroskopisch ausgewertet. Repräsentative Resultate aus dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 3.23 dargestellt.

Septin-4 und borg4 konnten in den Zellen häufig als filamentförmige Strukturen visualisiert werden. Dies war besonders offensichtlich in den NIH-3T3 Zellen (siehe Abbildung 3.23, obere Reihe) zu erkennen. Vermutlich hatte borg4 in diesem Fall transient an die von Septin-4 ausgebildeten Filamente gebunden. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass beide Proteine im Zytoplasma der Zellen auf großen Arealen eine überlappende Lokalisierung zeigten. Das wurde besonders beim Überlagern der Einzelbilder (Mix) durch die gelbe Mischfarbe deutlich. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass Septin-4 und borg4 in transfizierten Zellen, bedingt durch ihre Kollokalisierung, miteinander interagieren können. Um diese Vermutung zu bestätigen,

und eine Protein-Protein-Interaktion nachweisen zu können, wurde nachfolgend eine Koimmunopräzipitation durchgeführt.

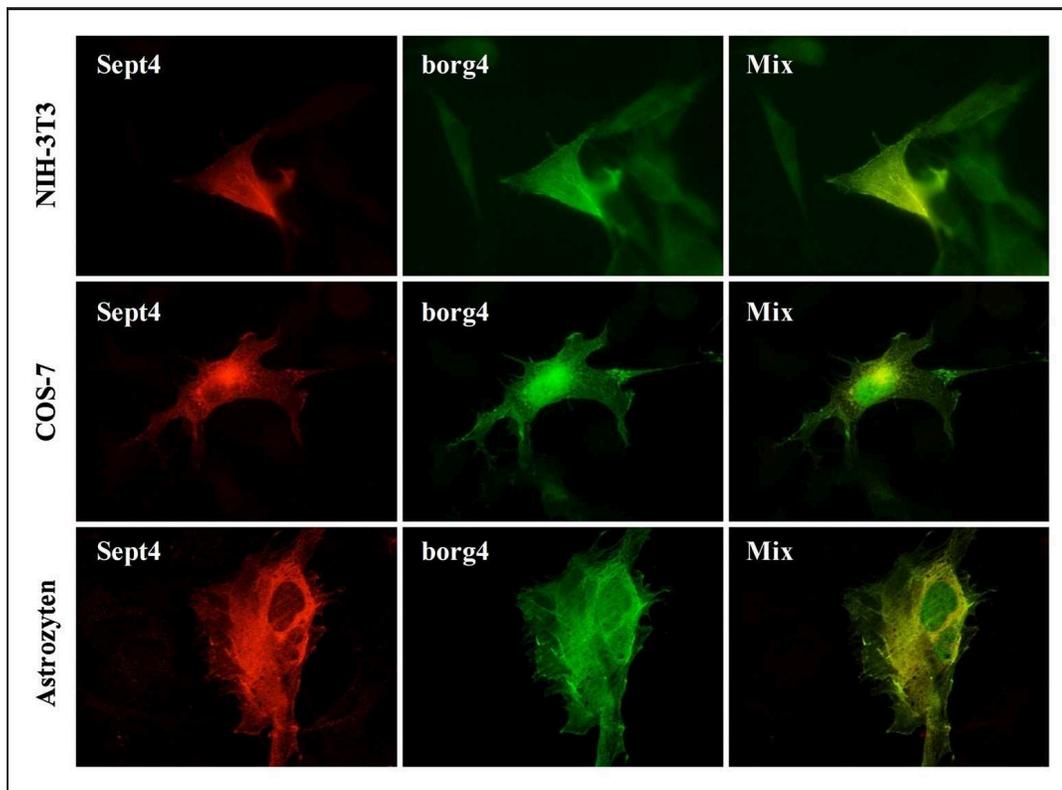


Abbildung 3.23: Der Nachweis der Kolokalisation von Septin-4 und borg4 nach transienter Kotransfektion in NIH-3T3, COS-7 und primären cerebellaren Astrozyten erfolgte mittels Immunzytochemie mit anti-Sept4 (rot) und anti-borg4 (grün) Antikörpern. Die gelben Bereiche bei Bildüberlagerung deuten auf eine Kolokalisierung hin. Aufnahmen 400x

Diese Koimmunopräzipitation erfolgte mit einem anti-GFP Antikörper aus lysierten HEK-293 Zellen, die ektopisch Sept4-myc, borg4-GFP oder beide Fusionsproteine exprimierten. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.24 dargestellt.

Zur Kontrolle wurden die Expressionsmengen der einzelnen Fusionsproteine in den Zellen mit den entsprechenden, gegen die jeweilige myc- oder GFP-Markierung gerichteten Antikörpern überprüft (3.24 links, HEK-293 Lysate). In den verschiedenen HEK-293 Lysaten waren sowohl Sept4-myc als auch borg4-GFP gut detektierbar. In den kotransfizierten Zellen lagen beide Fusionsproteine in annähernd gleicher Menge vor.

Um nachzuweisen, dass die Fusionsproteine nicht unspezifisch an den Fc-Teil des polyklonalen GFP-Antikörpers binden, wurde eine entsprechende Kaninchen IgG-Kontrolle im Experiment mitgeführt. Wie im mittleren Teil der Abbildung (IgG) gut zu sehen ist, ließen sich nur die schweren Ketten (ca. 55 kDa) der IgG Kontrolle auf der Membran nachweisen, die Fusionsproteine wurden hingegen nicht gebunden. Bei der Immunopräzipitation konnten die borg4-GFP Fusionsproteine spezifisch aus

allen Zellen, die vorher mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert wurden, präzipitiert werden. Zusätzlich kopräzipitierte der Antikörper auch das, an borg4-GFP gebundene, Sept4-myc-Protein aus den kotransfizierten Zellen. Die Fusionsproteine hatten ein Molekulargewicht von ca. 58 kDa (Sept4-myc) oder ca. 63 kDa (borg4-GFP) und die Detektionssignale lagen somit etwas oberhalb der schweren Antikörperketten (Stern) auf der Membran. Zusammenfassend steht das Resultat der Koimmunopräzipitation im Einklang mit den Ergebnissen der immunzytochemischen Färbungen (Abb. 3.23) und zeigte ebenfalls, dass beide Proteine *in-vitro* miteinander interagierten.

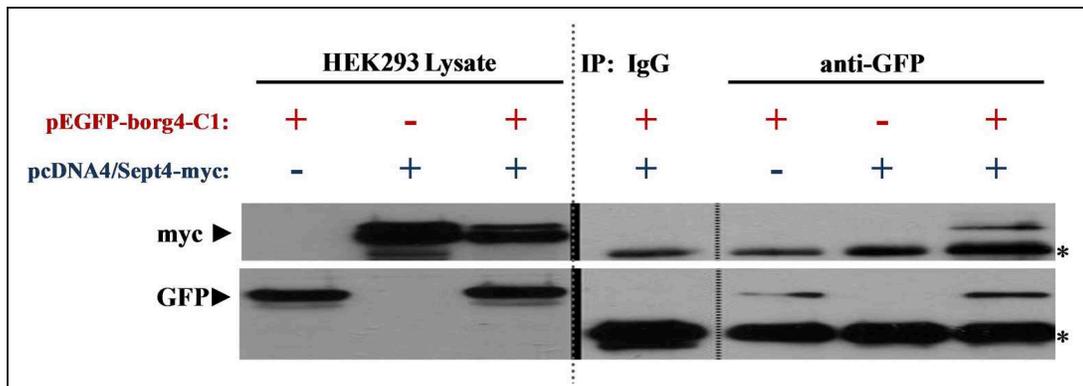


Abbildung 3.24: Koimmunopräzipitation von Septin-4 und borg4 aus transient kotransfizierten HEK-293 Zellen als Nachweis der Kolo-kalisation und damit der Protein-Protein-Interaktion. **links:** Detektion der Sept4-myc und borg4-GFP Fusionsproteine mit anti-c-Myc bzw. anti-GFP AK in einfach- und kotransfizierten Zelllysaten. **rechts:** Immunopräzipitation (IP) mit dem anti-GFP AK oder den entsprechenden Immunglobulinen (IgG) als Kontrolle. Der anti-GFP AK präzipitiert borg4-GFP aus den einfach- sowie borg4-GFP und Sept4-myc aus den kotransfizierten Zellen. Die Signale der schweren AK-Ketten wurden mit Sternen markiert.

3.6 Interaktion von Septin-4 und borg4 mit dem Zytoskelett

Um erste Hinweise auf die funktionelle Relevanz von Septin-4 und borg4 in Bergmann Gliazellen zu bekommen, sollte die zelluläre Lokalisation der Proteine *in-vitro* und *in-vivo* näher analysiert und mögliche Interaktionen mit dem Zytoskelett untersucht werden. Für die *in-vitro* Studien wurden Zellen mit für die jeweiligen Proteine kodierenden Plasmiden transfiziert, 24 h später immunzytochemisch gefärbt und danach mikroskopisch ausgewertet. Um die Proteinlokalisierung *in-vivo* bestimmen zu können, wurde eine Membranfraktionierung vom Mauserebellum durchgeführt. Die Ergebnisse der *in-vitro* Analysen sind in den Abbildungen 3.25 und 3.26, die der Membranfraktionierung in Abbildung 3.27 dargestellt.

Sowohl in primären cerebellaren Astrozyten (siehe Abbildung 3.25) als auch in

COS-7 Zellen (Ergebnis nicht gezeigt), die Septin-4 ektopisch exprimierten, konnte immunzytochemisch keine Kolokalisierung mit Aktin- oder Mikrotubulifilamenten nachgewiesen werden. Das Protein ließ sich nur homogen verteilt im Zytoplasma der jeweiligen Zellen nachweisen.

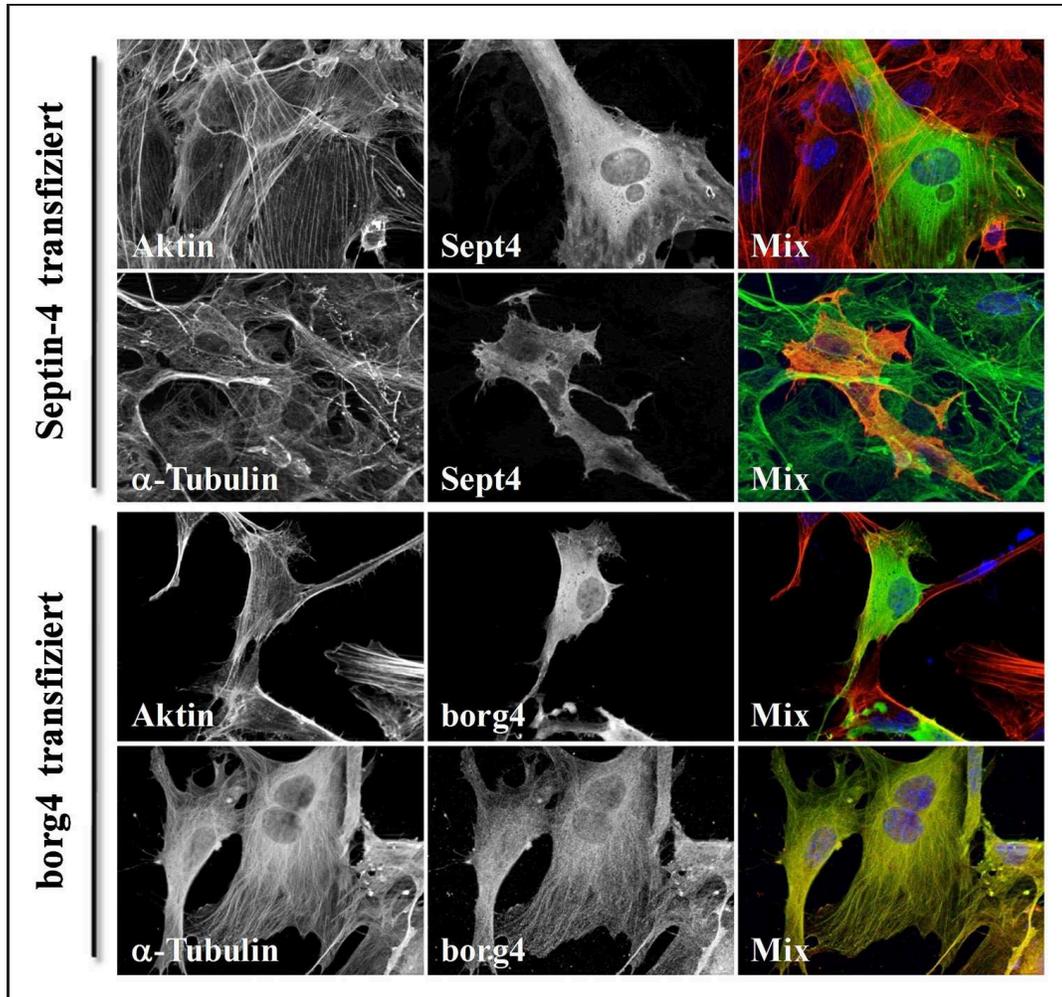


Abbildung 3.25: Die Analysen zum Nachweis der subzellulären Lokalisation von Septin-4 und borg4 in transient transfizierten, primären cerebellaren Astrozyten wurde mittels Immunzytochemie mit Rhodamin-Phalloidin bzw. α -Tubulin (rot) und anti-Sept4 bzw. anti-borg4 (grün) Antikörpern durchgeführt. Während keine markante Kolokalisierung von Septin-4 mit Aktin- oder Mikrotubulifilamenten nachweisbar war, zeigte sich eine punktuelle Kolokalisierung von borg4 und Mikrotubulifilamenten. Eine borg4-Aktin-Interaktion war nicht detektierbar. Die gelben Bereiche nach Bildüberlagerung (Mix) deuteten auf Kolokalisierung hin. Aufnahmen 400x

Wurden die Zellen allerdings zusätzlich noch mit borg4 kotransfiziert, konnte eine auffällige Veränderung der Lokalisation von Septin-4 beobachtet werden (siehe Abbildung 3.26). In Septin-4 / borg4 kotransfizierten Zellen wurde nun eine Kolokalisierung von Septin-4 mit Aktinfilamenten nachgewiesen. Besonders stark war

der Effekt in den COS-7 Zellen zu beobachten. Dort bildete Septin-4 markante filamentförmige Strukturen aus. Nach Überlagern der mikroskopischen Einzelaufnahmen der Septin-4- und Aktin-Färbungen (Rhodamin-Phalloidin) wurden Bereiche mit überlappender Proteinverteilung durch die gelbe Mischfarbe verdeutlicht und zusätzlich durch Pfeile markiert (Abbildung 3.26, unten). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass borg4 möglicherweise an der Filamentbildung und Verteilung von Septin-4 beteiligt war.

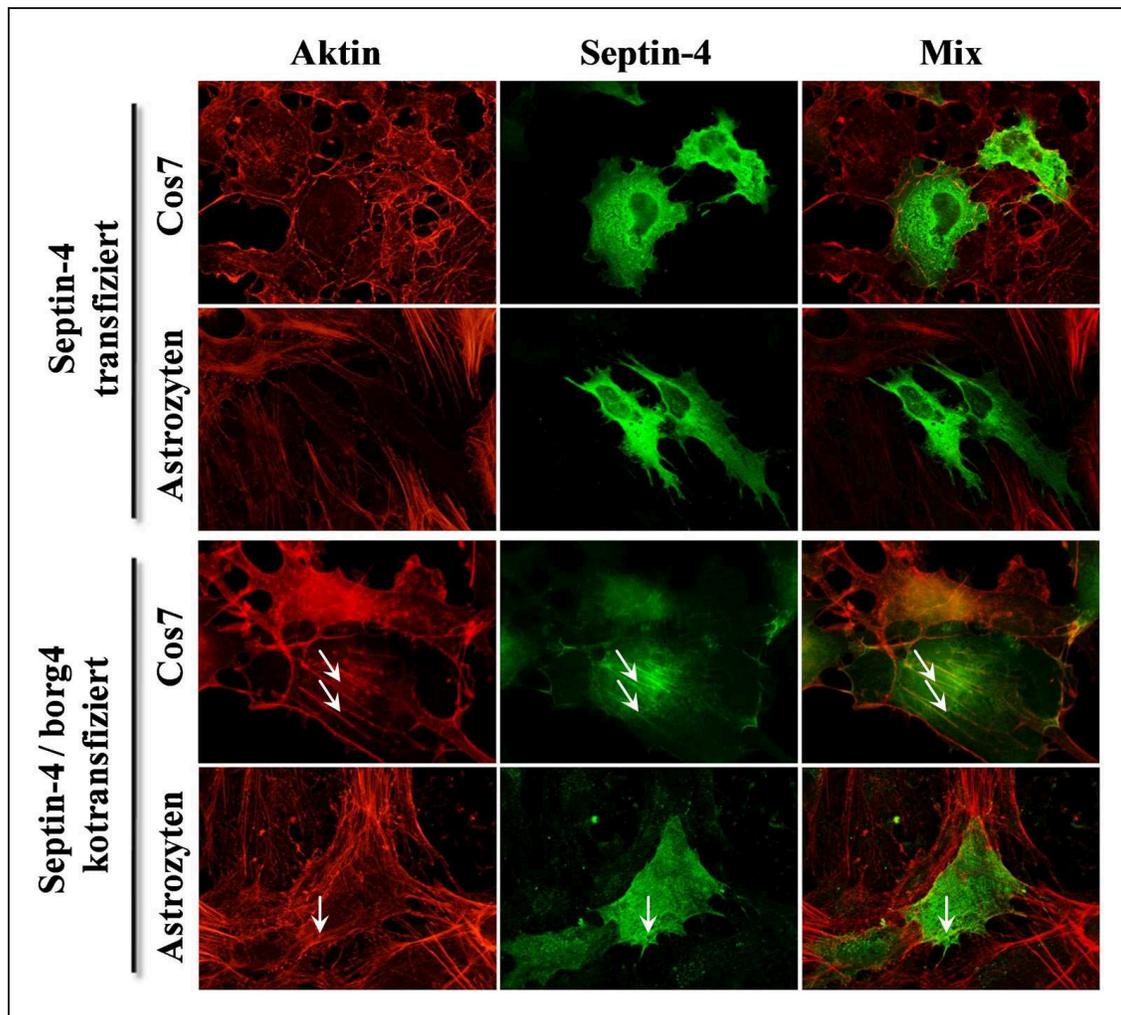


Abbildung 3.26: In mit borg4 kotransfizierten COS-7 Zellen bzw. primären cerebellaren Astrozyten war eine veränderte Lokalisierung von Septin-4 zu beobachten. Während Septin-4 in einfach transfizierten Zellen keine Kolokalisierung mit Aktinfilamenten zeigte, konnte in mit borg4 kotransfizierten Zellen in bestimmten Bereichen (weiße Pfeile) eine Kolokalisierung mit Aktin detektiert werden. Dieser Effekt war besonders stark in den COS-7 Zellen zu beobachten. Aufnahmen 400x

Borg4 selbst konnte ebenfalls homogen verteilt im Zytoplasma der Zellen detektiert werden. Während eine Kolokalisation mit F-Aktin in keinem der untersuchten Zelltypen beobachtet werden konnte, war eine überlappende Proteinverteilung mit

α -Tubulin nachweisbar (siehe Abbildung 3.25). Dieses Ergebnis zeigt, dass borg4 in der Lage ist, mit Mikrotubuli zu interagieren.

