

**Morphologische und ultrastrukturelle  
Charakterisierung der Mitochondrien in  
Purkinje-Zellen Engrailed-2-transgener Mäuse**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Lukas Johann Oelmeier**

aus Bonn

2024

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Leonhard Baader
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Becker

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.02.2024

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Direktor: Prof. Dr. Tim Clarner

*Für meine Familie.*



## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	8
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	12
1.1	Engrailed-2 und Autismus	12
1.2	Der Transkriptionsfaktor Engrailed-2	13
1.3	Funktionen von Engrailed-2	15
1.3.1	Die Rolle von Engrailed-2 bei der Kompartimentierung des Kleinhirns	15
1.3.2	Engrailed als Regulator der axonalen Wegfindung	17
1.3.3	Engrailed als Überlebensfaktor mesenzephaler dopaminerger Neurone	18
1.4	Entwicklung cerebellärer Purkinje-Zellen und ihre Beeinflussung durch Engrailed-2	19
1.4.1	Der Aufbau des cerebellären Kortex	20
1.4.2	Die Dendritenentwicklung der Purkinje-Zellen	21
1.4.3	Die Kompartimentierung des Kleinhirnkortex	22
1.4.4	Transgene Mausmodelle zur Analyse der Engrailed-2-Funktionen	23
1.5	Mitochondrien in Neurogenese, Differenzierung, Axogenese und Neurodegeneration	25
1.6	Mitochondrien und ihre Rolle in der Pathophysiologie der Autismus-Spektrum-Störungen	29
1.7	Fragestellung	30
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	32
2.1	Geräte und Chemikalien	32
2.1.1	Geräte	32
2.1.2	Chemikalien	33
2.1.3	Antikörper	38
2.2	Versuchstierhaltung	39
2.3	Molekularbiologische Methoden	40
2.3.1	Genotypisierung der L7En-2-Tiere	40
2.3.2	Genotypisierung der En-2 <sup>-/-</sup> -Tiere	42
2.4	Histologische Methoden	44

2.4.1	Perfusion	44
2.4.2	Vibratomschnitte	45
2.4.3	Immunhistochemische Färbungen an cerebellären Geweben	45
2.4.4	Cerebelläre Schnittkulturen	47
2.4.5	Vorbereitung der Präparate für die Elektronenmikroskopie	48
2.5	Biochemische Methoden	49
2.5.1	Proteinextraktion und Proteinkonzentrationsbestimmung	49
2.5.2	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
2.5.3	Western Blot-Analyse	50
2.6	Mikroskopie und fotografische Dokumentation	51
2.6.1	Mikroskopie und fotografische Dokumentation der SDHA-Färbungen	51
2.6.2	Mikroskopie und fotografische Dokumentation der elektronenmikroskopischen Präparate	52
2.7	Morphometrie	52
2.7.1	Morphometrie des SDHA-Signals in Vibratomschnitten und Schnittkulturen	52
2.7.2	Morphometrie der Mitochondrien in elektronenmikroskopischen Aufnahmen	53
2.8	Statistische Auswertung und Darstellung der Daten	54
2.8.1	Auswertung der Daten aus immunhistochemischen SDHA-Färbungen	54
2.8.2	Auswertung der Daten aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen	55
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
3.1	Etablierung einer immunhistochemischen SDHA-Färbung zur mitochondrialen Darstellung	57
3.2	Zelluläre Verteilung der Mitochondrien in Purkinje-Zellen Engrailed-2-transgener Mäuse	60
3.2.1	Verteilung des mitochondrialen SDHA-Signals in Purkinje-Zellen von L7En-2-transgenen und Wildtyp-Mäusen	62
3.2.2	Verteilung des mitochondrialen SDHA-Signals in Purkinje-Zellen von Engrailed-2-Knockout- und Wildtyp-Mäusen	67
3.3	Verteilung des mitochondrialen SDHA-Signals in cerebellären Schnittkulturen L7En-2-transgener Mäuse	71
3.4	Morphometrische Analyse der Mitochondrien L7En-2-transgener Mäuse in elektronenmikroskopischen Aufnahmen	74

3.4.1	Untersuchung von Fläche und Durchmesser einzelner Mitochondrien	76
3.4.2	Untersuchung der Mitochondrien unter Berücksichtigung ihrer Purkinje-Zell-Zugehörigkeit	78
3.5	SDHA-Western Blot-Analysen an Wildtyp- und L7En-2-Cerebella	84
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>86</b>
4.1	Kritische Auseinandersetzung mit dem Nachweis der zellulären Verteilung des mitochondrialen Proteins SDHA	87
4.2	Die Mitochondrienverteilung als mögliche Ursache des atypisch verteilten SDHA-Signals in <i>En2</i> -transgenen Purkinje-Zellen	89
4.3	Intrinsische Regulation der SDHA-Expression durch Engrailed-Proteine	92
4.4	Extrinsische Faktoren als Ursache des atypisch verteilten SDHA-Signals	93
4.5	Der veränderte Succinatdehydrogenase-Transport als mögliche Ursache des atypisch verteilten SDHA-Signals	95
4.6	Folgen atypisch verteilter Mitochondrien und einer veränderten mitochondrialen Aktivität auf die neuronale Funktion	99
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>102</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>104</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>106</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>127</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
Ad	adult
Ap	axonaler Pol
APS	Ammoniumpersulfat
ARRB1	Arrestin Beta-1
ATP	Adenosintriphosphat
BAK	BCL2 homologous antagonist killer
BAX	BCL2-assoziiertes X-Protein
BCA	Bicinchoninsäure
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BGBI.	Bundesgesetzblatt
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DJ1	Parkinson-assoziierte Deglykase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
Dp	dendritischer Pol
DRP1	Dynamamin-related protein-1
E11, 13, ...	embryonaler Tag 11, 13, ...



EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFNA2, 5	Ephrin-A2, -A5
EIF4E	Eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 4E
ELF1	E74-like factor-1
EM	Elektronenmikroskopie
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotic
FGF8	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-8
FI	Fluoreszenzintensität
FIS1	Mitochondrial fission-1 protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
HIF1(A)	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1A
HRP	Meerrettichperoxidase
L7- <i>pcp-2</i>	Purkinje cell protein-2
LINE-1	Long interspersed nuclear element-1
MFN1, 2	Mitofusin-1, -2
miRNA	Micro-RNA
MIRO1, 2	Mitochondriale Rho-GTPase 1, 2
(m)RNA	(Boten-)Ribonucleinsäure
MS275	Entinostat
MW	Mittelwert
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form)
NDUFS1, 3	NADH-Dehydrogenase-Ubichinon-Eisen-Schwefel-Protein-1, -3
NGS	Normal-Goat-Serum

NT3, 4	Neurotrophin-3, -4
OPA1	Optic atrophy protein-1
P3, 6, ...	postnataler Tag 3, 6, ...
PAX2, 6, ...	Paired box-2, -6, ...
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PBX	Pre-B cell leukemia transcription factor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
PINK1	PTEN-induzierte Kinase-1
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAGS	Repulsive axon guidance signal
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHDA, B, C, D	Succinatdehydrogenase, Untereinheit A, B, C, D
SHH	Sonic Hedgehog
siRNA	kleine eingreifende RNA
SIRT3	Sirtuin-3
sRNA	kleine bakterielle RNA
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS(T)	Tris-gepufferte Saline (mit Tween20)
TE	Tris-EDTA

TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tg	transgen
TIM	Translocase der inneren Membran
TOM	Translocase der äußeren Membran
TRAK1, 2	Trafficking kinesin-binding protein-1, -2
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV	ultraviolett
WNT	Wingless/Integrated
Wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

### 1.1 Engrailed-2 und Autismus

Autismus zählt zu den neuropsychiatrischen Verhaltensstörungen, deren Ursache vor allem in einer genetischen Prädisposition gesehen wird. Seit einiger Zeit wird Engrailed-2 (*EN2*) als Kandidatengenen für Autismus-Spektrum-Störungen (ASD) beim Menschen diskutiert. Gefunden wurde ein intronischer Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP), rs1861972-rs1861973 A-C, der mit ASD assoziiert werden konnte (Benayed et al., 2005, Benayed et al., 2009, Gharani et al., 2004) und einen transkriptionellen Aktivator darstellt, die Transkription der *EN2*-DNA also verstärkt (Choi et al., 2012). 2016 konnte in einer thailändischen Kohorte eine Punktmutation gefunden werden, die ebenfalls mit ASD assoziiert wurde, aber eine Missense-Mutation darstellte (Hnoonual et al., 2016). Dies weist darauf hin, dass die Aktivierung und Repression der *EN2*-Genexpression ähnliche phänotypische Ausprägungen verursachen kann.

Nicht nur SNPs des *EN2*-Gens sind mit autistischen Phänotypen assoziiert; es gibt darüber hinaus Hinweise auf eine veränderte epigenetische Regulation der *EN2*-Expression im post-mortem Cerebellum eines autistischen Patientenkollektivs. In den Geweben der autistischen Patienten fanden sich verminderte Methylierungen des Lysins 27 des Histons 3, welches im methylierten Zustand die *EN2*-Expression reprimierte (James et al. 2013). Hingegen wurden vermehrte Methylierungen des Lysin 4 des Histons 3 nachgewiesen, welches im methylierten Zustand die *EN2*-Expression induzierte. Ausgelöst durch SNPs, Missense-Mutationen und veränderte epigenetische Mechanismen in Cerebellum-Geweben autistischer Patienten ließen sich folglich sowohl erhöhte als auch erniedrigte *EN2*-Expressionen mit Autismus assoziieren. Beide Regulationstypen standen außerdem im Tiermodell mit cerebellären Auffälligkeiten einer beeinträchtigten Purkinje-Zell-Reifung in Zusammenhang (Jankowski et al., 2004; Joyner et al., 1991; Millen et al. 1994). Über welche neuronale Netzwerke das Kleinhirn an einem autistischen Phänotyp beteiligt ist, ist bisher noch nicht geklärt. Diskutiert wird eine Verbindung zum Locus coeruleus, der Informationen direkt von den Purkinje-Zellen des Kleinhirns erhält (Schwarz et al., 2015). Dysfunktionen des adrenergen Locus coeruleus-

Systems gingen mit autistischen Verhaltensweisen einher (Mehler und Purpura, 2009), und auch in Engrailed-Knockout-Tieren, die autistische Verhaltensauffälligkeiten zeigen, war der Locus coeruleus in seiner Entwicklung beeinträchtigt (Simon et al., 2005). Engrailed-2-Genvariationen wurden nicht nur mit ASD assoziiert: In neuropädiatrischen Patienten mit *EN2*-Mutationen wurden auch gehäuft mentale Retardierung, Cerebralparese, Epilepsien und Verhaltensstörungen gefunden (Carratala-Marco et al., 2018).

Neben diesen humangenetischen und humane post-mortem Gewebe betreffenden Funden belegen Beobachtungen aus engrailed-transgenen Mausmodellen eine Verbindung von engrailed-Genveränderungen zu Phänotypen neuropsychiatrischer Erkrankungen. *En2*-Knockout-Tiere zeigten in Verhaltensversuchen verminderte soziale Interaktionen, eine eingeschränkte Konditionierung aversiver Reize und ein vermindertes Interesse an neu dargebotenen Objekten. Zudem wurden eine erschwerte räumliche Orientierung, depressive Charakteristika, sowie leichtgradig eingeschränkte motorische Fähigkeiten bei diesen Tieren beobachtet (Cheh et al., 2006). Hingegen fanden sich keine signifikanten Unterschiede zu Wildtyp-Tieren bei der Messung von stereotypen Verhaltensweisen oder Ultraschall-Lauten (Brielmaier et al., 2012). Interessanterweise lag im Cerebellum dieser Tiere auch eine signifikant höhere Serotonin-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp-Tier vor (Cheh et al., 2006). Dies ist deshalb bemerkenswert, da in autistischen Patienten erhöhte Serotonin-Spiegel im Serum festgestellt wurden (Whitaker-Azmitia, 2001) und bildgebungstechnisch erhöhte Serotonin-Synthesekapazitäten nachgewiesen werden konnten (Chugani et al., 1999). Außerdem konnten genetische Polymorphismen in der Promotor-Region eines Serotonintransporter-Gens mit Autismus assoziiert werden (Yirmiya et al., 2001).

## 1.2 Der Transkriptionsfaktor Engrailed-2

Engrailed-Proteine zählen zu den Homöodomain-Proteinen, einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, welche sich durch eine evolutionär hochkonservierte, ca. 60 Aminosäuren umfassende DNA-bindende Homöodomain auszeichnen (Logan et al., 1992; Prochiantz et al., 2014). Von Engrailed sind in Vertebraten zwei homologe Gene

bekannt, Engrailed-1 und Engrailed-2, welche größtenteils funktionell äquivalent sind (Morgan, 2006). Das Protein Engrailed-2 wurde erstmals in *Drosophila melanogaster*-Mutanten charakterisiert, bei welchen nach Deletion des Engrailed-2-Gens die regelrechte Entwicklung von Flügelsegmenten gestört war (Garcia-Bellido und Santamaria, 1972). Heute sind Engrailed-Gene in zahlreichen Tierstämmen nachgewiesen worden, in denen sie multiple Funktionen ausüben. Sie spielen bei der Festlegung der zellulären Identität von Einzelzellen oder Gruppen von Zellen, auch als Segmentierungsprozesse bekannt, eine Rolle, steuern die Zellvermehrung und das Überleben von Zellen und regulieren das zielgerichtete Auswachsen von Zellfortsätzen und damit sowohl Zellmigrations-Prozesse als auch die axonale Wegfindung. Zudem sind Engrailed-Proteine an der Differenzierung von Zellen beteiligt.

Engrailed-Proteine waren die ersten Homöodomain-Proteine, von denen nachgewiesen werden konnte, dass sie nicht nur – wie es für Transkriptionsfaktoren charakteristisch ist – an transkriptionellen Prozessen beteiligt sind, sondern auch in der Lage sind, durch Sekretion in den extrazellulären Raum und die Internalisierung in andere Zellen an interzellulären Signalprozessen teilzunehmen (Spatazza et al., 2013, Wizenmann et al., 2009). Die für diese Eigenschaften notwendigen Aminosäuresequenzen konnten auf molekularer Ebene identifiziert werden (Dupont et al., 2007; Maizel et al., 1999). Der Import von Homöodomain-Proteinen in die Zielzelle erfolgt nicht über etablierte Mechanismen der Endozytose – so zumindest der derzeitige Kenntnisstand – sondern wird durch eine Internalisierungssequenz gesteuert, mittels derer die Engrailed-Proteine ohne klassische Rezeptoren durch Membranen transportiert werden können (Derossi et al., 1996). Neben den Funktionen als Transkriptionsfaktoren und interzelluläre Signalmoleküle sind diese Homöodomainproteine an der Regulation der Translation (Dubnau und Struhl, 1996; Topisirovic et al. 2005), an der DNA-Replikation (Miotto und Graba, 2010) sowie an zellulären DNA-Reparatursystemen beteiligt (Rubin et al., 2007).

Das Engrailed-2-Protein besitzt außer der Homöodomäne noch weitere phylogenetisch stark konservierte Anteile, welche als Engrailed-Homologie-Regionen (EH) 1-5 bezeichnet werden. Die Homöodomäne wird nach dieser Nomenklatur als EH4 klassifiziert. Die Regionen EH1 und EH5 fungieren als Mediatoren einer transkriptionellen Repression, wobei EH1 mit dem Co-Repressor Groucho interagiert (Morgan, 2006; Tolkunova et al.,

1998). Auch die beiden Regionen EH2 und EH3 sind mittels einer Interaktion mit dem Homöodomainprotein PBX an der transkriptionellen Regulation beteiligt (Peltenburg und Murre, 1997).

### 1.3 Funktionen von Engrailed-2

#### 1.3.1 Die Rolle von Engrailed-2 bei der Kompartimentierung des Kleinhirns

Eine der frühesten beschriebenen Funktionen der Engrailed-Proteine stellt die Festlegung der Grenzen zwischen Diencephalon, Mesencephalon und Metencephalon dar. Engrailed-1 (EN1) wird frühembryonal in der Mittel- und Nachhirnregion exprimiert. Wird die EN1-Expression in murinen Deletionsmutanten unterdrückt, fehlen das Cerebellum und die Colliculi, die Hirnnerven III und IV werden nicht angelegt und die Extremitäten unvollständig ausgebildet (Wurst et al., 1994). Die Tiere versterben perinatal. Die ektopische Expression von EN im dorsalen Diencephalon von Hühnchen führt hingegen zur Differenzierung dieses Anteiles im Sinne des Tectums. Hierbei wird der diencephale Marker PAX6 reprimiert, während die im Mesencephalon exprimierten Faktoren PAX2, PAX5, FGF8, WNT1 und EFNA2 induziert werden (Araki und Nakamura, 1999). Darüber hinaus konnte in Transplantationsversuchen an Hühnchen und Wachteln gezeigt werden, dass die Verpflanzung von metencephalen, EN-exprimierenden Gewebeanteilen in das Prosencephalon dort ebenfalls eine EN-Expression und nachfolgend eine Umdifferenzierung in mesencephales Gewebe induziert (Martinez et al., 1991). Ähnliche Ergebnisse konnten beim Einbringen von Metencephalon-Gewebe aus Säugetieren in das Vorderhirn von Hühnchen beobachtet werden (Martinez et al., 1991). Auch in Xenopus-Embryonen führt die Überexpression von Engrailed zur ektopen Induktion mesencephaler Marker im Diencephalon, sowie zusätzlich zu einer Inhibition der Entwicklung der Augenbläschen (Ristoratore et al., 1999). Entsprechend resultierte die Ausschaltung der Expression der beiden Gene *eng2* und *eng3* im Zebrafisch in einer abnormen Faltung der Grenzregion zwischen Mittel- und Hinterhirn, und einer damit einhergehenden Repression der mesencephalen Markerproteine *Fgf8*, *Wnt1* und *Pax5* (Scholpp und Brand, 2001). Interessanterweise wurde beobachtet, dass die Induktion von EN in Hühnchen-Empfänger-Geweben signifikant häufiger bei WNT1-exprimierenden

Maus-Spendergeweben auftrat, sodass ein synergistischer Mechanismus zwischen WNT1 und EN wahrscheinlich erscheint (Bally-Cuif et al., 1992). Der ebenfalls an der Grenze von Mittel- und Nachhirn exprimierte Fibroblasten-Wachstumsfaktor 8 (FGF8) induziert die Expression von EN, während ihrerseits die FGF8-Expression von EN aufrechterhalten wird (Liu und Joyner, 2001). Dies geschieht auf transkriptioneller Ebene durch die Bindung von EN an das intronische Fragment der *Fgf8*-DNA (Gemel et al., 1999). Diese Rolle von FGF8 bei der neuronalen Differenzierung der Mittelhirn-Nachhirn-Grenze lässt sich in Zebrafischen verifizieren (Scholpp und Brand, 2001; Scholpp et al., 2003). Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass von einer starken phylogenetischen Konservierung dieses Mechanismus der regionenspezifischen Zelldifferenzierung ausgegangen werden kann.

Im Vergleich zu *En1*-Deletionsmutanten sind *En2*-Knockouttiere überlebensfähig, zeigen aber auch morphologische Veränderungen des Cerebellums: Es ist insgesamt in seiner Größe verringert und weist eine im Vergleich zum Wildtyp tier veränderte Faltung auf (Millen et al., 1994). Ähnlich *En1* bewirkt die Deletion des *En2*-Gens eine Posteriorisierung des Kleinhirns. Der Lobulus VIII, der normalerweise dem Zentrallobus zugeordnet ist, nimmt Eigenschaften des posterioren Lobus an. EN2 wird in einer im Vergleich zu EN1 lokal begrenzten Region um das Mittelhirn und Nachhirn exprimiert, überlappt in seiner Expression allerdings mit der des EN1. Es wird davon ausgegangen, dass EN2 die Funktion von EN1 kompensieren kann und deswegen der Phänotyp der *En2*-Deletion milder ausfällt (Hanks et al., 1995). Die Koordination der neuronalen Differenzierung an der Schnittstelle zwischen Mittel- und Nachhirn durch Engrailed betrifft auch die Entwicklung von noradrenergen oder serotonergen Kerngebieten. Ist die Expression von *En1* oder *En2* unterdrückt, sind die Anlagen des serotonergen dorsalen Raphekerns sowie des noradrenergen Locus coeruleus in ihrer Größe stark reduziert oder fehlen gänzlich. Andere serotonerge und noradrenerge Kerngebiete sind hingegen nicht betroffen (Simon et al., 2005).

Diese Experimente zeigen, dass Engrailed-Proteine für die Festlegung von Segmenten und Kompartimenten wichtig sind. Sie scheinen dabei für die zelluläre Identität und die damit verbundene Expression eines spezifischen Genmusters verantwortlich zu sein. Sie definieren eine für ein Segment/Kompartiment typische Zellidentität.



### 1.3.2 Engrailed als Regulator der axonalen Wegfindung

Die Etablierung von Kompartimenten im Zentralnervensystem ermöglicht die Aufteilung von größeren Zellverbänden in kleinere funktionelle Einheiten. Damit diese Zellkompartimente interagieren können, sind zielgerichtete Verschaltungen zwischen Hirnarealen nötig. Engrailed kann in die Kontrolle der Axonentwicklung eingreifen und gezielt Kernareale miteinander verbinden. Dieser Prozess wird als axonale Wegfindung bezeichnet. Durch ektopische Expression von Engrailed im mesencephalen Tectum von Hühnchen konnte gezeigt werden, dass nasale retinale Axone durch Engrailed angezogen wurden und temporale Axone Engrailed-exprimierende Gebiete eher vermieden (Friedman und O'Leary, 1996). Weitere Arbeiten aus dieser Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass diese Engrailed-Effekte über Rezeptor-Tyrosinkinasen der Ephrin-Familie vermittelt werden. EphrinA5-Liganden werden im Tectum in einem Gradienten entlang einer anterior-posterioren Achse exprimiert, sodass anterior geringere Konzentrationen vorliegen als posterior. Korrespondierend dazu befinden sich auf den Membranen auswachsender Axone temporaler retinaler Ganglienzellen vermehrt EphA-Rezeptoren, welche eine Abstoßung dieser Axone von tectalen Regionen höherer EFNA5-Liganden-Konzentration vermitteln (Fuchs et al., 2012). Die Etablierung der Gradienten der Eph-Liganden im Tectum wiederum kann durch EN2 gesteuert werden (Shigetani et al., 1997). Daten aus Hühnerembryonen, in deren rostralem Tectum EN1 mittels eines viralen Vektors überexprimiert wurde, zeigen, dass diese Überexpression eine Veränderung des rostrokaudalen Gradienten der Signalmoleküle RAGS und ELF1 und eine Abstoßung temporaler Axone bewirkt (Logan et al., 1996).

Neben der Regulation der axonalen Wegfindung in ihrer Funktion als klassische Transkriptionsfaktoren werden Engrailed Proteine auch als in den Extrazellulärraum sezernierte, interzellulär wirksame Signalmoleküle diskutiert. In *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, dass die Axone temporaler retinaler Ganglienzellen (rGCs) von hohen extrazellulären Konzentrationen von Engrailed-2 abgestoßen werden, während die Axone der nasalen rGCs von En2 angezogen wurden. Nach der Internalisierung von Engrailed in die Axone findet eine vermehrte Phosphorylierung des Initiationsfaktors der Translation EIF4E sowie des EIF4E-bindenden Proteins 4E-BP1 statt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Funktion von En2 bei der Führung der Axone der retinalen Ganglienzellen

auf einer Regulation der Translation beruht (Brunet et al., 2005). Darüber hinaus ist bekannt, dass Engrailed synergistisch zu EphrinA5 wirken kann, indem es die auswachsenden Axone für Ephrin-A5 sensibilisiert. So können selbst unterschwellige Konzentrationen der Ephrin-A5-Liganden eine Abstoßung der temporalen Axone retinaler Ganglienzellen bewirken (Wizenmann et al., 2009). Interessanterweise geschieht dies durch einen Adenosin A1-Rezeptor-vermittelten Mechanismus: Extrazelluläres Engrailed wird in die Wachstumskegel der Axone aufgenommen, und stimuliert dort, vermittelt durch vermehrte Translation der Komplex-1-Untereinheit NDUFS3, die ATP-Synthese und Sekretion in den Extrazellulärraum sowie dessen Hydrolyse. Das hierbei entstehende Adenosin vermittelt in Interaktion mit dem Adenosin A1-Rezeptor die Axon-führenden Eigenschaften von Engrailed (Stettler et al., 2012).

Ähnliche parakrine Funktionen von Engrailed sind mittlerweile auch im Zebrafischsystem bekannt. Eine ausreichende Konzentration von Eng2b - einer der in Zebrafischen exprimierten Variante des Engrailed-2-Proteins – im Extrazellulärraum ist notwendig, um eine regelrechte Entwicklung des Mittelhirns zu gewährleisten (Rampon et al., 2015).

### 1.3.3 Engrailed als Überlebensfaktor mesenzephaler dopaminerges Neurone

Eine weitere wichtige Erkenntnis aus der Analyse von *En1/En2*-Defizienzmutanten war, dass mesenzephaler dopaminerges Neurone (mDA-Neurone) zum Großteil fehlten. Diese Neurone spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung. Engrailed steht in zweierlei Weisen mit dem Schicksal dieser Zellen in Verbindung; zum einen in der Phase ihrer Anlage und zum anderen bei der Sicherstellung ihres Überlebens (Gherbassi und Simon, 2006).

Die Entwicklung der mDA-Neurone wird durch die beiden Faktoren SHH und FGF8 induziert. Während SHH zur Induktion dieser Neurone entlang einer dorso-ventralen Achse ausreichend ist, wird zur Induktion entlang der anterior-posterioren Achse zusätzlich FGF8 benötigt (Ye et al., 1998). mDA-Neurone exprimieren Engrailed zwischen dem embryonalen Tag 11 und 14 (Gherbassi und Simon, 2006), Engrailed induziert die FGF8-Expression und kann darüber auch die Identität der mDA-Neurone steuern (Gemel et al., 1999).

