

Striatin, ein Marker glialer Vorläuferzellen im Kleinhirnkortex

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Bogdan Pintea
aus
Temeschburg/Rumänien

2011

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Baader
2. Gutachter: PD Dr. Ronald Jabs

Tag der Mündlichen Prüfung: 04.02.2011

Aus dem Anatomischen Institut, Anatomie und Zellbiologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Karl Schilling

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	7
2	Einleitung.....	10
2.1	Striatin, ein Multimodulatorprotein und potentiell Zielgen von <i>Engrailed-2</i>	11
2.2	Das Cerebellum	13
2.2.1	Anatomie und makroskopische Gliederung	13
2.2.2	Der zelluläre Aufbau des adulten Kleinhirns.....	14
2.3	Die Entwicklung des Kleinhirns	16
2.3.1	Cerebelläre Anlage und pränatale Phase.....	16
2.3.2	Postnatale Phase	16
2.4	Das Mausmodell L7En-2.....	18
2.4.1	Das Homeobox- und Segment-Polaritätsgen <i>Engrailed-2</i>	18
2.4.2	Funktionelle Bedeutung von <i>Engrailed-2</i> während der Kleinhirnmorphogenese	20
2.4.3	Die L7En-2 Maus als Modellsystem für Untersuchungen zur Pathogenese von Autismus	21
2.5	Zielsetzung der Arbeit	23
3	Materialien und Methoden.....	24
3.1	Geräte, Chemikalien, Lösungen.....	24
3.1.1	Geräte	24
3.1.2	Chemikalien.....	25
3.1.2.1	Antikörper und Detektionsreagentien	25
3.1.2.2	Nukleinsäuren und Aufreinigungskits.....	26
3.1.2.3	Modifizierende Enzyme	26
3.1.2.4	Sonstige Chemikalien.....	26
3.1.3	Lösungen:.....	28
3.2	Versuchstiere	31
3.3	Genotypisierung der Versuchstiere anhand von Schwanzbiopsien	31
3.4	Perfusionsfixierung von Gewebe für die in situ Hybridisierung und Immunhistochemie	33
3.5	IsH Sonden	35

3.6	Histologische Techniken	37
3.6.1	In situ Hybridisierung	37
3.6.2	Immunohistochemie	39
3.6.3	Kombinierte In situ Hybridisierung und Immunohistochemie	40
3.6.4	Neurocan-GFP Histochemie.....	42
3.7	Auswertungsprotokolle.....	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Die Spezifität der Striatin IsH-Sonde.....	44
4.2	Das Expressionsmuster von Striatin-mRNA während der Kleinhirnentwicklung	49
4.3	Charakterisierung der strn-positiven Zellen in der weißen Substanz des Kleinhirns.....	51
4.4	Differentielle Expression von Striatin-mRNA im Kleinhirnkortex von Wildtyp- und L7En-2 Mäusen	58
5	Diskussion	65
5.1	Striatin als Marker glialer Vorläuferzellen.....	66
5.2	Zytoskelett-assoziierte Gene als Effektoren des Engrailed-2 vermittelten Fortsatzwachstums	71
6	Zusammenfassung.....	72
7	Literaturverzeichnis	73
8	Danksagung	87
9	Lebenslauf.....	88

1 Abkürzungsverzeichnis

Nicht aufgeführt sind international gebräuchliche Einheiten, und die von diesen Einheiten abgeleiteten Maßeinheiten und Potenzen.

A	Adenin
ABC	Avidin-Biotin Complex
Ad	adulte Mäuse, älter als 2 Monaten
Amp	Ampicillin
AP	Alkaline Phosphatase
As	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum ALBUMIN
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CA1-3	Regionen des Cornu ammonis des Hippocampus
CABP	Calbindin D28k Protein
<i>Crmp1</i>	<i>Collapsin response mediator protein 1</i> mRNA
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMFA	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGL	Stratum granulosum externum
<i>En</i>	<i>Engrailed</i>
Fab	Immunglobulinfragmente a und b
FCS	fetaler Kälberserum
FVB/N	Mausstamm

IGL	Stratum granulosum internum
IHC	Immunhistochemie
IsH	<i>In situ</i> Hybridisierung
GAPDH	Glyceraldehydphosphatdehydrogenase Protein
GFAP	GLIAL FIBRILLARY ACID PROTEIN
GFP	GRÜNN FLOURESZIERENDES PROTEIN
GS	Ziegenserum / goat serum
G	Guanin
HRP	HORSERADISH PEROXIDASE Protein
L7	<i>L7/pcp-2</i> Gen
L7	L7/PCP-2 Protein
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
L7En-2	ENGRAILED-2 Protein Überexpressions-Mausmutante
MAB	Maleinsäurepuffer (maleic acid buffer)
MBP	MAJOR BASIC PROTEIN
ML	Stratum moleculare/ molecular layer
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NeuN	Neuron-spezifisches Antigen
NPCs	Neuronale Vorläuferzellen/Stammzellen
Nucl.	ZNS Kerne
OPCs	Oligodendrozyten Vorläuferzellen
P	Postnaltag (Alter des Tieres in Tagen nach der Geburt)
PCR	Polymerasekettenreaktion/ polymerase chain reaction
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffer saline)
PBST	PBS mit Tween 20
PAX2	PAIRED BOX TRANSCRIPTION FACTOR 2 Protein
PFA	Paraformaldehyd
PL	Purkinjezellschicht
PNS	Peripheres Nervensystem
PP2A	PROTEIN PHOSPHATASE 2 ALPHA Protein
PVA	Polyvinylalkohol
Pt	Putamen

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SG2NA	Striatin, Calmodulin binding protein 3
Shh	„sonic-hedge-hog“ Maus
SOX10	SEX DETERMINING REGION Y BOX 10
SSC	Natriumchlorid-Natriumzitat-Puffer
<i>Strn</i>	<i>Striatin</i> Gen
STRN	STRIATIN Protein
T	Thymin
TBE	TRIS-Borat-EDTA -Puffer
TCF7L2	TRANSCRIPTION FACTOR 7-like 2 , Alternativname: TCF4
TEA	Triethanolamin
TM4SF	Transmembran 4 (Protein) Superfamily
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>Tspan-5</i>	<i>Tetraspanin-5</i> Gen
TSPAN-5	TETRASPANIN-5 Protein
U	Unit (Enzymeinheit)
ZNS	Zentralnervensystem
Vol.	Volumen
WM	Substantia alba / white matter
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen

2 Einleitung

Mehrzellige Organismen benötigen zur Erhaltung, Abstimmung und Steuerung ihrer Organe im Inneren und für die Kommunikation mit ihrer Umwelt ein System zur Informationsaufnahme, -verarbeitung und -weitergabe. Während das endokrine System zur Kommunikation das Blutgefäßsystem nutzt, und damit simultan unterschiedlichste Organe steuert, ist speziell für den schnellen Informationsfluss das Nervensystem zuständig. Prinzipiell besteht das Nervensystem aus zwei Zelltypen, den Neuronen und den Gliazellen. Die Nervenzellen besitzen aufgrund ihres polaren Aufbaus die Fähigkeit, an einem Ende, dem dendritischen Pol, Informationen aufzunehmen, und diese am anderen Ende, dem axonalen Pol, wieder abzugeben (His, 1886; Forell, 1887; von Waldeyer-Hartz, 1891; Ramon y Cajal, 1911; zusammengefasst von Guillery, 2005). Basierend auf diesen Eigenschaften wurden die Nervenzellen lange Zeit als alleinig verantwortlich für die Informationsleitung im Nervensystem angesehen (Schleich, 1894; Brown und Sherrington 1911; von Holst, 1935).

Die Funktionalität des ZNS wird ganz wesentlich von den Gliazellen im Nervensystem mitbestimmt. Höhere mehrzellige Organismen besitzen für eine schnelle Informationsweiterleitung eine Isolierschicht um die langen Axonausläufer, das Myelin. Diese Myelinscheiden sorgen dafür, dass neuronale Erregungen saltatorisch und damit schneller als graduelle Erregungspotentiale weitergeleitet werden (Huxley und Stämpfli, 1949; Hartline und Colman, 2006). Die Myelinisierung wird durch Oligodendrozyten realisiert (Virchow, 1846; Bunge et al., 1961; Verkhratsky, 2006). Die Bedeutung dieser Myelinscheiden wird dadurch deutlich, dass demyelinisierende Erkrankungen zu Lebenseinschränkungen, Funktionseinschränkungen und in letzter Instanz zum Tode der Patienten führen (Langer-Gould et al., 2006). Mikroglia, eine weitere Population von Gliazellen, sind die phagozytierenden Zellen des ZNS. Sie können endogene und exogene Neurotoxine sowie ungewollte entzündliche Zellen entsorgen und sind so für die zelluläre und stoffliche Homöostase des ZNS wichtig (Hortega del Río, 1921; Tambuyzer et al., 2009). Zahlenmäßig am häufigsten unter den Gliazellen und funktionell am heterogensten sind die Astrozyten. Ihre Funktion geht weit über eine reine

Ernährungsfunktion der Nervenzellen hinaus. Sie bilden die Membrana limitans glialis perivascularis zur Aufrechterhaltung der Bluthirnschranke, steuern den Kalium Haushalt des ZNS und sind in den Wiederherstellungszyklus von Neurotransmitter eingebunden (Seifert et al., 2006). Seit den 90er Jahren mehren sich Hinweise darauf, dass Astrozyten aktiv an der Informationsweiterleitung teilnehmen (Berger et al., 1991; Steinhauser et al., 1992; Steinhauser et al., 1994). Es kann mittlerweile als gesichert angesehen werden, dass nicht nur neuronale Veränderungen, sondern auch gliale Defizienzen in psycho-neurologischen Symptomenkomplexen resultieren. Beispielgebend seien hierfür Epileptische Erkrankungen, die amyotrophe Lateralsklerose, cerebrale ischämische Infarkte und die hepatische Encephalopathie genannt (Seifert et al., 2006).

Basis für unser Verständnis von der Informationsweiterleitung im ZNS ist die Identifizierung und Charakterisierung der Gene und Genprodukte, die am Aufbau eines neuro-glialen Netzwerkes beteiligt sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben wir die Expression des Striatins, von dem eine Funktion bei der Etablierung synaptischer Verschaltungen postuliert wird, in Wildtyp-Tieren und in Tieren mit defizienter neuronaler Differenzierung untersucht.

2.1 Striatin, ein Multimodulatorprotein und potentiell Zielgen von *Engrailed-2*

Striatine werden zu den sogenannten „scaffolding“ (Gerüst-)Proteinen gerechnet. Gerüstproteine bestimmen die Zusammensetzung und den Aufbau von submembranären Proteinkomplexen, und greifen somit in die lokale intrazelluläre Signalvermittlung ein. Mitglieder der Striatinfamilie sind intrazelluläre Proteine, die durch mehrere Protein-Protein Interaktionsdomänen charakterisiert sind. Vom C-Terminus aus genannt sind dies mehrere WD-Domänen, eine Calcium-Calmodulin-bindende Domäne, eine coiled-coil Struktur, sowie eine Caveolin-Bindungsdomäne. WD-Domänen bieten eine Plattform, auf der verschiedene Proteine reversibel, entweder simultan oder sequentiell miteinander interagieren können (Smith et al., 1999). Ein klassisches Beispiel für WD-Proteine ist das kleine G-Protein G_{β} , das mit G_{γ} und etwa 15

verschiedenen Proteinen, darunter Zytoskelettproteine, interagieren kann und direkt auf die zelluläre Differenzierung Einfluss nimmt (Dave et al., 2009). Die Calcium-Calmodulin-bindende Domäne hat pleiotrophe Funktionen, unter anderem in der Signalweiterleitung innerhalb dendritischer Dornfortsätze. Striatine interagieren mit Calcium-Calmodulin und dissoziieren bei ansteigenden Calciumkonzentrationen von der Membran. Die Bindung an die Membran wird über die Caveolin-bindende Domäne an Calveolin-1 vermittelt, und wird durch Calcium gehemmt. Ebenfalls von zentraler Bedeutung für die Lokalisation und Funktion von Striatinen ist die Coiled-coil Domäne. Sie vermittelt die Homo- und Heterooligomerisation der Striatine und ist für die korrekte Positionierung der Striatine in den dendritischen Dornfortsätzen verantwortlich (Gaillard et al., 2006). Striatine können folglich als Calcium-Sensoren innerhalb von subzellulären Entitäten betrachtet werden, die über zytoskelettale Proteine und Proteinmodifikatoren Einfluss auf die Signalweiterleitung in allen Zellen nehmen (Benoist et al., 2006).

Basierend auf den Strukturcharakteristika konnten bisher drei Vertreter der Striatinproteinfamilie identifiziert werden: STRN, SG2NA und Zinedin (Castets et al., 1996; 2000; Blondeau et al., 2003). Die drei Mitglieder der Striatinfamilie zeigen ein sowohl Organ-spezifisches als auch Zelltyp-spezifisches Expressionsmuster. Während Zinedin überwiegend im Gehirn exprimiert wird, werden STRN und SG2NA in allen Organen exprimiert. Innerhalb des Gehirns überlappen die Expressionsareale von STRN und SG2NA, auch wenn die relativen Mengen von Region zu Region unterschiedlich sind (Castets et al., 2000; Gaillard et al., 2006). Dies wurde als Hinweis dafür gesehen, dass erstens die verschiedenen Mitglieder der Striatinfamilie ähnliche Funktionen in unterschiedlichen Zellen ausüben, und dass sie zweitens als hetero- und homooligomerisierte Proteinkomplexe agieren. Striatin war das erste isolierte und charakterisierte Protein aus der Striatinfamilie. Es wurde aus Synaptosomenpräparationen aus dem Gehirn isoliert und sequenziert (Castets et al., 1994; Castets et al., 1996). Die postulierte dendritische Lokalisation konnte später in elektronenmikroskopischen Studien verifiziert werden (Kachidian et al., 1998). Heute ist bekannt, dass Striatin nicht nur in somatodendritischen Dornen von GABAergen striatalen Neuronen, sondern auch in Neuronen des olfaktorischen und motorischen Systems (Castets et al., 1996). Die Expression ist allerdings verhältnismäßig niedrig

(Salin et al., 1998). Entsprechend der Lokalisation von STRN zeigten Striatin-defiziente Motoneurone eine deutliche Reduktion im Wachstum von dendritischen Dornen, und Ratten mit entsprechendem Gendefekt zeigen Defizite in der motorischen Kontrolle (Bartoli et al., 1999).

Vor Kurzem wurde anhand einer Array-Analyse postuliert, dass Striatin in Engrailed-2 überexprimierenden Purkinjezellen des Kleinhirns transgener Mäuse vermehrt exprimiert wird (Holst et al., 2008). Um die Bedeutung dieses Befundes zu verstehen, wird im Folgenden zunächst der Aufbau und die Entwicklung des Kleinhirns, und anschließend Grundlagen über die Bedeutung von Engrailed-2 für die Entwicklung der Kleinhirnstruktur beschrieben.

2.2 Das Cerebellum

2.2.1 Anatomie und makroskopische Gliederung

Ein beliebtes und wissenschaftlich attraktives Modellsystem, um die Expression und Funktion von Genen während der Entwicklung des ZNS zu untersuchen, ist das Kleinhirn. Das Cerebellum besitzt aufgrund seiner Zugehörigkeit zum Archi- und Paleocortex einen relativ einfachen Aufbau, dessen Grundprinzipien mit den Arbeiten von Ramon y Cajal und C. Golgi weitgehend aufgeklärt waren (Ramon y Cajal, 1911; Golgi, 1903). Genetisches Wissen über Markerproteine von bestimmten Zelltypen und deren Entwicklungsstadien, sowie die Möglichkeit, einzelne Zelltypen spezifisch genetisch manipulieren zu können, sind weitere Faktoren, die den Kleinhirnkortex zu einem attraktiven Modellsystem für Untersuchungen der ZNS-Entwicklung machten (Kenney und Segal, 2005).

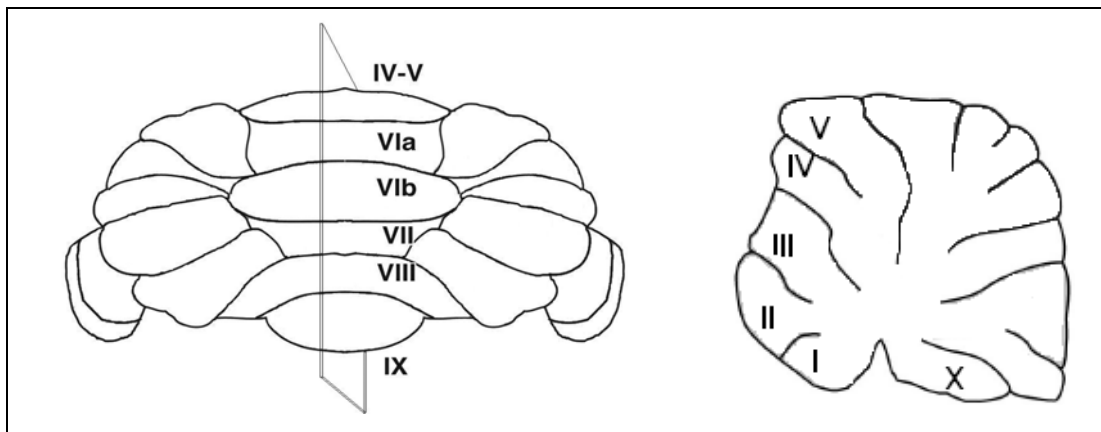


Abb. 1: Das Kleinhirn der Maus: die linke Abbildung zeigt die dorsale Ansicht mit der sagittalen Schnittebene durch die Vermis, die rechte zeigt eine sagittale Ansicht der Vermis cerebelli. Die einzelnen Lobuli sind nach Altman und Bayer (1997) mit römischen Zahlen beschriftet.

Das Cerebellum teilt man makroskopisch entlang der mediolateralen Achse in zwei Hemisphären und einen Wurm, und in der rostrokaudalen Achse in mehrere Lobi ein, welche wiederum in Lobuli mit charakteristischem Aufbau unterteilt werden. Bei der Zuordnung von Lobuli zu bestimmten Lobi möchte ich mich im Rahmen dieser Arbeit auf die Einteilung von Bayer und Altman beziehen, da diese derzeit aus entwicklungsbiologischer und funktioneller Sicht am sinnvollsten scheint (Altman und Bayer, 1997). Danach wird der Cortex cerebelli in einen Lobus anterior (Lobuli I – V), einen Lobus centralis (Lobuli VI – VIII), einen Lobus posterior (Lobulus IX) und einen Lobus flocculonodularis (Lobulus X) eingeteilt (Abb. 1).

2.2.2 Der zelluläre Aufbau des adulten Kleinhirns

Alle Lobuli haben eine gemeinsame Zytoarchitektur, die zunächst einmal in eine äußere Schicht grauer Substanz, der Rinde, und eine innere Schicht aus weißer Substanz, dem Mark, eingeteilt wird. Im adulten Kleinhirn besteht die Rinde aus drei Schichten, die von außen nach innen gemäß ihrem Inhalt folgende Namen erhalten haben: stratum moleculare (ML), Purkinjezellschicht (PCL) und das stratum granulosum internum (IGL) (Ramon y Cajal, 1911; Golgi, 1903).

Im ML, der äußersten subpial gelegenen Schicht des adulten Kleinhirnkortex, dominieren volumenmäßig die Zellfortsätze. Der Großteil der Fortsätze stammt von den Purkinjezellen, die ihren Dendritenbaum in das ML aussenden. Ferner verlaufen in dem ML die Parallelfasern der Körnerzellen, sowie Dendriten und Axone von kleinen Interneuronen, die als Korb-/Sternzellen bezeichnet werden. In dem ML befinden sich zudem Kletterfasern, afferente Axone aus der unteren Olive, und Ausläufer von Bergmannglia (Ramon y Cajal, 1911; Golgi, 1903). Im Anschluss an die Molekularschicht folgt nach innen die Purkinjezellschicht (PCL), die aus einer einzelnen Zelllage Purkinjezellsomata besteht. Die innere Körnerzellschicht bildet die innerste zelluläre Schicht der Rinde und beinhaltet die ausdifferenzierten Körnerzellen, große Golgi-Interneurone (Ramon y Cajal, 1911; Golgi, 1903), Lugarozellen und unipolare Bürstenzellen, die ebenfalls zum interneuronalen System des Kleinhirns gehören (Ito, 2006; Schilling et al., 2008). Zudem existieren in den einzelnen Schichten verschiedene Gliazellen wie Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikrogliazellen.

Unterhalb der Rinde liegt das Kleinhirnmittelhirn mit der Substantia alba (weiße Substanz, WM) und der Substantia grisea, den tiefen Kleinhirnkernen (DCN). Die Substantia alba besteht aus dem Nervengeflecht der ankommenden Nervenfasern, d.h. den Moosfasern und Kletterfasern, und aus den abgehenden Purkinjezellaxonen (Ramon y Cajal, 1911; Golgi, 1903). Die zellulären Komponenten der Substantia alba bilden die Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia (Virchow, 1846; Verkhratsky, 2006). Perinatal finden sich in der WM jedoch auch sehr viele migrierende Vorläuferzellen, deren Herkunft und Ziel noch nicht abschließend geklärt ist (Weisheit et al., 2006). Wie das Großhirn hat auch das Kleinhirn Kerngebiete, die wichtige Relaisstationen der extrapyramidal-motorischen Bahnen darstellen. Diese Nuclei liegen in der weißen Substanz im ventralen Teil des Kleinhirns. Die Nucl. fastigii liegen am weitesten dorsal im Marklager des Wurms; lateral davon liegen die Nucl. emboliformes und Ncl. globosi sowie die Nucl. dentati, die größte Kerngruppe im Kleinhirnmittelhirn, deren Umrisse ein stark gefaltetes Band darstellen (Altman und Bayer, 1997).

2.3 Die Entwicklung des Kleinhirns

2.3.1 Cerebelläre Anlage und pränatale Phase

Das Kleinhirn entwickelte sich aus dem dorsalen Anteil des Metencephalon. Aus einer paarigen Verdickung des dorsalen Flügelplattenabschnitts entstehen zunächst zwei Kleinhirnwülste (Sidman und Rakic, 1982). Diese wachsen in den IV. Ventrikel hinein und verwachsen in der Mittellinie zu einem unpaaren Abschnitt, der Vermis. Die lateralen Anteile der dorsalen Flügelplatte stülpen sich kaudalwärts über die Brücke und die Medulla oblongata hinweg, und bilden die Hemisphären (Sidman und Rakic, 1982). Die Kleinhirnplatte setzt sich aus dem Neuroepithel, einer Mantel- und einer Marginalschicht zusammen. Etwa am achten Embryonaltag der Maus wandern Neuroblasten aus dem Neuroepithel zunächst dorsalwärts und dann anterior und verbreiten sich so über die Rautenlippe auf die Oberfläche des Kleinhirns. Diese Zellen bilden die Vorläuferzellen der Körnerzellen (Alder et al., 1996; Alcantara et al., 2000; Wingate, 2001). Eine zweite Population von Neuroblasten wandert durch die Mantelzone in die Marginalzone, wo sie sich zu Purkinjezellen ausdifferenzieren. Aus den Neuroblasten, die in der Markzone verbleiben, bilden sich die zentralen Kerne.

2.3.2 Postnatale Phase

Zum Tag der Geburt besteht das Kleinhirn der Maus aus vier Schichten. Die externe Körnerzellschicht (EGL), eine schwach ausgeprägte Molekularschicht, dann die während der ersten Postnatalwoche noch mehrlagige Purkinjezellschicht und ganz innen die innere Körnerzellschicht. Etwa 2 Tage nach der Geburt beginnen die embryonalen, direkt der Pia mater angrenzend liegenden Körnerzellvorläuferzellen in einer zweiten Phase der Proliferation sich zu vermehren und sich asymmetrisch zu teilen (Miale und Sidman, 1961; Fujita et al., 1966; Fujita, 1967). Postmitotische Zellen wandern zunächst in tangentialer Richtung entlang der cerebellären Oberfläche, bevor sie sich von der äußeren Schicht durch die Purkinjezellschicht hindurch nach innen bewegen und zu ausdifferenzierten Körnerzellen reifen (Ryder und Cepko, 1994; Sgaier, 2005). Entsprechend der Funktion der EGL als germinatives postnatales Zentrum, ist

diese Schicht im erwachsenen Tier nicht mehr vorhanden. Die EGL enthält neben den Körnerzellen Endfüßchen der Bergmann-Glia, der radiären Glia des Kleinhirns. Gleichzeitig mit der Körnerzellvermehrung beginnen die Purkinjezellen mit der Ausbildung von Dendriten, so dass ab dem fünften Postnataltag eine klare Schichtenabfolge zu erkennen ist. Bereits vor der zweiten Phase der Körnerzellproliferation, in der letzten Embryonalwoche, beginnen die Moosfasern und die Kletterfasern in Richtung Kleinhirncortex zu wachsen, und nehmen in der ersten Postnatalwoche Verbindung mit ihren Zielzellen auf, die Moosfasern zu den Körnerzellen, und die Kletterfasern zu den Purkinjezellen. Auch wenn nach dem 17ten Postnataltag noch Rearrangements von Synapsen und Änderungen in der Dendritogenese üblich sind, ist die grobe morphologische Entwicklung des Kleinhirns der Maus nach der zweiten Postnatalwoche abgeschlossen (Altman und Bayer, 1997; Voogd und Glickstein, 1998).

