

Einfluss des Neurofibromatose Typ 2 Proteins auf die Purkinjezellmorphologie im Kleinhirn der Maus

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

Franziska Lang, geb. Richter
aus Ilmenau
2019

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Stephan Baader
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Henneberger

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.05.2019

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Karl Schilling

*Diese Arbeit ist meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Anke und Thomas Richter,
sowie meinem Ehemann Christian Lang, gewidmet.*

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis.....	8
2.	Einleitung.....	10
2.1.	Das Krankheitsbild Neurofibromatose Typ 2	10
2.2.	Bekannte Zielgene und Interaktionspartner des Tumorsuppressors Merlin.....	12
2.3.	Funktion des Tumorsuppressorgens Merlin im zentralen Nervensystem	13
2.4.	Purkinjezellen im Kleinhirnzellverband	15
2.4.1.	Verschaltung der Purkinjezellen im Kleinhirn	15
2.4.2.	Morphologische Entwicklung des Dendritenbaumes	18
2.4.3.	Entwicklungsstadien nach Hendelmann und Aggerwal (1980).....	20
2.5.	Dornfortsätze der Purkinjezellen	22
2.6.	Mausmutanten mit einer Defizienz in der Isoform 1 des <i>Nf2</i> Gens (<i>Nf2 Iso1</i> Mäuse)	22
2.7.	Fragestellung.....	25
3.	Material und Methoden.....	26
3.1.	Geräte und Chemikalien.....	26
3.1.1.	Geräte	26
3.1.2.	Chemikalien.....	27
3.2.	Versuchstierhaltung.....	30
3.3.	Molekularbiologische Methoden	31
3.3.1.	Genotypisierung der Mäuse	31
3.3.2.	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion zum RNA-Nachweis	33
3.3.2.1	RNA Isolation aus Kleinhirngewebe	33
3.3.2.2	Synthese der komplementären DNA	34
3.3.2.3	Analyse der cDNA	34
3.4.	Biochemische Methoden	36
3.4.1.	Präparation der Proteinproben sowie Proteinkonzentrationsbestimmung	36
3.4.2.	SDS-PAGE.....	37
3.4.3.	Western Blot Analyse	37
3.5.	Histologische Färbungen.....	38
3.5.1.	Gewebevorbereitung	38

3.5.2.	Immunhistologische Färbung	39
3.5.2.1	Indirekte Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen	39
3.5.2.2	Direkte Färbung mit Kresylviolett.....	40
3.5.3.	Golgi-Färbung	41
3.6.	Schnittkultur.....	42
3.7.	Übersichtsaufnahmen.....	44
3.8.	Aufnahmen der mikroskopischen Schnitte	44
3.8.1.	Das Aufrechte Mikroskop von Nikon	44
3.8.2.	Konfokales-Laser-Scanning-Mikroskop	44
3.8.3.	Axioskop.....	45
3.9.	Morphometrische Auswertung der Purkinjezellen	45
3.9.1.	Auswertung Calbindin gefärbter Vibratomschnitte.....	45
3.9.2.	Einzelzellauswertung von Golgi-gefärbten Geweben und immunhistochemisch gefärbter Schnittkulturen	46
3.9.3.	Rekonstruktion adulter Purkinjezellen	47
3.9.4.	Auswertung der Dornfortsätze	48
3.10.	Statistik.....	49
3.11.	Bildbearbeitung	50
4.	Ergebnisse	51
4.1.	Expression von <i>Nf2</i> in <i>Nf2 Iso1</i> defizienten Mäusen	51
4.1.1.	Expressionsanalysen von <i>Nf2</i> im Kleinhirn auf DNA Ebene.....	51
4.1.2.	Expressionsanalysen von <i>Nf2</i> im Kleinhirn auf RNA Ebene.....	52
4.2.	Makroskopische Darstellung des Kleinhirns von <i>Nf2 Iso1</i> defizienten Mäusen .	53
4.3.	Einfluss der <i>Nf2 Iso1</i> Defizienz auf die Purkinjezellentwicklung	55
4.3.1.	Dichte der Purkinjezellen.....	55
4.3.2.	Altersentsprechender Verlauf der Entwicklung	57
4.4.	Morphometrische Analyse der Purkinjezellen.....	62
4.4.1.	Molekularschichtdicke	62
4.4.2.	Fläche des Dendritenbaumes.....	64
4.4.3.	Komplexität der Dendritenbäume	66
4.4.3.1	Verzweigungspunkte	67
4.4.3.2	Definition der Dendritenordnungen.....	68

4.4.4.	Längenwachstum im Dendritenbaum/ Lage der Verzweigungspunkte	72
4.4.4.1	Pfadlängen	73
4.4.4.2	Segmentlängen	77
4.4.5.	Orientierung der Bifurkationsäste	78
4.4.6.	Dendritendurchmesser	83
4.4.7.	Mögliche Auswirkungen auf die Elektrophysiologie: Rall Power.....	85
4.5.	Dornfortsatzwachstum der Purkinjezellen	86
4.5.1.	Synapsen, die Schnittstellen zwischen Purkinjezellen und eingehenden Signalen	88
4.5.1.1	Immunhistologie der Präsynapsen	88
4.5.1.2	Western Blot des präsynaptischen Markers Synaptobrevin	90
4.6.	Auswirkung extrinsischer Einflüsse	90
4.6.1.	Schnittkulturen.....	90
5.	Diskussion	92
5.1.	Auswirkung der <i>Nf2 Iso1</i> Defizienz auf die Purkinjezellendifferenzierung in den ersten Tagen nach Geburt.....	93
5.2.	Einfluss von Merlin auf das Dendritenwachstum	94
5.3.	Mögliche mechanistische Grundlagen der <i>Nf2</i> Wirkung.....	98
5.4.	Einfluss von <i>Nf2</i> auf das Verzweigungsmuster im Dendritenbaum von Purkinjezellen	100
5.5.	Einfluss von Merlin auf die Bildung von Dornfortsätzen.....	101
5.6.	Intrinsische versus extrinsische Mechanismen der Purkinjezell-Differenzierung in <i>Nf2 Iso 1</i> defizienten Mäusen	102
5.7.	Kritische Betrachtung der Messgenauigkeit in der Lichtmikroskopie	105
6.	Zusammenfassung	110
7.	Abbildungsverzeichnis.....	112
8.	Tabellenverzeichnis.....	116
9.	Literaturverzeichnis	117
10.	Danksagung	129

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Cdc42	cell division cycle 42
DIV 8	Days in vitro (Tage in Kultur)
DNA	deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleinsäure)
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
En-2	engrailed 2
engl.	Englische Übersetzung
g	Gravitationskonstante
H ₂ O	Wasser
Iso	Isoform
Max	Maximum
Min	Minimum
MPP1	Membrane Palmitoylated Protein 1
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NA	Numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
NF2	Neurofibromatose Typ 2 Protein, Tumorsyndrom
<i>Nf2</i>	Neurofibromatose Typ 2 Gen
p	Signifikanzniveau
P0, P8,	Anzahl der Tage nach Geburt
PAK	p21 (RAC1) activated kinase
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	potentia Hydrogenii
PVDF Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran

Pz	Purkinjezelle
Rac(1)	Rac family small GTPase 1
Ras	resistance to audiogenic seizures
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction (Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion)
SE	Standardfehler
si RNA	Small interfering RNA (kleine eingreifende RNA)
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
UV-Licht	ultra violettes Licht
ZNS	Zentralnervensystem

2. Einleitung

2.1. Das Krankheitsbild Neurofibromatose Typ 2

Die Neurofibromatose Typ 2 (NF2) gehört mit einer Inzidenz von 1:25.000 zu den selteneren Krankheitsbildern. Laut dem Sachverständigenausschuss für seltene Erkrankungen der Europäischen Union (EUCERD) zählen Krankheiten, bei denen nicht mehr als 5 von 10.000 Menschen in der Europäischen Union betroffen sind, als selten. Wie 80 % der seltenen Erkrankungen gehört auch die Neurofibromatose Typ 2 zu den genetisch bedingten Krankheiten. NF2 ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, der eine Mutation des Gens Neurofibromatose Typ 2 (*NF2*) zugrunde liegt. Laut der Knudson-Hypothese bedarf es zum Ausbruch der Krankheit zweier Mutationsereignisse, die zur Inaktivierung des Gens führen. Im Falle der vererbten Form ist bereits Eines in der Keimbahnzelle inaktiviert und das Zweite geht im Verlauf des Lebens durch somatische Mutation verloren (Knudson, 1971). Es gibt jedoch auch Betroffene, bei denen eine Neumutation zum Funktionsverlust des ersten Gens führt. Bei einer weiteren Variante wird nur eines der *NF2* Allele geschädigt und die Funktion des zweiten Allels durch eine alternative Mutation oder ein alternatives Ereignis beeinträchtigt.

Basierend auf diesen genetischen Grundlagen wird die Neurofibromatose Typ 2 den hereditären Tumorsyndromen zugeordnet.

Das Auftreten von multiplen gutartigen Tumoren ist das vorherrschende Symptom einer NF2 Erkrankung. Da sich die Tumore sehr häufig im peripheren Nervensystem als Schwannome manifestieren und diese Schwannome im Vestibularorgan zur Kompression des Nervus vestibulocochlearis führen, leiden viele Patienten unter Hörverlust, Gleichgewichtsstörungen oder Tinnitus. Treten die gutartigen Tumore an anderer Stelle auf, kann es zu Sehinderung und Nervenausfällen in Form von Sprach- und Schluckstörungen oder Gangunsicherheiten kommen. Diese Symptome stellen nur einen kleinen Auszug aus einer Liste, der in der Datenbank OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, Phänotyp Nummer #101000) gesammelten Symptome dar. Neben diesen neurologischen Defiziten (Blakeley und Plotkin, 2016) wurden jedoch auch Symptome wie Polyneuropathie als Begleitsymptome diagnostiziert, die nicht durch

Tumorerkrankungen erklärt werden konnten, sondern in Abwesenheit von Tumoren auftraten (Petrilli und Fernández-Valle, 2016).

Betroffene berichten bereits in den ersten zwei Lebensjahrzehnten über erste Symptome, wie Ausfälle von Sensibilitäten und motorischen Defiziten, die sich bei fast 100 % der genetischen Merkmalsträger bis zum 60. Lebensjahr manifestieren.

Diagnostisch wegweisend finden sich neben der Genanalyse in der bildgebenden neurologischen Untersuchung mittels Magnetresonanztomographie die gutartigen Tumore in Form von beidseitigen vestibulären Schwannomen sowie Schwannome anderer Hirnnerven, peripherer Nerven und des Rückenmarks. Zudem konnten Meningeome, Ependymome, Gliome und Neurofibrome nachgewiesen werden (Evans, 2009). Okuläre Auffälligkeiten (Katarakt) und kutane Schwannome gelten als zusätzliche Diagnosekriterien nach Baser (Baser et al., 2011). Gerade ein früher Krankheitsbeginn und intrakranielle Meningeome gelten als Risikofaktoren für eine erhöhte Sterblichkeit vor dem 7. Lebensjahrzehnt (Asthagiri et al., 2009).

Therapeutisch ist es derzeit nicht möglich, die Ursache der NF2 zu beseitigen. Jedoch können die Symptome der Betroffenen reduziert werden, indem die Tumormasse, die die Nerven hauptsächlich im Kopf und am Rückenmark komprimiert, bestenfalls komplett entfernt wird (Evans, 2009). Gerade für die sehr häufig bilateral auftretenden Vestibularisschwannome, die für die meisten Patienten morbiditäts- und mortalitätsbestimmend sind (Blakeley und Plotkin, 2016), sollte jedoch individuell entschieden werden, wie lange ein konservatives Zuwarten möglich ist und wann eine Operationsindikation mit dem Risiko des Hörverlustes gerechtfertigt ist (Szudek et al., 2012). Als mögliche Alternative zu dieser Therapie wird die nicht invasive Radiochirurgie diskutiert, allerdings kontrovers, da nachfolgend maligne Entartungen beschrieben werden (Petrilli und Fernández-Valle, 2016; Vries et al., 2015).

Zusätzlich bieten neue pharmakologische Therapien erfolgreiche Behandlungsansätze. So konnten dank der Identifikation zellulärer Signalwege, die das NF2 Genprodukt Merlin vermittelt, eine Reihe von Wachstumsfaktorrezeptoren ermittelt werden, die mittlerweile als Angriffspunkte für eine medikamentöse Therapie dienen. Zu diesen Wachstumsfaktoren/-rezeptoren zählen der insulinartige Wachstumsfaktor 1 IGF1R (engl. Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor), der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (engl. Epidermal Growth Factor Receptor), der Blutplättchen-Wachstumsfaktor

PDGF (engl. Platelet Derived Growth Factor) oder der Gefäßwachstumsfaktor VEGF (engl. Vascular Endothelial Growth Factor). Als sehr erfolgreiches Beispiel soll hier Bevacizumab angeführt werden. Das Medikament bindet an den Gefäßwachstumsfaktor VEGF, wodurch die Bindung des VEGF an seinen Rezeptor verhindert und dadurch unter anderem die Bildung neuer Tumorgefäßsysteme und damit das Tumorwachstum gehemmt wird (Vries et al., 2015). In einer retrospektiven Studie konnte bei Patienten mit NF2 während der Einnahme von Bevacizumab eine Tumorverkleinerung und eine Hörverbesserung beobachtet werden (Plotkin et al., 2012). Durch den Transfer vom Wissen der Signalwege um Merlin konnte so eine erfolgreiche Therapie für Patienten etabliert werden.

Des Weiteren spielen inaktivierende Mutationen von *NF2* nicht nur bei der autosomal vererbten Neurofibromatose Typ 2 eine große Rolle. Sie konnten auch als biallelische somatische Mutationen in sporadisch auftretenden Vestibularisschwannomen nachgewiesen werden (Vries et al., 2015). Zudem findet man sie in malignen Tumoren wie in Mesotheliomen, Brustkrebs, Prostatakrebs, kolorektalen Karzinomen, hepatischen Karzinomen, klarzelligen Nierenkarzinomen sowie Melanomen (Petrilli und Fernández-Valle, 2016). Daraus lässt sich ableiten, dass das mutierte Tumorsuppressorgen *NF2* an der Tumorentstehung unterschiedlichster Gewebearten beteiligt ist.

Wie oben bereits angedeutet, spielt das NF2 Genprodukt Merlin an vielen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle. Es beeinflusst als Tumorsuppressor nicht nur die Proliferation, sondern inhibiert die Zelldifferenzierung und beeinflusst die Zellwanderung. Interessanterweise werden diese vielfältigen zellulären Prozesse durch nur wenige molekulare Mechanismen vermittelt.

2.2. Bekannte Zielgene und Interaktionspartner des Tumorsuppressors Merlin

Genetische Analysen des Erbguts von Familien mit Neurofibromatose Typ 2 ergaben eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *NF2* auf Chromosom 22q12. Die Abkürzung für das Genprodukt Merlin (engl. moesin-ezrin-radixin-like protein) weist auf die Ähnlichkeit zu der ERM Proteinfamilie, bestehend aus Ezrin, Radixin und Moesin, hin, die eine Interaktion zwischen Zellmembran und Zytoskelett herstellen (Trofatter, 1993; Asthagiri et al., 2009). Später konnte in der Maus eine dem menschlichen Gen homologe Gensequenz identifiziert werden, dessen Produkt mit 595 zu 587

Aminosäuren zu 98 % dem menschlichen Merlin Protein entspricht. Diese Daten basieren auf bioinformatischer Abschätzung der Intronsequenzen nach Gutmann (Claudio et al., 1994; Gutmann et al., 1995).

Neben der verkettenden Funktion zwischen Membranproteinen und kortikalem Zytoskelett wird Merlin auch ein Einfluss auf die Kontrolle der Verteilung von Membranrezeptoren zugeschrieben (McClatchey und Fehon, 2009). Eine Akkumulation von Signalübertragungen auf einen definierten Ort sind aber Voraussetzung für eine koordinierte Zellreaktion und insofern für Prozesse wie Zelladhäsion wichtig. Zusätzlich spielt Merlin durch die Regulation des Aktin und Mikrotubuli Zytoskeletts eine Rolle in der Proliferation, Migration und Mitose, sowie in der Morphologie und beim Wachstum der Zellen (Petrilli und Fernández-Valle, 2016; Asthagiri et al., 2009). Der Verlust von Merlin führt zu einer fortwährenden Aktivierung der Rac1/Cdc42/PAK Signalkaskade, die mit Zellwachstum und Deregulation des Aktinzytoskeletts in Verbindung gebracht wird (Petrilli und Fernández-Valle, 2016).

Zudem ist Merlin an der Tumorgenese beteiligt über Zell-Zell-Kontakte, im Zellkern über wachstumsunterdrückende Programme sowie über die Mitose (Li et al., 2012). Als wichtiger Signalweg wird hier die Interaktion von Merlin mit dem Hippo-Signalweg diskutiert (Reginensi et al., 2016).

2.3. Funktion des Tumorsuppressorgens Merlin im zentralen Nervensystem

Die Idee, dass Merlin für die Entwicklung des Zentralnervensystems wichtig ist, basiert auf Expressionsanalysen, aber auch auf ersten funktionellen Studien.

Bereits zu Beginn der Neurogenese lässt sich ein sprunghafter Anstieg der Expressionsrate von Merlin in embryonalem Gewebe feststellen. In der weiteren Entwicklung des neuronalen Gewebes bis hin zu voll ausdifferenziertem Gewebe nimmt diese stetig zu. Damit ist eine erste Korrelation zwischen der Expression und definierten Entwicklungsvorgängen hergestellt und der Einfluss auf Morphogenese und Organogenese in Mäusen unterstrichen (Grönholm et al., 2005). Western Blot Analysen von adultem menschlichem Gewebe zeigen eine Genaktivität von Merlin in Hirnstamm, Diencephalon, Basalganglien, Corpus Callosum, Hypophyse und Cerebellum sowie eine schwache Aktivität in Lobus temporalis, Globus pallidus und Hippocampus (Grönholm et al., 2005). Auch den Bakker et al. konnten 1999 eine starke Expression im Kleinhirn,

vornehmlich an den Purkinjezellen, nachweisen, wohingegen in Interneuronen des Kleinhirns keine Genaktivität beobachtet werden konnte (den Bakker et al., 1999). Auch in Ratte und Maus lässt sich Merlin im Kleinhirn nachweisen (Grönholm et al., 2005). Gutmann et al. konnten die Merlin Expression anhand von mRNA Hybridisierung in Purkinjezellen und Körnerzellen der adulten Rattenkleinhirne bestätigen, wie auch die Nicht-Expression in Zellen der Molekularschicht (Gutmann et al., 1995). Bei drei Tage alten Mäusen konnten Schulz et al. auch in der weißen Substanz des Kleinhirns, neben der externen und internen Körnerzellschicht, ein Vorkommen von Merlin detektieren (Schulz et al., 2010).

Im Verlauf der Entwicklung des Kleinhirns findet man große Mengen an Merlin in neugeborenen Mäusen bis zum 9. Tag nach Geburt, die anschließend auf die Hälfte abfällt (Schulz et al., 2010). Speziell in Purkinjezellen lassen sich mit einem Merlin-spezifischen Antikörper das Soma und die Dendriten in 5 und 9 Tage alten Mäusen immunhistochemisch deutlich anfärben, die Axone treten schwächer hervor (Schulz et al., 2010). Ab P15 (15. Tag nach Geburt) konnte vom angefärbten Soma und den Dendriten nur noch ein diffuses Signal detektiert werden. Demgegenüber reagierten die Fasertrakte innerhalb der Körnerzellschicht und der weißen Substanz, die am ehesten Purkinjezellaxonen entsprachen, positiv (Schulz et al., 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression von Merlin im Kleinhirn bis zum 9. Tag nach Geburt stetig zunimmt und sich in dieser Zeit im Soma, sowie den Dendriten der Purkinjezellen und anschließend in den Axonen lokalisieren lässt. Die Merlin-Expression korreliert somit negativ mit dem Dendritenwachstum.

Diese negative Korrelation zwischen der Dendritogenese der Purkinjezellen und der Expression von Merlin zeigte sich auch in L7En-2 Tieren, in denen eine erhöhte Expression von Merlin nachgewiesen werden konnte, gleichzeitig aber eine charakteristische Verzögerung der Purkinjezellentwicklung auftrat (Schulz et al., 2010; Jankowski et al., 2004).

Diese korrelativen Ansätze konnten in weiteren Untersuchungen und Zellkulturen untermauert werden. So wurde bei dissoziierten zerebellaren Zellen durch eine Überexpression von Merlin eine signifikante Reduktion der Anzahl von Neuriten pro Zelle, sowie eine Verkürzung der Länge der Neuriten hervorgerufen. Im Gegensatz dazu

wurde die Merlin Expression mittels Transfektion von *Nf2* spezifischer siRNA blockiert, wodurch es zum Anstieg der Anzahl der Neuriten pro Zelle kam und zudem längere Neuriten gemessen werden konnten (Schulz et al., 2010).

Auch transfizierte P19 Zellen unterliegen dem gleichen Wachstumsmuster (Schulz et al., 2010). Ein möglicher Signalweg stellt sich hierbei über die Inhibierung der Aktivität von Rac, einer kleinen GTPase, durch den Phosphorylierungsstatus Merlins dar (Schulz et al., 2010).

Als weiteres, sehr interessantes Molekül, steht Paxillin im Zusammenhang mit dem Fortsatzwachstum von Nervenzellen. Dabei kontrolliert Merlin die Neuritenformation durch die Verbindung von Paxillin zum Aktinzytoskeltett, die bei Mutation von Merlin das Neuritenwachstum inhibiert. Ähnliches gilt für β II-Spectrin, einem Protein des Zytoskeletts (Yamauchi et al., 2008).

Um den Effekt von Merlin auf die Fortsatzentwicklung in der Dendritogenese genauer *in vivo* untersuchen zu können, eignen sich Purkinjezellen aufgrund ihres charakteristischen Dendritenbaumes sehr gut als Modell. Hinzukommend lässt sich ihre Entwicklung im Tiermodell sehr gut verfolgen, da sie primär postnatal stattfindet (Schulz et al., 2010; Hendelman und Aggerwal, 1980; Kapfhammer, 2004). Deswegen soll im folgenden Kapitel die Purkinjezellreifung im Detail beschrieben werden, bevor ich auf die Einführung der hier verwendeten transgenen Tiermodelle eingehe.

2.4. Purkinjezellen im Kleinhirnzellverband

2.4.1. Verschaltung der Purkinjezellen im Kleinhirn

Purkinjezellen stellen nicht nur die imposantesten Neurone des Kleinhirnkortexes dar, sondern sind auch funktionell zentrale Verschaltstationen für alle ein- und ausgehenden Signale im Kleinhirn.

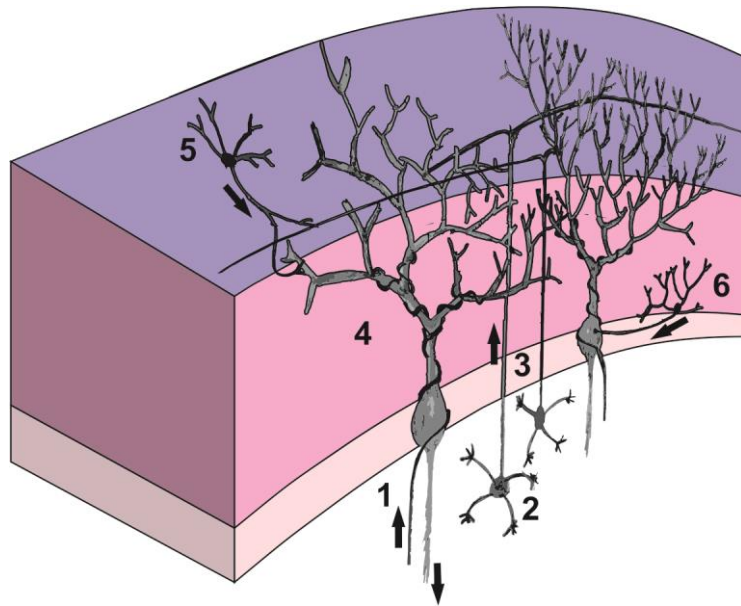


Abb. 1: Schematische Darstellung der Purkinjezellverschaltung im Kleinhirnkortex. Mit Pfeilen markiert ist die Richtung der Signalweiterleitung entlang der entsprechenden Axone.

Externe Signale erreichen die Purkinjezellen (4) über die Kletterfasern (1), die Parallelfasern (3) der Körnerzellen (2), über die Sternzellen (5) und Korbzellen (6) (Orientiert an Nature Reviews Neurosciences Online; [http://neurons.co.uk/Neurosciences/Tutorials/M7/M.7.1.c Cerebellar Cortex.html](http://neurons.co.uk/Neurosciences/Tutorials/M7/M.7.1.c%20Cerebellar%20Cortex.html)).

Externe Signale erreichen die Purkinjezellen im Kleinhirn über eine Vielzahl von Synapsen. Die Kletterfasern entspringen dem unteren Olivenkomplex und enden direkt an den Purkinjezellen. Wie bereits aus der Nomenklatur hervorgeht, klettern die Fasern zirkulär um den Purkinjezellkörper bis zu den proximalen Dendriten (Abb. 1, Nummer 1). Im adulten Tier erfolgt die Innervation, im Gegensatz zu der postnatalen Reifungsphase, nur noch über eine Kletterfaser pro Zelle. Dahingegen erfolgt die Erregung der Moosfasern auf die Purkinjezelle über zwischengeschaltete Körnerzellen (Abb. 1, Nummer 2). Diese leiten das Signal dann über deren Axone auf rund 100.000 Synapsen des Dendritenbaumes weiter (Abb. 1, Nummer 3) (Sotelo, 2004). Aufgrund ihres charakteristischen Verlaufes werden sie als Parallelfasern bezeichnet. Eine weitere Besonderheit ist die senkrechte Ausrichtung der Aufgabelung der Parallelfasern zum Dendritenbaum der Purkinjezelle. Um diese Lagebeziehung zu verstehen, ist es wichtig zu wissen, dass der ausladende und komplexe Dendritenbaum der Purkinjezellen (Abb. 1, Nummer 4) sich primär in einer Ebene ausbildet. Außerdem sind die

Purkinjezellen in der sagittalen Schnittebene wie Spalier nebeneinander ausgerichtet. Die Parallelfasern verlaufen senkrecht zur Sagittalebene.

Inhibitorische Afferenzen empfangen die Purkinjezellen, als zentrale Schaltstellen des Kleinhirns, von Interneuronen, wie den Stern- (5) und Korbzellen (6), deren Dendriten und Axone sich in alle Ebenen ausbreiten.

Die Purkinjezellen integrieren alle Informationen und leiten sie dann gebündelt und verarbeitet an die tiefen Kleinhirnkerne weiter. Sie stellen damit die einzigen Efferenzen des Kleinhirnkortexes dar.

Durch die Lagebeziehung der kortikalen Kleinhirnneurone zueinander entstehen die charakteristischen drei Schichten des Kleinhirns. Diese Schichten entstehen durch lokale Zellproliferation und Zellmigration während der Entwicklung des Kleinhirns. In den ersten Lebenstagen begrenzt die externe Körnerzellschicht das Kleinhirn in Richtung Pia mater. Es folgt darunter die Molekularschicht mit den Dendritenbäumen der Purkinjezellen, die wiederum superfizial der Purkinjezellsomata, der Purkinjezellschicht, liegt. Bis zur terminalen cerebellären Zellschichtung im Erwachsenenalter migrieren die Körnerzellen zur Gänze aus der Molekularschicht unter die Zellkörper der Purkinjezellen. Somit schließt sich dann im adulten Tier der Pia mater nachfolgend die Molekularschicht, dann die Purkinjezellschicht, die innere Körnerzellschicht und letztlich das Kleinhirnmantel an (Leto et al., 2016).

Betrachtet man makroskopisch das Kleinhirn, dann untergliedert es sich in zwei Hemisphären und den in der Mitte liegenden Kleinhirnwurm. Außerdem wird seine Oberfläche durch oberflächliche Furchen (Fissurae), Lappen (Lobi) und Läppchen (Lobuli) deutlich vergrößert. In einem Mediosagittalschnitt erscheint es daher wie ein Baum (Abb. 2 A) (Larsell, 1952).

Diesen Lobuli werden nach der Einteilung von Larsell spezifische Nummern zugewiesen (Abb. 2 A und B). Von besonderer Bedeutung für die genauere morphologische Analyse der Purkinjezellen in dieser Arbeit ist der anteriore Lobus mit seinen Lobuli I-IV. Die Auswahl des Lobus basiert darauf, dass man bei den Zellen dieser Lobuli von einer vergleichbaren Morphologie der Purkinjezellen und insbesondere deren Dendritenbäumen ausgehen kann. Am Apex der Lobuli, sowie in der Tiefe der Fissur,

sind die Zellen aufgrund unterschiedlicher Dichte und unterschiedlicher morphologischer Ausprägung nicht mehr vergleichbar (Cerinara et al., 2015).

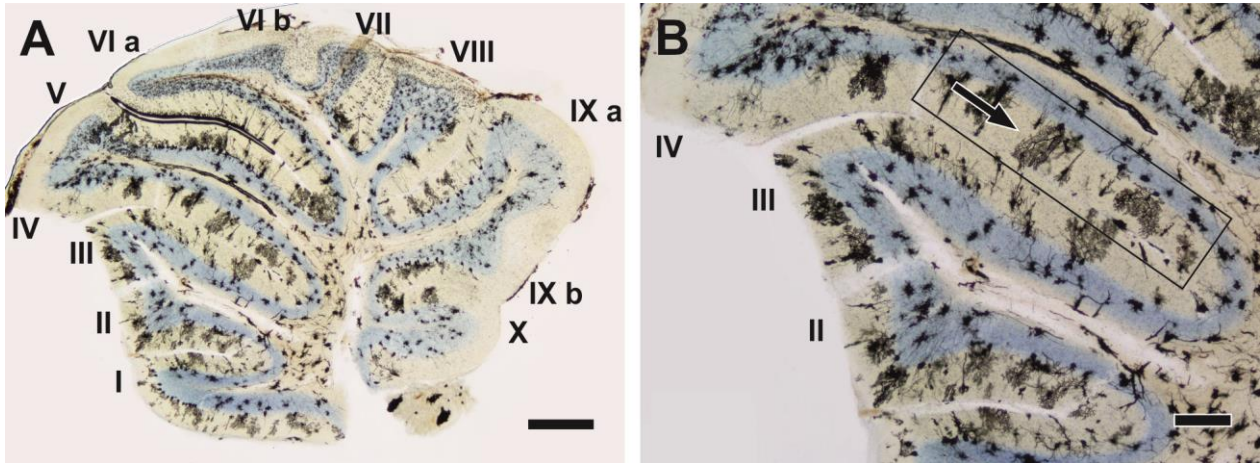


Abb. 2: Übersichtsaufnahme eines sagittalen Kleinhirnschnittes einer adulten Maus mit Golgi- und Nissl-gefärbt. **A**, sagittaler Schnitt aus der Mitte der vermalen Region mit der Zuordnung der Lobuli nach Larsell, **B**, vergrößerter anteriorer Lobus mit Lobuli II, III, IV, mit Pfeil ist eine Purkinjezelle in der Fissur des Lobulus 4 gekennzeichnet (Markierung Rechteck) (Maßstab bei A 500 µm, bei B 200 µm).

2.4.2. Morphologische Entwicklung des Dendritenbaumes

Die Purkinjezellentwicklung der Maus lässt sich grob in zwei Abschnitte gliedern. Die erste Phase begrenzt sich auf die erste postnatale Woche, in der sich die Morphologie der Zelle mehrfach stark verändert. Man geht davon aus, dass intrinsische Faktoren dabei maßgeblich sind. In der zweiten Phase findet die Hauptdifferenzierung des Dendritenbaumes statt, die zum einen intrinsisch gesteuert wird und zum anderen von afferenten Fasertrakten, hauptsächlich den Parallelfasern, anhängig ist (Sotelo und Dusart, 2009; Dusart und Flamant, 2012).

Diese Entwicklungsschritte sind in zahlreichen Übersichtsarbeiten des letzten Jahrhunderts bildlich mittels Golgi-gefärbten Zellen von Mäusen und Ratten beschrieben worden (Larsell, 1952; Hendelman und Aggerwal, 1980, Addison, 1911).

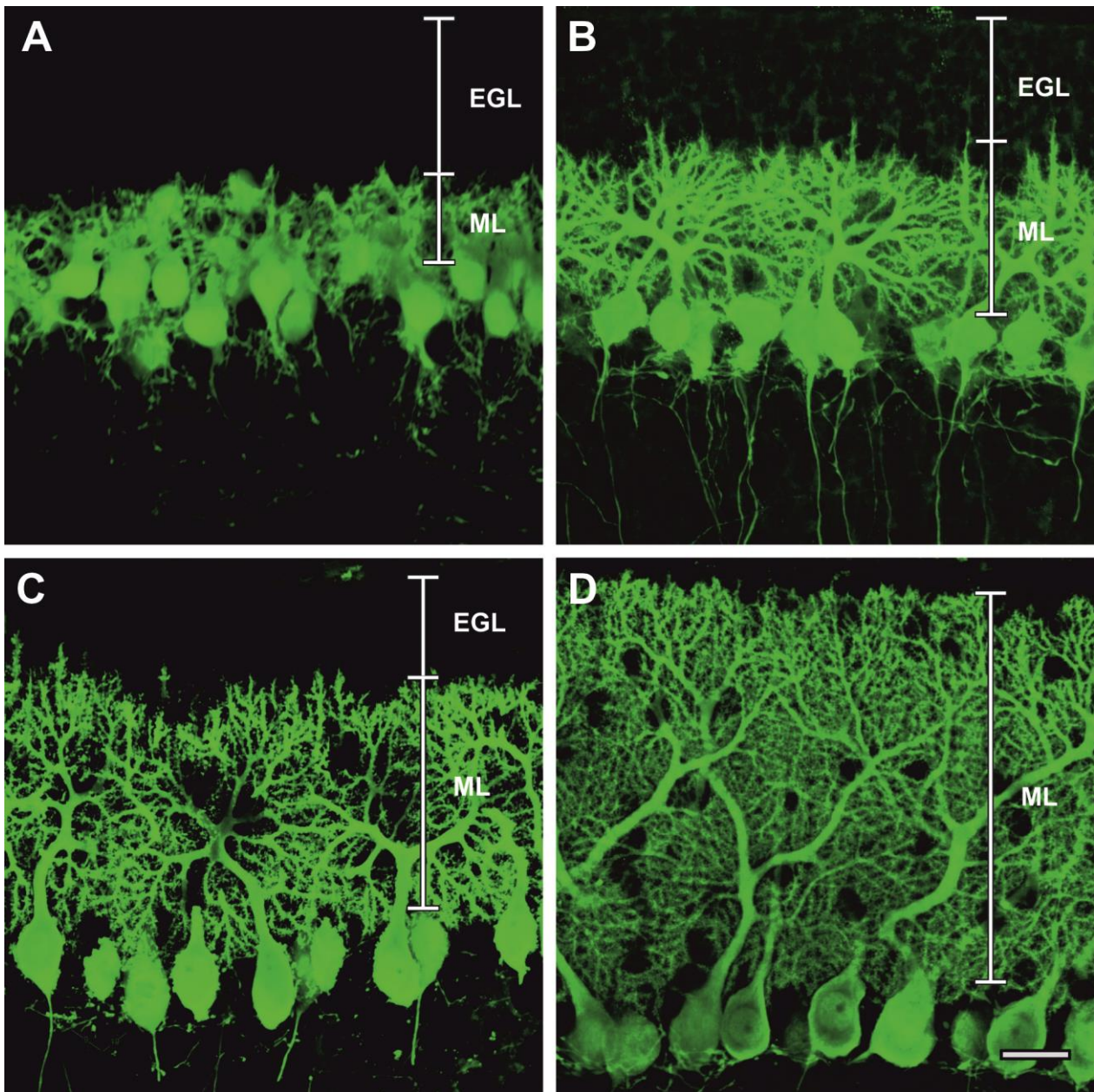


Abb. 3: Postnatale Entwicklung von Purkinjezellen in der Wildtypmaus. Der apikale Dendritenbaum ist zur Pia mater hin ausgerichtet, die Somata zur weißen Substanz hin. Abgebildet sind Summationsbilder von Calbindin gefärbten Kleinhirnschnitten verschiedener Alterstufen. **A**, P3, **B**, P7, **C**, P9, **D**, P15 (EGL = Externe Körnerzellschicht; ML = Molekularschicht) (Maßstab 25 µm).

Der Hauptfokus der folgenden Beschreibung liegt auf der Ausdifferenzierung des sehr komplexen Dendritenbaumes der späteren Entwicklungsstadien, da diese die Grundlage zum Verständnis der hier untersuchten transgenen *Nf2 Iso1* Knockout- und Wildtypiere bilden (Abb. 3).

2.4.3. Entwicklungsstadien nach Hendelmann und Aggerwal (1980)

Als Grundlage der Beschreibung der Entwicklungsstadien soll die Stadieneinteilung nach Hendelmann und Aggerwal dienen, da sie als eine der wenigen auf der Zellentwicklung von Mäusen basiert.

Im Stadium 1, direkt nach der Geburt (P0-P3), werden die Zellen der Mäuse als unreif beschrieben (Hendelman und Aggerwal, 1980). Dies bedeutet, dass die Purkinjezellen ihre Migration in Richtung Cortex des Kleinhirns beendet haben, aber noch in 3-5 Zellschichten angeordnet sind (Abb. 3 A) (Altman, 1972). Bereits zu diesem Zeitpunkt haben sie einige Fortsätze, die sich jedoch zum Teil im Laufe der Entwicklung wieder zurückbilden.

Innerhalb der ersten Lebensstage (P4-P6), im Stadium 2, bilden sie zahlreiche lange Ausläufer rund um ihren Zellkörper aus, die zur fälschlichen, rein morphologischen Beschreibung als Sternzellen führten. Zudem beginnen sie sich mehr und mehr in einer kortikalen Einzelzellschicht anzuordnen. Später, im adulten Stadium, werden alle Zellkörper direkt nebeneinander zu liegen kommen (Addison, 1911; Altman, 1972).

Im Stadium 3 (P7-P10) wandert der Zellkern der Purkinjezellen in Richtung des basalen Zellpols. Nachdem sich die meisten Ausläufer zurückgebildet haben, verbleiben noch ein bis drei dickere Primäräste am apikalen Pol. Durch aufwärtsgerichtetes Auswachsen dieses apikalen Zellpols bildet sich ein Stammdendrit aus (Sotelo und Dusart, 2009; Altman, 1972). Am oberen Ende des Stammdendriten lässt sich dabei eine dickere Ansammlung von Protoplasma erkennen (Abb. 3 B). Schon Addison beschrieb dieses Vorkommen als Wachstumskegel (Addison, 1911).

Er konnte zudem bei Ratten beobachten, dass der Zellkörper bis zum 10. Tag nach Geburt stetig an Größe zunimmt. Der Zellkern wandert dabei in Richtung des basalen Zellpols. Zudem nimmt das Zytoplasmavolumen zu. Somit bekommt das Soma im Verlauf der Entwicklung erst eine konische, bei manchen Zellen auch eine eher rundliche Form (Addison, 1911). Gleiche Beobachtungen machte Altman, der das Soma der adulten Tiere als birnenförmigen Körper beschreibt (Altman, 1972).

Obwohl der Zellkörper im Stadium 3 in der Golgi-Färbung glatt begrenzt erscheint, befinden sich auf seiner Oberfläche viele dünne und kurze Pseudopodien, die sich elektronenmikroskopisch darstellen lassen. Sie stellen die postsynaptischen Einheiten

der Kletterfasern dar (Hendelman und Aggerwal, 1980; Altman, 1972; Kapfhammer, 2004).

Im Stadium 4 entstehen am Ende des Stammdendriten Dendritenäste, die sich mehrfach verzweigen. Dadurch wird der Baum komplexer und größer, die Molekularschicht wird dicker (Hendelman und Aggerwal, 1980). Im weiteren Verlauf manifestieren sich, meist auch optisch durch die verschiedenen Dendritendurchmesser erkennbar, zwei tragende Hauptäste ausgehend vom Stammdendriten, die dem Baum sein geweihartiges Aussehen verleihen (Addison, 1911). Durch immer feinere Verästelungen wird die Baumkrone zunehmend komplexer und noch dichter (Abb. 3 C).

In den ersten Tagen nach der Geburt beschreiben Berry und Bradley noch ein Längenwachstum der einzelnen Hauptdendritenäste, die später konstant bleiben. Der Baum expandiert durch Verlängerung und vor allem durch Aufzweigung seiner distalen Enden weiter. Dieses Muster korreliert auch mit der Verteilung der präsynaptischen Eingangssignale. Die proximalen stammnahen Dendritenäste werden von Kletterfasern erreicht und bleiben als Stützgerüst konstant erhalten. An den distalen Ästen, deren Anzahl stetig zunimmt, werden Parallelfaserkontakte gebildet (Berry und Bradley, 1976).

In Ratten ändert sich die Wachstumsebene des Dendritenbaumes zwischen P15 und P30 von der transversalen in die vertikale Ebene und lässt den Baum merklich in die Höhe wachsen (Berry und Bradley, 1976). Bei Mäusen geschieht dies bereits zwischen P10 und P15, wobei an P13 schon die volle Breite erreicht wird (Sotelo und Dusart, 2009). Die maximale Länge findet sich ab Tag 20 (Weiss, Gary, M. und Pysh, 1978). Dennoch wird der Baum noch durch immer feinere Verästelungen dichter. Durch Addition aller Astlängen konnte gezeigt werden, dass das Wachstum des Dendritenbaumes ab P50 in der Ratte endet (Berry und Bradley, 1976).

