

**Identifikation und Charakterisierung differenziell
exprimierter Gene in einer Mausmutanten mit
prolongierter Engrailed-2 Expression
mithilfe der Array-Technologie**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Martin Ingo Holst
aus Köln

Bonn, März 2007

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich Wilhelms Universität Bonn

1. Referent Prof. Dr. Stephan L. Baader

2. Referent Prof. Dr. Thomas M. Magin

Tag der Promotion: 18.06.2007

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

Erscheinungsjahr 2007

*Meinen Eltern
und
Daniela*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Cerebellum als Modellsystem der Entwicklungsneurobiologie	1
1.1.1	Aufbau und Funktion des Kleinhirns	2
1.1.2	Die Zelltypen des Kleinhirns und ihre neuronale Verschaltung	3
1.1.3	Molekulare Grundlagen der embryonalen Entwicklung des Cortex cerebelli	6
1.1.4	Entwicklung des Kleinhirns	7
1.2	Expression, molekularer Aufbau und Funktionen von Engrailed	8
1.3	Die L7En-2 Überexpressionsmutante	11
1.4	Zielsetzung	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Geräte	14
2.2	Chemikalien	15
2.2.1	Chemikalien und Enzyme	15
2.2.2	Antikörper für Westernblot und Immunzytochemie	16
2.2.3	Verwendete Substanzen, Lösungen, Puffer	16
2.3	Zellkultur	17
2.3.1	Zelllinien	17
2.3.2	Kultivierung und Konservierung der Zelllinien	17
2.3.3	Stabile Transfektion	18
2.3.4	Bestimmung der AP-Aktivität im Zellkulturmedium	18
2.3.5	Einfluss von Semaphorin 3A auf die Migration von Körnerzellen	19
2.4	Biochemische Methoden	20
2.4.1	Proteinextraktion aus cerebellärem Gewebe	20
2.4.2	Proteinextraktion aus Zellkulturen	21
2.4.3	Proteinbestimmung	21
2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	22
2.4.5	Westernblot-Analyse	23
2.4.6	Immunchemischer Nachweis von Proteinen auf Westernblot-Membranen	24
2.5	Immunzytochemie	25
2.5.1	Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen in Zellkulturen	25
2.5.2	Immunhistochemie an Vibratomschnitten	26
2.6	Molekularbiologische Methoden	26
2.6.1	Fotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	26
2.6.2	Transformation chemisch kompetenter E. coli Bakterien mit Plamid-DNA	27
2.6.3	Präparation von Plasmid-DNA	27
2.6.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	27
2.6.5	Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleinsäure-Lösungen	28
2.6.6	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.6.7	Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen	29
2.6.8	Ligation von DNA	29
2.6.9	Fill-In Reaktion mit Klenow Fragment	29
2.6.10	Kolonie-PCR	30
2.6.11	Genotypisierung von L7En-2 transgenen Mäusen	31
2.6.12	Vektoren für Zellkultorexperimente	32
2.6.13	siRNA Oligonukleotid-Sequenzen	34
2.6.14	Annealingreaktion der siRNA Oligonucleotide	35
2.6.15	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe	35
2.6.16	DNase-Verdau	36
2.6.17	Reverse Transkription zur Synthese von cDNA	36
2.6.18	Bestimmung relativer mRNA Konzentrationen durch Realtime PCR	37
2.6.19	Analyse von PCR-Produkten in Silbergelen	39

2.6.20	Sonden-Herstellung für die in situ Hybridisierung	40
2.6.20.1	Herstellung von in situ Sonden basierend auf Plasmid-DNA	41
2.6.20.2	PCR zur Herstellung von in situ Sondensequenzen	42
2.6.20.3	In vitro Transkription zur Herstellung einer Digoxigenin markierten RNA Sonde	43
2.6.21	Präparation und Fixierung von Gewebeproben	44
2.6.22	Paraffineinbettung und Schnitte	45
2.6.23	Entparaffinierung und Vorbehandlung der Schnitte für die in situ Hybridisierung	45
2.6.24	In situ Hybridisierung	46
2.7	Analyse differenzieller Genexpression mithilfe der Array-Technologie	49
2.7.1	Proben-Aufbereitung	49
2.7.2	Array-Hybridisierung	49
2.7.2.1	Material und Lösungen	50
2.7.2.2	Vorbereitung der Array-Membranen	52
2.7.2.3	Pre-Hybridisierung mit einer Kanamycin- und M13-Probe	52
2.7.2.4	„Stripping“	53
2.7.2.5	Komplexe Hybridisierung	53
2.7.2.6	Herstellung der komplexen cDNA-Probe	54
2.7.3	Array-Datenauswertung	55
2.7.3.1	Bildanalyse und Messung der Expressionsdaten	55
2.7.3.2	Datentransformation und Selektion der differenziell exprimierten Gene	56
2.7.3.3	DEF Faktor	57
2.7.3.4	Cluster-Analyse	58
2.7.3.5	Funktionelle Klassifizierung der differenziell exprimierten Gene und statistische Auswertung der GO-Gruppen	58
2.8	Software	59
3	Ergebnisse	60
3.1	Analyse der differentiellen Genexpression im Cerebellum der L7En-2 Maus mithilfe der Array-Technologie	60
3.1.1	Selektion der differenziell exprimierten Gene	65
3.1.2	Verifikation der Array-Daten	67
3.1.3	Der Differenzielle Expressions Faktor	68
3.1.4	Clusteranalyse	71
3.2	Differenzielle Expression von Parvalbumin in der L7En-2 Maus	73
3.2.1	Relative Quantifizierung der Parvalbumin Expression durch Realtime-PCR	75
3.2.2	Proteinexpression von Parvalbumin	77
3.2.3	Verifizierung der Parvalbumin Expression mittels in situ Hybridisierung	79
3.3	Expressionsanalyse von Tetraspanin-5	82
3.3.1	Analyse der Tetraspanin-5 Expression durch Realtime-PCR	83
3.3.2	Verifizierung der Tetraspanin-5 Expression durch in situ Hybridisierung	84
3.3.3	Analyse der Tetraspanin-5 Expression in Zellkulturen	87
3.3.4	Repression von Tetraspanin-5 durch siRNA	89
3.4	Analyse der Cholecystokinin Expression im Cerebellum	92
3.5	Analyse der Metastasen Suppressorgen 1 Expression	100
3.6	Analyse von Signalmolekülen des Semaphorin 3A Signalweges	104
3.6.1	Analyse der Semaphorin 3A Expression	104
3.6.2	Expression von Neuropilin-1 und CRMP 5, Mediatoren im Semaphorin 3A Signaltransduktionsweg	107
3.6.3	Einfluss von Semaphorin 3A auf die Migration von Körnerzellen	110
3.7	Differenziell exprimierte Gene mit einer Assoziation zum Autismus Syndrom	112
3.8	Funktionelle Klassifizierung und statistische Analyse der differenziell exprimierten Gene	113

4	Diskussion	116
4.1	Array-Analysen als Methode zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene in Zelltyp-spezifischen transgenen Tiermodellen	116
4.2	Repression als vorwiegende Expressionsregulation in Engrailed-2 überexprimierenden Mäusen	120
4.3	Cytoskelettbestandteile als potenzielle Zielgene von Engrailed-2	122
4.4	Das Calcium bindende Protein Parvalbumin	123
4.5	Das Transmembranprotein Tetraspanin-5	125
4.6	Das Peptidhormon Cholecystokinin und die Verbindung zum Autismus	127
4.7	Das Metastasen Suppressorgen 1	131
4.8	Semaphorin 3A	132
4.9	Einfluss von Engrailed-2 auf den intrazellulären Membran- und Zytoskelettmetabolismus	134
5	Anhang	140
5.1	Ergänzende Ergebnisse	140
5.1.1	Genotypisierung von L7En-2 transgenen Mäusen	140
5.1.2	CT-Werte und Standardkurven der Parvalbumin Realtime-PCR-Analyse	141
5.1.3	Qualitätskontrolle der Realtime-PCR	143
5.1.4	Qualitätskontrolle der RNA	144
5.1.5	MDM Algorithmus	145
5.1.6	Engrailed Bindungsstellen	150
5.1.7	Tabellen GO-Analysen	151
5.2	Zusammenfassung	156
5.3	Literaturverzeichnis	159
5.4	Abkürzungsverzeichnis	173

1 Einleitung

1.1 Das Cerebellum als Modellsystem der Entwicklungsneurobiologie

Das Nervensystem des Menschen ist eine der komplexesten biologischen Strukturen, die in der Natur vorkommen. Die Frage, wie diese Strukturen gebildet werden und welcher Zusammenhang zwischen der Form und der Funktion besteht, nimmt seit den Anfängen der Neurowissenschaften eine zentrale Stellung ein.

Für die Untersuchung von neurobiologischen Entwicklungsprozessen bietet das Kleinhirn (Cerebellum) eine Reihe von Vorteilen. Als Bestandteil des Zentralnervensystems lässt es sich gut vom Großhirn abgrenzen und ist damit für die experimentelle Forschung leicht zugänglich. Der zelluläre Aufbau ist einfach organisiert und basierend auf den Arbeiten von Camillo Golgi und Santiago Ramón y Cajal gut charakterisiert (Ramon y Cajal, 1911; Golgi, 1885; Glickstein, 2006; Llinas, 2003; Sotelo, 2003). Ebenso sind die grundlegenden Funktionen und die Verschaltung der verschiedenen neuronalen Zelltypen untereinander intensiv erforscht. Für die experimentelle Arbeit ist darüber hinaus von Vorteil, dass die Entwicklung des Kleinhirns bei Säugetieren, im Unterschied zu allen anderen Gehirnarealen, weitgehend postnatal stattfindet, wodurch der Zugang zum Gewebematerial wesentlich vereinfacht wird. Auf molekulargenetischer Basis stehen eine Reihe von gut charakterisierten biochemischen Markern zur Identifizierung der Zellen und ihrer Differenzierungsstadien zur Verfügung. Auch sind die Methoden zur spezifischen Manipulation der Genexpression im Cerebellum für eine Untersuchung der molekulargenetischen Mechanismen der Entwicklung gut etabliert.

1.1.1 Aufbau und Funktion des Kleinhirns

Das Kleinhirn bildet bei Mäusen einen morphologisch leicht zu separierenden Bereich an der dorsalen Rückseite des Gehirns dorsal der Pons und der Medulla oblongata aufliegend (Abb. 1).

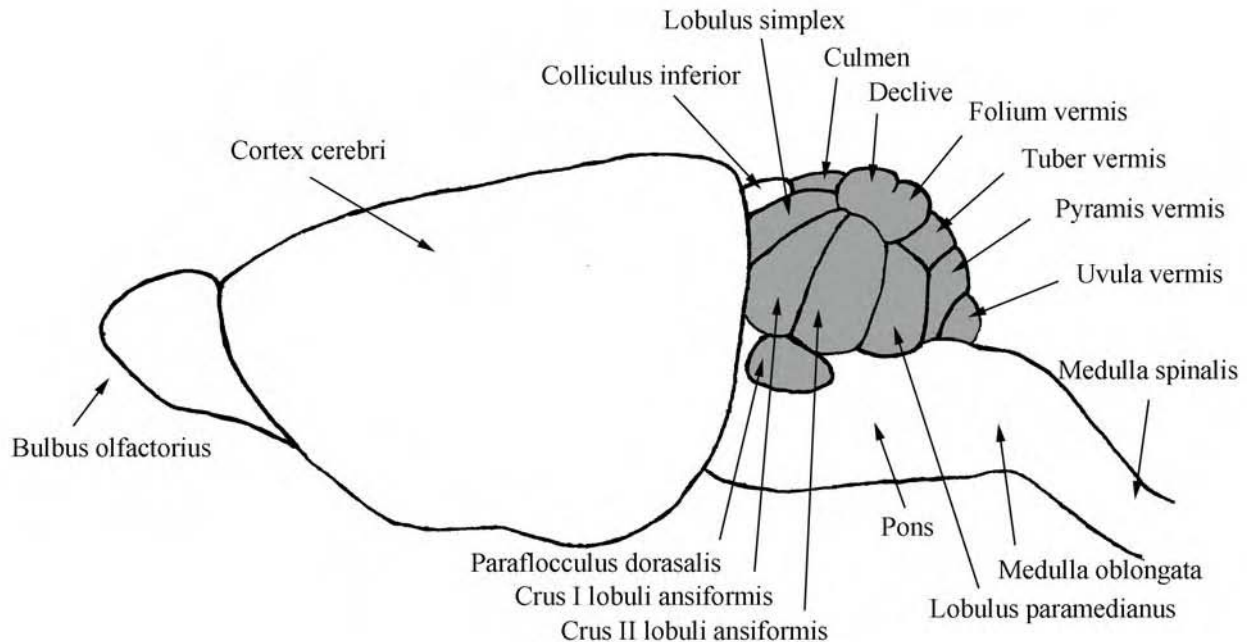


Abb. 1: Laterale Ansicht auf das Gehirn einer Maus. Das Cerebellum (grau) liegt an der Rückseite des Gehirns oberhalb der Pons und der Medulla oblongata. Abgeändert nach (Sidman and Pierce, 1971)

Über die drei Kleinhirnstiele (Pedunculus cerebellaris superior, medius, inferior) ist das Cerebellum mit dem Hirnstamm verbunden. In den Kleinhirnstielen verlaufen die Leitungsbahnen, über die das Cerebellum seine Informationen erhält. Eingehende Informationen werden über die afferenten (zuleitenden) Leitungsbahnen transportiert, die aus fast allen Bereichen des zentralen Nervensystems stammen. Die efferenten (ableitenden) Fasern projizieren in Kerngebiete, die fast ausschließlich im Kleinhirn selbst liegen. Bei der Aufsicht auf das Cerebellum von dorsal liegen, lateral symmetrisch angeordnet zwei Hemisphären, getrennt durch den zentral liegenden Wurm (Vermis). Nach Larsell wird der Vermis des Kleinhirns in den Lobus anterior, Lobus posterior und einen Lobus flocculonodularis eingeteilt (Larsell, 1952). Die einzelnen Lobi werden wiederum in Lobuli unterteilt, wobei diese nach neuerer Nomenklatur von I-X durchnummeriert werden. Im Jahr 1997 postulierte Altman und Bayer eine Einteilung, auf die ich mich in dieser Arbeit beziehe (Altman and Bayer, 1997). Danach wird der Lobus anterior in die Lobuli I-V eingeteilt, der Lobus centralis umfasst die Lobuli VI-VIII, der Lobus posterior besteht aus dem Lobulus IX und der Lobulus flocculonodularis aus dem Lobulus X (Abb. 2). Die Oberfläche des Kleinhirns weist tiefe Einfaltungen (Fissuren) auf, wobei charakteristische Fissuren die Fissura prima zwischen dem Lobulus V und VI, die Fissura secunda zwischen dem Lobulus VIII und IX und die Fissura

posterolateralis zwischen dem Lobulus IX und X sind. Die Spitze eines Lobulus wird als Apex bezeichnet.

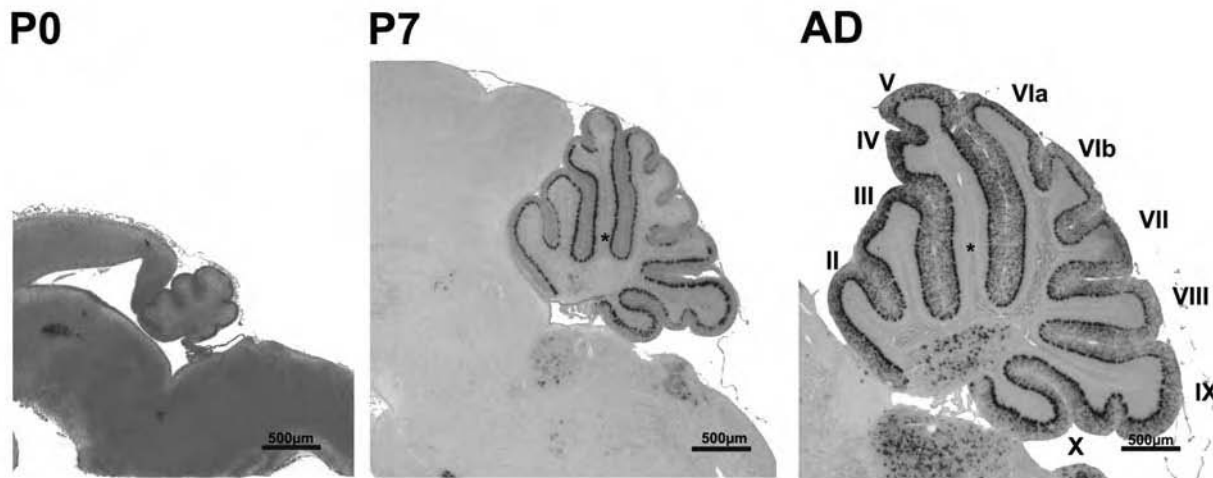


Abb. 2: Postnatale Entwicklung des Kleinhirns der Maus. P0 = neugeboren, P7 = 7 Tage alt, AD = adult (> 2 Monate). In sagittalen Schnitten ist die charakteristische Lobulierung des Kleinhirns deutlich sichtbar.

Funktionell besitzt das Cerebellum eine wichtige Rolle bei der Integration von sensorischen Informationen für die Koordination und die Feinabstimmung von Bewegungsabläufen und motorischen Lernvorgängen. Neben diesen klassischen Funktionen werden dem Cerebellum in der jüngsten Zeit auch emotionale und kognitive Eigenschaften zugewiesen, wie die Verarbeitung von Sprache und Funktionen bei der Aufmerksamkeit (Barinaga, 1996; Allen et al., 1997; Nicolson et al., 2001).

1.1.2 Die Zelltypen des Kleinhirns und ihre neuronale Verschaltung

In der Kleinhirnrinde (Cortex cerebellaris) eines adulten Säugers sind drei laminar angeordnete Zellschichten erkennbar (Abb. 3). Unterhalb der Piaoberfläche befindet sich die Molekularschicht (ML). Sie besteht im Wesentlichen aus Fortsätzen cerebellärer Neurone (Dendriten der Purkinjezellen, Axone der Körnerzellen) sowie den inhibitorischen Interneuronen (Korb- und Sternzellen). Unter der Molekularschicht liegt als Einzelzellschicht die Purkinjezellschicht (PL) mit den Somata der Purkinjezellen (PC). Es folgt die innere dicht gepackte Körnerzellschicht (GCL), die neben der großen Anzahl von Körnerzellen (GC) auch inhibitorische Neurone wie die Golgi- und Lugarozellen beinhaltet. Unterhalb der Körnerzellschicht fängt die weiße Substanz an. In ihr liegen die myelinisierten afferenten Fasern (Moosfasern (MF), Kletterfasern (CF)), die von außerhalb des Kleinhirns in die Kleinhirnrinde projizieren und die efferenten Fasern der Purkinjezellen, die zum größten Teil zu Neuronen der tiefen cerebellären Kerne (DCN) ziehen.

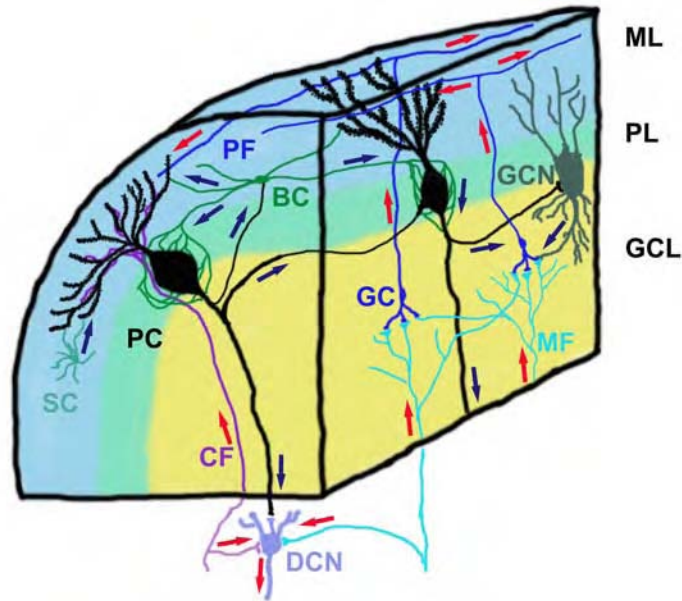


Abb. 3: Ausschnitt aus dem cerebellären Cortex mit den verschiedenen Zelltypen. Verändert nach (Kandel et al., 1995).

Zelltyp	Abkürzung	Aktivität	Neurotransmitter
Purkinjezellen	PC	inhibitorisch	GABA(Gamma Aminobuttersäure)
Körnerzellen	GC	exzitatorisch	Glutamat
Korb- und Stern-Zellen	BC, SC	inhibitorisch	GABA
Golgizellen	GCN	inhibitorisch	GABA, Glycin
Moosfasern	MF	exzitatorisch	
Kletterfasern	CF	exzitatorisch	
Parallelfasern	PF	exzitatorisch	
Tiefe Cerebelläre Kerne	DCN	inhibitorisch	
Molekularschicht	ML	beide Qualitäten	
Purkinjzellschicht	PL	inhibitorisch	
Körnerzellschicht	GCL	exzitatorisch	

Im Cortex des Kleinhirns kommen vier Haupttypen von Neuronen vor (Voogd and Glickstein, 1998). Die Purkinjezellen stellen die Hauptneurone des Kleinhirns dar und bilden die zentrale Integrationsstelle für alle aktivierenden und inhibierenden Signale im Kleinhirnkortex. Die Purkinjezellen sind inhibitorische, GABAerge Neurone mit auffällig großen Somata und einem stark verzweigten Dendritenbaum. Ihre Dendriten liegen in der Molekularschicht in der sagittalen Ebene planar angeordnet. Die Axone der Purkinjezellen sind die einzigen Efferenzen aus der Kleinhirnrinde. Noch innerhalb der inneren Körnerzellschicht verzweigen sich ihre Axone und bilden seitlich Kollateralen zu anderen Purkinjezellen aus. Die myelinisierten Hauptaxone projizieren jedoch auf Neurone in den tiefen Kleinhirnkernen (Nucleus dentatus, Ncl. emboliformis, Ncl. globosus, Ncl. fastigii) sowie den Vestibulariskernen, auf die sie einen inhibitorischen Einfluss haben. Von diesen Gebieten aus werden die gesamten Efferenzen des Kleinhirns in die motorischen Regionen der Großhirnrinde und des Hirnstamms übertragen.

Diesen efferenten Bahnen stehen zwei afferente Systeme gegenüber, die extracerebellären Ursprungs sind, und Einfluss auf die Aktivität der Purkinjezellen nehmen. Die Kletterfasern (CF)

entstammen Neuronen aus der unteren Olive, die im Gehirnstamm liegt und in extrapyramidalmotorische Erregungskreisläufe integriert ist. In der Molekularschicht umflechten die Kletterfasern die Dendritenbäume der Purkinjezellen und bilden mehrere Hundert von glutamatergen Synapsen mit ihnen aus. Eine Purkinjezelle wird dabei nur von einer Kletterfaser innerviert.

Das andere afferente System wird durch die Moosfasern (MF) gebildet. Sie stammen aus verschiedenen Hirnstammkernen sowie Rückenmarksneuronen und erreichen den Kleinhirnkortex über pontocerebelläre und spinocerebelläre Bahnsysteme. Die exzitatorischen Axone der Moosfasern enden an den Körnerzellen, wo sie zusammen mit den Axonen der inhibitorischen Golgi-Zellen Synapsen mit den Dendriten der Körnerzellen ausbilden. Der Endkopf einer Moosfaser bildet mit den synaptischen Kontakten der Golgizellen und der Körnerzellen eine Struktur aus, die als Glomerulus cerebellaris bezeichnet wird.

Die Körnerzellen haben ein kleines Soma und bilden die größte Anzahl der Neuronen im Cerebellum. Ihre Aufgabe ist es, die Signale der Moosfasern und Golgizellen zu verarbeiten und an die Purkinjezellen weiter zu leiten. Die Körnerzellen senden ihre nicht myelinisierten Axone in die Molekularschicht, in der sich die Axone T-förmig aufteilen und als Parallelfasern (PF) in Kontakt mit den Dendriten der Purkinjezellen treten. Die Parallelfasern laufen perpendikular durch die flächig ausgebreiteten Dendritenbäume von mehreren aufeinander folgenden Purkinjezellen. Die Parallelfasern üben einen exzitatorischen Einfluss über glutamaterge Synapsen auf die Purkinjezellen aus. Sie treten ebenfalls in Kontakt mit den in der Molekularschicht verstreut liegenden Korb- und Sternzell-Interneuronen. Die Korb- und Stern-Zellen bilden GABAerge Synapsen mit den Dendriten der Purkinjezellen und wirken als Vorwärtsinhibitoren auf die Aktivität der Purkinjezellen.

Die Dendriten der Golgizellen liegen hauptsächlich in der Molekularschicht und werden durch die exzitatorischen Synapsen der Parallelfasern kontaktiert. Die Zellkörper liegen unterhalb der Purkinjezellschicht und ihre Axone breiten sich in der Körnerzellschicht aus. Durch Kollateralen der Purkinjezellenaxone erhalten die Golgizellen inhibitorische Einflüsse, wodurch eine weitere Rückkopplung auf die Purkinjezellaktivität erreicht wird. Über ihre Axone üben die Golgizellen einen inhibitorischen Einfluss auf die Endköpfe der Moosfasern in den Glomeruli cerebellaris aus. Das Signal dient als Rückwärtsinhibition für die Körnerzellen.

Weitere neuronale Zelltypen, die in der inneren Körnerzellschicht identifiziert wurden, sind die Lugaro-Zellen und die unipolaren Bürstenzellen. Die Lugarozellen liegen unterhalb der Purkinjezellschicht und bilden Kontakte mit den Korb- und Sternzellen in der Molekularschicht. Sie gehören zu den GABAergen Interneuronen und üben eine inhibitorische Rückkopplung auf die Purkinjezellen aus (Laine and Axelrad, 1998; Simat et al., 2007). Im Gegensatz zu den

Lugarozellen sind die unipolaren Bürstenzellen glutamaterge Interneurone, die hauptsächlich im Lobulus IX und X lokalisiert sind und eine exzitatorische Feedforward-Kontrolle auf Körnerzellen ausüben (Mugnaini and Floris, 1994; Englund et al., 2006; Nunzi and Mugnaini, 2000; Nunzi et al., 2002).

Außer den neuronalen Zellen kommen im Cerebellum auch die typischen Gliazellen vor. Neben Astroglia (Astrozyten), Oligodendroglia (Oligodendrozyten) und Mikroglia findet man im Cerebellum als eine spezielle Form der Radialglia die Bergmannglia. Die Zellkörper liegen unter den Purkinjezellen, ihre Fortsätze durchziehen die Molekularschicht und enden an der Pia mater. Sie dienen während der Entwicklung als Leitstruktur für Purkinjezellen und Körnerzellen bei ihrer Migration an die jeweiligen Endpositionen (Bellamy, 2006) und spielen im adulten Kleinhirn eine wichtige Rolle beim Metabolismus extrazellulär vorkommender Neurotransmitter.

1.1.3 Molekulare Grundlagen der embryonalen Entwicklung des Cortex cerebelli

Die embryonale Entwicklung des Kleinhirns wird durch das Zusammenspiel einer Reihe von sezernierten Faktoren und zellulär lokalisierten Transkriptionsfaktoren organisiert. Bisher konnten mehrere wichtige Faktoren und deren Regulationsmechanismen identifiziert werden (Abb. 4). Im Grenzbereich zwischen Mesencephalon (Mittelhirn) und Metencephalon (Hinterhirn), aus dem sich das Cerebellum entwickelt, ist der für die cerebelläre Entwicklung wichtige Isthmus Organisator lokalisiert. Initial wird diese Region durch die Expression der Transkriptionsfaktoren orthodenticle homologue 2 (Otx2) und gastrulation brain homeobox 2 (Gbx2) aus der Familie der Homeodomänproteine spezifiziert (Wang and Zoghbi, 2001; Nakamura and Watanabe, 2005; Broccoli et al., 1999). Beide Gene haben aufeinander eine reprimierende Wirkung, wodurch die Mittel- Hinterhirngrenze („mid-hindbrain junction“) eindeutig festgelegt wird. Am Anfang der Genkaskade zur Festlegung des Isthmus Organisators steht der Lim Homeodomän-Transkriptionsfaktor Lmx1b, der zur Induktion des sezernierten Fibroblasten-Wachstumsfaktors 8 (Fgf8) führt und wahrscheinlich auch die Expression des sezernierten Drosophila Homologs wingless 1 (Wnt1) beeinflusst (Guo et al., 2007). Als eine weitere Hauptkomponenten bei der Festlegung des Isthmus Organisators wird das Gen paired box 2 (Pax2) angesehen, das ebenfalls auf Fgf 8 regulatorisch wirkt (Pfeffer et al., 2002). Fgf8 steht an zentraler Stelle dieses Regulationsnetzwerks und beeinflusst die Regulation weiterer Gene. Am Ende diese Kaskade von Transkriptions- und Wachstumsfaktoren werden durch Wnt 1 die aus Drosophila bekannten Segment-Polaritätsgene Engrailed-1 und Engrailed-2 induziert (Garcia-Bellido and Santamaria, 1972; Morata and Lawrence, 1975; Kornberg, 1981). Die Engrailed Transkriptionsfaktoren können

folglich als Endglied einer Kaskade angesehen werden, die direkt Effektorgene und damit zelluläre Prozesse steuern.

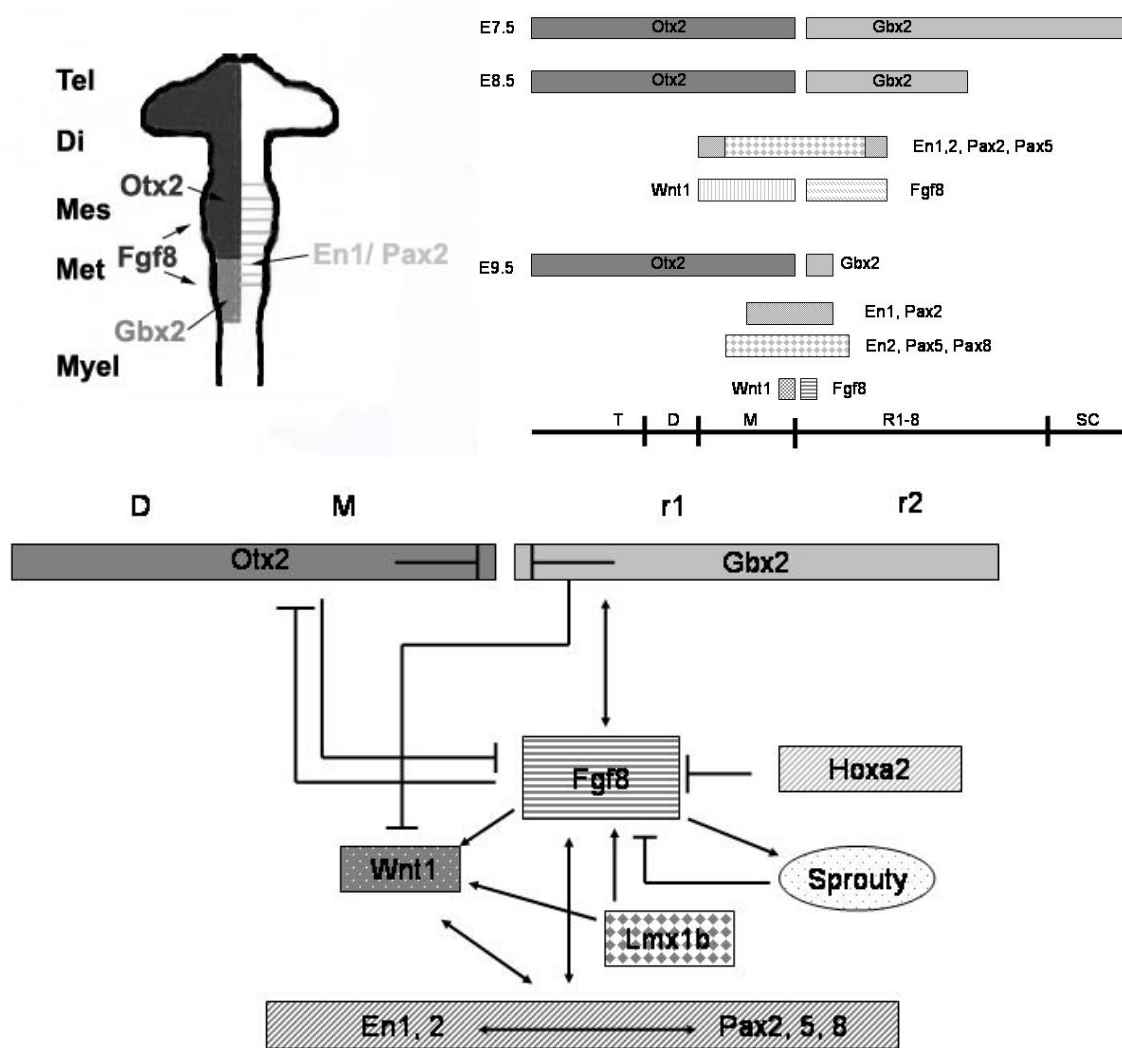


Abb. 4: Genexpressionsmuster und Regulationsmechanismen während der embryonalen (E) Entwicklung des Kleinhirns. T, Telencephalon; D, Diencephalon; M, Mesencephalon; r, Rhombomere; SC, Rückenmark. Verändert nach (Li et al., 2005; Nakamura and Watanabe, 2005; Wurst and Bally-Cuif, 2001; Guo et al., 2007)

1.1.4 Entwicklung des Kleinhirns

Die gesamte embryonale Entwicklung der Maus dauert 18 Tage (E18), wobei das Cerebellum erst am embryonalen Tag acht (E8) erstmals morphologisch erkennbar wird. Der größte Teil der Entwicklung und Differenzierung des Kleinhirns findet erst nach der Geburt innerhalb der ersten drei postnatalen Wochen statt. Das Cerebellum entsteht aus einem Neuroepithel auf der dorsalen Seite des Neuralrohrs an der Grenze zwischen dem Mesencephalon und dem Metencephalon. Die Neuronen des Kleinhirns entstammen aus zwei verschiedenen Keimregionen, die zusammen die cerebelläre Anlage ausbilden. Aus dem Bereich der Ventrikular-Zone im Dach des vierten

Ventrikels werden als Erstes die Neurone der tiefen Kerne (E10-12) und die Purkinjezellen (E11-13) gebildet (Miale and Sidman, 1961). Nach der Bildung der Purkinjezellen entstehen in der ventrikular Zone die Korb- und Sternzellen sowie die Golgizellen. Diese Zellen wandern später durch die weiße Substanz in den cerebellären Kortex ein. Die Neurone der cerebellären Kerngebiete wandern in die Tiefe, während sich die undifferenzierten Purkinjezellen unterhalb der Oberfläche ansiedeln. Erste Kontakte der Purkinjezellen mit den Kletterfasern werden um den dritten postnatalen Tag (P3) geschlossen. Innerhalb der ersten 5 postnatalen Tage erfolgt die Anordnung zur typischen Purkinjezellschicht. In dieser Phase fangen die Purkinjezellen mit der Ausbildung der Dendriten und dem Aufbau neuronalen Verschaltungen an.

Die andere Keimregion wird von der beidseitigen Ausstülpung der Flügelplatte des Metencephalon („rhombencephale Lippe“) gebildet. Aus ihr gehen die Körnerzellen hervor (E13-15). Sie migrieren nach anterior unterhalb der Oberfläche des Kleinhirns und bilden die externe Körnerzellschicht. Die Zellen bleiben bis in die postnatale Phase mitotisch aktiv. Nach der Proliferation beginnen die postmitotischen Körnerzellen um den postnatalen Tag 3 mit ihrer Differenzierung. Diese beginnt mit der Wanderung in horizontaler Richtung, wobei bipolare Neurone entstehen. Anschließend wandern die Zellen radiär in Richtung der Purkinjezellen, wobei die Zellsomata ein Axon zurücklassen. Es entsteht die T-förmige Parallelfaser. Im Verlauf der Entwicklung (P7-P15) migrieren alle Körnerzellen durch die Purkinjezellschicht hindurch ins Innere des Kleinhirns und bilden dort die innere Körnerzellschicht. In dieser Phase bilden die Parallelfasern synaptische Kontakte mit den Dornfortsätzen (Spines) der Purkinjezeldendriten, den Korb- und Stern-Zellen sowie den Golgizellen aus. Die Dendriten der Körnerzellen bilden zusammen mit den Enden der Moosfasern und den Golgizeldendriten die Glomeruli Strukturen um den postnatalen Tag zehn aus.

1.2 Expression, molekularer Aufbau und Funktionen von Engrailed

Die Gene Engrailed-1 und Engrailed-2 gehören zu den Homeobox-Transkriptionsfaktoren mit einer Funktion als Repressor bei der Genregulation. Sie werden um den embryonalen Tag acht während der Entstehung der cerebellären Anlage im Bereich der Mittelhirn-Hinterhirngrenze exprimiert (Davis et al., 1988; Joyner and Martin, 1987). Im Zeitraum zwischen den Embryonaltagen E15,5 und 17,5 werden sie transient in einem sagittalen Streifenmuster exprimiert, wobei Engrailed-2 in fünf getrennten Streifen exprimiert wird und Engrailed-1 drei Streifen ausbildet (Millen et al., 1995). Nach der Geburt wird die Expression von Engrailed-1 um den postnatalen Tag fünf herunterreguliert. In den Purkinjezellen wird die Expression von Engrailed-2 um den Tag der

Geburt abgeschaltet, dagegen wird es in der Körnerzellschicht bis ins adulte Stadium exprimiert (Davis et al., 1988).

Zusätzlich zur Regulation der Transkription weist der Aufbau von Engrailed offensichtlich auf eine Reihe von funktionellen Besonderheiten hin (Morgan, 2006; Simon et al., 2004). Der Sequenzvergleich der Engrailed-Gene zwischen verschiedenen Arten zeigte in fünf Regionen eine starke Homologie (EH, Engrailed homology regions) (Abb. 5). Die größte Konservierung findet man in der Homeodomäne EH4, die für die DNA-Bindung verantwortlich ist. Die anderen Domänen sind an der Interaktion mit Proteinen beteiligt. Die Repression der Transkription wird über die EH1 und EH5 Region vermittelt, wobei die EH1 Domäne für ihre Funktion auf die Bindung des Korepressors Groucho angewiesen ist. Die anderen Domänen EH2 und EH3 vermitteln die Assoziation mit dem Transkriptionsfaktor Pbx/extradenticle, wodurch die DNA-Bindungsaffinität und die Spezifität von Engrailed modifiziert werden kann. Durch eine Phosphorylierung kann die Bindung von Engrailed an die DNA verstärkt werden. Eine weitere - ungewöhnliche - Eigenschaft von Engrailed besteht in Assoziation mit Membranvesikeln, der Sekretion und der Wiederaufnahme in anderen Zellen (Brunet et al., 2005; Joliot et al., 1997). Diese Fähigkeiten sind abhängig von der Phosphorylierungsstelle und einem Bereich in der Homeodomäne, der für den nukleären Export und extrazelluläre Freisetzung verantwortlich ist. Eine andere bemerkenswerte Eigenschaft liegt in der Bindung an den eukaryontischen Translations-Initiations-Faktor 4e (eIF4E) über eine Sequenz im N-terminalen Ende. Zusätzlich zur Regulation der Transkription besteht daher die Möglichkeit auf die Translation Einfluss zu nehmen.

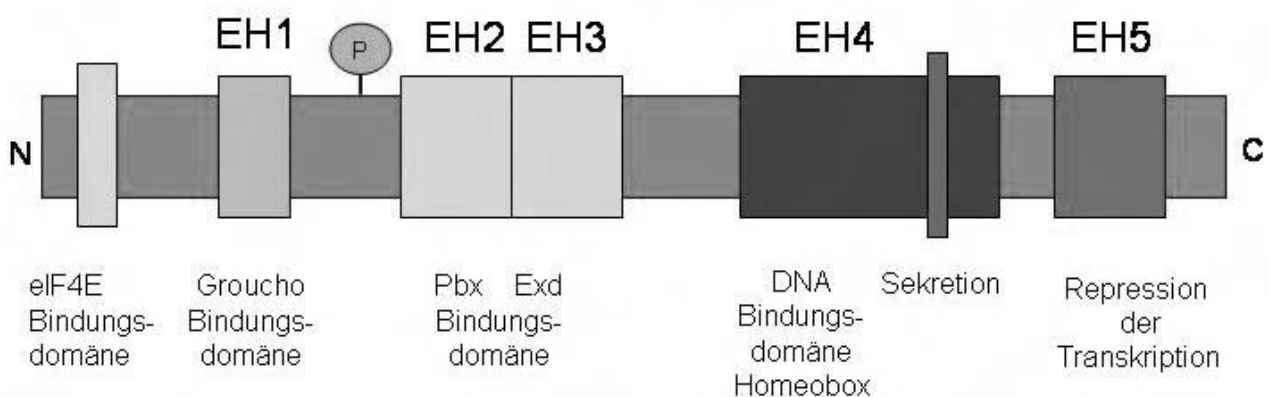


Abb. 5: Molekulare Struktur von Engrailed. EH 1-5, Homologie Regionen; P, Phosphorylierungsstelle. Verändert nach (Simon et al., 2004; Morgan, 2006)

Erkenntnisse über eine Funktion von *Engrailed* bei der Festlegung der Polarität von Körpersegmenten stammen ursprünglich aus Studien an *Drosophila*. Mutationen von *Engrailed* führten zu Fehlern bei der Festlegung der Grenzen zwischen anterioren und posterioren Anteilen der Flügel. In diesen Segmenten zeigten sich homeotische Transformationen mit einer Umwandlung von posterioren Flügelanteile in anteriore Anteile des Flügels (Garcia-Bellido and Santamaria, 1972; Morata and Lawrence, 1975). Im Gegensatz zur Deletion von *Engrailed* führt die ektopische Expression zu Transformationen von anterioren Flügelsegmenten in posteriore Strukturen des Flügels (Guillen et al., 1995).

Die Funktion von *Engrailed* bei der Spezifikation von posterioren Strukturen zeigt sich in ähnlicher Weise auch bei den *Engrailed-2* Nullmutanten der Maus (Millen et al., 1994). Bei diesen Mutanten zeigten sich ebenfalls posterior-anteriore Transformationen. Die posteriore Region von Lobulus VI übernahm die Identität des anterioren Lobulus VI und der posteriore Paraflocculus wurde in einen anterioren Paraflocculus umgewandelt. Es zeigte sich jedoch auch eine Assoziation des vermalen Lobulus VIII mit dem posterioren Lobulus IX, was eher auf eine anterior-posteriore Transformation hindeutet. Die weitgehende funktionelle Verwandtschaft der beiden Gene und ihre Redundanz wurde durch den Austausch von *Engrailed-1* durch *Engrailed-2* in der *Engrailed-1* Nullmutanten nachgewiesen (Hanks et al., 1995). Auch ist es interessant, dass die Funktion von *Engrailed-1* durch das *Drosophila*-Gen zumindest teilweise ersetzt werden kann (Hanks et al., 1998). Die starke Homologie zwischen den Genen macht deutlich, dass die wichtigsten funktionellen Unterschiede nicht auf verschiedenen Moleküleigenschaften beruhen, sondern hauptsächlich im zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster von *Engrailed-1* und *Engrailed-2* zu finden sind (Millen et al., 1994; Wurst et al., 1994).

Aufgrund der Expression von *Engrailed-2* in den cerebellären Vorläuferzellen und der Tatsache, dass Nullmutationen eines der beiden *Engrailed*-Gene zu einem 40 %igen bis totalen Verlust der Purkinjezellen führte, wurde angenommen, dass *Engrailed* eine Funktion bei der Spezifikation und dem Überleben von Neuronen hat. Anzeichen für eine Funktion von *Engrailed-1* und *Engrailed-2* beim Überleben von Neuronen stammen aus Studien über dopaminerge Neurone der Substantia nigra (Simon et al., 2004; Alberi et al., 2004; Simon et al., 2001).

Hinweise für eine Funktion von *Engrailed-2* bei der Musterbildung und der Spezifikation von Neuronen stammen aus den Analysen der *Engrailed-2* Überexpressionsmutanten und der Nullmutanten. Diese zeigen komplementäre Veränderungen der parasagittalen Expressionsmuster, aufgrund dieser Veränderungen kann für *Engrailed-2* eine Funktion bei dem Aufbau der afferenten Verschaltungen im Kleinhirnkortex postuliert werden (Millen et al., 1994; Joyner et al., 1991; Baader et al., 1999; Kuemerle et al., 1997). Unterstützt wird dies durch Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass eine Expressionsveränderungen von *Engrailed-2* im retinotektalen System des

Hühnchens den Verlauf der retinotektalen Bahnsysteme modifiziert (Friedman and O'Leary, 1996; Cheng et al., 1995; Shigetani et al., 1997; Logan et al., 1996). Neuere Studien belegen, dass Engrailed-2 sezerniert werden kann und einen Einfluss auf die Wachstumsrichtung von Axonen hat (Brunet et al., 2005; Gherbassi and Simon, 2006; Joliot et al., 1997; Joliot et al., 1998; Maizel et al., 1999; Maizel et al., 2002). Aus diesen Befunden wird ersichtlich, dass Engrailed-2 einen maßgeblichen Einfluss bei der Verschaltung von zentralnervösen Strukturen besitzt.

Physiologische Studien an adulten Engrailed-2 Nullmutanten belegten, dass die Tiere ein Defizit im Erlernen von motorischen Fähigkeiten haben (Cheh et al., 2006; Gerlai et al., 1996). Da Engrailed-2 etwa um den Tag der Geburt in den Purkinjezellen abgeschaltet wird, und damit postnatal nur noch in den Körnerzellen innerhalb des Kleinhirns exprimiert wird, spielt Engrailed-2 offensichtlich auch eine wichtige Rolle bei der Aktivität der Körnerzellen.

Der Grund für die postnatale Abschaltung von Engrailed-2 in den Purkinjezellen hängt wahrscheinlich mit der Regulation von Differenzierungsprozessen zusammen. Hinweise auf diesen Zusammenhang finden sich in der Engrailed-2 Überexpressionsmutanten, die eine Hemmung der Purkinjezell-Differenzierung aufweist (Baader et al., 1998).

1.3 Die L7En-2 Überexpressionsmutante

Mit der Engrailed-2 Überexpressionsmutanten (L7En-2) steht ein Modellsystem für postnatale Differenzierungsprozesse im Cerebellum zur Verfügung (Baader et al., 1998; Baader et al., 1999). Die Überexpression von Engrailed-2 wird erreicht durch die Nutzung des L7/pcp-2 Promotors (Oberdick et al., 1990). Dieser Promotor ermöglicht eine spezifische Expression in den Purkinjezellen des Kleinhirns in einem zeitlich und räumlich gut charakterisierten Muster (Smeyne et al., 1991). In der embryonalen Phase wird die Überexpression in den Purkinjezellen aktiviert, die normalerweise keine endogene Engrailed-2 Expression aufweisen und komplementär zu den endogen Engrailed-2 exprimierenden Purkinjezellen lokalisiert sind. Postnatal wird die Expression dann auf alle Purkinjezellen ausgedehnt. Durch die Wirkung des Promotors wird die Expression in den Purkinjezellen der L7En-2 Tiere bis in die adulten Stadien verlängert (Abb. 6).

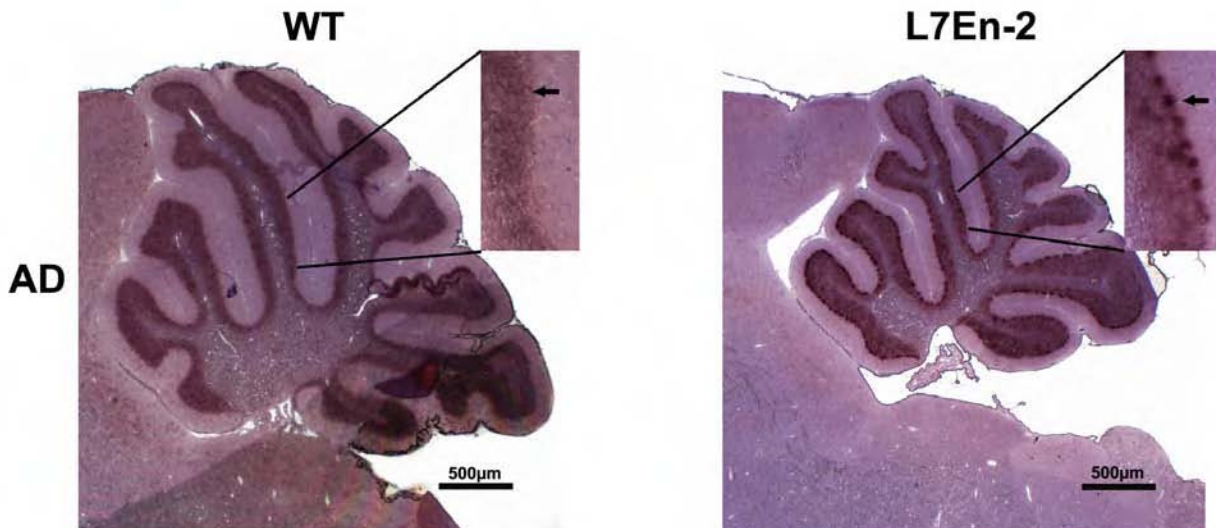


Abb. 6: In situ Hybridisierung mit einer Engrailed-2 spezifischen Sonde auf sagittalen Schnitten von adulten Wildtyp-Tieren (WT) und transgenen Mäusen (L7En-2). Die Pfeile in den Vergrößerungen markieren die Purkinjellschicht. Die Engrailed-2 Expression ist im Wildtyp auf die innere Körnerzellschicht beschränkt. In den L7En-2 transgenen Tieren kann eine Engrailed-2 Expression in den Körnerzellen und in den Purkinjellen nachgewiesen werden. Das Signal in der inneren Körnerzellschicht deutet auf eine vergleichbare Hybridisierungseffizienz der in situ Hybridisierung zwischen Wildtyp und L7En-2 Tieren hin.

Die bereits erwähnten Differenzierungsstörungen in den L7En-2 Tieren führen zu einer Reduktion der Größe des Kleinhirns um ca. 50 % im vermalen Bereich und ca. 40 % in den Hemisphären (Baader et al., 1998; Baader et al., 1999). Detaillierte morphologische Analyse des Kleinhirns der L7En-2 Tiere deckten eine um drei bis vier Tage verzögerte Entwicklung und Reifung der Purkinjellen auf. Deutlich zeigte sich dies in einer Retardierung der Dendritogenese mit verkürzten Dendritenbäumen (Jankowski et al., 2004). Durch die verlangsamte Reifung kommt es zu einer Anreicherung von Zellen in einer Apoptose-sensitiven Phase, so dass frühpostnatal vermehrt Purkinjellen absterben. Die Anzahl der Purkinjellen ist bei den L7En-2 Tieren um ca. 40 % im Vergleich zu den Wildtyp Tieren reduziert. Darüber hinaus wurden Störungen der afferenten Verschaltungsmuster festgestellt.

Die zeitlich korrekte Abschaltung der endogenen Engrailed-2 Expression nach der Geburt scheint also ein wichtiger Faktor für die postnatale Differenzierung der Purkinjellen zu sein. Während die Expression in der frühen embryonalen Phase möglicherweise einen vorzeitigen Beginn der Differenzierung und Reifung verhindert, wird durch die Abschaltung von Engrailed-2 in der Phase nach der Geburt die Expression von Genen ermöglicht, die an diesen Differenzierungs- und Reifungsprozessen der Purkinjellen maßgeblich beteiligt sind.

1.4 Zielsetzung

Obwohl die Expression von Engrailed-Proteinen in Säugern gut untersucht ist, und das Gen relativ klein und gut molekularbiologisch handhabbar ist, sind bisher wenig funktionelle Studien beschrieben (Brunet et al., 2005). An Engrailed-defizienten Mausmutanten wurde in den letzten 5-10 Jahren versucht, erste Kandidatengene zu identifizieren, die durch Engrailed maßgeblich reguliert werden, um damit auf eine zelluläre Funktion des Engrailed-2 schliessen zu können. Die Engrailed-defizienten Mäuse erlauben aber primär die Suche nach Genen, die während der frühen, embryonalen Entwicklung für die Purkinjezellen wichtig sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Gene gesucht werden, die durch die Expression von Engrailed-2 reguliert werden und die für die perinatale Entwicklung des Kleinhirns eine Bedeutung haben.

Für dieses Vorhaben sollte ein Genom-weites Screeningverfahren eingesetzt werden, mit dem in einem Ansatz die Expression tausender von Genen parallel untersucht werden kann. Als Technik wurde hierfür die Array-Technologie verwendet, und auf Genexpressionsunterschiede zwischen L7En-2 und Wildtyptieren angewendet.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller / Vertrieb
Blotkammer	NovaBlot Multiphor II System	Amersham, GE Healthcare Life Sciences
Blotkammer	Tankblot	Whatman Biometra, Göttingen
Digital-Kamera	DT5	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Digital-Kamera	DFC 350 FX	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Elektrophoresekammer	Electrophoresis Multiphor II System,	Amersham, GE Healthcare Life Sciences
Elektrophoresekammer	Comphor L Midi	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Elektrophoresekammer	SubCell Model 96	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophoresekammer	Minigel-Twin	Whatman Biometra, Göttingen
Geldokumentation	Geldoc 2000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gewebezerhacker	Tissue Chopper	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen
Hybridisierungs-Schrank	BFD 53	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen
Inkubator	Innova 4000 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, New Jersey, USA
Inkubator Zellkultur	Hera Cell	Hereaus, Thermo Fisher Scientific
Kaltlichtquelle	KL1500LCD	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Mikroskop	Axioskop 2 Mot	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Mikroskop	Axiovert 135	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Mikroskop	DM IRE2	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Paraffin Vacuum-Infiltrationsprozessor	Tissue Tek 3	Sakura
Paraffineinbettstation		PSI Medizin Technik, Laudenbach
PCR-Thermocycler	GeneAmp PCR System 2400	PerkinElmer LAS GmbH, Jügesheim
PCR-Thermocycler	PTC-200 MJ Research Gradient Cycler	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
PCR-Thermocycler	Mastercycler egradient S	Eppendorf AG, Hamburg
PCR-Thermocycler	iCycler, Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PH Meter	350 pH/Temp/mV Meter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Fotometer	Life Science UV/Vis Spectrofotometer DU 530	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Fotometer	µQuant Mikroplatten Spektralfotometer	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Rotationsmikrotome	HM 355 S	MICROM International GmbH, Walldorf
Stereolupe	Semi 200C	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Stromversorgung	Electrophoresis Power Supply EPS 350 1XL	Amersham, GE Healthcare Life Sciences
Stromversorgung	PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 H	SCHALLTEC GmbH, Mörfelden-Walldorf
Vibrator	VT1000 S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Waagen	Labstyle 303, AG204 Delta Range, PG503-S Delta Range	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Zentrifugen	Biofuge primo R, Biofuge primo, Biofuge pico, Multifuge 3 S-R	Hereaus, Thermo Fisher Scientific

Tab. 1: Verwendete Geräte.

2.2 Chemikalien

2.2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Substanzen wurden, sofern nicht anders ausgewiesen, von folgenden Firmen bezogen:

Firma	Vertrieb	
Abcam		Cambridge, UK
ABgene		Hamburg
Ambion	Applied Biosystems	Darmstadt
Amersham Biosciences	GE Healthcare Europe GmbH	München
Biomol	Biomol GmbH	Hamburg
BioRad	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Calbiochem	Merck KGaA	Darmstadt
Dako	Dako Deutschland GmbH	Hamburg
Dynal	Invitrogen	Paisley, UK
Eurogentec	Eurogentec s.a.	Seraing, B
Fermentas	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Gibco	Invitrogen	Paisley, UK
Greiner	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Hoechst	Sanofi-Aventis	Frankfurt
ICN	ICN PHARMACEUTICALS GERMANY GMBH	Frankfurt
Invitrogen	Invitrogen	Paisley, UK
Macherey-Nagel	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG	Düren
Merck	Merck KGaA	Darmstadt
Millipore	Millipore GmbH	Schwalbach
Molecular Probes	Invitrogen	Paisley, UK
Nalgene	Fisher Scientific GmbH	Schwerte
National Diagnostics		Atlanta, USA
New England Biolabs	New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main
Nunc	Fisher Scientific GmbH	Schwerte
Oncogene	Oncogene Research Products	Cambridge, UK
Pierce, Perbio	Perbio Science Deutschland	Bonn
Qiagen		Hilden
RZPD	RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH	Berlin
Roche	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim
Serva	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Sigma	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Seelze
Stratagene	Stratagene Europe	Amsterdam, NL
Upstate	Millipore GmbH	Schwalbach
Vector Laboratories	Linaris Biologische Produkte GmbH	Wertheim

Tab. 2: Bezugsquellen der Substanzen.

2.2.2 Antikörper für Westernblot und Immunzytochemie

Primäre Antikörper	Verdünnung	Anwendung	Spezies	Antikörperklonalität	Bezugsquelle	Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Parvalbumin	1:500	Westernblot	Maus	monoklonal	Sigma, P3088	Ziege α Maus IgG / HRP	1:5000	Dako, P0447
Synaptophysin G95	1:20000	Westernblot	Kaninchen	polyklonal	(Jahn et al., 1985)	Ziege α Kaninchen IgG / HRP	1:20000	Dako, P0448
Tetraspanin-5	1:200	Immunzytochemie	Kaninchen	polyklonal	Baader, SL	Ziege α Kaninchen biotinylierter IgG	1:200	Vector Laboratories, BA1000
Tetraspanin-5	1:5000	Westernblot	Kaninchen	polyklonal	Baader, SL	Ziege α Kaninchen IgG / HRP	1:5000	Dako, P0448
Neuropilin-1	1:200	Immunzytochemie	Kaninchen	polyklonal	Oncogen, PC343	Ziege α Kaninchen biotinylierter IgG	1:200	Vector Laboratories, BA1000
$\beta 2$ Microglobulin	1:10000	Westernblot	Kaninchen	polyklonal	Abcam, AB6608	Ziege α Kaninchen IgG / HRP	1:10000	Dako, P0448
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	1:10000	Westernblot	Maus	monoklonal	Ambion, 4300	Ziege α Maus IgG / HRP	1:10000	Dako, P0448
Striatin	1:2000	Westernblot	Kaninchen	polyklonal	Upstate, 07-304	Ziege α Kaninchen IgG / HRP	1:5000	Dako, P0448

Tab. 3: Verwendete Antikörper und deren Verdünnungen.

2.2.3 Verwendete Substanzen, Lösungen, Puffer

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit deionisiertem Wasser bei Raumtemperatur angesetzt.

BSA

Bovine Serum Albumin (Sigma, A8806)

TBS

150 mM NaCl

50 mM Tris

Der pH der Lösung wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt.

PBS

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na_2HPO_4

2 mM KH_2PO_4

Der pH-Wert wurde mit HCL auf 7,4 eingestellt.

20 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA)

20 g Paraformaldehyd wurden bei 55 °C, unter Zugabe von einigen Tropfen 5 N NaOH, in 60 ml H₂O gelöst, nach der Zugabe von 10 ml 10x PBS wurden mit 1 N HCl der pH auf 9,0 eingestellt und mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt.

2.3 Zellkultur**DMEM Medium**

DMEM (Gibco, 31966-021)

10 % (v/v) FCS Foetale Bovine Serum (Gibco, 10270-106)

1x Penicilin-Streptomycin (Gibco, 15140-122)

2.3.1 Zelllinien

Name		ATCC Nummer
N2A, Neuro-2a	Neuroblastomzelllinien der Maus	ATCC CCL-131
Daoy	Humane desmoplastische cerebelläre Medulloblastom-Zelllinien	ATCC HTB-186
Hek-293	Humane embryonale Nierenzelllinie	ATCC CRL-1573

Tab. 4. Zelllinien.

2.3.2 Kultivierung und Konservierung der Zelllinien

Die Zelllinien wurden in 8 ml DMEM Medium in 10 cm Zellkulturschalen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei einer 90 %igen Konfluenz wurden die Zellen auf neue Kulturschalen umgesetzt. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 2 ml 1x Trypsin/EDTA (Gibco, 15400-054) verdünnt in PBS von der Kulturschale abgelöst (2 min bei 37 °C). Die in Trypsin-Lösung resuspendierten Zellen wurden mit 8 ml DMEM Medium versetzt und bei 230 g für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml DMEM Medium resuspendiert und 100-400 µl Zellsuspension in neue Zellkulturschalen ausgesät.

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen eingefroren. Die Zellen einer konfluenten Zellkulturschale wurden trypsinisiert und nach einer Zentrifugation in 1000 µl DMEM Medium resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 900 µl in ein Cryo-Röhrchen (Nunc, 377267) überführt und mit 100 µl DMSO (Sigma, D-2651) gemischt. Über Nacht wurden die Zellen bei -70 °C in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter (Nalgene) eingefroren. Danach wurde das Cryo-Röhrchen in die Gasphase eines Stickstoffbehälters überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen kurz in einem 37 °C-Wasserbad erwärmt und dann in 5 ml DMEM Medium resuspendiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 230 g wurde das Zellpellet in 1 ml DMEM Medium resuspendiert und in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät.

2.3.3 Stabile Transfektion

Für die Transfektion wurden am Vortag in einer „6 Well-Platte“ 50000 Zellen pro Well ausgesät und über Nacht im Zellkultur-Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in 2 ml DMEM Medium inkubiert. Am folgenden Tag wurden für jeden Transfektionsansatz in 100 µl DMEM (ohne Serum) 3 µl FuGENE 6 (Roche, 1815091) und 2 µg Plasmid-DNA verdünnt und für 15 min bei RT inkubiert. Der gesamte Transfektionsansatz wurde dann auf die Zellen pipettiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen in zwei 10 cm Zellkulturschalen umgesetzt. Zur Selektion wurde dem Kulturmedium 100 µg / ml Zeocin (Invitrogen, R250-01) hinzugefügt. Je nach Zustand der Zellen wurde das Selektionsmedium erneuert bzw. die Zellen auf neue Kulturschalen umgesetzt

2.3.4 Bestimmung der AP-Aktivität im Zellkulturmedium

Entwicklungspuffer

100 mM Tris / HCl

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

Mit HCl wurde der pH-Wert auf 9,5 eingestellt.

AP-Substratpuffer

1 Tablette 4-Nitrophenyl Phosphat (Roche) gelöst in 100 ml Entwicklungspuffer

Die Synthese von Semaphorin 3A durch Hek-293 Zellen und die Sekretion in das Kulturmedium wurde indirekt über die Bestimmung der Aktivität einer Alkalischen Phosphatase (AP) ermittelt. Die Hek-293 Zellen synthetisierten ein Fusionsprotein bestehend aus Semaphorin 3A und der alkalischen Phosphatase. Für den Test wurden 80 µl Zellkulturüberstand mit 20 µl AP-Substratpuffer gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit einem Mikroplatten Spektralfotometer (µQuant) bei der Wellenlänge $\lambda = 405 \text{ nm}$ bestimmt. Zur Ermittlung des Nullwerts wurde der Mediumüberstand von Hek-293 Zellen verwendet, die keine alkalische Phosphatase sezernierten.

2.3.5 Einfluss von Semaphorin 3A auf die Migration von Körnerzellen

Agarose

1,2 % (w/v) Agarose "low gelling Temp." (Sigma, A-9045) in Hank's Puffer

Hank's Puffer

137 mM NaCl

5 mM KCl

0,7 mM Na₂HPO₄*2H₂O

5 mM Glucose (C₆H₁₂O₆*H₂O)

2,5 mM CaCl₂*2H₂O

1,3 mM MgSO₄*7H₂O

4,2 mM NaHCO₃

Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt und die Lösung steril filtriert.

Hek-293 AP-Sema3A

Die stabil transformierten Hek-293-Zellen, die Semaphorin 3A als Fusionsprotein mit einer alkalischen Phosphatase in Zellkulturmedium sezernierten, wurden freundlicherweise von A.W. Püschel aus Münster zur Verfügung gestellt (Adams et al., 1997; Rohm et al., 2000b; Rohm et al., 2000a).

Hek-293 AP

Die Hek-293-AP-Zellen wurden stabil transformiert mit einem Expressionsplasmid (AP-pcDNA3.1zeo+) für die alkalische Phosphatase.

Hoechst 33342

20 µg / ml Hoechst (Sigma, B-2261) wurden in PBS gelöst.

Laminin

40 µl Laminin 1mg/ml (Sigma, L2020) wurden in 2 ml PBS.

Neurobasal Medium

100 ml Neurobasal Medium (Gibco, 12348-017)

1 ml L-Glutamine 200 mM (Gibco, 25030-024)

1 ml B-27 Supplement (Gibco, 17504-044)

Um zu überprüfen, ob Semaphorin 3A eine Wirkung auf die Migration von Körnerzellen hat, wurden cerebelläre Schnittkulturen zusammen mit einer Semaphorin 3A Quelle kultiviert. Die Cerebellum-Schnitte wurden zusammen mit Hek-293 Zellen inkubiert, die Semaphorin 3A gekoppelt an eine alkalische Phosphatase synthetisierten und in das Kulturmedium sezernierten. Die Produktion von Semaphorin 3A wurde indirekt über einen Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität im Zellkulturüberstand kontrolliert (AP-Test OD = 2,6). Als Kontrolle dienten Hek-293 Zellen die nur die alkalische Phosphatase produzierten (AP-Test OD = 3,4).

Die Hek-293 Zellen wurden in einem 0,3 %igen (w/v) Agarosetropfen eingeschlossen und auf der Zellkulturschale immobilisiert. Anschließend wurden die Zellkulturschalen mit einer Lamininlösung für 15 min bei RT inkubiert. Die Lamininlösung wurde abgesaugt, dann wurde

einmal mit PBS gewaschen und Neurobasal Medium in die Zellkulturschalen eingefüllt. Bis zur Positionierung der Kleinhirnschnitte wurden die Schalen im Zellkulturinkubator aufbewahrt.

Von neugeborenen Mäusen wurde das Cerebellum herauspräpariert und in Hank's Puffer aufbewahrt, bis alle Tiere fertig präpariert waren. Mit dem „Tissue Chopper“ wurden 350 µm dicke Schnitte des Kleinhirns angefertigt und in Hank's Puffer aufbewahrt bis zum Transfer auf die Zellkulturschalen. Die Cerebellum-Schnitte wurden in verschiedenen Abständen zu den Hek-293 Zellen auf den Zellkulturschalen positioniert. Die Schnitte wurden für 2 Tage in Neurobasal Medium kultiviert und dann mit 4 % (v/v) Paraformaldehyd fixiert.