Im der adulten Maus bestehen etwa 10-15% des gesamten Gehirns inklusive Cortex und weißer Substanz aus nicht-neuronalen Zellen. Die Reifung dieser nicht-neuronalen Zellen erfolgt parallel mit der der Neuronen. So setzt zum Beispiel die Myelinisierung im Kleinhirn der Maus zwischen dem dritten Tag (Bousslama-Oueghlani et al., 2003) und dem Ende der ersten postnatalen Woche ein (Foran und Peterson, 1992). Die myelinisierenden Oligodendrozyten des Kleinhirns entwickeln sich aus Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPCs), die bereits vor der Geburt im Bereich der tiefen Kerne vorzufinden sind (Levine et al., 1993). Die OPCs wandern entweder in der pränatalen Phase aus der ventrikulären und subventrikulären Zone in den Kleinhirncortex ein, oder sie entstehen aus ortständigen neuronalen Vorläuferzellen (NPCs) der Cerebellumanlage (Milosevic und Goldman, 2004). Für die zweite Theorie, die die Entstehung der OPCs aus ortständigen NPCs der Cerebellumanlage favorisiert, spricht die Tatsache, dass OPCs im Vergleich zu NPCs relativ wenig migrieren (Wolswijk und Noble, 1989; Compston et al., 1997). Aufklärung bei der Frage nach den Oligodendrozytenvorläuferzellen könnte die Entdeckung der NG2-Zellen liefern, die für sie charakteristische Chondroitinsulfat-Proteoglykan, aber auch AMPA und GABA_A Rezeptoren exprimieren (Bergles et al., 2010). Sie konnten bereits in der 17 Gestationswoche beim Menschen nachgewiesen werden und existieren lebenslang.

(Staugaitis und Trapp, 2009). Sie besitzen die Fähigkeit, sich in Oligodendrozyten auszudifferenzieren, aber auch andere neuronale und astrogliale Phänotypen anzunehmen (Trotter et al., 2010; Zhu et al., 2008). Mittlerweile werden diese NG2-positiven Zellen als eigenständige Klasse von neuroglialen Zellen behandelt.

Neben den Oligodendrozyten existieren im gesamten Kleinhirnkortex eine Vielzahl und Vielfalt von Astrozyten, deren Identifizierung erst begonnen hat (Matyash und Kettenmann, 2010). Während ursprünglich Astrozyten alleinig in ihrer Ernährungsfunktion für Neuronen und als Grundbaustein der Gliaschranke charakterisiert waren, werden Astrozyten heutzutage als aktive Bausteine der Neurotransmission angesehen (Reichenbach et al., 2010; Volterra und Meldolesi, 2005). Eine Klassifizierung basierend auf ihren morphologischen und funktionellen Eigenschaften ist extrem komplex und nicht einheitlich beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit soll zwischen den protoplasmischen Astrozyten der grauen Substanz und den fibrösen Astrozyten der weißen Substanz auf morphologischer Ebene unterschieden werden. Biochemisch charakterisierbar ist die Klasse der GFAP-positiven Astrozyten, die zum einen die reaktive Glia enthält, zum anderen als neurale Vorläuferzellpopulation beschrieben ist. Reaktive Gliazellen werden so genannt, da sie nach Gewebsverletzungen aktiviert werden und das intermediäre Filamentprotein GFAP exprimieren (Sun et al., 2010). GFAP-positive Zellen sind aber auch unter der radialen Glia, die als Bahnsysteme für die Migration von Neuronen, und als ubiquitäre Vorläuferzellen angesehen werden. Sie können sich sowohl in Neurone als auch in Gliazellen differenzieren, und führen Schlüsselfunktionen bei der Musterbildung und der Regionen-spezifischen Differenzierung des ZNS aus (Campbell und Gotz, 2002).

2.4 Das Mausmodell L7En-2

2.4.1 Das Homeobox- und Segment-Polaritätsgen Engrailed-2

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten hervorgegangen ist, basiert die Funktion des ZNS auf der Verschaltung von definierten Arealen des Gehirns. Entsprechend ist

der Kleinhirnkortex mit der unteren Olive über die Kletterfasern und mit der Pons über die Moosfasern verschaltet. Die Einteilung des Kleinhirnkortex in definierte Areale oder Kompartimente/Segmente ist folglich ein strukturelles Bauprinzip, das für alle ZNS Abschnitte in ähnlicher Weise gilt (Baer von, 1828; Bergquist und Källen, 1953).

Charakteristisch für den Kleinhirnkortex ist die Einteilung in parasagittal ausgerichtete Kompartimente, die biochemisch anhand der Expression einer Vielzahl von Genen definiert werden können. Diese kortikalen Kompartimente sind mit definierten Arealen aus der unteren Olive und den tiefen Kernen verschaltet. In Arbeiten von Joyner wurden erstmals Proteine in Mäusen beschrieben, die in *Drosophila* mit dem Namen *engrailed* (verkrüppelt) bezeichnet waren und bei der Segmentierung der Flügel und der Definition der anteroposterioren Achse eine Rolle spielten. Entsprechend dem *Drosophila*-Gen wurden die Säugerhomologe als *en-1* und *en-2* bezeichnet (Joyner et al., 1985; Joyner und Martin, 1987). Die beiden Gene zeigen im anterioren Bereich der Neuralrinne in den ersten Somiten-Stadien der Entwicklung eine deutliche Expression in der cerebellären Anlage. Kurz nachdem sich das Neuralrohr geschlossen hat (Embryonaltag (E) 8,5 in der Maus) kann man an der Grenze vom Mesencephalon zum Metencephalon in einer charakteristischen transversalen Bande die Expression der beiden *engrailed*-Gene nachweisen. Dabei erscheint die Expression in einem Gradienten von posterior nach anterior abzunehmen (Davis und Joyner, 1988; Davis et al., 1991). Bereits zu diesem Zeitpunkt können Unterschiede in der Expression der beiden homologen Gene beobachtet werden. So wird *en-1* etwas weiter anterior exprimiert als *en-2*. Dieser Unterschied in der Expression manifestiert sich im weiteren Fortschreiten der Entwicklung. Während am Embryonaltag 17 nur in wenigen Zellen des Kleinhirns eine Expression von *en-1* gesehen werden konnte, war *en-2* in charakteristischen parasagittalen angeordneten Streifen von cerebellären Neuronen exprimiert (Millen et al., 1995). Im postnatalen Tier ist die Expression von *en-2* offensichtlich auf die Körnerzellschicht beschränkt (Davis und Joyner, 1988; Davis et al., 1991). Dies bedeutet, dass die Expression in den Purkinjezellen um den Tag der Geburt deutlich reduziert oder sogar reprimiert worden ist (Davis und Joyner, 1988). Welche Rolle das parasagittale Expressionsmuster als auch die charakteristische perinatale Repression

der Expression von *Engrailed-2* im Kleinhirncortex für dessen Histogenese hat, war lange Zeit unklar.

2.4.2 Funktionelle Bedeutung von Engrailed-2 während der Kleinhirnmorphogenese

Für funktionelle Analysen der *engrailed* Gene wurden zum einen klassische Deletionsmutanten verwendet, zum anderen Überexpressionsmutanten entwickelt. Entsprechend der Expression beider *engrailed* Homologen in der Mittelhirn-Nachhirnregion zeigten beide Deletionsmutanten massive Degenerationen in dieser Region. Während bei einer *en-1* Nullmutation das gesamte Kleinhirnprimordium fehlte (Wurst et al., 1994), waren bei einer *en-2* Nullmutation um etwa 40 % weniger Kleinhirnzellen vorhanden, was in einer entsprechenden Volumenreduktion des Kleinhirnkortex resultierte (Millen et al., 1994). Als zelluläre Grundlage für das Fehlen von Neuronen wurden Effekte von Engrailed auf das neuronale Überleben diskutiert. Dopaminerge mesencephale Neurone von Nullmutanten überleben entsprechend dieser Hypothese tatsächlich schlechter als ihre Wildtyp-Pendants (Alberi et al., 2004).

Eine weitere interessante Beobachtung in der *en-2* Nullmutanten war, dass die Lobulierung (Millen et al., 1994) und die rostrocaudale Kompartimentierung des Kleinhirns, wie sie durch biochemische Marker definiert wird, leicht verändert waren (Kuemmerle et al., 1997). Die Ergebnisse sind allerdings sehr schwer zu interpretieren, da bei Mäusen mit einem unterschiedlichen genetischen Hintergrund hohe Variabilitäten in der Ausprägung dieser sagittalen und rostrocaudalen Kompartimente beobachtet worden sind (Inouye und Murakami, 1980; Neumann et al., 1990).

Effekte auf die Verschaltung des Kleinhirncortex konnten in keinem wesentlichen Umfang festgestellt werden (Vogel et al., 1996). Wesentlich detailliertere Informationen lieferte hier eine Überexpressionsmutante, in der *en-2* spezifisch in den cerebellären Purkinjezellen über die perinatale Phase hinaus exprimiert wurde (Baader et al., 1998). Offensichtlichstes Merkmal dieser Überexpression war der Verlust von etwa 40 % der Purkinjezellen, die während der ersten Postnatalwoche abstarben (Jankowski et al., 2004). Durch die Überexpression wurde aber offensichtlich auch die parasagittale

Kompartimentierung des Kleinhirnkortex wesentlich beeinflusst. Anstelle in klar definierten Kompartimenten, wuchsen Moosfasern aus lumbosakralen Rückenmarkssegmenten Segment-übergreifend in den Kleinhirnkortex ein. Zudem war die parasagittale biochemische Kompartimentierung der Purkinjezellen in entsprechender Weise aufgehoben (Baader et al., 1999). Bestätigt werden konnten diese Ergebnisse später an *en-1* und *en-2* Doppelmutanten (Sillitoe et al., 2008; Sillitoe et al., 2010).

Da *en-2* normalerweise nur bis zur Geburt in Purkinjezellen exprimiert wird, und die Expression mit dem Beginn der Dendritogenese von Purkinjezellen abnimmt, wurde vermutet, dass Engrailed-2 die Dendritogenese unterdrückt, und damit ein zu frühes Ausreifen der Dendriten verhindert. Tatsächlich zeigten Purkinjezellen der L7En-2 Maus nach verlängerter *en-2* Expression eine Reduktion in der Dendritenreifung (Jankowski et al., 2004). Korrespondierend mit der verzögerten Dendritenreifung waren die Ausdifferenzierung der Bergmannglia, und die Myelinisierung der Purkinjezellaxone um 2-3 Tage verzögert.

Molekulare Grundlagen für die Engrailed-2-Effekte sind bisher nicht bekannt. In einer Studie von Holst et al. wurden mit Hilfe von Array-Untersuchungen Gene identifiziert, die potentiell in den L7En-2 Tieren reguliert sind (Holst et al., 2008). Diese Analysen lassen vermuten dass der zelluläre Phänotyp der Engrailed-2 Überexpression auf einer Fehlverteilung von Proteinen innerhalb der Purkinjezellneurone zurückzuführen ist. Striatin wurde als eines der regulierten Gene identifiziert.

2.4.3 Die L7En-2 Maus als Modellsystem für Untersuchungen zur Pathogenese von Autismus

Die Untersuchung der Engrailed Signalvermittlung ist nicht nur von grundlegendem neurobiologischem Interesse, sondern hat auch Relevanz für das Verständnis der Pathogenese verschiedener Erkrankungen des ZNS. Genetische Kopplungsanalysen zeigten eine wenn auch geringe Assoziation von Einzelnukleotidpolymorphismen im *en-2* Gen mit dem Auftreten von Autismus (autistic spectrum disorders [ASDs]) (Benayed et

al., 2005). Das Autismus Syndrom wurde 1943 von Leo Kanner zum ersten Mal beschrieben (Kanner, 1943) und erst 1971 von der Schizophrenie unterschieden (Kolvin, 1971). Es tritt bei Menschen innerhalb der ersten 36 Monate des Lebens auf und ist eine klinische Diagnose. Die Klinik spiegelt eine Regression oder einen vollständigen Verlust einer zuvor in der kindlichen Entwicklung normal erworbenen Fähigkeit wieder (Trottier et al., 1999). Neuropathophysiologisch finden sich bei den Patienten Defekte in der sekundären Verarbeitung von sensorischen und sensiblen Einflüssen. Neuromorphologisch ist das am meisten beschriebene Phänomen eine Hypoplasie der cerebellären Vermis insbesondere der Lobuli VI und VII. In verschiedenen postmortem Studien konnte auch eine deutliche Abnahme der Purkinjezellzahl festgestellt werden (Ritvo et al., 1986; Bauman und Kemper, 1994; Bailey et al., 1998; Courchesne et al., 1994). Diese Kriterien sowohl in ihrer zeitlichen als auch morphologischen und quantitativen Ausprägung korrelieren mit dem Phänotyp der L7En-2 Maus (Jankowski et al., 2004; Jankowski et al., 2010). Tatsächlich konnte in Mäusen mit einer Engrailed-2 Nullmutation autistische Verhaltenscharakteristika nachgewiesen werden (Kuemerle et al., 2006). Zudem zeigen Daten aus der Engrailed-2 Überexpressionsmutante, dass Engrailed-2 auf die synaptische Verschaltung Einfluss nimmt. Ein Pathomechanismus innerhalb des synaptischen Kommunikationsapparates ist derzeit auch das meist favorisierte Modell (Bourgeron, 2009). Für die mangelnde oder fehlgesteuerte synaptische Kommunikation werden Neuroligine und entsprechende Rezeptoren, der mTOR/PI3K Signalweg, sowie Neuromodulatoren wie Oxytocin und Vasopressin verantwortlich gemacht (Insel, 2010; Varoquaux et al., 2006). Gene, die in den L7En-2 Tieren reguliert werden, nehmen direkten Einfluss auf die Expression dieser Neuromodulatoren (Holst et al., 2008).

Auch wenn Defizite in Neuronen als primäre Ursache der Pathogenese für Autismus angesehen werden, mehren sich Hinweise darauf, dass Gliazellen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese spielen (zusammengefasst bei Courchesne et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der cerebellären WM in autistischen Patienten retardiert ist. Während der Volumenanteil der WM an der Gesamtmasse des Gehirns im normalen Kollektiv für die Lebensspanne zwischen dem 2ten und 3ten Jahr und der Adoleszenz bei 50 % liegt, liegt er bei autistischen Kindern bei nur 7 %

(Courchesne et al., 2001; Carper et al., 2002). Zudem konnte in einer Reihe von Studien nachgewiesen werden, dass abnorme Proteine der WM und des Myelins in Patienten mit Autismus und Fragile X Syndrom, eine monogenetische vererbare Form des Autismus, auftreten (Folstein und Rosen-Sheidley, 2001). Das Auftreten klinischer Symptome der Krankheit korreliert mit dem Zeitpunkt von Gliogenese und Myelinisierung im ZNS (Dobbing und Sands, 1981; Kinney et al., 1988; Ballesteros et al., 1993). Für eine Glia-Pathologie könnte auch die Tatsache sprechen, dass es vermehrt zu Glia-assoziierten Epilepsien im autistischen Kollektiv kommt. Circa 20-30 % der Patienten leiden an einer Epilepsie, welche zumindest teilweise mit einer Gliopathologie assoziiert sind (Fombonne und du Mazaubrun 1992; Fombonne et al., 1997; Tuchman und Rapin, 2002). Eine Assoziation von Striatinen mit dem Autistischen Krankheitsbild ist bisher nicht beschrieben. Das Kleinhirn spielt zweifelsohne eine untergeordnete Rolle bei der Etablierung des autistischen Phänotyps. Hierbei sind sicherlich das limbische System und insbesondere die Amygdala von größerer Bedeutung. Davon unabhängig bietet das Kleinhirn aber ein ideales und dem limbischen System überlegenes Modellsystem dar, mit dem Grundlagen der Autismuspathogenese untersucht werden können.

Neben dem Autismus gibt es eine Vielzahl weiterer Erkrankungen, die mit einer Hypo- oder Hyperplasie, und/oder mit neurodegenerativen Erscheinungen der cerebellären Vermis einhergehen. Hierfür seien stellvertretend Erkrankungen des neurologisch-motorischen Spektrums wie z.B. die cerebelläre Ataxie, schizophrene Psychosen und Tumore genannt (Nopoulos et al., 1999; Loeber et al., 1999; 2001; Pietsch et al., 2004). Eine Assoziation mit Striatinen oder dem Engrailed Signalweg sind allerdings nicht untersucht.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Reifung und morphologische Ausdifferenzierung neuronaler und glialer Zellen sind grundlegende Voraussetzungen für die Funktion des Zentralnervensystems. Da Striatine als Multimodulatorproteine im Kleinhirn exprimiert werden und dort nach einer Studie

von Holst (Holst et al., 2008) eine Rolle bei der cerebellären Entwicklung spielen könnten, stand die Analyse des Expressionsmusters von *striatin* im sich entwickelnden Kleinhirn im Fokus dieser Arbeit. Basierend auf initialen Studien zeigte sich in der weißen Substanz des ZNS eine temporäre, aber markante Färbung von Zellen, die bisher nicht beschrieben war. Diese Zellpopulation wurde mit Hilfe von Zellmarkerproteinen, mit Hilfe des spezifischen Expressionsprofils und mit Hilfe des Auftretens der Zellen in Abhängigkeit von der zellulären Umgebung charakterisiert.

3 Materialien und Methoden

3.1 Geräte, Chemikalien, Lösungen

Dieser Abschnitt enthält ein Glossar zu den im Methodenteil nicht näher spezifizierten Geräten, Reagenzien und Lösungen.

Präparationsbesteck wurde über Fine Science Tools GmbH (Heidelberg) bezogen.

Die Zusammensetzungen der Lösungen sind für die Standardgebrauchslösungen unten angegeben.

3.1.1 Geräte

35x10-/ 60x15-Schale	Nunc, Roskilde, Produkt-Nr.153066/ 150288
6er-/ 12er-/ 24er-Multischale	Biochrom, Berlin, Produkt-Nr.P92060/P 92120/ P 92240
Blotkammer	Pharmacia Biotech, Uppsala, Nova Blot
DNA/RNA Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Elektroporationsgerät, E.coli Pulser	Bio-Rad, München
Geldokumentationssystem, Gel Doc 2000	Bio-Rad, München
Gelkammer	Biometra, Göttingen
Hybridisierungssofen	H.Sauer, Reutlingen
Laborwasser Aufbereitungssystem, MobilRO 30-90	

	Werner, Leverkusen
Mikroskop, Axioskop 2 MOT	Zeiss, Oberkochen
Kamera für Durchlicht. DT5	Olympus, Hamburg
Software AnalySIS 5.0	SIS, Münster
Kamera für Fluoreszenz, MicroMAX	Trenton, USA
Software Metamorph 4.6r9	Visitron Systems GmbH, Puchheim
Mikroskop, Orthoplan	Leitz, Wetzlar
Mikrotom, Typ:355S	Microm, Walldorf
Mikrowelle	Samsung, Seoul
Mikrospritzen	Hamilton, Nevada
pH Meter, Typ 300	Beckman, Stanford
Schlauchpumpe	Meredos, Bovende
Schüttelwasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Tischzentrifuge, Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau
Tischschüttler	Scientific Industries, New York

3.1.2 Chemikalien

3.1.2.1 Antikörper und Detektionsreagentien

Kaninchen:	Anti-PAX2 Antikörper	Zymed Laboratories /Invitrogen, Carlsbad
	Anti-STRIATIN Antikörper	Upstate/Millipore Corp, Billerica
	Anti-SOX10 Antikörper	von Prof Wegner überlassen
	Anti-TCF712 Antikörper	Upstate/Millipore Corp, Billerica
Maus:	Anti-MBP	Serotec, Oxford
	Anti-GFAP	ICN Biomedicals, Ohio
	Anti pan-TUBULIN	Sigma, Deisenhofen, Steinheim
	Anti SYNAPTOTAGMIN1	Synaptic Systems, Göttingen
Schaf:	Anti-Digoxigenin Fab	
	Alkalische Phosphatase Fab	Roche, Mannheim
	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat(BCIP)	Sigma, Deisenhofen
	Diaminobenzidine (DAB)	Sigma, Deisenhofen
	Nitroblue tetrazolium (NBT)	Sigma, Deisenhofen

3.1.2.2 Nukleinsäuren und Aufreinigungskits

1 Kilobase (kB)-Leiter	Live Technologies, Karlsruhe
Bäckerhefe t-RNA (yt RNA)	Roche, Mannheim
DIG-RNA Labeling Mix, 10x	Roche, Mannheim
d NTP	Roche, Mannheim
Heringssperma	Sigma, Deisenhofen, Steinheim
Qiaprep Miniprep und Midiprep Kit	Qiagen, Hilden

3.1.2.3 Modifizierende Enzyme

Restriktionsendonukleasen

Acc I; Bam H I; Hind III; Not I; Pst I; Pvu II; Xba I

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

T3 RNA- Polymerase	Roche, Mannheim
T7 RNA- Polymerase	Roche, Mannheim
Taq- DNA- Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.1.2.4 Sonstige Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen Merck (Mannheim) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen), wenn nicht anders angegeben.

Agarose (Seakem [®] LE Agarose)	Biozym, Hessisch Oldendorf. FMC
Blockierungsreagenz	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	
BSA	Roche, Mannheim
Calciumchlorid-Dihydrat [CaCl ₂ *H ₂ O]	
Dextransulfat	
Diaminobenzidin Tetrachlorid	
Diethylpyrocarbonat (DEPC/C ₆ H ₁₀ O ₅)	
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	
Dithiotreitol (DTT)	
Essigsäure, 37 %	

Essigsäureanhydrid
 Ethanol
 Ethidiumbromid [$C_{21}H_{20}N_3Br$]
 Ficoll
 Formaldehyd
 Formamid
 Histowax
 Kaliumchlorid
 Kaliumhydrogenphosphat [KH_2PO_4]
 Lichtfilm, Bio Max Kodak, Rochester
 Magnesiumchlorid-Hexahydrat [$MgCl_2 \cdot 6H_2O$]
 Magnesiumsulfat-Heptahydrat [$MgSO_4 \cdot 7H_2O$]
 Methanol
 Methylbenzoat
 Methylgrün
 3-(N morpholino) Propansulfonsäure (MOPS)
 Natriumacetat
 Natriumhydrogencarbonat [$NaHCO_3$]
 Natriumhydroxid- Plättchen
 Natriumhydrogenphosphat [$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$]
 Nylonmembran, , Hybond N+ Amersham/Nycomed, Zürich
 Objektträger
 Paraformaldehyd
 Paraplast
 Pikrinsäure
 Polyvinylpyrrolidon (PVP)
 Propanol
 Proteinase K Live Technologies, Karlsruhe
 Saccharose
 Salzsäure, rauchend
 Tertiär-Amylalkohol
 Transfermembran Millipore Corp, Billerica

Triethanolamin (TEA)
Tri-Natriumcitrat-dihydrat
Triton-X 100
Wasserstoffperoxid 30 %
Xylol

3.1.3 Lösungen:

Acetylierungslösung:

0,25 % (v/v) Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin

Alkalische Phosphatase-Substratlösung (AP-Substrat):

3,3 µl BCIP (5-Brom-4-chloro-3-indolylphosphat)

6,6 µl NBT (**Nitro**blautetrazoliumchlorid)

1ml Entwicklungspuffer

Aprotinin Stocklösung:

1 mg APROTININ

1ml mM Hepes pH:8,0

Lagerung bei -20 °C

Avertin 40X Stocklösung:

10g Tribromoethylalkohol gelöst in 10ml tert-Amylalkohol

bei Gebrauch 1:40 in 0,9 % NaCl Lösung verdünnt

BCIP-Stocklösung:

50mg BCIP in 1ml Dimethylformamid (DMFA) gelöst

Lagerung bei -20 °C

Blockierlösung für Anti-DIG Fab:

2 % (w/v) Lösung

2 g Blockierungsreagenz in MAB-Puffer

50x Denhardt's:

1 % (w/v) BSA

11 % (w/v) Ficoll

0,3 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP)

Entwicklungspuffer:

100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH:9,5

10x Hybridisierungssalz:

4 M NaCl, 200 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH:7,5

Ladepuffer:

50 % Glycerol, 1 mM EDTA, 0,4 % Bromphenolblau, 0,4 % Xylencyanolblau

LB-Medium :

9 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl

Das Medium wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

LB-Medium/Ampicillin:

50 µg/ml Ampicillin in LB-Medium

Leupeptin Stocklösung

1mg Leupeptin

1ml H₂O

Lagerung bei -20 °C

Maleinsäurepuffer (MAB-Puffer):

100 mM Maleinsäure, 150mM NaCl, pH:7,5

Membranpermeabilisierungslösung I:

0,2 M HCl in H₂O_{bidest}

Membranpermeabilisierungslösung II:

0,5 % (v/v) Triton X-100 in PBS

10x MOPS:

0,2 M 3-(N morpholino) Propansulfonsäure (MOPS)

0,08 M Na-Acetat

0,01 M EDTA, pH 7,0

NBT-Stocklösung:

50 mg NBT in 700 µl DMFA + 300 µl H₂O_{bidest} gelöst (Lagerung bei -20 °C)

Paraformaldehydstocklösung:

20 % (w/v) Paraformaldehyd in H₂O(DEPC) mit NaOH auf 55 °C erwärmt und gelöst, anschließend mit 1/10 Volumen 10x PBS versetzten pH:7,4 einstellen

10x PBS

1,37 M NaCl, 0,02 M KCl, 0,1 M Na₂HPO₄, 0,02 M KH₂PO₄, pH:7,4

Peroxidase (endogener) Blockierlösung:

4 % (v/v) H₂O₂ in 10 % (v/v) Methanol

Proteinextraktion Puffer1:

1,0 ml 1M Tris-HCl, pH:8,0

5,0 ml Salz Mix

31,5 ml H₂O (Ampuva)

Proteinextraktion Puffer2:

950µl Proteinextraktion Puffer1

25µl Aprotinin Stocklösung

25µl Leupeptin Stocklösung

20x SSC:

3M NaCl, 300 mM Na-Citrat

Ringer-Lösung:

8,00g NaCl, 0,2 g KCl, 1,00 g NaHCO₃, 0,22 g CaCl₂ ad 1000ml mit H₂O_(bidest)

Salzlösung (50ml):

100 mM NaCl = 0,295g NaCl

100 mM KCl = 0,3728g KCl

30 mM MgCl₂ = 0,1428g MgCl₂ Hexahydrat

auf 50ml Lösung mit H₂O auffüllen

TE Lösung:

10mM Tris und 1mM EDTA pH 9 ja für die Kernfärbung

3.2 Versuchstiere

Alle Gewebeproben wurden Mäusen entnommen. Hierfür wurden männliche, hemizygot L7En-2 Tiere auf dem Hintergrund FVB/N gezüchtet und mit weiblichen FVB/N Mäusen verpaart. Die Haltungsbedingungen entsprachen den geltenden Tierschutzrichtlinien (TSchG, 2005). Die Elterntiere wurden ad libidum gefüttert und hatten einen Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden Helligkeit und Dunkelheit. Der Tag der Geburt wurde als Postnataltag 0 festgelegt. Letzterer entsprach im Durchschnitt dem 19.Tag der Schwangerschaft. Als Adult galten Tiere, die älter als 2 Monate waren.