Als markantes Charakteristikum wird in Stadium 5 (ab P15) das wieder komplett glatt erscheinende Soma angegeben. Außerdem sind zu dieser Zeit nun auch die Zellen der äußeren Körnerzellschicht vollständig in die innere migriert, sodass die Endäste der Dendriten die äußere Membran erreichen (Abb. 3 D) (Addison, 1911). Diese peripheren letzten Äste sind sehr dicht mit Dornfortsätzen besetzt (Hendelman und Aggerwal, 1980).

2.5. Dornfortsätze der Purkinjezellen

Dornfortsätze sind kleine Protrusionen an Dendriten, auf denen meist exzitatorische synaptische Eingänge verschaltet sind. Es gilt, zwei unterschiedliche Arten von Dornfortsätzen zu unterscheiden. An den distalen Dendritenästen finden sich lange, schlanke Dornfortsätze mit verlängertem Kopf, deren präsynaptische Partner die Axonterminale der Parallelfasern sind. Im Gegensatz dazu finden sich an den proximalen Teilen des Baumes, also dem Stamm und den abgehenden Hauptästen, in der Anzahl geringere, in Trauben vorkommende, kürzere Dornfortsätze mit runderen Köpfen. Diese kürzeren Fortsätze stellen die synaptische Verbindung mit den Kletterfasern her und können aufgrund ihrer Größe kaum unter dem Lichtmikroskop dargestellt werden (Sotelo und Dusart, 2009). Des Weiteren finden sich lange, ganz dünne Fortsätze ohne erkennbare Kopfregion, die für Vorläufer von Dornfortsätzen gehalten und als Filopodien bezeichnet werden.

2.6. Mausmutanten mit einer Defizienz in der Isoform 1 des *Nf2* Gens (*Nf2 Iso1* Mäuse)

Basierend auf der zeitlichen und räumlichen Expression von NF2 Protein im Kleinhirn der Maus, war das Ziel dieser Arbeit, einen ersten Anhaltspunkt über potentielle Funktionen von NF2 im Zentralnervensystem in vivo zu erhalten. Dazu eignen sich grundsätzlich Mäuse mit einem gezielten genetischen Defekt im *Nf2* Gen. *Nf2* Knockoutmäuse sterben allerdings bereits während der embryonalen Entwicklung, so dass bereits früh auf Alternativen ausgewichen wurde. Eine dieser Alternativen sind Isoform-spezifische-Knockoutmodelle. Sie haben den Vorteil, dass sie lebensfähig sind und ein Effekt auf distinkte Isoformen reduziert werden kann. Der offensichtliche Nachteil ist, dass kompensatorische Effekte einen Defizienzeffekt überdecken können (McClatchey et al., 1997). Tatsächlich wurde gezeigt, dass in den *Nf2 Iso1* Mäusen temporär in der ersten Postnatalwoche die Isoform 2 hochreguliert war. Dennoch sind diese isoformspezifischen Mausmodelle ein akzeptiertes erstes Modellsystem (Schulz et al., 2013).

Insgesamt existieren 10 verschiedene Isoformen des menschlichen *NF2* Gens. Die beiden bekanntesten Hauptisoformen 1 und 2 der 17 Exonen langen Gensequenz von *Nf2* unterscheiden sich lediglich durch das Vorkommen des Exons 16. Die von Zoch et

al. übernommene Abbildung 4 soll den jeweiligen Aufbau und Unterschied der beiden *Nf2* Isoformen 1 und 2 verdeutlichen.

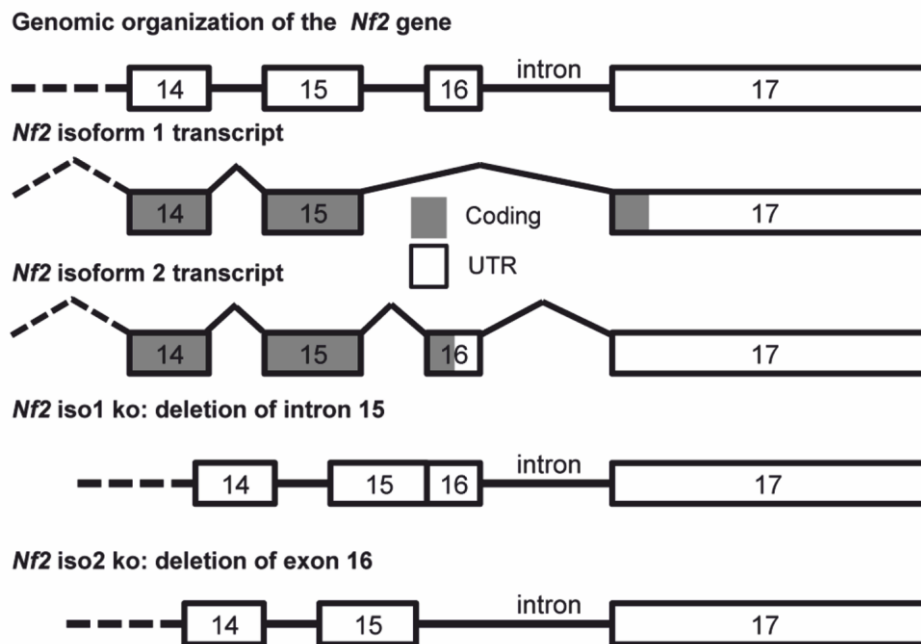


Abb. 4: Aufbau des Gens der *Nf2* *Iso1* und *Nf2* *Iso2* Knockoutmäuse (Abbildung aus Zoch et al., 2015) übernommen.

Beide Isoformen unterscheiden sich letztendlich durch die Existenz bzw. das Fehlen des Exons 16. Dank RT-PCR Analyse lassen sich Isoform 1 und Isoform 2 mit dem gleichen Primerpaar durch Amplifikation der Exone 12 bis 17 genetisch unterscheiden. Im Gegensatz zur Isoform 1 exprimiert die Isoform 2 das Exon 16 inklusive eines Stop Codons, wodurch das PCR Produkt nachweislich länger ist (Schulz et al., 2010).

Beim Menschen führen auf Proteinebene bei der Isoform 2 durch Ablesen des Exon 16 weitere 45 Nukleotide zu einem verkürzten Protein, da im Vergleich zur Isoform 1 fünf Aminosäuren weniger gebildet werden. Die Isoform 1 präsentiert sich hingegen durch ein längeres Protein mit helikalem hydrophilem Carboxylende. Somit ergibt sich für die Isoform 2 ein Protein mit 590 Aminosäuren, im Gegensatz zur Isoform 1 mit 5 zusätzlichen Aminosäuren (Gutmann et al., 1995).

Um die Funktion der jeweiligen Isoform näher untersuchen zu können, wurde von M. Niwa-Kawakita und Dr. Marco Giovannini eine jeweils isoformspezifische Knockoutmaus generiert. Durch alternatives Splicen des *NF2* Exons 16 exprimieren die Tiere jeweils nur eine der beiden Isoformen, so dass dadurch ein Knockout der jeweils anderen Isoform entsteht (Zoch et al., 2015). Der Knockout der Isoform 2 wird demnach über die Entfernung des Exon 16 erreicht. Bei der Merlin Isoform 1 Knockoutmaus kann hingegen durch die Fusion von Exon 15 und 16, sowie durch Fehlen des Introns 15, das Exon 16 abgelesen werden.

Allgemeine Untersuchungen der Knockouttiere beider Isoformen zeigten eine normale Entwicklung ohne Wachstums- oder Gewichtsveränderungen sowie keine erhöhte Letalität. Zudem konnten keine Tumorformationen in den Hauptorganen nachgewiesen werden (Zoch et al., 2015). Bisher wurde angenommen, dass hauptsächlich die Isoform 1 tumorsupprimierende Funktion besitzt (Asthagiri et al., 2009; Sherman et al., 1997), was jedoch durch Zoch et al. widerlegt werden konnte und somit beiden Isoformen diese Eigenschaft zugeschrieben wird (Zoch et al., 2015).

Entsprechend wurde für Isoform 1 und 2 ein Einfluss auf das Fortsatzlängen- und dickenwachstum von Neuriten nachgewiesen (Schulz et al., 2010, Schulz et al., 2013). Hierbei scheint es insofern Unterschiede zu geben als die Isoform 1 eher das Längen- und die Isoform 2 spezifischer das Dickenwachstum reguliert. Da im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit der Einfluss von *Nf2* auf die neuronale Differenzierung im Fokus stand, wurde hier die morphologische Charakterisierung des Kleinhirns in der *Nf2* Isoform 1 defizienten Maus analysiert. In einem parallel durchgeführten Projekt wurde die Isoform 2 Mutante und zwei konditionelle Mausmutanten mit einer zelltypspezifischen Deletion im *Nf2*-Gen untersucht.

2.7. Fragestellung

Obwohl *Nf2* und sein Genprodukt, das Merlin-Protein, im Zentralnervensystem exprimiert wird und sich gerade in Neuronen eine deutliche Korrelation der Expression mit der Reifung von Nervenzellen darlegen lässt, gibt es bis dato keine experimentellen Befunde, die eine Funktion von Merlin im ZNS in vivo nachweisen. Da die Reifung von cerebellären Purkinjezellen sehr genau beschrieben ist, eignet sich diese Zelle im Besonderen, Änderungen in der Morphologie während der Entwicklung anhand eines genetischen Modellsystems zu untersuchen.

Daher soll im Rahmen dieser Arbeit geprüft werden, ob *Nf2* Isoform 1 spezifische Knockoutmäuse Änderungen in der Dendritenmorphologie cerebellärer Purkinjezellen zeigen.

3. Material und Methoden

3.1. Geräte und Chemikalien

3.1.1. Geräte

Die folgenden Listen enthalten alle im Institut für Anatomie und Zellbiologie Bonn verwendeten Geräte und Materialien, die im nachfolgenden Text nicht ausführlich beschrieben werden.

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Modell, Hersteller/Vertrieb
Cryostat	HM 560, Microm, Thermo Fisher Scientific™ Inc., Walldorf
Einbettautomat	Tissue-Tek VIP 3000, Vogel, Giessen
Geldokumentation	Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelkammern Gelelektrophorese	SubCell Model 96, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Homogenisator	Polytron® PT 1200E, Kinematica AG, Littau-Luzerne, CH
Objektträger	1) Histobond® Adhäsions-Objektträger Marienfeld, Lauda-Königshofen 2) SuperFrost® Plus Objektträger Menzelgläser, Braunschweig
Perfusionspumpe	TL 230V/50HZ, Meredos GmbH, Bovenden
pH-Meter	350 pH/Temp/mV Meter, Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Qubit 2.0 Fluorometer	Molecular Probes, invitrogen, Paisley, UK
Schlittenmikrotom	Rotationsmikrotom HM 355 mit Schnitttransfersystem STS Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf

Stereolupe	Stemi 1000, Zeiss, Oberkochen
Netzteil	Electrophoresis Power Supply EPS 3501XL, GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK
Thermocycler	GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer, Althegnenberg
Thermocycler	C1000 Touch™, Thermal Cycler, Bio Rad München
Echtzeit-Thermocycler	CFX96™ Real-Time System, Bio Rad, München
Thermomixer	Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Tissue Chopper	Mcllwain Tissue Chopper, FMI GmbH, Egelsbach
Vibratom	VT1000S, Leica Biosystem, Nussloch
Vortex-Schüttler	Reagenzglasschüttler 444-137, VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Waage	LabStyle 303, Mettler Toledo, Gießen
Zellkultureinsatz	Millicell, Merck Millipore, Darmstadt
Zentrifuge	Heraeus PICO17 Centrifuge, Thermo Scientific, Hanau

3.1.2. Chemikalien

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.

A 40 % (w/v) Acrylamid Bis-Acrylamid:	AccuGel 29:1 (National Diagnostics)	
Agarose	Seakem® LE Agarose Biozym, Hessisch Oldendorf, FMC	
AMPUWA-Wasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg	
Chloroform	Merck KGaA , Deutschland	
100 x CaCl ₂ -MgCl ₂ Stocklösung	Substanzen	Pro 100 µl
	MgCl ₂ * 6 H ₂ O	1,0 g
	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	1,5 g

	dd H ₂ O	Ergänzen auf 100 µl
Depex	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	
DMSO	Dimethylsulfoxid, Sigma, Saint Louis, USA	
dNTP	Thermo Scientific, USA	
Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/ml)	Sigma, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze	
Protein-Extraktionspuffer	4 x Tris/ 0,1 % SDS 10 % Sucrose Protease Inhibitor Pefabloc 1:1000	
Gelatine	Gelatin from porcine skin, Type A, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	
Modifizierte Hank`s Lösung pH 7,2, steril filtriert	Substanzen	Pro Liter
	137 mM NaCl	8 g
	5 mM KCl	0,373 g
	0,7 mM Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	0,125 g
	5 mM Glukose * H ₂ O	1,0 g
	2,5 mM CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,368 g
	1,2 mM MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,317 g
	4,17 mM NaHCO ₃	0,35 g
Isopropanol	Carl Roth GmbH , Karlsruhe	
Kresylviolett	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	
100 bp DNA Leiter (0,5 µg/µl)	NEB, New England Biolabs, USA	
1 Kilobase (kB) DNA-Leiter (0,5 µg/µl)	NEB, New England Biolabs, USA	
Ladepuffer 6 x	Fermentas, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	
NaCl-Lösung, 0,9 %	Diaco Biofarmaceutici, It	
Neurobasal™-A Medium	Thermo Fisher, Scientific™ Inc., Dreieich	
Neurobasalmedium	Neurobasal™-A Medium	50 ml
	200 mM Glutamax	0,5 ml
	B27- supplement	1 ml

10 x PBS	Substanzen	Pro Liter
	1500 mM NaCl	87,7 g
	97,2 mM Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	13,8 g
	dd H ₂ O	Ergänzen auf 1 l
	pH 7,4 durch HCl	
PBS ⁺	1 x PBS mit 10 ml 100 x CaCl ₂ -MgCl ₂ - Stocklösung	
Proteinase K	Carl Roth GmbH , Karlsruhe	
Puffer, Dream Taq	Thermo Scientific, USA	
10 x SDS Elektrophorese-Puffer	250 mM Tris 192 mM Glycin 1,0 % (w/v) SDS	
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, pH 6,8 0,4 % SDS	
6 x SDS Probenpuffer	120 mM Tris / HCl pH 6,8 24 % (w/v) Glycerin 2,4 % (w/v) SDS 10 % 0,0012 % (w/v) Bromphenolblau 2 % 6 % (v/v) β-Mercaptoethanol	
20 x SSC	Substanzen	Pro Liter
	NaCl 3 M	175,3 g
	Na-Citrate 0,3 M	88,2 g
	Mit HCl auf pH 7,0	
	dd H ₂ O	Ergänzen auf 1 l
10 x TBS	50 mM Tris 150 mM NaCl, pH 7,5	
Taq-DNA-Polymerase	DreamTaq DNA Polymerase, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	
TBE-Puffer	89 mM Tris	

	89 mM Borsäure 2 mM EDTA pH-Wert 8
TBST	1 x TBS mit Zusatz von 0,054 % Tween20
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, pH 8,8 0,4 % SDS
TritonX-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert gekennzeichnet, von den Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Seelze), Serva (Heidelberg) oder Roche (Heidelberg) bezogen.

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

Antikörper	Spezies	Bezugsquelle
Anti-Calbindin-D-28K	Kaninchen	Swant, Marly 1, CH
Anti-Calbindin-D-28K	Maus	Sigma-Aldrich, St.Luis, USA
Anti-Synaptobrevin2/ VAMP2	Maus	Synaptic System, Göttingen
Anti-Maus, Alexa Fluor 546	Ziege	Invitrogen, Darmstadt
Anti-Kaninchen, Alexa Fluor 488	Ziege	Invitrogen, Darmstadt
Ziege anti-Kaninchen IgG- HRP	Ziege	DAKO, Hamburg

3.2. Versuchstierhaltung

Die experimentelle Auswertung basiert auf Kleinhirngewebe von *Nf2 Iso1* Mutationsmäusen, die von Riken BioResource bezogen wurden und dankenswerter Weise von Dr. Helen Morrison, Jena, im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Baader, Bonn, zur Verfügung gestellt wurden.

In den folgenden Analysen werden homozygote Knockouttiere *Nf2 Iso1^{-/-}* den jeweiligen homozygoten Wildtyptieren *Nf2 Iso1^{+/+}* gegenübergestellt. Beide Tierlinien basieren auf einem C57BL/6J Hintergrund (Janvier, Paris, Frankreich).

Die Versuchstierhaltung erfolgte auf Grundlage des zum Zeitpunkt der Anfertigung der experimentellen Arbeit gültigen Tierschutzgesetzes und nach den Richtlinien der örtlichen Aufsichtsbehörden. Die Mäuse lebten zu den gleichen Haltungsbedingungen mit freiem Zugang zu Wasser und Futter sowie einem regelmäßigen Tag-Nacht-Rhythmus zu 12/12 Stunden.

Nach einer durchschnittlichen 19-tägigen Schwangerschaft der Tiere wird der Tag der Geburt bis zur Mitte der Lichtphase als postnatal 0 (P0) definiert. Mit Überschreiten eines Alters von 60 Tagen werden sie als Erwachsene eingestuft. Die hier verwendeten adulten Tiere waren zweieinhalb Monate alt.

Die Perfusionsfixierung wurde als Versuchsvorhaben unter dem Aktenzeichen Az. 84-02.05.20.13.121 vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Genotypisierung der Mäuse

Die Genotypisierung erfolgte anhand der DNA von Schwanzbiopsien. Die Schwanzbiopsien wurden entweder zum Zeitpunkt des Experiments oder nach dem Absetzen und der Ohrmarkierung der Mäuse im Alter von 4-6 Wochen entnommen. Mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden die für die Knockouttiere charakteristische Gensequenz mit ungefähr 391 Basenpaaren vervielfältigt. Im Vergleich dazu beträgt das Amplifikationsprodukt bei den Wildtyptieren 267 Basenpaare. Nach der Auftrennung des DNA-Gemisches mittels Gelelektrophorese konnte anhand der unterschiedlichen Laufweiten die Zuordnung der Genotypen vorgenommen werden. Im Folgenden werden die Einzelschritte genauer dargestellt.

Um die DNA aus dem Gewebe zu isolieren, wurden die Schwanzspitzen in einem Thermoschüttler bei 55 °C über Nacht in einem Verdaupuffer von insgesamt 200 µl je Tier mit der Zusammensetzung aus jeweils 20 µl 10 x PCR-Puffer und 5 µl Proteinase K aus einer Stocklösung mit 10 mg/ml, sowie 175 µl Reinstwasser inkubiert. Nachdem sich der Gewebeverband vollständig aufgelöst hatte, erfolgte die Denaturierung der Proteinase K durch 10-minütiges Erhitzen bei 95 °C.

Die PCR wurde als sogenannte „Hot Start“ PCR durchgeführt, d.h. die Primer in 18 µl Mix 1 (siehe Tab. 1 Mix 1) wurden zusammen mit 2 µl durch Proteinase K verdauten

Schwanzspitzen versetzt und die DNA zunächst bei 95 °C für 30 Sekunden denaturiert. Dann wurde, zur Vermeidung von Evaporation, auf 80 °C abgekühlt, 5 µl des PCR-Mix 2 (siehe Tab. 4 Mix 2) zu jeder Schwanzprobe zugesetzt. Danach erfolgte die Amplifikationsphase, in der 35 Zyklen folgender Schritte zur exponentiellen Vermehrung der DNA-Fragmente durchgeführt wurden: nach dem Schmelzen der DNA bei 94 °C, 30 Sekunden Primer-Anlagerung bei 62 °C und 1 Minute Synthese bei 72 °C schloss sich eine abschließende Synthesereaktion von 5 Minuten bei 72 °C an.

Tab. 4: PCR-Ansätze für die Analyse jeweils einer Schwanzprobe der *Nf2 Iso1* Tiere.

Mix 1		Mix 2	
Puffer, 10 x	2,0 µl	Puffer, 10 x	0,5 µl
5'-Primer (Nf2 insert Fw.) 20 pmoles/µl: 5'-CCT CAA GCC CAA GGC AGA AGA	1,0 µl	dNTP 10 mM	0,4 µl
3'-Primer (Nf2 insert 2a Rev.) 20 pmoles/µl: 5'- CTT CAG AGT GAG GCA GTC TTC TAG G	1,0 µl	Taq Enzym 5 U/µl	0,2 µl
H ₂ O	14,0 µl	H ₂ O	3,9 µl

Zur Auftrennung der einzelnen DNA-Banden wurden die Vorrichtungen der Firma Biozym mit 70 ml beziehungsweise 90 ml Gelbettvolumina zur Gelelektrophorese genutzt. Hierzu wurde in 1 x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer, 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA pH-Wert 8) die Agarose als 2 %-Lösung durch mehrfaches Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach dem Abkühlen in einem Verhältnis von 1:20.000 mit Ethidiumbromidstammllösung (10 mg/ml) zur Darstellung der Banden versetzt und in die Gelkammer mit Gelkamm gegossen.

Die aus der PCR gewonnenen DNA-Proben wurden mit 4 µl 6 x Ladepuffer versetzt und 12-15 µl dieser DNA Lösung in die einzelnen Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde eine Leerprobe mit H₂O statt DNA und eine 100 bp DNA Leiter (0,5 µg/µl) aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte abhängig von ihrer Sequenzlänge mittels

Elektrophorese unter 100 V in 60 Minuten. Die mit Ethidiumbromid angereicherten Banden konnten nun unter UV-Licht sichtbar gemacht werden und photodokumentarisch mit Hilfe des Geldokumentationssystems von Biorad festgehalten werden.

3.3.2. Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion zum RNA-Nachweis

Um die Transkriptionsprodukte der Isoform 1 des *Nf2* Gens und dessen Knockout auf RNA-Ebene darzustellen, folgte nach der RNA Isolation aus dem Kleinhirngewebe die Synthese von cDNA (komplementäre DNA), die Amplifikation der Exonsequenz 14-17 und deren elektrophoretische Analyse.

3.3.2.1 RNA Isolation aus Kleinhirngewebe

Nach Dekapitation der 8 Tage alten Mäuse wurden die Kleinhirne zügig heraus präpariert, 100 mg des Gewebes abgewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle Arbeiten mit RNA wurden mit Handschuhen und mit möglichst RNase-freien Materialien durchgeführt, um einen vorzeitigen enzymatischen Abbau zu verhindern. Zu 100 mg Gewebe wurde 1 ml Trizol in einem 2 ml Eppendorf-Röhrchen hinzugegeben und die Suspension mittels Polytron Homogenisators auf Höchststufe jeweils für zweimal 10 Sekunden homogenisiert.

Zur besseren Trennung der wässrigen RNA-haltigen Phase von der Phenolphase wurden 0,2 ml Chloroform hinzu pipettiert und die Proben leicht per Hand invertiert. Nach der Inkubation auf Eis für 3-5 Minuten erfolgte die Zentrifugation für 15 Minuten unter 13.000 x g zur Probenauftrennung. Dadurch entstanden 3 Schichten mit jeweils den Proteinen in der organischen Phase, der DNA in der Interphase und der RNA in der wässrigen Phase. Die oberste wässrige Phase mit der gelösten RNA wurde in ein neues Eppendorf Röhrchen überführt.

Zur RNA Ausfällung wurde ein gleiches Volumen Isopropanol hinzugegeben und die Proben bei -80 °C für 10 Minuten inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation mit 10.000 x g bei 4 °C für 15 Minuten sedimentierte sich die RNA als Pellet am Boden des Röhrchens. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und erneut mit 8.000 x g bei 4 °C für weitere 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das so gewaschene RNA-Pellet wurde für 10 Minuten an der Luft getrocknet,

um jegliches Ethanol zu entfernen. Die Resuspension erfolgte mit 50 µl Ampuwa Wasser.

Mittels Fotometer und Qubit™ RNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) konnte die RNA Konzentration ermittelt werden.

3.3.2.2 Synthese der komplementären DNA

Die Transkription der RNA zur komplementären DNA (cDNA) erfolgte mit Hilfe des SuperScript® III First Strand Synthesis Systems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). 1-5 µg RNA wurden in einem Ansatz mit 1 µl Hexanukleotiden (50 ng/µl), 1 µl eines 10 mM dNTP-Mixes und bidestilliertem Wasser (ergänzt auf insgesamt 10 µl) vermennt und bei 65 °C für 5 Minuten denaturiert. Nach rascher Abkühlung der Proben auf Eis für 1 Minute erfolgte die Zugabe des cDNA Synthese Mixes (10 x RT Puffer 2 µl, 25 mM MgCl₂ 4 µl, 0,1 M DTT 2 µl, RNaseCUT™ (40 U/µl) 1 µl, SuperScript® III RT (200 U/µl) 1 µl) mit anschließender kurzer Zentrifugation. Nach Erwärmung der Proben auf 25 °C für 10 Minuten wurde die cDNA bei 50 °C für 50 Minuten im Thermocycler synthetisiert. Im Anschluss wurde die Enzymreaktion mit 85 °C für 5 Minuten gestoppt und die Proben zentrifugiert. Als letzter Schritt wurde der Probe 1 µl RNase H hinzugegeben und diese auf 37 °C für 20 Minuten belassen, um mögliche verbliebene RNA zu eliminieren. Zur weiteren PCR und Gelelektrophorese wurden 2 µl der Proben verwendet.

3.3.2.3 Analyse der cDNA

Das Funktionsprinzip der cDNA-Analyse gleicht der oben beschriebenen PCR und elektrophoretischen Auftrennung der DNA.

Die verwendeten Primerpaare (Tab. 5) dienen dazu, bestimmte Exonabschnitte, die für die Isoform 1 des *Nf2* Gens charakteristisch sind, zu amplifizieren.

Tab. 5: Benennung der Nukleotidsequenzen der verwendeten Primerpaare zur Analyse der *Nf2* Isoformen, deren Zielsequenzen, sowie die Länge der erwarteten Zielsequenzen.

nf2mex1_F (IV A4): 5`- AGGTCGCTGAGGTGGGGGTTG	nf2m_ex6_R (IV A5): 5`- GGTGCTCCGCATACCAAGCCG	Exon 1-6	1050 bp
nf2mex4_F (IV A6): 5`- CGTCCGTGCTCTTGGCGTCAT	nf2m_ex13_R (IV A7): 5`- GGTGGGCTTGGTGGCGATTTC	Exon 4-13	1030 bp
nf2mex12_F (IV A8): 5`- GCTGGAGGCTGAAGTGCTGGC	nf2m_ex17_R (IV A9): 5`- TGGCCGGGTCACCTGCTAGAG	Exon 12-17	496 bp

Zu Beginn der PCR wurden jeweils 23 µl von Mix 1 (Tab. 6) und 2 µl des vorher hergestellten cDNA Aliquots in ein PCR Röhrchen pipettiert und im Thermocycler auf 96 °C 3 Minuten lang zur Denaturierung der cDNA erhitzt. Nach Hinzugabe des Mix 2 (Tab. 6) wurden die Zyklen der Denaturierung (1 Minute bei 94 °C), der Anlagerung der Primer (1 Minute bei 50 °C) sowie der Synthese der komplementären DNA Stränge (1 Minute bei 72 °C) 35 Mal wiederholt und endeten mit einer Extensionsphase (5 Minuten bei 72 °C).

Tab. 6: PCR-Ansätze für die Analyse jeweils eines Primerpaares zur Analyse der *Nf2 Iso1* Expression.

Mix 1		Mix 2	
10 x Puffer, Dream Taq	2,5 µl	10x Puffer, Dream Taq	0,5 µl
MgCl ₂	1,0 µl	dNTP 10mM	0,4 µl
F-Primer	0,5 µl	Taq Enzym (Dream 5U/µl)	0,1 µl
R-Primer	0,5 µl	H ₂ O	4,0 µl
DMSO	1,8 µl		
H ₂ O	17,7 µl		

Die gelelektrophoretische Auftrennung der cDNA-Fragmente erfolgte in einem 1 %igen Agarose Gel in 1 x TBE unter 100 Volt für 60 Minuten.

3.4. Biochemische Methoden

Mittels Western Blot ist es möglich, eine quantitative Analyse von Proteinkonzentrationen durchzuführen. Die dafür notwendigen Schritte werden im Folgenden näher erläutert.

3.4.1. Präparation der Proteinproben sowie Proteinkonzentrationsbestimmung

Das Kleinhirngewebe wurde bei P8 alten Mäusen nach Dekapitation aus dem Schädelknochen präpariert und nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS mit 250 μ l Extraktionspuffer (siehe 3.1.2) versehen und auf Eis gekühlt. Zur Proteinextraktion wurden beide Komponenten mittels eines Glashomogenisators sowie eines Ultraschallhomogenisators (SONOPULS Homogenisator HD2070, Bandelin, Berlin, Level 3, 10 Stöße, 60 % Power, 5 Zyklen) homogenisiert und anschließend bei 10.000 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit der Proteinlösung konnte so abpipettiert und bei -80 °C eingefroren werden.

Für die Proteinquantifizierung und kolorimetrische Detektion wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA) nach Produktinformation verwendet. Als Standardvergleichslösungen wurden aus einer Albumin Standard Lösung (2 mg/dl) und dem Proteinprobenpuffer Gemische aufsteigender Konzentration hergestellt (125-2000 μ g/ml). Zudem wurde jeweils ein Doppelansatz mit der Proteinprobe mit 25 μ l in unterschiedlichen Verhältnissen von 1:10 und 1:100 in eine 96 Well Platte vorgelegt und anschließend mit 200 μ l Reaktionslösung ergänzt (aus dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit; Reagenz A + Reagenz B im Verhältnis 50:1 (A:B)). Nach leichtem Invertieren erfolgte die Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C. Nach kurzer Abkühlungsphase bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 562 nm mittels Mikroplattenspektralphotometer (μ Quant, BioTek Instruments, Bad Friedrichshall) gemessen. Von den erhaltenen Extinktionswerten der Standardproteine wurden Regressionsgeraden errechnet, anhand derer die Proteinkonzentration der Proben ermittelt wurde. Diese Prozedur war im Labor als Microsoft Datenblatt implementiert. Nur Standardkurven mit einem Regressionkoeffizienten größer als 0,98 wurden verwendet. Ansonsten wurde neu pipettiert.

3.4.2. SDS-PAGE

Mittels der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, engl. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) können Proteine nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden.

Nachdem in die „Mini-PROTEAN Gießstation“ das Trenngel blasenfrei eingegossen und mit Isopropanol benetzt wurde, folgte nach Polymerisation die Entfernung des Isopropanol und Einfüllen des Sammelgels mit Probenkamm (Tab. 7).

Tab. 7: Zusammensetzung der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgele.

Trenngel	12,5 %	Sammelgel	
Trenngel-Puffer	3,0 ml	Sammelgel-Puffer	630 µl
H ₂ O	5,76 ml	H ₂ O	3,6 ml
Acrylamid 40%	3 ml	Acrylamid	625 µl
10 % SDS	0,12 ml	10 % SDS	50 µl
10 % APS	0,12 ml	10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl

Nach Denaturierung der Proteine bei 95 °C und kurzzeitiger Zentrifugation konnten die Proben, zusammengesetzt aus 10 µg Proteinen, 5 µl 6 x Ladepuffer und bidestilliertem Wasser auf 30 µl ergänzt, in die Taschen pipettiert werden.

Das Polyacrylamidgel wurde in 10 x SDS Elektrophorese-Puffer eingelegt und die Proben sowie der Größenmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, Vilnius, LTU) zunächst bei 20 mA bis zur Sammelgel-Trenngel-Grenze laufen gelassen. Dadurch wurden die Proben in einer scharfen Bande aufkonzentriert. Die folgende Erhöhung der Stromstärke auf 25 mA sorgte für eine schnellere Auftrennung der Proben. Mittels Western Blot wurden die Proteine anschließend auf eine Membran transferiert.

3.4.3. Western Blot Analyse

Der Elektrotransfer, der mit SDS-beladenen negativ geladenen Proteine, wurde mittels Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad, Hercules, USA) für 10 min bei bis zu 25 Volt

mit 2,5 Amper durchgeführt. Zuvor wurden die PVDF Membranen für 3 Minuten in Methanol aktiviert und nachfolgend ebenfalls 3 Minuten mit Transferpuffer äquilibriert. Nach dem Proteintransfer auf die Membran wurden die unspezifischen Proteinbindungsstellen mit einem Blockierungspuffer (5 % Milchpulver, gelöst in 1 x TBS) für 2 Stunden blockiert. Hiernach erfolgte die Inkubation des ersten Antikörpers (Calbindin 1:10.000, Synaptobrevin 1:1000, in Blockierungspuffer) über Nacht bei 4 °C. Nach Inkubation der Membran mit dem 2. Antikörper (Ziege anti-Kaninchen, IgG/HRP gekoppelt, 1:20.000, in Blockierungspuffer) für 3 Stunden erfolgten 4 Waschschrte mit TBST für 5 Minuten.

Im Anschluss wurden die Membranen mit der Entwicklerlösung, bestehend aus gleichen Mengen von SuperSignal® West Femto Stable Peroxide Buffer und SuperSignal® West Femto Luminol/Enhancer Solution (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific, 35095/ Waltham, USA), für 5 Minuten im Dunkeln inkubiert, um so die gebundenen Antikörper nachzuweisen.

Die Fotodokumentation erfolgte mit dem Western Blot Detektor (ImageQuant LAS 4000 Mini, GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, UK).

Anschließende Quantifizierung der Bandenstärke und damit der Vergleich zwischen den Proteinmengen von Calbindin und Synaptobrevin der P8 Wildtyp- und Knockouttiere erfolgte durch die Auswertung der Helligkeiten der Bandenmitten mit ImageJ (NIH).

3.5. Histologische Färbungen

3.5.1. Gewebepvorbereitung

Um eine ausreichende Gewebefixierung des Kleinhirns zu erreichen, wurden die Tiere perfusionsfixiert. Hierzu wurde den adulten Mäusen ein Gemisch aus 2 mg Ketamin und 0,4 mg Rompun in 0,9 %iger NaCl-Lösung (Ketamin 7538814, Ratiopharm, 50 mg/ml; Rompun 03406, Bayer, 20 mg/ml) intraperitoneal injiziert. Acht Tage alte Mäuse sind etwa 10x leichter, entsprechend wurde weniger Anästhetikum verwendet. Die Perfusion erfolgte altersentsprechend primär mit Ringerlösung mit 12 ml/min bzw. 17 ml/min. Mittels umgekehrtem Y-Schnitt wurde das Abdomen eröffnet, das Zwerchfell teilweise entfernt, das Herz durch partielle Entfernung des Brustkorbes dargestellt, das rechte Atrium zum Abfluss eröffnet, sowie der linke Ventrikel über Injektion einer

Butterflykanüle zur Blutwäsche genutzt. Nach vollständigem Austausch des Blutvolumens mittels Perfusionspumpe wurde die eigentliche Fixierung mit 4 %igem Paraformaldehyd, gelöst in PBS unter physiologischem pH-Wert, altersentsprechend mit einer Gesamtmenge bis zu 42,5 ml durchgeführt.

Im Anschluss wurde, nach Eröffnen der Schädelkalotte mit einer Schere über das Foramen magnum entlang der Medulla oblongata, sowie sagittal bis zur vorderen Schädelgrube, das komplette Gehirn freipräpariert und nach Durchtrennung der Hirnnerven entnommen. Das Gewebe wurde für 6 h nachfixiert und anschließend mehrfach mit PBS gewaschen.

3.5.2. Immunhistologische Färbung

3.5.2.1 Indirekte Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Nach Fixation und Entnahme des Kleinhirngewebes aus dem Schädelknochen wurden aus diesem, mittels eines Vibratoms, 50 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt. Mit Hilfe von Antikörpern, die spezifisch an Proteine von Zellbestandteilen binden können, ist es möglich, gezielt bestimmte Zelltypen darzustellen. In dieser Arbeit konnten so die zu untersuchenden Purkinjezellen mit Calbindin D-28k in den Gewebeschnitten sichtbar gemacht werden. Calbindin-D-28k ist ein Kalzium bindendes Protein, das im Kleinhirn ausschließlich in Purkinjezellen vorkommt. Somit dient der spezifische primäre Antikörper Calbindin-D-28K zuverlässig als Marker von Purkinjezellen. Mit dem Synaptobrevinantikörper ist es zudem möglich, präsynaptische Proteine des Zell-Zell-Kontaktes zweier Nervenzellen darzustellen. Die Verwendung eines fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpers verstärkt dann das durch den Erstantikörper detektierte Epitop über seine Bindung an diesen und ermöglicht somit ein spezifischeres Färbeergebnis, sowie die Reduktion möglicher störender Hintergrundsignale.

Um die Purkinjezellen nahezu vollständig darstellen zu können, wurden sagittale Gewebeschnitte entlang der Hauptausrichtung ihres Dendritenbaumes benötigt. Hierzu wurde das Kleinhirn in einem 1,5 %igem Agarblock (gelöst in PBS) eingebettet und nach Zuschnitt auf dem Vibratomtisch mit Sekundenkleber in 90 Grad zur Schnittrichtung befestigt. Das Schneiden aller Gewebe mittels Vibratom wurde in PBS durchgeführt und die Schnitte anschließend bis zur weiteren Verwendung in mit Azid versetztem PBS bei 4 °C gelagert.

Vor der Inkubation des ersten, sowie des zweiten Antikörpers wurden die ausgewählten Schnitte zweimal für jeweils 15 Minuten in PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Antigendemaskierung, bei der jeder Schnitt in 0,5 ml 2 x SSC (pH 7) in einem Eppendorfgefäß für eine halbe Stunde bei 80 °C inkubiert wurde. Die Permeabilisation des Gewebes konnte durch 0,5 % TritonX-100 in PBS nach 30 Minuten erreicht werden. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit einer 0,2 % Gelatinelösung in PBS⁺ (siehe 3.1.2) für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. In der gleichen Blockierlösung wurde der Primärantikörper im Verhältnis 1:1.500 (Calbindin-D-28k), bzw. 1:400 (Anti-Synaptobrevin2) hinzugegeben und bei 4° C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte nach 4-maligem Waschen mit PBS die Inkubation mit dem Sekundärantikörper im Verhältnis 1:500 in Blockierlösung. Letztendlich wurden die Schnitte nach weiteren vier Waschgängen für je 15 Minuten mit Mowiol auf einen Objektträger verbracht und mit einem Deckglas abgedeckt.

Dasselbe Färbeprotokoll wurde für die Anfärbung der cerebellären Schnittkulturen eingesetzt.

3.5.2.2 Direkte Färbung mit Kresylviolett

Für die histologischen Übersichtsaufnahmen wurden Paraffinschnitte genutzt, die aus Formalin-fixiertem Kleinhirngewebe gewonnen wurden. Diese Paraffinschnitte wurden mit Kresylviolett gefärbt, eine Färbung, die sich besonders gut zur Anfärbung der Nisselsubstanz von Nervenzellen in den Zellkörpern eignet und damit neuronale Strukturen darstellt. Die perfusionsfixierten Gewebe wurden über eine Woche mehrfach in Leitungswasser gewaschen, um das überschüssige Fixans zu entfernen. Anschließend erfolgte die Dehydratation in 70 % Alkohol, da sich Paraffin in Wasser nicht lösen lässt. Das durch den Einbettautomaten paraffinierte Gewebe konnte im Anschluss am Mikrotom in 5 µm dicke Schnitte weiterverarbeitet werden. Im 37 °C warmen Wasserbad entfalteten sich die sagittal geschnittenen Kleinhirngewebebeobachten vollständig, so dass sie auf HistoBond Objektträger aufgezogen werden konnten und bei 37 °C über Nacht getrocknet wurden.

Vor der Färbung der Schnitte mit 0,1 % Kresylviolett für 8 Minuten wurde die Entparaffinierung in Xylol 3 x jeweils 10 Minuten und zur Hydrierung in absteigender

Alkoholreihe (Ethanol 3 x 90 % - 3 x 70 % - 3 x 50 %) jeweils 3 Minuten lang durchgeführt. Überschüssige Färbelösung wurde durch kurzes Waschen mit Leitungswasser entfernt. Zur Differenzierung erfolgte ein weiterer Schritt mit 70 % Ethanol. Nach Dehydratation mit 90 % und 100 % Ethanol für jeweils 2 und 4 Minuten wurde mit Xylol auf ein organisches Lösungsmittel gewechselt, so dass letztendlich mit Depex eingedeckelt werden konnte.

3.5.3. Golgi-Färbung

Mittels der Golgi-Imprägnationsfärbung ist es möglich, einzelne Nervenzellen komplett darzustellen und sie so morphologisch in ihrer Ganzheit beurteilen zu können. Historisch liegt der von Camillo Golgi entwickelten Färbemethode eine Fixierung des Gewebes mit Kaliumdichromat und Osmiumsäure mit anschließender Versilberung durch Silbernitrat zugrunde. Derzeit gibt es weiterentwickelte, industriell zusammengestellte Kitsysteme, die ein zuverlässiges Anfärben jeglicher Neuronentypen und Gliazellen in ausgewogenem Verhältnis gewährleisten und diese somit für eine Einzelzellanalyse zugänglich machen. Im Folgenden wurde der FD Rapid GolgiStain™ Kit (FD NeuroTechnologies, Columbia MD 21046, USA) verwendet und das vorgesehene Protokoll angepasst, um die Kontraste der Färbung bestmöglich für die Fotomikroskopie nutzbar zu machen. Gerade bei sehr hochauflösenden Aufnahmen, z. B. bei der Darstellung der Purkinjezellfortsätze, ist es wichtig, eine Hyperchromatisierung des Gewebes zu vermeiden.