Die fixierten Zellen wurden mit Hoechst 33342 angefärbt und im Fluoreszenz-Mikroskop fotografiert. Die Aufnahmen wurden in Schwarz-Weiß-Bilder umgewandelt, wobei die Zellen weiß markiert wurden. In konzentrisch angelegten Kreisen um die Schnitte herum wurde die weiße Fläche gemessen und damit die Flächen berechnet, die prozentual von Zellen in einer bestimmten Fläche um die Schnittkultur bedeckt wurden. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Proteinextraktion aus cerebellärem Gewebe

Homogenisations-Puffer

0,32 M Sucrose
5 mM HEPES pH 7,4
0,2 mM CaCl₂
25 µg / ml Leupeptin
25 µg / ml Aprotinin

Das Cerebellum von Mäusen wurde präpariert und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für den Nachweis von Parvalbumin ist Calcium ein notwendiger Bestandteil der Pufferlösung bei der Aufarbeitung der Proben (Vig et al., 1998). Für die Extraktion der Proteine aus dem Gewebe wurden 100 mg gefrorenes Gewebe mit 150 µl Homogenisations-Puffer versetzt und in einem Glas Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde 2 h bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Der Proteingehalt wurde mit dem „BCA Protein reagent“ (Pierce, Perbio, Rockford, USA) in einem Mikroplattenspektrofotometer (µQuant) bestimmt. 30 µg Protein wurden in Proteinproben-Puffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 15 % (w/v) SDS-Polyacrylamid Gel, mit

einem anschließenden Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-C extra, Amersham Biosciences, RPN 203E).

2.4.2 Proteinextraktion aus Zellkulturen

Proteinextraktions-Puffer

20 mM Tris-HCl, pH 8.0

10 mM NaCl

10 mM KCl

3 mM MgCl₂

25 µg / ml Leupeptin

25 µg / ml Aprotinin

Für die Extraktion von Proteinen aus Zellkulturen wurden jeweils vier Zellkulturschalen (10 cm) mit Zelllinie kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit 4 ml kaltem PBS pro Schale gewaschen und dann in 2 ml kaltem PBS mit einem Zellschaber gesammelt. Nach einer Zentrifugation bei 200 g für 10 min bei 4 °C wurde das Pellet in 200 µl kaltem Proteinextraktions-Puffer resuspendiert und im Eiswasserbad für 30 sec sonifiziert. Anschließend wurde die sonifizierte Zellsuspension bei 2000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und eingefroren. Die Proteinbestimmung wurde mithilfe des „Bio-Rad Protein Assay“ (500-0006) in einem Mikroplattenspektrofotometer durchgeführt. Für die Westernblot-Analyse wurden 15 µg Protein in Proteinproben-Puffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 12 % (w/v) SDS-Polyacrylamid Gel. Anschließend wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran (Immobilon-P PVDF, Hybond ECL Nitrozellulose) transferiert.

2.4.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay von Pierce (23225) und einem BSA-Standard nach Angaben des Herstellers. Es wurde eine Eichreihe mit verschiedenen BSA Konzentrationen (50 – 1000 µg / ml) in Homogenisations-Puffer angesetzt. Von den Proben und den Standardlösungen wurden jeweils 10 µl mit 200 µl Reaktionsmischlösung gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Für jeden Wert wurden Dreifachmessungen durchgeführt. Mit einem Mikroplattenspektrofotometer (µQuant) wurde bei der Wellenlänge $\lambda = 562$ nm die Lichtabsorption gemessen. Mithilfe einer Eichkurve wurden die Konzentrationen der Proben ermittelt.

Für Proben mit geringen Proteinkonzentrationen wurde das „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate“ (Bio-Rad, 500-0006) angewendet. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Eichreihe mit verschiedenen BSA Konzentrationen (1,56 – 25 µg / ml) in H₂O (Ampuwa) hergestellt. Von den Proben wurden verschiedene Verdünnungen (1:200, 1:500) mit H₂O (Ampuwa) angesetzt. Für jeden Wert wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Das Reaktionsreagenz wurde nach Angaben des Herstellers angesetzt. Von dem Reaktionsmix wurden 40 µl mit 160 µl Probenverdünnung gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Gemessen wurden die Proben in einem Mikroplattenspektrofotometer (µQuant) bei der Wellenlänge $\lambda = 595$ nm. Die Konzentrationen der Proben wurden mithilfe einer Eichkurve bestimmt.

2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Lösungen

10,0 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
N,N,N,N,-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
10,0 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)

Proteinproben-Puffer

62,5 mM Tris / HCl pH 6,8
25 % (w/v) Glycerin
2 % (w/v) SDS
0,001 % (w/v) Bromphenolblau
2 % (v/v) β -Mercaptoethanol (erst kurz vor Gebrauch zugeben)

Sammelgel-Puffer

0,5 M Tris / HCl, pH 6,8

Trenngel-Puffer

1,5 M Tris / HCl, pH 8,8

40 % (w/v) Acrylamid Bis-Acrylamid

AccuGel 29:1 (National Diagnostics)
Acrylamid : Bis-Acrylamid
Die Lösung wurde bei RT gelagert.

Elektrophorese-Laufpuffer (10x)

250,0 mM Tris
1,92 M Glycin
1,0 % (w/v) SDS
pH-Wert 8,3

Die Elektrophorese zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde mithilfe des Elektrophorese Systems „Minigel-Twin“ (Whatman-Biometra) durchgeführt. Das SDS-Polyacrylamidgel bestehend aus einem Sammelgel und einem Trenngel wurde nach folgendem Ansatz hergestellt.

Trenngel	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %	Sammelgel	
Trenngel-Puffer	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml	Sammelgel-Puffer	0,75 ml
H₂O	7,0 ml	6,4 ml	5,8 ml	5,2 ml	4,3 ml	H₂O	4,26 ml
Acrylamid	1,8 ml	2,4 ml	3,0 ml	3,6 ml	4,5 ml	Acrylamid	0,9 ml
10 % SDS	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl	10 % SDS	60 µl
10 % APS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	10 % APS	30 µl
TEMED	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl	TEMED	6 µl

Tab. 5: SDS-Polyacrylamidgel.

Zuerst wurde das Trenngel angesetzt und nach dem Einfüllen zwischen zwei Glasplatten mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert (45 min) war, wurde das Isopropanol entfernt, der Probenkamm eingefügt und das Sammelgel gegossen. Nach 30 min Polymerisationszeit wurde für die Elektrophorese der Probenkamm entfernt, das Gel mit 1x Elektrophorese-Laufpuffer überschichtet und die Probenaschen mit Puffer gespült. Vor dem Auftragen der Proteine in die Probenaschen wurden die Proteine im Proteinproben-Puffer bei 95 °C für 5 min denaturiert. Die Trennung der Proteine im Gel erfolgte zuerst bei 30 mA mit konstanter Spannung, nachdem die Proteine durch das Sammelgel gelaufen waren, wurde die Spannung auf 40 mA erhöht. Als Molekulargewichtsmarker wurde der „Precision Plus Protein Standard“ der Firma BioRad (161-0373) eingesetzt. Die Proteine wurden nach der Gelelektrophorese durch einen Westernblot auf eine Membran transferiert.

2.4.5 Westernblot-Analyse

Transfer-Puffer

25,0 mM Tris, pH 8,0
 192,0 mM Glycin
 20,0 % (v/v) Methanol

Membranen

Hybond-C extra Nitrocellulose (Amersham Biosciences, RPN 203E)
 Hybond ECL Nitrocellulose (Amersham Biosciences, RPN 203D)
 Immobilon-P PVDF (Millipore, IPVH00010)

Für den Transfer von Proteinen aus einem SDS-PAGE-Gel auf eine Membran wurde das kühlbare Tankblot-System von Whatman-Biometra verwendet, alternativ wurde das Semi-Dry Transfersystem „NovaBlot Multiphor II System“ von Amersham Biosciences eingesetzt.

Für das Tankblot-System wurden alle Filter und Membranen mit Transfer-Puffer getränkt und in folgender Reihenfolge aufeinandergelegt: 3 Lagen Whatman-Filterpapier, Trenngel, die nach Herstellerangaben vorbereitete Membran, wiederum 3 Lagen Whatman-Filterpapier. Die Blottingapparatur wurde mit Transfer-Puffer gefüllt und die Transfereinheit eingesetzt. Der Transfer erfolgt bei 400 mA für 2 h mit laufender Kühlung. Nach dem Transfer wurden die Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Für das Semi-Dry Verfahren wurden die Filter und die Membran in Transfer-Puffer getränkt und in folgender Reihenfolge auf die untere Platte der Apparatur (Anode) gelegt: 6 Lagen Whatman-Filterpapier in der Größe des Trenngels, die nach Herstellerangaben vorbereitete Membran, das Trenngel und wieder 6 Lagen Whatman-Filterpapier. Abschließend wurde die obere Platte der Apparatur (Kathode) auf den Stapel aufgelegt. Der Transfer im elektrischen Feld erfolgte unter Kühlung mit 0,8 mA pro Quadratcentimeter Gelfläche für 90 min.

2.4.6 Immunchemischer Nachweis von Proteinen auf Westernblot-Membranen

PBST

0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS

Milchpulver PBST

5,0 % (w/v) Milchpulver (fettfrei) in PBST

Nach dem Transfer der Proteine auf eine Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungen die Membran in 5 % (w/v) Milchpulver PBST blockiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für 5 min in PBST gewaschen. Zum Nachweis von verschiedenen Proteinen wurden die Membranen in separate Teile zerschnitten und getrennt mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert. Die primären Antikörper (Tab. 3) wurden in 5 % (w/v) Milchpulver PBST verdünnt und mit den Membranen bei 4 °C über Nacht inkubiert. Danach wurden die Membranen mehrmals (5x für 5 min) in PBST gewaschen und für mindestens 1 h mit dem sekundären Antikörper (Tab. 3) inkubiert, der ebenfalls in 5 % (w/v) Milchpulver PBST verdünnt wurde. Die Membran wurde erneut fünfmal für 5 min gewaschen. Zur Detektion der Signale wurde das Chemilumineszenz „ECL+Plus Western Blotting Detection“ System (Amersham Bioscience, RPN2132) verwendet in Kombination mit Autoradiografie-Filmen von Kodak (X-OMAT AR XAR5, X-OMAT LS).

2.5 Immunzytochemie

2.5.1 Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen in Zellkulturen

DAB

0,5 % (w/v) Diamionbenzidine Tetrahydrochlorid in TBS

Zur Analyse der Proteinexpression wurden Zellen in Zellkulturplatten kultiviert und für 30 min mit 4 % (w/v) PFA / PBS bei RT fixiert. Für den Nachweis von Tetraspanin-5 musste die Fixierlösung zusätzlich 0,5 % (v/v) Glutaraldehyde enthalten. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS für 5 min gewaschen. Zur Inaktivierung endogener Peroxidasen wurden die Zellen mit einer 1 % (v/v)igen H_2O_2 Lösung in PBS für 5 min behandelt. Die Zellen wurden mit einer 0,5 %igen (v/v) Triton X100 Lösung in PBS für 5 min permeabilisiert. Es folgten drei Waschschritte mit PBS für jeweils 5 min. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen für zwei Stunden mit einer 2 %igen (w/v) BSA / PBS Lösung inkubiert. Die primären Antikörper (Tab. 3) wurden in 2 % (w/v) BSA / PBS Lösung verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit den Zellen inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit PBS für jeweils 5 min. Ein biotinylierter Antikörper (Tab. 3, Vector Lab) wurde in einer 2 %igen (w/v) BSA / PBS Lösung verdünnt und für 2 h mit den Zellen inkubiert. Zur Detektion wurde der „Vectastain ABC Kit“ (Vector Lab., PK-4000) eingesetzt, der auf der Bildung eines Avidin-Biotin Komplexes (ABC) beruht. Lösung A wurden 1:100 in PBS verdünnt und gemischt danach wurde die entsprechende Menge Lösung B (1:100) hinzugegeben. Die gemischte AB-Lösung wurde für 30 min inkubiert. Der überschüssige biotinylierte Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für 5 min mit PBS entfernt. Danach wurden die Zellen mit der AB-Lösung für 1 h bei RT inkubiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Zur Visualisierung wurde eine Lösung bestehend aus 0,05 % (w/v) DAB und 0,03 % (v/v) H_2O_2 in PBS angesetzt und unter Sichtkontrolle mit den Zellen inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Entfernung der DAB-Lösung und mehrmaligem Waschen mit PBS beendet. Alle DAB-haltigen Lösungen wurden durch eine Behandlung mit Natriumhypochloridlösung inaktiviert.

2.5.2 Immunhistochemie an Vibratomschnitten

PBS+

PBS ergänzt mit 1 mM CaCl₂ und 0,5 mM MgCl₂

Vibratomschnitte mit einer Dicke von 60 µm wurden für 30 min bei 80 °C in 1x SSC gekocht. Es folgten drei Waschschrte mit PBS für jeweils 5 min. Mit einer 0,5 %igen (v/v) Triton X 100 Lösung in PBS wurden die Zellen für 30 min bei RT permeabilisiert. Erneut wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Die Inaktivierung endogener Peroxidasen erfolgte mit einer Lösung bestehend auf 0,1 % (v/v) H₂O₂ und 10 % (v/v) Methanol in PBS für 20 min bei RT. Die Schnitte wurden dann wieder dreimal mit PBS gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mit einer Lösung aus 0,1 % (v/v) Triton X100 und 2 % (w/v) BSA in PBS+ für 2 h bei RT. Der primäre Antikörper (Tab. 3) wurde verdünnt in einer Lösung aus 0,1 % (v/v) Triton X100 und 2 % (w/v) BSA in PBS+ verdünnt und über Nacht bei RT inkubiert. Danach wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Der sekundäre biotinylierte Antikörper (Tab. 3) wurde in einer Lösung aus 0,1 % (v/v) Triton X100 und 2 % (w/v) BSA gelöst in PBS+ und für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Detektion der Signale wie oben beschrieben mit dem „Vectastain ABC Kit“ (Vector Lab., PK-4000).

2.6 Molekularbiologische Methoden

dNTP's

10 mM dNTP's (Amersham Biosciences, 27-2035-01) in H₂O

H₂O-DEPC

0,5 ml DEPC (Sigma D-5758) wurden in 1 l H₂O bei 37 °C über Nacht inkubiert, und dann für 40 min autoklaviert.

2.6.1 Fotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung wurde fotometrisch bei einer Wellenlänge $\lambda = 260$ nm in 5 mM Tris-Puffer bestimmt. Die Messung wurde mit einem Spektralfotometer (μ Quant) in Mikroplatten (Greiner, UV-Star, 655801) durchgeführt. Der Quotient aus den Absorptionen von $A_{\lambda 260} / A_{\lambda 280}$ zeigt eine mögliche Verunreinigung mit Proteinen an. Reine Nukleinsäurelösungen haben einen Quotienten von 1,8 bis 2,0. Die Absorption von eins bei einer Wellenlänge $\lambda = 260$ nm entspricht 50 µg / ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg / ml RNA

2.6.2 Transformation chemisch kompetenter E. coli Bakterien mit Plamid-DNA

LB-Medium

1,0 % (w/v) Select Peptone 140, 0,5 % (w/v) Select Yeast Extrakt, 0,5 % (w/v) NaCl wurden gelöst und dann autoklaviert.

Vor der Verwendung wurde in Abhängigkeit vom Resistenzgen der transformierten Plasmide ein Antibiotikum hinzugefügt.

Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg / ml

Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg / ml

Tetracyclin in einer Endkonzentration von 10 µg / ml

Agar-Platten

1,5 % (w/v) Agar, 1,0 % (w/v) Select Peptone 140, 0,5 % (w/v) Select Yeast Extrakt, 0,5 % (w/v) NaCl wurden gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde der Lösung ein entsprechendes Antibiotikum hinzugegeben und der noch flüssige Agar in Petrischalen gegossen.

Chemisch kompetente E.coli Bakterien (DH5 alpha) wurden 30 min auf Eis aufgetaut. Von der Bakteriensuspension wurden 100 µl mit 1 µl Plamid-Lösung (0,1-1,0 µg) vermischt. Der Ansatz wurde für 45 sec bei 42 °C inkubiert und dann sofort mit 900 µl LB-Medium aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C unter Schütteln wurden 100 µl auf Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.6.3 Präparation von Plamid-DNA

Die Isolierung von Plamid-DNA aus E.coli Bakterien erfolgte mithilfe des „NucleoSpin Plamid QuickPure Kit“ (Machery & Nagel, 740615.250) bzw. dem „NucleoBond PC500 Kit“ (Machery & Nagel, 740574.50) nach Herstellerangaben.

2.6.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Reaktionsbedingungen und Puffer wurden nach den Angaben der Hersteller angewendet. Für einen analytischen Ansatz wurden 2 µl 10x Puffer und 10 U Restriktionsendonukleasen mit 1 µg DNA in 20 µl H₂O gemischt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Für einen präparativen Ansatz wurden 10 µg DNA in einem Reaktionsansatz von 200 µl über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.6.5 Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleinsäure-Lösungen

Zur Aufreinigung von Nukleinsäure-Lösungen wurden diese in einem Verhältnis von 1:1 mit einer Mischung aus Phenol / Chloroform (1:1) gemischt und bei 16000 g für 5 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und mit der gleichen Menge Chloroform gemischt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 16000 g wurde die obere wässrige Phase abgenommen und in einem neuen Mikroreaktionsgefäß mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und dem 2.5 fachen Volumen 100 % Ethanol versetzt. Die Präzipitation der DNA erfolgte bei -20 °C über Nacht und einer anschließenden Zentrifugation für 1 Stunde bei 21000 g und 4 °C. Das Ethanol wurde entfernt und das Pellet mit 400 µl 70 % (v/v) Ethanol-DEPC versetzt und erneut für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 50-100 µl H₂O-DEPC resuspendiert. Die Konzentration wurde mit einem Fotometer bestimmt.

2.6.6 Agarose-Gelelektrophorese

6x DNA-Ladepuffer

0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylencyanol
40 % (w/v) Sucrose in H₂O

10x TBE

0,5 M Tris pH 8,0
0,5 M Borsäure
10 mM EDTA

Die Gelelektrophorese wurde eingesetzt, um DNA-Fragmente für analytische oder präparative Zwecke im elektrischen Feld aufzutrennen. In Abhängigkeit von der Fragmentgröße wurden Agarosegel mit verschiedenen Konzentrationen (0,5 – 2 % (w/v)) in 1x TBE Puffer hergestellt. Nach dem Aufkochen wurde die flüssige Agaroselösung mit 0.5 µg/ml (w/v) Ethidiumbromid versetzt, wodurch später die Nukleinsäuren durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht wurden. Die DNA Proben wurden mit DNA-Ladepuffer gemischt und zur Auftrennung in die Ladetaschen des Gels aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer konstanten elektrischen Spannung von 5 Volt / cm (Elektrodenabstand).

2.6.7 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Für präparative Anwendungen wurden die entsprechenden DNA-Fragmente aus einem Agarosegel unter UV-Licht ausgeschnitten und mithilfe des „PCR clean-up Gel extraction Kit“ (Machery & Nagel, 740609.50) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.6.8 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten in ein Vektor-Plasmid wurde mit einer T4-DNA Ligase (NEB) nach folgendem Ansatz durchgeführt.

50 ng Vector DNA

Fragment-DNA, in einem 3:1 molaren Verhältnis von Fragment-DNA zu Vector-DNA

2 µl T4 DNA Ligase Puffer (NEB)

1 µl T4 DNA Ligase (NEB, M0202S)

Mit H₂O wurde das Reaktionsvolumen auf 20 µl aufgefüllt.

Die Ligation wurde bei 16 °C über Nacht durchgeführt. Von dem Ligationsansatz wurden 5 µl zur Transformation von E.coli Bakterien eingesetzt.

2.6.9 Fill-In Reaktion mit Klenow Fragment

Zum Auffüllen von 5'-überhängenden Enden von DNA Fragmenten wurde folgender Ansatz hergestellt.

1 µg DNA

2 µl T4 Ligase Puffer (NEB)

2 µl dNTP's 10 mM

1 µl Klenow Fragment 5 U / µl (NEB, M0212S)

in einem Reaktionsvolumen von 20 µl

Die Reaktion für 15 min bei 25 °C durchgeführt, und dann bei 75 °C für 20 min abgestoppt.

2.6.10 Kolonie-PCR

Nach der Klonierung eines neuen DNA-Konstruktes wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt, um positive Bakterien-Klone zu identifizieren. Im Anschluss an eine Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor wurden die neu erzeugten Plasmide in E.coli Bakterien transformiert. Auf Agarplatten wurden Bakterienkolonien kultiviert und einzelne Kolonien wurden in einer 96 Well-Platte mit LB-Medium gesichert und dann in einen PCR-Ansatz überführt. Für die PCR-Reaktion wurde folgender Ansatz hergestellt.

Mix1	30 μ l	Endkonzentration
H ₂ O	6,6 μ l	
10xPuffer (NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 μ l	75 mM Tris HCl, 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,01 % Tween 20
dNTPs (10 mM)	0,6 μ l	200 μ M
DMSO	1,2 μ l	4 %
MgCL ₂ 25 mM	2,4 μ l	2 mM
Primer1 (2,5 pmol / μ l)	3,6 μ l	300 nM
Primer2 (2,5 pmol / μ l)	3,6 μ l	300 nM
Mix2		
H ₂ O	8,85 μ l	
10xPuffer (NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 μ l	
Taq DNA Polymerase 5 U / μ l (Fermentas, EP0402)	0,15 μ l	0,5 U / 20 μ l

Tab.6: Kolonie-PCR.

Das PCR-Temperaturprogramm enthält einen Pausenschritt, in dem der Reaktionsmix 2 in die PCR-Gefäße hinzugefügt wurde.

PTC200		
94 °C	3 min	
80 °C	hold	Zugabe Mix2
94 °C	1 min	x 35
55 °C	1 min	
72 °C	1,3 min	
72 °C	10 min	
4 °C	hold	

Tab. 7: Temperaturprogramm Kolonie-PCR .

Nach der PCR-Reaktion wurden die Ansätze in einem Agarosegel analysiert. Aus der 96-Well-Platte wurden positive Bakterien-Klone amplifiziert und kryokonserviert. Zur Präparation der Plasmid-DNA wurde eine Kultur der Bakterien-Klone angesetzt und mithilfe von „Extraktions-Kit“ isoliert.

2.6.11 Genotypisierung von L7En-2 transgenen Mäusen

Die Genotypisierung der L7En-2 transgenen Mäusen (Anhang: 5.1.1) basiert auf dem Nachweis des Exon 4 aus dem L7/pcp-2 Gen und dem 5'-UTR des Engrailed-2 Gens. Diese Kombination ist in Wildtyp Mäusen nicht vorhanden. Den zu charakterisierenden Tieren wurde eine Schwanzbiopsie abgenommen. Die Biopsie wurde in 400 µl 1x PCR-Puffer mit Proteinase K (250 µg / ml), 2 mM MgCL₂ und 0,1 % (v/v) Triton X100 bei 55 °C über Nacht inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 16000 g wurde 1 µl der DNA-Lösung in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Ansatz hergestellt.

Mix1	20 µl	Endkonzentration	PCR Produkte	
H2O	5,7 µl			
10xPuffer (NH ₄) ₂ SO ₄	1,5 µl	75 mM Tris HCl, 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,01% Tween 20		
dNTPs (10 mM)	0,4 µl	200 µM		
DMSO	0,8 µl	4 % (v/v)		
MgCL ₂ (25 mM)	1,6 µl	2 mM		
L7EN_F (10 pmol / µl)	1,0 µl	500 nM	500 bp	
L7EN_R (10 pmol / µl)	1,0 µl	500 nM		
GAPDH F (0,5 pmol / µl)	1,0 µl	25 nM	983 bp	230 pb
GAPDH R (0,5 pmol / µl)	1,0 µl	25 nM		
DNA-Lösung	1,0 µl			
Mix2				
H2O	4,4 µl			
10xPuffer (NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 µl			
Taq DNA Polymerase 5 U / µl (Fermentas, EP0402)	0,1 µl	0.5 U / 20 µl		

Tab. 8: L7En-2 Tail-PCR.

Name	Sequenz 5' → 3'
L7EN_F	CTGGGACCCTCAGCCCTCACC
L7EN_R	TCCTTCTCCGTCTACCGCAGG
GAPDH F	TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC
GAPDH R	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC

Tab. 9: Primersequenzen für die L7En-2 Tail-PCR.

PTC200		
94 °C	3 min	
80 °C	hold	Zugabe von Mix 2
94 °C	1,0 min	x 35
63°C	1,0 min	
72 °C	1,5 min	
72 °C	10 min	

Tab. 10: L7En-2 Tail-PCR Temperaturprogramm.

2.6.12 Vektoren für Zellkulturexperimente

Alle Konstrukte wurden nach der Klonierung durch die Firma Seqlab (Sequence Laboratories, Göttingen) sequenziert.

Vector AP-pcDNA3.1zeo+

Das Gen der humanen sekretierten alkalischen Phosphatase (SEAP) wurde in den Vector pcDNA3.1zeo+ (Invitrogen, V860-20) inseriert. Das SEAP-Gen stammt aus dem Vector H-Sema3A pAP-Tag4, der freundlicherweise von A. L. Kolodkin aus Baltimore, USA zur Verfügung gestellt wurde (Kolodkin et al., 1997; Cheng et al., 1995; Flanagan and Leder, 1990). Das Gen der alkalischen Phosphatase (1,5 kB) wurde mithilfe der Restriktionsendonukleasen HindIII und BglII aus dem Vector geschnitten, und dann in die geöffneten Schnittstellen HindIII und XhoI des pcDNA3.1zeo+ Vektors ligiert. Nach der Ligation wurden die „überstehenden Enden“ der BglII und XhoI Schnittstellen in einer „Fill-In-Reaktion“ mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt. Der Vektor wurde durch eine erneute Ligation der „glatten Enden“ geschlossen.

Human secreted placental heat-stable alkaline phosphatase (SEAP) gene

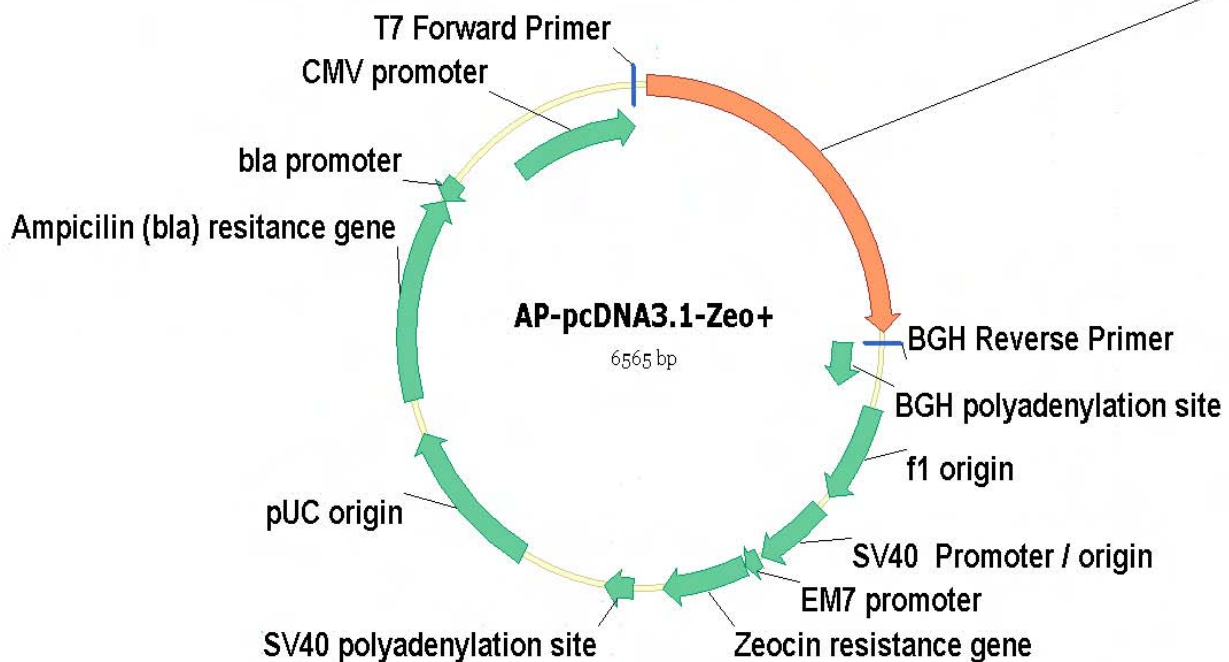


Abb. 7: Vector AP-pcDNA3.1zeo+.

Vektor siRNA pH1-EGFP-pcDNAzeo3.1+

Das Gen für das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) wurde aus dem Vector pEGFP1 (Clontech) mithilfe der Restriktionsendonukleasen BamHI und NotI ausgeschnitten und in die geöffneten BamHI und NotI Schnittstellen des Vektors pcDNA3.1zeo+ (Invitrogen) ligiert. Der H1-Promotor wurde in einer PCR-Reaktion aus dem Plasmid pH1-pcRII-Topo P(2-) amplifiziert und mit BglII Schnittstellen versehen. Das Plasmid pH1-pcRII-Topo P(2) mit dem H1-Promotor wurde freundlicherweise von R. Meier-Bornheim aus der Abteilung für Zellbiochemie der Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Nach der Auftrennung in einem Agrosegel und Aufreinigung des PCR-Produktes wurden die BglII Schnittstellen durch eine Restriktionsendonuklease geöffnet. Über eine Phenol/Chloroform Extraktion wurde der H1-Promotor gereinigt und in die BglII Schnittstellen des Vektors pEGFP pcDNA3.1zeo+ ligiert.

Die siRNA Sequenzen wurden als einzelsträngige Oligonukleotide (Invitrogen) synthetisiert und nach einer „Annealingreaktion“ in die geöffneten PstI und EcoRV Schnittstellen des Vektors pH1-EGFP-pcDNA3.1zeo+ ligiert.

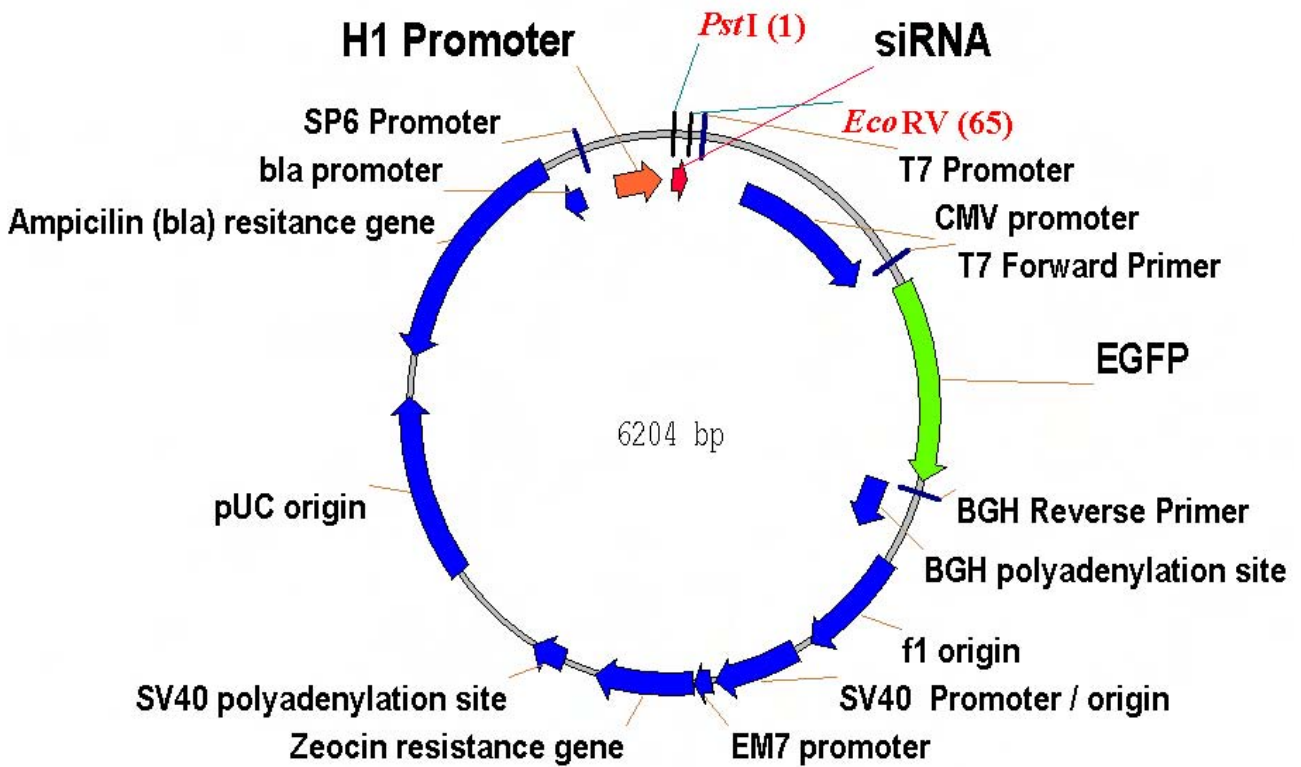


Abb. 8: siRNA pH1-EGFP-pcDNAzeo3.1+.

2.6.13 siRNA Oligonukleotid-Sequenzen

Die Sequenzen für die siRNA gegen Tetraspanin-5 (Accession Nr. AF121344 Mus Musculus) wurden über eine Software der Firma DHARMA CON (WWW.DHARMA CON.COM) ermittelt. Die Struktur der siRNA Oligonucleotide wurde basierend auf der Veröffentlichung von Brummelkamp et al. entworfen (Brummelkamp et al., 2002). Nach der Synthese der einzelsträngigen Oligonukleotide (Invitrogen) wurden die passenden Oligonukleotide in einer Annealingreaktion miteinander verbunden.

siRNA Tspan5 oligo1 F/R EC1 ORF 517

```

PST I          siRNA N1-19          siRNA N19-1          Stop          EcoRV
START         sense                 Spacer          antisense
5'  GCCCAAGGTGTCCTCTCCAACATTTCAAGAGAATGTTGGAGAGGACACCTTTTTTTGGAAAGAT
    ACGTCGGGTTCCACAGGAGAGGTTGTAAGTTCTCTTACAACCTCTCCTGTGGAAAAAACCTTTCTA
    
```

siRNA Tspan5 oligo2 F/R EC2 [D-C] 1AA

```

PST I          siRNA N1-19          siRNA N19-1          Stop          EcoRV
START         sense                 Spacer          antisense
5'  GCCCGCTGATGATTGGAACTAATTTCAAGAGATTAGGTTCCAATCATCAGCTTTTTTTGGAAAGAT
    ACGTCGGGCGACTACTAACCCTTGGATTAAAGTTCTCTAATCCAAGGTTAGTAGTCGAAAAAACCTTTCTA
    
```


siRNA Tspan5 oligo4 F/R EC2 [D-B] 3AA

```

PST I          siRNA N1-19          siRNA N19-1
START         sense          Spacer          antisense          Stop          EcoRV
5'  GCCCTGACATTGATCTACAGAACTTCAAGAGAGTTCTGTAGATCAATGTCATTTTTGGAAAGAT
    ACGTCGGGACTGTAAGTACTAGATGTCTTGAAGTTCTCTCAAGACATCTAGTTACAGTAAAAACCTTTCTA
  
```

2.6.14 Annealingreaktion der siRNA Oligonucleotide

Die einzelsträngigen Oligonukleotide wurden in Ligase-Puffer (NEB) in einer Konzentration von 500 pmol/l gelöst. Jeweils 20 µl der zueinander passenden einzelsträngigen Oligonukleotide wurden in einem 1,5-ml-Plastikreaktionsgefäß gemischt. In einem Becherglas wurden 600 ml Wasser auf 95 °C erhitzt. Die Reaktionsgefäße wurden in einen Schaumstoffschwimmer eingesetzt und in das Becherglas überführt. Das Becherglas wurde langsam (4 - 5 h) auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Nach der Annealingreaktion wurden 10 µl des Ansatzes zur Ligation mit dem Vector pH1-EGFP-pcDNAzeo3.1+ eingesetzt.

2.6.15 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Für die Isolierung von cerebellärer RNA wurden in flüssigem Stickstoff eingefrorene Kleinhirne verwendet. Pro mg Kleinhirngewebe können ca. 1 bis 5 µg Gesamt-RNA isoliert werden. In einem RNase freien Glashomogenisator wurde das Gewebe (50 – 100 mg) in 1 ml Trizol (Invitrogen, 15596-026) homogenisiert und dann in 2 ml Polypropylen Reaktionsgefäße überführt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT folgte eine Zentrifugation bei 12000 g für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde in neue 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Zu 1 ml Trizol wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und für 15 sec gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde der Ansatz bei 12000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde nach der Zentrifugation in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml Trizol gemischt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei RT und eine anschließende Zentrifugation bei 12000 g für 10 min bei 4 °C. Die Isopropanollösung wurde vorsichtig entfernt und das RNA-Pellet mit kaltem 1,5 ml 75 % (v/v) Ethanol-DEPC versetzt. Das RNA-Pellet wurde durch vortexen abgelöst und anschließend durch eine Zentrifugation bei 7500 g für 10 min bei 4 °C wieder präzipitiert. Der Ethanolüberstand wurde entfernt und das RNA-Pellet für 5 - 10 min an der Luft getrocknet. Das Pellet wurden in ca 50 µl H₂O DEPC resuspendiert und für 10 min bei 55 °C gelöst. Die Konzentration wurde mit einem Fotometer bestimmt. Die aliquotierte RNA-Lösung wurde bei -80 °C gelagert.

2.6.16 DNase-Verdau

Nach der Isolierung der Gesamt-RNA wurde zur Entfernung von Kontaminationen mit genomischer DNA die RNA einem Dnase-Verdau unterzogen. Für den Dnase-Verdau wurde das „DNA-free, DNase Treatment & Removal Kit“ (Ambion, 1906) und 10 µg RNA nach folgendem Ansatz eingesetzt.

X µl H₂O DEPC
 X µl RNA 10 µg
 10 µl 10x DNase Buffer
 1 µl DNase I (2 U)

 100 µl

Der DNase-Verdau wurde für 20 – 30 min bei 37 °C durchgeführt. Zur Inaktivierung der DNase wurden 10 µl „DNase Inactivation Reagent“ hinzugefügt und stark gemischt. Nach einer Inkubation von 2 min bei RT wurde eine Zentrifugation bei 10000 g für 1 min durchgeführt. Die RNA-Lösung im Überstand wurde aliquotiert und in neuen Reaktionsgefäßen eingefroren.

2.6.17 Reverse Transkription zur Synthese von cDNA

Zur Synthese einer cDNA wurde die SuperScript II reverse Transkriptase (Invitrogen 18064-022) eingesetzt und ca. 1 µg RNA aus dem DNase-Verdau.

X µl H₂O DEPC
 10 µl Gesamt-RNA 1 µg (DNA frei)
 1 µl Hexanukleotide (30 ng / µl)
 1 µl dNTP's 10 mM in DEPC

 12 µl

Dieser Ansatz wurde 5 min bei 65 °C erhitzt und dann sofort in Eis auf 4 °C abgekühlt. Anschließend wurde dem Ansatz 4 µl 5x Transkriptionspuffer, 2 µl 0.1 M DTT und 1 µl RNase-Inhibitor hinzugefügt und gemischt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 25 °C, gefolgt von 2 min bei 42 °C. Nach dieser Inkubation wurde dem Ansatz 1 µl SuperScript II reverse Transkriptase (Invitrogen) hinzugefügt und für 60 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch eine Inkubation bei 70 °C für 15 min gestoppt. Nach dem Abkühlen auf 4 °C wurde die cDNA aliquotiert und fotometrisch gemessen. Die Aliquots wurden bei – 20 °C gelagert.

2.6.18 Bestimmung relativer mRNA Konzentrationen durch Realtime PCR

Die Realtime-PCR ist eine Methode, die eine relative Quantifizierung von mRNA Konzentrationen in verschiedenen Proben mit Hilfe von Referenzproben ermöglicht (Wong and Medrano, 2005). Für die Realtime-PCR wurde in dieser Arbeit die SYBR-Green-Technologie eingesetzt, bei der ein fluoreszierender Farbstoff mit dem amplifizierten PCR-Produkten interagiert und bei einer entsprechenden Anregung Fluoreszenzlicht emittiert. Durch die Amplifikation steigt die Menge an PCR-Produkt an und infolgedessen das emittierte Fluoreszenzlicht. Das Fluoreszenzlicht wird von einem Detektor gemessen, und die Intensität in relativen Fluoreszenzlichteinheiten angegeben. Diese relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) werden gegen die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen und derjenige PCR-Zyklus bestimmt, bei dem die RFU-Werte einen bestimmten Schwellenwert (Threshold Cycle, CT) in der frühen exponentialen Amplifikationsphase der PCR überschreitet. Je größer die Menge der Zielsequenz im Ausgangsmaterial ist, desto schneller steigt das Fluoreszenzsignal an, wodurch bei entsprechend niedrigen Werten der CT-Schwellenwert erreicht wird. Vergleichsproben die eine geringere Menge der Zielsequenz beinhalten erzeugen in analoger Weise größere CT-Werte.

Für die Realtime-PCR wurde der BioRad iCycler eingesetzt und die Auswertung der Daten wurde mit dem Biorad iCycler Analyseprogramm (Version 3.0a) mit folgenden Parametern durchgeführt: PCR Base Line Subtracted; Threshold Cycle Calculation, Baseline Cycles 4 through 18, Threshold Position 5000.

Zur Untersuchung der Expressionsunterschiede zwischen L7En-2 und Wildtyp Tieren (P7) wurde eine „Two-step Realtime PCR“ durchgeführt. Bei dieser Art von Realtime-PCR wird die Synthese der cDNA durch die reverse Transkription und die PCR-Amplifikation in zwei Schritten durchgeführt.

Nach einer Trizol-Extraktion der Gesamt-RNA aus Kleinhirnen wurde zur Entfernung von genomischer DNA die RNA einem DNase-Verdau unterzogen. Anschließend wurde mittels reverser Transkription aus der RNA eine cDNA synthetisiert.

In die Realtime-PCR wurden jeweils 25 ng cDNA pro Reaktion (20 µl) eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von Parvalbumin und Tetraspanin-5 untersucht. Zur Normalisierung der Proben wurden als Referenzproben Beta-2 Microglobulin (B2m), Hypoxanthine Guanin Phosphoribosyl Transferase 1 (Hprt1) und Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase (Gapdh) verwendet (Vandesompele et al., 2002). Für jedes Gen wurden von den WT und den L7En-2 Proben jeweils Triplikate gemessen.

Bei der quantitativen Analyse spielt die Effizienz der PCR-Reaktion eine entscheidende Rolle, da jedes PCR-Produkt unterschiedlich gut amplifiziert wird (Pfaffl, 2001). Zur Bestimmung der PCR-

Effizienz (E) wurde für jedes Gen eine Standardkurve aufgenommen. Hierzu wurde in einer Doppelbestimmung die Genexpression in einer P7 WT cDNA gemessen (Anhang: 5.1.2). Die Konzentrationen der cDNA-Standards wurden gegen die CT-Werte aufgetragen und die Amplifikations-Effizienzen wurden über die Steigung der Standardgeraden (slope) ermittelt [PCR Efficiency = $[10^{(-1/slope)}]$]. Für die Berechnung der relativen mRNA Mengenunterschiede (R) in den Proben wurde das Rest-Programm angewendet, das für die Berechnung der Expressionsverhältnisse folgende Formel anwendet (Pfaffl et al., 2002).

$$R = \frac{E_{(\text{Testgen})}^{(CT_{\text{Wildtyp Testgen}} - CT_{\text{Mutante Testgen}})}}{E_{(\text{Referenzgen})}^{(CT_{\text{Wildtyp Referenzgen}} - CT_{\text{Mutante Referenzgen}})}}$$

Für die Genauigkeit der Analyse ist es entscheidend, dass nur das spezifische PCR-Produkt während der Reaktion amplifiziert wird. Die Bildung von unspezifischen Amplifikationsprodukten wie zum Beispiel Primer-Dimere verfälschen die Ergebnisse, da durch das SYBR-Green alle DNA Moleküle im PCR-Ansatz markiert werden. Unterschiedliche PCR Produkt in einem Ansatz können aufgrund von verschiedenen Schmelzpunkten nachgewiesen werden. Zur Überprüfung wurden die PCR-Produkte nach der Reaktion in einer Schmelzpunktanalyse auf die Bildung von Primer-Dimeren untersucht (Anhang: 5.1.3).

Für die PCR-Reaktionen wurde der „iQ SYBR Green Supermix“ (BioRad, 170-8880) und spezielle PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml Thermo Strip, ABgene, AB-0264; Ultra Clear Cap Strips, Abgene, AB-0866) verwendet.

H2O	7 µl	
iQ-SYBR Green Supermix	10 µl	
F Primer 10 pmol / ul	1 µl	500 nM
R Primer 10 pmol / ul	1 µl	500 nM
cDNA	1 µl	25 ng

Tab. 11: PCR-Ansatz für die Realtime-PCR.

°C	sec	Zyklen		
95	120	1	Denaturierung	
94	15	45	Denaturierung	
60	30		Anlagerung	
72	30		Verlängerung	Fluoreszenzmessung
72	600	1	Verlängerung	
95	60	1	Denaturierung	
95 → 30	10	1	Schmelzpunktanalyse	Fluoreszenzmessung

Tab. 12: Temperaturprogramm für die Realtime-PCR.

Name	Sequenz 5' → 3'
Parvalbumin F	AGACAAAAGTGGCTTCATTGAGGAGGA
Parvalbumin R	CGGCCAGAAGCGTCTTTGTTTCTT
Tspan5 3UTR F	CTGCGACCACTGCTGTCAGACACTG
Tspan5 3UTR R	CTCCATCAGGTGAGACTGTAGGCC
B2m Ex1-3 F	TGCTATCCAGAAAACCCCTCAAAT
B2m Ex1-3 R	CTCGATCCCAGTAGACGGTCTTG
Hprt1-50 F	AGCTACTGTAATGATCAGTCAACG
Hprt1-50 R	AGAGGTCCTTTTACACAGCA
Gapdh F	GGTCATCCCAGAGCTGAACG
Gapdh R	TGGCTGTTGAAGTCGCAGGA

Tab. 13: Primersequenzen für die Realtime-PCR. Die Primer wurden in 5 mM Tris mit einer Konzentration von 10 pmol / µl gelöst.

2.6.19 Analyse von PCR-Produkten in Silbergelen

Tris-Sulfat Puffer

35 mM Tris-Base pH9,0

0,2 % (v/v) H₂SO₄

Tris-Borat (TB) Puffer

1,04 M Tris Base pH 9,0

0,28 M Borsäure

0,001 % (w/v) Bromphenolblau

Zur Analyse von PCR-Produkten wurde ein 16 % (w/v) Polyacrylamidgel (PAA) auf einer Gelbond PAG Folie (Biozym, 54727) hergestellt.

PAA Gel	16 %
H ₂ O	6,0 ml
40 % Acrylamid	6,0 ml
Tris-Sulfat Puffer	3,0 ml
10 % APS	105 µl
TEMED	5,3 µl

Tab. 14: PAA-Gel.

Aus 2 %iger (w/v) Agarose in 1x TB-Puffer wurden 2 Pufferstreifen hergestellt, die auf das Gel an die Enden der Trennstrecken gelegt wurden und als Auflage für die Elektroden dienten. Von den PCR-Ansätzen wurden bis zu 4 µl auf das Gel aufgetragen und bei 15 mA und 15 °C in der Multiphor II Elektrophoresekammer aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in 1 % (v/v) HNO₃ für 3 min fixiert. Das Gel wurde dann dreimal für 30 sec in H₂O gewaschen. Die Färbung erfolgte in einer 0,4 %igen (w/v) AgNO₃-Lösung für 20 min. Das Gel wurde erneut fünfmal für jeweils 1 min in H₂O gewaschen. Die Entwicklung wurde in einer 0,27 M Natriumcarbonat-Lösung mit 0,03 % (v/v) Formaldehyd solange durchgeführt, bis die Banden gut sichtbar wurden. Die Reaktion wurde mit einer 10 %igen (v/v) Essigsäure-Lösung abgestoppt. Das Gel wurde kurz gewässert und dann in einer 10 %igen (v/v) Glycerinlösung 5 min inkubiert. Anschließend wurde das Gel entweder getrocknet oder in einer Folie eingeschweißt.

2.6.20 Sonden-Herstellung für die in situ Hybridisierung

Die Sequenzen für die Herstellung von in situ Sonden wurden entweder über eine PCR generiert oder lagen in Plasmidform vor. Das Plasmid zur Herstellung der Parvalbumin Sonde wurde freundlicherweise von Beat Schwaller aus Fribourg in der Schweiz zur Verfügung gestellt. Die Plasmide für die Tetraspanin-5 und Semaphorin 3A Sonden wurden über das RZPD in Berlin bezogen. Die Mtss1 Sonde wurde freundlicherweise von Sabine Molly aus der Anatomie in Bonn zur Verfügung gestellt.

	Accession Nr.	bp	antisense	RNA Polymerase	sense	RNA Polymerase	Plasmid
Parvalbumin	NM_022499	73-319	HindIII	T7	EcoRI	SP6	pGEM3/f+
Tetraspanin-5	NM_019571	2185-3174	EcoRI	T3	NotI	T7	IMAGp952P0226Q
Semaphorin 3A	NM_009152	2737-	XhoI	T3	HindIII	T7	IMAGp952L0412Q

Tab. 15: Plasmide zur Herstellung von in situ Sonden.

Primer	anti-sense	sense	Sequenz 5' → 3'	Ref. Sequenz	bp
CCK F HindIII T3 ISH		T3	CAGTCAAGCTTAATTAACCCTCACTAAAGGG ATGAAGAGCGGCGTATGTCTGTGC	NM_031161	68-468
CCK R EcoRI T7 ISH	T7		CTGAGAATTCTAATACGACTCACTATAGGG TGTGGTTGTTTCCTCATTCC	NM_031161	68-468
CRMP5 F HindIII T3 ISH		T3	CAGTCAAGCTTAATTAACCCTCACTAAAGGG AGGATGCTAAACCACCACCTG	NM_023047	2006-2207
CRMP5 R EcoRI T7 ISH	T7		CTGAGAATTCTAATACGACTCACTATAGGG AAGGAAGGAAGGAGCAGGGC	NM_023047	2006-2207
Mtss1 F T3		T3	AAGCTTAATTAACCCTCACTAAAGGG GGAGGCTGTGATCGAGAAG	NM_144800	468-1183
Mtss1 R T7	T7		GGATCCTAATACGACTCACTATAGGG CAGCTTGTGAGGGTCCATG	NM_144800	468-1183

Tab. 16: Primer für die Herstellung von in situ Sonden.

2.6.20.1 Herstellung von in situ Sonden basierend auf Plasmid-DNA

10 µg Plasmid-DNA wurden in einem Restriktionsverdau in 100 µl mit den entsprechenden Enzymen für die sense und antisense Orientierung linearisiert. Die vollständige Spaltung der Plasmid-DNA wurde in einem 1 %igen (w/v) Agarosegel überprüft.

Restriktionsansatz

x µl H₂O Endvolumen 100 µl
 10 µg Plasmid-DNA
 10 µl 10x Puffer
 30 U Restriktionsendonuklease
 37 °C über Nacht

Nach dem Restriktionsverdau wurde die Plasmid-DNA durch ein Phenol-Chloroform Extraktion gereinigt und mit LiCl/Ethanol gefällt. Der Restriktionsansatz wurde mit 500 µl Phenol/Chloroform (1:1) gemischt und bei 12000 g für 5 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Chloroform gemischt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 12000 g wurde die obere wässrige Phase abgenommen und in einem neuen Mikroreaktionsgefäß mit 250 µl 100 % Ethanol und 5 µl 8 M LiCl-DEPC gemischt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 12000 g für 1 h bei 4 °C wurde der Ethanolüberstand entfernt. Das Pellet wurde mit 400 µl 70 % (v/v) Ethanol-DEPC gemischt und erneut für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 50 µl H₂O-DEPC resuspendiert. Die Konzentration wurde mit einem Fotometer bestimmt.

2.6.20.2 PCR zur Herstellung von in situ Sondensequenzen

Zur Generierung einer Sondensequenz mithilfe der PCR wurden Primer entworfen, die eine Bindestelle für eine RNA-Polymerase (T3, T7) und die Zielsequenz für das gesuchte Gen enthielten. Für eine eventuelle Klonierung wurden Restriktionsschnittstellen in die Primersequenzen integriert.

Vorwärts Primer (F)

HindIII T3

CAG TCA AGC TTA ATT AAC CCT CAC TAA AGG G – genspezifische Sequenz

Rückwärts Primer (R)

EcoRI T7

CTG AGA ATT CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG G – genspezifische Sequenz

Die PCR wurde nach folgendem Ansatz durchgeführt. Als Template für die PCR wurde eine cDNA aus Wildtyp P7 Kleinhirnen eingesetzt.

Mix1	50 µl	Endkonzentration
H2O	X	
10 X PCR Puffer	3,75 µl	10 mM Tris HCl pH 9,0, 1,5 mM MgCl ₂ , 50 mM KCl
dNTP (10mM)	1 µl	200 µM
Vorwärts Primer (2,5 mol / µl)	6 µl	300 nM
Rückwärts Primer (2,5 pmol / µl)	6 µl	300 nM
DMSO	2 µl	4 % (v/v)
cDNA	2 µl	
Mix2		
H2O	10,75 µl	
10X PCR Puffer	1,25 µl	10 mM Tris HCl pH 9,0, 1,5 mM MgCl ₂ , 50 mM KCl
Taq-DNA Polymerase (5 U / µl) Amersham	0,5 µl	2,5 U / 50 µl

Tab. 17: PCR zur Herstellung von in situ Sondensequenzen.

94 °C	3 min	
80 °C	Zugabe von Mix 2	
X 35		
94 °C	1,0 min	
63 °C	1,0 min	
72 °C	1,3 min	
X 1		
72 °C	10 min	
4 °C	Hold	

Tab. 18: Temperaturprogramm.

Nach der PCR wurde der Ansatz in einem 1 %igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt und die Gel-Bande mit dem PCR-Fragment ausgeschnitten. Das PCR-Fragment wurde aus dem Gel Stück mithilfe einer Säulen-Extraktion laut Hersteller Protokoll (Nucleospin Extract, Machery-Nagel ,740590250) aufgereinigt. Von der Säule wurde das Fragment mit 50 µl autoklaviertem H₂O pH 8,5 eluiert. Das PCR-Fragment wurde zur Herstellung einer Digoxigenin markierten RNA Sonde in eine in vitro Transkription eingesetzt.

2.6.20.3 In vitro Transkription zur Herstellung einer Digoxigenin markierten RNA Sonde

Eine Digoxigenin-markierte RNA Sonde wurde nach folgendem Ansatz synthetisiert mit einer entsprechenden RNA-Polymerase für die sense bzw. antisense Sonde.

X µl H₂O-DEFC (Endvolumen 20 µl)
1 µg linearisiertes Plasmid (sense, antisense Richtung); bzw. PCR-Produkt
2 µl Dig-RNA-Labeling Mix (Roche)
2 µl 10x Transkriptionspuffer
1 µl RNase Inhibitor
1 µl RNA Polymerase T7, T3, SP6 (Roche)

Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37 °C wurde folgender Ansatz zugefügt und nochmals für eine weitere Stunde inkubiert.

7 µl H₂O-DEPC
1 µl Dig-RNA-Labeling Mix (Roche)
1 µl 10x Transcriptionspuffer
1 µl RNA Polymerase T7, T3, SP6 (Roche)

Es folgte eine Fällung mit 90 µl 100 % Ethanol und 1,5 µl 8 M LiCl-DEPC über Nacht bei -20 °C und eine Zentrifugation für 1 Stunde mit 21000 g bei 4 °C. Der Ethanol-Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol-H₂O-DEPC versetzt und für 1 Stunde mit 21000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet an der Luft getrocknet und in 50 – 100 µl H₂O-DEPC resuspendiert. Die Konzentration der Sonde wurde in einem Fotometer bestimmt. Alle Sonden wurden in einem Agarosegel analysiert.

RNA-Ladepuffer

10 % (w/v) 10x MOPS
50 % (v/v) Formamid
40 % (v/v) H₂O-DEPC

Orange G Lösung

20 % (w/v) Ficoll
 10 mM Tris / HCL pH7,5
 1 mg / ml Orange G

1 µl Sonde und 9 µl RNA Ladepuffer wurden gemischt und für 5 min auf 65 °C erhitzt, dann wurden 3 µl Orange G Lösung hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde auf einem 1 %igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt.

2.6.21 Präparation und Fixierung von Gewebeproben**Avertin**

Stocklösung : 10 g Tribromoethylalkohol (Fulka, 90710) gelöst in 10 ml
 Tert-Amylalkohol (Sigma, 240489), bei 4 °C gelagert
 Gebrauchslösung : 2,5 % (v/v) in 0,9 % (w/v) NaCl

Ringerlösung

136,89 mM NaCl
 2,68 mM KCl
 11,90 mM NaHCO₃
 1,98 mM CaCl₂

Fixans**3,7 %ige (v/v) Formaldehydlösung**

Aus einer 37 %igen Formaldehydlösung (säurefrei, stabilisiert mit 10 % Methanol und Calciumcarbonat, Merck 1.03999.2500) wurde eine 3,7 %ige (v/v) Lösung in PBS angesetzt und der pH Wert auf 9,0 eingestellt.

Altersstufe	Avertin 2,5 %	ml / min Perfusionslösung	Ringerlösung	Fixans
P0	0,10 ml	7,0 ml	1,75 ml	21,0 ml
P3	0,10 ml	7,0 ml	3,50 ml	21,0 ml
P5	0,15 ml	10,0 ml	7,50 ml	21,0 ml
P7	0,15 ml	10,0 ml	7,50 ml	25,0 ml
P9	0,20 ml	12,0 ml	9,00 ml	25,0 ml
P11	0,20 ml	12,0 ml	9,00 ml	25,0 ml
P15	0,30 ml	14,0 ml	10,50 ml	28,0 ml
AD	0,75 ml	17,0 ml	12,80 ml	42,5 ml

Tab. 19: Mengen der Perfusionslösungen.

Durch eine intraperitoneale Injektion einer 2,5 %igen (v/v) Avertin-Lösung wurden die Mäuse narkotisiert. Zur Bestimmung des Genotyps wurden den Tieren Schwanzbiopsien abgenommen. Nach Eröffnung des Thorax wurde eine Kanüle in den linken Herz-Ventrikel eingeführt. Durch einen Schnitt im rechten

Atrium konnte die Perfusionslösung wieder abfließen. Mit einer Perfusionspumpe wurde zunächst das Blut mit Ringerlösung ausgespült und anschließend wurden die Tiere mit Fixans perfundiert. Die Mengen der Lösungen wurden in Abhängigkeit vom Alter der Tiere gewählt (Tab. 19). Nachdem das Gehirn präpariert wurde, erfolgte eine Immersionsfixierung für 3 Tage in Fixationslösung und eine Wässerung in Leitungswasser für weitere 3 Tage.

2.6.22 Paraffineinbettung und Schnitte

In einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 % - 70 % Ethanol) wurde das fixierte Gewebe je eine Stunde entwässert und anschließend in einem Paraffin-Vakuum-Infiltrationsprozessor (Tissue-TekIII) paraffiniert (Histovax, Jung Histowax, Cambridge Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland). Das paraffinierte Gewebe wurde in einen Paraffinblock eingebettet.

Mit einem Rotationsmikrotom (HM 355S, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland) wurden 10 µm Schnitte angefertigt und auf adhäsiven Mikroskopobjektträgern (SuperFrost Plus, Menzel-Glaeser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen.

2.6.23 Entparaffinierung und Vorbehandlung der Schnitte für die in situ Hybridisierung

10x PBS-DEPC

1,71 M NaCl
33,5 mM KCl
50,2 mM Na₂HPO₄
18,4 mM KH₂PO₄

Der pH Wert wurde auf pH 7,4 eingestellt, 1l 10x PBS wurde mit 0,5 ml DEPC versetzt, bei 37 °C über Nacht inkubiert und für 40 min autoklaviert.

PBS-DEPC

1 l 1x PBS (pH 7,4) wurde mit 0,5 ml DEPC versetzt, bei 37 °C über Nacht inkubiert und für 40 min autoklaviert.

20 % (w/v) Paraformaldehyd PBS-DEPC (PFA)

20 g Paraformaldehyd wurden bei 55 °C, unter Zugabe von einigen Tropfen 5 N NaOH, in 60 ml H₂O-DEPC gelöst, nach der Zugabe von 10 ml 10x PBS-DEPC wurde mit 1 N HCl der pH auf 9,0 eingestellt und mit DEPC-H₂O auf 100 ml aufgefüllt.

1 % (v/v) H₂O₂ 20 % (v/v) Methanol PBS-DEPC

30 ml Methanol und 5 ml 30 % (v/v) H₂O₂ wurden in 150 ml PBS-DEPC gelöst.

Proteinase K (Sigma P6556)

20 mg / ml H₂O-DEPC, Aliquots wurden bei -20 °C gelagert

Triton X 100

Es wurde eine 0,25 %ige Lösung (v/v) in PBS-DEPC hergestellt.

0,2 M HCL

3 ml 37 % (v/v) HCl wurden in 147 ml H₂O-DEPC gelöst.

10 x TEA

26,6 ml Tri-Ethanolamin wurden in 200 ml H₂O-DEPC gelöst.

0,1 M TEA, 0,25 % (v/v) Essigsäureanhydrid

In 150 ml H₂O-DEPC wurden 15 ml 10x TEA und 375 µl Essigsäureanhydrid gelöst.

20x SSC-DEPC

3 M Natrium Chlorid

300 mM Natrium Citrat

Die Lösung wurde mit 14 N HCl auf pH 7,0 eingestellt, 0,5 ml DEPC wurden in 1 l 20x SSC bei 37 °C über Nacht inkubiert, und dann für 40 min autoklaviert.

Die Entparaffinierung der Schnitte wurde in Xylol (3x, je 10 min) durchgeführt, gefolgt von einer absteigenden Alkoholreihe (je 5 min in Isopropanol, 3x 100 %, 90 %, 70 %, 50 %, 25 %). Nach einem Waschschrift in PBS-DEPC für 5 min wurden die Schnitte für 90 min in 4 % PFA-PBS-DEPC fixiert. Dann wurden die Schnitte zweimal für 5 min in PBS-DEPC gewaschen und für 15 min in 1 % (v/v) H₂O₂-Methanol inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift in PBS-DEPC (2x, 5 min) wurde eine Inkubation mit Proteinase K (10 µg/ml) für 4 min durchgeführt. Es folgten zwei Waschschriffe mit PBS-DEPC für 5 min. Die Schnitte wurden dann für 4 min mit 0,25 % (v/v) Triton behandelt und dreimal für 5 min in PBS-DEPC gewaschen. Es folgte eine Inkubation in 0,2 M HCl für 8 min und 0,1 M TEA für 10 min. Die Schnitte wurden anschließend in 2x SSC bei 50 °C für 10 min äquilibriert.

2.6.24 In situ Hybridisierung**Hybridisierungslösung**

10 g Dextransulfat (Sigma D-8906) wurden in 20 ml H₂O-DEPC gelöst

10 ml Hybridisierungssalz Lösung

50 ml Formamid entionisiert

2 ml 50x Denhardt Lösung (Sigma D-2532)

2 ml 10 % (w/v) SDS-DEPC

2,5 ml ssDNA (10 mg / ml)

2,5 ml yeast t-RNA (10 mg / ml)

mit H₂O-DEPC auf 100 aufgefüllt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert

Hybridisierungslösung

300,0 mM NaCl
20,0 mM Tris·HCl, pH 7,5
5,0 mM EDTA
50,0 % (v/v) Formamide (deionisiert)
2,0 % (v/v) Denhardt Lösung (Sigma D-2532)
0,2 % (w/v) SDS
0,25 mg / ml Transfer Ribonukleinsäure aus Bäckerhefe (Sigma R-9001)
0,25 mg / ml Deoxyribonukleinsäure aus Heringsperma (Sigma –D1626)
100,0 mg / ml Dextransulfat (Sigma D-890)
80,0 mM DTT

10x Hybridisierungssalz

3 M NaCl
200 mM Tris HCl
50 mM EDTA pH 7,5
in H₂O-DEPC

SS DNA Deoxyribonukleinsäure aus Heringsperma

10 mg / ml ssDNA Sigma (D-1626) gelöst in H₂O-DEPC

yeast t-RNA Transfer Ribonukleinsäure aus Bäckerhefe

10 mg / ml yeast t-RNA Sigma (R-9001) gelöst in H₂O-DEPC

4M DTT wurde in H₂O-DEPC gelöst und Aliquots wurden bei -20 °C gelagert

Formamid (entionisiert)

100 ml Formamid (Merck 1,09684,1000) wurden mit 5 g „BioRad AG 501-X8 Resin 20-50 mesh (142-6424) anion exchange resin“ für 30 min bei Raumtemperatur gerührt und dann filtriert, Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.

MAB

100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl
Mit 10 M NaOH wurde der pH Wert auf pH 7,5 eingestellt.

Blockierlösung

2 % (w/v) Blocking Reagent (Roche, 1096176) in MAB

Anti-Digoxigenin AP Fab-Fragment (Roche 11093274910)

1 : 5000 in Blockierlösung

Entwicklungspuffer (Alkalische Phosphatase Puffer)

100 mM Tris / HCl
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂
Mit HCl wurde der pH Wert auf 9,5 eingestellt.

BCIP/NBT Farbsubstrat

(Promega, S3771)
50 mg / ml NBT
50 mg / ml BCIP

NBT/BCIP Entwicklungspuffer

in 10 ml Entwicklungspuffer wurden 66 μl NBT und 33 μl BCIP gelöst.

Die Sonden wurden nach der Herstellung in 1x SSC-DEPC verdünnt (2-10 ng / μl) und in einer Endkonzentration von 0,2 – 1 ng / μl im Hybridisierungsmix eingesetzt. Für die Hybridisierung wurde pro Schnitt folgender Ansatz hergestellt.

Hybridisierungsmix

20 μl Sondenverdünnung in 1x SSC-DEPC

4 μl DTT

176 μl Hybridisierungslösung

Dieser Ansatz wurde gemischt und für 5 min bei 80 °C im Heizblock erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Die Schnitte wurden aus dem 2x SSC herausgenommen und die Ränder wurden trocken gewischt. Um die Schnitte herum wurde ein Plastikrahmen (GeneFrame 125 μl , Abgen AB-0578) aufgeklebt. Der Hybridisierungsmix wurde aufgetragen und es folgte eine Inkubation in einer feuchten Kammer bei 70 °C über Nacht. Nach der Hybridisierung wurden die Schnitte in 2x SSC bei 60 °C gewaschen, zuerst für 5 min und dann erneut für 30 min. Es folgte eine Inkubation in 50 % (v/v) Formamid SSC für 20 min bei 60 °C, danach in 0,1 % (v/v) SSC bei 70 °C für 45 min. Die Schnitte wurden für 5 min in MAB-Puffer äquilibriert, anschließend wurde für 60 min die Blockierlösung aufgetragen. Über Nacht wurden die Schnitte mit einem Anti-DIG-AP-Antikörper 1 : 5000 in Blockierlösung bei 4 °C inkubiert (Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragment, Roche Diagnostics, 11093274910). Nach der Inkubation wurden die Schnitte 5-mal für jeweils eine Stunde in MAB-Puffer gewaschen und dann für 5 min in Entwicklungspuffer äquilibriert. Die Detektion erfolgte in NBT/BCIP Entwicklungspuffer. In Abhängigkeit von der Signalstärke wurden die Schnitte für 1-7 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde in PBS abgestoppt und die Plastikrahmen entfernt. Die Schnitte wurden kurz in Leitungswasser gewaschen und in Mowiol 4-88 (Hoechst) eingedeckelt.