Trotz dieser Funktion als Zellidentitäts-Regulator werden in *En1/En2*-Doppelmutanten-Mäusen viele mDA Neurone angelegt, welche jedoch bei Geburt der Tiere nicht mehr nachweisbar sind. Dies ließ sich durch die Beobachtung begründen, dass bis zu E14 eine Caspase-3 vermittelte Apoptose der mDA-Neurone stattfand, die über einen zellautonomen Mechanismus vermittelt wurde und nicht sekundär auf der Deletion der Mes- und Metenzephalonregionen in diesen Mausmutanten beruhte (Albéri et al., 2004). Auch in heterozygoten *En1*-Mausmutanten konnte ein – wenn auch weniger drastisch ausgeprägter – Verlust der mDA-Neurone beobachtet werden. Dieser Zellverlust war ab der achten postnatalen Woche zu beobachten und mit einem auffälligen Verhaltensphänotyp assoziiert, der sich durch eine eingeschränkte Motorik, Anhedonie und ein gestörtes Sozialverhalten auszeichnete (Sonnier et al., 2007). In Zellkultur konnte dieselbe Arbeitsgruppe nachweisen, dass Engrailed-1 LINE-1-Elemente reprimierte und so DNA-Schädigungen und ein Absterben der mDA-Neurone verhindern konnte (Blaudin de Thé et al., 2018). Diese Befunde zeigen, dass Engrailed neuroprotektiv auf mDA-Neurone wirkt.

Ein weitere Erklärungsmöglichkeit für eine neuroprotektive Funktion von Engrailed wurde durch Versuche an *En1*-heterozygoten Tieren gefunden. Wenn in diese Tiere intrastriatal alpha-Synuklein-Fibrillen injiziert wurden, überlebten Neurone der Substantia nigra schlechter als im Wildtyp-Hintergrund (Chatterjee et al. 2019). Engrailed könnte also über extrazelluläre Mechanismen das Überleben von Neuronen beeinflussen.

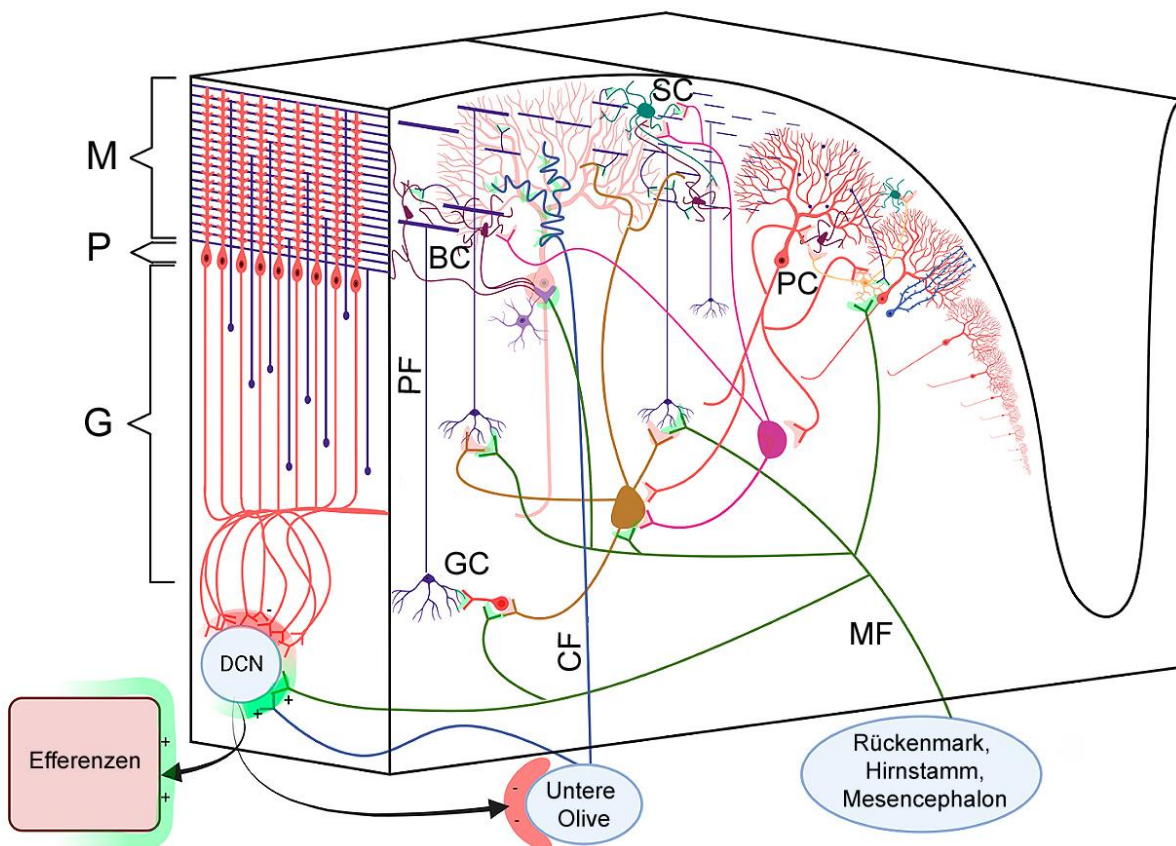
#### 1.4 Entwicklung cerebellärer Purkinje-Zellen und ihre Beeinflussung durch Engrailed-2

Wie bereits ausgeführt wurde, gehören Engrailed-Gene zu den Segment-Polaritätsgenen, was bedeutet, dass sie in die Etablierung von Segmenten und Kompartimenten sowie in die Aufrechterhaltung oder Festlegung von polaren Strukturen involviert sind. Gerade der Aufbau der Neurone ist von einer kennzeichnenden Polarität geprägt. Bevor auf den Einfluss von Engrailed-2 auf die neuronale Polarität eingegangen wird, soll kurz die Entwicklung des Kleinhirnkortex skizziert werden, die untrennbar mit der Ausprägung der polaren Purkinje-Zellen verknüpft ist. Das Wissen um den Aufbau des Kleinhirnkortex ist außerdem für die Beurteilung der hier gezeigten Kleinhirnschnitte essentiell.

#### 1.4.1 Der Aufbau des cerebellären Kortex

Der cerebelläre Kortex einer adulten Maus besteht aus drei histologischen Schichten; von der pialen Oberfläche ausgehend sind dies die Molekularschicht, welche im Wesentlichen die Dendritenbäume der Purkinje-Zellen und nur wenige Zellsomata enthält, die Purkinje-Zell-Schicht, in der die gleichnamigen Zellen einen Monolayer bilden, sowie die Körnerzellschicht mit einer sehr hohen Zelldichte. Unterhalb des Kleinhirnkortex liegt die weiße Substanz, in die zentral die Kleinhirnerne eingebettet sind. Die Purkinje-Zell-Neurone des Cerebellums entstehen in der ventrikulären Zone, werden zwischen E11 und E13 aus Stammzellen generiert und wandern in radiärer Richtung zur Kleinhirnplatte (Inouye und Murakami, 1980). Hier ordnen sie sich zunächst als eine mehrschichtige Struktur zwischen den Neuronen der Kleinhirnerne – die ungefähr zeitgleich entstehen – und der in der Proliferation befindlichen äußeren Körnerzellschicht an. Die außen gelegenen Körnerzellen wandern nach ihrer Entstehung sukzessive in radiärer Richtung nach innen, so dass sich bis zum P5 unterhalb der Purkinje-Zellschicht eine Schicht Körnerzellen bildet – die definitive Körnerzellschicht des erwachsenen Kleinhirns (Sotelo, 2004). Die Schichtung des Kleinhirnkortex eines Neugeborenen besteht also aus vier Schichten, die des erwachsenen Tieres aus drei. Der Aufbau und die Verschaltung sind Abb. 1 zu entnehmen.

Innerhalb des Kortex wurden acht verschiedene Neuronenpopulationen identifiziert, unter denen die Purkinje-Zellen eine zentrale Rolle einnehmen. Sie sind die einzigen Projektionsneurone des Kleinhirnkortex und stellen damit dessen efferentes System dar. Purkinje-Zellen werden von Kletterfasern innerviert, die aus den Nuclei olivares inferiores der Medulla oblongata stammen (Desclin, 1974) und dem Kleinhirn propriozeptive Informationen und Rückkopplungen aus den Bewegungsvorgängen im Körper zuleiten. Gleichzeitig werden die Purkinje-Zellen an ihren distalen Dendritenfortsätzen durch Parallelfasern kontaktiert, die von den Körnerzellen stammen. Letztere erhalten wiederum propriozeptive, aber auch vestibuläre Informationen über die Moosfasern. Von den



**Abb. 1: Aufbau und Verschaltung des Kleinhirnkortex.** Die Purkinje-Zellen (PC) erhalten Afferenzen aus der unteren Olive als Kletterfasern (CF), von den Körnerzellen (GC) als Parallelfasern (PF) und von Korbzellen (BC) und Sternzellen (SC). Die Purkinje-Zell-Axone projizieren in die tiefen Kleinhirnerne (DCN), die wiederum die einzige cerebelläre Efferenz darstellt. Die Körnerzellen erhalten wiederum Afferenzen aus Moosfasern (MF). (M) Molekularschicht, (P) Purkinje-Zellschicht, (G) Körnerzellschicht. Modifiziert nach Sydnor et al., 2022.

Parallelfasern ausgehend werden außerdem inhibitorische Interneurone erregt, welche wiederum die Purkinje-Zellen inhibieren. Ihre Somata liegen entweder in der Molekularschicht (Korb- und Sternzellen), in der Purkinje-Zell-Schicht (Candelabrum-Zellen) oder der Körnerzellschicht (Golgi-Zellen und Lugarozellen); ihre Dendriten liegen in der Molekularschicht, wo sie Informationen aus den Parallelfasern erhalten.

#### 1.4.2 Die Dendritenentwicklung der Purkinje-Zellen

Die Dendritogenese der Purkinje-Zellen läuft nach einem strikten Zeitplan ab und wird in Stadien eingeteilt. Embryonal zeigen Purkinjezellen einen bipolaren Aufbau mit einem führenden Fortsatz in Richtung der Pia und einem nachfolgenden Fortsatz in Richtung

tiefe Kerne. Bis P3 werden dann zunehmend neue Stammdendriten gebildet, die in der Folgezeit bis P6 wieder rückgebildet werden. Übrig bleiben bis zu zwei definitive Stammdendriten, die meist noch auf einen reduziert werden. Der Stammdendrit wächst in die Molekularschicht ein, während er sich immer feiner aufzweigt. Das Wachstum des Dendritenbaumes findet zwischen P10 und P15 größtenteils parallel zur cerebellären Oberfläche statt, während nach P15 die vertikale Wachstumskomponente im Fokus steht. Bis P30 ist die morphologische Dendritogenese der Purkinje-Zellen abgeschlossen (Armengol and Sotelo 1991, Berry und Bradley, 1976). Während des gesamten Prozesses existieren bereits Synapsen zwischen den unreifen Purkinje-Zell-Dendriten und den Axonen der einwachsenden Kletter- und Parallelfasern. Diese Synapsen bilden sich im weiteren Verlauf der Entwicklung ebenfalls zum Teil wieder zurück (Chedotal und Sotelo, 1993).

#### 1.4.3 Die Kompartimentierung des Kleinhirnkortex

Der cerebelläre Kortex ist funktionell in parasagittale Banden unterteilt, zwischen denen sich sowohl die Konnektivität als auch das biochemische Expressionsprofil der Purkinje-Zellen unterscheiden (Hawkes und Gravel, 1991; Oscarsson, 1979). Erste Befunde, die eine parasagittale Kompartimentierung des Kleinhirns zeigen, stammen von Jan Voogd, der anhand der Myeloarchitektur Fasern verfolgen und Axone entlang der Mittellinie gruppieren konnte (Voogd et al., 1969). Auf biochemischer/genetischer Ebene können diese Kompartimente heute durch viele Beispiele belegt werden, wie zum Beispiel Zebrin II (Ahn et al., 1994), *L7-pcp-2* (Oberdick et al., 1993), sowie *WNT7B*, *PAX2* und auch *EN1* und *EN2*. Neben diesen parasagittalen Mustern gibt es auch Genexpressionsprofile, die den Kleinhirnkortex entlang der antero-posterioren Achse in Kompartimente einteilen (Millen et al., 1995). Die beiden Mustertypen lassen vermuten, dass der Kleinhirnkortex schachbrettartig in kleine Areale von fünf bis zehn Purkinje-Zellen eingeteilt ist, die jeweils eigenständige Entitäten darstellen könnten. Da unter den Musterbildnern auch axonale Wegfindungsmoleküle und Transkriptionsfaktoren sind, liegt es nahe, dass die Entstehung der Kompartimente auf mehreren interagierenden Faktoren beruht, zu denen auch *EN2* gehört.

#### 1.4.4 Transgene Mausmodelle zur Analyse der Engrailed-2-Funktionen

Um die Funktion von EN2 *in vivo* zu untersuchen, entwickelten Joyner et al. (1991) ein murines Knockout-Modell, indem sie in das zweite Exon – welches auch die für die Homöodomain von EN2 kodierende Sequenz enthält – mit einem Expressionsvektor für das Neomycin-Resistenzgen ersetzten. Diese Tiere waren überlebens- und fortpflanzungsfähig, fielen jedoch durch ein im Vergleich zum Wildtyp verkleinertes Cerebellum und dessen veränderte Lobulierung auf: In vermalen Sagittalschnitten zeigte sich eine Assoziation des Lobulus VIII (Pyramis) mit dem Lobulus IX (Uvula), abweichend von dessen Vergesellschaftung mit den Lobuli VI (Declive) und VII (Tuber vermis) im Wildtyp-Tier. Im Bereich der Kleinhirn-Hemisphären fand sich zudem eine veränderte Faltung der beiden Crura des Lobulus ansiformis, sowie zusätzlich ein verkleinerter Paraflocculus (Joyner et al., 1991). Aufgrund der gezielten Ausschaltung der für die Homöodomain von EN2-kodierenden Sequenz wird diese Mausmutante als En-2<sup>hd</sup> bezeichnet. Ein molekularer Signalweg, der für die morphologischen Änderungen verantwortlich sein könnte, ist bisher nicht bekannt, aber die Gruppe um Joyner konnte zeigen, dass sich die innere Körnerzellschicht langsamer entwickelte. Da die Proliferation von Körnerzellen die Lobulierung des Kleinhirns maßgeblich beeinflusst (Legué et al., 2016) liegt die Vermutung nahe, dass auch in der En-2<sup>hd</sup> Maus lokal unterschiedliche Proliferationsvorgänge die Lobulierung beeinflussen. Alternativ oder damit assoziiert könnte die Identität einzelner Körnerzellgruppen verändert worden sein, so dass sich anterior gelegene Körnerzellen wie posteriore Zellen verhalten und an anderer Stelle zu proliferieren beginnen. Dies konnte aus En-2<sup>hd</sup> Mäusen, die mit Mäusen einer lacZ-exprimierenden Mauslinie gekreuzt waren, gefolgert werden. LacZ wurde in diesen Kreuzungen in distinkten parasagittalen und cranio-caudalen Mustern exprimiert. Wurde nun Engrailed-2 deletiert, war das Muster Lobus-spezifisch verändert. Dies wurde als Änderung der Zellidentität in En-2<sup>hd</sup>-Tieren interpretiert (Millen et al. 1994).

Auch wenn in En-2<sup>hd</sup>-Mutanten kein EN2-Protein nachgewiesen werden konnte, war nicht ausgeschlossen, dass verkürzte EN2-Proteine exprimiert werden, z.B. durch die Nutzung alternativer Promotoren oder durch den im Expressionsvektor enthaltenen beta-Aktin-Promotor. Da diese EN2-Proteinvarianten funktionelle Domänen enthalten können, kann eine

biologische Restaktivität nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund etablierten Millen et al. (1994) eine zweite transgene Mauslinie, in der eine Neomycin-Resistenzkassette große Teile des Exons 1 ersetzte. Diese Mauslinie wird aufgrund der N-terminalen Deletion als *En-2<sup>ntd</sup>* bezeichnet. Eine morphologische Untersuchung dieser Tiere legte die gleichen Auffälligkeiten in der cerebellären Größe und Lobulierung offen, die auch in den *En-2<sup>hd</sup>*-Mäusen beschrieben worden waren. Auch wenn alternative Genprodukte in der *En-2<sup>ntd</sup>* Maus nicht ausgeschlossen werden können, zeigt die Kongruenz der beiden Phänotypen, dass der morphologische Phänotyp mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Fehlen von EN2 zurückzuführen ist (Millen et al., 1994).

Bereits 1995 konnte gezeigt werden, dass *En2*-mRNA spätembryonal in parasagittalen Mustern im Kleinhirn exprimiert wird (Millen et al. 1995). Zu diesem Zeitpunkt wachsen Moos- und Kletterfasern in das Kleinhirn (Mason und Gregory, 1984), sind aber noch nicht mit den späteren Zielzellen verbunden. Erst innerhalb der ersten beiden Postnatalwochen wachsen die Afferenzen in den Kortex ein und bilden mit den Zielzellen synaptische Verbindungen, die in parasagittalen Mustern angeordnet sind (Miyazaki et al., 2012; Vogel et al., 1996). Um eine Rolle von *Engrailed-2* bei der parasagittalen Organisation des Kleinhirnkortex experimentell zu beweisen, wurde EN2 unter dem *L7-*pcp-2**-Promotor in Purkinje-Zellen des Kleinhirns exprimiert (Baader et al., 1998). Da EN2 im Cerebellum unter normalen Bedingungen lediglich in der frühen Embryonalzeit in Purkinje-Zellen und danach nur noch in Körnerzellen exprimiert wird, liegt in den *L7En-2*-Tieren in späten embryonalen und adulten Stadien eine prolongierte, ektopische Expression von *Engrailed-2* vor. Gleichzeitig wird in physiologisch EN2 negativen Zellen in der *L7En-2* Mutante nun EN2 exprimiert, sodass das parasagittale physiologische EN2 Expressionsmuster aufgehoben ist. In der Folge war die typische biochemische Kompartimentierung der Purkinje-Zellen nur noch diffus ausgeprägt und korrelierend damit das Einwachsen der Moosfasern verändert (Baader et al. 1999). Ähnlich den Knockouttieren zeigten die *L7En-2* Mäuse ebenfalls ein kleineres Kleinhirn. Diese Größenreduktion konnte auf ein lokal umschriebenes Absterben von Purkinje-Zellen zurückgeführt werden (Jankowski et al. 2004). Die überlebenden Purkinje-Zellen wirken zunächst morphologisch unauffällig, weisen jedoch zwischen P5 und P7 eine verlangsamte Dendritenentwicklung auf, die im adulten Stadium in einem kürzeren Dendritenbaum sichtbar ist (Jankowski et al. 2004).



### 1.5 Mitochondrien in Neurogenese, Differenzierung, Axogenese und Neurodegeneration

Mitochondrien sind Organellen, die Energie für den zellulären Stoffwechsel durch oxidative Phosphorylierung bereitstellen und damit an wesentlichen zellulären Funktionen beteiligt sind. Sie nehmen eine zentrale Rolle beim Überleben von Neuronen ein, induzieren oder verhindern Zelltod, sind wichtig für die Neurogenese und die zelluläre Differenzierung. Dabei erfüllen die Mitochondrien Aufgaben im zellulären Metabolismus, der Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichtes, der Calcium-Homöostase und des Fettstoffwechsels.

Mitochondrien einer Zelle sind durch Teilungen und Verschmelzungen einem ständigen Wandel unterworfen (Pernas und Scorrano, 2016). Diese Veränderungen laufen synchronisiert zum Zellzyklus ab: In der G1- und der S-Phase finden vermehrt Fusionsvorgänge statt, während sich in der G2- und der Mitosephase die Mitochondrien häufiger teilen (Iwata und Vanderhaeghen, 2021; Mitra et al., 2009). Die mitochondriale Dynamik ist folglich mit der Neurogenese eng verknüpft. In neuronalen Stammzellen, die sich in der Selbsterneuerung befinden, ist die Fusionsaktivität der Mitochondrien höher als in Zellen, die differenzieren (Iwata et al., 2020; Khacho et al., 2016). Auf der anderen Seite ist die mitochondriale Fusion mit einer gesteigerten oxidativen Phosphorylierung verbunden (Yao et al., 2019), sodass in proliferierenden Zellen vermehrt Energie zur Verfügung steht. Gleichzeitig wurden in teilungsfähigen Zellen eine erhöhte aerobe Glykolyse gefunden. Durch die Glykolyse werden zum einen ATP und Reduktionsäquivalente, zum anderen Intermediärprodukte für Synthesestoffwechselwege wie die Nukleotidbiosynthese bereitgestellt (Lunt und Vander Heiden, 2011; Pfeiffer et al., 2001). Beim Übergang von der Proliferationsphase in die Zelldifferenzierung erfolgt die zunehmende Umstellung von der Glykolyse zur oxidativen Phosphorylierung (Agostini et al., 2016; O' Brien et al., 2015). Experimentelle Belege hierfür wurden in *Drosophila*-Neuroblasten gefunden, die nach Repression von Untereinheiten der Cytochrom-C-Oxidase weiter proliferierten und nicht mehr ausdifferenzieren konnten (Homem et al., 2014). In *Drosophila*-Modellen für unterschiedliche Hirntumoren fand sich jedoch bei einem Knockdown der Komplexe I und V auch eine Einschränkung der Mitoserate (van den Ameele und Brand, 2019), was darauf hindeutet, dass die oxidative Phosphorylierung

nicht nur im Übergang von Proliferation zu Differenzierung entscheidend ist, sondern auch die Proliferation limitieren kann. Über welche Mechanismen die oxidative Phosphorylierung die Proliferation und/oder Differenzierung beeinflusst ist nicht abschließend geklärt. Arbeiten an hippokampalen neuronalen Stammzellen zeigen, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) die Neurogenese abhängig vom Kontext und vom Zelltyp beeinflussen können (Adusumilli et al., 2021; Iwata und Vanderhaeghen, 2021; Khacho et al., 2016).

Ähnlich vielschichtig ist der Einfluss der Energiegewinnung über die Glykolyse auf Proliferation und zelluläre Differenzierung. Wird die Expression des murinen TP53-induzierbaren Glykolyse und Apoptose Regulators (TIGAR) vermindert, sinkt auch die Expression von Markern der neuronalen Differenzierung (Zhou et al., 2019). Der Ablauf der Glykolyse ist demnach also für die zelluläre Differenzierung wichtig. Ist allerdings das Glykolyse-Intermediärprodukt Methylglyoxal (MGO) in höheren Mengen vorhanden, wird die Notch1-Rezeptor-Translation reprimiert und die zelluläre Differenzierung von neuronalen Stammzellen verhindert (Peng et al., 2019; Rodrigues et al., 2020). Glykolytische Prozesse sind also zell- und kontextabhängig für verschiedene Prozesse der Differenzierung essentiell.

Neben der zentralen Rolle der Mitochondrien bei der oxidativen Phosphorylierung beherbergen Mitochondrien Enzyme des Citratzyklus und der beta-Oxidation - Prozesse, die die Proliferationsleistung von Stammzellen beeinflussen können (Iwata und Vanderhaeghen, 2021): Das *McpH1*-Gen (Microcephalin) ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und aktiviert dort Calcium-Kanäle (Journiac et al., 2020). Eine veränderte intramitochondriale Calciumkonzentration beeinflusst die Aktivität der alpha-Ketoglutarat-Dehydrogenase, einem Schlüsselenzym des Citratzyklus (Iwata und Vanderhaeghen, 2021) und reguliert die neuronale Proliferation (Jayaraman et al., 2018). Ist die Expression der Carnithin-Palmitoyltransferase 1a erniedrigt oder deren Funktion blockiert, kann die beta-Oxidation in den Mitochondrien in geringerem Umfang ablaufen und entsprechend weniger Energie zur Verfügung gestellt werden. Der Wechsel zwischen ruhenden und proliferierenden neuronalen Stammzellen ist gestört und Zellen sterben zunehmend ab (Knobloch et al., 2017). Der mitochondriale Stoffwechsel kann somit über mehrere Stoffwechselwege die Neurogenese steuern.

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale Anzahl, Größe und Stoffwechselaktivität im Zusammenhang mit der Entwicklungsgeschwindigkeit von Neuronen in unterschiedlichen Spezies stehen (Iwata et al., 2023). Um die Entwicklung komplexer neuronaler Netzwerke zu ermöglichen, muss die Axonentwicklung eines jeden Neurons sowie die axonale Wegfindung präzise gesteuert werden. Für diese Prozesse wird viel Energie benötigt (Carlier, 1990). Ungefähr 50 % des ATP in Neuronen werden im Aktinstoffwechsel verbraucht (Bernstein und Bamburg, 2003). Daher ist nachvollziehbar, dass Mitochondrien als Hauptakteure in der ATP-Synthese zum Zellpol, an dem die Axogenese stattfindet, gelangen müssen. Circa 30 - 40 % der Mitochondrien einer Zelle befinden sich zu jedem Zeitpunkt in Bewegung. Hierbei kommt ein Mikrotubuli-gestützter Transportmechanismus zum Einsatz. Es wird zwischen dem anterograden und dem retrograden Transport unterschieden, wobei Mitochondrien auch während des Transportvorganges ihre Richtung ändern können (Smith und Gallo, 2018). Der anterograde Transport wird über eine Interaktion des Kinesins KIF5 mit der äußeren Mitochondrienmembran mittels der GTPasen MIRO1 und MIRO2 sowie TRAK1 vermittelt (Hirokawa et al., 1991; Lin und Sheng, 2015). Der retrograde Transport findet Dynein-vermittelt statt. Hier dienen ebenfalls TRAK1 sowie TRAK2 als Mediator zwischen Mitochondrien und Mikrotubuli (van Spronsen, 2013). Durch den erhöhten Energiebedarf an distalen Axonendigungen ist es wenig verwunderlich, dass hier nicht nur eine siebenfach höhere Mitochondriendichte als in proximaleren Teilen des Axons nachgewiesen werden konnte, sondern auch eine höhere Dichte als in anderen Zellfortsätzen. Wurden Axone an ihrem Wachstum gehindert, zogen sich die Mitochondrien in zentralere Zellkompartimente zurück (Morris und Hollenbeck, 1993). Dies lässt darauf schließen, dass der mitochondriale Transport in einer Nervenzelle dynamisch auf das Wachstumsverhalten ihres Axons reagieren kann. Jedoch können mitochondriale Dynamiken ihrerseits auch die Axogenese beeinflussen. In Zellen, in denen die Funktion von DRP1 – einem wichtigen mitochondrialen Fissionsprotein – gehemmt wurde, kam es zu einem verringerten axonalen Wachstum (Steketee et al., 2012).