Da die gegen Septin-4 und borg4 gerichteten Antikörper nicht dazu geeignet waren, die beiden Proteine in cerebellaren Schnitten nachzuweisen, war eine immunhistochemische Analyse zur subzellulären Lokalisation in Bergmann Gliazellen *in-vivo* nicht möglich. Daher wurde zur Validierung der im vorigen Absatz beschriebenen immunzytochemischen *in-vitro* Studien und zur genauen experimentellen Bestimmung der Lokalisation von Septin-4 und borg4 *in-vivo* eine Membranfraktionierung durchgeführt. Das Ergebnis dieser Fraktionierung ist in Abbildung 3.27 dargestellt.

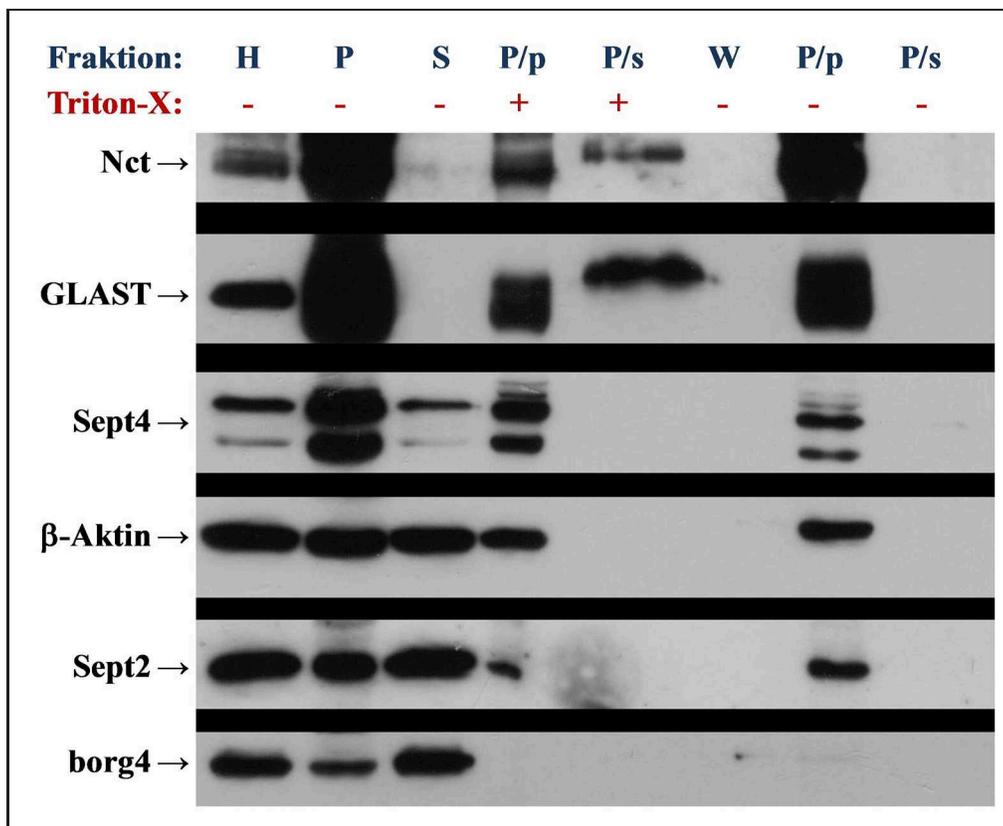


Abbildung 3.27: Die Membranfraktionierung von Cerebellum-Homogenaten der Maus zeigte, dass Septin-4 *in-vivo* mit dem Zytoskelett assoziiert ist und borg4 im Zytosol lokalisiert ist. Die Separierung von Membran- (P) und zytosolischer Proteinfraction (S) erfolgte durch differentielle Zentrifugation aus P21 Mauscerebellum-Homogenaten (H). Membranproteine wie Nicastrin (Nct) und GLAST lassen sich durch Detergenzbehandlung aus dem Membranpellet herauslösen und reichern sich in der Triton-X löslichen Fraktion (P/s+) an. Sept4, Sept2 verbleiben zusammen mit β -Aktin im detergenzunlöslichen Zytoskelettpellet (P/p). Die Waschfraktion (W), das mit PBS behandelte Membranpellet (P/p-) und die PBS-lösliche Fraktion (P/s-) dienten als Kontrollen.

Cerebellum-Homogenate (H) der Maus wurden durch differentielle Zentrifugation in membranassoziierte und zytosolische Proteinbestandteile separiert. Im Membranpellet (P) reicherten sich neben Membrankomponenten auch alle Zytoskelettbestand-

teile an, während rein zytosolische, lösliche Proteine im Überstand (S) zu finden waren. Durch Detergenzbehandlung mit Triton X-100 war es möglich, membranständige und membranassoziierte Proteine aus dem Membranpellet herauszulösen (Abb. 3.27, Fraktion P/s). Proteine die mit dem Zytoskelett assoziiert waren, verblieben bei dieser Behandlung im detergenzunlöslichen Pellet (Abb. 3.27, Fraktion P/p). Als Kontrollen für dieses Experiment dienten die integralen Membranproteine Nicastrin und GLAST. Außerdem wurde ein Aliquot des Membranpellets mit PBS an Stelle von Triton X-100 behandelt. Die erhaltenen Proteinfractionen wurden mittels Western-Blot auf eine Membran transferiert und mit den entsprechenden Antikörpern detektiert.

Nach Auswertung dieses Experimentes konnte festgestellt werden, dass Septin-4 wie auch Septin-2 im Cerebellum der Maus mit dem Zytoskelett assoziiert waren. Beide Proteine verblieben nach der Membranfraktionierung im detergenzunlöslichen Zytoskelettpellet, zusammen mit β -Aktin, das als Kontrolle fungierte. Borg4 war im Zytosol der Zellen lokalisiert, da es in der löslichen Fraktion zu finden war. Die beiden Membranproteine Nicastrin und GLAST ließen sich wie erwartet mit dem Detergenz aus dem Membranpellet herauslösen und waren in der P/s Fraktion nachzuweisen. Mit PBS war es hingegen nicht möglich, diese Proteine aus dem Membranpellet (P/p) zu extrahieren.

3.6.1 Studien zur funktionellen Relevanz von Septin-4 und borg4 in organotypischen Schnittkulturen und primären cerebellaren Astrozyten

Um die funktionelle Relevanz von Septin-4 und borg4 für die Entwicklung der Bergmann Gliazellen *in-vitro* analysieren zu können, sollten cerebellare Schnittkulturen zum Zeitpunkt P7 angelegt, Bergmann Gliazellen mittels *Gene-Gun* Beschuss mit für die Proteine kodierenden Plasmid-DNAs transfiziert und eine eventuell induzierte Zelldifferenzierung nach einer Woche immunhistochemisch ausgewertet werden. Zur Durchführung dieser Versuchsreihe waren Vorexperimente erforderlich, die zeigen sollten, ob der Versuchsaufbau dazu geeignet war, die Thyroidhormon-abhängige *in-vivo* Entwicklungssituation vergleichbar zu simulieren. Das Ergebnis der Kultivierung cerebellarer Schnitte unter eu- und athyroiden Bedingungen ist in Abbildung 3.28 dargestellt.

Die Differenzierung der Purkinjezellen erfolgte über den analysierten Kultivierungszeitraum von neun Tagen hinweg, unabhängig davon, ob im Medium Thyroidhormone enthalten waren oder nicht. Es war kein morphologischer Unterschied zwischen den in Vollmedium mit Thyroidhormonen kultivierten und den unter Thyroidhormon-freien Bedingungen kultivierten Purkinjezellen zu beobachten. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Purkinjezellen mit zunehmender Kultivierungsdauer aus der Purkinjezellschicht auswanderten und ihre geordnete Dendritenstruktur verloren. Dies konnte wahrscheinlich auf die stark ausgeprägte Gliose der Bergmann Gliazellen in den Schnitten zurückgeführt werden. Da es in diesem Modellsystem bereits unter Standard- und Thyroidhormon-freien Kultivierungsbedingungen zu starken morphologischen Veränderungen der Purkinje- und der Bergmann Gliazellen kam,

konnte dieses System nicht für funktionelle Entwicklungsstudien über eine Zeitspanne von mehr als zwei Tagen hinweg genutzt werden und war somit im Rahmen dieser Arbeit unbrauchbar. Daher wurden als alternatives *in-vitro* Modellsystem zur Bestimmung des funktionellen Einflusses von Septin-4 und borg4 für die Zellmorphologie von Gliazellen astrozytär angereicherte primäre Mischzellkulturen aus dem Cerebellum der Maus verwendet. Diese sollten nach Transfektion mit Septin-4 und borg4 beide Proteine überexprimieren, und ein möglicher Einfluss auf die Morphologie der Gliazellen sollte dokumentiert werden.

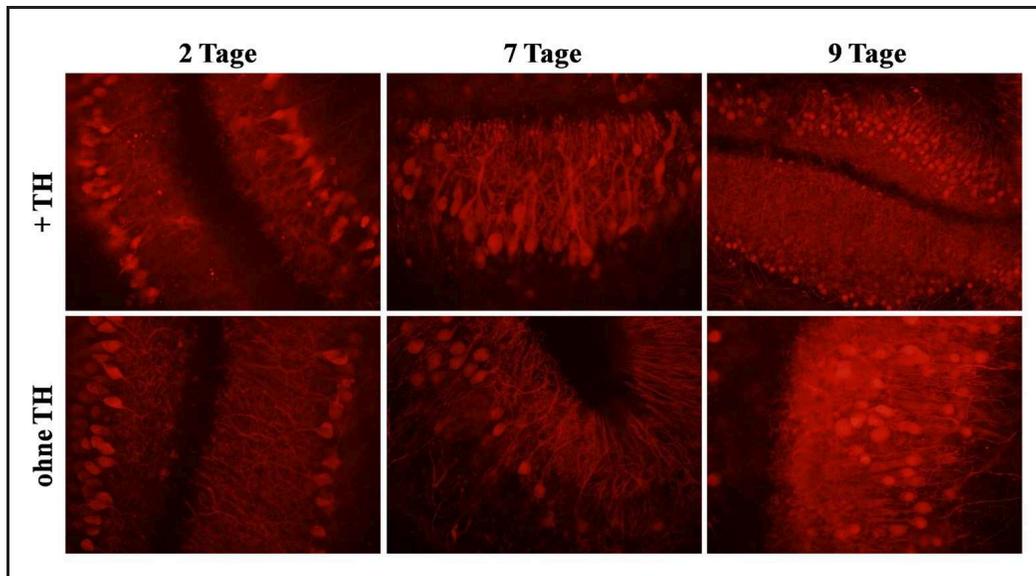


Abbildung 3.28: *Thyroidhormone haben keinen Einfluss auf die Differenzierung von Purkinjezellen in cerebellaren Schnittkulturen. Sagittal, 300 µm dick geschnittene WT-Cerebella zum Zeitpunkt P10 wurden in Neurobasalmedium mit bzw. ohne TH kultiviert und immunhistochemisch mit anti-Calbindin als Purkinjezellmarker gefärbt. Aufnahmen 200x*

Hierbei stellte sich heraus, dass eine ektopische Expression von Septin-4 einen toxischen Effekt auf die Zellen hatte. Dies konnte sowohl für die primären Astrozyten als auch für transformierte Zellen wie COS-7 gezeigt werden und ist in der Abbildung 3.29 dokumentiert.

COS-7 Zellen wurden hierfür mit einem für Septin-4 kodierenden Plasmid transfiziert und die Auswirkung der Proteinexpression auf die Zellen nach 16 h, 3 und 6 Tagen immunzytochemisch analysiert (siehe Abbildung 3.29, A). Als Kontrolle dienten untransfizierte COS-7 Zellen. Die mit Septin-4 transfizierten Zellen zeigten eine abnormale Morphologie und starben bereits nach einem Tag ab. Das wurde besonders durch die stark fragmentierten Zellkerne sichtbar. Der Effekt auf primäre Astrozyten war noch viel stärker. Hier konnten bereits nach einem Tag fast keine transfizierten Zellen mehr nachgewiesen werden. Deshalb wurden diese Zellkulturen direkt nach der Transfektion (24 h) und nach einer Woche auf die Präsenz des für Septin-4 kodierenden Plasmides überprüft. Hierfür wurde aus den Zellen genomische DNA isoliert und mittels PCR und zwei, für das Plasmid spezifischen, Primerpaaren ver-

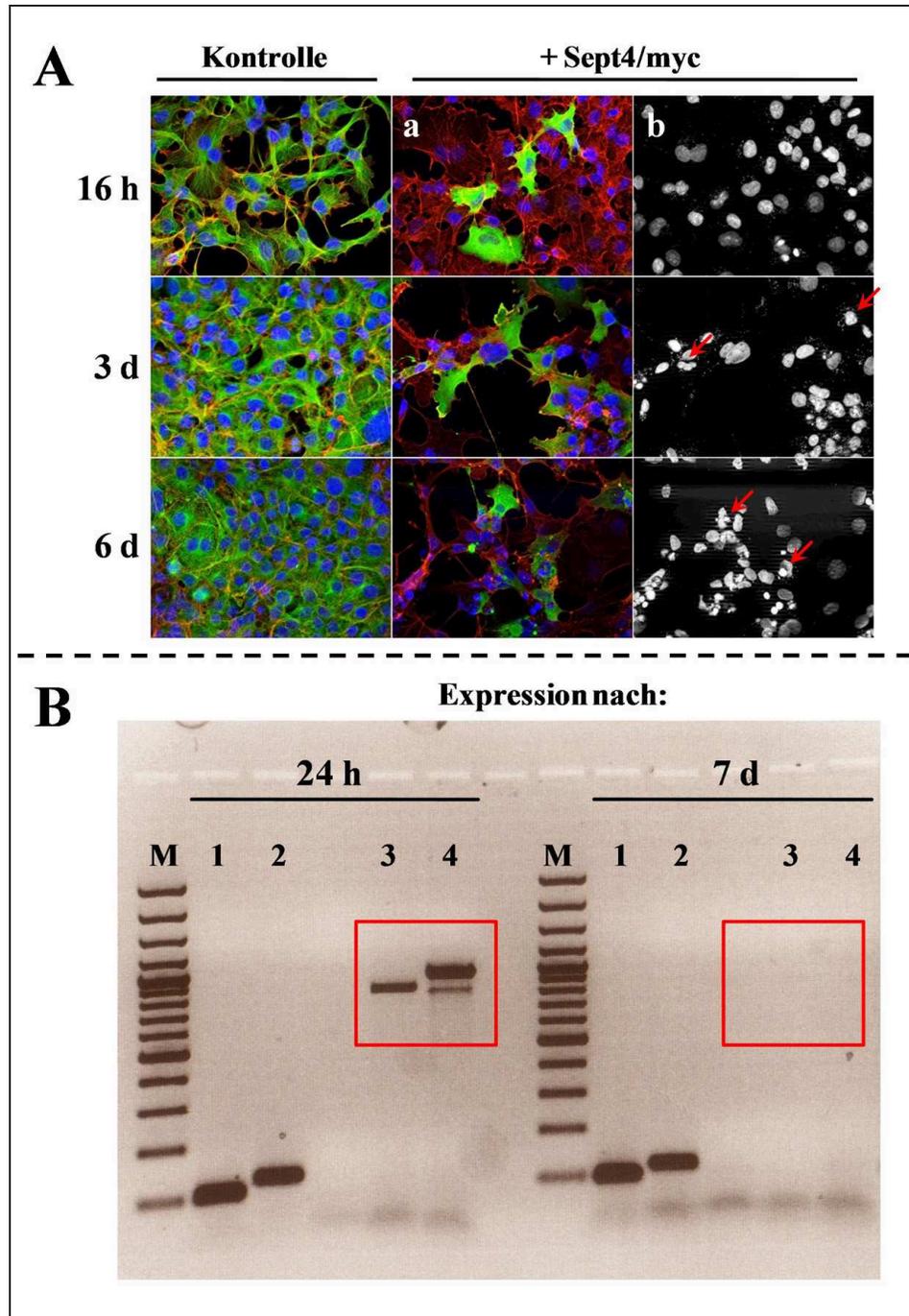


Abbildung 3.29: Der Toxizitäts-Nachweis einer Überexpression von Septin-4 erfolgte mittels Immunzytochemie (A) und PCR (B). **A:** Transfektion von COS-7 Zellen mit Sept4-myc und nachfolgende immunzytochemische Analyse der Zellen nach 16 h, 3 und 6 Tagen durch Färbungen gegen Aktin (rot) und α -Tubulin (untransfizierte Kontrollzellen, grün) bzw. c-Myc (transfizierte Zellen, grün): Die apoptotischen Zellen zeigten Zellkern-Fragmentierung (b, Pfeile). Aufnahmen 200x; **B:** Nachweis des transfizierten Plasmides in primären cerebellaren Astrozyten durch Isolierung genomischer DNA und nachfolgender PCR mit spezifischen Primern gegen Cyclophilin (1), Septin-4 (2) und das Plasmid selbst (3, 4) nach 24 h und 7 Tagen.

sucht, das Plasmid nachzuweisen (siehe Abbildung 3.29, B). Als Kontrollen dienten Primerpaare gegen Cyclophilin und endogen exprimiertes Septin-4. Während nach 24 h das Expressionsplasmid noch nachweisbar war, fiel diese Detektion nach einer Woche negativ aus. Da die transfizierten Astrozyten für dieses Experiment in serumfreiem Medium kultiviert wurden und sich unter diesen Bedingungen nur sehr langsam teilten, konnte ausgeschlossen werden, dass das Plasmid aufgrund eines starken Verdünnungseffektes nicht mehr nachzuweisen war.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es durch den toxischen Effekt einer ektopischen Septin-4 Expression auf die Zellen nicht möglich war, langfristige Einflüsse einer Transfektion mit diesem Protein auf die Zellmorphologie zu untersuchen. Im Gegensatz zu Septin-4 konnten sowohl transformierte Zellen wie COS-7 als auch primäre cerebellare Astrozyten erfolgreich mit Plasmiden, die für borg4 kodierten, transfiziert werden. So konnte in diesem Fall experimentell untersucht werden, welche physiologische Relevanz borg4 für die Morphologie von Gliazellen hat. Bei diesen Analysen zeigte sich überraschenderweise, dass Zellen, die ektopisch borg4 in hohem Maße exprimieren, eine sehr markante Veränderung ihrer Zellmorphologie zeigten. Primäre cerebellare Astrozytenkulturen und transformierte Zellen (COS-7) wurden mit einem für borg4 kodierenden Plasmid transfiziert, nach 24 h immunzytochemisch gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Bei diesem Experiment konnte festgestellt und repräsentativ gezeigt werden, dass Zellen, die borg4 überexprimieren, im Vergleich zu untransfizierten Kontrollzellen, vermehrt sehr lange und dünne Ausläufer ausbildeten. Dieses Ergebnis ist für jeweils mehr als fünfundzwanzig repräsentative COS-7 Zellen in Abbildung 3.30 bzw. für eine ähnlich große Anzahl primärer Astrozyten in Abbildung 3.31 dargestellt.