Die Gewebepreparation erfolgte durch Dekapitation der 8 Tage alten Tiere ohne nachfolgende Fixierung. Das komplette Gehirn wurde zügig aus dem Schädelknochen entnommen und in eiskühlem PBS mehrfach gewaschen, um Blut und Fellbestandteile zu entfernen. Hiernach wurde das Kleinhirn separiert und in Lösung A und B des Kits im Verhältnis 1:1 eingetaucht, die 24 Stunden zuvor zur Präzipitatausfällung angesetzt wurde. Am darauffolgenden Tag wurde die Immersionslösung erneuert und für 3 Wochen bei Raumtemperatur und Dunkelheit belassen. Pro 1 cm³ Gewebe sollten für eine zuverlässige Sensitivität der Färbung 5 ml angesetzt werden. Danach wurden die Kleinhirne für eine Woche bei 4 °C in Lösung C überführt, die nach 24 h einmalig gewechselt wurde. Alle verwendeten Behältnisse und

Transfermaterialien bestanden während allen Arbeiten aus Glas oder Plastik, um eine Reaktion mit Metall zu vermeiden.

Im Anschluss wurden die Gewebe mittels Cryostat bei -24 °C auf eine Dicke zwischen $100\text{ }\mu\text{m}$ bei den jüngeren Tieren und $140\text{ }\mu\text{m}$ bei den Adulten geschnitten, um eine dreidimensionale Darstellung des Purkinjezellendritenbaumes zu gewährleisten. Zuvor wurden die Proben in einem Plastikschälchen mit Einfriermedium (TFM, TBS, Durham, NC, USA) umschlossen. Der Inhalt der Plastikschälchen wurde dann schwimmend auf Isopentan in einer Wanne auf Trockeneis für 10 Minuten tiefgefroren.

Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Glasspatels auf den Objektträger transferiert, auf dem sich ein sehr kleiner Tropfen Lösung C befand, der zum vollständigen Entfalten des Gewebes beitragen sollte. Die Trocknung fand unter Raumtemperatur in Dunkelheit für 4 Tage statt.

Vor der Färbung mit Lösung D und E und destilliertem Wasser (im Verhältnis 1:1:2) wurden die Schnitte mit Wasser 2 x für je 2 Minuten gewaschen. Da sie sich meist zu diesem Zeitpunkt schon vom Objektträger lösten, wurden sie danach, falls notwendig, als schwimmende Schnitte in Uhrgläsern weiterbehandelt. Als Einwirkzeit der Färbelösung stellte sich heraus, dass nach 12 Minuten die Purkinjezellmembran ausreichend intensiv gefärbt war, um detaillierte mikroskopische Aufnahmen zu generieren.

Nachfolgend wurden die Schnitte 3 x für jeweils 4 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Kresylviolett für 4 Minuten gegengefärbt. Dann erfolgte die Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe (50 % - 70 % - 90 % und letztendlich in 100 % Ethanol 4 x jeweils 4 Minuten). Nach Klärung in Xylol 3 x für 4 Minuten wurden die Schnitte auf die Objektträger zurück transferiert und mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt.

3.6. Schnittkultur

Der Vorteil von cerebellären Schnittkulturen resultiert aus der guten morphologischen Beurteilbarkeit einzelner Purkinjezellen, da sich während der Kultivierung der Schnitte durch Zelluntergang die Dichte der Zellen reduziert. Die überlebenden Zellen lassen sich nach immunhistochemischer Färbung mit Calbindin gut darstellen und analysieren. Somit wachsen die Purkinjezellen in ihrer physiologischen neuronalen Umgebung,

jedoch ohne den Einfluss von ankommenden (afferenten) Signalen der Moos- und Kletterfasern. Nachteil der Zellkultur ist die artifizielle Umgebung der Purkinjezellen, die das Dendritenwachstum wesentlich beeinflusst.

Folgende, in dieser Arbeit verwendeten Gewebeschnitte, entstammten Wildtyp- und Knockouttieren am Tag der Geburt. Die Präparate wurden für 8 Tage (DIV 8) in Nährmedium kultiviert, anschließend fixiert und immunhistochemisch gefärbt.

Zur Gewinnung der Proben wurden die Tiere per Dekapitation getötet und das Gehirn wie zur Perfusion aus dem Schädel präpariert und in Eis gekühlte Hank`s Lösung transferiert. Nach Separieren des Kleinhirns wurden unter der Stereolupe die Hirnhäute entfernt. Mittels Tissue Chopper konnte das Gewebe in 300 µm dicke Schnitte zerteilt werden. Diese wurden mit Hank`s Lösung vom Schneidetisch gewaschen und ab diesem Zeitpunkt ausschließlich mit sterilen Materialien unter der Sterilbank weiterbehandelt.

Während der Equilibrierung der Schnitte in angesetztem Neurobasal Medium in einer Zellkulturschale bei 37 °C wurde eine Zellkulturplatte (6-Well) mit jeweils 1 ml Kulturmedium und Zellkultureinsätzen bestückt. Danach erfolgte der Transfer der Schnitte mittels gestutzter Pipette auf die Membran der Zellkultureinsätze. Dabei war auf ausreichend Abstand zwischen den Proben zu achten, um ein Ineinanderwachsen der Proben zu verhindern. Zudem wurde möglichst wenig Basalmedium übertragen, um Infektionen zu vermeiden. Damit die Schnitte nicht austrockneten, erhielten sie in die Kammer 200 µl Medium, sowie nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden im Wärmeschrank bei 37 °C weitere 50 µl. Zudem wurde kontrolliert, ob die Gewebeproben sich bereits an der Membran anhefteten, oder sie bei zu viel Medium aufschwammen.

Am darauffolgenden Tag wurde das Neurobasal Medium gewechselt, in dem 400 µl entnommen und 500 µl neue Lösung hinzugegeben wurde. Dieses Prozedere wurde bis zum Abstoppen der Kultur alle 2 Tage wiederholt. Nach insgesamt 8 Tagen Wachstum wurden die Schnitte mit 4 % Paraformaldehyd für 1 Stunde fixiert und nachfolgend 3 x mit PBS gewaschen. Zur Immunfärbung wurden die Schnitte vorsichtig mit einem Pinsel von der Membran gelöst. Die immunhistochemische Färbung erfolgte in Analogie zu den Gewebeschnitten (siehe 3.5.2.1).

3.7. Übersichtsaufnahmen

Um einen Gesamteindruck der Kleinhirne in toto in anatomisch regelrechter Lage dorsal des Hirnstammes zu gewinnen, wurden die Gehirne nach Präparation aus dem Schädel im 45° Winkel von hinten mit einem digitalen Kameramikroskop (DigiMicroProfi, Dietzenbach) fotografiert. Der Winkel wurde mit Hilfe einer Rampe hergestellt, da vom Hersteller aufgrund des starren Aufbaus des Halteapparates nur eine senkrechte Aufnahme von oben vorgesehen ist. Bei den adulten Tieren wurde, im Gegensatz zu den P8 Tieren, auf eine Perfusionsfixierung verzichtet, da so anhand der meningealen Gefäße die Lobulierung besser zu erkennen war.

3.8. Aufnahmen der mikroskopischen Schnitte

3.8.1. Das Aufrechte Mikroskop von Nikon

Alle mikroskopischen Übersichtsabbildungen der mit Nissl oder Golgi-gefärbten Gewebeschnitte wurden mit dem aufrechten Mikroskop von Nikon (ECLIPSE Ni, Nikon, Tokyo) mit unterschiedlichen Objektiven (2 x Objektiv NA = 0,4; 4 x Objektiv NA = 0,10; 20 x Objektiv NA = 0,4) und dazugehöriger Kamera (DS-Fi2), sowie Software (NIS-ElementsD) von Nikon aufgenommen.

3.8.2. Konfokales-Laser-Scanning-Mikroskop

Alle immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden am Konfokalen-Laser-Scanning Mikroskop (Leica TCS SP2, Leica Microsystems, Wetzlar) fotodokumentarisch zur anschließenden Analyse festgehalten.

Die hier verwendeten Laser waren der Argonionenlaser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und der Helium/Neon-Laser mit 543 nm. Diese wurden zur Darstellung von Doppelfärbungen genutzt, die durch die Aufnahme mit 2 unterschiedlichen Detektionskanälen möglich waren. Anhand verschiedener Emissionskurven der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe konnte die Detektionsbreite der Wellenlängen zusätzlich überlappungsfrei eingestellt werden. Hinzukommend fand die Bildaufnahme zeitversetzt statt.

Um für die spätere metrische Auswertung mit möglichst hochauflösendem Bildmaterial arbeiten zu können, wurden die Aufnahmeparameter nach Benutzerhandbuch und

Informationen der Firma Leica optimiert. Somit wurden für die Schnittbildaufnahmen der mit Calbindin gefärbten Kleinhirne ein 40 x Objektiv mit Öl und numerischer Apertur von 1,25 eingesetzt, sowie ein Pinhole von 2 Airy-Einheiten (AE). Zudem erfolgten Mehrfachaufnahmen der Bildzeilen und Bildebenen mit einer langsamen Scangeschwindigkeit bei identischem Laser.

Für die Detailaufnahme der mit Synaptobrevin gegengefärbten Schnitte von Wildtyp- und Knockouttieren wurde ein 63 x Objektiv, NA = 0,6-1,4, sowie eine Pinholeeinstellung von 1 AE verwendet. Im Gegensatz zur obigen Priorität auf optimale Kontraste der Aufnahmen wurden hier vollkommen identische Parameter zum Vergleich von Intensitäten (bezüglich Gain- und Offsetwert) eingesetzt.

3.8.3. Axioskop

Mittels Axioskop 2 MOT (Zeiss, Jena) und zugehöriger Software AxioVision, Release 4.8.3 SP3, sowie Kamera (Photometrics Cool SNAP Ez, Visitron Systems, Puchheim) wurden alle Bilderstapel Golgi-gefärbter Schnitte zur Rekonstruktion und Auswertung der Dendritenbäume, als auch der Dornfortsätze aufgenommen. Für diese Durchlichtaufnahmen fanden Plan-Neofluar Objektive mit den Maßstabszahlen 20 x (NA = 0,5 Luft), 40 x (NA = 1,3, Öl) und 100 x (NA = 1,3, Öl) Verwendung. Der Kontrast wurde mittels Graufilter und angepasster Belichtungszeit für die jeweilige Dicke der Schnitte von maximal 140 µm optimal eingestellt.

3.9. Morphometrische Auswertung der Purkinjezellen

Die folgenden Parameter wurden jeweils an identisch aufbereiteten histologischen Präparaten von *Nf2 Iso1^{+/+}* und *Nf2 Iso1^{-/-}* Mäusen manuell erhoben. Zum Vergleich wurden nur Bildmaterial gleichen Aufbaus verwendet und Messungen unter denselben Bedingungen durchgeführt.

3.9.1. Auswertung Calbindin gefärbter Vibratonschnitte

Zur Bestimmung der Molekularschichtdicke wurden mikrophotographische Bilddateien von mit Calbindin gefärbten 50 µm dicken Vibratonschnitten am Konfokalen-Laser-Scanning Mikroskop aufgenommen und mittels der frei zugänglichen Bildsoftware Fiji

ausgewertet (Schindelin et al., 2012). Hierzu wurden von jeweils 3 Pärchen 8 Tage alter und adulter Tiere mittige Ausschnitte der Lobuli 3 und 4 des Kleinhirns gewählt. Anhand der Bilderstapel, die mit einem 40 x Objektiv (NA = 1,25, mit Öl, Voxelgröße von 92 nm x 92 nm x 750 nm) über einen Bereich von 4,5 µm aufgenommen worden waren, erfolgte die Dickenmessung der Molekularschicht über einzelne gerade Linien ausgehend von der Basis des Stammdendriten zur oberen Grenze der Dendriten im Lot zur Pia mater. Es wurde dabei jeweils das Bild ausgewählt, bei dem der Austritt des Stammdendriten vom Soma der Purkinjzelle klar identifizierbar war. Existierte mehr als ein Stammdendrit, wurde der weiter Differenzierte gewählt.

In gleichem Bildmaterial wurde im jeweils passenden Einzelbild der Zellkörperdurchmesser der Purkinjzellen (Somadurchmesser) an der weitesten Ausdehnung senkrecht zum Stammdendritenabgang vermessen.

Zudem erfolgte die Zählung der Purkinjzellen mit klar sichtbarem Abgang des Stammdendriten und Axonaustritt pro 100 µm über den Gesamtbereich von 4,5 µm der Schichtaufnahmen.

Weiterhin wurden diese Zellen der drei Altersstufen P7-P9 selbstdefinierten Purkinjzellentwicklungsklassen zugeordnet. Alle Zellen hatten bereits einen klar erkennbaren Stammdendriten mit einem sich zu differenzieren beginnenden Dendritenbaum entsprechend des Übergangs zwischen Stadium drei und vier nach Hendelman und Aggerwal.

Klasse 1: Mittige prominente Auftreibung am Ende des Stammes als Ursprung aller Dendriten.

Klasse 2: Aufgliederung in Primär-, Sekundär-, Tertiärdendriten, allerdings mit Dendritendurchmessern dicker als der Stammdendrit.

Klasse 3: Verzweigungsmuster ähnlich des adulten Aufbaus, klar erkennbare meist dichotomen Verzweigungen mit Dendritendurchmessern ähnlichen Kalibers.

3.9.2. Einzelzellauswertung von Golgi-gefärbten Geweben und immunhistochemisch gefärbter Schnittkulturen

Um einen Eindruck über die Komplexität des Verzweigungsgrades des Dendritenbaumes während der Entwicklung zu erhalten, wurden Schichtaufnahmen des

Durchlichtmikroskops der Golgi-gefärbten P8 und adulten Wildtyp- und Knockouttiere mittels Fiji ausgewertet (40 x Objektiv, NA = 1,3, mit Öl, Bildauflösung 1392 x 1040 Pixel, 344 nm Bildabstand). Dabei wurde die Gesamtfläche des Dendritenbaumes bestimmt und die Anzahl der Verzweigungspunkte unter der Verwendung der maximalen euklidischen Distanz von Zellen der Lobuli 3 und 4 als etablierte Parameter gemessen (Kapfhammer und Guggler, 2012; Schrenk et al., 2002). Zur Bestimmung der Gesamtfläche des Dendritenbaumes wurden nicht nur die Endpunkte der Dendriten verbunden, sondern der Umriss möglichst nah an den einzelnen Ästen entlanggeführt und das Soma ausgeschlossen.

Gleiche Parameter wurden für die Auswertung der Schnittkulturen (DIV 8, Schnitte eines Wildtypieres und zweier Knockouttiere) angewendet. Die Aufnahmen waren mit dem Laser-Scanning Mikroskop (40 x Objektiv, NA = 1,25, mit Öl und einer Voxelgröße von 92 nm x 92 nm x 750 nm) gemacht worden, so dass der Zellkörper inklusive der mehrfachen Stammdendriten dargestellt werden konnte. Alle zugrundeliegenden Zellen hatten bereits Dendriten mit deutlichen Dornfortsätzen ausgebildet.

Die Vermessung des maximalen euklidischen Abstandes zwischen den äußersten Endästen in der Horizontalen der Golgi-gefärbten Schnitte diente zur Verifikation der Größe der Purkinjezellen, erlaubt aber zusätzlich die laterale Ausdehnung einer Purkinjezelle zu erfassen.

Um einen schnellen Eindruck über die Segmentlängen der P8 alten Tiere zu erhalten, konnte der effiziente Parameter der Pfadlänge etabliert werden. Um einen vergleichbaren Ausgangspunkt der Messung zu schaffen, wurde jeweils ausgehend von 10 unterschiedlichen Endsegmenten, die in Richtung Pia mater wuchsen, mittels „segmented line tool“ in Fiji der komplette Weg bis zum Soma zurückverfolgt und gemessen. Somit ergibt sich zum einen eine Addition aller Segmentlängen und zum anderen auch eine Aussage über den Verzweigungsgrad, soweit man während der Messung die Verzweigungspunkte mitzählte.

3.9.3. Rekonstruktion adulter Purkinjezellen

Die dreidimensionale Rekonstruktion von Purkinjezellen aus 3 Pärchen adulter Knockout- und Wildtypmäuse erfolgte manuell mit Hilfe des Rekonstruktionsprogrammes Neuromatic (Myatt et al., 2012). Hierzu wurden

Durchlicht-Schichtaufnahmen (40 x Objektiv, NA = 1,3, mit Öl, Bildauflösung 1392 x 1040 Pixel, 344 nm Bildabstand) der Golgi-gefärbten Kleinhirne verwendet und jeweils 6 Zellen aus dem anterioren Lobus rekonstruiert. Alle ausgewerteten Purkinjezellen lagen entlang der gestreckten Teile der Fissuren zwischen Lobuli III und IV. Die Purkinjezellen mussten in ihrem gesamten Verlauf von der Somazellschicht bis zur Pia mater rekonstruierbar sein. Anhand der Software ist es möglich, jeden einzelnen Ast entsprechend seines variierenden Durchmessers entlang mit vielen einzeln aufgezogenen Zylindern abzubilden, Verzweigungspunkte der Bi- und Trifurkationen gesondert zu markieren, sowie Endpunkte zu bestimmen. Als eigenständiger Ast galten nur Dendriten, deren Länge größer war als ihr Durchmesser. Zur genaueren Abbildung des Dendritendurchmessers wurde immer mittels Autofokus die schärfste Aufnahme entlang der z-Achse ermittelt. Danach wurden die jeweiligen Zylinder in der xy-Ebene unter Ausschluss der Dornfortsätze rekonstruiert. Die Besonderheit von Neuromatic ist, im Vergleich zu anderen Rekonstruktionsprogrammen, die Implementierung der Abstandsmessung zwischen den jeweiligen Ebenen in der Rekonstruktion zusätzlich zur xy-Auflösung.

Zur anschließenden Datenextraktion der rekonstruierten Zellen wurde das ebenfalls frei zugängliche Programm L`measure (Scorcioni et al., 2008) verwendet, das auf Grundlage der einzelnen Zylinder eine Vielzahl von Parametern, wie z.B. Länge, Anzahl, Winkel, Verzweigungspunkte und Durchmesser der einzelnen Dendriten aus verschiedenen analytischen Softwarepaketen extrahieren kann.

3.9.4. Auswertung der Dornfortsätze

Um die Dornfortsätze auf den Enddendriten der Purkinjezellen näher charakterisieren zu können, wurde die jeweils schärfste Fokusebene der Schichtaufnahmen Golgi-gefärbter Schnitte adulter Tiere gesucht und von allen darstellbaren Dornfortsätzen der maximale Kopfdurchmesser sowie die maximale Länge des Halses inklusive Kopf durch das Werkzeug der segmentierten Linie des Bildbearbeitungsprogramms Fiji über eine Mindestdistanz von 40 µm je Zelle vermessen und gezählt. Es lagen Durchlichtaufnahmen von Purkinjezellen aus den Lobuli 3 und 4 von insgesamt 3 verschiedenen Pärchen vor (100 x Objektiv, NA = 1,3, mit Öl, Bildauflösung 906 x 677 Pixel, Bildabstand 344 nm).

3.10. Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit der frei zugänglichen Software R Studio durchgeführt (R: A language and environment for statistical computing, The R core team, 2008). Für die Wahl eines geeigneten statistischen Verfahrens auf signifikante Unterschiede in den Messdaten wurden die Messwerte zunächst auf die Gleichheit der Varianz mittels des Levene-Tests überprüft. Lagen die p-Werte unter 0,01, war das Testergebnis signifikant unterschiedlich von der Nullhypothese und die Annahme gleicher Varianz wurde verworfen. Der Shapiro-Wilks-Test wurde verwendet, um die Daten auf Normalverteilung zu prüfen.

Waren Levene- und Shapiro-Testergebnisse nicht signifikant unterschiedlich und sollten nur Messwerte zwischen den Genotypen beider experimenteller Gruppen verglichen werden, wurde der Student's t-Test oder die einfaktorische ANOVA verwendet. Die Zweifach-ANOVA wurde für parametrisch verteilte Messwerte eingesetzt, bei denen ein Vergleich der Daten in Abhängigkeit vom Genotyp und eines weiteren Parameters (wie z.B. Dendritenordnung, Gesamtverzweigungspunkte je Zelle) analysiert werden sollte (Ryan et al., 2014, Zanjani et al. 2016). Da keine Messwiederholungen verwendet wurden (repeated measures), wurde auch kein post-hoc Test in dieser Arbeit genutzt. Die Darstellung der Daten erfolgte in linearer Regression. In Diagrammen der linearen Darstellungen wurden zur besseren Übersicht nur die Mittelwerte der y-Werte für die jeweiligen x-Werte angegeben, die statistische Auswertung jedoch mit allen Werten durchgeführt. Konnten signifikant unterschiedliche Varianzen ermittelt werden, können anhand der Mittelwertvergleiche Aussage über Effekte von Faktoren auf Messwerte getroffen werden. In den Legenden und im Text sind Mittelwerte mit Standardfehlern genannt, so dass die Stärke des Effektes nachvollziehbar ist. In den Abbildungslegenden sind die Signifikanzniveaus für Effekte für den Faktor Genotyp, für den zweiten Faktor, sowie für den Interaktionsterm (Genotyp: zweiter Faktor) angegeben.

Bei signifikanten Levene- und Shapiro-Wilks-Testergebnissen wurde von nicht parametrisch verteilten Daten ausgegangen. In diesem Fall wurde der Rangsummentest nach Wilcoxon oder der Kolmogorow-Smirnow Test durchgeführt, und damit Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung zwischen den experimentellen Gruppen eruiert. Dieses Verfahren war zur statistischen Auswertung von Parametern notwendig,

die einzelne Dendritenäste oder Verzweigungspunkte betreffen (Dendritenordnung, euklidische Distanz, Pfadlänge bis zu einzelnen Kreuzungspunkten, Segmentlänge, Dendritendurchmesser oder Bifurkationswinkel (Fujishima et al., 2012, Berry und Flinn, 1984, Kim et al., 2011))

Um Winkelmessungen zu vergleichen, bedarf es einer besonderen Statistik, da Winkel nur im Bereich zwischen 0° und 360° dargestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Watson-Williams Test eingesetzt, der Unterschiede im Mittelwert von Winkelgruppen untersucht.

Die Legende des Signifikanzniveaus entspricht folgenden Werten: $***p \leq 0,001$, $**p \leq 0,01$, $*p \leq 0,05$, $p > 0,5$.

3.11. Bildbearbeitung

Die Bildbearbeitung und -zusammenstellung erfolgte mit Fiji und Corel Draw 13. Am häufigsten basieren Übersichtsdarstellungen auf Summationsbildern der einzelnen Aufnahmeebenen. Die Darstellung der Bilder erfolgte ausschließlich nach linearen Adjustierungen von Kontrasten und Helligkeiten.

4. Ergebnisse

4.1. Expression von *Nf2* in *Nf2 Iso1* defizienten Mäusen

4.1.1. Expressionsanalysen von *Nf2* im Kleinhirn auf DNA Ebene

Basierend auf der Expression von Merlin in Neuronen des Zentralnervensystems und initialen *in vitro* Studien, die einen Einfluss von Merlin auf das Fortsatzwachstum zeigten, sollten im Rahmen dieser Arbeit morphologische Änderungen im Kleinhirn von *Nf2 Iso1*^{-/-} Knockoutmäusen analysiert werden. Diese Mäuse können bedingt durch eine genetische Mutation, die bisher noch nicht publiziert worden ist, keine Isoform 1 des Merlin Proteins herstellen. Die Expression des *Nf2 Iso2* Gens sollte hingegen möglich sein. Bei der Analyse der *Nf2 Iso1* defizienten Mäuse wurde auf ein Protokoll zurückgegriffen, das vom Hersteller der Maus (M. Giovannini) in der Riken Datenbank hinterlegt ist (http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/detail.php?reg_no=RBRC01870). Mutmaßlich wurde in dieser Maus das Splicing von Exon 16 verhindert, wodurch dieses Exon abgelesen wird und somit das in Exon 16 befindliche Stopkodon zu einer verkürzten Proteinlänge, der Isoform 2, führt. Die in der Datenbank vorgegebenen Primer binden an den Beginn von Exon 16 und an den Anfangsteil des Introns 16/17, wodurch in Wildtyptieren ein 267 bp großes Fragment generiert wird. Die Mutation führt zu einer Insertion eines DNA Fragmentes und damit zu einem 391 langen DNA Fragment.

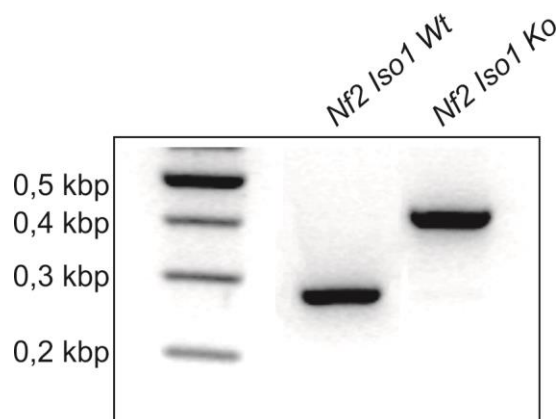


Abb. 5: Genotypisierung transgener Tiere mittels PCR-Analyse von *Nf2 Iso1*^{+/+} (Wt) und *Nf2 Iso1*^{-/-} (Ko) Tieren.

In einem in Abb. 5 gezeigten exemplarischen PCR Gel lassen sich diese Banden sehr gut voneinander trennen. Auffällig war, dass vereinzelt eine schwache Bande bei den Isoform 1 defizienten Tieren erkennbar war, was entweder auf ein Pipettierartefakt oder aber auf eine geringfügige Expression der Isoform 1 hinweisen könnte.

Die bei Riken vorgegebene PCR Analyse der Maus-DNA erzielte folglich die erwarteten Ergebnisse und beweist die genomische Veränderung, erlaubt jedoch nicht die Darstellung der Expression.

4.1.2. Expressionsanalysen von *Nf2* im Kleinhirn auf RNA Ebene

Der Nachweis der *Nf2* Expression wurde durch die Analyse der mRNA mittels reverser Transkription und anschließender PCR erbracht. Die RNA-Expressionsanalyse sollte zeigen, dass das Exon 16 der *Nf2* Iso1 Knockoutmäuse abgelesen wird, wodurch ein längeres RT-PCR Produkt entsteht als bei der natürlich vorkommenden Isoform 1 von Merlin. Bei der Wildtypmaus sollte jedoch neben diesem Exon 16 enthaltenden Fragment zusätzlich ein um das Exon 16 kürzeres Fragment auftauchen. Diese kürzere mRNA kann nur die Isoform 1 repräsentieren, während das längere Fragment nur die Isoform 2 generiert (Abb. 6). Demzufolge ist es möglich, über das Exon 16 beide Isoformen voneinander zu unterscheiden. Da das Exon 16 nur 45 bp lang ist, wurden nur die Exone 12 bis 17 mittels PCR amplifiziert. Somit sollten die resultierenden Fragmente für Isoform 1 und 2 entsprechend 472 bp (Iso1) und 517 bp (Iso2) lang sein.

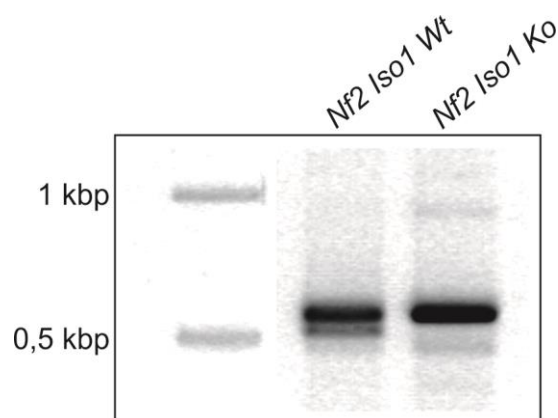


Abb. 6: *Nf2* Genexpression im Kleinhirn *Nf2* *Iso1* defizienter Mäuse. RT-PCR Produkte der Exone 12 bis 17 eines *Nf2* *Iso1*^{+/+} (Wt) und *Nf2* *Iso1*^{-/-} (Ko) Tieres.

Die PCR Analyse von RNA Extrakten aus dem Kleinhirngewebe von Wildtyptieren und *Nf2 Iso1* defizienten Tieren bestätigten diese theoretischen Überlegungen. Die zusätzliche sehr schwache Bande unterhalb der Isoform 1 und Isoform 2 Bande kann entweder Hintergrund darstellen, oder aber auf weitere Splice-Varianten hinweisen, wie sie bei dem Neurofibromatosegen in einer Vielzahl gefunden wurden.

Auf Proteinebene unterscheiden sich die beiden Isoformen 1 und 2 nur um 5 Aminosäuren. Dies ist mit gängigen Methoden nicht nachweisbar, insofern wurde sich hier auf die Daten von anderen Arbeitsgruppen verlassen, die diese Maus bereits genutzt haben (Schulz et al., 2013).

4.2. Makroskopische Darstellung des Kleinhirns von *Nf2 Iso1* defizienten Mäusen

Wie bereits bekannt, findet bei den *Nf2 Iso1* genveränderten Tieren eine normale Entwicklung ohne auffallende Gewichts- und Wachstumsveränderungen im Vergleich zu Wildtyptieren statt. Dies sollte für das Wachstum des Gehirns verifiziert werden. Dazu wurden Gehirne von 8 Tage alten und von adulten Tieren entnommen und digitale Aufnahmen hergestellt (Abb. 7).

Verglichen wurde die mediolaterale sowie craniocaudale Ausdehnung des Kleinhirns. Anhand der Messung der beiden Pärchen entsteht der Eindruck, dass am 8. Tag nach Geburt das Kleinhirn des Knockouttieres kleiner ist, als das des Wildtyptieres und im Erwachsenenalter dieses Verhältnis genau umgekehrt ist (Abb. 7).

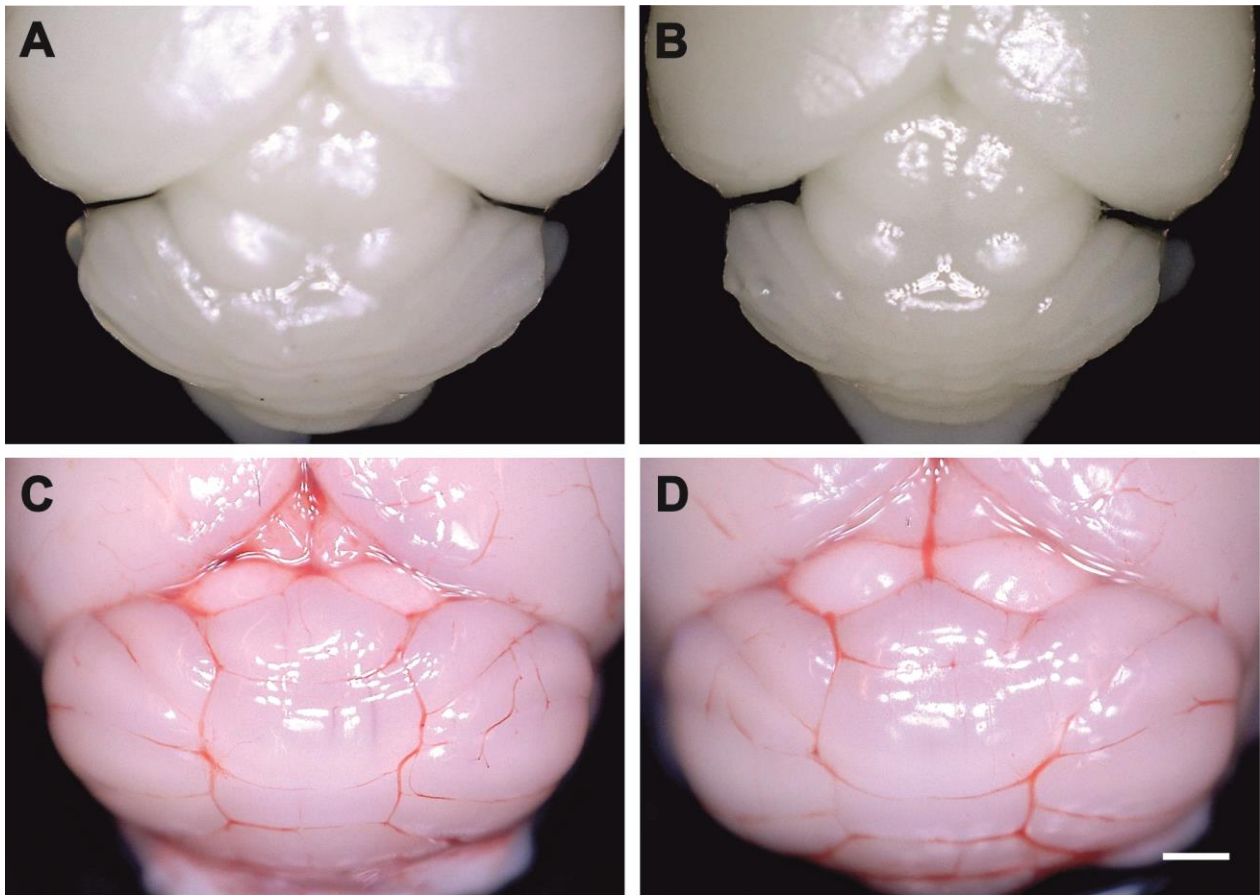


Abb. 7: Vergleichende Darstellung der makroskopischen Kleinhirnanatomie. Dorso-okzipitale Aufnahmen der fixierten Kleinhirne von **A**, P8 *Nf2 Iso1^{+/+}* (Wt), mediolaterale Breite $w_t = 14,2$ mm, craniocaudale Ausdehnung $w_t = 5,6$ mm, **B**, P8 *Nf2 Iso1^{-/-}* (Ko), mediolaterale Breite $k_o = 13,2$ mm, craniocaudale Ausdehnung $k_o = 4,5$ mm sowie unfixierter Kleinhirne von **C**, Adultes *Nf2 Iso1^{+/+}* (Wt)-Tier, mediolaterale Breite $w_t = 16,4$ mm, craniocaudale Ausdehnung $w_t = 8,9$ mm, **D**, Adultes *Nf2 Iso1^{-/-}* (Ko) -Tier, mediolaterale Breite $k_o = 16,4$ mm, craniocaudale Ausdehnung $w_t = 8,9$ mm, (Maßstab 2 mm).

Da diese Messmethode sehr grob ist, wurde zusätzlich die Lobulierung des Kleinhirns genauer untersucht. Dazu wurden Sagittalschnitte aus der Mitte der Vermis hergestellt und mit Kresylviolett gefärbt (Abb. 8). In beiden Genotypen ist bereits bei P8 eine klare Unterteilung des Kleinhirnkortexes in die für ihn typischen Lobuli zu erkennen. Dieses vergleichbare Bild ändert sich bis zum Erwachsenenalter nicht. Sowohl die Anordnung, als auch die Ausdehnung der Lobuli sowie die Fissurentiefe sind unverändert.

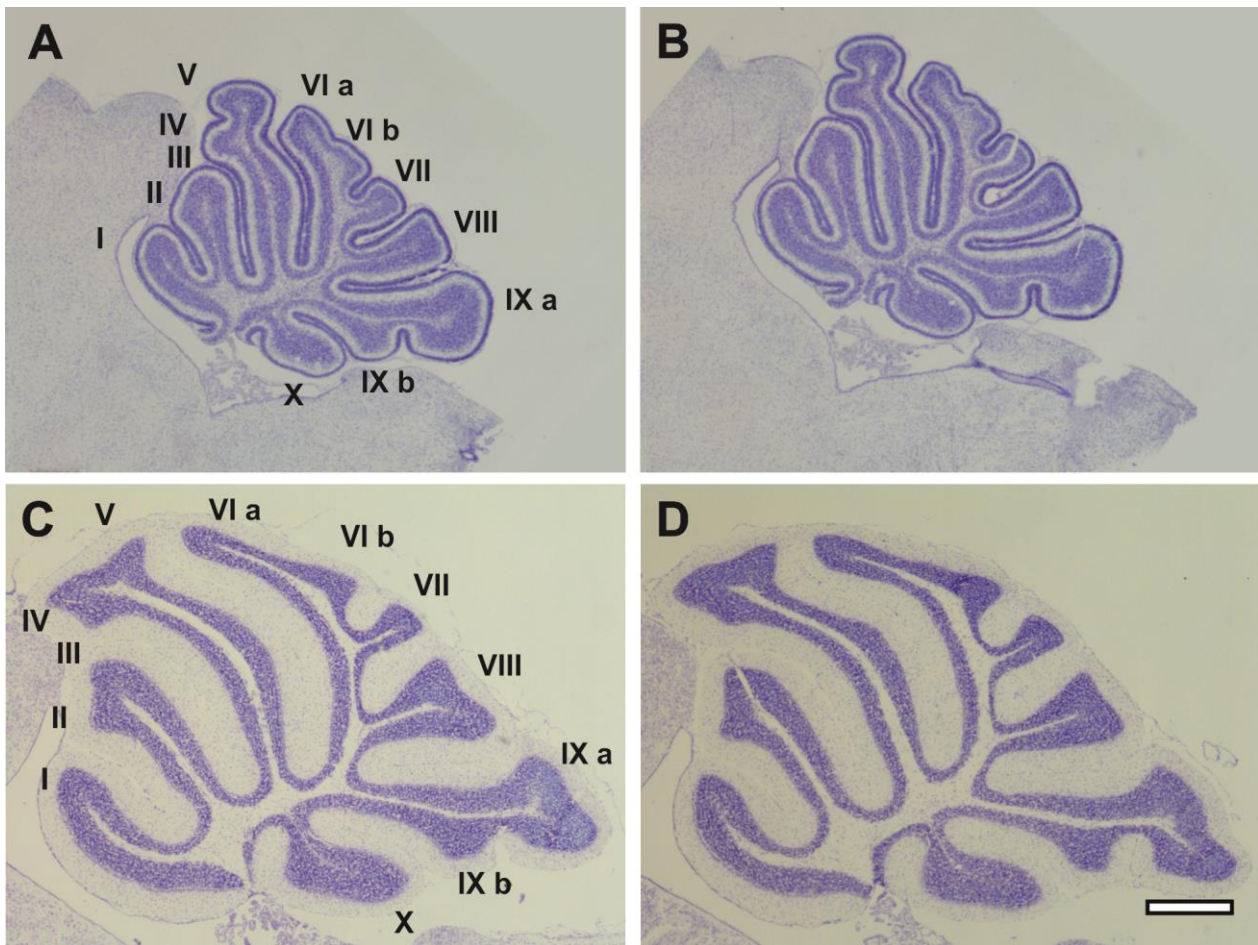


Abb. 8: Lobulierungsmuster sagittaler, vermaler Kleinhirnschnitte. Gezeigt sind Nisslgefärbte Paraffinschnitte im Bereich der Vermis von **A**, P8 *Nf2 Iso1^{+/+}* (Wt), **B**, P8 *Nf2 Iso1^{-/-}* (Ko), **C**, Adulten *Nf2 Iso1^{+/+}* (Wt), **D**, Adulten *Nf2 Iso1^{-/-}* (Ko), -Tieren, (Maßstab 100 µm).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass das Fehlen der Isoform 1 des *Nf2* Gens keinen Effekt auf das Größenwachstum des Kleinhirns hat und die anteroposteriore Kompartimentierung des Kleinhirns unbeeinflusst lässt.

4.3. Einfluss der *Nf2 Iso1* Defizienz auf die Purkinjzellentwicklung

4.3.1. Dichte der Purkinjzellen

Um eine quantitative Aussage über die verschiedenen morphometrischen Parameter der Purkinjzellentwicklung und des Purkinjzeldendritenbaumes treffen zu können, ist die Dichte der Zellen ein erster und oft genutzter Anhaltspunkt.

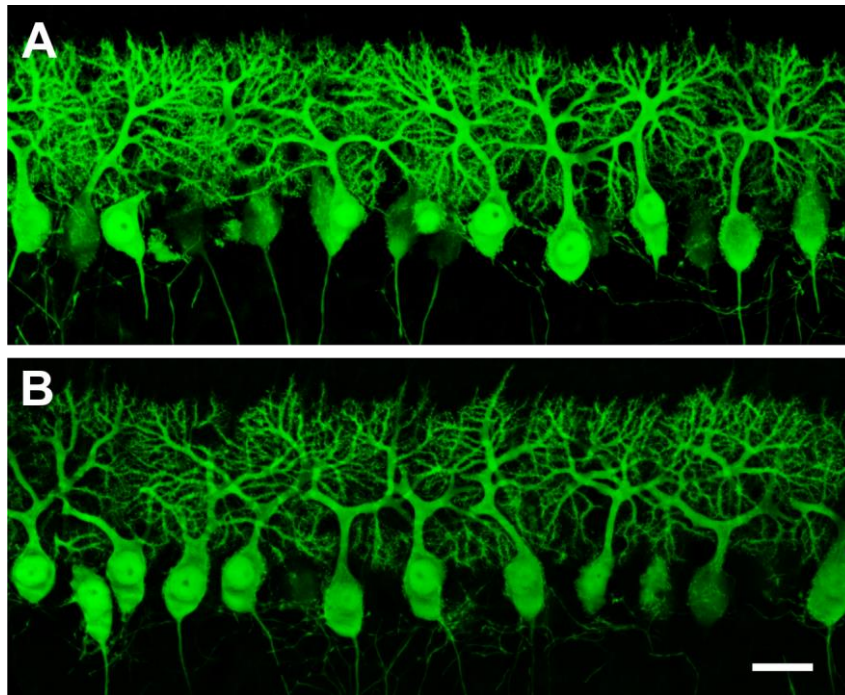


Abb: 9: Einzelschicht-Bildung der Purkinjezellen von acht Tage alten Mäusen. Dargestellt sind Purkinjezellen der Fissur zwischen Lobuli 3 und 4 aus Calbindin gefärbten Vibratomschnitten der Kleinhirne von **A**, *Nf2 Iso1^{+/+}* (Wt), **B**, *Nf2 Iso1^{-/-}* (Ko) - Mäusen (Summationsbilder über 7 Schichtaufnahmen (insgesamt 4,5µm), (Maßstab 25 µm).

