

**Vergleichende Expressionsanalyse von Tetraspanin-5
im sich entwickelnden Kleinhirn der Maus und im
Medulloblastomgewebe von Mensch und Maus**

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

Alkje Birke Kristina Wöllner
aus Waldbröl

2007

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Stephan L. Baader
2. Gutachter: Prof. Dr. Hanns Häberlein

Tag der Mündlichen Prüfung: 10.07.2007

Aus dem Anatomischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Prof. Dr. Karl Schilling

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Inhalt

<u>1. Abkürzungsverzeichnis</u>	6
<u>2. Einleitung</u>	9
2.1 Tetraspanine	9
2.2 Tetraspanin-5	12
2.3 Aufbau des Kleinhirns:	14
2.4 Entwicklung des Kleinhirns:	16
2.5 Medulloblastome:	17
2.6 Ziel meiner Arbeit:	17
<u>3. Material und Methoden</u>	18
3.1 Immunhistochemie	18
3.1.1 Affinitätsaufreinigung des polyklonalen Tetraspanin-5-Antikörpers:	18
3.1.1.1 Reinigung der Affinitätssäule:	19
3.1.1.2 Dotblot	19
3.1.1.3 Westernblot der Eluate	20
3.1.1.4 Proteinbestimmung	21
b) photometrische Proteinbestimmung:	21
c) Proteinbestimmung mittels Coomassie-Gel:	21
d) Proteinbestimmung nach Bradford mit Protein Assay Reagent (BioRad):	22
3.1.2 Immunhistochemische Färbung	22
3.2 RT-PCR	24
3.2.1 RNA-Präparation aus Zellkultur	24
3.2.2 Reverse Transkription	25
3.2.3 Primer	25
3.2.4 PCR-Durchführung	26
3.2.5 Quantifizierung der Bandenstärke im Agarosegel:	27
3.2.6 PCR aus Patientenmaterial	28
3.2.7 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	28

3.3 Analyse des Bandenmusters	29
3.3.1 Analytischer Verdau	29
3.3.2 Analytische PCR	30
3.4 Klonierung	30
3.4.1 Vorbereitung.....	30
3.4.1.1 Klonierungsstrategien	30
3.4.1.2 Vorbereitung des Vektors: Plasmid-Präparation (Maxiprep)	31
3.4.1.3 Vorbereitung des Inserts: Gelelution	31
3.4.1.4 Restriktionsverdau.....	32
3.4.2 Ligation.....	32
3.4.3 Transformation	33
3.4.4 Überprüfung der Transformation	33
3.4.4.1 Kolonie-PCR.....	33
3.4.4.2 Plasmid-Päparation (Miniprep) und HotShot-Sequenzierung	34
3.4.5 Anlegen von Glycerinkulturen	34
3.5 Zellkultur	35
3.5.1 verwendete Zelllinien:	35
3.5.2 verwendete Plasmide:.....	35
3.5.3 Transfektion von Zelllinien	36
3.5.3.1 Bestimmung der Zellzahl	36
3.5.3.2 Bestimmung der Plasmidkonzentration	36
3.5.3.3 eigentliche Transfektion.....	36
3.5.4 Nachweis spezifischer Proteine mittels Western Blot.....	37
3.5.4.1 Proteinextraktion aus Zellkultur.....	37
3.5.4.2 Western Blot.....	37
3.5.5 Nachweis spezifischer mRNAs mittels PCR.....	38
3.5.5.1 RNA-Präparation aus Zellkultur	38
3.5.5.2 Reverse Transkription (s. 3.2.2).....	38
3.5.5.3 PCR	39

<u>4. Ergebnisse</u>	40
4.1 Immunhistochemischer Nachweis des Tetraspanin-5.....	40
4.1.1 Etablierung der immunhistochemischen Färbung an Paraffinschnitten.....	40
4.1.2 Kontrolleexperimente zum Nachweis der Spezifität der Immunreaktion.....	41
a) Vergleich des Immunsersums mit dem Präimmunsersum.....	41
b) Immunhistochemie an Niere und Milz.....	42
c) Blockierung durch Peptide.....	44
4.2 Tetraspanin-5-Expression während der Kleinhirnentwicklung.....	45
4.3 Vergleich der Tetraspanin-5-Expression in Wildtyp und L7En-2 transgenen Mäusen.....	48
4.4 Immunhistochemische Färbung des Medulloblastoms gegen Tetraspanin-5.....	50
4.5 Charakterisierung von Spleißvarianten in Medulloblastomzelllinien und menschlichem Medulloblastomgewebe.....	51
4.6 Transfektion menschlicher und muriner Zelllinien mit Tetraspanin-5.....	59
<u>5. Diskussion</u>	62
5.1 Mögliche Funktionen des Tetraspanin-5 während der Kleinhirnentwicklung.....	62
5.2 Regulation der Tetraspanin-5-Expression auf Proteinebene.....	65
5.3 Spleißvarianten des Tetraspanin-5 und deren potentiellen Funktionen.....	66
5.4 Spleißvarianten in Medulloblastomen.....	68
5.5 Ausblick.....	69
<u>6. Zusammenfassung</u>	70
<u>7. Literaturangaben</u>	72
<u>8. Danksagung</u>	76

1. Abkürzungsverzeichnis

-/-	Nullmutation
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
Brij	Polyoxyethylenglycol-dodecyl-ether
BSA	bovines Serumalbumin
CCG-Motiv	Cystein-Cystein-Glycin-Motiv
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	2-(Cyclohexylamino)-Ethansulfonsäure
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E10 – 13	10. – 13. Embryonaltag
EC	Extrazellulärdomäne
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGL	äußere Körnerschicht
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibrozyten Wachstumsfaktor
GABA	γ -Aminobuttersäure
IGL	innere Körnerschicht
ISH	in situ-Hybridisierung

kDa	Kilodalton
Lb	Lobulus
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LE-Agarose	niedrig Elektroendosmose-Agarose
ML	Molekularschicht
mRNA	Boten-RNA
Ncl.	Nucleus
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
P0, 3, 5 usw.	0., 3., 5. usw. Postnataltag
PAA	Polyacrylamid
PALS	periarterielle lymphatische Scheide
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBST	PBS-Tween
PC	Purkinjenzelle
PCL	Purkinjenzell-Schicht
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
PNET	primitiver neuroektodermaler Tumor
Ptc	Patched
PVDF	Polyvinylidindifluorid
PXXC-Motiv	Prolin-X-X-Cystein-Motiv
RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	Echtzeit-PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Shh	Sonic Hedgehog
SSC	Standard Citrat-Kochsalzlösung
T-ALL	T-Zell akute lymphatische Leukämie
TBE	Tris-borat-EDTA
TM	Transmembrandomäne
Ts5hu	humanes Tetraspanin-5
Ts5m	murines Tetraspanin-5

Tspan5	Tetraspanin-5
Vol.	Volumen
WM	weiße Substanz
wt	Wildtyp

2. Einleitung

Mit dem Bekanntwerden der kompletten DNA-Sequenz des Menschen stellt sich in zunehmendem Maße die Frage nach der Funktion und dem Zusammenspiel der einzelnen Gene in unserem Körper. Da in aller Regel auf Proteinebene letztendlich entschieden wird, welche Funktionen ausgeübt werden, besteht die Herausforderung in der heutigen medizinisch-naturwissenschaftlichen Forschung darin, Materialien und Techniken zu entwickeln, die definierte Proteine einer funktionellen Analyse zugänglich machen.

Engrailed-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die während der Segmentierung von Organismen wie *Drosophila*, aber auch bei Kompartimentierungs- und, wie neuere Arbeiten zeigen, Wachstumsprozessen eine wichtige Rolle spielen. Obwohl bereits Anfang der 80er Jahre das Gen kloniert wurde, haben wir erst vor etwa 10 Jahren begonnen, erste potentielle Zielgene von Engrailed aufzudecken. Dieser Fragestellung nachgehend wurde in der Arbeitsgruppe um Herrn Dr. Baader nach Genen gesucht, die auf Grund einer spezifischen Überexpression von Engrailed-2 in cerebellären Purkinjezellen zu einer verlangsamten Reifung dieser Neuronen führen (Holst und Baader, unveröffentlichte Daten). Mittels Microarray-Analysen konnten etwa 200 Gene isoliert werden, die als potentielle Kandidatengene der neuronalen Reifung in Frage kommen. Eines dieser Gene ist als Tetraspanin-5 (Tspan5) oder Net-4 vor kurzem in der Literatur beschrieben worden. Ziel dieser Arbeit war es nun, einen Antikörper zu charakterisieren, der den Nachweis des Tetraspanin-5-Proteins im Gewebsschnitt erlaubte, und die Expression des Tetraspanin-5-Proteins während der Kleinhirnentwicklung zu analysieren.

2.1 Tetraspanine

Tetraspanin-5 gehört zur Familie der Tetraspanine, von der allein bei den Säugetieren inzwischen 32 verschiedene Mitglieder bekannt sind (Hemler, 2003). Es handelt sich dabei um Transmembranproteine mit vier Transmembrandomänen und charakteristischen Cysteinresten, die den Tetraspaninen ihre für sie typische Tertiärstruktur verleihen. In den Transmembrandomänen TM 1, 3 und 4 befinden sich polare Reste (Asparagin, Glutamin, Glutamat), die in 70 bis 90 % aller Tetraspanine konserviert sind. Sie sind wichtig für die Heteromultimerisation mit verschiedenen

Tetraspaninen einer Zellmembran. Diese Fähigkeit der Tetraspanine zur Aggregatbildung stellt die biochemische Basis für die Ausbildung von Tetraspanin-Mikrodomänen auf Membranen dar, was zu dem Begriff des „Tetraspaninweb“ führte. Zudem sind diese polaren Reste für die korrekte Anordnung der Transmembrandomänen und damit auch für die korrekte Faltung des Proteins insgesamt mit seinen extra- und intrazellulären Bereichen notwendig (Maecker et al., 1997; Stipp et al., 2003).

Fast alle Tetraspanine haben mindestens an einer der vier zytoplasmatischen juxtamembranären Positionen einen Zysteinrest, der als Palmytylierungsstelle dient. In CD9 und CD151 gibt es sogar an allen vier Positionen entsprechende Zysteinreste. Ein Verlust dieser Palmytylierungsstellen geht mit einem Verlust lateraler Verbindungen zu anderen Tetraspaninen und damit mit der Auflösung des Tetraspaninwebs einher (Stipp et al., 2003).

Die zytoplasmatischen Termini sind nur in 21 – 38 % der Tetraspanine identisch, zeigen aber große Homologien bei gleichen Tetraspaninen unterschiedlicher Spezies, so dass davon auszugehen ist, dass sie spezifische Funktionen erfüllen. Der N-Terminus enthält Erkennungssequenzen für den Einbau in das korrekte Kompartiment der Zelle (Zellmembran, lysosomale Membran etc.), der C-Terminus dient als Verbindung zum Cytoskelett und zu Signaltransduktionsmolekülen wie Proteinkinase C (PKC) und Phosphatidylinositol-4-Kinase (Stipp et al., 2003).

Die beiden extrazellulären Schleifen weisen die größte Variabilität unter den verschiedenen Tetraspaninen auf. Über die kleine Schleife (EC 1) ist noch wenig bekannt. In manchen Tetraspaninen, wie z. B. CD9, ist sie glykolysiert. Die große Schleife (EC 2) ist sehr variabel in ihrer Sequenz, weist aber drei Zysteinreste auf (zwei in einem CCG-Motiv 50 AS in 3'-Richtung von TM 3, einen, dem meist ein Glycin vorausgeht 11 AS in 5'-Richtung von TM 4), die in 100 % aller Tetraspanine konserviert sind. Ein weiterer Zysteinrest kommt in 94 % aller Tetraspanine in Form eines PXXC-Motivs vor. Diese Zysteine bilden miteinander zwei Disulfidbrücken aus, die für die korrekte Faltung von EC 2 unabdingbar sind. Bei 66 % der Tetraspanine findet sich noch ein weiteres Zysteinpaar, das eine dritte Disulfidbrücke bildet. Des Weiteren enthält die EC 2 höher konservierte hydrophobe Bereiche, die der Homodimerisation dienen, und eine Region höchster Variabilität, die leicht polar geladen ist und wohl spezifischen Protein-Protein-Interaktionen dient (Stipp et al., 2003, Maecker et al., 1997).

Somit können Tetraspanine als „Transmembran Linker Protein“ (Stipp et al., 2003) wirken, die über ihre große extrazelluläre Schleife mit extrazellulären Proteinen in Verbindung treten und dann Signale über ihren C-Terminus über Signaltransduktionskaskaden ins Zellinnere weitergeben. Über das Tetraspaninweb ist eine laterale Amplifikation des Signals über die Zellmembran möglich.

Für viele Interaktionen von Tetraspaninen mit anderen Proteinen konnten keine spezifischen Interaktionsdomänen identifiziert werden, so dass man davon ausgeht, dass Tetraspanine eine Rolle als molekulare Vermittler spielen. Sie unterstützen die Bildung größerer Molekülkomplexe an der Zellmembran, oft ohne integraler Bestandteil zu sein, vermutlich durch Stabilisierung zufällig auftretender Interaktionen (Maecker et al., 1997).

Tetraspanine interagieren mit anderen Molekülen auf verschiedenen Interaktionsebenen. Auf einer ersten Ebene sind homotypische Bindungen oder heterotypische Interaktionen mit anderen Tetraspanin-Familienmitgliedern und anderen Proteinen zu nennen, die auch gegenüber Detergenzien wie Brij96, Digitonin und Triton X-100 stabil sind. Zu ihnen gehören z. B. spezifische Interaktionen einer kleinen Zahl von Tetraspaninen innerhalb des Tetraspaninwebs, aber auch die Bindung von Uroplakin Ib an das Nicht-Tetraspanin Uroplakin III in der apikalen Membran von Urothelzellen. Die meisten Interaktionen von Tetraspaninen spielen sich auf einer zweiten Interaktionsebene ab und sind leicht löslich, während die Bindungen der dritten Ebene sich nicht mit Brij 58, 99 oder CHAPS lösen lassen und zu großen, leichten Komplexen fusionieren, den lipid raft-ähnlichen Mikrodomänen (Hemler, 2001).

Die Interaktionspartner der Tetraspanine sind zahlreich: Integrine, Proteine aus der Ig-Superfamilie, Proteoglykane als Bestandteile der interzellulären Matrix, Wachstumsfaktoren und verschiedene Rezeptoren wurden beschrieben (Hemler, 2001). Auf Grund der vielfältigen möglichen Protein-Protein-Interaktionen ist es nicht erstaunlich, dass Tetraspanine im Zusammenhang mit Zellmorphologie, -proliferation, -migration und -motilität, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion sowie Zellreifung und -fusion genannt werden.

Die grundlegende, auch klinische Bedeutung der Tetraspanine wird durch die Phänotypen unterstützt, die bei bisher bekannten Mutationen oder Expressionsänderungen in Tetraspaningenen in Mensch und Maus hervorgerufen werden. Mutationen im Peripherin/RDS-Gen führen zu schweren Retinopathien, da bei defektem Protein die Photorezeptor-Morphogenese unterbrochen wird. Eine Deletion in CD81 führt bei Mäusen zu gestörter B-Zellfunktion und beschleunigter T-Zellproliferation. Die Expression vieler Tetraspanine sind entweder positiv (CO-029, PETA-3, SFA-1, SAS) oder negativ (CD9, CD63, CD82) mit Tumorzellmetastasierung assoziiert (Maecker et al. 1997). Oozyten von CD9-defizienten Mäusen sind nicht in der Lage, mit Spermien zu fusionieren. Mutationen im humanen Tetraspanin Tm4sf2/A12, welches hauptsächlich im Hippocampus exprimiert wird und eine Rolle beim Lernen und der Gedächtnisbildung spielt, wurden bei Patienten mit klinisch auffälliger mentaler Retardierung gefunden. (Hemler, 2001).

Manche Tetraspanine (z. B. CD9, CD63, CD81) werden ubiquitär exprimiert, während andere sehr gewebespezifisch sind oder nur in bestimmten Entwicklungsphasen exprimiert werden. So kommt CD37 z. B. nur auf reifen B-Zellen vor, während CD9 nur auf Prä-B-Zellen exprimiert wird (Maecker et al., 1997).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Tetraspanine auf Grund ihrer Bindungseigenschaften und ihres ubiquitären Vorkommens bei vielfältigen zentralen Entwicklungsprozessen eine wichtige Rolle spielen.

2.2 Tetraspanin-5

Tetraspanin-5 wird im Zentralnervensystem und hier insbesondere im cerebrären Cortex, Hippocampus und Amygdala, und im Kleinhirn sehr stark exprimiert (García-Frigola et al., 2000 und 2001; Juenger et al., 2005). Außerdem haben Northern Blot-Analysen ergeben, dass Tspan5 auch in Herz, Niere und Hoden stark exprimiert ist, während Lunge und Leber nur schwache, Milz und Skelettmuskel keine Banden zeigten (García-Frigola et al., 2000).

Juenger et al. (2005) haben mit in situ-Hybridisierungen Parallelen zwischen Tspan5-mRNA-Expression und neuronaler Entwicklung im Cerebellum von Mäusen nachweisen können und

damit eine Rolle von Tspan5 bei diesen Prozessen nahe gelegt. Bei neugeborenen Mäusen (P0) zeigt sich im Kleinhirn ein nur schwaches Tspan5-Signal. Dieses Signal ist auf Regionen beschränkt, wo Neuronenvorläufer lokalisiert sind (in den tiefen Kernregionen, in der noch recht breiten Schicht unreifer Purkinjezellen (PC) und in der externen Körnerschicht (EGL)). Am deutlichsten ist das Signal der PC im rostralen Bereich des posterioren Lobus (Abb. 6). In den folgenden Tagen steigt der Gehalt an Tspan5-mRNA stark an: Bereits an Postnataltag 7 (P7) zeigen die Purkinjezellen, die zu diesem Zeitpunkt ihren charakteristischen Dendritenbaum ausbilden, ein deutlich stärkeres Signal, wobei sich noch immer der Lobus posterior am stärksten anfärbt. Positiv ist auch die interne Körnerschicht (IGL), während das Signal in der EGL schwächer ist und sich nur noch auf den inneren Bereich mit postmitotischen, prä-migratorischen Zellen beschränkt. In der Purkinjezell-Schicht konnten Juenger et al. (2005) entgegen den Ergebnissen von García-Frigola et al. (2001) auch ein Signal in nicht-neuronalen Zellen, vermutlich Bergmann-Glia, erkennen. Ab P11 zeigt sich in PC ein gleichbleibend hoher Tspan5-mRNA-Gehalt. Ab P9 findet sich auch in der Molekularschicht ein leichtes Signal, das nicht in Purkinjezell-Dendriten lokalisiert ist, sondern vermutlich in dort residenten Zellen.

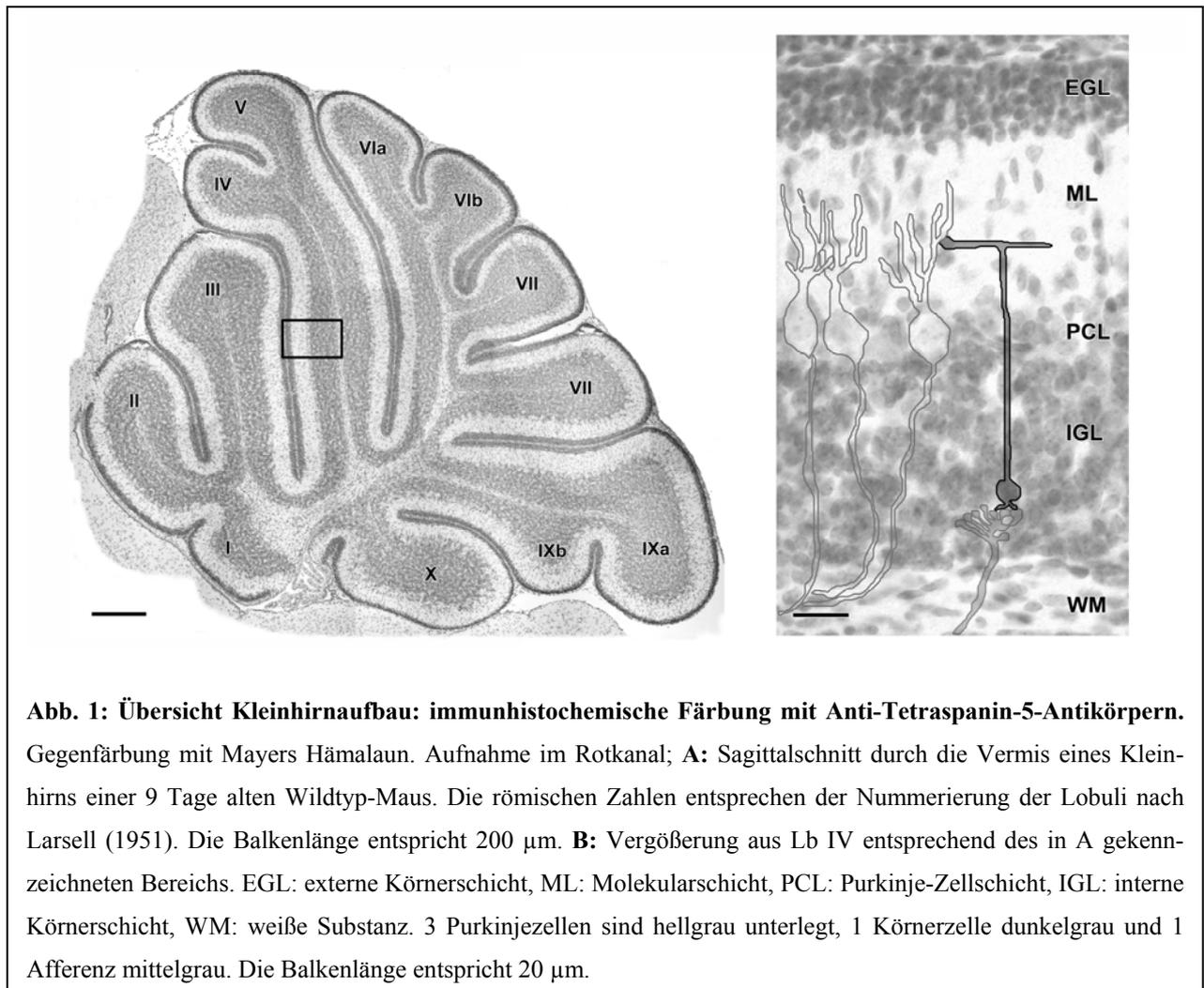
In L7En-2 transgenen Mäusen, in denen En-2 überexprimiert und dadurch die Purkinjezell-Reifung deutlich verzögert ist, haben Juenger et al. (2005) ab P7 Unterschiede zum Wildtyp in der Tspan5-mRNA-Expression gesehen, die sich auch bei adulten Tieren noch zeigen lassen. Während Körnerzellen bei Wildtyp und Mutante eine vergleichbare Expression aufwiesen, war in Purkinjezellen der L7En-2-Tiere die Expression deutlich reduziert. Erwartungsgemäß zeigten En-2^{-/-}-Tiere im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede in der Tspan5-mRNA-Expression, weder in Körnerzellen, noch in den zu diesem Zeitpunkt physiologischerweise Engrailed-2-negativen Purkinjezellen. Zudem war Tspan-5 in Engrailed-2-positiven Purkinjezellen herunterreguliert, in Körnerzellen mit endogen hoher Engrailed-2-Expression aber stark exprimiert. Juenger et al. (2005) gehen deswegen davon aus, dass Engrailed-2 indirekt oder zelltypspezifisch die Transkription von Tspan5 herunterreguliert.