Eine Quantifizierung von Zellfläche und -umfang mittels graphischer Auswertung über das Programm NIH-Image sollte Aufschluss darüber bringen, in welchem relativen Verhältnis sich diese Größen in den transfizierten Zellen, verglichen mit den Kontrollzellen, veränderten. Die Auswertung dieser Quantifizierung wurde in Abbildung 3.32 A und B visualisiert. In Bild 3.32 A ist ein repräsentativer Vergleich zwischen einer Kontroll- und einer borg4-transfizierten Zelle dargestellt. Die beobachteten faserartigen Fortsätze der transfizierten Zellen wurden zusätzlich durch Pfeile markiert. Bei der quantitativen Auswertung, die in Bild 3.32 B für COS-7 (links) und primäre Astrozyten (rechts) dargestellt ist, konnte festgestellt werden, dass sich die Fläche in den transfizierten Zellen nicht änderte, dafür aber der Umfang um mehr als das Doppelte zunahm. Dieser Effekt war hoch signifikant und in den primären Astrozyten besonders stark ausgeprägt. Der erhöhte Zellumfang bei gleichbleibender Zellfläche war ein Indiz dafür, dass die Zellen nicht gewachsen sind, sondern ihre Gestalt durch die Ausbildung der Fortsätze so verändert haben, dass daraus eine stark vergrößerte Oberfläche, bzw. in der zweidimensionalen Darstellung der mikroskopischen Aufnahme ein erhöhter Zellumfang, resultierte.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass borg4 einen entscheidenden regulatorischen Einfluss auf die Zellmorphologie ausübte. Ein möglicher kumulativer Effekt bei der Kotransfektion von borg4 und Septin-4 konnte aufgrund der toxischen Auswirkung der ektopischen Septin-4 Expression nicht näher untersucht und analysiert werden.

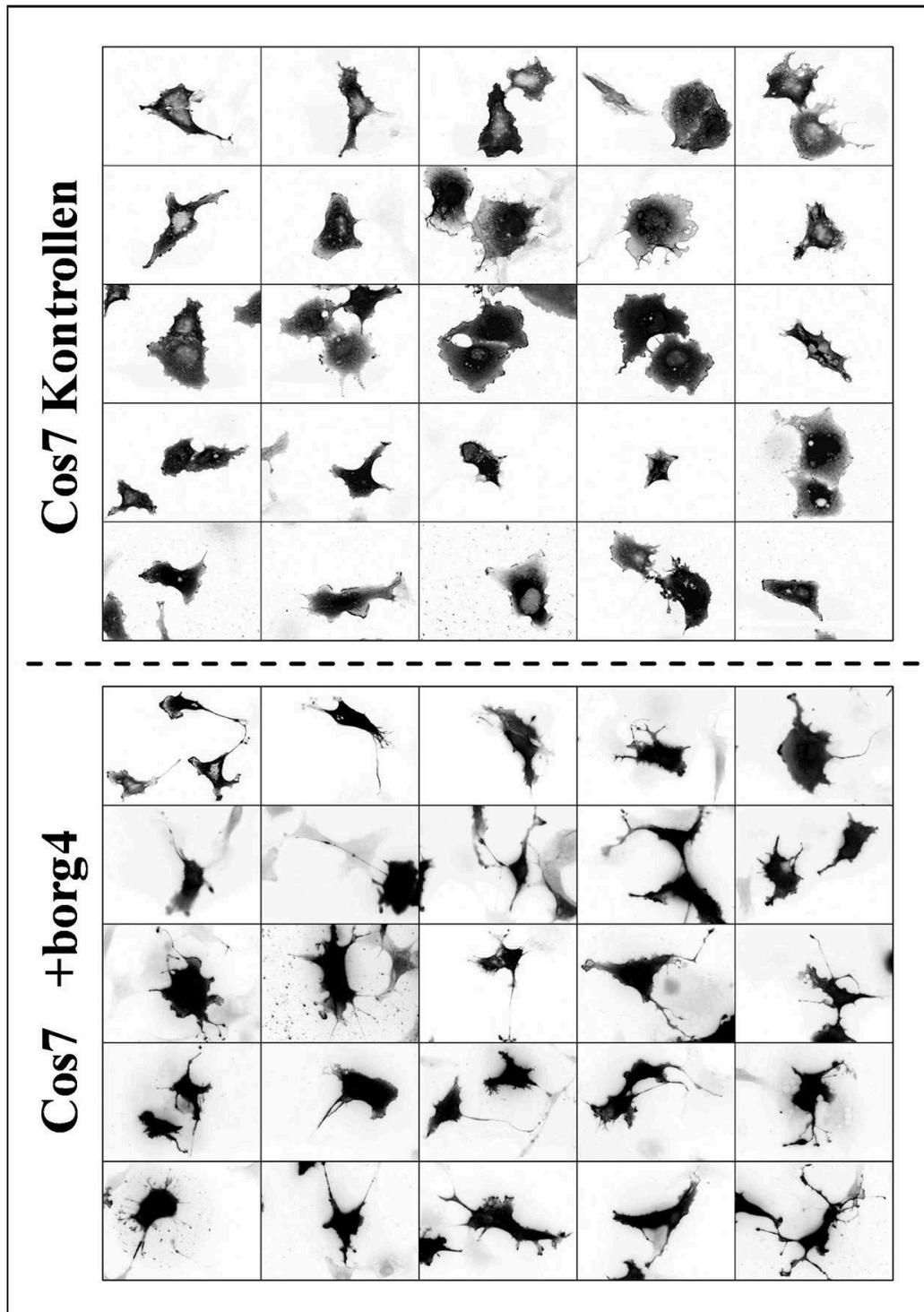


Abbildung 3.30: COS-7 Zellen, die borg4 ektopisch exprimierten, bildeten vermehrt auffällig lange, dünne Fortsätze aus. Gegenüberstellung der repräsentativen Morphologie von untransfizierten (oben, Kontrollen) und borg4-transfizierten (unten) COS-7 Zellen. Aufnahmen 630x

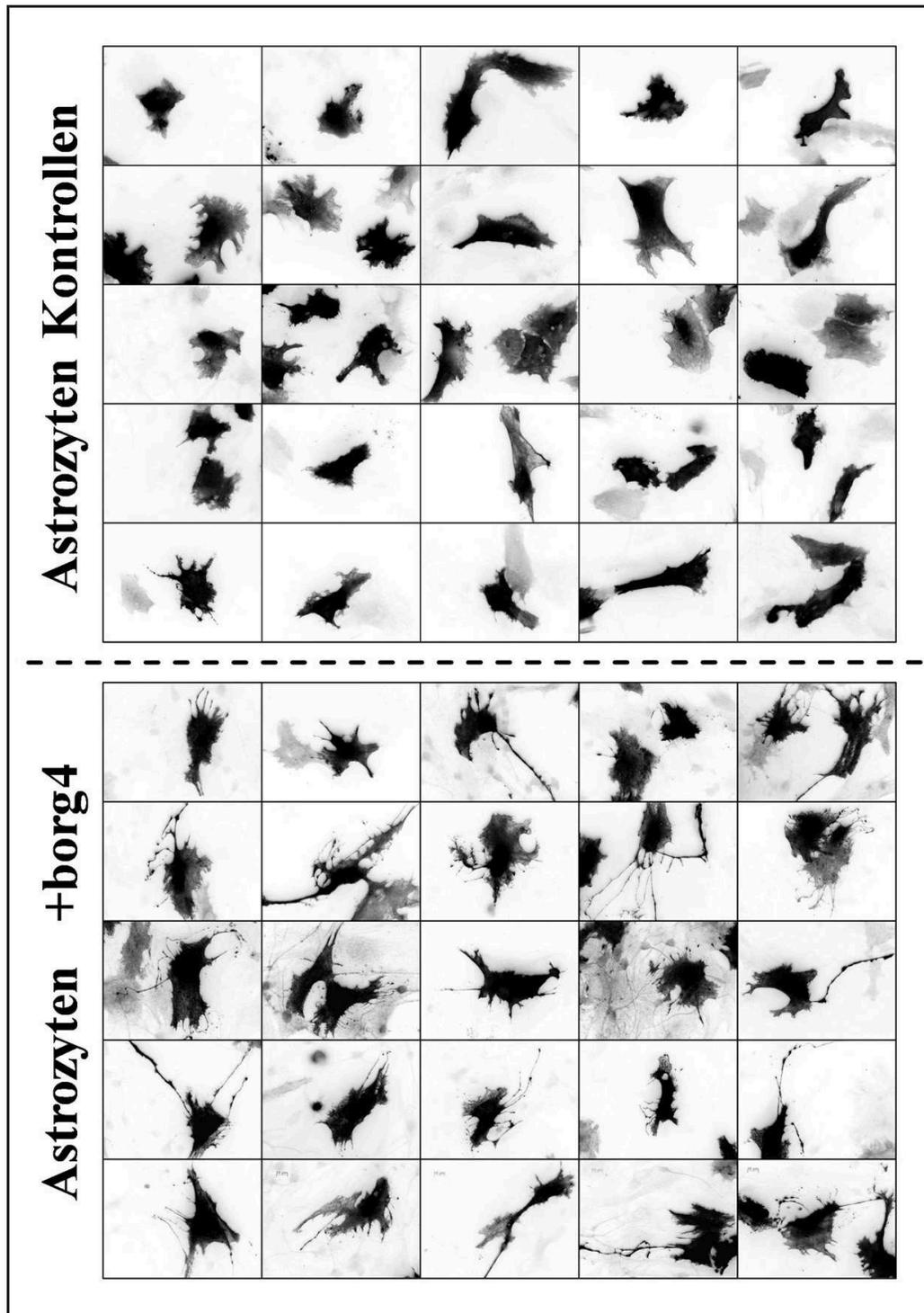


Abbildung 3.31: Primäre cerebellare Astrozyten, die borg4 ektopisch exprimierten, bildeten vermehrt auffällig lange, dünne Fortsätze aus. Gegenüberstellung der repräsentativen Morphologie von untransfizierten (oben, Kontrollen) und borg4-transfizierten (unten) Primärzellen, Aufnahmen 630x

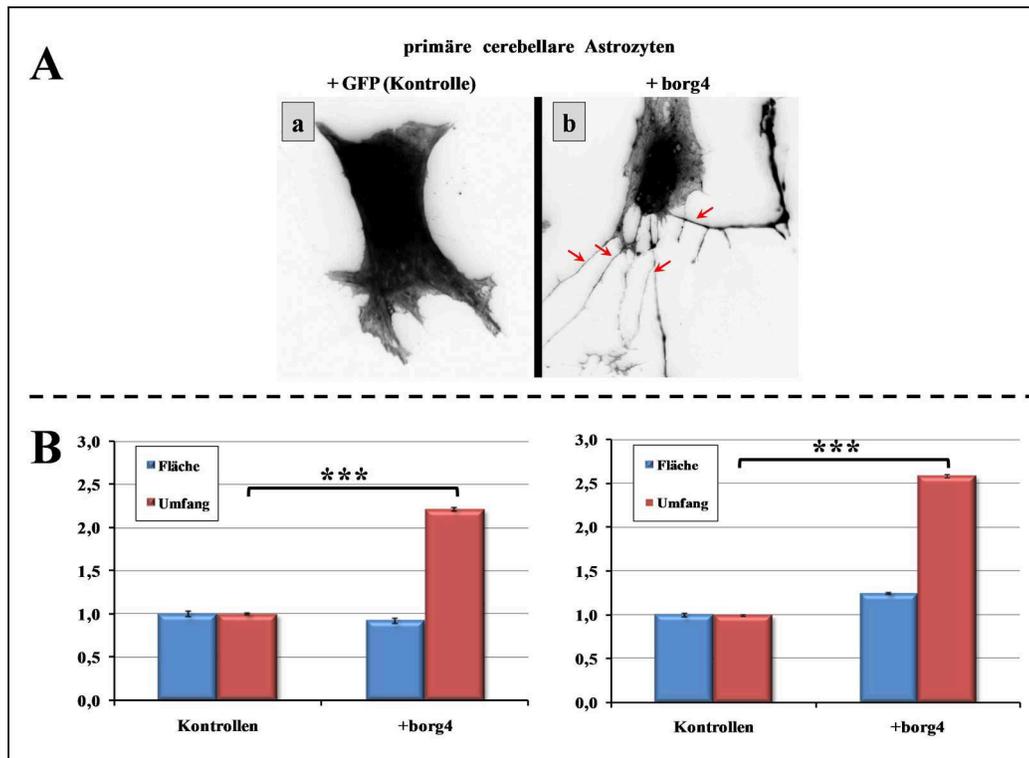


Abbildung 3.32: Quantifizierung der in den Abbildungen 3.30 und 3.31 vorgestellten Morphologieänderungen von borg4-transfizierten COS-7 Zellen und primären cerebellaren Astrozyten. **A:** Zellen, die borg4 ektopisch exprimieren, bilden auffällig lange, dünne Fortsätze (rote Pfeile) aus, die in den untransfizierten Kontrollzellen nicht zu beobachten waren. **B:** Quantifizierung ($n \geq 25$) der relativen Flächen und Umfänge von untransfizierten und mit borg4 transfizierten COS-7 Zellen (links) und primären cerebellaren Astrozyten (rechts). Bei annähernd gleichbleibender Zellfläche stieg der Zellumfang in den mit borg4 transfizierten Zellen um mehr als das Doppelte an. Alle Daten entsprechen Mittelwerten \pm SEMs. Signifikanz nach einseitigem Student's *t*-test (***) $p < 0.001$

4

Diskussion

4.1 Thyroidhormone als essentielle Regulatoren der Bergmann Glia- und Purkinjzell-Differenzierung im Cerebellum

Thyroidhormone sind sowohl für Entwicklungs- als auch für physiologische Prozesse im Körper von essentieller Bedeutung. Ihre Wirkung erstreckt sich auf eine Vielzahl wichtiger Organe, wobei speziell das sich entwickelnde Gehirn ein bedeutendes und interessantes Ziel ist. Besonders das Cerebellum von Nagern stellt ein ideales Modellsystem zur Analyse der Thyroidhormon-Wirkung auf neuronale Entwicklung und Differenzierung dar. Es wird pränatal angelegt, die strukturelle Ausbildung der charakteristischen cerebellaren Schichten sowie die Migration und Differenzierung spezieller Zellen erfolgen bei Nagern aber erst postnatal.

In der Literatur wird sehr oft ein generalisiertes, klassisches Bild der Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf das Gehirn dargestellt. Dieses umfasst die Aufnahme des Prohormons Thyroxin (T4) durch spezielle Thyroidhormon-Transporter in das Gehirn, die enzymatische Umwandlung von T4 zu T3 in Astrozyten durch Deiodinase Typ II und den Transport des aktiven Hormons T3 in die Neurone. Dort bindet T3 an im Zellkern lokalisierte Thyroidhormon-Rezeptoren und daraus resultiert eine Transkriptionsaktivierung oder -repression. In diesem Zusammenhang wurden bisher besonders der Einfluss von Schilddrüsenhormonen auf die Differenzierung der Purkinjzellen, die Migration der Körnerzellen und die Axonmyelinisierung im Kleinhirn untersucht.

Die Bedeutung von Schilddrüsenhormonen für eine ausgereifte Dendritogenese der Purkinjzellen und Synaptogenese zwischen Purkinjzellen und Interneuronen im Kleinhirn ist seit vielen Jahren bekannt und morphologisch gut in der Literatur beschrieben. Die Purkinjzellen im hypothyroiden Cerebellum zeigen einen verkürzten, wenig ausdifferenzierten Dendritenbaum mit einer geringen Dichte dendritischer *spines* [52, 100]. Dieser Aspekt konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit experimentell sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* bestätigt werden.

Die direkte Wirkung von Thyroidhormonen auf die Purkinjzelle oder ein zu Grunde liegender molekularer Mechanismus konnten bis heute jedoch nicht gezeigt werden. Aus dem immunhistochemischen Nachweis des Thyroidhormon-Rezeptors (TR) $\beta 1$

in Purkinjezellen resultierte die Annahme von Strait et al. [61], dass dieser Rezeptor eine zentrale Rolle in der T3-induzierten Gehirnentwicklung spielt und die Purkinjezellen direkt durch die Wirkung des Hormons beeinflusst werden. Dieses Ergebnis konnte aber nicht reproduziert werden. Bradley et al. [101] hatten sogar zuvor experimentell beobachtet, dass TR α und TR β mRNA in der cerebellaren Molekularschicht und den Purkinjezellen nicht nachweisbar sind.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Purkinjezellen durch Hypothyroidismus morphologisch und funktionell stark beeinträchtigt sind, die molekularen Ursachen hierfür jedoch noch weitgehend unbekannt sind.