Die Arbeitsgruppe um Hollenbeck machte die interessante Beobachtung, dass sich Mitochondrien bevorzugt in aktiv auswachsenden Axonkollateralen befanden (Ruthel und Hollenbeck, 2003). Bei der Bildung von Axonkollateralen werden Netzwerke von

Aktinfilamenten benötigt, welche die Aussprossung von Filopodien ermöglichen. Diese Ansammlungen von Aktinfilamenten bilden sich bevorzugt in räumlicher Nähe zu Mitochondrien aus und benötigen dazu deren respiratorische Aktivität (Ketschek und Gallo, 2010; Smith und Gallo, 2018; Spillane et al., 2011). Konsistent mit dieser Beobachtung war bei einer experimentellen Verringerung der Mitochondriendichte oder einer Störung der mitochondrialen respiratorischen Aktivität die Axonkollateralisierung eingeschränkt (Spillane et al., 2013). In dopaminergen Neuronen finden sich ebenfalls Belege für die Korrelation zwischen mitochondrialer Funktion zur Axonkollateralisierung (Pacelli et al., 2015). Insgesamt scheinen die mitochondriale Verteilung und Funktion bei der Axonkollateralisierung eher eine permissive als eine induktive Funktion einzunehmen. Somit sind eine ausreichende Dichte und Funktion eine notwendige, jedoch nicht hinreichende Bedingung für die Ausbildung von Kollateralen (Smith und Gallo, 2018). Entsprechend führen Änderungen in der Anzahl von Mitochondrien oder im mitochondrialen Stoffwechsel auch zu verminderter axonaler Regeneration (Han et al., 2016) und erhöhter Degeneration (Barrientos et al., 2011).

Seit längerer Zeit wird die mitochondriale Dysfunktion in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie des Morbus Parkinson diskutiert. In post-mortem Geweben von Parkinson-Patienten fanden sich reduzierte Aktivitäten des mitochondrialen Komplex I der Atmungskette (Schapira et al., 1990). Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle bei der Auslösung der Apoptose-Kaskade durch die Permeabilisierung ihrer Membran (Kroemer et al., 2007). Aufgrund des defizienten Komplex I werden die Mitochondrien sensibler für die Auslösung der Apoptose über den Bax-Signalweg. Somit wird die Apoptoseschwelle der Neurone herabgesetzt (Perier et al., 2005). Diese Beobachtungen lassen jedoch die Frage offen, ob die reduzierte Funktion der Atmungskette in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung kausal beteiligt ist, oder ob sie möglicherweise sekundär durch die Neurodegeneration ausgelöst wird. Um diese Frage experimentell zu adressieren, entwickelten Ekstrand et al. ein murines Knockout-Modell für das für den mitochondrialen Transkriptionsfaktor A kodierende Gen (*Tfam*). In diesen Mäusen zeigte sich eine insgesamt verringerte Expression für Proteine der Atmungskette kodierenden mitochondrialen DNA. Begleitend kam es zur Degeneration dopaminergener Neurone, der Bildung intraneuronaler Einschlusskörper sowie einem parkinsonoiden Phänotyp mit Bewegungsstörung (Ekstrand et al., 2007). Eine

Beeinträchtigung der Atmungskette resultiert neben der erhöhten Vulnerabilität der Zellen im Bezug auf Apoptose außerdem in der vermehrten Bildung von ROS. Dieser oxidative Stress kann wiederum die respiratorische Aktivität der Mitochondrien beeinträchtigen (Schapira, 1995); es handelt sich somit um einen Teufelskreis, der letztendlich in die Neurodegeneration führt. Darüber hinaus sind verschiedene mitochondriale Proteine bekannt, deren Mutation mit Neurodegeneration assoziiert sind. Beispiele hierfür sind das in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte PINK1 (Gandhi et al., 2006; Silvestri et al., 2005), oder das in Mitochondrien lokalisierte Protein DJ1 (Bonifati et al., 2003; Yokota et al., 2003). Auch pharmakologische Eingriffe in den mitochondrialen Stoffwechsel resultieren in degenerativen Prozessen. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) hemmt den Komplex I der oxydativen Phosphorylierung, erhöht die ROS-Produktion und fördert kognitive Defizite und Bewegungsstörungen (Hantraye et al., 1996). Das Pestizid Rotenon inhibiert ebenfalls den Komplex I, was zu einem hochselektiven nigrostriatalen Zellverlust und einem damit einhergehenden hypokinetisch-rigiden Phänotyp führt (Betarbet et al., 2000). Eine mitochondriale Dysfunktion kann das zelluläre Überleben auch indirekt über die proteasomale Funktion betreffen. Ist die oxidative Phosphorylierung gestört, so schränkt dies ATP-abhängige proteasomale Prozesse ein und nicht degradierte Proteine können akkumulieren (Höglinger et al., 2003; Schapira, 2008).

#### 1.6 Mitochondrien und ihre Rolle in der Pathophysiologie der Autismus-Spektrum-Störungen

Es existieren viele Belege dafür, dass Autismus-Spektrum-Störungen mit einer mitochondrialen Dysfunktion verknüpft sein könnten, auch wenn bisher kein kausaler Zusammenhang nachgewiesen werden konnte. Im Serum autistischer Kinder wurden verminderte Spiegel von NAD<sup>+</sup> und ATP nachgewiesen, während in ihrem Plasma eine Reduktion antioxidativer Moleküle wie des reduzierten Glutathions vorlag (Essa et al., 2013). In einzelnen Fällen waren ASD-Patienten im Kinder- und Jugendalter mit verminderten Aktivitäten der mitochondrialen Komplexe II und III in Skelettmuskelbiopsien auffällig (Guevara-Campos et al., 2013). Auch in neuronalen post-mortem Geweben wurden verminderte Aktivitäten mitochondrialer Enzyme – im Speziellen der Komplexe I und V der

Pyruvat-Dehydrogenase im frontalen Kortex (Gu et al., 2013) sowie der Komplexe I und IV im Temporallappen (Tang et al., 2013) – nachgewiesen. Auf Proteinebene konnten zudem geringere Mengen der mitochondrialen Fusionsproteine MFN1, MFN2 und OPA1, und höhere Mengen der mitochondrialen Spaltungsproteine FIS1 und DRP nachgewiesen werden. Vermutlich ist also die mitochondriale Dynamik in Zellen des ZNS von ASD-Patienten verändert.

Auch wenn Mechanismen der Engrailed-vermittelten Neuroprotektion (s. Kapitel 1.3.3) bisher nur unzureichend untersucht sind, bestehen Hinweise darauf, dass Engrailed über einen Mitochondrien-vermittelten Mechanismus neuroprotektiv wirken kann (Fuchs et al., 2012). Die Zugabe von exogenem Engrailed zu kultivierten mDA-Neuronen, die zuvor mit 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) – einer Substanz, die die Funktion des Komplexes I der Atmungskette hemmt und zur Erzeugung parkinsonoider Zustände im Tiermodell verwendet wird – behandelt worden waren, verbesserte deren Überleben. Dieser protektive Effekt konnte durch die Zugabe von *Ndufs1*-siRNAs abgeschwächt werden, was nahelegt, dass Engrailed die Translation mehrerer Komplex-I-Untereinheiten induziert. Konsistent mit dieser Hypothese ist der Befund, dass im Nervengewebe von heterozygoten *En1*-defizienten Mäusen geringere Mengen an *Ndufs1* und *Ndufs3* exprimiert werden. Wurde vermehrt Engrailed exprimiert, stieg der Dopamingehalt in mDA-Neuronen. Engrailed beeinflusst also nicht nur das Überleben der mDA Neurone, sondern auch ihre Funktion (Alvarez-Fischer et al., 2011).

## 1.7 Fragestellung

Da aus vorangegangenen Untersuchungen bekannt ist, dass eine Überexpression von Engrailed-2 die Differenzierung von Purkinje-Zellen temporär verlangsamt und diese Entwicklungsretardierung bis ins adulte Stadium persistiert, stellt sich die Frage, über welche Mechanismen diese Entwicklungsstörung verursacht werden könnte. Ergebnisse aus genetischen Analysen haben gezeigt, dass Mitochondrien ein Ziel der veränderten Engrailed-Expression sein könnten (Holst et al., 2008). Mitochondrien nehmen eine wichtige Rolle bei der Neurogenese, bei Apoptose, bei axonalem Wachstum und Ausdifferenzierung von Neuronen ein (Cheng et al., 2010). Mitochondrien und Engrailed

spielen also in ähnlichen zellulären Prozessen eine Rolle. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine veränderte Engrailed Expression mit einer verminderten Expression von Parvalbumin assoziiert ist (Jankowski et al., 2004). Eine Parvalbumin-Defizienz führte in Neuronen zu einem vergrößerten Mitochondrienvolumen und zu einer Zunahme der Mitochondriendichte (Janickova et al., 2020). Es erscheint folglich plausibel anzunehmen, dass die En2 Überexpression direkt oder über die Veränderung der Parvalbumin-Expression die Mitochondrien-Morphologie und/oder -Funktion beeinflusst und damit zur Entwicklungsretardation von Neuronen führt.

Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war es, zu untersuchen, ob in den Purkinje-Zellen von Engrailed-2 defizienten und überexprimierenden Mäusen die Mitochondrien in Struktur, Anzahl oder Anordnung verändert sind.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Chemikalien

#### 2.1.1 Geräte

**Tab. 1:** Verwendete Geräte.

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung, Hersteller</b>
Binokular-Lupe	Wild M8, Wild Heerbrugg, Heerbrugg, Schweiz
Blotting-Gerät	Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Brutschrank	Heracell™ VIOS 160i CO2 Incubator, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Elektronenmikroskop	JEM-1400Plus, JEOL, Akishima, Japan
Elektrophoresekammer (Western Blot)	Bio-Rad Criterion™ Cell, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Elektrophoresekammer (Gelelektrophorese)	Sub-Cell GT Cell, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Geldokumentationssystem	Gel Doc 2000™, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Heizplatte	RCT basic, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Homogenisator	Precellys 24 Tissue Homogenizer, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Imaging System für Western Blot	Advanced Fluoreszenz & ECL Imager, Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Konfokales Laser Scanning-Mikroskop	1. Eclipse Ti2, Nikon Microscope Solutions, Tokio, Japan 2. Leica DM IRE2, Leica Microsystems, Wetzlar
Netzteil für Gelelektrophorese	Bio-Rad Power Pac 300, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Ofen	Thermo Scientific™ Vacuotherm, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Perfusionspumpe	KDS Legato 100, KD Scientific Inc., Holliston, USA



Gerät	Bezeichnung, Hersteller
pH-Meter	SevenCompact, Mettler-Toledo International Inc., Columbus, USA
Photometer	µQuant Universal Microplate Spectrophotometer, Bio Tek Instruments Inc., Charlotte, USA
Schüttler	1. Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Deutschland 2. Mixer HC, Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Thermocycler	GeneAmp PCR System 2400, PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Tissue Chopper	Mcllwain Tissue Chopper, Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd., Guildford, Vereinigtes Königreich
Vibratom	Leica VT 100S, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Vortex	Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Waage	NewClassic MS, Mettler-Toledo International Inc., Columbus, USA
Zellkultur-Einsätze	Millicell® Cell Culture Inserts, Durchmesser 30 mm, Porengröße 0,4 µm, Merck Millipore, Burlington, USA
Zentrifuge	Pico™ 17, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

### 2.1.2 Chemikalien

**Tab. 2:** Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalien, Reagenzien	Hersteller/Bezugsquelle
Acrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Agar agar	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Agarose	Biozym LE Agarose, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

<b>Chemikalien, Reagenzien</b>	<b>Hersteller/Bezugsquelle</b>
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Ampuwa (Wasser)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
B-27™ Supplement	Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Coomassie-Blau	PageBlue™ Protein Staining Solution, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
dNTP	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
2-Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
10x DreamTaq™-Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
GeneRuler 100 bp Plus DNA-Marker	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
GlutaMAX™ Supplement	Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Glycidether 100	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Ketamin	Ketamidol 100 mg/ml Injektionslösung, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garbsen, Deutschland
6x Ladepuffer Gelelektrophorese	6x DNA Loading Dye, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
4x Laemmli Probenpuffer	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Magnesiumchlorid 25 mM	MgCl <sub>2</sub> 25 mM, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Methylnadic anhydrid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mowiol® 4-88	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Neurobasal™ Medium	Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Osmiumtetroxid	Polysciences Inc., Warrington, USA

Chemikalien, Reagenzien	Hersteller/Bezugsquelle
Page Ruler™ Proteinmarker	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Primer	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Propylenoxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Proteinase K	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ringer-Lösung	Ringer Fresenius Spüllösung Plastipur®, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
Rompun	Rompun 20 mg/ml (Wirkstoff: Xylazin) Injektionslösung, Bayer, Leverkusen, Deutschland
10x Roti® Block	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Taq-Polymerase	DreamTaq™ DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
TEMED	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Trans-Blot® Turbo™ Transfer Buffer	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

**Tab. 3:** Verwendete Lösungen.

Lösungen	Zusammensetzung	
Cacodylatpuffer (Elektronenmikroskopie)	Inhaltsstoffe	in 1000 ml
	Natriumcacodylat	42,8 g
	ddH <sub>2</sub> O	auf 1000 ml, pH 7,4
100 x Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> -Stammlösung für PBS/Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Inhaltsstoffe	pro 100 ml
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,0 g
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,5 g
	ddH <sub>2</sub> O	auf 100 ml

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
10x Elektrophorese-Puffer (Western Blot)	Inhaltsstoffe	pro 1000 ml
	Tris	30,29 g
	Glycin	144,13 g
	SDS	10 g
	ddH <sub>2</sub> O	auf 1000 ml, pH 8,3
Epon-Mischung	Inhaltsstoffe	Volumen
	Epon Reagenz A	18 ml
	Epon Reagenz B	12 ml
	2,4,6-Tris(dimethyla- mino-methyl)phenol	0,6 ml
Epon Reagenz A	Inhaltsstoffe	Volumen
	2-Dodecenylnbernstein- säureanhydrid	100 ml
	Glycidether 100	62 ml
Epon Reagenz B	Inhaltsstoffe	Volumen
	Methylnadic anhydrid	89 ml
	Glycidether 100	100 ml
Extraktionspuffer (Western Blot)	Inhaltsstoffe	pro 100 ml
	1M Tris HCl pH 8,0	5 ml
	1M NaCl	15 ml
	Triton X-100	1 ml
	Natrium-Deoxycholat	0,5 g
	SDS	0,1 g
	ddH <sub>2</sub> O	auf 100 ml

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
Modifizierte Hank's Lösung	Inhaltsstoffe	pro 1000 ml
	NaCl	8,0 g
	KCl	0,373 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,125 g
	Glucose x H <sub>2</sub> O	1,0 g
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,368 g
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,317 g
	NaHCO <sub>3</sub>	0,35 g
	ddH <sub>2</sub> O	auf 1000 ml, pH 7,2
Medium für cerebelläre Schnittkulturen	Inhaltsstoffe	pro 50 ml
	Neurobasal™ Medium	48,5 ml
	B-27™ Supplement	1 ml
	GlutMAX™ Supplement	0,5 ml
10x PBS	Inhaltsstoffe	pro 1000 ml
	NaCl	87,7 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	13,8 g
	ddH <sub>2</sub> O	auf 1000 ml
PBS/Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Inhaltsstoffe	pro 1000 ml
	10x PBS	100 ml
	100 x Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> -Stammlösung	10 ml
	ddH <sub>2</sub> O	auf 1000 ml, pH 7,4
2x Phosphat-Puffer	Inhaltsstoffe	pro 1000 ml
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	27,6 g
	ddH <sub>2</sub> O	auf 1000 ml, pH 7,2
Sammelgel-Puffer (Western Blot)	Inhaltsstoffe	pro 100 ml
	Tris	6,06 g
	SDS	0,4 g
	ddH <sub>2</sub> O	auf 100 ml, pH 6,8

Lösungen	Zusammensetzung	
TBE	Inhaltsstoffe	pro 1000 ml
	Tris	108 g
	Borsäure	55 g
	0,5 M Na <sub>2</sub> EDTA	40 ml
	ddH <sub>2</sub> O	auf 1000 ml
10x TBS	Inhaltsstoffe	pro 1000 ml
	Tris	6,06 g
	NaCl	8,76 g
	ddH <sub>2</sub> O	auf 1000 ml, pH 7,6
TBST	Inhaltsstoffe	pro 1000 ml
	10x TBS	100 ml
	Tween 20	1 ml
	ddH <sub>2</sub> O	auf 1000 ml
TE	Inhaltsstoffe	pro 1000 ml
	Tris	1,21 g
	EDTA	0,37 g
	Tween 20	0,5 ml
	ddH <sub>2</sub> O	auf 1000 ml, pH 9,0
Trenngel-Puffer (Western Blot)	Inhaltsstoffe	pro 100 ml
	Tris	18,17 g
	SDS	0,4 g
	ddH <sub>2</sub> O	auf 100 ml, pH 8,8

### 2.1.3 Antikörper

**Tab. 4:** Verwendete Antikörper.

Antikörper	Spezies	Hersteller
Anti-Calbindin-D28K	Maus	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Anti-Cyclophilin B	Kaninchen	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-FIS-1	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Anti-Mitofusin-2	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

Antikörper	Spezies	Hersteller
Anti-SDHA	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-TOM20	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Maus AlexaFluor 488	Ziege	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Anti-Kaninchen Cy3	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-Kaninchen HRP	Ziege	Dako, Agilent, Santa Clara, USA

## 2.2 Versuchstierhaltung

Bei den für diese Arbeit verwendeten Tieren handelt es sich um Mäuse aus der Linie L7En-2, die in einem reinen FVB/N-Hintergrundstamm gehalten werden, und En-2<sup>-/-</sup>-Mäuse (En-2<sup>ntd</sup>, Erläuterung s. Kapitel 1.4.4), die auf einen C57BL6-Hintergrundstamm rückgekreuzt waren. Die FVB/N-Tiere wurden von der Firma Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen und im hauseigenen Tierstall gezüchtet. Sie sind für ihre großen Würfe und eine hohe reproduktive Potenz bekannt (Taketo et al., 1991). Die C57BL6/JRj-Mäuse stammen ebenfalls von der Firma Janvier. Beide Mauslinien zeigen keinen pathologischen Phänotyp (Baader et al. 1998, Wurst et al. 1994).

Die Haltung der Tiere erfolgte nach § 11 des geltenden Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), welches zuletzt durch Artikel 2 Absatz 20 des Gesetzes vom 20. Dezember 2022 (BGBl. I S. 2752) geändert wurde. Die Tiere wurden in Isolatoren bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von zwölf Stunden Licht zu zwölf Stunden Dunkelheit gehalten. Sie hatten jederzeit freien Zugang zu Futter und Wasser sowie zu Versteckmöglichkeiten und Gegenständen zur Beschäftigung. Abweichungen von diesem Regelwerk sind bei den einzelnen Versuchen angegeben und damit begründet, dass die Experimente bereits ab 2018/2019 durchgeführt worden sind.

Zur Verpaarung wurde je ein Männchen mit bis zu zwei Weibchen für drei Tage in einem Käfig zusammengesetzt. Um übermäßige Zucht zu vermeiden, wurden die Mäuse für höchstens vier Tage zusammengesetzt und die Verpaarungen in der Tierzuchtmanagementsoftware PyRAT (Python based Relational Animal Tracking) dokumentiert. Die durchschnittliche Schwangerschaftsdauer beträgt 20 Tage. Der Tag der Geburt des

Nachwuchses wird als P0 bezeichnet. Für die weiteren Versuche wurden Tiere am dritten und siebten Postnataltag (P3, P7), sowie adulte Tiere mit einem Alter von drei bis sechs Monaten verwendet (im Folgenden mit Ad abgekürzt).

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Genotypisierung der L7En-2-Tiere

Die Genotypisierung wurde an Schwanzspitzen durchgeführt, die von juvenilen und adulten Mäusen abgenommen wurden. Es sei darauf hingewiesen, dass diese Experimente vor Neuerung des Tierschutzgesetzes durchgeführt wurden und noch keinen Tierversuchsantrag erforderten. Die Schwanzspitzenbiopsien wurden in 200 µl eines Verdauungspuffers gegeben, der sich wie folgt zusammensetzte:

<b>Schwanzspitzen-Verdau</b>	<b>1x</b>
10x Dream-Taq-Buffer	20 µl
Proteinase K (10 mg/ml)	5 µl
H <sub>2</sub> O	175 µl
<b>Gesamt</b>	<b>200 µl</b>

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 55 °C unter Schütteln bei 500 rpm. Am nächsten Tag wurde die Proteinase K bei 95 °C für 15 min denaturiert. Die Reagenzgefäße wurden für 1 min bei 13000 rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert und anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

Für die PCR wurden die folgenden Primer verwendet (jeweils in der Konzentration 20 pmol/µl):

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
L7En-2-Primer forward	5' - CTGGGACCCTCAGCCCTCACC
L7En-2-Primer reverse	5' - TCCTTCTCCGTCTACCGCAGG
GAPDH-Primer forward	5' - TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC
GAPDH-Primer reverse	5' - CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC

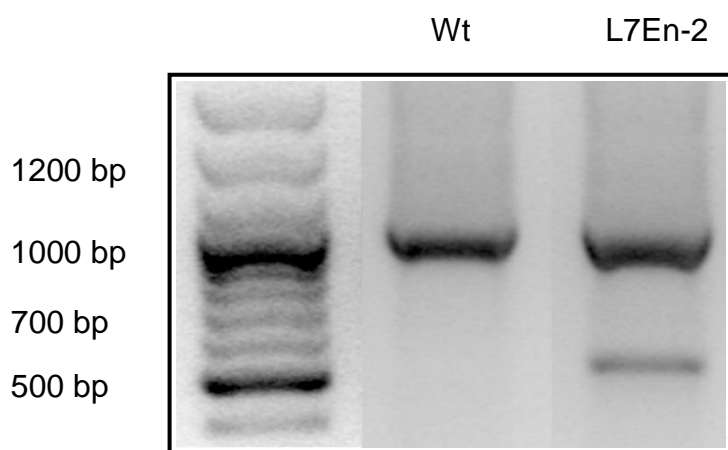


Es wurden zwei PCR-Mischungen angesetzt (die Angaben sind pro Ansatz zu verstehen):

<b>PCR-Mix 1</b>	<b>1x</b>
10x DreamTaq™-Puffer	1,5 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0,32 µl
L7En-2_F-Primer	0,5 µl
L7En-2_R-Primer	0,5 µl
GAPDH_F-Primer	0,5 µl
GAPDH_R-Primer	0,5 µl
DMSO	1,2 µl
H <sub>2</sub> O	7,98 µl
<b>Gesamt</b>	<b>13 µl</b>

<b>PCR-Mix 2</b>	<b>1x</b>
10x DreamTaq™-Puffer	0,5 µl
dNTP (10 mM)	0,4 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl
H <sub>2</sub> O	3,8 µl
<b>Gesamt</b>	<b>5 µl</b>

In jedes PCR-Reaktionsgefäß wurden 13 µl des PCR-Mix 1 und 2 µl DNA aus den Schwanzspitzen-Verdauen pipettiert. Die Proben wurden in den Thermocycler geladen und das PCR-Programm wurde gestartet. Nach einem anfänglichen Denaturierungsschritt für 30 s bei 94 °C wurden die Proben auf eine Temperatur von 80 °C gebracht und bei dieser Temperatur je 5 µl des PCR-Mix 2 mit der Taq-Polymerase zugegeben. Es handelte sich somit um eine Hot-Start-PCR. Es wurden 30 PCR-Zyklen mit den Parametern 1 min Denaturierung bei 94 °C, 1 min Hybridisierung bei 63 °C und 1 min Elongation bei 72 °C durchlaufen. Anschließend erfolgte eine finale Extensionsphase für 5 min bei 72 °C. Die Proben wurden bei 4 °C aufbewahrt.



**Abb. 2: Genotypisierung L7En-transgener Mäuse mittels PCR und Gelelektrophorese.** Die erwarteten Fragmentlängen der PCR-Produkte betragen 500 bp für das L7En-2-Konstrukt und 1000 bp für das GAPDH-Kontroll-Produkt.

Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte mittels einer Agarose-Gelelektrophorese. Es wurde ein 1 %iges Agarosegel in TBE-Puffer gegossen und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml versetzt (1:20.000 einer 10 mg/ml Stocklösung). Die Elektrophorese wurde für 60 min bei 100 V durchgeführt. Die Gele wurden unter UV-Licht aufgenommen. Als Referenz wurde der DNA-Marker 100 bp plus eingesetzt. Erwartet wurde eine Bandenlänge von 500 bp für das L7En-2-Genkonstrukt und eine Bande bei 1000 bp für das Kontroll-Genprodukt GAPDH (vgl. Abb. 2).