2.7 Analyse differenzieller Genexpression mithilfe der Array-Technologie

Der Prozess der Genexpressionsanalyse durch die Array-Technologie kann in mehrere Schritte untergliedert werden. Die ersten Schritte umfassen die Probenaufbereitung, dann folgt die eigentliche Array-Hybridisierung. Die anschließende Datenauswertung gliedert sich in zwei Abschnitte: Messung und Aufbereitung der Expressionsdaten gefolgt von einer bioinformatischen Analyse.

2.7.1 Proben-Aufbereitung

Für die Präparation des Kleinhirns wurden Wildtyp- und L7En-2 Mäuse in den Altersstufen P0, P7 und adult ausgewählt. Der Genotyp dieser FVB/N Mäuse wurde mittels PCR bestimmt (siehe Kapitel: 2.6.11). Das Cerebellum wurde präpariert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus den eingefrorenen Kleinhirnen wurde mit Trizol die Gesamt-RNA isoliert (siehe oben) und die Konzentration wurde fotometrisch gemessen.

WT	Anzahl	Gesamt-RNA
P0	43	380,0 µg
P7	10	1217,4 µg
adult	6	710,6 µg
L7EN-2		
P0	46	370,0 µg
P7	14	1455,9 µg
adult	6	394,8 µg

Tab. 20: Menge der Gesamt-RNA.

Aus der Gesamt-RNA wurde mithilfe des „Dynabeads mRNA Direct Micro Kit“ (Invitrogen, Dynal, 610,21) die mRNA laut Herstellerprotokoll gewonnen. Die Menge und die Integrität wurden in einem Agilent Bioanalyzer überprüft (5.1.4). Die mRNA wurde dann für die Herstellung der komplexen cDNA-Probe eingesetzt.

2.7.2 Array-Hybridisierung

Für die Array Analyse wurden die Macroarray-Membranen (Mouse Unigene Set-RZPD 1, Unigene cDNA Filter Library 952) vom RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin) verwendet. Die PVDF-Membranen (22 cm x 22 cm) umfassten 24960 cDNA-Klone, wobei die einzelnen Klone in Duplikaten auf den Membranen vorkamen. Unter den 24960 Klonen

befanden sich 15830 bekannte Gensequenzen und 9130 nicht annotiert ESTs (expressed sequence tags). Da für die meisten Auswertungen diese ESTs nicht von den annotierten Genen unterschieden wurden, sind im Nachfolgenden auch die ESTs unter dem Begriff „Gene“ zusammengefasst worden.

Die Qualität der Membranen wurde durch eine vorhergehende Pre-Hybridisierung mit einer markierten Kanamycin-Probe und M13-Probe überprüft. Die Aufarbeitung und Qualitätskontrolle der mRNA und die Hybridisierung der Macroarray-Membranen wurden in Zusammenarbeit mit dem Gene Expression Profiling Service des RZPDs (Dr. Christian Maercker) am RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) in Heidelberg durchgeführt.

Folgende Mengen mRNA und Filter wurden für die Hybridisierung eingesetzt.

	WT Filter-Nr,	WT mRNA	L7En-2 Filter-Nr,	L7En-2 mRNA
Hybridisierung 1				
P0	390,2,158	374,0 ng	390,3,101	388,7 ng
P7	390,2,242	393,0 ng	390,2,245	392,0 ng
adult	390,2,246	391,0 ng	390,2,247	389,0 ng
Hybridisierung 2				
P0	390,2,161	374,0 ng	390,2,162	388,7 ng
P7	390,2,248	393,0 ng	390,2,249	392,0 ng
adult	390,2,250	391,0 ng	390,2,251	389,0 ng

Tab. 21: mRNA Mengen für die Herstellung der cDNA-Proben und Array-Filter-Nr.

2.7.2.1 Material und Lösungen

Hexanukleotid-Mix (10x)	Roche
Klenow Fragment of DNA Polymerase I (Klenow)	Roche
T4 Polynukleotide Kinase (500 Units) und buffer	New England Biolabs
tRNA babess yeast (10 mg/ml)	Roche
RNasin Ribonuklease Inhibitor (40 U/μl)	Promega
SuperScript II reverse Transkriptase Kit	Invitrogen
Competition DNA (mouse Cot-1; 1 mg/ml)	Invitrogen
S-300 Säule, Mobi Spin S-300	MobiTec GmbH,
7,5 M Ammoniumacetat pH 7,5	
d(A) 40 Nukleotide (1 μg/μl)	
dTV Primer (anchored dT18)	
Poly(A) ⁺ -RNA	
DEPC treated H ₂ O	
Ethanol (95 % (v/v))	

Hyb-Mix/Pre-hybridization Mix

7 % (w/v) SDS
0,5 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,2
10 mM EDTA pH 8,0

„Stripping -Solution“

5 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7,2
0,1 % (w/v) SDS

C-Mix

100 mM dATP
100 mM dGTP
100 mM dTTP
in 0,1 x TE

Waschpuffer 1

1x SSC
0,1 % (w/v) SDS

Waschpuffer 2

0,3x SSC
0,1 % (w/v) SDS

Waschpuffer 3

0,1x SSC
0,1 % (w/v) SDS

Waschpuffer 4

1 % (w/v) SDS
40 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7,2

Amasino

7 % (w/v) SDS
130 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7,2
250 mM NaCl

1 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,2

720 mM Na₂HPO₄
280 mM NaH₂PO₄·x1H₂O

50x Denhardt's Puffer

5 g Ficoll (Type 400),
5 g Polyvinylpyrrolidon
5 g BSA (Fraktion V)
Die Substanzen wurden in 500 ml H₂O gelöst und danach durch eine 0,45 µm Filter filtriert.
Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.

20x SSC pH 7,0

3 M NaCl
0,3 M Natrium-Citrat

2x Denhardt's Hyb-Mix

12x SSC

10x Denhardt's Puffer

0,5 % (w/v) SDS

2.7.2.2 Vorbereitung der Array-Membranen

Die „Stripping-Solution“ wurde in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt. Die Macroarray-Membranen wurden in die „Stripping-Solution“ gelegt und ca. 30 – 45 min leicht geschüttelt. Danach wurde die „Stripping-Solution“ entfernt und die Macroarray-Membranen wurden mit TE gewaschen. Zwischen 2 Filterpapieren wurden die Membranen bei Raumtemperatur getrocknet.

2.7.2.3 Pre-Hybridisierung mit einer Kanamycin- und M13-Probe

Zur Kontrolle der Qualität der Macroarray-Membranen wurden diese mit einer Kanamycin-Probe und einer M13-Probe hybridisiert. Die Macroarray-Membran wurde in 25 ml Hyb-Mix für 4 h bei 65 °C inkubiert. In dieser Zeit wurde die Kanamycin-Probe radioaktiv markiert (random primed Klenow labeling). Hierzu wurden 25 ng Kanamycin-PCR-Fragment in 9 µl H₂O auf 100 °C für 10 min erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Es wurden dann 2 µl Hexanukleotide-Mix, 3 µl C-Mix, 2 µl Klenow-Enzym (1 U / µl) und 5 µl [α -³³P]-dCTP hinzugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde die Lösung für 10 min auf 65 °C erhitzt. Anschließend wurde die Sonde mit 4 µl tRNA (10 mg/ml), 22 µl 7,5 M Ammonium-Acetat und 150 µl 96 % Ethanol versetzt und danach durch eine Zentrifugation bei 12000 g gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl H₂O resuspendiert. Von der markierten Sonde wurden für eine Macroarray-Membran ca. 5×10^5 cpm in 25 ml Hyb-Mix eingesetzt. Die Hybridisierung der Sonde erfolgt bei 65 °C über Nacht in einem Hybridisierungsöfen. Am folgenden Tag wurden die Macroarray-Membran 20 min in Waschpuffer 1 bei 65 °C gewaschen. Dann wurde zweimal für 10 min in Waschpuffer 2 bei 65 °C gewaschen und erneut mit Waschpuffer 3 für 10 min bei 65 °C. Bis zur Hybridisierung mit der M13-Probe wurden die Macroarray-Membranen in TE gelagert.

Zur Markierung einer M13-Probe wurden 100 ng M13-Vektor-Oligonucleotide (100 ng / µl), 2 µl 10x T4 Polynukleotid-Kinase Puffer, 1 µl T4 Polynukleotid-Kinase (10000 U / ml) und 3 µl Gamma 33P ATP in einem Endvolumen von 20 µl H₂O bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die M13-

Hybridisierung wurde in 25 ml Amasino pro Macroarray-Membran über Nacht bei 25 °C durchgeführt. Nach der Hybridisierung wurden die Macroarray-Membranen zweimal für 30 min bei 25 °C in Waschpuffer 4 gewaschen. Die Membranen wurden dann in Saran Folie eingepackt und für 18-24 h zur Belichtung eines „Phospho-Imager Screens“ eingesetzt. Nach der Exposition wurden die „Screens“ mit einem Phospho-Imager (Fuji FLA3000 Phospho-Imager) eingescannt.

2.7.2.4 „Stripping“

Zum Entfernen der Kanamycin- und M13-Proben wurden die Macroarray-Membranen erneut der „Stripping Prozedur“ unterworfen. Die „Stripping-Solution“ wurde in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt und die Filter wurden in der heißen Lösung inkubiert. Die Membranen wurden in dieser Lösung dann für 30-45 min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Dann wurden die Macroarray-Membranen bei Raumtemperatur zwischen zwei Filtern getrocknet. Bis zur Hybridisierung mit den Kleinhirnproben wurden die Membranen zum Abklingen der Radioaktivität 4-6 Wochen gelagert. Zur Kontrolle der Rest-Radioaktivität wurde vor der nächsten Hybridisierung ein Phospho-Imager Screen aufgelegt und im Phospho-Imager eingescannt.

2.7.2.5 Komplexe Hybridisierung

Die Macroarray-Membranen wurden zuerst mit 7,5 ml H₂O angefeuchtet und dann in einen Hybridisierungs-Zylinder überführt. Es wurde ein „Competition-Mix“ aus 7,5 µl Competition-DNA (Mouse Cot-1) und 7,5 µl d(A) 40 angesetzt. Der „Competition-Mix“ wurde bei 100 °C für 5 min denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Der „Competition-Mix“ wurde zusammen mit 7,5 ml 2x Denhardt's Hyb Mix auf 65 °C erwärmt und dann in den mit 7,5 ml H₂O gefüllten Hybridisierungszylinder überführt. Die Array-Membranen wurden in dieser Lösung für zwei Stunden bei 65 °C vorhybridisiert.

2.7.2.6 Herstellung der komplexen cDNA-Probe

Aus der Kleinhirn-mRNA wurde durch eine reverse Transkription eine radioaktiv markierte cDNA hergestellt. Für die Erst-Strang-cDNA-Synthese mit der SuperScript II reversen Transkriptase wurden ca. 400 ng poly(A)-RNA (siehe Tabelle: 21) und 0,5 µg dTV-Primer (dT18, 1-2 µl, 500 ng / µl) in 10,5 µl H₂O-DEPC gelöst, für 10 min auf 70 °C erhitzt, und dann sofort auf Eis abgekühlt. Zu dieser Lösung wurden dann 0,5 µl RNasin, 5,0 µl 5x Erst-Strang Puffer, 2,5 µl 0,1 M DTT, 0,5 µl 20 mM dGTP, dATP, dTTP und 5,0 µl [alpha-³³P] dCTP (10 µCi / µl) zugefügt und für 1 min auf 37 °C erwärmt. Dann wurde 1 µl SuperScript II reverse Transkriptase hinzugegeben, gemischt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Hydrolyse der RNA wurden 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0), 1 µl 10 % (w/v) SDS und 3 µl 3 N NaOH zugefügt und für 30 min bei 68 °C inkubiert und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Bei Raumtemperatur wurden 1 µl 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 3 µl 2 N HCl und 16 µl H₂O zugefügt und nach jeder Zugabe gemischt.

Von dieser Lösung wurden 1 µl in 2 ml Szintillations-Lösung gegeben und in einem Szintillations-Messgerät wurde die Radioaktivität (Gesamt-CPM) bestimmt. Das Säulenmaterial einer S-300 Säule wurde gemischt, die Bodenkappe entfernt und der Deckel leicht geöffnet. Die Säule wurde dann für 1 min bei 1000 g zentrifugiert. Direkt auf das Säulenmaterial wurde dann der Reaktionsansatz gegeben und durch eine Zentrifugation für 2 min bei 1000 g in ein Schraubdeckel-Röhrchen zentrifugiert. Das Volumen des Durchflusses wurde bestimmt und wie oben die Radioaktivität gemessen. Mithilfe der CPM-Daten wurde die Inkorporation der Radioaktivität in die cDNA bestimmt.

Die markierten Proben wurden für 5 min bei 100 °C denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Zur Hybridisierung wurden die markierten cDNA's zu den vorhybridisierten Macroarray-Membranen gegeben und für 24 Stunden bei 65 °C inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurden die Macroarray-Membranen in 50 ml Waschpuffer 1 bei 65 °C für 20 min gewaschen und dann für 10 min bei 65 °C in Waschpuffer 2. Die Membranen wurden aus dem Hybridisierungszylinder in eine Box mit 500 ml Waschpuffer 2 überführt und für 10 min bei 65 °C unter leichtem Schütteln (20 rpm) inkubiert. Der nächste Waschschrift erfolgt mit 500 ml Waschpuffer 3 für 10 min bei 65 °C. Danach wurden die Membranen mit der Oberseite nach unten auf Papiertücher gelegt und in Saran Folie eingepackt.

Auf die Macroarray-Membranen wurde ein Phospho-Imager Screen gelegt und für 18-24 h exponiert. Nach der Exposition wurde der Phospho-Imager Screen mit einem Phospho-Imager (Fuji FLA3000 Phospho-Imager) eingescannt.

2.7.3 Array-Datenauswertung

2.7.3.1 Bildanalyse und Messung der Expressionsdaten

Zur Analyse der Signale auf der Macroarray-Membran wurden die Phospho-Imager Bilddateien in das „AIDA-Array Metrix“ V3,5 2003 Image Analyse Programm (Raytest, Straubenhardt, Germany) geladen. Es wurde ein Gitternetzwerk konstruiert mit 3 mal 3 Feldern. Jedes dieser Felder wurde in 16 mal 16 weitere Unterfelder unterteilt. In jedem Unterfeld wurden 5 mal 5 Kreise angelegt, diese Kreise markierten jeden auf der Macroarray-Membran enthaltenen Klon (Abb. 9). Durch die Kreise wurden die genauen Positionen der Klone auf dem Filter definiert. Auf der Macroarray-Membran kommen die verschiedenen Klone in einem 5x5 Unterfeld doppelt in asymmetrischer Verteilung vor, zusätzlich beinhaltet jedes dieser Unterfelder drei Kontrollpunkte. Im Zentrum jedes 5x5 Unterfeldes befindet sich ein Kanamycin-Kontrollklon, der für die Qualitätskontrolle dient. Zusätzlich sind in jedem 5x5 Unterfeld zwei Arabidopsis MTP cDNA-Klone vorhanden, die bei der Hybridisierung mit den Kleinhirnproben keine Signale erzeugen und zur Normierung der Hintergrundintensitäten dienen. Das Gitternetzwerk wurde über die Bilddatei der Macroarray-Membran gelegt und die Übereinstimmung der Kreise mit den Positionen der Klone auf der Macroarray-Membran justiert. Die Hybridisierungsintensitäten der Proben auf der Macroarray-Membran wurden durch entsprechende Grauwerte repräsentiert, die von dem Aida-Programm für jeden Kreis eingelesen wurden. Die Expressionswerte wurden durch eine Integration der Signalintensitäten der Messpunkte ermittelt, wobei die Signalintensitäten als PSL (Photo-Stimulierte-Lumineszenzen) gemessen wurden.

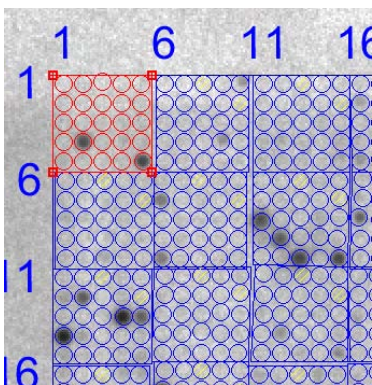


Abb. 9: Gitternetzwerk zur Auswertung der Arraydaten, in rot ist ein 5x5 Unterfeld markiert.

2.7.3.2 Datentransformation und Selektion der differenziell exprimierten Gene

Nach der Generierung der Expressionswerte wurde eine Hintergrundkorrektur durchgeführt, bei der die Expressionswerte mit den lokalen Unterschieden der Hintergrundintensitäten abgeglichen wurden. Hierzu wurden für jedes 5x5 Unterfeld die Werte der zwei Arabidopsis MTP Kontrollklone ausgewählt. Für die Berechnung der Hintergrundintensitäten wurde die Programm-Option „Weighted Background dots“ Subtraktion verwendet. Bei dieser Methode wurde der Einfluss von jedem Hintergrundpunkt auf jeden Datenpunkt, unter Berücksichtigung der Abstände zwischen den Punkten, ermittelt und korrigiert, wobei die Hintergrundintensitäten auf den Wert null normiert wurden.

Unterschiede zwischen verschiedenen Array-Membranen, die durch experimentelle Variationen wie zum Beispiel verschiedene Markierungsraten der Proben oder unterschiedliche Hybridisierungseffizienzen entstehen, wurden durch ein Normalisierungsverfahren korrigiert. Zur Normalisierung wurde die „Global Reference Dots“ Option im Aida-Programm eingesetzt. Bei diesem Verfahren wurden die Intensitäten der hintergrundkorrigierten Punkte in Relation zum Mittelwert aller Punkte gesetzt.

Die Datensätze der Kontrollen (Kanamycin und Arabidopsis) wurden aus dem Datenbestand entfernt. Durch die Hintergrundkorrektur wurden zum Teil negative Expressionsdaten erzeugt. Um bei den folgenden Berechnungen Divisionen durch null zu vermeiden, wurden alle Expressionswerte kleiner als 1 gleich 1 gesetzt. Mit den korrigierten Expressionswerten wurde der Quotient (R) aus den L7En-2 und WT-Daten gebildet.

$$R = \frac{C}{M}$$

C : Client; L7En-2 Expressionsdaten

M: Master; WT-Expressionsdaten

Zusätzlich wurden aus den Expressionswerten die absolute Differenz (ABS Diff) gebildet.

$$\text{ABS Diff} = |\text{Master-Client}|$$

Zur Selektion der differenziell exprimierten Gene wurde in der Datenbank Microsoft Access ein Visual Basic Makro (MDM, Microarray-Database-Manager) mit der Datenbank-Programmiersprache SQL erstellt (5.1.5). Mit diesem Makro konnten die Expressionsdaten in Abhängigkeit von drei Kriterien gefiltert werden. Für eine Selektion als differenziell exprimiertes Gen musste das Expressionsverhältniss von L7En-2 und WT mindestens einen Faktor von 2 für

eine Aktivierung oder 0,5 für eine Repression über- bzw. unterschreiten. Zusätzlich musste die absolute Differenz mindestens einen Unterschied von 20 zwischen den WT und L7En-2 Expressionsdaten aufweisen. Darüber hinaus mussten diese Kriterien in mindestens 3 von 4 Fällen erfüllt sein. Die mit diesen Kriterien selektionierten Datensätze wurden für die weitere Analysen verwendet.

2.7.3.3 DEF Faktor

Zur Beurteilung der gefilterten Gene wurde ein Faktor (DEF = Differential Expression Faktor) entwickelt, der außer den Expressionsdaten auch deren Standardabweichung einbezieht und die Daten aus den Doppelbestimmungen in einem Wert zusammenfasst.

$$\text{DEF} = \log_2(\bar{C} / \bar{M}) \frac{|\bar{C} - \bar{M}|}{\sqrt{(S_C)^2 + (S_M)^2}}$$

- I) $\log_2(\bar{C} / \bar{M})$ ist das Verhältnis aus den Mittelwerten der Expressionsdaten von L7En-2 Tieren (\bar{C} ; Client) und WT Tieren (\bar{M} , Master). Die Logarithmierung bewirkt eine Standardisierung der hochregulierten (>2) und herunterregulierten (<2) Expressionsverhältnisse.
- II) $|\bar{C} - \bar{M}|$ ist die absolute Differenz aus den Mittelwerten der Expressionsdaten der L7En-2 Tiere (\bar{C}) und der WT-Tiere (\bar{M}).
- III) $\sqrt{(S_C)^2 + (S_M)^2}$ berechnet die Varianzen der Expressionsdaten von L7En-2-Tieren (C) und WT-Tieren (M).

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} * \sum(x_i - \bar{x})^2}$$

x_i = Expressionsdaten von WT oder L7En-2

\bar{x} = Mittelwert der Expressionsdaten

n = Anzahl der Expressionsdaten

Positive DEF Werte zeigen eine Erhöhung der Genexpression an, negative Werte bedeuten eine Repression der Genexpression. Außer der Stärke der differenziellen Expression gibt der DEF-Wert einen Hinweis auf die Qualität der Expressionsdaten.

2.7.3.4 Cluster-Analyse

Die Cluster-Analyse ist eine Methode, mit deren Hilfe Genexpressionsmuster in Array-Daten untersucht werden können. Die Cluster-Analyse wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um den zeitlichen Verlauf der differentiellen Expression während der Kleinhirnentwicklung zu verfolgen. Für die hierarchische Clusteranalyse wurden die DEF-Werte von den differentiell exprimierten Genen verwendet. Die Analyse erfolgte mit dem Programm Genesis (V1.7) und den Parametern (Agglomeration Rule : Average linkage clustering; Calculation parameters : Cluster genes) (Sturn et al., 2003; Sturn et al., 2002). Durch die hierarchische Clusteranalyse wurden die Gene in Abhängigkeit der Expressionswerte in Gruppen mit vergleichbaren Expressionsmustern zusammengefasst. Die Expressionswerte der Gene wurden mit Farben codiert, wobei die aktivierten Gene rot und die reprimierten Gene grün markiert wurden. Die Höhe der DEF-Werte wurde durch die Intensität der Farben dargestellt. Cluster mit ähnlichen Expressionsmustern wurden nach der Analyse in 6 verschiedenen Gruppen aufgeteilt, wobei die Dendrogrammbaumstruktur und die Gennamen entfernt wurden

2.7.3.5 Funktionelle Klassifizierung der differentiell exprimierten Gene und statistische Auswertung der GO-Gruppen

Die Analyse der Expressionsmuster der differentiell exprimierten Gene ermöglicht eine Aussage über die biologischen Prozesse, die möglicherweise einen Einfluss auf die Entwicklung des Kleinhirns haben. Für diese Analyse wurden die Gene mit ihren biologischen Funktionen assoziiert und der Zusammenhang der differentiell exprimierten Gene mit den verschiedenen Prozessen statistisch überprüft. Mithilfe der Gene Ontology Datenbank (GO) und dem GFinder Programm wurden die Annotationen und die Klassifizierung der Gene sowie die statistische Auswertung durchgeführt (Masseroli et al., 2004; Masseroli et al., 2005; Ashburner et al., 2000).

In einer Referenzliste („background list“) wurden allen Genen eine eindeutige Identifikationsnummer (NCBI Locus Link ID; LLID) zugewiesen. Von 24960 cDNA-Sequenzen, die auf dem Array codiert sind, konnten 21591 (86,5 %) einer LLID (NCBI Locus Link ID / GeneID) Identifikation zugeordnet werden. Aufgrund des Nachweises eines Gens durch unterschiedliche Sonden auf dem Array, konnten letztendlich nur 12156 (56,3 %) Gene nachgewiesen werden. Diese Sequenzen wurden in einer Referenzliste gespeichert. Von 133 differentiell exprimierten cDNA-Sequenzen in der Altersstufe P0 konnten 105 (EW 1=4;

EW 1=101) einer LLID zugewiesen werden. In der Altersstufe P7 konnten von 449 cDNA-Sequenzen 380 (EW 1=107; EW -1=273) einer LLID zugeordnet werden und für das adulte Stadium besaßen von 38 cDNAs 28 (EW 1=11; EW -1=17) eine LLID

Die Expression der Gene wurde mit verschiedenen Werten gekennzeichnet (0 = nicht reguliert; 1 = hochreguliert; -1 herunterreguliert). Für die differenziell exprimierten Gene wurde für jede Altersstufe eine separate Liste mit den entsprechenden Expressionswerten erstellt. Die Referenzliste und die Listen mit den differenziell exprimierten Sequenzen wurden in die GFinder Datenbank geladen und statistisch mit folgenden Parametern ausgewertet (Statistical test : hypergeometric ; p-value less than $P=0,05$ of over-represented categories; Ontology = Biological Process, X1 = all levels of the Go tree; Y1 class = 1 and -1; Y0 class = 0). Nach der Annotierung der Gene mit ihren biologischen Prozessen wurde durch die statistische Analyse überprüft, ob unter den differenziell exprimierten Genen Gruppen vorkommen, die in den verschiedenen biologischen Prozessen signifikant überrepräsentiert sind. Im Anschluss an die Analyse wurden die einzelnen GO-Kategorien basierend auf der GO-Struktur in übergeordneten Gruppen zusammengefasst.

2.8 Software

Adobe Photoshop 6.0

Microsoft Excel 2002

Microsoft Access 2002

NIH ImageJ 1.37c

Raytest Aida 3.5

Invitrogen Vector NTI 10.0.1

Genesis 1.7.2 http://genome.tugraz.at/genesisclient/genesisclient_description.shtml

GFINDER <http://www.medinfopoli.polimi.it/GFINDER/>

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der differentiellen Genexpression im Cerebellum der L7En-2 Maus mithilfe der Array-Technologie

In dieser Arbeit sollten Gene identifiziert werden, die aufgrund einer Engrailed-2 Überexpression in cerebellären Purkinjezellen einer transgenen Maus eine spezifische Verlangsamung in der Reifung dieser Zellen zeigten (Baader et al., 1998; Baader et al., 1999). Für die Analyse wurde die Array-Technologie eingesetzt (Stears et al., 2003; Hegde et al., 2000; Schena et al., 1996), mit der es möglich ist, mehrere tausend Gene parallel zu analysieren. Auf den Macroarray-Membranen, die für diese Arbeit verwendet wurden, sind ca 25000 Gensequenzen enthalten. Für die Auswertung der dabei entstehenden riesigen Datenmengen wurde ein Analyseprogramm entwickelt, mit dem differentiell exprimierte Gene nach bestimmten Kriterien ausgewählt werden konnten. Der gesamte Prozess der Analyse umfasste demnach folgende Teilschritte:

- 1) Gewinnung und Aufarbeitung der Proben
- 2) Hybridisierung der Arrays
- 3) Datenanalyse

Die Abbildung 10 skizziert die Array-Technologie, mit der die differentielle Genexpression in der L7En-2 Überexpressionsmutante untersucht wurde. Nach der Gewinnung und Markierung des Proben-Materials aus den Kleinhirnen von Wildtyp und L7En-2 Mäusen wurden die zu vergleichenden Proben auf jeweils eine Macroarray-Membran hybridisiert. Von den Membranen wurden die Expressionsdaten gewonnen, die dann einer Datenanalyse unterzogen wurden. Die Verifikation umfasste die Überprüfung der differentiellen Genexpression mit verschiedenen Methoden, unter denen die *in situ* Hybridisierung den Schwerpunkt bildete.

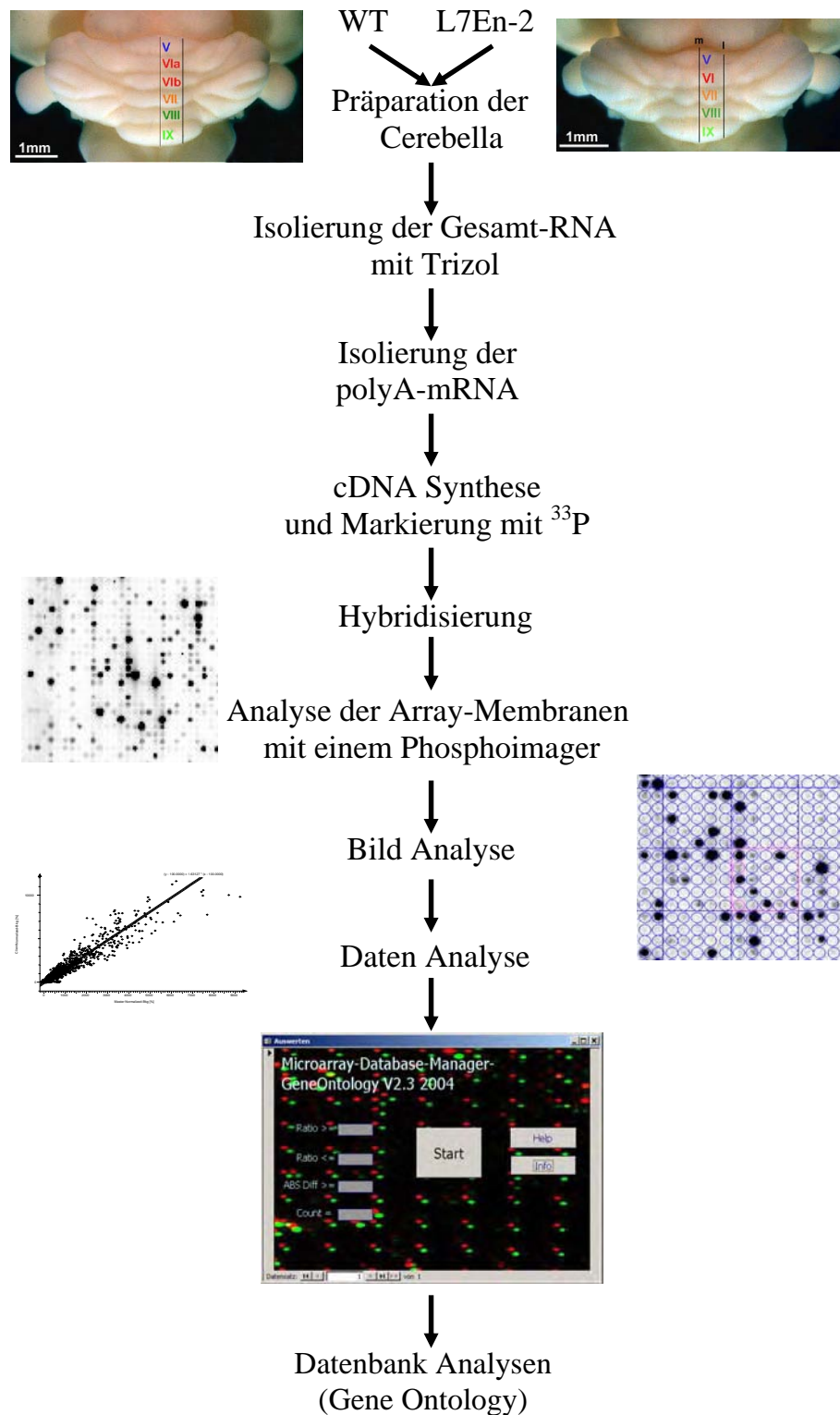


Abb. 10: Genexpressionsanalyse mithilfe der Array-Technologie.

Für die Analyse wurden Cerebella von WT und L7En-2 Mäusen präpariert. Die Gesamt-RNA wurde aus den Cerebella isoliert und für die Hybridisierung auf die Array-Membranen aufbereitet. Nach der Hybridisierung wurden die Membranen mit einem Phosphoimager gescannt. Zur Generierung der Expressionsdaten wurden die Bild-Daten quantifiziert. Nach einer Hintergrundsubtraktion und einer Normalisierung wurden die Expressionsdaten mit dem MDM-Programm gefiltert, und anschließend in einer Datenbankanalyse nach charakteristischen Genexpressionsmuster durchsucht.

Für die Untersuchung der Genexpressionsmuster der L7En-2 Maus wurden drei verschiedene Entwicklungsstufen ausgewählt, die charakteristische Prozesse der neuronalen Entwicklung des Kleinhirns umfassen. Die früheste Altersstufe, die untersucht wurde, war der Tag der Geburt (Postnataltag 0, P0). Zu diesem Zeitpunkt ist die Proliferation der Purkinjezellen bereits abgeschlossen (E11-E13) und die ersten morphologischen Veränderungen in der Entwicklung des Kleinhirns werden sichtbar. In dieser Phase haben die Purkinjezellen ihre Zielgebiete unterhalb der externen Körnerzellschicht erreicht, sind aber noch nicht in der typischen Einzelzellschicht angeordnet. Während der Migration haben die Purkinjezellen mit der Bildung von Axonen begonnen, sie besitzen aber zu diesem Zeitpunkt, wenn überhaupt, nur einen rudimentären Dendritenbaum mit sehr kurzen Fortsätzen.

Die Altersstufe P0 ist der Zeitpunkt, an dem die transgene Expression von Engrailed-2 unter der Kontrolle des L7 Promoters (ab E14-15) aktiv ist und die endogene Engrailed-2 Expression reduziert wird. Einen Effekt der Engrailed-2 Überexpression auf die Regulation von anderen Genen kann demnach erst mit dem Beginn der Altersstufe P0 erwartet werden. Entsprechend wurden noch keine ausgeprägten morphologischen Unterschiede zwischen Wildtyp und L7En-2 Kleinhirnen gefunden (Baader et al., 1998).

Eine weitere wichtige Phase ist das Stadium um den postnatalen Tag sieben (Postnataltag 7, P7). Die Purkinjezellen sind dann in der für sie typischen Einzelzellschicht unterhalb der externen Körnerzellschicht angeordnet. In dieser Phase zeigen die Purkinjezellen eine massive Zunahme in der Größe und Komplexität ihrer Dendritenbäume und entwickeln zunehmend synaptische Kontakte mit anderen Neuronen. An diesem Zeitpunkt wurden auch die deutlichsten morphologischen Unterschiede zwischen den Wildtyp- und L7En-2 Mäusen ermittelt.

Die morphologische Reifung des Kleinhirns wird beim Wildtyp Tier normalerweise bis zum postnatalen Tag siebzehn vervollständigt. Für die Endpunkt-Messung wurde deshalb das adulte Stadium (AD) ausgewählt (> zwei Monate). Hier sind alle morphologischen Differenzierungsprozesse abgeschlossen und die neuronalen Schaltkreise über synaptische Kontakte etabliert. Im Vordergrund stehen hier Prozesse zur Aufrechterhaltung der normalen Gehirnfunktion. Bei dieser Altersstufe sind die morphologischen Unterschiede zwischen den Wildtyp und dem L7En-2 Tieren nicht mehr so prominent ausgeprägt wie bei den sieben Tage alten Mäusen. In der adulten Altersstufe sollten jedoch am ehesten Genexpressionsunterschiede auffindbar sein, die einer permanenten Änderung in der L7En-2 Maus unterworfen sind.

Für die Array-Analyse wurden die Kleinhirne von Wildtyp und L7En-2 Mäusen präpariert. Der Genotyp der Mäuse wurde mithilfe einer PCR-Analyse bestimmt (Anhang: 5.1.1; Abb. 46). Das Gewebe wurde nach der Präparation direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für jede Altersstufe und jeden Genotyp wurden mehrere Kleinhirne bei der Aufarbeitung zusammengefasst, um eine

ausreichende Menge an RNA zu erhalten und interindividuelle Expressionsvariabilitäten zu minimieren. Aus den Gewebeproben wurde mit Trizol die Gesamt-RNA und nach einer Qualitätskontrolle der RNA mit einem Agilent Bioanalyzer (Anhang: 5.1.4; Abb. 50) mithilfe von Dynabeads die mRNA isoliert. Es folgte eine cDNA-Synthese, in der die Proben mit ^{33}P radioaktiv markiert wurden und anschließend die Hybridisierung auf Array-Membranen.

Nach der Hybridisierung der Proben wurden die Array-Membranen in einem Phosphoimager gescannt. Die anschließende Bild-Analyse hat die Aufgabe, die Expressionsdaten zu erfassen. Die gemessenen Expressionsdaten wurden gegen die Hintergrundintensitäten abgeglichen, wobei lokale Unterschiede der Hintergrundintensitäten auf den Array-Membranen berücksichtigt wurden. Die Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Array-Membranen, die aufgrund von unterschiedlichen Hybridisierungseffizienzen entstehen, wurden durch ein Normalisierungsverfahren ausgeglichen. Um bei nachfolgenden Berechnungen Divisionen durch 0 zu vermeiden, wurden die normalisierten Expressionswerte, die kleiner als 1.0 waren, auf den Wert 1.0 gesetzt.

Nach der Aufbereitung der Daten geben Scatterplots einen ersten Eindruck über die Qualität der Hybridisierungen (Eilers and Goeman, 2004). Von den normalisierten und transformierten Daten wurde der \log_2 der Expressionsintensitäten von WT und L7En-2 berechnet und gegeneinander aufgetragen (Abb. 11).

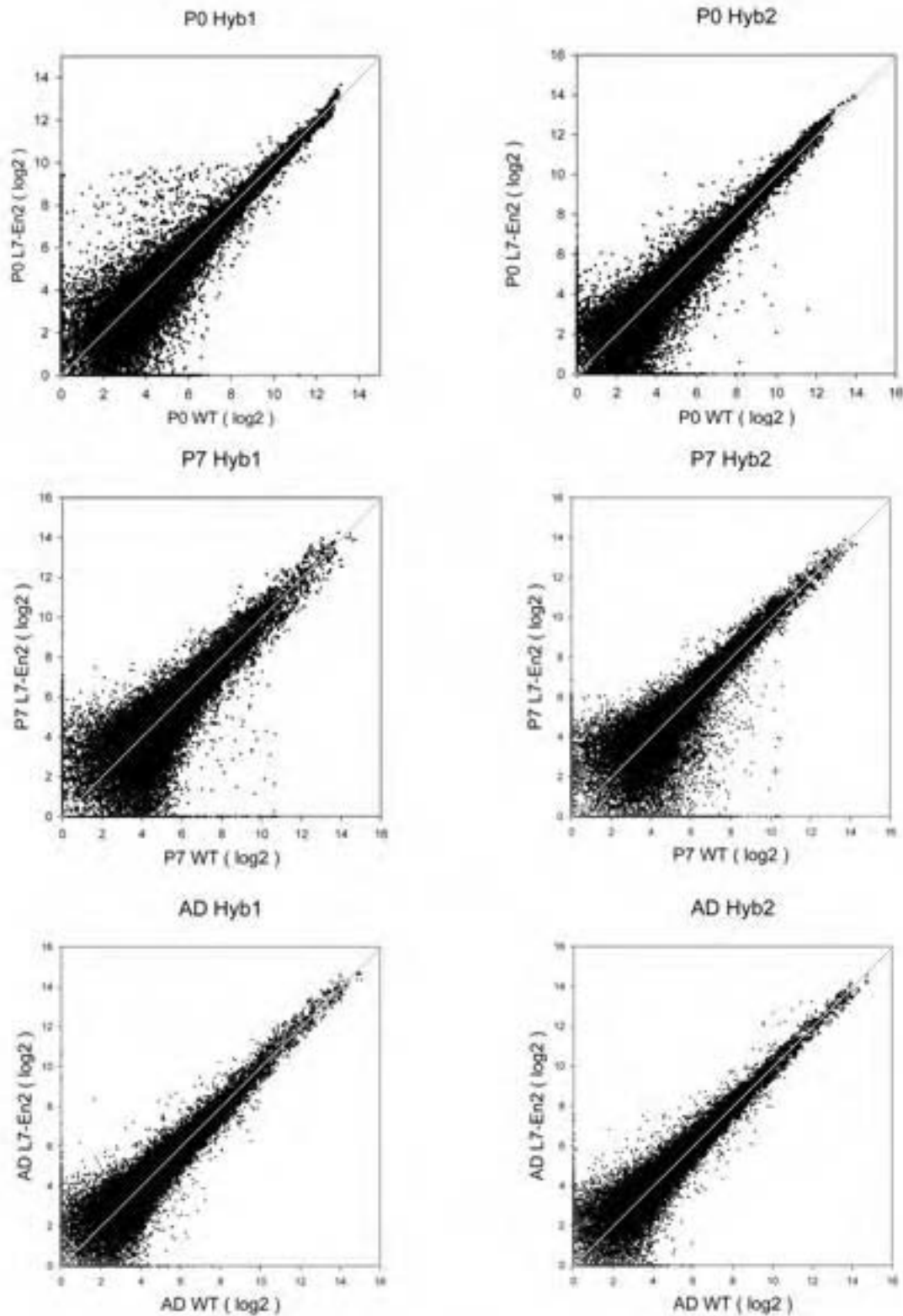


Abb. 11: Scatterplots der Expressionsdaten.

Die normalisierten und transformierten Expressionsdaten von je zwei Hybridisierungen für die Altersstufen P0, P7 und adult (AD) wurden log₂ transformiert und die WT und die L7En-2 Daten gegeneinander aufgetragen. Die Datenpunkte sind entlang der Mittellinie des Diagramms angeordnet, Punkte, die unter der Mittellinie liegen, zeigen eine mögliche Repression im L7En-2 Tier an. Entsprechend zeigen die Daten über der Mittellinie eine mögliche Aktivierung an.

Die Datenpunkte, die unter der Mittellinie liegen, deuten auf eine Repression der Genexpression im L7En-2 Tier hin, dementsprechend repräsentieren Datenpunkte über der Mittellinie den aktivierten Genpool. Die Gegenüberstellung von WT und L7En-2 erzeugte eine symmetrische Verteilung der Datenpunkte entlang der Mittellinie. Diese Verteilung der Daten zeigt an, dass für den Großteil der Gene in den Proben kein Unterschied in der Expression festgestellt werden konnte. Die größte Datendichte befindet sich bei den niedrigen Expressionswerten, da viele Gene nur sehr schwach exprimiert wurden und viele Daten im Bereich des Hintergrundniveaus liegen. Bei dem Vergleich der verschiedenen Hybridisierungen untereinander wird deutlich, dass die Daten in der Grundstruktur eine sehr ähnliche Verteilung haben, sich aber in Detailbereichen unterscheiden. Das Diagramm für die Hybridisierung 1 der Altersstufe P0 unterscheidet sich von der zweiten Hybridisierung im Bereich oberhalb der Mittellinie, dies deutet auf Unterschiede bei der Hybridisierung hin. Die Hybridisierungen der Altersstufen P7 und adult zeigen eine gleichmäßigere Datenverteilungen zwischen den beiden Hybridisierungen. Bei den Hybridisierungen der Altersstufen P7 liegen mehr Datenpunkte unterhalb der Mittellinie, dies deutet auf eine Verschiebung der Expressionswerte in den reprimierten Bereich an.

3.1.1 Selektion der differenziell exprimierten Gene

Ein weiterer wichtiger Punkt, der durch die Diagramme verdeutlicht wird ist, dass die Expressionswerte mit niedrigen Intensitäten eine größere Streuung aufweisen als die Expressionswerte mit hohen Intensitäten. Aufgrund der großen Datenmengen und den Varianzen, die von Experiment zu Experiment auftreten können, müssen die Gene herausgefiltert werden, die mit einer möglichst hohen Wahrscheinlichkeit differenziell exprimiert sind. Da für eine statistische Auswertung mehr als zwei Hybridisierungen notwendig sind, wurde hier ein Analyseansatz entwickelt, der es erlaubt, auf einem nicht statistischen Weg aus den Expressionsdaten differenziell exprimierte Gene herauszufiltern (Beissbarth et al., 2000; Quackenbush, 2002). Für die Filterung der Datensätze wurden drei Parameter verwendet:

- 1) Ratio
- 2) absolute Differenz (Abs. Diff.)
- 3) Anzahl der Daten für ein Gen mit vergleichbarem Ergebnis (Count)

Die Expressionsverhältnisse (Ratios) errechnen sich aus dem Verhältnis zwischen mittlerer Expression der WT Datenpunkte und der mittleren Expression der L7En-2 Datenpunkte. Für die Selektion der differenziell exprimierten Gene wurde als Grenze eine zweifache Aktivierung oder

Repression angewendet. Die absolute Differenz wurde als Selektionskriterium eingeführt, um hohe bzw. sehr niedrige Expressionsverhältnisse eliminieren zu können, die auf einem niedrigen absoluten Expressionslevel beruhen. Für eine positive Selektion wurde die absolute Genexpressionsdifferenz empirisch auf größer als 20 gesetzt. Der dritte Parameter „Count“ wurde eingeführt, um stark variable Analyseergebnisse verwerfen zu können. Bei zwei Hybridisierungsdurchgängen mit je zwei Messwerten für jedes Transkript wurden nur die Gene selektioniert, bei denen die Ratios und die absolute Differenz in 3 von 4 Fällen mit den festgelegten Grenzwerten eine Übereinstimmung zeigten.

Für die Analyse wurde ein Programm (Microarray-Database-Manager, MDM) entwickelt, mit dem die differenziell exprimierten Gene aus den Array-Daten mit den oben definierten Parametern herausgefiltert werden konnten (Abb. 12). Das MDM-Programm basierte auf einer Microsoft Access Datenbank zur Speicherung der Expressionsdaten. Die Auswertung erfolgte mithilfe eines Analyse-Algorithmus, der mit der Datenbank Programmiersprache SQL (Standard Query Language) und Visual Basic Makros erstellt wurde (5.1.5).

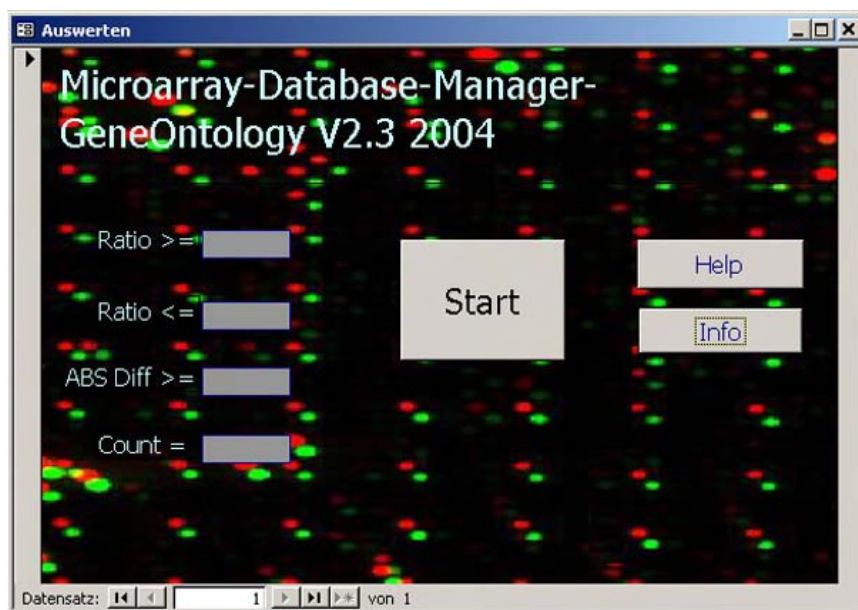


Abb. 12: Menü des MDM Analyse Programms.

Das MDM-Programm ermöglicht die Datenfilterung der Expressionsdaten mit den Parametern Ratio = Verhältnis, ABS Diff = absolute Differenz der Expressionswerte, Count = Anzahl der Fälle mit den gleichen Expressionstendenzen.

Die Tabelle 22 fasst die Anzahl der differenziell exprimierten Gene zusammen, die durch die Analyse mit dem MDM-Programm ermittelt wurden. Von den 24960 Genen auf der Array-Membran wurden in den verschiedenen Altersstufen im Mittelwert ca. 35 % exprimiert. In der Altersstufe P0 wurden von den 9925 exprimierten Genen 1,3 % (127) herunterreguliert und 0,1 % (6) heraufreguliert. Die Anzahl der exprimierten Gene lag in der Altersstufe P7 bei 9467, von diesen wurden 3,4 % (325) herunterreguliert und 1,3 % (124) heraufreguliert. Bei den adulten

Tieren waren 7232 Gene exprimiert. Die Anzahl der herunterregulierten Gene sank auf 0,2 % (18) und die heraufregulierten auf 0,3 % (20).

	reprimiert				aktiviert				exprimiert	
Altersstufe	Summe	%	annotiert	nicht annotiert	Summe	%	annotiert	nicht annotiert	24960	%
P0	127	1,3	60	67	6	0,1	4	2	9925	39,8
P7	325	3,4	177	148	124	1,3	71	53	9467	37,9
AD	18	0,2	14	4	20	0,3	9	11	7232	29,0

Tab. 22: Differenziell exprimierte Gene.

Die Tabelle zeigt die Anzahl der differenziell exprimierten Gene in den verschiedenen Altersstufen.

3.1.2 Verifikation der Array-Daten

Die Expressionsdaten der Array-Analyse wurden mit anderen Standardmethoden der Molekularbiologie überprüft, um eine Aussage über die Zuverlässigkeit der ermittelten Daten zu erhalten. Von 20 Genen wurden mit in situ Hybridisierung und oder Westernblot-Analyse die Expression im Cerebellum von Wildtyp und L7En-2 Mäusen untersucht (Tab. 23). In den verschiedenen Altersstufen (P0, P7, adult) wurden bis zu drei Zeitpunkte analysiert mit insgesamt 39 Einzeluntersuchungen. Von diesen Analysen zeigten 25 eine Übereinstimmung zwischen den Array-Daten und den Kontrollexperimenten. Es stellte sich heraus, dass sieben der Array-Daten falsch negativ und sieben falsch positiv waren. Die falsch negativen Ergebnisse bedeuten, dass die Array-Daten keine Veränderungen anzeigten, aber mit den Standardmethoden ein echter Expressionsunterschied festgestellt werden konnte. Die falsch positiven Ergebnisse beruhen auf Daten, die in den Array-Analysen eine Expressionsänderung aufwiesen, die jedoch mit den Standardmethoden nicht bestätigt werden konnten. Aus diesen Untersuchungen ergibt sich eine Zuverlässigkeit der Array-Daten von 64 %, die berechnet wurde aus dem Verhältnis zwischen den Daten die eine Übereinstimmung zeigten und der Gesamtzahl der Untersuchungen. Die Sensitivität, mit der die Rate der richtig positiven Ergebnisse bestimmt wurde, lag bei 46 %. Die Spezifität, mit der negative Ergebnisse korrekt erkannt wurden, erreichte einen Wert von 73 %.

<i>Gen Name</i>	P0	P7	adult
EphA4	- / 0,8/-0,2		
S100beta			+ / 0,9/-0,0
Synaptophysin	+ / 0,9/-0,1	+ / 0,9/0,4	+ / 0,7/-0,5
Semaphorin 3A	+ / 1,1/0,0	- / 1,0/0,0	- / 0,8/-0,1
Zebrin II		+ / 0,8/-0,2	- / 0,8/-0,6
L7/pcp-2		- / 0,7/-0,7	+ / 1,3/0,2
Notch-1		+ / 0,5/-1,0	
Parvalbumin		- / 0,5/-2,1	+ / 0,8/-1,0
CRMP5	+ / 0,4/-2,3	+ / 0,7/-0,3	+ / 0,8/-0,1
MTSS1	+ / 0,5/-1,2	- / 0,1/-3,6	+ / 0,8/-0,1
Tetraspanin-5	+ / 0,5/-0,8	- / 0,2/-2,8	+ / 0,9/-0,1
CCK	- / 0,5/-2,5	- / 0,6/-0,2	- / 0,0/-26,6
Striatin		+ / 2,7/7,0	+ / 1,5/1,5
Rac1		+ / 2,2/2,7	
Ap2a1	+ / 0,5/-1,0	+ / 1,0/0,0	
ApoA4		+ / 1,2/0,0	
CDS2		+ / 0,6/-1,0	+ / 0,6/-1,6
Crmp1	+ / 1,0/0,0	+ / 1,0/0,0	
RhoB		+ / 2,7/2,4	
Vav2		+ / 0,9/-0,1	

richtig positiv (rp)	6	
richtig negativ (rn)	19	
falsch positiv (fp)	7	
falsch negativ (fn)	7	
gesamt (g)	39	
konsistent (c)	25	rp + rn
Sensitivität %	46,2	rp / (rp+fn) * 100
Spezifität %	73,1	rn / (rn+fp) * 100
Positive Selektions- wahrscheinlichkeit %	64,1	c / g

Tab. 23: Verifikation der Arraydaten.

Die Array-Ergebnisse von verschiedenen Genen wurden mit in situ Hybridisierung und oder Westernblot-Analyse überprüft. Die Zeichen stellen die Resultate dieser Überprüfung dar (+ nicht reguliert, + hochreguliert, - runterreguliert bei den L7En-2 Mäusen). Die erste Zahl gibt das Verhältnis der Mittelwerte zwischen den L7En-2 und den Wildtyp Expressionsdaten an, wobei regulierte Gene Werte von $\leq 0,5$ und $\geq 2,0$ besitzen. Die zweite Zahl gibt den DEF (siehe unten) für das jeweilige Gen an, mit den Grenzwerten $\leq 2,0$ und $\geq 2,0$.

3.1.3 Der Differenzielle Expressions Faktor

Bei der Analyse der Expressionsdaten fällt eine hohe Variabilität der Einzeldaten in den unterschiedlichen experimentellen Ansätzen auf. Um diese Variabilität bei der Selektion zu berücksichtigen, wurde ein Faktor entwickelt, der die Expressionsdaten aus den verschiedenen Hybridisierungen mit der jeweiligen Standardabweichung in Beziehung setzt. Dieser Faktor wird im Folgenden als DEF („Differential Expression Faktor“) bezeichnet und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{DEF} = \log_2(\bar{C} / \bar{M}) \frac{|\bar{C} - \bar{M}|}{\sqrt{(S_C)^2 + (S_M)^2}}$$

- I) $\log_2(\bar{C} / \bar{M})$ ist das Verhältnis aus den Mittelwerten der Expressionsdaten von L7En-2 Tieren (\bar{C} ; Client) und WT Tieren (\bar{M} ; Master). Die Logarithmierung bewirkt eine Standardisierung der hochregulierten (>2) und herunterregulierten (<2) Expressionsverhältnisse.
- II) $|\bar{C} - \bar{M}|$ ist die absolute Differenz aus den Mittelwerten der Expressionsdaten der L7En-2 Tiere (\bar{C}) und der WT Tiere (\bar{M}).
- III) $\sqrt{(S_C)^2 + (S_M)^2}$ berechnet die Varianzen der Expressionsdaten von WT Tieren (M) und L7En-2 Tieren (C).

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} * \sum (x_i - \bar{x})^2}$$

x_i = Expressionsdaten von WT oder L7En-2

\bar{x} = Mittelwert der Expressionsdaten

n = Anzahl der Expressionsdaten

Der DEF-Wert besitzt folgende Eigenschaften: positive DEF-Werte bedeuten eine Hochregulation der Genexpression in den L7En-2 Tieren, entsprechend bedeuten negative DEF-Werte eine Repression. Die Richtung wird durch das log2 Verhältnis der Expressionsdaten bestimmt. Die Höhe des DEF-Werts wird durch die absolute Differenz der Expressionswerte, durch die Expressionsverhältnisse und durch die Varianz der Daten beeinflusst. Eine starke differenzielle Expression der Gene zwischen WT und L7En-2 Tieren führt zu großen Werten bei der absoluten Differenz und den Expressionsverhältnissen, wodurch der DEF-Wert erhöht wird. Geringe Varianzen der Expressionswerte haben ebenfalls einen positiven Einfluss auf den DEF-Wert. Im Gegensatz dazu wird der DEF-Wert klein, wenn die Gene nur eine geringe differenzielle Expression aufweisen und / oder die Expressionswerte starken Varianzen unterworfen sind.

Der DEF-Wert stellt eine Kenngröße dar, mit der gleichzeitig die Expressions-Richtung, das Niveau der Expressionswerte und die Varianz der Daten aus mehreren Experimenten in einem Wert zusammengefasst werden können. Dieser Faktor sollte sich folglich für eine schnelle Beurteilung

der Expressionsdaten eignen und Array-Auswertungen erleichtern. Da dieser Faktor aber in der Literatur noch nicht eingeführt ist, wurden Anotationen und statistische Tests mit Daten aus dem Standardauswerteverfahren durchgeführt und die DEF-Wert basierte Auswertung damit verglichen. Als Beispiel für die Verteilung der DEF-Werte ist in der Abb. 13 die Häufigkeitsverteilung der DEF-Werte für die Altersstufe P7 dargestellt. Die größte Anzahl von Genen befindet sich im Bereich zwischen minus zwei und zwei. Je weiter die Gene vom Nullpunkt entfernt liegen, desto wahrscheinlicher liegt eine differenzielle Regulation vor. Die Verteilung der DEF-Werte weist eine leichte Verschiebung in den negativen Bereich auf. In dem Diagramm sind die Positionen von einigen Genen markiert, die in dieser Arbeit untersucht und als regulierte Gene identifiziert wurden. Wie aus Abb. 13 zu sehen ist, waren sowohl Gene als reguliert identifiziert worden, die einen niedrigen, wie auch solche, die einen hohen DEF-Wert besaßen. Es war allerdings ein deutlicher Unterschied in der Visualisierbarkeit des Unterschiedes zwischen Semaphorin 3A (DEF 0,0) und Mtss1 (DEF -3,6) zu beobachten (siehe Kapitel 3.5; 3.6). Trotz der auch mit diesem Verfahren auftretenden falsch negativen und falsch positiven Gene sind hiermit zum Standardverfahren äquivalente Ergebnisse zu erzielen, und erlauben eine leichte und semiquantitative Einschätzung der Expressionsdaten.

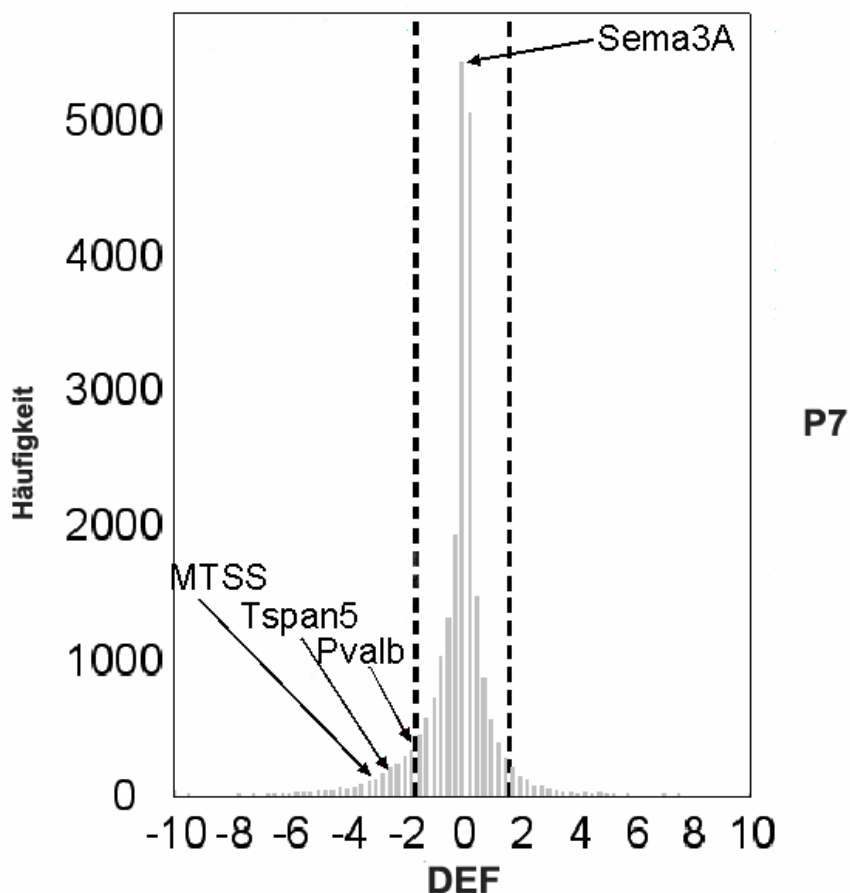


Abb. 13: Verteilung der DEF-Daten in der Altersstufe P7.

3.1.4 Clusteranalyse

Die Analyse der Array-Daten hat gezeigt, dass die Überexpression von Engrailed-2 während der Entwicklung des Kleinhirns eine unterschiedlich große Anzahl von Genen in den verschiedenen Altersstufen beeinflusst. Unter der Annahme, dass für den Ablauf eines bestimmten biologischen Prozesses ein bestimmtes Set an Genen zu einem bestimmten Entwicklungsabschnitt exprimiert und reguliert ist, sollte eine Gruppierung der differenziell exprimierten Gene in L7En-2 und Wildtyptieren eine Orientierung geben, ob diese differenziell exprimierten Gene charakteristische Expressionsmuster aufweisen. Mithilfe der Clusteranalyse wurden die differenziell exprimierten Gene in Gruppen mit ähnlichen Expressionsmustern zusammengefasst (Quackenbush, 2001; Eisen et al., 1998). Die Auswertung der differenziell exprimierten Gene erfolgte in einer hierarchischen Clusteranalyse mit dem Programm Genesis (Sturn et al., 2003; Sturn et al., 2002).

Die Expressionswerte der Gene wurden mit verschiedenen Farben codiert, wobei die aktivierten Gene rot und die reprimierten Gene grün markiert wurden. Die Höhe der Expressionsdifferenz, gegeben als DEF-Wert, wird durch die Intensität der Farben dargestellt. Hier zeigt sich auch der entscheidende Vorteil der Einführung der DEF-Werte, die ein quantifizierbares Maß für die Qualität der differenziellen Expression darstellen.

In Abhängigkeit der Expressionsmuster konnten die differenziell exprimierten Gene in sechs verschiedenen Hauptgruppen eingeordnet werden (Abb. 14). In der Gruppe Nr.1 enthalten die Cluster Gene, die hauptsächlich in der Altersstufe P0 herunter reguliert wurden. In die Gruppe Nr.2 wurden Daten gruppiert, die eine Aktivierung der Genexpression in der Altersstufe P7 anzeigen. Die Gruppe Nr.3 umfasst Cluster mit Genen, bei denen die Expression in der Altersstufe P7 reprimiert wurde. Das Cluster Nr.4 beinhaltet Gene mit einer Repression im adulten Stadium, und das Cluster Nr.5 zeigt Gene, die eine Aktivierung in dieser Altersstufe aufweisen. In dem Cluster Nr.6 wurden Gene gruppiert, die nicht den anderen Gruppen zugeordnet werden konnten.

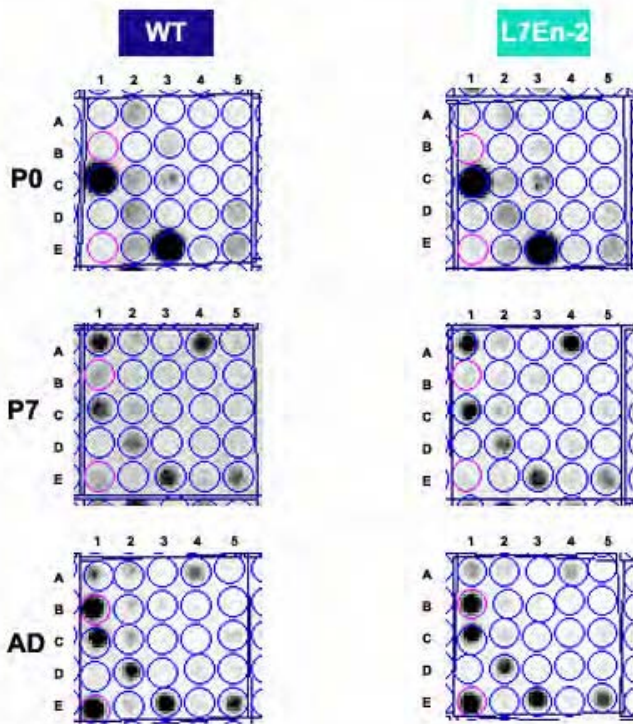
Die Resultate der Clusteranalyse lassen mehrere Auffälligkeiten in der Verteilung der Gene auf die verschiedenen Cluster erkennen. Es zeigt sich, dass in der Altersstufe P7 die meisten Gene reguliert wurden. Diese Gene kommen zum einen in der Gruppe Nr. 2 vor, die die aktivierten Gene enthält, und zum anderen in der Gruppe Nr. 3, die Gene mit einer Repression umfasst. Weiterhin fällt auf, dass in den verschiedenen Altersstufen mehr Gene reprimiert wurden als aktiviert. Ein wichtiger Punkt dieser Analyse ist, dass bei einem Großteil der Gene eine differenzielle Genexpression nur zu einem der drei Zeitpunkte festgestellt werden konnte und nur ein geringer Teil in mehreren Altersstufen reguliert wurde. Die meisten Gene mit einer Regulation in mehreren Altersstufen weisen die gleiche Richtung bei der Regulation auf, sie wurden entweder hoch- oder herunterreguliert. Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass die höchste Anzahl von Genen bei P7 reguliert wurde, und diese meist herunterreguliert sind. Da in jeder Altersstufe unterschiedliche Gene reguliert waren, ist davon auszugehen, dass die Expression der differenziell exprimierten Gene nicht ausschließlich durch *Engrailed-2* reguliert, sondern im Wesentlichen auch durch entwicklungsgeschichtliche Veränderungen beeinflusst wurde.

3.2 Differenzielle Expression von Parvalbumin in der L7En-2 Maus

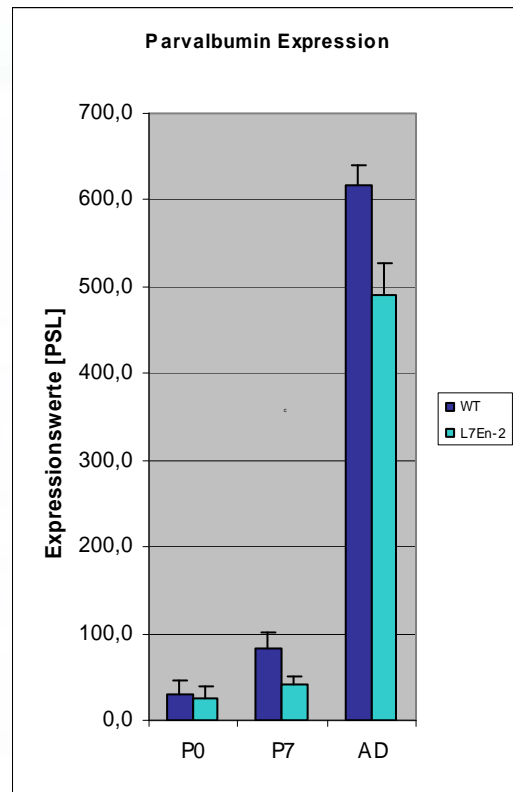
Um die Daten aus den Array-Experimenten zu überprüfen, wurde die Expression ausgewählter Gene mit anderen Methoden verifiziert. Das Calcium-bindende Protein Parvalbumin (Pvalb) ist ein bekanntes Marker Protein für Purkinjezellen, für Korb-/Sternzellen und für Neurone der tiefen Kerne im Cerebellum. Da die Expressionslevel des Parvalbumingens charakteristischerweise mit zunehmender Reifung der Purkinje- und Korb-/Sternzellen ansteigen, und vorangegangene Arbeiten gezeigt haben, dass in der L7En-2 Maus die Entwicklung der Purkinjezellen durch den Einfluss der Überexpression von *Engrailed-2* verzögert ist, würde eine reduzierte Expression von Parvalbumin in diesen Mäusen einen kausalen Zusammenhang nahe legen.