Die Tatsache, dass Tspan5 in reifen Zellen mit ausgebildeten Dendriten am stärksten exprimiert ist, wirft die Frage nach dessen Rolle während der Dendritogenese auf. Die bekannten Interaktionen von Tetraspaninen mit Integrinen (Berditchevski, 2001; Hemler, 2001; Maecker et al., 1997; Shi et al., 2000), die generell eine Rolle bei Zellmigration, aber auch bei der Bildung von Zell-

fortsätzen spielen, sowie mit Signaltransduktionsenzymen wie Proteinkinase C (Zhang et al., 2001), die in Purkinjezellen die Ausbildung des Dendriten moduliert, legt eine aktive Rolle von Tspan5 sehr nahe. Auch ist zu vermuten, dass Tspan5 ähnlich wie das Tetraspanin late bloomer (Fradkin et al., 2002) bei *Drosophila* Einfluss auf die Formation synaptischer Dornfortsätze hat.

Um erste Hinweise auf mögliche Funktionen von Proteinen zu erhalten, ist es üblich, deren Expression im Laufe der neuronalen Entwicklung zu untersuchen. Diese Korrelationsstudien werden häufig im Cerebellum durchgeführt, da dieser Teil des Zentralnervensystems einen einfachen Aufbau mit nur wenigen, gut untersuchten Neuronentypen besitzt, und dessen Histogenese weitgehend bekannt ist.

2.3 Aufbau des Kleinhirns:



Das Kleinhirn befindet sich in der hinteren Schädelgrube. Es ist bilateral symmetrisch aufgebaut und gliedert sich mediolateral in die unpaarige Vermis und die zwei Hemisphären. In rostrokaudaler Richtung untergliedern parallele Fissuren die einzelnen Folia. Die entwicklungs-geschichtlich ältesten Fissuren schneiden am tiefsten ein und bilden die Grundlage der anatomischen Einteilung in Lobuli (Lb) (Abb. 1 A). Die beiden ältesten Hauptfissuren (Fissura prima zwischen Lb V und VI, Fissura posterolateralis zwischen Lb IX und X) untergliedern das Kleinhirn in den Lobus anterior, posterior und flocculonodularis (Marani et al., 1979). Auf diese Nomenklatur nach Larsell (1951) beziehen sich die Bezeichnungen in dieser Arbeit.

Im Schnitt kann man makroskopisch, ähnlich wie beim Großhirn, den Mantel aus grauer Substanz von der weißen Substanz unterscheiden. In die weiße Substanz eingelagert befinden sich vier Paare von Kleinhirnkernen: medial der Ncl. fastigii, lateral der Ncl. dentatus und dazwischen die intermediäre Kerngruppe aus Ncl. globosus und Ncl. emboliformis.

Zytoarchitektonisch ist das Kleinhirn recht einfach aufgebaut (Abb. 1 B): Die graue Substanz ist im Gegensatz zu der beim Großhirn sehr dünn und setzt sich nur aus drei Schichten zusammen: der subpialen Molekularschicht (Stratum moleculare) schließt sich nach innen die Purkinjezell-Schicht an, die nur aus einer einzigen Zelllage besteht, und anschließend die Körnerschicht (Stratum granulosum).

In der Molekularschicht befinden sich v. a. eine Vielzahl von Axonen und Dendriten. Besonders hervorzuheben sind die Parallelfasern als Axone der Körnerzellen und die Dendritenbäume der Purkinjezellen, die senkrecht zu einander verlaufen und in synaptischen Kontakt miteinander treten. Zwischen den Fasern eingestreut finden sich vereinzelt Korb- und Sternzellen, intrakortikale Hemmneurone, deren Axone sich transversal zur Folienachse ausstrecken und sich somit auf mehrere Dutzend Purkinjezellen inhibierend auswirken (Voogd et al., 1998).

Die Purkinjezell-Schicht besteht im Wesentlichen aus einer einzelnen Zelllage GABAerger Purkinjezellen, die sich durch ihren ca. 25 µm-hohen birnenförmigen Zellkörper und den sich zwei-dimensional in die Molekularschicht ausbreitenden Dendritenbaum auszeichnen. Ihr Axon bildet die einzige Efferenz des Kleinhirnes und hat Verbindung zu Kleinhirn- und Hirnstammkernen.

Die Körnerschicht wird aus einer Vielzahl dicht liegender Körnerzellen gebildet, die ihr ihr typisches gekörntes Aussehen verleihen und die ihre Axone als Parallelfasern in die Molekularschicht entsenden. Im äußeren Bereich dieser Schicht, dicht unter der Purkinjezell-Schicht, findet man vereinzelt Golgi-Zellen, die als intrakortikale Hemmneurone Körnerzellen inhibieren (Voogd et al., 1998).

In der weißen Substanz verlaufen die Axone der Purkinjezellen, die die einzige Efferenz des Kleinhirns darstellen, sowie Moos- und Kletterfasern und Fasern monoaminerger Neuronen als Afferenzen.

2.4 Entwicklung des Kleinhirns:

Die neuronalen Zellen des Kleinhirns entstammen entwicklungsgeschichtlich aus zwei Hirnregionen: der Ventrikulärzone und der Rautenlippe. Um den 10. bis 13. Embryonaltag (E10 – 13) migrieren bei der Maus die späteren Kernneurone und die Purkinjezellen aus der Ventrikulärzone in den cerebellären Cortex. Anschließend wandern Körnerzellen aus der Rautenlippe tangential der cerebellären Oberfläche in den Cortex ein und bilden hier die externe Körnerzellschicht. Zur gleichen Zeit beginnen die Golgizellen mit ihrer Migration aus der Ventrikulärzone in den Cortex (Goldowitz et al., 1998; Jankowski et al., 2004).

Postnatal migrieren die Körnerzellen entlang der Bergmann-Gliafasern radial einwärts, um die bleibende interne Körnerzellschicht auszubilden.

Während der ersten 5 Lebenstage bildet sich der Purkinjezell-Monolayer aus und der charakteristische Dendritenbaum beginnt zu entstehen. Bis etwa zum 17. Postnataltag hat sich die normale Morphologie des Mäusecerebellums ausgebildet (Jankowski et al., 2004).

2.5 Medulloblastome:

Bei ungehemmter Proliferation pluripotenter embryonaler Zellen im Kleinhirn kommt es zur Entstehung von Medulloblastomen, die zu den primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNET) gezählt werden. Medulloblastome sind die häufigsten Hirntumore bei Kindern und treten mit einem Altersgipfel zwischen drittem und achtem Lebensjahr auf. Sie manifestieren sich im Kleinhirn, am häufigsten in der Vermis und stammen von pluripotenten embryonalen Zellen ab, beim desmoplastischen Medulloblastom gelten Körnerzell-Vorläufer als Ursprung (Kenney et al., 2002; Oliver et al., 2005). Diese Tumoren sind kleinknotig aufgebaut und sehr zellreich. Im Inneren der Knoten befinden sich beim desmoplastischen Typ differenzierte Zellen, die von proliferierenden Zellen umgeben sind.

Ätiologisch spielen bei etwa 25 % der sporadisch auftretenden Medulloblastome Mutationen im Sonic hedgehog (Shh)-Patched-Pathway eine Rolle. Mutationen im Patched-Gen führen zum autosomal-dominant vererbten Goltz-Gorlin-Syndrom (Basalzellaevus-Syndrom) mit multiplen Basaliomen, Skelettanomalien (Kieferzysten, Spina bifida), Ovarialfibromen und Hirntumoren (Medulloblastome, Meningeome) (Oliver et al., 2005).

2.6 Ziel meiner Arbeit:

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte das Expressionsverhalten des Tetraspanin-5-Proteins genauer untersucht werden. Dabei wurden folgende Fragen experimentell angegangen:

1. Die Expression des Tspan5 sollte auf Proteinebene im Kleinhirn verfolgt und mit publizierten Daten der mRNA-Expression verglichen werden.
2. Die Expression von Tspan5-Protein sollte in nativem Gewebe und in Tumormaterial aus der Maus vergleichend untersucht werden.
3. Unterschiede in der Expression sollten auf das menschliche System übertragen und auch hier Unterschiede im Expressionsverhalten analysiert werden.

3. Material und Methoden

Alle Patienten haben vor dem operativen Eingriff zugestimmt, das Gewebematerial für wissenschaftliche Untersuchungen zur Pathogenese von Tumoren zur Verfügung zu stellen. Diese Untersuchungen sind gemäß der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (2004) durchgeführt worden. Die Ethikkommission des Universitätsklinikums Bonn hat der Nutzung des Tumorbank-Materials für klinisch-wissenschaftliche Zwecke zugestimmt. Patientenmaterial wurde uns von PD Dr. M. Simon und Prof. Dr. J. Schramm aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten Tiere wurden nach den Richtlinien des aktuellen deutschen Tierschutzgesetzes unter Aufsicht der entsprechenden amtlichen Behörden sowie des Tierschutzbeauftragten der Universität Bonn durchgeführt. Das Probenmaterial für ptc/- Mäuse wurde uns von Frau Prof. Dr. H. Hahn, Abteilung für Humangenetik der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt.

3.1 Immunhistochemie

3.1.1 Affinitätsaufreinigung des polyklonalen Tetraspanin-5-Antikörpers:

Ein spezifisches Antikörperserum wurde durch Immunisierung eines Kaninchens mit einem Tetraspanin-5 spezifischen Peptid hergestellt (Details siehe Dissertation K. Duffe). Aus diesem polyklonalen Kaninchenserum #1076 (18.09.2002) wurde der Anti-Tetraspanin-5-Antikörper (Anti-Tspan5-Antikörper) mittels Affinitätssäule aufgereinigt: vor Beginn wurde die Affinitätssäule zweimal mit je 10 ml Waschpuffer A (10 mM Tris / HCl; pH 7,5) gespült. 1 ml Serum wurde mit 9 ml sterilem 10 mM Tris-Puffer, pH 7,5 verdünnt auf die Säule gegeben, das Filtrat aufgefangen und erneut über die Säule filtriert. Anschließend wurde die Säule mit 2 x 10 ml Waschpuffer A und mit 2 x 10 ml Waschpuffer B (Tris / HCl; pH 7,5; 500 mM NaCl) gewaschen. Die Waschfiltrate wurden ebenfalls gesammelt und bis zur erfolgreichen Aufreinigung aufgehoben. Daraufhin erfolgte die erste Elution mit 10 ml 100mM Glycin; pH 2,5 (saurer pH-Sprung). Das Eluat wurde in sieben 2 ml-Eppendorf-Gefäße, die vorher mit je 0,5 ml 1 M Tris-

Puffer; pH 8,0 beschickt worden sind, aufgefangen. Es folgte ein weiterer Spülgang der Säule mit Waschpuffer D (10 mM Tris / HCl; pH 8,8). Die zweite Elution erfolgte mit 10 ml 100 mM Triethylamin; pH 11,5 (basischer pH-Sprung). Auch dieses Eluat wurde in 1 M Tris-Puffer, pH 8,0 aufgefangen. Anschließend folgte eine dritte Elution mit Regenerationspuffer (8 M Urea in 10 mM Tris / HCl; pH 7,5). Danach wurde die Säule mit Waschpuffer A neutralisiert und mit Reinstwasser gewaschen. Zur Aufbewahrung bei 4°C wurde sie mit 10 ml 20 %-igem Ethanol beschickt.

3.1.1.1 Reinigung der Affinitätssäule:

Es stellte sich als sinnvoll heraus, die Affinitätssäule nach längerem Nichtbenutzen zu reinigen, da andernfalls das Aufreinigen des Antikörpers sich um ein Mehrfaches verlängerte. Dazu ließ man das Ethanol ablaufen und schwemmte anschließend den Säulinhalt mit Reinstwasser auf. Diese Suspension wurde in ein Reagenzgefäß überführt, in dem sich die Kügelchen absetzen konnten. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, die Kügelchen mehrmals mit Regenerationspuffer (8 M Urea in 10 mM Tris / HCl; pH 7,5) gewaschen. Währenddessen wurde die Säulenmembran mehrfach mit Reinstwasser gespült und anschließend die in Regenerationspuffer suspendierten Kügelchen in die Säule zurückgeführt. Nachdem der Puffer abgelaufen war, wurde mit Reinstwasser nachgespült und anschließend die Säule wieder mit 20 %-igem Ethanol gefüllt und bei 4 °C aufbewahrt.

3.1.1.2 Dotblot

Um festzustellen, in welchen Fraktionen nach dem Aufreinigen Antikörper vorhanden waren, wurde von jedem Durchlauf durch die Affinitätssäule 1 µl auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond-ECL, Amersham Biosciences) aufgetragen. Nach dem Trocknen (1 h bei Raumtemperatur) wurde die Membran mehrfach in PBS-Tween (PBST) (PBS: 150 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄·xH₂O, mit NaOH pH 7,2 eingestellt; PBST: 50 ml 10 x PBS, 0,25 ml 0,05 % Tween 20, bis 500 ml mit Reinstwasser auffüllen) gewaschen und anschließend mindestens 1 h mit 5 %-iger Milchpulver-PBST-Lösung geblockt. Dem folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit einer 1:800 verdünnten Lösung von biotinyliertem Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper in 5 %-igem Milchpulver-PBST. Daran schlossen sich mehrere Spülgänge mit PBST (1 x 15 min, 3x

5 min) und dann die Inkubation mit DAB (Diaminobenzidin) (1 ml DAB und 0,01 ml H₂O₂ in 9 ml PBS) an bis eine deutliche Braunfärbung sichtbar wurde (ca. 5 – 10 min).

3.1.1.3 Westernblot der Eluate

Um nach der Aufreinigung die Fraktion, in der die Anti-Tspan5-Antikörper am reinsten vorlagen, zu finden, wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt:

Auf ein 12 %-iges SDS-Gel (Trenngel: 2,5 ml Lower Buffer (1,5 M Tris, pH 8,8), 4,4 ml Reinstwasser, 3,0 ml 40 % Acrylamid, 0,1 ml 10 % SDS (Sodiumdodecylsulfat), 50 µl APS (Ammoniumpersulfat), 10 µl TEMED (Gibco/BRL); Sammelgel: 0,625 ml Upper Buffer (0,5 M Tris, pH 6,8), 3,55 ml Reinstwasser, 0,75 ml 40 % Acrylamid, 50 µl 10 % SDS, 25 µl 10 % APS, 5 µl TEMED) wurden je 20 µl Proteinprobe aufgetragen (für 12 Proben à 20 µl: 24 µl Proteinlösung (adultes Cerebellum), 96 µl Proteinextraktionspuffer (1 x Tris/SDS, 10 % Sucrose in Reinstwasser), 120 µl Probenpuffer (2 x Tris/SDS, 10 % β-Mercaptoethanol, 2 % SDS, 10 % Sucrose, 20 µg/ml Bromphenol-Blau in Reinstwasser), 5 min Erhitzen auf 95 °C, kurz abzentrifugieren). Als Marker diente der Kaleidoscope Prestained Standard (BioRad). Die Elektrophorese (Minigel Twin, Biometra) bei 30 mA erfolgte bis etwa ein Finger breit vor Erreichen des unteren Gelrandes. Anschließend erfolgte das Elektro-Blotting (Pharmacia Biotech Multiphor II) in Transfer-Puffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20 % Methanol in Reinstwasser) auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond-P, Amersham Biosciences) bei 400 mA und 4 °C.

Die Membran wurde entsprechend der Spuren des Gels in Streifen geschnitten und für 1 h in Milchpulver-PBST geblockt. Nach zweimaligem Waschen mit PBST wurden die Streifen dann über Nacht bei 4 °C mit den verschiedenen Antikörper-Lösungen (je 100 µl in 1 ml Milchpulver-PBST) inkubiert. Ein Streifen verblieb als Kontrolle ohne Erstantikörper in PBST.

Am folgenden Tag wurden die Membranstreifen mehrmals in PBST gewaschen und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper inkubiert (Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper-HRP (Dako), 1:800 in 5 %-Milchpulver-PBST). Nach mehrfachem Waschen in PBST wurden die Membranen im dunkeln mit Amersham Western Blot Detection Reagent (Lsg. A : Lsg. B = 40 : 1) benetzt und anschließend in eine Plastikfolie gelegt, um den Autoradiografie-Film

(Kodak) zu belichten (1 min, 5 min, 30 min). Der Film wurde in Silbersalzlösung entwickelt und anschließend fixiert.

3.1.1.4 Proteinbestimmung

a) Proteinbestimmung mit BCA Protein Assay (Pierce):

Als Referenz diente eine Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA), jeweils mit Proteinextraktionspuffer (1 x Tris/SDS, 10 % Sucrose in Reinstwasser) verdünnt (0 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 100 µg/ml, 80 µg/ml, 60 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml). Die Antikörperproben (jeweils erste Elution der Aufreinigungen vor bzw. nach Aufkonzentrierung mittels Centriplus YM-50 Centrifugal Filter Units (Millipore)) wurden 1:2 und 1:10 in Proteinextraktionspuffer verdünnt.

Jeweils 25 µl Proteinlösung wurden mit 200 µl BCA-Working Reagent (50 Teile Reagenz A, 1 Teil Reagenz B) 30 min bei 60 °C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen wurde die Proteinkonzentration mittels µ-Quant (Bio-Tek Instruments) gemessen und daraus mit KC4 (Bio-Tek Instruments) die Proteinkonzentration berechnet.

b) photometrische Proteinbestimmung:

Als Leerwert wurden 25 µl Tris, pH 8,0 in 75 µl 100 mM Glycin, pH 2,5 eingesetzt. Um den Proteingehalt der 1. Elution zu ermitteln, wurde die Extinktion bei 280 nm (Beckmann DU 530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer) von 25 µl Elution 1 in 75 µl 100 mM Glycin, pH 2,5 gemessen und daraus die Proteinkonzentration errechnet. Dabei entspricht 1 OD etwa 1 mg/ml.

c) Proteinbestimmung mittels Coomassie-Gel:

Auf ein 12 %-iges SDS-Gel (s. 3.1.1.3) wurden BSA-Verdünnungen (50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800µg/ml) für die Erstellung einer Referenzkurve, sowie verschiedene Volumina Antikörper-Proben aufgetragen. Verdünnt wurde jeweils mit Proteinextraktionspuffer (2 x Tris/SDS, 10 % Sucrose in Reinstwasser). Als Größenmarker diente der Kaleidoscope Prestained

Standard (BioRad). Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA über 2 h. Die Gele wurden mit Coomassie-Stain (0,05 % Coomassie-Brilliant blue R 250 (Serva Blau) (50 mg) in 50 ml Methanol, 10 ml Essigsäure, 40 ml Reinstwasser) eingefärbt (2,5 h) und danach über Nacht in Coomassie-Destain (25 ml Methanol, 35 ml Essigsäure, mit Reinstwasser aufgefüllt auf 500 ml) entfärbt. Der Proteingehalt der Antikörper-Proben wurde dann durch Vergleich mit den Referenzproben abgeschätzt.

d) Proteinbestimmung nach Bradford mit Protein Assay Reagent (BioRad):

Als Standard diente auch hier eine BSA-Verdünnungsreihe (40 µg/ml, 20µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, jeweils in 100 mM Glycin, pH 2,5 bis 400 µg/ml, dann mit Reinstwasser weiter verdünnt). Die Antikörperproben aus den jeweils 1. Elutionen wurden 1:10 mit Reinstwasser verdünnt. 160 µl Probe bzw. Standard wurden 40 µl Protein Assay Reagent (BioRad) (1 Vol. Reagenz in 4 Vol. Ampuwa (Fresenius Kabi)) zugefügt und nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur die Extinktion bei 595 nm mittels µ-Quant (Bio-Tek Instruments) gemessen und daraus mit KC4 (Bio-Tek Instruments) die Proteinkonzentrationen berechnet.

Da sich diese Methode in der praktischen Durchführung als die Beste erwies, wurde sie für alle weiteren Experimente zur Proteinbestimmung genutzt.

3.1.2 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemische Färbung mit Anti-Tspan5-Antikörpern wurden unterschiedlich fixierte Präparate verwendet:

Die zur Herstellung der Präparate verwendeten Tiere wurden mit Ringer-Lösung (für 1 l: 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,0 g NaHCO₃, 0,22 g CaCl₂) vorperfundiert. Anschließend folgte die Perfusion mit der Bouin'schen Fixationslösung oder mit Formalin (75 ml gesättigte Picrinsäure, 25 ml Formalin, 5 ml Essigsäure; Formalin: 90 ml PBS, 10 ml 3 %-iges Formaldehyd). Die entnommenen Gewebe wurden mehrere Stunden nachfixiert und dann mehrfach in 70 %-igem Ethanol

(nach Bouinfixierung) bzw. über mehrere Tage in Leitungswasser (nach Formalinfixierung) gewaschen und anschließend mit 70 %-igem Ethanol entwässert.

Die Einbettung erfolgte nach weiterer Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol in 56 °C-warmem Paraffin. Mit Hilfe des Mikrotoms (Microm HM 355S) wurden aus den Paraffinblöcken 10 µm dicke Schnitte hergestellt, die auf Objektträger aufgezogen drei Tage bei 37 °C getrocknet wurden.

Zur Färbung wurden die Präparate in einem ersten Schritt in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert: 3 x Xylol, 3 x 100 % Ethanol, 90 % Ethanol, 75 % Ethanol (jeweils ca. 10 min.) und anschließend in PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation in 2 x SSC (300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat, pH 7,0) für 30 min bei 100 °C. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Präparate 30 min in 4 % Paraformaldehyd und 0,5 % Glutaraldehyd in PBS nachfixiert und anschließend in PBS gewaschen.

Endogene Peroxidasen wurden durch 10 min Inkubation mit 1 % H₂O₂ / 10 % Methanol in PBS blockiert. Anschließend wurden die Präparate in PBS gewaschen. Danach erfolgte das Permeabilisieren der Membranen mit 0,5 % Triton X-100 in PBS für 30 min. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Präparate für eine Stunde mit 2 % BSA in PBS in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die BSA-Lösung abgesaugt und die Präparate mit einer Anti-Tetraspanin-5-Antikörperlösung (1:200 in 2 % BSA in PBS) über zwei Nächte bei 4°C inkubiert.

Nach Waschen mit PBS wurden die Präparate für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper (biotinylierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper; 1:200 in 2 % BSA in PBS) inkubiert. Gründlichem Waschen in PBS folgte die einstündige Inkubation mit ABC-Lösung (Avidin-Biotin-Komplex) (Vectastain ABC-Kit). Nach erneutem Waschen in PBS erfolgte die Färbung mit DAB (0,05 % Diaminobenzidin-HCl in PBS, 0,03 % H₂O₂) bis ein deutliches Signal sichtbar wurde. Anschließend wurde die Reaktion durch mehrfaches Waschen mit PBS gestoppt.

Gegebenenfalls folgte eine Gegenfärbung mit 17 % Mayers Hämalaun:

Die Präparate wurden für 3 bis 4 min mit gefiltertem 17 % Mayers Hämalaun inkubiert und anschließend mit HCl-gesäuertem Reinstwasser gespült bis keine Farbwolken mehr abgingen. Dem Bläuen unter fließendem warmen Leitungswasser (2 bis 3 min) folgte kurzes Spülen mit kaltem Leitungswasser.