### 2.3.2 Genotypisierung der En-2<sup>-/-</sup>-Tiere

Der Verdau der Schwanzspitzenbiopsien erfolgte analog zur Beschreibung für die Genotypisierung der L7En-2-Tiere. Für die PCR wurden die folgenden Primer verwendet (jeweils in der Konzentration 20 pmol/µl):

Primer	Sequenz
Engrailed-Primer EF5_F	5' - CAACCACCAGCATCCACATC
Neomycin-Primer NF1_F	5' - CTGGGCACAACAGACAATCG
Engrailed-Primer ER3_R	5' - CAGAATAGCGCGTGCAAGTAG

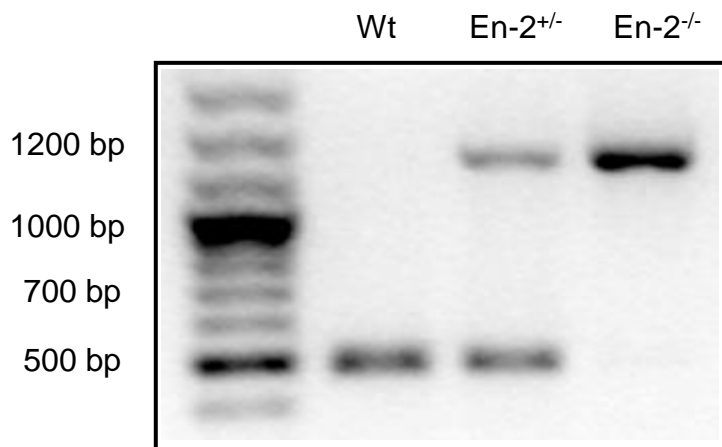
Es wurden zwei PCR-Mischungen angesetzt (die Angaben sind pro Ansatz zu verstehen):

<b>PCR-Mix 1</b>	<b>1x</b>
10x DreamTaq™-Puffer	2 µl
EF5-Primer	0,4 µl
NF1-Primer	0,5 µl
ER3-Primer	1 µl
DMSO	1,6 µl
H <sub>2</sub> O	12,5 µl
<b>Gesamt</b>	<b>18 µl</b>

<b>PCR-Mix 2</b>	<b>1x</b>
10x DreamTaq™-Puffer	0,5 µl
dNTP (10 mM)	0,6 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl
H <sub>2</sub> O	3,6 µl
<b>Gesamt</b>	<b>5,0 µl</b>

Die Prozedur war identisch zu der bei der L7En-2-Charakterisierung beschriebenen. Unterschiede waren, dass 35 PCR-Zyklen mit den Parametern 1 min Denaturierung bei 94 °C, 1 min Hybridisierung bei 62 °C und 1 min 30 s Elongation bei 72 °C durchlaufen wurden und anschließend eine finale Extensionsphase für 5 min bei 72 °C erfolgte. Die Proben wurden ebenfalls bei 4 °C aufbewahrt.

Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte auf einem 1 %igen Agarose-Gel. Erwartet wurde eine Bandenlänge von 482 bp für das En-2-PCR-Produkt und eine Bande bei 1150 bp für das *En2*-Produkt mit interponierter Neomycin-Kassette (vgl. Abb. 3).



**Abb. 3: Genotypisierung *En-2*<sup>-/-</sup>-transgener Mäuse mittels PCR und Gelelektrophorese.** Die erwarteten Fragmentlängen der PCR-Produkte betragen 482 bp für das *En2*-Produkt und 1150 bp für das *En2*-Neomycin-Konstrukt.

## 2.4 Histologische Methoden

### 2.4.1 Perfusion

Die Methode der Perfusionsfixierung wurde mit Aktenzeichen Az 84-02.04.2017.A120 vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt und unter Anleitung des Tierversuchsleiters Prof. Baader durchgeführt. Die Anästhesie der Tiere wurde durch eine intraperitoneale Injektion einer Ketamin/Rompun-Lösung (Volumenverhältnis 4:1) durchgeführt. Für adulte Tiere wurden 300 µl (entsprechend 24 mg Ketamin/ 1,2 mg Rompun) verwendet, für P7-Tiere 50 µl. Für P3-Tiere wurde das Anästhetikum im Verhältnis 1:5 in Ringer-Lösung verdünnt und es wurden 20 µl pro Tier injiziert. Der Wirkungseintritt des Anästhetikums wurde abgewartet und anschließend durch die Reaktionslosigkeit auf dargebotene auditive Reize sowie Schmerzreize überprüft. Eine Schwanzspitzenbiopsie für die Genotypisierung (s. o.) wurde entnommen.

Die Tiere wurden auf einer Unterlage fixiert und das Fell mit 70 % Ethanol benetzt. Die Haut und das Peritoneum wurden im Bereich des Oberbauches eröffnet und der Schnitt wurde bis zur oberen Thoraxapertur erweitert. Die Rippen wurde durch laterale Schnitte entlang der Axillarlinie durchtrennt, ohne die Axillargefäße oder die Aa. thoracicae internae zu verletzen. Der Thoraxschild wurde nach lateral und kranial mobilisiert und fixiert. Hierbei wurde darauf geachtet, den Hals nicht zu komprimieren, um die arterielle Gefäßversorgung zum Gehirn nicht einzuschränken. Das Herz wurde im Mediastinum mobilisiert. Die Perfusionskanüle wurde an der Herzspitze in leicht dorsaler Stichrichtung in den linken Ventrikel eingeführt. Dann wurde die Perfusionspumpe gestartet und gleichzeitig

das rechte Atrium eröffnet. Begonnen wurde die Perfusion mit Ringerlösung bei einem konstanten Fluss von 15 ml/min bei adulten, von 10 ml/min bei sieben Tage alten und 7 ml/min bei drei Tage alten Tieren. Danach erfolgte die Perfusion mit denselben Flussraten mit 4 % Paraformaldehyd, das in Phosphatpuffer mit pH 7,4 angesetzt und auf Körpertemperatur vorgewärmt wurde. Es wurde jeweils für 2 min mit Fixans perfundiert.

Nach der Perfusion wurden die Tiere dekapitiert. Von kaudal aus wurde die Kopfhaut median bis zur Schnauze eingeschnitten und nach lateral mobilisiert. Die nuchale Muskulatur wurde entfernt. Anschließend wurde die Schädelkalotte vom Foramen magnum ausgehend nach lateral durchtrennt und abgenommen. Das Gehirn wurde vorsichtig angehoben und die Hirnnerven an der Schädelbasis durchtrennt. Nach der vollständigen Präparation wurden die Hirngewebe in 4 % PFA auf dem Schüttler bei Raumtemperatur nachfixiert; bei Präparation adulter Tiere für 6 h, bei P7-Tieren für 3 h und bei P3-Tieren für 2 h. Nach einem Wasch-Schritt in PBS wurden die Gewebe in 0,1 % Natriumazid/PBS bei 4°C aufbewahrt, um einer Kontamination durch Mikroorganismen vorzubeugen.

#### 2.4.2 Vibratomschnitte

Die fixierten Gewebe wurden in 2 % Agar/PBS eingebettet (ca. 10 ml pro Gewebe). Es wurden 50 µm dünne Vibratomschnitte hergestellt. Am Frequenz-Drehregler wurde der Wert 6 gewählt, am Geschwindigkeits-Drehregler der Wert 5. Die Amplitude wurde auf die Stufe 4 eingestellt. Zum Schutz vor Kontamination durch Mikroorganismen und zur Vermeidung von Austrocknungseffekten wurden die Schnitte in 0,1 % Natriumazid/PBS in 24-Well-Platten aufbewahrt.

#### 2.4.3 Immunhistochemische Färbungen an cerebellären Geweben

Für die in dieser Arbeit gezeigten lichtmikroskopischen Auswertungen der mitochondrialen Verteilung wurden ausschließlich vermale Schnitte des Cerebellums verwendet. Die Schnitte wurden aus dem Natrium-Azid in PBS überführt und bei Raumtemperatur einmal für 5 min und einmal für 10 min gewaschen. Anschließend wurde eine Antigen-Demas- kierung in TE-Puffer bei einem pH von 9,0 unter 30-minütigem Erhitzen auf 80 °C

durchgeführt. Die Schnitte wurden in 2 ml - Eppendorf-Tubes mit TE (pH 9) gegeben und in diesen im temperierbaren Inkubationsschüttler für 30 min auf 80 °C erhitzt. Die mit SDHA-Erstantikörper zu färbenden Schnitte wurden kurz in PBS abgekühlt und in 100 % Methanol bei -20 °C für 30 min inkubiert. Das Methanol war auf -20 °C vorgekühlt worden. Bei den Schnitten, die nicht mit SDHA-Antikörper gefärbt wurden, wurde diese Prozedur übersprungen. Nach einem einzelnen Wasch-Schritt in PBS erfolgte die Permeabilisierung der Schnitte in 0,5 % Triton X-100/PBS für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte einmal für 5 min und einmal für 10 min in PBS gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen für den Erstantikörper fand eine Inkubation in Roti® Block-Lösung in PBS/Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> für 2 h bei Raumtemperatur statt. Danach wurde der Erstantikörper appliziert. Dieser wurde in der oben genannten Blockierlösung ange-setzt. Zur Verifizierung der Purkinje-Zell-Identität wurde ein gegen Calbindin gerichteter, in Mäusen hergestellter Antikörper (Sigma) in der Verdünnung 1:500 benutzt. Für die mitochondriale Darstellung kam ein gegen die Untereinheit A der Succinatdehydrogenase (SDHA) gerichteter Antikörper aus Kaninchen in der Verdünnung 1:200 zur Anwendung. Es wurde ein Volumen von 300 µl Antikörper-Lösung pro Well verwendet. Als Kontrollfärbungen wurden Schnitte verwendet, die nicht in Erstantikörper, sondern lediglich in Blockierlösung inkubiert worden waren. Die Inkubation der Erstantikörper/Blockierlösung erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler bei 100 rpm. Um eine Austrocknung der Schnitte zu vermeiden, wurden die 24-Well-Platten am Rand mit Parafilm abgedichtet. Zur Etablierung der mitochondrialen Färbung wurden alternativ auch Antikörper gegen MFN2 (1:50), TOM20 (1:200) und FIS1 (1:100) verwendet.

Am zweiten Tag fanden zunächst gründliche Wasch-Schritte in PBS einmal für 5 min und fünfmal für 10 min statt. Anschließend wurden die Schnitte mit den Zweitantikörpern anti-Maus-Alexa-488 mit grüner Fluoreszenz sowie mit anti-Kaninchen-Cy-3 mit roter Fluoreszenz inkubiert. Beide Zweitantikörper wurden 1:1000 in Roti® Block-Lösung/PBS/Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> verdünnt und 500 µl Volumen pro Well aufgetragen. Die Inkubation fand für 2 h bei 37 °C im Brutschrank bei Dunkelheit statt. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Wasch- und Inkubationsschritte bei Dunkelheit durchgeführt, um die Fluoreszenz des Zweitantikörpers nicht auszubleichen. Es schlossen sich zwei Wasch-Schritte, einmal für 5 min und einmal für 10 min, in PBS an. Eine Gegenfärbung der Zellkerne fand danach mit Hoechst 33258 (1 µg/ml in PBS) für 10 min bei Raumtemperatur mit 500 µl

Färbelösung pro Well statt. Es folgten erneut Wasch-Schritte, einmal für 5 min und fünfmal für 10 min. Schließlich wurden die gefärbten Schnitte in 70-100 µl Mowiol pro Objektträger eingedeckelt. Vor der Mikroskopie wurden die Schnitte für mindestens 6 h, meist jedoch über Nacht getrocknet. Die fertigen Objektträger wurden bei Dunkelheit und 4 °C aufbewahrt.

#### 2.4.4 Cerebelläre Schnittkulturen

Die für diese Arbeit verwendeten cerebellären Schnittkulturen wurden zum Teil von mir selbst und zum Teil zur Reduktion der Versuchstierzahlen in Zusammenarbeit mit Herrn Mohammed Bahaaeldin angefertigt. Es wurden ausschließlich Tiere der L7En-2-Mauslinie zum Zeitpunkt P8 verwendet. Die Präparation fand unter einer Sterilbank mit sterilem Instrumentarium statt. Die Tiere wurden dekapitiert. Von kaudal aus wurde die Kopfhaut median bis zur Schnauze eingeschnitten und nach lateral mobilisiert. Die nuchale Muskulatur wurde entfernt. Anschließend wurde die Schädelkalotte vom Foramen magnum ausgehend nach lateral durchtrennt und abgenommen. Das Gehirn wurde vorsichtig angehoben und die Hirnnerven an der Schädelbasis durchtrennt. Nach der Entnahme wurden die Hirngewebe sofort in eiskalte Hank's-Lösung überführt. Dort wurden die Grenze zwischen Vorderhirn und Mittelhirn und anschließend die Pedunculi cerebellares durchtrennt. Die Meningen wurden weitestgehend entfernt, um ein Auswandern der Zellen und damit Anheften der Schnitte an die Zellkulturmembran zu ermöglichen. Die Klinge des Tissue Choppers wurde angefeuchtet. Es wurden 350 µm dicke Schnitte angefertigt und in Hank's-Lösung überführt. Die Hank's-Lösung wurde anschließend verworfen und durch Kulturmedium (s. Tab. 3) ersetzt. 6-Well-Platten wurden mit 1 ml Kulturmedium pro Well befüllt und mit Zellkultureinsätzen bestückt. Die Schnitte wurden auf die Membranen transferiert. Es wurde überschüssiges Medium abpipettiert, sodass lediglich ein schmaler Flüssigkeitssaum um das Gewebe verblieb. Damit wurde ein Aufschwimmen verhindert und das Anwachsen der Kulturen ermöglicht. Die Kulturplatten wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Nach 6 h wurden 100 µl Medium auf die Membran hinzugegeben. Nach 24 h wurden ca. 450 µl Medium vom Rand der Membran abgenommen und durch die gleiche Menge frischen Mediums ersetzt.

Im weiteren Verlauf erfolgte ein Wechsel des Mediums alle zwei bis drei Tage. Hierzu wurden 200 µl Medium abgenommen und 250 µl frisches Medium hinzugefügt. Die Schnittkulturen wurden nach sieben Tagen *in vitro* (DIV7) fixiert. Dafür wurde das restliche Medium verworfen. Es wurde je 1 ml einer 4 % Paraformaldehyd-Lösung unter und auf die Membran gegeben. Die Inkubation wurde für 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurden die Gewebe bei 4 °C in Natriumazid/PBS aufbewahrt, um eine Kontamination zu verhindern.

Die Färbungen der Schnittkulturen wurden identisch zu den Färbungen der Vibratom-schnitte (s. Kapitel 2.4.3) durchgeführt. Die Mikroskopie, die Datenerfassung und die statistische Auswertung erfolgten nach den unten beschriebenen Methoden.

#### 2.4.5 Vorbereitung der Präparate für die Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Präparate wurden freundlicherweise von Frau Stefanie Ramrath zur Verfügung gestellt. Zur Beurteilung der Ergebnisse soll die Methodik im Folgenden kurz dargestellt werden. Die sieben Tage alten Mäuse wurden mit einer 2,5 % Paraformaldehyd/2,5 % Glutaraldehyd-Lösung in Phosphatpuffer perfundiert und ihre Cerebella präpariert (Methodik s. Kapitel 2.4.1). Die Gewebe wurden mit dem Vibratom in 100 µm dicke Teilstücke geschnitten und für dreimal 5 min in Cacodylatpuffer gewaschen. Anschließend fand eine Inkubation in 1 % Osmiumtetroxid für 2 h bei Raumtemperatur statt. Es folgte eine erneute Spülung in Cacodylatpuffer für zweimal 10 min. Im Anschluss wurden die Gewebe in einer Ethanolreihe entwässert (zweimal 5 min in 30 %, 10 min in 50 %, 70 % und 90 %, sowie zweimal 10 min in 100 % Ethanol). Danach fand eine Inkubation in 100 % Propylenoxid für zweimal 15 min statt. Eine im Verhältnis 1:1 mit Propylenoxid vermischte Eponmischung wurde für eine Stunde auf die Gewebe gegeben, gefolgt von einem 3:1-Gemisch aus Eponmischung und Propylenoxid über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Polymerisation in purer Eponmischung durchgeführt. Hierzu wurden die Gewebestücke in Plastikformen gegeben und das Kunstharz in einem Brutschrank bei 100 mbar Vakuum zunächst für 6 h bei 40 °C und anschließend für 12 h bei 60 °C polymerisiert. Anschließend wurden 70 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt.



## 2.5 Biochemische Methoden

### 2.5.1 Proteinextraktion und Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die in dieser Arbeit gezeigten Western Blots wurden Gewebe sieben Tage alter Mäuse (P7) verwendet. Die Tiere wurden durch cervikale Dislokation getötet und dekapitiert. Die Präparation der Gehirne erfolgte analog zur Beschreibung in Kapitel 2.4.1. Nach der Entnahme wurde das Cerebellum in PBS auf Eis präpariert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebe wurden bei -80 °C gelagert. Es wurde eine Schwanzspitzenbiopsie für die Genotypisierung entnommen.

Zur Proteinextraktion wurden die Cerebella in 400 µl Protein-Extraktionspuffer und 16 µl 25x cOmplete™-Protease-Inhibitor-Puffer gegeben. Es wurden Precellys-Beads hinzugegeben und im Homogenisator ein Programm von 10 s bei 5000 rpm durchlaufen. Nach einem Inkubationsschritt auf Eis für 15 min wurden die Homogenisate für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in 1,5 ml-Reagenzgefäße überführt. Es folgte eine Behandlung im Ultraschallbad mit fünf Zyklen mit jeweils 5 s.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben wurde ein BCA-Proteinassay durchgeführt. Hierzu wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) nach dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll verwendet. Es wurde eine Verdünnungsreihe einer BSA-Lösung mit Konzentrationen von 0 - 2000 µg/ml hergestellt. In eine 96-Well-Platte wurden jeweils drei Ansätze der unterschiedlich konzentrierten BSA-Lösungen als Standardreihe, sowie jeweils drei Ansätze der Proteinextrakte in den Verdünnungen 1:10 sowie 1:20 pipettiert. Zu den Proben wurden jeweils 200 µl BCA-Lösung gegeben. Die Proben wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die Farbreaktion durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 562 nm quantifiziert. Anhand der mit der Standardreihe ermittelten Kalibrierungsgerade wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt. Diese Methodik war im Labor anhand einer Tabellenkalkulation etabliert. 120 µl der Proteinextrakte wurden mit 40 µl 4x SDS Laemmli-Probenpuffer verdünnt und bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.5.2 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gele für die SDS-PAGE wurden einen Tag vor dem Versuch vorbereitet. Das obere Gel (Sammelgel) enthielt 5 % Acrylamid und das untere Gel (Trenngel) enthielt 10 % Acrylamid. Die Gele setzten sich wie folgt zusammen:

<b>Sammelgel</b>	<b>Volumen</b>	<b>Trenngel</b>	<b>Volumen</b>
Sammelgelpuffer	315 µl	Trenngelpuffer	1500 µl
Acrylamid 40 %	312,5 µl	Acrylamid 40 %	1500 µl
H <sub>2</sub> O	1825 µl	H <sub>2</sub> O	2880 µl
SDS 10 %	25 µl	SDS 10 %	60 µl
APS 10 %	25 µl	APS 10 %	60 µl
TEMED	2,5 µl	TEMED	2,5 µl
<b>Gesamt</b>	<b>2505 µl</b>	<b>Gesamt</b>	<b>6002,5 µl</b>

Die Gele wurden in die mit Elektrophoresepuffer (siehe Tab. 2) gefüllte Elektrophoresekammer eingebaut und beladen. Die Proteinverdünnungen wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt. In jede Kammer des Sammelgels wurden 10 µl Proteinverdünnung und 10 µl Laemmli-Probenpuffer gegeben. Von jedem Proteinextrakt wurden Proteinmengen von 10 µg und 20 µg aufgetragen. Es wurde PageRuler (Thermo Fisher Scientific) als Proteinmarker verwendet. Die Elektrophorese wurde mit 20 mA pro Gel in der Kammer gestartet. Nachdem die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten, wurde die Stromstärke auf 25 mA pro Gel erhöht.

### 2.5.3 Western Blot-Analyse

Die PVDF-Membranen wurden für 2 min in 100 % Methanol aktiviert und danach kurz in ddH<sub>2</sub>O abgewaschen. Anschließend fand eine Equilibrierung in Trans-Blot Turbo-Puffer für 10 min statt. Die Gele wurden im Trans-Blot® Turbo™ Transfer System für 10 min bei 25 V und 2,5 mA auf die Membranen übertragen. Die Gele wurden auf einem Schüttler für 2 h in Coomassie-Blau gefärbt und danach über Nacht in ddH<sub>2</sub>O ausgewaschen. Die PVDF-Membranen wurden für 5 min in TBST gewaschen und danach für 2 h bei Raumtemperatur in 5 % Milch in TBST blockiert. Je nach Proteinmasse der untersuchten

Proteine wurden die Membranen anhand des Proteinmarkers zerschnitten und in 8 ml Erstantikörper-Lösung in Falcon Tubes bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Es kam derselbe Antikörper gegen SDHA wie in der immunhistochemischen Färbung (s. Kapitel 2.4.3) in der Verdünnung 1:1000 zum Einsatz. Als Kontrollen wurde Cyclophilin in der Verdünnung 1:8000 benutzt.

Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal für 15 min in TBST gewaschen. Als Zweitantikörper kamen in Ziegen produzierte HRP-konjugierte gegen Maus bzw. Kaninchen gerichtete Antikörper zum Einsatz. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 100 rpm. Zur Quantifizierung der Proteinmengen wurde eine Chemolumineszenz-Reaktion durchgeführt. Es wurde das Femto-Reagenz (Thermo Fisher Scientific) mit einer Inkubationsdauer von 5 min bei Dunkelheit benutzt. Nach dem Anfertigen von Aufnahmen im Imaging-System wurde die Auswertung der Bandenstärken in ImageJ/FIJI durchgeführt.

## 2.6 Mikroskopie und fotografische Dokumentation

### 2.6.1 Mikroskopie und fotografische Dokumentation der SDHA-Färbungen

Die Mikroskopie und die fotografischen Aufnahmen der Gewebsschnitte wurden an zwei unterschiedlichen Mikroskopen (s. Tab. 1) durchgeführt, wobei zu vergleichende Schnitte immer an demselben Mikroskop aufgenommen wurden. Es wurden jeweils mindestens drei Gewebsschnitte von jeweils drei Wildtyp-Tieren und drei transgenen Tieren angefärbt und von jedem gefärbten Schnitt mindestens zwei Aufnahmen angefertigt. Die exakten statistischen Werte sind in den Legenden genannt. Für jede der transgenen Mauslinien En-2<sup>ntd</sup> und L7En-2 wurden zu den Zeitpunkten dritter Postnataltag (P3), siebter Postnataltag (P7) und adult (Ad) jeweils drei Paare von Wildtyp- und transgenen Tieren untersucht. Die Schnitte wurden vor der Auswertung so prozessiert, dass ein Vergleich der Färbung am axonalen und dendritischen Pol nicht verändert wurde (s.u.).

## 2.6.2 Mikroskopie und fotografische Dokumentation der elektronenmikroskopischen Präparate

Die elektronenmikroskopischen Präparate wurden mir freundlicherweise von Frau Stefanie Ramrath zur Verfügung gestellt. Die Präparate wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop TEM JEOL JEM 1400 Plus aufgenommen, das mit einer Matataki Hochgeschwindigkeits-CMOS Kamera mit 2048x2048 Pixel, 30 Frames/s und 16 bit Graustufen ausgestattet war. Die Aufnahmen wurde bei einer konstanten Spannung von 100 kV und adäquater Objektivblende zur Kontrastierung der Schnitte gemacht. Für die Mitochondrien-Auswertung wurde eine 10.000-fache Vergrößerung verwendet.

## 2.7 Morphometrie

### 2.7.1 Morphometrie des SDHA-Signals in Vibratomschnitten und Schnittkulturen

Die morphometrischen Analysen wurden mit der Bildbearbeitungssoftware ImageJ/FIJI (Rueden et al., 2017) durchgeführt. Die Farbbildaufnahmen wurden zunächst in die unterschiedlichen Farbkanäle separiert. Hierbei stellte ein Kanal das Fluoreszenzsignal der Calbindin-Färbung, einer das Signal der SDHA-Färbung und einer das der Gegenfärbung der Zellkerne dar. Falls notwendig wurde eine Nachkontrastierung der Farbkanäle vorgenommen, wobei darauf geachtet wurde, dass nur lineare Prozeduren und keine Gamma-Korrekturen zur Anwendung kamen. Dies ist wichtig und möglich, da im Rahmen dieser Arbeit Fluoreszenzverhältnisse innerhalb einer Zelle am axonalen und dendritischen Pol verglichen werden sollten. Mit Hilfe der durch das Mikroskop abgespeicherten Bilddaten wurde der Originalmaßstab der Bilder im Programm hinterlegt.

Im Calbindin-Farbkanal wurden geeignete Purkinje-Zellen ausgewählt. Es wurden nur solche Zellen in die Morphometrie eingeschlossen, die eine eindeutige und kräftige Calbindin-Färbung aufwiesen, sich mit keiner anderen Purkinje-Zelle überlagerten und vollständig im Bild zu sehen waren. Außerdem musste es sich um Anschnitte handeln, in denen ein axonaler und ein dendritischer Zellpol klar erkennbar waren. Es wurde ein quadratisches Areal innerhalb des axonalen Pols gewählt. In diesem Areal wurden die Messgrößen (Fläche, Koordinaten, Mittelwert der Grauwerte und Summe der Grauwerte

des Areal) im SDHA-Fluoreszenzkanal erhoben. Innerhalb eines quadratischen Messbereiches der gleichen Größe wurden die gleichen Parameter am dendritischen Zellpol der Purkinje-Zelle erfasst, und schließlich noch einmal in einem der Zelle benachbarten Bereich für die Messung des Hintergrundsignals.

Für die Morphometrie der Schnittkulturen wurden die auf den Bildern mikroskopisch dokumentierten Purkinje-Zellen basierend auf ihrer Lage in Gruppen eingeteilt. In der Gruppe 1 befanden sich alle Zellen, für die sich im Abstand von zwei Purkinje-Zell-Somata keine weitere Purkinje-Zelle befand. Die Gruppe 2 schloss zusätzlich auch die Zellen ein, in deren Umkreis sich keine Purkinje-Zelle mit dem Abstand eines Purkinje-Zell-Somas befand. Die Gruppe 3 schließlich umfasste alle fotografierten Zellen. Dieses Prozedere wurde in Anlehnung an vorangegangene Arbeiten gemacht, in denen gezeigt werden konnte, dass die Purkinje-Zell-Morphologie je nach Nachbarschaftsbeziehung unterschiedlich ist (Jankowski et al., 2004, Kapfhammer, 2004).