3.3 Genotypisierung der Versuchstiere anhand von Schwanzbiopsien

Zur Genotypisierung der Versuchstiere wurde bei juvenilen Mäusen 2 mm des Schwanzes, bei adulten Tieren aufgrund der stärkeren Verknöcherung und dem deswegen geringeren DNA-Gehalt ca. 4 mm kupiert. Pro Schwanzspitze wurde 0,2 ml

Lysispuffer (50 mM Tris HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 0.5 % SDS) und 10 µl Proteinase K (Stammlösung 10 µg/µl) zugegeben. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 55 °C unter Schütteln inkubiert.

Nachdem sich die Schwanzspitzen völlig aufgelöst hatten, wurde zu dem Lysat ein Volumen Phenol (Tris äquilibriert) zugegeben, geschüttelt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einem Vol. eines Phenol / Chloroform Gemisches (jeweils in selben Anteilen) versetzt. Nach erneutem Schütteln und Zentrifugieren wurde die DNA in der wässrigen Phase durch die Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 1 Vol. Ethanol abs. und mehrfachen Invertieren des Reaktionsgefäßes gefällt. Anschließend wurde die DNA 8 min bei 13000 U/min abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Präzipitat mit 400 µl 70 % Ethanol gewaschen und wieder zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstand wurde die DNA für ca. 2 min in einer Vakuumpumpe getrocknet und in 50 µl H₂O gelöst.

Die Genotypisierung erfolgte über PCR, wobei die Primer Teile des *L7* Promotors und des *en-2* Gens umspannten. Um zu vermeiden, dass sich unspezifische Produkte amplifizierten, wurde der Reaktionsansatz (Mix 1) zuerst bei 94 °C denaturiert, erst dann erfolgte die Zugabe des Enzyms (Mix 2).

PCR-Ansatz für die L7En-2 Genotypisierung:

Mix 1 :	10x Puffer	1,5µl
	dNTP (10 mM)	0,4µl
	5' Primer (L7En-2_F)	0,5µl
	3' Primer (L7En-2_R)	0,5µl
	DMSO	0,8µl
	H ₂ O	10,3µl
	DNA	1µl
Mix 2 :	Taq- Polymerase (cc)	0,2 µl
	10x Puffer	0,5 µl
	H ₂ O	4,3 µl

Als Primer wurden folgende Sequenzen eingesetzt:

5'Primer(*L7 en-F*):5' AAGAATTCTAGGTAAGGATTTAGGGGCACTTCTGAG 3'

3'Primer(*L7 en-R*):5' AGTTGGTGATGCGATGTGGATGCTC 3'

Zum Start des PCR –Programms wurden die Proben 3 Minuten auf 94 °C erhitzt und anschließend auf +80 °C abgekühlt. Während diesem PCR-Schritt wurde der Mix 2 hinzugefügt und dann 30 PCR-Zyklen durchgeführt. Jeder Zyklus durchlief folgende Schritte: je 60 sec bei 90 °C (Denaturierung), 60 sec bei 63 °C (Anlagerung der Primer), gefolgt von 90 sec 72 °C (Synthesereaktion). Den Abschluss der Zyklen bildete eine 10 minütige Synthesereaktion bei 72 °C. Ein Ansatz ohne DNA diente als Negativkontrolle. Die PCR- Produkte wurden durch DNA-Gelelektrophorese in einem 1 % Agarosegel analysiert. Für die Herstellung des Gels wurde die Agarose in dem 1x TBE Puffer aufgekocht und gelöst. Für den DNA-Nachweis wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Die DNA- Proben wurden mit 6x Ladepuffer (allgemeine Lösungen) versetzt und in 1x TBE bei 100 V in der Gelkammer (Biorad) elektrophoretisch aufgetrennt.

3.4 Perfusionsfixierung von Gewebe für die in situ Hybridisierung und Immunhistochemie

Für die Perfusionsfixierung wurden die Tiere je nach Altersstufe mit 0,1 – 0,5 ml Avertin (2,5 %) narkotisiert (Tab. 1) und das Herz durch Eröffnen des Thorax entlang der unteren Thoraxapertur freigelegt. Bei den jüngeren Tieren, Postnataltag 0 bis 15 (P0-P15), wurde zunächst das rechte Herzohr durch einen kleinen Schnitt eröffnet und dann die Perfusionskanüle in die Spitze des linken Ventrikel eingeführt. Bei älteren Tieren wurde das Herz an der Spitze des linken Ventrikels eingeschnitten, eine Rundkopfkannüle eingeführt. Dann wurde das rechte Atrium angeschnitten. Über eine Perfusionspumpe mit einer Durchflussrate von 10 ml/min bei Neugeborenen bis fünf Tage alten Tieren, von 12ml/min bei sieben bis 15 Tage alten Mäusen und von 17 ml/min bei adulten Tieren wurde dann über den Körperkreislauf das Blut sukzessive

durch Fixans ersetzt. Zunächst wurde mit 5-30 ml Ringerlösung, dann mit der Fixierlösung (zwischen 15 und 60 ml PFA/FA) perfundiert.

Alter Id Nr.	Genotyp	Alter Id Nr.	Genotyp
P0 87/6	Wt	P7 256/1	Wt
P0 87/5	L7En-2	P7 256/2	L7/En2
P0 121/10	L7En-2	P9 160/1	Wt
P0 121/9	Wt	P9 160/2	Wt
P0 150/11	L7En-2	P9 160/3	L7En-2
P0 150/4	Wt	P11 45/8	
P3 79/5	L7En-2	P11 45/9	
P3 79/4	Wt	P11 34/6	L7En-2
P3 79/3	L7En-2	P11 34/7	Wt
P7 157/4	Wt	P15 72/4	Wt
P7 157/2	Wt	P15 72/3	L7En-2
P7 157/3	L7En-2	P15 86/8	Wt
P7 151/5	Wt	P15 86/7	L7En-2
P7 151/8	L7En-2	P17 294/1	
P7 151/4	L7En-2	P17 294/	
P7 151/9	Wt	Adult 197/3	L7En-2
P7 151/6	L7En-2	Adult 197/4	Wt

Tab. 1: Tabellarisch Aufzählung der eingesetzte Tiere mit Alter, Identifikationsnummer und Genotyp

Im Anschluss wurde das Gehirn aus dem Schädel präpariert und anhand der Gehirnmorphologie der Erfolg der Perfusion überprüft. Das Gehirn wurde in das gleiche Fixans überführt und vier Stunden immersionsfixiert. Nach dieser Postfixierung mussten die Formalaldehyd-fixierten Gewebe noch mindestens einen Tag in Leitungswasser gewässert werden, um das Fixans wieder herauszuwaschen. Für die Einbettung wurden die Gehirne in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dann wurde das Gewebe mittels des Einbettautomaten Tissue Tek III über mehrere Lösungswechsel von Methylbenzoat und flüssigem Paraplast in letzteres überführt.

Einbettprotokoll für Mausgehirne:

30 min 70 % Ethanol

30 min 70 % Ethanol

30 min 80 % Ethanol	30 min 80 % Ethanol
45 min 96 % Ethanol	20 min 100 % Ethanol
20 min 100 % Ethanol	45 min Methylbenzoat
45 min Methylbenzoat	45 min Methylbenzoat
45 min Paraplast	45 min Paraplast
Paraplast bis zum Ausbetten.	

Die Gehirne wurden nun in mit Paraplast gefüllte Plastikförmchen überführt und parallel zur Blöckchenkante ausgerichtet. Nach Aushärtung des Paraffins wurden die Geweblöckchen am Microtomhalter montiert und in sagittaler Ebene geschnitten. Die 10 µm dünnen Schnitte wurden einige Minuten auf einer ca. 40 °C warmen Wasseroberfläche gestreckt und auf Adhäsionsobjektträger aufgezogen. Danach wurden sie für mindestens 24 Stunden bei 37 °C getrocknet.

3.5 IsH Sonden

Alle Arbeiten mit RNA wurden mit Handschuhen durchgeführt. Die Pinzetten und die Arbeitsfläche wurden mit Propanol abgewischt. Die Glaswaren wurden bei 200 °C in einem Wärmeschrank sterilisiert.

Die Lösungen wurden mit 0,05 % (v/v) DEPC für 12h bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Entfernung des DEPC autoklaviert.

Die Sonden wurden mir von Herrn Dr. Martin Holst zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen sollen hier aber kurz erwähnt werden, da sie für die Beurteilung der Versuche von Bedeutung sind und noch nicht publiziert sind.

Rac 1 IsH anti-sense Sonde:

ACCCGGATACCCTGTGTCGACCTGTTCTTCTAATACTGTCTAACGCAGGGGAGAGGATGGGCGTCTG
TCTGCACAAGAATTAACGAAAAGGGAACACTCAGGACGTAGTAACTTTTACAGGCACGTTTCACCA
TAGGACTTCACGCTGTGGTGACAGGGTTATGAGGATAGTAGGAGCACCCCTGCTTCGAACTAGAATC
CCTACTATTCTGTGGTAACTCTTCGACTTCCTCTTCTTCGACTGGGGGTAGTGGATGGGCGTCCCC
GACCGGTACCGCTTTCTCTAGCCACGACAGTTTATGGACCTCACGAGTTCGAGAGTGTGTCGCTCCTG

AGTTCTGTCACAACTGCTTCGATAGGCTCGCCAAGAGACAGGGGGAGGACAGTTCTTCTCCTTCTC
TTTTACGGACGACAACATTTACAGCCTCGG**GGAGCAAGAGCCAGGACGGAC**

Rac1 IsH sense Sonde:

TGGGCCTATGGGACACAGCTGGACAAGAAGATTATGACAGATTGCGTCCCCTCTCCTACCCGCAGAC
AGACGTGTTCTTAATTTGCTTTTCCCTTGTGAGTCCTGCATCATTTGAAAATGTCCGTGCAAAGTGGTA
TCCTGAAGTGCAGACCACTGTCCCAATACTCCTATCATCCTCGTGGGGACGAAGCTTGATCTTAGG
GATGATAAGGACACCATTGAGAAGCTGAAGGAGAAGAAGCTGACCCCATCACCTACCCGCAGGGG
CTGGCCATGGCGAAAGAGATCGGTGCTGTCAAATACCTGGAGTGCTCAGCTCTCACACAGCGAGGA
CTCAAGACAGTGTTTGACGAAGCTATCCGAGCGGTTCTCTGTCCCCCTCCTGTCAAGAAGAGGAAGA
GAAAATGCCTGCTGTTGTAAATGTCGGAGCC**CCTCGTTCTCGGTCTGCCTG**

Rac3 IsH anti-sense Sonde:

GGAACTCTTACAGGCACGGTTCACCATGGGTCTCCACGCCGTGGTGACGGGTGTGTGTGGGTAGG
AAGACCACCCGTGGTTCGACCTGGAGGCACTACTGTTCTATGCTAACTTGCCGACGCCCTGTTCTT
CGACCGTGGGTATTGGATGGGGGTTCCGGACCGGTACCGGGCTCTCTAACCAAGGCAGTTCATGGA
CCTCACGAGTCGAGACTGGGTCTCTCCAGACTTCTGTACAAGCTGCTCCGGTAGGCCCGACACGA
GACGGGTGGAGGTCACTTTTTTCGGTCCGTTCTTACGTGACATAAGATCTCGGAACGGACCGGTCCG
ACCGAGTCTCGCGACCGAGTTCATCCGCGAGCACAACCTCGACACACTACAGGGACTCAGACGACA
CCCCACACCACCCACCCGTCCCC**TTCGTA**CTCCTGTTCCGACCC

Rac3 IsH sense Sonde:

CCTTTGAGAATGTCCGTGCCAAGTGGTACCCAGAGGTGCGGCACCACTGCCACACACACCCATCCT
TCTGGTGGGCACCAAGCTGGACCTCCGTGATGACAAGGATACGATTGAACGGCTGCGGGACAAGAA
GCTGGCACCCATAACCTACCCCAAGGCCTGGCCATGGCCGAGAGATTGGTTCGGTCAAGTACCT
GGAGTGCTCAGCTCTGACCCAGAGAGGTCTGAAGACAGTGTTGACGAGGCCATCCGGGCTGTGCT
CTGCCACCTCCAGTGAAAAAGCCAGGCAAGAAGTGCACTGTATTCTAGAGCCTTGCTGGCCAGCC
TGGCTGCAGAGCGCTGGCTCAAGTAGGCGCTCGTGTGAGCTGTGTGATGTCCCTGAGTCTGCTGT
GGGAGTGGTGTGGGTGGGCAGGGG**AAGCATGAGGACAAGGCTGGG**

Strn IsH sense Sonde:

CAAGAGCTGGGAATTCCTGCCTCTGTGGATCTGGTGAGCAGCGACCCGAGCCATATGGTAGCATCG
TTAGCAAGGGATATAAGCATCTTTAACATGGAGACACAGCAGCGAGTTCTCACGCTAGAATCCAA
TGTTGATTCAACATCCAGTTCTTCTGCCAAATAAACAGAGTCATCAGCCATCCTACCCTCCCAATCA
GCATCACCGCTCATGAAGACAGGCACATCAAGTTCTACGATAACAATACAGGCAAACCTGATCCACTC

GATGGTGGCCACCTGGAAGCTGTGACAAGCCTGGCAGTTGACCCGAATGGCCTCTACTTGATGTCT
GGCAGTCATGACTGTTCAATACGCTTATGGAATTTAGAAAGTAAGACATGTATCCAGGAGTTCACAGC
TCATCGGAAGAAATTTGAAGAATCGATCCACGATGTAGCATTCCACCCTTCCAAGTGCTATATAGCCA
GCGCTGGAGCCGACGCCCTGGCTAAGGTCTTTGTATGATGNGGCACAGCAGCTTCACCTTGTAGCT
CTTTATAAAAGTCAACTGCACAACAGAGATACGGAAG**ACCAGGGCAAGAATCAGCTCG**

Strn IsH anti-sense Sonde:

GTTCTCGACCCCTTAAGGACGGAGACACCTAGACCACTCGTCGCTGGGCTCGGTATACCATCGTAGC
AAGTCGTTCCCTATATGTTTCGTAGAAATTGTACCTCTGTGTCGTCGCTCAAGAGTGCGATCTTAGGTT
ACAAC TAAGTTGTAGGTCAAGAAGGACGGTTTATTTGTCTCAGTAGTCGGTAGGATGGGAGGGTTAG
TCGTAGTGGCGAGTACTTCTGTCCGTGTAGTTCAAGATGCTATTGTTATGTCCGTTTACTAGGTGAG
CTACCACCGGGTGGACCTTCGACACTGTTCCGACCGTCAACTGGGCTTACCGGAGATGAACTACAGA
CCGTCAGTACTGACAAGTTATGCGAATACCTTAAATCTTTCACTGTACATAGGTCCTCAAGTGTCGA
GTAGCCTTCTTTAACTTCTTAGCTAGGTGCTACATCGTAAGGTGGGAAGGTTACGATATATCGGTC
GCGACCTCGGCTGCGGGACCGATTCCAGAAACATACTACNCCGTGTGTCGTCGAAGTGGAACATCGAG
AAATATTTTCAGTTGACGTCTTGTCTCTATGCCTTCT**TGGTCCCGTTCTTAGTCGAGC**

Diese Gene wurden aufgrund von Array-Studien als in L7En-2 differentiell exprimiert identifiziert (Holst et al., 2008). DIG-markierte sense und antisense mRNA Proben wurden entweder anhand von Plasmiden mittels *in vitro* Transkription, oder anhand von PCR Produkten hergestellt. In beiden Fällen waren die Zielsequenzen von RNA-Polymerasepromotoren flankiert (gelb). Die antisense Proben dienten als spezifische Sequenzen, die an endogene mRNA hybridisieren. Sense Proben sollten kein Signal ergeben und wurden entsprechend als Negativkontrolle eingesetzt. Um den einwandfreien technischen Ablauf der *in situ* Hybridisierung zu kontrollieren, wurden *Parvalbumin* antisense-Sonden (in Tieren ab einem Alter von 3 Tage) und *Crmp1* antisense-Sonden (in Gewebe von P0 und P3 Mäusen) eingesetzt.

3.6 Histologische Techniken

3.6.1 In situ Hybridisierung

Mit der *in Situ* Hybridisierung werden mRNA Sequenzen im Gewebe (*in situ*) nachgewiesen. Die IsH wurde auf Paraffinschnitten vorgenommen. Um das Gewebe für die Sonden zugänglich zu machen, müssen die auf den Objektträgern haftenden Paraffinschnitte entparaffiniert und für die Hybridisierung vorbehandelt werden. Dazu führten wir folgende Schritte durch:

Nach Äquilibration in PBS wurde das Gewebe nachfixiert und erneut in PBS gewaschen. Die Acetylierung des Gewebes dient zur Neutralisierung positiv geladener Ionen, welche negativ geladenen Nucleinsäuren unspezifisch binden würden. In den folgenden Schritten wurde das Gewebe mit SSC Puffer äquilibriert, so dass die Hybridisierungslösung auf die Schnitte gegeben werden konnten. Da die Hybridisierungslösung eine hohe Viskosität besitzt, wurden die Objektträger in den folgenden Schritten erwärmt. Es ist allerdings darauf zu achten, dass dabei das Gewebe nicht austrocknet.

Die Arbeitsfläche wurde vor den nächsten Schritten mit 70 % Propanol gereinigt.

Die Sonden wurden in 1xSSC(DEPC) 1:100 vorverdünnt.

Ein Hybridisierungsmix aus:

- 15 µl Sondenvorverdünnung (Endkonz.= 1:10000),
- 3 µl 4M DTT (2µl/100µl), und
- 132 µl Hybridisierungslösung

wurde gemischt, und für 5 Minuten bei 80 °C im Heizblock denaturiert. Danach wurden sie auf Eis gekühlt. 150µl Hybridisierungslösung wurde auf jeden umrahmten Gewebeschnitt aufgetragen. Anschließend wurden die GeneFrames mit einem Deckglas verschlossen. Danach erfolgte die Inkubation für 16 Stunden (über Nacht) in einer feuchten Kammer bei einer Temperatur von 67,5 °C bis 70 °C. Am nächsten Tag wurde die ungebundene mRNA durch stringente Waschbedingungen vom Gewebe gewaschen. Vor der immunhistochemischen Detektion der Digoxigenin-markierten Sonden wurden die Gewebeschnitte für 5 Minuten in MAB-Puffer äquilibriert. Unspezifischen Protein Bindungsstellen wurden anschließend für 30-60 Minuten mit 2 % (w/v) Blockingreagenz von Roche blockiert. Die immunhistochemische Detektion der

Digoxigenin-markierten Sonden erfolgte über Nacht bei 4 °C mit dem 1:5000 verdünnten (1µl/5ml Blockierungslösung) Anti-Digoxigenin AP Fab-Fragment.

Der Antikörper wurde am nächsten Tag von den Gewebeschnitten in vier Waschschritten zu je einer Stunde in MAB-Puffer abgewaschen. Vor der Entwicklung erfolgte die Äquilibration der Gewebeschnitte für 1h in Entwicklungspuffer. Die Farbentwicklung erfolgte über 3 bis 7 Tage in der NBT/BCIP Entwicklungslösung.

Die Reaktion wurde für ein antisense-sense-Paar gleichzeitig abgestoppt, wenn der Kontrast zwischen der sense- und antisense-Probe am größten war. Dabei wurde die Entwicklungslösung mit Leitungswasser von den Objektträgern abgewaschen.

Zur Konservierung der Ergebnisse wurde das Wasser von den Objektträgern abgeschüttelt, und die Gewebeschnitte mit Mowiol eingedeckelt.

3.6.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode zum Nachweis von Proteinen im Gewebe oder in Zellkulturen. Sie basiert auf der Antigen-Antikörper-Reaktion. Die IHC wurde auf Paraffinschnitte vorgenommen. Um das Gewebe für die Antikörper zugänglich zu machen, mussten die Proben entparaffiniert und hydriert werden. Dies wurde durch drei Waschschrritte mit Xylol und der Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 90 %, 80 %, 75 %, 50 %, 25 %) erreicht. Viele Antikörper erkennen nur denaturierte Antigene. Deshalb wurde das Gewebe bei 80 °C in 2xSSC für 8 bis 12 Minuten, je nach Antigen, erhitzt. Durch diese Behandlung geht die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine verloren. Alternativ wurden Proben zur Denaturierung für 2 x 5 min bei 500 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Es folgte nun das Blocken der endogenen Peroxidase, wofür die Proben für 10 Minuten in 1 % H₂O₂ / 10 % Methanol in 1xPBS inkubiert wurden. Die folgenden Behandlungen mit Proteinase K und Triton X100 dienen der Permeabilisierung des Gewebes, womit die Zugänglichkeit des Antikörper zum Antigen verbessert wird. Zur Blockierung der unspezifischen Proteinbindung wurden die Gewebeschnitte für 30 bis 60 Minuten in 2 % w/v BSA in 1xPBS Lösung inkubiert. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgt bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer.

Die Antikörperverdünnung wurde empirisch bestimmt und wird in 2 % w/v BSA in 1xPBS durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die überflüssige Antikörper Lösung mit 1x PBS Lösung abgewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper für 1 bis 2 Stunden in einer 1:300 Verdünnung in 2 % (w/v) GS in 1x PBS. Danach wurde ungebundener 2ter Antikörper durch dreimaliges, 15 minütiges Waschen mit 1x PBS entfernt.

Bei einer IHC mit fluoreszierenden Detektionsreagentien wurden die Präparate anschließend mit Mowiol eingedeckelt.

Für die DAB HRP-IHC wurden die Präparate nach dem Abwaschen des ungebundenen 2. Antikörpers für 45 bis 60 Minuten im ABC-Reagenz inkubiert. Ungebundenes Streptavidin wurde dreimal für fünf Minuten mit 1x PBS abgewaschen. Der gebundene Peroxidase-Streptavidin-Biotin-Komplex ermöglicht nun die Färbung der Antigen-gebundenen Antikörper. Für die Farbentwicklung wurden die Schnitte für 1 bis 30 Minuten mit einer Lösung aus 0,05 % DAB, und 3 % H₂O₂ in 1 x PBS inkubiert. Die Farbreaktion wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und nach ausreichender Färbung in 1xPBS gestoppt. Die Präparate wurden nun mit klassischen histochemischen Methoden (Hämalumfärbung) gegengefärbt. Zur Sicherung der Präparate werden sie über eine aufsteigende Alkoholreihe (5 min 70 % Ethanol, 5 min 90 % Ethanol, 5 min 100 % Ethanol, 3 x 5 min Xylol) entwässert, und in Xylol überführt. Die Präparate konnten nun mit Depex, einem Harz, eingedeckelt werden.