Die Array-Daten bestätigten, dass die Expression von Parvalbumin während der Entwicklung des Kleinhirns ansteigt (Abb. 15). In den Tieren der Altersstufe P0 befanden sich die Array-Expressionsdaten auf einem Niveau im Bereich des Hintergrunds. Mit der zunehmenden Entwicklung des Kleinhirns (P7 und AD) konnte ein Anstieg der Expression gemessen werden. Zudem konnte ein deutlicher Expressionsunterschied von Parvalbumin zwischen den WT und L7En-2 Tieren festgestellt werden. In den adulten Tieren wurde Parvalbumin sehr stark exprimiert, jedoch war der Unterschied zwischen WT und L7En-2 Tiere nicht mehr so ausgeprägt wie bei den Tieren der Altersstufe P7.

A)



B)



C)

Pvalb	Mittelwert ± SD [PSL]	Mittelwert ± SD [PSL]	Mittelwert	Mittelwert [PSL]	DEF
	WT	L7En-2	Ratio	ABS Diff	
P0	30,1 ± 16,0	24,2 ± 14,7	0,8	5,9	-0,03
P7	82,0 ± 19,1	40,3 ± 10,1	0,5	41,6	-2,09
AD	617,2 ± 22,2	491,5 ± 36,8	0,8	125,7	-0,96

Abb. 15: Array-Daten der Parvalbumin Expression.

Die Daten der Arrayanalysen zeigen das Expressionsprofil für Parvalbumin während der Entwicklung des Kleinhirns in den Altersstufen P0, P7 und adult. A) Auf den Array Bildern befinden sich die Hybridisierungspunkte für Parvalbumin an den Positionen B1 und E1. Die Expressionswerte wurden ermittelt durch eine Integration der Signalintensitäten der Messpunkte gemessen als PSL (Photo-Stimulierte-Lumineszenz) gefolgt von einer Hintergrundkorrektur und Normalisierung. B,C) Aus den Expressionswerten der Doppelbestimmungen von zwei Hybridisierungen (n=4) wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung (SD) berechnet. Die absolute Differenz (ABS Diff) wurde aus den WT und L7En-2 Expressionswerten berechnet und der Mittelwerte gebildet. Der DEF-Wert verdeutlicht die differenzielle Expression.

3.2.1 Relative Quantifizierung der Parvalbumin Expression durch Realtime-PCR

Mithilfe der Realtime-PCR wurde die Expression der Parvalbumin mRNA im Gesamtkleinhirnextrakt quantifiziert (Wong and Medrano, 2005). Für die Analysen wurde die RNA von WT und L7En-2 Kleinhirnen der Altersstufe P7 eingesetzt, da diese Proben einen in der Array-Analyse nachweisbaren Unterschied zeigten. Als Referenzgene für die Quantifizierungen wurden drei Gene ausgewählt, von denen keine Regulation ihrer Expression zu erwarten ist. Dies waren Beta-2 microglobulin (B2m), Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (Hprt1) und Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) (Vandesompele et al., 2002). Zur Standardisierung des Realtime-Verfahrens wurden die Effizienzen (E) (Anhang 5.1.2, Abb. 47) der einzelnen PCR-Reaktionen, sowie die Qualität der PCR-Produkte mittels Schmelzpunktanalysen (Anhang: 5.1.3; Abb. 48) überprüft. Die Realtime-PCR Analyse der Parvalbumin Proben (Abb. 16) ergab einen durchschnittlichen CT-Wert (Threshold Cycle; PCR Zyklus an dem das Fluoreszenz-Signal den Detektionsschwellenwert erreicht) von 30,0 für WT Tiere und einen CT-Wert von 32,4 für L7En-2 Mäuse (Tab. 24) (Realtime-PCR Daten siehe Anhang: 5.1.2; Tab. 30). Die CT-Werte der Referenzgene zeigten dagegen in beiden Genotypen nur geringe Unterschiede (<0,17). Dies bedeutet, dass auch nach Berücksichtigung der ermittelten PCR-Effizienzen (Pfaffl, 2001), weniger Parvalbumin mRNA in L7En-2 im Vergleich zu Wildtyptieren vorhanden war. Umgerechnet ergibt dieser Unterschied im CT-Wert einen relativen Expressionsunterschied um den Faktor 4,6 (Tab. 24).

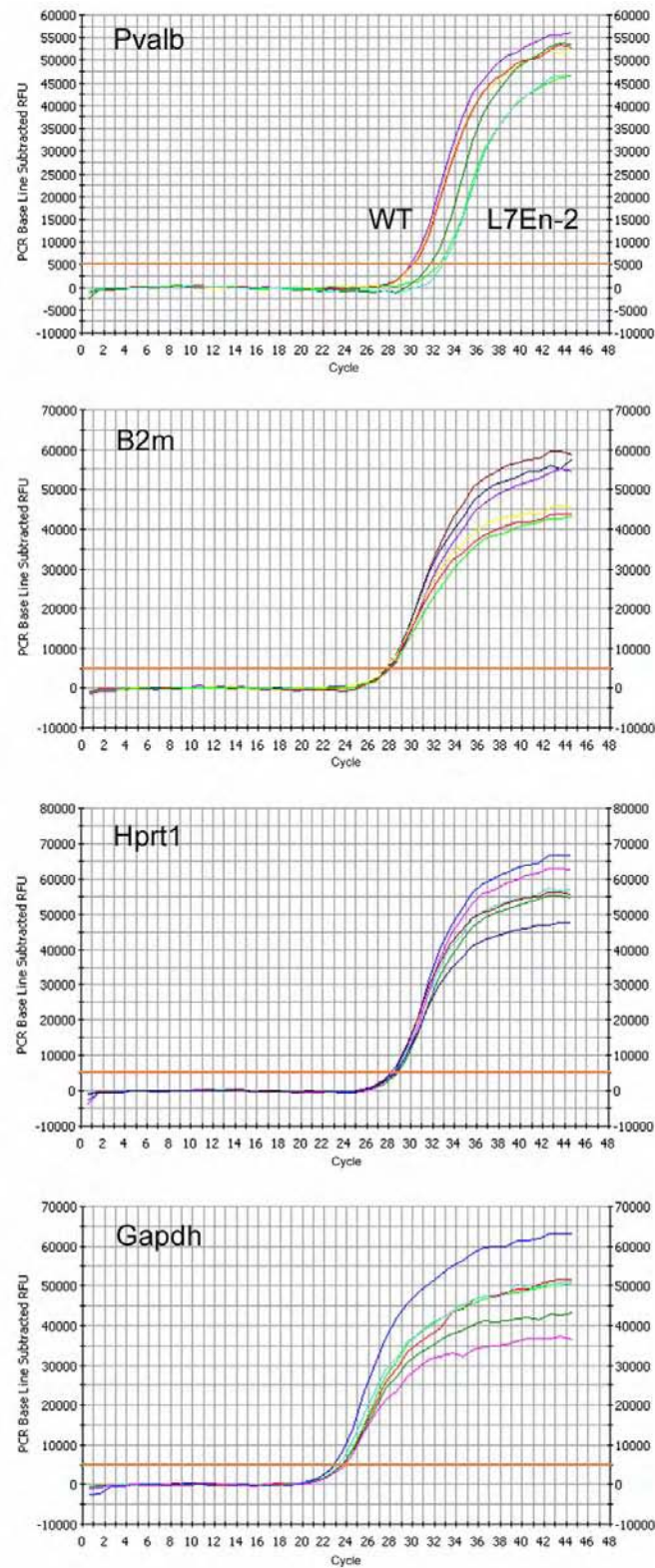


Abb. 16: Realtime-PCR Analyse.

In der Realtime-PCR wurde die Menge an transkribierter Parvalbumin mRNA in 7 Tage alten WT und L7En-2 Kleinhirnen verglichen. Als Referenzgene dienten Beta-2 microglobulin (B2m), Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (Hprt1) und Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh). Für jedes Gen wurden jeweils Triplikate von WT und L7En-2 Proben gemessen. Im Diagramm sind die Anzahl der PCR-Zyklen gegen die Hintergrund-korrigierten relativen Fluoreszenzwerte (RFU) aufgetragen. Der Schwellenwert für die Detektion der CT-Wert wurde auf 5000 RFU gesetzt.

	B2m	Pvalb	Hprt1	Pvalb	Gapdh	Pvalb	
PCR Effizienz (E)	2,02	1,82	1,93	1,82	1,95	1,82	
Kontrolle / WT	Referenzgen	Zielgen 1	Referenzgen	Zielgen 2	Referenzgen	Zielgen 3	
	B2m	Pvalb	Hprt1	Pvalb	Gapdh	Pvalb	
n	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	
CT Mittelwert	27,88	30,00	28,53	30,00	23,61	30,00	
Standard Abweichung	0,03	0,01	0,04	0,01	0,00	0,01	
Probe / L7En-2	Referenzgen	Zielgen 1	Referenzgen	Zielgen 2	Referenzgen	Zielgen 3	
	B2m	Pvalb	Hprt1	Pvalb	Gapdh	Pvalb	
n	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	
CT Mittelwert	27,78	32,35	28,45	32,35	23,29	32,35	
Standard Abweichung	0,02	0,36	0,10	0,36	0,25	0,36	
E(Ziel) ^{CT}		0.244		0.244		0.244	
E(Reference) ^{CT}		1.073		1.050		1.236	
		Zielgen 1		Zielgen 2		Zielgen 3	
		Pvalb		Pvalb		Pvalb	Mittelwert
Faktor der Herunterregulation		4.398		4.304		5.066	4.6
Absolute Gen-Regulation		0.227		0.232		0.197	0.2
2 log (absolute Gen-Regulation)		-2.137		-2.106		-2.341	-2.2

Tab. 24: Auswertung der Realtime-PCR Analyse.

Die Tabelle listet PCR Effizienzen, CT-Mittelwerte und Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen sowie die Unterschiede in der Expressionsstärke von Parvalbumin für WT- und L7En-2 Proben auf.

3.2.2 Proteinexpression von Parvalbumin

Als zweite Methode zur Verifikation der Array-Daten wurde die Expression auf Proteinebene mittels Westernblot-Analyse untersucht. 30 µg Protein von Extrakten aus dem gesamten Cerebellum wurden in einem SDS-Polyacrylamid elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Der Nachweis erfolgte mit einem Antikörper gegen Parvalbumin. Als Referenz-Kontrolle für gleiche Proteinmengen in den verschiedenen Proben wurde ein Synaptophysin Antikörper eingesetzt.

Der Vergleich der Proteinmengen von Parvalbumin in den Proben der Wildtyp Tiere und der L7En-2 Tiere zeigte ebenfalls eine Reduktion der Parvalbuminexpression in den L7En-2 Proben (Abb. 17). Bei der adulten Altersstufe war eine Angleichung des Expressionsniveaus von Parvalbumin zwischen den WT Tieren und den L7En-2 Tieren auffällig. Die Referenzbanden von

Synaptophysin dienten als Nachweis für gleiche Proteinmengen in den Proben von Wild- und L7En-2 Tieren. Zusätzliche Banden auf dem Blot beruhten auf unspezifischen Bindungen des zweiten Antikörpers, und sind in allen Spuren in ähnlicher Intension zu sehen. Dies spricht für eine vergleichbare Menge an aufgetragenem Protein. Zur Quantifizierung wurden die Westernblots densitometrisch ausgewertet (Abb. 18).

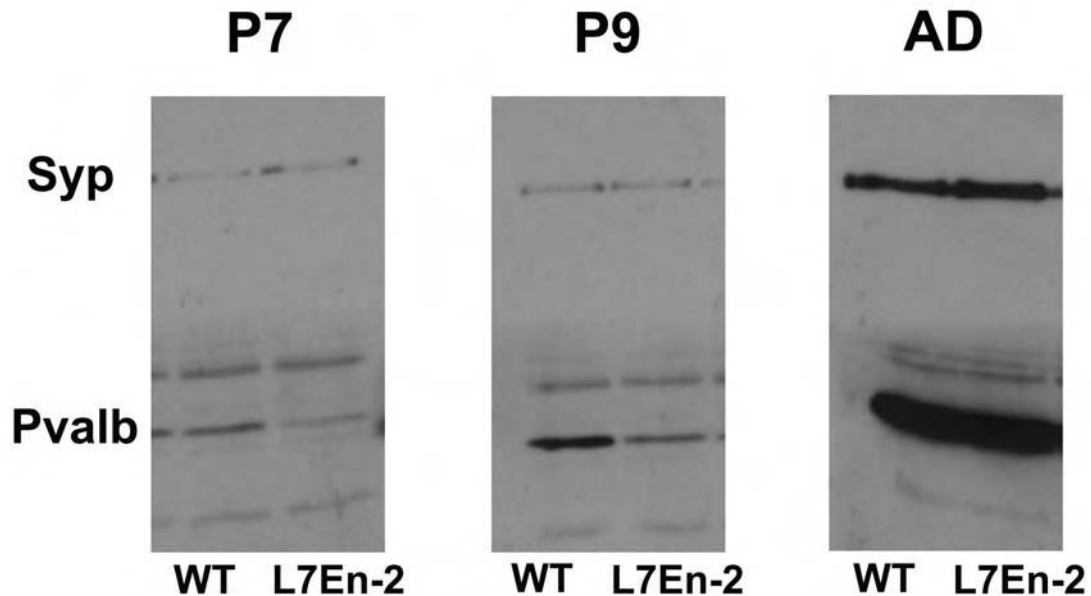


Abb. 17: Westernblot-Analyse von Parvalbumin.

Gleiche Aliquots von Cerebellumextrakten der Altersstufen P7, P9 und adult wurden in einem SDS-Polyacrylamid Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Parvalbumin (Pvalb) und Synaptophysin (Syp) wurden durch spezifische Antikörper auf der Membran nachgewiesen und sind entsprechend markiert. Synaptophysin diente als Referenz zur Kontrolle gleicher aufgetragener Proteinmengen. Die zusätzlichen Banden aufgrund von unspezifischen Bindungen des zweiten Antikörpers zeigten ebenfalls gleiche Proteinmengen in den Proben an.

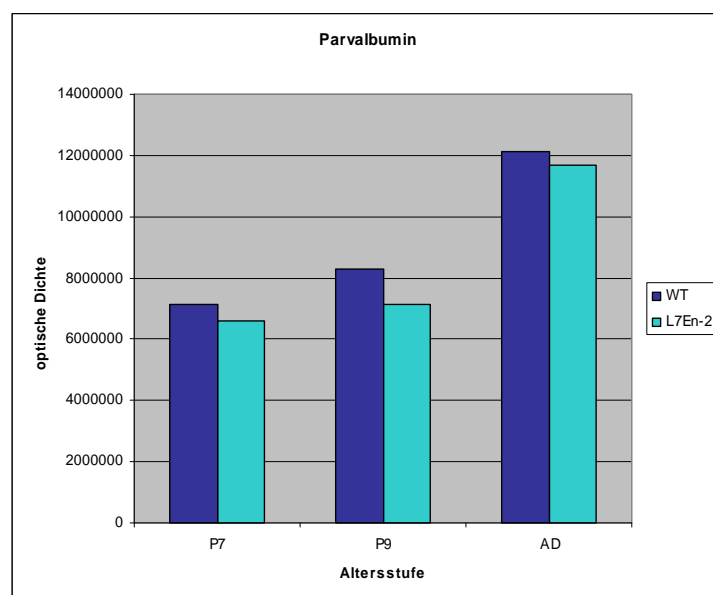


Abb. 18: Quantitative, densitometrische Auswertung der Westernblot-Analyse.

Die Intensitäten der Banden wurden als optische Dichte quantifiziert. Die Daten wurden auf die Synaptophysin Referenzbande normalisiert.

3.2.3 Verifizierung der Parvalbumin Expression mittels in situ Hybridisierung

Eine weitere Methode zur Verifikation der Array-Daten stellt die in situ Hybridisierung dar. Bei dieser Methode wird mittels einer Digoxigenin-markierten antisense RNA-Sonde die mRNA im Gewebe nachgewiesen, was den Nachweis der mRNA Expression auf zellulärer Ebene erlaubt. Durch den Vergleich der mRNA Expression in unterschiedlichen Zellen ist es möglich, auch hier einen, wenn auch semiquantitativen Vergleich von Genexpressionsstärken zu erhalten. In diesem Zusammenhang ist es wichtig darauf hinzuweisen, dass die Überexpression des En-2 in L7En-2 Mäusen auf die Purkinjezellen beschränkt ist, sodass durch En-2 induzierte Veränderungen in der Genexpression lokal umschriebene Areale und Zellen betreffen sollten. Dies muss aber nicht zwangsläufig auf Purkinjezellen beschränkt sein, da mit dem hier durchgeführten Ansatz auch indirekte Genexpressionsänderungen untersucht werden können.

Wie basierend auf den Array-Daten erwartet, konnte in den Schnitten von P0 Tieren kein Parvalbumin Signal im Kleinhirn nachgewiesen werden (Abb. 19, 20). Demgegenüber zeigte sich in den WT Tieren der Altersstufe P7 ein deutliches Signal in den Purkinjezellen und eine beginnende Expression in den Korb-/Sternzellen des Kleinhirns. Im adulten Tier war die Parvalbuminexpression dann auch in den inhibitorischen Interneuronen stark angestiegen. Der Vergleich zwischen den P7 Wildtyp Tieren und den L7En-2 Tieren ergab einen deutlichen, Purkinjezell-spezifischen Unterschied im Expressionsniveau von Parvalbumin. Während die Expression in Korb-/Sternzellen unverändert geblieben war, war die von Parvalbumin in den Purkinjezellen der L7En-2 Tiere zu diesem Zeitpunkt stark reduziert. Dieser Unterschied nivellierte sich mit fortschreitender Entwicklung.

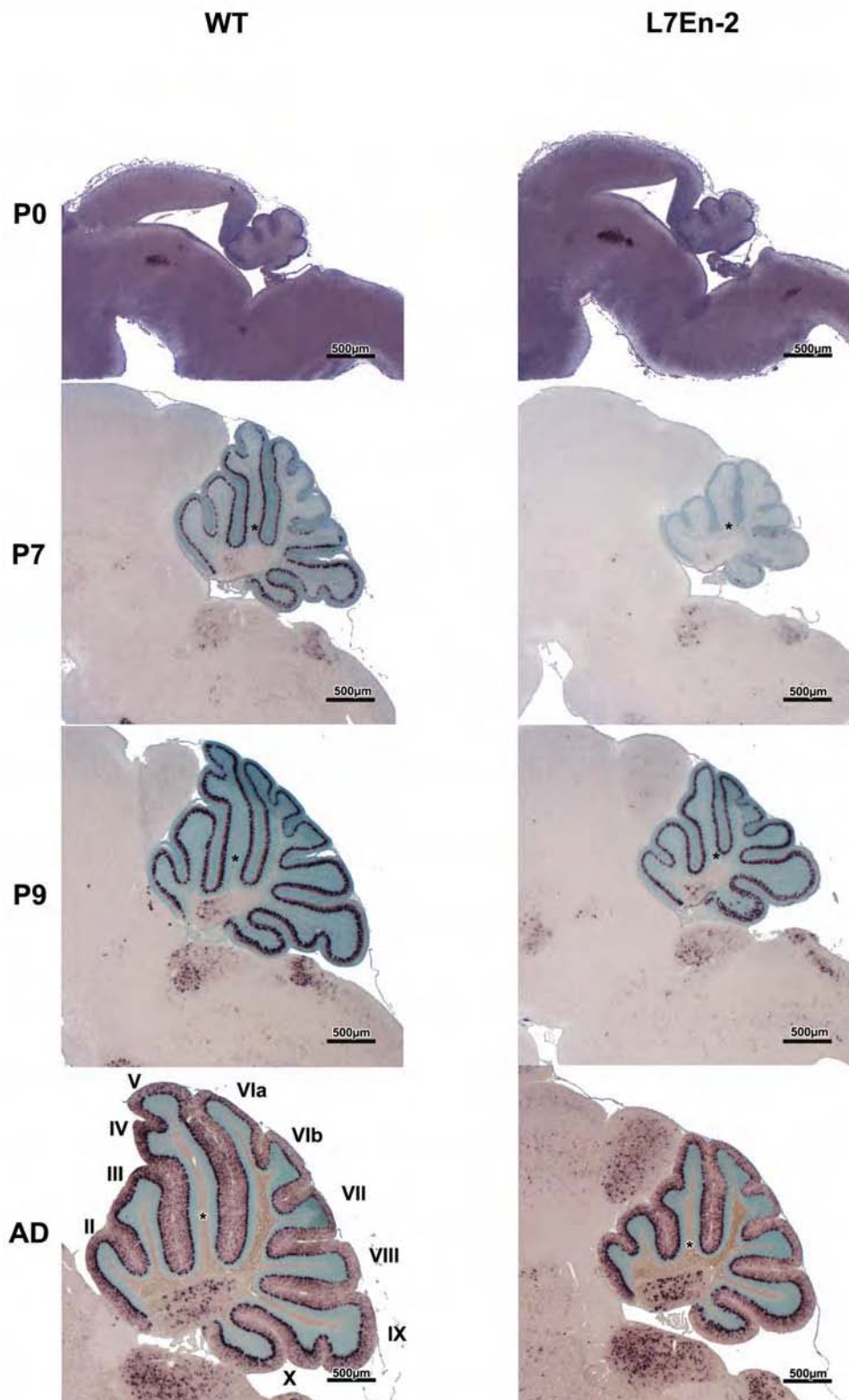


Abb. 19: Parvalbumin in situ Hybridisierung.

Mit einer digoxigenin markierten Sonde wurde die Parvalbumin mRNA in sagittalen Paraffinschnitten im Cerebellum von neugeborenen (P0), sieben Tage (P7) alten und adulten (AD) Mäusen nachgewiesen. Im Cerebellum wurden Purkinjezellen und in den adulten Tieren zusätzlich die Korb- und Sternzellen in der Molekularschicht angefärbt. In den tiefen Kernen des Kleinhirns und in verschiedenen Kerngebieten außerhalb des Kleinhirns wurden Neurone angefärbt, die als interne Referenz verwendet werden können. Die grüne Färbung beruht auf der Kerngegenfärbung mit Methylgrün. Die römischen Ziffern II-X bezeichnen die verschiedenen Lobuli im adulten WT Tier. Die Sterne markieren die Herkunftsgebiete der Ausschnittsvergrößerung in Abb. 20.

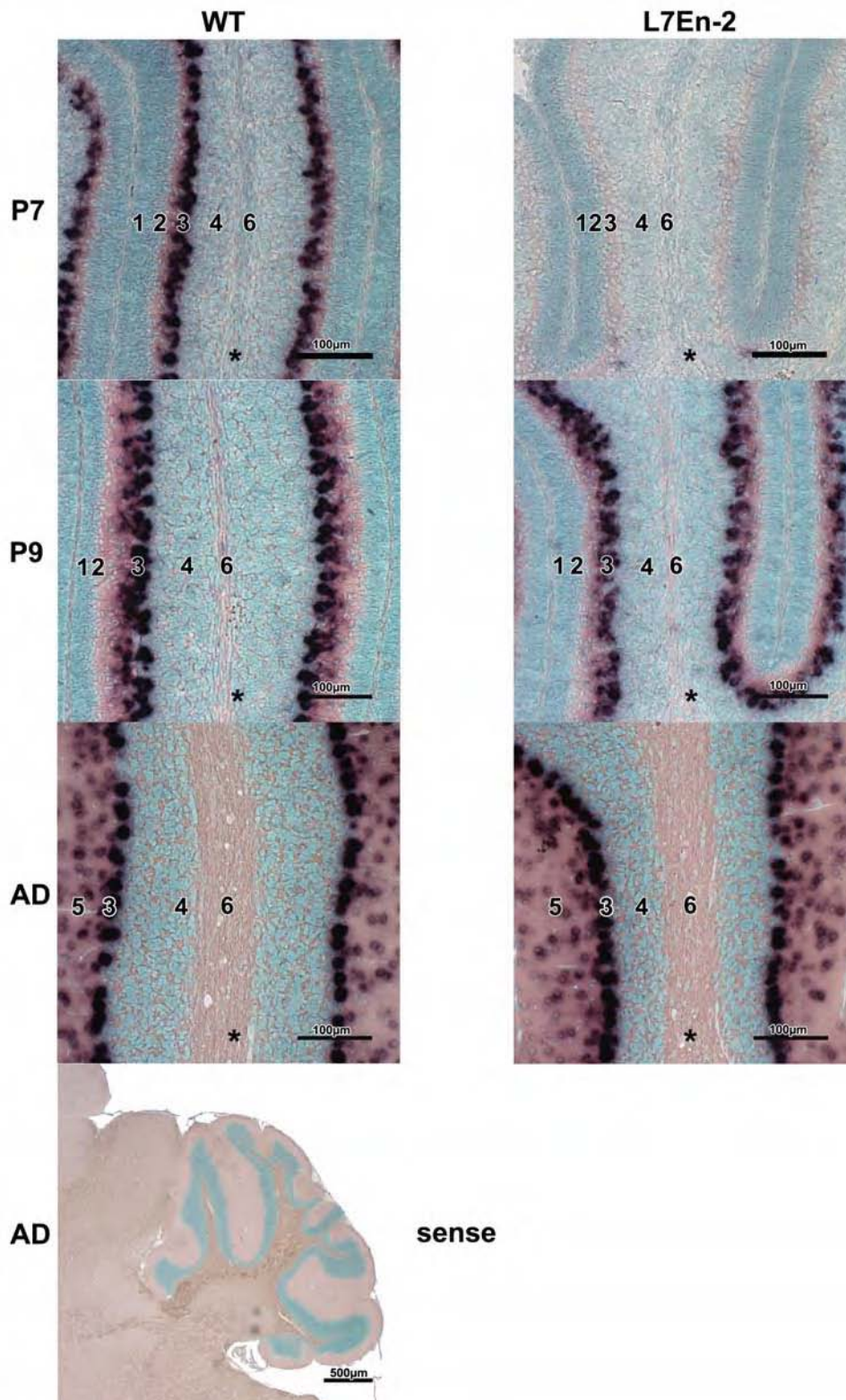


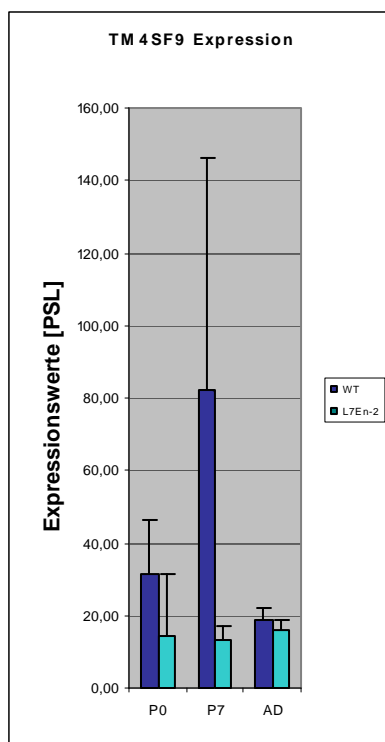
Abb. 20: Ausschnittsvergrößerung der Parvalbumin in situ Hybridisierung.

Die Zahlen kennzeichnen die verschiedenen Schichten des cerebellären Kortex: 1) äußere Körnerzellschicht, mitotisch aktiver Teil; 2) äußere Körnerzellschicht, postmitotischer Teil; 3) Purkinjezellschicht; 4) innere Körnerzellschicht; 5) Molekularschicht; 6) weiße Substanz. Die Sense Sonde dient als Negativkontrolle.

3.3 Expressionsanalyse von Tetraspanin-5

Das Transmembran-Protein Tetraspanin-5 (Tm4sf9, Tspan5) gehört zur Superfamilie der Tetraspanine, die eine Rolle bei zellulären Prozessen wie der Proliferation, der Zellmigration, der Differenzierung und der Synapsenbildung spielen (Maecker et al., 1997; Greene and Tischler, 1976). Bei der Entwicklung des Kleinhirns hat es möglicherweise bereits embryonal eine Funktion bei der Entstehung und Wanderung von Zellen, da es schon in der frühen postnatalen Phase, wenn auch in geringem Maße exprimiert wird. Während der Entwicklung steigt die Expression von Tetraspanin-5 deutlich an. In der L7En-2 Maus konnte eine reduzierte Expression von Tetraspanin-5 in den Altersstufen P0 und P7 festgestellt werden (Abb. 21). Die Expressionswerte für die adulte Altersstufe zeigten jedoch Werte, die im Bereich der Hintergrundintensitäten einzuordnen sind.

A)



B)

Tm4sf9	Mittelwert ± SD [PSL]	Mittelwert ± SD [PSL]	Mittelwert	Mittelwert [PSL]	DEF
	WT	L7En-2	Ratio	ABS Diff	
P0	31,2 ± 15,2	14,4 ± 17,1	0,4	17,9	-0,80
P7	82,1 ± 64,3	13,4 ± 3,4	0,2	24,4	-2,84
AD	18,9 ± 3,4	16,1 ± 2,8	0,9	1,5	-0,15

Abb. 21: Expressionsdaten der Array-Analyse von Tetraspanin-5. SD Standardabweichung, PSL Photo-Stimulierte-Lumineszenze.

3.3.1 Analyse der Tetraspanin-5 Expression durch Realtime-PCR

Die Expression der mRNA von Tetraspanin-5 (Tm4sf9) wurde zunächst wieder in einer Realtime-PCR Analyse verifiziert. Analog zu der Parvalbumin Expressionsanalyse wurde die cerebelläre RNA von Tieren der Altersstufe P7 eingesetzt. Als Referenzgene wurden wiederum B2m, Hprt1 und Gapdh verwendet. Die CT-Werte und Schmelzkurven-Analyse können dem Anhang (5.1.2; 5.1.3) entnommen werden. Für die WT Tiere wurde ein durchschnittlicher CT-Wert von 28,73 gemessen, bei den L7En-2 Tieren lag der CT-Wert im Mittel bei 28,43. Der Faktor der Regulation lag im Mittel bei 1,15. Es konnten also durch die Quantifizierungsmethode der Realtime-PCR keine signifikanten Unterschiede in der Expression von der Tetraspanin-5 mRNA zwischen den WT und L7En-2 Tieren festgestellt werden.

	B2m	Tm4sf9	Hprt1	Tm4sf9	Gapdh	Tm4sf9	
PCR Effizienz (E)	2,02	1,98	1,93	1,98	1,95	1,98	
Kontrolle WT	Referenzgen	Zielgen 1	Referenzgen	Zielgen 2	Referenzgen	Zielgen 3	
	B2m	Tm4sf9	Hprt1	Tm4sf9	Gapdh	Tm4sf9	
n	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	
CT Mittelwert	27,87	28,73	28,57	28,73	28,57	28,73	
Standard Abweichung	0,02	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	
Probe L7En-2	Referenzgen	Zielgen 1	Referenzgen	Zielgen 2	Referenzgen	Zielgen 3	
	B2m	Tm4sf9	Hprt1	Tm4sf9	Gapdh	Tm4sf9	
n	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	
CT Mittelwert	27,77	28,43	28,47	28,43	28,47	28,43	
Standard Abweichung	0,08	0,19	0,36	0,19	0,36	0,19	
E(Ziel) ^{CT}		1,23		1,23		1,23	
E(Reference) ^{CT}		1,07		1,07		1,07	
		Zielgen 1		Zielgen 2		Zielgen 3	
		Tm4sf9		Tm4sf9		Tm4sf9	Mittelwert
Faktor der Heraufregulation		1,14		1,15		1,15	1,15
Absolute Gen-Regulation		1,14		1,15		1,15	1,15
2 log (absolute Gen-Regulation)		0,19		0,20		0,20	0,20

Tab. 25: Untersuchung der Expression von Tetraspanin-5 durch Realtime-PCR. Die vergleichende Untersuchung der Tetraspanin-5 Expression in sieben Tage alten WT und L7En-2 Tieren ergab keinen Unterschied. Als Referenzgene dienten B2m, Hprt1 und Gapdh.

3.3.2 Verifizierung der Tetraspanin-5 Expression durch in situ Hybridisierung

Zur Verifikation der Array-Daten wurde die Expression und das Expressionsmuster von Tetraspanin-5 im Cerebellum wiederum mittels in situ Hybridisierung untersucht. Außer einem etwas auffälligeren Tetraspanin-5 Signal im zentralen Lobus von neugeborenen WT Tieren, konnte in dieser Altersstufe nur ein sehr schwaches Signal nachgewiesen werden (Abb. 22). Dies zeigte sich insbesondere durch die lange Inkubationszeit von etwa 7 Tagen mit dem Färbereagenz. Zum Zeitpunkt P7 war dann bereits ein eindeutiges Signal sowohl in der Purkinjzellschicht als auch in der inneren Körnerzellschicht zu sehen. Die Inkubationszeit mit dem Färbereagenz lag hier bereits bei 2 Tagen. Wiederum war eine deutlich hervorgehobene Expression im Bereich des Zentrallobus zu sehen, der aufgrund der zunehmenden Lobulierung nun in den Lobuli VIb und VII lokalisiert werden konnte. Zwei Tage später ergibt sich dann eine Signalintensität, wie sie auch im adulten Tier anzutreffen ist. Die innere Körnerzellschicht stellt sich als homogen gefärbten Band nahe der weißen Substanz dar. Die Purkinjzellen sind durch die starke Expression auf zellulärer Ebene deutlich hervorgehoben und die Expression hat sich auf die gesamte Purkinjzellschicht ausgedehnt, sodass keine massiven lokalen Unterschiede mehr zu sehen sind.

Der Vergleich, der in situ Hybridisierungssignale in Wildtyp und L7En-2 Mäusen zeigte, dass bei neugeborenen Mäusen eine schwächere Intensität der Färbung im L7En-2 Schnitt zu beobachten war (Abb. 22). Aufgrund der allgemein niedrigen Expressionsniveaus ist dies aber schwer zu beurteilen. Zum Zeitpunkt P7 konnte dagegen ein deutlicher Unterschied in der Signalintensität im Bereich der Lobuli VIb und VII in Purkinjzellen demonstriert werden (Abb. 22). Dieser Unterschied war Purkinjzell-spezifisch und in den folgenden Entwicklungstagen immer deutlicher zu sehen. Erst im adulten Tier war der Unterschied in der Tetraspanin-5 Expression zwischen WT und L7En-2 Tieren wieder schwächer ausgeprägt. Als Referenz für die Beurteilung der in situ Hybridisierungsqualität wurde das Mittelhirn herangezogen, welches in den beiden Genotypen vergleichbare Intensitätssignale zeigte.

Neben der Expression von Tetraspanin-5 in Purkinjzellen war ein deutliches Signal in der inneren Körnerzellschicht zu sehen (Abb. 23). Ein schwaches Signal konnte auch in dem inneren Anteil der äußeren Körnerzellschicht nachgewiesen werden. In dieser Schicht befinden sich die postmitotischen Körnerzellen, bevor sie mit der Migration in die innere Körnerzellschicht beginnen. Der äußere Anteil der äußeren Körnerzellschicht mit den mitotisch aktiven Körnerzellen wurde nicht angefärbt. Im Gegensatz zu den Purkinjzellen war in den Körnerzellen zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung in der Tetraspanin-5-Expression zwischen Wildtyp und L7En-2 Tieren sichtbar.

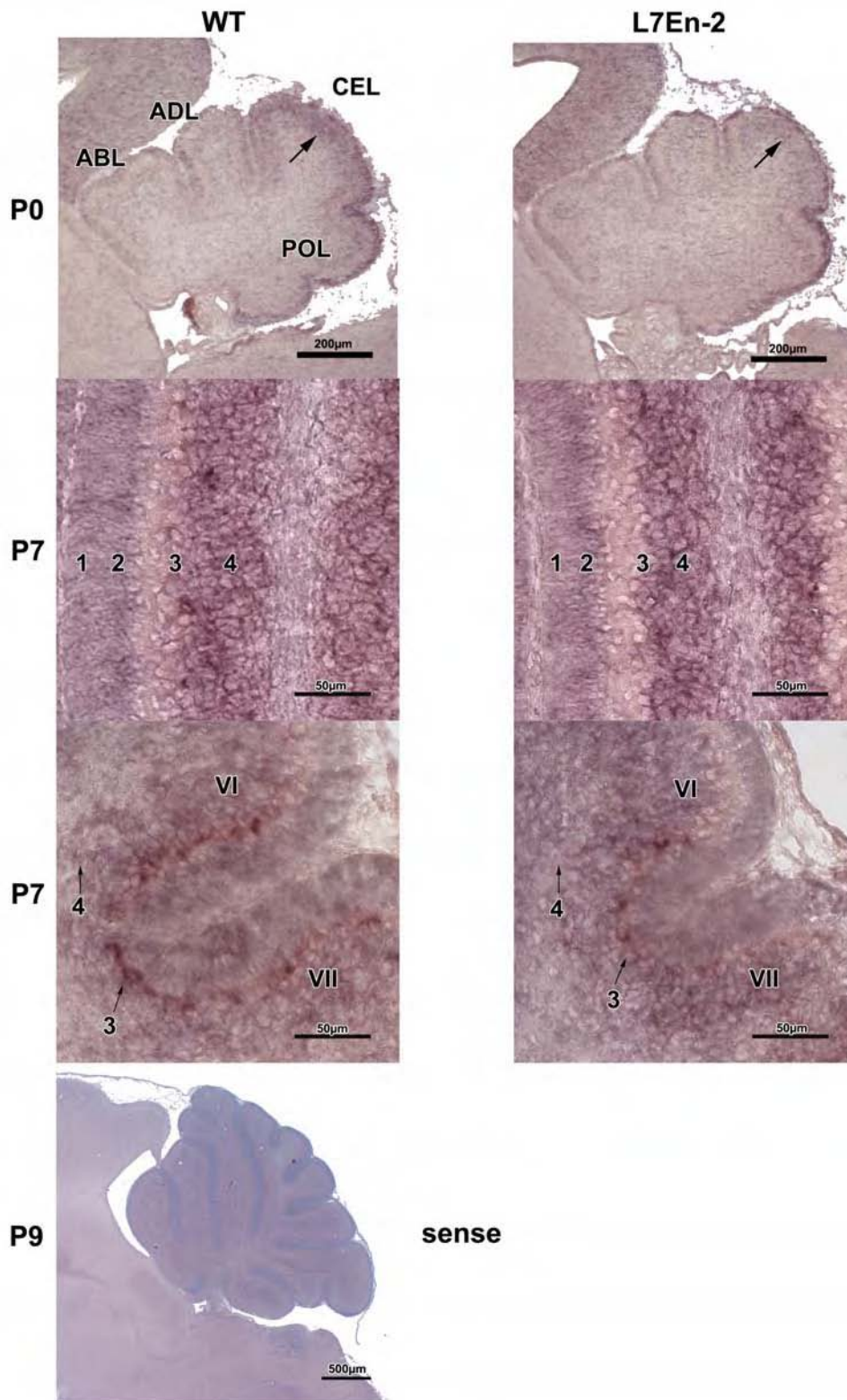


Abb. 22: Tetraspanin-5 in situ Hybridisierung.

Die in situ Hybridisierung mit einer Tetraspanin-5 spezifischen Sonde zeigte einen deutlichen Anstieg der Tetraspanin-5 mRNA Expression während der Entwicklung. Die Expression in den L7En-2 Tieren ist im Verhältnis zu Wildtyptieren herabgesetzt. Auffällig ist die starke Expression in den Lobuli IV und VII. Eine Tetraspanin-5 Sense Sonde wurde als Negativkontrolle eingesetzt. 1) äußere Körnerzellschicht, mitotisch aktiver Teil; 2) äußere Körnerzellschicht, postmitotischer Teil; 3) Purkinjezellschicht; 4) innere Körnerzellschicht; ABL anterobasale Lobulus, ADL anterodorsale Lobulus, CEL centrale Lobulus, POL posteriore Lobulus.

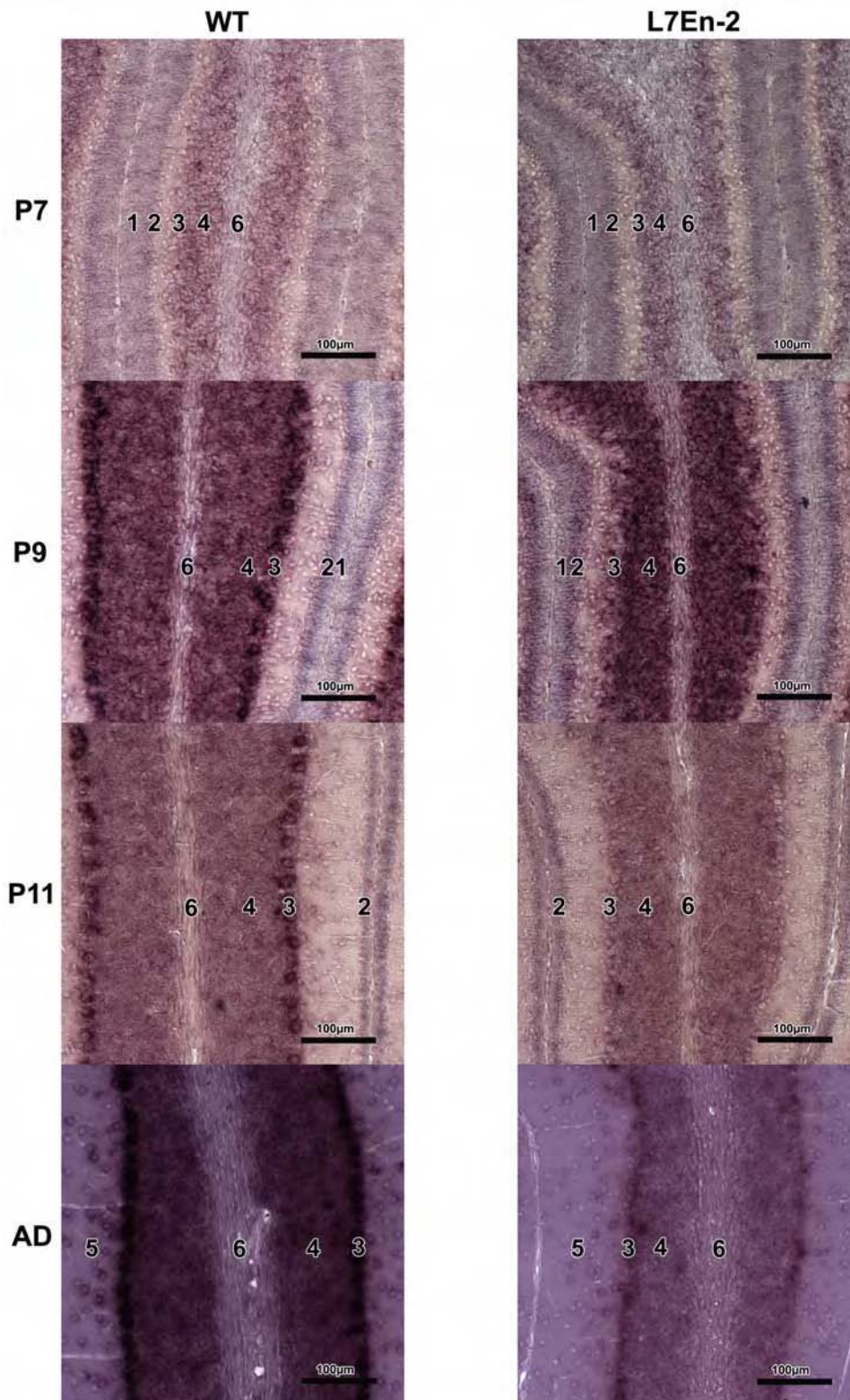


Abb. 23: Tetraspanin-5 in situ Hybridisierung.

Tetraspanin-5 wird während der Entwicklung des Kleinhirns in zunehmendem Maße in allen Neuronen des Kleinhirns exprimiert. Gezeigt sind die Postnaltage P7, P9, P11 und adult (AD). Die Schnitte zeigen Vergrößerungen des Kleinhirns im Bereich der Lobuli VI-V. 1) äußere Körnerzellschicht, mitotisch aktiver Teil; 2) äußere Körnerzellschicht, postmitotischer Teil; 3) Purkinjzellschicht; 4) innere Körnerzellschicht; 5) Molekularschicht; 6) weiße Substanz.

3.3.3 Analyse der Tetraspanin-5 Expression in Zellkulturen

Die deutliche Repression der Tetraspanin-5 Expression in Purkinjezellen wirft die Frage nach potenziellen Funktionen dieses Transmembranproteins auf. Da bisher noch keine experimentellen Ansätze dafür beschrieben sind, sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, die Expression von Tetraspanin-5 zu verändern und einen Einfluss dieser Veränderung auf die Zellmigration in einem in vitro System zu beschreiben. Zum Nachweis des Proteins wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Joachim Kappler ein polyklonales Antikörperserum gegen Tetraspanin-5 generiert. Die Funktionalität des Antikörpers wurde sowohl in immunocytochemischen Experimenten als auch durch Westernblot-Analysen überprüft (unveröffentlichte Daten aus medizinischen Doktorarbeiten von Frau cand.med. Katja Duffe, Frau cand.med. Jennifer Lind und Frau cand.med. Kristina Wöllner).

Zunächst wurde mithilfe des Antikörpers der endogene Spiegel der Tetraspanin-5 Expression in verschiedenen Zelllinien untersucht. Subkonfluent wachsende Zellen der Linien Hek-293, Daoy, SJMM1, SJMM2 und N2A zeigten ein deutliches Signal bei Antikörperverdünnungen von 1:100 bis 1:400. Erst bei einer Verdünnung von mehr als 1:1000 nahm die Intensität des immunocytochemischen Signals ab. Die Inkubation mit Blockierlösung ohne ersten Antikörper führte zu keinem spezifischen Signal.

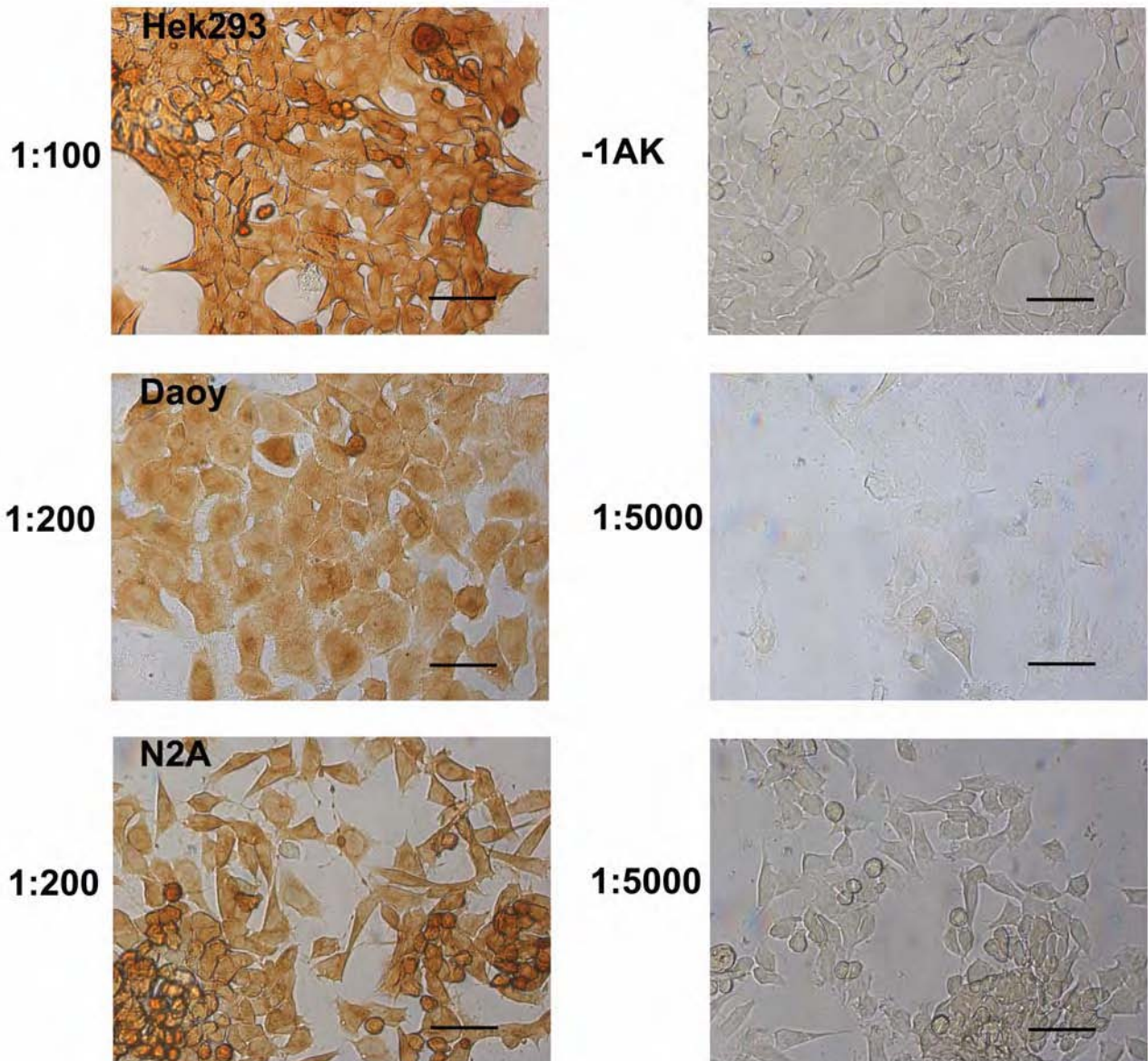


Abb. 24: Immunocytochemischer Nachweis der Expression von Tetraspanin-5 in Zellkulturen. Mit einem polyklonalen Antikörper gegen Tetraspanin-5 konnte die Expression des Proteins in allen untersuchten Zelllinien (hier sind exemplarisch Hek-293, Daoy, N2A-Zellen gezeigt) nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurde der erste Antikörper weggelassen (-1AK) oder 1:5000 verdünnt. (Messbalken 100 µm).

Um die Spezifität des Antikörpers zu untermauern, wurden Westernblot-Analysen mit Homogenaten aus Zelllinien analysiert, die sich von neuralem Gewebe ableiteten (Abb. 25). Die elektrophoretische Auftrennung und der Nachweis mit dem Antikörper gegen Tetraspanin-5 ergab eine spezifische Bande bei ca 40 kDa, wobei ein geringer Größenunterschied zwischen humanem (Daoy) und murinem (N2A) Tetraspanin-5 festzustellen war. Die Bindung des Antikörpers im Westernblot konnte mit einem Peptid (10-, 100-facher molarer Überschuss), das der Bindungssequenz des Antikörpers im Protein entspricht, spezifisch blockiert werden.

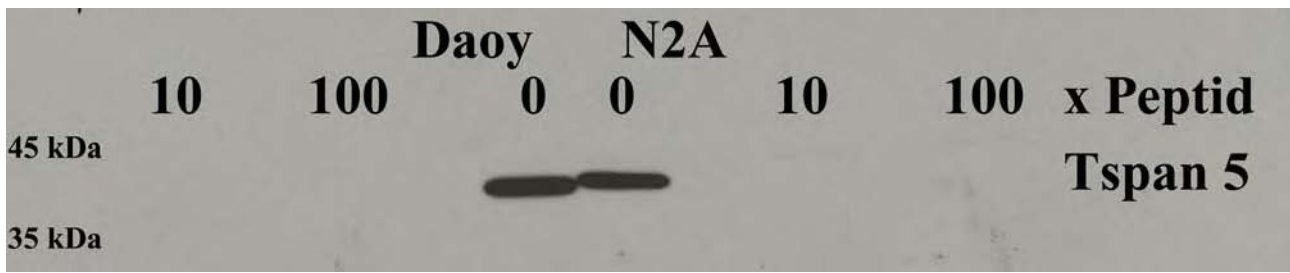


Abb. 25: Nachweis von Tetraspanin-5 durch Westernblot-Analyse in Zellkulturen. Die Zelllinien Daoy und N2A zeigten nach Westernblot-Analyse eine spezifische Bande bei 40 kDa, welche bei Zugabe eines Epitop-spezifischen Peptids in 10-, und 100-fachem molaren Überschuss nicht mehr nachweisbar war.

3.3.4 Repression von Tetraspanin-5 durch siRNA

Da alle hier untersuchten Zelllinien eine deutliche Expression des Tetraspanin-5 zeigten, wurde versucht, die Expression mithilfe der RNA Interferenz Technik zu unterdrücken. Für diesen Ansatz wurde ein Vektor (pH1-EGFP-pcDNAzeo3.1+, Material und Methoden 2.6.12, Abb. 8) konstruiert, der unter der Kontrolle des humanen H1 Promotors die Expression von siRNA (small interfering RNA) gegen Tetraspanin-5 ermöglicht. Die erfolgreiche Transfektion der Zellkulturen konnte über die Expression von EGFP (enhanced-green-fluorescent-protein) nachgewiesen werden (Abb. 26 A). Transient transfizierte Zelllinien zeigten keine Unterdrückung der Tetraspanin-5 Expression (Abb. 26 B, C). Dies konnte für drei unterschiedliche Tetraspanin-5 spezifische Oligonukleotidsequenzen gezeigt werden. Dementsprechend waren nach Transfektion von Daoy Zellen mit einem siRNA-Vektor (siRNA2) und einem Kontroll-Vektor (EGFP) ohne siRNA keine auffälligen morphologischen Veränderungen der Zellen zu erkennen (Abb. 26A).

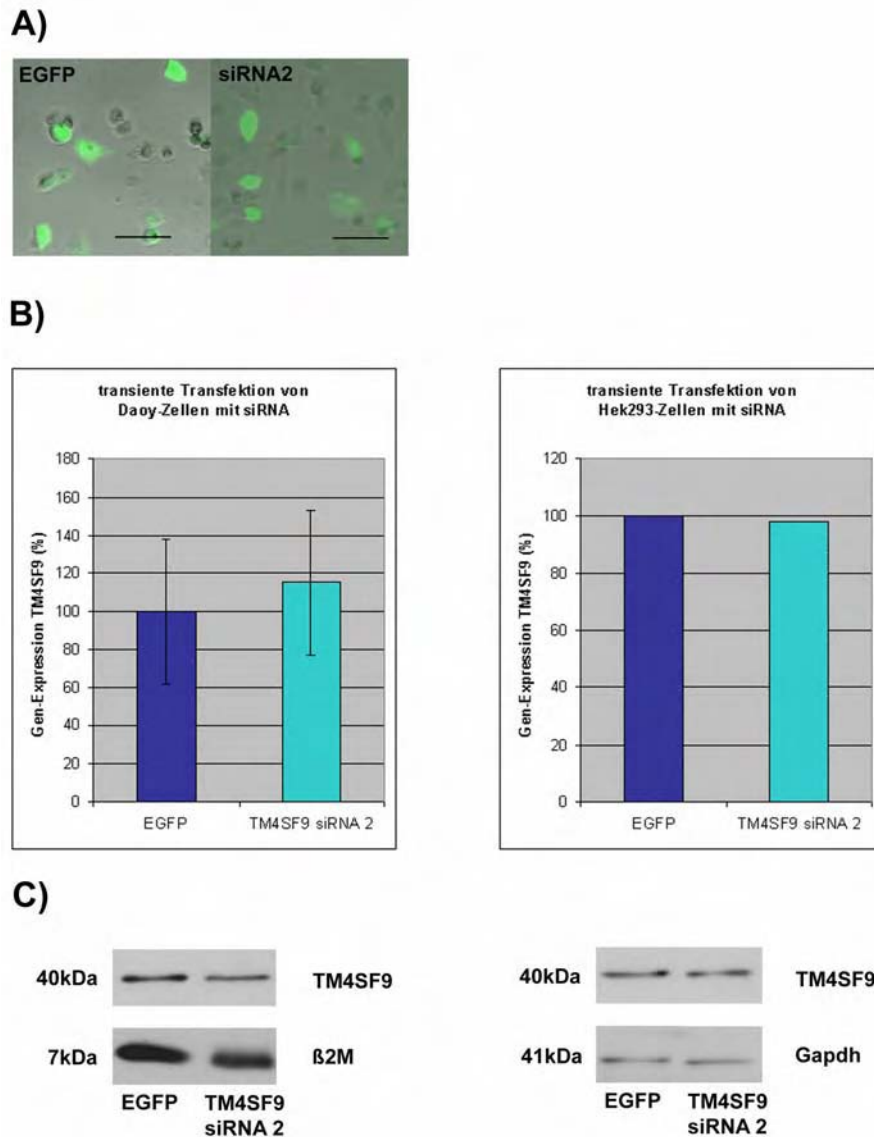
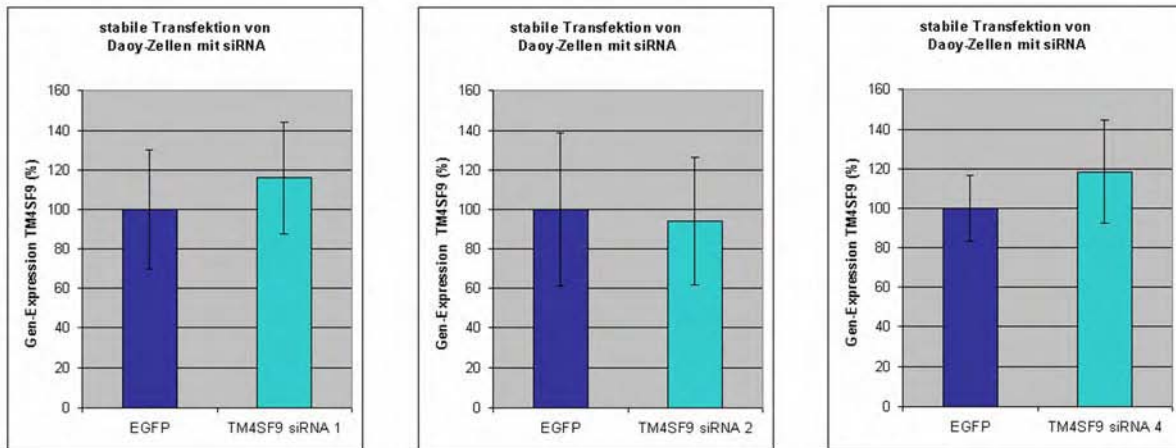


Abb. 26: Transiente Transfektion von Zellkulturen mit siRNA.

Zellkulturen (Daoy, Hek-293) wurden transient mit einem siRNA-Vektor (siRNA2) und einem Kontroll-Vektor (EGFP) transfiziert. A) Kontrolle der Transfektion über die EGFP-Expression in Daoy-Zellen. B, C) Westernblot-Analyse von Zellkulturhomogenaten (Daoy, Hek-293) mit einem Tetraspanin-5 Antikörper. Die Westernblots wurden densitometrisch ausgewertet. Die Tetraspanin-5 Expression wurde normalisiert auf die Referenzbanden der Antikörper β 2M oder Gapdh. Bei der Transfektion der Daoy-Zellen wurden Mittelwert und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten berechnet. Die Werte der Kontrolle (EGFP) wurden auf 100 % gesetzt und die Daten der siRNA mit der Kontrolle ins Verhältnis gesetzt.

Da in den transient transfizierten Zelllinien das Ergebnis durch nicht-transfizierte Zellen überlagert sein könnte, wurde eine stabile Selektion der transfizierten Zellen mit Zeocin durchgeführt. Obwohl nach der Selektion nur Zellen übrig blieben, die den Vektor stabil in ihr Genom integriert hatten, konnte in der Westernblot-Analyse keine deutliche Reduktion des Tetraspanin-5 Proteins festgestellt werden (Abb. 27). Auch der Einsatz von verschiedenen siRNA Vektoren (siRNA 1,2,4), die gegen unterschiedliche Bereiche der Tetraspanin-5 mRNA gerichtet waren, führten nicht zu einer nennenswerten Reduktion von Tetraspanin-5.

A)



B)

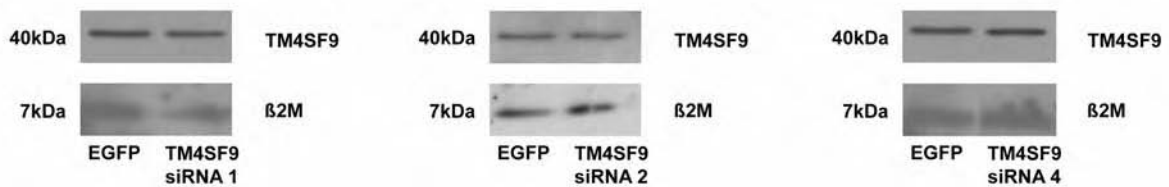


Abb. 27: Westernblot-Analyse von stabiler Transfektion von Daoy-Zellen mit verschiedenen siRNAs. Daoy-Zellen wurden mit verschiedenen siRNA-Vektoren (siRNA1,2,4) und Kontroll-Vektoren (EGFP) transfiziert. Durch eine Selektion mit Zeocin wurden stabile Zelllinien etabliert. Die stabilen Zelllinien wurden in einer Westernblot-Analyse auf die Expression von Tetraspanin-5 untersucht. Die Westernblots wurden densitometrisch quantifiziert und die Daten mittels der β 2M Daten normalisiert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus den Daten von drei unabhängigen Westernblot-Analysen ermittelt. Die Werte der Kontrolle (EGFP) wurden auf 100 % gesetzt und die Daten der siRNA mit der Kontrolle ins Verhältnis gesetzt.

Da in Daoy-Zellen keine wesentliche Reduktion von Tetraspanin-5 mit der siRNA erzielt werden konnte, stellte sich die Frage, ob in anderen Zell-Typen ein positives Ergebnis erreicht werden konnte. Jedoch zeigten auch die Westernblot-Analyse von stabil transfizierten Hek-293 und N2A Zelllinien keine eindeutige Reduktion der Tetraspanin-5 Proteinmenge (Abb. 28).

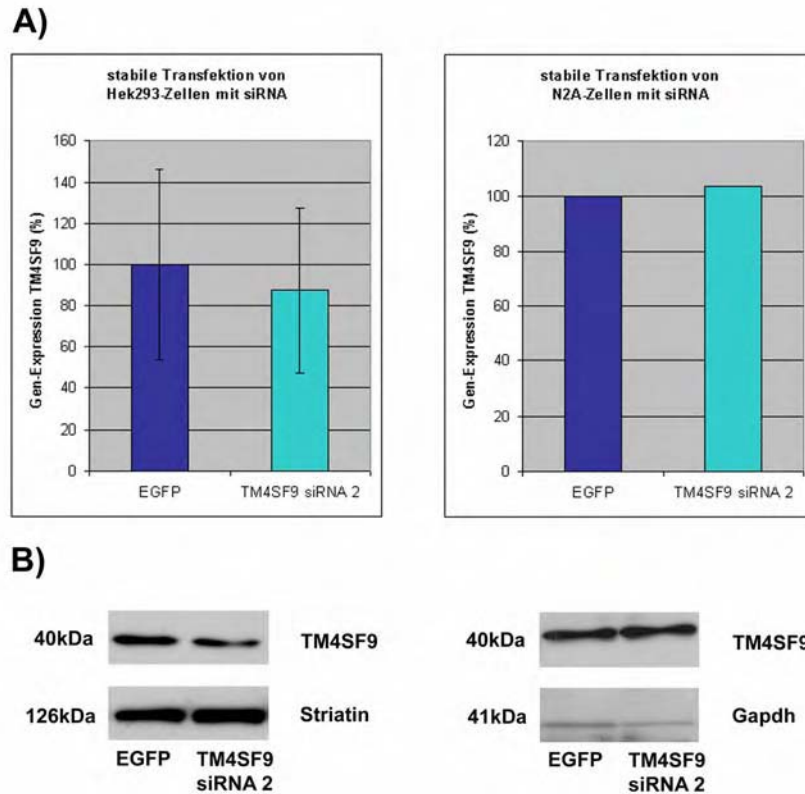


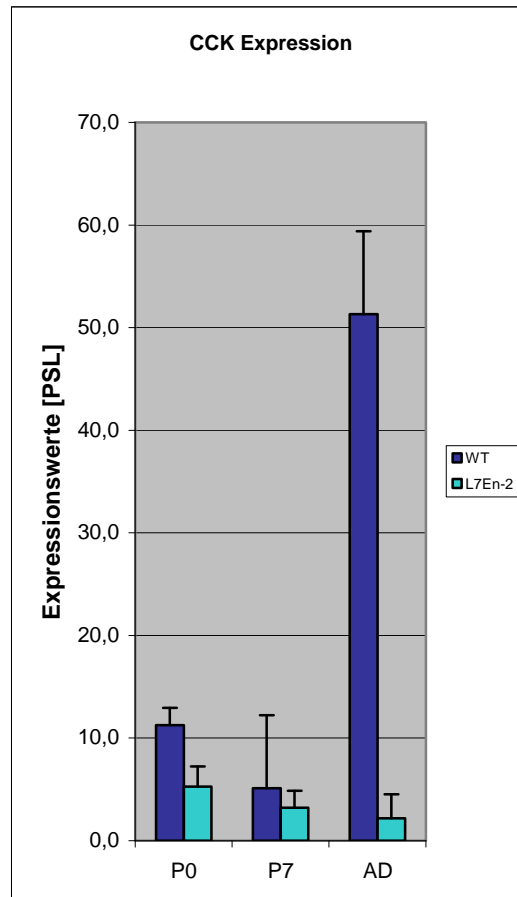
Abb. 28: Westernblot-Analyse von stabil transfizierten Hek-293 und N2A Zellen.

Hek-293 und N2A Zellen wurden mit einem siRNA Vektor (siRNA2) und einem Kontroll-Vektor (EGFP) transfiziert. Nach einer Selektion mit Zeocin wurde von Homogenaten der Zellkulturen eine Westernblot-Analyse mit einem Tetraspanin-5 Antikörper durchgeführt. Als Referenz wurde ein Antikörper gegen Striatin bzw. Gapdh eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte analog wie in Abb. 26, 27.

3.4 Analyse der Cholecystokinin Expression im Cerebellum

Cholecystokinin (CCK) ist ein Peptid, das im Magen-Darmtrakt die Freisetzung von Pankreas-Enzymen und die Kontraktion der Gallenblase induziert. Als Neuropeptid wirkt es im Zentralnervensystem als Neurotransmitter oder Neuromodulator.

CCK wurde aus den gefilterten Genen der Array-Daten ausgewählt, da es im adulten Tier einen sehr hohen DEF-Wert aufzeigte und im Kleinhirn als exprimiertes Gen beschrieben wurde. Endogen wird CCK in der ersten postnatalen Woche nur in geringen Mengen exprimiert (Abb. 29). Trotz der geringen Expression im jungen WT Tier konnte im L7En-2 Tier zum gleichen Zeitpunkt ein jeweils geringeres Signal nachgewiesen werden. Da die physiologische Expression im adulten Tier sehr hoch ist, und die in der L7En-2 Maus gering blieb, ist der hohe DEF-Wert zu diesem Zeitpunkt nachvollziehbar.



CCK	Mittelwert ± SD [PSL]	Mittelwert ± SD [PSL]	Mittelwert	Mittelwert [PSL]	DEF
	WT	L7En-2	Ratio	ABS Diff	
P0	11,3 ± 1,7	5,3 ± 2,0	0,5	6,0	-2,5
P7	5,1 ± 7,1	3,2 ± 1,6	0,6	1,9	-0,2
AD	51,3 ± 8,1	2,2 ± 2,4	0,0	49,1	-26,6

Abb. 29: CCK Array-Daten.