### 2.7.2 Morphometrie der Mitochondrien in elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Die Morphometrie der Mitochondrien in elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde ebenfalls in ImageJ/FIJI durchgeführt. Die Darstellung wurde, falls notwendig, durch die lineare Anpassung von Helligkeit und Kontrast optimiert; es wurden keine Gamma-Korrekturen verwendet. Die Maßstäbe wurden aus den vom Mikroskop abgespeicherten Bilddaten ergänzt. Für die Auswertung der mitochondrialen Parameter wurden die mit 10.000-facher Vergrößerung angefertigten elektronenmikroskopischen Bilder zusätzlich digital vergrößert.

Der dendritische Pol von Purkinje-Zellen zeichnet sich bereits früh durch das Auftreten eines prominenten Stammdendriten aus, der einen Durchmesser von mehreren Mikrometern haben kann und eine klare Orientierung in Richtung äußere Körnerzellschicht aufweist. Innerhalb des dendritischen Pols befinden sich zahlreiche Mitochondrien, raues und glattes endoplasmatisches Retikulum sowie ribosomale Rosetten und Anschnitte des Golgi-Apparates (Altman und Bayer, 1997). Im Gegensatz dazu zeichnet sich der axonale Pol durch die Ausrichtung zur inneren Körnerzellschicht aus, besitzt vermehrt Mikrotubuli und dichte Fasertrakte. Zu dessen Identifikation wurde im Rahmen der vorliegenden

Arbeit primär die Lokalisation gegenüber dem dendritischen Pol als Kriterium genutzt, sowie die Tatsache, ob ein verdickter axonaler Zytoplasmasaum zu erkennen war.

Zunächst wurde die gesamte zytoplasmatische Fläche des fotografierten Purkinje-Zell-Pols mit dem Freihand-Werkzeug ausgemessen, um später die erhobenen mitochondrialen Parameter auf Flächeneinheiten normieren zu können. Die Zugehörigkeit der Aufnahme zum axonalen oder dendritischen Zellpol wurde nach den oben beschriebenen morphologischen Kriterien bestimmt und in einer Excel-Datenliste vermerkt. Im nächsten Schritt wurde für jedes innerhalb des Zellanschnittes liegende Mitochondrium mit dem Freihandwerkzeug die Fläche gemessen, sowie mit dem Abstandswerkzeug der größte Querdurchmesser.

## 2.8 Statistische Auswertung und Darstellung der Daten

### 2.8.1 Auswertung der Daten aus immunhistochemischen SDHA-Färbungen

Die statistischen Auswertungen der Daten aus den immunhistochemischen SDHA-Färbungen an den cerebellären Vibratonschnitten und Schnittkulturen wurden mit der Software R Studio auf Grundlage der Programmiersprache R durchgeführt (R Core Team, 2023). Für die Auswertung wurden die Fläche des Messbereichs sowie die Aufsummierung der Grauwerte des Bereiches („Raw Integrated Density“) in einen Dataframe geladen. Es wurden für die vermessenen Purkinje-Zellen fortlaufende Nummern vergeben. Von den Messwerten des axonalen und des dendritischen Zellpoles für die SDHA-Intensitäten wurde der Hintergrund-Messwert abgezogen.

Um eventuelle Fehlmessungen bei der Datenerhebung aus der Statistik zu eliminieren, wurden Datenpunkte mit nicht vorhandenen Messwerten und negativen Messwerten gestrichen. Zunächst wurde untersucht, ob die SDHA-Fluoreszenzintensitäten der beiden einzelnen untersuchten Genotypen normalverteilt waren. Hierzu erfolgte die Darstellung der Intensitäten in einem Histogramm, um einen optischen Eindruck von Verteilung der Daten zu erhalten. Einen zusätzlichen Anhalt bot der Shapiro-Wilk-Test (Funktion „shapiro.test()“ in R). Anschließend wurde auf die Varianzgleichheit der Stichproben (Homoskedastizität) getestet. Dies geschah mit dem Levene-Test (Funktion „leveneTest()“ aus dem Package „car“ in R).

Im nächsten Schritt konnte nach dem Nachweis der Normalverteilung und Varianzgleichheit der t-Test angewendet werden (Funktion „t.test()“ in R). Mit diesem wurden die Mittelwerte der Quotienten der SDHA-Fluoreszenzintensitäten des axonalen und des dendritischen Pols der untersuchten Purkinje-Zellen zwischen den Genotypen verglichen. Außerdem wurde eine Zweifaktorenanalyse durchgeführt, bei der die Abhängigkeit der SDHA-Fluoreszenzintensität am axonalen Pol von der Intensität am dendritischen Pol sowie vom Genotyp untersucht wurde.

### 2.8.2 Auswertung der Daten aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Für die statistische Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden den Mitochondrien nach dem Laden der Daten in einen Dataframe in R Studio eine fortlaufende Nummer zugewiesen. Der Datensatz wurde nach Genotyp und intrazellulärer Lokalisation unterteilt.

Zunächst wurden die mitochondrialen Parameter Fläche und Durchmesser als Einzelbeobachtungen betrachtet und zwischen den Genotypen verglichen. Die Untersuchung dieser Größen erfolgte zu Beginn unabhängig von der intrazellulären Lokalisation, dann vergleichend zwischen axonalem und dendritischen Zellpol. In einem zweiten Auswertungsschritt wurden die Mitochondrien nach ihrer Zugehörigkeit zu den erfassten Purkinje-Zellen gruppiert betrachtet. Diese Auswertung ermöglichte zusätzlich noch die Berechnung und Analyse der Dichte mitochondrialer Anschnitte und der mitochondrialen Fläche pro zytoplasmatischer Fläche des aufgenommenen Zellpols. Die mitochondrialen Anschnitte pro Zelle wurden ausgezählt und zur zytoplasmatischen Fläche des jeweiligen Zellpols ins Verhältnis gesetzt. In einem nächsten Schritt wurden die mitochondrialen Einzelflächen aufsummiert und somit die mitochondriale Gesamtfläche in jedem dokumentierten Zellanschnitt bestimmt, welche ebenfalls auf die zytoplasmatischen Fläche normiert wurden. Es wurden auch die Mittelwerte der mitochondrialen Fläche sowie des mitochondrialen Durchmessers pro Zellanschnitt bestimmt. Nun wurden für die vier Parameter (mitochondriale Anzahl/zytoplasmatische Fläche des aufgenommenen Zellpols, mitochondriale Fläche/zytoplasmatische Fläche des aufgenommenen Zellpols, mittlere mitochondriale Fläche und mittlerer mitochondrialer Durchmesser) jeweils wie oben die Normalverteilung

und Varianzgleichheit festgestellt. Zur Signifikanzprüfung wurden wie oben t-Test sowie Zweifaktorenanalyse verwendet.

Für die Visualisierung der Daten und die Zusammenstellung der Grafiken wurden R Studio, ImageJ/FIJI und Adobe Photoshop CS5 verwendet. Das Signifikanzniveau wurde in den Grafiken wie folgt angegeben: \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*  $p \leq 0,05$ ; n.s.(nicht signifikant)  $p > 0,05$ .



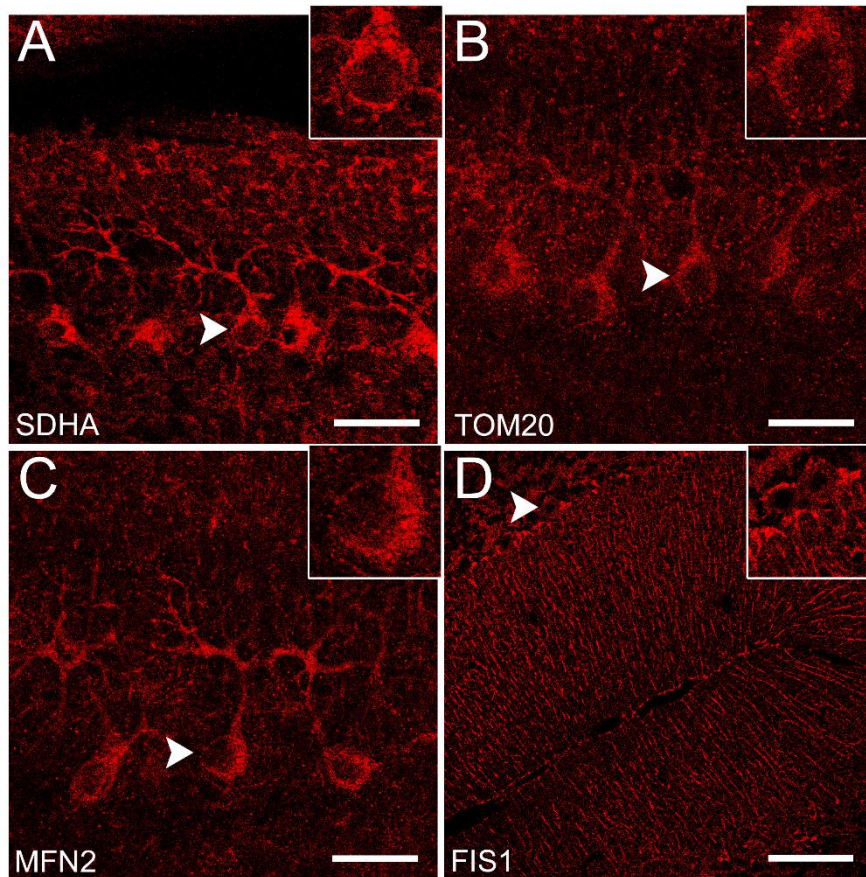
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung einer immunhistochemischen SDHA-Färbung zur mitochondrialen Darstellung

Um mitochondriale Verteilungsmuster in cerebellären Purkinjezellen der Maus lichtmikroskopisch darstellen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein Protokoll für eine immunhistochemische Doppelfärbung der Mitochondrien und Purkinje-Zellen etabliert. Als Kandidaten für die Mitochondrien-Färbung wurden Antikörper gegen die Translokase der äußeren Membran (TOM20), gegen Mitofusin 2 (MFN2), gegen das mitochondriale „Fission“-Protein (FIS1) und gegen die Untereinheit A der Succinatdehydrogenase (SDHA) (s. Tab. 3) aus der Literatur ausgewählt. Die Calbindin-Färbung ist eine seit den 80er Jahren gängige Färbung zur Darstellung der cerebellären Purkinje-Zellen (Enderlin et al., 1987; Jande et al. 1981). Calbindin ist ein Calcium-bindendes Protein, das innerhalb des Kleinhirnkortex ausschließlich in den Purkinje-Zellen exprimiert wird. Die Expression ist in früh-postnatalen Stadien der Entwicklung zwar noch gering, aber so deutlich sichtbar, dass die Purkinje-Zellen in ihrer Gesamtheit erkennbar sind. In der Zusammenschau mit der SDHA-Färbung erlaubt die Doppelfärbung die Bestimmung der intrazellulären Lokalisation des erfassten mitochondrialen Fluoreszenz-Signals.

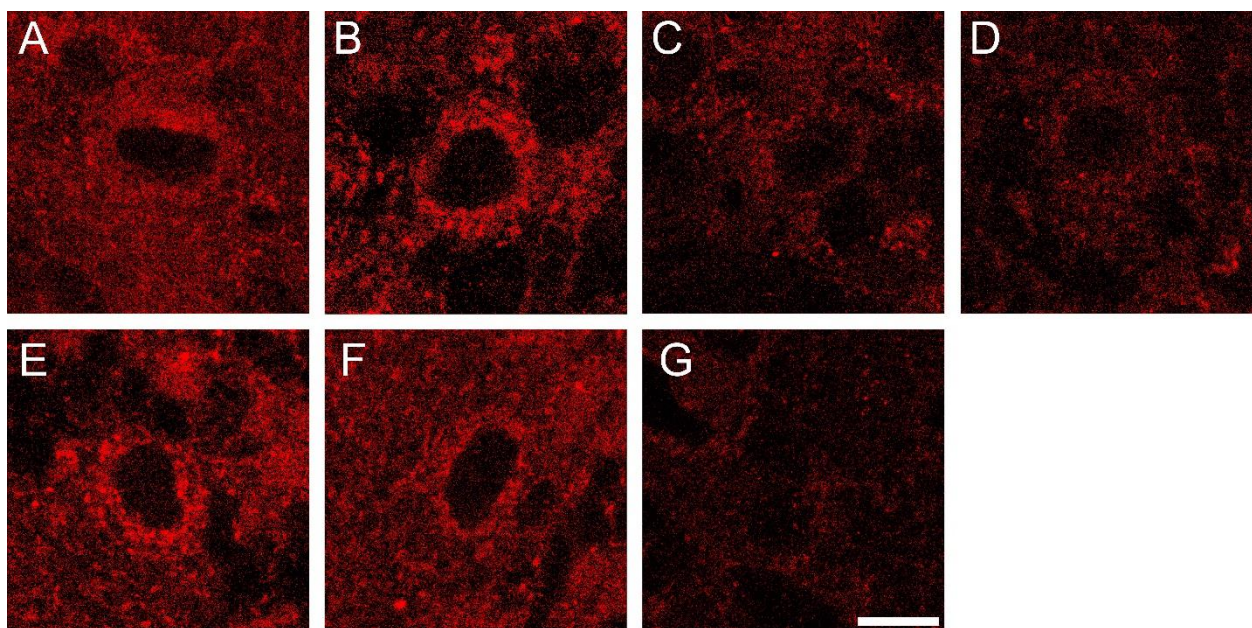
Für die Etablierung der mitochondrialen Färbung wurden hemispherale Schnitte aus adulten Wildtyp-Cerebella verwendet. Die Schnitte wurden einer Antigen-Demaskierungsprozedur in Natriumcitrat unterzogen, mit Methanol und Triton X-100 behandelt und nach Blockierung mit den Erstantikörpern behandelt. Der Antikörper gegen MFN2 wurde 1:50 und 1:100, TOM20 1:200 sowie 1:500, FIS1 1:100 sowie 1:500 und SDHA 1:100 und 1:200 verdünnt. Weitere technische Details zu den Teilschritten der immunhistochemischen Färbung sind dem Kapitel 2.4.3 zu entnehmen.

Bei allen Färbeprotokollen war eine leicht punktierte Färbung im Bereich der Purkinje-Zell-Somata, aber auch in Fortsätzen oder Astrozyten zu erkennen (vgl. Abb. 4). Ein deutlicher Unterschied war in der FIS1-Färbung auszumachen (Abb. 4 D). Mit diesen Antikörpern ließen sich sehr deutlich radiär ausgerichtete Fortsätze und Zellkörper darstellen, die in



**Abb. 4: Immunhistochemische Färbung von Mitochondrien im Kleinhirnkortex.** Folgende Antikörper wurden genutzt: SDHA 1:200 (A), TOM20 1:200 (B), MFN2 1:100 (C), FIS1 1:100 (D). Pfeilspitzen: Purkinje-Zell-Soma. Maßstabsbalken: 30 µm in A-C, 75 µm in D.

der Purkinje-Zellschicht lagen. Die einzigen bekannten Zellen innerhalb des Kleinhirnkortex mit dieser Morphologie und Lage sind Bergmann-Glia-Zellen. Da der Fokus der Arbeit auf der Darstellung der Purkinje-Zell-Mitochondrien lag, wurde diese Färbung nicht weiterverfolgt. Die SDHA-, TOM20- und MFN2 Färbungen zeigten dagegen eine deutliche Assoziation mit Purkinje-Zellen. Bei den TOM20- und MFN2 Färbungen waren neben dem spezifischen Signal punktförmige Signale zu sehen, die über das gesamte Präparat verteilt waren, mutmaßlich Präzipitate von Antikörpern. SDHA ist als Bestandteil der Atmungskette und des Citratzyklus in der inneren Mitochondrienmembran aller Mitochondrien lokalisiert ist. Aus diesen Gründen, und auch weil das SDHA-Signal die stärkste Färbung aufwies, wurde im Folgenden mit dem SDHA-Antikörper weitergearbeitet (s. Abb. 5).



**Abb. 5: Etablierung der immunhistochemischen SDHA-Färbung.** Abgebildet sind mit Erstantikörper gegen SDHA nach unterschiedlichen Protokollen gefärbte Purkinje-Zellen adulter Mäuse. (A) Referenzprotokoll mit Antigen-Demaskierung in Natriumcitrat 10 mM, Inkubation in Methanol (-20 °C) für 10 min sowie Blockierung in 0,2 % Gelatine/0,05 % Triton X-100/PBS+, (B) Antigen-Demaskierung in TE-Puffer (pH 9,0), (C) Blockierung in 0,2 % Gelatine/0,05 % Triton X-100/2 % BSA, (D) Blockierung in 2 % NGS, (E) Blockierung in Roti® Block/PBS+, (F) Inkubation in Methanol (-20 °C) für 30 min, (G) Negativkontrolle ohne Erstantikörper, Maßstab: 10 µm

Der erste Parameter, der verändert wurde, war die Antigen-Demaskierung. Hintergrund dieses Versuchs war, dass bei einer immunhistochemischen Färbung von nukleären Antigenen häufig eine Antigen-Demaskierung mit einem basischen Puffer benötigt wird. Es wird angenommen, dass dies auf der Lage der Antigene im Kern beruht, der von einer Doppelmembran umgeben ist. Da sich mitochondriale Antigene – wie nukleäre – ebenfalls im Inneren einer Doppelmembran befinden, wurde dies auch für mitochondriale Proteine angenommen. Tatsächlich konnte durch die Nutzung eines basischen TE-Puffers die Fluoreszenzintensität deutlich verbessert werden, wie in Abb. 5 B ersichtlich. Ein Versuch ohne Demaskierung ergab kein Fluoreszenzsignal und die Nutzung eines leicht sauren Puffers eine schwache, wenn auch sichtbare Färbung (Abb. 5 A).

In den Färbungen nach dem Protokoll mit Antigen-Demaskierung in leicht saurem Puffer fiel eine starke Hintergrundfärbung auf (vgl. Abb. 5 A). Um diese zu verringern, wurden unterschiedlich starke alternative Blockierlösungen verwendet (0,2 % Gelatine/0,05 %

Triton X-100/2 % bovines Serum-Albumin, 2 % Normal-Goat-Serum sowie Roti® Block in PBS/Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>). Die Blockierung in Roti® Block brachte hierbei die besten Ergebnisse (Abb. 5 E).

Vom Hersteller der Antikörper wurde ein Inkubationsschritt in 100 % Methanol bei -20 °C empfohlen. In der Regel ist dies vor allem bei membranständigen Proteinen günstig, da durch Methanol integrierte Membranproteine für Antikörper zugänglich gemacht werden. Die Färbung war nach Inkubation in Methanol für 10 min, aber vor allem nach 30 min in Intensität und Distinktheit deutlich erhöht (Abb. 5 F).

### 3.2 Zelluläre Verteilung der Mitochondrien in Purkinje-Zellen Engrailed-2-transgener Mäuse

Veränderungen in der Lokalisation, Dichte und Größe von Mitochondrien sind mit zellulären Veränderungen wie Neurogenese, De- und Regeneration, axonalem Wachstum oder neuronaler Kommunikation assoziiert worden. Da Engrailed an der Regulation der genannten Prozesse beteiligt ist, war es erstes Ziel dieser Arbeit, die Verteilung der Mitochondrien in situ in Kleinhirngewebe von *En2*-Knockout- und L7En-2-Überexpressionsmutanten zu untersuchen. Hierzu wurden vermale Vibratomschnitte an Postnataltag 3 (P3), an P7, sowie von adulten Tieren immunhistochemisch gefärbt. Als adulte Tiere wurde Mäuse im Alter zwischen drei und sechs Monaten genutzt.

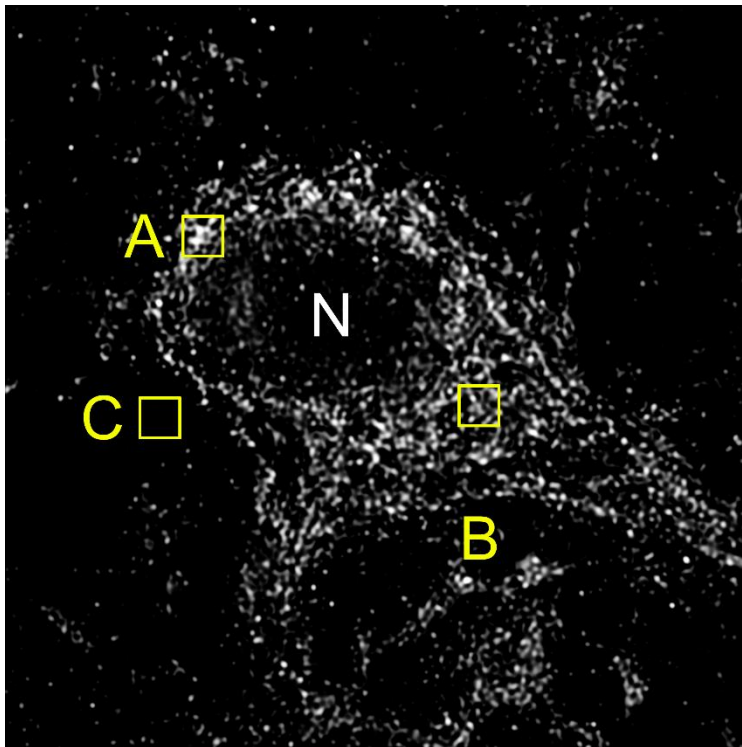
Gefärbt wurden jeweils korrespondierende Schnitte entlang der mediolateralen Achse aus Wildtyp (Wt) und L7En-2-transgenen Tieren. Da bekannt ist, dass sich Purkinje-Zellen entlang der rostrocaudalen und mediolateralen Achse biochemisch unterscheiden, wurden ausschließlich Purkinje-Zellen des anterioren Lobus der cerebellären Vermis in die Analyse eingeschlossen. Zudem wurden nur Purkinje-Zellen gewählt, die entlang der Fissuren lokalisiert waren, da Purkinje-Zellen am Apex und in der Grube der Fissuren als morphologisch sehr heterogene Gruppe von Purkinje-Zellen bekannt sind (Nedelescu und Abdelhack, 2013).

Die Schnitte wurden gegen Calbindin gefärbt, um die Purkinje-Zellen eindeutig identifizieren zu können. In die mikroskopische Untersuchung, das Imaging sowie die morphometrischen und statistischen Auswertungen wurden ausschließlich Purkinje-

Zellen des anterioren Lobus des Cerebellums eingeschlossen. Es wurden jeweils Gewebe von drei Tieren jedes Genotyps und Alters und von jedem Kleinhirngewebe mindestens drei Schnitte untersucht. Durch diese strikte Fokussierung auf vergleichbare Areale in Wildtyp- und transgenen Tieren kann vermieden werden, dass Areal-spezifische Unterschiede das Ergebnis verfälschen.

Abb. 6 zeigt eine konfokale Aufnahme einer typischen Immunfluoreszenz-Färbung eines Kleinhirnschnittes aus einem WildtypTier mit dem Erstantikörper gegen SDHA. Die SDHA-Färbung ist in Grauwerten dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die punktierte, teils straßenförmige SDHA-Färbung in den Purkinje-Zell-Somata. Dieses Färbemuster ist ausschließlich im Zytoplasma der Zelle zu finden, nicht aber im Zellkernbereich. Dies lässt sich anhand der Aussparung der Zellkernregionen in einem konfokalen Bild, das mit einem Pinhole von 1 aufgenommen worden ist, gut darstellen (N in Abb 6). Kontrollpräparate ohne den ersten Antikörper zeigten keine Färbung und nach Erhöhung der Sensitivität am Mikroskop nur ein diffuses Signal ohne punktiertes Muster. Es ist also davon auszugehen, dass die SDHA-Färbung spezifisch ist.

Unter physiologischen Bedingungen sind Mitochondrien in Dendriten und Axonen und auch innerhalb der Somata in unterschiedlichen Quantitäten verteilt. Für die Analyse der Mitochondrienverteilung in Zellen ist es also wichtig, welche Schnittebene durch eine Zelle gewählt wird. Deswegen wurden für die Messungen nur Purkinje-Zellen herangezogen, deren Zellkörper im Bildausschnitt in Gänze zu sehen war und in denen der Zellkern mindestens 50 % des Zellsoma ausfüllte. In den ausgewählten Purkinje-Zellen wurden dann Messbereiche gewählt, wie sie in Abb. 6 zu sehen sind, und hier die Grauwerte als integrierte Messdaten mit ImageJ aufsummiert. Jede axonale und dendritische Messung wurde auf einen Referenzwert normiert, der aus der Region um die Purkinje-Zellen gewählt wurde. Diese Purkinje-Zell-nahe Lage des Referenzwertes wurde gewählt, um möglichst nahe an dem eigentlichen Messwert zu liegen und zum anderen möglichst wenig Signal zu erhalten. Es muss allerdings beachtet werden, dass nahe der Purkinje-Zell-Somata dendritische Fortsätze von Purkinje-Zellen und Interneuronen sowie Axone von z.B.