3.6.3 Kombinierte In situ Hybridisierung und Immunhistochemie

Die *in situ* Hybridisierung wurde wie oben beschrieben vorgenommen (siehe Kapitel 2.6.1 *In situ* Hybridisierung). Nach dem Abstoppen der AP Reaktion mit Wasser, wurden die Präparate für 5 Minuten in 1xPBS Lösung Äquilibrierung. Es folgte eine Proteindenaturierung für 10 Minuten in 80 °C heißer 2xSSC Lösung (pH 7). Für eine anti-nukleäre Immunhistochemie eignete sich an Stelle des 2xSSC Puffers ein TE Puffer (pH 9). Um die endogene Peroxidase zu blockieren, wurden die Präparate für 10 Minuten in 10 % Methanol und 3 % H₂O₂ in 1xPBS getaucht. Wie im davor beschriebenen IHC Protokoll musste auch in diesem Protokoll die Zellmembran mit 0,25

% (v/v) verdünntem Triton X-100 in 1xPBS Puffer für 10 Minuten permeabilisiert werden. Vor der Inkubation mit dem 1. Antikörper wurden die unspezifischen Proteinbindungen mit verschiedenen Proteinlösungen, je nach Antigen wie folgt blockiert:

30 min 2 % BSA in 1xPBS (bei Pax2)

30 min 2 % GS in 1xPBS (bei NeuN, GFAP, MBP)

30 min 3 % GS, 4 % BSA in 1xPBS (bei TCF7L2, Sox10)

Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurde die überflüssige 1. Antikörper-Lösung in drei Durchgängen für 10 Minuten mit 1xPBS abgewaschen. Danach folgte die Inkubation mit einem 1:300 verdünnten und biotinylierten 2ten Antikörper in einer 2 %igen GS 1xPBS Lösung. Der nicht gebundene biotinylierte 2ten Antikörper wurde durch 3 Waschschriffe von 10 Minuten Länge mit 1xPBS entfernt. Es folgte eine 45 bis 60 Minuten lange Inkubation mit dem ABC-Reagenz, zur Bildung des Avidin Biotin Komplex. Nicht gebundenes Reagenz wurde in drei jeweils 5 Minuten langen Waschschriffen abgewaschen. Die Farbentwicklung wurde mit einem DAB-Reagenz bestehend aus 0,05 % DAB, und 3 % H₂O₂ in 1xPBS vorgenommen. Die Farbreaktion wurde nach spätestens 30 min durch gründliches Waschen mit 1xPBS abgestoppt. Zur Konservierung des Gewebematerials wurden sie mit Mowiol eingedeckelt.

Die hier beschriebene Methode wurde bereits mehrfach in der Literatur erwähnt (siehe z.B. Nagaso et al., 2001; Zaidi et al., 2000). Sie hat sich als Standard bisher allerdings nicht durchgesetzt. Gründe hierfür könnten sein, dass die morphologische Qualität durch die harschen Behandlungen während der IsH negativ beeinflusst wird, dass zweitens die Prozedur sehr zeitaufwendig ist, und drittens für jedes Protein etabliert werden muss. Tatsächlich sind Färbungen mit Antikörper gegen zytoplasmatische Proteine sehr diffizil und nicht immer aussagekräftig. Kombinationen von IsH-Signalen mit Immunkomplexen von nukleären Proteinen sind demgegenüber mit guter Qualität durchzuführen. Dies beruht sicherlich darauf, dass Kernproteine aufgrund der Lokalisation vom IsH Signal gut unterscheiden lassen. Ein Grund ist aber auch, dass die immunhistochemischen

Protokolle dem IsH Protokoll ähnlich sind und somit bessere Signale erwarten lassen und tatsächlich ergaben.

3.6.4 Neurocan-GFP Histochemie

Neurocan ist ein natürlich vorkommendes Proteoglykan, welches den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix im ZNS darstellt. Eine grundlegende Eigenschaft der Proteoglykane ist ihre positive chemische Ladung, über die sie mit der Hyaluronsäure Ionenbindungen eingehen. Diese Eigenschaft wurde bei dem hier durchgeführten, histochemischen Nachweis von Hyaluronsäure ausgenutzt. Durch eine Inkubation der Gewebeschnitte in einer schwach alkalischen Lösung (TBS mit einem pH von 8,0) wurden die ionischen Bindungen im Gewebe teilweise gelöst. Zum Nachweis der Hyaluronsäure wurde die Hyaluronsäurebindungsstelle des Neurocan mit dem Grünfluoreszierenden Protein fusioniert. Durch die Bindung des rekombinanten Neurocan konnte Hyaluronsäure grün fluoreszierend markiert werden (Zhang et al., 2004).

Im folgendem wird das Protokoll an Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten beschrieben. Wie in der Immunhistochemie werden die Gewebsschnitte mit Hilfe von Xylol entparaffiniert. Danach wird das Xylol in absteigenden Propanol/Wasser-Lösungen von den Präparaten abgewaschen und die Schnitte gewässert.

3 x 10 min Xylol

3 x 10 min 100 % Propanol

5 min 90 % Propanol

5 min 70 % Propanol

5 min PBS

Es folgte eine leichte Nachfixierung für 15 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd in 1xPBS (pH:7,4), die die Haftung der extrazellulären Matrix an das Objektträgermaterial verbessern half. Nach dreimaligem Waschen mit 1xTBS (pH 8,0) wurden unspezifische Proteinbindungen mit 2 % Ziegenserum für 1 Stunde blockiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit dem fluoreszent markierten Neurocan Molekül. Sie erfolgte

über Nacht bei 4 °C in einer Verdünnung von 0,5-0,625 U Neurocan-GFP/ml Blockierungsreagenz. Nicht gebundene Substanz wurde in vier Waschschrinen von jeweils 15 Minuten mit 1xTBS pH 8,0 gewegewaschen. Die Objektträger wurden mit Mowiol eingedeckelt, und das Ergebnis unter dem Fluoreszenz-Mikroskop begutachtet.

3.7 Auswertungsprotokolle

Zur Quantifizierung der *Striatin*-positiven Zellen im Kleinhirngewebe wurden drei Wildtyp Tiere und vier L7En-2 Tiere gefärbt. Anschließend wurden korrespondierende Schnitte der beiden Genotypen aus dem vermalen Abschnitt des jeweiligen Cerebellums mikroskopisch photographiert. Insgesamt gingen 120 Aufnahmen in die Auswertung ein. Alle Aufnahmen wurden am Axiovert-Mikroskop der Firma Zeiss bei gleicher Vergrößerung durchgeführt. Die Zellzahl der *Striatin*-positiven Zellen der einzelnen Präparate wurde mit Hilfe der „Cell Counter“ Funktion der Software ImageJ (Version 1.38X) und die Kleinhirinfläche wurde mit der Programmfunktion „Area“ desselben Programmes bestimmt. Mit SigmaPlot 2001 v.7.1 wurde ein Student's t-Test für die beiden Kollektive, Wildtyp und L7En-2 gemacht, sowohl für die absolute als auch für die relative Zellzahl.

4 Ergebnisse

4.1 Die Spezifität der Striatin IsH-Sonde

Die *in situ* Hybridisierung bietet als Nukleinsäurenachweis gegenüber den gängigen molekularbiologischen Ansätzen wie Northernblot oder PCR Techniken den Vorteil der zellulären Auflösung. Nachteilig ist gegenüber den molekularbiologischen Methoden die fehlende Größeninformation der nachgewiesenen mRNA. Deshalb ist für die Durchführung und Interpretation von *in situ* Hybridisierungen die Spezifität der verwendeten Sonden von zentraler Bedeutung. Da kein Gewebe mit fehlender Striatinexpression zur Verfügung stand, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Kontrollexperimente durchgeführt. Zum einen wurden neben den mRNA spezifischen antisense-Sonden sense-Sonden verwendet, die entweder kein Signal oder ein untypisch verteiltes Signalmuster ergeben sollten. Des Weiteren wurde das Expressionsmuster mit bereits beschriebenen Expressionsorten von *strn* aus der Literatur verglichen. Nachteil der IsH Methode ist zudem, dass sich unterschiedliche Gewebe je nach Fixierungsqualität und Immunnachweisqualität der markierten Sonden sehr heterogen färben. Zur Kontrolle der Gewebequalität wurden deshalb Gene verwendet, die entweder weitgehend ubiquitär exprimiert sind und damit alle Zellen/Neurone gleichermaßen färben sollten, oder solche Gene, von denen ein Unterschied in der Expression zwischen Wildtyp- und L7En-2-Tieren beschrieben wurden. Dazu gehörten die Zytoskelett-regulierenden Gene *rac1*, *rac3* als ubiquitär exprimierte Gene und das Tetraspaningen *tspan-5* als differentiell exprimiertes Gen (Juenger et al., 2005). Wie im Kapitel 3.4 zu lesen sein wird, gibt es noch weitere Argumente für die Auswahl der Gene.

Für die Untersuchungen der Sondenspezifität wurden jeweils aufeinanderfolgende Schnitte einer Schnittserie durch das Gehirn verwendet und immer benachbarte Schnitte mit sense- und antisense Proben markiert. Während die antisense-Sonden für alle hier untersuchten Gene ein zelluläres, zytoplasmatisch lokalisiertes Signal in definierten Gehirnabschnitten zeigten, führte die Hybridisierung mit den sense Sonden entweder zu

keinem oder zu einem schwachen, nicht ausschließlich zellulär lokalisierten Signal (Abb. 2). Die *tspan-5*-antisense und –sense Sonden verhielten sich entsprechend.

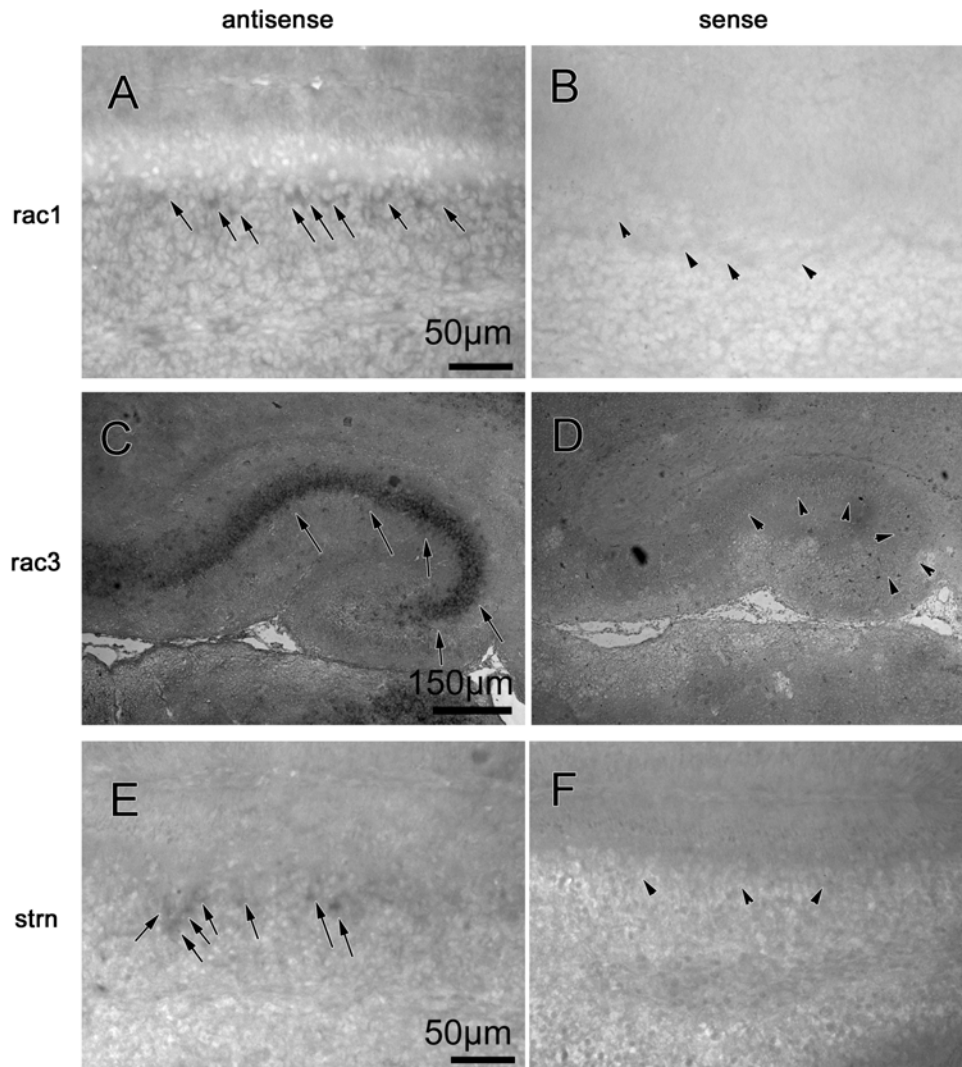


Abb. 2: IsH an Gehirnen von sieben Tage alten Wildtyp-Mäusen mit antisense (A, C, E) und sense Sonden (B, D, F) für die Gene *rac1* (A, B), *rac3* (C, D), und *strn* (E, F). Die Pfeile deuten auf IsH-positive Zellen und Areale, die Pfeilspitzen auf entsprechende Areale in benachbarten Gewebsschnitten, die mit sense-Probe behandelt wurden.

Ein Vergleich des Expressionsmusters der verschiedenen Gene mit bekannten Expressionsorten ergab ebenfalls eine sehr hohe Konkordanz.

rac1 wird ubiquitär in vielen Gehirnarealen exprimiert. Hier seien stellvertretend Kernregionen des Mittelhirns, der hippocampale und cerebrale Cortex, sowie der Thalamus und Bulbus olfactorii aufgeführt (Bolis et al., 2003). Dieses Expressionsmuster konnte in vergleichbarer Weise mit den hier verwendeten Proben dargestellt werden (Abb. 3).

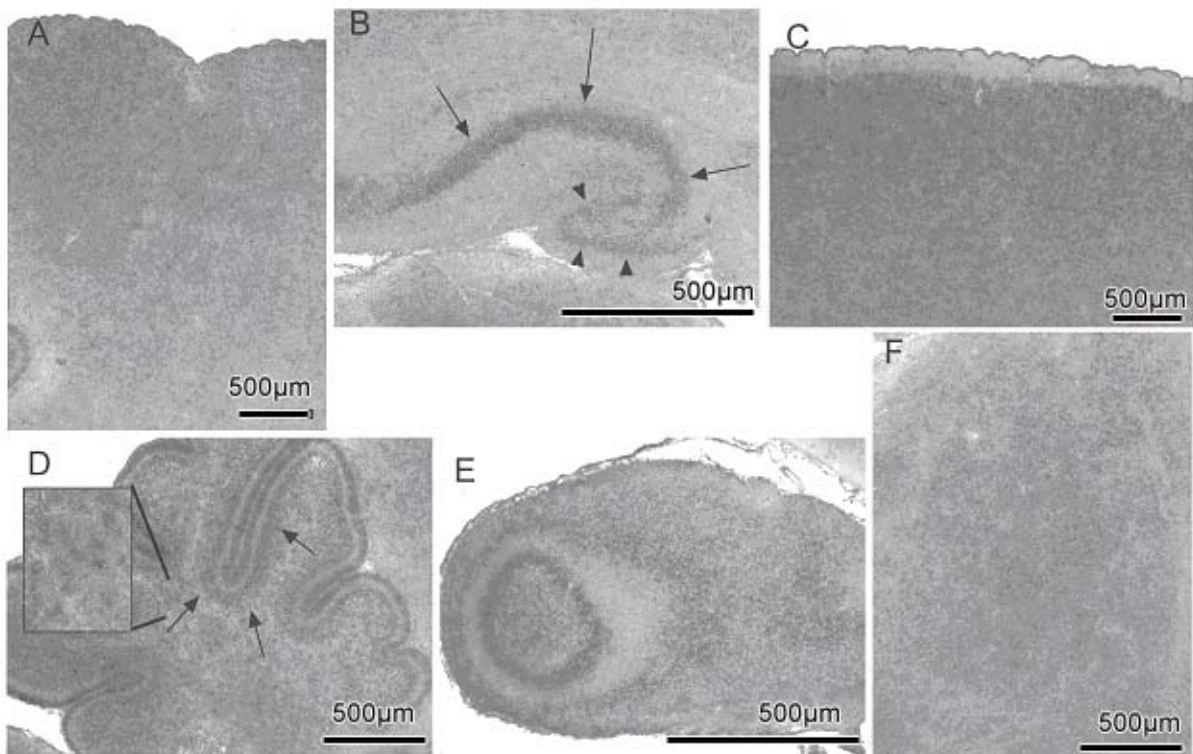


Abb. 3: ISH mit einer *rac1*-spezifischen Sonde an Hirngewebe von sieben Tage alten Mäusen. Die Aufnahmen zeigen eine Expression in der Vierhügelplatte (A), im Hippocampus in den Regionen CA1, CA2, CA3 (markiert durch Pfeile) und im Gyrus dentatus (Pfeilspitzen (B)), im Cortex cerebri (C), im Cerebellum mit ISH Signal im Cortex cerebelli (Pfeile) und diffus im Kleinhirnmark siehe Vergrößerungskasten (D), im Bulbus olfactorius (E), und im Thalamus (F).

rac3 wird außerhalb des Kleinhirns in der Medulla oblongata, im Hippocampus, im Thalamus, im Bulbus olfactorius und im Neocortex exprimiert (Bolis et al., 2003). In der Großhirnrinde bilden sich frontoparietal drei distinkte Zellschichten ab, die *rac3* mRNA exprimieren; occipital teilen sich diese Banden in sechs distinkte *rac3*-positive Zellschichten. Dieses Expressionsmuster konnte im Rahmen dieser Arbeit verifiziert

werden, womit die Tauglichkeit der verwendeten *rac3* Sonde nachgewiesen ist (Abb. 4).

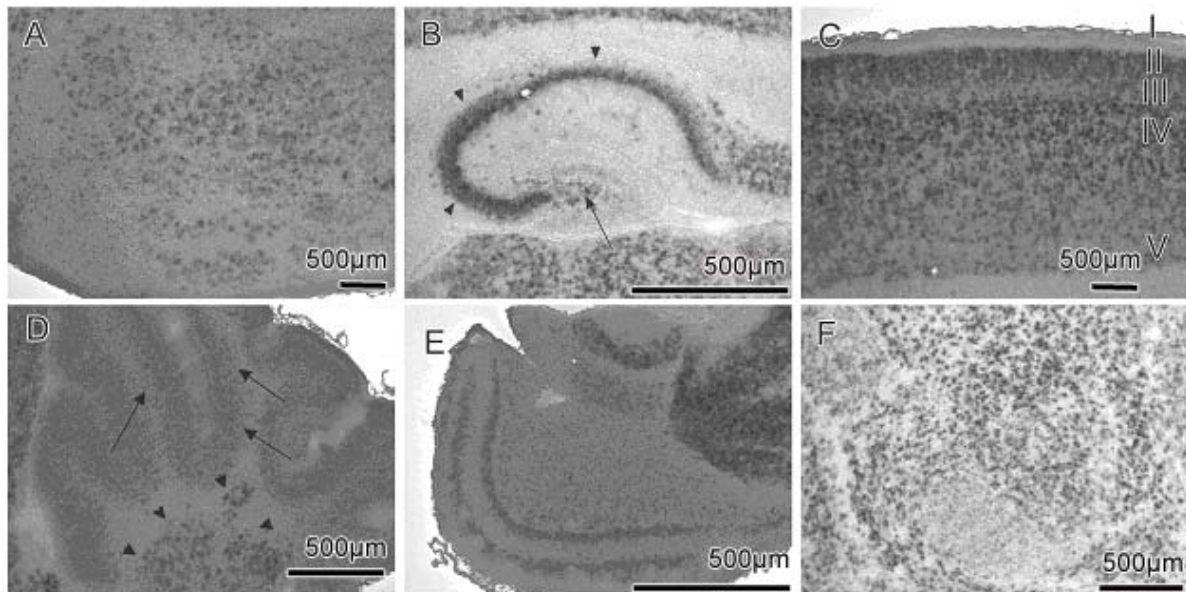


Abb. 4: IsH mit einer *rac3*-spezifischen Sonde an Hirnschnitten von sieben Tage alten Wt-Mäusen. Die Aufnahmen zeigen eine Expression im Hirnstamm (A), im Hippocampus mit Expressionen in den Regionen CA1, CA2, CA3 (Pfeilspitzen) und im Hilus fasciae dentatae (Pfeil) (B). Im Cortex cerebri ist eine Expression in allen Schichten zu erkennen mit erhöhter Expression in den Schichten II und IV (C). Zudem konnte ein deutliches IsH-Signal im Cerebellum (Pfeilspitzen deuten auf die tiefen Kerne, Pfeile auf das Stratum granulosum internum (D), im Bulbus olfactorius (E), und im Thalamus(F) nachgewiesen werden.

Den *Striatinen* werden derzeit drei Gene zugeordnet, die auf Gensequenzebene Homologien von 60-70 % aufweisen. Die hier verwendete *in situ* Hybridisierungssonde stammt aus dem kodierenden Bereich und umfasst teilweise die WD40 Domäne. Um die Spezifität der Sonde zu demonstrieren, haben wir die Verteilung der Signale mit Daten aus der Literatur verglichen. Während *strn* primär in Basalganglien, Hirnstamm und spinalen Motoneuronen exprimiert wird (Castets et al., 1996), wird *zinedin* in einem neuronal komplementären Expressionsprofil exprimiert. *SG2NA*, ein weiteres Mitglied dieser Familie, wird dagegen in unterschiedlichen Geweben, also auch außerhalb des Zentralnervensystems exprimiert. Nachgewiesen werden konnte eine Expression in der Herz- und Skelettmuskulatur, und im Lungengewebe (Castets et al., 2000).

In meinen Experimenten konnte ich *strn* Signale im Putamen (Abb. 5A), in der CA1, CA2, CA3 Region des Hippocampus (Abb. 5C) und in der Medulla oblongata (Abb. 5D), sowie schwächere Färbungen im Gyrus dentatus des Hippocampus (Abb. 5C), und in der Großhirnrinde (Abb. 5B) nachweisen. Eine *strn*-Expression war außerdem in den Neuronen des Kleinhirnkortex darzustellen (Abb. 5F). Dieses Expressionsmuster stimmte im Wesentlichen mit dem beschriebenen Muster von *strn* überein und spricht für die Nutzbarkeit der Sonde.

Auffällig waren allerdings zusätzliche, deutliche Signale in der weißen Substanz, die in mit sense-Probe markierten Gewebeproben nicht zu sehen waren (Abb. 2). Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die verwendete Probe die Expression des *strn* repräsentiert, und die Färbung der weißen Substanz einen bisher noch nicht beschriebenen Expressionsort darstellte.

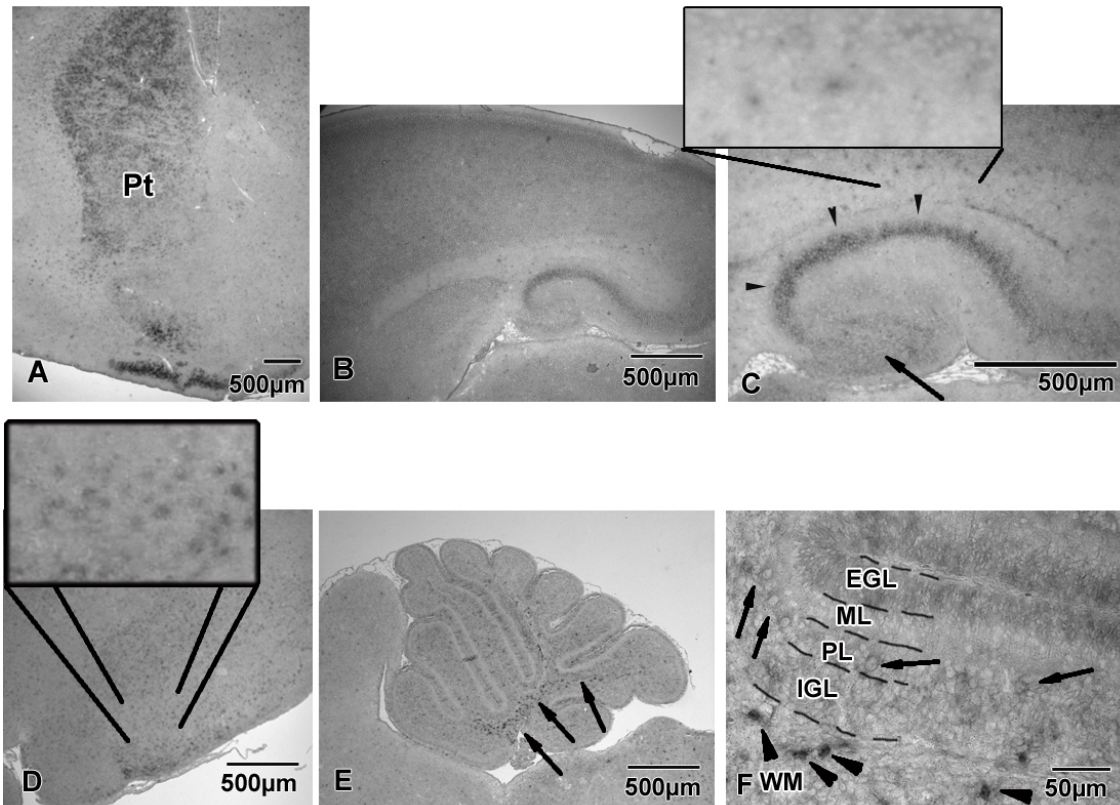


Abb. 5: IsH Nachweis der *strn* Expression im ZNS von sieben Tage alten Wt-Mäusen mittels einer *strn*-spezifischen IsH-Probe. Die Aufnahmen zeigen eine Expression in den Basalganglien: Putamen/Pt (A); im Cortex cerebri (B); im Hippocampus; in einzelnen Zellen des Balkens (siehe Vergrößerungskasten in C); sowie in der ventralen Medulla oblongata (D), und im Cerebellum (E,F). Hier stechen vor allem distinkte Signale in der weißen Substanz (WM) ins Auge (E); eine Vergrößerung des Kleinhirnpräparates zeigt eine Expression in der äußeren Körnerzellschicht (EGL), einzelne positive Purkinjezellen in der Purkinjezellschicht (PL, mit einem Pfeil markiert), sowie ein Signal in der inneren Körnerzellschicht (IGL) (F).