Die Dichte der Zellen vermittelt einen Eindruck von der Menge an vorhandenen Zellen, deren Positionierung und der Menge an benachbartem Gewebe (Abb. 9). In jeweils 12 Arealen pro Genotyp wurde die Purkinjezellanzahl bestimmt. Es ergab sich für die 8 Tage alten Wildtyptiere eine Zelldichte von 3,5 Zellen / 100 µm (SE 0,2) und für die Knockouttiere von 3,0 Zellen / 100 µm (SE 0,3). Aus diesen Werten kann man ablesen, dass die Dichte der Purkinjezellen in beiden Genotypen vergleichbar war und somit die Purkinjezellen in korrespondierenden Abschnitten gleichmäßig im Kleinhirnkortex verteilt sind ($n_{wt} = 74$ Zellen auf 2095 µm, $n_{ko} = 59$ Zellen auf 1970 µm, Student t-Test, $p = 0,13$). Zudem ist aus den oben gezeigten Bildern gut zu erkennen, dass die Purkinjezellen in beiden Genotypen in einer für sie typischen monolayer Struktur angeordnet waren. Bei Betrachtung derselben Parameter im adulten Tier konnte ebenfalls kein Unterschied in Purkinjezelldichte, -anzahl und -verteilung festgestellt werden ($Wt = 2,6 \pm 0,1$ Zellen / 100 µm, $Ko = 2,5 \pm 0,1$ Zellen / 100 µm, $n_{wt} = 51$ Zellen auf 1951 µm, $n_{ko} = 51$ Zellen auf 2045 µm, Student t-Test, $p = 0,49$). In beiden Genotypen nahm die Dichte der Zellen über den Zeitraum von P8 bis Adult leicht ab,

was grundsätzlich auf ein Absterben von Purkinjezellen zurückgeführt werden könnte, und/oder auf eine Zunahme von Zellmaterial und extrazellulären Matrixbestandteilen. Beide Hypothesen sind mit Literaturdaten konform, wobei der physiologische Zelltod nach dem Postnataltag 3 vernachlässigbar gering ist (Jankowski et al., 2009), was die Zelltodhypothese unwahrscheinlich macht.

4.3.2. Altersentsprechender Verlauf der Entwicklung

Da das Protein Merlin gerade in den ersten Tagen nach der Geburt vermehrt gebildet wird, also während der Dendritogenese, war diese Phase der Purkinjezellreifung von besonderem Interesse. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich die Purkinjezellen morphologisch gut charakterisieren, da sie auf der einen Seite bereits einen etablierten Stammdendriten ausgebildet haben, auf der anderen Seite jedoch die Differenzierung des Dendritenbaumes erst wenig fortgeschritten ist, so dass mehrere Bäume mit relativ geringem Aufwand immunhistochemisch gefärbt und danach in ihrer gesamten Ausdehnung und Verzweigung analysiert werden können. Anhand der Anzahl der Stammdendriten, seines Verzweigungsmusters, eines darauf basierenden eigenen, neuen Klassifikationssystems, sowie der Größe der Zellsomata, soll im Folgenden eine Aussage über die Entwicklung der *Nf2 Iso1^{-/-}* Purkinjezellen getroffen werden.

Wie in der Einleitung beschrieben, entwickeln Purkinjezellen pränatal eine Vielzahl von Fortsätzen aus, von denen sich aber perinatal die meisten perisomatischen Ausläufer wieder zurückbilden und nur bis zu drei Primäräste am apikalen Zellpol verbleiben. Letztendlich entwickelt sich nur einer zum Stammdendriten. Persistieren mehr als ein Stammdendrit, wird dies als Hinweis der Entwicklungsverzögerung angesehen (Sotelo und Dusart, 2009).

Aus diesem Grund wurde bei den *Nf2 Iso1^{+/+}* sowie bei *Nf2 Iso1^{-/-}* Mäusen zum Zeitpunkt P8 das Verhältnis der mehrstämmigen Zellen gegenüber denjenigen mit einem Stammdendriten ermittelt. Dabei habe ich mich speziell auf die Fissur zwischen den Lobuli 3 und 4 konzentriert, da bekannt ist, dass die Stammanzahl je nach Lobulus stark variieren kann (Nedelescu et al., 2018). Bei den Knockouttieren konnte ein Verhältnis im Mittel von $0,13 \pm 0,07$ von 2 zu 1 Stammdendriten ermittelt werden. Im Vergleich dazu fand sich bei den Wildtyptieren ein ähnlicher Mittelwert von $0,10 \pm 0,05$.

Mehr als 2 Primäräste wurden weder bei der Wildtyp- noch bei der Knockoutmaus gesehen. Somit konnte nach Sotelo keine Entwicklungsverzögerung innerhalb dieser frühen Phase festgestellt werden (Student t-Test, $p = 0,72$, $n_{\text{Zellen Gesamt}} = 125$).

Zudem fanden sich sowohl in adulten Knockout- als auch Wildtyptieren Purkinjezellen mit 2 Primärästen in vergleichbarer Anzahl pro Bildausschnitt ($MW_{\text{Wt}} = 0,04 \pm 0,03$, $MW_{\text{Ko}} = 0,1 \pm 0,05$, Student t-Test, $p = 0,29$, $n_{\text{Ausschnitte, Wt, Ko}} = 12$). Die Zahl 0,04 gibt an, dass nur 4 von 100 Zellen zwei Primäräste aufwiesen.

Als zweiter Ansatz zur Entwicklungsbeurteilung von Purkinjezellen diene ein bereits früher beschriebenes, für meine Arbeit aber spezifisch adaptiertes, Klassifikationssystem der einzelnen Purkinjezellen nach ihrer Dendritenmorphologie. Mit Hilfe dieses Klassifikationssystems soll gerade die Initialphase der Dendritenbaumdifferenzierung direkt nach Etablierung des Stammdendriten feiner untergliedert werden. Der Fokus liegt dabei auf morphologischen Beobachtungen (Wildtypmäuse im Alter von P7-P9) der Dendritenwachstumszone, die bereits 1911 von Addison beschrieben worden war (Addison, 1911). Diese befindet sich am apikalen Ende des Primärdendriten.

So wurde die These aufgestellt, dass in Klasse 1 (Abb. 10 A) die neugebildeten Dendritenäste vor allem radiär von dieser Wachstumszone ausgehen. In Klasse 2 (Abb. 10 B) entsteht aus dieser prominenten Zone die erste große Bifurkation des Dendritenbaumes, charakterisiert durch deutlich erhöhte Dendritenastdurchmesser in der Hauptverzweigung. Im weiteren Verlauf (Klasse 3, Abb. 10 C) verzweigen sich die Dendriten meist ausgehend vom geweihartigen Grundaufbau vermehrt, so dass die Anzahl der Bifurkationen und damit einhergehend die Segmentanzahl stetig zunehmen.

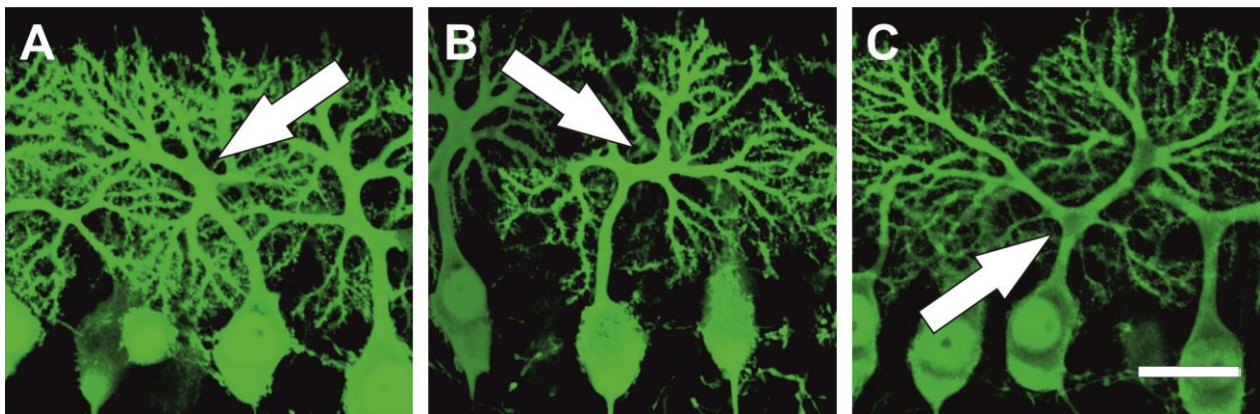


Abb. 10: Klassifizierung der Purkinjezellen nach der Dendritenmorphologie am ersten Aufzweigungspunkt. Dargestellt sind Summationsbilder von Schichtaufnahmen einzelner exemplarischer Calbindin gefärbter Purkinjezellen der Klasse 1 (A), Klasse 2 (B), und Klasse 3 (C), (Maßstab 25 μ m).

In der konkreten Anwendung der Klassifizierung auf ein Zellkollektiv von P7 bis P9 alten Tieren konnte als zeitliches Korrelat der aufgestellten Thesen rein deskriptiv eine Zunahme der Purkinjezellen in Klasse 3 festgestellt werden. Ebenso nahm im Vergleich der gemittelten Prozentzahlen die Anzahl der Klasse 2 Zellen und vor allem der Klasse 1 Zellen zu P9 hin ab (Abb. 11).

Im Vergleich der Genotypen fiel vor allem das Datenmaterial vom Zeitpunkt P8 auf. Hier waren im Knockouttier prozentual mehr weiter entwickelte Stadien der Klasse 3 zu finden. Entsprechend überwog in den Wildtyptieren zu diesem Zeitpunkt die Klasse 1. Einen Tag vorher, an P7, war dies tendenziell bereits sichtbar und auch einen Tag später waren in den Knockouttieren die Purkinjezellen scheinbar weiterentwickelt als in den Wildtyptieren. Diese Beobachtung kann als Hinweis auf eine weiter fortgeschrittene Reifung der Purkinjezellen in *Nf2 Iso1* Knockoutmäusen zu Beginn der ersten Woche nach Geburt interpretiert werden.

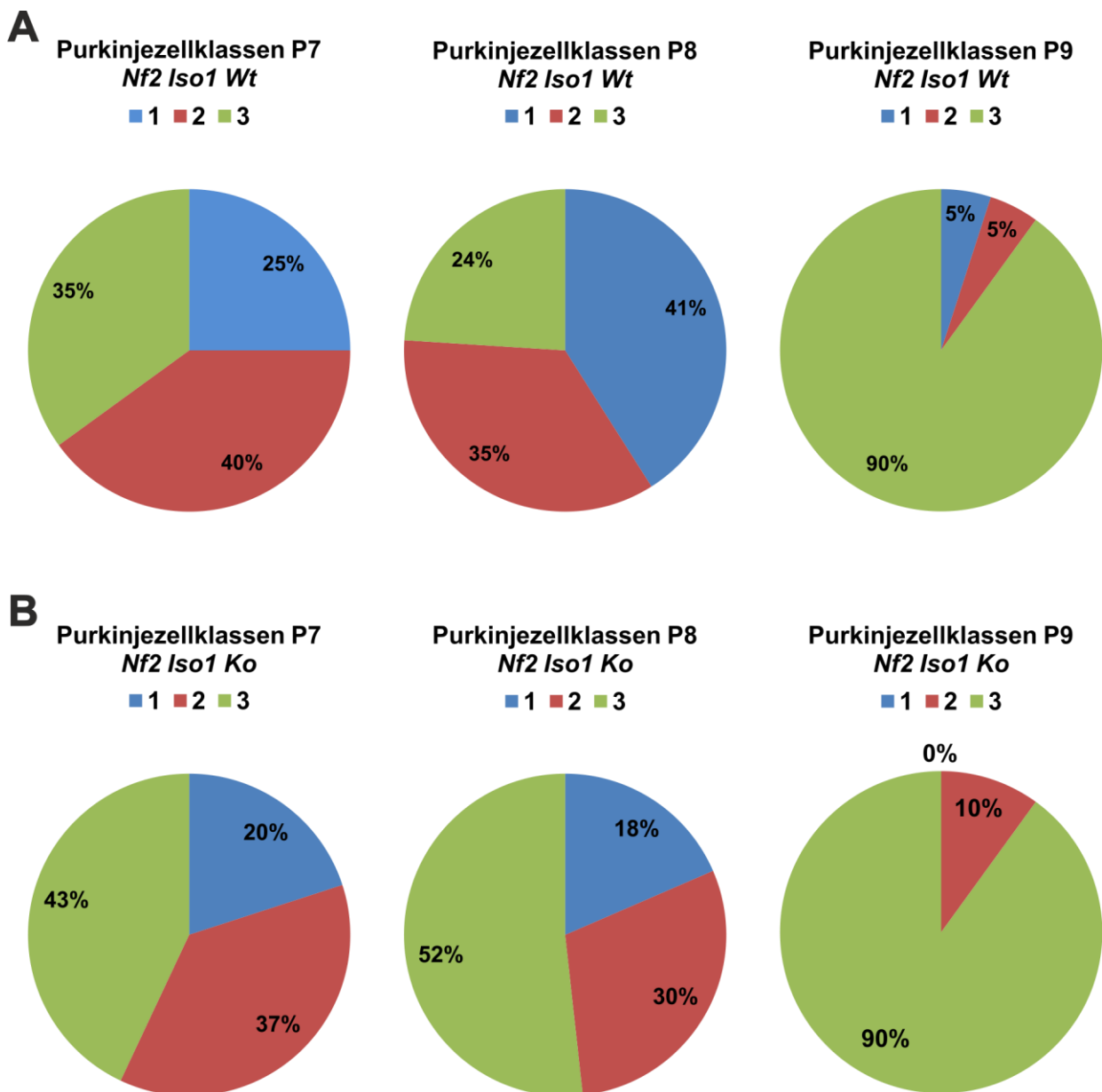


Abb. 11: Prozentualer Anteil der Verteilung der Purkinjezellen innerhalb der 3 Entwicklungsklassen. Gezeigt sind Kreisdiagramme geordnet nach Alter und Genotyp, **A**, obere Reihe *Nf2 Iso1^{+/+}* (Wt) insgesamt 94 Zellen, **B**, untere Reihe *Nf2 Iso1^{-/-}* (Ko), insgesamt 98 Zellen.

Als weiterer Parameter zur Beurteilung der Purkinjezellentwicklungsstadien wurde die Größenzunahme des Somas ausgewertet. Addison protokollierte bereits 1911 bei Ratten ein Wachstum der Zellkörper bis über den 20. Tag nach Geburt hinaus (Addison, 1911). Interessanterweise waren zum Zeitpunkt P8 die Durchmesser der Somata beider Genotypen vergleichbar (Abb. 12 A). Demgegenüber gestellt, zeigte sich jedoch bei den

Purkinjezellkörpern der ausgewachsenen Knockoutmäuse ein um 12 % verkleinerter signifikant unterschiedlicher Durchmesser (Abb. 12 B). Dies mag als geringer Unterschied erscheinen, ist aber durchaus relevant, wenn man beachtet, dass die Purkinjezell-Somata zwischen P8 und Adulttieren um etwa den gleichen Prozentsatz wachsen. Im Gegensatz zu den Wildtyptieren scheinen die Zellkörper der Isoform 1 Knockoutmäuse also nach dem 8. Tag nach Geburt kaum an Größe zuzunehmen.

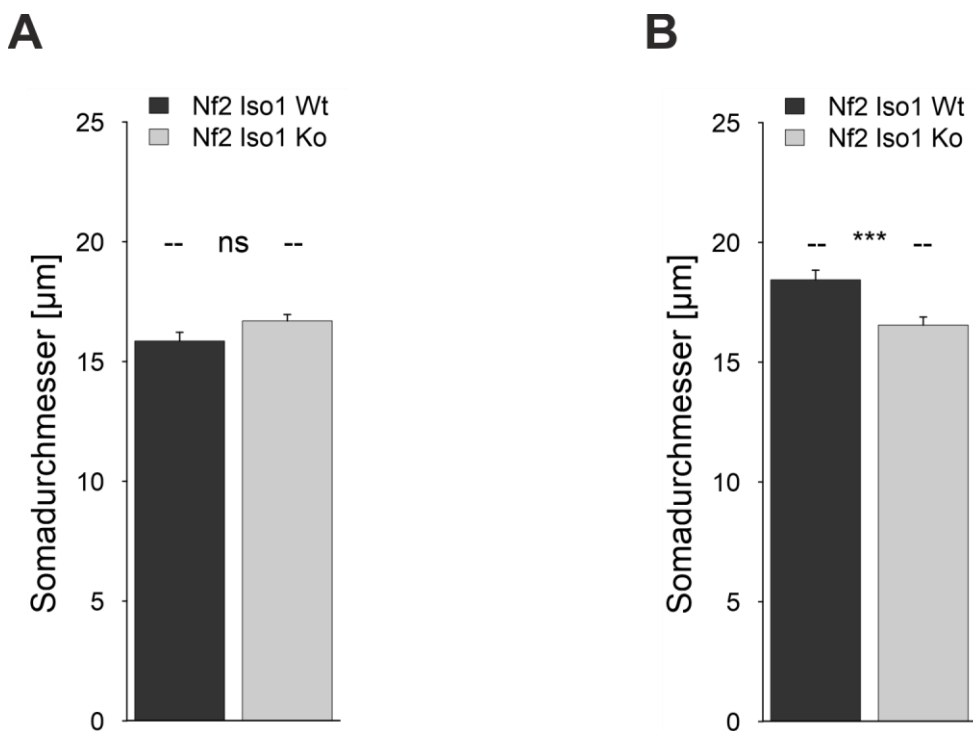


Abb. 12: Somadurchmesser während der postnatalen Entwicklung der Purkinjezellen. Gezeigt ist die Auswertung der Messungen der Purkinjezell-Somadurchmesser am achten Tag nach Geburt und bei adulten Tieren. **A**, P8, ($MW_{Wt} = 15,9 \pm 0,4 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 16,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$, Student t-Test, $p = 0,07$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 30$), **B**, Adult ($MW_{Wt} = 18,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 16,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$, Student t-Test, $***p \leq 0,001$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 30$).

Somit lässt sich zusammenfassen, dass die Purkinjezellen der Knockouttiere zu Beginn der zweiten Woche einen dezenten Entwicklungsvorsprung zeigten, jedoch bis zur Adoleszenz eher in der Differenzierung zurückblieben. Ein ähnliches Phänomen lässt sich auch bei der Betrachtung der Molekularschichtdicke im folgenden Kapitel beobachten.

4.4. Morphometrische Analyse der Purkinjezellen

4.4.1. Molekularschichtdicke

Ein weiterer Parameter, der bei der morphometrischen Analyse von Purkinjezellen genutzt wird, ist die Dicke der Molekularschicht. Diese nimmt von der Geburt über die ersten beiden Entwicklungswochen kontinuierlich zu und vermittelt damit einen guten Eindruck darüber, ob die Dendritogenese regelgerecht und in welcher Geschwindigkeit abläuft.

Die Einzelmessungen der Molekularschichtdicken ergaben für die jüngeren Isoform 1 Knockouttiere eine um 21 % dickere, in den Adulten jedoch eine um 23 % dünnere Schichtdicke als in den altersentsprechenden Wildtypen (Abb. 13). Gerade bei den P8 alten Tieren könnte die Diskrepanz die unterschiedliche Entwicklungsreife zu diesem Zeitpunkt widerspiegeln. Bis in das adulte Alter scheint dieser Vorschub in der Entwicklung der Knockouttiere jedoch äquivalent zur Somagröße nicht weiter zu bestehen. Vielmehr gewinnt man den Eindruck, die Purkinjezellen blieben in der Entwicklung stehen. Detaillierte Aussagen über die Ausdifferenzierung des Dendritenbaumes lassen sich allerdings nur aus der Einzelzellanalyse extrahieren. In dieser ist es möglich, über die Segmentanzahl und die Anordnung der einzelnen Äste im Raum ein Korrelat für die Komplexität und damit die Reife des Baumes zu erhalten.

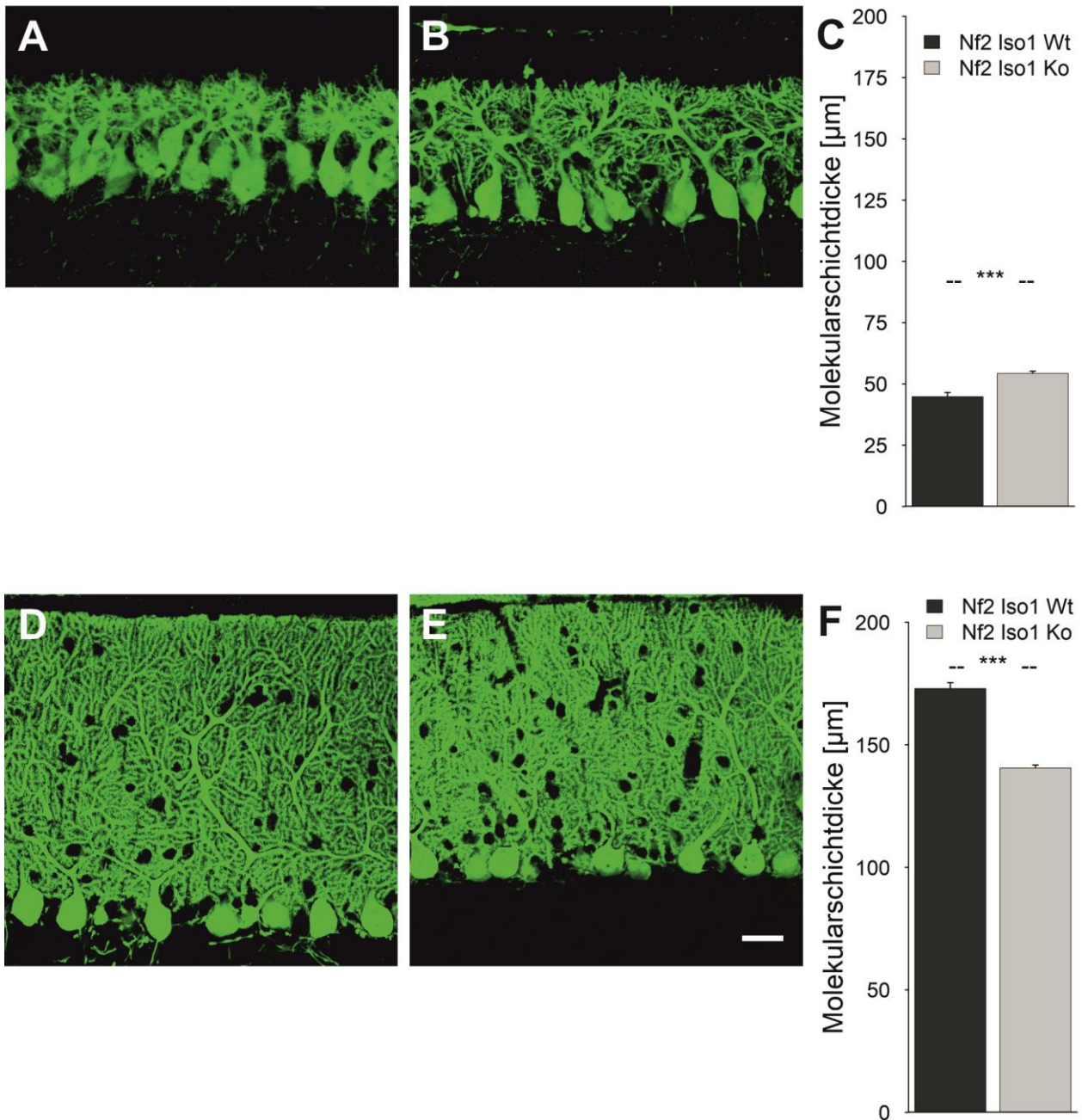


Abb. 13: Dickenmessung der Molekularschicht im Kleinhirnkortex von *Nf2 Iso1* Mäusen. Gezeigt sind Summationsbilder von Schichtaufnahmen Calbindin gefärbter Vibratomschnitte (Maßstab 20 μm). **A**, P8 *Nf2 Iso1*^{+/+}, **B**, P8 *Nf2 Iso1*^{-/-}, **C**, Balkendiagramm P8, ($MW_{Wt} = 44,8 \pm 1,7 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 54,3 \pm 0,9 \mu\text{m}$, Rangsummentest nach Wilcoxon, $***p \leq 0,001$, $n_{\text{Messungen, Wt, Ko}} = 60$), **D**, Adult *Nf2 Iso1*^{+/+}, **E**, Adult *Nf2 Iso1*^{-/-}, **F**, Balkendiagramm Adult, ($MW_{Wt} = 173,0 \pm 2,4 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 140,5 \pm 1,2 \mu\text{m}$, Rangsummentest nach Wilcoxon, $***p \leq 0,001$, $n_{\text{Messungen, Wt, Ko}} = 60$).

Im Folgenden werden nun einige Parameter beschrieben, die Einfluss auf die Molekularschichtdicke haben können und die Morphologie des Dendritenbaums der Purkinjezellen widerspiegeln.

4.4.2. Fläche des Dendritenbaumes

Da die Schichtdicke der Molekularschicht bei P8 vergrößert und in adulten Knockouttieren verkleinert war, wurde in der Folge getestet, ob die Veränderung der Fläche, die von einer Purkinjezelle eingenommen wird, entsprechende Werte aufzeigte. Dafür ist es notwendig, einzelne Purkinjezellen in ihrer gesamten Ausdehnung darstellen zu können. Hierfür habe ich eine Golgi-Färbung etabliert, die genau diese Auswertung erlaubt. Normalerweise breitet sich der Dendritenbaum einer Purkinjezelle nur in der Sagittalebene aus, so dass in Sagittalschnitten der gesamte Bereich der Purkinjezelle dargestellt werden kann. Dicke Schnitte wurden gewählt, um kleinere Variationen bei der getroffenen Schnittebene auszugleichen. Die Schnittebene wurde bereits beim Schneiden kontrolliert, indem darauf geachtet wurde, dass nur solche Präparate für die Analyse benutzt wurden, in der der Aquaeductus mesencephali, der selbst nur um die 100 μm dick ist, auf nur zwei bis drei Schnitten angeschnitten war. Damit kann die Schnittebene um nur 50-100 μm variieren. Bei Nutzung von 100 μm dicken Schnitten bei 8 Tage alten und 140 μm dicken Schnitten bei adulten Tieren für die Analyse ist es also wahrscheinlich, dass eine komplette Purkinjezelle dargestellt werden konnte, Randeffekte ausgenommen. Daher kann über den Flächeninhalt die sagittale Gesamtausdehnung der Purkinjezellen bestimmt werden.

Werden die einzelnen Purkinjezellen der Größe nach geordnet dargestellt (Abb. 14 C, D), so wird die große Heterogenität in der Größe der Zellen deutlich. Es wird aber auch sichtbar, dass die Purkinjezellen von Knockout-Tieren deutlich kleiner sind als die von Wildtyp-Tieren.

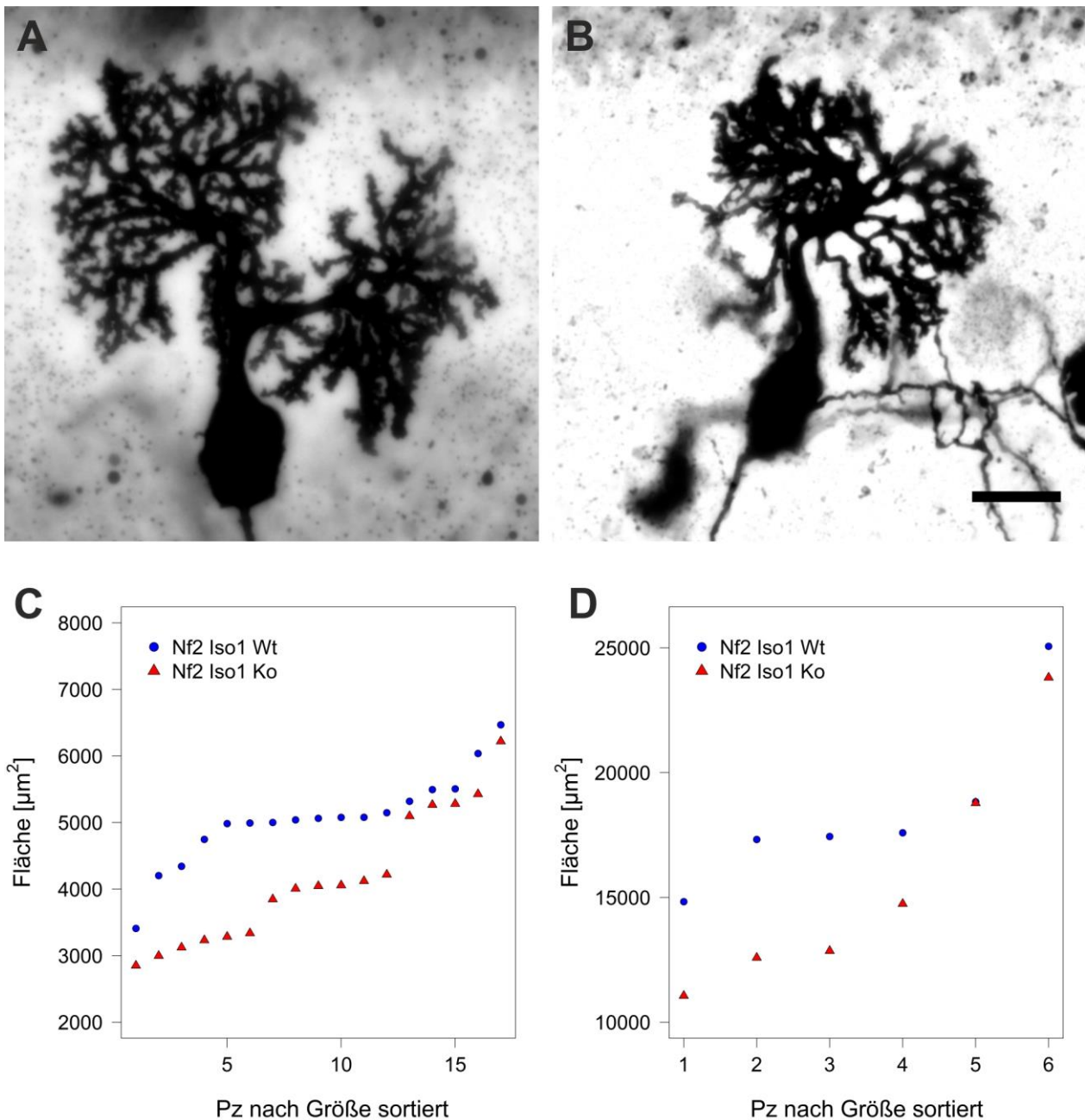


Abb. 14: Ausdehnung des Dendritenbaums von Golgi-gefärbten Purkinjezellen 8 Tage alter Tiere. Gezeigt sind Summationsbilder von Schichtaufnahmen Golgi-gefärbter Kleinhirnschnitte (Maßstab 20 µm). **A**, P8 *Nf2 Iso1^{+/+}*, **B**, P8 *Nf2 Iso1^{-/-}*, **C**, Punktediagramm der Dendritenbaumflächen einzelner Zellen von P8 ($MW_{Wt} = 5053 \pm 166 \mu\text{m}^2$, $MW_{Ko} = 4142 \pm 241 \mu\text{m}^2$, einfaktorische Varianzanalyse, $***p_{\text{Genotypen}} \leq 0,001$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 17$), **D**, Punktediagramm der Dendritenbaumflächen einzelner Zellen von adulten Tieren ($MW_{Wt} = 18511 \pm 1414 \mu\text{m}^2$, $MW_{Ko} = 15640 \pm 1962 \mu\text{m}^2$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 6$, einfaktorische Varianzanalyse, $*p_{\text{Genotypen}} = 0,03$).

Im Vergleich zu den Wildtyptieren nahm der Dendritenbaum der Knockoutmäuse im Mittel am 8. Tag nach der Geburt eine wesentlich kleinere Fläche ein (22 %, Abb. 14 C).

Diese Beobachtung bestätigte sich auch im Größenvergleich der Purkinjezellen von adulten Tieren mit 18 % kleineren Dendritenbäumen (Abb. 14 D).

Da bekannt ist, dass sich der Dendritenbaum postnatal zuerst in die Breite entwickelt, wurde die breiteste Ausdehnung gemessen, die der Baum in Bezug auf die Pia mater erreicht. Damit könnte die Diskrepanz zwischen der größeren Fläche der Dendritenbäume der Wildtyptiere am postnatalen Tag 8 gegenüber der dickeren Molekularschicht der Knockouttiere erklärt werden. Hierbei zeigte sich jedoch kein Unterschied ($MW_{Wt} = 93,1 \pm 3,4 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 87,2 \pm 4,4 \mu\text{m}$, Student t-Test, $p = 0,3$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 17$). Da der Dendritenbaum bei Mäusen nur bis Tag 13 nach Geburt in die Breite wächst und danach nur noch an Höhe zunimmt, sollte sich eine mögliche Differenz auch bei den adulten Tieren als Effekt der ersten 2 Lebenswochen zeigen (Takeda et al., 1992). Auch hier konnte keine Breitenzunahme der Dendritenbäume der *Nf2* defizienten Mäuse nachgewiesen werden ($MW_{Wt} = 151,4 \pm 13,2 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 152,0 \pm 15,6 \mu\text{m}$, Student t-Test, $p = 1,0$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 6$).

Zusammenfassend muss also festgehalten werden, dass es einen nicht aufzulösenden Unterschied zwischen den Messungen der Molekularschicht und der Messung der Ausdehnung einzelner Purkinjezellen gibt. Diese Diskrepanz werde ich in der Diskussion ausführen. Es sei aber darauf hingewiesen, dass dasselbe Phänomen auch bei den Isoform 2 transgenen Tieren beobachtet worden ist.

4.4.3. Komplexität der Dendritenbäume

Die Messung der Molekularschichtdicke und der Größe des Dendritenbaumes sind als sehr grobe Maße zu interpretieren, da hierbei nur die äußeren Enden des Baumes berücksichtigt werden und damit die Aststruktur im inneren Teil des Baumes vollkommen unberücksichtigt bleibt. Daher wurde neben der Ausdehnung der einzelnen Dendritenbäume deren Komplexität über die Anzahl der Verzweigungspunkte analysiert. Je mehr Verzweigungspunkte ein Baum hat, desto mehr einzelne Dendritenäste sind vorhanden. Anhand dieser ist er in der Lage, in alle Richtungen mit den afferenten Neuronen über seine Dornfortsätze in Kontakt zu treten. Zudem kann über eine starke Verzweigung ein dichtes Netz mit kurzen Wegen für die Signalweiterleitung geschaffen werden (Liu und Sanes, 2017).

4.4.3.1 Verzweigungspunkte

Gerade bei den jüngeren Tieren spiegelt der Verzweigungsgrad der Dendriten die Entwicklung einer Purkinjezelle wider. Für die genauen Analysen des Dendritenbaumes konnten im direkten Vergleich der P8 Knockoutmäuse mit altersgleichen Wildtypmäusen keine gravierenden Entwicklungsverzögerungen anhand der Anzahl der Bifurkationen pro Zelle festgestellt werden ($MW_{Wt} = 166 \pm 8$, $MW_{Ko} = 159 \pm 8$, Student t-Test, $p = 0,6$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 17$).

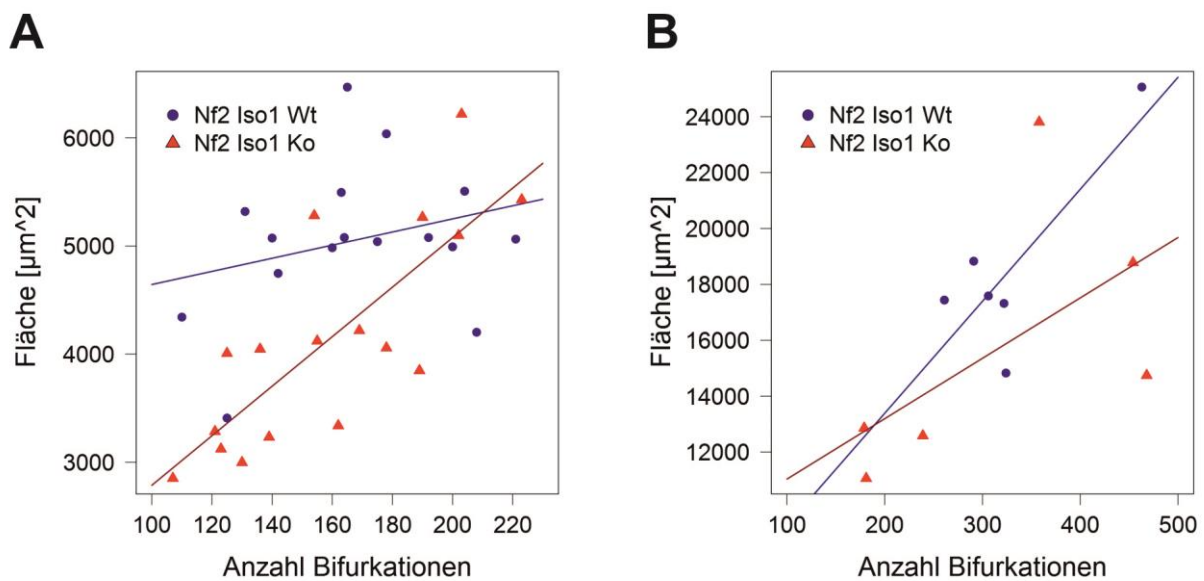


Abb. 15: Darstellung der Anzahl der Bifurkationen im Bezug zu der Ausdehnung des Dendritenbaumes von Golgi-gefärbten Purkinjezellen. **A**, Punktediagramm 8 Tage alter Tiere ($MW_{Wt} = 5053 \pm 166 \mu m^2$, $MW_{Ko} = 4142 \pm 241 \mu m^2$, zweifaktorielle Varianzanalyse, $**p_{Genotypen} = 0,0012$, $***p_{Bifurkationen} \leq 0,001$, $*p_{Bifurkation: Genotypen} = 0,02$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 17$), **B**, Punktediagramm adulter Tiere ($MW_{Wt} = 18511 \pm 1414 \mu m^2$, $MW_{Ko} = 15640 \pm 1962 \mu m^2$, zweifaktorielle Varianzanalyse, $p_{Genotypen} = 0,3$, $p_{Bifurkationen} = 0,5$, $*p_{Bifurkation: Genotypen} = 0,03$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 6$).

Betrachtet man allerdings die Anzahl der Bifurkationen pro Fläche, die der jeweilige Purkinjezellbaum einnimmt, wird deutlich, dass trotz breiter Streuung der Anzahl der Bifurkationen in beiden Mauslinien der Flächeninhalt der 8 Tage alten Wildtypiere weniger schwankt, als bei den Knockouttieren. Dies weist auf eine höhere Variabilität der Isoform 1 Knockouttiere in dieser Entwicklungsstufe hin (Abb. 15 A). In den Wildtypieren scheint hierbei die Dendritenbaumfläche nur gering mit der

Bifurkationszahl zuzunehmen, während in den Knockoutmäusen eine deutlich positive Korrelation existiert ($*p_{\text{Genotypen}} = 0,02$, zweifaktorielle Varianzanalyse). Die Wildtyp-Purkinjezellen scheinen sich also auf kleinem Raum relativ stark zu verzweigen, während bei Knockouttieren gerade bei geringeren Verzweigungsgraden die Dendritenausdehnung entsprechend klein bleibt. In adulten Purkinjezellen scheint sich dieses Bild geradezu umzudrehen, wobei angemerkt werden muss, dass die Anzahl der ausgewerteten Purkinjezellen zu niedrig ist, um eine belastungsfähige Aussage zu treffen ($p_{\text{Genotypen}} = 0,5$, zweifaktorielle Varianzanalyse). Entsprechend ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Flächeninhalten der Purkinjezellen in der zweifaktoriellen Varianzanalyse nachzuweisen (Abb, 15 B). Auffallend ist jedoch auch hier eine große Variabilität der adulten Purkinjezellen der Knockoutiere in Bezug auf die Anzahl der Bifurkationen pro Zelle ($MW_{\text{Wt}} = 327,8 \pm 28,7$, $MW_{\text{Ko}} = 313,2 \pm 53,8$, Levene-Test, $*p = 0,04$, Rangsummentest nach Wilcoxon, $p = 0,8$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 6$).