Anschließend wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol, 90 % Ethanol, 96 % Ethanol, 2 x 100 % Ethanol, 2 x Xylol) entwässert und mit DePeX (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) eingedeckelt.

Mit dem Mikroskop (Axioskop 2 MOT, Carl Zeiss, Jena) und einer DMC Ie-Digitalkamera (Polaroid, Cambridge) bzw. einer Olympus DT5-Kamera und jeweils identischen Einstellungen für eine bestimmte Vergrößerung wurden die Präparate abfotografiert und anschließend mit Adobe PhotoShop 6.0 bearbeitet. Es wurden nur lineare Prozesse zur Bearbeitung der Bilder verwendet, um einen direkten Vergleich der Bilder zu gewährleisten.

3.2 RT-PCR

3.2.1 RNA-Präparation aus Zellkultur

Daoy-Zellkulturen wurden mit PBS gewaschen und extrazelluläre Peptidketten mit Trypsin gelöst, so dass nach kurzer Inkubation (1-2 min bei 37 °C) eine Zellsuspension entstand. Die Zellen wurden abzentrifugiert und im entstandenen Pellet mit Trizol homogenisiert (5 min bei Raumtemperatur). Nach Zugabe von Chloroform wurde jeweils 15 min bei 4 °C und 12000 x g zentrifugiert, um die wässrige von der phenolischen Phase zu trennen. Der wässrigen Phase wurde zum Ausfällen der RNA Isopropanol zugefügt (entweder bei - 20 °C über Nacht oder 10 min bei Raumtemperatur). Nach Verwerfen des Überstandes wurden mit - 20 °C-kaltem 70 %-igen Ethanol verbliebene Salze ausgewaschen. Das nach Zentrifugieren verbliebene Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend in DEPC (Diethylpyrocarbonat)-haltigem Reinstwasser resuspen-

diert. Zur besseren Löslichkeit der RNA wurde die Suspension 5 min auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ heruntergekühlt und danach direkt auf $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Zum Aufbewahren wurde die RNA bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

3.2.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription der RNA wurden jeweils $5\text{ }\mu\text{g}$ RNA (nach photometrischer Konzentrationsbestimmung mittels μ -Quant) in DEPC-Reinstwasser auf ein Volumen von $20\text{ }\mu\text{l}$ verdünnt.

Zum Lösen von Sekundärstrukturen der RNA wurden die Lösungen für 5 min auf $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt und anschließend direkt auf Eis gestellt. Dann wurden jeweils $5\text{ }\mu\text{l}$ 5 x First Strand RT-Puffer (Invitrogen), $1\text{ }\mu\text{l}$ $0,1\text{ M}$ DTT (Dithiothreitol), $1\text{ }\mu\text{l}$ $500\text{ }\mu\text{M}$ Hexanucleotide sowie $2\text{ }\mu\text{l}$ mM dNTP zugefügt. Zum Starten der reversen Transkription (2 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurden 10 U RNase-Inhibitor und 200 U SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) zugefügt. Abkühlen auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ beendete die Reaktion.

3.2.3 Primer

Die Primer (s. Tab. 1) wurden mit Hilfe von Oligo MS DOS konstruiert, und mittels BLAST-Search (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) wurde nach möglichen weiteren Bindungspartnern gesucht, um deren Kreuzhybridisierungseigenschaften so gering wie möglich zu halten.

Bezogen wurden die Primer von Invitrogen Custom Primers oder Sigma-Genosys. Von den Primern wurden mit 10 mM Tris, pH 8,0 Stocklösungen mit einer Konzentration von $200\text{ pmol}/\mu\text{l}$ hergestellt, die dann bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden. Die Gebrauchslösung wurde auf $20\text{ pmol}/\mu\text{l}$ verdünnt.

Name	Sequenz	Bindungsstelle in Exon	Restriktions- schnittstellen
Ts5_hu_F	GCT CTC GAG CAG AGG ATG TCC GGG AAG CA	I	Xho I
Ts5_hu_R	ACT AAG CTT AGC GGT TGC AGG GGG TCT AC	VIII	Bam HI
Ts5_1_R	CCG GCA GTG AGC TCC AGG AAG	IV	
Ts5_4_F	GGC GTT CCA TTC TCC TGC TGC	IV	
Ts5_4_R	GCT CGC CCT GAC AGC TTC GAT	VIII	
Ts5_II_F	TGG AAT TGG ACT GTG GGC ATG	II	
Ts5_III_R	GGG TCA AAG CCG CCG AGA TCG	III	
Ts5_IV_F	GGA TCA AAG ACC AGC TGT ATT	IV	PvuII
Ts5_IV_R	AAT ACA GCT GGT CTT TGA TCC	IV	PvuII
Ts5_m_F	GCT CTC GAG GAT CCC AGA GGA TGT CCG GGA AGC A	I	Xho I
Ts5_m_R	ACT AAG CTT GGA TCC GCA GTG GTC GCA GGG GTC TAC	VIII	Bam HI

Tab. 1: Exon-spezifische Primersequenzen für das Tetraspanin-5-Gen. Fettgedruckt ist jeweils die Sequenz der enthaltenen Restriktionsschnittstellen; in der letzten Spalte sind die zugehörigen Restriktionsenzyme genannt.

3.2.4 PCR-Durchführung

20 µl-Ansätze (je Ansatz): 3,1 µl Reinstwasser, 2 µl 10 x Taq-Buffer mit (NH₄)₂SO₄ (MBI), 1,6 µl 25 mM MgCl, 0,8 µl DMSO, 0,8 µl 10 mM dNTP, 0,5 µl Forward-Primer (20 pmol/µl), 0,5 µl Reverse-Primer (20 pmol/µl), 0,5 µl cDNA, 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (recombinant) (MBI)

50 µl-Ansätze (je Ansatz): 35,1 µl Reinstwasser, 5 µl 10 x Taq-Buffer mit (NH₄)₂SO₄ (MBI), 4 µl 25 mM MgCl, 2 µl DMSO, 1 µl 10mM dNTP, 1 µl Forward-Primer (20 pmol/µl), 1 µl Reverse-Primer (20 pmol/µl), 0,5 µl cDNA, 0,4 µl Taq-DNA-Polymerase (recombinant) (MBI)

Das PCR-Programm umfasste eine initiale Denaturierung bei 94 °C (3 min), in deren Anschluss bei 80 °C die Polymerase zugefügt wurde (Hot start-PCR). Dem folgten 30 Zyklen (Denaturierung bei 94 °C für 1 min, Hybridisierungstemperatur bei 63 °C für 1 min, Elongation bei 72 °C für 1,5 min) und eine abschließende Elongation bei 72 °C für 10 min. Gerät: Perkin Elmer GeneAmp PCR-System 2400

Nach Abschluss der PCR wurden jeweils 10 µl PCR-Produkt 2 µl Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 40 % Sucrose in H₂O) zugefügt und auf ein 1,5 %-iges Agarosegel (130 ml TBE-Puffer, 1,95 g LE-Agarose, 8 µl Ethidiumbromid) aufgetragen. Als Standard wurde die 100 bp-DNA-Ladder (NEB) verwendet. Die Gelelektrophorese in einer ComPhor Midi- oder ComPhor Mini-Kammer (Biozym) verlief bei 100 V über ca. 45 min. Abschließend wurde das Gel unter der UV-Lampe fotografiert (GelDoc 2000, BioRad) und das Foto mit Quantity One-4.1.1 (BioRad) linear bearbeitet.

3.2.5 Quantifizierung der Bandenstärke im Agarosegel:

Nach Abfotografieren des Gels (GelDoc 2000, BioRad) und Exportieren in Photoshop 6.0 wurde mittels Auswahlrechteck ein Bereich im Zentrum jeder Bande ausgewählt und dessen Helligkeit dem Histogramm entnommen. Dieser Vorgang wurde für jede Bande drei Mal wiederholt und das arithmetische Mittel aus den erhaltenen Werten bestimmt. Die durchschnittlichen Helligkeiten der drei Banden mit den kürzeren Fragmenten wurden jeweils mit der der Bande mit dem längsten Fragment verglichen.

Die Signifikanz der hierbei festgestellten Unterschiede in der Bandenstärke zwischen Tumor- und Kontrollgewebe wurde mittels Student-t-Test für zwei unverbundene Stichproben überprüft. Dabei wurde jeweils die relative Bandenstärke der entsprechenden Banden aus Tumor- ($n_1 = 6$) und Kontrollgewebe ($n_2 = 3$) miteinander verglichen, was im Student-t-Test einen schwach-signifikanten Unterschied der Bandenstärken des Δ II-Fragments ($\alpha < 10 \%$, $p > 0,90$), einen signifikanten Unterschied für das Δ III- ($\alpha < 5 \%$, $p > 0,95$) und sogar einen hoch-signifikanten Unterschied ($\alpha < 1 \%$, $p > 0,99$) für das Δ II + III-Fragment ergab.

3.2.6 PCR aus Patientenmaterial

Analog zur PCR aus aus Zellkultur gewonnener DNA wurde auch DNA aus Patientenmaterial amplifiziert. Das Material stammt aus Proben, die aus Medulloblastomen gewonnen wurden und uns freundlicherweise von Herrn Dr. Simon und Prof. Dr. J. Schramm, Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt wurden. Als Kontrollen dienten Proben, die aus weiteren Hirnbiopsaten entnommen wurden (Trauma, Meningeom, Epilepsie).

Das PCR-Produkt wurde sowohl im 1,5 %-igen Agarosegel (siehe 3.2.4) detektiert als auch mittels Silberfärbung im Polyacrylamidgel (PAA) (s. 3.2.7).

3.2.7 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Auf ein 12 %-iges Polyacrylamid-Gel (7,5 ml Reinstwasser, 4,5 ml 40 %-iges Acrylamid, 3 ml Tris-Sulfat, 105 μ l 10 % APS, 5,3 μ l TEMED) wurden je Tasche 2 μ l PCR-Produkt aufgetragen (bzw. 3 μ l 100 bp-Marker (NEB) und 1 kb-Marker (NEB)). Die Elektrophorese (Pharmacia Biotech Multiphor II) erfolgte bei 15 mA (\leq 1000 V) über 45 min.

Anschließend wurde das Gel in 1 %-iger HNO₃ 3 min fixiert, 2 – 3 x 30 sec gewässert und in 50 ml 0,4 %-iger AgNO₃-Lösung 30 min gefärbt. Nach fünfmaligem Wässern (je 1 min) konnte das Gel in Na-Carbonat (200 ml) / Formaldehyd (150 μ l) entwickelt werden bis sich die Banden braun färbten. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte über 3 min in 10 %-iger Essigsäure. Nach kurzem Wässern wurde das Gel zur Konservierung für 5 min in 10 %-iges Glycerin überführt und zur Aufbewahrung anschließend mit etwas Glycerin eingeschweißt.

3.3 Analyse des Bandenmusters

3.3.1 Analytischer Verdau

Um festzustellen, wie das spezifische Bandenmuster zustande kommt, das wir regelmäßig bei Tspan5-PCRs sehen konnten, wurde Tspan5 auf Restriktionsschnittstellen überprüft und in jedem Exon ein Enzym gesucht, das ausschließlich dort und nur einmal schneidet. Für Exon 1 und 2 haben sich nur solche Enzyme finden lassen, die mehrfach schnitten bzw. sich nicht beschaffen ließen. In Exon 3 schneidet Bsp 143 II nach 265 bp, in Exon 4 Pvu II nach 381 bp, in Exon 5 Mun I nach 519 bp, in Exon 6 Ade I nach 611 bp, in Exon 7 Hinc II nach 645 bp und in Exon 8 Eco R V nach 795 bp.

Die Restriktionsenzyme wurden vor dem Verdau mit Reinstwasser verdünnt, um besser zu pipetierende Volumina zu erhalten.

1 µl Tspan5-PCR-Produkt (ca. 200 ng/µl) wurden mit 1 µl 10 x Puffer Y+/Tango (MBI) (Eco R V mit 10 x SuRE Cut Buffer H (Roche-Boehringer Mannheim)) und je 1 µl Enzym (Ade I (MBI), Bsp 143 II (MBI), Hinc II (MBI), Mun I (MBI): 0,2 U; Pvu II (Amersham Pharmacia), Eco R V (Amersham Pharmacia): 0,3 U) versetzt und mit je 7 µl Reinstwasser auf 10 µl aufgefüllt. Der Verdau erfolgte über 2 h bei 37 °C.

Anschließend folgte eine Gelelektrophorese auf 2 %-igem Agarose-Gel bei 80 V über 90 min. Um eine gleichmäßige Salzkonzentration in allen Spuren zu haben, wurde der Größenmarker mit 10 x-Puffer Y+/Tango versetzt.

Die erhaltenen Fragmente wurden in der Größe mit den erwarteten verglichen.

3.3.2 Analytische PCR

Zur weiteren Untermauerung der Vermutung, dass in den Spleißvarianten entweder Exon II oder III oder beide fehlen, wurden Primer kreiert, die in Exon II oder III ansetzen: einen Forward-Primer in Exon II (Ts5_II_F) und einen Reverse-Primer in Exon III (Ts5_III_R).

In 20 µl-PCR-Ansätzen (s. 3.2.4) wurde Ts5_II_F mit Ts5_1_R kombiniert, sowie Ts5_III_R mit Ts5_hu_F.

Nach PCR und Gelelektrophorese (1,5 %-iges Agarose-Gel; 100 V, 60 min) wurden die erhaltenen Banden mit den erwarteten verglichen.

3.4 Klonierung

3.4.1 Vorbereitung

3.4.1.1 Klonierungsstrategien

Es wurden zwei verschiedene Klonierungsstrategien verfolgt:

1. Vektor (pBlueskript SK+) und Insert wurden mit Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend ligiert.
 - a) Tetraspanin wurde als Ganzes eingefügt
 - b) Tetraspanin wurde in zwei Teilen eingefügt: die erste Hälfte bis zur Pvu II-Schnittstelle in Exon IV (Ts5_hu_F, Ts5_IV_R) und die zweite von dort bis zum Ende (Ts5_IV_F, Ts5_hu_R) wurden einzeln amplifiziert in der Hoffnung, dadurch die Spleißvarianten besser getrennt aus dem Gel ausschneiden zu können.

2. TA-Klonierung: Unter Ausnutzung, dass die Taq-Polymerase meist einen Überhang von einer Base (meist Adenin) produziert, wurde das PCR-Fragment in einen Vektor mit T-Überhang (pGHL, pDrive) eingefügt.

3.4.1.2 Vorbereitung des Vektors: Plasmid-Präparation (Maxiprep)

In 2 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (1 % Pepton (10 g/l), 0,5 % Hefe-Extrakt (5 g/l), 0,5 % NaCl (5 g/l), 0,1 % Glucose (1 g/l); 1 µl Ampicillin (Amp) je ml LB-Medium) wurde eine Pipettenspitze gefrorene Glycerinkultur des entsprechenden Bakterienstamms suspendiert und für mehrere Stunden bei 37 °C auf dem Innova 4000 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific) bebrütet. Anschließend wurde mit dieser Vorkultur 200 ml LB-Medium (incl. Amp) angeimpft, die über Nacht bebrütet wurden.

Am Folgetag wurde die Plasmid-DNA aus der Bakteriensuspension entsprechend des Protokolls mit Hilfe des Plasmid Maxi Kits (QIAGEN) präpariert. Anschließend wurden mitpräzipitierte Salze in 70 %-igem Ethanol gelöst und mit diesem verworfen. Das entstandene Plasmidpellet konnte in Reinstwasser resuspendiert werden und die Konzentration photometrisch (in Tris-EDTA, pH 8,8; Beckmann DU 530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer; Extinktion bei $\lambda=260$ nm x 40 (OD) x Verdünnungsfaktor) bestimmt werden.

3.4.1.3 Vorbereitung des Inserts: Gelelektion

Das Produkt einer PCR mit zehn 50 µl-Ansätzen (s. 3.2.4) (Primer: Ts5_hu_F, Ts5_hu_R; bzw. Ts5_hu_F, Ts5_IV_R und Ts5_IV_F, Ts5_hu_R) wurde konzentriert auf ein 1,5 %-iges Agarose-Gel aufgetragen. Nach Elektrophorese bei 100 V (ca. 90 min) wurde versucht, unter UV-Kontrolle die 4 Tetraspaninbanden getrennt voneinander auszuschneiden. Die Gelstücke wurden abgewogen und anschließend analog des beiliegenden Protokolls mit Hilfe des NucleoSpin Extract-Kits (Macherey-Nagel) aufgearbeitet. Die DNA wurde mit 2 x 25 µl Reinstwasser, pH 8,5 eluiert und anschließend mit einer Vakuumzentrifuge (Centrivac, Heraeus) aufkonzentriert.

Leider zeigte sich bei gelelektrophoretischer Kontrolle der Eluate keine gute Isolierung der vier Varianten, auch nicht bei Amplifikation nur des vorderen Tspan5-Abschnitts, weshalb dann doch

alle vier gemeinsam zur Ligation eingesetzt wurden, um später auf Ebene der Bakterienklone die Varianten zu trennen.

3.4.1.4 Restriktionsverdau

Plasmid: 10 µg Plasmid (pBlueskript SK+), 10 µl 10 x SuRE Cut Buffer H (Roche-Boehringer Mannheim), 20 U Hind III (NEB), 20 U Xho I (Roche-Boehringer Mannheim), mit Reinstwasser auf 100 µl

Insert: 10 µg Ts5-PCR-Produkt, 10 µl 10x SuRE Cut Buffer H, 20 U Hind III, 20 U Xho I, mit Reinstwasser auf 100 µl

Der Verdau erfolgte bei 37 °C über 2 h. Zeigte sich danach in der Gelelektrophorese, dass der Verdau des Plasmids noch nicht quantitativ war, wurde der Ansatz erneut in den Brutschrank gestellt.

Nach quantitativem Verdau wurde das Produkt mit 2,5 Vol. – 20°C-kaltem 100 %-igen Ethanol 2 h bei – 20°C präzipitiert und anschließend 30 min bei 4 °C und 13000 x g zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes erfolgte eine Resuspension in 400 µl 70 %-igem Ethanol um mitpräzipitierte Salze zu lösen, die nach weiterer Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 13000 x g mit dem Ethanol abgossen werden. Das DNA-Pellet wurde mittels Vakuumzentrifuge (Centrivac, Heraeus) getrocknet und in Reinstwasser resuspendiert.

3.4.2 Ligation

20 µl Ligationsansätze: 50 µg Vektor wurden mit 15 µg Insert, 2 µl 10 x T4 DNA Ligase Reagent Buffer (NEB) und 1 µl T4 DNA Ligase (NEB) versetzt und das evtl. fehlende Volumen mit Reinstwasser aufgefüllt. Die Ligation erfolgte jeweils über ein Wochenende im UNO-Thermoblock (Biometra) bei folgendem Temperatur-Schema: 30 h bei 8 °C, 12 h bei 12 °C, 12 h bei 16 °C, Pause bei 25 °C, 20 min bei 70 °C, anschließend 4 °C.

Da sich ein zu hoher Salzgehalt als nachteilig für die Transformation erwiesen hat, wurden die Ligationsprodukte ausgefällt, indem ihnen 2,5 Vol. – 20 °C-kaltes 100 %-iges Ethanol zugefügt und sie dann ≥ 4 h bei – 20 °C gelagert wurden. Nach Zentrifugation bei 13000 x g und 4 °C für ≥ 1 h wurde das Ethanol abgegossen und das entstandene Pellet in 500 μ l 70 %-igem Ethanol resuspendiert und 20 min bei 13000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend nach Abgießen des Ethanols in der Centrivac (Heraeus) getrocknet und in 10 μ l Reinstwasser resuspendiert.

3.4.3 Transformation

Je 40 μ l elektrokompetente *E. coli* des Stamms DH5 α wurden mit 2 μ l Ligationsprodukt vermischt in eine sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvette (*E. coli* Pulser/Gene Pulser Cuvettes, BioRad) überführt. Die Elektroporation erfolgte im *E. coli* Pulser (BioRad) mit 1,22 kV. Anschließend wurden die Zellen sofort in je 1 ml LB-Medium (s. 3.4.1.2) überführt, um sich 30 min bei 37 °C zu erholen. Nach Abzentrifugieren wurde das entstandene Zellpellet in 1 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium resuspendiert und davon 100 μ l ausplattiert (Platten (TPP Zellkultur-schalen \varnothing 100 x 20 mm): LB-Medium mit 1,5 % Bacto Agar und 1 ‰ Ampicillin (wurde erst unmittelbar vor dem Gießen zugefügt)). Der Rest der Bakteriensuspension wurde bis zum nächsten Morgen im Kühlschrank aufbewahrt, um ggf. nach kurzer Inkubation bei 37 °C weitere Bakterien auszuplattieren bzw. mit einem bestimmten Stamm weiterzuarbeiten. Die beimpften Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und die gewachsenen Kolonien am folgenden Morgen gezählt und daraus die Transformationsrate bestimmt.

3.4.4 Überprüfung der Transformation

3.4.4.1 Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob die Transformation erfolgreich war und die Bakterien das entsprechende Plasmid und damit auch das Insert aufgenommen haben und v. a. um zu überprüfen, welche Spleißvariante der entsprechende Klon exprimiert, wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Dazu wurden über Nacht gewachsene Kolonien mit der Pipettenspitze gepickt und im PCR-Mix (20 μ l-

Ansätze, analog zu s. 3.2.4; Forward-Primer: Ts5_hu_F, Reverse-Primer: Ts5_4_R) anstatt der cDNA suspendiert. Mit diesen Ansätzen wurden dann Hot start-PCRs gefahren (s. 3.2.4) und das PCR-Produkt anschließend auf ein 1,5 %-iges Agarosegel aufgetragen.

Nach der Elektrophorese bei 100 V zeigte sich im UV-Licht, ob der Klon das Plasmid mit dem gewünschten Insert tatsächlich enthielt.

3.4.4.2 Plasmid-Päparation (Miniprep) und HotShot-Sequenzierung

Die nach dem Picken jeweils einer Kolonie abgeworfene Pipettenspitze wurde genutzt, um mit dem jeweiligen Klon eine neue Bakterienkultur (5 ml) anzuimpfen. Diese wurde über Nacht bei 37 °C bebrütet, um am Folgetag daraus zum einen das Plasmid zur näheren Analyse (HotShot-Sequenzierung) zu präparieren, zum anderen um Glycerinkulturen zum Einfrieren anzulegen.

a) Plasmid-Präparation (Miniprep)

Aus 3 ml Übernacht-Bakterienkultur wurde das Plasmid mithilfe des NucleoSpin Plasmid Quick-Pure-Kits (Macherey-Nagel) analog des vorgegebenen Protokolls präpariert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mittels μ -Quant (3 μ l Plasmid-Lösung in 147 μ l 5 mM Tris; pH 8,5).

b) HotShot-Sequenzierung

0,6 μ g Plasmid wurden mit 20 pmol T7-F-Primer bzw. BGH-R-Primer in einem Gesamtvolumen von 7 μ l 5mM Tris; pH 8,5 zur HotShot-Sequenzierung zu Seqlab, Göttingen versandt.

3.4.5 Anlegen von Glycerinkulturen

Nach dem Abzentrifugieren von 2 ml Bakterienkultur wurde das entstandene Pellet in 800 μ l LB-Medium mit Ampicillin resuspendiert und in einem Gefrierrohrchen (Cryo.S Cellstar, Greiner Labortechnik) mit 200 μ l Glycerin vermischt in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei - 70 °C.