Während der letzten zwanzig Jahre wurde das klassische Bild der Thyroidhormon-Wirkung auf neuronale Zellen durch zahlreiche Studien zur Bedeutung der Gliazellen und der Neuron-Glia-Wechselwirkungen im Gehirn sukzessiv erweitert. Dabei konnten einige grundlegende zelluläre Funktionen der Gliazellen für die Migration, Entwicklung und Differenzierung der Neuronen gezeigt werden. Im Jahr 2007 beschrieb die Arbeitsgruppe um Nishida et al. [102], (i) dass Astrozyten diffusible Faktoren sezernieren, die die Synapsenbildung der Neurone beeinflussen, (ii) dass Astrozyten-Neuronen-Kontakte über den Ephrin-Signalweg für die Stabilisierung, das Überleben und die morphologische Reifung der dendritischen Fortsätze erforderlich sind und (iii) dass die von Rac1 abhängige Beweglichkeit der Gliafortsätze für das Reifen der dendritischen *spines* entscheidend sind. Weiterhin tragen Gliazellen durch Cholesterolsynthese und -abgabe zur Synaptogenese zwischen Neuronen bei und sind für die strukturelle Stabilität der ausgebildeten Synapsen verantwortlich [103].

Durch solche Ergebnisse wurde deutlich, dass nicht die Neurone alleine die zentrale und bedeutende Rolle im ZNS spielen, sondern es immer nur eine essentielle Einheit aus Nerven- und Gliazellen gibt. Allerdings sind bis heute nur wenige Daten darüber verfügbar, ob und wie Thyroidhormone auf die einzelnen Gliazellpopulationen im Gehirn wirken. Bekannt ist lediglich, dass die von Astrozyten realisierte Synthese von Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren, die für die Migration und Entwicklung der Neurone essentiell sind, unter hypothyroiden Bedingungen beeinträchtigt ist [104]. Für Oligodendrozyten konnte nachgewiesen werden, dass diese bei Abwesenheit von Thyroidhormonen nicht ausdifferenzieren und dadurch die Nervenzellaxone nur unzureichend myelinisiert werden [52].

Aus diesem Grund war die erste Fragestellung dieser Arbeit darauf ausgerichtet, ob Thyroidhormone die Entwicklung der morphologisch auffälligsten Gliazellpopulation im Cerebellum, der Bergmann Gliazellen, ebenfalls beeinflussen und welche molekularen Grundlagen der Thyroidhormon-abhängigen Differenzierung der Bergmann Glia zu Grunde liegt. Außerdem wurde die Möglichkeit in Erwägung gezogen, dass eine unter athyroiden Bedingungen beeinträchtigte Entwicklung und Differenzierung der Bergmann Gliazellen eine Ursache für die retardierte Morphologie der Purkinjezellen darstellen könnte. Da diese spezialisierten Astrozyten im Cerebellum die engsten Interaktionspartner für die Entwicklung und Reifung der Purkinjezellen sind, wurde vermutet, dass die beobachtete Thyroidhormon-Wirkung auf die Purkinjezellen indirekt, über das Zytoskelett und damit die Differenzierung der Bergmann Gliazellen beeinflussende molekulare Mechanismen vermittelt wird.

Bergmann Gliazellen wurden nach ihrer Entdeckung im Jahre 1875 anfänglich nur füllende und stützende Funktionen im Kleinhirn zugeschrieben. Doch bis heute konnten viele weitere Funktionen experimentell bestätigt werden. Nachdem Delaney und Cui et al. [37, 38] zeigen konnten, dass das experimentelle Entfernen der Astrozyten bzw. der Bergmann Gliazellen im sich entwickelnden und adulten Gehirn der Maus zu enormen morphologischen Missbildungen der Purkinje- und Körnerzellen und zu funktionellen Störungen wie motorischer Diskoordination und Ataxie führte, wurde klar, dass Bergmann Gliazellen für die Entwicklung und das Überleben der Neurone im Kleinhirn essentiell sind. Als Ursache wurden exzitotoxische Effekte nach drastischer Reduzierung der, von den Gliazellen exprimierten, Glutamattransporter GLAST und GLT-1 diskutiert. Die Arbeitsgruppe um Hoser et al. [105] bestätigte 2007 mit einer Sox4 (SRY (*sex determining region Y*)-Box 4) Mausmutante ebenfalls, dass das Fehlen funktioneller Bergmann Gliazellen zu einer Missbildung des Cerebellums und zu Ataxie führt, obwohl alle cerebellaren Neuronentypen vorhanden waren.

Die Entwicklung der Bergmann Glia-Radialfasern, den die Molekularschicht bis zur Pia durchspannenden Hauptfilamenten, beginnt in der Maus am Tag E15. Diese GFAP-positiven Fasern unterstützen postnatal die Migration der Körnerzellen von der äußeren in die innere Körnerzellschicht, bilden eine Führungsstruktur für die Organisation und Synaptogenese der Interneurone aus und stellen ein strukturelles Gerüst für das gerichtete und koordinierte vertikale Wachstum der Purkinjezellendriten dar. Die wachsenden Spitzen der Dendriten interagieren mit den Radialfasern der Bergmann Glia und bilden mit den seitlichen Fortsätzen dieser Fasern ein dichtes Netzwerk aus [42, 43, 106].

Zum Zeitpunkt der Geburt lassen sich unreife Bergmann Gliazellen mit glatten Radialfasern, ohne seitliche Fortsätze, im Cerebellum nachweisen [107]. Das konnte mit den hier durchgeführten morphologischen Studien bestätigt werden. Die Ausbildung der seitlichen, lamellenartigen Bergmann Glia-Fortsätze erfolgt erst postnatal und verläuft synchron mit der Ausdifferenzierung der Purkinjezellendriten. Das Signal, das zum Auswachsen dieser Fortsätze führt, ist bis heute unbekannt [34].

Diese kurzen seitlichen Bergmann Glia-Fortsätze haben sehr bedeutende Funktionen: Sie dienen als Kontaktstellen zu benachbarten Neuronen, sind an Synaptogenese und synaptischer Plastizität beteiligt und entfernen Kalium oder Neurotransmitter wie Glutamat aus dem synaptischen Spalt, um die Nervenzellen vor Neurotoxizität zu schützen [34, 36, 108]. Grosche et al. [34, 108] bezeichneten diese, die Synapsen umschließenden Glia-Neuron-Kontaktstellen, als Mikrodomänen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal dokumentiert, dass die äußerst vielseitig funktionellen, seitlichen Fortsätze der Bergmann Glia in Abhängigkeit vom Schilddrüsenhormon-Status der Maus ausgebildet werden, während die Formation der Bergmann Glia-Radialfasern, sowie die Anzahl der Bergmann Gliazellen selbst, davon unbeeinflusst sind. Diese neuen Ergebnisse resultieren aus Analysen von eu- und athyroide, GFP-transgenen Mäusen zum Zeitpunkt P6, P12 und P21 hinsicht-

lich ihres Entwicklungszustandes der Bergmann Gliazellen im Cerebellum. Da bei diesem Mausmodell GFP unter einem gliaspezifischen Promotor exprimiert wird, kann die komplette Bergmann Glia-Morphologie ausgezeichnet visualisiert werden. Die retardierte Differenzierung der lamellenartigen Bergmann Glia-Fortsätze konnte auf diese Weise über den, für die Kleinhirnentwicklung kritischen Zeitbereich von drei Wochen nach der Geburt hinweg eindrucksvoll gezeigt und analysiert werden. Eine Substitution der athyroiden Versuchstiere mit Thyroxin (T4) revidierte den beobachteten retardierten Phänotyp vollständig. Dieses Experiment bestätigte somit den Einfluss von Thyroidhormonen auf die korrekte Entwicklung der Bergmann Gliazellen im Cerebellum. Durch einen Apoptose-Assay konnte bewiesen werden, dass nur die Entwicklung aber nicht die Anzahl dieser Zellen im athyroiden Cerebellum, verglichen mit dem euthyroiden Zustand, verändert ist. Weder in Pax8^{-/-} noch in Cerebella von Wildtypmäusen wurde mit der Apoptose einhergehende DNA-Fragmentierung in Bergmann Gliazellen detektiert. Daher können auch die strukturellen Defizite der Purkinjezellen nicht, ähnlich wie bei Delaney et al. [37, 38] beschrieben, auf eine reduzierte Bergmann Glia-Population zurückgeführt werden. Weiterhin kann ausgeschlossen werden, dass die Inaktivierung des Pax8-Gens selbst für den beobachteten Phänotyp im Cerebellum verantwortlich ist. Pax8 wird zwar im Gehirn exprimiert, Pax8^{-/-} Mäuse zeigen aber aufgrund der redundanten Funktion von Pax2 keine Defekte des ZNS. Im Cerebellum selbst werden nur Pax2 (in Sternzellen), Pax3 (in Bergmann Glia und Interneuronen) und Pax6 (in Körnerzellen) exprimiert [109, 110]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die morphologischen Auffälligkeiten im Kleinhirn durch Substitution mit Schilddrüsenhormonen komplett reversibel sind.

Eine direkte Wirkung von Thyroidhormonen auf Astrozyten, sowie die engen Interaktionen von Gliazellen und Neuronen (Purkinjezellen) konnte im Rahmen der Arbeit auch in *in-vitro*, in Zellkulturstudien, nachgewiesen werden. Zum einen induzierte die Zugabe von 1 nM T3 in das Medium einer primären cerebellaren Mischzellkultur eine auffällige morphologische Veränderung der Astrozyten. Die Zelloberfläche expandierte und die GLAST-Immunoreaktivität nahm stark zu. Wiederum konnten keine Veränderungen der GFAP-positiven Intermediärfilamente der Gliazellen festgestellt werden.

Dies steht im Gegensatz zu der Beobachtung, dass Thyroidhormon-Defizienz eine verzögerte Astrozytendifferenzierung mit erniedrigter GFAP-Expression induziert [71]. Diese, von der Arbeitsgruppe um Bernal et al. [60, 71] beschriebene, erniedrigte Expression von GFAP konnte jedoch weder in TR α -defizienten noch in hypothyroiden Pax8^{-/-} Mäusen verifiziert werden. Mit den für die gezeigten Experimente genutzten anti-GFAP Antikörpern der Firma Sigma waren, unabhängig von Mausgenotyp und Thyroidhormon-Status, keine Veränderungen der GFAP-positiven Radialfasern der Bergmann Gliazellen detektierbar. Mit dem in der zitierten Literatur aufgelisteten anti-GFAP Antikörper der Firma Dako hingegen konnte in keiner angewandten Schnitt- bzw. Färbemethode eine positive Färbung erreicht werden. Eine Begründung hierfür könnte sein, dass ein anderer Antikörper für die in der Literatur dargestellten Experimente genutzt wurde oder dieser spezielle Antikörper nur eine unter bestimmten Bedingungen modifizierte, wie z.B. phosphorylierte Form

von GFAP erkennt und diese Proteinform in den gezeigten Versuchen nicht vorlag. Li et al. [111] konnten nämlich zeigen, dass verschiedene Spezies von GFAP durch alternatives *Splicen* oder Phosphorylierung entstehen.

Zum anderen konnte in Zellkultur reproduzierbar beobachtet werden, dass Purkinjezellen nur in engstem Kontakt zu Astrozyten wachsen und differenzieren. Obwohl beide Zelltypen ihre aus dem Gewebe bekannte Form und Polarität verlieren, bleiben ihre Interaktionen erhalten. An den weitgehend überlappenden Kontaktstellen zwischen den Zelltypen war eine erhöhte GLAST-Immunoreaktivität detektierbar. Das deutet zum einen darauf hin, dass vor allem die GLAST-positiven, seitlichen Gliafortsätze mit den Purkinjezellen interagieren und demonstriert zum anderen die Bedeutung dieses Transporters für die Neuron-Glia-Interaktionen.

4.2 Regulation Bergmann Glia-spezifischer Gene und Proteine durch Thyroidhormone

Unter athyroiden Entwicklungsbedingungen können im Kleinhirn der Maus distinkte Veränderungen in der Morphologie von Bergmann Gliazellen beobachtet werden. Diese spezialisierte Gliapopulation im Cerebellum weist bei postnataler Abwesenheit von Schilddrüsenhormonen eine retardierte Entwicklung ihrer vernetzenden seitlichen Fortsätze auf. Ein molekularer Mechanismus, der als Grundlage für den beobachteten Phänotyp dienen könnte, wurde bisher noch nicht beschrieben.

Da für die korrekte Ausbildung der kurzen seitlichen Bergmann Glia-Fortsätze das Aktinzytoskelett von entscheidender Bedeutung ist, wurden spezifisch in Bergmann Gliazellen exprimierte Gene und Genprodukte hinsichtlich ihrer Thyroidhormon-abhängigen Verteilung untersucht. Von diesen Kandidatengenen war nur bekannt, dass sie entweder selbst als Zytoskelettbestandteil am Umbau der Zellgestalt beteiligt sind, oder als Teil einer Signalkaskade fungieren, die die Struktur des Zytoskeletts reguliert. Mit dieser Strategie sollten erste Hinweise auf einen putativen molekularen Mechanismus bzw. einen Signalweg gesammelt werden, der, ausgehend von Thyroidhormonen, die Assemblierung des Zytoskeletts der Zelle beeinflusst. In diesem Zusammenhang wurden die Verteilung und die Thyroidhormon-abhängige Expression von GFAP, verschiedenen Septinen, allen fünf bekannten borg und GLAST untersucht.

4.2.1 GFAP

Ein markantes Zytoskelettprotein in Astrozyten und Hauptkomponente der Bergmann Glia-Radialfasern ist GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*). GFAP fungiert in Astrozyten, wie auch Vimentin, als strukturelle Unterstützung von Intermediärfilamenten. Vimentin ist ein vorgeburtlicher Gliazellmarker und wird nach der Geburt durch die Expression von GFAP abgelöst [112]. Daher wurden die hier vorgestellten Untersuchungen zur Thyroidhormon-abhängigen Expression von Zytoskelettproteinen in einem ersten Ansatz auf GFAP fokussiert. Die in der Literatur [111] gezeigte Verschiebung der GFAP-Expressionsmengen in hypothyroiden Tieren konnte

mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten bestätigt werden. In hypothyroiden Pax8^{-/-} Mäusen war zum Zeitpunkt P12 eine erhöhte GFAP-Expression detektierbar und die normale Herunterregulierung nach Tag 21 war verzögert. Die Schlussfolgerung von Li et al. [111], dass eine durch Thyroidhormon-Defizienz induzierte, verzögerte Expression von GFAP auch mit einer verzögerten Differenzierung der Bergmann Gliazellen einhergeht, ist diskussionswürdig, da weder im athyroiden Kleinhirn, noch in unter Schilddrüsenhormon-Mangel kultivierten Astrozyten eine Veränderung der GFAP-positiven Radialfasern nachweisbar war. Weiterhin konnte in der von Ribotta et al. [112] beschriebenen GFAP KO Maus nur ein geringer Einfluss auf die Morphologie der Bergmann Glia nachgewiesen werden. Sowohl die Radialfasern als auch die seitlichen Bergmann Glia-Fortsätze werden in diesem Modellsystem ausgebildet. Auch die Purkinjezellen zeigen in diesem Mausmodell keine retardierte Entwicklung. Zusammengenommen kann daher geschlussfolgert werden, dass GFAP bei der Thyroidhormon-induzierten Entwicklung von Bergmann Glia und Purkinjezellen keine entscheidende Rolle spielt.

4.2.2 Septine

Septine bilden eine eigene Klasse von Zytoskelettproteinen, sind aber ebenfalls in der Lage, mit anderen Zytoskelettbestandteilen wie Aktinfilamenten und Mikrotubuli oder der Zellmembran, zu interagieren [74, 113]. Im Gehirn exprimieren sowohl Neurone als auch Gliazellen spezifisch verschiedene Septinmonomere, die dann zu bestimmten Oligomeren mit distinkten, zelltypspezifischen Funktionen assemblieren [80]. Aus der Literatur ist bekannt, dass Septine (Septin-5, -7 und -11) in Neuronen für die Ausbildung und Morphogenese von *spines* und dendritischen Verzweigungen von essentieller Bedeutung sind. Die Septinheterotrimere sind am Hals der *spines* und an den Verzweigungspunkten der Dendriten lokalisiert und bilden dort eine ringförmige Struktur, die, ähnlich wie bei der Teilung von Hefen, *spines* und sich verzweigende Dendriten abschnüren und stabilisieren. Deshalb wird Septinen auch eine konservierte Funktion von der Hefe bis hin zu Säugern zugeschrieben. Eine erniedrigte Septin-7 Expression resultiert in aberranter dendritischer Verzweigung und *spine*-Morphogenese [82, 83, 114]. Bezüglich der konservierten Funktion und der strukturellen Vergleichbarkeit von dendritischen *spines* bzw. dendritischen Verzweigungen mit den kurzen seitlichen Fortsätzen der Bergmann Gliazellen, wurden in dieser Arbeit Bergmann Glia-spezifische Septine wie Septin-2 und Septin-4 [80, 89] als putative Kandidaten hinsichtlich ihrer Verteilung und ihrer Thyroidhormon-abhängigen Expression im Cerebellum untersucht. Experimentell sollte festgestellt werden, ob diese Septine in Abhängigkeit von Schilddrüsenhormonen die Assemblierung des Zellzytoskeletts der Bergmann Glia beeinflussen und somit an der beobachteten morphologischen Veränderung aktiv beteiligt sein könnten.

Übereinstimmend mit der Literatur konnte gezeigt werden, dass im sich entwickelnden Cerebellum Septin-2 vor allem in Bergmann Gliazellen und Oligodendrozyten der weißen Substanz exprimiert wird. Eine Thyroidhormon-abhängige Expression konnte jedoch weder auf mRNA noch auf Proteinebene beobachtet werden. Daher wurde Septin-2 nicht fortführend analysiert.