Expressionsdaten der Array-Analyse von CCK für die Altersstufen P0, P7 und adult. SD Standardabweichung, PSL Photo-Stimulierte-Lumineszenze.

Diese Ergebnisse konnten mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung verifiziert werden. Während für die Altersstufe P0 im WT Tier eine schwache Expression von CCK in der Purkinjzellschicht (Abb. 30) nachweisbar war, konnte bei dem L7En-2 Tier kein Signal in der Purkinjzellschicht nachgewiesen werden.

Auch bei sieben Tage alten Wildtyptieren konnte eine schwache Expression gefunden werden. Auffällig war, dass das CCK-Hybridisierungssignal regionale Unterschiede in der Signalstärke zeigte: die Expression war auf die anterioren Bereiche des Kleinhirns (Lobus I bis VIa) begrenzt. Der Vergleich zwischen dem WT und dem L7En-2 Tier ließ eine deutliche Repression von CCK in den Purkinjzellen erkennen. Um abzuklären, dass dieser Unterschied nicht auf einem unterschiedlichen Expressionsmuster in mediolateraler Richtung beruhte, wurden zum einen

mehrere Sagittalschnitte gefärbt, die alle dasselbe Ergebnis lieferten. Zum anderen wurden Frontalschnitte gefärbt, in denen sagittale Variationen der Expression demonstriert werden können. In diesen Schnittserien von Wildtyp Tieren der Altersstufe P7 konnte eine durchgehende Expression in den vermalen Bereichen des Kleinhirns festgestellt werden (Abb. 32). Nach lateral und in den tieferen Bereichen der Fissuren zeigte sich eine Abnahme der Expression.

Während der weiteren cerebellären Entwicklung konnte ein starker Anstieg im Expressionsniveau von CCK in den Purkinjezellen der Wildtyp Tiere beobachtet werden. Dieser Anstieg war nur in den CCK exprimierenden Arealen sichtbar, d. h. zwischen den Lobuli II und VIa (Abb. 30). In den posterioren Lobuli VII-IX war die Expression sehr heterogen, mit teilweise relativ gut sichtbaren Signalen benachbart von CCK negativen Zellen. In den adulten Wildtyp Tieren war die CCK-Expression in den Purkinjezellen nochmals gesteigert. Die anterioren Lobuli zeigten nun eine durchgehende Expression, während in den posterioren Lobuli Teilbereiche gefärbt waren. Unabhängig von der Region war in L7En-2 Tieren das CCK-Signal komplett reprimiert worden. Bei der Analyse der Frontalschnitte wurde deutlich, dass in den anterioren Lobuli die Expression von CCK durchgehend vorhanden war (Abb. 33, 34). Je weiter die Bereiche posterior lagen, desto stärker kam es zu einer Musterbildung, in der sich positive und negative Bereiche abwechselten. Das Färbemuster in Frontalschnitte zeigt, dass der Unterschied in der CCK-Expression zwischen WT und L7En-2 Mäusen nicht auf der Schnittausswahl beruhen konnte.

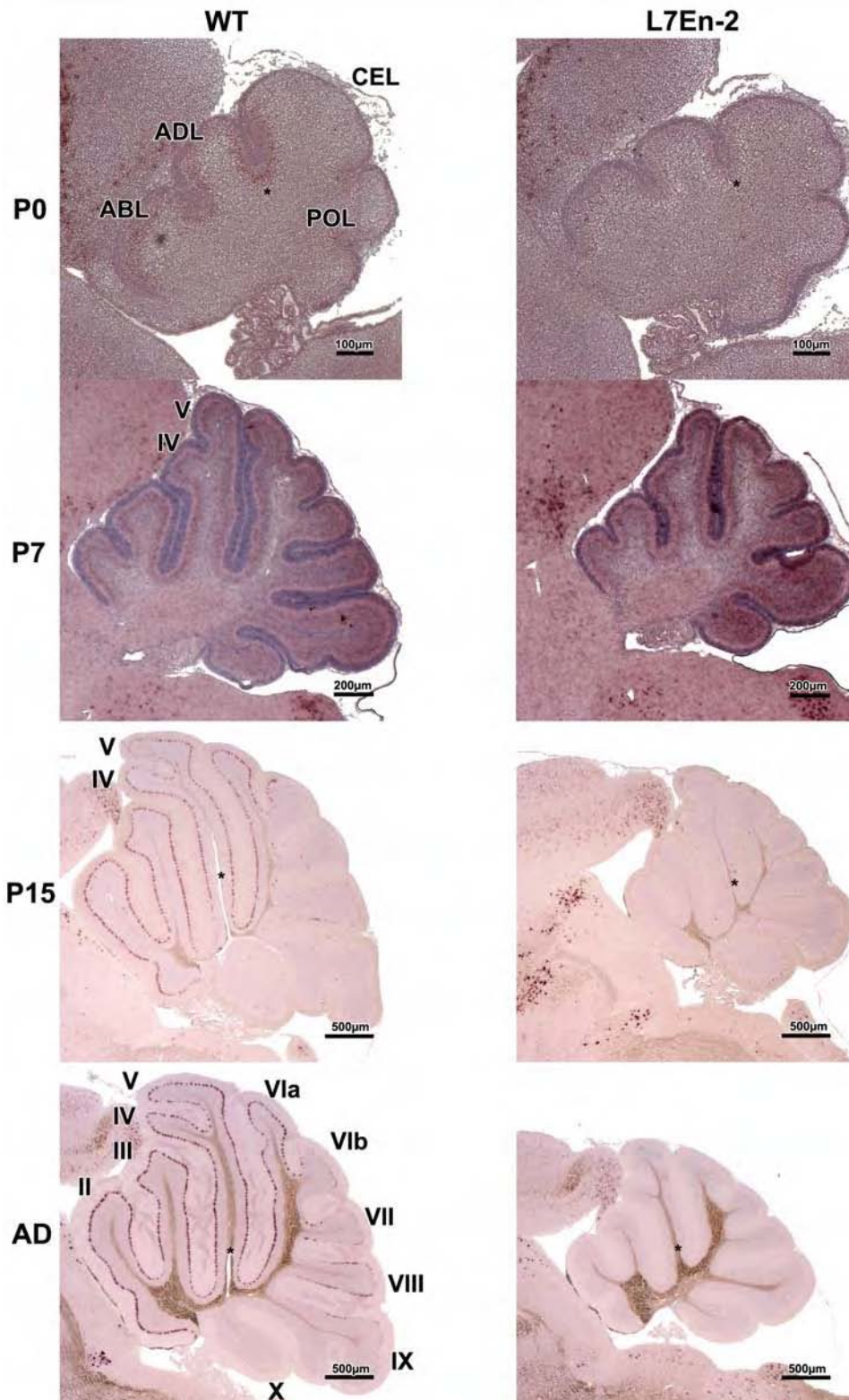


Abb. 30: CCK in situ Hybridisierung.

Nachweis der CCK mRNA durch in situ Hybridisierung an sagittalen Schnitten des Kleinhirns der Altersstufen P0, P7, P15 und adult. Die römischen Ziffern II-X bezeichnen die verschiedenen Lobuli in den WT Tieren. ABL anterobasale Lobulus, ADL anterodorsale Lobulus, CEL zentrale Lobulus, POL posteriore Lobulus.

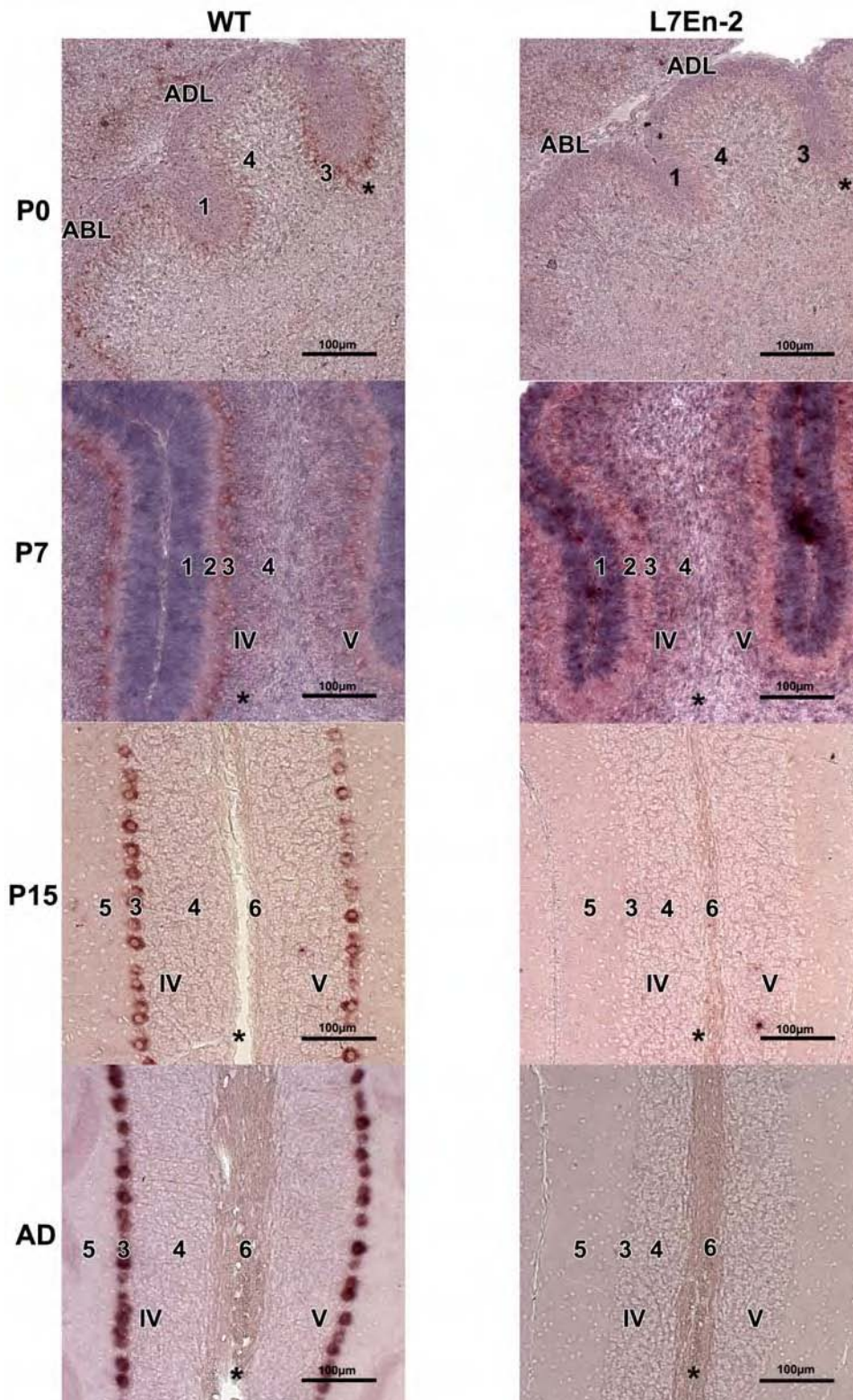


Abb. 31: Vergrößerung der CCK in situ Hybridisierungen aus Abb. 30.

Die Abbildungen zeigen Vergrößerungen der in situ Hybridisierungen aus Abb. 30. In der Altersstufe P0 aus dem Bereich ABL anterobasale Lobulus und ADL anterodorsale Lobulus, in den Altersstufen P7-AD aus dem Bereich der Lobuli IV und V. 1) äußere Körnerzellschicht, mitotisch aktiver Teil; 2) äußere Körnerzellschicht, postmitotischer Teil; 3) Purkinjezellschicht; 4) innere Körnerzellschicht; 5) Molekularschicht, 6) weiße Substanz.

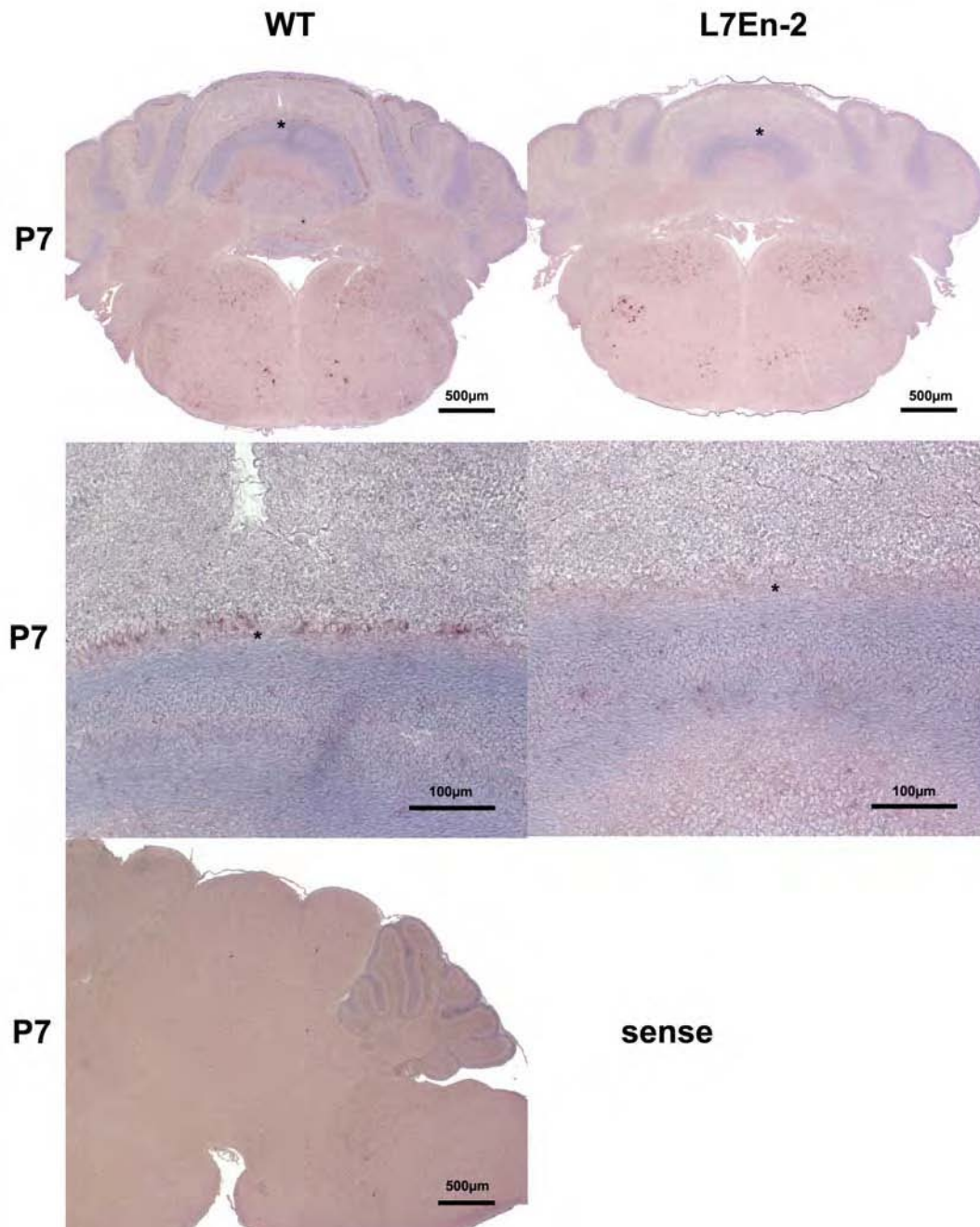


Abb. 32: CCK in situ Hybridisierung.

CCK in situ Hybridisierung an Frontalschnitten des Kleinhirns der Altersstufe P7. Die CCK positiven Zellen im Gehirnstamm belegen gleiche Hybridisierungseffizienzen bei den WT und L7En-2 Schnitten. Auf dem Sagittalschnitt wurde durch eine Sense-Sonde kein Signal erzeugt.

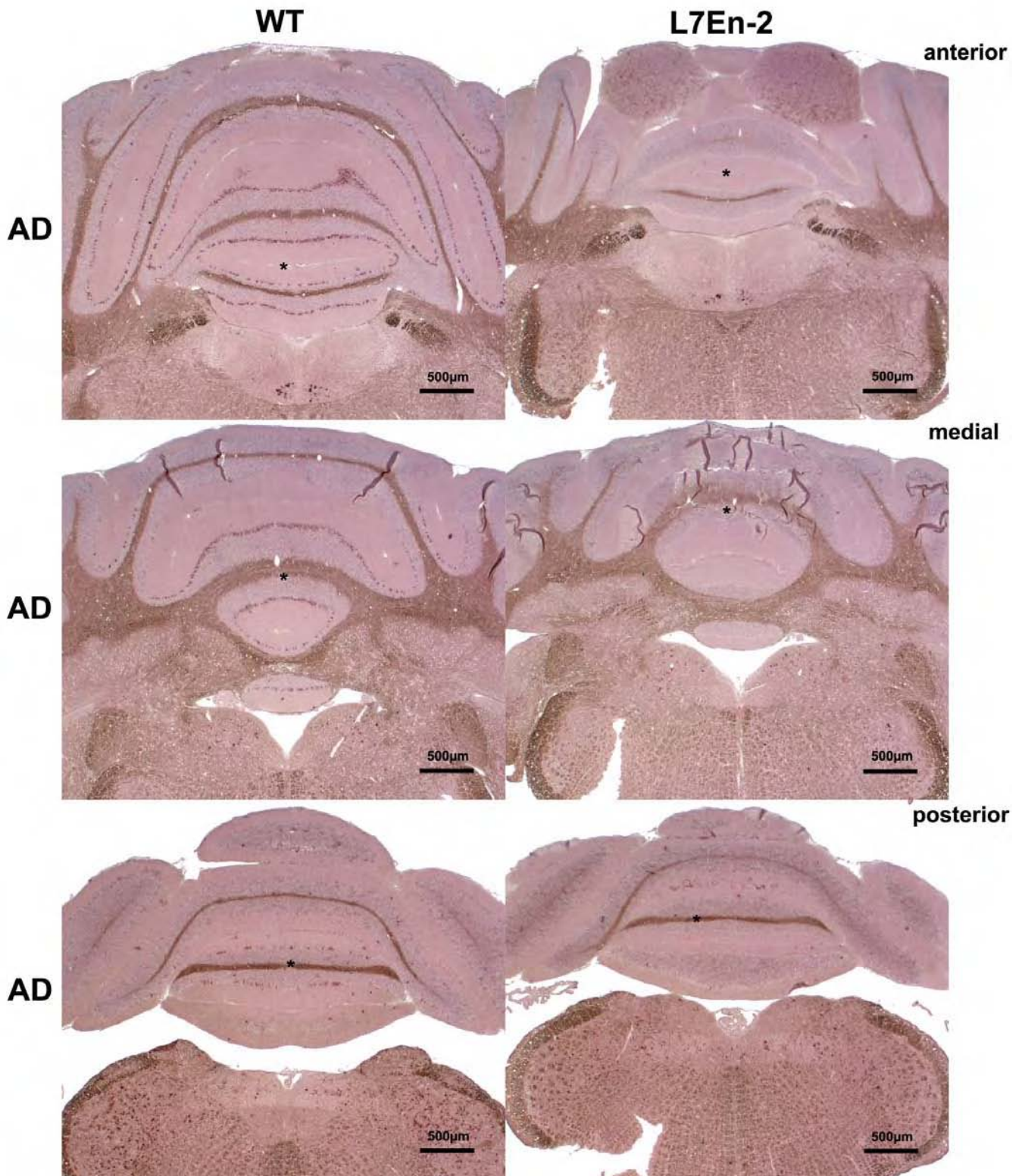


Abb. 33: CCK in situ Hybridisierung an frontalen Schnitten.
CCK in situ Hybridisierung an Frontalschnitten aus verschiedenen Bereichen des adulten Kleinhirns.

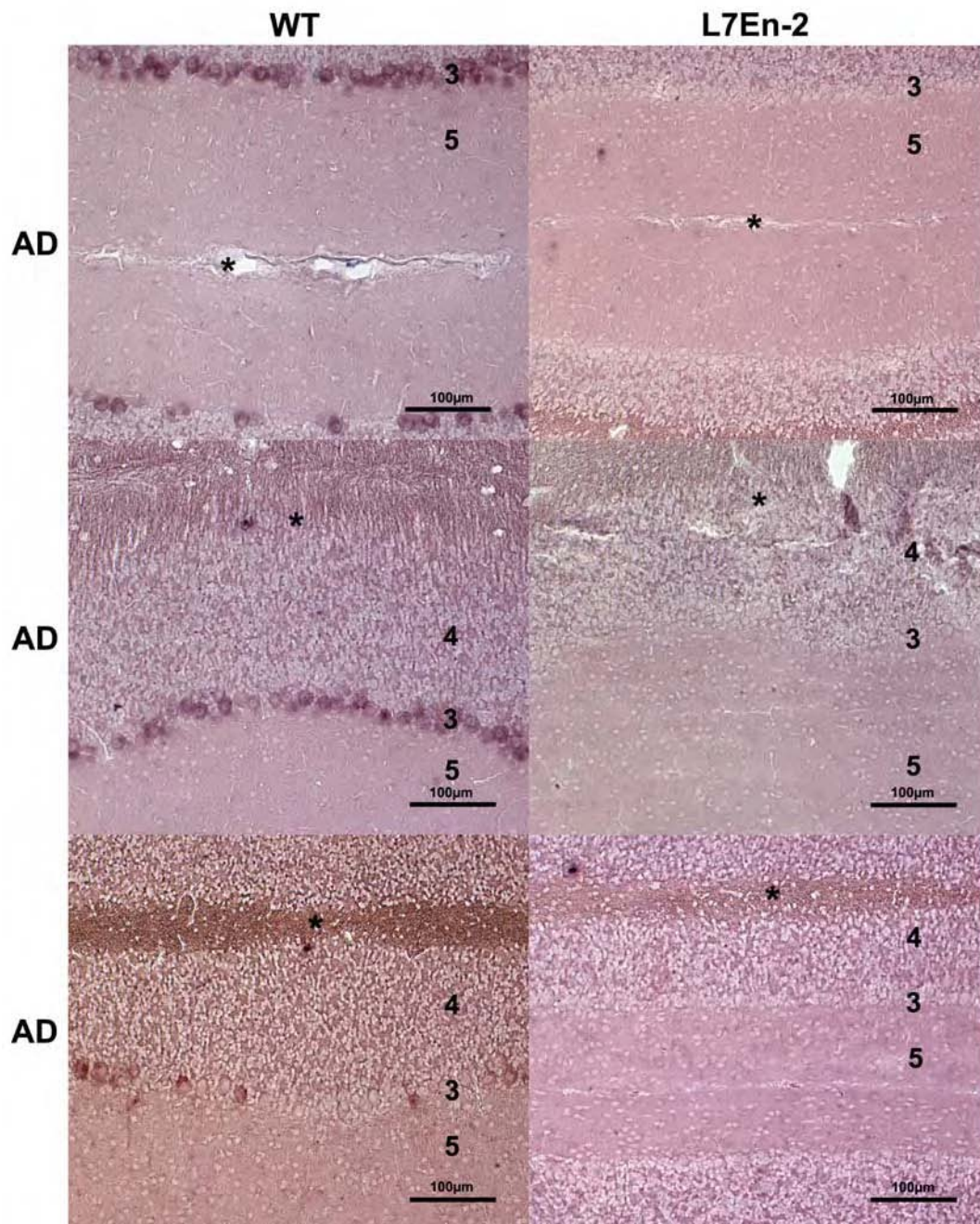
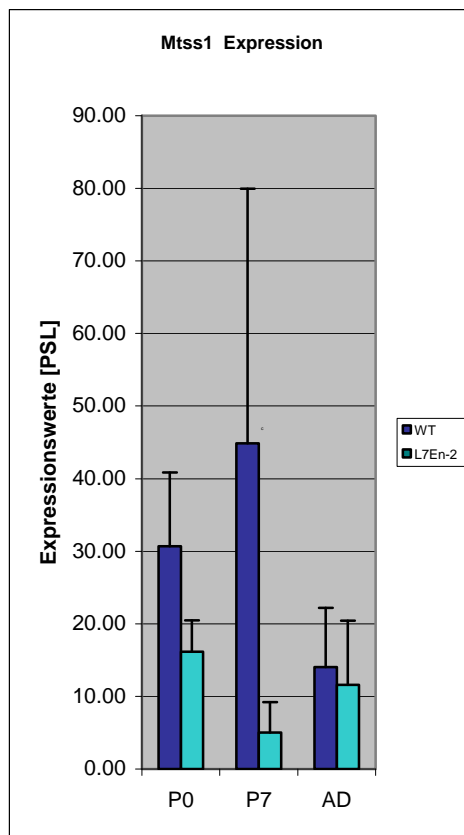


Abb. 34: Vergrößerung der CCK in situ Hybridisierung aus Abb. 33.

Sterne markieren den Herkunftsbereich aus Abb. 33. 3) Purkinjezellschicht; 4) innere Körnerzellschicht; 5) Molekularschicht.

3.5 Analyse der Metastasen Suppressorgen 1 Expression

Das Metastasen Suppressorgen 1 (Mtss1/MIM/Beg4) ist ein Aktin bindendes Protein, das an der Regulation der Aktin Zytoskelett-Dynamik beteiligt ist. Die Array-Daten zeigten für die Altersstufe P0 eine geringe Expression von Mtss1 an, mit einem kleinen Expressionsunterschied zwischen Wildtyp und L7En-2 Tieren (Abb. 35). In der Altersstufe P7 wurde ein Anstieg der Expression festgestellt. Hier zeigte sich ein deutlicher Expressionsunterschied zwischen WT und L7En-2 Tieren. In den adulten Stadien sanken die Expressionswerte wieder auf ein niedriges Niveau ab, ohne einen Unterschied zwischen WT und L7En-2 aufzuweisen.



Mtss1	Mittelwert ± SD [PSL]	Mittelwert ± SD [PSL]	Mittelwert	Mittelwert [PSL]	DEF
	WT	L7En-2	Ratio	ABS Diff	
P0	30,7 ± 10,2	16,1 ± 4,3	0,6	14,5	-1,2
P7	44,9 ± 35,1	5,0 ± 4,2	0,1	39,8	-3,6
AD	14,0 ± 8,1	11,6 ± 8,8	0,7	2,4	-0,1

Abb. 35: Mtss1 Array-Daten.

Expressionsdaten der Array-Analyse von Mtss1 für die Altersstufen P0, P7 und adult. SD Standardabweichung, PSL Photo-Stimulierte-Lumineszenze.

Die *in situ* Hybridisierung mit einer *Mtss1* spezifischen Sonde zeigte in der Altersstufe P0 eine Expression in der Purkinjzellschicht und der inneren Körnerzellschicht an (Abb. 36). Ein deutlicher Unterschied zwischen WT und L7En-2 Tieren konnte in dieser Altersstufe nicht festgestellt werden. Mit der Entwicklung stieg in der Altersstufe P7 die Expression von *Mtss1* im Cerebellum an. Ein starkes Signal zeigte sich sowohl in der inneren Körnerzellschicht, als auch in der Purkinjzellschicht. Ein schwaches Signal konnte auch in der äußeren Körnerzellschicht festgestellt werden. Eine deutliche Reduktion der Expression von *Mtss1* konnte nur in der Purkinjzellschicht der sieben Tage alten L7En-2 Tiere festgestellt werden (Abb. 37). Mit fortschreitender Entwicklung wurde in der Altersstufe P15 ein Rückgang der Expression in der inneren Körnerzellschicht sichtbar. Dagegen war ein Anstieg der Expression in der Purkinjzellschicht zu beobachten. Dieselbe Tendenz war auch in adulten Tieren zu beobachten. Bei den L7En-2 Tieren zeigte sich in den höheren Altersstufen ebenfalls eine Expression in der Purkinjzellschicht. Daraus folgt, dass im L7En-2 Tier die Expression von *Mtss1* einer Verzögerung unterliegt und mit fortschreitender Entwicklung das Niveau der Wildtyp-Expression erreicht, ähnlich dem Expressionsverhalten von Parvalbumin. Die Kontrolle mit einer Sense-Sonde ergab keine Signale.

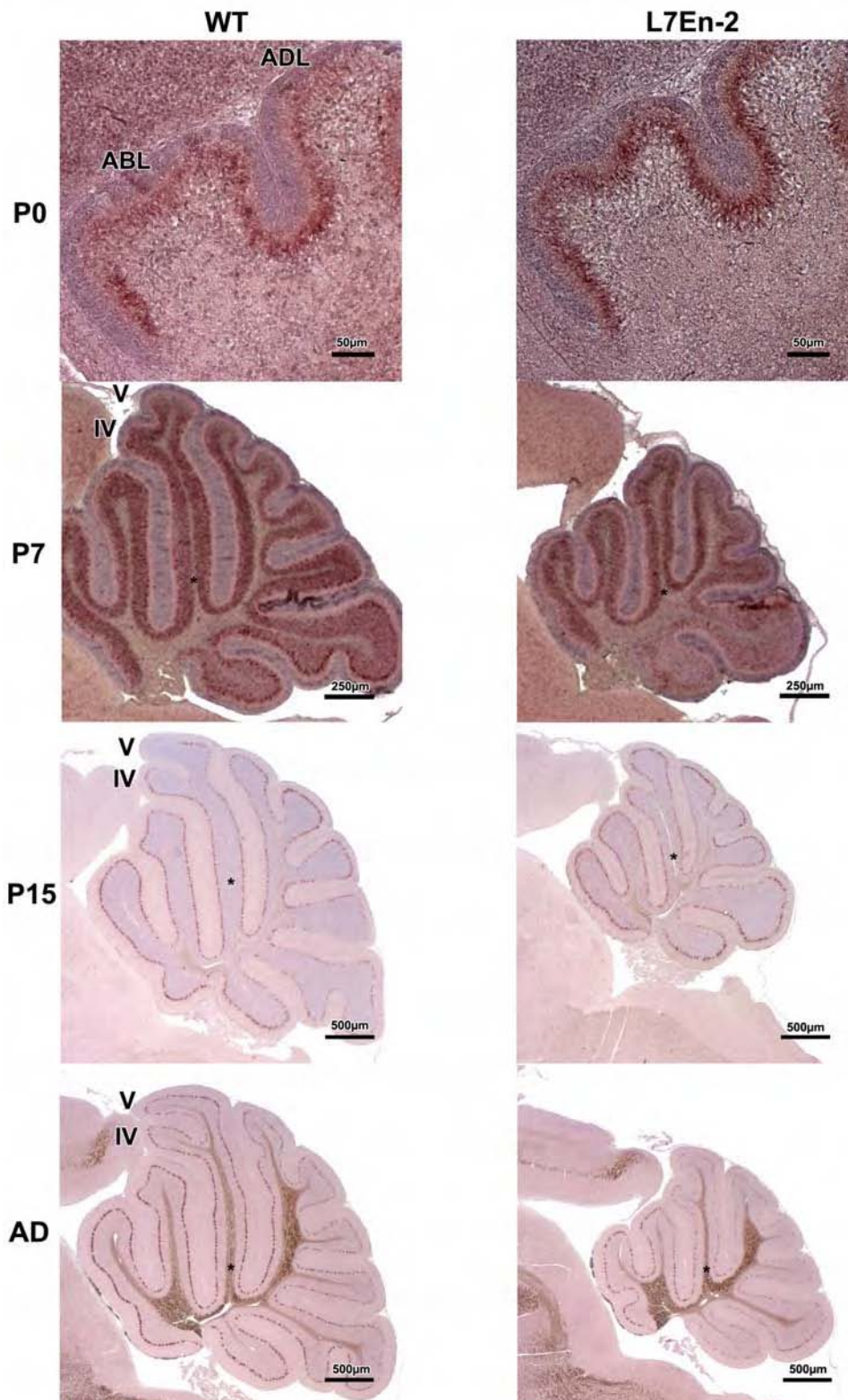


Abb. 36: Mtss1 in situ Hybridisierung.

Die Expression von Mtss1 wurde durch eine in situ Hybridisierung an sagittalen Schnitten des Kleinhirns in der Altersstufe P0, P7, P15 und adult untersucht. ABL anterobasale Lobulus, ADL anterodorsale Lobulus.

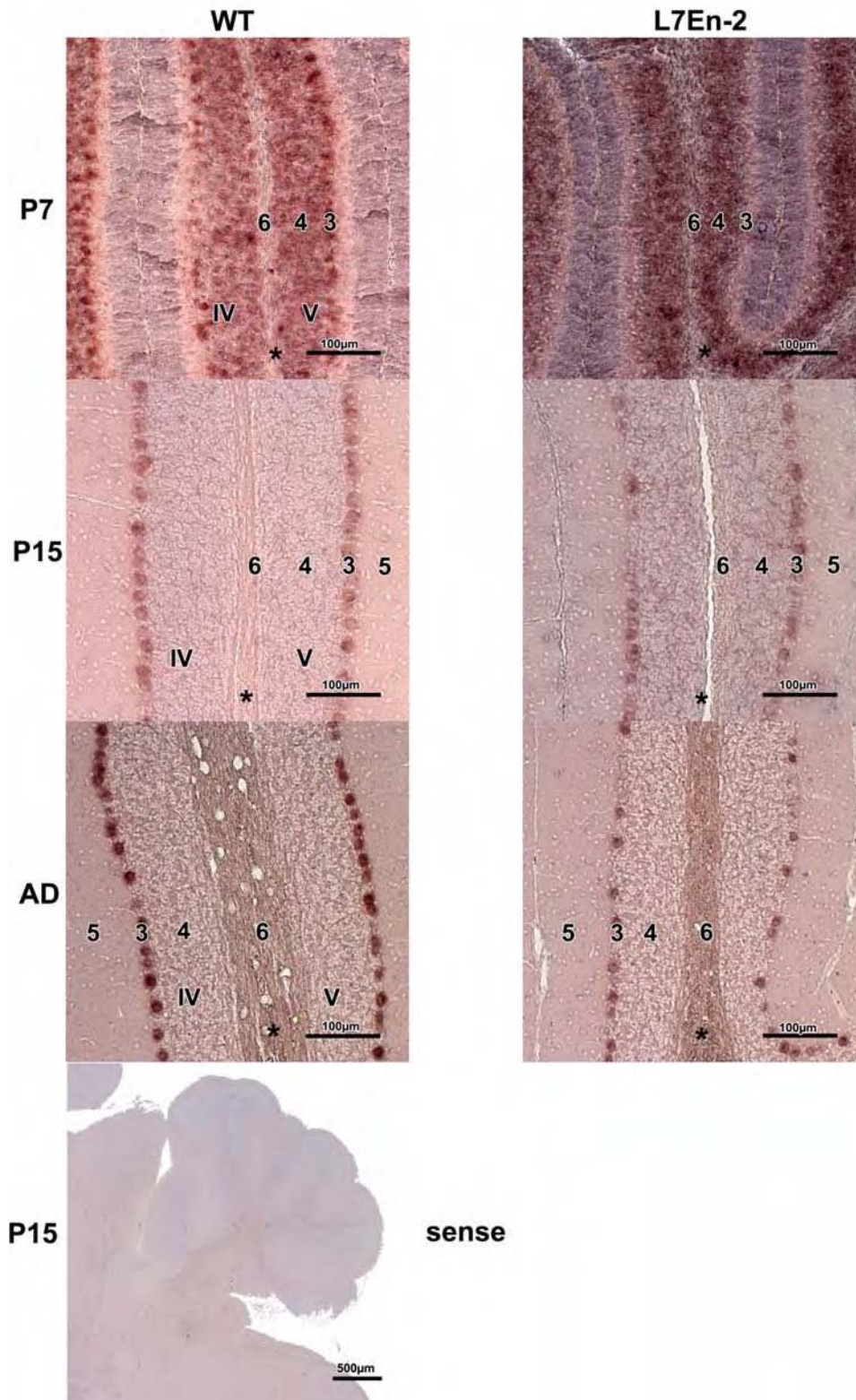


Abb. 37: Mtss1 in situ Hybridisierung.

Vergößerung der in situ Hybridisierungen aus Abb. 36. Die Schnitten der Altersstufe P7, P15 und adult zeigen den Bereich der Lobuli IV-V. 3) Purkinjzellschicht; 4) innere Körnerzellschicht; 5) Molekularschicht, 6) weiße Substanz. Der sagittale Schnitt der Altersstufe P15 wurde mit einer Mtss1 sense Sonde behandelt.

3.6 Analyse von Signalmolekülen des Semaphorin 3A Signalweges

3.6.1 Analyse der Semaphorin 3A Expression

Semaphorin 3A wurde nicht aufgrund der Array-Daten als differenziell exprimiertes Gen ausgesucht, sondern basierend auf seinen bekannten Funktionen, die mit dem beobachteten L7En-2 Phänotyp in vielen Punkten korrelieren. Semaphorin 3A (Sema3A) gehört zu einer großen Familie von Signalmolekülen, die entweder als sezernierte oder als membranständige Proteine interzelluläre Kommunikation vermitteln. Sie steuern im Wesentlichen Prozesse des axonalen und dendritischen Wachstums und der axonalen Wegfindung während der Entwicklung definierter Areale des Nervensystems (Goshima et al., 2002). In L7En-2 Tieren ist die axonale Wegfindung und die parasagittale Kompartimentierung beeinträchtigt (Baader et al., 1999) und zudem ist ein Einfluss von Engrailed-2 auf die Dendritogenese der Purkinjezellen beschrieben (Jankowski et al., 2004). Außerdem ist bekannt, dass Semaphorin 3A im Kleinhirnkortex exprimiert wird (Rabacchi et al., 1999); eine Funktion ist bisher aber nicht nachgewiesen worden. Da die Expression von Semaphorin 3A sehr niedrig, und nicht auf Purkinjezellen beschränkt ist, könnte die Sensitivität des Arraysystems für den Nachweis einer differenziellen Expression dieses Gens nicht ausreichen. Deswegen haben wir die Expression trotz der wenig aussagekräftigen Array-Ergebnisse mittels *in situ* Hybridisierung in Wildtyp- und L7En-2 Tieren verglichen.

Die Analyse der Array-Daten zeigte wie erwartet eine geringe Expression bei jungen Altersstufen (P0) mit einem leichten Anstieg während der ersten Postnatalwoche. Ein, wenn auch geringer, Unterschied in der Expressionsstärke zwischen WT und L7En-2 Tieren war nur im adulten Tier nachzuweisen (Tab. 26).

Sema3A	Mittelwert \pm SD [PSL]	Mittelwert \pm SD [PSL]	Mittelwert	Mittelwert [PSL]	DEF
	WT	L7En-2	Ratio	ABS Diff	
P0	51,1 \pm 4,8	53,8 \pm 6,1	1,1	2,7	0,03
P7	135,1 \pm 34,7	135,6 \pm 70,5	1	30	0
AD	142,4 \pm 20,1	113,8 \pm 61,2	0,8	28,6	-0,1

Tab. 26: Array-Expressionsdaten von Semaphorin 3A, SD Standardabweichung, PSL Photo-Stimulierte-Lumineszenze.

Konsistent mit Literaturdaten war die Expression des Semaphorin 3A im Kleinhirn im Vergleich zur Parvalbumin Expression sehr niedrig. Dies machte sich in einer sehr langen Inkubationszeit bei der Färbereaktion bemerkbar. Während bei Parvalbumin bereits nach 2 Tagen sehr starke Signale vorhanden waren, dauerte die Inkubation bei Semaphorin 3A bis zu 6 Tagen.

Eine schwache Expression von Semaphorin 3A konnte in der Purkinjezellschicht von neugeborenen Mäusen (P0) festgestellt werden, es zeigte sich jedoch kein Expressionsunterschied zwischen WT und L7En-2 Tieren. Mit der Zunahme der Semaphorin 3A-Expression in sieben Tage alten Tieren war dann aber ein Unterschied in der Expression zwischen WT und L7En-2 Tieren in den anterioren Lobuli II bis IV auffällig (Abb. 38, P7, Lobulus IV). Dieser Expressionsunterschied konnte auch in frontalen Schnitten beobachtet werden (Abb. 39). Der Unterschied in der Expression blieb bis in das adulte Stadium erhalten (Abb. 38). Die Negativkontrolle mit einer Semaphorin 3A sense Sonde zeigte keine Signale (Abb. 39).

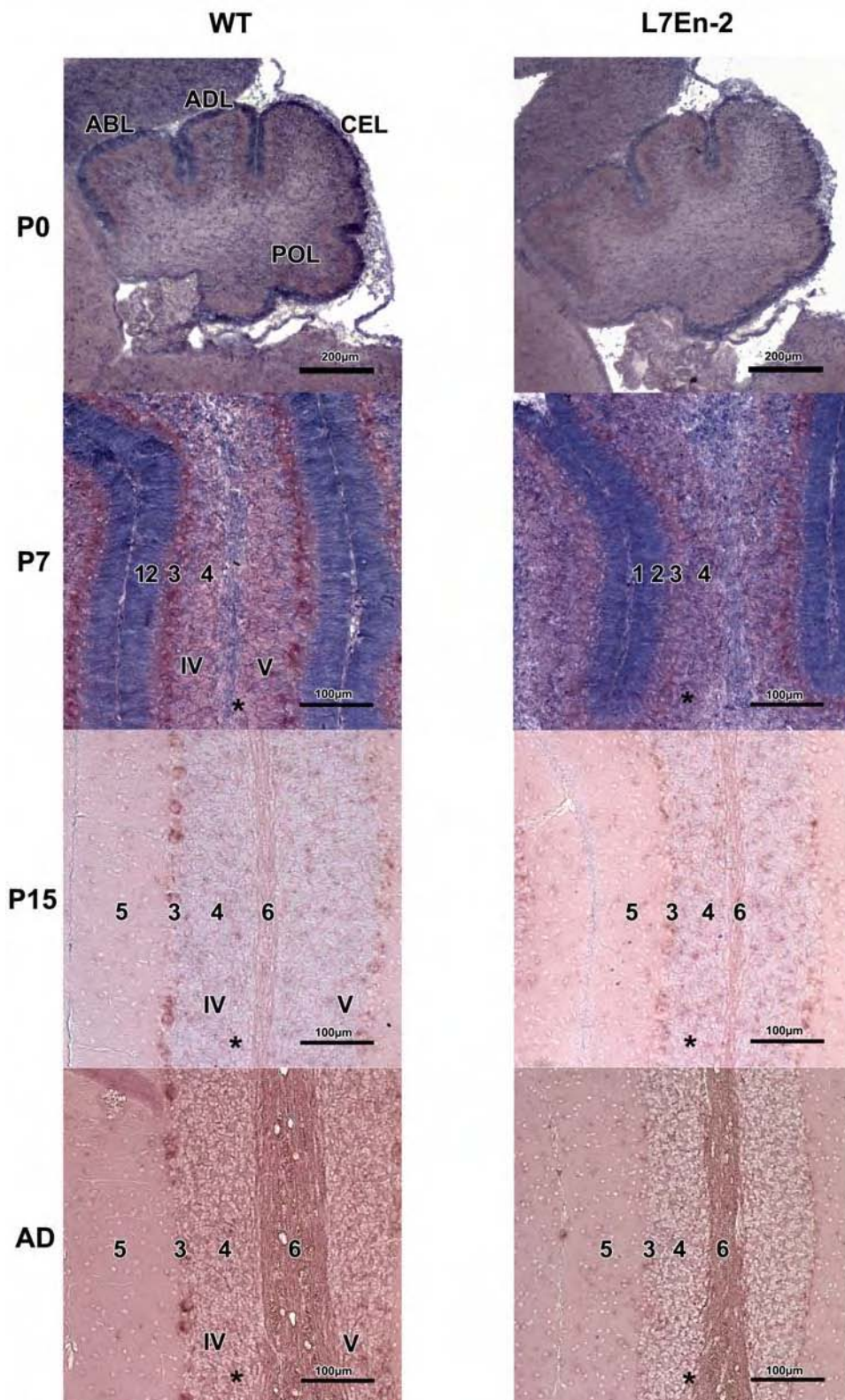


Abb. 38: Semaphorin 3A in situ Hybridisierung.

Die Expression von Semaphorin 3A wurde mit einer digoxigenin markierten in situ Sonde auf sagittalen Schnitten von Kleinhirnen in den Altersstufen P0, P7, P15 und adult (AD) nachgewiesen. Die Schnitte der Altersstufe P7 bis AD zeigen Vergrößerungen des Kleinhirns im Bereich der Lobuli IV-V. 1) äußere Körnerzellschicht, mitotisch aktiver Teil; 2) äußere Körnerzellschicht, postmitotischer Teil; 3) Purkinjenzellschicht; 4) innere Körnerzellschicht; 5) Molekularschicht, 6) weiße Substanz, ABL anterobasale Lobulus, ADL anterodorsale Lobulus, CEL zentrale Lobulus, POL posteriore Lobulus.

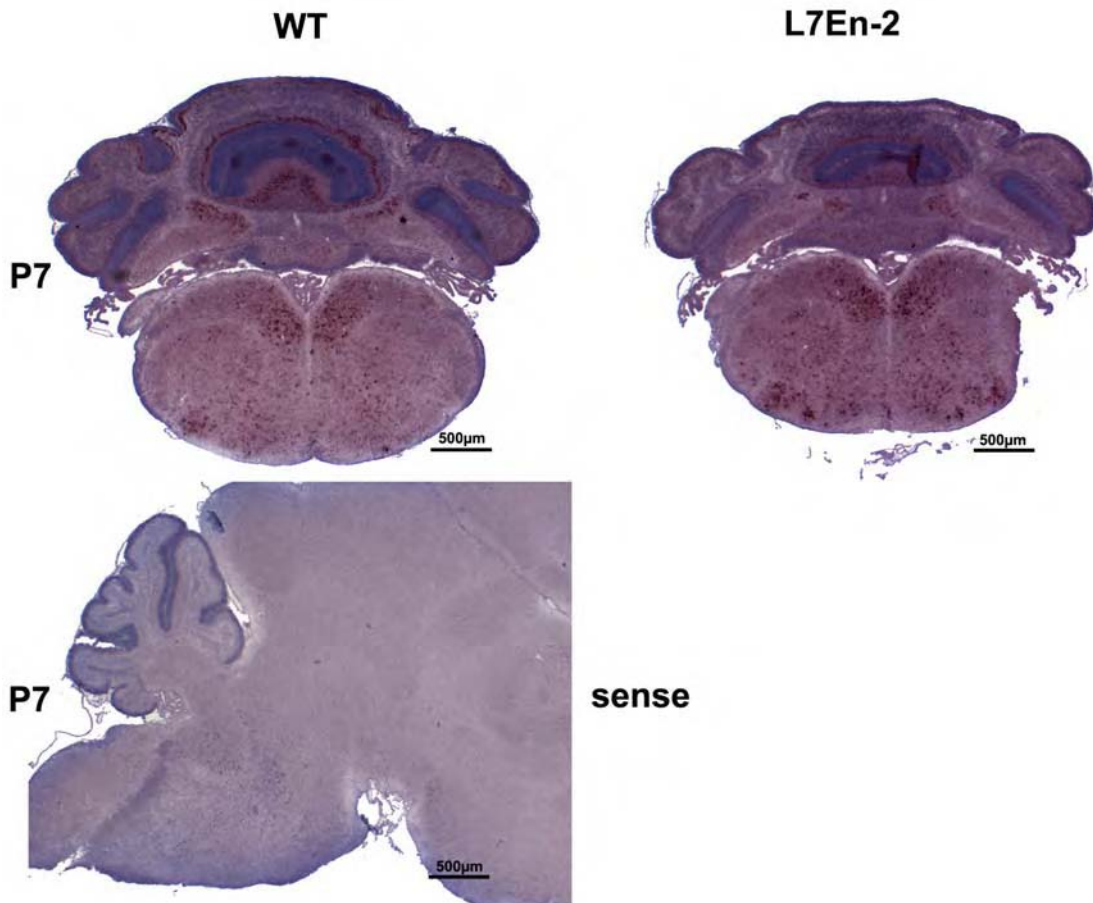


Abb. 39: Semaphorin 3A in situ Hybridisierung.

In situ Hybridisierung mit einer Sema3A Sonde an frontalen Schnitten des Kleinhirns in der Altersstufe P7. Der P7 WT Sagittalschnitt wurde mit einer Sema3A Sense Sonde behandelt.

3.6.2 Expression von Neuropilin-1 und CRMP 5, Mediatoren im Semaphorin 3A Signaltransduktionsweg

Semaphorin 3A Signale werden durch das Sema3A-Rezeptor-Komplexmolekül Neuropilin-1 und das Collapsin Response Mediator Protein 5 (CRMP 5), das intrazellulär eine modifizierende Wirkung auf das Aktinzytoskelett ausübt, vermittelt.

Um einen Anhaltspunkt zu bekommen, ob Sema3A im cerebellären Cortex eine Funktion ausüben kann, wurde die Expression dieser Moleküle untersucht. Durch einen immunhistochemischen Nachweis mit einem Antikörper gegen Neuropilin-1 konnte eine Expression im Cerebellum an Vibratomschnitten von Wildtyp Tieren (P9) nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein deutliches Signal in der Molekularschicht mit den migrierenden postmitotischen Körnerzellen (Abb. 40).

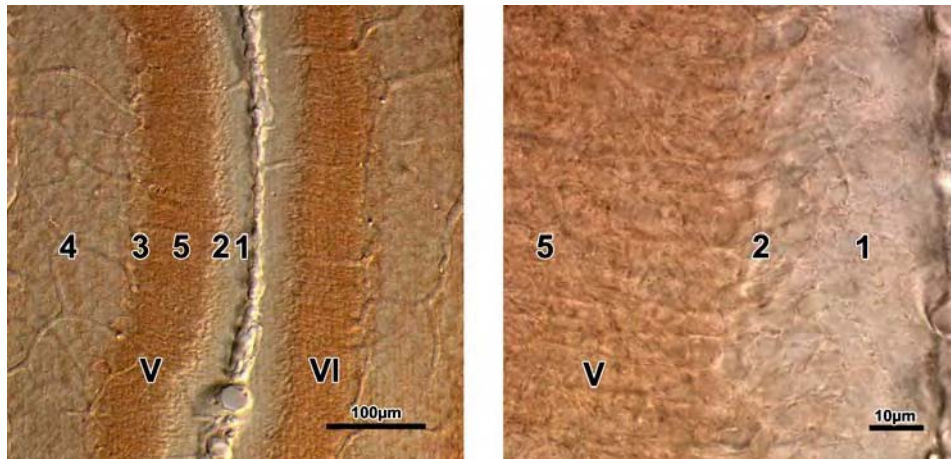


Abb. 40: Neuropilin-1 Expression im Cerebellum.

Auf Vibratomschnitten von Wildtyp Tieren (P9) wurde mit einem Antikörper die Expression von Neuropilin-1 untersucht. Der Ausschnitt zeigt den Bereich des Kleinhirns mit den Lobuli V-VI. 1) äußere Körnerzellschicht, mitotisch aktiver Teil; 2) äußere Körnerzellschicht, postmitotischer Teil; 3) Purkinjzellschicht; 4) innere Körnerzellschicht, 5) Molekularschicht

Die Array-Daten (Tab. 27) von CRMP 5 deuten auf eine Reduktion der CRMP 5 Expression in den L7En-2 Tieren in der Altersstufe P0 hin.

CRMP 5	Mittelwert \pm SD [PSL]	Mittelwert \pm SD [PSL]	Mittelwert	Mittelwert [PSL]	DEF
	WT	L7En-2	Ratio	ABS Diff	
P0	56,2 \pm 4,4	22,2 \pm 18,1	0,4	42,5	-2,3
P7	73,6 \pm 40,7	58,1 \pm 41,6	0,8	43,9	-0,3
AD	30,0 \pm 24,8	25,2 \pm 9,0	0,9	10,1	-0,1

Tab. 27: CRMP-5 Array-Expressionsdaten, SD Standardabweichung, PSL Photo-Stimulierte-Lumineszenze.

Dieser Expressionsunterschied konnte jedoch nicht durch die in situ Hybridisierung bestätigt werden (Abb. 41). Die Sense-Sonde erzeugte ein starkes Hintergrundsignal, das aber Unterschiede zu dem Antisense-Signal zeigte.

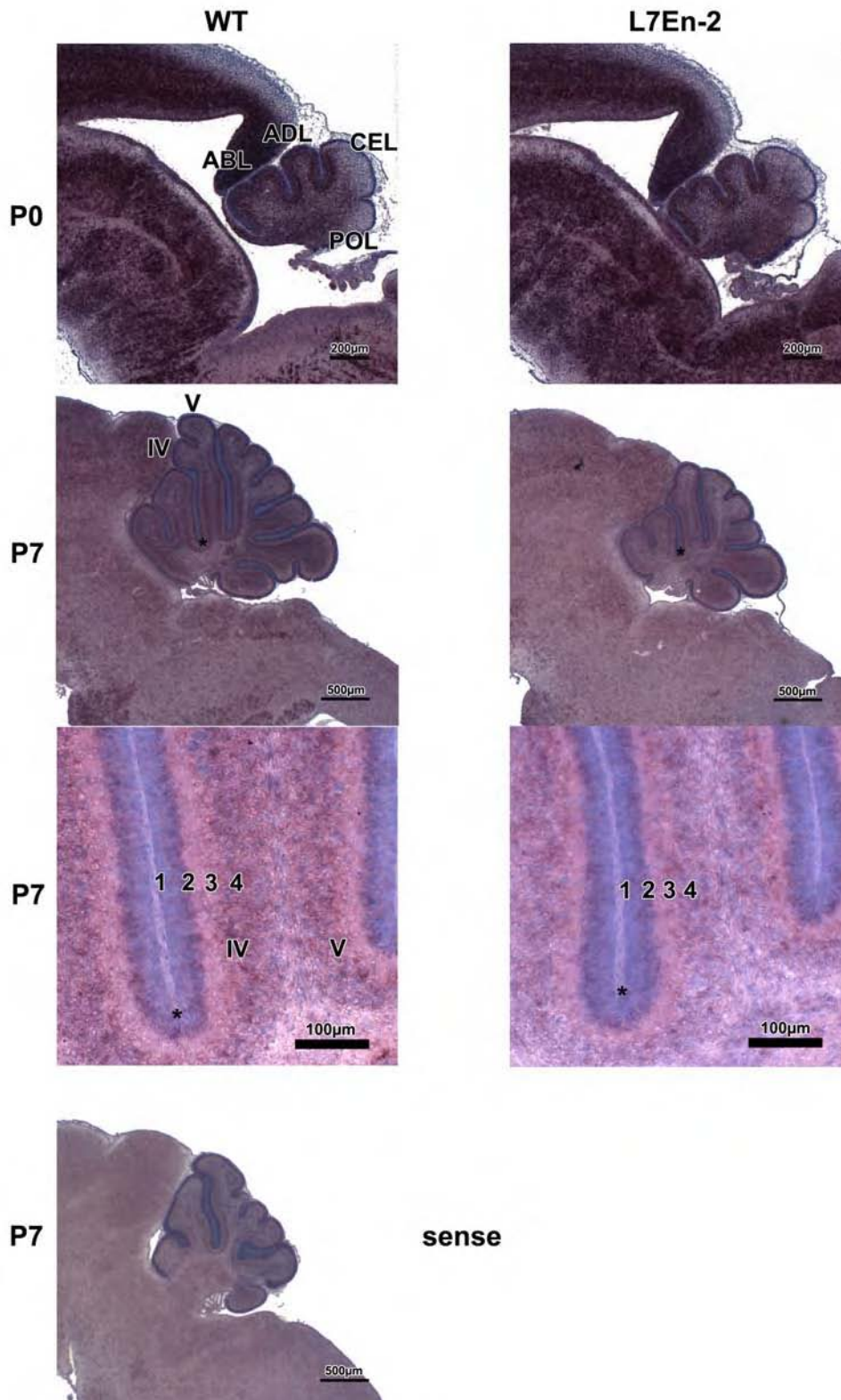


Abb. 41: CRMP 5 in situ Hybridisierung.

Die Expression von CRMP-5 wurde mit einer digoxigenin markierten in situ Sonde auf sagittalen Schnitten von Kleinhirnen in den Altersstufen P0 und P7 untersucht. Die Vergrößerung der Schnitte der Altersstufe P7 zeigen den Bereich der Lobuli IV-V. 1) äußere Körnerzellschicht, mitotisch aktiver Teil; 2) äußere Körnerzellschicht, postmitotischer Teil; 3) Purkinjezellschicht; 4) innere Körnerzellschicht, ABL anterobasale Lobulus, ADL anterodorsale Lobulus, CEL centrale Lobulus, POL posteriore Lobulus.

Auch wenn kein Unterschied zwischen WT und L7En-2 mit der *in situ* Hybridisierung festgestellt werden konnte, so gibt das Expressionsmuster von CRMP 5 einen möglichen Hinweis auf die Bedeutung der Funktion von Semaphorin 3A im Cerebellum. Das cytosolische Protein CRMP 5 wird interessanterweise in den postmitotischen Körnerzellen exprimiert, die mit der Migration aus der äußeren Körnerzellschicht in die inneren Körnerzellschicht beginnen. Nicht aber in dem proliferativen äußeren Anteil der äußeren Körnerzellschicht (Ricard et al., 2001; Fukada et al., 2000). Diese Expressionsmuster von CRMP 5 und von Neuropilin-1 in der äußeren Körnerzellschicht führte mich zu der Fragestellung, ob Semaphorin 3A einen Einfluss auf die Migration der Körnerzellen von der äußeren in die innere Körnerzellschicht hat.

3.6.3 Einfluss von Semaphorin 3A auf die Migration von Körnerzellen

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Migration von Körnerzellen unter dem Einfluss von Semaphorin 3A in Zellkulturen untersucht. Hierzu wurden von fünf neugeborenen Wildtyp Mäusen organotypische Schnittkulturen des Kleinhirns zusammen mit Clustern von Hek-293 Zellen inkubiert, die Semaphorin 3A gekoppelt an eine alkalische Phosphatase in das Kulturmedium sezernierten. Als Kontrolle dienten Hek-293 Zellen, die nur die alkalische Phosphatase produzierten.

Für die Messung der gerichteten Wanderung wurden die Schnittkulturen durch eine Linie in zwei Hälften geteilt, deren eine Hälfte zur Semaphorin 3A Quelle zeigte, die andere Hälfte lag auf der abgewandten Seite (Abb. 42). Dann wurden konzentrische Kreise um die Schnittkultur gelegt und in den einzelnen Kreissegmenten die Flächen gemessen, die von ausgewanderten Zellen eingenommen wurden und in Relation zur Gesamtfläche dieser Kreissegmente gesetzt. Werte, die von den Hek-293 Zellen zugewandten Flächen stammten, wurden als positiv Werte definiert, und solche, die auf der entgegengesetzten Seite ermittelt wurden, als negativ bewertet.

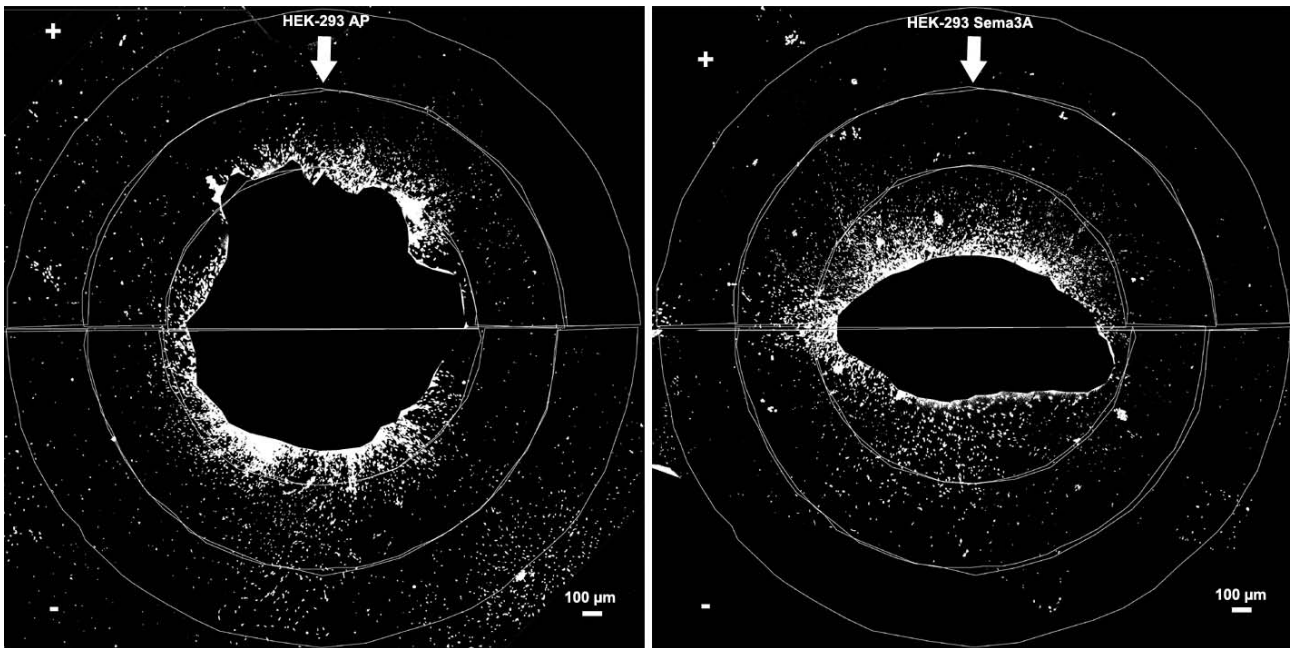


Abb. 42: Migration von Körnerzellen unter dem Einfluss von Semaphorin 3A.

Von neugeborenen Wildtyp Mäusen (n=5) wurden Schnitte des Kleinhirns unter dem Einfluss von Semaphorin 3A (Sema3A) oder der alkalischen Phosphatase (AP) kultiviert. Sema3A und AP wurde von Hek-293 produziert, die mit den Schnitten kokultiviert wurden. Die Pfeile zeigen die Richtung an, aus der das Semaphorin 3A / AP Signal kommt.

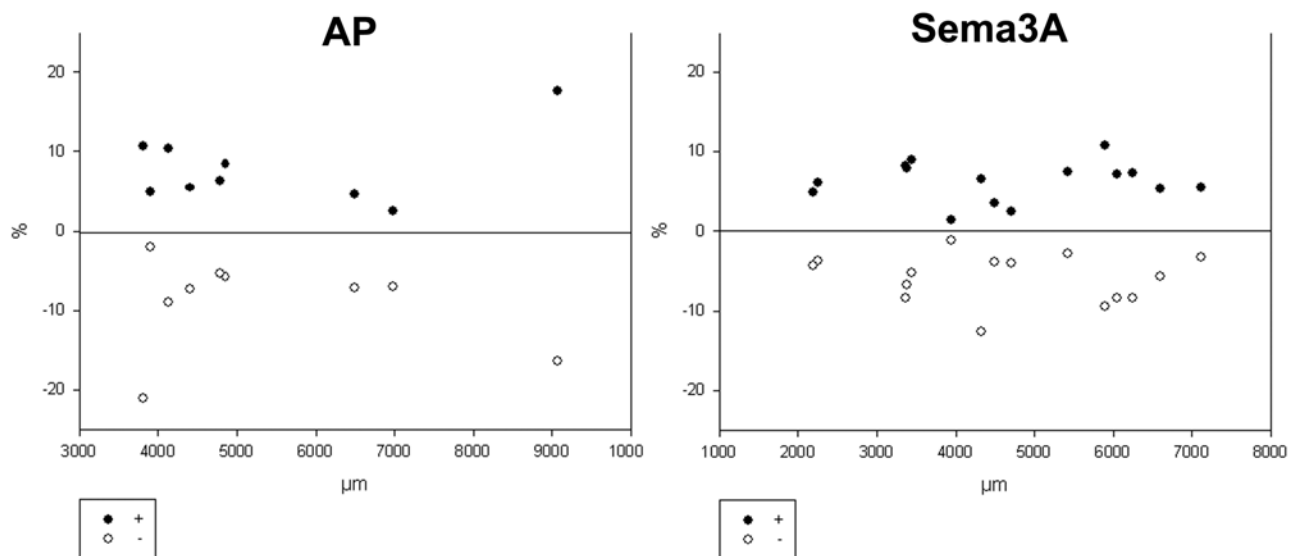


Abb. 43: Auswertung der Körnerzellmigration unter Sema3A Einfluss.

In einem definierten Bereich um die Schnitte wurde die prozentuale Fläche gemessen, die von den ausgewanderten Zellen eingenommen wurde (AP n=9; Sema3A n=15). Auf der den Hek-293 Zellen zugewandten Seite wurden die Werte mit positivem Vorzeichen markiert, Zellen die auf der gegenüberliegenden Seite aus dem Schnitt ausgewandert waren, wurden mit negativen Werten gekennzeichnet. Die prozentualen Werte wurden gegen die Entfernung der Schnitte von den Hek-293 Zellen im Diagramm aufgetragen.

Die Auswertung der AP-Daten zeigte eine gleichmäßige Verteilung der Werte auf der positiven und der negativen Seite (Abb. 43). Die Sema3A-Daten zeigten ebenfalls eine gleichmäßige Verteilung der Werte auf den beiden Seiten. Auch der Abstand der cerebellären Schnittkulturen von den Sema3A produzierenden Hek-293 Zellen spielte für das Wanderungsverhalten der Körnerzellen

keine Rolle. Durch eine statistische Auswertung mit einem Mann-Whitney U-Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den AP-Daten und den Sema3A-Daten festgestellt werden ($P=0.633$). Dies könnte bedeuten, dass Semaphorin 3A tatsächlich keinen Einfluss auf die Migration von Körnerzellen hat. Allerdings ist zu bedenken, dass das Sema3A in unserem Testsystem frei diffundieren kann und damit eine gleichmäßige Auswanderung um den Slice resultiert. Es zeigte sich aber auch kein Unterschied im Wanderungsverhalten zwischen Semaphorin 3A und AP behandelten Kulturen. Trotzdem können technische Probleme noch nicht ausgeschlossen werden, und andere Systeme zur Untersuchung der gerichteten Wanderung nötig machen.

3.7 Differenziell exprimierte Gene mit einer Assoziation zum Autismus Syndrom

Aufgrund der vermehrten Hinweise, dass Engrailed mit dem Auftreten von autistischen Symptomen assoziiert ist (Gharani et al., 2004), wurden die differenziell exprimierten Gene mit Autismus assoziierten Genen verglichen (Wassink et al., 2004). Von den 89 postulierten Autismus-Kandidatengenen konnten acht Gene identifiziert werden, die möglicherweise auch in der L7En-2 Maus einer Veränderung in der Genexpression aufweisen ($DEF >1$ oder < -1).

<i>Gene</i>	<i>Name</i>	<i>P0</i>	<i>P7</i>	<i>AD</i>
ApoE	Apolipoprotein E	0.8/-0.2	1.7/3.6	1.2/0.3
Avpr1a	Arginine vasopressin receptor 1A	1.1/0.0	1.5/1.3	1.1/0.1
Hoxb1	Homeo box B1	0.5/-2.7	1.1/0.0	0.9/-0.1
Mecp2	Methyl CpG binding protein 2	1.3/0.5	0.6/-1.0	0.9/0.0
Nf2	Neurofibromatosis 2	1.0/0.0	2.4/1.8	2.7/0.7
Rab3a	RAB3A, member RAS oncogene family	0.7/-1.9	1.3/0.6	1.1/0.1
St7	Suppression of tumorigenicity 7	0.6/-1.3	0.1/-2.5	1.0/0.0
Slc6a4	Solute carrier family 6 (serotonin transporter), member 4	0.7/-0.1	0.4/-1.4	1.9/1.8

Tab. 28: Array-Daten der Autismus assoziierten Gene.