4.2 Das Expressionsmuster von Striatin-mRNA während der Kleinhirnentwicklung

Da eine *strn*-Expression in Zellen der weißen Substanz noch nicht beschrieben ist, sollte zur Verifikation der Daten zunächst der zeitliche Verlauf der Expression während der

postnatalen Entwicklung des Kleinhirns dargestellt werden. Dazu wurden Kleinhirnschnitte von Wildtyp-Mäusen unterschiedlichen Alters mit *strn*-spezifischen Proben hybridisiert und gefärbt (Abb. 6). Am dritten Postnataltag wurde *strn* weder in den PCs noch in Zellen der weißen Substanz exprimiert (Abb. 6A). Während dies auch nach 12 Tagen Inkubation mit dem Entwicklungsreagenz nicht der Fall war, konnte bereits am zweiten Tag ein spezifisches Signal mit einer Kontrollsonde gegen CRMP-1 nachgewiesen werden (Daten hier nicht gezeigt). In sieben Tage alten Tieren war ein deutliches zelluläres Signal zu sehen, das sich in Zellen nahe der tiefen Kerne und innerhalb der Lobuli befand (Abb. 6B, F). Diese Verteilung *strn*-positiver Zellen bestätigte sich in Schnitten von Tieren, die elf Tage nach der Geburt analysiert wurden (Abb. 6C, G). Die Zahl der positiven Zellen nahm allerdings deutlich zu. Die Zellen waren jetzt hauptsächlich in der WM, in den tiefen Kernen und innerhalb der Lobuli zu sehen. Im Vergleich zu P7 waren zunehmend mehr *strn*-positive Zellen in der grauen Substanz zu sehen. Obwohl sich einzelne *strn*-positive Zellen bereits in früheren Altersstufen in der IGL nachweisen ließen, konnten sie regelmäßig und in mehreren Lobuli erst ab dem 15ten Postnataltag dargestellt werden (Abb. 6D, E, H, I). Zusätzlich war ab dem elften Postnataltag eine deutliche Zunahme der Färbung in der IGL zu sehen. Dieses Färbemuster in der IGL war in adulten Tieren als prominentes Signal darstellbar, während die makrozellulären *strn*-positiven Zellen in der WM zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar waren.

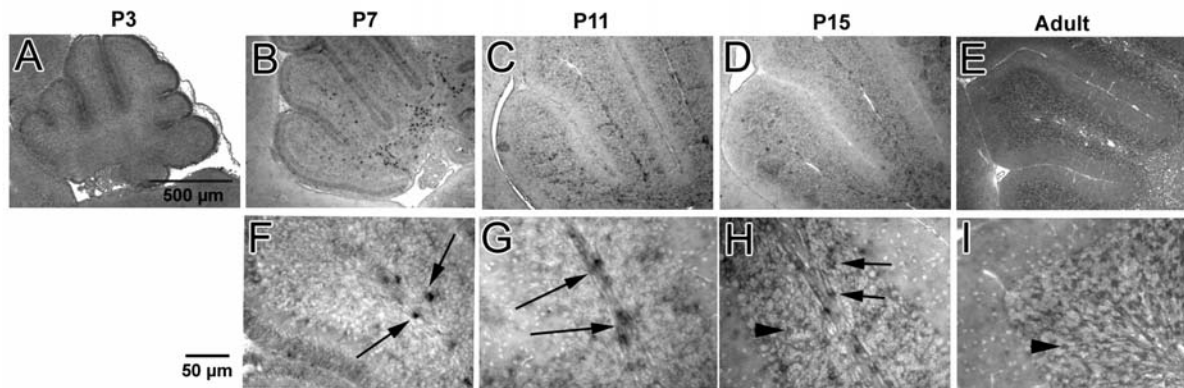


Abb. 6: Die Expression von *strn*-mRNA während der postnatalen Kleinhirnentwicklung in Wt-Mäusen. *In situ* Hybridisierungen mit einer *strn* mRNA antisense Sonde wurden an P3 (A), P7(B, F), P11(C, G), P15(D, H) und an adulten Mäusen durchgeführt(E, I). Auffällig war eine starke zelluläre Färbung in der WM zwischen den Altersstufen P7 bis P15 (mit Pfeilen markiert). In P15 und adulten Tieren war zudem die IGL deutlich gefärbt (Pfeilspitzen in H und I). Die zelluläre Färbung in der WM war in den Kleinhirnschnitten adulter Tiere nicht mehr nachweisbar.

4.3 Charakterisierung der *strn*-positiven Zellen in der weißen Substanz des Kleinhirns

In der Literatur sind mehrere Zellpopulationen beschrieben, die während der postnatalen Entwicklung über die WM zu ihren Zielorten wandern (Weisheit et al., 2006). Zu diesen Zellen gehören Oligodendrozyten und Astrozyten, aber auch als unreif beschriebene Neurone, die später zu Korb-, Sternzellen oder zu Lugarozellen ausdifferenzieren. Um die *strn*-positiven Zellen identifizieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Doppelfärbungstechnik angewandt, die es erlaubte, das *strn*-IsH-Signal mit dem immunhistochemischen Nachweis von Markerproteinen für neuronale und gliale Zellen definierter Reifungsstadien zu kombinieren. Die hier genutzte Technik basiert auf einer Methode, die Nagaso et al. (Nagaso et al., 2001; Zaidi et al., 2000) beschrieben hat.

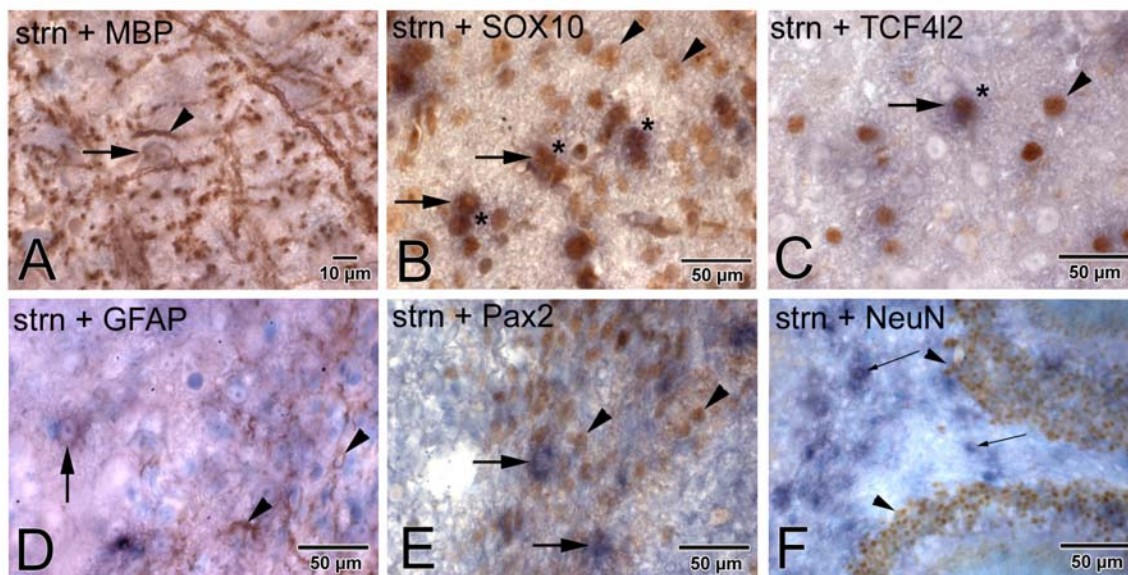


Abb. 7: Charakterisierung von *strn*-positiven Zellen in der cerebellären WM von sieben bis neun Tage alten Mäusen mittels IsH-IHC Doppelfärbung. In allen Aufnahmen repräsentiert das bläulich/violette Signal die IsH-Färbung gegen *strn* und das bräunliche Signal die immunhistochemische Färbung. Antikörper gegen folgende Markerproteine wurden eingesetzt: MBP für reife Oligodendrozyten (A); Sox10 für Oligodendrozyten (B); TCF712 für eine Subspezies der Oligodendrozyten (C), GFAP für reaktive Astrozyten (D), Pax2 für postmitotische migrierende Interneurone (E), und NeuN für postmitotische Körnerzellen (F). Das *strn*-IsH-Signal ist mit einem Pfeil, die braunen IHC-Signale mit Pfeilspitzen markiert. Zellen, die sowohl ein IsH als auch ein IHC Signal besitzen, sind mit einem Stern (*) markiert (B, C).

Da das *strn* Signal in der WM nachzuweisen war und dort Myelinscheiden einen wesentlichen Anteil des Neuropils ausmachen, wurde in einem ersten Ansatz die *strn* IsH mit einem MBP Immunnachweis kombiniert. Während die *in situ* Hybridisierung typischerweise runde, größere Zellen darstellte, färbte der MBP-Antikörper Faserstrukturen und punktförmige Strukturen als Querschnitte durch Fasern an. Wie in Abb. 7A gezeigt sind die *strn*-positiven Zellen immer von MBP-positiven Fasern umgeben. Eine Zuordnung der MBP Signale zu definierten Zellen ist allerdings nicht möglich. Um die *strn*-Oligodendroglia-Beziehung genauer zu untersuchen, habe ich im Folgenden einen nukleären Antikörper gegen SOX10 verwendet, der alle Entwicklungsstadien von Oligodendrozyten erkennt. Das SOX10-Protein war in denselben Zellen der WM des Kleinhirns exprimiert, in denen auch die *strn*-mRNA

nachgewiesen werden konnte (Abb. 7B; Zellen sind mit einem Stern markiert). Etwa 50 % der Sox10-positiven Zellen besaßen ein moderates bis deutliches *strn*-Signal im Zytoplasma. Die Doppelfärbung mit dem Proliferationsmarker Tcf7l2 (Abb. 7C) ergab, dass 25 % der *strn*-positiven Zellen auch Tcf7l2 exprimierten (mit einem Stern markierte Zellen). Dies zeigt, dass zumindest ein Teil der *strn*-positiven Zellen zellteilungsfähig sind, und der oligodendroglialen Zelllinie zugewiesen werden konnte.

Als weitere Klasse glialer Zellen sind Astrozyten in der WM beschrieben. GFAP kommt sowohl in reaktiven Astrozyten als auch in neuronalen Vorläuferzellen vor. Anhand von GFAP-Färbungen konnten eindeutig Astrozyten in der WM neun Tage alter Tiere nachgewiesen werden. Diese GFAP-Signale konnten aber nicht mit dem *strn*-Signal kolokalisiert werden, so dass davon auszugehen ist, dass, wenn überhaupt, nur ein ganz geringer Anteil der *strn*-positiven Zellen reaktiven Astrozyten oder GFAP-positiven Vorläuferzellen zugeordnet werden kann (Abb. 7D).

Neben den glialen Zellen wurde die Expression von *strn* in neuronalen Vorläuferzellen untersucht. Der Transkriptionsfaktor Pax2 wird als Marker für wandernde Korb-/Sternzellen angesehen (Weisheit et al., 2006). Wie zu erwarten war, konnte das Pax2-Signal primär in der WM nachgewiesen werden. Es war aber keine Kolokalisation mit dem *strn*-Signal zu sehen (Abb. 7E). Die unterschiedlichen Größen der angefärbten Strukturen sprechen zudem gegen eine Koexpression in demselben Zelltyp. Analog konnte und wurde keine Kolokalisation mit dem Körnerzellmarker NeuN gefunden (Abb. 7F). NeuN färbt spezifisch postmitotische Körnerzellen der IGL.

Bisher veröffentlichte Daten zeigten, dass *strn* in adulten Tieren primär in Neuronen exprimiert wird (Castets et al., 1996). Die hier durchgeführten *in situ* Hybridisierungen sprechen für eine zusätzliche temporäre gliale *strn* Expression. Um die erhobenen Befunde auf Proteinebene abzuklären, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt.

Für die Untersuchungen der Antikörperspezifität wurden jeweils benachbarte Schnitte durch das Gehirn verwendet. Die Schnitte wurden mit und ohne Primärantikörper

inkubiert die die Signalintensitäten verglichen. Während die Proben, die mit anti-STRIATIN Antikörper inkubiert wurden ein spezifisches Signal nach der Immunreaktion ergaben, konnte in der Negativkontrolle keine Färbung nachgewiesen werde. (Abb. 8)

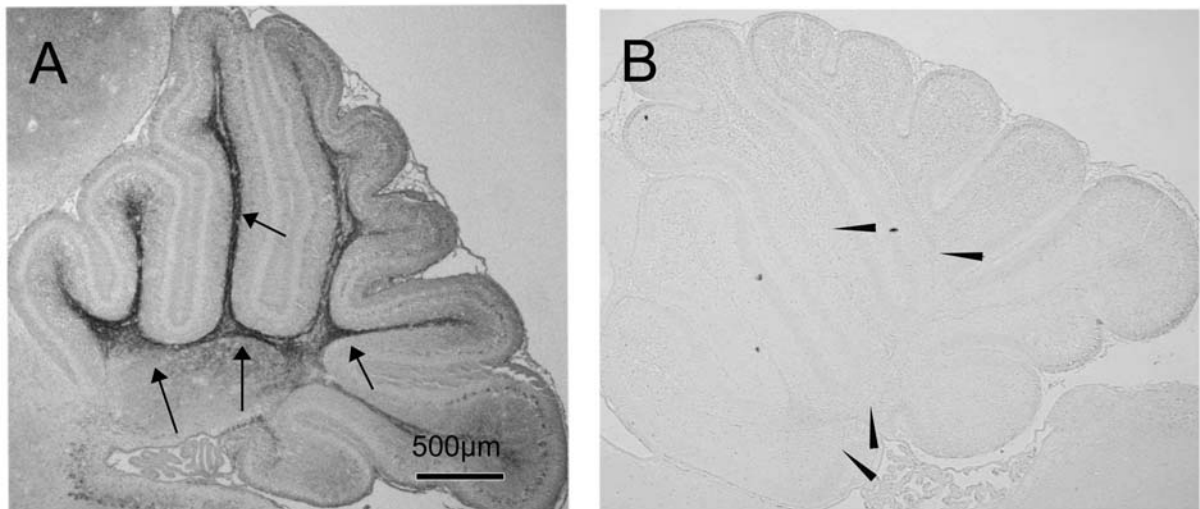


Abb. 8: IHC Färbung an Gehirnen von sieben Tage alten Wildtyp-Mäusen. (A) Inkubation mit anti-STRN Antikörper, (B) Negativkontrolle ohne anti-STRN Antikörper. Die Pfeile deuten auf positive Areale im Kleinhirn, die Pfeilspitzen auf entsprechende Areale im benachbarten Gewebeschnitt der Negativkontrolle.

Die STRN-Immunhistochemie ergab eine gleichmäßige, pointillistische Färbung der WM des Kleinhirns und eine dezente Färbung von einzelnen Purkinjezellen (Abb. 9 E, F). Zusätzlich war ein deutliches Signal im Striatum und in weiteren markhaltigen Regionen des ZNS nachzuweisen. Damit bestätigten sich die Ergebnisse aus den IsH-Experimenten (vergleiche Abb. 5A mit Abb. 9A). Eine weitere Färbung war im Hippocampus zu sehen, wobei hier das Signal im Gegensatz zur IsH auf zellarme und fortsatzreiche Schichten beschränkt war. Das Stratum oriens, das Stratum radiatum, das Stratum moleculare areae dentatae und der Hilus fasciae dentatae waren hervorgehoben (Abb. 9B). Ein IsH-ähnliches Signal war in der Pons und in der Medulla oblongata zu sehen (vergleiche Abb. 5D mit Abb. 9D)

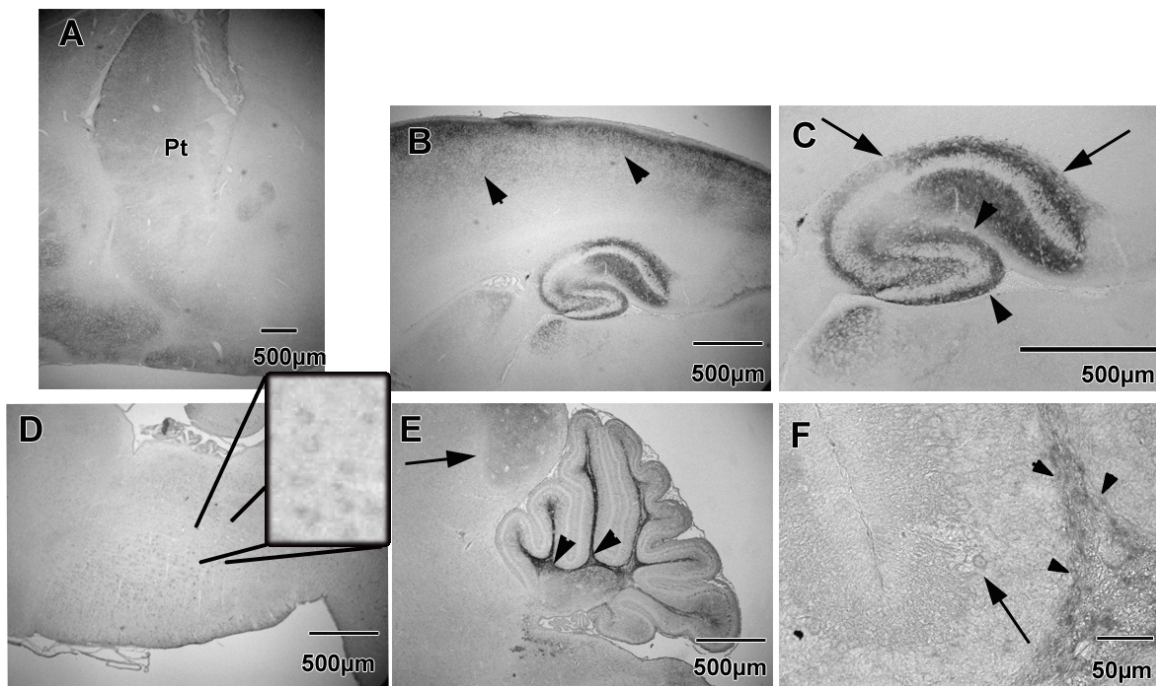


Abb. 9: Lokalisation des STRN-IHC Signals im Zentralnervensystem in sieben Tage alten Wt-Mäusen. (A) Basalganglien mit Signal im Putamen (Pt); (B) Teilansicht des Telencephalon mit einem diffusen Signal im Neocortex (Pfeilspitzen); (C) Signal im Hippocampus im stratum radiatum (Pfeile), im Hilum fasciae dentatae und im stratum moleculare areae dentatae (Pfeilspitzen); (D) ventrale Medulla oblongata mit einer großen Anzahl von STRN-positiven makronukleären Zellen (siehe Vergrößerungskasten); (E) IHC-Signal im Colliculus inferior (Pfeil) und in der cerebellären WM (Pfeilspitzen); (F) Vergrößerung des cerebellären Cortex mit Signal in der WM (Pfeilspitzen) und einzelnen positiven Purkinjezellen (Pfeil); die anderen Schichten des Cerebellums, die EGL, ML, und IGL zeigen zu diesem Zeitpunkt, wenn dann, nur ein minimales Signal.

Ähnlich den Ergebnissen der IsH konnte folglich auch mit der immunhistochemischen Methode ein deutliches Signal in der WM nachgewiesen werden. Bestätigt werden sollte dieses Ergebnis durch die Darstellung der Proteinexpression von STRN während der Entwicklung des Kleinhirns. Dazu wurden wiederum Kleinhirnschnitte von drei, sieben, elf und fünfzehn Tage alten und erwachsenen Tieren immunhistochemisch gefärbt. Postnatal konnte das STRN ab dem 3ten Tag in der weißen Substanz der vermalen Region des Kleinhirns nachgewiesen werden. Es verteilt sich auf die gesamte WM und ist bei höchster Auflösung punkt bis ovalförmig disseminiert verteilt. In P7-Tieren hatte das Signal deutlich an Stärke zugenommen. In P9-Tieren war das Signal in der WM des

Kleinhirns am höchsten, um dann von zentral nach superfizial zwischen P11 und P15 abzunehmen (Abb. 10). In adulten Tieren ist in Wt-Mäusen die IGL die dominanteste STRN-positive Region. Damit stimmt das zeitliche und räumliche Expressionsmuster mit den Daten aus der IsH überein.

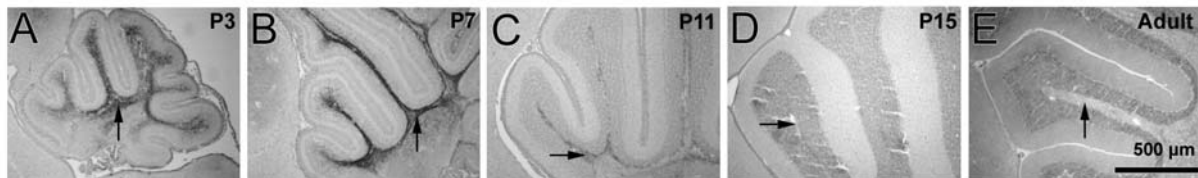


Abb. 10: Entwicklungsabhängige Expression von STRN im Kleinhirn der Wt Maus. Paraffin eingebettete Schnitte von P3 (A), P7 (B), P11(C), P15 (D) und adulten Mäusen (E) wurden immunhistochemisch mit einem spezifischen STRN Antiserum gefärbt. Pfeilspitzen deuten auf das STRN-IHC-Signal in der WM, Pfeile auf IHC-Signal in der IGL.

Analog den IsH-Experimenten wurden auch auf Proteinebene Striatin-positiven Areale mit der Expression definierter Markerproteine korreliert. Die Doppelfärbungsstudien erfolgten an sieben bis neun Tage alten Tieren. Zu diesem Zeitpunkt war das Striatin-Protein am deutlichsten in der WM sichtbar. Eine Doppelfärbung für MBP und Striatin erbrachte keine Überlappung der Signale. In Bereichen, in denen die Myelinisierung fortgeschritten und das MBP-Protein deutlich nachweisbar war, war das STRN Signal nur schwach ausgeprägt (Abb. 11 A-C; siehe Pfeile).

In der Literatur wird das STRN als ein Protein der somatodendritischen Dornfortsätzen beschrieben, was zumindest teilweise mit Synaptotagmin kolokalisiert ist. Die hier gezeigten Befunde stimmen mit dieser Aussage überein. Vor allem unterhalb der IGL im Bereich der tiefen Kerne des Kleinhirns und in einzelnen schwach positiven Purkinjezellen konnten Signale für Striatin und Synaptotagmin kolokalisiert werden (Abb. 11 G, H, I). Dies würde mit Orten korrelieren, an denen Purkinjezellaxone mit den Neuronen der tiefen Kerne und deren Dendriten interagieren.

STRN zeigte aber keine Kolokalisation mit anti-Tubulin, einem axonalen Markerprotein. Demgegenüber war STRN eindeutig mit Neurocan-GFP, welches an Hyaluronane der extrazellulären Matrix bindet, kolokalisiert (Abb. 11 D, E, F).