3.5 Zellkultur

3.5.1 verwendete Zelllinien:

- Daoy: adhären wachsende humane Medulloblastomzellen
- N2A: adhären wachsende murine Neuroblastomzellen

3.5.2 verwendete Plasmide:

Transfiziert wurden zwei verschiedene Klone der humanen Δ III-Spleißvariante, sowie murines Tetraspanin-5 in pcDNA3.1. Als Kontrollen dienten der Leervektor, EGFP in pcDNA3.1 sowie eine Scheintransfektion ohne Plasmid (s. Tab. 2).

	Insert	Vektor
1	-	-
2	Ts5_hu_ΔIII	pcDNA3.1
3	Ts5_hu_ΔIII	pcDNA3.1
4	Ts5_m	pcDNA3.1
5	EGFP	pcDNA3.1
6	-	pcDNA3.1

Tab. 2: Konstrukte zur Transfektion von Daoy- und N2A-Zellen. Gelistet sind die cDNA-Fragmente und der Vektor, die für die Konstruktion der Klone verwendet wurden. Ts5_hu_ΔIII: humane Δ III-Spleißvariante (zwei Klone), Ts5_m: murines Tspan5; Kontrollen: Leervektor und EGFP in pcDNA3.1

3.5.3 Transfektion von Zelllinien

3.5.3.1 Bestimmung der Zellzahl

Nach Trypsinieren einer konfluenten Zellkultur und Abzentrifugieren dieser Zellsuspension wurde das entstandene Pellet in 300 µl DMEM (Gibco, Invitrogen) resuspendiert und 20 µl dieser Suspension mit 80 µl 0,5 %-iger Trypanblau-Lösung verdünnt. Davon wurden 10 µl in eine Zählkammer überführt und vier große Quadrate ausgezählt. Anhand dessen konnte die Zellzahl / ml bzw. das Volumen, das die gewünschte Zellzahl zur Transfektion enthielt (50 000 (für Daoy) oder 100 000 (für N2A) Zellen), berechnet werden.

3.5.3.2 Bestimmung der Plasmidkonzentration

Je 3 µl Plasmid-Lösung (Maxiprep) wurde in 147 µl Tris, pH 8,5 verdünnt und anschließend mittels µQuant die OD bei 260 nm bestimmt (als Leerwert dienten 150 µl Tris, pH8,5). Da 1 OD 50 µg/ml DNA entspricht, ließ sich daraus die Konzentration berechnen.

3.5.3.3 eigentliche Transfektion

Die Transfektion der am Vortag ausgesäten Zellen mit den entsprechenden Plasmiden und FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche) erfolgte nach dem vorgegebenen Protokoll (www.roche-applied-science.com/pack-insert/1814443a.pdf) für 6-Well-Platten (TPP Zellkultur Testplatte 6).

Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen in 10 cm-Kulturschalen (TPP Zellkulturschalen Ø 100 x 20 mm) umgesetzt und ab da zur Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen dem DMEM/10 % FCS-Medium Zeocin (Invitrogen) (50 µg/ml Medium) und zum Schutz vor Infektionen Penicillin / Streptomycin (1:1000) zugefügt. Die Kulturen wurden täglich kontrolliert und das Medium je nach Zustand und Menge des Zelldetritus gewechselt. Annähernd konfluent besiedelte Platten wurden gesplittet.

3.5.4 Nachweis spezifischer Proteine mittels Western Blot

3.5.4.1 Proteinextraktion aus Zellkultur

Nach zweimaligem Waschen der Zellkulturplatten (je 4 konfluente Platten) mit je 4 ml eiskaltem PBS wurden die Zellen mit je 2 ml eiskaltem PBS mit einem Zellschaber (Sarstedt) von den Platten geschabt und 10 min bei 200 x g und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 3 ml Proteinextraktionspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 25 µg/ml Leupeptin (Thiol-Protease-Inhibitor), 25 µl/ml Aprotinin (Serin-Protease-Inhibitor)) resuspendiert und die entstandene Zellsuspension für 30 sec mit 60 % Power und 5 Zyklen sonifiziert (Sono-plus Ultraschall-Homogenisator UW 2070, Bandelin Electronic Berlin).

Anschließend konnten die Proteinproben in flüssigem Stickstoff eingefroren werden und bei – 80 °C lagern.

Zur Proteinbestimmung wurde der BioRad Protein Assay 500-0005 (s. 3.1.1.4 d) benutzt. Als Standard dienten folgende BSA-Konzentrationen: 0 µg/ml, 1,5625 µg/ml, 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25,0 µg/ml. Die Proteinproben wurden 1:500 verdünnt.

3.5.4.2 Western Blot

Auf ein 12 %-iges SDS-Gel (s. 1.1.3) wurden 20 µl Proteinlösung (je 5 µl 4 x Probenpuffer (2 x Tris/SDS, 10 % β-Mercaptoethanol, 2 % SDS, 10 % Sucrose, 20 µg/ml Bromphenol-Blau in Reinstwasser), 15 µg Protein in Reinstwasser; ergab die Proteinbestimmung einen Konzentration < 1000 µg/ml, so wurde unabhängig von der Konzentration 15 µl Proteinprobe eingesetzt) je Spur aufgetragen, als Größenmarker wurde der Kaleidoscope Prestained Standard (BioRad) eingesetzt. Die Elektrophorese (s. 3.1.1.3) bei 40 mA im Trenngel wurde kurz vor Erreichen des unteren Gelrandes gestoppt, und anschließend wurden die Proteine bei 86 mA über 90 min auf eine PVDF-Membran (Hybond, Amersham) transferiert (entspricht 0,8 mA/cm²).

Auf der Höhe von etwa 20 kDa wurde die Membran durchgeschnitten und beide Membranteile mindestens 1 h mit 5 %-igem Milchpulver-PBST geblockt. Anschließend wurden die Membranteile über Nacht bei 4 °C mit dem Erstantikörper inkubiert, und zwar der Teil mit den Proteinen >

20 kDa mit Anti-Tspan5-Antikörper (1:5000 in 5 %-igem Milchpulver-PBST), der mit den Proteinen < 20 kDa mit Anti- β 2-Mikroglobulin-Antikörper (1:5000 in 2 % BSA-PBST; vorher durch 3 Faltenfilter gefiltert).

Am Folgetag wurden beide Membranteile mehrfach gründlich mit PBST gewaschen und für 2 h mit dem Zweitantikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-HRP, 1:5000 in 5 %-igem Milchpulver-PBST (> 20 kDa) bzw. 2 %-igem BSA-PBST (< 20 kDa)) bei 4 °C inkubiert und anschließend wieder mehrfach mit PBST gespült.

Zum Detektieren der Proteinbanden wurde die Membran wieder zusammengesetzt, mit Western Blot Detection Reagent (Amersham) benetzt und damit ein Autoradiografie-Film (Kodak) belichtet (3 min, 15 min).

3.5.5 Nachweis spezifischer mRNAs mittels PCR

3.5.5.1 RNA-Präparation aus Zellkultur

Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und nach zweiminütigem Homogenisieren mit Trizol mit einem Zellkulturschaber von den Platten heruntergeschabt und für weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch 10 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert und dem Überstand 200 μ l Chloroform zugefügt. 5 min Inkubation bei Raumtemperatur schloss sich eine erneute Zentrifugation für 15 min bei 12000 x g und 4 °C an, um die wässrige von der phenolischen Phase zu trennen. Der wässrigen Phase wurde zum Ausfällen der RNA Isopropanol zugefügt (entweder bei – 20 °C über Nacht oder 10 min bei Raumtemperatur). Nach Verwerfen des Überstandes wurden mit - 20 °C-kaltem 70 %-igen Ethanol verbliebene Salze ausgewaschen. Das nach Zentrifugieren verbleibende Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend in DEPC-enthaltendem Reinstwasser resuspendiert. Zur besseren Löslichkeit der RNA wurde die Suspension 5 min bei – 80 °C eingefroren und danach direkt auf + 60 °C erhitzt. Zum Aufbewahren wurde die RNA bei – 80 °C eingefroren.

3.5.5.2 Reverse Transkription (s. 3.2.2)

3.5.5.3 PCR

Um den Erfolg der Transfektion auf Ebene der Nucleinsäuren zu überprüfen, wurde die DNA mittels PCR (s. 3.2.4 für 20 µl-Ansätze) amplifiziert und nach Gelelektrophorese mit Hilfe der UV-Lampe dargestellt. Als Primer dienen Ts5_hu_F, Ts5_4_R oder Ts5_hu_R (humane Sequenz als Insert) bzw. Ts5_m_F, Ts5_m_R (murine Sequenz als Insert).

4. Ergebnisse

4.1 Immunhistochemischer Nachweis des Tetrspanin-5

Antikörper besitzen je nach Typ und Erkennungsepitop sehr unterschiedliche Eigenschaften, die die Nutzbarkeit in immunhistochemischen und molekularbiologischen Analysen bestimmen. Zudem unterscheidet sich jede Antikörperpräparation in ihrem Gehalt an spezifischem Antikörper und damit in der Verdünnung, die für Experimente optimal ist. Insbesondere bei Verwendung von polyklonalen Seren ist zudem die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen. Deswegen müssen vor den eigentlichen Experimenten die optimalen Bedingungen für jeden Antikörper und für jede Antikörperpräparation ermittelt werden.

4.1.1 Etablierung der immunhistochemischen Färbung an Paraffinschnitten

Der hier verwendete Antikörper wurde im Kaninchen hergestellt und aus dem vom immunisierten Kaninchen gewonnenen Blutplasma mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Das Eluat wurde konzentriert und die Proteinmenge des Konzentrats nach Bradford ermittelt. Erster Schritt in der Etablierung einer immunhistochemischen Färbung ist die Wahl eines geeigneten Fixans. Routinemäßig werden hierfür vernetzende und präzipitierende Agenzien eingesetzt. In dieser Arbeit wurde eine Kombination aus beiden Methoden in Form der Bouin'schen Fixierlösung und ein rein vernetzendes Agens, das Formalin eingesetzt. Aldehyde wie z. B. Formalin denaturieren Proteine durch Vernetzung von Aminogruppen, bei Bouin-Fixierung hingegen bleibt die Proteinstruktur erhalten. Die Nutzung von Paraffinschnitten begründet sich in der sehr guten morphologischen Erhaltung des Gewebes und damit in einer detaillierteren Analysemöglichkeit.

Als Testschnitte wurden Sagittalschnitte von 9 Tage alten Mäusehirnen verwendet, weil sich in diesem Alter in der in situ-Hybridisierung (ISH) eine hohe Tspan5-Expression gezeigt hatte (Juenger et al., 2004). Als Basisprotokoll dienten Tritonbehandlung, Hitzedenaturierung und als niedrig stringentes Blockiermittel bovines Serumalbumin (BSA). Während bei formalinfixiertem

Gewebe eine schichtenspezifische Färbung des Kleinhirnkortex zu sehen war, zeigten die Bouinfixierten Präparate auch nach längerer Farbentwicklung keine Reaktion.

Für die Bindung des Antikörpers an die als Epitop wirkende carboxyterminale Peptidsequenz von Tetraspanin-5 scheint es also notwendig zu sein, dass das Protein durch vernetzende Fixanzien in seiner Tertiärstruktur aufgeschlossen wird. Diese Vermutung ließ sich durch eine zusätzliche Nachfixierung der Präparate mit 4 % Paraformaldehyd / 0,5 % Glutaraldehyd und eine dadurch verursachte stärkere Färbung bestätigen. Das Permeabilisieren der Membran mit Triton X-100 führte allerdings zu keiner zusätzlichen Steigerung der Färbeintensität.

Das Ergebnis immunhistochemischer Färbungen hängt stark von Qualität und Konzentration der Antikörperlösung ab. Deswegen haben wir den Anti-Tspan5-Antikörper, der nach Aufreinigung in einer Konzentration von 148,87 µg/ml vorlag, in verschiedenen Konzentrationen dieser Lösung (1:50, 1:100, 1:200, 1:500) eingesetzt. Dabei ist es wichtig, eine Antikörperkonzentration zu wählen, mit der zum einen ein ausreichendes Signal gewährleistet ist, andererseits aber auch noch eine Differenzierung unterschiedlichen Proteingehalts anhand der Färbeintensität möglich ist, was bei unserem Antikörper bei einer Konzentration von 1:200 (entspricht 0,74 µg/ml) der Fall war.

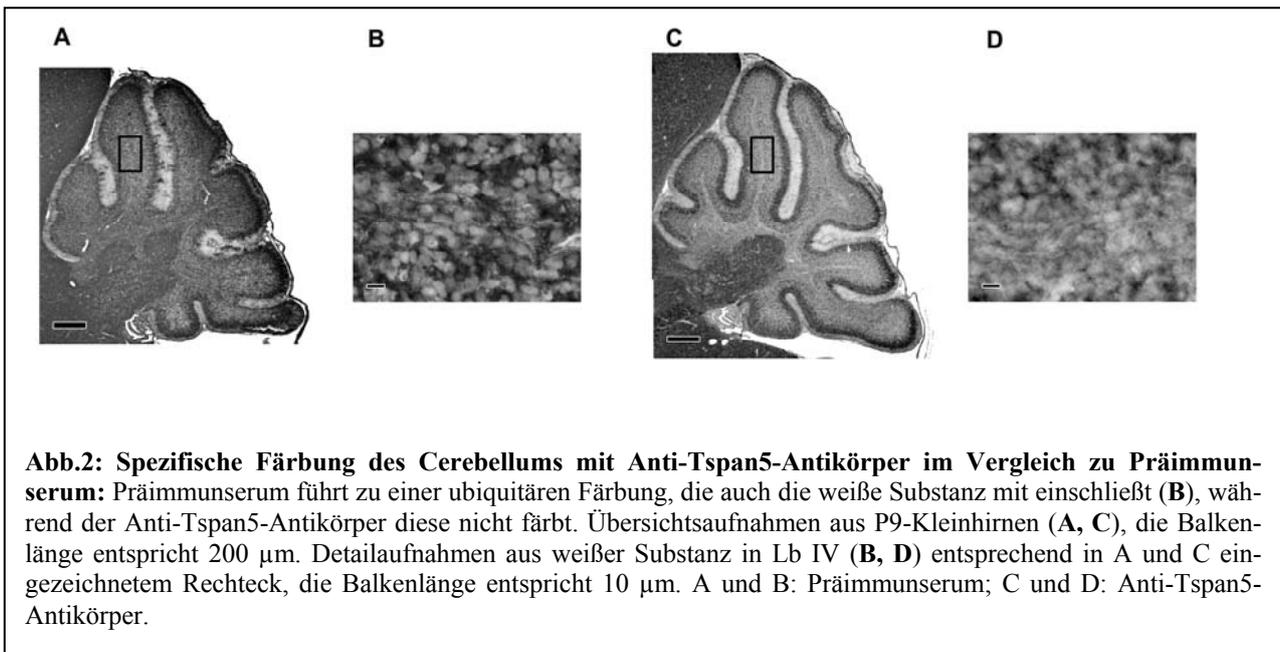
4.1.2 Kontrollexperimente zum Nachweis der Spezifität der Immunreaktion

Jede Herstellung eines Antikörpers ist mit der Überprüfung seiner Qualität und Spezifität verbunden, d. h. der spezifischen Bindung des Antikörpers an das gewünschte Antigen.

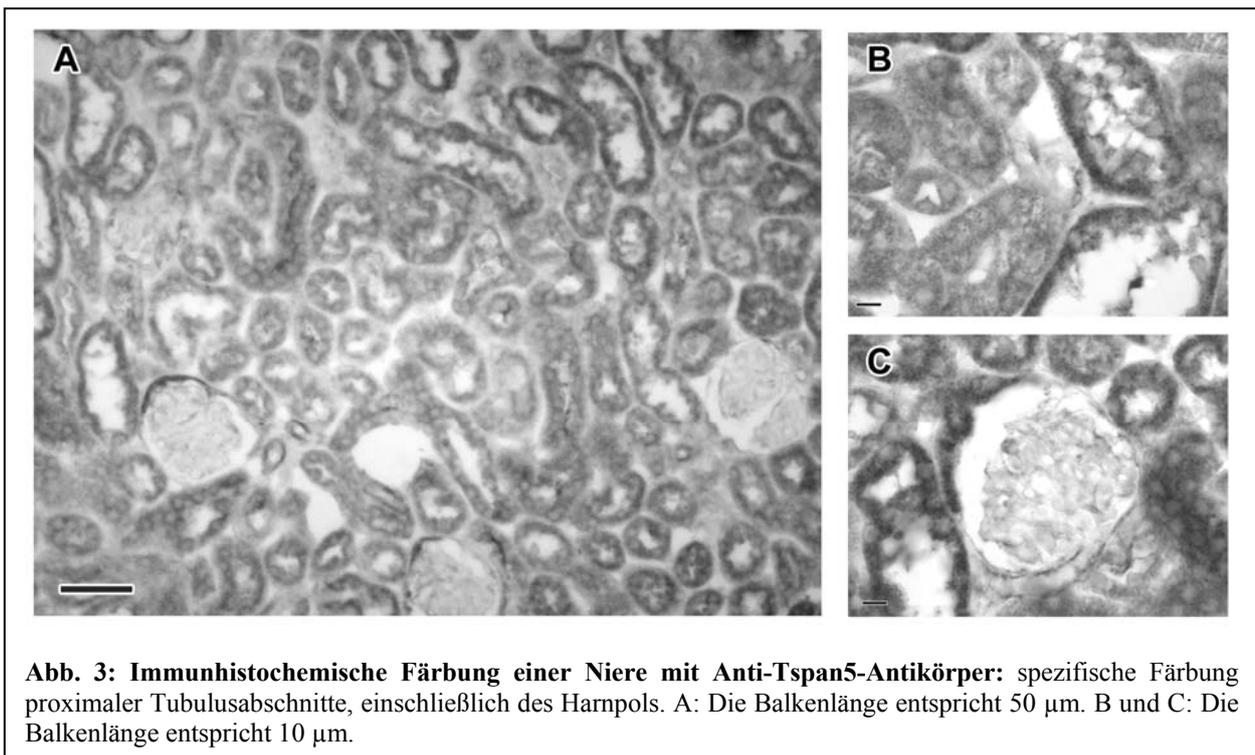
a) Vergleich des Immuserums mit dem Präimmuserum

Erste Überprüfung der Qualität einer Antikörperpräparation ist der Vergleich des Serums vor Immunisierung des Kaninchens mit Serum des Kaninchens nach der Immunisierung mit dem spezifischen Antigen in einer immunhistochemischen Färbung. Dadurch kann ermittelt werden, ob überhaupt ein Antikörper auf Grund der Immunisierung produziert worden ist.

Nach Färbung mit dem Präimmunserum zeigte sich eine ubiquitäre Färbung, sowohl in den zellulären als auch in den Faserregionen des Kleinhirnkortex. Der Antikörper hingegen färbte im Wesentlichen Purkinjenzellen und deren Fortsätze, die Zellen der inneren Körnerschicht sowie die Molekularschicht im Bereich zwischen den Purkinjenzell-Dendriten. Die weiße Substanz war nicht gefärbt (Abb. 2).



b) Immunhistochemie an Niere und Milz



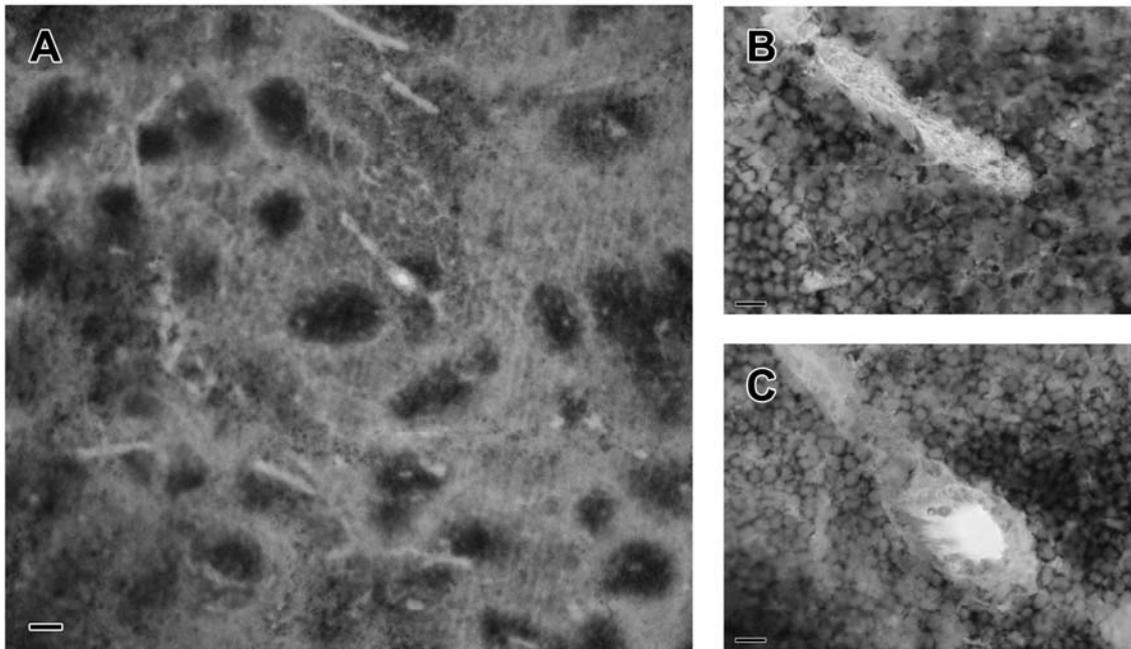


Abb. 4: Immunhistochemische Färbung einer Milz mit Anti-Tspan5-Antikörper, gegengefärbt mit Mayers Hämalaun: spezifische Anfärbung der weißen Pulpa, einschließlich der periarteriellen lymphatischen Scheiden (B, C). A: Die Balkenlänge entspricht 50 μm . B und C: Die Balkenlänge entspricht 10 μm .

Da uns aus der Literatur (Juenger et al., 2004, García-Frigola et al., 2000) bekannt war, dass die Niere Tetraspanin-5-mRNA enthält, die Milz aber nicht, haben wir als nächstes die Spezifität unseres Antikörpers auf diesen beiden Organen getestet.

In der Niere konnten wir dabei wie bei Juenger et al. (2004) beschrieben eine sehr heterogene Lokalisation von Tspan5 feststellen (Abb. 3): während tubuläre Bereiche ein deutliches Signal aufwiesen, waren Glomerula annähernd negativ (Abb. 3 C). Besonders stark war die Färbung proximaler Tubulusabschnitte einschließlich des Harnpols, während sich distale Tubulusabschnitte schwächer anfärbten.