Septin-4 hingegen, das ein vergleichbares Expressionsmuster wie Septin-2 im Klein-

hirn der Maus aufweist, wird dort sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene unter athyroiden Bedingungen stark herunter reguliert. Dass es sich hierbei tatsächlich um einen Effekt handelt, der auf die Wirkung von Schilddrüsenhormonen zurückzuführen ist, konnte durch Substitutionsexperimente athyroider Mäuse gezeigt werden. Nach externer Gabe von T4 konnte das Expressionsniveau von Septin-4 im Cerebellum von Pax8^{-/-} Mäusen auf das Niveau der Wildtyp-Kontrolltiere normalisiert werden. Diese Thyroidhormon-abhängige Expression von Septin-4 wurde vorher noch nicht in der Literatur beschrieben. Das Ergebnis beweist, dass dieses, in Bergmann Gliazellen hoch exprimierte, Gen positiv durch Thyroidhormone reguliert wird.

Über die spezielle Funktion von Septin-4 im Cerebellum gibt es bis heute nur wenige Hinweise. Eine für dieses Protein defiziente Mausmutante wurde hinsichtlich ihrer Bergmann Glia-Morphologie und Kleinhirnstruktur nur von der Arbeitsgruppe um Kinoshita et al. [115] analysiert. Die Daten dieser japanischen Gruppe deuten darauf hin, dass die Zytoskelettorganisation der Gliazellen nur wenig beeinflusst ist. Da von der Arbeitsgruppe aber nur ein kurzer Kongress-*abstract* als Literaturquelle zur Verfügung stand [115], konnte nicht nachvollzogen werden, welche Strukturen und Zytoskelettbestandteile der Gliazellen genau untersucht wurden. Außerdem wurde gezeigt, dass eine Inaktivierung von Septin-4 die Verteilung der Oberflächenmoleküle für eine normale Glia-Neuron-Interaktion beeinflusst, die Migration der Körnerzellen inhibiert, eine Fehlausrichtung und Anomalien der Purkinjezellen induziert und für eine reduzierte Synaptogenese verantwortlich ist. Septin-4 wird daher als für die Organisation einer funktionellen Verbindung zwischen Bergmann Glia und cerebellaren Neuronen essentielles Protein beschrieben [115]. Da besonders der, in diesem *abstract* dargestellte, Phänotyp der cerebellaren Neuronen (Fehlausrichtung und Anomalien der Purkinjezellen) stark an den hypothyroiden Phänotyp der Pax8^{-/-} Maus erinnert, wurde Septin-4 in der vorliegenden Arbeit als ein putatives Kandidatengen zur Thyroidhormon-abhängigen Entwicklung und Differenzierung von Bergmann Gliazellen analysiert.

4.2.3 borg

Ein Signalweg, der bekannt dafür ist, dass er die Assemblierung des Zytoskeletts in Neuronen und somit die Dendritenausbildung und *spine*-Morphogenese stark beeinflusst, ist der Rho GTPase Signalweg. Rho GTPasen wie RhoA, Rac1 und Cdc42 haben als molekulare Schalter eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts der Zellen. Missregulationen in dieser Signalkaskade werden oft als Ursachen für mentale Retardierung diskutiert. Besonders Cdc42 ist für die Differenzierung und räumliche Strukturierung von sich entwickelnden Neuronen von entscheidender Bedeutung [116, 117, 118]. Die Neurone einer Cdc42-defizienten Mausmutante besitzen daher eine stark verringerte Dichte an dendritischen *spines* [119]. Diese, besonders im Cerebellum hoch exprimierte Rho GTPase, reguliert die Organisation des Aktin-Zytoskeletts durch Interaktion mit nachgeordneten Effektorproteinen, bei denen es sich selbst nicht um Kinasen handelt. Eine neue Familie solcher Effektorproteine, die borg-Proteine, wurde 1999 erstmalig über ihre zur Bindung an Cdc42 notwendige und daher stark konservierte CRIB-Domäne identifiziert

und beschrieben. In Zellkulturexperimenten mit transformierten Zellen (NIH-3T3) wurde ihr Einfluss auf die Zellmorphologie bestätigt [91, 92, 93, 120].

Da eine detaillierte Signalkaskade, in die Cdc42 und borg-Proteine als ihre Effektoren integriert sind und die die Zellpolarität und den Umbau des Zytoskeletts reguliert, bis heute nicht bekannt ist, wurde nach weiteren Effektorproteinen gesucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass borg in der Lage sind, an Septine zu binden und deren Organisation und Assemblierung zu steuern. Borg-Proteine dienen somit als Bindeglied zwischen der, das Zytoskelett in cerebellaren Zellen beeinflussenden, Rho GTPase Cdc42 und Septinen [90].

Aufgrund dieser aus der Literatur bekannten Fakten und dem Umstand, dass weitere Interaktionspartner von Septin-4 in Bergmann Gliazellen gefunden werden sollten, wurde die Verteilung und Thyroidhormon-abhängige Expression von borg-Proteinen im Cerebellum näher untersucht. So konnte nachgewiesen werden, dass im Kleinhirn der Maus vier der fünf borg-Familienmitglieder exprimiert werden, zwei davon, borg4 und borg5, spezifisch in Bergmann Gliazellen. Da aber nur borg4 eine Thyroidhormon-abhängige Expression sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene zeigt, wurden weitergehende Studien im Zusammenhang mit Septin-4 auf dieses Genprodukt fokussiert. Weiterhin kann aus diesem Experiment geschlossen werden, dass aufgrund der Verteilung und der exklusiven Wirksamkeit der Schilddrüsenhormone auf borg4 kein kompensatorischer Effekt auf die Funktion dieses Genproduktes durch die anderen borg-Familienmitglieder zu erwarten ist.

Der Umstand, dass borg4 im Cerebellum phosphoryliert vorliegt, könnte einen Hinweis auf einen möglichen Regulationsmechanismus darstellen, da Phosphorylierungen für die Bergmann Glia-Differenzierung und die Zytoskelettorganisation von entscheidender Bedeutung sind. So konnte gezeigt werden, dass z.B. die Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) als negativer Regulator diese Prozesse im Kleinhirn kontrolliert [121].

4.2.4 GLAST

Ein weiteres Protein, das in den seitlichen Fortsätzen der cerebellaren Bergmann Glia in hohem Maße exprimiert und sehr oft im Zusammenhang mit Neurodegeneration diskutiert wird, ist der Glutamattransporter GLAST.

Obwohl eine geringe GLAST-Expression bereits im fötalen Kleinhirn nachweisbar ist, erreicht diese erst ab der zweiten postnatalen Woche (ca. P10) ihren Höchstwert. Zu diesem Zeitpunkt lässt sich der für Astrozyten spezifische Glutamattransporter in der cerebellaren Molekularschicht, und zwar in den kurzen seitlichen Bergmann Glia-Fortsätzen, in hoher Menge nachweisen. Diese Fortsätze interagieren mit den auswachsenden und differenzierenden Dendriten der Purkinjezellen und umschließen exzitatorische Synapsen an den dendritischen *spines*. Hierbei bilden die lamellenartigen kurzen Bergmann Glia-Fortsätze ein dichtes Netzwerk, das die Synapsen komplett umschließt. GLAST hat in diesen synaptischen Bereichen die Funktion, den Neurotransmitter Glutamat nach Erregung des Neurons sofort aus dem synaptischen Spalt durch Aufnahme in die Gliazelle zu entfernen. Dieser Mechanismus garantiert, dass die Erregbarkeit der Neurone erhalten bleibt und diese vor Exzitotoxizität geschützt werden. Neben GLAST kommt noch ein weiterer Glutamattransporter in

cerebellaren Gliazellen vor, der aber erst später in der Entwicklung des Kleinhirns und in viel geringerem Maße exprimiert wird: GLT-1 [43, 122, 123, 124, 125].

Eine abnormale Funktion des Glutamataufnahmesystems der Gliazellen im Gehirn führt zu neurodegenerativen Erkrankungen wie Dominante Spinocerebellare Ataxie (SCA) oder ALS (*amyotrophic lateral sclerosis*). Hierbei bildet die Akkumulation des Neurotransmitters im synaptischen Spalt die Grundlage für das Erreichen toxischer Glutamatkonzentrationen im Gehirn. Diese führen dann zur Degeneration der Nervenzellen [39, 126].

Die essentielle Bedeutung von GLAST für eine geregelte Homöostase der Neurotransmitter im Kleinhirn konnte ebenfalls durch die Analyse einer GLAST-defizienten Mausmutante bestätigt werden. Diese KO Maus zeichnet sich durch einen ataxischen Phänotyp mit motorischer Diskoordination aus und zeigt eine hohe Empfindlichkeit für cerebellare Verletzungen sowie eine vervielfachte Innervation durch Kletterfasern im adulten Cerebellum. Das Fehlen des Transporters führt zu erhöhten extrazellulären Glutamatmengen, welche Neurodegeneration durch Exzitotoxizität und progressive Paralyse zur Folge haben [88, 127, 128].

Aufgrund der Lokalisation von GLAST in den seitlichen Bergmann Glia-Fortsätzen, der enormen Bedeutung des Transporters für die Entwicklung und Synaptogenese der cerebellaren Neuronen und seiner engen Interaktion mit Septinen in den Gliazellen [89], wurde GLAST als drittes Kandidatengen im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Obwohl im Kleinhirn der Maus auf mRNA- und Proteinebene keine Thyroidhormon-abhängige Expression nachweisbar war, konnte in primären Astrozytenkulturen nach Stimulation mit T3 ein Anstieg der GLAST-Proteinmenge beobachtet werden. Diese Diskrepanz könnte darauf zurückgeführt werden, dass es in den Experimenten nicht möglich war, die Signale einer bestimmten Gliazellpopulation, wie z.B. den Bergmann Gliazellen, zuzuordnen. Weiterhin könnte dieser gliaspezifische und absolut essentielle Transporter im Gehirn auf Proteinebene entweder durch posttranslationale Modifikationen, veränderte Halbwertszeit oder Translokation abhängig vom Schilddrüsenhormonstatus der Zellen reguliert werden. Im normalen Zustand erfolgt eine Translokation von GLAST von bzw. zur Zellmembran abhängig von der Neurotransmitterkonzentration im synaptischen Spalt. Der Neurotransmitter ist somit kurzzeitig in der Lage, seine eigene Eliminierung durch Autoregulation zu steuern. Eine Langzeitregulation erfolgt über eine Glutamat-abhängige Transkriptionskontrolle durch die Proteinkinase C [129]. Von Kinoshita et al. [89] konnte aber auch nachgewiesen werden, dass Septine wie Septin-2 und Septin-4, abhängig von GTP, direkt an den C-Terminus von GLAST binden und den Transporter so in der Plasmamembran stabilisieren. Ist diese Bindung nicht möglich (konstitutive GDP-Mutante), wird die Glutamataufnahme aus dem synaptischen Spalt durch Internalisierung von GLAST inhibiert. Eine Bindung wäre auch nicht möglich, wenn eine Komponente des von Kinoshita et al. [89] postulierten Sept2/4/7-Trimeres fehlen würde, wie es in den athyroiden Bergmann Gliazellen der Fall ist.

Da GLAST ebenfalls in die Dendritogenese der Purkinjezellen involviert ist und eine chemische Inhibition des Glutamattransporters zu abnormaler Morphogenese der Purkinjezellen führt [130], wäre dieser Mechanismus eine denkbare Ursache, wie

Genprodukte in Bergmann Gliazellen über GLAST die Morphogenese des Hauptneurons im Kleinhirn beeinflussen könnten.

4.2.5 Thyroidhormon-Rezeptoren und TH-abhängige Regulation Bergmann Glia-spezifischer Gene

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit belegt werden konnte, dass mit Septin-4 und borg4, zwei, auf das Zellzytoskelett regulierend wirkende Proteine, in Abhängigkeit von Thyroidhormonen exprimiert werden, sollte die Frage beantwortet werden, welche Thyroidhormon-Rezeptoren in den Bergmann Gliazellen diesen Effekt vermitteln.

Da aus der Literatur bekannt war, dass Astrozyten sowohl TR α und TR β Subtypen exprimieren [71], wurden euthyroide (Wildtyp, TR α 1^{-/-}, TR β ^{-/-}) und athyroide Rezeptor-defiziente (TR α 1^{-/-}Pax8^{-/-}, TR β ^{-/-}Pax8^{-/-}) Mauscerbella hinsichtlich ihrer Transkriptmengen von Septin-4 und borg4 mittels radioaktiver *In-situ* Hybridisierung (ISH) analysiert und miteinander verglichen. Eine Substitution der athyroiden TR-defizienten Versuchstiere sollte zeigen, welchen Effekt die Abwesenheit des jeweiligen Rezeptors auf die Wiederherstellung der Transkriptspiegel der beiden Gene hat.

Bei diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die durch Thyroidhormone vermittelte Regulation der Transkriptmengen von Septin-4 und borg4 hauptsächlich durch TR α 1 induziert wird. Fehlt dieser Rezeptor, resultiert daraus eine Verringerung der Transkriptspiegel beider Gene. Dies war in TR β -defizienten (TR β ^{-/-}) Mäusen nicht der Fall. Wurden zusätzlich athyroide TR-defiziente Tiere untersucht, konnten erniedrigte Septin-4- und borg4-Transkriptmengen auch im TR β -defizienten (TR β ^{-/-}Pax8^{-/-}) Cerebellum beobachtet werden, während keine weiteren Veränderungen im athyroiden TR α 1-defizienten (TR α 1^{-/-}Pax8^{-/-}) Cerebellum feststellbar waren. Eine Substitution der athyroiden TR-defizienten Mäuse mit T4 führte nur in dem TR β -defizienten (TR β ^{-/-}Pax8^{-/-}) Cerebellum zu einem Anstieg der Transkriptspiegel, da dort TR α 1 als Mediator der Thyroidhormon-Wirkung unverändert exprimiert wurde. Der im Ergebnisteil demonstrierte und hier zusammenfassend beschriebene Einfluss von TR α 1 konnte sowohl für Septin-4 als auch für borg4 nachgewiesen werden. Allerdings spiegelten die ISH-Signalintensitäten für die borg4-Transkriptmengen das Ergebnis eindeutiger wider. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass borg4 im TR α 1^{-/-}-Cerebellum stärker durch Thyroidhormone reguliert wird als Septin-4. Alternativ könnte auch vermutet werden, dass die Expression von Septin-4 in den Bergmann Gliazellen viel höher ist als die von borg4. Bei der radioaktiven ISH handelt es sich um eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von mRNA in Geweben. Wird ein Gen stark exprimiert, ist eine differentielle Expression unter verschiedenen Bedingungen oft schwer nachweisbar, da eine lineare Beziehung zwischen Transkriptspiegel und Signalintensität nicht mehr gegeben ist. Das könnte hier auch für Septin-4 der Fall sein. Eine Lösung des Problems könnte eine DIG-ISH darstellen, da diese weniger sensitiv als die radioaktive ISH ist. Septin-4 konnte in Vorversuchen mittels DIG-ISH im Cerebellum nachgewiesen werden, während dies für borg4 nicht möglich war (Ergebnis nicht gezeigt).

Auch eine, zur Validierung der ISH, durchgeführte quantitative Real-Time-PCR konnte die beobachteten Ergebnisse nicht vollständig reproduzieren. Abweichend von den ISH-Resultaten konnte durch die Real-Time-PCR nicht ermittelt werden, dass die Transkriptmengen beider Gene nach der T4-Substitution wieder auf die Wildtyp-Niveaus ansteigen. In der TR α 1-defizienten Versuchsgruppe konnte lediglich gezeigt werden, dass sich die mRNA-Mengen von Septin-4 und borg4 nach Substitution nicht signifikant verändern. Eine signifikante Veränderung war hingegen in der TR β -defizienten Versuchsgruppe nachweisbar, diese erreichte aber nicht das Wildtypniveau. Wahrscheinlich können die differierenden Ergebnisse der beiden Methoden damit begründet werden, dass die analysierten Signale bei der ISH deutlich einer bestimmten Zellpopulation zugeordnet werden können (histologische Studie der Schnitte vom Cerebellum), während durch die Real-Time-PCR mRNA-Mengen aus heterogenen Zellpopulationen des ganzen Cerebellums vermessen werden. Im Fall von Septin-4 können Kontaminationen mit Gliazellen der weißen Substanz und im Fall von borg4 Kontaminationen mit dem Choroid Plexus nicht ausgeschlossen werden.

Da im Rahmen der Arbeit dargestellt werden konnte, dass TR α 1 entscheidend für die Vermittlung der Thyroidhormon-abhängigen Expression von Septin-4 und borg4 im Cerebellum der Maus ist, sollte ebenfalls analysiert werden, ob die Morphologie der Bergmann Glia in TR α 1-defizienten Tieren verändert ist. TR β -defiziente Cerebella wurden zur Kontrolle ebenfalls untersucht. Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Defizienz der Rezeptoren keinen Einfluss auf die Entwicklung der Bergmann Gliazellen hat. Das deutet darauf hin, dass die Abwesenheit von Thyroidhormonen starke Beeinträchtigungen für die Entwicklung cerebellarer Zellen haben, die nicht auftreten, wenn nur die Thyroidhormon-Rezeptoren fehlen. Dieses Phänomen, dass Mäuse, die defizient für alle TRs sind, nicht den gleichen schweren Phänotyp zeigen, wie Mäuse, die sich aufgrund einer gestörten Hormonsynthese hypothyroid entwickeln [58, 69], lässt sich damit begründen, dass Thyroidhormon-Rezeptoren im ligandenfreien Zustand als Aporezeptoren wirken. Diese Aporezeptorfunktion reguliert die Transkription von Zielgenen und scheint für die schädlichen Effekte des Hypothyroidismus und damit auch für die gestörte postnatale Entwicklung des Cerebellums unter hypothyroiden Bedingungen verantwortlich zu sein [19, 69, 99]. Aus diesem Grund ist die Morphologie der Bergmann Glia- und der Purkinjezellen eines TR-defizienten Kleinhirns vergleichbar mit der Situation in Wildtyptieren. Fehlt der Rezeptor komplett, kann er auch nicht als Aporezeptor fungieren. Das Ergebnis, dass der Phänotyp cerebellarer Neuronen in TR α 1-defizienten Mäusen nicht verändert ist, wurde bereits 2002 von Morte et al. [99] beschrieben. Die von derselben Arbeitsgruppe in einer nachfolgenden Publikation [60] diskutierten Auffälligkeiten der Astrozytendifferenzierung konnten allerdings nicht bestätigt werden und sind bei der sehr engen Interaktion beider Zelltypen auch unwahrscheinlich. Eine, durch die Abwesenheit eines Thyroidhormon-Rezeptors, gestörte Differenzierung der Bergmann Glia würde zwangsläufig auch in einem veränderten Phänotyp der Purkinjezellen resultieren [37, 38].