Dargestellt sind die Expressionsverhältnisse und DEF Werte für ASD Gene, die im L7En-2 Kleinhirn als differenziell exprimiert gefunden wurden.

3.8 Funktionelle Klassifizierung und statistische Analyse der differenziell exprimierten Gene

Die Ursachen für die Entwicklungsstörung des Kleinhirns der L7En-2 Maus beruhen auf Veränderungen des Genexpressionsmusters bedingt durch die Überexpression von Engrailed-2. Durch eine Analyse der zugrunde liegenden biologischen Prozesse sollte überprüft werden, ob der Zusammenhang zwischen den beteiligten Genen und dem Phänotyp dargestellt werden kann.

Um eine Aussage über die biologische Bedeutung der Genexpressionsmuster zu erhalten, müssen die regulierten Gene mit biologischen Eigenschaften korreliert werden. Die Gene Ontology Datenbank (GO) stellt ein standardisiertes System zur Annotierung von Genen zur Verfügung (Ashburner et al., 2000). Jedes Gen wird seiner Funktion entsprechend in eine oder mehrere Untergruppen der Kategorien biologische Prozesse, molekulare Funktion und zelluläre Lokalisation einsortiert.

Mit Hilfe von Analyseprogrammen können die Annotierungen statistisch ausgewertet werden. Diese Programme analysieren, ob ein bestimmtes Set von Genen einer Kategorie im Vergleich zur Gesamtzahl der Gene dieser Kategorie statistisch signifikant überrepräsentiert ist. Die Analyse wurde mit dem Programm GFINDER durchgeführt (Masseroli et al., 2004; Masseroli et al., 2005).

Das GFINDER Programm lieferte eine Tabelle mit den GO-Kategorien, in denen die Gene signifikant überrepräsentiert waren. Häufig wurden Gene in mehrere verschiedene Kategorien eingeordnet oder sie kamen in untergeordneten Ebenen der einzelnen Kategorien mehrfach vor.

Da die Ergebnisse dieser Analyse, mit allen Kategorien und Unterkategorien, sehr detailliert waren, wurden die einzelnen Kategorien basierend auf der GO-Struktur in übergeordnete Gruppen zusammengefasst. Dabei wurden Gene, die in mehr als einer Unterkategorie vorkamen in der entsprechenden übergeordneten Gruppe nur einfach gezählt (Tab. 29). Eine detaillierte Tabelle findet sich im Anhang (5.1.7, Tab. 31).

Name	Funktion	P0	P7	AD	Name	Funktion	P0	P7	AD
Akap10	protein localization		0.0/-3.5		Lpgat1	lipid metabolism		0.5/-2.1	
Arhgap17	protein localization	0.5/-1.0		0.3/-10.1	Pla2g4a	lipid metabolism		0.0/-6.9	
Cog3	protein localization		3.2/2.4		Pnlip	lipid metabolism		0.1/-3.8	
Ii	protein localization		3.8/2.8		Slc5a1	lipid metabolism		0.4/-4.5	
Napa	protein localization		0.5/-0.7		Arhgap17	organization/biogenesis	0.5/-2.0		0.3/-10.1
Oxa11	protein localization		0.3/-2.6		Epb4.112	organization/biogenesis		0.6/-0.4	
Rab22a	protein localization		0.2/-5.0		Epb4.113	organization/biogenesis		0.5/-1.0	
Rab32	protein localization		2.6/2.6		Peci	organization/biogenesis		2.2/1.2	
Rab35	protein localization		2.0/6.0		Pex11a	organization/biogenesis		0.1/-3.8	
Rhob	protein localization		2.7/2.4		Prkci	organization/biogenesis			0.5/-2.4
Scf1	protein localization		0.4/-3.6		Pxmp3	organization/biogenesis		0.5/-1.9	
Sfrs1	protein localization		0.5/-5.0		Ddx5	regulation of metabolism		0.3/-7.7	
Snap23	protein localization		2.5/4.9		Ebf1	regulation of metabolism		0.3/-1.8	
Snx10	protein localization		0.1/-2.4		Kitl	regulation of metabolism		0.4/-1.6	
Snx15	protein localization		0.2/-2.0		Pparbp	regulation of metabolism		0.1/-4.0	
Spnb2	protein localization		0.4/-2.4		Rac1	regulation of metabolism		2.2/2.7	
Synj2bp	protein localization		0.2/-3.2		Skiip	regulation of metabolism		0.4/-1.8	
Tmed7	protein localization		0.2/-3.0		Smad5	regulation of metabolism		0.4/-2.0	
Tram1	protein localization		0.3/-3.2		Ccl22	response to external stimulus	0.5/-1.1		
Vdp	protein localization		2.4/0.9		Chi3l3	response to external stimulus	0.5/-1.4		
Vps26	protein localization		0.1/-4.7		Mtap1a	response to external stimulus		2.7/2.7	
1810062O14Rik	Localization	0.5/-1.5			Nfkbiz	response to external stimulus	0.5/-4.8		
Ap2a1	Localization	0.5/1.0			Opn3	response to external stimulus		0.2/-2.1	
Ap2b1	Localization	3.7/2.5		4.0/3.7	Pde6d	response to external stimulus		2.9/2.3	
Arhgap17	Localization	0.5/-1.0			Tlr7	response to external stimulus	0.5/-1.3		
Gga2	Localization	4.4/2.1			Actn2	muscle contraction		3.1/5.3	
Ghr	Localization	0.5/-1.2			Ryr1	muscle contraction		0.1/-7.1	
Ndel1	Localization	0.5/-1.1			Tnni1	muscle contraction		0.0/-11.3	
Parp9	Localization	0.5/-1.1			Tnnt2	muscle contraction		0.2/-3.6	
Rab21	Localization	0.4/-1.4			Wdr21	muscle contraction		0.1/-12.4	
Slc25a17	Localization	0.5/-1.5			Ing1	cell cycle		3.3/3.5	
Slc30a6	Localization		0.4/-2.4		Nf2	cell cycle		2.4/1.8	
Snap23	Localization		2.5/4.9		Rhob	cell cycle		2.7/2.4	
Timm23	Localization	0.5/-2.0		0.3/-10.1	Tusc4	cell cycle		0.5/-0.9	
Tmed5	Localization	0.6/-1.1			Cck	Development			0.0/-26.6
0610009K11Rik	protein metabolism	0.3/-2.1			Meox2	Development	0.5/-0.9		
3732413I11Rik	protein metabolism	0.5/-3.7			Msh6	Development	0.5/-1.5		
Ankib1	protein metabolism	0.5/-1.9			Six3	Development	0.5/-1.0		
Ap2b1	protein metabolism	3.7/2.5		4.0/3.7	AW742319	signal transduction	0.5/-3.1		
Fzr1	protein metabolism	0.5/-2.0			Azi2	signal transduction	0.3/-3.4		
Gga2	protein metabolism	4.4/2.1			Smad5	signal transduction		0.4/-2.0	
Nmt1	protein metabolism	0.4/-1.8			Spnb2	signal transduction		0.4/-2.4	
Pml	protein metabolism	0.5/-1.4			Pparbp	hormone metabolism		0.1/-4.0	
Sfrs1	protein metabolism			0.5/-2.0	Ttr	hormone metabolism			0.4/-7.3
Wwp1	protein metabolism	0.5/-1.4			Msh6	DNA metabolism	0.5/-1.5		
Apoa4	lipid metabolism		0.2/-7.3		Sfrs1	RNA metabolism			0.5/-2.0
Cds2	lipid metabolism		0.6/-1.0		Clec2g	regulation of cell differentiation	0.5/-1.8		
Lass4	lipid metabolism		0.0/-13.7						
Akap10	protein localization		0.0/-3.5						

Tab. 29 : Ergebnisse der GO-Analyse der differenziell exprimierten Gene.

Die differenziell exprimierten Gene wurden mithilfe der GO-Datenbank klassifiziert. Durch eine statistische Analyse mit dem GFINDER Programm wurden signifikant überrepräsentierte Gene in den verschiedenen GO-Kategorien identifiziert. In der Liste befinden sich die ausgewählten Gene mit ihren biologischen Funktionen. Für die verschiedenen Altersstufen (P0, P7, adult) sind die Mittelwerte der Expressionsverhältnisse (L7En-2/WT) und die DEF-Werte dargestellt.

Durch die GO-Analyse wurden die biologischen Funktionen und Prozesse hervorgehoben, die bei der Entwicklung des Kleinhirns der L7En-2 Maus möglicherweise eine entscheidende Rolle spielen. Auffälligerweise zeigten viele der regulierten Gene eine Assoziation mit Transportprozessen von Proteinen. Viele dieser Gene sind beteiligt an vesikulären Transportprozessen zwischen den verschiedenen Kompartimenten der Zelle wie dem Golgi Komplex, den Endosomen und der Plasma Membran. Sie besitzen Funktionen bei der Bildung und dem Aufbau der Vesikel, bei der selektiven Beladung der Vesikel und bei der spezifischen Fusion mit der Zielregion. Eine weitere interessante Kategorie enthält Gene, die der Zellorganisation und Biogenese zugeordnet wurden. Hier fallen insbesondere Gene auf mit Funktionen beim Aufbau und der Organisation des Cytoskeletts sowie Gene, die mit Peroxisomen assoziiert sind. Ebenfalls wichtig für den Aufbau und die Funktion der Zelle sind Gene, die am Aufbau von Membranen beteiligt sind und der Kategorie Lipid Metabolismus zugeordnet wurden.

Ein weiterer interessanter Aspekt dieser Analyse ist, dass bestimmte Prozesse hauptsächlich nur in einer bestimmten Phase der Entwicklung bei der L7En-2 Maus Veränderungen zeigten, wie z. B. der Lipid-Metabolismus in der Altersstufe P7.

Zusammenfassend zeigt diese funktionelle Klassifizierung der differenziell exprimierten Gene, dass es Cluster von Genen gibt, die mit polarem Transport, insbesondere von Membrananteilen assoziiert sind. Auch wenn nur 50 % der hier beschriebenen Genen tatsächlich in der L7En-2 Maus reguliert sind, lassen sich daraus wichtige Schlüsse über molekulare und zelluläre Vorgänge ableiten, die durch die Engrailed-2 Überexpression induziert werden.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Genexpressionsänderungen in L7En-2 Mäusen zu analysieren, und damit molekulare Mechanismen kennenzulernen, die dem Phänotyp dieser Mäuse zugrunde liegen. Der L7En-2 Phänotyp ist durch mehrere Entwicklungsdefizite charakterisiert, die sich in Form von vermehrt auftretendem neuronalem Zelltod, und einer verzögerten neuronalen Reifung darstellen. Mithilfe einer Array-Analyse konnten Gencluster identifiziert werden, die fehlgesteuerte zelluläre Transportprozesse als zentralen Mechanismus des Fortsatzwachstums postulieren lassen. Der zeitliche Ablauf dieser morphologischen Differenzierungsdefizite, sowie die morphologischen Charakteristika der L7En-2 Mäuse lassen an Anomalien des ZNS denken, wie sie in autistischen Patienten gefunden wurden. Neben Engrailed-2 selbst, das mit dem Auftreten von Autismus assoziiert worden ist, konnten eine Reihe von Autismus-assoziierten Genen in der Genliste der differenziell exprimierten Gene identifiziert werden. Die Schlussfolgerung, dass die gefundenen molekularen Mechanismen der neuronalen Reifung auch für die Ausprägung autistischer Symptome als ursächlich anzusehen sind, eröffnet ein erstes, wenn auch noch sehr spekulatives Konzept für eine mögliche zelluläre Pathogenese des Autismus.

4.1 Array-Analysen als Methode zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene in Zelltyp-spezifischen transgenen Tiermodellen

In L7En-2 Tieren wird das Transgen Engrailed-2 spezifisch in cerebellären Purkinjenzellen exprimiert. Die Überexpression des Transkriptionsfaktors wirkt aber nicht nur auf die synthetisierenden Zellen, sondern auch indirekt auf andere Zelltypen des Kleinhirns. Für L7En-2 Mäuse konnte gezeigt werden, dass weniger Körnerzellen, weniger Korb-/Sternzellen, aber auch weniger Oligodendrozyten vorhanden sind (Baader et al., 1998). Aufgrund dieser Voraussetzungen ergeben sich zwei Fragen: Warum wurden Zelltyp-spezifische Überexpressionsmutanten für die hier durchgeführten Untersuchungen verwendet, und lassen sich mit einer Genexpressionsanalyse des gesamten Kleinhirns überhaupt differenziell exprimierte Gene finden, die in Purkinjenzellen und sogar dort spezifisch differenziell exprimiert sind?

Der Hintergrund für die Wahl der Überexpressionsmutanten war die Beobachtung, dass endogen synthetisiertes Engrailed-2 bis zum Postnataltag 0 in den Purkinjenzellen exprimiert und danach abgeschaltet wird. Da kurz nach der Geburt die Dendritogenese in den Purkinjenzellen beginnt, sollte

sich die Expression der Regulatoren der Dendritogenese zu diesem Zeitpunkt verändern. Die Analyse der Überexpressionsmutanten sollte also die Möglichkeit geben, Gene zu finden, die an der frühen postnatalen Reifung der Purkinjezellneurone beteiligt sind. Die En-2 defizienten Mäuse zeigen im Unterschied zu den Überexpressionsmutanten einen embryonalen Defekt, der sich nicht nur auf die Purkinjezellen, sondern auch auf andere cerebelläre und extracerebelläre Neurone auswirkt. Die Untersuchungen beider Mäuse sind also nicht komplementär oder ergänzend, sondern zielen auf vollkommen verschiedene Gencluster ab.

Für die genomweite Expressionsanalyse von Zelltyp-spezifischen Mausmutanten wäre es wünschenswert, Purkinjezellen zunächst zu isolieren, damit daraus mRNA für die Array Analysen gewonnen werden können. Auch wenn Mäuse vorhanden sind, die EGFP spezifisch in Purkinjezellen exprimieren (Zhang et al., 2001; Tomomura et al., 2001) und die Möglichkeit geben, diese mittels FACS Sortierung anzureichern, so birgt diese Methode zwei Probleme: erstens werden durch die sehr langwierige Aufreinigungsprozedur die Purkinjezellen in ihrer Entwicklung gestört, was Ihnen auch die Möglichkeit gibt, Gene akut zu regulieren. Zudem würde sehr viel Material von den Purkinjezellen verloren gehen, da diese postnatal einen sehr großen Dendritenbaum ausbilden und mit der Dissoziation der Zellen die Neurone massiv geschädigt werden. Ein alternativer Ansatz zur Gewinnung von Purkinjezellen wäre die Laserdissektion. Hiermit können zwar relativ sauber Purkinjezellen isoliert werden, diese aber nur in geringen Mengen. Da sich sogar eng benachbarte Purkinjezellen erheblich in ihrer genetischen Zusammensetzung voneinander unterscheiden, und damit die Isolierung einer vergleichbaren Population von Zellen in zwei Tieren sehr schwierig ist, ist diesem Ansatz ein möglichst globaler vorzuziehen. Die Nutzung des gesamten Kleinhirns war folglich die praktikabelste und sinnvollste Methode zur Gewinnung von Probenmaterial für die Array-Analysen.

Die Array-Analysen wurden als Analysemethode gewählt, da sie bei einfacher Handhabung die gleichzeitige Analyse einer Vielzahl von Genen erlaubt. Der Erfolg einer Array-Analyse hängt dafür im Wesentlichen von den statistischen Auswerteverfahren ab. Im Folgenden soll deshalb diskutiert werden, welche Parameter zur erfolgreichen Analyse Zelltyp-spezifischer transgener Tiermodelle unabdingbar und sinnvoll sind.

Das Ergebnis von vergleichenden Expressionsanalysen besteht in der Identifizierung von einer Vielzahl von Genen mit sehr unterschiedlichen Expressionsdaten. Diese Variabilität birgt die Gefahr, dass die Anzahl und Zusammensetzung der identifizierten Gene ganz wesentlich von der Durchführung der einzelnen Experimente abhängig ist. Die Abschätzung der Hybridisierungsqualität ist deshalb ein erster Schritt der Array-Analyse. Hier wurde die Darstellung

der Expressionsdaten in Scatterplots angewendet. Die Hybridisierungen 1 und 2 in der Altersstufe P0 zeigten hohe Variabilitäten der Expressionsdaten. Die zugrunde liegenden Unterschiede in der Hybridisierungseffizienz können auf Variationen in der Hybridisierungsprobe, in der Hybridisierungs- und Waschttemperatur, geringfügige Unterschiede in der Pufferzusammensetzung sowie auf die Beschaffenheit und die Qualität der Array-Membranen zurückzuführen sein. Im Unterschied zu den P0 Expressionsdaten waren die Datenpunkte der Altersstufe P7 und Adult wesentlich enger und gleichmäßiger um den Bereich der nicht regulierten Gene gruppiert, was auf eine vergleichbare Qualität der Hybridisierung hinweist.

Für die hier verwendete Methode der Array-Analyse ist eine möglichst mehrfach wiederholte Hybridisierung von unterschiedlichen RNA-Präparationen auf unterschiedliche Filter unerlässlich. Nur diese Wiederholungen ermöglichen die erfolgreiche Identifizierung von Genen in einer Datenmenge, die starken Schwankungen unterworfen ist (Quackenbush, 2002). Untersuchungen an Replikaten ergaben, dass zweimal wiederholte, unabhängig voneinander durchgeführte Experimente bereits aussagekräftige Daten liefern können. Da jede Membran bereits zwei und mehr Genreplikate enthält, wurden für jedes Gen insgesamt mindestens vier Datenpunkte erzeugt.

Zusätzlich zu diesen Wiederholungen ist es aufgrund der biologischen und der experimentellen Variabilität zwischen verschiedenen Experimenten notwendig, die Daten aus den Array-Experimenten zu filtern, wodurch differenziell exprimierte Gene mit einer möglichst hohen positiven Trefferwahrscheinlichkeit selektioniert werden.

Gängige Methoden zur Auswertung von Array-Daten aus der Literatur basieren auf nicht-statistischen und statistischen Verfahren, wobei u. a. Varianten der F-Statistik, nichtparametrische Ansätze und empirische Bayes'sche Methoden eingesetzt werden (Dean and Raftery, 2005; Pan, 2002; Qin et al., 2004; Wu, 2005; Dudoit et al., 2002; Chen et al., 2002; Hatfield et al., 2003). Für unsere Zwecke wurde ein nicht-statistisches Selektionsverfahren ausgewählt, wie es bereits erfolgreich für die Isolierung differenziell exprimierter Gene in Arabidopsis Varianten, transgenen Mäusen und Menschen mit Schizophrenie-Symptomen eingesetzt wurde (Schena et al., 1995; Mirnics, 2001; Serra et al., 2004).

Wie für jede Art der genomweiten Analyse ist die Verifikation der Daten von zentraler Bedeutung. Als Methoden kommen schnelle, quantifizierbare und sensitive Methoden wie die Realtime-PCR, aber auch histologische, nicht-quantitative Techniken wie die Immunhistochemie oder in situ Hybridisierung in Frage. Da es initiales Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen war, generelle Genexpressionsunterschiede in L7En-2 Tieren zu identifizieren, wurden verschieden Techniken eingesetzt. Es stellte sich dabei heraus, dass die in situ Hybridisierung die effizienteste, aber auch

zeitlich anspruchsvollste Methode war. Der immunhistochemische Nachweis und die Westernblot-Analyse sind ganz wesentlich von der Verfügbarkeit spezifischer Antikörper abhängig. Zudem muss die Proteinexpression nicht mit der mRNA Expression übereinstimmen. Auch wenn letztendlich die Proteinexpression entscheidend für die Interpretation der Ergebnisse ist, so muss zunächst im Vordergrund stehen, die Array-Daten zu verifizieren. Mit der Realtime-PCR können prinzipiell alle Gene untersucht werden, sie ist aber nur für die Gene eignete, die Zelltyp-spezifisch in den Purkinjezellen exprimiert werden. Die *in situ* Hybridisierung bietet neben dem breiten Spektrum an Genen, welche untersucht werden können, die Möglichkeit, Expression auf zelluläre Ebene zu analysieren.

Für die Untersuchung der Zuverlässigkeit der hier durchgeführten Array-Analyse konnte zum Teil auf bereits bekannte Daten aus der Arbeitsgruppe zurückgegriffen werden. Die Auswahl der bis zu diesem Zeitpunkt untersuchten Gene basierte auf Literaturrecherchen, die eine Verbindung zwischen den ausgewählten Genen und *Engrailed* vermuten ließen. Für *L7/pcp-2* und *Zebrin II* konnte eine Herunterregulation um ca. 30 % im Cerebellum der *L7En-2* Maus durch RNase Schutzexperimente, Westernblot-Analyse und immunhistochemische Versuche nachgewiesen werden (Sanlioglu et al., 1998). Die Array-Daten für diese Gene zeigten eine gute Übereinstimmung, sowohl bei der Regulation als auch bei den untersuchten Zeitpunkten. Für *EphA4* wird angenommen, dass es durch *Engrailed-2* beeinflusst wird, da es im retinotektalen System herunterreguliert wird, und in diesen Bereichen eine starke Expression von *Engrailed-2* vorkommt (Friedman and O'Leary, 1996). Dementsprechend konnte durch *in situ* Hybridisierungen eine massive Herunterregulation in midcaudalen Bereichen des Cerebellums festgestellt werden, in denen spätembryonal hohe Mengen an *Engrailed-2* exprimiert werden (Martini, Diplomarbeit, Bonn, 2000). Diese Herunterregulation war auch in den Array-Analysen nachzuvollziehen, wenn auch aufgrund des lokalen Effektes unterhalb der Selektionsgrenze. Bei *Synaptophysin* und *S100beta* wurde keine Regulation festgestellt (Baader, unveröffentlichte Daten), und dasselbe Ergebnis war auch in den Array-Daten gefunden worden.

Eine Reihe weiterer Gene wurden basierend auf den Array-Daten verifiziert. Bei der Auswahl wurde versucht, ein möglichst breites Spektrum an Genen zu erfassen, sowohl was deren Expressionsprofil als auch deren funktionelle Aspekte anging. Im Fall von *Striatin* oder *GFAP* konnte mit allen Methoden eine Zunahme der Expression im Cerebellum der *L7En-2* Maus gefunden werden (Pintea, Dissertation in Bearbeitung, Bonn). Diese Zunahme beruht wahrscheinlich auf einem Volumen-Effekt, da durch die Verringerung der Größe des Cerebellums in der *L7En-2* Maus der relative Anteil der *Striatin*- oder *GFAP* positiven Zellen zunimmt. Auf die

erfolgreiche Verifikation der differentiellen Expression von Parvalbumin, Tetraspanin 5, Cholecystokinin, MTSS-1 und Semaphorin 3A wird später näher eingegangen.

Es soll hier aber nicht unerwähnt bleiben, dass auch etliche Expressionsmuster der Array-Daten nicht mit den Hybridisierungsdaten übereinstimmten. Dies betraf die Expression von Notch, CRMP5, Rac1, Ap2a1, ApoA4, CDS2, CRMP1, RhoB und Vav2. Es muss allerdings darauf verwiesen werden, dass vier dieser Gene mit den eingesetzten *in situ* Hybridisierungsproben nur schwer nachweisbar waren, sodass die Signalintensität nicht ausreichte, um quantitative Unterschiede aufzuzeigen.

Insgesamt konnten die Array-Daten von 20 Genen mit 39 Einzeluntersuchungen überprüft werden. Bei 25 Untersuchungen konnte eine Übereinstimmung der Array-Daten mit den Resultaten der Kontroll-Experimente gefunden werden, während bei sieben Genen ein falsch positives und bei sieben ein falsch negatives Ergebnis gefunden wurde. Hieraus resultierte eine Zuverlässigkeit von 64 % und eine Sensitivität von 46 %. Diese Werte liegen im Bereich der Erwartungen, wenn man berücksichtigt, dass spezifische und prominente Expressionsunterschiede nur in den *Engrailed-2* überexprimierenden Purkinjezellen zu erwarten sind, die RNA für die Analyse aber aus dem gesamten Cerebellum hergestellt wurde.

4.2 Repression als vorwiegende Expressionsregulation in *Engrailed-2* überexprimierenden Mäusen

Basierend auf dem Befund, dass etwa 50 % der Gene, die durch Array-Analysen identifiziert werden konnten tatsächlich differentiell exprimiert sind, konnten nun aus den Gendatenbanken Informationen gewonnen werden, die auf molekulare und zelluläre Ursachen des *L7En-2* Phänotyps schließen lassen. Auffällig war zunächst, dass korrespondierend mit den frühpostnatal vermehrt auftretenden Entwicklungsprozessen die Anzahl der exprimierten Gene in dem Zeitraum von P0 nach P7 steigt. In der adulten Altersstufe nimmt die Anzahl der exprimierten Gene dann deutlich ab. In dieser Phase ist die Entwicklung abgeschlossen und die neuronale Transmission und molekulare Transportprozesse stehen im Vordergrund (Kagami and Furuichi, 2001). In ähnlicher Weise nahm die Anzahl der differentiell exprimierten Gene zunächst zu und später ab. Diese Veränderungen sind aber nicht, oder zumindest nicht alleine auf die Zunahme der aktiven Gene zurückzuführen, da die prozentualen Zahlen der differentiell exprimierten Gene in den Altersstufen unterschiedlich ist.

Die Clusteranalyse, bei der die Gene anhand der relativen Expressionsunterschiede in Gruppen eingeteilt wurden, unterstrichen eindrucksvoll diese Beobachtung. Da in der Clusteranalyse die Regulationsrichtung mit berücksichtigt ist, kommt ein weiterer Punkt zur Geltung: In den Altersstufen P0 und P7 überwog die Anzahl der reprimierten Gene gegenüber der Anzahl der aktivierten Gene. Besonders deutlich zeigte sich der repressive Charakter der Genexpression in der Altersstufe P7. Für die Prozesse in den adulten Stadien spielt die Engrailed-2 Überexpression offensichtlich nur noch eine untergeordnete Rolle. Die generell unterdrückte Genexpression in Engrailed-2 überexprimierenden Mäusen lässt an eine Korrelation zwischen der Engrailed-2 Expression und der Repression denken. Tatsächlich ist von diesem Transkriptionsfaktor gezeigt worden, dass er in den meisten Systemen als Repressor dient (Tolkunova et al., 1998; Heemskerk et al., 1991). Zudem konnten bisher nur solche Gene als differenziell exprimiert verifiziert werden, die Purkinjenzell-spezifisch reprimiert waren, also in den Zellen, in denen Engrailed-2 überexprimiert wurde.

Ein direkter Einfluss von Engrailed-2 auf die Expression bestimmter Gene ist nur durch molekulare Methoden wie dem Mobility Shift Assay, oder foot printing möglich und erfordert eine über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehende detaillierte Analyse.

Für die Planung derartiger Untersuchungen muss zudem beachtet werden, dass Engrailed-2 entweder andere Kofaktoren für seine Aktivität benötigt, oder aber selbst als Kofaktor der Transkription dient. In *Drosophila* wurde gezeigt, dass der Korepressor Groucho für die Funktion von Engrailed-2 notwendig ist (Jimenez et al., 1997; Jimenez et al., 1999). Für Groucho ähnliche Proteine wurde eine Expression im Zentralnervensystem nachgewiesen und einige Mitglieder diese Proteinfamilien konnten auch im Kleinhirn lokalisiert werden (Allen and Lobe, 1999). Der Transkriptionsfaktor PBX1 interagiert ebenfalls mit Engrailed um die Expression von anderen Genen zu regulieren und wird im Cerebellum zumindest embryonal exprimiert (Peltenburg and Murre, 1996; Peltenburg and Murre, 1997; Redmond et al., 1996; Erickson et al., 2006). Eine wichtige Rolle spielt dieser Faktor bei der Regulation von Genen im Rhombencephalon (Maeda et al., 2002). Weitere Faktoren, die mit Engrailed interagieren können, gehören zu der Familie der „forkhead Box“ Transkriptionsfaktoren wie z. B. das Foxa2 Protein (Foucher et al., 2003), das bei der neuronalen Migration und der Entwicklung des Kleinhirns einen großen Einfluss besitzt (Zhou et al., 2001).

Die Interaktion von Engrailed-2 mit seinen Kofaktoren wird über mehrere Domänen realisiert (Tolkunova et al., 1998). Die integrative Wirkung dieser Domänen könnte durch unterschiedliche Kombinationen von gebundenen Kofaktoren eine große Varianz des Wirkungsspektrums von

Engrailed-2 erklären. Demnach sind wahrscheinlich für die Funktion von Engrailed-2 bei der Genregulation der Zeitpunkt und die Kombination von Kofaktoren entscheidend.

Eine Schwierigkeit, die bei der Suche nach Zielgenen von Homeobox Proteinen ganz generell auftritt, liegt in der starken Konservierung der Homeodomäne begründet. Aufgrund des konservierten DNA-Bindungsmotivs sind diese Motive im Genom weit verbreitet, und nicht spezifisch für ein einzelnes Homeobox Protein. Dies ist eine der möglichen Ursachen, warum bisher nur wenige direkte Zielgene von Homeobox Proteinen identifiziert werden konnten (Foucher et al., 2003).

Übereinstimmend mit der vermuteten Komplexität der Engrailed-2 Wirkung wurden die meisten, der in der L7En-2 Maus differenziell exprimierten Gene nur temporär reguliert, obwohl Engrailed-2 in der L7En-2 Maus durchgehend während der postnatalen Entwicklung überexprimiert wird.

4.3 Cytoskelettbestandteile als potenzielle Zielgene von Engrailed-2

Bisherige Untersuchungen zur Identifikation von potenziellen Zielgenen von Engrailed-2 nutzen im wesentlichen zwei Modelle. In Drosophila-Embryos wurden mithilfe einer Chromatin-Immunopräzipitation (UV-Kreuzvernetzung des endogenen Engrailed Proteins mit der genomischen DNA) 203 Bindungsstellen für Engrailed gefunden, von denen mittlerweile mehrere als direkte Zielgene von Engrailed bestätigt werden konnten (Solano et al., 2003). In Engrailed-2 Nullmutanten von Mäusen wurden Zielgene mittels „Gene-trap“ und Promotoranalysen identifiziert. Interessanterweise konnten einige dieser Gene mit dem Zytoskelett und damit mit Formveränderungen der Zelle inkl. dem Fortsatzwachstum assoziiert werden. Frizzled 2 wurde in Drosophila als potenzielles Zielgen charakterisiert. Frizzled2 ist ein Rezeptor für Wingless, dessen Säugetierhomologe auch im Kleinhirn exprimiert werden und eine wichtige Rolle bei der Definition des Kleinhirnnareals, bei der Kompartimentierung und axonalen Wegfindung und ganz allgemein der Reifung von Neuronen eine wichtige Rolle spielen (Patapoutian and Reichardt, 2000; Burden, 2000). In anderen Spezies wurden β 3 tubulin (Serrano et al., 1997), MAP1B (Montesinos et al., 2001), connectin und neuroglian (Siegler and Jia, 1999), BPAG1 (Mainguy et al., 1999) und polyhomeotic (Serrano et al., 1995) als Zielgene identifiziert. Die meisten dieser Gene greifen in den Aufbau und die Regulation des Zytoskeletts und der Adhäsion ein.

Im Folgenden sollen nun die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten und verifizierten Gene bezüglich ihrer potenziellen Bedeutung für die Entstehung des L7En-2 Phänotyps diskutiert werden. Zytoskelett assoziierte Gene kommen hierbei ebenso vor wie Gene aus anderen funktionellen Gengruppen.

4.4 Das Calcium bindende Protein Parvalbumin

Parvalbumin (Pvalb) wird spezifisch in Purkinjezellen, Korb- und Sternzellen innerhalb des Kleinhirnkortex exprimiert und gilt als hochspezifisches Markerprotein für diese Zelltypen (Celio and Heizmann, 1981; Celio, 1990). Es gehört zu der Familie der EF-Hand Calcium-Bindenden-Proteine und ist an der Regulation des zellulären Calciumhaushalts beteiligt (Kretsinger and Nockolds, 1973). Innerhalb der Zelle ist Calcium ein wichtiges Signalmolekül, das an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt ist. Da hohe intrazelluläre Calcium-Konzentrationen über längere Zeit zum Zelltod führen, ist es für die Zelle existenziell, die Calcium-Konzentrationen intrazellulär genau zu regulieren. Parvalbumin fungiert zusammen mit anderen Calciumbindenden-Proteinen wie Calbindin als transientes Puffer-System für freies intrazelluläres Calcium. In dieser Eigenschaft spielt Parvalbumin auch in den Dornfortsätzen (Spines) und Dendriten der Purkinjezellen bei der synaptischen Aktivierung eine entscheidende Rolle (Lee et al., 2000; Schmidt et al., 2003). Die Calciumbindenden-Proteine unterscheiden sich in ihren Bindungseigenschaften für Calcium und haben verschiedene zeitliche Expressionsmuster.

Während Calbindin schon in embryonalen Stadien exprimiert wird, startet die Expression von Parvalbumin erst in der Postnatal-Phase (Enderlin et al., 1987; Celio and Heizmann, 1981). Die normale Expression von Parvalbumin beginnt zu einem Zeitpunkt, an dem die Purkinjezellen sich in der Einzelzellschicht angeordnet haben und mit der Ausbildung der reifen Dendriten beginnen (Jankowski et al., 2004). In dieser Phase wird der multipolare Dendritenbaum in einen Stammdendrit mit dichotom verzweigtem Dendritenbaum umgewandelt. Während der gesamten Entwicklung korreliert die Expression von Parvalbumin mit der Dendritogenese der Purkinjezellen. Diese Expression bleibt während des ganzen Lebens erhalten, ebenso finden ständig Umbauvorgänge in den feinen Dendritenverzweigungen statt.

Diese Korrelation zwischen der Parvalbumin-Expression und der Dendritogenese findet ihre Parallele in der Dendritogenese der L7En-2 Maus (Jankowski et al., 2004). Die dort gefundene Verzögerung der Dendritogenese um 3-4 Tage wird begleitet durch eine entsprechende zeitliche Verzögerung in der Expression von Parvalbumin. Parallel mit der Ausreifung der Dendriten in den

L7En-2 Tieren zeigt sich eine Angleichung des Expressionslevels von Parvalbumin an das Niveau der Wildtypexpression. Hieraus könnte man ableiten, dass Parvalbumin maßgeblich an dem Auswachsen und der Ummodellierung von reifen Dendriten bei Purkinjezellen beteiligt ist. Interessanterweise wird Parvalbumin auch in den Korb- und Sternzellen erst dann exprimiert, wenn diese Zellen nach ihrer Wanderung durch die weiße Substanz des Kleinhirns und durch die innere Körnerzellschicht und Purkinjezellschicht die Molekularschicht erreicht haben und dort ihre Fortsätze ausbilden. In den Körnerzellen, die nur zwei kurze wenig verzweigte Dendriten aufweisen, wird kein Parvalbumin exprimiert. Insgesamt sprechen diese Daten für eine Rolle von Parvalbumin bei der Dendritogenese. Jedoch wurden keine Effekte auf die Purkinjezellmorphologie bei Parvalbumin Knock-out Tieren gefunden (Vecellio et al., 2000). Ein Grund dafür könnte sein, dass Parvalbumin keinen direkten Einfluss auf die Dendritogenese ausübt. Alternativ könnten die Effekte in den Purkinjezellen durch die Expression von weiteren Calciumbindende-Proteinen wie Calbindin oder Calretinin in den Purkinjezellen kompensiert werden. In der Tat konnte bei Doppel-Nullmutanten von Calbindin und Parvalbumin eine Auswirkung auf die Entwicklung und die Funktion von Spines festgestellt werden, die sich letztendlich auch in motorischen Defiziten äußerten (Schmidt et al., 2003).

Ein Zusammenhang zwischen der Parvalbumin-Expression, intrazellulärem Calcium und dem Fortsatzwachstum wird seit Längerem untersucht. Studien an hippocampalen Neuronen zeigten, dass eine Erhöhung des Calciumspiegels einen inhibierenden Einfluss auf die Motilität und Bildung von dendritischen Filopodien ausübt (Lohmann et al., 2005; Holcman et al., 2004; Calabrese et al., 2006; Konur and Ghosh, 2005). Filopodien sind Vorläuferstrukturen für Dornfortsätze, aus denen sich letztendlich Synapsen etablieren. Veränderungen in der Calcium-Dynamik können also einen maßgeblichen Einfluss auf die Synaptogenese nehmen. Bisher noch unveröffentlichte Daten zeigen, dass tatsächlich die Bildung von Purkinjezell-Dornfortsätzen in L7En-2 Mäusen verändert ist, d. h., im distalen Bereich bilden sich vermindert Dornfortsätze aus, während proximale Dendritenabschnitte unverändert blieben. Parvalbumin könnte also durchaus Anteil an den Entwicklungsstörungen der L7En-2 Maus haben.

4.5 Das Transmembranprotein Tetraspanin-5

Ein weiteres Gen, das bei der Analyse der differenziell exprimierten Gene identifiziert wurde, ist Tetraspanin-5. Es ist ein integrales Membran-Protein, das der Tetraspanin Superfamilie zuzuordnen ist. Zu dieser Familie gehören bei den Säugetieren 32 Mitglieder. Als besondere Charakteristika besitzen sie vier Transmembran-Domänen und zwei extrazelluläre Domänen mit unterschiedlicher Größe. Ferner sind sie durch mehrere stark konservierte Amino-Säure Motive und zwei charakteristische Disulfid-Brücken in der zweiten extrazellulären Domäne gekennzeichnet (Hemler, 2003). Die Tetraspanin-Proteine spielen u. a. eine Rolle bei der Zellproliferation, der Motilität, aber auch der Ausbildung der Zellmorphologie. Klinisch werden Tetraspanine mit Tumorwachstum und Metastasierungsprozessen assoziiert. Die verschiedenen Tetraspanine weisen ein sehr unterschiedliches Expressionsverhalten auf. Während einige eine fast ubiquitäre Verbreitung aufweisen (CD9, CD63, CD81, CD82) haben andere ein sehr spezifisches Expressionsmuster in Zellen des Immunsystems (CD37, CD53). Teilweise befinden sich mehrere Tetraspaninarten gleichzeitig auf derselben Zelle. Eine besondere Eigenschaft der Tetraspanine liegt in der Fähigkeit, molekulare Interaktionen untereinander und mit anderen Oberflächen-Proteinen wie z. B. Integrinen einzugehen. Diese molekularen Komplexe werden als Tetraspaninnetze (Web) oder Tetraspaninangereicherte-Mikrodomänen (tetraspanin-enriched microdomains, TEM) bezeichnet (Boucheix and Rubinstein, 2001; Hemler, 2005; Shoham et al., 2006). Sie könnten eine ähnliche Funktion haben wie die Lipidraft-Mikrodomänen (Pierce, 2004; Munro, 2003), von denen angenommen wird, dass sie durch eine lokale Anreicherung von Proteinen lokale Signaltransduktion amplifizieren.

Eine Expression von Tetraspanin-5 konnte im Kleinhirn bereits beschrieben werden. Es zeigte sich, dass Tetraspanin-5 bereits in embryonalen Stadien (E16) exprimiert wird und postnatal in Purkinjezellen sowie der inneren und äußeren Körnerzellschicht vorkommt (Garcia-Frigola et al., 2001; Garcia-Frigola et al., 2000).

Basierend auf den Daten der Array-Analyse konnte während der gesamten postnatalen Entwicklung des Kleinhirns eine Expression von Tetraspanin-5 festgestellt werden. Interessanterweise korreliert die Stärke der Tetraspanin-5 Expression mit bestimmten Phasen der Purkinjezellentwicklung. In der frühen postnatalen Entwicklung, in der die Purkinjezellen massive morphologische Veränderungen durchführen, findet sich nur eine geringe Expression. Ein deutlicher Anstieg der Expression zeigte sich während der Phase, in der die Purkinjezellen mit der Ausbildung von Spines und Synapsen auf den Dendriten beginnen und diese transient stabilisiert werden müssen (Juenger et al., 2005). Ein vergleichbares Expressionsverhalten kann auch in den Körnerzellen beobachtet werden; hier zeigt sich eine geringe Expression in den postmitotischen Körnerzellen der äußeren Körnerzellschicht

und eine deutlich gesteigerte in positionierten Zellen der inneren Körnerzellschicht mit reifenden Axonen und Dendriten.

Dieser Zusammenhang zwischen Expression und der zellulären Differenzierung konnte entsprechend auch bei den L7En-2 Tieren beobachtet werden. Die Reduktion der Tetraspanin-5 Expression geht mit einer verlangsamten Differenzierung der Dendritenfortsätze einher. Ein deutlicher Expressionsunterschied konnte im Vergleich zu Parvalbumin etwas später ab dem Postnataltag neun nachgewiesen werden. Im Unterschied zu Parvalbumin wurde die Expression von Tetraspanin-5 nach der ersten Postnatalwoche - dauerhaft - bis in die adulten Stadien reprimiert. Eine permanente Repression könnte bedeuten, dass Engrailed-2 direkt auf die Expression von Tetraspanin-5 einwirkt. Dagegen spricht aber, dass in reifen Körnerzellen sowohl Engrailed-2 als auch Tetraspanin-5 gleichzeitig exprimiert werden und dort keine Repression stattfindet. Daher handelt es sich wahrscheinlich um eine Zelltyp-spezifische Regulation von Tetraspanin-5 durch Engrailed-2. Diese Annahme ist durchaus vorstellbar, da die Wirkungsweise von Engrailed-2 einen primär modulatorischen Charakter aufweist, bei der Engrailed-2 zusammen mit anderen Faktoren die Transkriptionsaktivität bestimmt.

Welche Prozesse Tetraspanin-5 genau steuert, wissen wir derzeit noch nicht. Berücksichtigt man die bekannten Funktionen anderer Tetraspanine, so ist eine Rolle von Tetraspanin-5 bei Differenzierungsprozessen durchaus sinnvoll. Tetraspanine interagieren mit verschiedenen Subtypen von Integrinen, welche wichtige Assoziationen mit der Extrazellulärmatrix eingehen und dadurch Zell-Adhäsion steuern (Berditchevski, 2001; Berditchevski and Odintsova, 1999). Zelladhäsionen sind von grundlegender Bedeutung für die Wanderung von Zellen oder die Ausbildung und Reifung von Fortsätzen. CD151 interagiert zum Beispiel mit $\alpha3\beta1$ Integrin, und beeinflusst die Migration von Zellen auf Laminin-5. Wird die CD151 Expression mittels siRNA unterdrückt, oder die Funktion durch Mutagenese gestört, verlieren Zellen ihre Adhäsivität und ihre Motilität auf kollagenen Matrices (Lammerding et al., 2003; Winterwood et al., 2006). Ähnliches konnte für hämopoetische Zellen gezeigt werden (Fitter et al., 1999). Einen Einfluss auf das Neuritenwachstum von sympathischen Ganglien-Neuronen wurde von CD9 in Verbindung mit dem $\alpha3\beta1$ -Integrin gezeigt (Banerjee et al., 1997). In *Drosophila* konnte durch die Deaktivierung des Tetraspanins late bloomer eine Verzögerung der Synapsenbildung von Motoneuronen erreicht werden (Kopczynski et al., 1996). Auch wenn Tetraspanine keine „Master“-Regulatoren sind, so modulieren sie doch deutlich die Ausbildung der Synapsen. Eventuell ist das Tetraspanin-5 in L7En-2 ebenfalls an der Stabilisierung der Synapsen beteiligt, indem es die Verbindung mit der extrazellulären Matrix über Integrine aufrecht erhält.

Leider konnte durch die siRNA Experimente keine ausreichende Unterdrückung der Tetraspanin-5 Expression erzielt werden, sodass zelluläre Effekte einer Tetraspanin-5 Expressionsänderung bisher noch nicht untersucht werden konnten. Unter der Annahme, dass nicht alle der eingesetzten Oligonukleotide unbrauchbar waren, muss vermutet werden, dass die Stabilität des Tetraspanin-5 Proteins sehr hoch ist, und eine Repression der mRNA Expression keinen Einfluss auf die Proteinmenge hat. Zudem könnten geringe Mengen an mRNA ausreichen, um große Mengen Protein herzustellen. In diesem Fall würde die Herstellung einer Tetraspanin-5 defizienten Zelllinien oder von defizienten Mäusen weiterhelfen.

4.6 Das Peptidhormon Cholecystinin und die Verbindung zum Autismus

Cholecystinin (CCK) ist ein Peptid-Hormon, das zuerst im Gastrointestinal-Trakt entdeckt wurde und dort die Pankreassekretion und die Kontraktion der Gallenblase anregt. Es besitzt aber auch eine weite Verbreitung im Nervensystem, wo es als Neuropeptid die Neurotransmission moduliert (Vitale et al., 1991; Beinfeld, 2001). Damit nimmt CCK Einfluss auf das Angst- und Panik-Verhalten in Maus und Mensch (Rotzinger and Vaccarino, 2003; Chen et al., 2006; Bradwejn, 1993). CCK wird als Präpropeptid synthetisiert und im endoplasmatischen Reticulum durch die Enzyme Prohormon Convertase PC1, PC2 und PC5 in Peptide verschiedener Größe gespalten (Cain et al., 2003). Im Gehirn kommt am häufigsten das sulfatierte Octapeptid (CCK-8S) vor. Andere Formen mit unterschiedlichem Wirkungsspektrum sind: CCK-58, CCK-33, CCK-7, CCK-5, CCK-4. Im Cerebellum konnte CCK auf Basis der mRNA und des Peptids nachgewiesen werden, allerdings unterscheiden sich die Ergebnisse der verschiedenen Studien in Abhängigkeit von der untersuchten Art, der Nachweismethode und dem verwendeten Material. In einigen Studien konnte zwar die mRNA, nicht aber das Peptid nachgewiesen werden (Rehfeld et al., 1992; Fox et al., 1991; Takeda et al., 1989; Savasta et al., 1990; Gubler et al., 1987). Ein Antikörper gegen das CCK8S Peptid markierte im Cerebellum des Opossums spezifisch Moos- und Kletterfasern (King and Bishop, 1990). Zusätzlich konnte ein punktförmiges CCK-Signal in der Purkinjzellschicht gezeigt werden, das aber nicht den Purkinjzellen, sondern unreifen Kletterfasern zugeordnet wurde (King and Bishop, 1992).

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigten zweifelsfrei eine Expression von CCK auf mRNA Ebene in den Purkinjzellen des Kleinhirns. Da die hier verwendete Sonde für die in situ Hybridisierung, die komplette Gensequenz inklusive Teile der nicht-translatierten 3'-Region umfasste, konnte nicht

zwischen den verschiedenen Isoformen von CCK differenziert werden. Im Folgenden sind deshalb unter CCK alle Isoformen gemeint. Während die Expression von CCK am Tag der Geburt noch relativ gering ausgeprägt war, stieg sie drastisch bei sieben Tage alten Tieren an und blieb bis in das Adultstadium auf einem hohen Niveau. In den L7En-2 Tieren konnte eine fast vollständige Repression von CCK durch Engrailed-2 nachgewiesen werden, und dies unabhängig vom Alter der Tiere. Hieraus ergeben sich folgende Fragen. Welche Rolle spielt CCK bei der Kleinhirnentwicklung, sowie welche Rolle nimmt Engrailed-2 bei der Regulation der CCK-Expression ein?

Eine vom Alter der Mäuse unabhängige Repression der Expression könnte zunächst für einen direkten Einfluss von Engrailed-2 auf die CCK-Expression sprechen. In der Promotor-Region von CCK konnten tatsächlich durch eine Datenbank Analyse mehrere Bindungsmotive für Engrailed identifiziert werden (siehe Anhang 5.1.6, Abb. 51). Obwohl die Promoterregion seit 1990 bekannt ist, sind bisher noch keine detaillierten Studien über die Bindungsmöglichkeiten von Engrailed an den Promoter untersucht worden (Haun and Dixon, 1990; Hansen, 2001; Ebihara et al., 2003). Für diese Fragestellung wären „Luciferase-Assays, Mobility-Shift-Assays und DNase Footprinting Assays“ die geeigneten Ansätze.

Bei der Beantwortung der Frage, welche Rolle CCK in der Kleinhirnentwicklung spielt und wie diese mit bekannten Funktionen von Engrailed-2 korrelieren, können erste Hinweise aus vorhergehenden Studien abgeleitet werden. Im olfaktorischen System wurde gezeigt, dass CCK die Migration von GnRH-1 Neuronen aus der nasalen Region in das Telencephalon hemmt (Giacobini et al., 2004). Ferner scheint CCK die neuronalen Verschaltungen im Cerebellum zu modellieren (King and Bishop, 1990). Übereinstimmend mit diesen Studien konnte eine CCK-Expression im caudalen Anteil des Kleinhirns in definierten parasagittalen Streifen von Purkinjezellen nachgewiesen werden. Diese parasagittale Streifung gilt als morphologisches Korrelat funktioneller Verschaltungen. Darüber hinaus spielt CCK eine bedeutende Rolle bei der Modulation der neuronalen Signalübertragung (Bishop, 1996; Wood et al., 1988). Dies wird insbesondere durch klinische Studien unterstützt, in denen die Gabe von CCK zur Auslösung von Angst und Panikattacken bei Mensch und Tier führt (Chen et al., 2006; Rotzinger and Vaccarino, 2003; Bradwejn et al., 1991; Aluoja et al., 1997). Interessanterweise wird bei diesen Angstzuständen auch eine Reaktion in der vermalen Region des Kleinhirns ausgelöst (Schunck et al., 2006).

Bei all diesen Funktionen zeigt sich, dass CCK als diffusibler Faktor einen Einfluss auf Umstrukturierungsprozesse der Zellen nimmt. Dies gilt sowohl für die migratorischen Prozesse, als auch für die Aufgaben bei der Verschaltung und der Signalübertragung. Ein entsprechendes Funktionsprofil wird auch Engrailed-2 zugeschrieben (Morgan, 2006). Der Einfluss von Engrailed auf die Regulation der Ephrin-Expression ist ein Beispiel für die regulierte Expression eines

axonalen Wegfindungsmoleküls, das für das topografisch geordnete Einwachsen der retinalen Fasern in das Tektum mesencephali verantwortlich gemacht wird (Shigetani et al., 1997; Logan et al., 1996). Seit Kurzem ist auch bekannt, dass Engrailed-2 auf das Faserwachstum und damit potenziell auf die Wanderung von Zellen einwirken kann (Brunet et al., 2005).

Weitere Parallelen zwischen den Funktionen von Engrailed-2 und CCK können auf der Verhaltensebene diskutiert werden. Seit einigen Jahren werden Engrailed-2 Mutationen mit Autismus assoziiert (Trottier et al., 1999; Gharani et al., 2004; Bartlett et al., 2005; Benayed et al., 2005; Licinio and Wong, 2004). Von CCK ist bekannt, dass es die Freisetzung von Oxytocin aus hypothalamischen Neuronen stimuliert (Bondy et al., 1989; Blevins et al., 2003; Neumann et al., 1994; Hashimoto et al., 2005; Onaka et al., 1995). Die Präsenz von Oxytocin hat wiederum einen Einfluss auf das Sozialverhalten, wie durch Studien an Oxytocin Knock-out Mäusen belegt werden konnte (Ferguson et al., 2001; Winslow et al., 2000; Winslow and Insel, 2002; Ferguson et al., 2000; Young et al., 1997). In Kindern mit autistischen Entwicklungsstörungen wurde ein reduzierter Oxytocin-Plasmaspiegel gefunden (Modahl et al., 1998; Green et al., 2001). Darüber hinaus wurden Mutationen im Oxytocinrezeptorgen gefunden, welche mit Autismus assoziiert werden können (Ylisaukko-Oja et al., 2006; Wu et al., 2005; Young, 2001). Basierend auf diesen Befunden wurden erste erfolgreiche Therapieansätze mit Oxytocin durchgeführt, die aber noch durch weitere umfassendere Studien abgesichert werden müssen (Hollander et al., 2003). Der hier aufgezeigte Befund, dass Engrailed-2 die CCK-Expression steuert, könnte folglich bedeuten, dass Oxytocin verringert ausgeschüttet wird. Verminderte Oxytocinlevel führen dann zu Verhaltensweisen, wie sie bei autistischen Patienten gefunden wurden.

Darüber hinaus ist in diesem Zusammenhang interessant, dass außer CCK noch weitere Gene, die mit Autismus in Zusammenhang gebracht werden, von einer veränderten Genregulation durch die Überexpression von Engrailed-2 betroffen waren (Kap. 3.7; Tab. 28). Aus 89 Genen, die im Fokus als Autismus-Kandidatengene stehen (Wassink et al., 2004), konnten acht Gene mit einer potenziellen Regulation in der L7En-2 Maus identifiziert werden. Das Gen Neurofibromatosis 2 ist ein Tumor- und Metastasen-Suppressorgen, das für die Bildung von mehreren neuronalen Tumoren (Schwannome, Meningiome) verantwortlich gemacht wird (Lallemand et al., 2003) (siehe auch 4.9). Es interagiert mit Beta Spectrin II in den Somata der Purkinjezellen und zeigt eine Kolokalisation mit Beta 1 Integrin. Vermutlich ist es an der Zytoskelett-Organisation mit Einfluss auf die Zelladhäsion und Motilität beteiligt (Obremski et al., 1998; Chen et al., 2001). Rab3A ist am Transport von synaptischen Vesikeln beteiligt, weitere Rab-Proteinen sind ebenfalls differenziell reguliert (siehe auch 4.9) (Leenders et al., 2001). ApoE steht im Kontext mit dem Lipidmetabolismus (Mahley et al., 1984) und Slc6a4 ist ein Serotonin Transporter, der für die Aufnahme des Neurotransmitters Serotonin aus dem Synaptischen-Spalt in das präsynaptische

Neuron verantwortlich ist (Schweighofer et al., 2004). Diese Auswahl allein verdeutlicht beispielhaft, dass ein breites Spektrum an funktionell verschiedenen Genen mit Autismus assoziiert ist und nicht ein einzelnes für die Ausprägung von Autismus verantwortlich gemacht werden kann. Der multifaktorielle Charakter von Autismus weist viele Parallelen zum Phänotyp der L7En-2 Maus auf.

Interessanterweise wird die hier genutzte L7En-2 Maus mittlerweile als potenzielle Modellmaus für autistische Erkrankungen in der Literatur diskutiert (Murcia et al., 2005; Moy et al., 2006; Crawley, 2004; Lim et al., 2005). Neben den genetischen Daten sprechen hierfür vor allem morphologische Veränderungen im Cerebellum von Autisten und von L7En-2 Tieren (Belmonte et al., 2004). In der L7En-2 Maus ist wie bei den meisten Autisten die Anzahl der Purkinjezellen im Cerebellum reduziert, was in beiden Fällen mit einer reduzierten Größe des Kleinhirns einhergeht (Bauman and Kemper, 2005; Bailey et al., 1998; Townsend et al., 1999; Courchesne, 1997; Courchesne, 1991). Zudem zeigen beide Kleinhirne Defizite in der Differenzierung der Neurone. Der zeitliche Ablauf und das örtliche Auftreten dieser Defizite korreliert dabei in hohem Masse in Mensch und L7En-2 Maus.

Für eine Rolle des Kleinhirns bei Autismus sprechen auch Untersuchungen, die dem Cerebellum nicht nur eine Funktion bei motorischen Prozessen sondern auch bei emotionalen und cognitiven Aktivitäten zusprechen (Ito, 2006; Schutter and van Honk, 2005; Schmahmann and Caplan, 2006). Darüber hinaus gibt es schon eine Reihe von Studien, die sich mit der Rolle des Kleinhirns bei Autismus beschäftigen (Allen and Courchesne, 2003; Pierce et al., 2001; Critchley et al., 2000) (Courchesne, 1991). Ungeklärt ist bisher noch, ob tatsächlich die Überexpression oder aber eine Repression der Engrailed-2 Funktion ursächlich für die Entstehung des Autismus-Phänotyps ist. Auch Engrailed-2 Knock-out Mäuse zeigen der Überexpressionsmutanten vergleichbare morphologische Veränderungen des Kleinhirns. Zudem konnten Auffälligkeiten im Sozialverhalten festgestellt werden (Cheh et al., 2006; Kuemerle et al., 2006). Ein wichtiger Punkt, der als nächstes geklärt werden muss, ist die Bedeutung der Mutationen im Engrailed-2 Gen. Diese Mutationen liegen innerhalb des ersten und einzigen Introns im Engrailed-2 Gen. Bisher gibt es keinerlei Hinweise auf eine regulatorische Funktion dieses Genabschnittes.

4.7 Das Metastasen Suppressorgen 1

Das Metastasen Suppressorgen 1 (Mtss1, MIM) ist ein weiteres, in den L7En-2 Mäusen differenziell exprimiertes Gen. Es gehört zu der Gruppe der Zytoskelett-assoziierten Proteine. Im Cerebellum findet sich am Tag der Geburt nur eine geringe Expression. Diese steigt dann bis zur Altersstufe P7 deutlich an, und bleibt bis in die adulten Stadien in den Purkinjezellen auf einem hohen Niveau (Mattila et al., 2003) (Glassmann, Molly, et al., unveröffentlichte Daten).

Die Untersuchungen ergaben eine Zelltyp-spezifische Expression von Mtss1. In Purkinjezellen startet die Expression von Mtss1 nach ihrer Entstehung aus den Vorläuferzellen und blieb danach konstant erhalten. Dagegen wurde Mtss1 in den Körnerzellen nur transient exprimiert. Hier zeigte sich nach der Altersstufe P7 ein deutlicher Rückgang in der Expression. In beiden Zelltypen zeigte sich die Expression von Mtss1 jedoch erst in der postmitotischen Phase, während der Migration und der initialen Differenzierung von Axonen und Dendriten.

In dieser Entwicklungsphase unterliegen die Zellen starken morphologischen Veränderungen, entsprechend wichtige Prozesse sind dann der Transport von Membranpartikeln und der Zytoskeletumbau, bei denen Mtss1 wahrscheinlich eine Funktion zukommt. Ursprünglich wurde Mtss1 als ein Gen charakterisiert, dass in metastasierenden Tumorzellen des Blutes nicht exprimiert und deshalb „Missing in Metastasis“ (MIM) genannt wurde (Lee et al., 2002). Untersuchungen über den molekularen Aufbau zeigen, dass Mtss1 eine Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) Homologie 2 Domäne (WH2) enthält, mit der es Aktin-Monomere binden kann, sowie eine N-terminal lokalisierte IRSp53/MIM Domäne (IMD) über die es F-Aktin Moleküle bündeln kann (Yamagishi et al., 2004). Darüber hinaus besitzt Mtss1 eine IMD-Domäne, über die eine Assoziation mit Rac ermöglicht wird (Bompard et al., 2005; Yamagishi et al., 2004). Über diese Interaktion wird Rac an den Syntheseort der Aktinbündel positioniert, wodurch es seinen stimulierenden Einfluss auf die Synthese ausüben kann (Hall, 1998; Fukata et al., 2003). Unterstützung für eine Funktion von Mtss1 bei Zytoskelettorganisation wird durch Studien geliefert, in denen eine Expression von Mtss1 zur Modifikation von Aktinfilament und zur Ausbildung von Membranausfaltungen und Filopodien führte (Loberg et al., 2005; Woodings et al., 2003; Yamagishi et al., 2004). Diese Prozesse haben auch bei der Ausbildung von neuronalen Fortsätzen eine grundlegende Bedeutung.

Die frühe postnatale Expression von Mtss1 in den Körnerzellen deutet auf eine Funktion von Mtss1 bei der Migration und der synaptischen Integration hin. Dass die Körnerzellen nach ihrer Positionierung in der inneren Körnerzellschicht und der Ausbildung ihrer neuronalen Verschaltungen nur noch eine geringe strukturelle Dynamik aufweisen, könnte im Zusammenhang mit der Zelltyp-spezifischen Abschaltung der Mtss1 Expression stehen. Purkinjezellen dagegen

weisen zeitlebens eine extrem hohe Dynamik in den Verzweigungen der Dendritenbäume und den darauf befindlichen Spines auf. Entsprechend korreliert die Expression von *Mtss1* in den Purkinjezellen mit den andauernden Veränderungen der Zytoskelettarchitektur.

In den *L7En-2* Mäusen wurde *Mtss1* interessanterweise nur transient im Zeitraum um den Postnataltag sieben herunterreguliert. Diese Phase stimmt genau mit dem Entwicklungsabschnitt überein, in dem bei den *L7En-2* Tieren eine Verzögerung der Dendritogenese beobachtet wurde. Bemerkenswert ist, dass auch bei den adulten *L7En-2* Tieren eine schlüssige Übereinstimmung zwischen der Expression von *Mtss1* und dem Entwicklungszustand vorliegt, da bei diesen Tieren nur geringe Effekte auf die Purkinjezellmorphologie gefunden wurden und ein entsprechend hohes Expressionsniveau von *Mtss1* vorhanden ist. Neben Parvalbumin und Tetraspanin-5 ist *Mtss1* ein weiteres Gen, das einen plausiblen Zusammenhang zwischen der Expression und den morphologischen Veränderungen der Purkinjezellen in der *L7En-2* Maus aufweist.

Inwieweit *Mtss1* ein direktes Zielgen von *Engrailed-2* sein kann, ist fraglich, da Datenbankanalysen keine potenziellen Bindungsstellen für *Engrailed-2* in der Promoterregion innerhalb von 5kB identifizieren konnten (siehe Anhang 5.1.6, Abb. 51). Dafür wurden mehrere Bindungsstellen in Intronsequenzen gefunden, die möglicherweise bei der Expression von verschiedenen Varianten des Gens eine Rolle spielen könnten. Das Auftreten verschiedener Splice-Varianten wurde für *Mtss1* beschrieben (Loberg et al., 2005; Loberg et al., 2005).

4.8 Semaphorin 3A

Eines der Gene, die in den *L7En-2* Tieren differenziell reguliert werden und ebenfalls wie *Mtss1* einen Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts haben, ist Semaphorin 3A (*Sema3A*). Semaphorin 3A ist ein sezerniertes Signalmolekül mit sowohl repulsiven wie auch attraktiven Eigenschaften auf das Wachstum von Neuriten (Goshima et al., 2002; Bagnard et al., 2000). Es bindet an der Zielzelle an einen Rezeptorkomplex aus Neuropilin-1 (*Nrp1*), Plexin-A1 (*Plxna1*) und immunglobulin-domänen-reiche Proteine wie L1. Hiedurch aktiviert es intrazellulär verschiedene Signalwege, unter anderem solche über Rac1 und Collapsin Response Mediator Proteine (CRMP) (Deo et al., 2004). Durch die Aktivierung des Semaphorin 3A Signalwegs werden Modifikation des Aktinzytoskeletts ausgelöst (Yu and Kolodkin, 1999; Nakamura et al., 2000; Liu and Strittmatter, 2001).

Semaphorin 3A ist eines der als differenziell exprimiert gefundenen Gene, das im Array nicht als solches nachgewiesen werden konnte. Dies ist jedoch nicht auf eine zu schwache Expression

zurückzuführen, da die Expressionswerte der Array-Daten im Wildtyp-Tier für die untersuchten Altersstufen P0, P7 und adult mit den Literaturwerten übereinstimmen und deutlich über dem Hintergrundwert lagen (Rabacchi et al., 1999; Solowska et al., 2002). In Purkinjezellen der L7En-2 Maus, wurde Semaphorin 3A reprimiert und daher relativ zu Körnerzellen nur schwach exprimiert. Diese spezifische Veränderung der Expression in den Purkinjezellen ist durch Gesamtextrakt-Analysemethoden nicht nachweisbar. Jedoch konnte mit der zellulären Auflösung der *in situ* Hybridisierung die differenzielle Expression in den Purkinjezellen nachgewiesen werden.

Über eine Funktion von Semaphorin 3A im Kleinhirn ist bisher nicht viel bekannt. Pontocerebelläre Fasern reagieren in Explantatkulturen repulsiv auf Semaphorin 3A exprimierende Hek-Zellen (Solowska et al., 2002). Eine Semaphorin 3A Nullmutation zeigt allerdings keine deutliche Veränderung der Lokalisation und Morphologie axonaler Projektionen im Cerebellum (Catalano et al., 1998). Für Moosfaseraxone wurde eine unterschiedliche Sensitivität auf Semaphorin 3A festgestellt, die mit dem Expressionsniveau des Rezeptors Neuropilin-1 korreliert. Es konnte gezeigt werden, dass Axone mit einer hohen Expression von Neuropilin-1 nur in solche Gebiete des Kleinhirns einwachsen, die keine oder nur eine geringe Expression von Semaphorin 3A aufweisen.

In diesem Zusammenhang wäre es möglich, dass eine reduzierte Semaphorin 3A Expression in Purkinjezellen einen Einfluss auf die Feinregulation von Moosfasern haben könnte, ohne einen generellen Einfluss auf die parasagittale Kompartimentierung des Kleinhirns postulieren zu müssen. In der L7En-2 Maus konnten subtile, aber deutliche Unterschiede in dem Einwachsen von lumbalen spinocerebellären Fasern nachgewiesen werden, die in ihrer Lokalisation und Ausbreitung mit der reduzierten Semaphorin 3A Expression gut korrelierbar sind (Baader et al., 1999). Ein Einfluss der Semaphorin 3A Expression auf das Moosfaserwachstum scheint also durchaus begründet. Darüber hinaus werden als Grundlage der axonalen Verschaltung im Kleinhirn eine Reihe von molekularen Mechanismen diskutiert, exemplarisch seien hier Ephrine, Engrailed-2 selbst oder Wnt-Gene genannt, die ein Grund sein könnten, warum in der Semaphorin 3A Knock-out Maus keine deutlichen Veränderungen nachgewiesen werden konnten.

Ein Grund dafür, dass bisher keine Funktion von Semaphorin 3A innerhalb des Kleinhirnkortex entschlüsselt werden konnte, beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass bisher kein Rezeptorprotein für Semaphorin 3A im Kleinhirnkortex nachgewiesen werden konnte. Unsere Daten zeigen allerdings erste Hinweise auf eine Expression von Neuropilin-1 in postmitotischen Körnerzellen. Zudem konnte hier gezeigt werden, dass CRMP5 in postmitotischen Körnerzellen exprimiert wird (Bretin et al., 2005). Unabhängig davon, über welche Rezeptoren Semaphorin 3A im Kleinhirnkortex wirken mag, scheint zumindest der klassische Signalweg von Semaphorin 3A konserviert zu sein.

Das in Purkinjezellen exprimierte Semaphorin 3A könnte somit ein Faktor sein, der entweder die Wanderung der Körnerzellen von der äußeren zur inneren Körnerzellschicht generell steuert, oder ihnen nur eine Richtung vorgibt. Dies würde bedeuten, dass Semaphorin 3A einen attraktiven Einfluss auf die postmitotischen Körnerzellen ausübt. Es könnte sogar auf die innere Körnerzellschicht wirken und dort dafür sorgen, dass sie sich in einem umschriebenen Abstand von den Purkinjezellen ansammeln. Eine attraktive Wirkung konnte auf Dendriten kortikaler Neurone bereits nachgewiesen werden (Polleux et al., 2000).