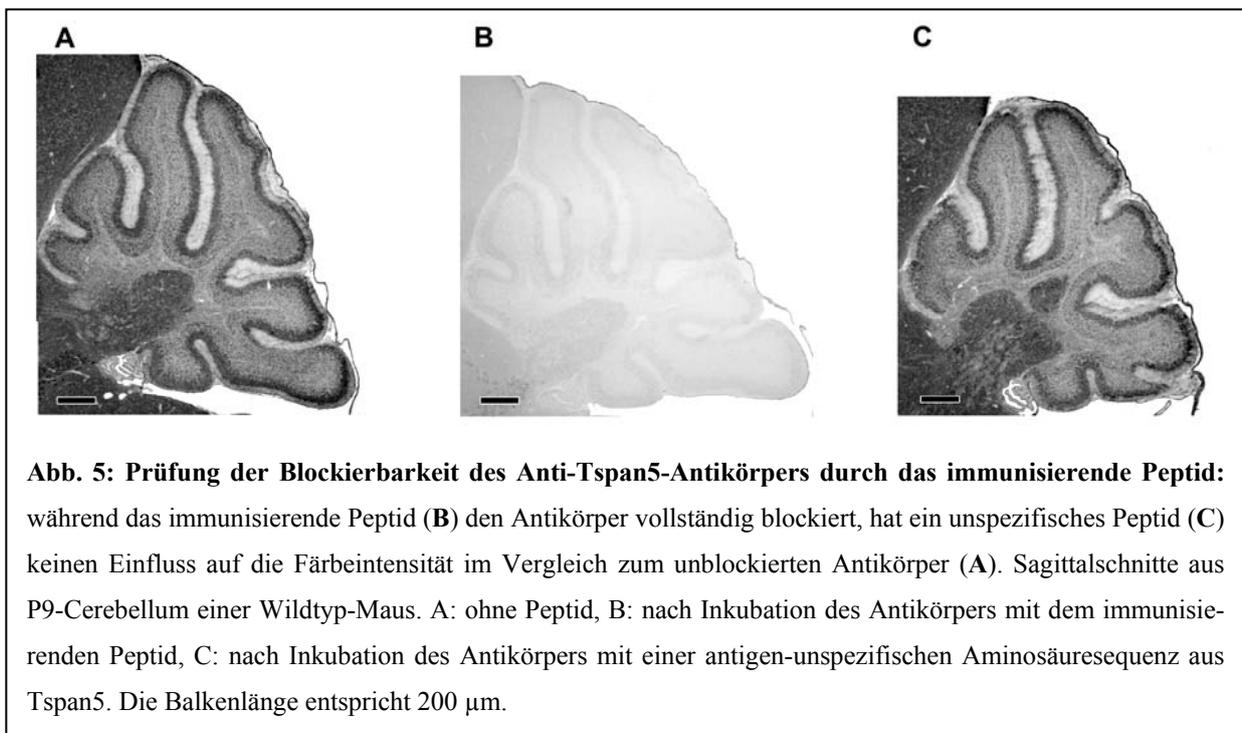
In Bezug auf die Milz wichen unsere Befunde allerdings von denen von García-Frigola et al. (2000) und Juenger et al. (2004) ab, die weder mittels Northern Blot noch mittels in situ-Hybridisierung Tetraspanin-5 finden konnten. Immunhistochemisch zeigte sich eine Anreicherung von

Tspan5 im Bereich der weißen Pulpa (Abb. 4). Sowohl die Milzfollikel als auch die periarteriellen lymphatischen Scheiden (PALS) wiesen dabei ein starkes Signal auf (Abb. 4). Eine Hintergrundfärbung kann ausgeschlossen werden, da der Zweitantikörper keinen Hintergrund macht und es sich außerdem um eine spezifische Färbung in den PALS, also den T-Zellregionen handelt. Auch der Westernblot zeigt eine spezifische Bande auf Höhe des Tspan5-Proteins, so dass wir im Bereich der Milz von einem Tetraspanin-5 spezifischen Signal ausgehen.

c) Blockierung durch Peptide

Basierend auf den diskrepanten Ergebnissen, haben wir die Spezifität des Antikörperserums überprüft indem wir dessen Bindungsstelle durch sequenzspezifische Peptide blockiert haben.

Inkubiert man den Antikörper 15 min mit dem immunisierenden Peptid (150-facher Peptidüberschuss), lässt sich dadurch das Signal aufheben (Abb. 5 B). Inkubiert man ihn hingegen mit einer antigen-unspezifischen Aminosäuresequenz aus Tspan5, kommt es zu keinerlei Signalabschwächung, das Präparat färbt sich genauso an wie ohne Peptid (Abb. 5 C).



Die Färbung durch das Präimmunserum lässt sich durch Zugabe des immunisierenden Peptids nur geringfügig und in allen Kortexarealen gleichmäßig abschwächen.

Zusätzlich zu diesen Untersuchungen haben wir unsere Peptidsequenz mit der Maus-Datenbank verglichen (BLAST-Search, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi) und nach homologen Sequenzen gesucht. Diese Suche ergab eine 100 %-ige Übereinstimmung der Sequenz lediglich mit dem Tetraspanin-5 verschiedener Spezies und einem sog. Tetraspanin-5-ähnlichen Protein, dessen Sequenz für verschiedene Säugetierspezies (nicht für die Maus) anhand deren genetischer Sequenz vorhergesagt wurde und das dem jeweiligen artspezifischen Tetraspanin-5 entsprechen könnte. Es konnten aber keine Homologien zu anderen Sequenzen festgestellt werden.

Die Ergebnisse unserer Kontrollen zeigen, dass der von uns entwickelte Antikörper eine Peptidsequenz erkennt, die für Tetraspanin-5 spezifisch ist.

4.2 Tetraspanin-5-Expression während der Kleinhirnentwicklung

Tetraspanin-5 wird während der postnatalen Entwicklung im Mäusecerebellum hochreguliert (Abb. 6). Während sich am Tag der Geburt (P0) immunhistochemisch nur ein sehr schwaches Signal, besonders im Bereich der Purkinjenzell-Schicht und hier insbesondere im Lobus posterior, nachweisen lässt (Abb. 6 A, B), sieht man bereits am 3. postnatalen Tag (P3) eine deutliche Intensivierung der Färbung der Purkinjenzell-Schicht, die zu diesem Zeitpunkt noch ein breites Zellband darstellt (Abb. 6 C, D).

Besonderes auffällig sind an P3 die radial durch die Molekularschicht bis hin zur Pia verlaufenden Fortsätze die sich stark Tspan5 positiv darstellen (Pfeil in Abb. 6 D). Da Purkinjenzellen ihren Dendritenbaum erst ab ca. P5 ausbilden, dieser erst nach ca. 17 Lebenstagen vollständig entwickelt ist (Jankowski et al., 2004), kann es sich hierbei nicht um Purkinjenzell-Dendriten handeln. Wir vermuten daher, dass es sich um die Fasern von Bergmann-Glia handelt, die den Körnerzellen als Leitstruktur für ihre radiale Migration in den cerebellären Cortex dienen. Ihre Somata liegen zwischen den Purkinjenzellen und ihre Fortsätze ziehen radiär bis unter die Pia, wo ihre Endfüßchen die Membrana limitans gliae bilden. Zur eindeutigen Identifizierung der radiären

Fasern wäre eine fluoreszente Doppelfärbung notwendig, wobei sich als Markergene für Purkinjezellen Calbindin und als Marker der radiären Glia das RC2-Antigen anbieten würde.

Zum Zeitpunkt P5 zeigt sich eine noch stärkere Färbung, weiterhin mit einer Betonung des Lobus posterior (Abb. 6 E). Wieder zeigen die Purkinjezellen ein deutliches Signal (Abb. 6 F). Inzwischen sind erste Ansätze ihres Dendritenbaums sichtbar, die auch Tspan5 positiv sind. Während sich in der EGL keine Zellen eindeutig abgrenzen lassen, zeigen die Zellen der IGL eine gleichmäßige Färbung. Die an P3 so deutlich sichtbaren radial verlaufenden Fasern sind nach wie vor sichtbar, allerdings im Vergleich zu den Purkinjezell-Dendriten deutlich abgeschwächt.

Ab P7 ist die Purkinjezell-Schicht in allen Lobi vergleichbar stark gefärbt (Abb. 6 G). Deutlich sieht man jetzt die auswachsenden Dendriten, die wie die entsprechenden Perikarya stark Tspan5 positiv sind (Abb. 6 H). Körner- und Golgi-Zellen in der IGL exprimieren ebenfalls Tspan5, auch in der EGL lassen sich vereinzelt Tspan5-haltige Zellen vermuten (weniger als 5 pro Gesichtsfeld bei 1000-facher Vergrößerung), eine eindeutige Zuordnung ist aber auf Grund der hier stark gefärbten Purkinjezell-Dendriten nicht möglich.

Zwei Tage später (P9) ist der Dendritenbaum, der sich wie der entsprechende Purkinjezellkörper immunhistochemisch gut darstellt, weiter gewachsen (Abb. 6 I, J). Die Molekularschicht zeigt bis auf Höhe der Dendritenenden ebenfalls eine ubiquitäre Färbung. Während die Zellen der inneren Körnerschicht nach wie vor gleichmäßig angefärbt sind, sieht man, dass sich in der externen Körnerschicht der innere Bereich mit postmitotischen, prämigrationären Zellen stark von dem ungefärbten äußeren Bereich abhebt (Pfeil in Abb. 6 J).

Der angefärbte Teil der Molekularschicht scheint im weiteren Verlauf mit dem Dendritenbaum der Purkinjezellen mitzuwachsen. Ein sehr gleichmäßiges Signal zeigt sich im Bereich zwischen den Dendriten bis auf Höhe ihrer Endigungen.

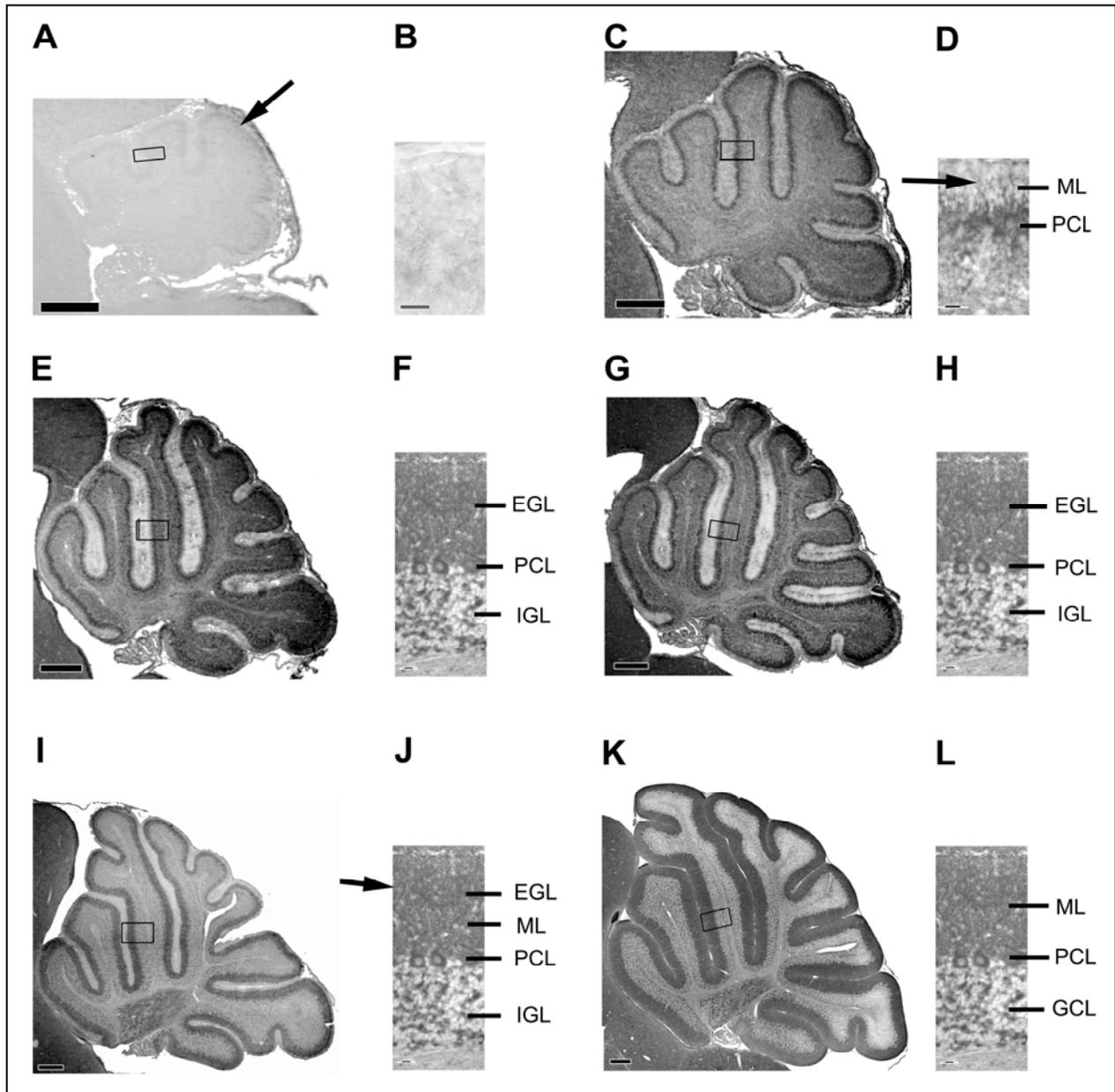


Abb. 6: Veränderung des Tspan5-Gehalts im Wildtyp-Cerebellum während der postnatalen Entwicklung:

An P0 sieht man eine nur schwache Färbung im Bereich des Lobus posterior (A, B, Pfeil in A), die in Purkinjezellen besonders ab P3 (C, D) hochreguliert wird. Zu diesem Zeitpunkt färben sich auch die Fortsätze der Bergmann-Glia (Pfeil in D) an. Im weiteren Verlauf stellt sich Tspan5 in postmitotischen Purkinje- und Körnerzellen, zum Zeitpunkt P9 (I, J) auch im Bereich der postmitotischen, prämitotischen Zellen der EGL (Pfeil in J) dar. Die Färbung der Molekularschicht verläuft parallel zum Wachstum der Purkinje-Zelldendriten. A, B: P0; C, D: P3; E, F: P5; G, H: P7; I, J: P9; K, L: P15. Übersichtsaufnahmen (A, C, E, G, I, K): Die Balkenlänge entspricht 200 μ m. Detailaufnahmen (B, D, F, H, J, L) aus den in Lb IV gekennzeichneten Bereichen: Die Balkenlänge entspricht 10 μ m. EGL: externe Körnerschicht, ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjezellschicht, IGL: interne Körnerschicht, GCL: Körnerschicht.

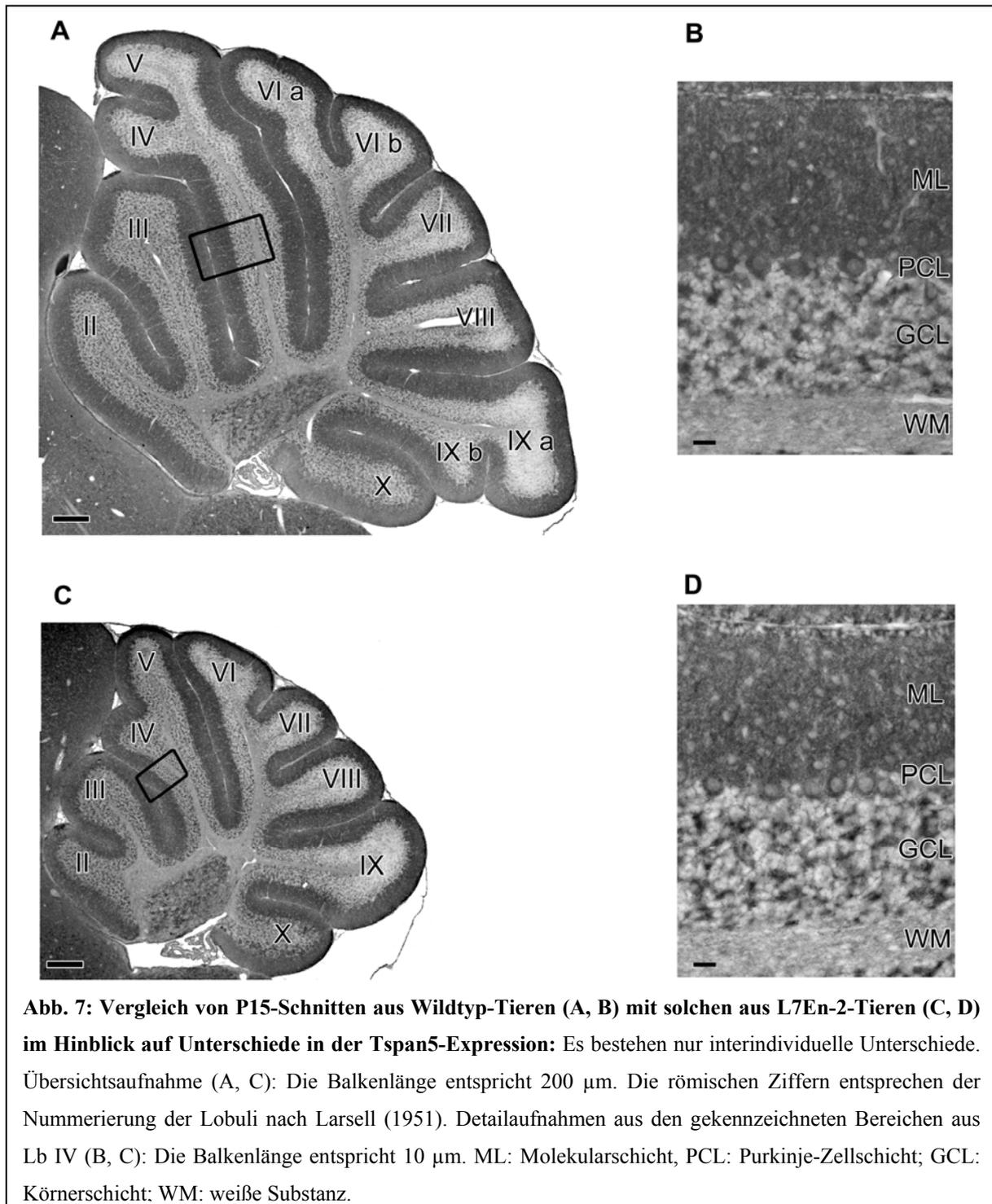
Ein adultes Färbemuster zeigt sich ab P15 (Abb. 6 K, L): Purkinjezellen und deren Fortsätze, sowie Körner- und Golgi-Zellen der IGL weisen ein starkes Tspan5-Signal auf. Aber auch die Molekularschicht ist homogen angefärbt, was für eine Lokalisation von Tspan5 in den dort vorkommenden Dendriten und Axonen spricht. Auf Grund dieser Färbung ist schwer abzugrenzen, inwieweit auch residente Zellen der Molekularschicht wie Korb- und Sternzellen angefärbt wurden.

Bei Beobachtung der Entwicklung der Tetraspanin-5-Expression in Kleinhirnen von Mäusen vom Tag der Geburt bis hin zu adulten Tieren zeigte sich, dass das Tspan5-Protein während der ersten postnatalen Tage bereits hochreguliert wird. Eine starke Expression konnten wir vor allem in Purkinjezellen sowie postmitotischen Körnerzellen sehen. Aber auch Gliazellen schienen Tetraspanin-5 zu exprimieren.

4.3 Vergleich der Tetraspanin-5-Expression in Wildtyp und L7En-2 transgenen Mäusen

Juenger et al. (2004) haben für Purkinjezellen einen sprunghaften Anstieg der Tetraspanin-5-mRNA von P5 auf P7 beschrieben, der zeitgleich mit den frühen Stadien der Dendritogenese (ab P5) auftritt. In L7En2-Tieren, bei denen die Purkinjezell-Entwicklung verzögert abläuft, zeigte sich konsistent bis hin zum adulten Kleinhirn eine verminderte Tspan5-Expression. Dies ließ Juenger et al. vermuten, dass Tetraspanin-5 für die Bildung der reifen Dendriten von Purkinjezellen eine wichtige Rolle spielt.

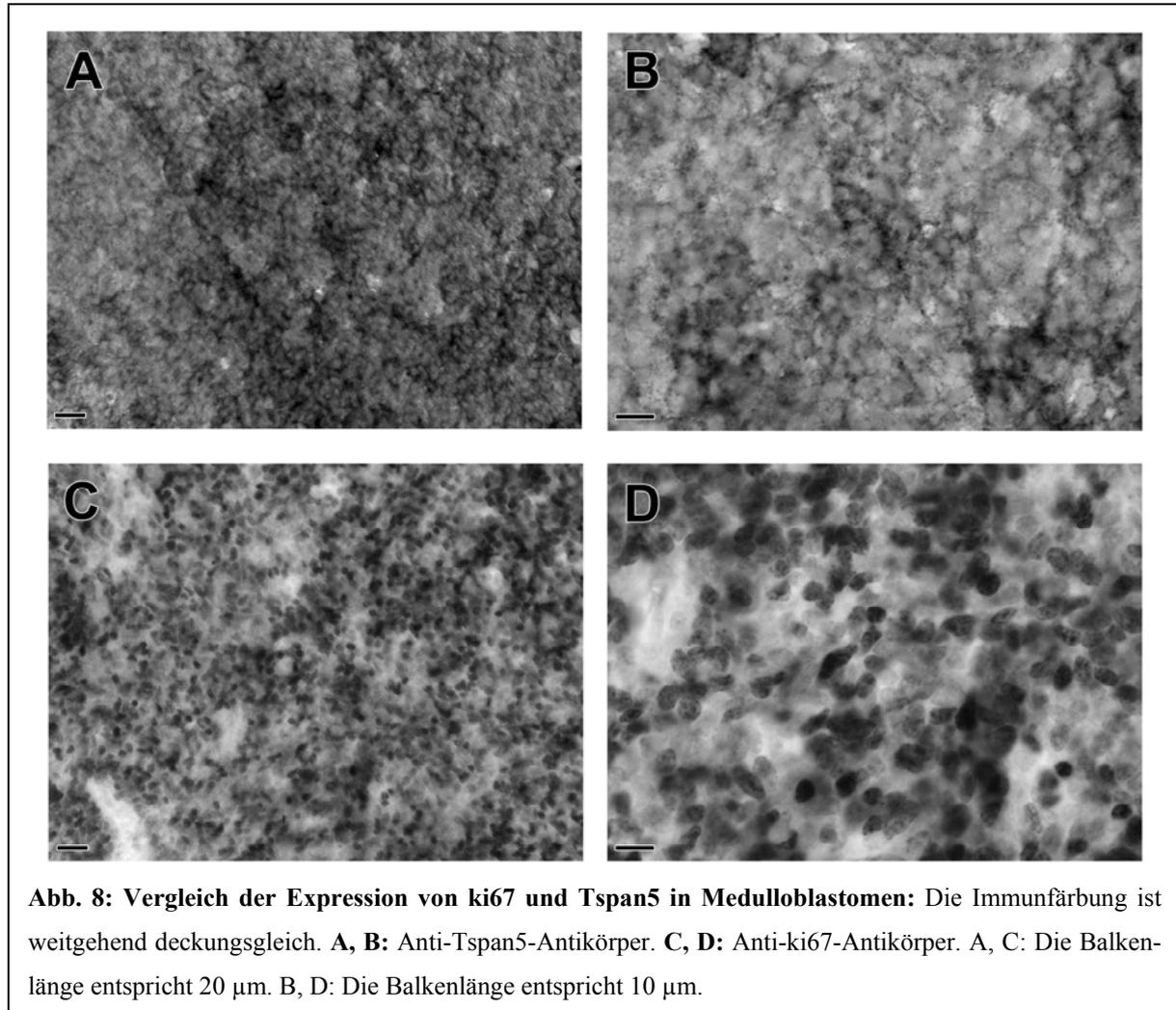
Auf Proteinebene zeigte sich uns bereits an P3, also bereits im Stadium der multipolaren Dendritenbäume, ein sprunghafter Anstieg von Tetraspanin-5. Zum Vergleich haben wir deswegen den Antikörper auch auf L7En2-Präparaten eingesetzt, wo sich uns weder eine andere Verteilung von Tspan5 als beim Wildtyp, noch Unterschiede in der Expressionsstärke darstellten (Abb. 7). Gesehene Differenzen in der Signalstärke der Purkinjezellen im Vergleich zu den Körnerzellen sind nicht konsistent und scheinen eher auf interindividuellen Unterschieden zu beruhen.