Bis heute konnten nur wenige Thyroidhormon-regulierte Gene, die für die Cerebellumentwicklung verantwortlich sind, identifiziert werden. Ursachen hierfür könnten

sein, dass die durch TRs vermittelte Transkription durch viele verschiedene Faktoren wie Rezeptor-Dimerisierung, -Modifikationen (Phosphorylierung), verschiedenste Transkriptionsfaktoren, Koaktivatoren und Korepressoren beeinflusst werden. Weiterhin wirken Schilddrüsenhormone im Cerebellum sowohl auf genomischer als auch auf nicht genomischer Ebene. Hierdurch könnte alternativ die Diskrepanz zwischen den, bei TR-defizienten und den Pax8^{-/-} Mäusen beobachteten, Phänotypen diskutiert werden [70]. Septin-4 und borg4 scheinen in einer Signalkaskade involviert zu sein, die zwar auf das Zytoskelett der Bergmann Glia wirkt und für die Ausdifferenzierung der kurzen seitlichen Fortsätze verantwortlich sein könnte, scheinen aber in diesem Prozess nicht die alleinige Schlüsselrolle zu spielen. Wäre dies der Fall, würde die beobachtete Verringerung der Transkriptmengen beider Gene, wie in den Pax8^{-/-} Mäusen, auch in den TR-defizienten Mäusen zur retardierten Entwicklung der Bergmann Gliazellen führen.

4.3 Interaktionen und Funktion der Bergmann Glia-spezifischen Proteine Septin-4 und borg4

4.3.1 Septin-4 und borg4: Interaktion *in-vitro*

Da aus der Literatur bekannt war, dass ein Mitglied der borg-Proteinfamilie, nämlich borg3, in der Lage ist, mit Septinen zu interagieren [94], sollte die Frage beantwortet werden, ob borg4 und Septin-4 nur zufällig eine ähnliche Lokalisierung im Cerebellum sowie eine positive Thyroidhormon-abhängige Regulation zeigen, oder ob diese beiden Proteine auch zellulär und funktionell miteinander verknüpft sind. Durch zwei verschiedene *in-vitro* Studien (Immunzytochemie und Koimmunopräzipitation) konnte erstmalig gezeigt werden, dass Septin-4 und borg4 in transfizierten primären Astrozyten oder transformierten Zellen eine überlappende Lokalisation zeigen und über Protein-Protein-Wechselwirkungen miteinander interagieren. Beide Proteine konnten aus transfizierten HEK-293 Zellen zusammen immunpräzipitiert werden.

In transfizierten Zellen, die ektopisch Septin-4 und borg4 gemeinsam exprimierten, wurden repräsentativ filamentförmige Strukturen nachgewiesen. Diese Strukturen scheinen aus einer Kolokalisation beider Proteine zu resultieren, wobei borg4 einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der Filamente hat: Nur in kotransfizierten Zellen konnten diese Fasern detektiert werden. Da Septine in der Regel Heterooligomere ausbilden, muss davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Zellen neben Septin-4 endogen noch weitere Septine exprimieren. Dieses Ergebnis steht mit der Tatsache in Einklang, dass borg-Proteine als Regulatoren der Septin Organisation fungieren und an Septine binden [90, 94].

4.3.2 Septin-4 und borg4: Interaktion mit dem Zytoskelett

Verschiedene Septine sind dafür bekannt, mit der Zellmembran, Aktin- und Mikrotubulofilamenten zu assoziieren. Dabei bilden sie entweder Diffusionsbarrieren oder ein molekulares Gerüst für weitere Membran- und Zytoskelettbindeproteine aus und

koordinieren somit Ereignisse an der Verbindung zwischen Zytoskelett und Zellmembran [74, 113]. In den, im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten, *in-vitro* Analysen konnte eine Kollokalisierung von Septin-4 mit α -Tubulin [74, 113] nicht bestätigt werden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die zur Interaktion notwendigen anderen Septinmonomere endogen nicht in den untersuchten Zellen exprimiert werden. Weiterhin ist anzunehmen, dass die verschiedenen Septinmonomere immer nur distinkt mit einer Zellkomponente interagieren und dadurch eine Art von Andock- bzw. Bindepunkt zwischen den verschiedenen Kompartimenten ausbilden.

Eine Assoziation von Septin-4 mit Aktinfilamenten konnte dagegen nur in den mit borg4 kotransfizierten Zellen detektiert werden. In Zellen, die ausschließlich ekto-pisch Septin-4 exprimieren, konnte das Protein nur homogen verteilt im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden. Eine Filamentbildung war hier nicht zu beobachten.

Eine Membranfraktionierung zeigte für die *in-vivo* Situation, dass Septin-4 im Cerebellum der Maus mit dem Aktinzytoskelett assoziiert ist und bestätigte damit Hinweise aus der Literatur [131]. Bei dieser Interaktion scheint also das komplexe und fein abgestimmte Zusammenspiel der endogen exprimierten Proteine von entscheidender Bedeutung zu sein.

In der Literatur konnte nachgewiesen werden, dass ein Heterooligomer aus Septin-2, -4 und -7 in den seitlichen Fortsätzen von cerebellaren Bergmann Gliazellen assembliert wird und dort strukturelle und regulatorische Funktionen ausübt [89]. Aus diesem Grund wurde Septin-2 in einige der durchgeführten Studien integriert. Septin-2 wird auf mRNA- und Proteinebene unabhängig von Schilddrüsenhormonen im Cerebellum exprimiert. Durch Membranfraktionierung konnte bewiesen werden, dass es dort, ebenso wie Septin-4, mit dem Aktinzytoskelett assoziiert ist. Eine Verbindung zur Zellmembran wird in diesem Septin-2/4/7-Trimer dann wahrscheinlich durch Septin-7 realisiert, welches durch Xie et al. [82] im Gehirn als membranassoziiertes Protein identifiziert wurde. Dies lässt den Schluss zu, dass dieses Septinoligomer tatsächlich eine funktionelle Einheit im Cerebellum darstellt und somit auf die Zellmorphologie der Bergmann Gliazellen einwirken könnte. Da für frühere Experimente, die gezeigt haben, dass Septin-2 mit der Zellmembran interagiert und keinen Komplex mit Septin-4 bildet [131], nur transfizierte transformierte Zelllinien wie COS-7 und NIH-3T3 Zellen genutzt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die *in-vivo* Situation hier nicht ausreichend wiedergegeben wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in immunzytochemischen Analysen und mittels Membranfraktionierung zum ersten Mal beobachtet, dass borg4 ein im Zytosol der Bergmann Glia lokalisiertes Protein ist, das nicht selbst mit dem Aktinzytoskelett interagiert. In primären Astrozyten war jedoch eine überlappende Lokalisierung mit α -Tubulin nachweisbar. Da es bislang keinerlei Studien zur Lokalisation und Funktion von borg4 gab, könnten diese Ergebnisse ein Indiz dafür sein, dass borg4 nicht nur ein Verbindungsglied zwischen Cdc42 und Septinen, wie Septin-4, darstellt [90], sondern auch als Verbindungsglied zwischen Mikrotubuli und dem Aktinzytoskelett fungiert, und damit die Zellmorphologie und -polarität beeinflussen und regulieren kann.

4.3.3 Einfluss von Septin-4 und borg4 auf die Zellmorphologie

In funktionellen Studien sollte der Einfluss von Septin-4 und borg4 auf die Zellmorphologie von cerebellaren Bergmann Gliazellen analysiert und bestätigt werden. Als Modellsystem sollten zuerst, mittels *Gene-Gun* transfizierte und über einen Zeitraum von einer Woche unter athyroiden Bedingungen kultivierte, gewebespezifische Schnittkulturen des Mauscerebellums genutzt werden. In Vorversuchen wurde jedoch sehr schnell ersichtlich, dass dieses Modellsystem nicht geeignet war. Die Purkinjezellen der angefertigten Schnitte zeigten nach der Kultivierung nicht den erwarteten retardierten Phänotyp, wie er aus *in-vivo* Studien bekannt war. Die Differenzierung dieser cerebellaren Neuronen erfolgte in den Kulturen unabhängig von der Zugabe von Schilddrüsenhormonen. Dadurch konnte in diesem Versuchsaufbau nicht zwischen endogener und externer Stimulation unterschieden und auf funktionelle Relevanz der Stimulanzen (Thyroidhormone, ektopisch exprimierte Proteine) geschlossen werden. Außerdem war aufgrund der Auflösung der cerebellaren Strukturen durch massive Gliose in den Schnitten keine Langzeitstudie möglich.

Alternativ sollten daher primäre cerebellare Astrozytenkulturen mit Septin-4 und/oder borg4 transfiziert und über die Analyse von Veränderungen der Zellmorphologie Rückschlüsse auf eine funktionelle Relevanz der Proteine gezogen werden. Hierbei musste festgestellt werden, dass die Überexpression von Septin-4 einen toxischen Effekt auf die Zielzellen ausübt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen, die zeigten, dass eine übermäßige intrazelluläre Anreicherung mit Septin-4 [86] oder Septin-5 [132] zu einem zytotoxischen Effekt auf die Zellen führt. Um diesen Effekt zu umgehen und eine intrazelluläre Aggregation der Septinmonomere zu verhindern, müssten wahrscheinlich die zum Trimerisieren erforderlichen zwei anderen Septine im passenden Verhältnis kotransfiziert werden [133]. Im Gegensatz zu Septin-4 konnten sowohl transformierte Zellen (COS-7) als auch primäre cerebellare Astrozyten erfolgreich mit borg4 transfiziert werden. Wenn diese Zellen borg4 ektopisch exprimieren, waren überraschenderweise robuste morphologische Veränderungen der Zellen zu beobachten. Die transfizierten Zellen bildeten bereits nach 24 h lange dünne und faserartige Fortsätze aus. Diese Veränderungen konnten nach der Bestimmung von Zellfläche und Umfang quantifiziert und hochsignifikant verifiziert werden. Das Ergebnis dokumentiert erstmalig, dass borg4 regulatorisch auf das Zytoskelett der Zellen und damit auf deren äußere Gestalt einwirkt. Dieses Resultat steht im Einklang mit den Ergebnissen von Joberty et al. [91], dass in mit borg3 transfizierte NIH-3T3 Zellen auffällige Veränderungen der Zellmorphologie zu beobachten waren. Auch diese Zellen bildeten repräsentativ dünne und filamentartige Ausläufer aus.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass über den funktionellen Einfluss von Septin-4 auf die Zellmorphologie anhand von vergleichender Literatur nur spekuliert werden kann. Ein experimenteller Nachweis war mit den gewählten Modellsystemen nicht möglich. Borg4 hingegen hat einen entscheidenden regulatorischen Einfluss auf die Umstrukturierung des Zellzytoskeletts. Über die nachgewiesene enge Interaktion mit Septin-4 kann daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine, durch Thyroidhormone gesteuerte, das Zytoskelett der Bergmann Glia und damit die Ausbildung

der seitlichen kurzen Fortsätze beeinflussende Signalkaskade spekuliert werden, die borg4 als regulatorische und Septin-4 als funktionelle Komponente enthält.

4.4 Zusammenfassung und Perspektiven

Wie im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden konnte, spielen Thyroidhormone nicht nur für die Entwicklung und Differenzierung der Purkinjezellen im Cerebellum eine essentielle Rolle. Auch die Ausbildung der kurzen seitlichen Fortsätze der Bergmann Glia wird durch die Präsenz von Schilddrüsenhormonen entscheidend beeinflusst. Diese Fortsätze haben bedeutende Funktionen für die Synaptogenese, die Stabilisierung und Plastizität der Synapsen und für den Neurotransmitterumsatz im synaptischen Spalt. Aus diesem Grund wurden Thyroidhormon-abhängig regulierte, Bergmann Glia-spezifische Gene und Genprodukte untersucht, die auf diese Prozesse funktionell und regulatorisch einwirken könnten. Dabei konnten zwei putative Kandidatengene, deren Expression positiv durch Schilddrüsenhormone reguliert wird und die in cerebellaren Bergmann Gliazellen exprimiert werden, identifiziert werden: Septin-4, ein Zytoskelettprotein, und borg4, ein regulatorisch auf die Umstrukturierung des Zytoskeletts einwirkendes Protein. Deshalb wird angenommen, dass diese Proteine in eine Signalkaskade involviert sind, die abhängig von Thyroidhormonen die Ausdifferenzierung der seitlichen Fortsätze der Bergmann Glia kontrolliert. Aufgrund der engen physiologischen Wechselwirkung zwischen den Bergmann Gliazellen und Neuronen, wie Purkinje- und Körnerzellen, könnte eine gestörte Entwicklung dieser funktionell bedeutendsten Gliazelle im Kleinhirn auch in der unter athyroiden Bedingungen beobachteten retardierten Purkinjezellentwicklung resultieren.

Bis heute konnten nur wenige Thyroidhormon-regulierte Gene, die für die Entwicklung des Cerebellums verantwortlich sind, identifiziert werden. Das ist zum einen darauf zurückzuführen, dass Thyroidhormon-Rezeptor-vermittelte Transkription durch verschiedenste Faktoren, wie Rezeptordimerisierung, gewebespezifische Transkriptionsfaktoren, Koaktivatoren und -repressoren, beeinflusst wird. Zum anderen ist bekannt, dass Schilddrüsenhormon-Rezeptoren im ligandenfreien Zustand als Aporezeptoren wirken und es dadurch zu einer enormen morphologischen Diskrepanz zwischen TR-defizienten und hormondefizienten ($Pax8^{-/-}$) Mäusen kommt. Die Wirkung der Aporezeptoren, besonders die des ligandenfreien $TR\alpha1$, scheint hauptsächlich für die unter hypothyroiden Bedingungen beobachteten schädlichen Effekte auf die postnatale Entwicklung des Cerebellums verantwortlich zu sein [19, 99]. Außerdem können Thyroidhormone auch auf nichtgenomischer Ebene wirken: Sie regulieren die Polymerisation von Aktinfilamenten oder phosphorylieren TRs über den MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinase-Signalweg. Diese Regulationsmechanismen scheinen besonders bei der Expression und Verteilung von Gliaproteinen wie GFAP und Laminin eine Rolle zu spielen und auf das Aktinzytoskelett in Astrozyten einzuwirken [64, 70]. Deshalb könnten neben der, an der positiven Regulation der Transkriptmengen von Septin-4 und borg4, beobachteten Beteiligung von $TR\alpha1$, auch nichtgenomische Prozesse eine entscheidende Funktion bei der Differenzierung der Bergmann Glia-Fortsätze ausüben. So konnte z.B. demonstriert werden, dass Proteinkinase A (PKA) durch Thyroidhormone aktiviert wird [134]. Da sowohl Septine als

auch borg4 phosphoryliert werden können, müsste in fortführenden Studien geprüft werden, ob diese Proteine auch auf nichtgenomischem Weg durch Thyroidhormone reguliert werden können.

Weiterhin bleibt offen, welche anderen Proteine als vor- und nachgeschaltete Effektoren in der Lage sind, mit Septin-4 und/oder borg4 zu interagieren. Interessant hierbei ist die Rolle von Cdc42 in der postulierten Signalkaskade, da ein Effektorprotein dieser Rho GTPase, die schon in früheren Studien mit dem Auswachsen der seitlichen Bergmann Glia-Fortsätze in Verbindung gebracht wurde [135], borg4 ist. Borg4 bindet über eine stark konservierte CRIB-Domäne an Cdc42 [91]. Da diese CRIB-Domäne als Markenzeichen der Effektorproteine von Rho GTPasen gilt [136], sollte daher fortführend ebenfalls eine mögliche Interaktion von borg4 mit anderen Rho GTPase untersucht werden.

Eine dritte entscheidende Komponente im Prozess der Thyroidhormon-regulierten Differenzierung der Bergmann Glia und Purkinjezellen im Cerebellum scheint der Glutamattransporter GLAST zu sein. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach kurzfristiger Stimulation von primären Astrozytenkulturen mit Thyroidhormon die GLAST-Proteinmenge in den Zellen ansteigt. In athyroiden Cerebella hingegen konnte weder auf mRNA noch auf Proteinebene eine unterschiedliche Expression, verglichen mit dem euthyroiden Zustand, nachgewiesen werden. Deshalb bleibt die Frage offen, ob dieser, besonders für die Funktionalität der cerebellaren Neuronen so essentielle, Glutamattransporter der Astrozyten durch die Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die Bergmann Gliazellen eventuell posttranskriptional modifiziert oder transloziert wird. Ein ähnlicher Mechanismus wurde im Zusammenwirken mit Septinen von Kinoshita et al. [89] *in-vitro* nachgewiesen.

In den letzten Jahren konnte vermehrt gezeigt werden, dass Gliazellen im Gehirn ihrer ehemals postulierten Außenseiterrolle (R. Virchow: griechisches Wort "glia" = Leim) nicht mehr gerecht werden. Oft können neuropathologische Zustände auf die gestörte Funktionalität der Gliazellen zurückgeführt werden. Ob die, unter athyroiden Entwicklungsbedingungen des Cerebellums, beobachtete starke Retardierung der Purkinjezellen und die damit verbundenen neurologischen Ausfälle, auf die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig dokumentierte beeinträchtigte Ausdifferenzierung der seitlichen Bergmann Glia-Fortsätze zurückzuführen ist, konnte nicht endgültig bewiesen werden. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass die Bergmann Glia an diesem Prozess nicht nur beteiligt ist, sondern dabei eine Hauptrolle spielt.