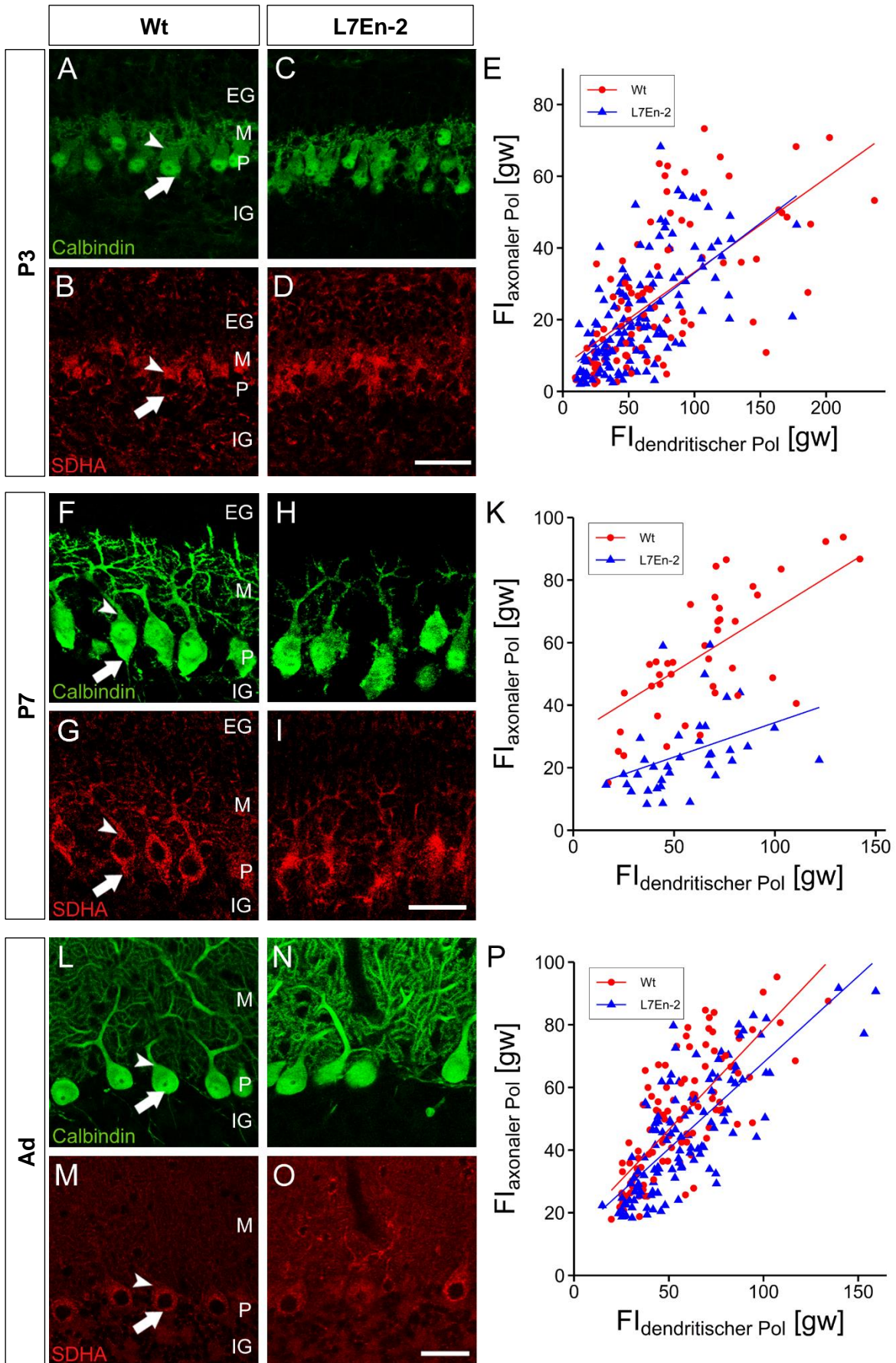


**Abb. 6: Analyse des mitochondrialen Signals in Purkinje-Zellen sieben Tage alter Mäuse.** Zur Darstellung kommt das isolierte Fluoreszenz-Signal der SDHA-Färbung von Purkinje-Zellen. Exemplarisch sind die Messbereiche für die Intensitätsmessung markiert; diese wurde mithilfe des Signals der Calbindin-Färbung (hier nicht abgebildet) am axonalen Zellpol (A) am dendritischen Zellpol (B) sowie in einem gesichert außerhalb der Purkinje-Zell-Somata liegenden Areal (C) zur Referenzmessung durchgeführt. N: Nucleus. Maßstab: 10  $\mu$ m.

Körnerzellen liegen, die ebenfalls Mitochondrien enthalten können, wenn auch in geringen Mengen. Die Messungen wurden für beide Mauslinien zu drei Präparationszeitpunkten (P3, P7 sowie adult im Alter von drei bis sechs Monaten) an jeweils drei Tieren der unterschiedlichen Genotypen durchgeführt.

### 3.2.1 Verteilung des mitochondrialen SDHA-Signals in Purkinje-Zellen von L7En-2-transgenen und Wildtyp-Mäusen

Abb. 7 zeigt konfokale Einzelschicht-Aufnahmen von Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit Erstantikörpern gegen Calbindin und SDHA, die an Wildtyp- und L7En-2-transgenen Geweben zu den Zeitpunkten P3 (A-E), P7 (F-K) und adult (L-P) vorgenommen worden sind. Die Calbindin-Färbung ist in grün, die mitochondriale SDHA-Färbung in rot dargestellt. Deutlich zu erkennen ist bei allen Zeitpunkten und in Zellen beider Genotypen ein SDHA-Fluoreszenz-Signal in der Purkinje-Zellschicht (P). Etwas schwächer ausgeprägt waren die Färbungen in der Molekularschicht (M) und die geringste Färbeintensität zeigte die Körnerzellschicht (EG, IG). Alle Regionen zeigten das für Mitochondrien



**Abb. 7 (vorherige Seite): Immunhistochemische Färbung der Mitochondrien in Purkinje-Zellen bei P3 (oben), P7 (Mitte) und adulten (unten) Wildtyp- und L7En-2-transgenen Mäusen.** Dargestellt sind jeweils Purkinje-Zellen des anterioren Lobus in doppelt gefärbten cerebellären Vibratonschnitten; links Wildtyp-Gewebe mit Calbindin-Färbung (A, F, L) sowie der gleiche Bildausschnitt mit SDHA-Färbung (B, G, M), rechts analog L7 En-2-transgenes Gewebe mit Calbindin- (C, H, N) und SDHA-Färbung (D, I, O). EG = äußere Körnerzellschicht, M = Molekularschicht, P = Purkinje-Zellschicht, IG = innere Körnerzellschicht, Pfeil: axonaler Zellpol, Pfeilspitze: dendritischer Zellpol. Maßstab: 30  $\mu\text{m}$ . (E, K, P) Lineare Modellierung des Zusammenhangs der SDHA-Fluoreszenzintensitäten des dendritischen (x-Achse) und axonalen (y-Achse) Pols einer Purkinje-Zelle. Es wurde eine Zweifaktorenanalyse verwendet. P3:  $p = 0,605$ ,  $n_{\text{wt}} = 99$ ,  $n_{\text{tg}} = 137$ ; P7:  $p = 0,005$ ,  $n_{\text{wt}} = 42$ ,  $n_{\text{tg}} = 36$ ; Ad:  $p < 0,001$ ,  $n_{\text{wt}} = 113$ ,  $n_{\text{tg}} = 120$

typische punktierte Fluoreszenzsignal. Die deutlich ausgeprägte Färbung der Purkinje-Zellen beruht wahrscheinlich auf der Größe dieser Zellen, die mit 20-25  $\mu\text{m}$  die größten des Kleinhirnkortex sind. Ein Vergleich der Menge von Mitochondrien zwischen verschiedenen Zelltypen wurde nicht vorgenommen und ist mit lichtmikroskopischen Methoden nur schwer durchführbar. Es kann festgehalten werden, dass SDHA in allen Schichten des Kleinhirnkortex ab P3 bis in das adulte Stadium exprimiert wurde. Die Intensitäten der Fluoreszenzsignale waren in allen Stadien in etwa vergleichbar.

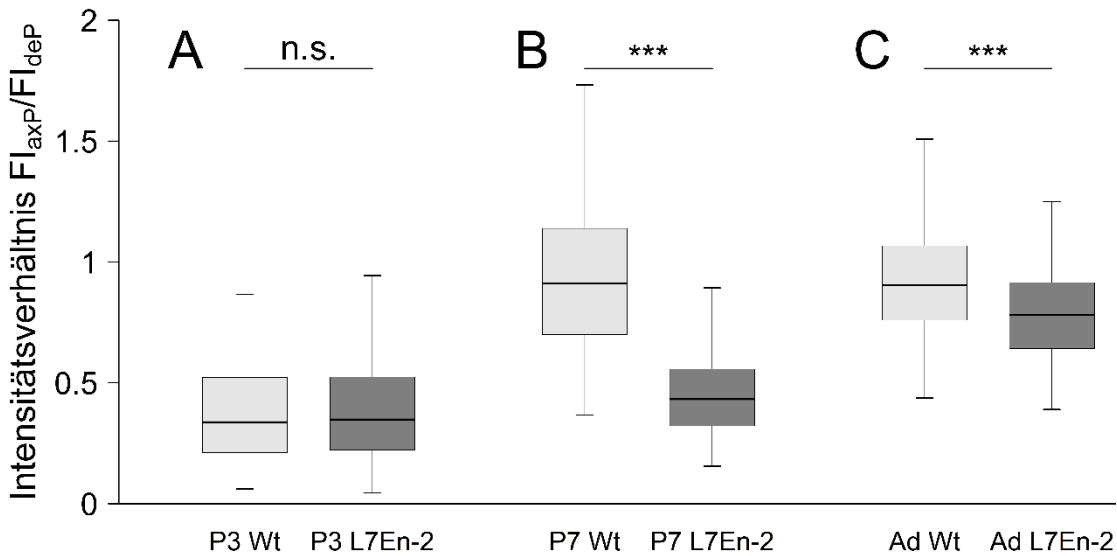
Bei der Analyse einzelner Wildtyp-Purkinje-Zellen an P3 fiel auf, dass die mitochondriale Färbung im dendritischen Purkinje-Zell-Pol und in den Stammdendriten starker akzentuiert war als im axonalen Pol (Pfeilspitze bzw. Pfeil in Abb. 7 B). Bei P7 war das Verhältnis zwischen den Farbintensitäten am axonalen und dendritischen Pol etwas größer als bei P3 (Abb. 7 G). Diese lokale Intensitätsverschiebung hin zum axonalen Pol scheint sich im adulten Wildtyp-Tier, wenn auch dezenter, fortzusetzen (Abb. 7 M). Diese Tendenz ist mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Verteilung von Mitochondrien während der Purkinje-Zell-Entwicklung konsistent (Altman, 1972). Unklar ist hierbei, ob diese Änderung der Signalverteilung auf einer Abnahme am dendritischen Pol oder einer Zunahme am axonalen Pol zurückzuführen ist. Die Dendritenbäume waren nur bei P7 in proximalen Bereichen gut erkennbar, während sie bei jüngeren und älteren Tieren deutlich schlechter gefärbt waren. Bei P7 konnte in unterschiedlicher Ausprägung auch in den weiteren Verzweigungen des Dendritenbaumes Färbungssignal gefunden werden (dies ist besonders anschaulich in Abb. 7 G).



In der rechten Spalte der Abb. 7 (E, K, P) findet sich eine Darstellung der SDHA Färbeintensitäten als Punktediagramm. Jeder aufgetragene Punkt entspricht der Färbeintensität in Grauwerten einer Purkinje-Zelle am axonalen versus dem dendritischen Pol. Für diese Punktwolke wurde dann eine lineare Regressionsgerade modelliert, um zu testen und zu visualisieren wie sich die Verteilung der Mitochondrien über die untersuchten Altersstufen hinweg und zwischen den Genotypen unterscheidet.

Die aus den Abbildungen ablesbare Verteilung der Mitochondrien lässt sich in den Punktediagrammen gut nachvollziehen. Bereits bei P3 war eine deutliche mitochondriale SDHA-Färbung in Purkinje-Zellen zu sehen. Die axonale Färbungsintensität nahm zu diesem wie auch allen anderen Zeitpunkten mit zunehmender dendritischer Intensität zu. Generell konnte – über alle Altersstufen und beide Genotypen hinweg – beobachtet werden, dass die Farbtensitäten am dendritischen Pol stärker als am axonalen Pol war. Im P7-Wildtyp-Kleinhirn wurden zunehmend Purkinje-Zellen mit stärkerem SDHA-Signal gefunden, wobei das dendritische Signal geringer war als bei P3 (Grauwerte von 200 (P3) und 150 (P7)). Das Verhältnis  $F_{\text{axonal}}/F_{\text{dendritisch}}$  war also insgesamt höher und blieb in adulten Wildtyp-Purkinje-Zellen ungefähr auf diesem Niveau stabil.

Vergleicht man die Verteilung des SDHA-Signals in L7En-2 Purkinje-Zellen mit denen der Wildtypzellen fällt bei P3 kein Unterschied auf (Abb. 7 E). In Purkinje-Zellen von L7En-2-Tieren bei P7 waren am dendritischen und axonalen Pol niedrigere Fluoreszenzsignale zu finden, wobei im Vergleich zu Wildtyp-Purkinje-Zellen die Intensität am axonalen Pol deutlich stärker abnahm. In L7En-2-Purkinje-Zellen wurde eine Zunahme der SDHA-Färbungsintensität am dendritischen Pol nur von einer im Vergleich zum Wildtyp minimalen Intensitätszunahme am axonalen Pol begleitet. Die Gerade für L7En-2-Purkinje-Zellen verläuft folglich flacher und niedriger als die Wildtyp-Gerade. Ein ähnlicher Zusammenhang war auch in adulten Tieren festzustellen, wobei hier die Unterschiede in der SDHA Färbung zwischen L7En-2- und Wildtyp-Purkinje-Zellen deutlich geringer ausgeprägt waren. Im Graphen für das adulte Tier verlaufen beide Geraden für Wildtyp- und L7En-2-Purkinje-Zellen steiler. Folglich skaliert das Signal am axonalen Pol stärker mit einer Signalzunahme am dendritischen Pol.



**Abb. 8: SDHA-Intensitätsverhältnisse des axonalen zum dendritischen Zellpol der Purkinje-Zellen aus Wildtyp- und L7En-2-transgenen Tieren.** Aufgetragen sind Daten der drei Altersgruppen P3 (links), P7 (Mitte) und adult (rechts), sowie vergleichend Wildtyp- (hell) und L7En-2-transgene Tiere (dunkel). Für P3: t-Test,  $p=0,865$ ,  $n_{wt} = 99$ ,  $n_{tg} = 137$ . Für P7:  $p<0,001$ ,  $n_{wt} = 42$ ,  $n_{tg} = 36$ . Für adult:  $p<0,001$ ,  $n_{wt} = 113$ ,  $n_{tg} = 120$ .

Vergleicht man die mittleren SDHA-Intensitäten als Intensitätsverhältnis  $FI_{ap}/FI_{dp}$  zwischen den beiden Genotypen bei P3, zeigt sich kein Unterschied zwischen Purkinje-Zellen (Abb. 8 A, t-Test:  $p = 0,865$ ; Wildtyp  $0,388 \pm 0,225$ ; L7En-2  $0,393 \pm 0,241$ ). Bei P3 Purkinje-Zellen aus Wildtyp-Gewebe wurden 28 % der Mitochondrien am dendritischen Pol, und 72 % am axonalen Pol lokalisiert. In Purkinje-Zellen aus transgenem Gewebe ergab sich ein identischer Befund mit 28 % der Mitochondrien axonal zu 72 % dendritisch lokalisiert. Die Untersuchung bei P7 hingegen lieferte einen deutlichen Unterschied zwischen Wildtyp- und L7En-2-Purkinje-Zellen bezüglich der Verteilung des mitochondrialen SDHA-Signals (Abb. 8 B; t-Test:  $p < 0,001$ ; für den Wildtyp:  $1,076 \pm 1,053$ ; für L7 En-2-transgene Tiere:  $0,477 \pm 0,243$ ). Der Intensitätsquotient im transgenen Gewebe lag um 56 % unter dem des Wildtyp-Gewebes. Im P7 Wildtyp-Tier lagen 52 % der Mitochondrien am axonalen Pol und 48 % am dendritischen Pol, während im transgenen Tier lediglich 32 % am axonalen und 68 % am dendritischen Pol lokalisiert waren.

Die Untersuchung des Intensitätsquotienten  $FI_{ap}/FI_{dp}$  für die Kohorte der adulten Tiere ergab eine weniger große Differenz der Mittelwerte zwischen den Genotypen als bei P7

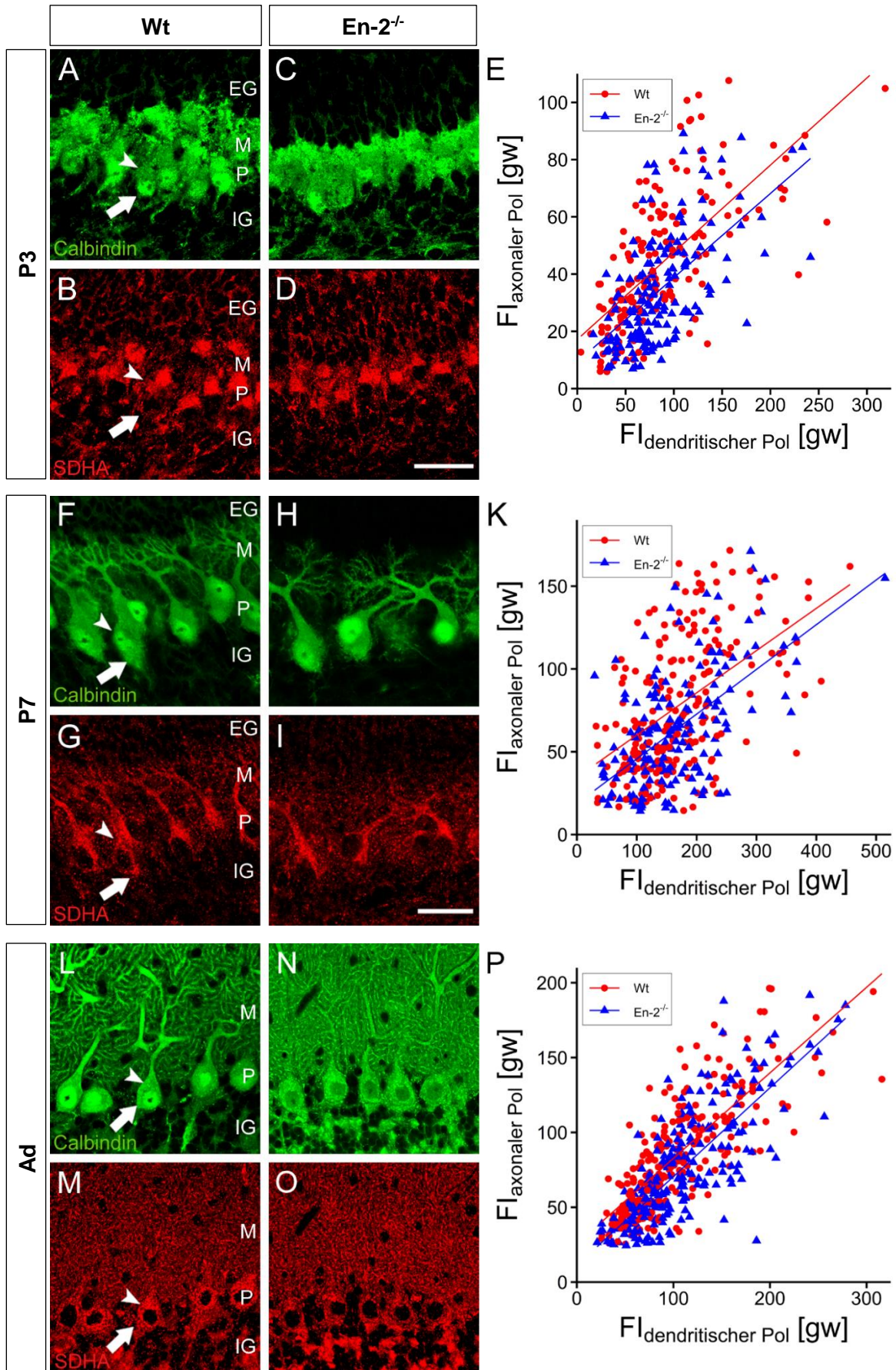
(Abb. 8 C). Der Unterschied war zwar hochsignifikant ( $p < 0,001$ ), belief sich aber lediglich auf eine Verringerung des Mittelwertes der Daten aus transgenen Tieren um 14 % (beim Wildtyp-Tier:  $0,938 \pm 0,247$ ; beim transgenen Tier:  $0,812 \pm 0,237$ ). In den Purkinje-Zellen aus Wildtyp-Gewebe lagen 48 % der Mitochondrien am axonalen Pol, während sich 52 % am dendritischen Pol befanden. Im transgenen Gewebe ließ sich dieses Verhältnis als 55 % axonal zu 45 % dendritisch beschreiben.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass sich die Verteilung der Mitochondrien im Laufe der Entwicklung von P3 zum adulten Tier zugunsten des axonalen Poles verschob. Dies traf für beide Genotypen zu, jedoch war der zeitliche Verlauf dieser Entwicklung unterschiedlich: Bei den Wildtyp-Tieren nahm der Anteil des mitochondrialen Fluoreszenz-Signales am axonalen Zellpol von 28 % bei P3 auf 48 % bei P7 zu, während sie zwischen P7 und den adulten Tieren konstant blieb. Bei den transgenen Tieren war ein Anstieg im Anteil des am axonalen Pol befindlichen Signals von 28 % auf 55 % erst später zwischen P7 und dem adulten Zustand zu beobachten.

### 3.2.2 Verteilung des mitochondrialen SDHA-Signals in Purkinje-Zellen von Engrailed-2-Knockout- und Wildtyp-Mäusen

Da die prolongierte Expression von *En2* in Purkinje-Zellen zu einer Umverteilung des SDHA-Signals führte, stellt sich die Frage, ob diese Veränderung eine direkte Folge der *En2*-Expression darstellt, oder ob sie in sekundärer Folge eines anderen entwicklungsbiologischen Prozesses auftritt, der durch *En2* vermittelt wird. Um diese Frage experimentell zu adressieren, wurden *En2*-defiziente Mäuse genutzt. Wenn es sich bei den beobachteten Effekten auf die Verteilung des SDHA-Signals in L7En-2-transgenen Purkinje-Zellen um einen primären Effekt handelt, so wäre auch in *En2*-Knockout-Tieren eine Veränderung zu erwarten, und diese Veränderung sollte komplementär zu den Auswirkungen der En-2-Überexpression sein.

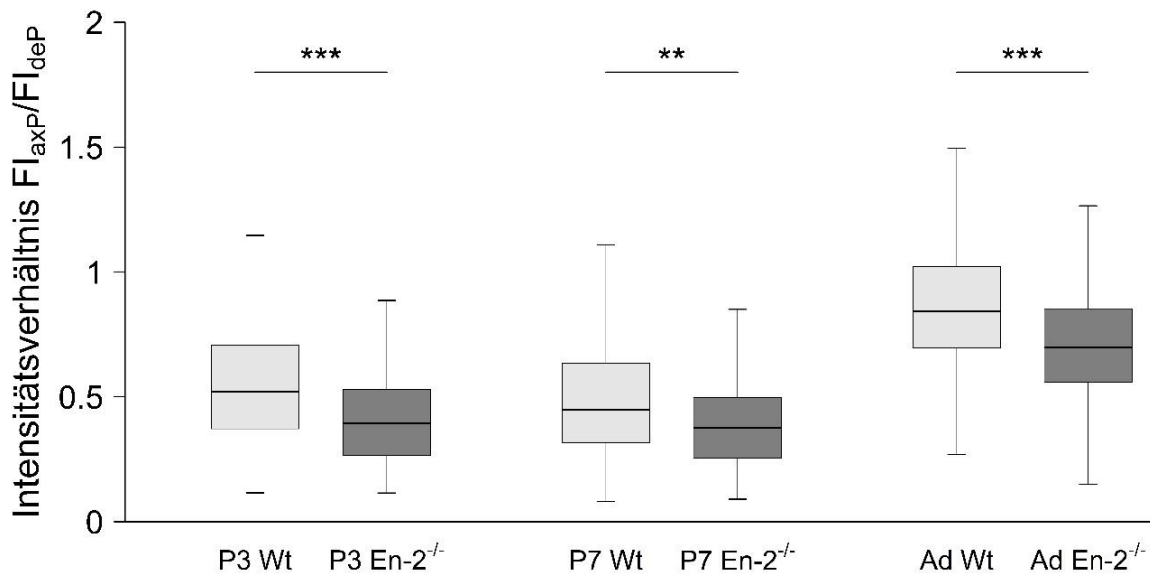
Analog zur Analyse des SDHA-Signals in den Purkinje-Zellen L7En-2-transgener Mäuse wurde diese für die Engrailed-2-Knockout-Mauslinie (*En2<sup>-/-</sup>*) zu den Zeitpunkten P3, P7 und an der adulten Maus durchgeführt. Die zu vergleichenden Knockouttiere und Kontrolltiere stammten jeweils aus demselben Wurf. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 9



**Abb. 9 (vorherige Seite): Immunhistochemische Färbung der Mitochondrien in Purkinje-Zellen bei P3 (oben), P7 (Mitte) und adulten (unten) Wildtyp- und *En2*<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Dargestellt sind jeweils Purkinje-Zellen des anterioren Lobus in doppelt gefärbten cerebellären Vibratonschnitten; links Wildtyp-Gewebe mit Calbindin-Färbung (A, F, L) sowie der gleiche Bildausschnitt mit SDHA-Färbung (B, G, M), rechts analog *L7En2*-transgenes Gewebe mit Calbindin- (C, H, N) und SDHA-Färbung (D, I, O). EG = äußere Körnerzellschicht, M = Molekularschicht, P = Purkinje-Zellschicht, IG = innere Körnerzellschicht, Pfeil: axonaler Zellpol, Pfeilspitze: dendritischer Zellpol. Maßstab: 30  $\mu$ m. (E, K, P) Lineare Modellierung des Zusammenhangs der SDHA-Fluoreszenzintensitäten des dendritischen (x-Achse) und axonalen (y-Achse) Pols einer Purkinje-Zelle. Es wurde eine Zweifaktorenanalyse verwendet. P3:  $p < 0,001$ ,  $n_{wt} = 169$ ,  $n_{-/-} = 166$ ; P7:  $p < 0,001$ ,  $n_{wt} = 209$ ,  $n_{-/-} = 171$ ; Ad:  $p < 0,001$ ,  $n_{wt} = 239$ ,  $n_{-/-} = 225$

(rechte Spalte als Punktediagramm) und 10 (Mittelwerte der  $Fl_{ap}/Fl_{dp}$  im Boxplot) gezeigt. Den Graphen in Abb. 9 ist zu entnehmen, dass die SDHA Intensitäten am axonalen und dendritischen Pol in allen Altersstufen und Genotypen korrelieren. Ein Anstieg der Intensität am axonalen Pol ist immer mit einer höheren Färbeintensität am dendritischen Pol assoziiert (für P3  $p < 0,001$ , für P7  $p < 0,001$  und für adulte Tiere  $p < 0,001$ ). Es zeigt sich aber auch, dass bei allen Altersstufen ein Unterschied in der Verteilung des SDHA Signals zwischen den Genotypen nachweisbar ist (für P3  $p < 0,001$ ; Abb. 9 E, für P7  $p < 0,001$ ; Abb. 9 K und für adulte Tiere  $p < 0,001$ ; Abb. 9 P). Bei vergleichbarer dendritischer SDHA-Intensität zwischen den Genotypen waren die SDHA Intensitäten der Purkinje-Zellen am axonalen Pol des transgenen Gewebes grundsätzlich niedriger. Dies wird durch die vertikale Verschiebung der beiden Geraden veranschaulicht.