4.4.3.2 Definition der Dendritenordnungen

Die physiologischen Eigenschaften eines Dendritenbaumes zu definieren, Informationen zu sammeln und bereits in prozessierter Form an die Somata weiterzuleiten, hängt von einer Reihe von Faktoren ab, wie z. B. der Anzahl von Segmenten, der Länge und Dicke von Segmenten sowie deren Verzweigungsgrad. Diese Parameter ändern sich je nach Dendritenordnung. Deshalb wurden die Dendritenbäume von jeweils 6 Purkinjezellen aus adulten Tieren beider Genotypen vollständig und aufwendig 3D rekonstruiert (Abb. 16).

Abhängig von ihrer Lage innerhalb des Dendritenbaumes unterliegen die einzelnen Dendritenäste unterschiedlicher Innervation. So ist bekannt, dass die Stamm-nahen proximalen Äste in adulten Tieren ihre Signale fast ausschließlich von Kletterfasern und die äußeren, peripheren Segmente von den Parallelfasern erhalten. Zudem wächst der Baum primär durch Neubildung von zusätzlichen Segmenten. Nur die proximalen Äste haben die Möglichkeit, innerhalb der ersten Tage nach Geburt, nachdem sie etabliert wurden, an Länge zuzunehmen. Daher erschien es für die Analyse sinnvoll, die jeweiligen Segmente der vollentwickelten adulten Dendritenbäume nach bestimmten Gesichtspunkten zu ordnen. Anhand der 3D Datensätze war es möglich, dezidierte

Aussagen über die Verzweigung, Lage, Länge und Dicke der jeweiligen Äste innerhalb des Baumes zu treffen.

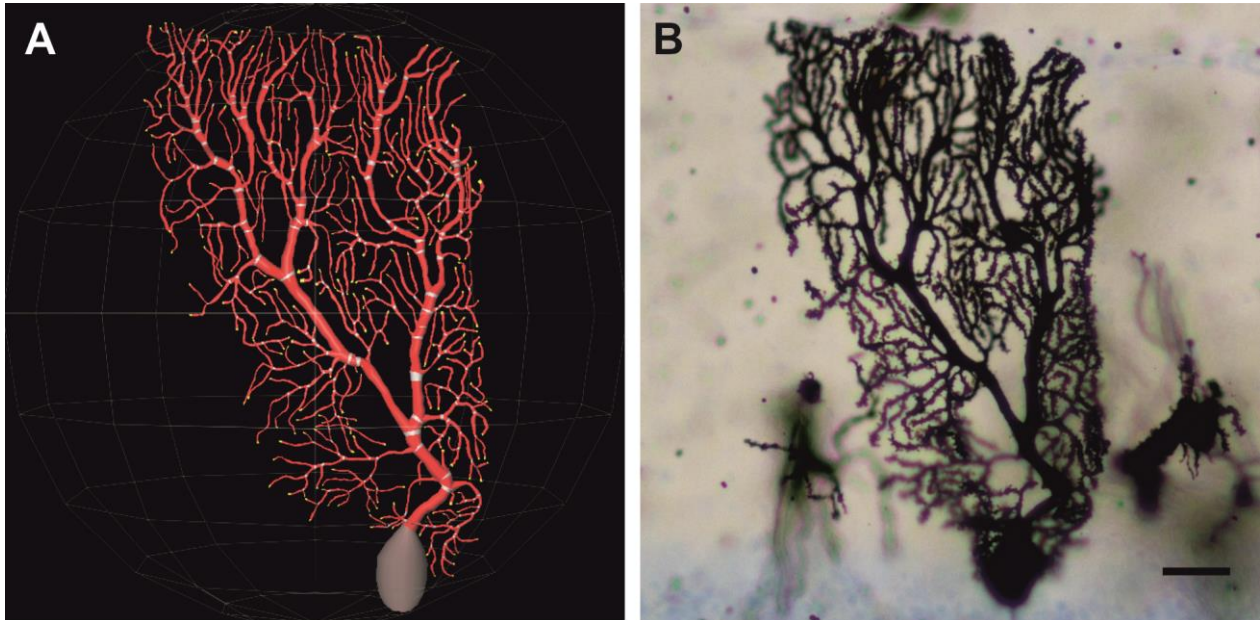


Abb. 16: Übersichtsdarstellung einer kompletten adulten Purkinjezelle eines Wildtyptieres aus der Fissur des Lobulus 4. **A**, Rekonstruierte adulte Purkinjezelle mittels Neuromantic, **B**, Originalabbildung einer Golgi-gefärbten Purkinjezelle, (Maßstab 25 μm).

Über die Verzweigungspunkte ist es möglich, die jeweiligen Dendritenäste bestimmten Dendritenordnungen zuzuweisen. Somit startet man am Stamm mit der Zählung (Dendritenordnung 1) und vergibt ab jeder weiteren Gabelung eine nächst höhere Ordnungsnummer. Äste mit niedriger Ordnungszahl befinden sich somit in der Nähe des Somas (proximal). Je höher die Dendritenordnung des Astes ist, desto weiter distal liegt er und umso mehr Verzweigungen gehen ihm voraus.

Ein alternatives Zuordnungssystem stellt die Methode nach Strahler dar. Hierbei wird genau invers vorgegangen und die äußersten Äste mit der Nummer 1 versehen. Da hier jedoch beim weiteren Vorgehen immer zwischen hinzustoßendem Tochterast und kontinuierlich fortlaufendem Elternast unterschieden werden muss, fand diese Zuordnung hauptsächlich in der manuellen Auswertung Anwendung (Berry und Bradley, 1976). Mit Hilfe des Datenextraktionsprogrammes L'measure konnte eine Strategie gefunden werden, diese inverse Zuordnung nach einem ähnlichen System aus rekonstruierten Purkinjezellen automatisch zu generieren. Das Ordnungssystem ist

angelehnt an die Flussordnungszahl nach Shreve (Shreve, 1966). Dieses Modell dient der Beurteilung der Hydrodynamik von Flüssen zur Bewertung der Wasserabflussmenge nach einer bestimmten Anzahl von Zuflüssen. Somit kann zu jedem Kreuzungspunkt die Menge an summierten Zugängen abgelesen werden. Da auch in der Neurophysiologie alle eingehenden Impulse auf den Dendritenbaum letztendlich über den Dendritenstamm zum Soma gelangen, bietet dieses Modell auch einen praktischen Bezug. Zusammenfassend trägt der Dendritenstamm somit die höchste Ordnungszahl. Diese lässt sich aus der Anzahl der äußersten Äste ermitteln (Abb. 17).

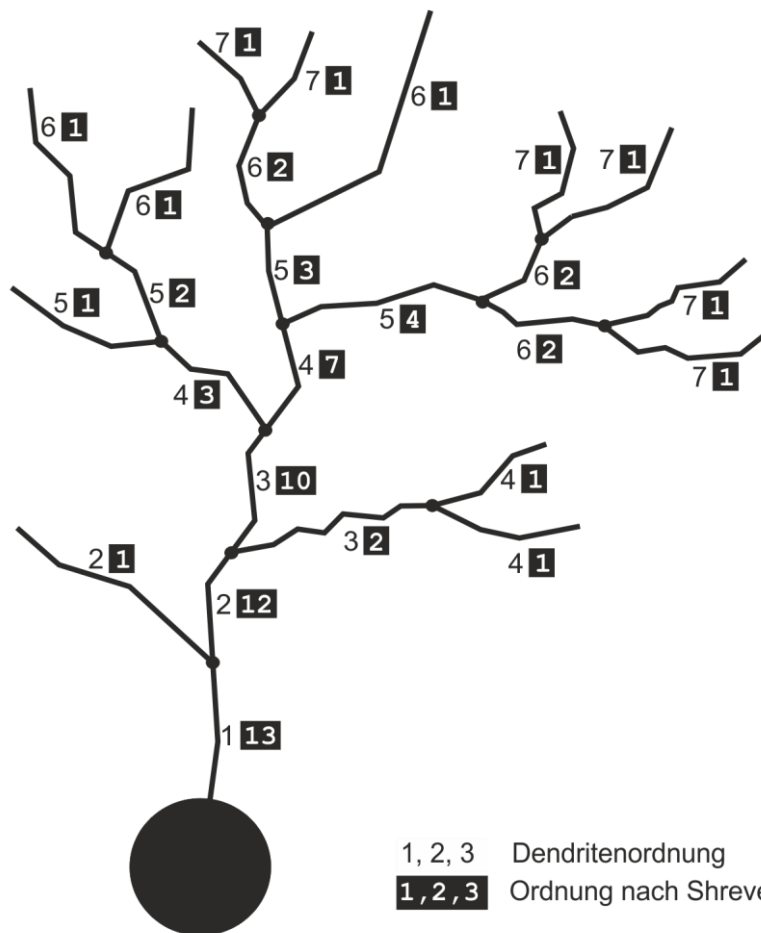


Abb. 17: Systematik der in dieser Arbeit verwendeten Dendritenordnungssysteme.

Neben der Gesamtzahl der Verzweigungspunkte liefert die Verteilung der Dendritenordnungen innerhalb der Baumkronen auch wichtige Hinweise auf die Entstehung neuer Äste. Es kann davon ausgegangen werden, dass nach Entstehung einer neuen Bifurkation das Elternsegment stabil bestehen bleibt. Zudem konnten

Hendelman und Aggerwal in zahlreichen morphologischen Studien eine Persistenz des Grundgerüsts der in den ersten Tagen (z.B. bei P8) entstehenden Dendritenabgänge beobachten. Somit liefert das Verteilungsmuster der Bifurkationen auch Rückschlüsse auf die Lage der Wachstumszonen.

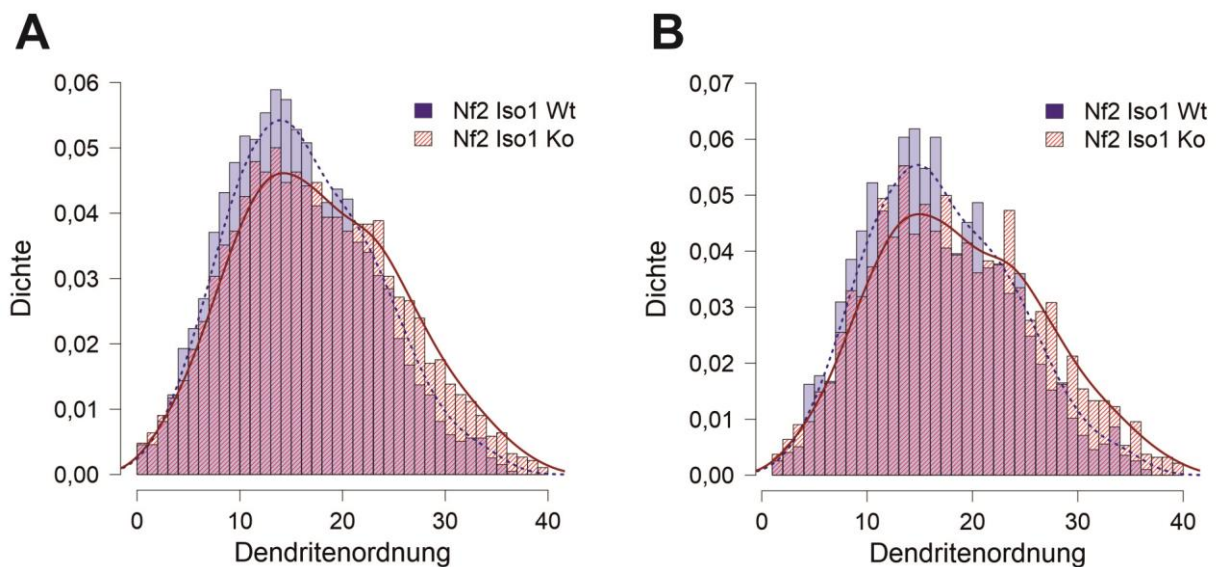


Abb. 18: Häufigkeitsverteilung der Dendritenordnungen adulter Purkinjezellen. **A**, aller Dendritenäste, ($MW_{Wt} = 16 \pm 0,1$, $MW_{Ko} = 18 \pm 0,2$, Rangsummentest nach Wilcoxon, $***p \leq 0,001$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 6$, $n_{Äste, Wt \text{ und } Ko} = 7676$), **B**, nur der terminalen Segmente, ($MW_{Wt} = 17 \pm 0,2$, $MW_{Ko} = 19 \pm 0,2$, Rangsummentest nach Wilcoxon, $***p \leq 0,001$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 6$, $n_{Äste, Wt \text{ und } Ko} = 3854$). Die Linien stellen an die Dichte angepasste Ausgleichskurven dar.

Betrachtet man die Gesamtheit aller Verzweigungspunkte beider Genotypen mit ihren jeweiligen Dendritenordnungen, so ergibt sich ein hochsignifikant verschobenes Verhältnis der Anzahl der Äste hin zu höheren Dendritenordnungen bei den Knockouttieren (Abb. 18). Um zu prüfen, ob sich dieser Effekt auch bis auf die terminalen Dendritenäste auswirkt, wurden diese gesondert untersucht. Auch hier zeigte sich, dass bei den Knockouttieren in den weit distal gelegenen Segmenten höhere Dendritenordnungen existieren. Somit kann von einer verstärkten Neubildung und einem zusätzlichen Wachstumsanreiz für die Dendritenäste in der Peripherie des Baumes in dem Isoform 1 Knockouttier ausgegangen werden.

4.4.4. Längenwachstum im Dendritenbaum/ Lage der Verzweigungspunkte

Neben der Anzahl der Segmente, einhergehend mit deren jeweiligen Verzweigungshäufigkeiten, spielt deren räumliche Anordnung für die Gesamtausdehnung des Dendritenbaumes eine wesentliche Rolle. Die Euklidische Distanz als Maß für den Abstand zwischen Verzweigung und Soma lässt somit Rückschlüsse auf die Lage der Verzweigungen innerhalb des Dendritenbaumes zu. Eine kleinere Distanz weist somit auf frühere und eventuell auch häufigere Verzweigungen hin.

Wenn Purkinjezellen der Knockouttiere häufiger Dendritensegmente höherer Ordnung besitzen, gleichzeitig aber die Dendritenausdehnung kleiner ist, sollten die Abstände der Verzweigungspunkte vom Soma (Euklidische Distanz) in Knockouttieren kürzer sein. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass trotz der breiter gestreuten Gesamtflächen der Purkinjezeldendritenbäume der Knockouttiere, der Euklidische Abstand bei den Wildtyptieren um 17 % signifikant größer war (Abb. 19 A). Auch der Abstand der terminalen Äste zum Soma zeigte sich bei den adulten *Nf2 Iso1^{-/-}* Tieren verkürzt (Abb. 19 B). Die unterschiedliche Steigung der Geraden und damit die Signifikanz im Interaktionsterm zeigt, dass kürzere euklidische Distanzen in höheren Dendritenordnungen von *Nf2 Iso1^{-/-}* Tieren nicht alleine auf den Distanzen in niedrigeren Dendritenordnungen zurückzuführen sind, sondern tatsächlich auch in höheren Dendritenordnungen Unterschiede in den euklidischen Distanzen zwischen Wildtyp- und Knockouttieren vorhanden sind.

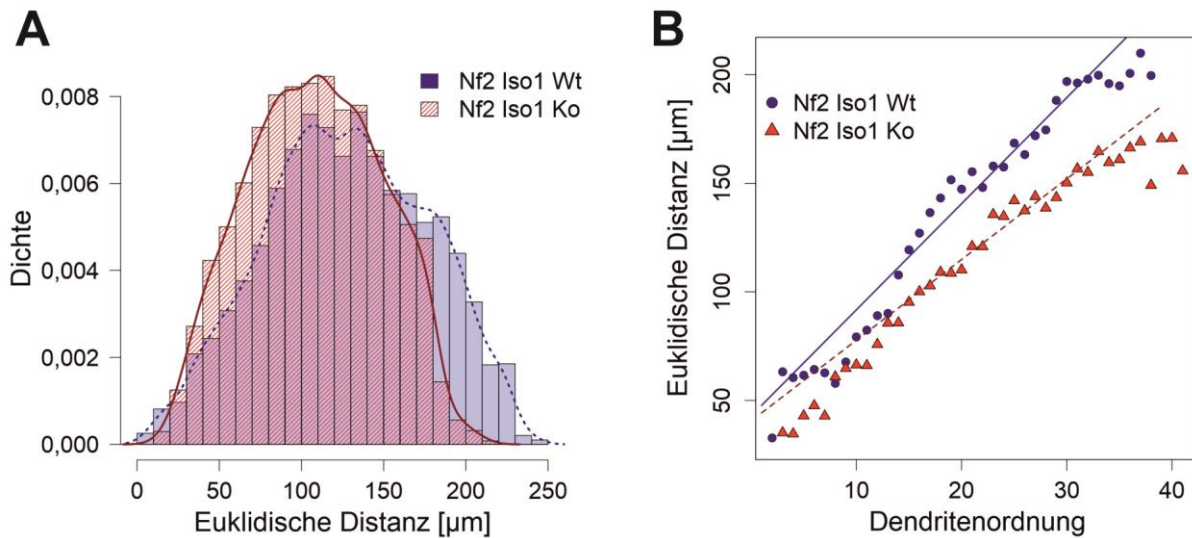


Abb. 19: Vergleich der Euklidischen Distanz zwischen den Verzweigungspunkten und dem Soma von Purkinjezellen adulter Mäuse. **A**, Häufigkeitsverteilung der Abstände aller Verzweigungspunkte zum Soma, ($MW_{Wt} = 127,1 \pm 0,8 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 108,5 \pm 0,7 \mu\text{m}$, Rangsummentest nach Wilcoxon, $***p \leq 0,001$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 6$, $n_{\text{Äste } Wt \text{ und } Ko} = 7676$), **B**, Lineare Darstellung der Mittelwerte der Euklidischen Distanz aller terminalen Segmente ($MW_{Wt} = 130,0 \pm 1,1 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 110,9 \pm 1,0 \mu\text{m}$, zweifaktorielle Varianzanalyse, $***p_{\text{Genotypen}} \leq 0,001$, $***p_{\text{Dendritenordnung}} \leq 0,001$, $***p_{\text{Genotypen}; \text{Dendritenordnung}} \leq 0,001$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 6$, $n_{\text{Äste, } Wt \text{ und } Ko} = 3857$).

4.4.4.1 Pfadlängen

Da die Euklidische Distanz den direkten Weg zwischen zwei Punkten, nicht aber die tatsächliche Länge des Dendritensegmentes beschreibt, wurden zusätzlich die Pfadlängen vom Soma zu den einzelnen Verzweigungspunkten gemessen (Abb. 20 A). Bezugnehmend auf die bisherigen Ergebnisse würde man davon ausgehen, dass die Segmentlängen der einzelnen Dendritenäste in den Isoform 1 Knockouttieren kürzer sein müssten. Erstaunlicherweise zeigt sich hier jedoch in der Häufigkeitsverteilung kein Unterschied (Abb. 20 B).

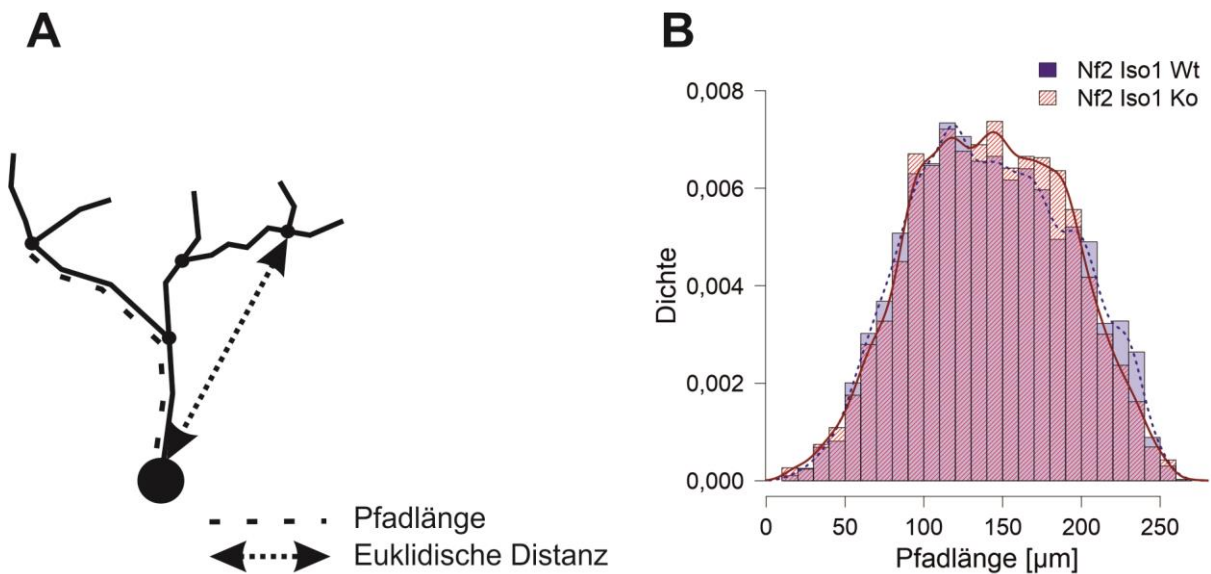


Abb. 20: Pfadlängenmessung von Purkinjezell-Dendritenabschnitten in adulten Mäusen. **A**, Unterschied zwischen Pfadlänge und Euklidischer Distanz (vergleiche <http://cng.gmu.edu:8080/Lm/help/index.htm>), **B**, Häufigkeitsverteilung der Pfadlängen ausgehend von allen Verzweigungspunkten ($MW_{Wt} = 142,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 141,9 \pm 0,8 \mu\text{m}$, Rangsummentest nach Wilcoxon, $p = 0,7$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 6$, $n_{\text{Äste, Wt und Ko}} = 7676$).

Ein Grund hierfür könnte sein, dass in dieser Häufigkeitsverteilung alle Längen subsumiert werden, die zwischen dem Soma und einem beliebigen Verzweigungspunkt auftauchen. Wenn es also lokale Unterschiede gibt, würden diese überdeckt werden. Alternativ könnte man annehmen, dass sich die Dendriten der Purkinjezellen von Isoform 1 Knockoutmäusen in einer kürzeren Distanz vom Soma aufzweigen. Dadurch würde die euklidische Distanz verkürzt, die Pfadlänge aber gleich lang bleiben (Abb. 19 B).

Daraus ergibt sich folgende Fragestellung: Geht dieser proximodistale Unterschied mit der Entwicklung der Purkinjezellen einher? Deshalb wurden dieselben Parameter in 8 Tage alten Mäusen untersucht. Dazu wurden in den jeweiligen Golgi-gefärbten Schnitten repräsentative Pfadlängen ausgewertet, ausgehend jeweils von 5 terminalen Ästen nahe der Pia mater zurück zum Soma. Hierbei zeigte sich eine um 8 % signifikante Längenreduktion in den Purkinjezellen der Isoform 1 Knockoutmäuse ($MW_{Wt} = 90,9 \pm 1,0 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 84,0 \pm 1,3 \mu\text{m}$, Student t-Test, $***p \leq 0,001$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 17$, $n_{\text{Messungen, Wt und Ko}} = 238$). Zudem fällt auf, dass sich die Anzahl der Verzweigungen auf der Pfadlänge nur um eine Dendritenordnung im Mittel

unterscheidet ($MW_{Wt} = 14 \pm 0,2$, $MW_{Ko} = 13 \pm 0,2$, Rangsummentest nach Wilcoxon, $*p = 0,034$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 17$, $n_{Messungen, Gesamt Wt und Ko} = 238$). Rückblickend zeigte sich bereits für die Gesamtzahl aller Verzweigungspunkte der Zellen in adulten Knockouttieren kein Unterschied ($MW_{Wt} = 166 \pm 8$, $MW_{Ko} = 159 \pm 8 \mu\text{m}$, Student t-Test, $p = 0,6$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 17$).

Vergleicht man die Pfadlängen der terminalen Äste nahe der Pia mater der acht Tage alten Tiere mit den dazugehörigen Dendritenordnungen, fällt auch hier auf, dass die Knockouttiere eine kürzere aufsummierte Pfadlänge aufweisen als die Wildtyptiere (Abb. 21 A). Aufgrund des charakteristischen Wachstumsverhaltens des Purkinjezell-dendritenbaumes sollte sich dieser Effekt auch in den adulten Tieren im Bereich der Dendritenordnungen 8 bis 20 wiederfinden und ist auch bereits bei der Auftragung aller Pfadlängen gegen die Dendritenordnungen erkennbar (Abb. 21 B).

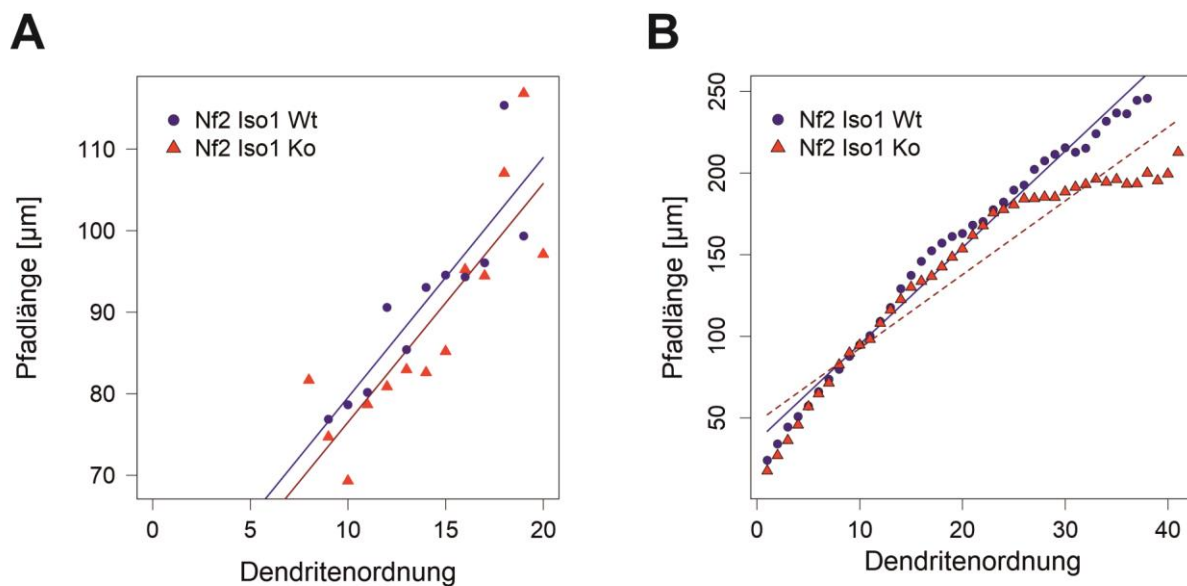


Abb. 21: Vergleich der Pfadlängen ausgehend von terminalen Endästen der acht Tage alten Tiere beziehungsweise aller Verzweigungspunkte der adulten Tiere bis zurück zum Soma. **A**, Punktediagramm der Pfadlängen ausgehend von Pia mater nahen terminalen Ästen 8 Tage alter Tiere nach Dendritenordnung der terminalen Äste sortiert ($MW_{Wt} = 90,9 \pm 1,0 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 84,0 \pm 1,3 \mu\text{m}$, zweifaktorielle Varianzanalyse, $***p_{Genotypen} \leq 0,001$, $***p_{Dendritenordnung} \leq 0,001$, $***p_{Genotypen: Dendritenordnung} = 0,6$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 17$, $n_{Messungen, Gesamt Wt und Ko} = 238$), **B**, Pfadlängen ausgehend von allen Bifurkationspunkten zurück zum Soma ($MW_{Wt} = 142,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 141,9 \pm 0,8 \mu\text{m}$, zweifaktorielle Varianzanalyse, $p_{Genotypen} = 0,1$, $***p_{Dendritenordnung} \leq 0,001$, $***p_{Genotypen: Dendritenordnung} \leq 0,001$ $n_{Zellen, Wt, Ko} = 6$, $n_{Messungen, Gesamt Wt und Ko} = 7696$).

Der Unterschied in den Pfadlängen ist zwischen den Genotypen nicht signifikant, wenn der Rangsummentest nach Wilcoxon genutzt wird, zeigt aber eine Signifikanz unter Verwendung des Kolmogorow-Smirnov-Test ($*p = 0,02$). Während ersterer auf die Rangfolge testet, d.h. Unterschiede im Mittelwert der Pfadlängen aller Dendritenordnungen aufzeigt, zielt der Kolmogorov-Smirnov-Test auf die Verteilung der Pfadlängen ab. Das heißt, im Mittel sind die Häufigkeitsverteilungen der Pfadlängen zwar vergleichbar, jedoch entlang der Dendritenordnungen auch bei den adulten Tieren unterschiedlich (Abb. 22 A und B).

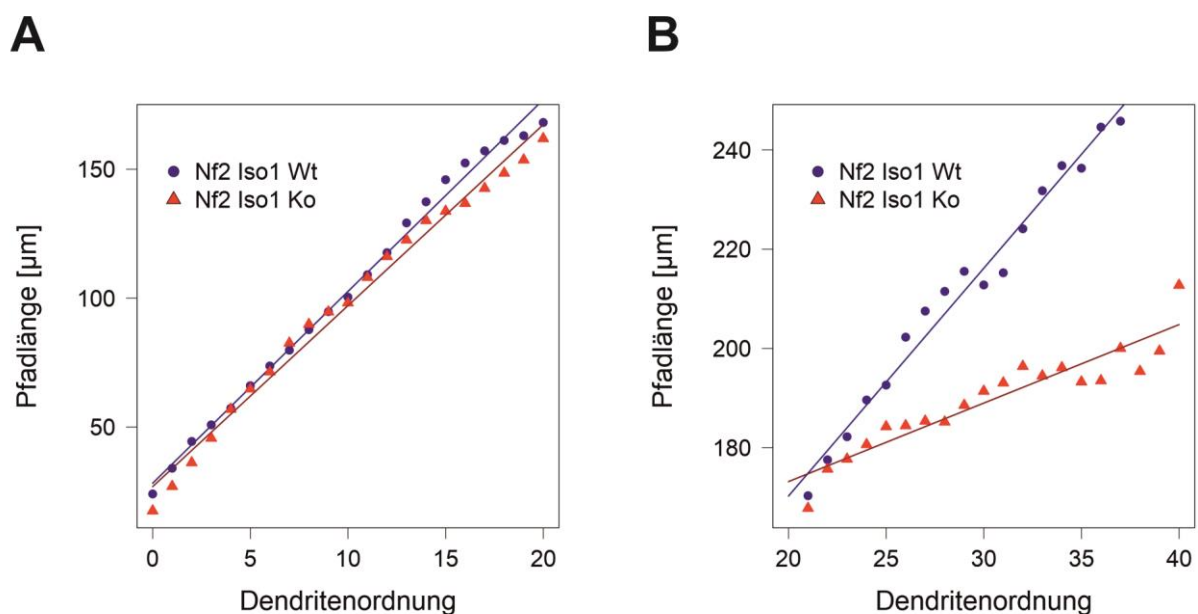


Abb. 22: Aufteilung der Pfadlängen des Dendritenbaumes von allen Verzweigungspunkten zurück zum Soma nach Dendritenordnungen. **A**, Punktediagramm der Pfadlängen der Dendritenordnungen 1 bis 20 spiegeln proximale Baumanteile wider ($MW_{Wt} = 123,4 \pm 0,8 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 115,5 \pm 0,8 \mu\text{m}$, zweifaktorielle Varianzanalyse, $***p_{\text{Genotypen}} \leq 0,001$, $***p_{\text{Dendritenordnung}} \leq 0,001$, $***p_{\text{Genotypen: Dendritenordnung}} \leq 0,001$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 6$, $n_{\text{Messungen, Gesamt Wt und Ko}} = 4952$), **B**, Punktediagramm der Pfadlängen der Dendritenordnungen 21 bis 40 spiegeln distale Baumanteile wider ($MW_{Wt} = 193,4 \pm 1,0 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 183,3 \pm 0,8 \mu\text{m}$, zweifaktorielle Varianzanalyse, $***p_{\text{Genotypen}} \leq 0,001$, $***p_{\text{Dendritenordnung}} \leq 0,001$, $***p_{\text{Genotypen: Dendritenordnung}} \leq 0,001$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 6$, $n_{\text{Messungen, Gesamt Wt und Ko}} = 2424$).

Grenzt man die Verzweigungspunkte anhand der Dendritenordnung auf Werte zwischen 1 und 20 ein (Abb. 22 A), lässt sich auch im adulten Tier ein signifikanter Unterschied der Pfadlängen zwischen den Genotypen wiederfinden, wie er bei den 8 Tage alten Tieren gezeigt wurde (vgl. Abb. 21 A). In der linearen Darstellung zeigt sich zudem in

den höheren Dendritenordnungen eine Abweichung der Pfadlänge zwischen beiden Genotypen. Dies bestätigte sich auch statistisch, wenn nur Werte von Dendritenordnungen größer gleich 21 miteinander verglichen wurden (Abb. 22 B).

4.4.4.2 Segmentlängen

Wenn die Pfadlängen der Dendriten von transgenen *Nf2* Purkinjezellen verkürzt sind, ist anzunehmen, dass auch die einzelnen Segmente in ihrer Länge reduziert sind. Allerdings kann dies auf einzelne Dendritenordnungen beschränkt sein.

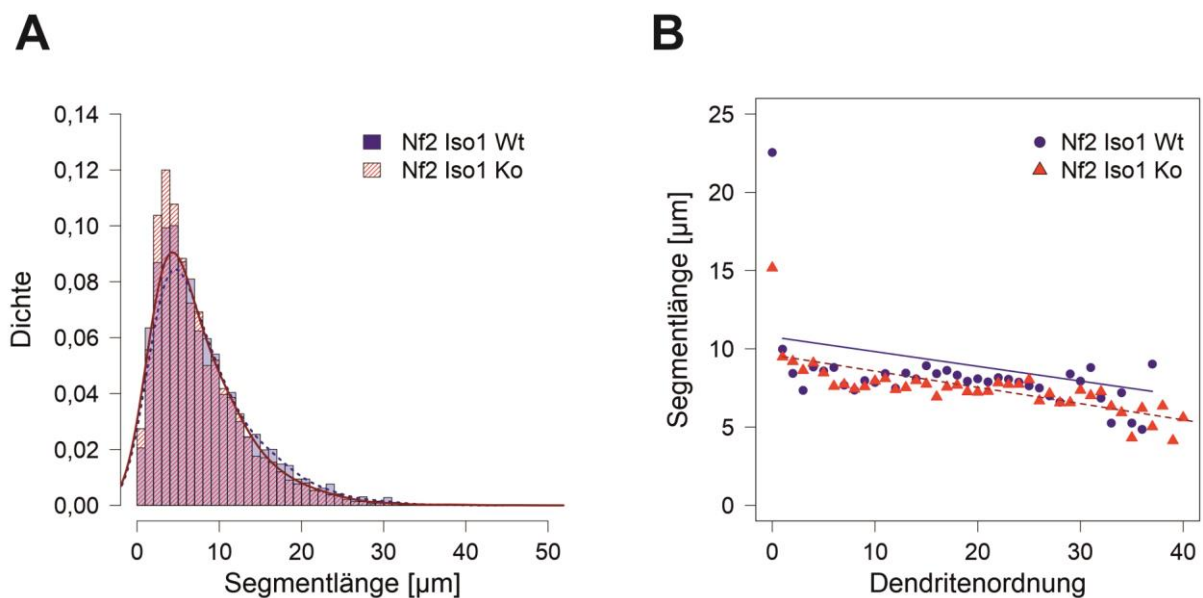


Abb. 23: Vergleich aller Einzelsegmentlängen von Purkinjezellen adulter Mäuse. **A**, Häufigkeitsverteilung aller Segmentlängen, ($MW_{Wt} = 8,08 \pm 0,1 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 7,50 \pm 0,1 \mu\text{m}$, Rangsummentest nach Wilcoxon, $***p \leq 0,001$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 6$, $n_{\text{Messungen, Gesamt Wt und Ko}} = 7696$), **B**, Punktediagramm aller Mittelwerte der Segmentlängen zu ihren Dendritenordnungen, (zweifaktorielle Varianzanalyse, $***p_{\text{Genotypen}} \leq 0,001$, $***p_{\text{Dendritenordnung}} \leq 0,001$, $***p_{\text{Genotypen: Dendritenordnung}} = 0,3$).

Wurden alle Segmentlängen in ihrer Häufigkeitsverteilung zwischen den beiden Genotypen verglichen, so ergab sich im Rangsummentest nach Wilcoxon ein signifikanter Unterschied von 8 % zwischen den Dendritensegmenten von Knockout- und Wildtyp-Purkinjezellen (Abb. 23 A). Werden die Segmentlängen den Dendritenordnungen gegenübergestellt, fällt auf, dass die Mittelwerte der

Stammdendriten (Ordnung 0) von Knockout-Purkinjezellen deutlich kürzer sind, als die der Wildtyp-Purkinjezellen (Abb. 23 B).

Zudem präsentieren sich über alle Dendritenordnungen hinweg, also in den proximalen wie auch in den distalen Abschnitten, die Segmentlängen in den Knockouttieren kürzer (Abb. 23 B).

Mit Hilfe des Ordnungssystems nach Shreve ist es zudem möglich, nur diese Segmente aus den Bäumen zu filtern, die dem Stammgerüst zugeschrieben werden können. Im Vergleich zu den restlichen proximalen und den meisten distalen Ästen können diese auch nach Etablierung weiterwachsen. Vergleicht man so nur die Segmentlängen zwischen Dendritenästen bis zur Dendritenordnung 10 (Ordnungssystem nach Shreve größer 50), zeigen sich auch hier tendenziell verkürzte Segmentlängen im Knockouttier, wobei die Streuung der Einzelwerte so hoch war, dass rechnerisch kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen gezeigt werden konnte (Abb. 24).

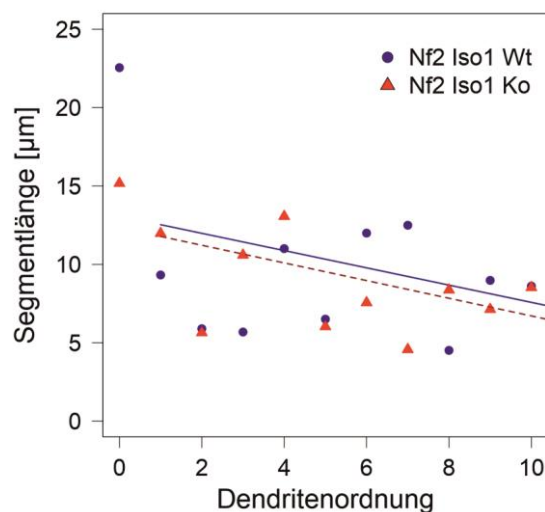


Abb. 24: Korrelation der Segmentlängen zu ihren Dendritenordnungen im Grundgerüst der Zellen, ($MW_{Wt} = 9,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 8,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$, zweifaktorielle Varianzanalyse, $\rho_{\text{Genotypen}} = 0,6$, $*\rho_{\text{Dendritenordnung}} = 0,02$, $\rho_{\text{Genotypen: Dendritenordnung}} = 0,7$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 6$, $n_{\text{Messungen, Wt und Ko}} = 191$).

4.4.5. Orientierung der Bifurkationsäste

Neben den Segmentlängen der Äste sowie deren Anzahl spielt auch die Ausrichtung der einzelnen Dendritenäste im Raum eine wesentliche Rolle für die Leitungseigenschaften

und damit funktionelle Verschaltung und Weiterleitung innerhalb der Dendritenbäume. Der Bifurkationswinkel ist ein Parameter, der die Ausrichtung der einzelnen Dendritenäste in einer Ebene widerspiegelt (Abb. 25 A). Er wird zwischen den beiden Tochterästen einer Bifurkation gemessen. Die Messungen zeigen, dass die *Nf2 Iso1^{-/-}* Mäuse vermehrt größere Winkel zwischen Dendritenästen besitzen als ihre Artgenossen (Abb. 25 B).

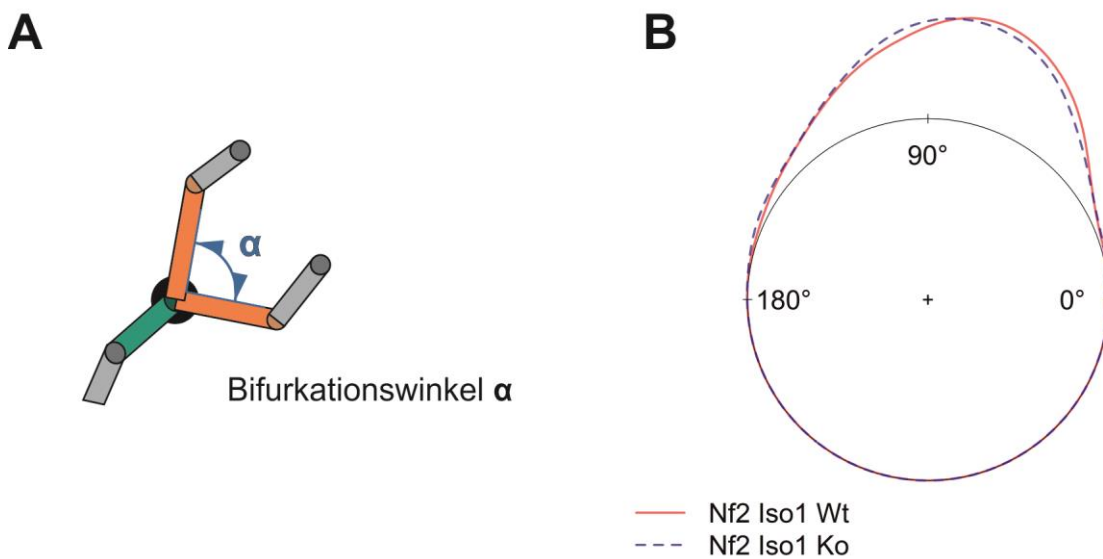


Abb. 25: Bifurkationswinkel als Winkel zwischen den beiden Tochterästen einer Bifurkation. **A**, schematische Darstellung des Bifurkationswinkels (vergleiche <http://cng.gmu.edu:8080/Lm/help/index.htm>), **B**, Häufigkeitsverteilung aller Bifurkationswinkel ($MW_{Wt} = 82,2 \pm 0,6^\circ$, $MW_{Ko} = 84,6 \pm 0,6^\circ$, $Min_{Wt} = 0,5$, $Max_{Wt} = 175,3$, $Min_{Ko} = 4,6$, $Max_{Ko} = 172,0$, Watson-Williams Test, $**p = 0,005$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 6$, $n_{Messungen, Gesamt Wt und Ko} = 3842$).