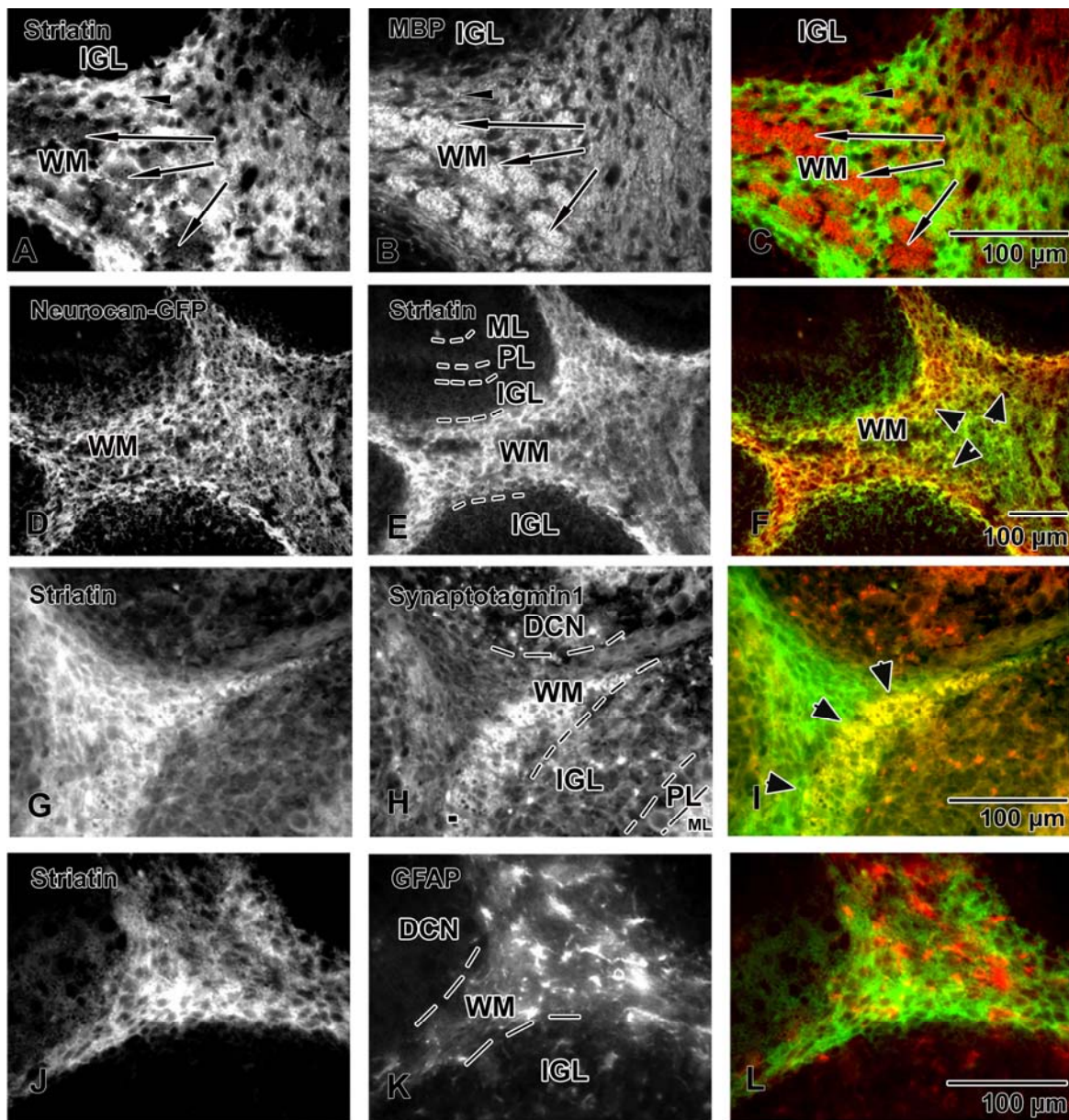


Abb. 11: Charakterisierung STRN-positiver Zellen im postnatalen Kleinhirn der Maus. Proben wurden fluoreszent gegen STRN (A, D, G, J) sowie gegen Markerproteine für Oligodendrozyten / MBP (B), extrazelluläres Hyaluronan/ Neurocan-GFP (D), synaptische Kontaktregionen / Synaptotagmin1 (H), und GFAP-positive Astrozyten/ GFAP (K) doppelgefärbt. C, F, I, L zeigen die überlagerten Bilder, wobei grün jeweils das STRN-Signal und rot das Signal des Markerproteins darstellt. Eine Kolokalisation von Fluoreszenzsignalen ergibt somit die Farbe gelb (Pfeilspitzen in F und I). In A, B und C deuten die Pfeile auf myelinisierte Axonbündel, und heben damit das komplementäre Färbemuster von STRN und MBP hervor.

4.4 Differentielle Expression von Striatin-mRNA im Kleinhirnkortex von Wildtyp- und L7En-2 Mäusen

Das Wachstum, Überleben und die Positionierung von Neuronen und Glia hängt ganz wesentlich von deren unmittelbarer stofflicher und zellulärer Umgebung ab. Im Kleinhirn ist bekannt, dass Purkinjezellen, Bergmanngliazellen und Körnerzellen in ihrer Anzahl und Reifung in reziproker Weise voneinander abhängig sind (Delaney et al., 1996; Smeyne et al., 1995). Auch das Wanderungsverhalten der Oligodendrozyten und damit die Myelinisierung ist von der Reifung der Purkinjezellen abhängig (Gianola et al., 2003; Mathis et al., 2003). Die Anzahl und Reifung der Interneurone scheinen demgegenüber weniger durch benachbart liegende Purkinjezellen oder Körnerzellen in ihrer Differenzierung und Lage beeinflusst zu werden. Die Abhängigkeit der Reifung von der zellulären Umgebung kann demzufolge zur Charakterisierung eines Zelltyps herangezogen werden. In dieser Arbeit wurde deshalb das Auftreten von *strn*-positiven Zellen in Wildtyp- und transgenen L7En-2 Mäusen verglichen. L7En-2 Mäuse zeigen, basierend auf einer Überexpression des Transkriptionsfaktors Engrailed-2, ein erhöhtes Absterben der Purkinjezellen, eine reduzierte Dendritenreifung, und in Folge eine verringerte Anzahl von Körnerzellen. Holst et al., 2008, haben in Array-Analysen gefunden, dass *strn* in L7En-2 Mäusen hochreguliert ist. Dies sollte mittels IsH und IHC verifiziert werden. Da die morphologischen Methoden zwar den Vorteil einer genauen Lokalisation eines Antigens im Gewebe erlauben, aber nur unzureichend quantifizierbar sind, wurden drei weitere Gene in die Analyse einbezogen. Zum einen wurde die Expression von *tspan-5* in Wt- und transgenen Tieren verglichen. Hier sollte ein deutlich sichtbarer Unterschied bestehen (Juenger et al., 2005). Die Rho-GTPase *rac3* dagegen wird laut Arrayanalyse nicht reguliert. *Rac1* zeigte im Arrayverfahren eine Repression der Expression. Ein Überblick der Ergebnisse ist in Abb. 12 zu sehen.

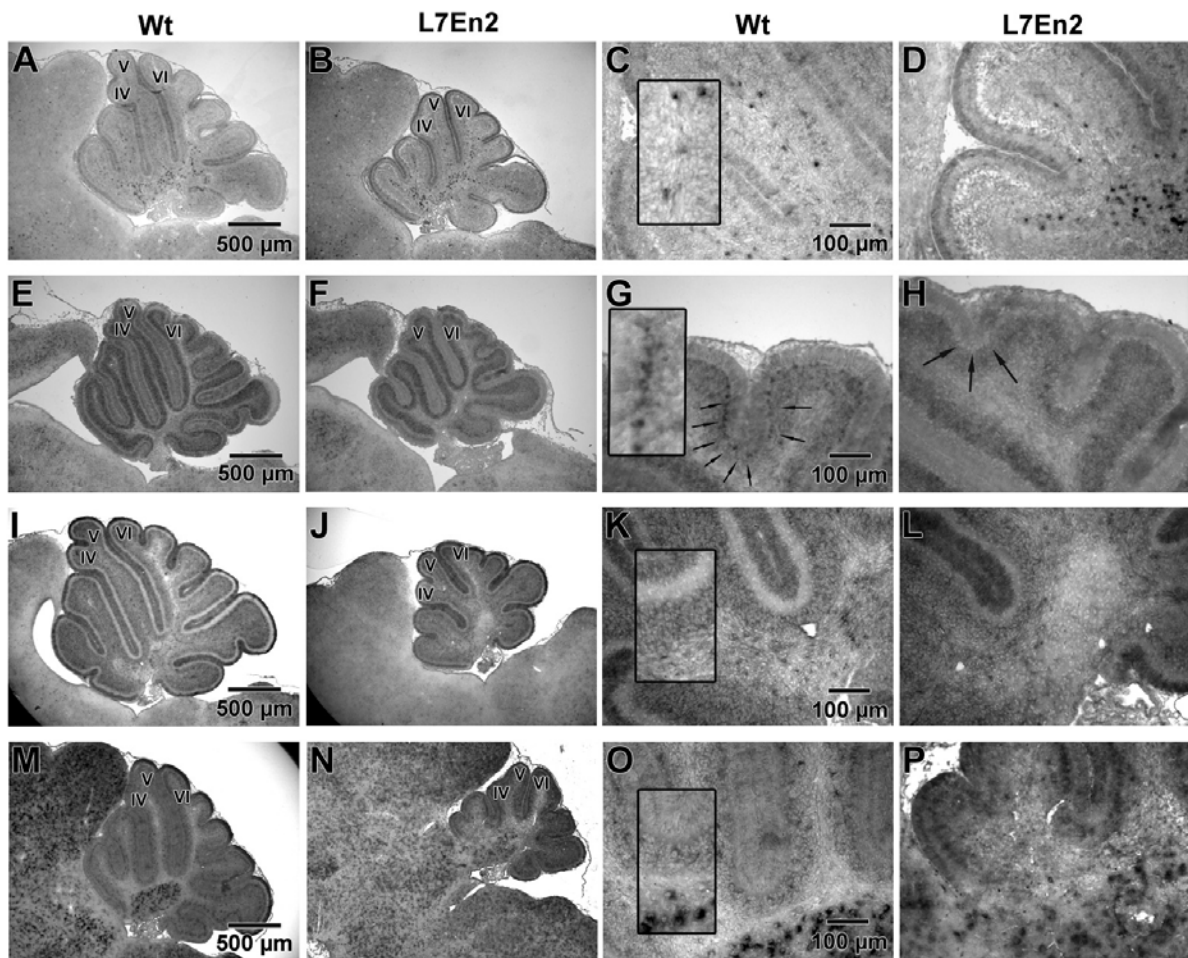


Abb. 12: Ish zum Nachweis der Expression von *strn* (A-D), *tspan-5* (E-H), *rac1* (I-L), und *rac3* (M-P) im Kleinhirncortex von sieben Tage alten Wt und L7En-2 Mäusen. Römische Zahlen bezeichnen vermale Lobuli. Die Inlets sind 3x Vergrößerungen der zugehörigen Übersichten (C, G, K, O). Deutlich treten die *strn*-positiven Zellen in der WM von Wt und L7En-2 Tieren hervor (C, D). Die Pfeile in G und H zeigen auf einzelne *tspan-5*-positive Purkinjezellen, die in den Wt stark, in den L7En-2 Tieren dagegen ungefärbt sind. Weder in der *rac1*- noch in der *rac3*-Färbung waren Unterschiede zwischen den Genotypen festzustellen.

Sowohl in Wt- als auch in L7En-2 Tieren waren die eingangs beschriebenen großen *strn*-positiven Zellen klar darstellbar. Die Dichte der stark positiven Zellen schien allerdings in der WM der L7En-2-Mäuse deutlich höher zu sein (Abb. 12 C, D). Die Intensität der Färbung war, auch bei schwächeren Färbungen, zwischen beiden Genotypen vergleichbar. Die Qualität der Gewebeproben wurde mit dem Nachweis von

tspan-5, *rac1* und *rac3* an Nachbarschnitten mittels IsH nachgewiesen. Der Einsatz der *tspan-5* Sonde ergab am Postnataltag 7 eine distinkte Färbung der inneren Hälfte des Stratum granulosum externum, eine deutliche Färbung des stratum granulosum internum, sowie eine sich in weiten Bereichen von dieser Färbung nicht absetzende Färbung der Purkinjellschicht (Abb. 12 G). Wie von Juenger et al. (2005) beschrieben, wird *tspan-5* während der ersten Postnatalwoche nicht gleichmäßig in allen Purkinjellen des Kleinhirnkortex exprimiert. Eine definierte Region von Purkinjellen mediosagittal und unmittelbar kaudal der primären Fissur des Lobus centralis (Lobulus VIb-VII) war akzentuiert in den Wt-Tieren gefärbt. Diese deutlich gefärbte Region war in den L7En-2-Mäusen nicht zu erkennen. Es sei hier angemerkt, dass die deutlichen Expressionsunterschiede, wie sie bei Juenger et al. beschrieben sind, erst ab dem Postnataltag 9 auftreten und im Rahmen meiner Arbeit verifiziert werden konnten. Die Gewebeproben zeigten folglich ein erwartetes Muster der Genexpression für *tspan-5*.

Das *rac1* Gen konnte ubiquitär im Stratum granulosum externum, in der Purkinjellschicht, im Stratum granulosum internum und im Kleinhirnmantel nachgewiesen werden (Abb. 12 A-D). Zur vergleichenden Quantifizierung der *rac1*-Signalintensitäten, wurden exakt korrespondierende Schnitte entlang der mediolateralen Achse gefärbt und die Signalintensität in definierten Lobuli verglichen. Es wurden jeweils drei Schnitte von unterschiedlichen Färbungen aus drei Tieren analysiert. Die Qualität der *in situ* Hybridisierung wurde anhand der Signalintensität im Hippocampus verglichen. Wie Abb. 13 zeigt, war eine tendenzielle Repression der *rac1*-Expression in den Purkinjellen zu sehen. Allerdings waren die Unterschiede zu gering, und von Färbung zu Färbung so heterogen, dass Unterschiede nicht sicher darstellbar waren. Die Intensitäten im Kleinhirngewebe von Wt und L7En-2 Mäusen waren so homogen, dass Unterschiede in der Expression, wie Sie für *strn* und *tspan-5* gefunden werden konnten, nicht auf Gewebeartefakte zurückgeführt werden konnten.

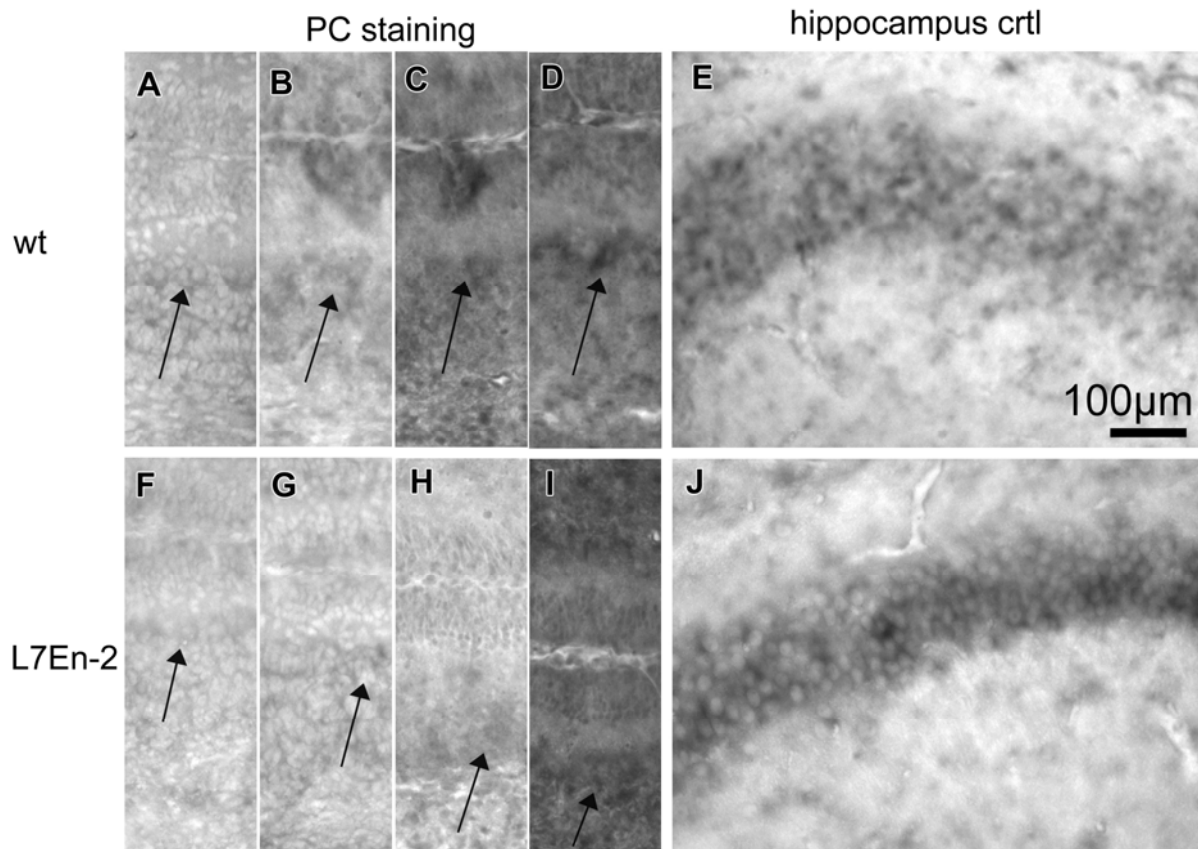


Abb. 13: Vergleich der *rac1*-Expression im Kleinhirncortex von Wt- (A-D) und L7En-2-Tieren (F-I) mittels IsH. Zur vergleichenden Intensitätsdarstellung des *rac1*-Signals wurden zusätzlich Aufnahmen aus den CA1-CA2 Regionen des Hippocampus von Wt (E) und L7En-2 Tieren (D) dargestellt. Die Pfeilspitzen markieren in den Aufnahmen die Purkinjzellsomata, wobei in den Wt-Tieren tendenziell mehr Signal nachweisbar war als in den L7En-2 Mausmutanten.

Rac3-mRNA wurde am prominentesten in den Neuronen der tiefen Kerne exprimiert (Abb. 12 M-P). Eine höhere Auflösung, wie sie in Abb. 12 O zu sehen ist, zeigte aber auch eine Expression von *rac3* in den Purkinjzellen und den Neuronen (Körnerzellen und Golgizellneurone) der inneren Körnerzellschicht. Man beachte, dass sowohl die Neurone der tiefen Kerne als auch Neurone des Mittelhirns in etwa der gleichen Intensität angefärbt wurden, so dass von einer vergleichbaren *in situ* Hybridisierungsqualität ausgegangen werden konnte. Die Signalintensität in den Purkinjzellen von Wt und L7En-2 Tieren war vergleichbar. Ähnlich den *rac1*-Färbungen zeigten also auch die *rac3*-Färbungen, dass die Gewebeproben von Wt und L7En-2 Tieren vergleichbare IsH-Ergebnisse lieferten.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass trotz der Schwierigkeiten, die bei der Quantifizierung von Signalintensitäten mittels IsH bestehen, Unterschiede in der Verteilung des *strn*-Signals zwischen Wt und L7En-2 Gewebe dargestellt werden konnten. Dieser Unterschied lag aber nicht in der Expressionsstärke von *strn* in Purkinjellen, wie eingangs vermutet, sondern in der erhöhten Menge gefärbter Zellen im Kleinhirn von L7En-2 im Vergleich zu Wt-Tieren (Abb. 12 C, D).

Um diesen Eindruck zu quantifizieren, wurde die Anzahl der *strn*-positiven Zellen in der WM mehrerer korrespondierender Gewebeschnitte im Bereich der Vermis gezählt und die Einzelwerte in Relation zum Volumen des jeweiligen Schnittes gesetzt. Das Volumen eines Schnittes wurde aus der Fläche und der Dicke des Schnittes berechnet, wobei die Fläche mit dem Programm ImageJ ermittelt wurde und die Dicke durch die Schnittdicke mit 8 μm vorgegeben war. Die statistische Auswertung der Zellzahl der *strn*-positiven Zellen pro Volumen ergab eine statistisch signifikante Zunahme der relativen Zellzahl in der L7En-2 im Vergleich zur Wt-Maus.

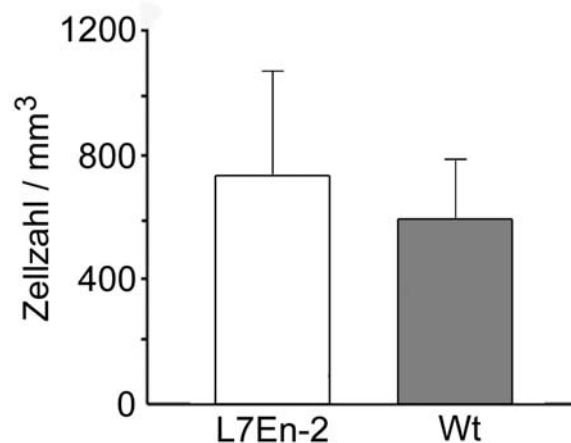


Abb. 14: Quantifizierung der Dichte der *strn*-positiven Zellen in der weißen Substanz von L7En-2 und Wt Tieren. Es wurden die Anzahl *strn*-positiver Zellen in der weißen Substanz pro mm^3 errechnet. Die Angaben repräsentieren die Mittelwerte der ermittelten Dichte mit dazugehörigem Standardfehler. Die statistische Auswertung ergibt einen signifikanten Unterschied (Student's t-test: $p < 0,01$; $n_{(\text{L7En-2})}=13$, $n_{(\text{Wt})}=16$).

Es ist bekannt, dass das Cerebellumvolumen der L7En-2 Tiere um 50% abnimmt. Die Dichtezunahme der *strn*-positiven Zellen in der WM könnte somit auch durch eine überproportionale Abnahme des Cerebellumvolumens im Verhältnis zur Zahl *strn*-positiver Zellen erklärt werden. Um dies abzuklären, wurden alle *strn*-positiven Zellen in der WM mehrerer Schnitte ausgezählt und die absoluten Zellzahlen verglichen. Die Zahl *strn*-positiver Zellen war in L7En-2 Tieren um ~35 % niedriger (Abb. 15). Die Zunahme der *strn*-positiven Zelldichte in L7En-2 Tieren beruht folglich nicht auf einer Erhöhung der Zahl *strn*-positiver Zellen, sondern auf einer überproportional hohen Reduktion des Kleinhirnvolumens in L7En-2 Mäusen bei gleichfalls abnehmender Zahl *strn*-positiver Zellen.

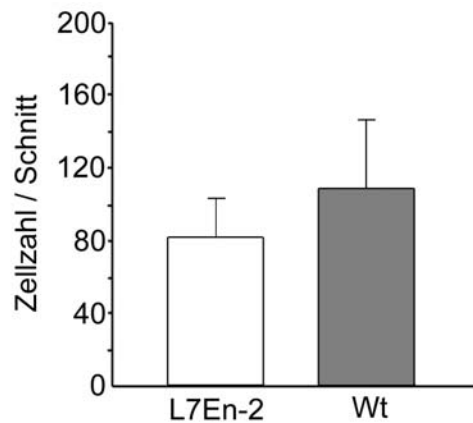


Abb. 15: Quantifizierung der absoluten Anzahl *strn*-positiver Zellen in der weißen Substanz von L7En-2 und Wt-Tieren, die Balken repräsentieren Mittelwerte der Zellzahlen mit zugehörigen Standardfehlern. Es konnte ein statistisch hoch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Student's t-test: $p \ll 0,01$; $n_{(L7En-2)}=13$, $n_{(Wt)}=16$).

Ausgehend von einer um zirka 35 % sinkenden Anzahl von *strn*-positiven Zellen, und einer um bis zu 50 %igen Verkleinerung des Kleinhirns in L7En-2 im Vergleich zu Wildtyptieren, würde dies bedeuten, dass die Menge an Striatin pro Kleinhirn in L7En-2 Tieren zunimmt. Damit stimmen die experimentellen Daten mit den Ergebnissen aus den Arrayanalysen überein. Hier zeigt sich in besonderem Masse der Vorteil und Nutzen

der *in situ* Hybridisierung, mit der die Expression von Genen in einzelnen Zelltypen verglichen werden kann.

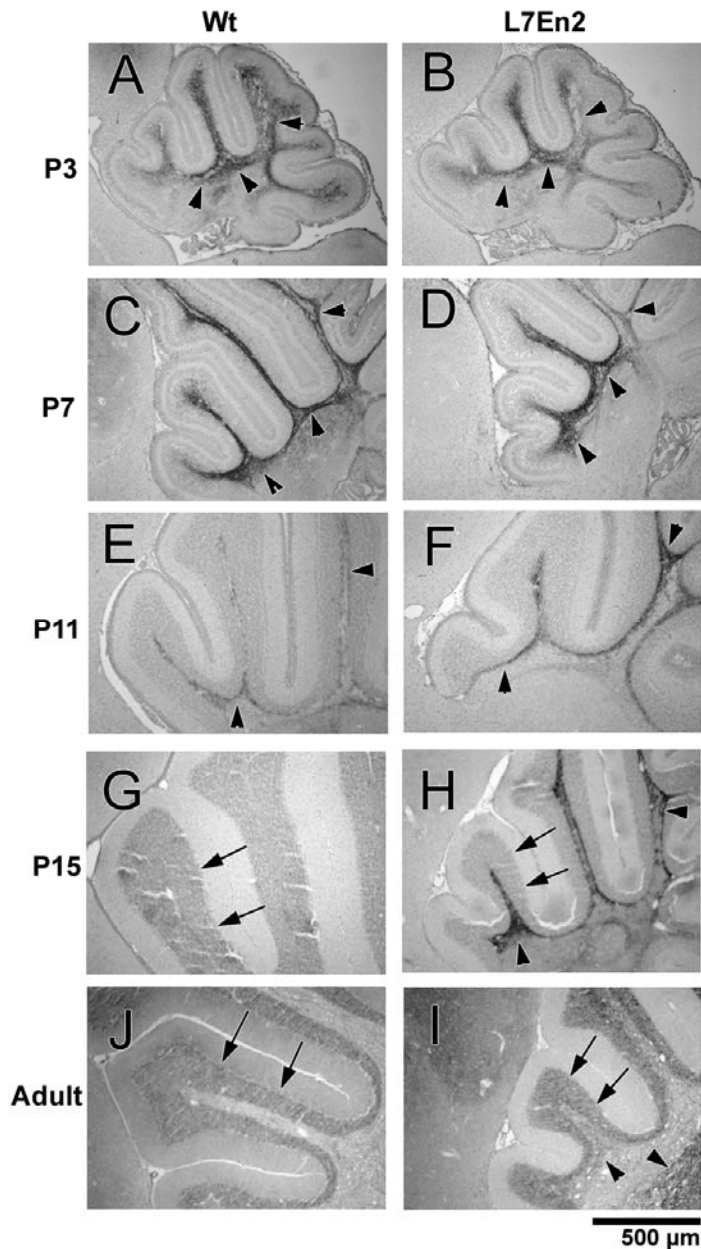


Abb. 16: Entwicklungsabhängige Expression von STRN im Kleinhirn der Maus. In Paraffin-eingebettete Schnitte drei (P3; A, B), sieben (P7; C, D), elf (P11; E, F), und fünfzehn Tage alter (P15; G, H), sowie adulter Mäuse (J, I) wurden immunhistochemisch mit einem spezifischen STRN-Antiserum gefärbt. Links sind Schnitte von Wt-Tieren (A, C, E, G, J), rechts von transgenen L7En-2 Mäusen zu sehen (B, D, F, H, I). Mit Pfeilspitzen wurde das STRN IHC Signal in der WM und mit Pfeilen das IHC Signal in der IGL markiert.