Das Kleinhirn von $\text{En}^{-/-}$ -Mäusen ist auf Grund des anderen genetischen Hintergrundes in seiner Entwicklung dem der FVB/N-Mäuse (L7En2, entsprechender Wildtyp) um drei Tage voraus. Entsprechend früher zeigte sich hier auch eine Tetraspanin-5 Expression. So entspricht die Expression des Tspan5-Proteins im Cerebellum von $\text{En}^{-/-}$ -Mäusen zum Zeitpunkt der Geburt derjenigen, die wir in FVB/N-Mäusen erst zum Zeitpunkt P3 gesehen haben. Berücksichtigt man

diese zeitliche Verschiebung, so zeigte sich uns, in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Juenger et al. (2004) für Tspan5-mRNA, in vermalen Sagittalschnitten aus Kleinhirnen von Wildtyp und $En^{-/-}$ -Tieren ein vergleichbares Expressionsmuster des entsprechenden Proteins.

4.4 Immunhistochemische Färbung des Medulloblastoms gegen Tetraspanin-5



Noduläre desmoplastische Medulloblastome sind kleinknotig aufgebaut. Inseln weniger dicht gepackter differenzierter Zellen sind umgeben von dichter liegenden, hochproliferativen Zellen, die ein dichtes Netz aus interzellulären Retikulinfasern bilden. Das klassische Medulloblastom unterscheidet sich von der desmoplastischen Variante durch das Fehlen des Retikulinnetzes und des nodulären Aufbaus (Pietsch et al. 1997). Ätiologisch leiten sich die desmoplastischen Medulloblastome von Körnerzellvorstufen ab und zeigen in etwa 20 % Mutationen im Patched-

Gen (Pietsch et al., 1997; Kenney et al., 2002), einem Tumorsuppressor-Gen im Sonic Hedgehog(ssh)-Pathway. Da wir in ausdifferenzierten Körnerzellen Tspan5 nachweisen konnten, stellte sich die Frage, ob dies auch für die Zellen desmoplastischer Medulloblastome zutrifft.

Mäuse mit Nullmutation des Patched-Gens ($ptc^{-/-}$) können hier als Modell dienen, da sie auf Grund ihrer Mutation zur Bildung einer Vielzahl von Tumoren und insbesondere auch zur Ausprägung nodulärer desmoplastischer Medulloblastome neigen (Kenney et al., 2002). In der immunhistochemischen Färbung von Kleinhirnen solcher Patched^{-/-}-Tiere zeigte sich innerhalb der Knötchen eine starke Färbung für Tspan5, die sich weitgehend mit NeuN positiven Bereichen deckt. NeuN ist ein Marker für ausdifferenzierte Neuronen. Diese Färbung ließ sich aber auf Grund des Zellreichtums nur schlecht beurteilen. Auf Grund von Randeffekten und anderer Artefaktmöglichkeiten lässt sich hier keine Aussage über den Tspan5-Gehalt machen.

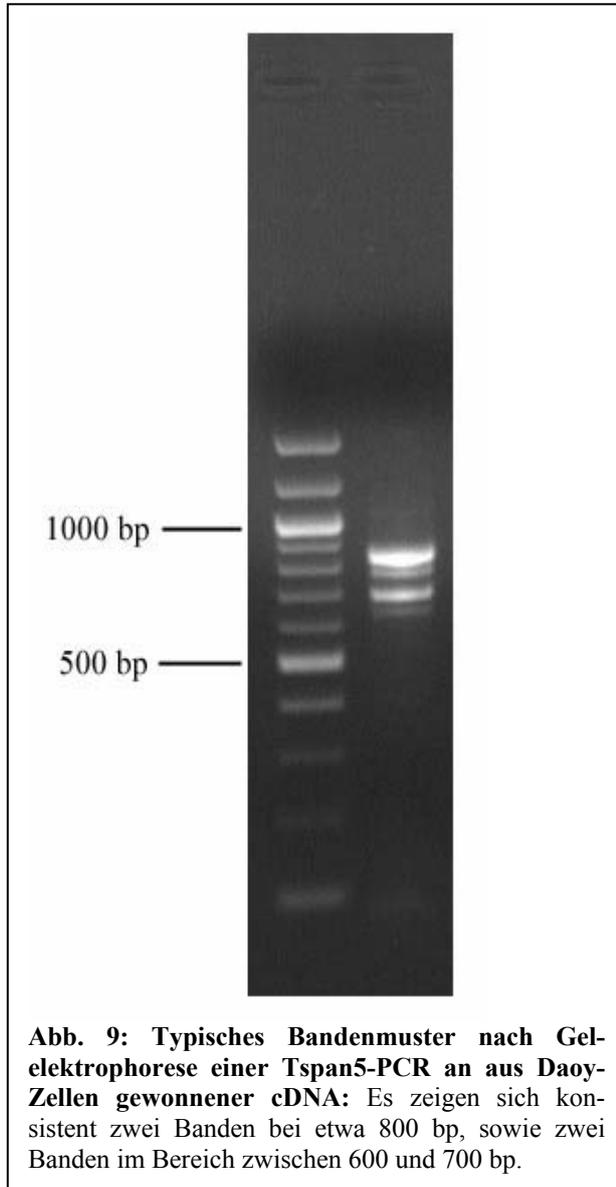
Andererseits deckt sich die Tspan5-Färbung aber auch in großen Teilen mit durch anti-ki67-Antikörper gefärbten Bereichen. Ki67 ist ein Expressionsmarker für proliferativ aktive Zellen.

4.5 Charakterisierung von Spleißvarianten in Medulloblastomzelllinien und menschlichem Medulloblastomgewebe

Um besser beurteilen zu können, ob Tetraspanin-5 auch in proliferierenden Zellen exprimiert wird, haben wir uns entschieden, dies an Zelllinien, also hochproliferativen Systemen, zu untersuchen. Zur Überprüfung mittels PCR haben wir zunächst humane Medulloblastom-Zelllinien herangezogen. Daoy-Zellen entstammen aus dem desmoplastischen Medulloblastom eines vierjährigen Jungen, Med283 aus einer peritonealen Metastase eines Medulloblastoms vom klassischen, nicht-desmoplastischen Typ eines sechsjährigen Jungen (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/CellLines, www.atcc.org/common/catalog/cellBiology/cellBiologyIndex.cfm).

Bei beiden humanen Zelllinien konnten wir in der cDNA Tetraspanin-5 amplifizieren. Dies bedeutet, dass entgegen der in vivo-Ergebnisse an proliferierenden Körnerzellen der externen Körnerzellschicht, proliferationskompetente Medulloblastomzelllinien hohe Level an Tspan5 exprimieren.

Charakterisierung der Spleißvarianten



Wie bereits in einer früheren Doktorarbeit (Jennifer Lind) innerhalb der Arbeitsgruppe gezeigt, war nach der Amplifikation der menschlichen Tspan5-cDNA ein aus vier Banden bestehendes Bandenmuster zu sehen (bei Daoy-cDNA: zwei starke Banden bei etwa 800 bp und zwischen 600 und 700 bp, sowie jeweils unmittelbar unterhalb dieser eine schwache Bande; Abb. 9). Da das Bandenmuster mit verschiedenen Proben in gleicher Weise auftrat und von den PCR-Bedingungen unabhängig war, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den Banden um spezifische

Amplifikationen handeln musste. In Rahmen dieser Arbeit wollte ich herausfinden, ob es sich dabei um Spleißvarianten des Tspan5 handeln kann.

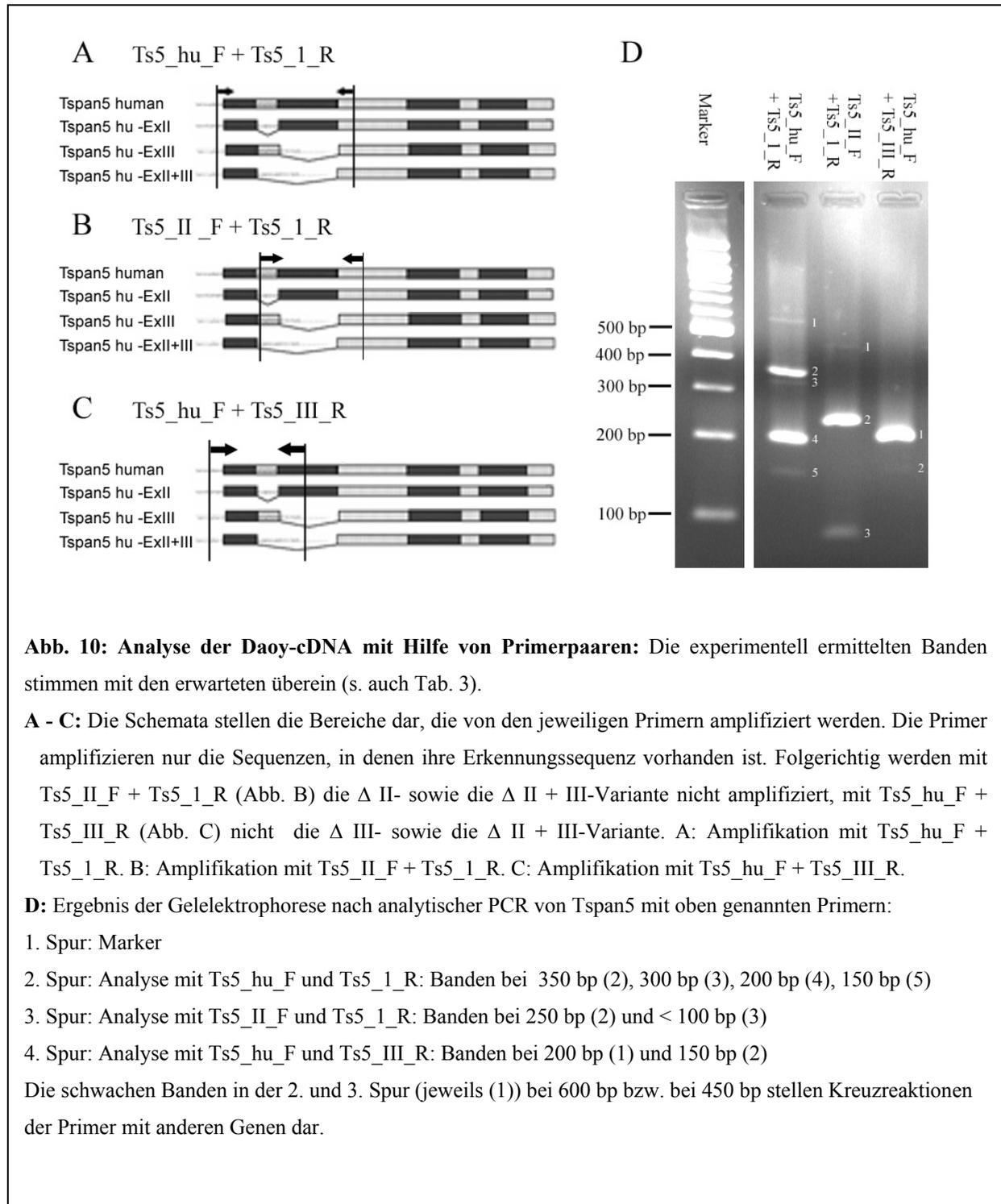
Um dieser Frage nachzugehen, wurden zwei experimentelle Ansätze gewählt: zum einen habe ich Daoy-cDNA mittels eines Satzes verschiedener Primer untersucht (Abb. 10), zum anderen habe ich die PCR-Fragmente mit Restriktionsenzymen analysiert (Abb. 11). Wie im weiteren Verlauf beschrieben, wurden einzelne Banden kloniert und sequenziert.

Zunächst wurde mit zwei Primerpaaren gearbeitet, um herauszufinden, in welchem Bereich im Falle von Spleißvarianten Exons fehlen könnten. Ein Primerpaar (Ts5_hu_F, Ts5_1_R) hat den Bereich von Exon I bis IV amplifiziert, das andere (Ts5_4_F, Ts5_4_R) den Bereich von Exon IV bis VIII. Während ich so für die vordere Hälfte vier Banden erhielt, zeigte sich für das hintere Molekülteil nur eine Bande bei 250 bp (in diesem Bereich liegen nach Vergleich mit der Sequenz für humanes Tspan5 240 bp (NCBI Sequence Viewer, NM_005723; www.sanger.ac.uk)). Die vier Banden des vorderen Molekülabschnitts liegen etwa bei 350 bp, 300 bp, 200 bp und 150 bp (Abb. 10).

Im Folgenden haben wir die ersten vier Exons mit weiteren Primerpaaren näher analysiert. Dazu wurden Primer genutzt, die in Exon II (Ts5_II_F) bzw. III (Ts5_III_R) binden. Kombiniert man Ts5_II_F mit Ts5_1_R, zeigen sich auf dem Gel drei Banden, wobei die größte mit etwa 450 bp länger ist als das eigentlich amplifizierte Stück (225 bp). Diese interpretieren wir als Kreuzreaktion der Primer mit anderen Genen. Die weiteren beiden Banden finden sich bei etwa 230 bp und < 100 bp. Bei Amplifikation mit Ts5_hu_F mit Ts5_III_R habe ich zwei Banden erhalten, und zwar bei 200 bp und 150 bp (Abb. 10).

Wenn wir also davon ausgehen, dass unsere Spleißvarianten im Bereich der ersten vier Exons liegen, legt ein Vergleich der Größe der Banden mit den bekannten Längen der Exons von Tspan5 (www.sanger.ac.uk) nahe, dass es sich bei unserem Bandenmuster um Varianten handeln könnte, denen Exon II (51 bp) oder III (147 bp) oder II und III (198 bp) fehlen. Die Basenpaardifferenz zwischen den einzelnen Banden beträgt ca. 50 bp, 150 bp und 200 bp zur größten Bande. Vergleichen wir die Bandenmuster, die wir durch Amplifikation von humanem Tspan5 mit verschiedenen Primerpaaren erhalten haben, mit den so erwarteten, bestätigt sich unsere

Hypothese, dass es sich bei dem Bandenmuster um Spleißvarianten des Tspan5 handelt (s. Abb. 10, Tab. 3).



	Ts5_hu_F + Ts5_1_R		Ts5_II_F+Ts5_1_R		Ts5_hu_F+Ts5_III_R	
	vorhandene Banden	erwartete Banden	vorhandene Banden	erwartete Banden	vorhandene Banden	erwartete Banden
Tspan-5 (807 bp)	ca. 350 bp	341 bp	ca. 230 bp	225 bp	ca. 200 bp	197 bp
Δ II (- 51 bp)	ca. 300 bp	290 bp	-	-	ca. 150 bp	146 bp
Δ III (- 147 bp)	ca. 200 bp	194 bp	< 100 bp	78 bp	-	-
Δ II + III (- 198 bp)	ca. 150 bp	143 bp	-	-	-	-

Tab. 3: Vergleich erwarteter mit experimentell ermittelten Bandenlängen. Analysiert wurde Daoy-cDNA mit Hilfe dreier Primerpaare. Es zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung (s. auch Abb. 10).

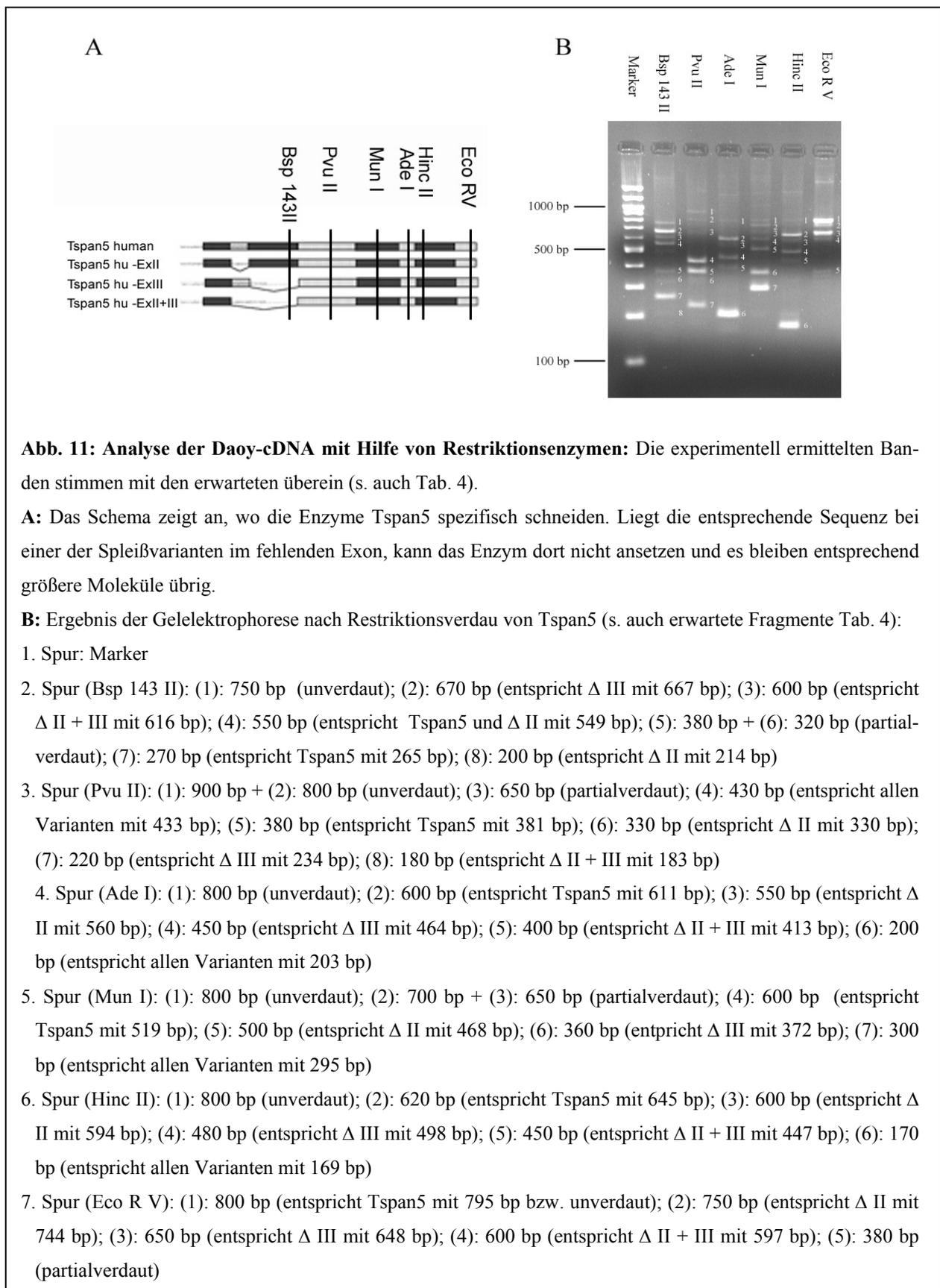
Um weiter zu untermauern, dass es sich bei den vier Banden um die genannten Spleißvarianten handelt, haben wir sie zusätzlich noch mit Hilfe von Restriktionsenzymen untersucht. Für jedes Exon (außer I und II) haben wir ein Restriktionsenzym gefunden, das ausschließlich dort schneidet, und wiederum berechnet, welche Banden wir erwarten, wenn unsere Hypothese stimmt und diese dann mit den tatsächlich vorgefundenen verglichen (Abb. 11, Tab.4). Dies konnte unsere Annahme zusätzlich unterstützen.

Erwartete Banden:

	Exon III	Exon IV	Exon V	Exon VI	Exon VII	Exon VIII
	Bsp 143 II	Pvu II	Mun I	Ade I	Hinc II	Eco R V
Tspan-5 (814 bp)	265 bp + 549 bp	381 bp + 433 bp	529 bp + 295 bp	611 bp + 203 bp	645 bp + 169 bp	795 bp + 19 bp
Δ II (- 51 bp)	214 bp + 549 bp	330 bp + 433 bp	468 bp + 295 bp	560 bp + 203 bp	594 bp + 169 bp	744 bp + 19 bp
Δ III (- 147 bp)	667 bp	234 bp + 433 bp	372 bp + 295 bp	464 bp + 203 bp	498 bp + 169 bp	648 bp + 19 bp
Δ II + III (- 198 bp)	616 bp	183 bp + 433 bp	321 bp + 295 bp	413 bp + 203 bp	447 bp + 169 bp	597 bp + 19 bp

Tab. 4: Erwartete Bandenlängen nach Verdau der Tetraspanin-5-Spleißvarianten mit Restriktionsenzymen.

Die angegebenen Fragmentlängen entstehen nach Verdau der gesamten Tetraspanin-5-cDNA mit den spezifisch in den Exonen III bis VIII schneidenden Enzymen (s. auch Abb. 11).



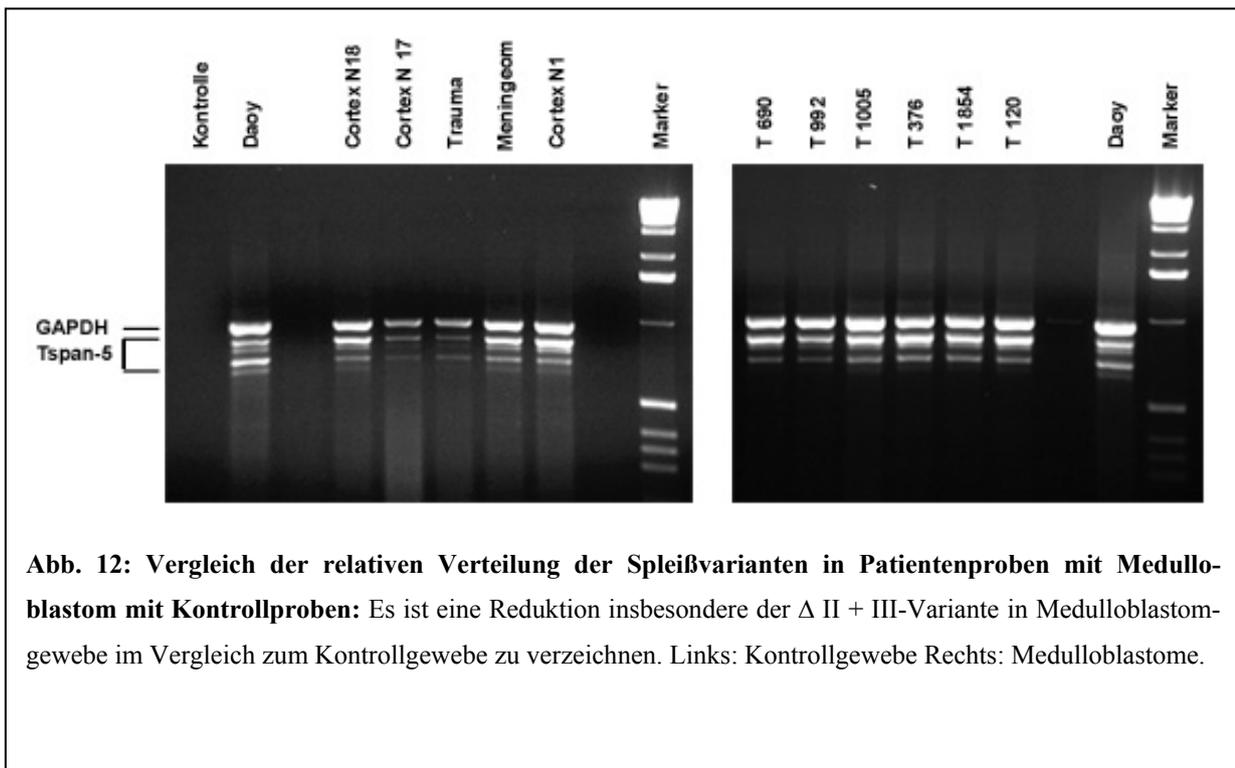
Sowohl die Primer- als auch die Restriktionsanalysen sprechen demnach dafür, dass von humanem Tetraspanin-5 vier Spleißvarianten existieren: Das full length Tetraspanin-5 mit einer codierenden Sequenz von 807 Basenpaaren (einschließlich der Primersequenzen von Ts5_hu_F und Ts5_hu_R erhalten wir eine Sequenz von 814 bp für die Tspan5-cDNA), eine Δ II-Variante, in der Exon II mit 51 bp fehlt, eine Δ III-Variante, in der Exon III mit 147 bp fehlt, sowie eine Variante, in der sowohl Exon II als auch III fehlen.