Eine reduzierte Expression von Semaphorin 3A in L7En-2 Tieren könnte ein verlangsamtes Einwandern der Körnerzellen in den Kleinhirnkortex hervorrufen. Hinweise dafür könnten sein, dass in L7En-2 Tieren eine dünnere innere Körnerzellschicht gefunden wurde. Jedoch konnte in den hier durchgeführten Zellkulturexperimenten kein Effekt von Semaphorin 3A auf die Wanderung der Körnerzelle aus cerebellären Schnittkulturen nachgewiesen werden.

Da gezeigt wurde, dass die Purkinjezellen keine auffällige Reduktion in der Sonic hedgehog Expression (Baader, unveröffentlichte Daten) aufweisen und auch die Dichte der Purkinjezellen bis auf die umschriebenen Areale nicht verändert ist, ist eine geringere Proliferation als Grund für das Auftreten der geringeren inneren Körnerzellschicht eher unwahrscheinlich. Ob allerdings eine vermehrte Apoptose von Körnerzellen in der äußeren Körnerzellschicht vorkommt, ist bisher nicht bekannt. Auch wissen wir nicht, ob weniger wandernde Körnerzellen im L7En-2 Kleinhirnkortex vorkommen.

4.9 Einfluss von Engrailed-2 auf den intrazellulären Membran- und Zytoskelettmetabolismus

Zur Ermittlung der biologischen Prozesse, die eine Rolle bei dem Phänotyp der L7En-2 Maus spielen könnten, wurden die differenziell exprimierten Gene mit ihren zellulären Funktionen verknüpft und in Gruppen mit gleichen funktionellen Eigenschaften eingeordnet. Um eine möglichst unabhängige Gruppierung zu erhalten, wurden hierfür die Klassifizierungen des „Gene Ontology Konsortiums“ angewendet (Gene Ontology Consortium, 2004).

Für die Verknüpfung und die Auswertung der Array-Daten mit den Informationen in der Gene Ontology Datenbank wurde für diese Arbeit das „GFINDER“ Analyse Programm eingesetzt (Masseroli et al., 2005; Masseroli et al., 2004). Ein wichtiger Bestandteil dieser Analyse bestand in der statischen Auswertung der Zuordnungen. Hierbei wurde überprüft, ob die differenziell exprimierten Gene in den einzelnen Untergruppen signifikant überrepräsentiert sind. Das gehäufte

Auftreten von Genen in bestimmten Gruppen spricht für eine besondere Bedeutung dieser Prozesse bei der Entstehung des L7En-2 Phänotyps.

Die Tabelle 29 (Kap. 3.8; Anhang 5.1.7, Tab 31) zeigt die Gene und ihre assoziierten Prozesse, die in der Analyse der Gene Ontology Daten mit dem GFINDER Programm als signifikant überrepräsentiert nachgewiesen wurden. Besonders auffällige Gene und Gengruppen werden in den folgenden Abschnitten einer näheren Betrachtung unterzogen, wobei herausgestellt werden soll, welche zellulären Prozesse möglicherweise für den L7En-2 Phänotyp von Bedeutung sind.

In der frühen postnatalen Phase der Kleinhirnentwicklung, zwischen den Altersstufen P0 und P7, wurden auffällig viele der differenziell exprimierten Gene den Gruppen Transport und Lokalisation zugeordnet. Viele dieser Gene sind an vesikulären Transportprozessen zwischen dem Golgiapparat und den Endosomen sowie der Plasmamembran beteiligt (Abb. 44) (Bonifacino and Glick, 2004; Tooze, 2001; Black and Pelham, 2000). Der Golgiapparat spielt eine zentrale Rolle bei der posttranslationalen Modifikation, der Sortierung und dem zielgerichteten Transport von Proteinen. Hinweise auf die Ursachen für die cerebellären Entwicklungsstörungen der L7En-2 Maus könnten die folgenden, an Transportprozessen beteiligten Gene liefern.

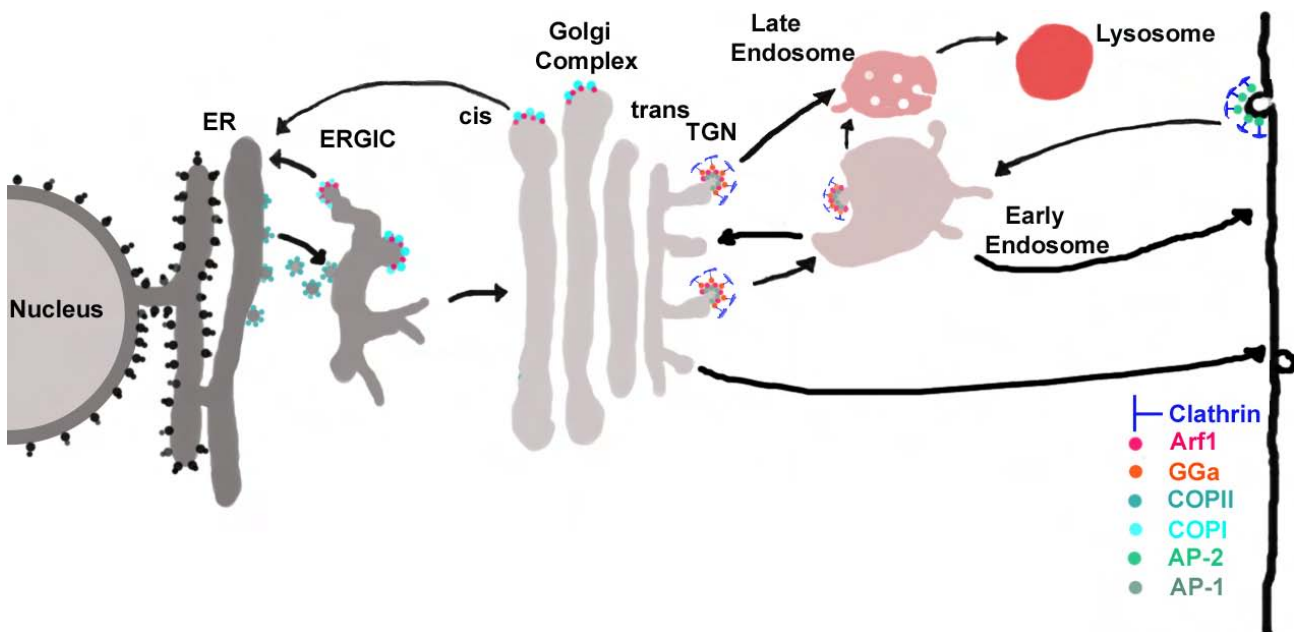


Abb. 44: Vesikuläre Transportwege im ER-Golgi System.
Abgeändert nach (Bonifacino and Glick, 2004).

Unter den differenziell exprimierten Genen befindet sich das Adapterprotein GGA2 ("golgi associated gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 2"). Bei der Bildung von Vesikeln mit einer Clathrinhülle (Clathrin-Coated-Vesicles) am Trans-Golgi-Netz (TGN) interagieren die

GGA2-Adapterproteine mit ARF-GTPasen und den Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR), wobei die GGA-Proteine eine Sortierfunktion ausüben, damit die richtigen Rezeptoren in die Vesikel rekrutiert werden (Abb. 45) (Puertollano et al., 2001a; Zhu et al., 2001).

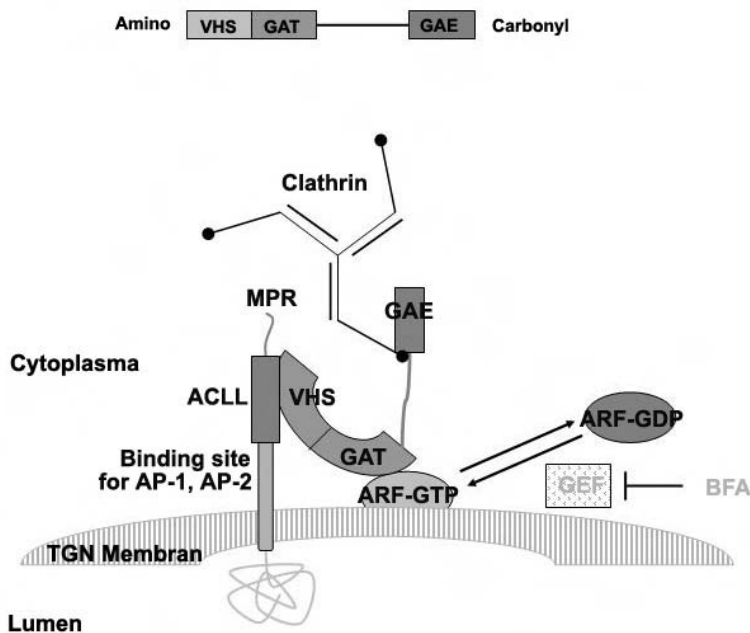


Abb. 45: Komponenten der Vesikelbildung.
Abgeändert nach (Tooze, 2001; Puertollano et al., 2001b)

Das Cog3-Protein ist Bestandteil des COG-Komplexes (Conserved Oligomeric Golgi), der aus acht Untereinheiten (Cog 1-8) zusammengesetzt ist (Ungar et al., 2006). Dieser Komplex vermittelt die initiale Bindung von COPI (coat protein complex I) Transport-Vesikeln an Golgimembranen beim retrograden Vesikel-Transport des Golgiapparats (Suvorova et al., 2002). Für den COG-Komplex sind weitere Interaktionspartner bei der Vesikel-Bindung an den Golgiapparat beschrieben. Das Interaktionsspektrum beinhaltet unter anderem die SNARE- (soluble N-ethyl maleimide sensitive factor attachment protein receptor) und die Rab-Proteine.

Basierend auf der Array-Analyse zeigten mehrere Rab-Proteine (Rab21, Rab22a, Rab32, Rab35) in der L7En-2 Maus eine differenziell Expression. Die Rab-Proteine sind kleine GTPasen, von denen bisher über 60 Familienmitglieder identifiziert worden sind (Stenmark and Olkkonen, 2001). Sie sind an wichtigen Schritten bei der Vesikelbildung, dem Transport von Vesikeln und Organellen und der Bindung von Vesikeln an ihre Zielstrukturen beteiligt (Zerial and McBride, 2001; Stenmark and Olkkonen, 2001). Studien an epithelialen Zelllinien zeigten eine Lokalisation von Rab21 auf endozytotischen Vesikeln und belegen eine Funktion bei dem Transport zwischen dem frühen und späten Endosom (Simpson et al., 2004; Zhang et al., 2006). Im Hinblick auf den Phänotyp der L7En-2 Maus sind auch neuere Studien interessant, in denen für Rab21 eine Funktion bei der

Regulation der Zelladhäsion und der Migration durch die Kontrolle des endosomalen Transports von β 1-Integrin nachgewiesen wurde (Pellinen et al., 2006). Rab22a und Rab35 sind in frühen und späten Endosomen lokalisiert und ebenfalls an dem spezifischen Transport bzw. der Fusion der Vesikel mit den Zielstrukturen beteiligt (Mesa et al., 2001; Kouranti et al., 2006).

Das differenziell exprimierte Vesikel-Protein SNAP-23 (soluble NSF attachment protein) ist eng verwandt mit dem neuronspezifischen SNAP-25 Protein (Ishiki and Klip, 2005). Beide Proteine haben eine Funktion bei der Calcium abhängigen Exozytose und sind beteiligt an der Bindung der sekretorischen Vesikeln an die Ziellmembran (McMahon and Sudhof, 1995; Sorensen, 2005). Während für SNAP-23 u. a. eine Funktion beim Transport von Glutamat-Rezeptoren in die Dendriten vor der Synapsenbildung nachgewiesen wurde, ist SNAP-25 im Axon lokalisiert und an der Fusion von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran beteiligt (Washbourne et al., 2004; Chen et al., 1999; Oyler et al., 1991). Im Gegensatz zu Snap-23 ist das Gen Napa herunterreguliert, das für das alpha Snap-Protein (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein alpha) codiert. Wie Snap-23 hat es eine Funktion bei der Fusion von Vesikeln mit der Ziellmembran (Babcock et al., 2004).

Anhand der hier beispielhaft vorgestellten Gene wird deutlich, dass es bei der L7En-2 Maus an verschiedenen Positionen zu Störungen der vesikulären Transportprozesse kommt. Eine Auswirkung auf die Entwicklung der Purkinjezellen der L7En-2 Maus ist gut vorstellbar, da der zielgerichtete Transport von Proteinen und Membranbestandteilen die Basis für die Etablierung einer zellulären Polarität bildet. Für die Ausbildung dieser Polarität bei neuronalen Zellen, mit ihren charakteristischen Axonen und Dendriten, sind die korrekte Sortierung und der zielgerichtete Transport von Proteinen und Membranbestandteilen entscheidend (Horton and Ehlers, 2003). In hippocampalen Neuronen orientiert sich der Golgiapparat in Richtung des längsten Dendriten und ein Hauptanteil der gebildeten Vesikel wird in Richtung des Hauptdendriten transportiert. Dieser Transport kann durch eine Behandlung mit Brefeldin A unterbrochen werden. Diese Substanz führt zum Zerfall des Golgi Apparats woraus eine Inhibition des dendritischen Wachstums um 86 % resultiert (Horton et al., 2005). Die Reduktion des Dendritenwachstums ist reversibel und kann durch Auswaschen von Brefeldin A aufgehoben werden, wobei der Golgiapparat und das Dendritenwachstum wieder hergestellt werden (Lippincott-Schwartz et al., 1989).

Ein ähnlicher Effekt könnte auch bei dem Phänotyp der L7En-2 Maus eine Rolle spielen, die Beeinträchtigung der Dendritogenese könnte demnach auch eine Folge von gestörten vesikulären Transportprozessen sein. Interessant ist auch der zeitliche Aspekt, da die differenzielle Expression der Gene genau mit der kritischen Phase der Dendritogenese zusammenfällt. Nach dieser Phase werden die meisten Gene wieder normal exprimiert und entsprechend wird der Rückstand in der Entwicklung der Dendriten wieder kompensiert.

Eine weitere interessante Gruppe unter den regulierten Genen umfasst solche, die am Aufbau und der Funktion des Zytoskeletts beteiligt sind. Zytoskelett Proteine sind zum einen eng mit der morphologischen Organisation der Zelle verbunden, zum anderen mit intrazellulären Transportprozessen. Spectrine sind Zytoskelett Proteine, die aus zwei Dimeren mit jeweils einer alpha und einer beta Untereinheit gebildet werden. Durch die variablen Heterodimerformen und dadurch bedingten multiplen Bindungsstellen für Oberflächenproteine und Aktin, sind sie als zentrale Linkerproteine ausgezeichnet und können in Kombination mit Ankyrin, Adducin und Protein 4.1 Proteine an der Zellmembran positionieren (Bennett and Baines, 2001; Mohler et al., 2004). Dadurch können Umgebungssignale in Zellbewegungen umgewandelt werden. Die Vielfalt an Interaktionsmöglichkeiten wird durch Splicevarianten und deren unterschiedliche zelluläre Verteilung erhöht. Spectrin β II (Spnb2) kommt zum Beispiel in zwei unterschiedlich langen Isoformen im Cerebellum vor. Die Expression der kurzen Form ist beschränkt auf den Zellkörper von Purkinjezellen (Xu et al., 2002) während die lange Form auch in den Neuriten vorkommt.

Die Expression des Spectrin β II wurde in den L7En-2 Mäusen herunterreguliert. Immunhistochemische Untersuchungen haben ergeben, dass diese Regulation primär auf den axonalen Pol der Purkinjezellsomatas bezogen war. Speziell für Spectrin β II konnte gezeigt werden, dass es die Verankerung des Glutamat Transporters EAAT4/SLC1A6 an der Oberfläche der Plasmamembran stabilisiert. Zudem ist gezeigt, dass Spectrine über Ankyrine für die Lokalisation von Kanalproteinen verantwortlich sind. Während der EAAT4 Glutamat Transporter hauptsächlich postsynaptisch auf dendritischen Spines und distalen Dendriten der Purkinjezellen exprimiert wird (Nagao et al., 1997; Dehnes et al., 1998), findet man Natriumkanäle primär auf dem axonalen somatischen Pol von Neuronen. Die Missexpression von Spektrinen könnte folglich die Dislokation solcher Transport- und Kanalproteine zur Folge haben, welche mehrere zelluläre Szenarios als Konsequenz vorstellen lassen. Werden Transporter oder Kanäle an einer Membrandomäne angehäuft, vor allem in Zusammenhang mit Zytoskelettproteinen, bilden sich Dornfortsätze aus. Tatsächlich konnten in L7En-2 Mäusen am axonalen Pol der Purkinjezellsomata massive Anhäufungen von Synapsen gefunden werden, wie sie in dieser Anzahl normalerweise nur bei den Dendriten der Purkinjezellen vorkommen (Liebig, Dissertation, Bonn, in Bearbeitung). Ein vermehrter Glutamattransport an einem falschen Ort könnte aber auch zur Zellschädigung führen. In L7En-2 Mäusen sterben ca. 40 % der Purkinjezellen während der frühen Postnatalperiode im Kleinhirn ab (Baader et al., 1998). Gleichzeitig ist bekannt, dass Mutationen im humanen Spectrin-Gen (SPTBN2/SCA5) zur Ausbildung der Spinocerebellären Ataxie Typ5 (SCA5) führt (Ikeda et al., 2006). In MRI und Autopsy-Untersuchungen wurden eine cerebelläre korticale Atrophy sowie ein Verlust von Purkinjezellen und eine verkleinerte Molekularschicht festgestellt.

Dass Spektrin β II assoziierte Mechanismen für die Ausprägung des L7En-2 Phänotyps eine Rolle spielen, zeigt auch die Beobachtung, dass das Gen Neurofibromatosis 2 (Nf2) hochreguliert ist. Das Genprodukt von Nf2, Merlin, interagiert direkt mit Spectrin β 2 und verbindet als Mitglied der Bande 4.1 Proteine Membrankomponenten mit dem Zytoskelett (Neill and Crompton, 2001). Merlin kolokalisiert mit dem postsynaptischen Protein PSD-95 und ist in postsynaptischen Verdichtungen von dendritischen Spines nachgewiesen worden. Eine Rolle von Merlin bei der Bildung und Ausprägung von dendritischen Spines ist also wahrscheinlich und könnte durch seine nachgewiesene Expression in Purkinjezellen auch für diesen Zelltyp zutreffen (Gronholm et al., 2005). Die Interaktion von Merlin mit Cadherinen und Integrinen legt zusätzlich eine Funktion dieses Linkerproteins bei der Ausbildung von Synapsen und deren Plastizität nahe (Obremski et al., 1998; Lallemand et al., 2003).

Abschließend kann festgehalten werden, dass durch die Array-Analyse wichtige Einblicke in die Prozesse der neuronalen Entwicklung gewonnen werden konnten. Für die neuronale Reifung sind korrekt durchgeführte Sortiermechanismen und Transportprozesse von Proteinen und Membranbestandteilen wichtige Voraussetzungen für die Festlegung der axonalen und somato-dendritischen Domänen in den L7En-2 Purkinjezellen, wie auch in anderen Neuronen (Tang, 2001; Burack et al., 2000; Jan and Jan, 2003). Da die prinzipielle Struktur der Purkinjezellen in den L7En-2 Tieren nicht zerstört ist, ist zu vermuten, dass Engrailed-2 für die Festlegung der korrekten Adressierung von Membranvesikeln zuständig ist, nicht aber für die generelle Bildung von Vesikeln. Damit werden Membranbestandteile für die Ausbildung von Neuriten gebildet, aber nicht an der richtigen Stelle in der Zelle deponiert. Dies führt zwangsweise zu einem verzögerten Fortsatzwachstum. Da aber nur eine Richtung, nämlich die in Richtung Dendrit gestört ist, bleibt nur das Dendritenwachstum zurück, nicht aber das der Axone.

Endogen könnte Engrailed-2 die Rolle zukommen, die axonale, embryonal stattfindende Reifung zu fördern, und eine frühe Ausbildung der Dendriten zu verhindern. Erst die Abschaltung der Expression des Repressorgens Engrailed-2 in der frühen postnatalen Phase ermöglicht die Ausreifung der Dendriten. Engrailed-2 könnte somit als eine Art Zeitschalter fungieren, der eine vorzeitige Aktivierung der Purkinjezellreifung verhindert.

5 Anhang

5.1 Ergänzende Ergebnisse

5.1.1 Genotypisierung von L7En-2 transgenen Mäusen

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden mithilfe einer PCR-Analyse genotypisiert (Abb. 46). Dazu wurde den Mäusen eine Schwanzspitzenbiopsie abgenommen, und diese mittels ProteinaseK proteolytisch verdaut. Durch die Proteolyse des Gewebes wurde DNA in Lösung gebracht, die nun mit der PCR analysiert werden konnte. Die verwendeten L7En-2-spezifischen Primer ergaben bei den L7En-2 Tieren eine spezifische Bande bei ca 500 bp, während bei den WT Tieren keine spezifische Bande erzeugt wurde. Als Kontrolle dienten Gapdh Primer (983 bp; 230 bp).

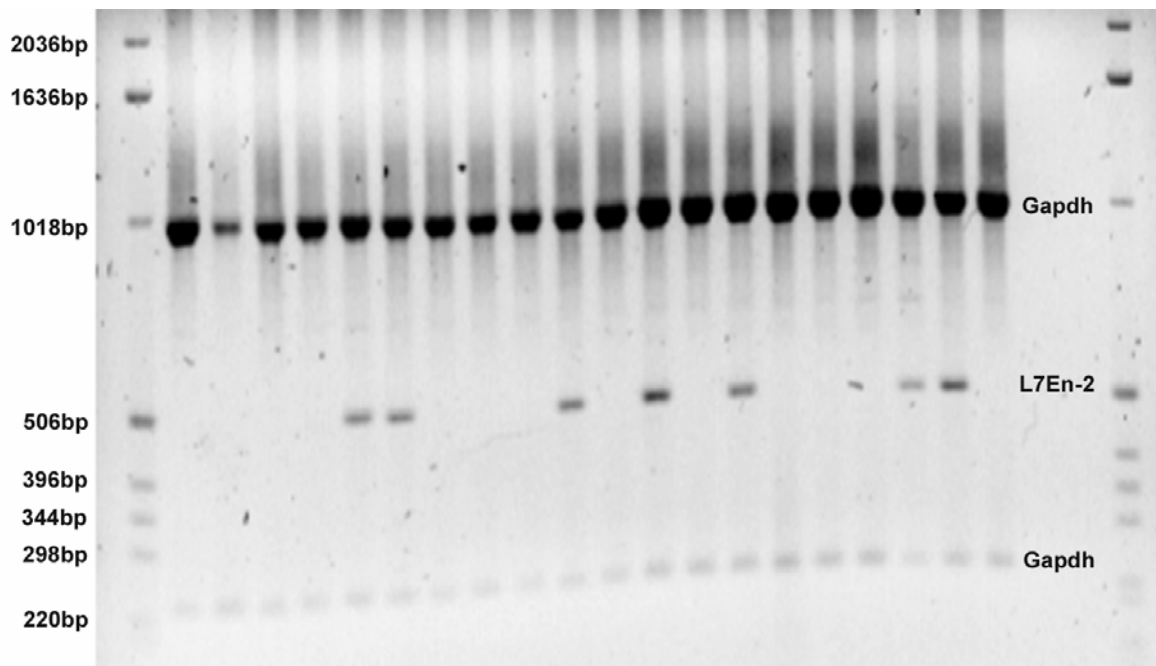


Abb. 46: PCR-Analyse zur Charakterisierung von WT und L7En-2 Mäusen.

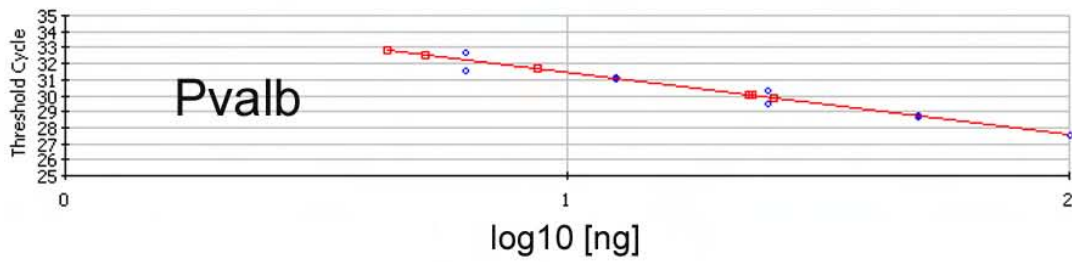
5.1.2 CT-Werte und Standardkurven der Parvalbumin Realtime-PCR-Analyse

	Pvalb	B2m	Hprt1	Gapdh
	Threshold Cycle (CT)	Threshold Cycle (CT)	Threshold Cycle (CT)	Threshold Cycle (CT)
P7WTcDNA25ng	29.88	27.91	28.75	23.68
P7WTcDNA25ng	30.04	27.7	28.47	23.58
P7WTcDNA25ng	30.07	28.03	28.36	23.57
P7ENcDNA25ng	32.54	27.63	28.66	23.13
P7ENcDNA25ng	31.68	27.8	28.09	22.9
P7ENcDNA25ng	32.84	27.91	28.61	23.85
P7WTcDNA 100ng	27.58	25.36	26.09	20.67
P7WTcDNA 100ng	27.6	25.44	26.48	20.67
P7WTcDNA 50ng	28.84	26.33	27.24	22.08
P7WTcDNA 50ng	28.69	26.55	27.33	21.91
P7WTcDNA 25ng	29.54	27.02	27.9	22.61
P7WTcDNA 25ng	30.31	27.02	28.42	22.65
P7WTcDNA 12.5ng	31.13	28.02	28.89	23.6
P7WTcDNA 12.5ng	31.23	28.73	29.4	23.87
P7WTcDNA 6.25ng	31.61	29.14	30.59	24.91
P7WTcDNA 6.25ng	32.73	29.58	30.62	25.09

Tab. 30: Threshold Cycle (CT) der Realtime PCR-Produkte für Pvalb, B2m, Hprt1 und Gapdh.

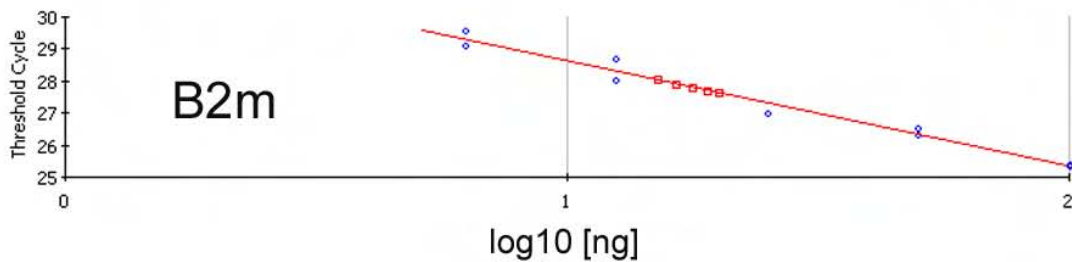
Correlation Coefficient: 0.982 Slope: -3.843 Intercept: 35.297 $Y = -3.843 X + 35.297$
 PCR Efficiency: 82.1 %

□ Unknowns
 ○ Standards



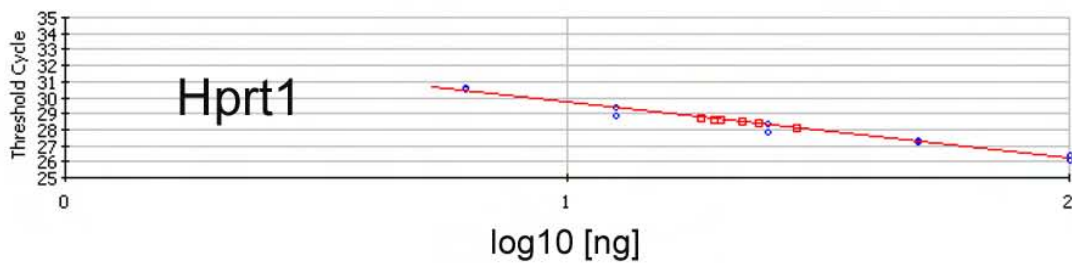
Correlation Coefficient: 0.985 Slope: -3.277 Intercept: 31.900 $Y = -3.277 X + 31.900$
 PCR Efficiency: 101.9 %

□ Unknowns
 ○ Standards



Correlation Coefficient: 0.987 Slope: -3.486 Intercept: 33.170 $Y = -3.486 X + 33.170$
 PCR Efficiency: 93.6 %

□ Unknowns
 ○ Standards



Correlation Coefficient: 0.993 Slope: -3.455 Intercept: 27.634 $Y = -3.455 X + 27.634$
 PCR Efficiency: 94.7 %

□ Unknowns
 ○ Standards

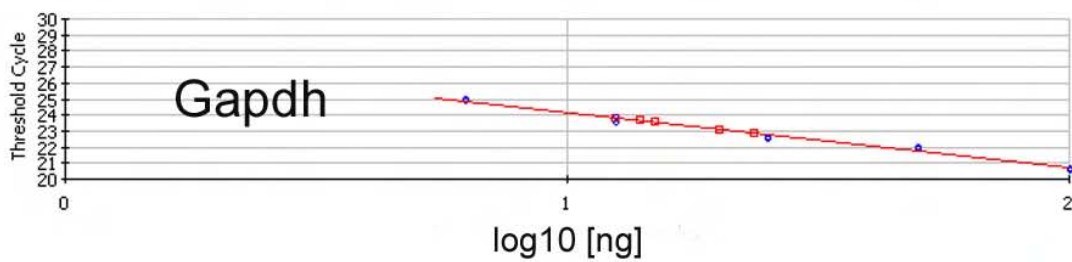


Abb. 47: Standardkurven der Realtime-PCR Analyse.

5.1.3 Qualitätskontrolle der Realtime-PCR

Die Schmelzkurven-Analyse zeigt spezifisch amplifizierte PCR-Produkte (Abb. 48).

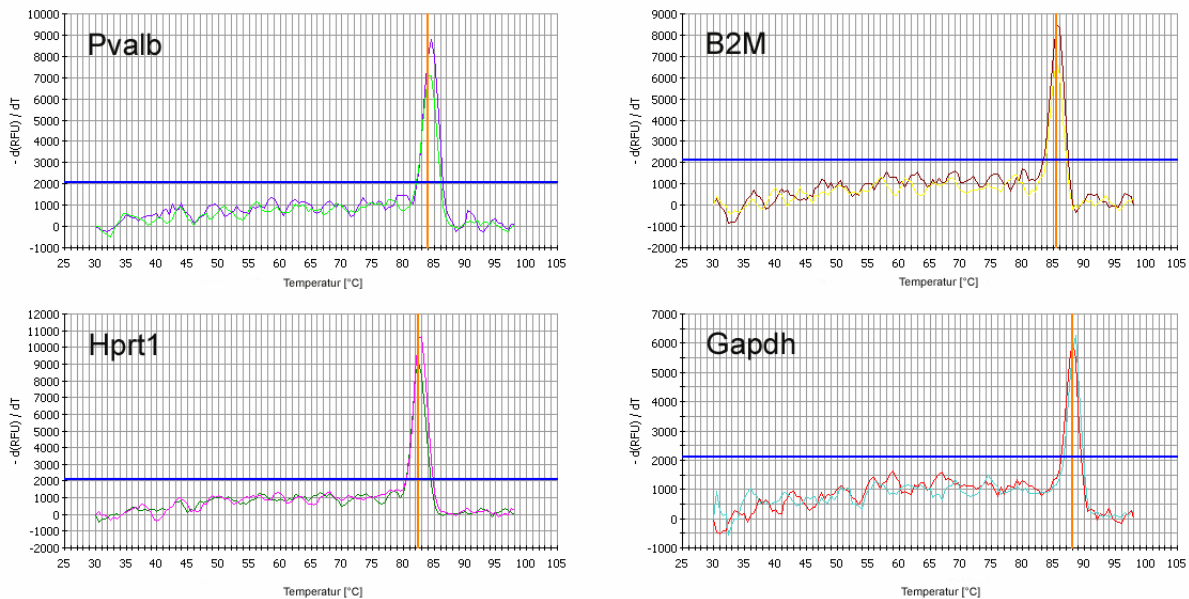


Abb. 48: Schmelzkurven für die P7 WT und L7En-2 PCR-Produkte.

Nach der Realtime-PCR wurden die PCR-Produkte in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Die PCR-Ansätze (3-8, 11-12) zeigen, dass in der PCR spezifisch jeweils nur ein Produkt amplifiziert wurde.

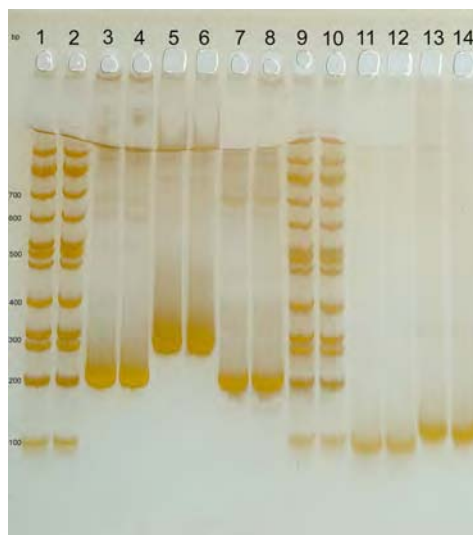
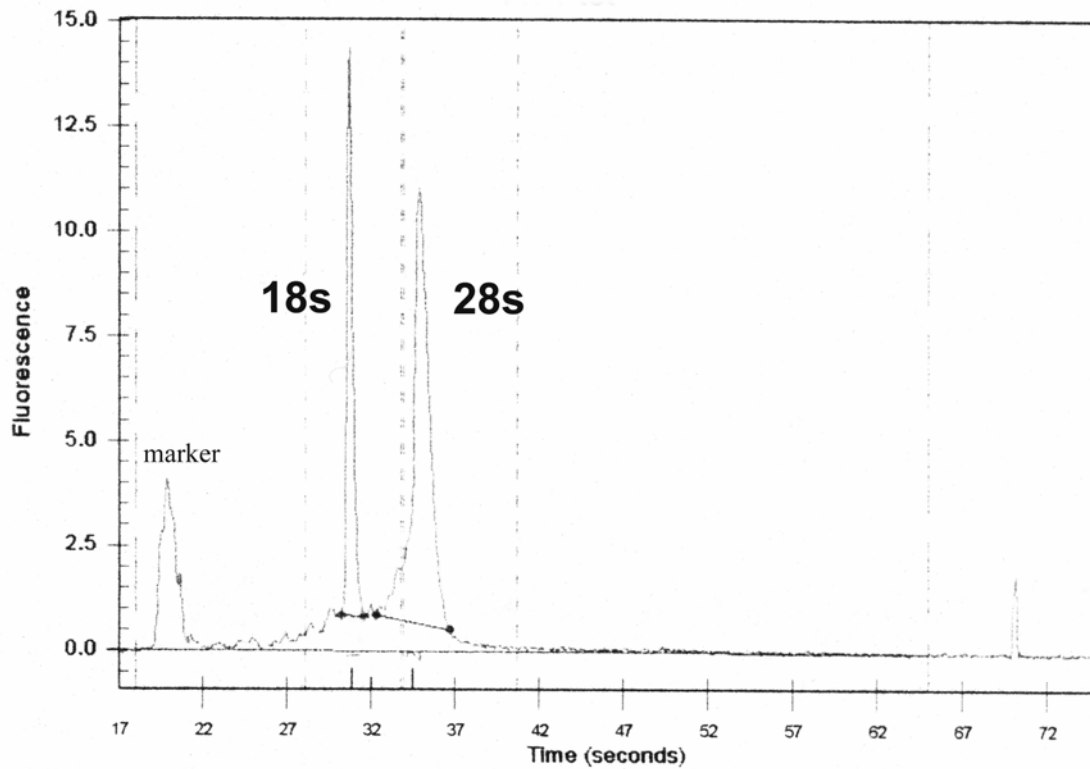


Abb. 49: Auftrennung der Realtime-PCR Produkte in einem Silbergel.

Die Realtime PCR-Produkte wurden in einem 16 % Polyacrylamidgel getrennt und durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht. 1, 2, 9,10) 100 bp Marker NEB; 3) Primer Gapdh, P7 WT cDNA; 4) Primer Gapdh, P7 L7En-2 cDNA; 5) Primer B2m, P7 WT cDNA; 6) Primer B2m, P7 L7En-2 cDNA; 7) Primer Hprt1, P7 WT cDNA; 8) Primer Hprt1, P7 L7En-2 cDNA ; 11) Primer Pvalb, P7 WT cDNA; 12) Primer Pvalb, P7 L7En-2 cDNA 13) Primer Tspan5, P7 WT cDNA; 14) Primer Tspan5, P7 L7En-2 cDNA.

5.1.4 Qualitätskontrolle der RNA

Nach der Isolierung der RNA mit Trizol wurde die Qualität in einem Agilent 2100 Bioanalytiker überprüft. Das Elektropherogramm (Abb. 50) zeigt die typischen 18s und 28s Peaks der ribosomalen RNA. Die RNA Probe war intakt, ohne Anzeichen von Degradation.



Corrected RNA Area: 102.33
RNA Concentration: 1,927.11 ng/ul

rRNA Contamination: 51.12 %

#	Name	Start Time(s)	End Time(s)	Corr. Area	% of total Area
1	rRNA	30.20	31.55	18.10	17.69
2	rRNA	32.30	36.65	34.21	33.43

Abb. 50: Qualitätskontrolle der RNA.

5.1.5 MDM Algorithmus

Der Algorithmus zur Selektion von differenziell exprimierten Genen wurde als Makro in einer Access-Datenbank mit der Datenbankprogrammiersprache SQL implementiert.

'Version MDM-V2.3 Microarray-Database-Manager 2004 ;

Copyright by Christian Matthies and Martin Ingo Holst ; mailto:martin.holst@uni-bonn.de

Option Compare Database

Option Explicit

Sub analyse(THRrnklgl As String, THRrngrgl As String, THRabsdiff As String, THRcnt As String)

If MsgBox("Das kann jetzt länger dauern. OK?", 33, "Achtung") = vbOK Then

' Variablen Deklarationen

Const MaxDaten As Integer = 30000

Dim db As Database, SQL As String, SQL1 As String

Dim rst1 As Recordset, rst21 As Recordset, rst22 As Recordset, rst3 As Recordset, rst4 As Recordset, rst5 As Recordset, rst6 As Recordset, rst As

Recordset

Dim td As TableDef

Dim Abfrage1 As QueryDef, Abfrage21 As QueryDef, Abfrage22 As QueryDef, Abfrage3 As QueryDef, Abfrage4 As QueryDef, Abfrage5 As

QueryDef

Dim f As Field

Dim schwelleRn As Integer

Dim schwelleABSD As Integer

Dim titel As String

'schwelleRn = InputBox("Schwellenwert: Ratio >= ", "Bitte Wert eingeben", 1)

'schwelleABSD = InputBox("Schwellenwert: ABS Difference >= ", "Bitte Wert eingeben", 1)

Set db = CurrentDb

'Abfrage 1

Dim x As Byte

SQL = "SELECT Tab1.[Ratio], Tab1.[Master], Tab1.[Client], Tab1.[ABS Diff], Tab1.Diff, Tab1.Name, Tab1.ID, Tab1.Aida, Tab1.hyb, Tab1.Index, Tab1.Label, Tab1.Type"

SQL = SQL + " FROM Tab1"

SQL = SQL + " WHERE (((Tab1.ID)<>'marker:Arabidopsis') And ((Tab1.ID)<>'marker:Kanamycin') And ((Tab1.ID)<>'empty')) "

If anz_tables > 1 Then

For x = 2 To anz_tables

SQL = SQL + " UNION SELECT Tab" + Format(x) + ".[Ratio], Tab" + Format(x) + ".[Master], Tab" + Format(x) + ".[Client], Tab" + Format(x) + ".[ABS Diff], Tab" + Format(x) + ".Diff, Tab" + Format(x) + ".Name, Tab" + Format(x) + ".ID, Tab" + Format(x) + ".Aida, Tab" + Format(x) + ".hyb, Tab" + Format(x) + ".Index, Tab" + Format(x) + ".Label, Tab" + Format(x) + ".Type"

SQL = SQL + " FROM Tab" + Format(x)

SQL = SQL + " WHERE (((Tab" + Format(x) + ".ID)<>'marker:Arabidopsis') And ((Tab" + Format(x) + ".ID)<>'marker:Kanamycin') And ((Tab" + Format(x) + ".ID)<>'empty')) "

Next x

End If

On Error Resume Next

DoCmd.DeleteObject acQuery, "Abfrage1"

On Error GoTo 0

Set Abfrage1 = db.CreateQueryDef("Abfrage1")

Abfrage1.SQL = SQL

Set rst1 = db.OpenRecordset("Abfrage1")

'Abfrage 2.1

If THRrngrgl <> "" Then

SQL = "SELECT Abfrage1.[Ratio], Abfrage1.[Master], Abfrage1.[Client], Abfrage1.[ABS Diff], Abfrage1.Diff, Abfrage1.Name, Abfrage1.ID,

Abfrage1.Aida, Abfrage1.hyb, Abfrage1.Index, Abfrage1.Type"

SQL = SQL + " FROM Abfrage1 WHERE ("

SQL = SQL + " ((Abfrage1.[Ratio]) >= " + THRrngrgl + ")

If (THRabsdiff <> "") Then

SQL = SQL + " And ((Abfrage1.[ABS Diff]) >= " + THRabsdiff + ")

End If

SQL = SQL + ") ORDER BY Abfrage1.ID, Abfrage1.hyb;"

On Error Resume Next

DoCmd.DeleteObject acQuery, "Abfrage21"

On Error GoTo 0

Set Abfrage21 = db.CreateQueryDef("Abfrage21")

Abfrage21.SQL = SQL

Set rst21 = db.OpenRecordset("Abfrage21")

End If

```

'Abfrage 2.2
  If (THRrnklgl <> "") Then
    SQL = "SELECT Abfrage1.[Ratio], Abfrage1.[Master], Abfrage1.[Client], Abfrage1.[ABS Diff], Abfrage1.Diff, Abfrage1.Name, Abfrage1.ID,
Abfrage1.Aida, Abfrage1.hyb, Abfrage1.Index, Abfrage1.Type"
    SQL = SQL + " FROM Abfrage1 WHERE ("
    SQL = SQL + "(Abfrage1.[Ratio]) <= " + THRrnklgl + ")"
    If (THRabsdiff <> "") Then
      SQL = SQL + " And ((Abfrage1.[ABS Diff]) >= " + THRabsdiff + ")"
    End If
    SQL = SQL + ") ORDER BY Abfrage1.ID, Abfrage1.hyb;"

  On Error Resume Next
  DoCmd.DeleteObject acQuery, "Abfrage22"
  On Error GoTo 0
  Set Abfrage22 = db.CreateQueryDef("Abfrage22")
  Abfrage22.SQL = SQL
  Set rst22 = db.OpenRecordset("Abfrage22")
  End If

'Abfrage 2.3
  If ((THRrnklgl = "") And (THRrngrgl = "")) Then
    SQL = "SELECT Abfrage1.[Ratio], Abfrage1.[Master], Abfrage1.[Client], Abfrage1.[ABS Diff], Abfrage1.Diff, Abfrage1.Name, Abfrage1.ID,
Abfrage1.Aida, Abfrage1.hyb, Abfrage1.Index, Abfrage1.Type"
    SQL = SQL + " FROM Abfrage1"
    If (THRabsdiff <> "") Then
      SQL = SQL + " WHERE ((Abfrage1.[ABS Diff]) >= " + THRabsdiff + ")"
    End If
    SQL = SQL + " ORDER BY Abfrage1.ID, Abfrage1.hyb;"

  On Error Resume Next
  DoCmd.DeleteObject acQuery, "Abfrage21"
  On Error GoTo 0
  Set Abfrage21 = db.CreateQueryDef("Abfrage21")
  Abfrage21.SQL = SQL
  Set rst21 = db.OpenRecordset("Abfrage21")
  End If

  If THRcnt = "" Then THRcnt = "3"
  SQL = ""

'Abfrage 3
  If ((THRrngrgl <> "")) Then 'Or ((THRrngrgl = "") And (THRrnklgl = "")) Then
    SQL = "SELECT Abfrage21.ID"
    SQL = SQL + " FROM Abfrage21"
    SQL = SQL + " GROUP BY Abfrage21.ID"
    SQL = SQL + " HAVING (((Count('Abfrage21.ID')) >= " + THRcnt + "))"
  End If

  If ((THRrnklgl <> "") And (THRrngrgl <> "")) Then
    SQL = SQL + " UNION "
  End If
  If (THRrnklgl <> "") Then
    SQL = SQL + "SELECT Abfrage22.ID"
    SQL = SQL + " FROM Abfrage22"
    SQL = SQL + " GROUP BY Abfrage22.ID"
    SQL = SQL + " HAVING (((Count('Abfrage22.ID')) >= " + THRcnt + "))"
  End If

  SQL = SQL + ";"

  On Error Resume Next
  DoCmd.DeleteObject acQuery, "Abfrage3"
  On Error GoTo 0
  Set Abfrage3 = db.CreateQueryDef("Abfrage3")
  Abfrage3.SQL = SQL
  Set rst3 = db.OpenRecordset("Abfrage3")

'Abfrage 4
  SQL = "SELECT Abfrage1.[Ratio], Abfrage1.[Master], Abfrage1.[Client], Abfrage1.[ABS Diff], Abfrage1.[Diff], Abfrage1.Name, Abfrage1.ID,
Abfrage1.Aida, Abfrage1.hyb, Abfrage1.Index, Abfrage1.Label, Abfrage1.Type"
  SQL = SQL + " FROM Abfrage3, Abfrage1"
  SQL = SQL + " WHERE Abfrage3.ID = Abfrage1.ID"

  On Error Resume Next
  DoCmd.DeleteObject acQuery, "Abfrage4"
  On Error GoTo 0
  Set Abfrage4 = db.CreateQueryDef("Abfrage4")
  Abfrage4.SQL = SQL

```



```
Set rst4 = db.OpenRecordset(SQL, dbOpenDynaset)
```

```
'Abfrage 5
```

```
SQL = "SELECT DISTINCT a4.[Ratio], a4.[Master], a4.[Client], a4.[ABS Diff], a4.[Diff], a4.Name, a4.ID, a4.Aida, a4.hyb, a4.Index, a4.Label,
a4.Type, filter.Chromosome AS Chromosome, filter.CloneProblem AS CloneProblem, filter.GenbankAccession AS
GenbankAccession,filter.ClusterDescription AS ClusterDescription,filter.ImageID AS ImageID, filter.Gene AS Gene, filter.SequenceVerified AS
SequenceVerified, filter.CloneID AS CloneID, filter.GO1 AS GO1, filter.GO2 AS GO2, filter.GO3 AS GO3, filter.GO4 AS GO4, filter.GO5 AS
GO5, filter.GO6 AS GO6, filter.GO7 AS GO7,filter.GO8 AS GO8,filter.GO9 AS GO9, filter.GO10 AS GO10, filter.A1 AS A1, filter.A2 AS
A2,filter.A3 AS A3,filter.A4 AS A4,filter.A5 AS A5,filter.A6 AS A6,filter.A7 AS A7,filter.A8 AS A8,filter.A9 AS A9,filter.A10 AS A10,filter.A11
AS A11,filter.A12 AS A12,filter.A13 AS A13,filter.A14 AS A14,filter.A15 AS A15,filter.A16 AS A16,filter.A17 AS A17,filter.A18 AS
A18,filter.A19 AS A19,filter.A20 AS A20"
SQL = SQL + " FROM Abfrage4 AS a4 INNER JOIN genlist AS filter ON (filter.RZPD_CloneID) = (a4.ID)"
```

```
On Error Resume Next
```

```
DoCmd.DeleteObject acQuery, "Abfrage5"
```

```
On Error GoTo 0
```

```
Set Abfrage5 = db.CreateQueryDef("Abfrage5")
```

```
Abfrage5.SQL = SQL
```

```
Set rst5 = db.OpenRecordset(SQL, dbOpenDynaset)
```

```
'Abfrage 6
```

```
SQL = "SELECT * FROM Abfrage5"
```

```
SQL = SQL + " ORDER BY Abfrage5.Name DESC, Abfrage5.ID, Abfrage5.hyb, Abfrage5.[Ratio];"
```

```
Set rst6 = db.OpenRecordset(SQL, dbOpenDynaset)
```

```
' Tabelle Ergebnis erstellen
```

```
titel = "Ergebnis"
```

```
If THRRngrgl <> "" Then titel = titel + " Rt >= " + Replace(THRRngrgl, ".", "_")
```

```
If THRrnklgl <> "" Then titel = titel + " Rt <= " + Replace(THRrnklgl, ".", "_")
```

```
If THRabsdiff <> "" Then titel = titel + " Dif >= " + Replace(THRabsdiff, ".", "_")
```

```
If THRcnt <> "" Then titel = titel + " Cnt >= " + Replace(THRcnt, ".", "_")
```

```
On Error Resume Next
```

```
DoCmd.DeleteObject acTable, titel
```

```
On Error GoTo 0
```

```
Set td = db.CreateTableDef(titel)
```

```
Set f = td.CreateField("Ratio", dbDouble)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("Master", dbDouble)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("Client", dbDouble)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("ABS Diff", dbDouble)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("Diff", dbDouble)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("ID", dbText, 255)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("ImageID", dbMemo)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("CloneID", dbMemo)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("hyb", dbMemo)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("Gene", dbMemo)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("GenbankAccession", dbMemo)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("ClusterDescription", dbMemo)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("GO1", dbMemo)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("GO2", dbMemo)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("GO3", dbMemo)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("GO4", dbMemo)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("GO5", dbMemo)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("GO6", dbMemo)
```

```
td.Fields.Append f
```

```
Set f = td.CreateField("GO7", dbMemo)
```

```
td.Fields.Append f
```

```

Set f = td.CreateField("GO8", dbMemo)
td.Fields.Append f
Set f = td.CreateField("GO9", dbMemo)
td.Fields.Append f
Set f = td.CreateField("GO10", dbMemo)
td.Fields.Append f
  Set f = td.CreateField("Chromosome", dbMemo)
td.Fields.Append f
Set f = td.CreateField("CloneProblem", dbMemo)
td.Fields.Append f
Set f = td.CreateField("SequenceVerified", dbMemo)
td.Fields.Append f
Set f = td.CreateField("Name", dbMemo)
td.Fields.Append f
Set f = td.CreateField("Aida", dbMemo)
td.Fields.Append f
Set f = td.CreateField("Index", dbMemo)
td.Fields.Append f
Set f = td.CreateField("Label", dbMemo)
td.Fields.Append f
Set f = td.CreateField("Type", dbMemo)
td.Fields.Append f
Set f = td.CreateField("A1", dbMemo)
td.Fields.Append f
  Set f = td.CreateField("A2", dbMemo)
td.Fields.Append f
  Set f = td.CreateField("A3", dbMemo)
td.Fields.Append f
    Set f = td.CreateField("A4", dbMemo)
td.Fields.Append f
    Set f = td.CreateField("A5", dbMemo)
td.Fields.Append f
    Set f = td.CreateField("A6", dbMemo)
td.Fields.Append f
    Set f = td.CreateField("A7", dbMemo)
td.Fields.Append f
    Set f = td.CreateField("A8", dbMemo)
td.Fields.Append f
    Set f = td.CreateField("A9", dbMemo)
td.Fields.Append f
    Set f = td.CreateField("A10", dbMemo)
td.Fields.Append f
    Set f = td.CreateField("A11", dbMemo)
td.Fields.Append f
    Set f = td.CreateField("A12", dbMemo)
td.Fields.Append f
    Set f = td.CreateField("A13", dbMemo)
td.Fields.Append f
    Set f = td.CreateField("A14", dbMemo)
td.Fields.Append f
    Set f = td.CreateField("A15", dbMemo)
td.Fields.Append f
    Set f = td.CreateField("A16", dbMemo)
td.Fields.Append f
    Set f = td.CreateField("A17", dbMemo)
td.Fields.Append f
    Set f = td.CreateField("A18", dbMemo)
td.Fields.Append f
    Set f = td.CreateField("A19", dbMemo)
td.Fields.Append f
    Set f = td.CreateField("A20", dbMemo)
td.Fields.Append f

```

```
db.TableDefs.Append td
```

```
Set rst = db.OpenRecordset(titel)
```

```
' Tabelle Ergebnis auffüllen
```

```

Dim z As Integer
z = 1
Do Until rst6.EOF
rst.AddNew
rst![Ratio] = rst6![Ratio]
rst![Master] = rst6![Master]
rst![Client] = rst6![Client]
rst![ABS Diff] = rst6![ABS Diff]
rst![Diff] = rst6![Diff]
rst![Gene] = rst6![Gene]

```

```

rst![ID] = rst6![ID]
rst![ImageID] = rst6![ImageID]
rst![CloneID] = rst6![CloneID]
rst![GenbankAccession] = rst6![GenbankAccession]
rst![Aida] = rst6![Aida]
rst![hyb] = rst6![hyb]
rst![Chromosome] = rst6![Chromosome]
rst![ClusterDescription] = rst6![ClusterDescription]
rst![CloneProblem] = rst6![CloneProblem]
rst![SequenceVerified] = rst6![SequenceVerified]
rst![GO1] = rst6![GO1]
rst![GO2] = rst6![GO2]
rst![GO3] = rst6![GO3]
rst![GO4] = rst6![GO4]
rst![GO5] = rst6![GO5]
rst![GO6] = rst6![GO6]
rst![GO7] = rst6![GO7]
rst![GO8] = rst6![GO8]
rst![GO9] = rst6![GO9]
rst![GO10] = rst6![GO10]
rst![Index] = rst6![Index]
rst![Label] = rst6![Label]
rst![Type] = rst6![Type]
rst![A1] = rst6![A1]
rst![A2] = rst6![A2]
rst![A3] = rst6![A3]
rst![A4] = rst6![A4]
rst![A5] = rst6![A5]
rst![A6] = rst6![A6]
rst![A7] = rst6![A7]
rst![A8] = rst6![A8]
rst![A9] = rst6![A9]
rst![A10] = rst6![A10]
rst![A11] = rst6![A11]
rst![A12] = rst6![A12]
rst![A13] = rst6![A13]
rst![A14] = rst6![A14]
rst![A15] = rst6![A15]
rst![A16] = rst6![A16]
rst![A17] = rst6![A17]
rst![A18] = rst6![A18]
rst![A19] = rst6![A19]
rst![A20] = rst6![A20]
rst.Update
rst.Move 0, rst.LastModified
rst6.MoveNext
z = z + 1
If z = MaxDaten Then 'Sicherheitshalber falls ein Fehler passiert ist
  MsgBox "Abbruch"
  Exit Do
End If
Loop
rst.Close
db.Close

MsgBox "Fertig!", 64, "Fertig"

End If
End Sub

Function anz_tables() As Byte
Dim i As Byte
i = 0
Do
On Error GoTo Ende
i = i + 1
DoCmd.OpenTable "Tab" + Format(i)
DoCmd.Close acTable, "Tab" + Format(i)
Loop
Exit Function
Ende:
i = i - 1
anz_tables = i
End Function

Public Function test()
MsgBox Format(0.5)
End Function

```

5.1.6 Engrailed Bindungsstellen

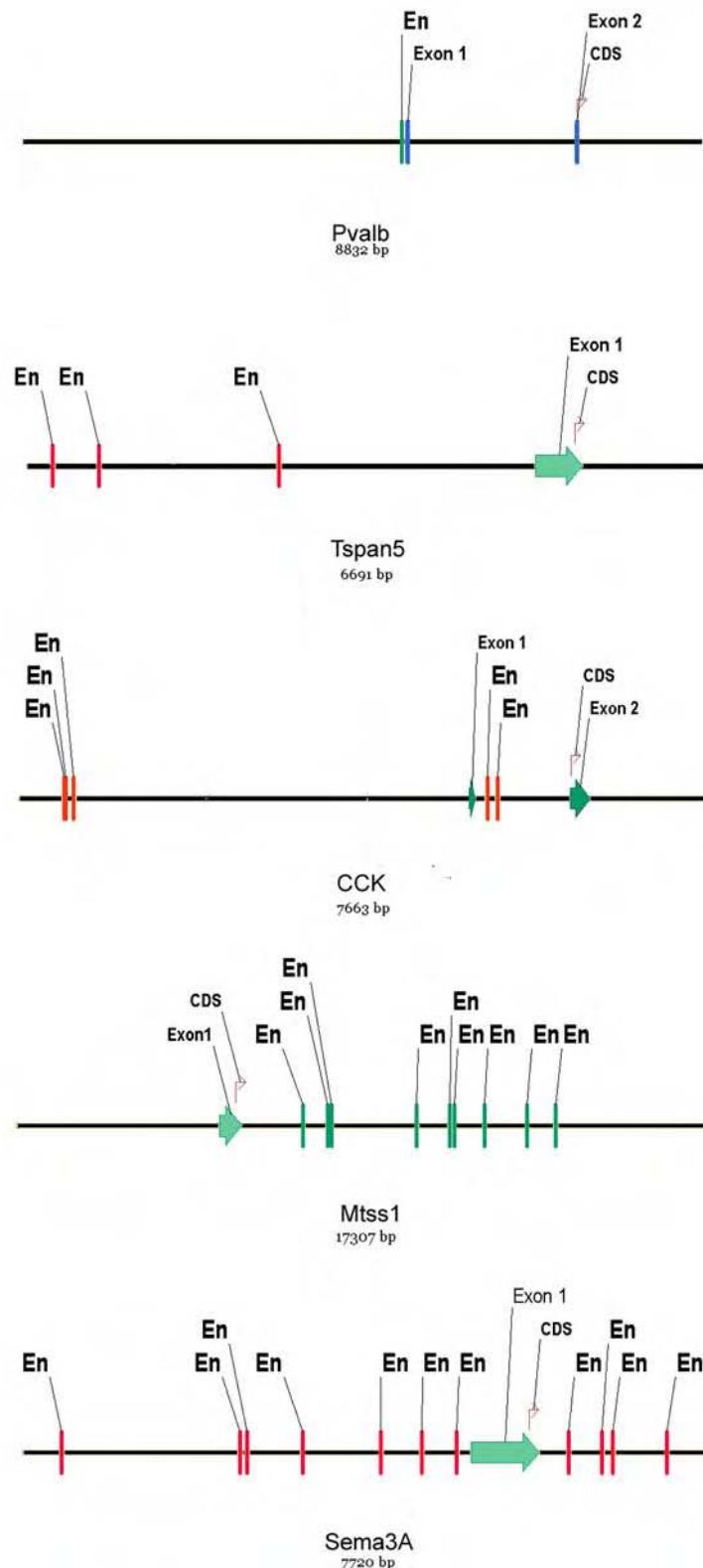


Abb. 51: Engrailed Bindungsstellen.

Die genomische Sequenz der Gene Parvalbumin, Tetraspanin 5, Cholecystokinin, Metastasen Suppressorgen 1 und Semaphorin 3A wurde mit dem Programm MatInspector von Genomatix (<http://www.genomatix.de>) analysiert. Die potenziellen Bindungsstellen für Engrailed (En) sowie der Start der kodierenden Sequenz (CDS) und die Exonstruktur sind angegeben.