Noch aussagekräftiger als der Bifurkationswinkel ist der Bifurkationsneigungswinkel. Er repräsentiert nicht nur die Beziehung zwischen zwei Dendritenästen, sondern setzt deren Zwischenwinkel in Bezug zum Ausgangsdendritenast. Somit gibt er zusätzlich Rückschlüsse auf die Ausrichtung beider Tochteräste zum Elternast (Abb. 26 A). Je kleiner die Werte, desto stärker sind die Abgänge innerhalb des Baumes zu den Seiten abgekippt. Daher weisen die geringeren Winkel der Knockouttiere auf eine Dendritenastentwicklung eher in der Horizontalen hin (Abb. 26 B).

Auch bei dem Parameter der Bifurkationsneigung ist es möglich, über die Dendritenordnungen den Baum weiter in proximale und distale Abschnitte zu untergliedern. Fokussiert man sich auf die proximalen Dendritenabschnitte in der Nähe des Soma, also diejenigen mit der Dendritenordnung kleiner gleich 20, bestätigt sich auch in dieser Untergruppe der Wachstumstrend nach lateral, wie im gesamten Baum ($MW_{Wt} = 113,8 \pm 0,7^\circ$, $MW_{Ko} = 109,6 \pm 0,7^\circ$, zweifaktorielle Varianzanalyse, $***p_{\text{Genotypen}} \leq 0,001$, $p_{\text{Dendritenordnung}} = 0,2$, $p_{\text{Genotypen: Dendritenordnung}} = 0,4$ $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 6$, $n_{\text{Messungen, Gesamt Wt und Ko}} = 1282$). In den distalen Anteilen mit Dendritenordnungen ≥ 21 zeigt sich entsprechend ein signifikanter Unterschied ($MW_{Wt} = 114,0 \pm 1,0^\circ$, $MW_{Ko} = 111,1 \pm 0,9^\circ$, zweifaktorielle Varianzanalyse, $*p_{\text{Genotypen}} = 0,04$, $**p_{\text{Dendritenordnung}} = 0,01$, $p_{\text{Genotypen: Dendritenordnung}} = 0,7$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 6$, $n_{\text{Messungen, Gesamt Wt und Ko}} = 3056$).

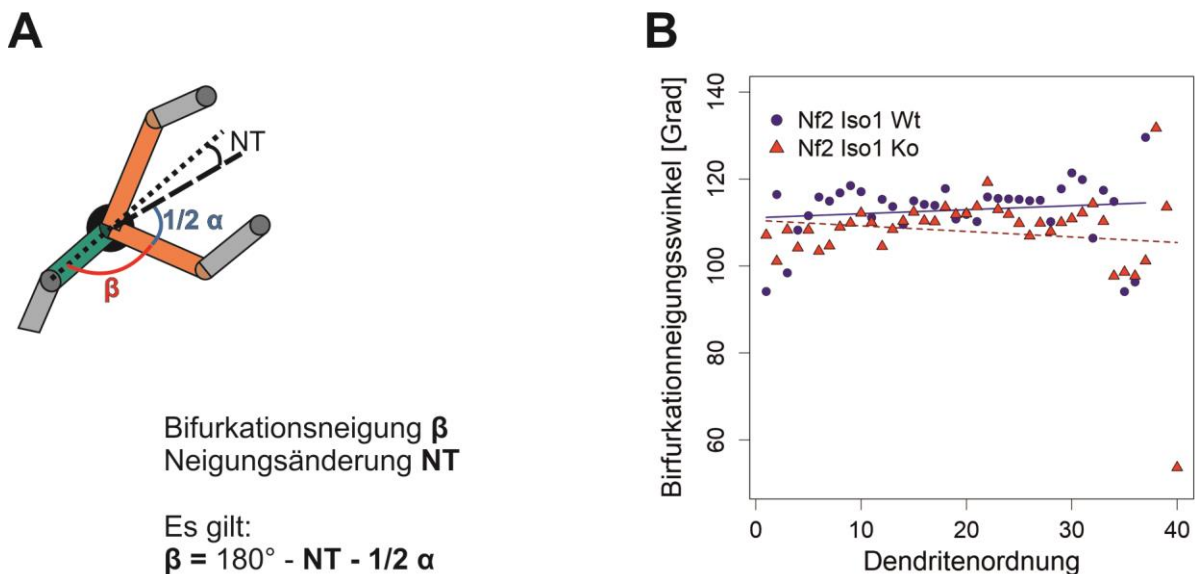


Abb. 26: Bifurkationsneigungswinkel als Ausdruck der Ausrichtung der Tochteräste zum Elternast. **A**, schematische Erklärung des Bifurkationsneigungswinkels mit der Neigungsänderung (NT) als kleinerer Außenwinkel zwischen Elternast und Tochterästen an einer Bifurkation (vergleiche <http://cng.gmu.edu:8080/Lm/help/index.htm>), **B**, Punktediagramm der Mittelwerte aller Bifurkationsneigungswinkel der jeweiligen Dendritenordnungen ($MW_{Wt} = 118,6 \pm 0,7^\circ$, $MW_{Ko} = 114,5 \pm 0,7^\circ$, zweifaktorielle Varianzanalyse, $***p_{\text{Genotypen}} \leq 0,001$, $*p_{\text{Dendritenordnung}} = 0,02$, $p_{\text{Genotypen: Dendritenordnung}} = 0,6$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 6$, $n_{\text{Messungen, Gesamt Wt und Ko}} = 3842$)

Offen bleibt jedoch bei dieser Untergliederung in distale und proximale Anteile des Baumes über die Dendritenordnung, ob sich die nach lateral gerichtete Wachstumstendenz auch in der späteren Entwicklung und damit unter dem Einfluss der Parallelfasern wiederfindet. So ist es entscheidend, nur Dendriten zu analysieren, die sich im Bereich der Endäste befinden. Daher wurden mittels Dendritenordnungssystem nach Shreve durch Selektion aller Werte ≥ 5 hauptsächlich die Endverzweigungen des Baumes herausgefiltert. Auch hier waren die Winkel β in den *Nf2 Iso1* Dendriten der Purkinjezellen von Knockouttieren kleiner als in Wildtyp-Purkinjezellen ($MW_{Wt} = 115,8 \pm 0,7^\circ$, $MW_{Ko} = 111,4 \pm 0,8^\circ$, zweifaktorielle Varianzanalyse, $***p_{\text{Genotypen}} \leq 0,001$, $*p_{\text{Dendritenordnung}} = 0,04$, $p_{\text{Genotypen: Dendritenordnung}} = 0,9$ nZellen, Wt, Ko = 6, nMessungen, Gesamt Wt und Ko = 6165). Da proximale Dendriten frühe Entwicklungsstadien und distale, besonders Endverzweigungen, eher spätere Stadien, repräsentieren, kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass NF2 die Ausrichtung der Dendriten beeinflusst.

Bei der Berechnung der Bifurkationswinkel und Neigungswinkel wurde der Dendritenbaum auf eine zweidimensionale Struktur projiziert. Dies ist eine durchaus sinnvolle Vereinfachung, da sich der Dendritenbaum der Purkinjezellen normalerweise nur in sagittaler Richtung ausdehnt. Betrachtet man den Dendritenbaum von der Seite, also entlang der Sagittalebene, so fällt auf, dass sich der Dendritenbaum von Wildtyp-Purkinjezellen tatsächlich sehr flach und plan darstellt. Diese plane, sagittale Ausrichtung erfährt der Dendritenbaum in der vierten Woche nach Geburt, also gerade nachdem in der dritten Woche ein massives Wachstum an neuen Segmenten stattgefunden hat. Vor der dritten Woche werden Purkinjezellen von mehreren Kletterfasern innerviert und zeigen besonders bei Mäusen, Bäume über mehrere Ebenen (Kaneko et al., 2011). Vergleicht man die frontalen Ansichten von Wildtyp und *Nf2 Iso1* Knockout-Purkinjezellen optisch miteinander, so zeigt sich kein auffälliger Unterschied (Abb. 27).

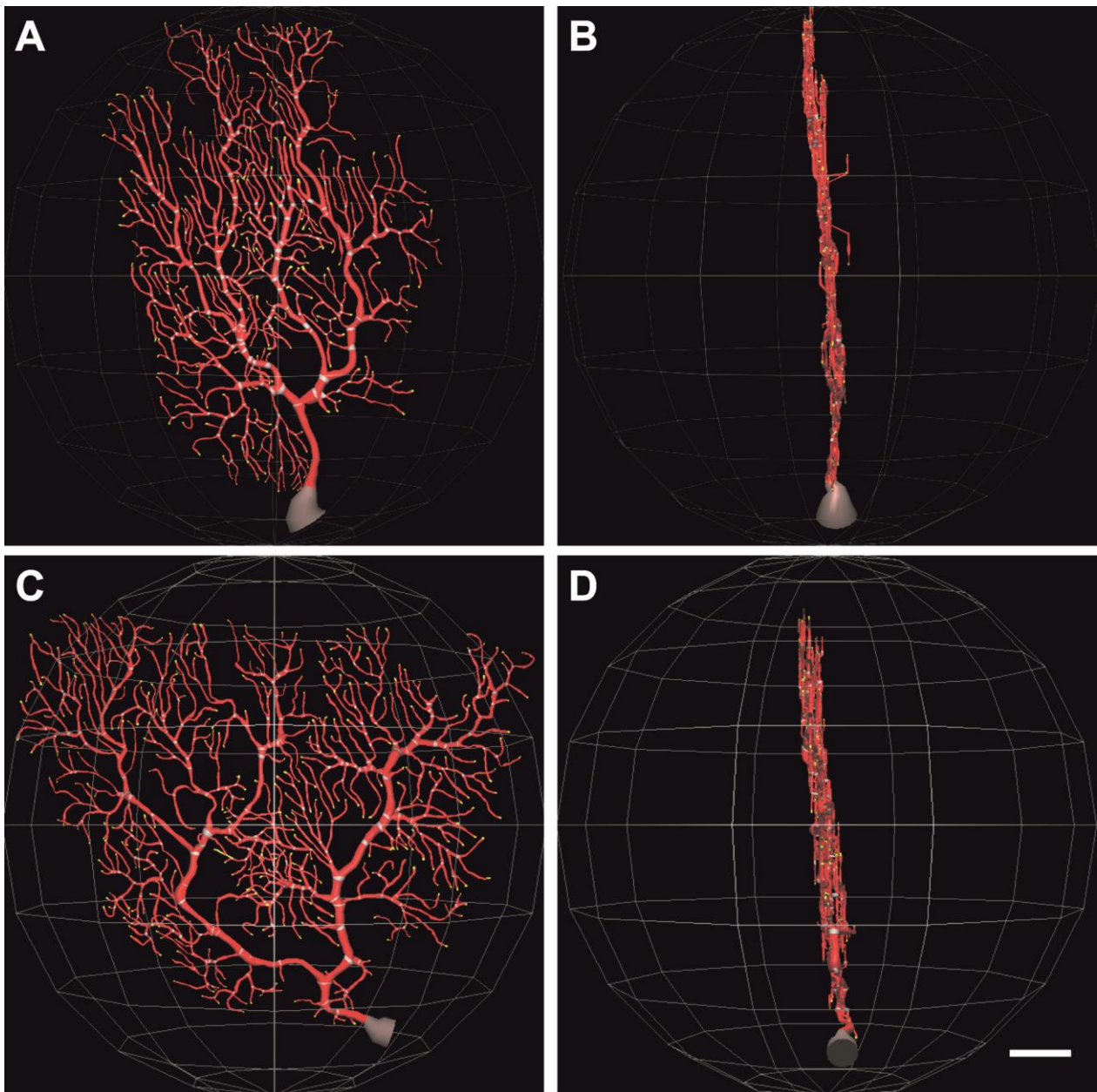


Abb. 27: Rekonstruierte adulte Purkinjezellen. **A**, *Nf2 Iso1* Wt in der sagittalen Ansicht, **B**, *Nf2 Iso1* Wt in der vertikalen/frontalen Ansicht, **C**, *Nf2 Iso1* Ko in der sagittalen Ansicht, **D**, *Nf2 Iso1* Ko in der vertikalen/frontalen Ansicht (Maßstab 25µm).

Diese Ausrichtung in sagittaler Ebene lässt sich auch quantifizieren durch die Messung des Winkels zwischen zwei benachbarten Ebenen einer Astgabel. Das heißt, verglichen werden in diesem Fall nicht die Winkel zwischen zwei Tochterdendriten, oder dem Tochter- zu Elterndendrit, sondern die Winkel zwischen den Ebenen, in der die Tochteräste und die Elternäste liegen. Dieser Parameter soll in der Folge das

Bifurkationsdrehmoment genannt werden (Abb. 28 A). Nehmen die Winkel 180° oder 0° ein, liegen die Ebenen planar.

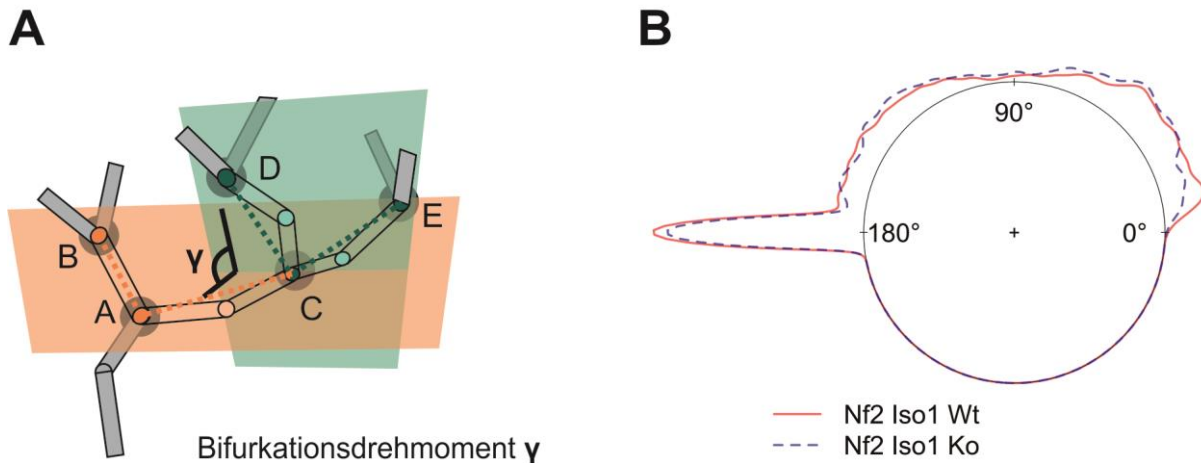


Abb. 28: Bifurkationsdrehmoment als Winkel zwischen den Ebenen der Tochterdendriten und der Ebene der Elterndendriten. **A**, Erklärung zum Bifurkationsdrehmoment γ als Winkel zwischen der Ebene der Elterndendriten (ABC) und der Ebene der Tochterdendriten (CDE) (vergleiche <http://cng.gmu.edu:8080/Lm/help/index.htm>), **B**, Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Bifurkationsdrehmomente von Purkinjezellen adulter Mäuse ($MW_{Wt} = 108,1 \pm 1,7^\circ$, $MW_{Ko} = 109,3 \pm 1,6^\circ$, Watson-Williams Test, $p = 0,6$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 6$, $n_{Messungen, Gesamt Wt und Ko} = 3573$).

Die Bifurkationsdrehmomente sowohl von Wildtyp- als auch von Knockout-Purkinjezellen zeigen eine klare bimodale Verteilung. Wurden die Drehmomente beider Purkinjezellen miteinander verglichen, so zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (Abb. 28 B). Gerade intakte Parallelfaserkontakte mit den Dendritenbäumen sorgen für Planarität. Ist diese Zell-Zell-Kommunikation gestört, nimmt das Bifurkationsdrehmoment Werte kleiner als 180° bzw. größer als 0° an und damit die Ausbreitung des Baumes in die dritte Ebene zu.

4.4.6. Dendritendurchmesser

Ein weiterer wichtiger Parameter für die Leitungsgeschwindigkeit der Dendriten ist deren Dicke. Bereits in der Gegenüberstellung des Gesamtvolumens der Dendritenbäume zwischen adulten Wildtypmäusen und den Isoform 1 Knockoutmäusen fällt in Abbildung 29 der viel volumenreichere Baum der Wildtyptiere auf.

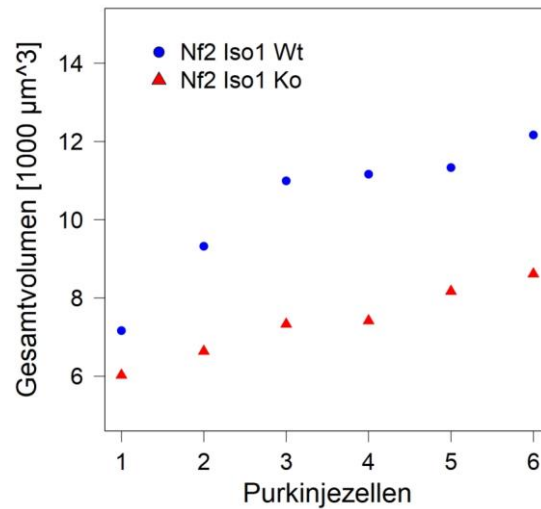


Abb. 29: Gesamtvolumen der einzelnen adulten Purkinjezellen, der Größe nach sortiert ($MW_{Wt} = 10357 \pm 742 \mu\text{m}^3$, $MW_{Ko} = 7366 \pm 389 \mu\text{m}^3$, einfaktorische Varianzanalyse, $***p_{\text{Genotypen}} \leq 0,001$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 6$, $n_{\text{Messungen, Gesamt Wt und Ko}} = 43662$).

Dabei errechnet sich das Gesamtvolumen aus der Addition aller Rekonstruktionszylinder, die im Rahmen der manuellen Rekonstruktion des adulten Purkinjezellendendritenbaumes verwendet wurden.

Auch im Vergleich der einzelnen Rekonstruktionszylinder zwischen beiden Tiergruppen lässt sich feststellen, dass die Isoform 1 Knockouttiere einen geringeren Dendritendurchmesser aufweisen (Abb. 30 A). Setzt man sich jedoch kritisch mit der manuellen Rekonstruktion auseinander, so gilt zu beachten, dass gerade bei den distalen Dendritenästen der Durchmesser durch den dichten Dornfortsatzbesatz schwer auszumachen ist. Daher gehen in die folgende statistische Auswertung nur die proximalen Anteile des Baumes ein. Dementsprechend wurden Rekonstruktionszylinder der Dendritenordnung nach Shreve größer 5 ausgewählt. Auch bei der Fokussierung auf proximale Dendritenabschnitte zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Dendritendicke (Abb. 30 B).

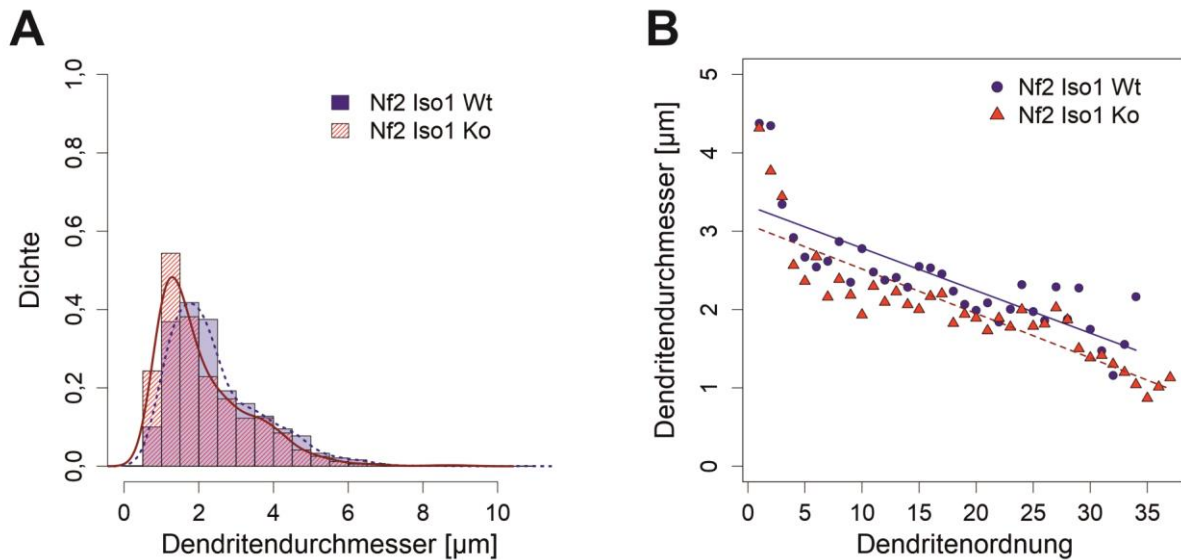


Abb. 30: Darstellung der Dendritendurchmesser von Purkinjezellen adulter Mäuse. **A**, Häufigkeitsverteilung der Dendritendurchmesser aller Segmente ($MW_{Wt} = 1,3 \pm 0,0050 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 1,2 \pm 0,0053 \mu\text{m}$, Rangsummentest nach Wilcoxon, $***p \leq 0,001$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 6$, $n_{\text{Messungen, Gesamt Wt und Ko}} = 43662$), **B**, Lineare Darstellung der proximalen Segmente (Dendritenordnung nach Shreve über 5), ($MW_{Wt} = 2,5 \pm 0,005 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 2,1 \pm 0,005 \mu\text{m}$, zweifaktorielle Varianzanalyse, $***p_{\text{Genotypen}} \leq 0,001$, $***p_{\text{Dendritenordnung}} \leq 0,001$, $**p_{\text{Genotypen:Dendritenordnung}} = 0,007$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 6$, $n_{\text{Messungen, Gesamt Wt und Ko}} = 6509$)

4.4.7. Mögliche Auswirkungen auf die Elektrophysiologie: Rall Power

Die Leitungseigenschaften eines Dendriten werden im Wesentlichen von der Dendritendicke, der Dendritenlänge und dem Verzweigungsgrad des Baumes bestimmt. Bereits 1959 erstellte Wilfrid Rall ein Neuronenmodell, das den Dendritenbaum als Zylinder-röhrensystem dargestellt, in dem eine optimale Signalweiterleitung dann gewährleistet ist, wenn sich die Durchmesser von einem Eltern- und den beiden Tochterdendriten potenziert mit der sogenannten Rall-Power entsprechen (Rall, 1959; Scorcioni et al., 2008). Die Rall-Power ist demnach ein Zahlenwert (n), der einen Wert zwischen 1 und 5 einnehmen kann, in der Regel aber um den Wert 1,5 ($3/2$) liegt. Diese von Rall eingeführte Kabeltheorie ist heute Basis vieler Modelldatenbanken und der computergestützten neurowissenschaftlichen Forschung (Scorcioni et al., 2008) (Abb. 31 A).

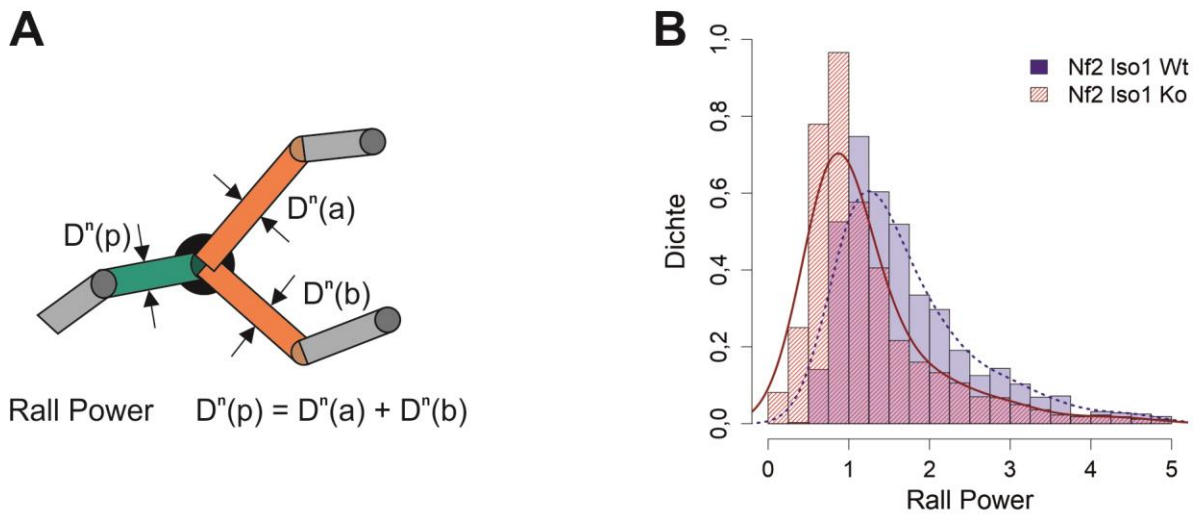


Abb. 31: Darstellung der Rall Power als Parameter aus der Elektrophysiologie von Purkinjezellen adulter Tiere. **A**, Erklärung der Rall Power n , D entspricht dem Durchmesser des Rekonstruktionszylinders an der Bifurkation des Elternastes (p), der beiden Tochteräste (a und b) (vergleiche <http://cng.gmu.edu:8080/Lm/help/index.htm>), **B**, Häufigkeitsverteilung der Rall Power Werte an den Dendritenverzweigungspunkten ($MW_{Wt} = 1,72 \pm 0,023$, $MW_{Ko} = 1,23 \pm 0,019$, Rangsummentest nach Wilcoxon, $***p \leq 0,001$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 6$, $n_{Messungen, Gesamt Wt und Ko} = 3055$).

Statistisch zeigt sich eine signifikant niedrigere Rall Power in den *Nf2 Iso1* Knockouttieren mit 1,23 im Gegensatz zu den Wildtyptieren mit 1,72. Geht man von einem optimalen Wert von 1,5 aus, wären die Leitungseigenschaften der Wildtyp-Dendriten vom Optimum um die Differenz von 0,2 abweichend, die Rall Power der Knockout-Dendritenbäume aber vom Wildtyp-Wert um die Differenz 0,4. Daraus lässt sich ableiten, dass sich die Signalweiterleitung in den Purkinjezellen der Knockouttiere deutlich von denen der Wildtyptiere unterscheidet.

4.5. Dornfortsatzwachstum der Purkinjezellen

Der hochkomplexe Dendritenbaum der Purkinjezellen dient der Signalweiterleitung, wohingegen jedoch die Signalübertragung zwischen den einzelnen Nervenzellen über Hunderttausende von Dornfortsätzen als Ausstülpungen der Dendriten und über deren synaptischen Spalt mit Neurotransmittern vonstattengeht. Jeder dieser Dornfortsätze besteht aus einem längeren oder kürzeren Hals sowie kleineren oder größeren Köpfen (Abb. 32 A und B, Abb. 33 A und B). Im Lichtmikroskop sind ihre Morphologie mittels der

Golgi-Färbung nur eingeschränkt beurteilbar, da man hier an die optische Auflösungsgrenze stößt. Möchte man die genaue Struktur der Dornfortsätze analysieren, gerade auch in Hinblick auf seine biochemischen Eigenschaften, so lassen sich z.B. die post-synaptische Dichte oder sogar einzelne Vesikel mit ihren Neurotransmittern am Kopf der Dornfortsätze nur unter dem Elektronenmikroskop beurteilen.

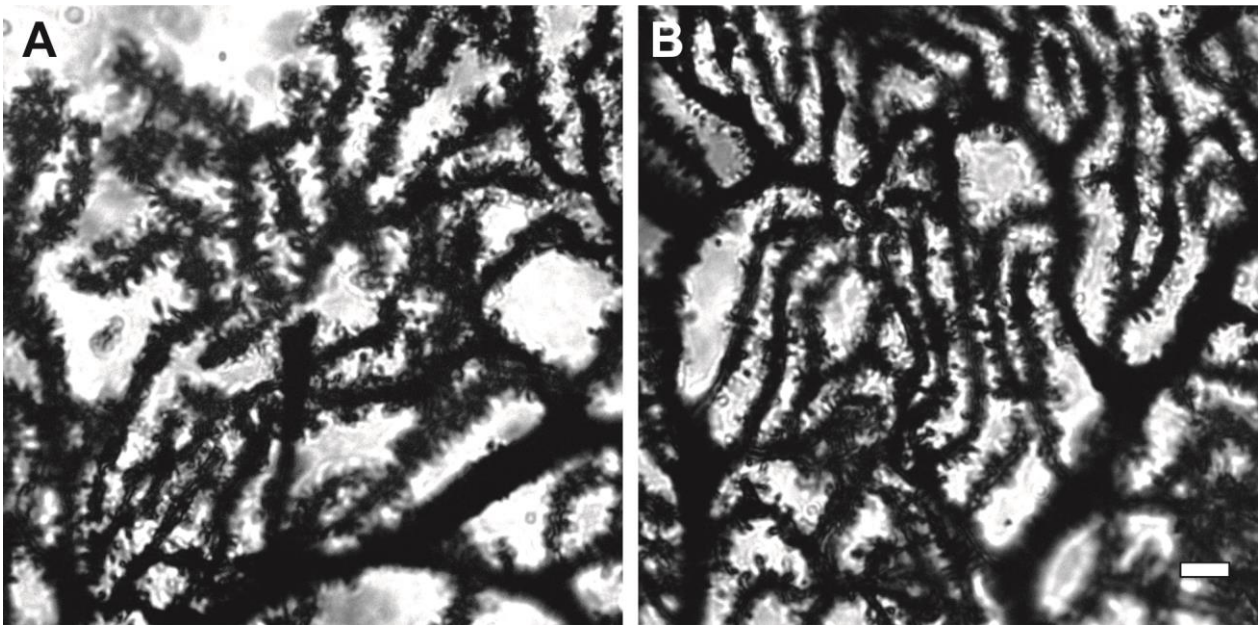


Abb. 32: Feiner Besatz des Dendritenbaumes mit Dornfortsätzen von Golgi-gefärbten Purkinjezellen adulter Tiere des Lobulus 4. **A**, *Nf2 Iso1^{+/+}*, **B**, *Nf2 Iso1^{-/-}*, (Maßstab 10 μm).

Jedoch lässt sich aufgrund der Anzahl der Dornfortsätze auf einem einzelnen Dendriten auch unter dem Lichtmikroskop ein Eindruck über deren Dichte gewinnen. Zählungen über eine Distanz von 10 μm der Dornfortsätze paramedian der Dendriten haben einen um etwa 10% signifikanten niedrigeren Besatz mit Dornfortsätzen in den *Nf2 Iso1* defizienten Purkinjezellen im Vergleich zu denen der Wildtypiere ergeben ($MW_{\text{Wt}} = 2,4 \pm 0,08 / \mu\text{m}$, $MW_{\text{Ko}} = 2,2 \pm 0,09 / \mu\text{m}$, Student t-Test, $*p = 0,038$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 6$, $n_{\text{Messungen, Gesamt Wt und Ko}} = 46$). Neben dem Besatz der Dornfortsätze auf den Dendritenästen kann auch deren Länge des Halses bestimmt werden. Hierbei zeigte sich ein nicht auflösbarer Unterschied ($MW_{\text{Wt}} = 1,2 \pm 0,02 \mu\text{m}$, $MW_{\text{Ko}} = 1,2 \pm 0,02 \mu\text{m}$, Student t-Test, $p = 0,26$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 6$, $n_{\text{Messungen, Gesamt Wt und Ko}} = 821$). Wohingegen

sich bei den Messungen der Kopfdurchmesser ein Unterschied abzeichnet. So lassen sich signifikant größere Dornfortsatzkopfdurchmesser bei den *Nf2 Iso1* Knockouttieren finden (Abb. 33 C).

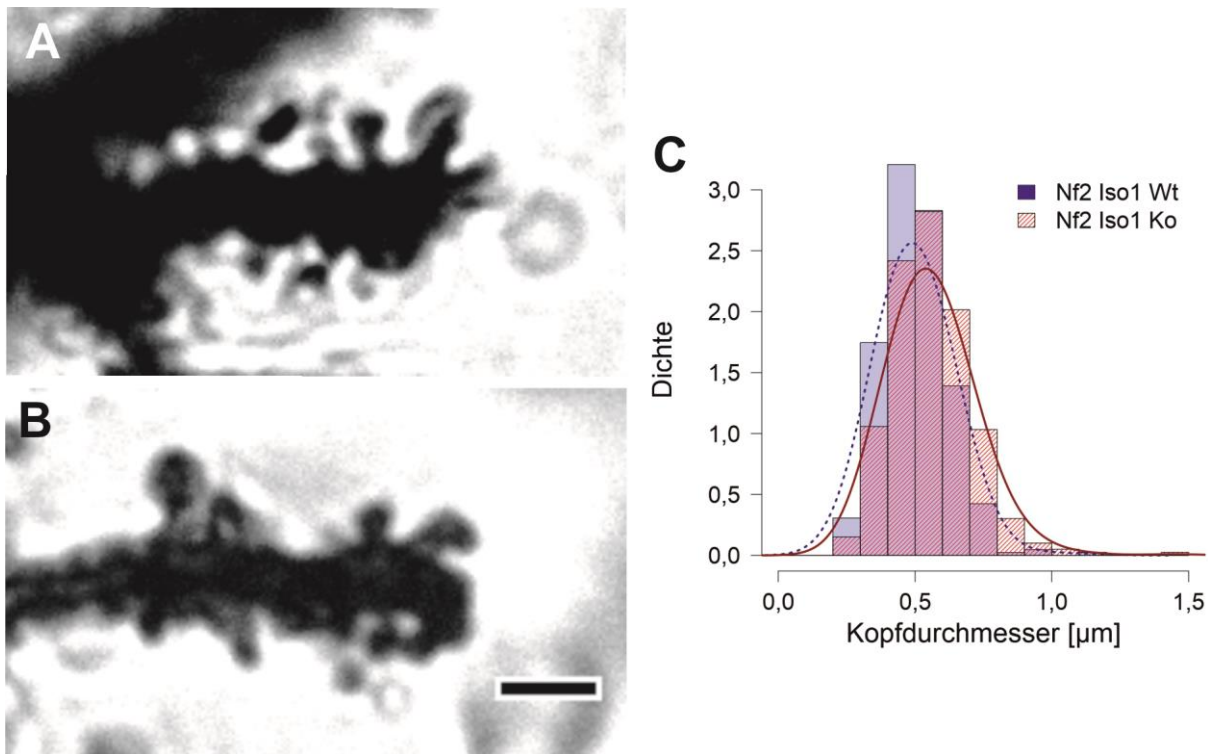


Abb. 33: Darstellung einzelner Dornfortsätze und deren Kopfdurchmesser Golgi-gefärbter Purkinjezellen adulter Tiere. **A**, *Nf2 Iso1*^{+/+}, **B**, *Nf2 Iso1*^{-/-}, (Maßstab 5 µm), **C**, Häufigkeitsverteilung der Kopfdurchmesser der Dornfortsätze ($MW_{Wt} = 0,5 \pm 0,006 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 0,6 \pm 0,007 \mu\text{m}$, Rangsummentest nach Wilcoxon, $***p \leq 0,001$, $n_{Zellen, Wt, Ko} = 6$, $n_{Messungen, Gesamt Wt und Ko} = 821$).

4.5.1. Synapsen, die Schnittstellen zwischen Purkinjezellen und eingehenden Signalen

4.5.1.1 Immunhistologie der Präsynapsen

Nachdem bereits mit den Dornfortsätzen der Purkinjezellen die postsynaptische Membranregion näher betrachtet wurde, wird an dieser Stelle immunhistochemisch ein Teil der präsynaptischen Membranregion dargestellt. Synaptobrevine sind als Transmembranproteine auf den Membranen von sekretorischen Vesikeln zu finden. Ihre Aufgabe ist es, die Membranverschmelzung zu begünstigen und damit über Exozytose die Neurotransmitter aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt frei zu geben. Daher

gewinnt man durch die immunhistochemische Darstellung von Synaptobrevin einen Eindruck von der Größe und Vesikeldichte der präsynaptischen Endigung.

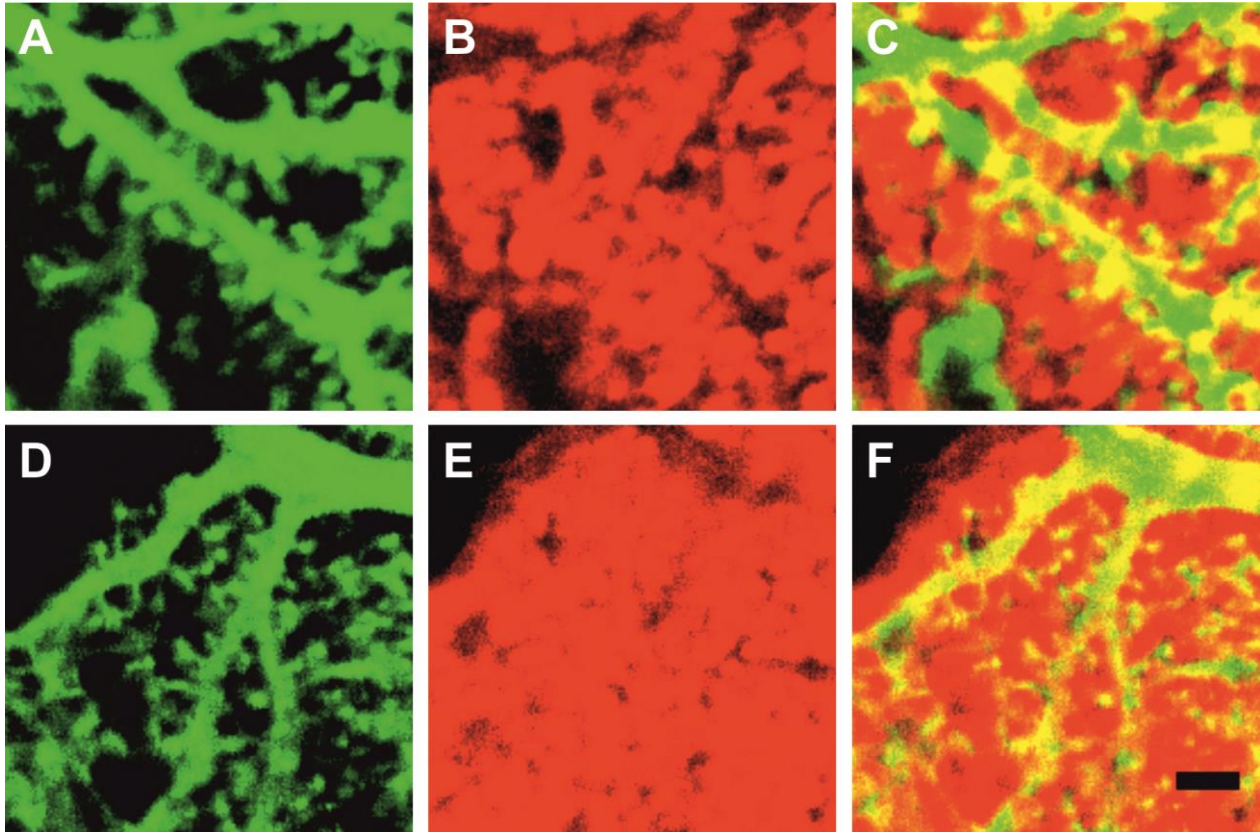


Abb. 34: Immunhistochemische Darstellung von Dornfortsätzen der Purkinjezeldendriten mit Antikörpern gegen Calbindin, dem Transmembranprotein sekretorischer Vesikel der Präsynapse Synaptobrevin in 9 Tage alten Mäusen. **A, B, C**, *Nf2 Iso1^{+/+}*, **D, E, F**, *Nf2 Iso1^{-/-}*, erste Spalte Färbung mit Calbindin, zweite Spalte Färbung mit Synaptobrevin, dritte Spalte Überlagerung der Calbindin- und Synaptobrevinaufnahmen (Maßstab 2,5 µm).

Anhand der in Abbildung 34 gezeigten Ausschnitte einer mit Calbindin gefärbten Purkinjezelle mit der Gegenfärbung von Synaptobrevin von 9 Tage alten Mäusen wird deutlich, dass sogar in diesem jungen Alter bei nicht vollentwickeltem Dendritenbaum die Vesikeldichte sehr hoch ist. Dennoch lässt sich im direkten Vergleich der Intensitäten der Abbildungen 34 B und E eine vergleichbare Färbung von Synaptobrevinproteinen von *Nf2 Iso1* Knockout- und Wildtypen abschätzen. Um hier jedoch eine valide und quantifizierbare Aussage treffen zu können, bedarf es einer höheren Auflösung, z.B. durch Herabsetzen des Pinholes in der konfokalen Mikroskopie, einer Erhöhung der

Anzahl an Schnitten und letztendlich die Darstellung der Synapsen mittels Elektronenmikroskop.