- [1] G. Löffler. **Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie**. Springer-Verlag Berlin, (2003).
- [2] www.elkgrovebiocranial.com/images/HYPOTHALAMUS.jpg.
- [3] P.M. Yen. **Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action**. *Physiological Reviews*, 81(3): 1097–1141, (2001).
- [4] A.C. Bianco and B.W. Kim. **Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action**. *Journal of Clinical Investigation*, 116(10): 2571–2579, (2006).
- [5] A.C. Bianco; D. Salvatore; B. Gereben; M.J. Berry and P.R. Larsen. **Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases**. *Endocrine Reviews*, 23(1): 38–89, (2002).
- [6] J. Bernal. **Thyroid Hormones and Brain Development**. *Vitamins & Hormones*, 71: 95–122, (2005).
- [7] C.C. Thompson and G.B. Potter. **Thyroid Hormone Action in Neural Development**. *Cerebral Cortex*, 10: 939–945, (2000).
- [8] P.E. Macchia. **Recent advances in understanding the molecular basis of primary congenital hypothyroidism**. *Molecular Medicine Today*, 6(1): 36–42, (2000).
- [9] S.M. Park and V.K.K. Chatterjee. **Genetics of congenital hypothyroidism**. *Journal of Medical Genetics*, 42, (2005).
- [10] P. Kopp. **Perspective: Genetic Defects in the Etiology of Congenital Hypothyroidism**. *Endocrinology*, 143(6): 2019–2024, (2002).
- [11] D.A. Price; R.M. Ehrlich and P.G. Walfish. **Congenital hypothyroidism. Clinical and laboratory characteristics in infants detected by neonatal screening**. *Archives of Disease in Childhood*, 56, (1981).
- [12] N.D. Barnes. **Screening for congenital hypothyroidism: the first decade**. *Archives of Disease in Childhood*, 60, (1985).
- [13] D. Plachov; K. Chowdhury; C. Walther; D. Simon; J.-L. Guenet and P. Gruss. **Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland**. *Development*, 110: 643–651, (1990).
- [14] A. Mansouri; K. Chowdhury and P. Gruss. **Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function**. *Nature Genetics*, 19: 87–90, (1998).

- [15] P.E. Macchia; P. Lapi; H. Krude; M.T. Pirro; C. Missero; L. Chiovato; A. Souabni; M. Baserga; V. Tassi; A. Pinchera; G. Fenzi; A. Grüters; M. Busslinger and R. Di Lauro. **PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis.** *Nature Genetics*, 19: 83–86, (1998).
- [16] D.A. Underhill. **Genetic and biochemical diversity in the Pax gene family.** *Biochemistry and Cell Biology*, 78(5): 629–638, (2000).
- [17] E.J.D. Robson; S.-J. He and M.R. Eccles. **A PANorama of PAX genes in cancer and development.** *Nature Reviews*, 6: 52–62, (2006).
- [18] N. Chi and J.A. Epstein. **Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease.** *TRENDS in Genetics*, 18(1): 41–47, (2002).
- [19] F. Flamant; A.-L. Pogue; M. Plateroti; O. Chassande; K. Gauthier; N. Streichenberger; A. Mansouri and J. Samarut. **Congenital Hypothyroid Pax8^{-/-} Mutant Mice Can Be Rescued by Inactivating the TR α Gene.** *Molecular Endocrinology*, 16(1): 24–32, (2002).
- [20] J. Wistuba; J. Mittag; C.M. Luetjens; T.G. Cooper; C.-H. Yeung; E. Nieschlag and K. Bauer. **Male congenital hypothyroid Pax8^{-/-} mice are infertile despite adequate treatment with thyroid hormone.** *Journal of Endocrinology*, 192: 99–109, (2007).
- [21] J. Mittag; E. Winterhager; K. Bauer and R. Grümmer. **Congenital Hypothyroid Female Pax8-Deficient Mice Are Infertile Despite Thyroid Hormone Replacement Therapy.** *Endocrinology*, 148(2): 719–725, (2007).
- [22] J. Bernal. **Thyroid hormone receptors in brain development and function.** *Nature: Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 3(3): 249–259, (2007).
- [23] Kembra L. Howdeshell. **A Model of the Development of the Brain as a Construct of the Thyroid System.** *Environmental Health Perspectives*, 110(3): 337–348, (2002).
- [24] G.W. Anderson. **Thyroid Hormones and the Brain.** *Frontiers in Neuroendocrinology*, 22: 1–17, (2001).
- [25] G.W. Anderson; C.M. Schoonover and S.A. Jones. **Control of thyroid hormone action in the developing rat brain.** *Thyroid*, 13(11): 1039–1056, (2003).
- [26] M.K.H. Schäfer; A. Mansouri; K. Bauer S. Friedrichsen; S. Christ; H. Heuer and T.J. Visser. **Regulation of Iodothyronine Deiodinases in the Pax8^{-/-} Mouse Model of Congenital Hypothyroidism.** *Endocrinology*, 144(3): 777–784, (2003).

- [27] P. Santisteban and J. Bernal. **Thyroid Development and Effect on the Nervous System.** *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 6: 217–228, (2005).
- [28] S.P. Porterfield and C.E. Hendrich. **The role of thyroid hormones in pre-natal and neonatal neurological development-current perspectives.** *Endocrine Reviews*, 14(1): 94–106, (1993).
- [29] M. Trepel. **Neuroanatomie. Struktur und Funktion.** Urban & Fischer Verlag, (1995).
- [30] K. Herrup and B. Kuemerle. **The Compartmentalization of the Cerebellum.** *Annual Review of Neuroscience*, 20: 61–90, (1997).
- [31] D. Purves; G.J. Augustine; D. Fitzpatrick; W.C. Hall; A.-S. LaMantia; J.O. McNamara and S.M. Williams. **Neuroscience.** Sinauer Associates Inc., USA, 3 edition, (2004).
- [32] C. Sotelo. **Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system.** *Progress in Neurobiology*, 72(5): 295–339, (2004).
- [33] R.R. Llinas. **The Cortex of the Cerebellum.** *Scientific American*, 232(1): 56–71, (1975).
- [34] J. Grosche; H. Kettenmann and A. Reichenbach. **Bergmann Glial Cells Form Distinct Morphological Structures To Interact With Cerebellar Neurons.** *Journal of Neuroscience Research*, 68: 138–149, (2002).
- [35] K. Yamada and M. Watanabe. **Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells.** *Anatomical Science International*, 77: 94–108, (2002).
- [36] A. Reichenbach; A. Siegel; M. Rickmann; J.R. Wolff; D. Noone and S.R. Robinson. **Distribution of Bergmann glial somata and processes: implications for function.** *Journal für Hirnforschung*, 36(4): 509–517, (1995).
- [37] C.L. Delaney; M. Brenner and A. Messing. **Conditional Ablation of Cerebellar Astrocytes in Postnatal Transgenic Mice.** *Journal of Neuroscience*, 16(21): 6908–6918, (1996).
- [38] W. Cui; N.D. Allen; M. Skynner; B. Gusterson and A.J. Clark. **Inducible Ablation of Astrocytes Shows That These Cells Are Required for Neuronal Survival in the Adult Brain.** *Glia*, 34, (2001).
- [39] S.K. Custer; G.A. Garden; N. Gill; U. Rueb; R.T. Libby; C. Schultz; S.J. Guyenet; T. Deller; L.E. Westrum; B.L. Sopher and A.R. La Spada. **Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport.** *Nature Neuroscience*, 9(10): 1302–1311, (2006).

- [40] P. Rakic. **Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus.** *Journal of Comparative Neurology*, 141(3): 283–312, (1971).
- [41] T.C. Bellamy. **Interactions between Purkinje neurones and Bergmann glia.** *The Cerebellum*, 5: 116–126, (2006).
- [42] T. Lordkipanidze and A. Dunaevsky. **Purkinje Cell Dendrites Grow in Alignment With Bergmann Glia.** *Glia*, 51: 229–234, (2005).
- [43] K. Yamada; M. Fukaya; T. Shibata; H. Kurihara; K. Tanaka; Y. Inoue and M. Watanabe. **Dynamic transformation of Bergmann glial fibers proceeds in correlation with dendritic outgrowth and synapse formation of cerebellar Purkinje cells.** *Journal of Comparative Neurology*, 418(1): 106–120, (2000).
- [44] A. Araque; G. Carmignoto and P.G. Haydon. **Dynamic Signaling Between Astrocytes and Neurons.** *Annual Review of Physiology*, 63: 795–813, (2001).
- [45] M. Eiraku; A. Tohgo; K. Ono; M. Kaneko; K. Fujishima; T. Hirano and M. Kengaku. **DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development.** *Nature Neuroscience*, 8: 873–880, (2005).
- [46] C.-M. Chuong; K.L. Crossin and G.M. Edelman. **Sequential Expression and Differential Function of Multiple Adhesion Molecules during the Formation of Cerebellar Cortical Layers.** *Journal of Cell Biology*, 104: 331–342, (1987).
- [47] A.J. Mothe and I.R. Brown. **Effect of hyperthermia on the transport of mRNA encoding the extracellular matrix glycoprotein SC1 into Bergmann glial cell processes.** *Brain Research*, 931: 146–158, (2002).
- [48] D.B. Mendis; S. Shahin; J.W. Gurd and I.R. Brown. **Developmental expression in the rat cerebellum of SC1, a putative brain extracellular matrix glycoprotein related to SPARC.** *Brain Research*, 633: 197–205, (1994).
- [49] D.B. Mendis; G.O. Ivy and I.R. Brown. **SC1, a brain extracellular matrix glycoprotein related to SPARC and follistatin, is expressed by rat cerebellar astrocytes following injury and during development.** *Brain Research*, 730: 95–106, (1996).
- [50] S. Lively; M.J. Ringuette and I.R. Brown. **Localization of the Extracellular Matrix Protein SC1 to Synapses in the Adult Rat Brain.** *Neurochemical Research*, 32: 65–71, (2007).

- [51] S. Lively and I.R. Brown. **Localization of the Extracellular Matrix Protein SC1 Coincides with Synaptogenesis During Rat Postnatal Development.** *Neurochemical Research*, 33(9): 1692–1700, (2008).
- [52] J. Bernal. **Thyroid hormone and the brain: target cells, role of receptors, and timing of action.** *Hot Thyroidology*, 2: 1–5, (2003).
- [53] N. Koibuchi and W.W. Chin. **Thyroid Hormone Action and Brain Development.** *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11(4): 123–128, (2000).
- [54] H. Heuer; M.K. Maier; S. Iden; J. Mittag; E.C.H. Friesema; T.J. Visser and K. Bauer. **The Monocarboxylate Transporter 8 Linked to Human Psychomotor Retardation Is Highly Expressed in Thyroid Hormone-Sensitive Neuron Populations.** *Endocrinology*, 146(4): 1701–1706, (2005).
- [55] N. Koibuchi and T. Iwasaki. **Regulation of Brain Development by Thyroid Hormone and its Modulation by Environmental Chemicals.** *Endocrine Journal*, 53(3): 295–303, (2006).
- [56] F. Flamant and J. Samarut. **Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice.** *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 14(2): 85–90, (2003).
- [57] P.J. OShea and G.R. Williams. **Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice.** *Journal of Endocrinology*, 175: 553–570, (2002).
- [58] S. Göthe; Z. Wang; L. Ng; J.M. Kindblom; A.C. Barros; C. Ohlsson; B. Vennström and D. Forrest. **Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation.** *Genes & Development*, 13: 1329–1341, (1999).
- [59] D. Forrest and B. Vennström. **Functions of thyroid hormone receptors in mice.** *Thyroid*, 10(1): 41–52, (2000).
- [60] B. Morte; J. Manzano; T.S. Scanlan; B. Vennström and J. Bernal. **Aberrant Maturation of Astrocytes in Thyroid Hormone Receptor α 1 Knockout Mice Reveals an Interplay between Thyroid Hormone Receptor Isoforms.** *Endocrinology*, 145(3): 1386–1391, (2007).
- [61] K.A. Strait; H.L. Schwartz; V.S. Seybold; N.C. Ling and J.H. Oppenheimer. **Immunofluorescence localization of thyroid hormone receptor protein β 1 and variant α 2 in selected tissues: Cerebellar Purkinje cells as a model for β 1 receptor-mediated developmental effects of thyroid hormone in brain.** *Neurobiology*, 88: 3887–3891, (1991).
- [62] H. Heuer and C.A. Mason. **Thyroid Hormone Induces Cerebellar Purkinje Cell Dendritic Development via the Thyroid Hormone Receptor α 1.** *Journal of Neuroscience*, 23(33): 10604–10612, (2003).

- [63] Y. Hiroi; H.-H. Kim; H. Ying; F. Furuya; Z. Huang; T. Simoncini; K. Noma; K. Ueki; N.-H. Nguyen; T.S. Scanlan; M.A. Moskowitz; S.-Y. Cheng and J.K. Liao. **Rapid nongenomic actions of thyroid hormone.** *PNAS*, 103(38): 14104–14109, (2006).
- [64] J.L. Leonard. **Non-genomic actions of thyroid hormone in brain development.** *Steroids*, 73: 1008–1012, (2008).
- [65] L. Wikström; C. Johansson; C. Salt; C. Barlow; A.C. Barros; F. Baas; D. Forrest; P. Thorn and B. Vennström. **Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor $\alpha 1$.** *EMBO Journal*, 17(2): 455–461, (1998).
- [66] A. Fraichard; O. Chassande; M. Plateroti; J.P. Roux; J. Trouillas; C. Dehay; C. Legrand; K. Gauthier; M. Kedinger; L. Malaval; B. Rousset and J. Samarut. **The T3R α gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production.** *EMBO Journal*, 16(14): 4412–4420, (1997).
- [67] D. Forrest; E. Hanebuth; R.J. Smeyne; N. Everds; C.L. Stewart; J.M. Wehner and T. Curran. **Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor β : evidence for tissue-specific modulation of receptor function.** *EMBO Journal*, 15(12): 3006–3015, (1996).
- [68] D. Forrest. **Editorial: Deafness and Goiter: Molecular Genetic Considerations.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(8): 2764–2767, (1996).
- [69] C. Venero; A. Guadano-Ferraz; A.I. Herrero; K. Nordström; J. Manzano; G. Moreale de Escobar; J. Bernal and B. Vennström. **Anxiety, memory impairment, and locomotor dysfunction caused by a mutant thyroid hormone receptor $\alpha 1$ can be ameliorated by T3 treatment.** *Genes & Development*, 19: 2152–2163, (2005).
- [70] N. Koibuchi; H. Jingu; T. Iwasaki and W.W. Chin. **Current perspectives on the role of thyroid hormone in growth and development of cerebellum.** *The Cerebellum*, 2: 279–289, (2003).
- [71] J. Manzano; J. Bernal and B. Morte. **Influence of thyroid hormones on maturation of rat cerebellar astrocytes.** *International Journal of Developmental Neuroscience*, 25(3): 171–179, (2007).
- [72] B. Byers and L. Goetsch. **A Highly Ordered Ring of Membrane-Associated Filaments in Budding Yeast.** *Journal of Cell Biology*, 69: 717–721, (1976).
- [73] M.S. Longtine; D.J. DeMarini; M.L. Valencik; O.S. Al-Awar; H. Fares; C. De Virgilio and J.R. Pringle. **The septins: roles in cytokinesis and other processes.** *Current Opinion in Cell Biology*, 8(1): 106–119, (1996).

- [74] E.T. Spiliotis and W.J. Nelson. **Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization.** *Journal of Cell Science*, 119(1): 4–10, (2005).
- [75] C. Martinez and J. Ware. **Mammalian Septin Function in Hemostasis and Beyond.** *Experimental Biology and Medicine*, 229: 1111–1119, (2004).
- [76] C.S. Weirich; J.P. Erzberger and Y. Barral. **The septin family of GTPases: architecture and dynamics.** *Nature*, 9: 478–490, (2008).
- [77] M. Kinoshita. **Assembly of mammalian septins.** *Journal of Biochemistry*, 134(4): 491–496, (2003).
- [78] B. Kartmann and D. Roth. **Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis.** *Journal of Cell Science*, 114: 839–844, (2001).
- [79] M. Kinoshita. **The septins.** *Genome Biology*, 4(11): 236.1–236.9, (2003).
- [80] A. Kinoshita; M. Noda and M. Kinoshita. **Differential Localization of septins in the Mouse Brain.** *Journal of Comparative Neurology*, 428(2): 223–239, (2000).
- [81] J. Xue; P.J. Milburn; B.T. Hanna; M.E. Graham; J.A.P. Rostas and P.J. Robinson. **Phosphorylation of septin 3 on Ser-91 by cGMP-dependent protein kinase-I in nerve terminals.** *Biochemical Journal*, 381: 753–760, (2004).
- [82] Y. Xie; J.P. Vessey; A. Konecna; R. Dahm; P. Macchi and M. Kiebler. **The GTP-Binding Protein Septin 7 Is Critical for Dendritic-Spine Morphology.** *Current Biology*, 17: 1746–1751, (2007).
- [83] T. Tada; A. Simonetta; M. Batteredon; M. Kinoshita; D. Edbauer and M. Sheng. **Role of Septin Cytoskeleton in Spine Morphogenesis and Dendrite Development in Neurons.** *Current Biology*, 17: 1752–1758, (2007).
- [84] P.A. Hall and S.E. Hilary Russell. **The pathobiology of the septin gene family.** *Journal of Pathology*, 204(4): 489–505, (2004).
- [85] M. Ihara; H. Tomimoto; H. Kitayama; Y. Morioka; I. Akiguchi; H. Shibasaki; M. Noda and M. Kinoshita. **Association of the Cytoskeletal GTP-binding Protein Sept4/H5 with Cytoplasmic Inclusions Found in Parkinsons Disease and Other Synucleinopathies.** *Journal of Biological Chemistry*, 278(26): 24095–24102, (2003).
- [86] M. Ihara; N. Yamasaki; A. Hagiwara; A. Tanigaki; A. Kitano; R. Hikawa; H. Tomimoto; M. Noda; M. Takanashi; H. Mori; N. Hattori; T. Miyakawa and M. Kinoshita. **Sept4, a Component of Presynaptic Scaffold and Lewy Bodies, Is Required for the Suppression of α -Synuclein Neurotoxicity.** *Neuron*, 53: 519–533, (2007).