Zur Bestätigung der *IsH*-Experimente wurde die STRN Expression mit Hilfe der Immunhistochemie in Wt Tieren und L7En-2 Tieren während der postnatalen Entwicklung verglichen. Wie für Wt Gewebe beschrieben, ist Striatin auch in L7En-2 Mäusen primär in der weißen Substanz lokalisierbar. Die Intensität der STRN-Färbung war im Kleinhirn drei Tage alter Tiere von L7En-2 und Wt Mäusen vergleichbar (Abb. 16

A, B). Ein ebenfalls vergleichbares STRN-Immunsignal konnte an Wt- und L7En-2-Geweben von sieben Tage alten Tieren nachgewiesen werden (Abb. 16 C, D). Dieses vergleichbare Expressionsprofil änderte sich am elften Postnataltag. Während das Signal in der WM von Wt-Tieren ab dem elften Postnataltag abnahm, war die Signalintensität im L7En-2 Kleinhirngewebe von elf und fünfzehn Tage alten Tieren nahezu unverändert im Vergleich zum neunten Postnataltag (Abb. 16 E-H). In adulten Tieren war weder in Wt- noch in L7En-2 Tieren eine Expression von STRN in der weißen Substanz zu sehen. Entgegen der STRN-Färbung in der weißen Substanz war ab dem elften Postnataltag in zunehmendem Masse ein deutliches Signal in der IGL nachzuweisen. In adulten Tieren war sowohl in L7En-2 als auch in Wt Mäusen die IGL die dominanteste STRN-positive Region.

Sowohl mit IsH als auch immunhistochemisch konnte folglich ein temporär auftretendes deutliches Signal in der weißen Substanz des Kleinhirns nachgewiesen werden. Dieses Signal kolokalisierte mit Markern für Oligodendrozyten und der extrazellulären Matrix, nicht aber mit neuronalen Markern oder GFAP, was vermuten lässt, dass Striatin temporär in einer Subpopulation von Oligodendrozytenvorläuferzellen exprimiert wird.

5 Diskussion

Striatin ist ein Protein mit multiplen Domänen. Basierend auf WD, Caveolin-, Coiled-coil, und Calmodulin-Domänen kann es mit vielen anderen Proteinen interagieren und so modulatorisch auf verschiedene intrazelluläre Signalwege und auf die Endozytose einwirken. Funktionell interessant ist seine Lokalisation in dendritischen Abschnitten von Neuronen, genauer gesagt in dendritischen Dornfortsätzen. Seine biochemischen Eigenschaften und seine Lokalisation sprechen dafür, dass STRN bei der Signalübertragung an den Synapsen und/oder dem vesikulären Transport eine wichtige Rolle spielt (Bartoli et al., 1998; Benoist et al., 2006). Dementsprechend zeigen Striatindefiziente Motoneurone eine deutliche Reduktion im Wachstum von dendritischen Dornen, und Ratten mit entsprechendem Gendefekt zeichnen sich durch einen

motorischen Kontrollverlust aus (Bartoli et al., 1999). Die postnatale Lokalisation von *strn* in der WM des Kleinhirns, im Balken und in der Medulla oblongata, sowie die postnatale Koexpression von *strn* mit SOX10 - Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit herausgefunden werden konnten - zeigen erstmals, dass *strn* auch in nicht-neuronalen Zellen exprimiert wird. Striatin konnte in denselben Schichten und Regionen zusammen mit TCF7L2, Synaptotagmin1 und Hyaluronsäure lokalisiert werden, nicht aber mit MBP, einem Markerprotein für reife Oligodendrozyten. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl der *Strn*-positiven Zellen parallel mit der Abnahme der Purkinjezellzahl in L7En-2 Tieren veränderte. Die positive Korrelation korrespondiert dabei mit den bekannten Relationen zu Oligodendrozytenzahlen und Neuronenzahlen, nicht aber mit der zu astrozytären Gliazellzahlen. Im Folgenden soll versucht werden, basierend auf den erhobenen Daten, die *strn*-positive Zellpopulation einem bekannten Zelltypus des Kleinhirnkortex zuzuordnen.

5.1 Striatin als Marker glialer Vorläuferzellen

Sowohl mittels IsH als auch mittels Immunhistochemie konnte neben der beschriebenen neuronalen Lokalisation, eine deutliche Lokalisation von *strn* in Zellen der WM des ZNS gezeigt werden. Diese Lokalisation in der WM war während der frühen postnatalen Gehirnentwicklung zu sehen, nicht aber im adulten, ausgereiften ZNS-Gewebe. Die *strn*-positiven Zellen der WM repräsentierten eine Zellpopulation mit großem, ovalem Soma und großem Kern. Die Zellen waren zum Teil SOX10-positiv, was als generelles Markerprotein für Oligodendrozyten bzw. Oligodendrozytenvorläuferzellen beschrieben ist (Bannykh et al., 2006); sie waren teilweise TCF7L2-positiv, und zeigen somit proliferative Eigenschaften (Jin T und Liu L, 2008); und sie zeigten keine Korrelation zu bekannten neuronalen cerebellären Markern wie NeuN oder PAX-2 (Weisheit et al., 2006). Die Morphologie dieser Zellen, die Expressionscharakteristika und die Lokalisation des *strn*-Signals lassen an eine Untergruppe von glialen Vorläuferzellen erinnern, die unter den Namen NG2-Zellen, „Synantozysten“ oder „Polydendrozyten“ in der Literatur beschrieben wurden (Bergles et al., 2010). Da die Nomenklatur noch nicht einheitlich genutzt wird, werde ich im Folgenden die Bezeichnung NG2-Zellen nutzen.

Diese Bezeichnung bezieht sich auf die Eigenschaft dieser Zellen Chondroitinsulfat Proteoglykan (NG2) zu exprimieren. Auch Synantozysten exprimieren NG2, sind aber durch ihre Interaktion mit Neuronen funktionell charakterisiert (Butt et al., 2002). Der Name Polydendrozyt beschreibt die Morphologie der Zellen, die sich durch einen stark verzweigten Zelltyp auszeichnen, und ebenfalls eine Subspezies NG2-positiver Zellen darstellen (Nishiyama et al., 2002; Nishiyama et al., 2009). NG2-Zellen stellen somit eine heterogene Population von Zellen dar, die zum einen als Vorläuferzellen für Oligodendrozyten, aber auch als Vorläufer für Astrozyten und Neuronen angesehen werden, und die funktionell in den Aufbau eines aktiven neuronalen Netzwerkes eingreifen können.

NG2-Zellen und ihre Fortsätze sind in allen Schichten des Kleinhirnkortex aufzufinden. Sie exprimieren keine typischen Marker für reife Neurone, für astrozytäre Gliazellen oder für reife Oligodendrozyten. Demgegenüber exprimieren NG2-Zellen Proliferationsmarker und Marker von Oligodendrozytenvorläuferzellen (Dawson et al., 2003). Diese biochemischen Charakteristika stimmen mit den hier erhobenen Befunden überein. *Strn*-positive Zellen exprimierten zumindest zum Teil SOX10 und TCF7L2 (Oligodendrozytenvorläufer), aber nicht MBP, GFAP, NeuN oder MAP-2. Synantozysten bilden Synapsen-ähnliche Strukturen mit benachbarten glialen und neuronalen Zellen aus (Bergles et al 2000, Ziskin et 2007 und Wigley R et al., 2007). Für STRN-positive Zellen konnte ich zeigen, dass sie Synaptotagmin1 exprimieren, ein präsynaptisches Markerprotein (Sudhof und Malenka, 2008; Gaillard et al., 2006; Liu et al., 2006).

Eine Zugehörigkeit der STRN-positiven Zellen zu NG2-Zellen wird auch durch das vergleichbare Expressionsprofil der beiden Gene unterstützt. NG2-Zellen sind während der gesamten postnatalen Entwicklung im Kleinhirn nachgewiesen worden, wobei das Expressionsniveau bis zur zweiten Postnatalwoche ansteigt und danach abfällt (He et al., 2009). Striatin konnte ab dem 3ten Postnataltag und bis zum 15ten Tag in der weißen Substanz nachgewiesen werden. Danach fiel die Expression in der weißen Substanz ab, während sie in der inneren Körnerzellschicht und in der Molekularschicht zunahm. Dieses zeitliche Expressionsprofil korreliert mit der Myelinisierung im Kleinhirnkortex der Maus und somit mit der Reifung der Myelin-produzierenden Zellen.

Im Kleinhirn schreitet die Myelinisierung progredient beginnend von den tiefen Kernen in Richtung Purkinjezellen fort (Lange, 1978). Die Myelinisierung scheint also mit der Reifung der Purkinjezellen zuzunehmen. Wenn die Myelinisierung von der Purkinjezellreifung abhängig ist, dann sollte die verzögerte Reifung der Purkinjezellen in L7En-2 Tieren zu einer Veränderung der L7En-2-Myelinisierung im Kleinhirn führen. Dies ist allerdings nicht der Fall, wie MBP-Färbungen von Vibratomschnitten und von Kleinhirnschnittkulturen von L7En-2 Tieren gezeigt haben (Liebig, Dissertation, Mat.-Nat. Fakultät, Universität Bonn, 2007). Demgegenüber war die Anzahl der *strn*-positiven Zellen in den L7En-2- gegenüber Wt-Tieren um 35 % erniedrigt. Dies entspricht quantitativ der 40 – 50 %igen Abnahme an PCs in L7En-2 Cerebella (Baader et al., 1998; Jankowski et al., 2010). Es besteht folglich eine positive Korrelation zwischen der Zahl der PCs und der Zahl *strn*-positiver Zellen im Kleinhirn der Maus. Entsprechend konnte für die Reifung der Purkinjezellen und die NG2 Expression eine positive Korrelation gefunden werden: die Expression von F3/Contactin, einem Differenzierungsgen für cerebelläre Neurone, nimmt zusammen mit NG2 während der Kleinhirnentwicklung zunächst zu, nach der zweiten Postnatalwoche wieder ab (De Benedictis et al., 2006). Die fehlende Relation der MBP-Färbungen zur *strn*-Färbung, sowie die korrespondierende Expression mit Markergenen für Oligodendrozytenvorläuferzellen unterstützen die Hypothese der STRN-Expression in letztgenannten.

Zur Zeit der Geburt sind im Kleinhirn Oligodendrozytenvorläufer (OPCs) oder Zellen, die sich zu Vorläufern entwickeln, vorhanden (Levine et al., 1993). Wie jedoch ihre Proliferation und Differenzierung zu cerebellären, reifen Oligodendrozyten gesteuert wird und welche Rolle die Neuronen dabei spielen, ist bis jetzt wenig untersucht. Basierend auf den hier durchgeführten Experimenten können wir postulieren, dass PCs zumindest teilweise die Reifung der Oligodendrozyten steuern. Als molekulare Regulatoren wurden N-Cadherine postuliert. Experimentelle Befunde zeigten jedoch, dass die N-Cadherin-vermittelte Interaktion zwischen Oligodendrozytenvorläuferzellen und PC-Axone zwar für die Myelinisierung derselben, nicht aber für die Reifung der OPCs verantwortlich gemacht werden können (Schnadelbach et al., 2001). Wahrscheinlicher sind somit

diffusible Faktoren wie Sonic hedgehog oder BMPs, die im Rückenmark für die Induktion der Oligodendrozyten wichtig sind (Spassky et al., 2001; Kessarar et al., 2004).

Synantozysten werden heute als fünfte Gruppe von glialen Zellen angesehen, die Vorläuferzellcharakter haben und in unterschiedliche neurale Zelltypen differenzieren können (Butt et al., 2005; Nishiyama et al., 2009). Für gesichert gilt, dass sie sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch nach Demyelinisierung in reife Oligodendrozyten differenzieren könnten (Keirstead et al., 1998). Zumindest *in vitro* können die NG2-positiven Zellen aber auch zu Typ 2 Astrozyten ausdifferenzieren werden, wenn sie mit Serum stimuliert werden (Kondo und Raff, 2000). Und schließlich können NG2-, CNPase-doppelt positive Zellen auch zu Neuronen werden, zumindest *in vitro* (Belachew et al., 2003). Ob NG2-Zellen neben ihrer Eigenschaft als Vorläuferzellen noch weitere Funktionen im ZNS erfüllen, ist bisher nicht bekannt. Sie interagieren sowohl mit Neuronen, als auch mit Blutgefäßen und Oligodendrozyten, und wirken damit an der Ausprägung der Blut-Hirnschranke und der Myelinisierung mit. Zudem bilden NG2-Zellen Synapsen-ähnliche Strukturen aus. STRN ist ein Protein, das in Dornfortsätzen lokalisiert worden ist, und von dem eine Rolle bei der Neurotransmission angenommen wird. Es wäre also durchaus denkbar, dass NG2-Zellen über STRN-haltige, Synapsen-ähnliche Strukturen an der Neurotransmission teilnehmen. Im Säuger werden tatsächlich verschiedene Neurotransmitterrezeptoren in Oligodendrozyten exprimiert (Wong, 2006). Es muss allerdings betont werden, dass bis heute keine spezialisierten Strukturen wie etwa Synapsen oder dendritische Dornen auf Synantozysten oder Oligodendrozyten nachgewiesen werden konnten (Bergles et al., 2000; Lin et al., 2005).

Die nur teilweise Überlappung der *strn*-Expression mit den Markerproteinen für Oligodendrozytenvorläufer lassen vermuten, dass die *strn*-positiven Zellen nur eine Untergruppe der NG2-Zellen darstellen. Tatsächlich muss man festhalten, dass NG2-Zellen in der weißen Substanz als eher spindelförmige Zellen mit einem polar ausgerichteten Zellsoma beschrieben sind (Butt et al., 2005). Nur in der IGL bilden die NG2-Zellen sternförmige Zellen mit einem stark verästelten Fortsatznetzwerk aus. Diese Morphologie stimmt zumindest mit der der *strn*-positiven Zellen nicht überein. *Strn*-

positive Zellen besaßen ein großes, rundovales Soma mit großem Kern, eher vergleichbar mit astrozytären protoplastischen Zellen. Man muss allerdings zugestehen, dass die Morphologie der *strn*-positiven Zellen in den IsH-gefärbten Schnitten nur schwer beurteilt werden kann.

Es ist ohne Zweifel, dass basierend auf den vorliegenden Ergebnissen der direkte Nachweis der Kolo-kalisation von Striatin mit den NG2 typischen Markerproteinen NG2 und PDGF Rezeptor 1 alpha erfolgen muss und auch erfolgen kann. Es gibt Antikörper gegen diese Markerproteine, sowie eine transgene Maus, in der NG2-positive Zellen YFP exprimieren (Karram et al. 2008).

Eine bisher ungeklärte Beobachtung ist die Tatsache, dass Striatin mit Hyaluronan-positiven Strukturen der extrazellulären Matrix kolo-kalisiert war. Wenn es sich bei den STRN-positiven Zellen um NG2-positive handelt, dann würden sie Chondroitinsulfat-Proteoglykane sezernieren. Diese Proteoglykane sind wie Hyaluronan Bestandteil der extrazellulären Matrix. Striatin besitzt nun die Möglichkeit, über WD40-Domänen an vielfältige Proteine zu binden, eventuell auch an Proteoglykane. Striatin könnte also ähnlich seiner intrazellulären Funktion (Goudreault et al., 2008) auch extrazellulär als Linkerprotein fungieren. Denkbar wäre eine Interaktion von STRN mit Glykosaminglykanen mittels seiner C-terminal gelegenen Coiled-coil Struktur, ähnlich wie das Angiopoetin like 4 Protein, das mittels Coiled-coil Strukturen an die extrazelluläre Matrix bindet und damit seine Proteolyse verhindert (Chomel et al. 2008). Ob allerdings STRN tatsächlich extrazellulär lokalisiert ist, muss durch immunelektronenmikroskopische Studien geklärt werden. Denkbar wäre nämlich, dass STRN in Fortsätze von Synantozysten transportiert wird, und damit eine lichtmikroskopisch erkennbare extrazelluläre Lokalisation nur suggeriert wird.

5.2 Zytoskelett-assoziierte Gene als Effektoren des Engrailed-2 vermittelten Fortsatzwachstums

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der Expression von Striatin die der Zytoskelett-assoziierten Gene *rac1* und *rac3* in Wildtyp- und L7En-2 Mäusen verglichen. Von den drei untersuchten Genen *rac1*, *rac3* und *strn* war zwar für *strn* die Menge pro Kleinhirn erhöht, die Menge an *strn*-mRNA pro Zelle aber unverändert. Nach unseren bisherigen Ergebnissen deutet nichts darauf hin, dass eines der *rac*-Gene über Engrailed-2 in den Purkinjezellen reguliert worden ist. Ebenfalls ausgeschlossen werden konnte ein parakriner Effekt von En-2 auf den PCs benachbarte Zellen, der grundsätzlich möglich ist (Joliot et al., 1997). Die *rac*-Ergebnisse unterstreichen zunächst einmal die Signifikanz der *strn*-Resultate. Sie gewinnen aber insbesondere im Lichte einer weiteren beschriebenen Regulation in L7En-2 PCs an Bedeutung. Rac1 ist ein wichtiger Regulator des Zytoskelett-assoziierten Proteins Neurofibromatose Typ 2 (NF2, Alternativname Merlin). Merlin/Nf2 ist ein Tumorsuppressorgen, von dem gezeigt werden konnte, dass es das Faserwachstum steuert (Schulz et al., 2010). Dieses Merlinprotein ist in den PC-Dendriten von L7En-2 Tieren angereichert. Da Merlin die Neuritogenese unterdrückt, würde die Überrepresentation von Merlin eine Reduktion der Dendriten postulieren, was auch in L7En-2 PCs gezeigt werden konnte (Jankowski et al., 2004). Ähnlich der Merlin-Funktion im ZNS, ist von Rac-Proteinen bekannt, dass sie in die Organisation des Aktin-Zytoskeletts eingreifen, und Funktionen bei der Zellmigration und der Adhäsion während der neuronalen Differenzierung ausüben (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997). Verschiedene Studien in unterschiedlichen Organismen und *in vitro* Versuche haben gezeigt, dass Rac-Proteine zudem für die Regulation des Fortsatzwachstums verantwortlich sind. Da Merlin das Wachstum von Schwanzzellen über die Inhibition der Rac-Aktivierung steuert, würde eine verringerte Rac Expression in L7En-2 Tieren bedeuten, dass Merlin keine Funktion in PCs mehr ausüben könnte. Insofern unterstützt die hier gezeigte Rac Expression, dass andere Gene für die Steuerung der veränderten Dendritogenese in L7En-2 PCs verantwortlich sind, und auch Rac-assoziierte Protein hierbei in Frage kommen.

6 Zusammenfassung

Striatine sind Gerüstproteine, die durch multiple Protein-Protein Wechselwirkungen als zentrale Signalwegmodulatoren und Regulatoren der Endozytose gelten. Alle Familienmitglieder der Striatine zeigen sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem eine Lokalisation in feinen Endfortsätzen, wo sie mutmaßlich die morphologische Dynamik der Fortsätze steuern. Eine nicht-neuronale Expression im ZNS wurde bisher nicht beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Striatin neben der Lokalisation in den cerebellären Purkinjezellen, und hier insbesondere in den dendritischen Fortsätzen, in einer Zellpopulation innerhalb der weißen Substanz in hohem Maße exprimiert wurde. Diese Expression in der weißen Substanz war nur während der ersten beiden Wochen nach der Geburt nachweisbar. Die Striatin-positiven Zellen waren zum Teil Sox10- und TCF7L2-positiv; sie waren aber MBP-negativ, und konnten weder mit den neuronalen noch mit astrozytären Markerproteinen NeuN, Map-2, Pax2 und GFAP kolokalisiert werden. Das Striatin-Immunsignal überlappte mit dem Immunsignal für Synaptotagmin und Hyaluronsäure. Lokalisationsort, zeitliches Expressionsmuster und Kolokalisation mit Proliferations- und Oligodendrozytenmarkern sprechen dafür, dass Striatin-positive Zellen zur Gruppe der NG2-positiven Zellen gehören. Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Striatin auch in nicht-neuronalen Zellen innerhalb des ZNS exprimiert wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass im Kleinhirn von L7En-2-Mäusen, in denen etwa 40% der Purkinjezellen postnatal absterben, die Anzahl der Striatin-positiven Zellen um denselben Prozentsatz verringert war. Die Zahl der Striatin-positiven Zellen korreliert folglich mit dem Vorhandensein von Purkinjezellen. Dies legt nahe, dass Purkinjezellen an der Regulation des Pools von Vorläuferzellen im Kleinhirnkortex beteiligt sind, und damit für die Kapazität oder fehlende Kapazität des Kleinhirnkortex zu regenerativen Prozessen mitverantwortlich sind.