4.5.1.2 Western Blot des präsynaptischen Markers Synaptobrevin

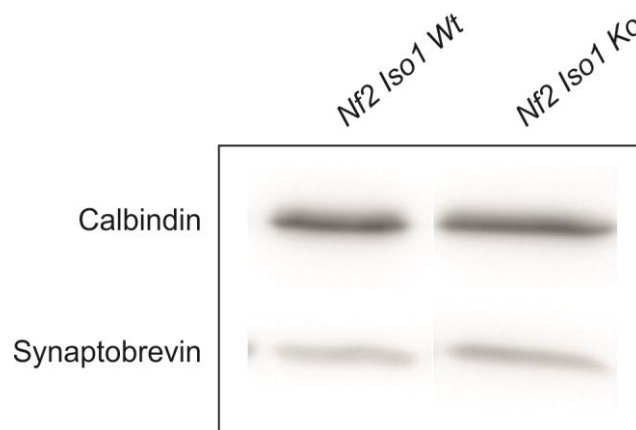


Abb. 35: Western Blot Analyse der Proteine Calbindin und Synaptobrevin in Kleinhirnen von 9 Tage alten Mäusen.

Neben dem immunhistochemischen Nachweis des präsynaptischen Proteins Synaptobrevin an Gewebeschnitten des Kleinhirns von Mäusen besteht auch die Option des biochemischen Nachweises mittels Western Blot. Zudem ist es über dieses Verfahren möglich, eine quantitative Analyse der Proteinkonzentrationen durchzuführen. Wird die Expressionsintensität des Synaptobrevins auf die Expression von Calbindin in Kleinhirnextrakten von Knockout- und Wildtyp-Tieren normiert, ergibt sich im *Nf2 Iso1* Knockout-Tier eine relative Expression von 35,7 % und von 41,7 % im Wildtyp-Tier (Abb. 35).

4.6. Auswirkung extrinsischer Einflüsse

4.6.1. Schnittkulturen

Vorteilhaft an der Methode der Schnittkulturen ist, dass die Purkinjezellen ohne den Einfluss von eingehenden Signalen der Kletter- und Parallelfasern wachsen. Daher können etwaige Veränderungen in der Morphologie Rückschlüsse auf einen extrinsischen Einfluss von Merlin erlauben.

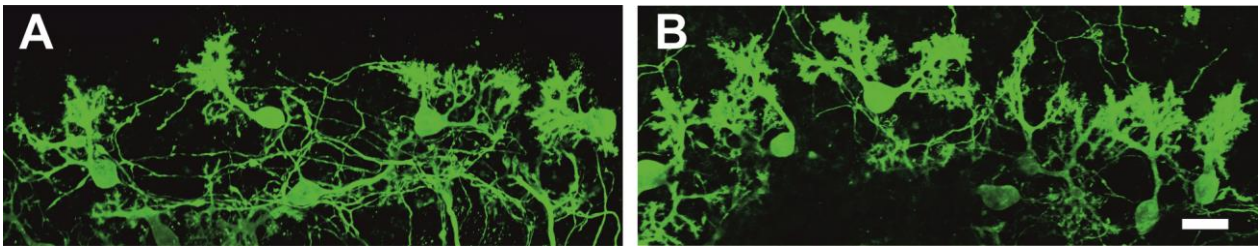


Abb. 36: Darstellung von Maximalprojektionen von Purkinjezellen mit Calbindin gefärbter Schnittkulturen DIV 8. **A**, *Nf2 Iso1^{+/+}*, **B**, *Nf2 Iso1^{-/-}* (Maßstab 25µm).

Anhand der vorliegenden Schnittkulturen wurden Parameter untersucht, die auch bei der Analyse der Golgi-gefärbten Schnitte Anwendung fanden (Abb. 36). Es lässt sich belegen, dass keine Unterschiede in der Dendritenbaumfläche detektierbar sind ($MW_{Wt} = 2252 \pm 186 \mu\text{m}^2$, $MW_{Ko} = 2245 \pm 179 \mu\text{m}^2$, Student t-Test, $p = 1,0$, $n_{\text{Schnittkulturen, Wt}} = 1$, $n_{\text{Schnittkulturen, Ko}} = 2$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 20$).

Ebenso verhielt es sich mit der Anzahl der Verzweigungspunkte pro Zelle ($MW_{Wt} = 42 \pm 3,5$, $MW_{Ko} = 38 \pm 3,5$, Student t-Test, $p = 0,4$, $n_{\text{Schnittkulturen, Wt}} = 1$, $n_{\text{Schnittkulturen, Ko}} = 2$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 20$).

Auch im Bereich der Längenmessung konnten keine unterschiedlichen Mittelwerte gefunden werden ($MW_{Wt} = 58,8 \pm 3,0 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 55,7 \pm 3,1 \mu\text{m}$, Student t-Test, $p = 0,5$, $n_{\text{Schnittkulturen, Wt}} = 1$, $n_{\text{Schnittkulturen, Ko}} = 2$, $n_{\text{Messungen gesamt}} = 79$). Als letzter Parameter wurde der Somadurchmesser untersucht. Hier ergab sich ein schwach signifikanter Hinweis darauf, dass die Purkinjezellen in den ersten 8 Tagen in Schnittkultur direkt nach Geburt ohne Einfluss der Kletter- und Parallelfasern eine Wachstumsveränderung erfahren ($MW_{Wt} = 14,2 \pm 0,5 \mu\text{m}$, $MW_{Ko} = 16,0 \pm 0,6 \mu\text{m}$, Student t-Test, $*p = 0,03$, $n_{\text{Schnittkulturen, Wt}} = 1$, $n_{\text{Schnittkulturen, Ko}} = 2$, $n_{\text{Zellen, Wt, Ko}} = 20$). Allerdings ist auch bekannt, dass der Haupteinfluss der extrinsischen Systeme erst innerhalb der zweiten Woche nach Geburt zum Tragen kommt. Daher wird es ein zukünftiges Ziel sein, die Rahmenbedingungen dieses Experimentes soweit weiterzuentwickeln, dass ein Fortbestehen der Schnittkulturen auch über zwei Wochen ermöglicht wird und zudem die Messungen an einer größeren Stückzahl wiederholt werden können.

5. Diskussion

Die Neurofibromatose Typ 2 ist eine Erkrankung, die nach heutigem Kenntnisstand hauptsächlich das periphere Nervensystem betrifft. *Nf2* und sein Genprodukt, das Merlin-Protein, werden aber auch in Neuronen des Zentralnervensystems, insbesondere in den Purkinjezellen, exprimiert. In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals funktionelle morphologische Effekte des Merlin-Proteins im zentralen Nervensystem gezeigt werden. Die Daten beruhen auf einem *Nf2* defizienten Tiermodell, in der spezifisch die Isoform 1 des *Nf2* nicht exprimiert werden kann (*Nf2 Iso1*).

Die morphologische Analyse und morphometrische Auswertung der Purkinjezellen von *Nf2 Iso1* defizienten Mäusen zeigte, dass Knockouttiere zeitabhängig einen zwar dezenten, aber gut messbaren Unterschied in der Dendritenmorphogenese aufwiesen. Bei acht Tage alten Tieren konnte eine verdickte Molekularschicht in den *Nf2 Iso1* defizienten Tieren nachgewiesen werden. Die Purkinjezellen der Knockouttiere zu diesem Zeitpunkt als auch in den adulten Tieren waren hingegen in ihrer Ausdehnung kleiner und gedrungener als die Wildtyp-Purkinjezellen. Die Dendriten der adulten Purkinjezellen verzweigten sich in einem kürzeren Abstand vom Soma, zeigten entsprechend kürzere Segmente, was in einer generell verkürzten Gesamtpfadlänge resultierte und gabelten sich in einem flacheren Neigungswinkel (Abb. 37). Zudem konnte ich höhere Dendritenordnungen in den *Nf2 Iso1* defizienten adulten Purkinjezellen verglichen zu den Wildtyp-Purkinjezellen feststellen. Außerdem war die Segmentdicke und das Verhältnis der Elterndendritendicke zu Tochterdendritendicke an den Bifurkationen in den adulten Knockout-Purkinjezellen verändert, was einen direkten Einfluss auf die Rall Power hat und entsprechend vermuten lässt, dass die Leitungseigenschaften der Knockout-Purkinjezellen gegenüber den Wildtyp-Purkinjezellen verändert sind. Zusätzlich konnten größere Kopfdurchmesser der Dornfortsätze in den *Nf2 Iso1* defizienten adulten Purkinjezellen gemessen werden, die einen Einfluss auf die Dornfortsatzentwicklung nahelegen, was ebenfalls als Hinweis auf eine potentielle physiologische Änderung interpretiert werden könnte.

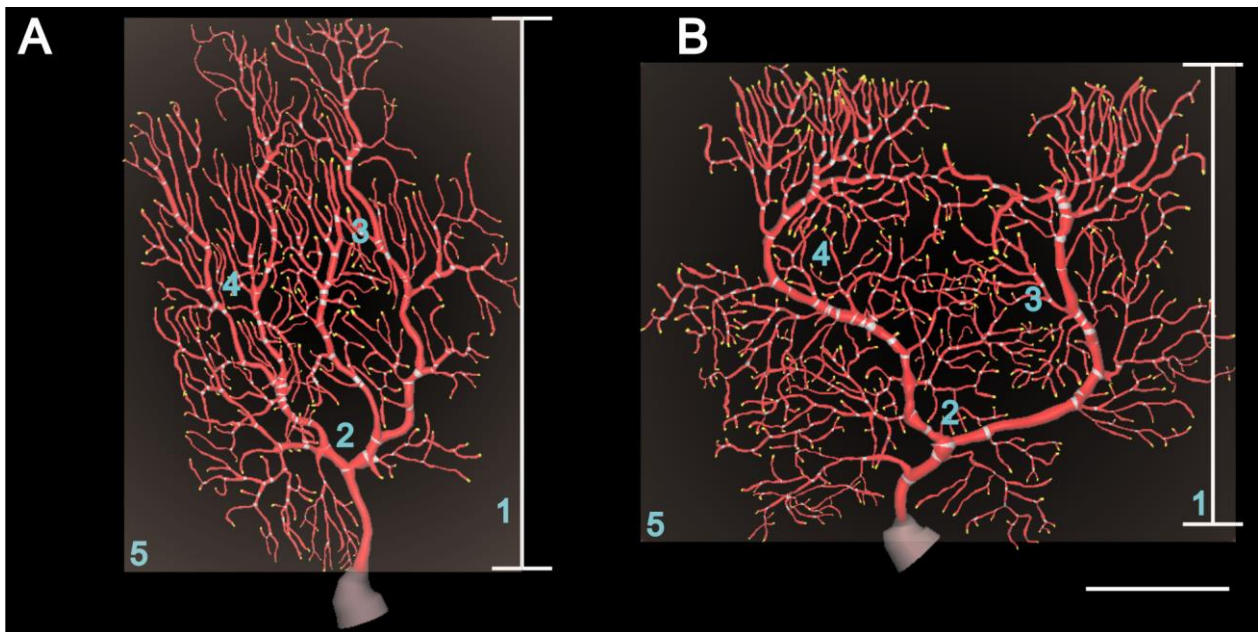


Abb. 37: Gegenüberstellung der mittels Neuromantic rekonstruierten adulten Purkinjezellen. **A**, *Nf2 Iso1^{+/+}*, **B**, *Nf2 Iso1^{-/-}*. Auffällig erscheint die reduzierte Molekularschicht-dicke (1), die erniedrigten Bifukationsneigungswinkel (2), die dünneren Astdurchmesser (3), die verkürzten Dendritensegmentlängen (4) und die verstärkte Ausrichtung in der Horizontalen (5) der Knockoutzelle (Maßstab 50µm).

5.1. Auswirkung der *Nf2 Iso1* Defizienz auf die Purkinjezellendifferenzierung in den ersten Tagen nach Geburt

Da die Reifung von cerebellären Purkinjezellen in der Literatur sehr genau beschrieben ist, eignet sich diese Zelle im Besonderen, in genetischen Modellsystemen, wie dem *Nf2 Iso1* Knockout, Erkenntnisse über den Progress der Entwicklung von Neuronen im ZNS zu gewinnen. Basierend auf den publizierten Daten von Schulz et al. (2010) hatte ich erwartet, dass die Dendriten in den *Nf2 Iso1* defizienten Tieren schneller wachsen und die *Nf2 Iso1^{-/-}* Purkinjezellen somit einen größeren Dendritenbaum ausbilden würden. Tatsächlich zeigten die Purkinjezellen der Knockouttiere eine höhere Anzahl weiter differenzierter Purkinjezellen in der ersten Postnatalwoche. Der Unterschied war visuell nicht sichtbar, da die Entwicklung der Purkinjezellen, trotz ihrer Auswahl einer eng begrenzten Region (Lobulus 3-4), sehr heterogen war. Diese unterschiedliche Ausprägung lässt sich auch in der breiten Streuung der Gesamtzahl der Bifurkationen pro Baum und der Gesamtfläche der Purkinjezell-Dendritenbäume ersehen. Ebenfalls passend zum erwarteten entwicklungsfördernden Effekt der *Nf2 Iso1* Defizienz auf die Dendritogenese war die Zunahme der Dicke der Molekularschicht des Knockouttieres

zum Zeitpunkt P8 im Vergleich zum Wildtyptier. Die Bestimmung der Molekularschichtdicke an mit Calbindin gefärbten Vibratomschnitten wird klassischerweise als einer der ersten Parameter zur Entwicklungsbeurteilung herangezogen.

Dieser These steht die durchgehend kleinere Fläche der Dendritenbäume einzelner Zellen der Knockouttiere in diesem Alter gegenüber. Dieser vermeintliche Widerspruch könnte damit erklärt werden, dass die obere Begrenzung der mit Calbindin gefärbten Molekularschicht nicht nur von einer einzelnen Zelle gebildet wird, sondern durch Überlagerung mehrerer Zellen verschoben wurde. Zudem ist bei der Golgi-Färbung, seit Etablierung der Färbung unklar, auf welchem Mechanismus sie beruht, womit eine Selektivität hin zu kleineren Purkinjezellen nicht ausgeschlossen werden kann. Entsprechend werden auch in den mit Calbindin gefärbten Schnitten unterschiedliche Reifungsstadien von Purkinjezellen gefärbt, die durchaus nebeneinander vorkommen. Somit ist es denkbar, dass die Schichtbegrenzung primär von den weiterentwickelten Zellen in den Vibratomschnitten gebildet wird.

Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass zwar einige Fakten für einen negativen Einfluss der Merlin-Mutagenese auf die Purkinjezellreifung sprechen, wissenschaftlich besser nachvollziehbare Ergebnisse aber auf einen positiven Effekt hindeuten. Das heißt, eine Merlin Isoform 1 Defizienz führte zu einer geförderten neuronalen Differenzierung im Kleinhirn der Maus.

5.2. Einfluss von Merlin auf das Dendritenwachstum

Bereits in früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass Merlin, das NF2 Genprodukt, das Fortsatzwachstum beeinflusst. Während bisherige Untersuchungen an Zellkultursystemen durchgeführt wurden, konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein Einfluss von NF2 auf das Dendritenwachstum *in vivo* nachgewiesen werden. Der Effekt von NF2 widerspricht allerdings den bisherigen Vermutungen, dass Merlin das Fortsatzwachstum negativ beeinflusst. Im Gegenteil, adulte *Nf2 Iso1* defiziente Mäuse zeigten eine dünnere, cerebelläre Molekularschicht im Vergleich zu Wildtyptieren. Die Pfadlängen waren verkürzt, die Distanzen der Verzweigungspunkte lagen näher am Soma und die Segmentlängen im distalen Bereich waren reduziert.

Diese vermeintliche Diskrepanz kann mehrere Ursachen haben. Wie bereits eingangs beschrieben, wird in der *Nf2 Iso1* defizienten Maus nur ein Genfragment entfernt, das für die Synthese der Isoform 1 essentiell ist. Die Isoform 2 kann aber nach wie vor synthetisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass zumindest temporär die Isoform 2 vermehrt exprimiert wird (Zoch et al., 2015). Nach institutsinternen Untersuchungen tritt diese Überexpression der Isoform 2 am Ende der ersten Postnatalwoche im Kleinhirn auf, ist aber im adulten Tier nicht mehr nachweisbar (A. Toledo). Die fehlende Isoform 1 Expression wird also um P8 durch eine Überexpression der Isoform 2 kompensiert. Die reduzierte Dendritenlänge in adulten Knockout-Purkinjezellen könnte also als Folge der Überexpression der Isoform 2 in den jungen Tieren resultieren und damit auf eine reprimierende Wirkung von NF2 auf die Dendritogenese hinweisen.

Ein weiterer Grund für die Diskrepanz zwischen den publizierten und den hier erhobenen Daten könnte darin liegen, dass hier zum ersten Mal *in vivo* Daten erhoben wurden. Unterstützung finden die Daten durch Untersuchungen an Neuroblastomzelllinien, in denen die Überexpression von *Nf2* das Fortsatzwachstum förderte (Yamauchi et al., 2008). Dieser positive Effekt ist in der Neuroblastomzelllinie abhängig von der Koexpression von Paxillin, einem Tubulus-assoziierten Protein, dessen Auftreten in fokalen Kontakten beschrieben ist. Demgegenüber steht die Verlängerung der Neuriten und die Zunahme des Neuriten-Zellverhältnisses durch Blockade der Merlinexpression (Schulz et al., 2010). Dies bedeutet, dass der Effekt von Merlin von Zelle zu Zelle verschieden sein kann und seine Wirkung von der Umgebung abhängig ist. Dieses Modell scheint durchaus plausibel, berücksichtigt man die derzeit geltende Vorstellung, dass Merlin isoformabhängig eine Vielzahl von Bindungspartnern besitzt und in multiple Signalwege eingreifen kann. So interagieren z. B. die Isoformen 1 und 2 von Merlin in unterschiedlicher Form mit Ezrin, einem Aktin bindenden Protein, was verschiedene zelluläre Antworten hervorruft (Grönholm et al., 1999; Meng et al., 2000; Bretscher et al., 2002). Ähnlich interagieren wohl NF2 Isoformen mit dem Leberzell-Wachstumsfaktor regulierten Tyrosinkinase Substrat (HRS) und sind wichtig für die wachstums-suppressive Wirkung des HRS (Gutmann, 2001; Sun et al., 2002). Weitere Interaktionspartner, die im Zentralnervensystem vorkommen, sind erythrocyte p55/MPP1, HEI10, und CD44 (Seo et al., 2009; Grönholm et al., 2006; Hartmann et al.,

2015). Eine detailliertere Liste kann von Scoles entnommen werden (Scoles, 2008). Das bedeutet, dass eine Vielzahl von Interaktionspartnern entweder beide oder nur eine Isoform in ihrer Funktion beeinflussen und damit auch konträre Effekte erzielen können. Eine weitere Heterogenität potentieller Funktionen wird durch die direkte Einflussnahme von *Nf2* in unterschiedliche intrazelluläre Signalwege ermöglicht. Merlin interagiert mit dem Rho/Rac Signalweg, der die Aktinpolymerisierung/-depolymerisierung reguliert (Scott und Luo, 2001; Lee et al., 2000) und mit dem Hippo/YAP Signalweg, der direkt auf transkriptionelle Kontrolle einer Zelle Einfluss nimmt (Zhang et al., 2010).

Unabhängig davon, ob nun ein wachstumshemmender oder -fördernder Einfluss der Isoform 1 Defizienz vorliegt, schließt sich die Frage an, in wieweit die relativ geringen Änderungen, die im Kleinhirn der transgenen Mäuse gefunden wurden, eine biologisch relevante Funktion von Merlin bei der Dendritogenese erlauben. Hier ist festzuhalten, dass die Dendritogenese, als Wachstum und Ausbildung von Verzweigungspunkten, ein sehr komplexer Vorgang ist, an der mannigfaltige zelluläre und molekulare Signalwege involviert sind.

Durch die Darstellung einzelner mit Golgi-gefärbter Zellen und Lebendzellbeobachtungen konnten mechanistische Grundlagen des Dendritenwachstums genauer untersucht werden (Scott und Luo, 2001). Allgemein kontrollieren auf der einen Seite intrinsische genetische Programme jeder Nervenzelle über Transkriptionsfaktoren deren Dendritogenese. Auf der anderen Seite wird ihr Wachstum von außen durch neuronale Aktivität über Neurotransmitter oder Kalziumeinstrom, durch Wegweiser-moleküle, wie Semaphorine oder Neutrophine, sowie Zell-Zellkontakte gesteuert. Damit die komplexe Entwicklung des Dendritenbaumes und dessen Stabilisation regelgerecht erfolgen kann, bedarf es somit einer ganzen Reihe molekularer Prozesse (Urbanska et al., 2008).

Letztendlich muss die Gesamtausdehnung eines Dendritenbaumes auch begrenzt werden. Hier sind Faktoren, wie die kleine GTPase RhoA bekannt (Scott und Luo, 2001; Lee et al., 2000).

Der Dendritenbaum wächst hauptsächlich durch lokale Elongation, Verzweigung und Retraktion (Dailey und Smith, 1996; Fujishima et al., 2012; Tanaka, 2015). Dadurch

bilden sich neue Zweige, wachsen, bleiben entweder bestehen und teilen sich oder sie bilden sich komplett zurück und treiben an einer anderen Stelle wieder neu aus. Das Besondere an Purkinjezellendendritenbäumen ist dabei, dass sie fast ausschließlich in einer Ebene wachsen ohne wesentliche Überkreuzungen der einzelnen Äste. Mittels der Zeitraffer-Konfokalen-Mikroskopie von dissoziierten Zellkulturen und einzeln angefärbten Zellen in Schnittkulturen konnte über Tage die Dendritenbaumentwicklung von Purkinjezellen verfolgt werden. Konzentriert man sich rein auf das Längenwachstum der einzelnen Dendriten, findet man hier den Zuwachs hauptsächlich am Ende der jeweiligen Äste (Fujishima et al., 2012). Demgegenüber bleiben die Segmente zwischen zwei Verzweigungspunkten relativ konstant. Dieser Sachverhalt wird durch die Beobachtung bestärkt, dass die Ausbildung von neuen Astgabeln primär am Ende der Dendriten stattfindet, nachdem er seine letztendliche Länge erreicht hat. Somit scheint es an dieser Position der Dendriten eine Wachstumskrone zu geben, von der auf der einen Seite das Längenwachstum, aber auch die Neubildung von Ästen durch Verzweigung der Bestehenden ausgeht (Fujishima et al., 2012). Gestärkt wird diese zeitliche und räumliche Reorientierung des Dendritenbaumes durch Beobachtungen an der Ratte. In diesem Modelltier wurde ab dem 20. Tag nach Geburt der Dendritenbaum derart modelliert, dass die Gesamtzahl der Segmente zwar konstant bleibt, sich jedoch in den höheren Ordnungen Dendriten zurückbilden und in mittleren Ordnungen Segmente hinzufügen (Sadler und Berry, 1989).

Diese Beobachtungen lassen zwei Schlüsse für meine Arbeit an *Nf2 Iso1* Tieren zu: Ich konnte primär Effekte im distalen Bereich des Dendritenbaums von *Nf2 Iso1^{-/-}* Purkinjezellen finden, was bedeutet, dass basierend auf den obigen Ausführungen die Effekte während der späten Entwicklung des Dendritenbaumes ausgeprägt worden sein müssen. Dies wiederum lässt rückschließen, dass die Isoform 1 zu diesem Zeitpunkt nicht durch die Isoform 2 Expression kompensiert worden war und damit die Vermutung naheliegt, dass die Merlin-Defizienz einen negativen Einfluss auf die Dendritogenese ausübt. Zum anderen lassen die publizierten Daten den Schluss zu, dass die Remodellierung des Dendritenbaumes der *Nf2 Iso1* Tiere gehemmt ist, was zur Folge hat, dass distale Dendriten erhalten bleiben und sich Dendriten niedriger Ordnung weniger ausprägen. Ein Alternatives Modell könnte sein, dass die frühe Dendritogenese,

basierend auf einer höheren Teilungsrate, zu kürzeren Segmenten in Dendriten niedrigerer Ordnungszahl führten, die distaleren Dendriten aber unbeeinflusst blieben.

5.3. Mögliche mechanistische Grundlagen der *Nf2* Wirkung

Dendritenverzweigungen entstehen durch Teilung des Wachstumskegels (Scott und Luo, 2001). Dieser befindet sich am Ende der Neuriten und besitzt als aufgetriebene Struktur ein Zentrum, das reich an Zytoplasma ist und rundherum zwei unterschiedliche Arten von Ausläufern bildet. Neben dünneren Ausstülpungen der Zellmembran, sogenannte Filopodien, findet man Lamellipodien, die dickere Membranvorwölbungen bilden (Hall, 1998). Beide Ausläufer enthalten das Strukturprotein der Aktinfilamente, die als Bestandteile des Zytoskeletts neben der mechanischen Aufrechterhaltung der Zellen auch an deren aktiver Bewegung, sowie an Transportvorgängen innerhalb der Zelle beteiligt sind. An der Neubildung sowie an der Etablierung neuer Dendriten ist maßgeblich das Zytoskelett mit den Hauptbestandteilen F-Aktin und den Mikrotubuli involviert. Deren Organisation kann durch zahlreiche aktinbindende Proteine und mit Mikrotubuli assoziierten Proteinen organisiert und kontrolliert werden (Konietzny et al., 2017). Und genau diese Zytoskelettbestandteile werden durch Merlin reguliert. Es ist bekannt, dass Merlin die Aktivierung von Rac blockiert und über diese Inhibierung wachstumsunterdrückend wirkt (Morrison et al., 2007). Innerhalb der Zelle leiten die verschiedenen Unterfamilien Rac und Cdc42 die Signale von der Zellmembran zu den Effektoren. Dabei treibt Rac die Ausbildung von Lamellopodien und Membrankräuselungen voran und Cdc42 polymerisiert die Aktinfilamente innerhalb der Filopodien (Acebes und Ferrús, 2000). Vor allem Rac und Cdc42 begünstigen somit die Umbauprozesse der Dendriten und deren Wachstum. Experimentell konnte gezeigt werden, dass eine Merlinüberexpression die durch Rac induzierten Signalwege inhibiert und die Menge des aktivierten Rac reduziert, jedoch nicht des aktivierten Cdc42 (Shaw et al., 2001; Schulz et al., 2010). Zusätzlich scheint Merlin nicht nur über die Rho-GTPase Aktivität auf das Aktin Zytoskelett einwirken zu können, sondern kontrolliert auch direkt dessen Umgestaltung (McClatchey und Giovannini, 2005). Rho wird allgemein eine wachstumsunterdrückende Funktion zugeschrieben (Luo, 2000).

Wie bereits oben für Filopodien ausgeführt, ist der Rho/Rac Signalweg auch für die Ausbildung von Fortsätzen ein zentraler Mechanismus. In Lebendzellbeobachtungen zentraler Nervenzellen der Albino Krallenfroschkaulquappen konnte gezeigt werden, dass eine verbesserte Rac Aktivität zur vermehrten Neubildung und Retraktion von zusätzlichen Dendritenästen führt (Li et al., 2000). Die Transfektion mit der dominant negativen Form von Rac in retinalen Ganglienzellen führt entsprechend zu einem gegensätzlichen Effekt (Wong et al., 2000). Interessanterweise wirkt sich Rac auch auf die Verteilung der Dendritenäste innerhalb des Baumes aus. So finden sich in dauerhaft Rac aktiven retinalen Ganglienzellen weniger Sekundär- und Tertiärdendriten, dafür ist jedoch die Anzahl an kurzen Enddendriten erhöht. Demgegenüber stehen die Zellen mit dem dominant negativ transfizierten Rac, die mehr Sekundär- und Tertiärdendriten und dafür weniger Endäste aufweisen (Wong et al., 2000; Ruchhoeft et al., 1999). Geht man davon aus, dass Rac Merlin phosphoryliert und damit dessen Interaktion mit dem Zytoskelett hemmt, müsste eine Merlinddefizienz zu einer höheren Komplexität im distalen Dendritenbaum führen und genau dies ist meine Beobachtung. Auch in transfizierten hippocampalen pyramidalen Neuronen verändert sich die Komplexität der Dendritenbäume (Nakayama et al., 2000). Entscheidend ist jedoch, dass auch in genetisch veränderten Mäusen mit einer dauerhaft aktivierten Rac1 in den Purkinjezellen Veränderungen der Morphologie im Dendritenbaum ersichtlich werden. Trotz der unveränderten Höhe der Molekularschichtdicke der von Luo et al. beschriebenen Zellen ist die Komplexität der Bäume leicht reduziert, was anhand der verminderten Anzahl an Endästen deutlich wird. Betrachtet man eingehender die abgebildete Einzellauswertung mit den Segmentzahlen geordnet nach der Strahlermethode, entsteht jedoch der Eindruck, die Bäume würden sich hauptsächlich in der Peripherie verzweigen und nicht in Soma Nähe (Luo et al., 1996). Eben dieser Effekt, dass es gerade in der Peripherie der Purkinjezellbäume zur vermehrten Bildung von Dendriten höherer Ordnungen kommt, konnte in den *Nf2 Iso1* defizienten Tieren beobachtet werden. Ob nun die fehlende Expression der Isoform 1 zu einer verstärkten Aktivierung von Rac führt und damit Einfluss auf die Dendritensegmente in der Peripherie nimmt, darüber lässt sich an dieser Stelle nur spekulieren.

5.4. Einfluss von *Nf2* auf das Verzweigungsmuster im Dendritenbaum von Purkinjezellen

Allgemein ist sehr wenig über die Ausrichtung der einzelnen Segmente ausgehend vom Verzweigungspunkt bekannt. Prinzipiell ist erwiesen, dass sich der Dendritenbaum zu Beginn der Entwicklung hauptsächlich lateral ausbreitet und später forciert an Höhe gewinnt. Nur wenige Autoren beziehen die Auswertung des Winkels zwischen den einzelnen Segmenten in ihre Analysen mit ein. Shefi et al. untersuchten ebendiese in Ganglienzellen von Insekten. Es konnte gezeigt werden, dass die Verzweigungen in dichten Zellkulturen unter den extrinsischen Einflüssen der umgebenen Zellen eine größere Spanne an Winkeln aufweisen, als die isolierten Neurone, obgleich ihr Mittelwert identisch ist (Shefi et al., 2005). In den *Nf2 Iso1* defizienten Tieren zeigten sich im Mittel größere Winkel, jedoch war die Spanne der größten und kleinsten Winkel reduziert. Somit konnte gezeigt werden, dass auch im Vergleich einer genveränderten Maus mit dem Wildtyp in hochkomplex entwickelten Zellen, wie den Purkinjezellen, solche Unterschiede detektierbar und auswertbar sind. Andere Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit der Winkelverteilung innerhalb der Dendritenbäume in ähnlich komplexen Neuronen. So konnten in den basalen Dendriten pyramidaler Neurone Regelmäßigkeiten in der Winkelverteilung aufgedeckt werden. Die ersten Bifurkationswinkel zwischen den Segmenten 2. Ordnung waren regelhaft die weitesten und glichen sich unabhängig von der kortikalen Region ihres Auftretens. Die Winkel höherer Ordnung nahmen bis in die Peripherie hin ab und die äußersten Winkel zwischen den terminalen Ästen ähneln sich in ihrer absoluten Lage innerhalb des Dendritenbaumes und ihrer absoluten Ordnungszahl (Bielza et al., 2014; Fernandez-Gonzalez et al., 2017). In Purkinjezellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Winkelmaße in den Wildtypen im Gegensatz zu den basalen Dendriten pyramidaler Neurone in höheren Dendritenordnungen zunehmen. Demgegenüber stand jedoch eine negative Korrelation der Winkel zu den Dendritenordnungen der Knockout- Purkinjezellen.

Sicherlich entsteht die Bifurkation aus einem Wachstumskegel am Ende eines Neuriten, jedoch lässt sich nur mutmaßen, dass ähnliche Mechanismen, wie beim gut untersuchten axonalen Wachstum, hier zum Tragen kommen. Neben chemotaktisch induzierter Wuchsrichtung spielen möglicherweise auch physikalische Kräfte der Zellmembran an der Verzweigung eine Rolle (Shefi et al., 2005).

Auf das Isoform 1 defiziente Mausmodell übertragen, in dem kleinere Bifurkationsneigungswinkel nachgewiesen wurden, könnte das bedeuten, dass entweder die Abzweigungen bereits initial in einem größeren Winkel angelegt worden sind oder aber, dass die NF2 defizienten Purkinjezellen sensitiver auf Nachbardendriten reagieren und sich entsprechend schneller zurückziehen.

Um jedoch eine dezidierte Aussage über die Elongation, Verzweigung und Retraktion der *Nf2 Iso1* defizienten Purkinjezellendriten treffen zu können, sind dissoziierte Zellkulturen mit Zeitraffer-Konfokaler-Mikroskopie von einzeln angefärbten Zellen in Schnittkulturen notwendig.

5.5. Einfluss von Merlin auf die Bildung von Dornfortsätzen

Nicht nur im Bereich der Wachstumskronen bilden sich Filopodien, sondern auch an den Schäften der Dendriten. Die sich entwickelnden Dornfortsätze sehen ebenso wie die filopodienartigen Ausläufer aus und werden von einigen Autoren auch für deren Vorstufen gehalten (Miller und Kaplan, 2003; Sala et al., 2008). Diese Dornfortsätze beinhalten eine hohe Konzentration an Aktinfilamenten, die ihnen eine schnelle Anpassung innerhalb von Sekunden im Rahmen der neuronalen Plastizität ermöglicht und damit auch zu morphologischen Veränderungen führt. Der generelle Aufbau eines dendritischen Dornfortsatzes besteht aus einem Kopf und einem dünnen Hals. Jedoch kann das Aussehen erheblich variieren. So finden sich große, kleine, ovale, sphärische oder irregulär geformte Köpfe sowie dünne, lange und dicke Hälse (Harris und Kater, 1994). Bereits letztes Jahrhundert wurde postuliert, dass die Dornfortsätze nicht nur einfache Verbindungen zwischen zwei Neuronen herstellen, sondern durch ihre Anzahl und Morphologie maßgeblich an Lernvorgängen und Gedächtnisfunktion beteiligt sind (Harris und Kater, 1994).

In den Isoform 1 Knockouttieren konnten vergrößerte Kopfdurchmesser der Dornfortsätze gemessen werden. Dabei wurden nur diejenigen Dornfortsätze untersucht, die sich auf peripheren Dendriten befanden, bekanntermaßen Verbindungen zu den Parallelfasern herstellen und damit die größte Anzahl der Dornfortsätze in Purkinjezellen repräsentieren. Gleichzeitig unterscheidet sich bei Wildtyp- und Knockoutmäusen deren Dichte. Die absolute Anzahl kann jedoch durch den Dendritendurchmesser, der in den proximalen Baumabschnitten signifikant verringert ist, variieren.

In der Literatur wird im Zusammenhang mit größeren Dornfortsätzen eine angepasste Zusammensetzung von Zellorganellen sowie eine funktionell stärkere Antwort auf die Signalweiterleitung beschrieben (Sala et al., 2008). Zudem ist es möglich, dass durch den Knockout der Isoform 1 von Merlin mit den resultierenden vergrößerten Dornfortsatzköpfen die Zell-Zell Kommunikation an der Synapse beeinflusst wird. Ebenso könnte über die kleinen GTPasen der Rho-Familie auch ein Einfluss auf die Dornfortsatz-morphologie ausgeübt werden, dabei am ehesten über Regulation des Aktinzytoskelettes (Newey et al., 2005). Grundsätzlich liefern die immunhistochemische Färbung mit Synaptobrevin, ein Membranmolekül der sekretorischen Vesikel, und der Westernblot von P9 alten Mäusen nur einen schwachen Hinweis auf eine Vergrößerung der präsynaptischen Dornfortsätze, wie er für die postsynaptischen Dornfortsätze gezeigt wurde. Im Detail lässt sich dies jedoch nur unter dem Elektronenmikroskop oder mittels der Elektrophysiologie beurteilen.

5.6. Intrinsische versus extrinsische Mechanismen der Purkinjezell-Differenzierung in *Nf2 Iso 1* defizienten Mäusen

Die Purkinjezellen im Kleinhirn entwickeln sich nicht autark, sondern reifen vielmehr im Zellverband mit Neuronen, deren Erregung an sie weitergeleitet wird, sowie Gliazellen, die Stütz- und Versorgungsfunktionen für die Nervenzellen übernehmen. So ist es naheliegend, dass neben den intrinsischen Faktoren all diese Zellen auch einen extrinsischen Einfluss auf das Wachstum der Dendritenbäume ausüben (Miller und Kaplan, 2003; Wong und Ghosh, 2002).

Purkinjezellen empfangen eine Vielzahl von afferenten Signalen von anderen Nervenzellen. Um die Auswirkung der afferenten Signale auf die Purkinjezellentwicklung näher untersuchen zu können, behandelten Altman und Anderson ihre Versuchsratten mit wiederholter niedrigdosierter Röntgenstrahlung nach der Geburt. Dies verhinderte die Ausbildung von postnatalen Korb-, Stern-, und Körnerzellen und veränderte die Morphologie und Anordnung der Purkinjezellen im Kleinhirn drastisch. Die Zellkörper wanderten nicht in eine Reihe und eine Schicht, sondern verteilten sich über den gesamten Kleinhirnkortex. Die Primärdendriten sprossen in unterschiedliche Richtungen aus. Obwohl die Dendritenbäume sich verzweigen, scheint deren Ausrichtung willkürlich und ungeordnet (Altman und Anderson, 1972).

In einem weiteren Mausmodell kann der fehlende Einfluss von Körnerzellen experimentell dargestellt werden. Bei den weaver-Mäusen führt das Fehlen eines einwärtsgerichteten Kaliumkanals zum Absterben migrierender Körnerzellvorläufer. Die Purkinjezellen dieser homozygoten Tiere erscheinen mit verdickten Primär- und Sekundärdendriten, wohingegen die Tertiärdendriten in der Anzahl reduziert sind. Zwar erreichen die Mehrzahl der Bäume die Begrenzung zur Pia mater, jedoch wachsen sie dann zuerst parallel zu ihr und ändern anschließend ihre Wachstumsrichtung wieder zurück zum Soma. Dieses ungewöhnliche Wachstumsmuster führte zu der Bezeichnung als Trauerweiden Purkinjezellen (Rakic und Sidman, 1973). Sadler und Berry untersuchten sehr detailliert das Wachstumsverhalten der einzelnen Dendritensegmente innerhalb des Purkinjezellbaumes. Sie kamen zu dem Schluss, dass bei den weaver-Mäusen gerade im Zeitraum nach dem 7. Tag nach Geburt keine Neubildungen von Segmenten mehr stattfanden. Normalerweise induzieren die Parallelfaserkontakte der Körnerzellen das weitere Wachstum und die Verzweigung der peripheren Dendriten ab diesem Zeitpunkt. Stattdessen wurde eine Längenzunahme der bereits bestehenden Dendriten beobachtet (Sadler und Berry, 1989).

Im Vergleich zu den Parallelfaserkontakten pro Purkinjezelle bilden Kletterfasern weitaus weniger Synapsen aus. Berry und Bradley untersuchten deren afferenten Einfluss auf die Purkinjezellmorphologie, indem sie die zuführenden Fasern im olivocerebellaren Trakt kurz nach der Geburt durchtrennten (Berry und Bradley, 1976). Die Auswertung der Rattenkleinhirne an P30 ergab eine Reduktion der gesamten Dendritenlänge des Baumes von 50 %, wobei die Endsegmentlängen sich nicht veränderten, jedoch deren Anzahl. Hinzu kommt, dass sich am Hauptstammgerüst an Stelle der kurzen, dornigen Fortsätze, die normalerweise mit den Kletterfasern Synapsen bilden, ohne deren Existenz feine, dünne sowie lange Dornfortsätze bilden, wie sie in der Peripherie mit den Parallelfaserkontakten gefunden werden (Berry und Bradley, 1976).

All diese markanten morphologischen Veränderungen der Purkinjezellen konnten in der Auswertung der Isoform 1 Knockoutmaus nicht gefunden werden. Weder eine mögliche Trauerweiden-Konfiguration, das Fehlen der peripheren Dendritenordnungen, eine drastische Reduktion der Gesamtlänge des Baumes, noch das Auffinden von schlanken, langen Dornfortsätzen am Dendritenbaumstamm weisen auf eine fehlende Zell-Zell-

Interaktion zwischen Körnerzellen, Kletterfasern und Purkinjezellen hin. Jedoch ist bekannt, dass Merlin gerade in den ersten zwei Lebenswochen nicht nur in Purkinjezellen, sondern auch in Körnerzellen exprimiert wird (Schulz et al., 2010). Da zudem die Isoform 1 von Merlin in allen Zellen der Maus ausgenockt ist, kann auch eine andersartige Signalweiterleitung zu morphologischen Veränderungen führen.

Auch in den Schnittkulturen, in denen die Afferenzen zum Kleinhirn durchtrennt werden, waren keine Änderungen der Purkinjezellmorphologie zu sehen. Dies kann methodische Ursachen haben, da die hier verwendeten Schnittkulturen am Tag der Geburt hergestellt und 8 Tage inkubiert worden sind. Geht man von einer temporären Wachstumsverzögerung durch die Manipulation der Zellen aus, werden in dieser Zeitspanne primär initiale Wachstumsprozesse der Dendriten ablaufen. Basierend auf den bisherigen Beobachtungen wäre ein weiterführender Ansatz, primär spätere Zeitpunkte zu untersuchen, d.h. entweder ältere Mäuse zu nutzen oder die Kulturdauer zu verlängern. Beides ist experimentell möglich.