- [87] N.C. Danbolt. **Glutamate uptake.** *Progress in Neurobiology*, 65: 1–105, (2001).
- [88] J.D. Rothstein; M. Dykes-Hoberg; C.A. Pardo; L.A. Bristol; L. Jin; R.W. Kuncl; Y. Kanai; M.A. Hediger; Y. Wang; J.P. Schielke and D.F. Welty. **Knock-out of Glutamate Transporters Reveals a Major Role for Astroglial Transport in Excitotoxicity and Clearance of Glutamate.** *Neuron*, 16: 675–686, (1996).
- [89] N. Kinoshita; K. Kimura; N. Matsumoto; M. Watanabe; M. Fukaya and C. Ide. **Mammalian septin Sept2 modulates the activity of GLAST, a glutamate transporter in astrocytes.** *Genes to Cells*, 9: 114, (2004).
- [90] G. Joberty; R.R. Perlungher; P.J. Sheffield; M. Kinoshita; M. Noda; T. Haystead and I.G. Macara. **Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42.** *Nature Cell Biology*, 3: 861–866, (2001).
- [91] G. Joberty; R.R. Perlungher and I.G. Macara. **The Borgs, a New Family of Cdc42 and TC10 GTPase-Interacting Proteins.** *Molecular and Cellular Biology*, 19(10): 6585–6597, (1999).
- [92] P.D. Burbelo; D.M. Snow; W. Bahou and S. Spiegel. **MSE55, a Cdc42 effector protein, induces long cellular extensions in fibroblasts.** *Cell Biology*, 96: 9083–9088, (1999).
- [93] D. Snow Hirsch; D.M. Pirone and P.D. Burbelo. **A New Family of Cdc42 Effector Proteins, CEPs, Function in Fibroblast and Epithelial Cell Shape Changes.** *Journal of Biological Chemistry*, 276(2): 875–883, (2001).
- [94] P.J. Sheffield; C.J. Oliver; B.E. Kremer; S. Sheng; Z. Shao and I.G. Macara. **Borg/Septin Interactions and the Assembly of Mammalian Septin Heterodimers, Trimers, and Filaments.** *Journal of Biological Chemistry*, 278(5): 3483–3488, (2003).
- [95] L. Zhuo; B. Sun; C.L. Zhang; A. Fine; S.Y. Chiu and A. Messing. **Live Astrocytes Visualized by Green Fluorescent Protein in Transgenic Mice.** *Developmental Biology*, 187: 36–42, (1997).
- [96] Y. Zuo; J.L. Lubischer; H. Kang; L. Tian; M. Mikesch; A. Marks; V.L. Scofield; S. Maika; C. Newman; P. Krieg and W.J. Thompson. **Fluorescent Proteins Expressed in Mouse Transgenic Lines Mark Subsets of Glia, Neurons, Macrophages, and Dendritic Cells for Vital Examination.** *Journal of Neuroscience*, 24(49): 10999–11009, (2004).
- [97] H. Heuer; M.K.H. Schäfer; D. O’Donnell; P. Walker and K. Bauer. **Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats.** *Journal of Comparative Neurology*, 428(2): 319–336, (2000).

- [98] D.A. Melton; P.A. Krieg; M.R. Rebagliati; T. Maniatis; K. Zinn and M.R. Green. **Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter.** *Nucleic Acids Research*, 12(18): 7035–7056, (1984).
- [99] B. Morte; J. Manzano; T. Scanlan; B. Vennström and J. Bernal. **Deletion of the thyroid hormone receptor $\alpha 1$ prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism.** *PNAS*, 99(6): 3985–3989, (2002).
- [100] J. Vincent; C. Legrand; A. Rabie and J. Legrand. **Effects of thyroid hormone on synaptogenesis in the molecular layer of the developing rat cerebellum.** *Journal of Physiology (Paris)*, 78(8): 729–738, (1982-1983).
- [101] D.J. Bradley; W.S. Young and C. Weinberger. **Differential Expression of α and β Thyroid Hormone Receptor Genes in Rat Brain and Pituitary.** *PNAS-Neurobiology*, 86: 7250–7254, (1989).
- [102] H. Nishida and S. Okabe. **Direct Astrocytic Contacts Regulate Local Maturation of Dendritic Spines.** *Journal of Neuroscience*, 27(2): 331–340, (2007).
- [103] F.W. Pfrieger. **Role of glia in synapse development.** *Current Opinion in Neurobiology*, 12: 486–490, (2002).
- [104] A.G. Trentin. **Thyroid hormone and astrocyte morphogenesis.** *Journal of Endocrinology*, 189: 189–197, (2006).
- [105] M. Hoser; S.L. Baader; M.R. Bösl; A. Ihmer; M. Wegner and E. Sock. **Prolonged Glial Expression of Sox4 in the CNS Leads to Architectural Cerebellar Defects and Ataxia.** *Journal of Neuroscience*, 27(20): 5495–5505, (2007).
- [106] F. Ango; C. Wu; J.J. Van der Want; P. Wu; M. Schachner and Z.J. Huang. **Bergmann Glia and the Recognition Molecule CHL1 Organize GABAergic Axons and Direct Innervation of Purkinje Cell Dendrites.** *PLOS Biology*, 6(4): 739–756, (2008).
- [107] M. del Cerro and J.R. Swarz. **Prenatal development of Bergmann glial fibres in rodent cerebellum.** *Journal of Neurocytology*, 5: 669–676, (1976).
- [108] J. Grosche; V. Matyash; T. Möller; A. Verkhratsky; A. Reichenbach and H. Kettenmann. **Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells.** *Nature Neuroscience*, 2(2): 139–143, (1999).
- [109] S.S. Trueba; J. Aug; G. Mattei; H. Etchevers; J. Martinovic; P. Czernichow; M. Vekemans; M. Polak and T. Atti-Bitach. **PAX8, TITF1, and FOXE1**

- Gene Expression Patterns during Human Development: New Insights into Human Thyroid Development and Thyroid Dysgenesis-Associated Malformations.** *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(1): 455–462, (2005).
- [110] A. Stoykova and P. Gruss. **Roles of Pax-Genes in Developing and Adult Brain as Suggested by Expression Patterns.** *Journal of Neuroscience*, 14(3): 1395–1412, (1994).
- [111] G.H. Li; J. Post; N. Koibuchi and E.M. Sajdel-Sulkowska. **Impact of thyroid hormone deficiency on the developing CNS: cerebellar glial and neuronal protein expression in rat neonates exposed to antithyroid drug propylthiouracil.** *The Cerebellum*, 2: 100–106, (2004).
- [112] M. Giménez y Ribotta; F. Langa; V. Menet and A. Privat. **Comparative Anatomy of the Cerebellar Cortex in Mice Lacking Vimentin, GFAP, and Both Vimentin and GFAP.** *Glia*, 31: 69–83, (2000).
- [113] M. Kinoshita and M. Noda. **Roles of Septins in the Mammalian Cytokinesis Machinery.** *Cell Structure and Function*, 26: 667–670, (2001).
- [114] Y. Barral and I.M. Mansuy. **Septins: Cellular and Functional Barriers of Neuronal Activity.** *Current Biology*, 17(22): R961–3, (2007).
- [115] M. Kinoshita; M. Ihara; A. Hagiwara; M. James; S. Itohara and M. Noda. **The septin cytoskeleton in Bergmann glia is essential for cerebellar architecture and motor learning.** *Seikagaru*, 77(8): 985, (2005).
- [116] E.-E. Govek S.E. Newey; V. Velamoor and L. Van Aelst. **Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation.** *Journal of Neurobiology*, 64(1): 58–74, (2005).
- [117] L. Luo. **Rho GTPases in Neuronal Morphogenesis.** *Nature Reviews*, 1: 173–180, (2000).
- [118] G.J.A. Ramakers. **Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition.** *TRENDS in Neurosciences*, 25(4): 191–199, (2002).
- [119] M. Negishi and H. Katoh. **Rho Family GTPases and Dendrite Plasticity.** *The Neuroscientist*, 11(3): 187–191, (2005).
- [120] D.M. Pirone; D.E. Carter and P.D. Burbelo. **Evolutionary expansion of CRIB-containing Cdc42 effector proteins.** *Trends in Genetics*, 17(7): 370–373, (2001).
- [121] Q. Yue; M. Groszer; J.S. Gil; A.J. Berk; A. Messing; H. Wu and X. Liu. **PTEN deletion in Bergmann glia leads to premature differentiation and affects laminar organization.** *Development*, 132: 3281–3291, (2005).

- [122] M.R. Regan; Y.H. Huang; Y. Shin Kim; M.I. Dykes-Hoberg; L. Jin; A.M. Watkins; D.E. Bergles and J.D. Rothstein. **Variations in Promoter Activity Reveal a Differential Expression and Physiology of Glutamate Transporters by Glia in the Developing and Mature CNS.** *Journal of Neuroscience*, 27(25): 6607–6619, (2007).
- [123] K.P. Lehre; L.M. Levy; O.P. Ottersen; J. Storm-Mathisen and N.C. Danbolt. **Differential Expression of Two Glial Glutamate Transporters in the Rat Brain: Quantitative and Immunocytochemical Observations.** *Journal of Neuroscience*, 15(3): 1835–1853, (1995).
- [124] Y. Takayasu; M. Iino; W. Kakegawa; H. Maeno; K. Watase; K. Wada; D. Yanagihara; T. Miyazaki; O. Komine; M. Watanabe; K. Tanaka and S. Ozawa. **Differential Roles of Glial and Neuronal Glutamate Transporters in Purkinje Cell Synapses.** *Journal of Neuroscience*, 25(38): 8788–8793, (2005).
- [125] K. Ullensvang; K.P. Lehre; J. Storm-Mathisen and N.C. Danbolt. **Differential Developmental Expression of the Two Rat Brain Glutamate Transporter Proteins GLAST and GLT.** *European Journal of Neuroscience*, 9: 1646–1655, (1997).
- [126] G. Gegelashvili; Y. Dehnes; N.C. Danbolt and A.Schousboe. **The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms.** *Neurochemistry International*, 37: 163–170, (2000).
- [127] K. Watase; K. Hashimoto; M. Kano; K. Yamada; M. Watanabe; Y. Inoue; S. Okuyama; T. Sakagawa; S. Ogawa; N. Kawashima; S. Hori; M. Takimoto; K. Wada and K. Tanaka. **Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice.** *European Journal of Neuroscience*, 10: 976–988, (1998).
- [128] T.R. Matsugami; K. Tanemura; M. Mieda; R. Nakatomi; K. Yamada; T. Kondo; M. Ogawa; K. Obata; M. Watanabe; T. Hashikawa and K. Tanaka. **Indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT1 to brain development.** *PNAS*, 103(32): 12161–12166, (2006).
- [129] E. López-Bayghen and A. Ortega. **Glutamate-dependent transcriptional regulation of GLAST: role of PKC.** *Journal of Neurochemistry*, 91: 200–209, (2004).
- [130] M. Tanaka; N. Maeda; M. Noda and T. Marunouchi. **A Chondroitin Sulfate Proteoglycan PTP ζ RPTP β Regulates the Morphogenesis of Purkinje Cell Dendrites in the Developing Cerebellum.** *Journal of Neuroscience*, 23(7): 2804–2814, (2003).

- [131] H. Xie; M. Surka; J. Howard and W.S. Trimble. **Characterization of the Mammalian Septin H5: Distinct Patterns of Cytoskeletal and Membrane Association From Other Septin Proteins.** *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 43: 52–62, (1999).
- [132] Z. Dong; B. Ferger; J.-C. Paterna; D. Vogel; S. Furler; M. Osinde; J. Feldon and H. Büeler. **Dopamine-dependent neurodegeneration in rats induced by viral vector-mediated overexpression of the parkin target protein, CDCrel-1.** *PNAS*, 100(21): 12438–12443, (2003).
- [133] M. Sirajuddin; M. Farkasovsky; F. Hauer; D. Kühlmann; I.G. Macara; M. Weyand; H. Stark and A. Wittinghofer. **Structural insights into filament formation by mammalian septins.** *Nature*, 449: 311–317, (2007).
- [134] M. Ghosh; K. Gharami; S. Paul and S. Das. **Thyroid hormone-induced morphological differentiation and maturation of astrocytes involves activation of protein kinase A and ERK signalling pathway.** *European Journal of Neuroscience*, 22(7): 1609–1617, (2005).
- [135] R. Belvindrah; P. Nalbant; S. Ding; C. Wu; G.M. Bokoch and U. Müller. **Integrin-linked kinase regulates Bergmann glial differentiation during cerebellar development.** *Molecular and Cellular Neuroscience*, 33: 109–125, (2006).
- [136] G.R. Hoffmann and R.A. Cerione. **Flipping the Switch: The Structural Basis for Signaling through the CRIB Motif.** *Cell*, 102: 403–406, (2000).

Danksagung

*“Glück ist nicht die Abwesenheit von Schwierigkeiten, sondern ihre Bewältigung.
Die Abwesenheit von Schwierigkeiten nennt man Langeweile.“*

(Peter Hohl (*1941); Quelle: “Lieber ein Optimist, der sich mal irrt...“)

Auf dieser Seite möchte ich besonders den Personen herzlich danken, die mir bei der Bewältigung dieser Doktorarbeit immer hilfreich und unterstützend zur Seite standen:

Zuerst möchte ich Dr. Heike Heuer für die Bereitstellung des thematisch sehr faszinierenden und experimentell oft herausfordernden Themas dieser Dissertation danken. Sie hat mir über den gesamten Zeitraum hinweg mit viel fachlicher Unterstützung, wertvoller Diskussion und Kritik, viel Motivation sowie Verständnis zur Seite gestanden.

Den Mitgliedern meines Thesis Committees - Dr. habil. Christoph Kaether, Prof. Dr. Stephan Baader, Prof. Dr. Karl Bauer und Dr. Heike Heuer - danke ich für das permanente Interesse an meiner Arbeit, für die praktische Unterstützung, die anregenden Diskussionen und die vielen hilfreichen Tipps.

Den Gutachtern der Arbeit danke ich herzlich für die Bereitschaft zur Übernahme dieser Aufgabe.

Forschung und Laborarbeit kann nur im Team optimal realisiert werden. Deshalb möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Arbeitskollegen der AG Heuer und der AG Kaether für die gute Zusammenarbeit bedanken. Besonders unsere gute Seele, Sabine Landmann, hat mit viel Ruhe und Geduld, permanenter Unterstützung im Labor und vielen leckeren Gummitierchen entscheidend zur angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen. Christina, Kerstin, Matze und Dani hatten stets ein offenes Ohr für meine fachlichen und organisatorischen Probleme und gemeinsam konnten wir viele dann auch lösen. Dafür danke ich euch recht herzlich!

Ohne die wertvolle Unterstützung durch unsere Tierhaus-Mitarbeiter, und hier besonders von Heidi Rosemann, wäre diese Arbeit wohl gar nicht möglich gewesen.

Bei Katrin Buder, Debra Weih, Ronny Hänold, Thomas Seiboth und Kathrin Landgraf möchte ich mich für ihre Hilfe bei experimentellen Problemen und für viele fruchtbare Diskussionen bedanken.

Meinen Freunden, die mir trotz akutem Zeitmangel die Treue gehalten haben, danke ich für viele motivierende Worte und entspannende gemeinsame Unternehmungen.

Aber das Wichtigste in meinem Leben sind meine Eltern Herbert und Irmgard, mein Bruder Raimund und mein Lebensgefährte Udo. Ihnen danke ich von ganzem Herzen dafür, dass sie immer für mich da sind, mich verstehen und mich unterstützen, mir helfen und mich so lieb haben, wie ich bin. Glück ist, dass es euch gibt!

Publikationen, Poster und Vorträge

Publikationen

Peer-reviewed journals:

S. Horn; C. Kaether; J. Mittag; M.K.H. Schäfer; S. Baader and H. Heuer: **“Thyroid Hormone Regulates Borg4 and Septin-4 Expression during Bergmann Glia Differentiation”**, submitted October 2008 to Journal of Neuroscience

M. Trajkovic; T.J. Visser; J. Mittag; S. Horn; J. Lukas; V.M. Darras; G. Raivich; K. Bauer and H. Heuer: **“Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8”**, Journal of Clinical Investigation, (2007), 117(3): 627-35

Abstracts:

S. Horn; K. Bauer and H. Heuer: **“Thyroid Hormone Action during Cerebellar Purkinje Cell and Bergmann Glia Development”**, 38th Meeting of the Society for Neuroscience, November 2008

S. Horn; J. Mittag; M.K.H. Schäfer und H. Heuer: **“Thyroid Hormone Action during Development of Cerebellar Purkinje Cells and Bergmann Glia”**, 7th Meeting of the German Neuroscience Society, March 2007

M. Trajkovic; T.J. Visser; J. Mittag; S. Jungk; S. Horn; J. Lukas; K. Bauer und H. Heuer: **“Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8”**, Thyroid, (2006), 16(9)
Meeting of the American Thyroid Association (ATA), October 2006

Vorträge

S. Horn: **“Thyroid hormone action during development of cerebellar Bergmann Glia and Purkinje cells - Technical Aspects”**, NEUROTRAIN Autumn School: Neuron-glia interactions in health and disease, Dubrovnik, Kroatien, Oktober 2007

S. Horn: **“Thyroid Hormone Action and Bergmann Glia: The Dark Side of the Moon”**, 9th Young Active Research Meeting, Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie, Lübeck, Oktober 2007

S. Horn: **“How does thyroid hormone influences dendrite development? Analysis of TH-regulated cerebellar differentiation”**, 8th Young Active Research Meeting, Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie, Würzburg, Oktober 2006

Poster-Präsentationen

S. Horn: **“Thyroid hormone action during development of cerebellar Bergmann Glia and Purkinje cells”**, NEUROTRAIN Autumn School: Neuron-glia interactions in health and disease, Dubrovnik, Kroatien, Oktober 2007

S. Horn und H. Heuer: **“Thyroid Hormone Action and Bergmann Glia: The Dark Side of the Moon“**, 2nd Meeting of the Collaborative Research Centre SFB 604: CellSignals Jena ‘07, Jena, September 2007

S. Horn und H. Heuer: **“Thyroid Hormone Action and Bergmann Glia: The Dark Side of the Moon“**, Bregenz Summer School on Endocrinology: Nuclear Receptors in Health & Disease, Bregenz, Österreich, Juli 2007

S. Horn; J. Mittag; M.K.H. Schäfer und H. Heuer: **“Thyroid Hormone Action During Development of Cerebellar Purkinje Cells and Bergmann Glia“**, 7th Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, März 2007