Entsprechend war zu allen untersuchten Altersstufen ein signifikanter Unterschied in den Quotienten  $Fl_{ap}/Fl_{dp}$  zwischen Wildtyp- und *En2*-Knockout-Tieren zu sehen (Abb. 10; t-Test für P3  $p < 0,001$ , für P7  $p = 0,007$ , für adulte Tiere  $p < 0,001$ ). Zum Zeitpunkt P3 lag bei den Knockout-Tieren ein in Relation zum Wildtyp um 26 % verringerter Intensitätsquotient vor (beim Wildtyp-Tier:  $0,577 \pm 0,342$ ; beim Knockout-Tier:  $0,427 \pm 0,213$ ). Im P3 Wildtyp-Tier waren 37 % der Mitochondrien am axonalen und 63 % am dendritischen Zellpol lokalisiert, in Knockout-Purkinje-Zellen waren es 30 % am axonalen und 70 % am dendritischen Pol. Bei P7 war das SDHA-Fluoreszenzintensitätsverhältnis in den Purkinje-Zellen der Knockout-Tiere im Vergleich zum Wildtyp um 17 % reduziert (beim Wildtyp-Tier:  $0,513 \pm 0,309$ ; beim Knockout-Tier:  $0,427 \pm 0,311$ ). Somit waren die Mitochondrien zu 34 % am axonalen und 66 % am dendritischen Pol (Wildtyp), bzw. 30 % am axonalen



**Abb. 10: SDHA-Intensitätsverhältnisse des axonalen zum dendritischen Zellpol der Purkinje-Zellen aus Wildtyp- und En-2<sup>-/-</sup>-Tieren.** Aufgetragen sind Daten der drei Altersgruppen P3 (links), P7 (Mitte) und adult (rechts), sowie vergleichend Wildtyp- (hell) und En-2<sup>-/-</sup>-Tiere (dunkel). Für P3: t-Test,  $p < 0,001$ ,  $n_{wt} = 169$ ,  $n_{tg} = 166$ . Für P7:  $p = 0,007$ ,  $n_{wt} = 209$ ,  $n_{tg} = 171$ . Für adult:  $p < 0,001$ ,  $n_{wt} = 239$ ,  $n_{tg} = 225$ .

und 70 % am dendritischen Pol (Knockout) lokalisiert. In adulten Tieren verringerte sich der Intensitätsquotient im Knockout-Tier verglichen mit dem Wildtyp um 17 % (beim Wildtyp-Tier:  $0,869 \pm 0,268$ ; beim Knockout-Tier:  $0,721 \pm 0,230$ ). Es waren 47 % der Mitochondrien am axonalen Pol und 53 % am dendritischen Pol (Wildtyp), bzw. 42 % am axonalen Pol und 58 % am dendritischen Pol (Knockout) lokalisiert. Im zeitlichen Verlauf von P3 zu adulten Tieren waren vermehrt Mitochondrien am axonalen Zellpol lokalisiert, sowohl in Wildtyp- als auch in Knockout-Purkinje-Zellen. Für beide Genotypen war der Anstieg erst nach P7 nachweisbar.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass also zwischen den hier verwendeten Hintergrundstämmen FVB/N (Hintergrundstamm der L7En-2-Mäuse) und C57BL6 (Hintergrundstamm der En-2<sup>-/-</sup>-Mäuse) Unterschiede im Verlauf der mitochondrialen Signalverteilung auftraten. Diese Unterschiede werden bei der Interpretation der Ergebnisse im Diskussionsteil noch eine Rolle spielen.

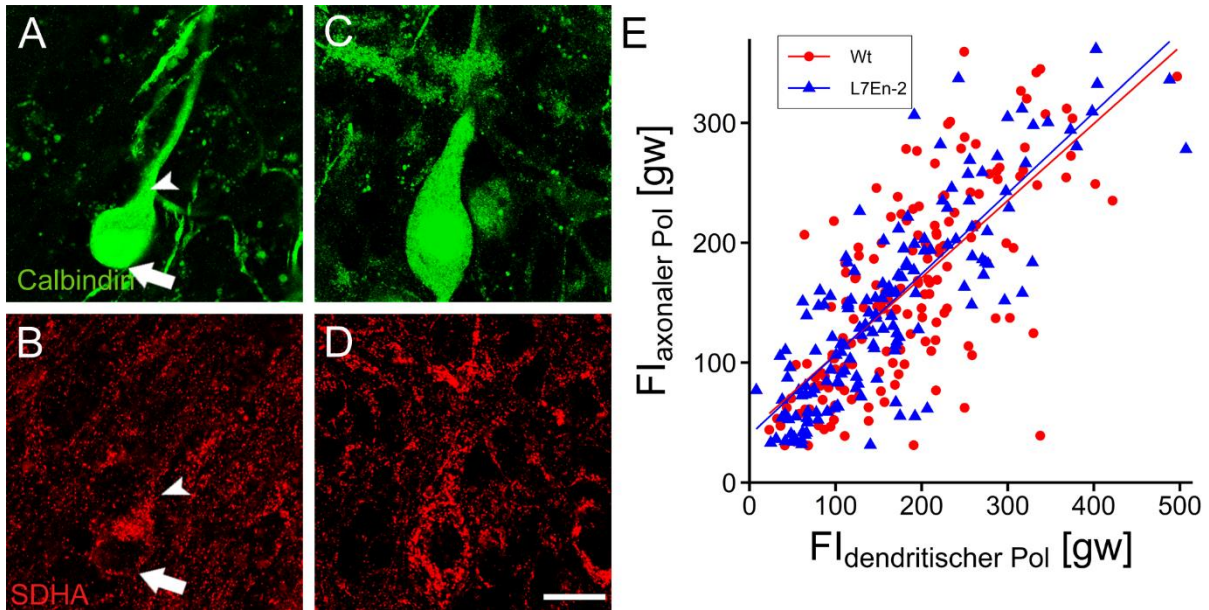
In der Zusammenschau der Analysen an L7En-2-Tieren und denen an Knockout-Tieren ergab sich also ein gleichsinniger Effekt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die

Intensität des SDHA-Signals am axonalen Zellpol sowohl in L7En-2-transgenen als auch in *En2*-defizienten Purkinje-Zellen im Vergleich zum dendritischen Zellpol als verringert darstellte. Bezugnehmend auf die eingangs formulierte Hypothese, dass sich bei einem primären Effekt von *En2* die Effekte der Überexpression und Repression komplementär zueinander verhalten sollten, sprechen die hier vorgelegten Ergebnisse gegen einen primär durch *En2* vermittelten Effekt auf die mitochondriale Verteilung.

### 3.3 Verteilung des mitochondrialen SDHA-Signals in cerebellären Schnittkulturen L7En-2-transgener Mäuse

Eine Möglichkeit, primär durch *En2* direkt vermittelte Effekte von sekundären Effekten zu unterscheiden, sind Schnittkulturen. Bei dieser Prozedur werden ca. 300 µm dicke cerebelläre Schnitte angefertigt, in denen alle extracerebellären Afferenzen zum Kleinhirn durchtrennt werden. Anschließend findet eine Differenzierung der Neurone in Kultur statt. Extrinsische Faktoren der neuronalen Differenzierung – seien es Neurotransmitter oder Wachstumsfaktoren - sind folglich verändert. Sind in solchen Schnittkulturen noch immer ähnliche morphologische Merkmale wie *in situ* nachweisbar, so spricht dies für einen intrinsischen Effekt der *En2*-Überexpression bzw. Repression.

Da die auffälligste Veränderung des SDHA-Signals bei den Purkinje-Zellen in L7En-2-transgenen Mäusen ca. eine Woche nach der Geburt zu sehen war, wurden zum Zeitpunkt P8 Schnittkulturen hergestellt. Die Kulturzeit für die Differenzierung der Purkinje-Zellen *in vitro* betrug hierbei sechs Tage. Es muss dabei festgehalten werden, dass die Purkinje-Zellen in Kultur zunächst einmal durch die Präparation in ihrer Entwicklung verlangsamt sind und die anschließende Differenzierung verzögert stattfindet. Die Schnittkulturen wurden von mir selbst und zum Teil zur Reduktion von Versuchstierzahlen im Rahmen des geltenden Tierschutzgesetzes in Zusammenarbeit mit Herrn Mohammed Bahaaeldin durchgeführt. Die Immunfluoreszenz-Färbung wurde von mir nach dem identischen Protokoll durchgeführt wie oben für die Vibratomschnitte beschrieben. Bei der Auswertung der Aufnahmen wurden die aufgenommenen Purkinje-Zellen je nach ihrer Lokalisation im Zellverband unterschiedlichen Gruppen zugeordnet. Insgesamt wurden nur Zellen in die

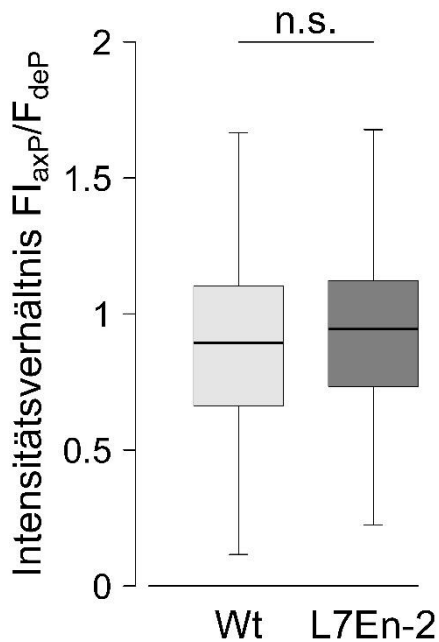


**Abb. 11: Immunhistochemische Färbung der Mitochondrien in Purkinje-Zellen in cerebellären Schnittkulturen aus Wildtyp- und L7En-2-transgenen Mäusen.** Präparation bei P8, in Kultur für sieben Tage. Dargestellt sind Purkinje-Zellen des anterioren Lobus in doppelt gefärbten cerebellären Vibratomschnitten; links Wildtyp-Gewebe mit Calbindin-Färbung (A) sowie der gleiche Bildausschnitt mit SDHA-Färbung (B), rechts analog L7En-2-transgenes Gewebe mit Calbindin- (C) und SDHA-Färbung (D). Pfeil: axonaler Zellpol, Pfeilspitze: dendritischer Zellpol. Maßstab: 30  $\mu\text{m}$ . (E) Lineare Modellierung des Zusammenhangs der SDHA-Fluoreszenzintensitäten des dendritischen (x-Achse) und axonalen (y-Achse) Pols einer Purkinje-Zelle. Es wurde eine Zweifaktorenanalyse verwendet.  $p = 0,619$ ,  $n_{\text{wt}} = 161$ ,  $n_{\text{tg}} = 159$

statistische Auswertung eingeschlossen, die sich innerhalb eines mikroskopischen Bildausschnittes bei 60-facher Vergrößerung in Nachbarschaft mindestens einer weiteren Purkinje-Zelle befanden. Darüber hinaus wurden die Auswertungen mit drei Gruppen von Purkinje-Zellen durchgeführt. In der ersten Gruppe wurden nur Purkinje-Zellen ausgewertet, die im Abstand von zwei Soma-Querdurchmesser keine weitere Purkinje-Zelle als Nachbarn hatten. Die zweite Gruppe an Purkinje-Zellen hatte Nachbar-Purkinje-Zellen im Abstand von mehr als einem Soma-Querdurchmesser, und die dritte Gruppe umfasste alle mikroskopisch aufgenommenen Zellen unabhängig davon, wie nahe andere Purkinje-Zellen benachbart lagen.

Wie auch bei der Untersuchung des Fluoreszenz-Signals der SDHA-Färbung an Vibratomschnitten wurden in den Aufnahmen der axonale und der dendritische Zellpol





**Abb. 12: SDHA-Intensitätsverhältnisse des axonalen zum dendritischen Zellpol der Purkinje-Zellen aus Schnittkulturen Wildtyp- und L7En-2-transgener Tiere.** Präparation bei P8, in Kultur für sechs Tage. Aufgetragen sind vergleichend Wildtyp- (hell) und L7En-2-Tiere (dunkel). t-Test,  $p = 0,085$ ,  $n_{wt} = 161$ ,  $n_{tg} = 159$

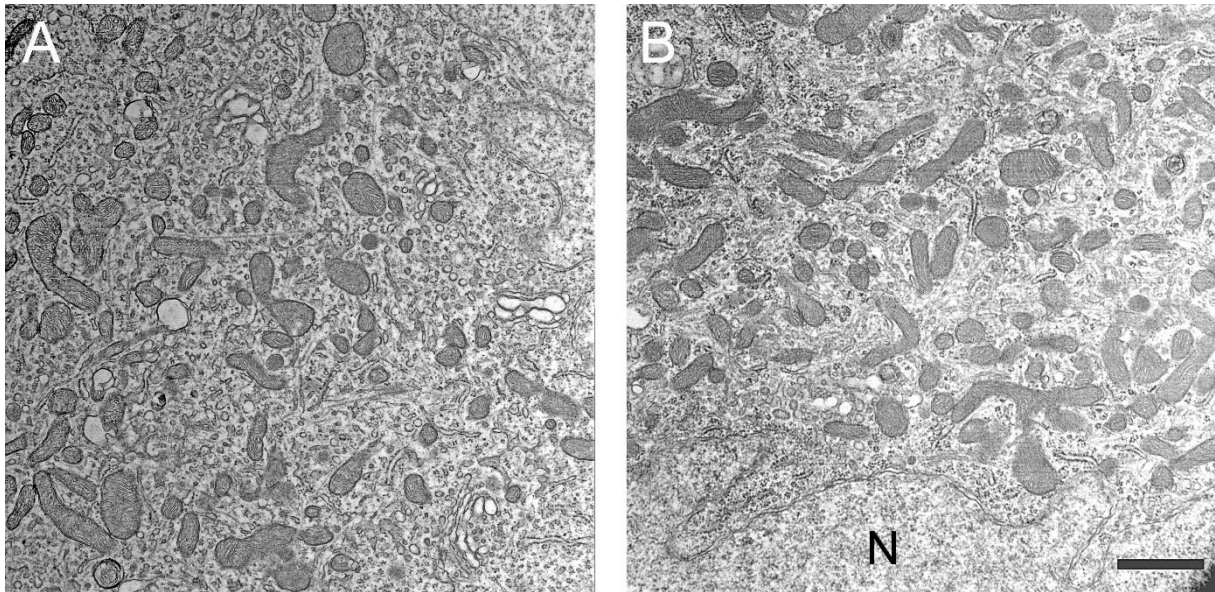
identifiziert und anschließend dort, sowie an einem durch die Calbindin-Färbung gesichert außerhalb, jedoch nahe der betreffenden Purkinje-Zelle liegenden Areal gleicher Größe (als Hintergrundmessung) die SDHA-Fluoreszenzintensitäten bestimmt. Die Abbildungen 11 und 12 zeigen die Ergebnisse aus diesen Versuchen, wobei hier alle Daten der Gruppe 3 abgebildet sind. Im Punktediagramm in Abb. 11 E stellt jeder Punkt die Zuordnung der SDHA-Intensität am axonalen Pol (y-Achse) zur Intensität am dendritischen Pol (x-Achse) einer Purkinje-Zelle dar. Es fällt auf, dass die beiden Punktwolken für die Daten aus Wildtyp-Tieren (rot) und L7En-2-transgenen Tieren (blau) sehr ähnlich verteilt waren und beide ihre größte Dichte im unteren linken Quadranten des Koordinatensystems aufwiesen. Auch die Geraden, die die lineare Modellierung des Zusammenhangs der Fluoreszenzintensitäten der beiden Zellpole abbildeten, differierten nicht wesentlich voneinander. Diese Beobachtungen passten zur Zweifaktoren-Analyse, mit welcher die Abhängigkeit der SDHA-Fluoreszenz-Intensität am axonalen Pol von der am dendritischen Pol und dem Genotyp untersucht wurde: Es zeigte sich hier zwar eine Abhängigkeit der beiden Intensitäten voneinander (Gruppe 1:  $p = 0,001$ , Gruppe 2:  $p = 0,001$ , Gruppe 3:  $p = 0,001$ ), jedoch keine Abhängigkeit der Intensität am axonalen Zellpol der Purkinje-Zellen vom Genotyp (Gruppe 1:  $p = 0,198$ , Gruppe 2:  $p = 0,794$ , Gruppe 3:  $p = 0,619$ ).

Abb. 12 enthält eine Darstellung des Intensitätsverhältnisses  $FI_{ap}/FI_{dp}$  als Boxplot. Die statistische Analyse dieses Quotienten zeigte keinen signifikanten Unterschied der Mittelwerte zwischen den Genotypen (für Wildtyp-Tiere  $0,936 \pm 0,407$ ; für transgene Tiere  $1,063 \pm 0,827$ ; t-Test, Gruppe 1:  $p = 0,694$ , Gruppe 2:  $p = 0,195$ , Gruppe 3:  $p = 0,085$ ). In den Purkinje-Zellen der cerebellären Schnittkulturen befanden sich somit beim Wildtyp-Tier 48 % der Mitochondrien am axonalen und 52 % am dendritischen Zellpol. Im L7En-2-transgenen Tier betragen diese Anteile 52 % (axonaler Pol) und 48 % (dendritischer Pol). Somit ließ sich in den Schnittkulturen kein signifikanter Unterschied in der Verteilung des mitochondrialen Signals zwischen Wildtyp- und L7En-2-transgenen Tieren beobachten. Zudem scheint es in dieser Hinsicht keinen Unterschied zu machen, ob eher in der Kultur vereinzelte oder gruppierte Zellen untersucht wurden.

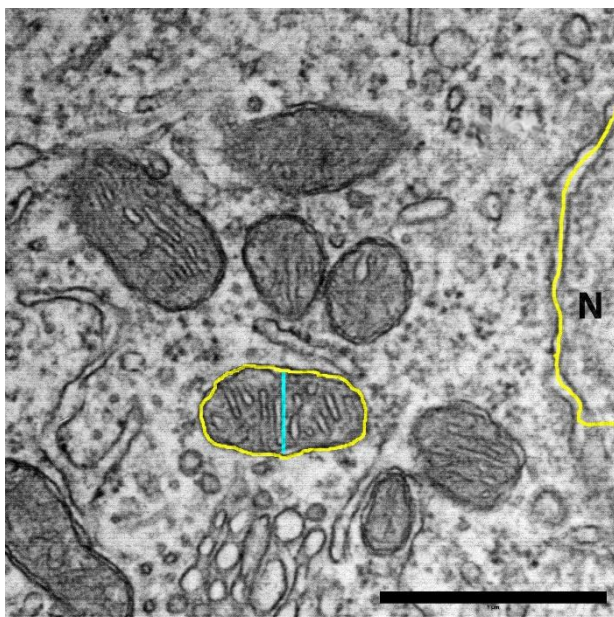
#### 3.4 Morphometrische Analyse der Mitochondrien L7En-2-transgener Mäuse in elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Die bisher dargestellten Daten zeigen, dass die Umverteilung des SDHA-Signals vom axonalen hin zum dendritischen Zellpol vor allem in *En2*-überexprimierenden Purkinje-Zellen im Vergleich zum Wildtyp auffällig war. Eine mögliche Hypothese zur Erklärung dieser Funde stellt eine veränderte intrazelluläre Lokalisation oder Morphologie der Mitochondrien dar, jedoch sind als weitere Ansätze auch eine veränderte Proteinexpression der SDHA in gleich verteilten Mitochondrien oder eine Kombination beider Modelle denkbar. Um diese Frage zu adressieren, wurde die Verteilung von Mitochondrien in hochauflösenden elektronenmikroskopischen Bildern von Purkinje-Zellen aus Wildtyp- und L7En-2-transgenen Tieren zum Zeitpunkt P7 verglichen. In diesem Genotyp und zu diesem Entwicklungszeitpunkt war in der lichtmikroskopischen Betrachtung der deutlichste Unterschied in der Verteilung des SDHA-Signals im Vergleich zu Wildtyp-Purkinje-Zellen beobachtbar.

Die elektronenmikroskopischen Präparate wurden aus cerebellären Geweben von P7-Tieren hergestellt und wurden mir dankenswerterweise von Frau Stefanie Ramrath zur Verfügung gestellt. Die Dokumentation erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Baader. Die



**Abb. 13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien in Purkinje-Zellen.** Zu sehen sind jeweils ein Bildausschnitt aus dem dendritischen Zellpol einer Purkinje-Zelle aus einer Wildtyp-Maus (A), sowie aus einer L7En-2-transgenen Maus (B). N = Nucleus. Maßstab: 1  $\mu$ m.



**Abb. 14: Morphometrie an Mitochondrien in elektronenmikroskopischen Aufnahmen.** Abgebildet ist die Erhebung der mitochondrialen Fläche (gelbe Umrandung) und des mitochondrialen Durchmessers (blaue Linie). Rechts im Bild verläuft die Grenze des bemessenen Zytoplasma-Areals, welches an den Nucleus (N) grenzt. Maßstab: 1  $\mu$ m .

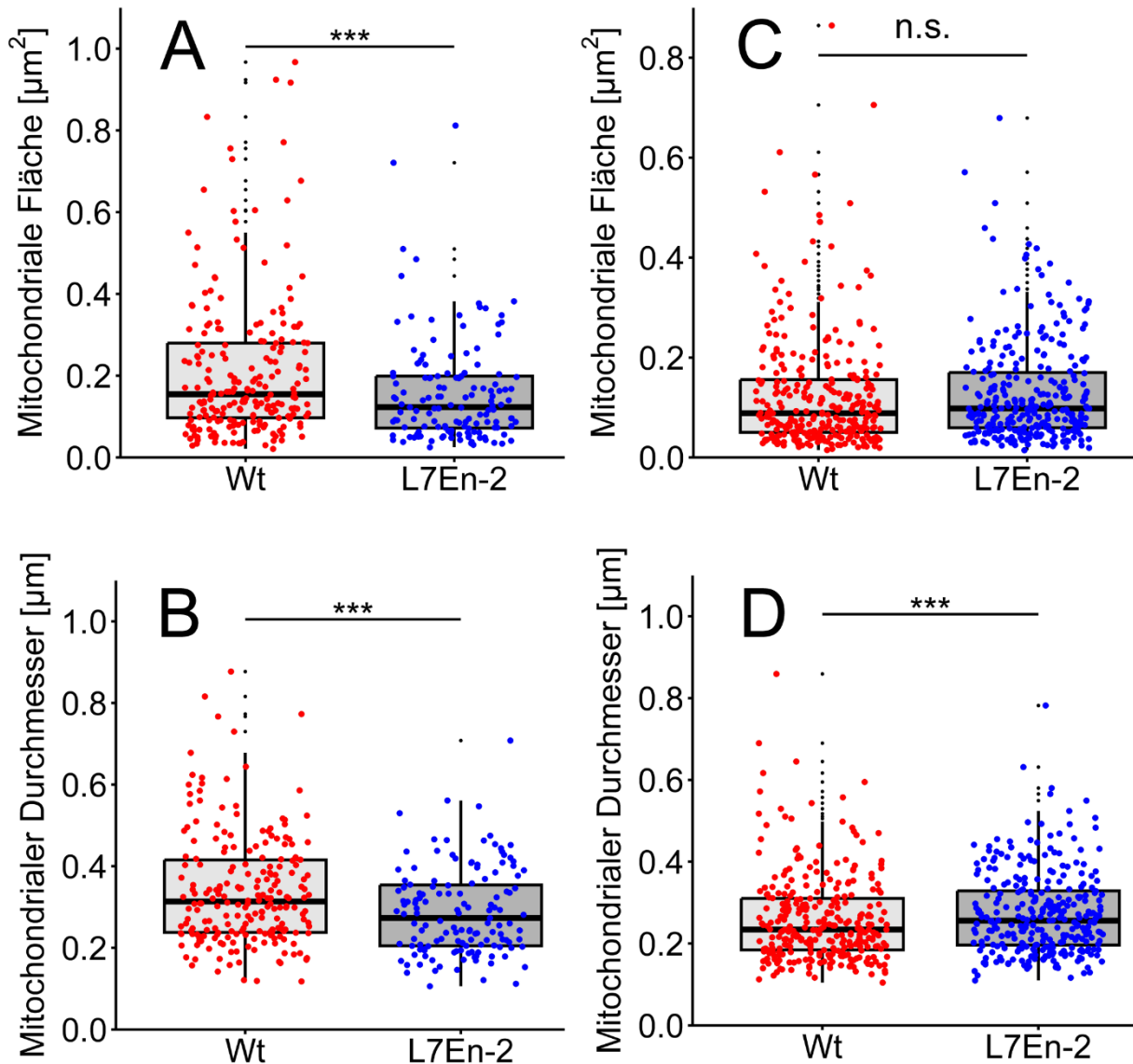
Auswahl der Schnitte, die Identifizierung der Abschnitte sowie das Protokoll zur Datenauswertung wurden von mir erarbeitet. In die Auswertung flossen Daten von zwei Wildtyp-Tieren und drei transgenen Tieren ein. Insgesamt wurden 79 Purkinje-Zellen von Wildtyp-Tieren und 46 von transgenen Tieren ausgewertet. Die vermessenen Zellausschnitte wurden anhand morphologischer Kriterien dem axonalen bzw. dendritischen Zellpol

zugeordnet, um die nachfolgend zu untersuchenden Parameter nach intrazellulärer Lokalisation getrennt zwischen den Genotypen vergleichen zu können. Aufgrund der deutlich selteneren Erfassung des axonalen Pols der Purkinje-Zellen (dieser war weniger häufig im elektronenmikroskopischen Präparat angeschnitten) gingen 93 dendritische Zellpole und 32 axonale Zellpole in diese Auswertung ein.