7 Literaturverzeichnis

- Alberi L**, Sgado P, Simon HH. Engrailed genes are cellautonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons. *Development* 2004; 131: 3229–3236
- Alcantara S**, Ruiz M, De Castro F, Soriano E, Sotelo C. Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* 2000; 127: 1359–1372
- Alder J**, Cho NK, Hatten ME. Embryonic precursor cells from the rhombic lip are specified to a cerebellar granule neuron identity. *Neuron* 1996; 17: 389–399
- Altman J**, Bayer SA. Development of the cerebellar system in relation to its evolution, structure, and functions. New York: CRC, 1997
- Baader SL**, Sanlioglu S, Berrebi AS, Parker-Thornburg J, Oberdick J. Ectopic overexpression of Engrailed-2 in cerebellar Purkinje cells causes restricted cell loss and retarded external germinal layer development at lobule junctions. *J Neurosci* 1998; 18: 1763–1773
- Baader SL**, Vogel MW, Sanlioglu S, Zhang X, Oberdick J. Selective Disruption of “Late Onset” Sagittal Banding Patterns by Ectopic Expression of Engrailed-2 in Cerebellar Purkinje Cells. *J Neurosci*. 1999; 19: 5370-5379
- Baer von K**. Über die Entwicklungsgeschichte der Thiere. Königsberg.
- Bailey A**, Luthert P, Dean A, Harding B, Janota I, Montgomery M, Rutter M, Lantos P. A clinicopathological study of autism. *Brain* 1998; 121: 889-905
- Ballesteros MC**, Hansen PE, Soila K . MR imaging of the developing human brain. Part 2. Postnatal development. *Radiographics*. 1993; 13: 611-622
- Bannykh SI**, Stolt CC, Kim J, Perry A, Wegner M. Oligodendroglial-specific transcriptional factor SOX10 is ubiquitously expressed in human gliomas. *J Neurooncol*. 2006; 76: 115-127

- Bartoli M**, Monneron A, Ladant D. Interaction of calmodulin with *striatin*, a WD-repeat protein present in neuronal dendritic spines. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 22248–22253
- Bartoli M**, Ternaux JP, Forni C, Portalier P, Salin P, Amalric M, Monneron A. Down-regulation of *striatin*, a neuronal calmodulinbinding protein, impairs rat locomotor activity. *J. Neurobiol.* 1999; 40: 234–243
- Bauman ML**, Kemper TI. *The Neurobiology of Autism*. Baltimore: MD The John Hopkins University Press, 1994
- Belachew S**, Chittajallu R, Aguirre AA, Yuan X, Kirby M, Anderson S, Gallo V. Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. *J Cell Biol.* 2003; 161: 169-186
- Benayed R**, Gharani N, Rossman I, Mancuso V, Lazar G, Kamdar S, Bruse SE, Tischfield S, Smith BJ, Zimmerman RA, Diccico-Bloom E, Brzustowicz LM, Millonig JH. Support for the homeobox transcription factor gene ENGRAILED 2 as an autism spectrum disorder susceptibility locus. *Am J Hum Genet.* 2005; 77: 851-868
- Benoist M**, Gaillard S, Castets F. The striatin family: a new signaling platform in dendritic spines. *J Physiol Paris* 2006; 99: 146-153
- Berger T**, Schnitzer J, Kettenmann H. Developmental changes in the membrane current pattern, K⁺ buffer capacity, and morphology of glial cells in the corpus callosum slice. *J Neurosci* 1991; 11: 3008-3024
- Bergles DE**, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 2000; 405: 187-191
- Bergles DE**, Jabs R, Steinhauser C. Neuron-glia synapses in the brain. *Brain Res Rev* 2010; 63: 130-137
- Bergquist H**, Källén B. On the development of neuromeres to migration areas in the vertebrate cerebral tube. *Acta Anat.* 1953; 18: 65– 73
- Blondeau C**, Gaillard S, Ternaux JP, Monneron A, Baude A. Expression and distribution of phocein and members of the *striatin* family in neurons of rat peripheral ganglia. *Histochem Cell Biol* 2003; 119: 131-138

- Bolis A**, Corbetta S, Cioce A, de Curtis I. Differential distribution of Rac1 and Rac3 GTPases in the developing mouse brain: implications for a role of Rac3 in Purkinje cell differentiation. *Eur J Neurosci.* 2003; 18: 2417-2424
- Bourgeron T.** A synaptic trek to autism. *Curr Opin Neurobiol* 2009; 19: 231-234
- Bousslama-Oueghlani L**, Wehrlé R, Sotelo C, Dusart I. The developmental loss of the ability of Purkinje cells to regenerate their axons occurs in the absence of myelin: an in vitro model to prevent myelination. *J Neurosci.* 2003; 23: 8318-8329
- Brown TG**, Sherrington CS. Observations on the localisation in the motor cortex of the baboon (« *Papio anubis* ») *J. Physiol.* 1911; 43: 209-218
- Bunge MB**, Bunge RP, Ris H. Ultrastructural study of remyelination in an experimental lesion in adult cat spinal cord. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961; 10: 67-94
- Butt AM**, Kiff J, Hubbard P, Berry M. Synantocytes: new functions for novel NG2 expressing glia. *J Neurocytol* 2002; 31: 551-565
- Butt AM**, Hamilton N, Hubbard P, Pugh M, Ibrahim M. Synantocytes: the fifth element. *J Anat.* 2005; 207: 695-706
- Campbell K**, Gotz M. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *TINS* 2002; 25: 235-238
- Carper RA**, Moses P, Tigue ZD, Courchesne E. Cerebral lobes in autism: early hyperplasia and abnormal age effects. *Neuroimage.* 2002; 16: 1038-1051
- Castets F**, Baillat G, Mirzoeva S, Mabrouk K, Garin J, d'Alayer J, Monneron A. A brain synaptosomal adenylyl cyclase of high specific activity is photolabeled with azido-ATP. *Biochemistry* 1994; 33: 5063-5069
- Castets F**, Bartoli M, Barnier JV, Baillat G, Salin P, Moqrigh A, Bourgeois JP, Denizot F, Rougon G, Calothy G, Monneron A. A novel calmodulin-binding protein, belonging to the WD-repeat family, is localized in dendrites of a subset of CNS neurons. *J Cell Biol* 1996; 134: 1051-1062
- Castets F**, Rakitina T, Gaillard S, Moqrigh A, Mattei MG, Monneron A. Zinedin, SG2NA, and *striatin* are calmodulin-binding, WD repeat proteins principally expressed in the brain. *J Biol Chem* 2000; 275: 19970-19977

- Chomel C**, Cazes A, Faye C, Bignon M, Gomez E, Ardidie-Robouant C, Barret A, Ricard-Blum S, Muller L, Germain S, Monnot C. Interaction of the coiled-coil domain with glycosaminoglycans protects angiopoietin-like 4 from proteolysis and regulates its antiangiogenic activity. *FASEB J.* 2009; 23: 940-949
- Compston A**, Zajicek J, Sussman J, Webb A, Hall G, Muir D, Shaw C, Wood A, Scolding N. Glial lineages and myelination in the central nervous system. *J Anat.* 1997; 190: 161-200
- Courchesne E**, Saitoh O, Townsend JP, Yeung-Chourchesne R, Press GA, Lincoln AJ, Haas RH, Schriebman L. Cerebellar hypoplasia and hyperplasia in infantile autism. *Lancet* 1994; 343: 63-64
- Courchesne E**, Karns CM, Davis HR, Ziccardi R, Carper RA, Tigue ZD, Chisum HJ, Moses P, Pierce K, Lord C, Lincoln AJ, Pizzo S, Schreiberman L, Haas RH, Akshoomoff NA, Courchesne RY. Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: an MRI study. *Neurology.* 2001; 57: 245-254
- Courchesne E**, Redcay E, Morgan JT, Kennedy DP. Autism at the beginning: microstructural and growth abnormalities underlying the cognitive and behavioral phenotype of autism. *Dev Psychopathol.* 2005; 17: 577-597
- Dave RH**, Saengsawang W, Yu JZ, Donati R, Rasenick MM. Heterotrimeric G-proteins interact directly with cytoskeletal components to modify microtubule-dependent cellular processes. *Neurosignals* 2009; 17: 100-108
- Davis CA**, Joyner AL. Expression patterns of the homeobox-containing genes *En-1* and *En-2* and the proto-oncogene *int-1* diverge during mouse development. *Genes Dev* 1988; 2: 1736 –1744
- Davis CA**, Holmyard DP, Millen KJ, Joyner AL. Examining pattern formation in mouse, chicken and frog embryos with an Enspecific antiserum. *Development* 1991; 111: 287–298
- Dawson MR**, Polito A, Levine JM, Reynolds R. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci* 2003; 24: 476-488

- De Benedictis L**, Bizzoca A, Corsi P, Albieri I, Consalez GG, Gennarini G. Activation profile of the F3/Contactin gene in the developing mouse cerebellum. *Mol Cell Neurosci* 2006; 32: 403-418
- Delaney CL**, Brenner M, Messing A. Conditional ablation of cerebellar astrocytes in postnatal transgenic mice. *J Neurosci* 1996; 16: 6908-6918
- Dobbing J**, Sands J. Vulnerability of developing brain not explained by cell number/cell size hypothesis. *Early Hum Dev.* 1981; 5: 227-231
- Etienne-Manneville S**, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; 420: 629-635
- Folstein SE**, Rosen-Sheidley B. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat Rev Genet.* 2001; 2: 943-955
- Fombonne E**, du Mazaubrun C. Prevalence of infantile autism in four French regions. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* 1992; 27: 203-210
- Fombonne E**, Du Mazaubrun C, Cans C, Grandjean H. Autism and associated medical disorders in a French epidemiological survey. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1997; 36: 1561-1569
- Foran DR**, Peterson AC. Myelin acquisition in the central nervous system of the mouse revealed by an MBP-Lac Z transgene. *J Neurosci.* 1992; 12: 4890-4897
- Forell A.** Einige hirnanatomische Betrachtungen und Ergebnisse. *Arch Psychiat. Berlin* 1887, 18: 162-168
- Fujita S**, Shimada M, Nakamura T. H3-thymidine autoradiographic studies on the cell proliferation and differentiation in the external and the internal granular layers of the mouse cerebellum. *J Comp Neurol.* 1966; 128: 191-208
- Fujita S.** Quantitative analysis of cell proliferation and differentiation in the cortex of the postnatal mouse cerebellum. *J Cell Biol.* 1967; 32: 277-287
- Gaillard S**, Bailly Y, Benoist M, Rakitina T, Kessler JP, Fronzaroli-Molinières L, Dargent B, Castets F. Targeting of proteins of the striatin family to dendritic spines: role of the coiled-coil domain. *Traffic.* 2006; 7: 74-84

- Gianola S**, Savio T, Schwab ME, Rossi F. Cell-autonomous mechanisms and myelin-associated factors contribute to the development of Purkinje axon intracortical plexus in the rat cerebellum. *J Neurosci* 2003; 23: 4613-4624
- Golgi C**. Opera Omnia Vol. 1-3. Milano: Hoepli Editore, 1903
- Goudreault**, D'Ambrosio LM, Kean MJ, Mullin MJ, Larsen BG, Sanchez A, Chaudhry S, Chen GI, Sicheri F, Nesvizhskii AI, Aebersold R, Raught B, Gingras AC. A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein. *Mol Cell Proteomics*. 2009; 8: 157-171
- Guillery RW**. Observations of synaptic structures: origins of the neuron doctrine and its current status. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005; 360: 1281-1307
- Hartline DK**, Colman DR. Rapid Conduction and the Evolution of Giant Axon and Myelinated Fibres. *Current Biology* 2006; 17:29-35
- He Y**, Cai W, Wang L, Chen P. A developmental study on the expression of PDGFalphaR immunoreactive cells in the brain of postnatal rats. *Neurosci Res* 2009; 65: 272-279
- His W**. Zur Geschichte der menschlichen Rückenmarkes und der Nervenwurzeln. Abhandlungen der Königlichen sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften. Mathematisch-physische Classe 1887; 13: 477-514
- Holst MI**, Maercker C, Pintea B, Masseroli M, Liebig C, Jankowski J, Miething A, Martini J, Schwaller B, Oberdick J, Schilling K, Baader SL. Engrailed-2 regulates genes related to vesicle formation and transport in cerebellar Purkinje cells. *Mol Cell Neurosci*. 2008; 38: 495-504
- Hortega del Río P**. Histogénesis y Evolución normal: Éxodo y distribución regional de la microglía. *Mem. R. Soc. esp. Hist. Natl.* 1921; 11:213-268
- Huxley AF**, Stämpfli R. Evidence for saltatory conduction in peripheal myelinated nerve fibres. *J. Physiol.* 1949; 108:315
- Inouye M**, Murakami U. Temporal and spatial patterns of Purkinje cell formation in the mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 1980; 194: 499–503

- Insel TR.** The Challenge of Translation in Social Neuroscience: A Review of Oxytocin, Vasopressin, and Affiliative Behavior. *Neuron* 2010; 65: 768-779
- Ito M.** Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol.* 2006; 78: 272-303
- Jankowski J, Holst MI, Liebig C, Oberdick J, Baader SL.** Engrailed-2 negatively regulates the onset of perinatal Purkinje cell differentiation. *J Comp Neurol.* 2004; 472: 87-99
- Jankowski J, Miething A, Schilling K, Oberdick J, Baader S.** Cell Death as a Regulator of Cerebellar Histogenesis and Compartmentation. *Cerebellum* 2010 [E-Pub].
- Jin T, Liu L.** The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus. *Mol Endocrinol.* 2008; 22: 2383-2392
- Joliot A, Trembleau A, Raposo G, Calvet S, Volovitch M, Prochiantz A.** Association of Engrailed homeoproteins with vesicles presenting caveolae-like properties. *Development* 1997; 124: 1865-1875
- Joyner AL, Kornberg T, Coleman KG, Cox DR, Martin GR.** Expression during embryogenesis of a mouse gene with sequence homology to the *Drosophila* engrailed gene. *Cell* 1985; 43: 29-37
- Joyner AL, Martin GR.** En-1 and En-2, two mouse genes with sequence homology to the *Drosophila* engrailed gene: expression during embryogenesis. *Genes Dev.* 1987; 1: 29-38
- Juenger H, Holst M, Duffe K, Jankowski J, Baader SL.** Tetraspanin-5 (Tm4sf9) mRNA Expression Parallels Neuronal Maturation in the Cerebellum of Normal and L7En-2 Transgenic Mice. *J Comp Neurol.* 2005; 483: 318-328
- Kachidian P, Vuillet J, Baroli M, Castets F, Nieoullon A, Kerkerian-Le Goff L.** Relationship between *striatin*-containing neurons and cortical or thalamic afferent fibres in the rat striatum. An ultrastructural study by dual labeling. *Neuroscience* 1998; 85: 111-122
- Kanner L.** Autistic Disturbances of Affective Contact. *Nervous Child* 2 1943; 217-250

- Karram K**, Goebbels S, Schwab M, Jennissen K, Seifert G, Steinhauser C, Nave KA, Trotter J. NG2-expressing cells in the nervous system revealed by the NG2-EYFP-knockin mouse. *Genesis* 2008; 46: 743-757
- Keirstead HS**, Levine JM, Blakemore WF. Response of the oligodendrocyte progenitor cell population (defined by NG2 labelling) to demyelination of the adult spinal cord. *Glia* 1998; 22: 161-170
- Kenney AM**, Segal RA. Subtracting the Math: prominin-positive cerebellar stem cells in white matter. *Nat Neurosci.* 2005; 8: 699-701
- Kessarlis N**, Jamen F, Rubin L, Richardson W D. Cooperation between sonic hedgehog and fibroblast growth factor/MAPK signalling pathways in neocortical precursors. *Development* 2004; 131: 1289–1298
- Kinney HC**, Brody BA, Kloman AS, Gilles FH. Sequence of central nervous system myelination in human infancy. II. Patterns of myelination in autopsied infants. *J Neuropathol Exp Neurol* 1988; 47: 217-234
- Kolvin I**. Studies in the childhood psychoses. I. Diagnostic criteria and classification. *Br J Psychiatry.* 1971; 118: 381-384
- Kondo T**, Raff M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 2000; 289: 1754-1757
- Kuemerle B**, Zanjani H, Joyner A, Herrup K. Pattern deformities and cell loss in *Engrailed-2* mutant mice suggest two separate patterning events during cerebellar development. *J Neurosci* 1997; 17: 7881–7889
- Kuemerle B**, Gulden F, Cherosky N, Williams E, Herrup K. The mouse *Engrailed* genes: A window into autism. *Behav Brain Res* 2006; 176: 121-132
- Lange W**. The myelination of the cerebellar cortex in the cat. *Cell Tissue Res* 1978; 188: 509-520
- Langer-Gould A**, Popat RA, Huang SM, Cobb K, Fontoura P, Gould MK, Nelson LM. Clinical and demographic predictors of long-term disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a systematic review. *Arch Neurol.* 2006; 63: 1686-1691

- Levine JM**, Stincone F, Lee YS. Development and differentiation of glial precursor cells in the rat cerebellum. *Glia*. 1993; 7: 307-321
- Lin SC**, Huck JH, Roberts JD, Macklin WB, Somogyi P, Bergles DE. Climbing fiber innervation of NG2-expressing glia in the mammalian cerebellum. *Neuron* 2005; 46: 773-785
- Liu MC**, Akle V, Zheng W, Dave JR, Tortella FC, Hayes RL, Wang KK. Comparing calpain- and caspase-3-mediated degradation patterns in traumatic brain injury by differential proteome analysis. *Biochem J*. 2006; 394: 715-725
- Loeber RT**, Sherwood AR, Renshaw PF, Cohen BM, Yurgelun-Todd DA. Differences in cerebellar blood volume in schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr Res*. 1999; 37: 81-89
- Loeber RT**, Cintron CM, Yurgelun-Todd DA. Morphometry of individual cerebellar lobules in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2001; 158: 952-954
- Mathis C**, Collin L, Borrelli E. Oligodendrocyte ablation impairs cerebellum development. *Development* 2003; 130: 4709-4718
- Matyash V**, Kettenmann H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev* 2010; 63: 2-10
- Miale IL**, Sidman RL. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp. Neurol*. 1961; 4: 277–296
- Millen KJ**, Wurst W, Herrup K, Joyner AL. Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse *Engrailed-2* mutants. *Development* 1994; 120: 695–706
- Millen KJ**, Chi-Chung H, Joyner AL. A role for *En-2* and other murine homologues of *Drosophila* segment polarity genes in regulating positional information in the developing cerebellum. *Development* 1995; 121: 3935–3945.65
- Milosevic A**, Goldman JE. Potential of progenitors from postnatal cerebellar neuroepithelium and white matter: lineage specified vs. multipotent fate. *Mol Cell Neurosci*. 2004; 26: 342-353

- Nagaso H**, Murata T, Day N, Yokoyama KK. Simultaneous detection of RNA and protein by *in situ* hybridization and immunological staining. *J Histochem Cytochem.* 2001; 49: 1177-1182
- Neumann PE**, Mueller GG, Sidman RL. Identification and mapping of a mouse gene influencing cerebellar folial pattern. *Brain Res* 1990; 524: 85– 89
- Nishiyama A**, Watanabe M, Yang Z, Bu J. Identity, distribution, and development of polydendrocytes: NG2-expressing glial cells. *J Neurocytol* 2002; 31: 437-455
- Nishiyama A**, Komitova M, Suzuki R, Zhu X. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10: 9-22
- Nopoulos PC**, Ceilley JW, Gailis EA, Andreasen NC. An MRI study of cerebellar vermis morphology in patients with schizophrenia: evidence in support of the cognitive dysmetria concept. *Biol Psychiatry.* 1999; 46: 703-711
- Pietsch T**, Taylor MD, Rutka JT. Molecular pathogenesis of childhood brain tumors. *J Neurooncol* 2004; 70: 203-215
- Ramon y Cajal** "Histologie du système nerveux de l'homme et des vertebres" Vols. 1 and 2. Paris: A. Maloine, 1911
- Reichenbach A**, Derouiche A, Kirchhoff F. Morphology and dynamics of perisynaptic glia. *Brain Res Rev* 2010; 63: 11-25
- Ritvo ER**, Freeman BJ, Scheibel AB. Lower Purkinje cell counts in the cerebella of four autistic subjects: initial findings of the UCLASNAC Autopsy Research Report. *Am J Psychiatry* 1986; 143: 862-866
- Ryder EF**, Cepko CL. Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron.* 1994; 12: 1011-1028
- Salin P**, Kachidian P, Bartoli M, Castets F. Distribution of striatin, a newly identified calmodulin-binding protein in the rat brain: an *in situ* hybridization and immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 1998; 397: 41-59

- Schilling K**, Oberdick J, Rossi F, Baader SL. Besides Purkinje cells and granule neurons: an appraisal of the cell biology of the interneurons of the cerebellar cortex. *Histochem Cell Biol.* 2008; 130: 601-615
- Schleich CL.** Schmerzlose Operationen. Berlin: Springer, 1894
- Schnadelbach O**, Ozen I, Blaschuk OW, Meyer RL, Fawcett JW. N-cadherin is involved in axon-oligodendrocyte contact and myelination. *Mol Cell Neurosci.* 2001; 17: 1084-1093
- Schulz A**, Geissler KJ, Kumar S, Leichsenring G, Morrison H, Baader SL. Merlin Inhibits Neurite Outgrowth in the CNS. *J Neurosci* 2010; 30: 10177-10186
- Seifert G**, Schilling K, Steinhäuser C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7: 194-206
- Sgaier SK**, Millet S, Villanueva MP, Berenshteyn F, Song C, Joyner AL. Morphogenetic and cellular movements that shape the mouse cerebellum; insights from genetic fate mapping. *Neuron* 2005; 45: 27-40
- Sidman RL**, Rakic P. Development of the human central nervous system. Springfield, IL: CC Thomas, 1982
- Sillitoe RV**, Stephen D, Lao Z, Joyner AL. Engrailed homeobox genes determine the organization of Purkinje cell sagittal stripe gene expression in the adult cerebellum. *J Neurosci* 2008; 28: 12150-12162
- Sillitoe RV**, Vogel MW, Joyner AL. Engrailed Homeobox Genes Regulate Establishment of the Cerebellar Afferent Circuit Map. *J Neurosci* 2010; 30: 10015-10024
- Smeyne RJ**, Chu T, Lewin A, Bian F, Crisman SS, Kunsch C, Lira SA, Oberdick J. Local control of granule cell generation by cerebellar Purkinje cells. *Mol Cell Neurosci* 1995; 6: 230-251
- Smith TF**, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 181-185

- Spassky N**, Heydon K, Mangatal A, Jankovski A, Olivier C, Queraud-Lesaux F, Goujet-Zalc C, Thomas JL, Zalc B. Sonic hedgehog-dependent emergence of oligodendrocytes in the telencephalon: evidence for a source of oligodendrocytes in the olfactory bulb that is independent of PDGFR α signaling. *Development* 2001; 128: 4993–5004
- Staugaitis SM**, Trapp BD. NG2-positive glia in the human central nervous system. *Neuron Glia Biol* 2009; 5: 35-44
- Steinhauser C**, Berger T, Frotscher M, Kettenmann H. Heterogeneity in the Membrane Current Pattern of Identified Glial Cells in the Hippocampal Slice. *Eur J Neurosci* 1992; 4: 472-484
- Steinhauser C**, Jabs R, Kettenmann H. Properties of GABA and glutamate responses in identified glial cells of the mouse hippocampal slice. *Hippocampus* 1994; 4: 19-35
- Sudhof TC**, Malenka RC. Understanding synapses: past, present, and future. *Neuron* 2008; 60: 469-476
- Sun D**, Lye-Barthel M, Masland RH, Jakobs TC. Structural remodeling of fibrous astrocytes after axonal injury. *J Neurosci* 2010; 30: 14008-14019
- Tambuyzer BR**, Ponsaerts P, Nouwen EJ. Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J Leukoc Biol*. 2009; 85: 352-370.
- Trotter J**, Karram K, Nishiyama A. NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Res Rev* 2010; 63: 72-82
- Trottier G**, Srivastava L, Walker CD. Etiology of infantile autism: a review of recent advances in genetic and neurobiological research. *J Psychiatry Neurosci*. 1999; 24: 103-115
- Tuchman R**, Rapin I. Epilepsy in autism. *Lancet Neurol*. 2002; 1: 352-358
- Van Aelst L**, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*. 1997; 11: 2295-2322

- Varoqueaux F**, Aramuni G, Rawson RL, Mohrmann R, Missler M, Gottmann K, Zhang W, Sudhof TC, Brose N. Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron* 2006; 51: 741-754
- Verkhatsky A**. Patching the glia reveals the functional organisation of the brain. *Pflugers Arch.* 2006; 453: 411-420
- Virchow R**. Ueber das granulirte Ansehen der Wandungen der Gehirnventrikel. *Allg. Z. Psychiatr.* 1846; 3: 424–450
- Vogel MW**, Ji Z, Millen K, Joyner AL. The Engrailed-2 homeobox gene and patterning of spinocerebellar mossy fiber afferents. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996; 96: 210-218
- Volterra A**, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 626-640
- Voogd J**, Glickstein M. The anatomy of the cerebellum. *Trend Neurosci.* 1998; 21: 370-375
- von Holst E**. Die Koordination der Bewegung bei den Arthropoden in Abhängigkeit von zentralen und peripheren Bedingungen. *Biol. Rev.* 1935; 10: 2234-2261
- von Waldeyer-Hartz**. Ueber einige neuere Forschungen im Gebiete der Anatomie des Centralnervensystems. *Deutsche medicinische Wochenschrift* 1891; 17: 1213-1218, 1244-1246, 1287-1289, 1331-1332, 1350-1356
- Weisheit G**, Gliem M, Endl E, Pfeffer PL, Buslinger M, Schilling K. Postnatal development of the murine cerebellar cortex: formation and early dispersal of basket, stellate and Golgi neurons. *Eur J Neurosci.* 2006; 24: 466-478
- Wigley R**, Hamilton N, Nishiyama A, Kirchhoff F, Butt AM. Morphological and physiological interactions of NG2-glia with astrocytes and neurons. *J Anat.* 2007; 210: 661-670
- Wingate RJ**. The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr Opin Neurobiol.* 2001; 11: 82–88
- Wolswijk G**, Noble M. Identification of an adult-specific glial progenitor cell. *Development.* 1989; 105: 387-400

- Wong R.** NMDA receptors expressed in oligodendrocytes. *Bioessays* 2006; 28: 460-464
- Wurst W,** Auerbach AB, Joyner AL. Multiple developmental defects in *Engrailed-1* mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* 1994; 120: 2065–2075
- Zaidi AU,** Enomoto H, Milbrandt J, Roth KA. Dual fluorescent *in situ* hybridization and immunohistochemical detection with tyramide signal amplification. *J Histochem Cytochem.* 2000; 48: 1369-1375
- Ziskin JL,** Nishiyama A, Rubio M, Fukaya M, Bergles DE. Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. *Nat Neurosci.* 2007;10: 321-330
- Zhang H,** Baader SL, Sixt M, Kappler J, Rauch U. Neurocan-GFP Fusion Protein: A New Approach to Detect Hyaluronan on Tissue Sections and Living Cells. *J Histo&Cytochem.* 2004; 52: 915-922
- Zhu X,** Hill RA, Nishiyama A. NG2 cells generate oligodendrocytes and gray matter astrocytes in the spinal cord. *Neuron Glia Biol* 2008; 4: 19-26

8 Danksagung

Mein Dank geht an meine Familie, die mir die Möglichkeit und die Unterstützung im Leben gab zum Studium der Medizin, welcher zur Anfertigung dieser Doktorarbeit führte.

Zugleich geht mein Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. Baader, an Herrn Prof. Dr. Schilling sowie das gesamte Laborteam des Anatomischen Instituts der Universität Bonn für ihre Hingabe, mir alles zu zeigen und für die Betreuung der Arbeit und Unterstützung bei Datenbearbeitung und –akquisition.