PCR aus Patientenmaterial

Nachdem Tetraspanin-5 in Medulloblastomzellen der Maus und in Zelllinien aus Mensch und Maus exprimiert wird, und offensichtlich sowohl murine (Doktorarbeit, J. Lind) als auch menschliche Zelllinien Spleißvarianten zeigen, wollten wir wissen, ob es Unterschiede im Spleißmuster von Medulloblastomen im Vergleich zu anderem Gewebe gibt. Deswegen haben wir PCRs mit aus Patientenmaterial gewonnener cDNA durchgeführt (Abb. 12). Als Kontrollmaterial diente cDNA aus dem Cortex von Epilepsiepatienten, aus Hirngewebe nach Schädel-Hirn-Trauma und eine Probe aus einem Meningeom.

Dabei fiel auf, dass bei allen Patientenproben – Medulloblastom und Kontrollen – die Spleißvarianten eine andere relative Verteilung aufwiesen als in Daoy-cDNA. Diese Unterschiede in der Verteilung der Varianten konnten wir quantifizieren indem wir alle Varianten mit dem gleichen Primerpaar (Ts5_hu_F, Ts5_1_R) amplifiziert haben und anschließend die Bandenstärken mit Hilfe der Grauwerte in Photoshop 6.0 untereinander verglichen haben. Die im folgenden angegebenen Werte geben jeweils den relativen Anteil an Grauwerten einer bestimmten Bande bezogen auf die full length-Bande an.

In Daoy war die Δ III-Variante genauso stark exprimiert wie das vollständige Tetraspanin-5 (Δ III zeigte im Histogramm durchschnittlich 96,1 % der Helligkeit des full length Tspan-5), während die anderen beiden Varianten sehr viel schwächere Banden aufwiesen, die Δ II + III-Variante (42,5 %) aber vergleichsweise unwesentlich schwächer als die Δ II-Variante (62,7 %).



In den Patientenproben hingegen war die normale 800 bp-Bande, die mit großem Abstand kräftigste. Δ III und Δ II folgten annähernd gleich stark, allerdings in Nicht-Medulloblastomen stärker ausgeprägt als in Medulloblastomen (Medulloblastome: Δ III: 38,9 %, Δ II: 45,6 %; Nicht-Medulloblastome: Δ III: 54,7 %, Δ II: 55,9 %). Die Bande für die Δ II + III-Variante war hier nur schwach zu sehen, bei den Medulloblastomen besonders schwach (13,5 %; zum Vergleich bei Nicht-Medulloblastomen: 32,9 %), in zwei von sechs Proben war sie kaum noch zu erkennen. Im Student-t-Test erwiesen sich diese Unterschiede als signifikant (Δ II: $p > 0,90$; Δ III: $p > 0,95$; Δ II + III: $p > 0,99$; $n_1 = 6$, $n_2 = 3$ ($n_1 =$ Medulloblastome, $n_2 =$ Kontrollgewebe)).

Ähnlich der Verteilung der Spleißvarianten in Patientenproben zeigte sich diese uns auch in Med283-Zellen: auch hier überwog die full length-Bande deutlich in der Intensität. Die übrigen Varianten erreichten maximal eine Intensität von 57,2 % (Δ III) im Vergleich zur full length-Variante (Δ II: 47,2 %, Δ II + III: 33,0 %). Insgesamt sehen wir also bei Med283-Zellen eine ähnliche Verteilung der Spleißvarianten wie im Nicht-Medulloblastomgewebe der Patientenproben.

4.6 Transfektion menschlicher und muriner Zelllinien mit Tetraspanin-5

Um Informationen über mögliche Funktionen der einzelnen Spleißvarianten zu erhalten, habe ich versucht, diese zu klonieren, um sie anschließend in Zellkulturen zu transfizieren.

Neben den Medulloblastomzelllinien Daoy und Med 283 konnte auch in N2A-Zellen, die neuroektodermalen Ursprungs sind und als murine Neuroblastome zitiert werden, Tetraspanin-5 nachgewiesen werden. Hierfür mussten allerdings Maus-spezifische Primer verwendet werden. Bei Amplifikation muriner cDNA entsteht typischerweise ein aus zwei Banden (bei ca. 800 und 600 bp) bestehendes Muster. Nach Klonieren durch Jennifer Lind zeigte sich dort das Fehlen des Exon IV mit 170 bp.

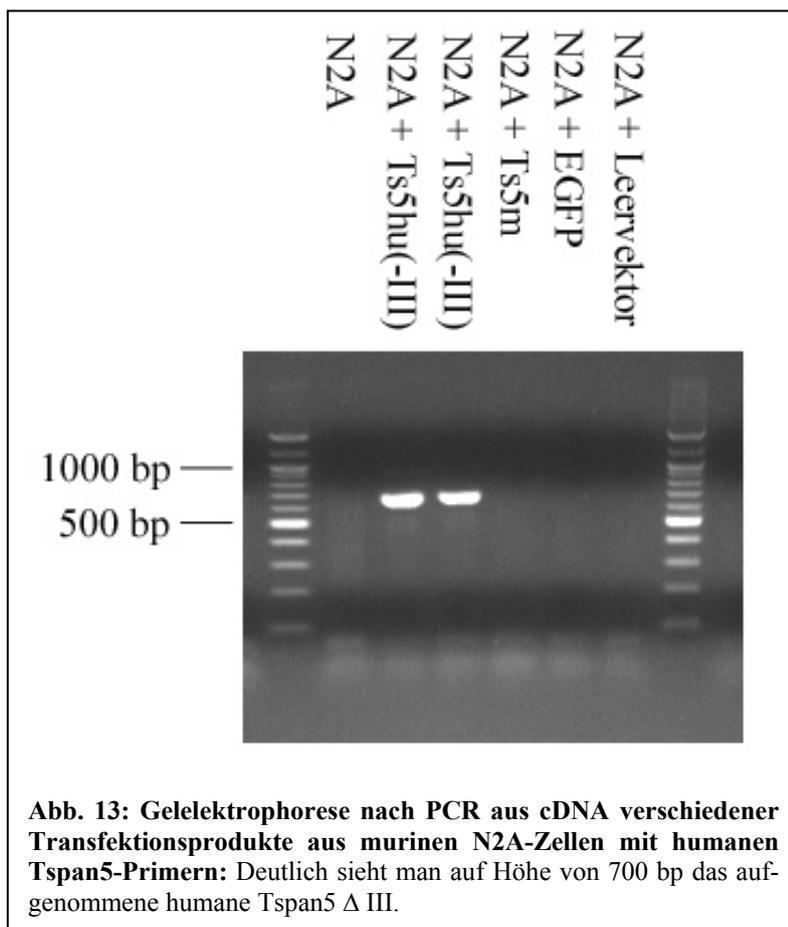
Das Klonieren der vier humanen Spleißvarianten gestaltete sich als außerordentlich schwierig: da jeweils 2 Banden im Gel so dicht beieinander lagen, war es nicht möglich, diese von einander zu isolieren. Und da das vollständige Tspan5 in wesentlich größeren Mengen vorkommt als die im Gel dicht darunter liegende Δ II-Variante, bzw. in der Δ III-Variante mehr als in der Δ II + III-Variante, konnten nur Klone mit der jeweils längeren Sequenz kloniert werden. Sequenzierungen haben die korrekte Sequenz des Tetraspanins in beiden Klonen bestätigt und gezeigt, dass es sich tatsächlich in dem einen Fall um das vollständige humane Tspan-5, in dem anderen um die Δ III-Variante handelte.

Um zu überprüfen, ob sich eine dieser Varianten (Δ III) in Zellkulturen transfizieren und dort exprimieren ließ, wurde die Δ III-Variante aus dem TA-Klonierungsvektor (pDrive) in einen pcDNA3.1zeo-Expressionsvektor umkloniert und mit diesem sowohl in humane Daoy- als auch in murine N2A-Zelllinien transfiziert. Die Wahl dieser Zellen beruht auf der Beobachtung dass alle Spleißvarianten in einer Zelllinie parallel vorkommen und bei Annahme, dass sie auch in einzelnen Zellen gleichzeitig auftreten, das Verhältnis der Spleißvarianten zueinander die Funktion des Tspan5 bestimmen könnte. Durch die Expression ausgewählter Spleißvarianten sollte sich das Verhältnis verändern und Effekte auf Zellmorphologie und Zellproliferation zeigen.

Aus den transfizierten Zelllinien wurden zunächst die stabil transformierten über deren Zeocin-Resistenz in Zeocin-haltigem Medium selektioniert und Zellen einzelner Klone amplifiziert. Die

PCR mit cDNA aus den verschiedenen Transfektanten ergab für Daoy-Zellen keine Unterschiede im Tspan5-Gehalt im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle. Weder die 800 bp- noch die Δ III-Bande stellte sich nach der Transfektion als auffallend kräftiger dar. Anders bei den N2A-Zellen, die normal kein humanes Tspan5 enthalten: Hier erhielt ich für die zwei Klone, in die ich die Δ III-Variante transfiziert hatte, in der PCR Banden auf Höhe der Δ III-Variante von humaner cDNA (Abb. 13).

Auf Proteinebene ließ sich die Transfektion allerdings nicht mehr so leicht nachvollziehen. Murines Tspan-5 stellt sich im Western Blot etwas schwerer dar als humanes, die Bande liegt mit 43 kD über der für humanes Tspan5, die sich bei 39,5 kD befindet. So erhielt ich für N2A-Proteinextrakt bei den mit humanem Tspan5 transfizierten Zellen nicht die erwartete Doppelbande in dieser Höhe, sondern nur eine einzelne Bande in Höhe des murinen Tspan5.



Diese Bande unterschied sich bei den beiden Klonen in ihrer Stärke bei etwa gleicher Menge aufgetragenen Proteins. Da in der Transfektion die Zahl der in die Zellen aufgenommenen Konstrukte stark variieren kann, ist dieser Befund nicht ungewöhnlich und spricht dafür, dass der eine Klon entsprechend mehr Konstrukte aufgenommen hat, während der andere, dessen Bande vergleichbar ist mit der von nicht-transfizierten N2A-Zellen dieses nur in einfacher Ausführung aufgenommen hat.

Aus der Höhe der Bande lässt sich schließen, dass entweder das humane Tspan5 exprimiert wurde, aber in den Mauszellen murin modifiziert wurde und somit ein anderes Laufverhalten hat, oder dass die humane cDNA Einfluss auf die Translationsrate der murinen cDNA hat.

5. Diskussion

5.1 Mögliche Funktionen des Tetraspanin-5 während der Kleinhirn-entwicklung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass ein in einer vorangegangenen Arbeit (Katja Duffe) hergestelltes Antiserum eine für Tetraspanin-5 spezifische Peptidsequenz erkennt und dass dieser Antikörper an Paraffinschnitten einsetzbar ist. In der immunhistochemischen Färbung zeigte sich eine im Laufe der Entwicklung ansteigende Signalstärke der Tspan5-Immunreaktivität in Körner- und Purkinjezellen. Diese Signalzunahme korreliert zeitlich und örtlich mit dem Fortschreiten der neuronalen Differenzierung in diesen zerebellären Neuronen. Damit stimmen diese Daten mit Befunden überein, die mit Hilfe von in situ-Hybridisierungen (ISH) ermittelt worden sind (Juenger et al., 2004).

Neben dieser weitgehenden Übereinstimmung in den mRNA- und Protein-Daten konnten aber zwei für die Funktion und Regulation des Tetraspanin-5 interessante Unterschiede festgehalten werden. Im Gegensatz zur ISH, in der sich nur die Somata der Purkinjezellen anfärben, zeigt sich uns auf Ebene der Proteine auch eine Anfärbung ihrer Dendriten. Diese Verteilung des Tetraspanin-5 ist bereits in den frühesten Stadien der Dendritogenese ab P5 zu sehen. Tetraspanin-5 scheint also im Perikaryon translatiert zu werden und gelangt dann via anterogradem dendritischen Transport in den Dendritenbaum. Damit zeigt es eine ähnliche Lokalisation wie late bloomer, ein Tetraspanin aus *Drosophila*, dem Funktionen bei der Synapsenbildung zugeschrieben werden (Fradkin et al., 2002).

Angesichts dieser Lokalisation könnte Tspan5 auch bei der frühen Dendritogenese, der Polarisierung der Zellen und der Initiation von Zellfortsätzen eine Rolle spielen. Zum Zeitpunkt P3, an dem Purkinjezellen multipolare Dendriten ausbilden, sehen wir den größten Anstieg an Tetraspanin-5 in Purkinjezellen. Hinweise für eine Rolle von Tetraspaninen bei der Neuritogenese stammen aus Experimenten an NT2N-Zellen. Hier konnten Stipp et al. (2000) zeigen, dass CD81 und CD151 essentiell für Ausbildung und Wachstum von Neuriten ist. Indirekt können Tetra-

spanine über die Interaktion mit einer Reihe von membrangebundenen Proteinen, u. a. mit Integrinen und Wachstumsfaktoren, Zellmigration und Neuritenwachstum beeinflussen (Maecker et al., 1997; Shi et al., 2000; Berditchevski, 2001; Hemler, 2001). Außerdem ist bekannt, dass Tetraspanine direkt mit Proteinkinase C (PKC) interagieren (Zhang et al., 2001) und über ihre Komplexe weitere Signaltransduktionsmoleküle wie die Phosphatidylinositol-4-Kinase rekrutieren. Die Aktivität von Proteinkinase C beeinflusst die Entwicklung der Dendriten in Purkinjezellen (Metzger u. Kapfhammer, 2000). Es wäre also durchaus vorstellbar, dass Tetraspanin-5 über Proteinkinase C die Dendritogenese in den Purkinjezellen positiv beeinflusst.

Alternativ könnte diese Lokalisation des Tspan5 auch auf einen den Integrinen ähnlichen Effekt auf die Synapsenreifung hinweisen. Integrine steuern die prä- und postynaptische Reifung (Chavis et al., 2001). Aber auch über diese spielen Tetraspanine eine wichtige Rolle bei der Reifung und dem Wachstum von Neuriten (Stipp et al., 2000). Die relativ zur *in situ*-Hybridisierung früh nachweisbare Expression von Tetraspanin-5-Protein in Purkinjezellen und seine Lokalisation in deren Fortsätzen könnten eine Funktion beim Aufbau des auffällig komplexen Dendritenbaums der Purkinjezellen nahe legen. Unterstützt wird diese Hypothese durch das ebenfalls frühe Auftreten von Tspan5 in der Molekularschicht. Dies ist vom Entwicklungsstand und Wachstum der Purkinjezell-Dendriten abhängig und könnte somit die Bereiche anzeigen, in denen Purkinjezellen bereits mit Parallelfasern, den Axonen der Körnerzellen, in synaptischen Kontakt getreten sind.

Während es in der *in situ*-Hybridisierung erst an P7 zu einem deutlichen Anstieg des spezifischen mRNA-Gehalts kommt, sehen wir auf Proteinebene diesen sprunghaften Anstieg bereits zum Zeitpunkt P3. Zu dieser Zeit beginnen die Purkinjezellen, sich in einer für sie charakteristischen Einzelzellschicht (Monolayer) anzuordnen (Jankowski et al., 2004) und multipolare Fortsätze auszubilden. Der zu Grunde liegende Prozess für diese für die Purkinjezellen einzigartige Anordnung ist bisher nicht verstanden. Zum einen könnte man sich einen aktiven Prozess vorstellen, bei dem die Purkinjezellen an bestimmte Stellen des Kleinhirnkortex wandern und sich dort positionieren. Tatsächlich ist von vielen Tetraspaninen bekannt, dass sie die Zellmotilität beeinflussen. Anti-CD9-Antikörper zum Beispiel stimulieren die Migration von Schwann-Zellen (Anton et al., 1995). Dieser Effekt wird über die extrazellulären Schleifen-Regionen der Tetraspanine ver-

mittelt, die über Integrine an extrazelluläre Matrix binden können (Berditchevski, 2001; Maecker et al., 1997; Yáñez-Mó et al., 2001).

Zum anderen könnte man sich einen passiven Prozess der Monolayerbildung vorstellen, bei dem die Purkinjezellen zwischen der äußeren und inneren Körnerzellschicht eingeschlossen werden. Dieser Prozess wird derzeit als der wahrscheinlichere angenommen. Hierbei könnten anziehende und abstoßende Zell-Zell- und/oder Zell-Matrixkontakte dazu führen, dass Purkinjezellen nebeneinander zu liegen kommen. Wie hier gezeigt, wird Tetraspanin-5 während der Monolayerbildung in Purkinjezellen exprimiert. Tetraspanine interagieren mit Integrinen, wobei direkte Protein-Protein-Interaktionen mit den Untereinheiten beta1, alpha3 und alpha6 gezeigt wurden. In Purkinjezellen des Kleinhirns werden neben der beta1-Untereinheit auch die alpha5-Integrinuntereinheit exprimiert. Von letzterer ist bekannt, dass sie ebenfalls, wenn auch schwächer als die anderen genannten Integrinuntereinheiten, mit Tetraspaninen interagieren (Graus-Porta et al., 2001; King VR et al., 2001, Scherberich A et al., 1998). Beta1- und alpha-Untereinheiten binden an extrazelluläre Matrix, die u. a. auch von Purkinjezellneuronen synthetisiert werden (Powell SK et al., 1998). Es ist also vorstellbar, dass vermittelt durch Tetraspanine die Adhäsion der Purkinjezellen an ihre Umgebung kontrolliert wird und dass durch diese Adhäsion die Monolayerbildung ermöglicht wird. Auslösender Faktor für die Monolayerbildung ist wahrscheinlich der Reelin-Pathway (Trommsdorff et al., 1999; Yuasa et al., 1993).

Des Weiteren könnten Mitglieder der Tetraspanin-Familie über Integrine eine Rolle beim Überleben von neuronalen und glialen Zellen spielen (Colognato et al., 2002; Stojanovic et al., 2005) und entsprechend für das Überleben in Purkinjezellen mit verantwortlich sein. Die Tatsache, dass zwischen Wildtyp und L7En-2-Tieren kein Unterschied in der Expression des Proteins zu finden war, zeigt allerdings, dass Tetraspanin-5 kein Hauptschalter für einen dieser Prozesse darstellt, sondern nur modulatorische Wirkung ausübt. Dies würde aber mit den bekannten Eigenschaften der Tetraspanine übereinstimmen.

5.2 Regulation der Tetraspanin-5-Expression auf Proteinebene

Tetraspanin-5 könnte nach den hier erhobenen Daten ein wesentlich breiteres Wirkungsspektrum während der Kleinhirnentwicklung einnehmen als bisher angenommen. Wenn Tetraspanin-5 aber eine Rolle bei der Dendritogenese hat, wie lässt sich dann erklären, dass wir in der Immunhistochemie keinerlei Unterschiede in der Expression des Tetraspanin-5-Proteins im Vergleich zwischen L7En2- und Wildtyp-Tieren sehen konnten, obwohl in den Mutanten die Entwicklung des Cerebellums und insbesondere die der Purkinjezellen und ihrer Dendriten stark verzögert verläuft? Juenger et al. (2004) hatten hier auf Ebene der mRNA eine verminderte Expression von Tspan5 in Purkinjezellen gezeigt.

mRNA hat in der Regel eine wesentlich kürzere Halbwertszeit als das zugehörige Protein: Der Insulinrezeptor hat zum Beispiel eine Halbwertszeit von 9 h (Knutson et al., 1985), während die Halbwertszeit der zugehörigen mRNA lediglich 2 h beträgt (McDonald et al., 1988). In einem Vergleich der Halbwertszeiten verschiedener Proteine und deren mRNAs zeigten Hargrove et al. (1989) für Proteine eine durchschnittliche Halbwertszeit von 32,9 h, für mRNAs von 8,4 h. Dies bedeutet, dass Protein in der Zelle vorhanden sein kann, obwohl zu diesem Zeitpunkt die für das Protein kodierende mRNA degradiert ist. Zudem können Unterschiede im mRNA- und Proteingehalt einer Zelle auf die massive Translationseffizienz bestimmter mRNAs zurückzuführen sein. Es ist bekannt, dass aus einem Mol mRNA mehr als 10^4 mol Protein synthetisiert werden können (Hargrove et al., 1989). Drittens können Proteine über unterschiedliche Mechanismen in der Zelle stabilisiert bzw. ihre Degradation verhindert werden. Die „N-end Rule“ besagt, dass Proteine mit bestimmten Aminosäuren im N-Terminus eine höhere Stabilität aufweisen (Bachmair et al., 1989; Bachmair et al., 1986). Auf Grund der stabilisierenden Aminosäuren (Methionin, Serin, Glycin) im N-Terminus des Tetraspanin-5-Proteins, kann deshalb von einer längeren Halbwertszeit (> 20 h) (Bachmair et al., 1989; Bachmair et al., 1986) dieses Membranproteins ausgegangen werden.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass trotz einer geringen Menge an mRNA große Mengen an Protein hergestellt und stabil erhalten werden können. Eine Herunterregulation der Tetraspanin-5-mRNA in L7En2 Tieren, wie sie bei Juenger et al. (2004) beschrieben ist, muss demzufolge

nicht notwendigerweise zu einer reduzierten Proteinmenge führen. Tatsächlich wurde auf Proteinebene kein Unterschied in der Expressionsmenge in Purkinjezellen von L7En-2 und Wildtyp-tieren gefunden. In funktioneller Hinsicht bedeutet dies, dass Tetraspanin-5 nicht ursächlich für die Ausprägung des L7En-2 Phänotyps verantwortlich sein kann. Vielmehr scheint Tetraspanin-5 in vielen Zellen exprimiert zu werden, die mit ihrer Umgebung mittels Zytoskelettelemente kommunizieren.

Mit diesem Unterschied der Halbwertszeiten von mRNA und Protein und der daraus abzuleitenden Akkumulation des Proteins in der Zelle lässt sich auch erklären, dass wir in der Milz Tetraspanin-5 eindeutig immunhistochemisch nachweisen konnten, während weder Juenger et al. (2004) in der *in situ*-Hybridisierung noch Garcia-Frigola et al. (2000) im Northern Blot entsprechende mRNA-Mengen gesehen haben. Die mRNA-Menge könnte sowohl in der Milz als auch in Kleinhirnneuronen unter der Nachweisgrenze liegen, während das Protein auf Grund seiner Syntheseleistung in größeren Mengen angereichert war.

Eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit einem anderen Peptid kann auf Grund unserer Kompetitionsexperimente mit dem spezifischen Peptid als unwahrscheinlich betrachtet werden. Außerdem zeigte sich in der Immunhistochemie ein Färbemuster, das weitgehend mit dem der *in situ*-Hybridisierung übereinstimmt.

5.3 Spleißvarianten des Tetraspanin-5 und deren potentiellen Funktionen

Eine weitere Möglichkeit, Unterschiede in der mRNA und Proteinexpression zu erklären, wäre das Auftreten unterschiedlicher Spleißvarianten, die auf mRNA Ebene nachgewiesen werden können, nicht aber auf Proteinebene. Tatsächlich konnte in einer früheren Arbeit von Jennifer Lind (Dissertation in Bearbeitung) gezeigt werden, dass es Spleißvarianten von Tetraspanin-5 gibt. Bisher konnten diese Spleißvarianten nicht detailliert charakterisiert und deren Vorkommen analysiert werden. Eine wesentliche Entdeckung dieser Arbeit ist, dass Tetraspanin-5-mRNA in unterschiedlichen Spleißvarianten im Kleinhirn der Maus, aber auch im nativen menschlichen Gewebe und Zellmaterial vorkommt. Das Auftreten von Spleißvarianten mag angesichts der Tat-

sache, dass über 70 % der menschlichen Multi Exon-Gene alternativ gespleißt werden (Johnson et al., 2003), und damit die Komplexität des menschlichen Proteoms (Harrison et al., 2002) erhöht wird, nicht erstaunlich sein. Zudem ist bekannt, dass das alternative Spleißen besonders im Immun- und Nervensystem (Stamm, 2002) stark ausgeprägt vorkommt. Die Tatsache aber, dass alternatives Spleißen mit neuronaler Zellerkennung, Ausbildung von Synapsen, Rezeptorspezifität, Neurotransmission und Ionenkanalfunktion assoziiert werden konnte und nicht zuletzt für Lern- und Gedächtnisprozesse essentiell ist (Grabowski et al., 2001, Zeng et al., 2006), lässt die Spleißvarianten des Tetraspanin-5 in einen funktionellen Zusammenhang stellen, denn all diese Prozesse werden u.a. von Tetraspaninen moduliert. Allerdings wissen wir noch nicht, zu welchem Zeitpunkt der Kleinhirnentwicklung welche Spleißvariante besonders herauf- oder herunterreguliert ist. Dies ist insbesondere im menschlichen oder Primatengewebe von Interesse, da es hier eine höhere Vielfalt an Spleißvarianten gibt.

Beim Menschen konnten wir vier verschiedene Spleißvarianten finden, die je nach Herkunft des untersuchten Gewebes in unterschiedlichen Relationen zueinander exprimiert werden. So sieht man Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien, aber auch zwischen Zelllinien und Patientenmaterial. In Daoy-cDNA habe ich im Vergleich zu Med 283-cDNA eine deutlichere Ausprägung der drei Spleißvarianten relativ zum vollständigen Tetraspanin-5 gesehen. Med283-Zellen stammen zwar auch aus einem Patienten mit Medulloblastom-Diagnose, die Zellprobe wurde aber aus einer peritonealen Metastase gewonnen. In Analogie waren in cDNAs aus Medulloblastommaterial deutliche Unterschiede zu Zelllinienmaterial zu finden. Während bei Daoy die Δ III-Bande ebenso kräftig war wie die full-length-Bande, die anderen beiden Spleißvarianten aber immerhin noch etwa der Hälfte der Intensität der full length-Bande entsprachen, überwog in den Medulloblastomproben der Patienten die full length-mRNA, während die Δ II+III-Variante an der Nachweisgrenze lag. Da beide Medulloblastom-Zelllinien bereits seit 1985 in Kultur gehalten werden, und sich Zelllinien im Laufe ihrer Kulturzeit biochemisch, morphologisch und genetisch verändern, sind Unterschiede zwischen Medulloblastom-cDNA aus Patientenmaterial und cDNA aus anderen Hirnbiopsaten von größerer Bedeutung.

5.4 Spleißvarianten in Medulloblastomen

Sowohl bei Medulloblastom-Gewebe als auch bei heterologen Gehirnbiopsaten stehen die Δ II- und Δ III-Variante im gleichen Verhältnis zur jeweiligen full length-Variante, wobei der Anteil dieser beiden Varianten bei Medulloblastomen insgesamt geringer ist. Besonders auffällig ist die stark reduzierte Expression der Δ II+III-Variante in Medulloblastomen im Vergleich zum Kontrollgewebe.

Über die Funktion dieser Spleißvarianten kann derzeit nur spekuliert werden. Aus Literaturvergleichen lassen sich aber interessante Arbeitshypothesen formulieren. Es ist möglich, dass die Spleißvarianten in nicht tumorösem Gewebe dazu dienen, die Translation von Tetraspanin-5 und damit den Expressionslevel zu regulieren. Immunhistochemische Untersuchungen deuten darauf hin, dass Tetraspanin-5 im gesunden Kleinhirn nur in postmitotischen, nicht proliferierenden Zellen exprimiert wird. In desmoplastischen, proliferativ aktiven Medulloblastomen konnten dagegen hohe Mengen an Tetraspanin-5 gefunden werden. Diese deckten sich zum Teil mit der Expression von NeuN, einem Marker differenzierter Körnerzellen, zum Teil aber auch mit der Expression des Proliferationsmarkers Ki 67. Auch die Expression von Tetraspanin-5 in Zelllinien spricht für eine Expression in proliferierenden Zellen, wobei es sich in beiden Fällen um pathologisch veränderte Zelltypen handelt. Eine Expression von Tetraspanin-5 in Zellen, die normalerweise kein Tetraspanin-5 enthalten, könnte folglich zu einem promotischen Effekt führen. Das Auftreten der Spleißvarianten ist dagegen in menschlichem Material mit nicht-tumorigem Material assoziiert. Das bedeutet, dass Spleißvarianten des Tetraspanin-5 die Expression des ungespleißten Transkripts unterdrücken könnten und vice versa nur geringe Mengen an Spleißvarianten die Expression steigern. Diese Überexpression des Tetraspanin-5 Proteins könnte dann zu ungehemmter Proliferation der Tumorzellen und/oder deren Metastasierung führen. Dass erhöhte Mengen an Tetraspaninen zu Tumorwachstum führen, wurde bereits postuliert und z. T. gezeigt. CO-029 (Sela et al., 1989), PETA-3/SFA-1 (Hasegawa et al., 1996) oder SAS (Jankowski et al., 1994) werden zum Beispiel in Sarkomen, CD63 in Melanomen (Atkinson et al., 1984) oder CD9 in T-ALL (Boucheix et al., 1991) stark exprimiert. Ein verändertes Spleißverhalten spielt in verschiedenen Tumoren neuroektodermalen Ursprungs eine Rolle. So erhalten Glioblastomzellen durch bevorzugtes Spleißen der 1 β -Isoform des FGF-Rezeptors und dadurch

bedingte höhere Affinität des Rezeptors für bestimmte Wachstumsfaktoren einen Wachstumsvorteil (Yamaguchi et al., 1994). Für manche malignen Melanome wird ein Wegfall des Tumorsuppressorgens BIN1 durch alternatives Spleißen beschrieben (Ge et al., 1999).

Interessanterweise wurde festgestellt, dass Gene, die eine Rolle bei der Zellkommunikation und/oder Enzymregulation spielen, das höchste Vorkommen alternativer Spleißvarianten zeigten (Johnson et al., 2003). Zu dieser Gruppe können auch die Tetraspanine gezählt werden. Man geht davon aus, dass bis zu 15 % aller Punktmutationen, die zu genetischen Erkrankungen beim Menschen führen, Spleißfehler verursachen (Krawczak et al., 1992). Diese Spleißfehler können zu Mustern an gespleißten Genen führen, die für bestimmte Erkrankungen charakteristisch sind (Stamm, 2002; Grabowski et al., 2001; Zeng et al., 2006). Bei den wenigsten alternativ gespleißten Proteinen ist allerdings eine Funktion der Spleißvarianten bekannt.

5.5 Ausblick

Ein erster Schritt in Richtung Analyse der Spleißvarianten wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Tetraspanin-5 lässt sich in Zelllinien exprimieren, was als experimenteller Ansatz für Transmembranproteine häufig nicht möglich ist. Zudem existieren entsprechende Expressionsplasmide für die menschlichen und murinen Tetraspanin-5-Varianten, so dass nun unterschiedliche Zelllinien und primäre Zellkulturen mit den Konstrukten transfiziert und die Wirkung der Varianten auf unterschiedliche zelluläre Prozesse untersucht werden können. Sicher wäre die Analyse weiterer Patientenproben nötig, um die hier erhobenen Befunde zu untermauern, und sie mit Tumorstadien und Tumorzellverhalten in Patienten in Zusammenhang zu bringen. Die Analyse anderer Tumoren würde ebenfalls helfen, die hier andiskutierten Assoziationen der Tetraspanin-5-Expression und seiner Spleißvarianten mit der Pathogenese der Tumoren zu unterstützen.

6. Zusammenfassung

Tetraspanin-5 gehört zur Familie der Tetraspanine, einer Familie von 4-Transmembranproteinen, die sich durch ihre typische Tertiärstruktur auszeichnen. Diese befähigt die Tetraspanine dazu, sowohl mit der extrazellulären Matrix als auch mit intrazellulären Signaltransduktionsmolekülen sowie weiteren membranständigen Proteinen zu interagieren und somit als „Transmembran Linker“ zu fungieren. Als solche spielen sie eine zentrale Rolle bei vielen Entwicklungsprozessen wie zum Beispiel Zellproliferation und –migration.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression des Tetraspanin-5-Proteins während der Entwicklung des Kleinhirns der Maus, sowie im Vergleich von physiologischem und tumorösem Gewebe bei Maus und Mensch näher untersucht werden. Dazu wurde zunächst eine immunhistochemische Färbung mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-Tspan5-Antikörper etabliert, die in Paraffinschnitten von murinen Kleinhirnen einen starken Anstieg in der Expression des Tetraspanin-5-Proteins im Verlauf der cerebellären Entwicklung ab Postnataltag 3 (P3) gezeigt hat. Hierbei wird das Tetraspanin-5-Protein insbesondere in Purkinjezellen und postmitotischen Körnerzellen exprimiert, wobei das zeitliche Expressionsmuster mit der Positionierung und Dendritogenese der cerebellären Neurone korreliert.

In Medulloblastomen der Maus konnte mit dieser immunhistochemischen Methode ebenfalls das Tetraspanin-5-Protein nachgewiesen werden. Hierbei deckte sich die Expression von Tetraspanin-5 im Wesentlichen mit der von NeuN, einem Marker für ausdifferenzierte Neuronen, was unsere Erkenntnisse aus den Expressionsanalysen am sich entwickelnden Kleinhirn bestätigt. In Teilen deckte sie sich allerdings auch mit Arealen, die den Proliferationsmarker Ki67 exprimieren.

Bei der Amplifikation der murinen und humanen Tetraspanin-5-cDNA zeigte sich ein konsistentes Bandenmuster, dass bei der Maus aus zwei Banden, beim Menschen aus vieren besteht. Diese konnten durch Analyse mit verschiedenen Restriktionsenzymen und Primern als Spleißvarianten

charakterisiert werden, wobei sich die vorliegende Arbeit insbesondere mit der Charakterisierung der menschlichen Spleißvarianten beschäftigt.

Die Untersuchung der Spleißvarianten in Tumorzelllinien, sowie Gewebeproben aus menschlichen Medulloblastomen und Kontrollproben ergab eine andere quantitative Verteilung der Spleißvarianten im Tumorgewebe, so dass wir davon ausgehen, dass eine unphysiologische Expression von Tetraspanin-5-Spleißvarianten zu unkontrolliertem Wachstum führen kann.

Das hier gezeigte Expressionsmuster des Tetraspanin-5 deutet auf vielfältige entwicklungsneurobiologische Prozesse hin, in die Tetraspanin-5 modulatorisch eingreifen kann, und weist damit auf Eigenschaften hin, die auch für andere Mitglieder der Tetraspaninfamilie charakteristisch sind.

7. Literaturangaben

Anton ES, Hadjiargyrou M, Patterson PH, Matthew WD. 1995. CD9 Plays a Role in Schwann Cell Migration in vitro. *J Neurosci* 15:584-595

Atkinson B, Ernst CS, Ghrist BF, Herlyn M, Blaszyk M, Ross AH, Herlyn D, Steplewski Z, Koprowski H. 1984. Identification of melanoma-associated antigens using fixed tissue screening of antibodies. *Cancer Res* 44:2577-2581

Bachmair A, Finley D, Varshavsky A. 1986. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234:179-186

Bachmair A, Varshavsky A. 1989. The degradation signal in a short-lived protein. *Cell* 56:1019-1032

Berditchevski F. 2001. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci* 114:4143-4151

Boucheix C, Benoit P, Frachet P, Billard M, Worthington RE, Gagnon J, Uzan G. 1991. Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins. *J Biol Chem* 266:117-122

Chavis P, Westbrook G. 2001. Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. *Nature* 411:317-321

Colognato H, Baron W, Avellana-Adalid V, Relvas JB, Baron-Van Evercooren A, Georges-Labouesse E, French-Constant C. 2002. CNS integrins switch growth factor signalling to promote target-dependent survival. *Nat Cell Biol* 4:833-841

Fradkin LG, Kamphorst JT, DiAntonio A, Goodman CS, Noordermeer JN. 2002. Genomewide analysis of the Drosophila tetraspanins reveals a subset with similar function in the formation of the embryonic synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13663-13668

Garcia-Frigola C, Burgaya F, Calbet M, de Lecea L, Soriano E. 2000. Mouse Tspan-5, a member of the tetraspanin superfamily, is highly expressed in brain cortical structures. *Neuroreport* 11:3181-3185

Garcia-Frigola C, Burgaya F, de Lecea L, Soriano E. 2001. Pattern of expression of the tetraspanin Tspan-5 during brain development in the mouse. *Mech Dev* 106:207-212

Ge K, DuHadaway J, Du W, Herlyn M, Rodeck U, Prendergast GC. 1999. Mechanism for elimination of a tumor suppressor: aberrant splicing of a brain-specific exon causes loss of function in Bin1 in melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9689-9694

Goldowitz D, Hamre K, 1998. The cells and molecules that make a cerebellum. *TINS* 21:375-382

- Grabowski PJ, Black DL. 2001. Alternative RNA splicing in the nervous system. *Prog Neurobiol* 65:289-308
- Graus-Porta D, Blaess S, Senften M, Littlewood-Evans A, Damsky C, Huang Z, Orban P, Klein R, Schittny JC, Müller U. 2001. β 1-Class Integrins Regulate the Development of Laminae and Folia in the Cerebral and Cerebellar Cortex. *Neuron* 31:367-379
- Hargrove JL, Schmidt FH. 1989. The role of mRNA and protein stability in gene expression. *FASEB J* 3:2360-2370
- Harrison PM, Kumar A, Lang N, Snyder M, Gerstein M. 2002. A question of size: the eukaryotic proteome and the problems defining it. *Nucleic Acids Res* 30:1083-1090
- Hasegawa H, Utsunomiya Y, Kishimoto K, Yanagisawa K, Fujita S. 1996. SFA-1, a Novel Cellular Gene Induced by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1, Is a Member of the Transmembrane 4 Superfamily. *J Virol* 70:3258-3263
- Hemler ME. 2001. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol* 155:1103-1107
- Hemler ME. 2003. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:397-422
- Jankowski BA, Mitchell DS, Smith SH, Trent JM, Meltzer PS. 1994. SAS, a gene amplified in human sarcomas, encodes a new member of the transmembrane 4 superfamily of proteins. *Oncogene* 9:1205-1211
- Jankowski J, Holst MI, Liebig C, Oberdick J, Baader SL. 2004. Engrailed-2 Negatively Regulates the Onset of Perinatal Purkinje Cell Differentiation. *J Comp Neurol* 472:87-99
- Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R, Shoemaker DD. 2003. Genome-Wide Survey of Human Alternative Pre-mRNA Splicing with Exon Junction Microarrays. *Science* 302:2141-2144
- Juenger CH, Holst IM, Duffe K, Jankowski J, Baader SL. 2005. Tetraspanin-5 (Tm4sf9) mRNA Expression Parallels Neuronal Maturation in the Cerebellum of Normal and L7En-2 Transgenic Mice. *J Comp Neurol* 483:318-328
- Kenney AM, Cole MD, Roswith DH. 2003. Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development* 130:15-26
- King VR, McBride A, Priestley JV. 2001. Immunohistochemical expression of the α 5 integrin subunit in the normal adult rat central nervous system. *J Neurocytol* 30:243-252
- Knutson VP, Ronnett GV, Lane MD. 1985. The Effects of Cycloheximide and Chloroquine on Insulin Receptor Metabolism. *J Biol Chem* 260:14180-14188

- Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. 1992. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90:41-54
- Maecker HT, Todd SC, Levy S. 1997. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 11:428-442
- Marani E, Voogd J. 1979. The Morphology of the Mouse Cerebellum. *Acta Morph. Neerl.-Scand.* 17:33-52
- McDonald AR, Goldfine ID. 1988. Glucocorticoid Regulation of Insulin Receptor Gene Transcription in IM-9 Cultured Lymphocytes. *J Clin Invest* 81:499-504
- Metzger F, Kapfhammer JP. 2000. Protein kinase C activity modulates dendritic differentiation of rat Purkinje cells in cerebellar slice cultures. *Eur J Neurosci* 12:1993-2005
- Oliver TG, Read TA, Kessler JD, Mehmeti A, Wells JF, Huynh TTT, Lin SM, Wechsler-Reya RJ. 2005. Loss of patched and disruption of granule cell development in a pre-neoplastic stage of medulloblastoma. *Development* 132:2425-2439
- Pietsch T, Waha A, Koch A, Kraus J, Albrecht S, Tonn J, Sörensen N, Berthold F, Henk B, Schmandt N, Wolf HK, von Deimling A, Wainwright B, Chenevix-Trench G, Wiestler OD, Wicking C. 1997. Medulloblastomas of the Desmoplastic Variant Carry Mutations of the Human Homologue of *Drosophila* patched. *Cancer Res* 57:2085-2088
- Powell SK, Williams CC, Nomizu M, Yamada Y, Kleinman HK. 1998. Laminin-Like Proteins Are Differentially Regulated During Cerebellar Development and Stimulate Granule Cell Neurite Outgrowth In Vitro. *J Neurosci Res* 54:233-247
- Scherberich A, Moog S, Haan-Archipoff G, Azorsa DO, Lanza F, Beretz A. 1998. Tetraspanin CD9 Is Associated With Very Late-Acting Integrins in Human Vascular Smooth Muscle Cells and Modulates Collagen Matrix Reorganization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1691-1697
- Sela BA, Steplewski Z, Koprowski H. 1989. Colon carcinoma-associated glycoproteins recognized by monoclonal antibodies CO-029 and GA22-2. *Hybridoma* 8:481-491
- Shi W, Fan H, Shum L, Derynck R. 2000. The Tetraspanin CD9 Associates with Transmembrane TGF- α and Regulates TGF- α -induced EGF Receptor Activation and Cell Proliferation. *J Cell Biol* 148:591-601
- Stamm S. 2002. Signals and their transduction pathways regulating alternative splicing: a new dimension of the human genome. *Hum Mol Genet* 11:2409-2416
- Stipp CS, Hemler ME. 2000. Transmembrane-4-superfamily proteins CD151 and CD81 associate with $\alpha 3\beta 1$ integrin, and selectively contribute to $\alpha 3\beta 1$ -dependent neurite outgrowth. *J Cell Sci* 113:1871-1882
- Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME. 2003. Functional domains in tetraspanin proteins. *TIBS* 28:106-112

- Stojanovic M, Germain M, Nguyen M, Shore GC. 2005. BAP31 and Its Caspase Cleavage Product Regulate Cell Surface Expression of Tetraspanins and Integrin-mediated Cell Survival. *J Biol Chem* 280:30018-30024
- Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J. 1999. Reeler/Disabled-like Disruption of Neuronal Migration in Knock-out Mice Lacking the VLDL Receptor and ApoE Receptor 2. *Cell* 97:689-701
- Voogd J, Glickstein M. 1998. The anatomy of the cerebellum. *TINS* 21:370-375
- Yáñez-Mó M, Tejedor R, Rousselle P, Sánchez-Madrid F. 2001. Tetraspanins in intercellular adhesion of polarized epithelial cells: spatial and functional relationship to integrins and cadherins. *J Cell Sci* 114:577-587
- Yamaguchi F, Saya H, Bruner JM, Morrison RS. 1994. Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:484-488
- Yuasa S, Kitoh J, Oda S, Kawamura K. 1993. Obstructed migration of Purkinje cells in the developing cerebellum of the reeler mutant mouse. *Anat Embryol* 188:317-329
- Zeng Z, Sharpe CR, Simons JP, Górecki DC. 2006. The expression and alternative splicing of alpha-neurexins during *Xenopus* development. *Int J Dev Biol* 50:39-46
- Zhang XA, Bontrager AL, Hemler ME. 2001. Transmembrane-4 Superfamily Proteins Associate with Activated Protein Kinase C (PKC) and Link PKC to Specific β_1 Integrins. *J Biol Chem* 276:25005-25013

8. Danksagung

Mit Abschluss meiner Dissertation möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe für die herzliche Aufnahme und jegliche Unterstützung, die ich dort erfahren durfte, bedanken. Ein ganz besonderer Dank gilt hierbei meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Stephan Baader, für die hervorragende Betreuung sowohl während der Experimente als auch während der schriftlichen Ausarbeitung. Auch wenn er mir viel Raum zum selbstständigen Arbeiten gab, so hatte er stets ein offenes Ohr, wenn es Probleme gab oder ich weitere Anregungen brauchte.

Innerhalb der Arbeitsgruppe möchte ich außerdem Martin Holst für seine fachkundige Hilfe und Beratung auf dem Bereich der Molekularbiologie danken, sowie Jakob Jankowski für seine Tipps bezüglich der Immunhistochemie und für die Zeit, die er investiert hat, mich mit den Kniffen in der Bildbearbeitung mittels Photoshop vertraut zu machen. Des Weiteren sei Alice Ihmer für ihre technische Unterstützung gedankt.

Herrn Prof. Dr. Johannes Schramm und Herrn PD Dr. Matthias Simon aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie danke ich für die Bereitstellung von Patientenproben. Ohne diese hätte ich die Spleißvarianten von Tetraspanin-5 nur in Zelllinien untersuchen können, was zu anderen Ergebnissen geführt hätte.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Studienstiftung des deutschen Volkes für die ideelle und finanzielle Förderung meines Studiums und meiner Promotion. Ohne gewisse finanzielle Freiheiten wäre mir die Verlängerung meines Studiums um ein Forschungssemester sicher nicht so leicht gefallen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, die mich in jeglicher Hinsicht sehr gefördert haben und mir damit überhaupt die Grundlage zu dieser Dissertation gelegt haben. Ebenso möchte ich mich bei all meinen Freunden und bei meiner Familie bedanken, dass sie mich durch die Phase des Studiums und der Promotion begleitet und mir immer Rückenwind gegeben haben.