Ob der *Nf2 Iso1* Knockout jedoch hauptsächlich einen intrinsischen oder extrinsischen Einfluss auf die Dendritenentwicklung der Purkinjezellen ausübt, kann nur über einen Zell-spezifischen Knockout der Isoform 1 abschließend geklärt werden. Zudem könnten die in dieser Arbeit beschriebenen Analysen mit einem *Nf2 Iso2* spezifischen Knockouttier, oder besser Zell-spezifischen Knockoutmodell, die Funktionsweise der beiden Haupt-isoformen von Merlin und deren Einfluss auf das zentrale Nervensystem weiter spezifizieren.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Isoform 1 von Merlin auch im Mausmodell einen Einfluss im zentralen Nervensystem ausübt, der anhand morphologischer Veränderungen der Dendritenbäume dargestellt wurde. Merlin scheint bei der Feinmodulation der Dendritenentwicklung nicht nur am Längenwachstum, sondern auch an der Verzweigung, dem Dendritendurchmesser und der Morphologie der Dornfortsätze maßgeblich beteiligt zu sein. Somit wird neben Merlins tumorsuppressiver Funktion seine Rolle im sich entwickelnden zentralen Nervensystem auch *in vivo* deutlich.

5.7. Kritische Betrachtung der Messgenauigkeit in der Lichtmikroskopie

Abschließend möchte ich auf grundsätzliche Schwierigkeiten der Morphometrie eingehen und damit die Wichtigkeit einzelner Parameter hervorheben, die für eine exakte Analyse beachtet werden müssen und hier auch berücksichtigt wurden. Die Qualität und Validität der Messwerte in der mikroskopischen Morphometrie ist unabdingbar von vielen technischen Faktoren abhängig, die bestenfalls vor Beginn der Experimente optimiert werden müssen.

Grundsätzlich sind immunhistologisch gefärbte Schnitte von vielen Parametern der Färbung abhängig: Wie lange wurde fixiert? Wie variabel ist das Fixans? Wie alt sind die Schnitte? Welche exakten Bedingungen herrschten während der immunhistochemischen Prozedur? Es wurden deshalb ausschließlich Aufnahmen histologisch identisch vorbehandelter Schnitte von Tieren gleichen Alters miteinander verglichen. Alle Gewebeproben entstammten der Mitte der Vermisregion des Kleinhirns, die klar zu identifizieren war. Zudem wurden nur Zellen aus dem Bereich des anterioren Lobus in die Analysen eingeschlossen. Bedingt durch die histologische Verarbeitung des Cerebellums kann es im Rahmen der Fixierung und Entwässerung vor der Eindeckelung zu Schrumpfungsartefakten kommen, die zu verkleinerten Messwerten führen. Besonders sind die Randbereiche der Schnitte betroffen, weshalb die Messungen auf die mittig gelegenen Fissuren der Lobuli konzentriert waren. Außerdem wurde beim Eindecken darauf geachtet, möglichst wenig Eindeckelmedium sowie dieselben Deckgläser zur Vergleichbarkeit der Brechungsindizes zu verwenden.

Die manuelle Messung der einzelnen Parameter erfolgte, anhand von aus Pixeln aufgebauten, Bilddateien. Daher wird im Folgenden kurz die Funktionsweise der Lichtmikroskopie, sowie deren mikrofotographische Bildentstehung skizziert. Besonders im Rahmen der manuellen Rekonstruktion spielt die Auflösung des Bildmaterials und die damit verbundene Messgenauigkeit bei der Bewertung der Ergebnisse und der bisweilen feinen Unterschiede eine entscheidende Rolle.

Alle rekonstruierten Purkinjezellen wurden mit Golgi gefärbt und mittels Durchlichtmikroskopie dargestellt. Mit Golgi-gefärbte Gewebeschnitte des Kleinhirns eignen sich für die Durchlichtmikroskopie besonders gut, da die Umgebung der einzeln angefärbten Zellen sehr gut lichtdurchlässig ist. Im Gegensatz dazu absorbieren die Purkinjezellen dieses und stellen einen starken Kontrast dar. Die Strahlen, die von einer Halogenlampe

ausgehen, leuchten die Objektebene im Vergleich zur punkweisen Darstellung der Laser-Scanning Mikroskopie flächenhaft aus. Damit einhergehend wird die Fokusebene scharf abgebildet, höhere und tiefere Schichten in geringem Umfang ebenso.

Da gerade im Bereich der Dornfortsatzausmessung am Rande der Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie gearbeitet wurde, folgt hier die von Ernst Abbe entwickelte Formel für den minimalen Abstand zweier Gitterlinien, die gerade noch als getrennt aufgenommen werden können.

$$d = \frac{\lambda}{2 \times NA}$$

d = minimaler, noch auflösbarer Abstand

λ = Wellenlänge des Lichtes

NA = Numerische Apertur des Objektivs

Als Wellenlänge werden 550 nm angenommen, da das menschliche Auge für diesen grün-gelblichen Bereich am empfindlichsten ist. Diese Formel trifft jedoch nur für die Konstellation zu, dass der Wert der Kondensorapertur den der numerischen Apertur des Objektivs nicht übersteigt. Für ein 100-faches Objektiv mit der bestmöglichen numerischen Apertur von 1,4 errechnet sich hiermit eine maximal auflösbare Objektgröße von 196 nm.

Geht man von dem realistischeren Fall aus, dass die Kondensorapertur kleiner ist und Lichtstreuung auch eine Rolle spielt, verändert sich der Korrekturwert und damit die Auflösung auf 239 nm wie folgt:

$$d = \frac{0,61 \times \lambda}{NA}$$

Entsprechend sind die Dornfortsätze der Purkinjellen, die sich im μm Bereich befinden, gut darstellbar.

Für die Rekonstruktion der Purkinjellen wurde das 40-fache Objektiv (NA = 1,3, mit Öl) verwendet, da es die einzelnen Zellen gerade noch vollständig am Stück darstellen kann. Bevor jedoch ein Bildformat festgelegt wird, sollte die laterale, sowie axiale Auflösung näher betrachtet werden. Nach den Rayleighkriterien wird die laterale Auflösung als der kleinste Abstand zweier Punkte beschrieben, die noch als getrennt

aufgenommen werden können. Sollen diese zwei Lichtpunkte ohne Informationsverlust dargestellt werden, so ist es laut Nyquist Theorem notwendig, den Abstand durch 2 bis 3 Rasterpunkte zu unterteilen. Bei maximaler Kameraauflösung von 1392 x 1040 Pixel wird somit eine Voxelkantenlänge von 161 nm/pix erreicht werden.

Mit Hilfe des Rayleighschen Tiefenaufhebungsvermögens gewinnt man einen Eindruck über die Dicke (d_z) der scharf abgebildeten Fokusebene:

$$d_z = \frac{\lambda}{2 \times n \times (\sin \alpha)^2}$$

λ = Wellenlänge des Lichtes

n = Brechzahl des Immersionsmediums

α = halber Öffnungswinkel des Objektivs

Mit einer Wellenlänge von 550 nm und einer Brechzahl des Immersionsöls von 1,51 ergibt sich bei einer Numerischen Apertur ein Bereich von ungefähr 250 nm. Aufgrund technischer Limitation wurden Bilderstapel in einem Abstand von 344 nm aufgenommen. Neben der mangelnden lückenlosen Darstellung in der z-Achse gilt es zusätzlich zu beachten, dass in der geometrischen Optik nur diejenigen Bildpunkte scharf abgebildet werden, die sich in der exakten Bildweite befinden. Umliegende Punkte, vor allem darüber und darunterliegende, werden mit zunehmender Entfernung als Unschärfekreise dargestellt.

Da somit eine automatisierte Erfassung über einen komplexen Bildstapel hinweg extrem erschwert ist, erfolgte die manuelle Vermessung der jeweiligen Objekte mit dem Hintergrundwissen der oben aufgeführten Punkte.

Damit die fotomikroskopisch aufgenommenen Bilder bei gleich weiter Einstellung der Aperturblende zugunsten der Auflösung der Darstellung einen möglichst hohen Kontrast aufweisen, wurden Graufilter zur Transmission des Lichtes eingesetzt. In der Durchlichtmikroskopie spiegelt sich der Kontrast in dem Helligkeitsverhältnis zwischen Hintergrund und in diesem Fall angefärbten, das Licht absorbierenden, Zellen wider. Dieses Verhältnis lässt sich steigern, in dem die Hintergrundintensität möglichst niedrig ist, was bei fast durchsichtigem umliegenden Gewebe durch Reduktion der Lichtintensität sowie Graufilter möglich ist. Dieser Zusammenhang wird in folgender Berechnung des Kontrastes deutlich:

$$C = \frac{(I_s - I_B) \times 100}{I_B}$$

C = Kontrast

I_s = Intensität Struktur

I_B = Intensität Hintergrund

Durch Anpassung der Belichtungszeit lassen sich so alle Strukturen in verschiedenen Gewebeschichttiefen gut darstellen. Im Gegensatz zu schwachen Fluoreszenzaufnahmen kann man davon ausgehen, dass ein ausreichendes Kontrastverhältnis durch die viel höheren Lichtintensitäten gegeben und somit nicht mit einem Darstellungsverlust an Objektgrenzen zu rechnen ist.

Zudem konnte durch die Verwendung des Universalobjektives Plan-Neofluar von Zeiss gerade für die Auswertung der Dornfortsätze eine Objektivklasse zwischen Planachromat und Planapochromat genutzt werden, um gerade im Randbereich möglichst kein gekrümmtes fotomikroskopisches Bild zu erhalten.

Bei den hier vorliegenden 8 Bit Grauwertebilderstapeln wurde auf eine Binarisierung und Verrechnung des Stapels mit einhergehendem enormen Informationsverlust, zur automatisierten Rekonstruktion z. B. durch ImageJ aufgrund der hohen Anzahl der Einzelschnittbilder (durchschnittlich 70), der Überlagerungen in den einzelnen Ebenen und der dicken histologischen Schnitte (bis zu 140µm) verzichtet.

Mit dem frei erhältlichen Programm Neuromantic war es, basierend auf allen Einzelschnittbildern, zudem möglich, durch manuelle Rekonstruktion des Dendritenbaumes über Zylinder, auch optisch nah beieinanderliegende oder sich überlappende Äste, genau abzubilden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass, besonders vor dem Hintergrund der Messverfahren, gerade die feinen Unterschiede in den für Messfehler anfälligen Parametern, wie der Segmentlänge, dem Dendritendurchmesser und der Auswertung der Dornfortsätze, kritisch zu bewerten sind. Jedoch zeigte sich selbst in diesen Parametern ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyptieren und der Isoform 1 spezifischen Knockoutmaus. Im Vergleich der Mittelwerte ergaben sich bei z. B. der Segmentlänge der einzelnen Dendriten der Purkinjezellen nur Abweichungen von unter 10 %, was auch im Rahmen der natürlichen biologischen Diversität vorkommen

könnte. Jedoch zeigte sich in der linearen Darstellung, also den Segmentlängen im Bezug zu den Dendritenordnungen, dass die Unterschiede in den gemessenen Werten der Segmente zwischen den beiden Genotypen unabhängig von der Dendritenordnung gleichermaßen auftreten. Betrachtet man zudem weniger fehleranfällige Parameter, wie die Gesamtfläche der Zellen, die Bifurkationsneigungswinkel oder die Verschiebung der Dendritenordnungen, bestätigt sich die unterschiedliche Morphologie der Zellen. Unabhängig von jeglichen Messmethoden liefert die Reduktion der Molekularschicht in adulten Knockoutmäusen schon beim bloßen Anblick den Hinweis, dass innerhalb des Dendritenbaumes der Purkinjezellen der Isoform 1 Knockouttiere morphologische Veränderungen stattgefunden haben.

Zusammengefasst zeigen meine Daten, dass eine veränderte Expression von Merlin im Zentralnervensystem dezente, aber morphologisch klar fassbare Unterschiede aufdecken. Dies konnte hier erstmals an lebenden Mäusen nachgewiesen werden. Die funktionelle Relevanz ist derzeit noch unklar. Bisher nicht veröffentlichte Daten zeigen allerdings, dass Amplituden und Frequenz von kleinen exzitatorischen Potentialen in den transgenen Purkinjezellen im Vergleich zu den Wildtyp-Purkinjezellen verändert sind. Wie der Konflikt zwischen *in vitro* und *in vivo* Daten aufgelöst werden kann und welche Mechanismen den zentralnervösen zellulären Prozessen zugrunde liegen, muss weiteren Arbeiten vorbehalten bleiben.

6. Zusammenfassung

Seit fast zehn Jahren ist bekannt, dass das Neurofibromatose Typ 2 (NF2) Genprodukt, auch Merlin genannt, im Zentralnervensystem exprimiert wird. In cerebellären Purkinjezellen wurde eine negative Korrelation der Expression mit der Reifung von Purkinjezellneuronen dargelegt. Bisher gab es jedoch keine experimentellen Belege, die eine Funktion von Merlin im Zentralnervensystem *in vivo* nachgewiesen hätten.

Da Merlin für die Entwicklung eines Organismus essentiell ist und Merlin defiziente Mäuse die Embryonalentwicklung nicht überleben, wurden im Rahmen dieser Arbeit Mäuse genutzt, die spezifisch die Isoform1 von *Nf2* nicht synthetisieren können (*Nf2 Iso1* Mausmodell). Diese Mäuse zeigen keine auffälligen Verhaltensanomalien und sind fertil.

Die nach standardisierten immunhistochemischen Verfahren durchgeführten morphologischen Analysen und morphometrischen Auswertungen der Purkinjezellen von *Nf2 Iso1* defizienten Mäusen zeigten, dass Knockouttiere zeitabhängig zwar dezente, aber gut messbare Unterschiede in der Dendritenmorphogenese aufwiesen. Die Molekularschichtdicke war postnatal in den *Nf2 Iso1* defizienten Purkinjezellen im Vergleich zu den Wildtyp-Purkinjezellen um 23% vergrößert. Junge *Nf2 Iso1^{-/-}* Purkinjezellen waren weiter differenziert und zeigten entsprechend eine höhere Bifurkationsvarianz. Im Laufe der Entwicklung drehte sich dieser Entwicklungsvorschub um, so dass adulte *Nf2 Iso1* defiziente Purkinjezellen eine um 19% dünnere Molekularschicht sowie kleinere Purkinjezellen mit weniger Volumen ausbildeten. Parallel waren in *Nf2 Iso1* defizienten Purkinjezellen höhere Dendritenordnungen zu finden und damit um 15% kürzere euklidische Distanzen zwischen Dendritenverzweigungspunkten und Soma. Zudem waren die Segmentlängen der Dendriten von Knockout-Purkinjezellen um 7.5% verkürzt. Ebenfalls ließen sich Veränderungen in physiologisch-morphologischen Parametern wie Bifurkationswinkel, Neigungswinkel und Rall Power nachweisen, die auf unterschiedliche elektrophysiologische Signalleitung schließen lassen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte folglich erstmals in einem *in vivo* Mausmodell gezeigt werden, dass Merlin weniger an der Etablierung der Grundstruktur eines

Dendritenbaumes beteiligt ist, sondern vielmehr die Feinstruktur der Dendritenentwicklung steuert.

Gerade diese morphologischen Unterschiede im Feinbau des Dendriten von Wildtyptieren und *Nf2* Isoform 1 spezifischen Defizienzmutanten unterstützen die seit geraumer Zeit existierende Hypothese, dass *Nf2* Mutationen oder genetische Variationen dieses Gens an der Ausbildung subtiler neuropsychiatrischer Erkrankungen beteiligt sind.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Purkinjezellverschaltung im Kleinhirnkortex.	16
Abb. 2: Übersichtsaufnahme eines sagittalen Kleinhirnschnittes einer adulten Maus mit Golgi- und Nissl-gefärbt.	18
Abb. 3: Postnatale Entwicklung von Purkinjezellen in der Wildtypmaus.....	19
Abb. 4: Aufbau des Gens der <i>Nf2 Iso1</i> und <i>Nf2 Iso2</i> Knockoutmäuse (Abbildung aus Zoch et al., 2015) übernommen.	23
Abb. 5: Genotypisierung transgener Tiere mittels PCR-Analyse von <i>Nf2 Iso1^{+/+}</i> (Wt) und <i>Nf2 Iso1^{-/-}</i> (Ko) Tieren.....	51
Abb. 6: <i>Nf2</i> Genexpression im Kleinhirn <i>Nf2 Iso1</i> defizienter Mäuse. RT-PCR Produkte der Exone 12 bis 17 eines <i>Nf2 Iso1^{+/+}</i> (Wt) und <i>Nf2 Iso1^{-/-}</i> (Ko) Tieres.	52
Abb. 7: Vergleichende Darstellung der makroskopischen Kleinhirnanatomie.	54
Abb. 8: Lobulierungsmuster sagittaler, vermalter Kleinhirnschnitte.....	55
Abb. 9: Einzelschicht-Bildung der Purkinjezellen von acht Tage alten Mäusen.	56
Abb. 10: Klassifizierung der Purkinjezellen nach der Dendritenmorphologie am ersten Aufzweigungspunkt.....	59
Abb. 11: Prozentualer Anteil der Verteilung der Purkinjezellen innerhalb der 3 Entwicklungsklassen.	60
Abb. 12: Somadurchmesser während der postnatalen Entwicklung der Purkinjezellen.	61

Abb. 13: Dickenmessung der Molekularschicht im Kleinhirnkortex von <i>Nf2 Iso1</i> Mäusen.	63
Abb. 14: Ausdehnung des Dendritenbaums von Golgi-gefärbten Purkinjezellen 8 Tage alter Tiere.....	65
Abb. 15: Darstellung der Anzahl der Bifurkationen im Bezug zu der Ausdehnung des Dendritenbaumes von Golgi-gefärbten Purkinjezellen.	67
Abb. 16: Übersichtsdarstellung einer kompletten adulten Purkinjezelle eines Wildtypieres aus der Fissur des Lobulus 4.....	69
Abb. 17: Systematik der in dieser Arbeit verwendeten Dendritenordnungssysteme.	70
Abb. 18: Häufigkeitsverteilung der Dendritenordnungen adulter Purkinjezellen.....	71
Abb. 19: Vergleich der Euklidischen Distanz zwischen den Verzweigungspunkten und dem Soma von Purkinjezellen adulter Mäuse.	73
Abb. 20: Pfadlängenmessung von Purkinjezell-Dendritenabschnitten in adulten Mäusen.	74
Abb. 21: Vergleich der Pfadlängen ausgehend von terminalen Endästen der acht Tage alten Tiere beziehungsweise aller Verzweigungspunkte der adulten Tiere bis zurück zum Soma.....	75
Abb. 22: Aufteilung der Pfadlängen des Dendritenbaumes von allen Verzweigungspunkten zurück zum Soma nach Dendritenordnungen.	77
Abb. 24: Korrelation der Segmentlängen zu ihren Dendritenordnungen im Grundgerüst der Zellen.	78

Abb. 25: Bifurkationswinkel als Winkel zwischen den beiden Tochterästen einer Bifurkation.	79
Abb. 26: Bifurkationsneigungswinkel als Ausdruck der Ausrichtung der Tochteräste zum Elternast.	80
Abb. 27: Rekonstruierte adulte Purkinjezellen.	82
Abb. 28: Bifurkationsdrehmoment als Winkel zwischen den Ebenen der Tochterdendriten und der Ebene der Elterndendriten.	83
Abb. 29: Gesamtvolumen der einzelnen adulten Purkinjezellen, der Größe nach sortiert.	84
Abb. 30: Darstellung der Dendritendurchmesser von Purkinjezellen adulter Mäuse.	85
Abb. 31: Darstellung der Rall Power als Parameter aus der Elektrophysiologie von Purkinjezellen adulter Tiere.	86
Abb. 32: Feiner Besatz des Dendritenbaumes mit Dornfortsätzen von Golgi-gefärbten Purkinjezellen adulter Tiere des Lobulus 4.	87
Abb. 33: Darstellung einzelner Dornfortsätze und deren Kopfdurchmesser Golgi-gefärbter Purkinjezellen adulter Tiere.	88
Abb. 34: Immunhistochemische Darstellung von Dornfortsätzen der Purkinjezeldendriten mit Antikörpern gegen Calbindin, dem Transmembranprotein sekretorischer Vesikel der Präsynapse Synaptobrevin in 9 Tage alten Mäusen.	89
Abb. 35: Western Blot Analyse der Proteine Calbindin und Synaptobrevin in Kleinhirnen von 9 Tage alten Mäusen.	90

Abb. 36: Darstellung von Maximalprojektionen von Purkinjezellen mit Calbindin gefärbter Schnittkulturen DIV 8.	91
Abb. 37: Gegenüberstellung der mittels Neuromantic rekonstruierten adulten Purkinjezellen.....	93

8.Tabellenverzeichnis

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Geräte.....	26
Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.....	27
Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.....	30
Tab. 4: PCR-Ansätze für die Analyse jeweils einer Schwanzprobe der <i>Nf2 Iso1</i> Tiere.	32
Tab. 5: Benennung der Nukleotidsequenzen der verwendeten Primerpaare zur Analyse der <i>Nf2</i> Isoformen, deren Zielsequenzen, sowie die Länge der erwarteten Zielsequenzen.....	35
Tab. 6: PCR-Ansätze für die Analyse jeweils eines Primerpaares zur Analyse der <i>Nf2 Iso1</i> Expression.....	35
Tab. 7: Zusammensetzung der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgele.	37

9. Literaturverzeichnis

Acebes A, Ferrús A. Cellular and molecular features of axon collaterals and dendrites. *Trends in Neurosciences*. 2000. 23: 557–565

Addison WHF. The development of the purkinje cells and of the cortical layers in the cerebellum of the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 1911. 21: 459–487

Altman J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *J. Comp. Neurol.* 1972. 145: 399–463

Altman J, Anderson WJ. Experimental reorganization of the cerebellar cortex. I. Morphological effects of elimination of all microneurons with prolonged x-irradiation started at birth. *J. Comp. Neurol.* 1972. 146: 355–406

Asthaigiri AR, Parry DM, Butman JA, Kim HJ, Tsilou ET, Zhuang Z, Lonser RR. Neurofibromatosis type 2. *The Lancet*. 2009. 373: 1974–1986

Baser ME, Friedman JM, Joe H, Shenton A, Wallace AJ, Ramsden RT, Evans DGR. Empirical development of improved diagnostic criteria for neurofibromatosis 2. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*. 2011. 13: 576–581

Berry M, Bradley P. The growth of the dendritic trees of Purkinje cells in the cerebellum of the rat. *Brain Research*. 1976. 112: 1–35

Berry M, Flinn R. Vertex analysis of Purkinje cell dendritic trees in the cerebellum of the rat. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 1984. 221: 321–348

Bielza C, Benavides-Piccione R, López-Cruz P, Larrañaga P, DeFelipe J. Branching angles of pyramidal cell dendrites follow common geometrical design principles in different cortical areas. *Scientific reports*. 2014. 4: 5909

Blakeley JO, Plotkin SR. Therapeutic advances for the tumors associated with neurofibromatosis type 1, type 2, and schwannomatosis. *Neuro-oncology*. 2016. 18: 624–638

Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2002. 3: 586–599

Cerminara NL, Lang EJ, Sillitoe RV, Apps R. Redefining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits. *Nature reviews. Neuroscience*. 2015. 16: 79–93

Claudio JO, Marineau C, Rouleau GA. The mouse homologue of the neurofibromatosis type 2 gene is highly conserved. *Human Molecular Genetics*. 1994. Vol. 3: 185–190

Dailey ME, Smith SJ. The Dynamics of Dendritic Structure in Developing Hippocampal Slices. *Journal of Neuroscience*. 1996. 16: 2983–2994

den Bakker MA, Vissers KJ, Molijn AC, Kros JM, Zwarthoff EC, van der Kwast, Theo H... Expression of the Neurofibromatosis Type 2 Gene in Human Tissues. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1999. 47: 1471–1479

Dusart I, Flamant F. Profound morphological and functional changes of rodent Purkinje cells between the first and the second postnatal weeks: a metamorphosis? *Frontiers in neuroanatomy*. 2012. 6: 11

Evans DGR. Neurofibromatosis type 2 (NF2): a clinical and molecular review. *Orphanet journal of rare diseases*. 2009. 4: 16

Fernandez-Gonzalez P, Benavides-Piccione R, Leguey I, Bielza C, Larrañaga P, DeFelipe J. Dendritic-branching angles of pyramidal neurons of the human cerebral cortex. *Brain structure & function*. 2017. 222: 1847–1859

Fujishima K, Horie R, Mochizuki A, Kengaku M. Principles of branch dynamics governing shape characteristics of cerebellar Purkinje cell dendrites. *Development* (Cambridge, England). 2012. 139: 3442–3455

Grönholm M, Muranen T, Toby GG, Utermark T, Hanemann CO, Golemis EA, Carpén O. A functional association between merlin and HEI10, a cell cycle regulator. *Oncogene*. 2006. 25: 4389–4398

Grönholm M, Sainio M, Zhao F, Heiska L, Vaheri A, Carpén O. Homotypic and heterotypic interaction of the neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein merlin and the ERM protein ezrin. *Journal of Cell Science*. 1999. 112: 895–904

Grönholm M, Teesalu T, Tyynelä J, Piltti K, Böhling T, Wartiovaara K, Vaheri A, Carpén O. Characterization of the NF2 protein merlin and the ERM protein ezrin in human, rat, and mouse central nervous system. *Molecular and cellular neurosciences*. 2005. 28: 683–693

Gutmann DH. Functional analysis of neurofibromatosis 2 (NF2) missense mutations. *Human Molecular Genetics*. 2001. 10: 1519–1529

Gutmann DH, Wright DE, Geist RT, Snider WD. Expression of the neurofibromatosis 2 (NF2) gene isoforms during rat embryonic development. *Human Molecular Genetics*. 1995. 4: 471–478

Hall A. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science*. 1998. 279: 509–514

Harris KM, Kater SB. Dendritic Spines: Cellular Specializations Imparting Both Stability and Flexibility to Synaptic Function. *Annual Review of Neuroscience*. 1994. 17

Hartmann M, Parra LM, Ruschel A, Böhme S, Li Y, Morrison H, Herrlich A, Herrlich P. Tumor Suppressor NF2 Blocks Cellular Migration by Inhibiting Ectodomain Cleavage of CD44. *Molecular cancer research: MCR*. 2015. 13: 879–890

Hendelman WJ, Aggerwal AS. The Purkinje neuron: I. A Golgi study of its development in the mouse and in culture. *The Journal of comparative neurology*. 1980. 193: 1063–1079

Jankowski J, Holst MI, Liebig C, Oberdick J, Baader SL. Engrailed-2 negatively regulates the onset of perinatal Purkinje cell differentiation. *The Journal of comparative neurology*. 2004. 472: 87–99

Jankowski J, Miething A, Schilling K, Baader SL. Physiological purkinje cell death is spatiotemporally organized in the developing mouse cerebellum. *Cerebellum (London, England)*. 2009. 8: 277–290

Kaneko M, Yamaguchi K, Eiraku M, Sato M, Takata N, Kiyohara Y, Mishina M, Hirase H, Hashikawa T, Kengaku M. Remodeling of monopolar Purkinje cell dendrites during cerebellar circuit formation. *PloS one*. 2011. 6: e20108

Kapfhammer JP. Cellular and molecular control of dendritic growth and development of cerebellar Purkinje cells. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. 2004. 39: 131–182

Kapfhammer JP, Gugger OS. The analysis of purkinje cell dendritic morphology in organotypic slice cultures. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2012

Kim J, Kwon N, Chang S, Kim K-T, Lee D, Kim S, Yun SJ, Hwang D, Kim JW, Hwu Y, Margaritondo G, Je JH, Im Rhyu J. Altered branching patterns of Purkinje cells in mouse model for cortical development disorder. *Scientific Reports*. 2011. 1: 122 EP

Knudson AG Jr. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1971. Vol. 68: pp. 820-823

Konietzny A, Bär J, Mikhaylova M. Dendritic Actin Cytoskeleton: Structure, Functions, and Regulations. *Frontiers in cellular neuroscience.* 2017. 11: 147

Larsell, O. The morphogenesis and adult pattern of the lobules and fissures of the cerebellum of the white rat. *J. Comp. Neurol.* 1952. Volume 97: 281–356

Lee T, Winter C, Marticke SS, Lee A, Luo L. Essential Roles of Drosophila RhoA in the Regulation of Neuroblast Proliferation and Dendritic but Not Axonal Morphogenesis. *Neuron.* 2000. 25: 307–316

Leto K, Arancillo M, Becker EBE, Buffo A, Chiang C, Ding B, Dobyns WB, Dusart I, Haldipur P, Hatten ME, Hoshino M, Joyner AL, Kano M, Kilpatrick DL, Koibuchi N, Marino S, Martinez S, Millen KJ, Millner TO, Miyata T, Parmigiani E, Schilling K, Sekerková G, Sillitoe RV, Sotelo C, Uesaka N, Wefers A, Wingate RJT, Hawkes R. Consensus Paper: Cerebellar Development. *Cerebellum (London, England).* 2016. 15: 789–828

Li W, Cooper J, Karajannis MA, Giancotti FG. Merlin: a tumour suppressor with functions at the cell cortex and in the nucleus. *EMBO reports.* 2012. 13: 204–215

Li Z, Van Aelst L, Cline HT. Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in *Xenopus* central neurons in vivo. *Nature neuroscience.* 2000

Liu J, Sanes JR. Cellular and Molecular Analysis of Dendritic Morphogenesis in a Retinal Cell Type That Senses Color Contrast and Ventral Motion. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience.* 2017. 37: 12247–12262

Luo L. RHO GTPASES in neuronal morphogenesis. *Nature Reviews Neuroscience*. 2000. 1. 173-180

Luo L, Hensch TK, Ackerman L, Barbel S, Jan LY, Jan YN. Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature*. 1996. 379: 837–840

McClatchey AI, Fehon RG. Merlin and the ERM proteins--regulators of receptor distribution and signaling at the cell cortex. *Trends in cell biology*. 2009. 19: 198–206

McClatchey AI, Giovannini M. Membrane organization and tumorigenesis--the NF2 tumor suppressor, Merlin. *Genes & development*. 2005. 19: 2265–2277

McClatchey AI, Saotome I, Ramesh V, Gusella JF, Jacks T. The Nf2 tumor suppressor gene product is essential for extraembryonic development immediately prior to gastrulation. *Genes Dev*. 1997. 11: 1253–1265

Meng J-J, Lowrie DJ, Sun H, Dorsey E, Pelton PD, Bashour A-M, Groden J, Ratner N, Ip W. Interaction between two isoforms of the NF2 tumor suppressor protein, merlin, and between merlin and ezrin, suggests modulation of ERM proteins by merlin. *J. Neurosci. Res*. 2000. 62: 491–502

Miller FD, Kaplan DR. Signaling mechanisms underlying dendrite formation. *Current Opinion in Neurobiology*. 2003. 13: 391–398

Morrison H, Sperka T, Manent J, Giovannini M, Ponta H, Herrlich P. Merlin/neurofibromatosis type 2 suppresses growth by inhibiting the activation of Ras and Rac. *Cancer research*. 2007. 67: 520–527

Myatt DR, Hadlington T, Ascoli GA, Nasuto SJ. Neuromantic - from semi-manual to semi-automatic reconstruction of neuron morphology. *Frontiers in neuroinformatics*. 2012. 6: 4

Nakayama AY, Harms MB, Luo L. Small GTPases Rac and Rho in the Maintenance of Dendritic Spines and Branches in Hippocampal Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 2000. 20: 5329–5338

Nedelescu H, Abdelhack M, Pritchard AT. Regional differences in Purkinje cell morphology in the cerebellar vermis of male mice. *Journal of neuroscience research*. 2018

Newey SE, Velamoor V, Govek E-E, Van Aelst L. Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *Journal of neurobiology*. 2005. 64: 58–74

Petrilli AM, Fernández-Valle C. Role of Merlin/NF2 inactivation in tumor biology. *Oncogene*. 2016. 35: 537–548

Plotkin SR, Merker VL, Halpin C, Jennings D, McKenna MJ, Harris GJ, Barker FG. Bevacizumab for progressive vestibular schwannoma in neurofibromatosis type 2: a retrospective review of 31 patients. *Otology & neurotology: official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*. 2012. 33: 1046–1052

Rakic P, Sidman RL. Organization of cerebellar cortex secondary to deficit of granule cells in weaver mutant mice. *The Journal of comparative neurology*. 1973. 152: 133–161

Rall W. Branching dendritic trees and motoneuron membrane resistivity. *Experimental Neurology*. 1959. 1: 491–527

Reginensi A, Enderle L, Gregorieff A, Johnson RL, Wrana JL, McNeill H. A critical role for NF2 and the Hippo pathway in branching morphogenesis. *Nature communications*. 2016. 7: 12309

Ruchhoeft ML, Ohnuma S-i, McNeill L, Holt CE, Harris WA. The neuronal architecture of *Xenopus* retinal ganglion cells is sculpted by rho-family GTPases in vivo. *Journal of Neuroscience*. 1999. 19: 8454–8463

Ryan SJ, Ehrlich DE, Rainnie DG. Morphology and Dendritic Maturation of Developing Principal Neurons in the Rat Basolateral Amygdala. *Brain structure & function*. 2014. 221: 839–854

Sadler M, Berry M. Topological Link-Vertex Analysis of the growth of Purkinje cell dendritic trees in normal, reeler, and weaver mice. *The Journal of comparative neurology*. 1989. 289: 260–283

Sala C, Cambianica I, Rossi F. Molecular mechanisms of dendritic spine development and maintenance. *Acta Neurobiol Exp*. 2008. 68: 289–304

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 2012. 9: 676–682

Schrenk K, Kapfhammer J, Metzger F. Altered dendritic development of cerebellar Purkinje cells in slice cultures from protein kinase C γ -deficient mice. *Neuroscience*. 2002. 110: 675–689

Schulz A, Baader SL, Niwa-Kawakita M, Jung MJ, Bauer R, Garcia C, Zoch A, Schacke S, Hagel C, Mautner V-F, Hanemann CO, Dun X-P, Parkinson DB, Weis J, Schröder JM, Gutmann DH, Giovannini M, Morrison H. Merlin isoform 2 in neurofibromatosis type 2-associated polyneuropathy. *Nature neuroscience*. 2013. 16: 426–433

Schulz A, Geissler KJ, Kumar S, Leichsenring G, Morrison H, Baader SL. Merlin inhibits neurite outgrowth in the CNS. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010. 30: 10177–10186

Scoles DR. The merlin interacting proteins reveal multiple targets for NF2 therapy. *Biochimica et biophysica acta*. 2008. 1785: 32–54

Scorcioni R, Polavaram S, Ascoli GA. L-Measure: a web-accessible tool for the analysis, comparison and search of digital reconstructions of neuronal morphologies. *Nature protocols*. 2008. 3: 866–876

Scott EK, Luo L. How do dendrites take their shape? *Nature neuroscience*. 2001. 4: 359–365

Seo P-S, Quinn BJ, Khan AA, Zeng L, Takoudis CG, Hanada T, Bolis A, Bolino A, Chishti AH. Identification of erythrocyte p55/MPP1 as a binding partner of NF2 tumor suppressor protein/Merlin. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*. 2009. 234: 255–262

Shaw RJ, Paez J, Curto M, Yaktine A, Pruitt WM, Saotome I, O'Bryan JP, Gupta V, Ratner N, Der CJ, Jacks T, McClatchey AI. The Nf2 Tumor Suppressor, Merlin, Functions in Rac-Dependent Signaling. *Developmental Cell*. 2001. 1: 63–72

Shefi O, Golebowicz S, Ben-Jacob E, Ayali A. A two-phase growth strategy in cultured neuronal networks as reflected by the distribution of neurite branching angles. *Journal of neurobiology*. 2005. 62: 361–368

Sherman L, Xu HM, Geist RT, Saporito-Irwin S, Howells N, Ponta H, Herrlich P, Gutmann DH. Interdomain binding mediates tumor growth suppression by the NF2 gene product. *Oncogene*. 1997. 15: 2505–2509

Shreve R. Statistical Law of Stream Numbers. *Journal of Geology - J GEOL.* 1966. 74: 17–37

Sotelo C. Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Progress in neurobiology.* 2004. 72: 295–339

Sotelo C, Dusart I. Intrinsic versus extrinsic determinants during the development of Purkinje cell dendrites. *Neuroscience.* 2009. 162: 589–600

Sun C-X, Haipok C, Scoles DR, Pulst SM, Giovannini M, Komada M, Gutmann DH. Functional analysis of the relationship between the neurofibromatosis 2 tumor suppressor and its binding partner, hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate. *Human Molecular Genetics.* 2002. 11: 3167–3178

Szudek J, Briggs R, Leung R. Surgery for neurofibromatosis 2. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery.* 2012. 20: 347–352

Takeda T, Ishikawa A, Ohtomo K, Kobayashi Y, Matsuoka T. Fractal dimension of dendritic tree of cerebellar Purkinje cell during onto- and phylogenetic development. *Neuroscience Research.* 1992. 13: 19–31

Tanaka M. The Dendritic Differentiation of Purkinje Neurons: Unsolved Mystery in Formation of Unique Dendrites. *Cerebellum (London, England).* 2015. 14: 227–230

Tanaka M, Yanagawa Y, Obata K, Marunouchi T. Dendritic morphogenesis of cerebellar Purkinje cells through extension and retraction revealed by long-term tracking of living cells in vitro. *Neuroscience.* 2006. 141: 663–674

Trofatter J. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell.* 1993. 72: 791–800

Urbanska M, Blazejczyk M, Jaworski J. Molecular basis of dendritic arborization. *Acta Neurobiol Exp.* 2008: 264–288

Vries M de, van der Mey AGL, Hogendoorn PCW. Tumor Biology of Vestibular Schwannoma: A Review of Experimental Data on the Determinants of Tumor Genesis and Growth Characteristics. *Otology & neurotology: official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology.* 2015. 36: 1128–1136

Weiss, Gary, M., Pysh JJ. Evidence for loss of Purkinje cell dendrites during late development: A morphometric Golgi analysis in the mouse. *Brain Research.* 1978. 154: 219–230

Wong ROL, Ghosh A. Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nature reviews. Neuroscience.* 2002. 3: 803–812

Wong WT, Faulkner-Jones BE, Sanes JR, Wong ROL. Rapid Dendritic Remodeling in the Developing Retina: Dependence on Neurotransmission and Reciprocal Regulation by Rac and Rho. *The Journal of Neuroscience.* 2000. 20: 5024–5036

Yamauchi J, Miyamoto Y, Kusakawa S, Torii T, Mizutani R, Sanbe A, Nakajima H, Kiyokawa N, Tanoue A. Neurofibromatosis 2 tumor suppressor, the gene induced by valproic acid, mediates neurite outgrowth through interaction with paxillin. *Experimental cell research.* 2008. 314: 2279–2288

Zanjani HS, Vogel MW, Mariani J. Deletion of the GluR δ 2 Receptor in the Hotfoot Mouse Mutant Causes Granule Cell Loss, Delayed Purkinje Cell Death, and Reductions in Purkinje Cell Dendritic Tree Area. *The Cerebellum.* 2016. 15: 755–766

Zhang N, Bai H, David KK, Dong J, Zheng Y, Cai J, Giovannini M, Liu P, Anders RA, Pan D. The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. *Developmental Cell.* 2010. 19: 27–38

Zoch A, Mayerl S, Schulz A, Greither T, Frappart L, Rübsam J, Heuer H, Giovannini M, Morrison H. Merlin Isoforms 1 and 2 Both Act as Tumour Suppressors and Are Required for Optimal Sperm Maturation. *PloS one*. 2015. 10: e0129151

10.Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Stephan Baader, der mich jahrelang begleitet und unterstützt hat! Er hatte immer zwei offene Ohren und prägte nicht nur diese Arbeit, sondern weit darüber hinaus mein wissenschaftliches Arbeiten und den Weg zum Arztberuf. Dank seines unermüdlichen persönlichen Einsatzes durfte ich viele Erfahrungen sammeln und hatte eine unschätzbare, lehrreiche Zeit.

Ein großes Dankeschön geht auch an seine Arbeitsgruppe, die durch ihren kollegialen Zusammenhalt eine konspirative Arbeitsatmosphäre erzeugte und mir mit vielen Tipps und Tricks stets zur Seite stand. Besonders Dr. Andrea Toledo faszinierte und inspirierte mich im regen Austausch rund um das Tumorsuppressorprotein Merlin. Durch die tatkräftige Unterstützung und die vielen Ratschläge von Stefanie Ramrath konnte ich viele laborspezifische Herausforderungen realisieren. Auch bei Nicoletta Czechowska und Carina Bönisch möchte ich mich ganz herzlich für diese wertvollen Jahre bedanken. Vor allem Antonia Van Rienen stand mir jederzeit zur Seite.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. med. Karl Schilling, Direktor des Instituts für Anatomie, und alle weiteren Mitarbeiter des Instituts für Anatomie und Zellbiologie für die herzliche Aufnahme ins Team.

Ohne meine Familie wäre jedoch diese Arbeit niemals möglich gewesen. Dank meiner Eltern hatte ich immer die nötige Freiheit und Sicherheit, die es mir erst ermöglichten, meine Wünsche umzusetzen. Jedoch begleitete mich keiner so intensiv in dieser Zeit wie mein Ehemann.