5.1.7 Tabellen GO-Analysen

Tab. 31 Tabellen GO Analysen

5.1.7 Tabellen GO-Analysen

Gene	Genname	Gene ID	Ratio/DEF P0	Ratio/DEF P7	Ratio/DEF AD	Biological Function	Ontology Category name	GO Term ID	GO Level	Ontology Category name	GO Term ID	GO Level
Akap10	A kinase (PRKA) anchor protein 10	56697		0.0/-3.5		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	protein localization	GO:0008104	5
Arhgap17	Rho GTPase activating protein 17	70497	0.5/-1.0		0.3/-10.1	protein localization	transport and localization	GO:0051234	5	calcium ion-dependent exocytosis	GO:0017156	9
Cog3	component of oligomeric golgi complex 3	338337		3.2/2.4		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	protein transport	GO:0015031	7
Ii	Ia-associated invariant chain	16149		3.8/2.8		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	protein transport	GO:0015031	7
Napa	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein alpha	108124		0.5/-0.7		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	protein localization	GO:0008104	5
Oxa11	oxidase assembly 1-like	69089		0.3/-2.6		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	protein localization	GO:0008104	5
Rab22a	RAB22A, member RAS oncogene family	19334		0.2/-5.0		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	protein localization	GO:0008104	5
Rab32	RAB32, member RAS oncogene family	67844		2.6/2.6		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	establishment of protein localization	GO:0045184	6
Rab35	RAB35, member RAS oncogene family	77407		2.0/6.0		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	protein transport	GO:0015031	7
Rhob	ras homolog gene family, member B	11852		2.7/2.4		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	protein transport	GO:0015031	7
Scfd1	sec1 family domain containing 1	76983		0.4/-3.6		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	protein localization	GO:0008104	5
Sfrs1	splicing factor, arginine/serine-rich 1 (ASF/SF2)	110809		0.5/-5.0		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	intracellular protein transport	GO:0006886	9
Snap23	synaptosomal-associated protein 23	20619		2.5/4.9		protein localization	transport and localization	GO:0051234	5	post-Golgi transport	GO:0006892	10
Snx10	sorting nexin 10	71982		0.1/-2.4		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	protein localization	GO:0008104	5
Snx15	sorting nexin 15	69024		0.2/-2.0		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	protein transport	GO:0015031	7
Spnb2	spectrin beta 2	20742		0.4/-2.4		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	protein localization	GO:0008104	5
Synj2bp	synaptojanin 2 binding protein	24071		0.2/-3.2		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	intracellular protein transport	GO:0006886	9
Tmed7	transmembrane emp24 protein transport domain containing 7	66676		0.2/-3.0		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	intracellular protein transport	GO:0006886	9
Tram1	translocating chain-associating membrane protein 1	72265		0.3/-3.2		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	intracellular protein transport	GO:0006886	9
Vdp	vesicle docking protein	56041		2.4/0.9		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	protein transport	GO:0015031	7
Vps26	vacuolar protein sorting 26 (yeast)	30930		0.1/-4.7		protein localization	transport and localization	GO:0008104	5	protein localization	GO:0008104	5
1810062O14Rik	RIKEN cDNA 1810062O14 gene	108995	0.5/-1.5			localization	transport and localization	GO:0008104	5	establishment of protein localization	GO:0045184	6
Ap2a1	adaptor protein complex AP-2, alpha 1 subunit	11771	0.5/1.0			localization	transport and localization	GO:0008104	5	vesicle-mediated transport	GO:0016192	7
Ap2b1	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	71770	3.7/2.5		4.0/3.7	localization	transport and localization	GO:0051234	5	vesicle-mediated transport	GO:0016192	7
Arhgap17	Rho GTPase activating protein 17	70497	0.5/-1.0			localization	transport and localization	GO:0051234	5	vesicle-mediated transport	GO:0016192	7

5.1.7 Tabellen GO-Analysen

Gene	Genname	Gene ID	Ratio/DEF P0	Ratio/DEF P7	Ratio/DEF AD	Biological Function	Ontology Category name	GO Term ID	GO Level	Ontology Category name	GO Term ID	GO Level
Gga2	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 2	74105	4.4/2.1			localization	transport and localization	GO:0051234	5	vesicle-mediated transport	GO:0016192	7
Ghr	growth hormone receptor	14600	0.5/-1.2			localization	transport and localization	GO:0051234	5	vesicle-mediated transport	GO:0016192	7
Ndel1	nuclear distribution gene E-like homolog 1 (A. nidulans)	83431	0.5/-1.1			localization	transport and localization	GO:0051234	5	axon cargo transport	GO:0008088	11
Parp9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	80285	0.5/-1.1			localization	transport and localization	GO:0051234	5	intracellular transport	GO:0046907	8
Rab21	RAB21, member RAS oncogene family	216344	0.4/-1.4			localization	transport and localization	GO:0051234	5	establishment of protein localization	GO:0045184	6
Slc25a17	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, peroxisomal membrane protein), member 17	20524	0.5/-1.5			localization	transport and localization	GO:0008104	5	intracellular transport	GO:0046907	8
Slc30a6	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 6	210148		0.4/-2.4		localization	transport and localization	GO:0051234	5	post-Golgi transport	GO:0006892	10
Snap23	synaptosomal-associated protein 23	20619		2.5/4.9		localization	transport and localization	GO:0051234	5	post-Golgi transport	GO:0006892	10
Timm23	translocase of inner mitochondrial membrane 23 homolog (yeast)	53600	0.5/-2.0		0.3/-10.1	localization	transport and localization	GO:0051234	5	establishment of protein localization	GO:0045184	6
Tmed5	transmembrane emp24 protein transport domain containing 5	73130	0.6/-1.1			localization	transport and localization	GO:0008104	5	protein transport	GO:0015031	7
0610009K11Rik	RIKEN cDNA 0610009K11 gene	68350	0.3/-2.1			protein metabolism	protein metabolism	GO:0019538	6	ubiquitin cycle	GO:0006512	9
3732413I11Rik	RIKEN cDNA 3732413I11 gene	74315	0.5/-3.7			protein metabolism	protein metabolism	GO:0019538	6	ubiquitin cycle	GO:0006512	9
Ankib1	ankyrin repeat and IBR domain containing 1	70797	0.5/-1.9			protein metabolism	protein metabolism	GO:0019538	6	protein ubiquitination	GO:0016567	10
Ap2b1	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	71770	3.7/2.5		4.0/3.7	protein metabolism	protein metabolism	GO:0019538	6	protein complex assembly	GO:0006461	7
Fzr1	fizzy/cell division cycle 20 related 1 (Drosophila)	56371	0.5/-2.0			protein metabolism	protein metabolism	GO:0019538	6	ubiquitin cycle	GO:0006512	9
Gga2	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 2	74105	4.4/2.1			protein metabolism	protein metabolism	GO:0019538	6	protein complex assembly	GO:0006461	7
Nmt1	N-myristoyltransferase 1	18107	0.4/-1.8			protein metabolism	protein metabolism	GO:0019538	6	protein myristoylation	GO:0018377	11
Pml	promyelocytic leukemia	18854	0.5/-1.4			protein metabolism	protein metabolism	GO:0019538	6	protein ubiquitination	GO:0016567	10
Sfrs1	splicing factor, arginine/serine-rich 1 (ASF/SF2)	110809			0.5/-2.0	protein metabolism	protein metabolism	GO:0019538	6	protein complex assembly	GO:0006461	7
Wwp1	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1	107568	0.5/-1.4			protein metabolism	protein metabolism	GO:0019538	6	ubiquitin cycle	GO:0006512	9
Apoa4	apolipoprotein A-4	11808		0.2/-7.3		lipid metabolism	lipid metabolism	GO:0006629	6	cholesterol absorption	GO:0030299	7
Cds2	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidylyltransferase) 2	110911		0.6/-1.0		lipid metabolism	lipid metabolism	GO:0006629	6	phospholipid metabolism	GO:0006644	9
Lass4	longevity assurance homolog 4 (S. cerevisiae)	67260		0.0/-13.7		lipid metabolism	lipid metabolism	GO:0006629	6	membrane lipid metabolism	GO:0046467	9
Lpgat1	lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1	226856		0.5/-2.1		lipid metabolism	lipid metabolism	GO:0006629	6	membrane lipid metabolism	GO:0046467	9

5.1.7 Tabellen GO-Analysen

Gene	Genname	Gene ID	Ratio/DEF P0	Ratio/DEF P7	Ratio/DEF AD	Biological Function	Ontology Category name	GO Term ID	GO Level	Ontology Category name	GO Term ID	GO Level
Pla2g4a	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	18783		0.0/-6-9		lipid metabolism	lipid metabolism	GO:0006629	6	membrane lipid metabolism	GO:0046467	9
Arhgap17	Rho GTPase activating protein 17	70497	0.5/-2.0		0.3/-10.1	organization / biogenesis	cell organization and biogenesis	GO:0016043	5	actin cytoskeleton organization and biogenesis	GO:0030036	9
Epb4.112	erythrocyte protein band 4.1-like 2	13822		0.6/-0.4		organization / biogenesis	cell organization and biogenesis	GO:0016043	5	cortical cytoskeleton organization and biogenesis	GO:0030036	9
Epb4.113	erythrocyte protein band 4.1-like 3	13823		0.5/-1.0		organization / biogenesis	cell organization and biogenesis	GO:0016043	5	cortical cytoskeleton organization and biogenesis	GO:0030036	9
Peci	peroxisomal delta3, delta2-enoyl-Coenzyme A isomerase	23986		2.2/1.2		organization / biogenesis	cell organization and biogenesis	GO:0016043	5	peroxisome organization and biogenesis	GO:0007031	7
Pex11a	peroxisomal biogenesis factor 11a	18631		0.1/-3.8		organization / biogenesis	cell organization and biogenesis	GO:0016043	5	peroxisome organization and biogenesis	GO:0007031	7
Prkci	protein kinase C, iota	18759			0.5/-2.4	organization / biogenesis	cell organization and biogenesis	GO:0016043	5	actin cytoskeleton organization and biogenesis	GO:0030036	9
Pxmp3	peroxisomal membrane protein 3	19302		0.5/-1.9		organization / biogenesis	cell organization and biogenesis	GO:0016043	5	peroxisome organization and biogenesis	GO:0007031	7
Ddx5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	13207		0.3/-7.7		regulation of metabolism	regulation of metabolism	GO:0019222	5	positive regulation of metabolism	GO:0009893	6
Ebf1	early B-cell factor 1	13591		0.3/-1.8		regulation of metabolism	regulation of metabolism	GO:0019222	5	positive regulation of metabolism	GO:0009893	6
Kitl	kit ligand	17311		0.4/-1.6		regulation of metabolism	regulation of metabolism	GO:0019222	5	positive regulation of metabolism	GO:0009893	6
Pparbp	peroxisome proliferator activated receptor binding protein	19014		0.1/-4.0		regulation of metabolism	regulation of metabolism	GO:0019222	5	positive regulation of metabolism	GO:0009893	6
Rac1	RAS-related C3 botulinum substrate 1	19353		2.2/2.7		regulation of metabolism	regulation of metabolism	GO:0019222	5	positive regulation of metabolism	GO:0009893	6
Skiip	SKI interacting protein	66354		0.4/-1.8		regulation of metabolism	regulation of metabolism	GO:0019222	5	positive regulation of metabolism	GO:0009893	6
Smad5	MAD homolog 5 (Drosophila)	17129		0.4/-2.0		regulation of metabolism	regulation of metabolism	GO:0019222	5	positive regulation of metabolism	GO:0009893	6
Ccl22	chemokine (C-C motif) ligand 22	20299	0.5/-1.1			response to external stimulus	response to external stimulus	GO:0009605	4	inflammatory response	GO:0006954	7
Chi3l3	chitinase 3-like 3	12655	0.5/-1.4			response to external stimulus	response to external stimulus	GO:0009605	4	inflammatory response	GO:0006954	7
Mtap1a	microtubule-associated protein 1 A	17754		2.7/2.7		response to external stimulus	response to external stimulus	GO:0009605	4	detection of abiotic stimulus	GO:0009582	6
Nfkbiz	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	80859	0.5/-4.8			response to external stimulus	response to external stimulus	GO:0009605	4	response to external biotic stimulus	GO:0043207	5

5.1.7 Tabellen GO-Analysen

Gene	Genname	Gene ID	Ratio/DEF P0	Ratio/DEF P7	Ratio/DEF AD	Biological Function	Ontology Category name	GO Term ID	GO Level	Ontology Category name	GO Term ID	GO Level
Opn3	opsin (encephalopsin)	13603		0.2/-2.1		response to external stimulus	response to external stimulus	GO:0009605	4	response to light	GO:0009416	6
Pde6d	phosphodiesterase 6D, cGMP-specific, rod, delta	18582		2.9/2.3		response to external stimulus	response to external stimulus	GO:0009605	4	response to light	GO:0009416	6
Tlr7	toll-like receptor 7	170743	0.5/-1.3			response to external stimulus	response to external stimulus	GO:0009605	4	inflammatory response	GO:0006954	7
Actn2	actinin alpha 2	11472		3.1/5.3		muscle contraction	muscle contraction	GO:0006936	5	muscle contraction	GO:0006936	5
Ryr1	ryanodine receptor 1, skeletal muscle	20190		0.1/-7.1		muscle contraction	muscle contraction	GO:0006936	5	muscle contraction	GO:0006936	5
Tnni1	troponin I, skeletal, slow 1	21952		0.0/-11.3		muscle contraction	muscle contraction	GO:0006936	5	muscle contraction	GO:0006936	5
Tnnt2	troponin T2, cardiac	21956		0.2/-3.6		muscle contraction	muscle contraction	GO:0006936	5	muscle contraction	GO:0006936	5
Wdr21	WD repeat domain 21	73828		0.1/-12.4		muscle contraction	muscle contraction	GO:0006936	5	muscle contraction	GO:0006936	5
Ing1	inhibitor of growth family, member 1	26356		3.3/3.5		cell cycle	cell cycle	GO:0007049	5	negative regulation of cell cycle	GO:0045786	8
Nf2	neurofibromatosis 2	18016		2.4/1.8		cell cycle	cell cycle	GO:0007049	5	negative regulation of cell cycle	GO:0045786	8
Rhob	ras homolog gene family, member B	11852		2.7/2.4		cell cycle	cell cycle	GO:0007049	5	negative regulation of cell cycle	GO:0045786	8
Tusc4	tumor suppressor candidate 4	56032		0.5/-0.9		cell cycle	cell cycle	GO:0007049	5	negative regulation of cell cycle	GO:0045786	8
Cck	cholecystokinin	12424			0.0/-26.6	Development	nervous system development	GO:0007399	5	neuronal migration	GO:0001764	8
Meox2	mesenchyme homeobox 2	17286	0.5/-0.9			Development	development	GO:0007275	3	somitogenesis	GO:0001756	7
Msh6	mutS homolog 6 (E. coli)	17688	0.5/-1.5			Development	development	GO:0007275	3	determination of adult life span	GO:0008340	6
Six3	sine oculis-related homeobox 3 homolog (Drosophila)	20473	0.5/-1.0			Development	development	GO:0007275	3	embryonic development (sensu Vertebrata)	GO:0043009	6
AW742319	expressed sequence AW742319	57874	0.5/-3.1			signal transduction	signal transduction	GO:0007165	5	I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	GO:0007249	8
Azi2	5-azacytidine induced gene 2	27215	0.3/-3.4			signal transduction	signal transduction	GO:0007165	5	I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	GO:0007249	8
Smad5	MAD homolog 5 (Drosophila)	17129		0.4/-2.0		signal transduction	signal transduction	GO:0007165	5	common-partner SMAD protein phosphorylation	GO:0007182	10
Spnb2	spectrin beta 2	20742		0.4/-2.4		signal transduction	signal transduction	GO:0007165	5	common-partner SMAD protein phosphorylation	GO:0007182	10
Pparbp	peroxisome proliferator activated receptor binding protein	19014		0.1/-4.0		hormone metabolism	hormone metabolism	GO:0042445	6	thyroid hormone generation	GO:0006590	10
Ttr	transthyretin	22139			0.4/-7.3	hormone metabolism	hormone metabolism	GO:0042445	6	thyroid hormone generation	GO:0006590	10
Msh6	mutS homolog 6 (E. coli)	17688	0.5/-1.5			DNA metabolism	DNA metabolism	GO:0006259	7	mismatch repair	GO:0006298	10
Sfrs1	splicing factor, arginine/serine-rich 1 (ASF/SF2)	110809			0.5/-2.0	RNA metabolism	RNA metabolism	GO:0016070	7	mRNA splice site selection	GO:0006376	14
Clec2g	osteoclast inhibitory lectin related protein	70809	0.5/-1.8			regulation of cell differentiation	regulation of cell differentiation	GO:0045595	5	negative regulation of myeloid blood cell differentiation	GO:0045638	9

5.2 Zusammenfassung

Die Überexpression von Engrailed-2 in den Purkinjezellen des Kleinhirns der L7En-2 Maus führt zu einem cerebellären Phänotyp, der bisher auf morphologischer Ebene gut untersucht ist, dessen genetischer, physiologischer und verhaltensphysiologischer Hintergrund aber unbekannt ist. Morphologische Analysen des L7En-2 Kleinhirns zeigen eine um etwa 40 % reduzierte Größe des Kleinhirns, welche mit einer apoptotischen Reduktion von Purkinjezellen in der transgenen Maus einhergeht. Morphologische Charakteristika des Purkinjezell-Absterbens sind dem physiologisch auftretenden Absterben sehr ähnlich. Da physiologischer Zelltod in einem sehr begrenzten Zeitfenster kurz nach der Geburt stattfindet, wurde vermutet, dass das Absterben der Purkinjezellen in L7En-2 Mäusen auf einer Verlängerung dieser sensitiven Phase beruht, d. h. auf einer zeitlich verzögerten Reifung der L7En-2 Purkinjezellen. Damit übereinstimmend zeigen L7En-2 Purkinjezellen eine Reduktion in der Differenzierung, denn sowohl die Reifung der Somata, als auch der Dendriten sind verzögert, und die somatotopisch geordnete Verschaltung der Purkinjezellen mit afferenten Moosfasern ist gestört.

In dieser Arbeit wurde nach potenziellen genetischen Ursachen für die beobachteten morphologischen Anomalien gesucht. Mithilfe der Array-Technologie wurden in drei verschiedenen Entwicklungsstufen insgesamt 620 Gene identifiziert, die in der L7En-2 Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus differenziell reguliert wurden. Die Verifikation von 20 Genen ergab eine Zuverlässigkeit von 64 % der Array-Analysen, wobei die Sensitivität, mit der positive Ergebnisse bestimmt wurden, bei 46 % lag. Der größte Teil der Gene zeigte eine Herunterregulation, was mit dem prinzipiell repressorischen Charakter von Engrailed Proteinen konform ist. Besonders ausgeprägt war die Genregulation am siebten Postnataltag, welcher für eine Phase der cerebellären Entwicklung mit wesentlichen morphologischen Änderungen charakteristisch ist. Darüber hinaus zeigte die hierarchische Clusteranalyse, dass die meisten Gene nur in bestimmten Entwicklungsstadien des Kleinhirns differenziell exprimiert werden.

Um die Ergebnisse der Array-Daten zu verifizieren und gleichzeitig potenzielle molekulare Effektoren für die beobachteten morphologischen Änderungen zu identifizieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression von fünf Genen genauer untersucht. Das Calcium-bindende Protein Parvalbumin (Pvalb) zeigte eine verzögerte Expression um den Postnataltag sieben. Die Korrelation des Expressionsmusters mit der Entwicklungsstörung der Dendriten deutet auf eine Funktion von Parvalbumin bei der Dendritogenese hin. Veränderungen in der Calcium-Dynamik zeigen eine Inhibition der Filopodienbildung, wodurch die Synaptogenese und Dendritogenese gestört werden.

Für das Transmembran-Protein Tetraspanin-5 (Tspan5) wurde eine Zelltyp-spezifische, reduzierte Expression gezeigt, die vom Postnataltag neun bis in die adulten Stadien andauerte. Die genaue Funktion von Tetraspanin-5 ist bisher noch nicht aufgeklärt, jedoch kann aufgrund der Funktion von anderen Tetraspaninen eine Beteiligung von Tetraspanin-5 bei der morphologischen Ausdifferenzierung von Zellen postuliert werden. Vorstellbar wäre, dass Tetraspanin-5 durch Proteinwechselwirkungen mit anderen Tetraspaninen und Zelladhäsionsmolekülen, sowie mit extrazellulären Botenstoffen beim zielgerichteten Strukturwandel eine Rolle spielt, wie er auch typisch für Synapsen ist.

In eine ähnliche funktionelle Klasse von Proteinen wird das Aktin-bindende Protein Metastasen Suppressoren 1 (Mtss1) gruppiert. Dieses Mtss1 Gen wurde ähnlich dem Expressionsmuster von Parvalbumin und Tetraspanin-5 Zelltyp-spezifisch um den Postnataltag sieben in den Purkinjezellen herunterreguliert.

Das Neuropeptid Cholecystokin (CCK) konnte als viertes Gen identifiziert werden, dessen Expression spezifisch in Purkinjezellen der L7En-2 Mäuse herunterreguliert wurde. Im Unterschied zu den bisher beschriebenen Genen wird CCK permanent während der gesamten postnatalen Kleinhirnentwicklung differenziell exprimiert. Unterschiedlich ist ebenfalls die bisher bekannte Funktion von CCK. In subkortikalen Gehirnregionen moduliert CCK die neuronale Signalübertragung. Auch wenn bisher eine Funktion von CCK im Kleinhirn unbekannt ist, so ist aus dem endokrinen System bekannt, dass CCK die Oxytocinsekretion reguliert. Oxytocin-Spiegel und Signaltransduktionsmechanismen werden als zentrale Regulatoren der sozialen Kommunikation angesehen. Gestörte Oxytocinlevel verursachen entsprechend autistische Symptome. Interessant wird dieser Zusammenhang zwischen CCK und Autismus durch den Befund, dass auch *Engrailed-2*-Mutationen mit autistischen Erkrankungen assoziiert worden sind.

Unabhängig von den Array-Daten wurden Gene untersucht, die mit der axonalen Verschaltung des Kleinhirns in Zusammenhang gebracht wurden. Hier habe ich die Expression des sezernierten Signalmoleküls Semaphorin 3A untersucht. In den Purkinjezellen der L7En-2 Tiere konnte eine wiederum Zelltyp-spezifische Reduktion der Expression in sieben Tage alten und adulten Tieren gezeigt werden. Da Semaphorin 3A Moosfasernwachstum inhibiert, könnte es für die beobachteten Veränderungen in der Verschaltung des L7En-2 Kleinhirnkortex verantwortlich sein. Daneben konnte hier gezeigt werden, dass der Rezeptor Neuropilin 1 und das intrazelluläre Signalmolekül CRMP 5 in postmitotischen Körnerzellen der äußeren Körnerzellschicht exprimiert werden. Auch wenn funktionelle Untersuchungen noch fehlen, erlauben diese Befunde die Spekulation, dass das Semaphorin-Signalsystem einen Einfluss auf die gerichtete Wanderung der Körnerzellen hat.

Aufgrund der doch unerwartet hohen Vertrauenswürdigkeit der Array-Daten wurden diese einem funktionellen Clustering unterworfen. Dabei zeigte sich, dass Gene, die in zelluläre Transportprozesse, in die Lokalisation von Proteinen und den Lipidmetabolismus eingreifen, stark überrepräsentiert waren. Diese Beobachtungen würden nicht nur mit dem morphologischen Phänotyp, sondern auch mit der Funktion der bereits verifizierten Gene korrelieren. Ein korrekter und zielgerichteter Transport von Vesikeln und Proteinen, und damit eine korrekte Verteilung von Membranorganellen in der Zelle, sind nicht nur entscheidend für das Überleben vs. Apoptose einer Zelle, sondern auch für die Ausbildung der Fortsätze an der richtigen Stelle und im richtigen Ausmaß. Darüber hinaus sind zelluläre Transportprozesse essenziell für die axonale Verschaltung des Zentralnervensystems.

Die hier durchgeführten Arbeiten zeigen, dass *Engrailed-2* ein wichtiger Faktor sein könnte, der den zellulären Transport steuert und damit Einfluss auf die neuronale Entwicklung und neuronale Kommunikation nimmt. Die Daten unterstützen ferner die Vermutung, dass *Engrailed-2* an der Ausprägung des Autismus beteiligt ist, und liefern eine experimentelle Basis, wie zumindest einige Gene aus dem Pool an Autismus-assoziierten Genen miteinander verwoben sein könnten.

5.3 Literaturverzeichnis

- Adams RH, Lohrum M, Klostermann A, Betz H, Puschel AW (1997) The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *EMBO J* 16: 6077-6086.
- Alberi L, Sgado P, Simon HH (2004) Engrailed genes are cell-autonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons. *Development* 131: 3229-3236.
- Allen G, Buxton RB, Wong EC, Courchesne E (1997) Attentional activation of the cerebellum independent of motor involvement. *Science* 275: 1940-1943.
- Allen G, Courchesne E (2003) Differential effects of developmental cerebellar abnormality on cognitive and motor functions in the cerebellum: an fMRI study of autism. *Am J Psychiatry* 160: 262-273.
- Allen T, Lobe CG (1999) A comparison of Notch, Hes and Grg expression during murine embryonic and post-natal development. *Cell Mol Biol* 45: 687-708.
- Altman J, Bayer SA (1997) Development of the cerebellar system in relation to its evolution, structure, and function. CRC Press.
- Aluoja A, Shlik J, Vasar V, Kingisepp PH, Jagomagi K, Vasar E, Bradwejn J (1997) Emotional and cognitive factors connected with response to cholecystokinin tetrapeptide in healthy volunteers. *Psychiatry Res* 66: 59-67.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25: 25-29.
- Baader SL, Sanlioglu S, Berrebi AS, Parker-Thornburg J, Oberdick J (1998) Ectopic overexpression of engrailed-2 in cerebellar Purkinje cells causes restricted cell loss and retarded external germinal layer development at lobule junctions. *J Neurosci* 18: 1763-1773.
- Baader SL, Vogel MW, Sanlioglu S, Zhang X, Oberdick J (1999) Selective disruption of "late onset" sagittal banding patterns by ectopic expression of engrailed-2 in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 19: 5370-5379.
- Babcock M, Macleod GT, Leither J, Pallanck L (2004) Genetic Analysis of Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Function in *Drosophila* Reveals Positive and Negative Secretory Roles. *Journal of Neuroscience* 24: 3964-3973.
- Bagnard D, Thomasset N, Lohrum M, Puschel AW, Bolz J (2000) Spatial distributions of guidance molecules regulate chemorepulsion and chemoattraction of growth cones. *J Neurosci* 20: 1030-1035.
- Bailey A, Luthert P, Dean A, Harding B, Janota I, Montgomery M, Rutter M, Lantos P (1998) A clinicopathological study of autism. *Brain* 121: 889-905.
- Banerjee SA, Hadjiargyrou M, Patterson PH (1997) An antibody to the tetraspan membrane protein CD9 promotes neurite formation in a partially alpha3beta1 integrin-dependent manner. *J Neurosci* 17: 2756-2765.
- Barinaga M (1996) The cerebellum: movement coordinator or much more? *Science* 272: 482-483.
- Bartlett CW, Gharani N, Millonig JH, Brzustowicz LM (2005) Three autism candidate genes: a synthesis of human genetic analysis with other disciplines. *Int J Dev Neurosci* 23: 221-234.
- Bauman ML, Kemper TL (2005) Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *Int J Dev Neurosci* 23: 183-187.
- Beinfeld MC (2001) An introduction to neuronal cholecystokinin. *Peptides* 22: 1197-1200.
- Beissbarth T, Fellenberg K, Brors B, Arribas-Prat R, Boer J, Hauser NC, Scheideler M, Hoheisel JD, Schutz G, Poustka A, Vingron M (2000) Processing and quality control of DNA array hybridization data. *Bioinformatics* 16: 1014-1022.

- Bellamy TC (2006) Interactions between Purkinje neurones and Bergmann glia. *Cerebellum* 5: 116-126.
- Belmonte MK, Allen G, Beckel-Mitchener A, Boulanger LM, Carper RA, Webb SJ (2004) Autism and abnormal development of brain connectivity. *J Neurosci* 24: 9228-9231.
- Benayed R, Gharani N, Rossman I, Mancuso V, Lazar G, Kamdar S, Bruse SE, Tischfield S, Smith BJ, Zimmerman RA, DiCicco-Bloom E, Brzustowicz LM, Millonig JH (2005) Support for the homeobox transcription factor gene ENGRAILED 2 as an autism spectrum disorder susceptibility locus. *Am J Hum Genet* 77: 851-868.
- Bennett V, Baines AJ (2001) Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* 81: 1353-1392.
- Berditchevski F (2001) Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci* 114: 4143-4151.
- Berditchevski F, Odintsova E (1999) Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J Cell Biol* 146: 477-492.
- Bishop GA (1996) Cholecystokinin modulation of spontaneous and excitatory amino acid-induced activity in the opossum cerebellum. *Neuropeptides* 30: 533-540.
- Black MW, Pelham HR (2000) A selective transport route from Golgi to late endosomes that requires the yeast GGA proteins. *J Cell Biol* 151: 587-600.
- Blevins JE, Eakin TJ, Murphy JA, Schwartz MW, Baskin DG (2003) Oxytocin innervation of caudal brainstem nuclei activated by cholecystokinin. *Brain Res* 993: 30-41.
- Bompard G, Sharp SJ, Freiss G, Machesky LM (2005) Involvement of Rac in actin cytoskeleton rearrangements induced by MIM-B. *J Cell Sci* 118: 5393-5403.
- Bondy CA, Jensen RT, Brady LS, Gainer H (1989) Cholecystokinin Evokes Secretion of Oxytocin and Vasopressin from Rat Neural Lobe Independent of External Calcium. *PNAS* 86: 5198-5201.
- Bonifacino JS, Glick BS (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116: 153-166.
- Boucheix C, Rubinstein E (2001) Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* 58: 1189-1205.
- Bradwejn J (1993) Neurobiological investigations into the role of cholecystokinin in panic disorder. *J Psychiatry Neurosci* 18: 178-188.
- Bradwejn J, Koszycki D, Bourin M (1991) Dose ranging study of the effects of cholecystokinin in healthy volunteers. *J Psychiatry Neurosci* 16: 91-95.
- Bretin S, Reibel S, Charrier E, Maus-Moatti M, Auvergnon N, Thevenoux A, Glowinski J, Rogemond V, Premont J, Honnorat J, Gauchy C (2005) Differential expression of CRMP1, CRMP2A, CRMP2B, and CRMP5 in axons or dendrites of distinct neurons in the mouse brain. *J Comp Neurol* 486: 1-17.
- Broccoli V, Boncinelli E, Wurst W (1999) The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmic organizer. *Nature* 401: 164-168.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553.
- Brunet I, Weinl C, Piper M, Trembleau A, Volovitch M, Harris W, Prochiantz A, Holt C (2005) The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* 438: 94-98.
- Burack MA, Silverman MA, Banker G (2000) The role of selective transport in neuronal protein sorting. *Neuron* 26: 465-472.
- Burden SJ (2000) Wnts as retrograde signals for axon and growth cone differentiation. *Cell* 100: 495-497.

- Cain BM, Connolly K, Blum A, Vishnuvardhan D, Marchand JE, Beinfeld MC (2003) Distribution and colocalization of cholecystokinin with the prohormone convertase enzymes PC1, PC2, and PC5 in rat brain. *J Comp Neurol* 467: 307-325.
- Calabrese B, Wilson MS, Halpain S (2006) Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology (Bethesda)* 21:38-47.: 38-47.
- Catalano SM, Messersmith EK, Goodman CS, Shatz CJ, Chedotal A (1998) Many major CNS axon projections develop normally in the absence of semaphorin III. *Mol Cell Neurosci* 11: 173-182.
- Celio MR (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35: 375-475.
- Celio MR, Heizmann CW (1981) Calcium-binding protein parvalbumin as a neuronal marker. *Nature* 293: 300-302.
- Cheh MA, Millonig JH, Roselli LM, Ming X, Jacobsen E, Kamdar S, Wagner GC (2006) En2 knockout mice display neurobehavioral and neurochemical alterations relevant to autism spectrum disorder. *Brain Res* 1116: 166-176.
- Chen D, Minger SL, Honer WG, Whiteheart SW (1999) Organization of the secretory machinery in the rodent brain: distribution of the t-SNAREs, SNAP-25 and SNAP-23. *Brain Res* 831: 11-24.
- Chen Q, Nakajima A, Meacham C, Tang YP (2006) Elevated cholecystokinergic tone constitutes an important molecular/neuronal mechanism for the expression of anxiety in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 3881-3886.
- Chen Y, Yu P, Lu D, Tagle DA, Cai T (2001) A novel isoform of beta-spectrin II localizes to cerebellar Purkinje-cell bodies and interacts with neurofibromatosis type 2 gene product schwannomin. *J Mol Neurosci* 17: 59-70.
- Chen Y, Kamat V, Dougherty ER, Bittner ML, Meltzer PS, Trent JM (2002) Ratio statistics of gene expression levels and applications to microarray data analysis. *Bioinformatics* 18: 1207-1215.
- Cheng HJ, Nakamoto M, Bergemann AD, Flanagan JG (1995) Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* 82: 371-381.
- Courchesne E (1991) Neuroanatomic imaging in autism. *Pediatrics* 87: 781-790.
- Courchesne E (1997) Brainstem, cerebellar and limbic neuroanatomical abnormalities in autism. *Curr Opin Neurobiol* 7: 269-278.
- Crawley JN (2004) Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 10: 248-258.
- Critchley HD, Daly EM, Bullmore ET, Williams SC, Van Amelsvoort T, Robertson DM, Rowe A, Phillips M, McAlonan G, Howlin P, Murphy DG (2000) The functional neuroanatomy of social behaviour: changes in cerebral blood flow when people with autistic disorder process facial expressions. *Brain* 123: 2203-2212.
- Davis CA, Noble-Topham SE, Rossant J, Joyner AL (1988) Expression of the homeo box-containing gene En-2 delineates a specific region of the developing mouse brain. *Genes Dev* 2: 361-371.
- Dean N, Raftery AE (2005) Normal uniform mixture differential gene expression detection for cDNA microarrays. *BMC Bioinformatics* 6: 173.
- Dehnes Y, Chaudhry FA, Ullensvang K, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1998) The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J Neurosci* 18: 3606-3619.
- Deo RC, Schmidt EF, Elhabazi A, Togashi H, Burley SK, Strittmatter SM (2004) Structural bases for CRMP function in plexin-dependent semaphorin3A signaling. *EMBO J* 23: 9-22.
- Dudoit S., Yang, Y. H., Callow, M. J., and Speed, T. P. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. *Statistica Sinica* 12, 111-139. 2002.
Ref Type: Generic

- Ebihara M, Ohba H, Hattori E, Yamada K, Yoshikawa T (2003) Transcriptional activities of cholecystokinin promoter haplotypes and their relevance to panic disorder susceptibility. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 118: 32-35.
- Eilers PHC, Goeman JJ (2004) Enhancing scatterplots with smoothed densities. *Bioinformatics* 20: 623-628.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *PNAS* 95: 14863-14868.
- Enderlin S, Norman AW, Celio MR (1987) Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl)* 177: 15-28.
- Englund C, Kowalczyk T, Daza RA, Dagan A, Lau C, Rose MF, Hevner RF (2006) Unipolar brush cells of the cerebellum are produced in the rhombic lip and migrate through developing white matter. *J Neurosci* 26: 9184-9195.
- Erickson T, Scholpp S, Brand M, Moens CB, Jan WA (2006) Pbx proteins cooperate with Engrailed to pattern the midbrain-hindbrain and diencephalic-mesencephalic boundaries. *Dev Biol*.
- Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ (2001) Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci* 21: 8278-8285.
- Ferguson JN, Young LJ, Hearn EF, Matzuk MM, Insel TR, Winslow JT (2000) Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nat Genet* 25: 284-288.
- Fitter S, Sincock PM, Jolliffe CN, Ashman LK (1999) Transmembrane 4 superfamily protein CD151 (PETA-3) associates with beta 1 and alpha IIb beta 3 integrins in haemopoietic cell lines and modulates cell-cell adhesion. *Biochem J* 338: 61-70.
- Flanagan JG, Leder P (1990) The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts. *Cell* 63: 185-194.
- Foucher I, Montesinos ML, Volovitch M, Prochiantz A, Trembleau A (2003) Joint regulation of the MAP1B promoter by HNF3beta/Foxa2 and Engrailed is the result of a highly conserved mechanism for direct interaction of homeoproteins and Fox transcription factors. *Development* 130: 1867-1876.
- Fox CA, Jeyapalan M, Ross LR, Jacobson CD (1991) Ontogeny of cholecystokinin-like immunoreactivity in the Brazilian opossum brain. *Brain Res Dev Brain Res* 64: 1-18.
- Friedman GC, O'Leary DD (1996) Retroviral misexpression of engrailed genes in the chick optic tectum perturbs the topographic targeting of retinal axons. *J Neurosci* 16: 5498-5509.
- Fukada M, Watakabe I, Yuasa-Kawada J, Kawachi H, Kuroiwa A, Matsuda Y, Noda M (2000) Molecular characterization of CRMP5, a novel member of the collapsin response mediator protein family. *J Biol Chem* 275: 37957-37965.
- Fukata M, Nakagawa M, Kaibuchi K (2003) Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin Cell Biol* 15: 590-597.
- Garcia-Bellido A, Santamaria P (1972) DEVELOPMENTAL ANALYSIS OF THE WING DISC IN THE MUTANT ENGRAILED OF DROSOPHILA MELANOGASTER. *Genetics* 72: 87-104.
- 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.
- Gene Ontology Consortium (2004) The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucl Acids Res* 32: D258-D261.
- Gerlai R, Millen KJ, Herrup K, Fabien K, Joyner AL, Roder J (1996) Impaired motor learning performance in cerebellar En-2 mutant mice. *Behav Neurosci* 110: 126-133.

- Gharani N, Benayed R, Mancuso V, Brzustowicz LM, Millonig JH (2004) Association of the homeobox transcription factor, ENGRAILED 2, 3, with autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry* 9: 474-484.
- Gherbassi D, Simon HH (2006) The engrailed transcription factors and the mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neural Transm Suppl* 47-55.
- Giacobini P, Kopin AS, Beart PM, Mercer LD, Fasolo A, Wray S (2004) Cholecystokinin modulates migration of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *J Neurosci* 24: 4737-4748.
- Glickstein M (2006) Golgi and Cajal: The neuron doctrine and the 100th anniversary of the 1906 Nobel Prize. *Curr Biol* 16: R147-R151.
- Golgi C (1885) *Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso*. Reggio Emilia.
- Goshima Y, Ito T, Sasaki Y, Nakamura F (2002) Semaphorins as signals for cell repulsion and invasion. *J Clin Invest* 109: 993-998.
- Green L, Fein D, Modahl C, Feinstein C, Waterhouse L, Morris M (2001) Oxytocin and autistic disorder: alterations in peptide forms. *Biol Psychiatry* 50: 609-613.
- Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *PNAS* 73: 2424-2428.
- Gronholm M, Teesalu T, Tynnela J, Piltti K, Bohling T, Wartiovaara K, Vaheri A, Carpen O (2005) Characterization of the NF2 protein merlin and the ERM protein ezrin in human, rat, and mouse central nervous system. *Molecular and Cellular Neuroscience* 28: 683-693.
- Gubler U, Chua AO, Young D, Fan ZW, Eng J (1987) Cholecystokinin mRNA in porcine cerebellum. *Journal of Biological Chemistry* 262: 15242-15245.
- Guillen I, Mullor JL, Capdevila J, Sanchez-Herrero E, Morata G, Guerrero I (1995) The function of engrailed and the specification of *Drosophila* wing pattern. *Development* 121: 3447-3456.
- Guo C, Qiu HY, Huang Y, Chen H, Yang RQ, Chen SD, Johnson RL, Chen ZF, Ding YQ (2007) *Lmx1b* is essential for *Fgf8* and *Wnt1* expression in the isthmic organizer during tectum and cerebellum development in mice. *Development* 134: 317-325.
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514.
- Hanks M, Wurst W, Anson-Cartwright L, Auerbach AB, Joyner AL (1995) Rescue of the *En-1* mutant phenotype by replacement of *En-1* with *En-2*. *Science* 269: 679-682.
- Hanks MC, Loomis CA, Harris E, Tong CX, Anson-Cartwright L, Auerbach A, Joyner AL (1998) *Drosophila* engrailed can substitute for mouse *Engrailed1* function in mid-hindbrain, but not limb development. *Development* 125: 4521-4530.
- Hansen TV (2001) Cholecystokinin gene transcription: promoter elements, transcription factors and signaling pathways. *Peptides* 22: 1201-1211.
- Hashimoto H, Onaka T, Kawasaki M, Chen L, Mera T, Soya A, Saito T, Fujihara H, Sei H, Morita Y, Ueta Y (2005) Effects of cholecystokinin (CCK)-8 on hypothalamic oxytocin-secreting neurons in rats lacking CCK-A receptor. *Auton Neurosci* 121: 16-25.
- Hatfield GW, Hung SP, Baldi P (2003) Differential analysis of DNA microarray gene expression data. *Mol Microbiol* 47: 871-877.
- Haun RS, Dixon JE (1990) A transcriptional enhancer essential for the expression of the rat cholecystokinin gene contains a sequence identical to the -296 element of the human *c-fos* gene. *J Biol Chem* 265: 15455-15463.
- Heemskerk J, DiNardo S, Kostriken R, O'Farrell PH (1991) Multiple modes of engrailed regulation in the progression towards cell fate determination. *Nature* 352: 404-410.

- Hegde P, Qi R, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, Hughes JE, Snesrud E, Lee N, Quackenbush J (2000) A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques* 29: 548-4, 556.
- 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.: 397-422.
- Hemler ME (2005) Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 801-811.
- Holcman D, Schuss Z, Korkotian E (2004) Calcium dynamics in dendritic spines and spine motility. *Biophys J* 87: 81-91.
- Hollander E, Novotny S, Hanratty M, Yaffe R, DeCaria CM, Aronowitz BR, Mosovich S (2003) Oxytocin infusion reduces repetitive behaviors in adults with autistic and Asperger's disorders. *Neuropsychopharmacology* 28: 193-198.
- Horton AC, Ehlers MD (2003) Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* 40: 277-295.
- Horton AC, Racz B, Monson EE, Lin AL, Weinberg RJ, Ehlers MD (2005) Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis. *Neuron* 48: 757-771.
- Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, Gincel D, Armbrust KR, Dalton JC, Stevanin G, Durr A, Zuhlke C, Burk K, Clark HB, Brice A, Rothstein JD, Schut LJ, Day JW, Ranum LP (2006) Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet* 38: 184-190.
- Ishiki M, Klip A (2005) Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. *Endocrinology* 146: 5071-5078.
- Ito M (2006) Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol* 78: 272-303.
- Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, Greengard P (1985) A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 4137-4141.
- Jan YN, Jan LY (2003) The control of dendrite development. *Neuron* 40: 229-242.
- 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.
- Jimenez G, Paroush Z, Ish-Horowicz D (1997) Groucho acts as a corepressor for a subset of negative regulators, including Hairy and Engrailed. *Genes and Development* 11: 3072-3082.
- Jimenez G, Verrijzer CP, Ish-Horowicz D (1999) A Conserved Motif in Goosecoid Mediates Groucho-Dependent Repression in *Drosophila* Embryos. *Mol Cell Biol* 19: 2080-2087.
- Joliot A, Maizel A, Rosenberg D, Trembleau A, Dupas S, Volovitch M, Prochiantz A (1998) Identification of a signal sequence necessary for the unconventional secretion of Engrailed homeoprotein. *Current Biology* 8: 856-863.
- Joliot A, Trembleau A, Raposo G, Calvet S, Volovitch M, Prochiantz A (1997) Association of Engrailed homeoproteins with vesicles presenting caveolae-like properties. *Development* 124: 1865-1875.
- Joyner AL, Herrup K, Auerbach BA, Davis CA, Rossant J (1991) Subtle cerebellar phenotype in mice homozygous for a targeted deletion of the En-2 homeobox. *Science* 251: 1239-1243.
- Joyner AL, Martin GR (1987) En-1 and En-2, two mouse genes with sequence homology to the *Drosophila* engrailed gene: expression during embryogenesis. *Genes Dev* 1: 29-38.
- Juenger CH, Holst MI, 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.
- Kagami Y, Furuichi T (2001) Investigation of differentially expressed genes during the development of mouse cerebellum. *Brain Res Gene Expr Patterns* 1: 39-59.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (1995) *Neurowissenschaften*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.

- King JS, Bishop GA (1990) Distribution and brainstem origin of cholecystokinin-like immunoreactivity in the opossum cerebellum. *J Comp Neurol* 298: 373-384.
- King JS, Bishop GA (1992) Ontogenesis of cerebellar afferents identified by cholecystokinin-like immunoreactivity. *Brain Res Dev Brain Res* 65: 237-252.
- Kolodkin AL, Levengood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD (1997) Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90: 753-762.
- Konur S, Ghosh A (2005) Calcium signaling and the control of dendritic development. *Neuron* 46: 401-405.
- Kopczynski CC, Davis GW, Goodman CS (1996) A neural tetraspanin, encoded by late bloomer, that facilitates synapse formation. *Science* 271: 1867-1870.
- Kornberg T (1981) Engrailed: a gene controlling compartment and segment formation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 1095-1099.
- Kouranti I, Sachse M, Arouche N, Goud B, Echard A (2006) Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Curr Biol* 16: 1719-1725.
- Kretsinger RH, Nockolds CE (1973) Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem* 248: 3313-3326.
- Kuemerle B, Gulden F, Cherosky N, Williams E, Herrup K (2006) The mouse Engrailed genes: A window into autism. *Behav Brain Res*.
- Kuemerle B, Zanjani H, Joyner A, Herrup K (1997) Pattern Deformities and Cell Loss in Engrailed-2 Mutant Mice Suggest Two Separate Patterning Events during Cerebellar Development. *Journal of Neuroscience* 17: 7881-7889.
- Laine J, Axelrad H (1998) Lugaro cells target basket and stellate cells in the cerebellar cortex. *Neuroreport* 9: 2399-2403.
- Lallemant D, Curto M, Saotome I, Giovannini M, McClatchey AI (2003) NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. *Genes Dev* 17: 1090-1100.
- Lammerding J, Kazarov AR, Huang H, Lee RT, Hemler ME (2003) Tetraspanin CD151 regulates alpha6beta1 integrin adhesion strengthening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7616-7621.
- Larsell O (1952) The morphogenesis and adult pattern of the lobules and fissures of the cerebellum of the white rat. *J Comp Neurol* 97: 281-356.
- Lee SH, Schwaller B, Neher E (2000) Kinetics of Ca²⁺ binding to parvalbumin in bovine chromaffin cells: implications for [Ca²⁺] transients of neuronal dendrites. *J Physiol* 525 Pt 2:419-32.: 419-432.
- Lee YG, Macoska JA, Korenchuk S, Pienta KJ (2002) MIM, a potential metastasis suppressor gene in bladder cancer. *Neoplasia* 4: 291-294.
- Leenders AG, Lopes da Silva FH, Ghijsen WE, Verhage M (2001) Rab3a is involved in transport of synaptic vesicles to the active zone in mouse brain nerve terminals. *Mol Biol Cell* 12: 3095-3102.
- Li JY, Lao Z, Joyner AL (2005) New regulatory interactions and cellular responses in the isthmus organizer region revealed by altering Gbx2 expression. *Development* 132: 1971-1981.
- Licinio J, Wong ML (2004) Back to where it all started: monoamines and behavior--from drug responses to genes. *Mol Psychiatry* 9: 427.
- Lim MM, Bielsky IF, Young LJ (2005) Neuropeptides and the social brain: potential rodent models of autism. *Int J Dev Neurosci* 23: 235-243.
- Lippincott-Schwartz J, Yuan LC, Bonifacino JS, Klausner RD (1989) Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* 56: 801-813.

- Liu BP, Strittmatter SM (2001) Semaphorin-mediated axonal guidance via Rho-related G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 13: 619-626.
- Llinas RR (2003) THE CONTRIBUTION OF SANTIAGO RAMON Y CAJAL TO FUNCTIONAL NEUROSCIENCE. *Nat Rev Neurosci* 4: 77-80.
- Loberg RD, Neeley CK, Adam-Day LL, Fridman Y, St John LN, Nixdorf S, Jackson P, Kalikin LM, Pienta KJ (2005) Differential expression analysis of MIM (MTSS1) splice variants and a functional role of MIM in prostate cancer cell biology. *Int J Oncol* 26: 1699-1705.
- Logan C, Wizenmann A, Drescher U, Monschau B, Bonhoeffer F, Lumsden A (1996) Rostral optic tectum acquires caudal characteristics following ectopic engrailed expression. *Curr Biol* 6: 1006-1014.
- Lohmann C, Finski A, Bonhoeffer T (2005) Local calcium transients regulate the spontaneous motility of dendritic filopodia. *Nat Neurosci* 8: 305-312.
- Maecker HT, Todd SC, Levy S (1997) The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 11: 428-442.
- Maeda R, Ishimura A, Mood K, Park EK, Buchberg AM, Daar IO (2002) Xpbx1b and Xmeis1b play a collaborative role in hindbrain and neural crest gene expression in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 5448-5453.
- Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Jr., Weisgraber KH (1984) Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 25: 1277-1294.
- Mainguy G, Erno H, Montesinos ML, Lesaffre B, Wurst W, Volovitch M, Prochiantz A (1999) Regulation of epidermal bullous pemphigoid antigen 1 (BPAG1) synthesis by homeoprotein transcription factors. *J Invest Dermatol* 113: 643-650.
- Maizel A, Bensaude O, Prochiantz A, Joliot A (1999) A short region of its homeodomain is necessary for engrailed nuclear export and secretion. *Development* 126: 3183-3190.
- Maizel A, Tassetto M, Filhol O, Cochet C, Prochiantz A, Joliot A (2002) Engrailed homeoprotein secretion is a regulated process. *Development* 129: 3545-3553.
- Masseroli M, Galati O, Pinciroli F (2005) GFINDER: genetic disease and phenotype location statistical analysis and mining of dynamically annotated gene lists. *Nucl Acids Res* 33: W717-W723.
- Masseroli M, Martucci D, Pinciroli F (2004) GFINDER: Genome Function INtegrated Discoverer through dynamic annotation, statistical analysis, and mining. *Nucl Acids Res* 32: W293-W300.
- Mattila PK, Salminen M, Yamashiro T, Lappalainen P (2003) Mouse MIM, a Tissue-specific Regulator of Cytoskeletal Dynamics, Interacts with ATP-Actin Monomers through Its C-terminal WH2 Domain. *Journal of Biological Chemistry* 278: 8452-8459.
- McMahon HT, Sudhof TC (1995) Synaptic core complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP25 forms high affinity alpha-SNAP binding site. *J Biol Chem* 270: 2213-2217.
- Mesa R, Salomon C, Roggero M, Stahl PD, Mayorga LS (2001) Rab22a affects the morphology and function of the endocytic pathway. *J Cell Sci* 114: 4041-4049.
- Miale IL, Sidman RL (1961) An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol* 4: 277-296.
- Millen KJ, Hui CC, Joyner AL (1995) A role for En-2 and other murine homologues of *Drosophila* segment polarity genes in regulating positional information in the developing cerebellum. *Development* 121: 3935-3945.
- Millen KJ, Wurst W, Herrup K, Joyner AL (1994) Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse Engrailed-2 mutants. *Development* 120: 695-706.
- Mirnics K (2001) Microarrays in brain research: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Neurosci* 2: 444-447.

- Modahl C, Green L, Fein D, Morris M, Waterhouse L, Feinstein C, Levin H (1998) Plasma oxytocin levels in autistic children. *Biol Psychiatry* 43: 270-277.
- Mohler PJ, Yoon W, Bennett V (2004) Ankyrin-B Targets β 2-Spectrin to an Intracellular Compartment in Neonatal Cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry* 279: 40185-40193.
- Montesinos ML, Foucher I, Conradt M, Mainguy G, Robel L, Prochiantz A, Volovitch M (2001) The neuronal microtubule-associated protein 1B is under homeoprotein transcriptional control. *J Neurosci* 21: 3350-3359.
- Morata G, Lawrence PA (1975) Control of compartment development by the engrailed gene in *Drosophila*. *Nature* 255: 614-617.
- Morgan R (2006) Engrailed: Complexity and economy of a multi-functional transcription factor. *FEBS Lett* 580: 2531-2533.
- Moy SS, Nadler JJ, Magnuson TR, Crawley JN (2006) Mouse models of autism spectrum disorders: the challenge for behavioral genetics. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 142: 40-51.
- Mugnaini E, Floris A (1994) The unipolar brush cell: a neglected neuron of the mammalian cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 339: 174-180.
- Munro S (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115: 377-388.
- Murcia CL, Gulden F, Herrup K (2005) A question of balance: a proposal for new mouse models of autism. *Int J Dev Neurosci* 23: 265-275.
- Nagao S, Kwak S, Kanazawa I (1997) EAAT4, a glutamate transporter with properties of a chloride channel, is predominantly localized in Purkinje cell dendrites, and forms parasagittal compartments in rat cerebellum. *Neuroscience* 78: 929-933.
- Nakamura F, Kalb RG, Strittmatter SM (2000) Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *J Neurobiol* 44: 219-229.
- Nakamura H, Watanabe Y (2005) Isthmus organizer and regionalization of the mesencephalon and metencephalon. *Int J Dev Biol* 49: 231-235.
- Neill GW, Crompton MR (2001) Binding of the merlin-I product of the neurofibromatosis type 2 tumour suppressor gene to a novel site in beta-fodrin is regulated by association between merlin domains. *Biochem J* 358: 727-735.
- Neumann I, LANDGRAF R, Takahashi Y, Pittman QJ, Russell JA (1994) Stimulation of oxytocin release within the supraoptic nucleus and into blood by CCK-8. *Am J Physiol* 267: R1626-R1631.
- Nicolson RI, Fawcett AJ, Dean P (2001) Developmental dyslexia: the cerebellar deficit hypothesis. *Trends Neurosci* 24: 508-511.
- Nunzi MG, Mugnaini E (2000) Unipolar brush cell axons form a large system of intrinsic mossy fibers in the postnatal vestibulocerebellum. *J Comp Neurol* 422: 55-65.
- Nunzi MG, Shigemoto R, Mugnaini E (2002) Differential expression of calretinin and metabotropic glutamate receptor mGluR1 α defines subsets of unipolar brush cells in mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 451: 189-199.
- Oberdick J, Smeyne RJ, Mann JR, Zackson S, Morgan JI (1990) A promoter that drives transgene expression in cerebellar Purkinje and retinal bipolar neurons. *Science* 248: 223-226.
- Obrebski VJ, Hall AM, Fernandez-Valle C (1998) Merlin, the neurofibromatosis type 2 gene product, and beta1 integrin associate in isolated and differentiating Schwann cells. *J Neurobiol* 37: 487-501.
- Onaka T, Luckman SM, Antonijevic I, Palmer JR, Leng G (1995) Involvement of the noradrenergic afferents from the nucleus tractus solitarius to the supraoptic nucleus in oxytocin release after peripheral cholecystokinin octapeptide in the rat. *Neuroscience* 66: 403-412.

- Oyler GA, Polli JW, Wilson MC, Billingsley ML (1991) Developmental expression of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5247-5251.
- Pan W (2002) A comparative review of statistical methods for discovering differentially expressed genes in replicated microarray experiments. *Bioinformatics* 18: 546-554.
- Patapoutian A, Reichardt LF (2000) Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance. *Curr Opin Neurobiol* 10: 392-399.
- Pellinen T, Arjonen A, Vuoriluoto K, Kallio K, Fransén JA, Ivaska J (2006) Small GTPase Rab21 regulates cell adhesion and controls endosomal traffic of beta1-integrins. *J Cell Biol* 173: 767-780.
- Peltenburg LT, Murre C (1996) Engrailed and Hox homeodomain proteins contain a related Pbx interaction motif that recognizes a common structure present in Pbx. *EMBO J* 15: 3385-3393.
- Peltenburg LT, Murre C (1997) Specific residues in the Pbx homeodomain differentially modulate the DNA-binding activity of Hox and Engrailed proteins. *Development* 124: 1089-1098.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30: e36.
- Pfeffer PL, Payer B, Reim G, di Magliano MP, Busslinger M (2002) The activation and maintenance of Pax2 expression at the mid-hindbrain boundary is controlled by separate enhancers. *Development* 129: 307-318.
- Pierce K, Müller RA, Ambrose J, Allen G, Courchesne E (2001) Face processing occurs outside the fusiform 'face area' in autism: evidence from functional MRI. *Brain* 124: 2059-2073.
- Pierce SK (2004) To cluster or not to cluster: FRETting over rafts. *Nat Cell Biol* 6: 180-181.
- Polleux F, Morrow T, Ghosh A (2000) Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404: 567-573.
- Puertollano R, Aguilar RC, Gorshkova I, Crouch RJ, Bonifacino JS (2001a) Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science* 292: 1712-1716.
- Puertollano R, Randazzo PA, Presley JF, Hartnell LM, Bonifacino JS (2001b) The GGAs promote ARF-dependent recruitment of clathrin to the TGN. *Cell* 105: 93-102.
- Qin LX, Kerr KF, Contributing Members of the Toxicogenomics Research Consortium (2004) Empirical evaluation of data transformations and ranking statistics for microarray analysis. *Nucl Acids Res* 32: 5471-5479.
- Quackenbush J (2001) Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet* 2: 418-427.
- Quackenbush J (2002) Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* 32 Suppl: 496-501.
- Rabacchi SA, Solowska JM, Kruk B, Luo Y, Raper JA, Baird DH (1999) Collapsin-1/semaphorin-III/D is regulated developmentally in Purkinje cells and collapses pontocerebellar mossy fiber neuronal growth cones. *J Neurosci* 19: 4437-4448.
- Ramon y Cajal S (1911) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertèbres*. Paris: Maloine.
- Redmond L, Hockfield S, Morabito MA (1996) The Divergent Homeobox Gene PBX1 Is Expressed in the Postnatal Subventricular Zone and Interneurons of the Olfactory Bulb. *J Neurosci* 16: 2972-2982.
- Rehfeld JF, Mogensen NW, Bardram L, Hilsted L, Monstein HJ (1992) Expression, but failing maturation of procholecystinin in cerebellum. *Brain Res* 576: 111-119.

- Ricard D, Rogemond V, Charrier E, Aguera M, Bagnard D, Belin MF, Thomasset N, Honnorat J (2001) Isolation and expression pattern of human Unc-33-like phosphoprotein 6/collapsin response mediator protein 5 (Ulip6/CRMP5): coexistence with Ulip2/CRMP2 in Sema3a- sensitive oligodendrocytes. *J Neurosci* 21: 7203-7214.
- Rohm B, Ottemeyer A, Lohrum M, Puschel AW (2000a) Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech Dev* 93: 95-104.
- Rohm B, Rahim B, Kleiber B, Hovatta I, Puschel AW (2000b) The semaphorin 3A receptor may directly regulate the activity of small GTPases. *FEBS Lett* 486: 68-72.
- Rotzinger S, Vaccarino FJ (2003) Cholecystokinin receptor subtypes: role in the modulation of anxiety-related and reward-related behaviours in animal models. *J Psychiatry Neurosci* 28: 171-181.
- Sanlioglu S, Zhang X, Baader SL, Oberdick J (1998) Regulation of a Purkinje cell-specific promoter by homeodomain proteins: repression by engrailed-2 vs. synergistic activation by Hoxa5 and Hoxb7. *J Neurobiol* 36: 559-571.
- Savasta M, Palacios JM, Mengod G (1990) Regional distribution of the messenger RNA coding for the neuropeptide cholecystokinin in the human brain examined by in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* 7: 91-104.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW (1996) Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *PNAS* 93: 10614-10619.
- Schmahmann JD, Caplan D (2006) Cognition, emotion and the cerebellum. *Brain* 129: 290-292.
- Schmidt H, Stiefel KM, Racay P, Schwaller B, Eilers J (2003) Mutational analysis of dendritic Ca²⁺ kinetics in rodent Purkinje cells: role of parvalbumin and calbindin D28k. *J Physiol* 551: 13-32.
- Schunck T, Erb G, Mathis A, Gilles C, Namer IJ, Hode Y, Demaziere A, Luthringer R, Macher JP (2006) Functional magnetic resonance imaging characterization of CCK-4-induced panic attack and subsequent anticipatory anxiety. *Neuroimage* ..
- Schutter DJ, van Honk J (2005) The cerebellum on the rise in human emotion. *Cerebellum* 4: 290-294.
- Schweighofer N, Doya K, Kuroda S (2004) Cerebellar aminergic neuromodulation: towards a functional understanding. *Brain Res Brain Res Rev* 44: 103-116.
- Serra HG, Byam C, Lande JD, Tousey SK, Zoghbi HY, Orr HT (2004) Gene profiling links SCA1 pathophysiology to glutamate signaling in Purkinje cells of transgenic mice. *Hum Mol Genet* 13: 2535-2543.
- Serrano N, Brock HW, Demeret C, Dura JM, Randsholt NB, Kornberg TB, Maschat F (1995) polyhomeotic appears to be a target of engrailed regulation in *Drosophila*. *Development* 121: 1691-1703.
- Serrano N, Brock HW, Maschat F (1997) beta3-tubulin is directly repressed by the engrailed protein in *Drosophila*. *Development* 124: 2527-2536.
- Shigetani Y, Funahashi JI, Nakamura H (1997) En-2 regulates the expression of the ligands for Eph type tyrosine kinases in chick embryonic tectum. *Neurosci Res* 27: 211-217.
- Shoham T, Rajapaksa R, Kuo CC, Haimovich J, Levy S (2006) Building of the tetraspanin web: distinct structural domains of CD81 function in different cellular compartments. *Mol Cell Biol* 26: 1373-1385.
- Sidman, R. L. and Pierce, E. T. Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord. Havard Uniniversity Press, Cambridge, Massachussetts . 1971.
Ref Type: Generic
- Siegler MV, Jia XX (1999) Engrailed negatively regulates the expression of cell adhesion molecules connectin and neuroglian in embryonic *Drosophila* nervous system. *Neuron* 22: 265-276.

- Simat M, Parpan F, Fritschy JM (2007) Heterogeneity of glycinergic and gabaergic interneurons in the granule cell layer of mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 500: 71-83.
- Simon HH, Saueressig H, Wurst W, Goulding MD, O'Leary DD (2001) Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes. *J Neurosci* 21: 3126-3134.
- Simon HH, Thuret S, Alberi L (2004) Midbrain dopaminergic neurons: control of their cell fate by the engrailed transcription factors. *Cell Tissue Res* 318: 53-61.
- Simpson JC, Griffiths G, Wessling-Resnick M, Fransen JA, Bennett H, Jones AT (2004) A role for the small GTPase Rab21 in the early endocytic pathway. *J Cell Sci* 117: 6297-6311.
- Smeyne RJ, Oberdick J, Schilling K, Berrebi AS, Mugnaini E, Morgan JI (1991) Dynamic organization of developing Purkinje cells revealed by transgene expression. *Science* 254: 719-721.
- Solano PJ, Mugat B, Martin D, Girard F, Huibant JM, Ferraz C, Jacq B, Demaille J, Maschat F (2003) Genome-wide identification of in vivo Drosophila Engrailed-binding DNA fragments and related target genes. *Development* 130: 1243-1254.
- Solowska JM, Mazurek A, Weinberger L, Baird DH (2002) Pontocerebellar axon guidance: neuropilin-1- and semaphorin 3A-sensitivity gradients across basilar pontine nuclei and semaphorin 3A variation across cerebellum. *Mol Cell Neurosci* 21: 266-284.
- Sorensen JB (2005) SNARE complexes prepare for membrane fusion. *Trends Neurosci* 28: 453-455.
- Sotelo C (2003) Viewing the brain through the master hand of Ramon y Cajal. *Nat Rev Neurosci* 4: 71-77.
- Stears RL, Martinsky T, Schena M (2003) Trends in microarray analysis. *Nat Med* 9: 140-145.
- Stenmark H, Olkkonen VM (2001) The Rab GTPase family. *Genome Biol* 2: REVIEWS3007.
- Sturn A, Mlecnik B, Pieler R, Rainer J, Truskaller T, Trajanoski Z (2003) Client-server environment for high-performance gene expression data analysis. *Bioinformatics* 19: 772-773.
- Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z (2002) Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18: 207-208.
- Suvorova ES, Duden R, Lupashin VV (2002) The Sec34/Sec35p complex, a Ypt1p effector required for retrograde intra-Golgi trafficking, interacts with Golgi SNAREs and COPI vesicle coat proteins. *J Cell Biol* 157: 631-643.
- Takeda K, Koshimoto H, Uchiumi F, Haun RS, Dixon JE, Kato T (1989) Postnatal development of cholecystokinin-like immunoreactivity and its mRNA level in rat brain regions. *J Neurochem* 53: 772-778.
- Tang BL (2001) Protein trafficking mechanisms associated with neurite outgrowth and polarized sorting in neurons. *Journal of Neurochemistry* 79: 923-930.
- Tolkunova EN, Fujioka M, Kobayashi M, Deka D, Jaynes JB (1998) Two Distinct Types of Repression Domain in Engrailed: One Interacts with the Groucho Corepressor and Is Preferentially Active on Integrated Target Genes. *Mol Cell Biol* 18: 2804-2814.
- Tomomura M, Rice DS, Morgan JI, Yuzaki M (2001) Purification of Purkinje cells by fluorescence-activated cell sorting from transgenic mice that express green fluorescent protein. *Eur J Neurosci* 14: 57-63.
- Tooze SA (2001) CELL BIOLOGY: GGAs Tie Up the Loose Ends. *Science* 292: 1663-1665.
- Townsend J, Courchesne E, Covington J, Westerfield M, Harris NS, Lyden P, Lowry TP, Press GA (1999) Spatial attention deficits in patients with acquired or developmental cerebellar abnormality. *J Neurosci* 19: 5632-5643.
- Trottier G, Srivastava L, Walker CD (1999) Etiology of infantile autism: a review of recent advances in genetic and neurobiological research. *J Psychiatry Neurosci* 24: 103-115.
- Ungar D, Oka T, Krieger M, Hughson FM (2006) Retrograde transport on the COG railway. *Trends Cell Biol* 16: 113-120.

- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.
- Vecellio M, Schwaller B, Meyer M, Hunziker W, Celio MR (2000) Alterations in Purkinje cell spines of calbindin D-28 k and parvalbumin knock-out mice. *Eur J Neurosci* 12: 945-954.
- Vig PJ, Subramony SH, Burright EN, Fratkin JD, McDaniel DO, Desai D, Qin Z (1998) Reduced immunoreactivity to calcium-binding proteins in Purkinje cells precedes onset of ataxia in spinocerebellar ataxia-1 transgenic mice. *Neurology* 51: 125-131.
- Vitale M, Vashishtha A, Linzer E, Powell DJ, Friedman JM (1991) Molecular cloning of the mouse CCK gene: expression in different brain regions and during cortical development. *Nucleic Acids Res* 19: 169-177.
- Voogd J, Glickstein M (1998) The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci* 21: 370-375.
- Wang VY, Zoghbi HY (2001) Genetic regulation of cerebellar development. *Nat Rev Neurosci* 2: 484-491.
- Washbourne P, Liu XB, Jones EG, McAllister AK (2004) Cycling of NMDA receptors during trafficking in neurons before synapse formation. *J Neurosci* 24: 8253-8264.
- Wassink TH, Brzustowicz LM, Bartlett CW, Szatmari P (2004) The search for autism disease genes. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 10: 272-283.
- Winslow JT, Hearn EF, Ferguson JN, Young LJ, Matzuk MM, Insel TR (2000) Infant vocalization, adult aggression, and fear behavior of an oxytocin null mutant mouse. *Horm Behav* 37: 145-155.
- Winslow JT, Insel TR (2002) The social deficits of the oxytocin knockout mouse. *Neuropeptides* 36: 221-229.
- Winterwood NE, Varzavand A, Meland MN, Ashman LK, Stipp CS (2006) A Critical Role for Tetraspanin CD151 in $\alpha 3 \beta 1$ and $\alpha 6 \beta 4$ Integrin-dependent Tumor Cell Functions on Laminin-5. *Mol Biol Cell* ..
- Wong ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39: 75-85.
- Wood PL, Steel DJ, Kim HS, Petrack B, Altar CA (1988) Inhibition of climbing and mossy fiber input to mouse cerebellar Purkinje cells by cholecystokinin. *J Pharmacol Exp Ther* 244: 58-62.
- Woodings JA, Sharp SJ, Machesky LM (2003) MIM-B, a putative metastasis suppressor protein, binds to actin and to protein tyrosine phosphatase delta. *Biochem J* 371: 463-471.
- Wu B (2005) Differential gene expression detection using penalized linear regression models: the improved SAM statistics. *Bioinformatics* 21: 1565-1571.
- Wu S, Jia M, Ruan Y, Liu J, Guo Y, Shuang M, Gong X, Zhang Y, Yang X, Zhang D (2005) Positive association of the oxytocin receptor gene (OXTR) with autism in the Chinese Han population. *Biol Psychiatry* 58: 74-77.
- Wurst W, Auerbach AB, Joyner AL (1994) Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* 120: 2065-2075.
- Wurst W, Bally-Cuif L (2001) Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer. *Nat Rev Neurosci* 2: 99-108.
- Xu J, Xu Y, Ellis-Davies GC, Augustine GJ, Tse FW (2002) Differential regulation of exocytosis by alpha- and beta-SNAPs. *J Neurosci* 22: 53-61.
- Yamagishi A, Masuda M, Ohki T, Onishi H, Mochizuki N (2004) A Novel Actin Bundling/Filopodium-forming Domain Conserved in Insulin Receptor Tyrosine Kinase Substrate p53 and Missing in Metastasis Protein. *Journal of Biological Chemistry* 279: 14929-14936.
- Ylisaukko-Oja T, Alarcon M, Cantor RM, Auranen M, Vanhala R, Kempas E, von Wendt L, Jarvela I, Geschwind DH, Peltonen L (2006) Search for autism loci by combined analysis of Autism Genetic Resource Exchange and Finnish families. *Ann Neurol* 59: 145-155.

Young LJ (2001) Oxytocin and vasopressin as candidate genes for psychiatric disorders: lessons from animal models. *Am J Med Genet* 105: 53-54.

Young LJ, Winslow JT, Wang Z, Gingrich B, Guo Q, Matzuk MM, Insel TR (1997) Gene targeting approaches to neuroendocrinology: oxytocin, maternal behavior, and affiliation. *Horm Behav* 31: 221-231.

Yu HH, Kolodkin AL (1999) Semaphorin signaling: a little less per-plexin. *Neuron* 22: 11-14.

Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 107-117.

Zhang X, Baader SL, Bian F, Muller W, Oberdick J (2001) High level Purkinje cell specific expression of green fluorescent protein in transgenic mice. *Histochem Cell Biol* 115: 455-464.

Zhang X, He X, Fu XY, Chang Z (2006) Varp is a Rab21 guanine nucleotide exchange factor and regulates endosome dynamics. *J Cell Sci* 119: 1053-1062.

Zhou H, Hughes DE, Major ML, Yoo K, Pesold C, Costa RH (2001) Atypical mouse cerebellar development is caused by ectopic expression of the forkhead box transcription factor HNF-3beta. *Gene Expr* 9: 217-236.

Zhu Y, Doray B, Poussu A, Lehto VP, Kornfeld S (2001) Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphate receptor. *Science* 292: 1716-1718.

5.4 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
Abb.	Abbildung
BC	Korbzellen
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
CCK	Cholecystokinin
cDNA	komplementäre DNA
CF	Kletterfasern
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DCN	tiefe cerebelläre Kerne
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	embryonal Tag
E.coli	Escherichia coli
EGFP	verstärktes grün fluoreszierendes Protein
g	Schleuderziffer
g	Gramm
GABA	Gamma Aminobuttersäure
GC	Körnerzelle
GCL	Körnerzellschicht
GCN	Golgizellen
h	Stunde
Ig	Immunglobulin
M	mol pro Liter
MF	Moosfasern
min	Minute(n)
ML	Molekularschicht
Mtss1	Metastasen Suppressorgen 1
n	Anzahl
OD	optische Dichte
P0	Tag der Geburt
P7	Postnataltag 7
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte-Saline
PC	Purkinjezelle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PF	Parallelfasern
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PL	Purkinjezellschicht
Pvalb	Parvalbumin

RFU	relativen Fluoreszenzeinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SC	Sternzellen
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sema3A	Semaphorin 3A
Tab.	Tabelle
Tspan5	Tetraspanin-5
U	Enzym Aktivitätseinheit
UTR	nicht translatierte Bereich
(v/v)	Volumen / Volumen
WT	Wildtyp
(w/v)	Gewichtsanteil / Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Veröffentlichungen

Holst MI, Maercker C, Zhang X, Masseroli M, Jankowski J, Martini J, Schwaller B, Oberdick J, Schilling K, Baader SL (2007) Differential gene expression analysis of Engrailed-2 overexpressing vs. wildtype cerebella reveals clusters of genes related to cellular compartmentation and Autism.

In Bearbeitung

Glassmann A, Molly S, Surchev L, Nazwar TA, Holst MI, Baader SL, Oberdick J, Pietsch T, Schilling K (2007) Developmental expression and differentiation-related neuron-specific splicing of metastasis suppressor 1 (Mtss1) in normal and transformed cerebellar cells

In Bearbeitung

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* 19;472: 87-99.

Juenger CH, Holst MI, 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.

Danksagung

Für die hervorragende Betreuung während der Erstellung meiner Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stephan Baader herzlichst bedanken. Die ständige Diskussionsbereitschaft zu allen praktischen und theoretischen Fragestellungen dieser Arbeit und der Freiraum zur Entwicklung von eigenen wissenschaftlichen Ideen und deren Durchführung waren entscheidend für die Erstellung dieser Arbeit. Die gute Zusammenarbeit wirkte stets motivierend und seine Unterstützung hat sehr zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Karl Schilling bedanken, für die Möglichkeit der Durchführung meiner Arbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie. Sein großes Interesse und die konstruktiven Anregungen zur Ausführung meiner Experimente und deren Auswertung waren mir eine große Hilfe.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Magin bedanke ich mich für die Übernahme der Begutachtung dieser Dissertation.

Allen Mitarbeitern des Labors danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit im Laboralltag. Ganz besonders gilt mein Dank Alice Ihmer für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente.

Auch für die Förderung durch Bonfor (0-167.0004 SLB) und BMBF 01KW9501 (CM) und das Graduiertenkolleg (Graduiertenkolleg 246 and Kn 200/4-6 TP6) bedanke ich mich.

Bei meinen Eltern möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken, die mich immer unterstützt haben und mir meinen Weg ermöglicht haben.

Ganz wichtig war während dieser Zeit für mich die außergewöhnliche Hilfe und das Verständnis meiner Frau Daniela. Für ihre Geduld und ihre große Liebe möchte ich mich ganz besonders bedanken.