Abb. 13 zeigt exemplarisch zwei Ausschnitte aus dem dendritischen Pol von Purkinje-Zellen aus Wildtyp (A) und L7En-2 Tieren (B). Zu sehen ist, dass die Mitochondrien als variabel gestaltete Entitäten im Soma lokalisiert sind und keine auffälligen Auftreibungen aufweisen. Dies spricht für eine ausreichende Qualität der EM-Präparate für eine quantitative Vermessung. Abb. 14 zeigt einen Ausschnitt aus einem Soma mit klar erkennbaren Mitochondrien inklusive der charakteristischen Doppelmembran. Von diesen Mitochondrien wurden, wie abgebildet, der Durchmesser und die Fläche vermessen.

#### 3.4.1 Untersuchung von Fläche und Durchmesser einzelner Mitochondrien

Da Mitochondrien in ihrer Gesamtheit in einem zweidimensionalen elektronenmikroskopischen Schnitt nicht dargestellt werden können, wurde die Fläche bestimmt, die Mitochondrien in einem bestimmten zytoplasmatischen Ausschnitt einnehmen. Diese Fläche ist ein Maß für die Anzahl und/oder Ausdehnung von Mitochondrien. Zu diesem Zweck wurden die Mitochondrien mit Hilfe des Freihand-Werkzeuges in ImageJ umrandet und nachfolgend ihre Einzelflächen bestimmt. Die Durchmesser wurden als Querdurchmesser der größten mitochondrialen Ausdehnung bestimmt (vgl. Abb. 14). Zunächst wurden die vermessenen Mitochondrien als einzelne Datenpunkte betrachtet und ausgewertet. Der Datensatz umfasste für jedes einzelne Mitochondrium die Fläche und den maximalen Querdurchmesser. Die Mitochondrien wurden zunächst unabhängig von ihrer intrazellulären Lokalisation ausgewertet (nicht abgebildet). Dabei zeigte sich zwischen Wildtyp- und L7En-2-transgenen Mäusen weder eine signifikante Differenz im größten mitochondrialen Querdurchmesser (t-Test,  $p = 0,082$ ), noch in deren Fläche ( $p = 0,331$ ). Wurden jedoch die Messwerte für Mitochondrien des axonalen sowie des dendritischen Zellpols für sich betrachtet, so ließen sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und



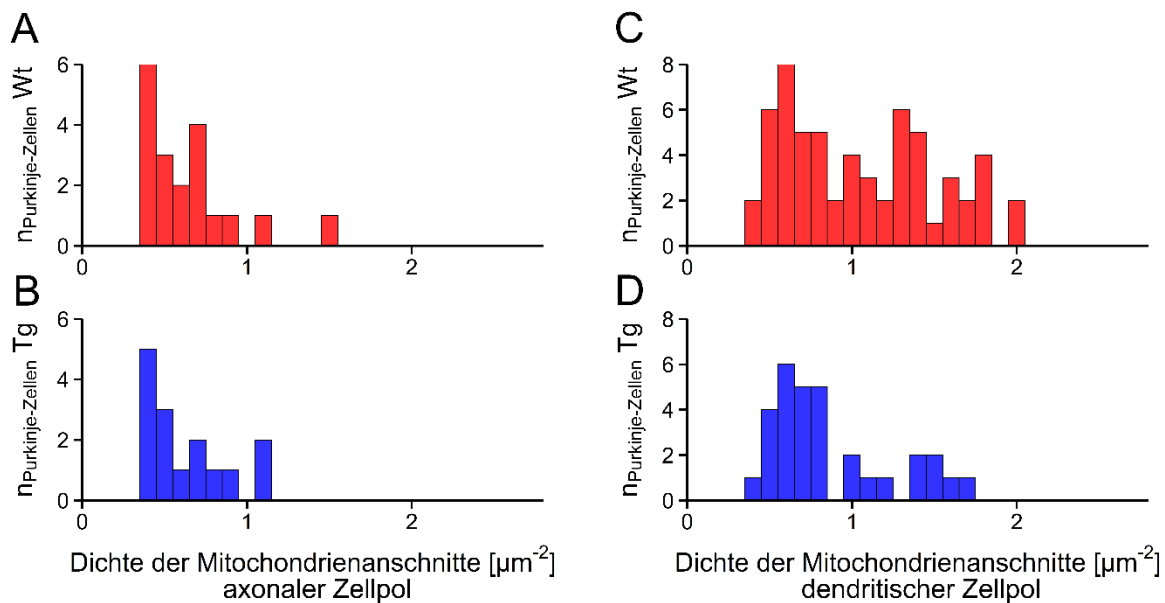
**Abb. 15: Mittelwerte der Fläche und des Durchmessers einzelner Mitochondrien in Wildtyp- und L7En-2-Purkinje-Zellen.** Gezeigt ist eine Gegenüberstellung der mittels Morphometrie elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Purkinje-Zellen ermittelter mitochondrialen Flächen (A, C) sowie der mitochondrialen Durchmesser (B, D) in Wildtyp- und L7En-2-transgenen Tieren. In den Diagrammen A und B kommt der axonale Pol zu Darstellung (Durchmesser: t-Test,  $p < 0,001$ , Fläche:  $p < 0,01$ ,  $n_{wt} = 218$ ,  $n_{tg} = 139$ ), in den Diagrammen C und D der dendritische Pol (Durchmesser:  $p < 0,001$ , Fläche:  $p = 0,756$ ,  $n_{wt} = 1991$ ,  $n_{tg} = 1157$ ). Zur übersichtlicheren Darstellung wurden in C und D jeweils 6 Werte in einem Datenpunkt gemittelt.

L7En-2-Tieren nachweisen (Abb. 15). Am axonalen Pol der Purkinje-Zellen der transgenen Tiere fanden sich im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant um 26 % verringerte durchschnittliche Fläche (t-Test,  $p < 0,001$ , beim Wildtyp  $MW = 0,213 \mu\text{m}^2$  und  $SD = 0,179 \mu\text{m}^2$ ; beim transgenen Tier  $MW = 0,158 \mu\text{m}^2$  und  $SD = 0,127 \mu\text{m}^2$ ) sowie ein um 15 % geringerer Durchmesser der Mitochondrien (t-Test,  $p < 0,001$ , beim Wildtyp  $MW = 0,340 \mu\text{m}$  und  $SD = 0,136 \mu\text{m}$ ; beim transgenen Tier  $MW = 0,289 \mu\text{m}$  und  $SD = 0,106 \mu\text{m}$ ).

Bei der Untersuchung des dendritischen Pols konnte – gegenteilig zum axonalen Pol – festgestellt werden, dass hier die Mitochondrien aus L7En-2-transgenen Geweben einen um 5 % größeren Durchmesser aufwiesen (t-Test,  $p < 0,001$ , beim Wildtyp  $MW = 0,255 \mu\text{m}$  und  $SD = 0,106 \mu\text{m}$ ; beim transgenen Tier  $MW = 0,267 \mu\text{m}$  und  $SD = 0,095 \mu\text{m}$ ); in ihrer Fläche offenbarte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (t-Test,  $p = 0,756$ , beim Wildtyp  $MW = 0,123 \mu\text{m}^2$  und  $SD = 0,128 \mu\text{m}^2$ ; beim transgenen Tier  $MW = 0,125 \mu\text{m}^2$  und  $SD = 0,103 \mu\text{m}^2$ ).

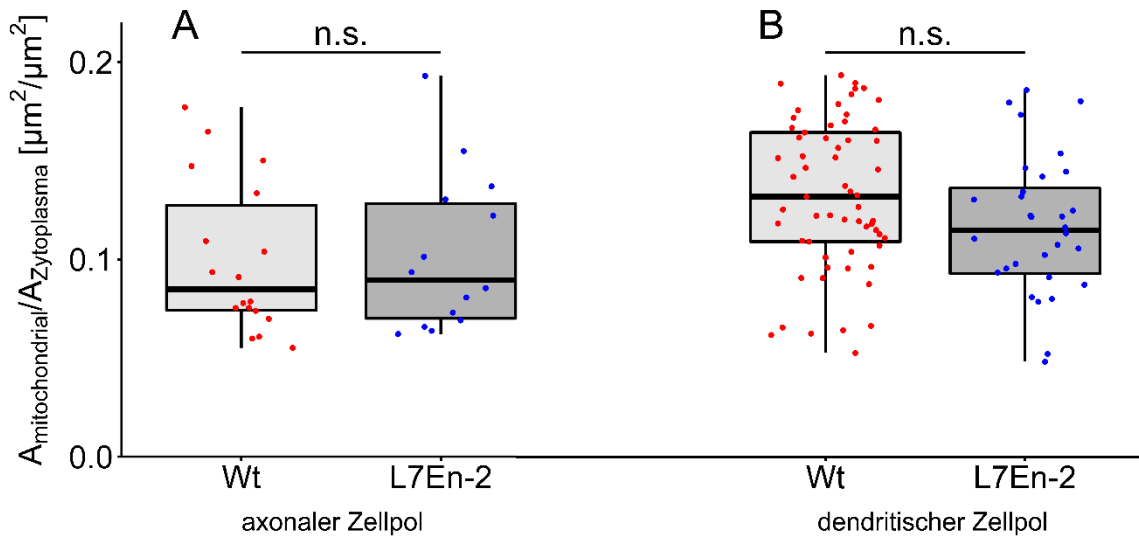
### 3.4.2 Untersuchung der Mitochondrien unter Berücksichtigung ihrer Purkinje-Zell-Zugehörigkeit

Die Betrachtung der mitochondrialen Parameter als Einzeldaten weist jedoch unterschiedliche Nachteile auf. Zum einen berücksichtigt diese Herangehensweise nicht, dass die Mitochondrien *in vivo* als ein zusammenhängendes System fungieren, in dem durch Teilung aus einem Mitochondrium mehrere Tochtermitochondrien hervorgehen können, oder mehrere Mitochondrien in der umgekehrten Weise zu einer gemeinsamen Entität verschmelzen können. Der Nachweis kleinerer Einzelmitochondrien muss somit beispielsweise nicht bedeuten, dass einer Zelle weniger mitochondriales Volumen zur Verfügung steht, wenn diese Veränderung durch eine höhere Anzahl der Mitochondrien kompensiert wird. Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen, ist es notwendig, die Mitochondrien in ihrer Zugehörigkeit zu Purkinje-Zellen gruppiert zu betrachten. Dies hat außerdem den Vorteil, dass zusätzliche Parameter – wie die Dichte mitochondrialer Anschnitte – hergeleitet und analysiert werden können. Auf der anderen Seite birgt die sehr hohe n-Zahl der mitochondrialen Einzeldaten die Gefahr, aufgrund der hohen statistischen Power Effekte nachzuweisen, die im betrachteten biologischen System nicht relevant sind. Aus diesen



**Abb. 16: Verteilung der Dichte mitochondrialer Anschnitte pro zytoplasmatischer Flächeneinheit am axonalen und dendritischen Zellpol.** Gezeigt wird auf der x-Achse die Dichte mitochondrialer Anschnitte pro zytoplasmatischer Flächeneinheit, auf der y-Achse die Anzahl der Purkinje-Zellen, bei denen die Dichte im auf der x-Achse gekennzeichneten Intervall liegt. Daten aus sieben Tage alten Wildtyp- (rot) und L7En-2-transgenen Mäusen (blau). Hierbei zeigen (A) und (B) die Mitochondriendichte am axonalen Zellpol, während in (B) und (D) jene am dendritischen Zellpol zur Darstellung kommt. Weder am axonalen Pol (t-Test:  $p = 0,694$ ), noch am dendritischen Pol ( $p = 0,092$ ) ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen Wt und L7En-2 nachweisen. Axonaler Zellpol:  $n_{\text{wt}} = 18$ ,  $n_{\text{tg}} = 14$ , Dendritischer Zellpol:  $n_{\text{wt}} = 61$ ,  $n_{\text{tg}} = 32$

Gründen wurden die Mitochondrien in einer zweiten Auswertung im Zellverband betrachtet. Zur Ermittlung der Dichte mitochondrialer Anschnitte in den beiden Zellpolen wurden die Anschnitte ausgezählt und ihre Gesamtzahl durch die zytoplasmatische Fläche des jeweils aufgenommenen Purkinje-Zell-Pols dividiert. Die nach dieser Methode ermittelten Werte sind in Abb. 16 dargestellt. Im Mittel waren in Purkinje-Zellen von Wildtyp-Tieren  $0.591 \pm 0.323$  mitochondriale Anschnitte/ $\mu\text{m}^2$  am axonalen Pol zu finden und im transgenen Tier  $0.102 \pm 0.265$  Anschnitte/ $\mu\text{m}^2$ . Am dendritischen Pol wurden  $1.133 \pm 0.542$  Anschnitte/ $\mu\text{m}^2$  beim Wildtyp- und  $0.936 \pm 0.469$  Anschnitte/ $\mu\text{m}^2$  beim transgenen Tier gemessen. Im Mittelwertvergleich zwischen den untersuchten Wildtyp- und L7En-2-transgenen Purkinje-Zellen offenbarte sich weder am axonalen (t-Test:  $p = 0,694$ ), noch am

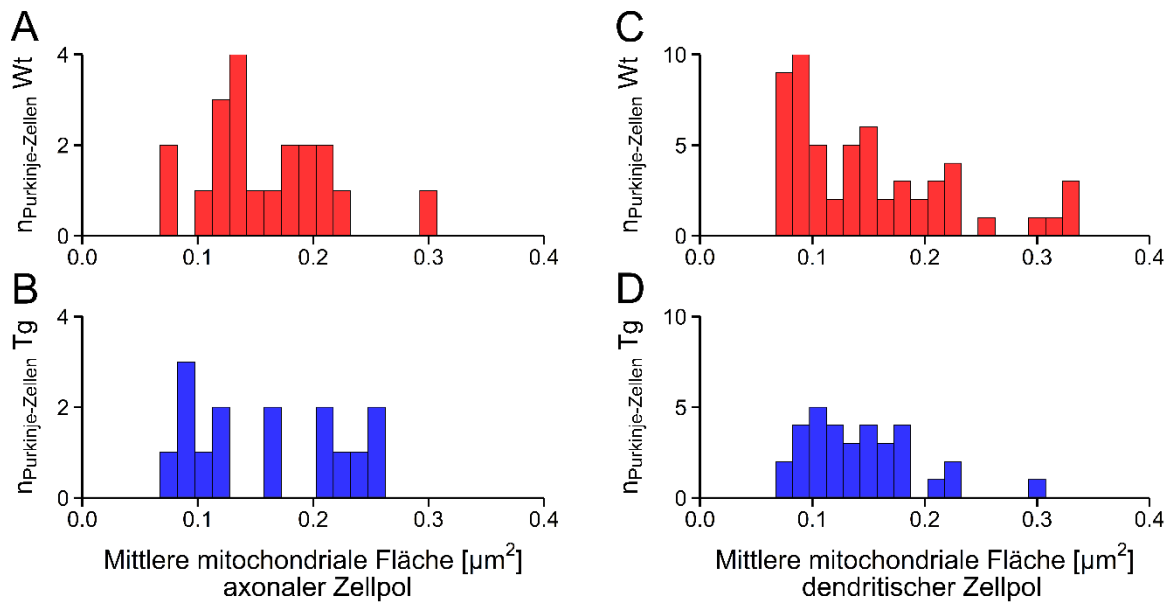


**Abb. 17: Mittelwerte der mitochondrialen Fläche pro zytoplasmatischer Flächeneinheit am axonalen und dendritischen Zellpol.** Zur Darstellung kommt der Quotient aus den aufsummierten mitochondrialen Einzelflächen in einer Purkinje-Zelle und der mikroskopisch aufgenommenen zytoplasmatischen Fläche, auf der die Mitochondrien vermessen wurden. Daten aus sieben Tage alten Wildtyp- (hellgrau mit roter Punktwolke) und L7En-2-transgenen Mäusen (dunkelgrau mit blauer Punktwolke). (A) zeigt die Quotienten am axonalen, (B) am dendritischen Zellpol. n.s. (Welch's t-Test, für den axonalen Pol:  $p = 0,862$ , für den dendritischen Pol:  $p = 0,053$ ), Axonaler Zellpol:  $n_{wt} = 18$ ,  $n_{tg} = 14$ , Dendritischer Zellpol:  $n_{wt} = 61$ ,  $n_{tg} = 32$

dendritischen Zellpol ( $p = 0,092$ ) ein statistisch signifikanter Unterschied. Eine Zweifaktorenanalyse bestätigte, dass die Dichte mitochondrialer Anschnitte nicht abhängig vom Genotyp variierte ( $p = 0,125$ ), zeigte jedoch auch, dass sehr wohl eine Abhängigkeit dieser Größe von der intrazellulären Lokalisation bestand ( $p < 0,001$ ). In den Wildtyp-Tieren konnte gezeigt werden, dass die Dichte mitochondrialer Anschnitte am axonalen Pol signifikant um 48 % geringer war als am dendritischen Pol (t-Test,  $p < 0,001$ ; für den axonalen Pol  $0,591 \pm 0,323$  Anschnitte/ $\mu\text{m}^2$ ; für den dendritischen Pol  $1,113 \pm 0,542$  Anschnitte/ $\mu\text{m}^2$ ), während sie in den transgenen Tieren am axonalen Pol in Relation zum dendritischen Pol um nur 34 % verringert war (t-Test,  $p = 0,021$ ; für den axonalen Pol  $0,616 \pm 0,265$  Anschnitte/ $\mu\text{m}^2$ ; für den dendritischen Pol  $0,936 \pm 0,469$  Anschnitte/ $\mu\text{m}^2$ ).

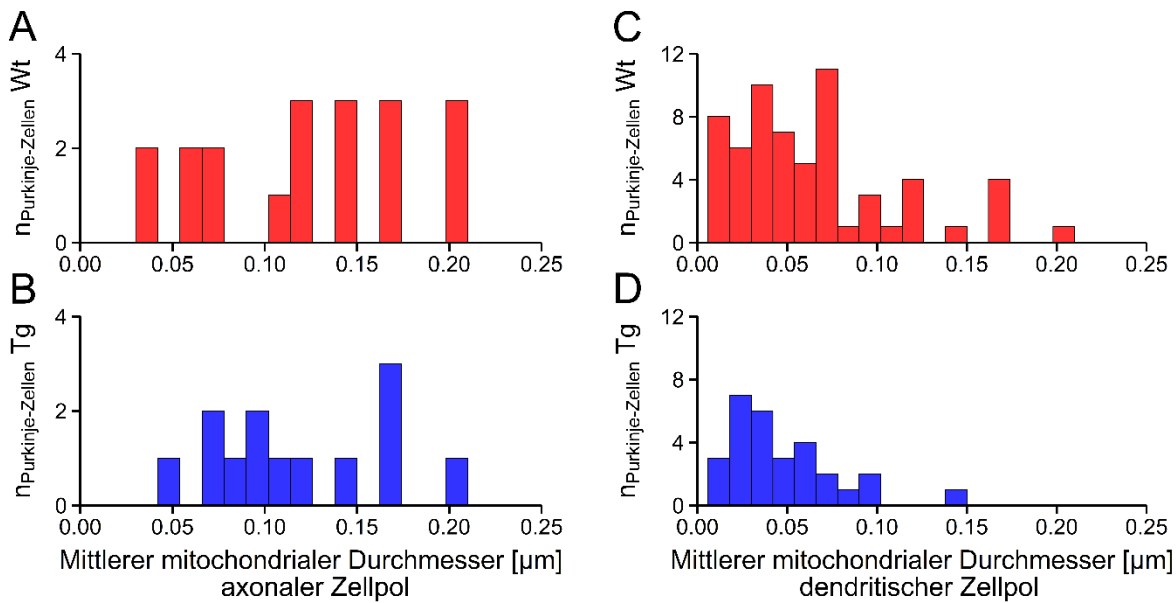
Um ein weiteres Maß für die mitochondriale Dichte zu erhalten, wurden die Einzelflächen aufsummiert und durch die Zytoplasmafläche eines jeden vermessenen Purkinje-Zell-Pols





**Abb. 18: Verteilung der pro Purkinje-Zelle gemittelten Fläche mitochondrialer Anschnitte am axonalen und dendritischen Zellpol.** Gezeigt wird auf der x-Achse die mittlere Fläche mitochondrialer Anschnitte, auf der y-Achse die Anzahl der Purkinje-Zellen, bei denen diese Fläche im auf der x-Achse gekennzeichneten Intervall liegt. Daten aus sieben Tage alten Wildtyp- (rot) und L7En-2-transgenen Mäusen (blau). Hierbei zeigen (A) und (B) die mitochondrialen Flächen am axonalen Zellpol, während in (C) und (D) jene am dendritischen Zellpol zur Darstellung kommen. Weder am axonalen Pol (t-Test:  $p = 0,468$ ), noch am dendritischen Pol ( $p = 0,759$ ) ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen Wt und L7En-2 nachweisen. Axonaler Zellpol:  $n_{wt} = 18$ ,  $n_{tg} = 14$ , Dendritischer Zellpol:  $n_{wt} = 61$ ,  $n_{tg} = 32$

dividiert. Eine grafische Darstellung dieser errechneten Größe findet sich in Abb. 17. Für die mitochondriale Fläche pro zytoplasmatischer Fläche des entsprechenden Zellpols ergab sich am axonalen Pol der Wildtyp-Tiere ein Mittelwert von  $0.100 \pm 0.038 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ , bei den L7En-2-Tieren von  $0.102 \pm 0.040 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ . Am dendritischen Pol betragen diese Maßzahlen beim Wildtyp  $0.132 \pm 0.038 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$  sowie beim transgenen Tier  $0.117 \pm 0.035 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ . Auch hier ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und L7En-2-transgenen Purkinje-Zellen nachweisen, weder am axonalen (t-Test:  $p = 0.862$ ), noch am dendritischen Zellpol ( $p = 0,053$ ). Dieser Befund wurde in der durchgeführten Zweifaktorenanalyse bestätigt. Hier fand sich keine Abhängigkeit der mitochondrialen Fläche pro zytoplasmatischer Flächeneinheit vom Genotyp ( $p = 0,123$ ), wohl aber von der



**Abb. 19: Verteilung des pro Purkinje-Zelle gemittelten Durchmessers mitochondrialer Anschnitte.** Gezeigt wird auf der x-Achse der mittlere Durchmesser (gemessen als größter Querdurchmesser) mitochondrialer Anschnitte, auf der y-Achse die Anzahl der Purkinje-Zellen, bei denen dieser Durchmesser im auf der x-Achse gekennzeichneten Intervall liegt. Daten aus sieben Tage alten Wildtyp- (rot) und L7En-2-transgenen Mäusen (blau). Hierbei zeigen (A) und (B) die mitochondrialen Durchmesser am axonalen Zellpol, während in (C) und (D) jene am dendritischen Zellpol zur Darstellung kommen. Weder am axonalen Pol (t-Test:  $p = 0,572$ ), noch am dendritischen Pol ( $p = 0,433$ ) ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen Wt und L7En-2 nachweisen. Axonaler Zellpol:  $n_{wt} = 18$ ,  $n_{tg} = 14$ , Dendritischer Zellpol:  $n_{wt} = 61$ ,  $n_{tg} = 32$

intrazellulären Lokalisation innerhalb eines Genotyps ( $p < 0,001$ ): Die mitochondriale Fläche in Relation zur Fläche des Zytoplasmas des angeschnittenen Zellpols in Purkinje-Zellen von Wildtyp-Tieren war am axonalen Pol signifikant um 25 % niedriger als am dendritischen Pol (t-Test,  $p = 0,002$ ; für den axonalen Pol  $0,100 \pm 0,038 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ ; für den dendritischen Pol  $0,132 \pm 0,038 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ ). In der L7En-2-transgenen Maus war die mitochondriale Fläche am axonalen Pol um 12 % geringer als am dendritischen Pol. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (t-Test,  $p = 0,225$ ; für den axonalen Pol  $0,102 \pm 0,040 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ ; für den dendritischen Pol  $0,117 \pm 0,035 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ ).

Zur Ermittlung der Größe bzw. Ausdehnung der einzelnen Mitochondrien wurden sowohl die Messungen der mitochondrialen Einzelflächen (Daten dargestellt in Abb.18), als auch jene der mitochondrialen Einzeldurchmesser (Abb. 19) herangezogen und diese innerhalb

einer Purkinje-Zelle gemittelt. Am axonalen Pol konnten  $0,200 \pm 0,097 \mu\text{m}^2$  (Wildtyp) sowie  $0,185 \pm 0,078 \mu\text{m}^2$  (transgenes Tier) als durchschnittliche mitochondriale Fläche ermittelt werden; am dendritischen Pol wurden  $0,144 \pm 0,079 \mu\text{m}^2$  für den Wildtyp und  $0,139 \pm 0,049 \mu\text{m}^2$  für das transgene Tier gemessen. Die Mittelwerte für den durchschnittlichen Durchmesser eines Mitochondriums am axonalen Pol ließen sich mit  $0,176 \pm 0,136 \mu\text{m}$  für Wildtyp-Tiere und auf  $0,157 \pm 0,113 \mu\text{m}$  für L7En-2-transgene Tiere beziffern. Der mittlere Durchmesser am dendritischen Pol war  $0,061 \pm 0,047 \mu\text{m}$  im Wildtyp- und  $0,051 \pm 0,059 \mu\text{m}$  im transgenen Tier breit. In beiden Fällen zeigte sich keine statistische Signifikanz, weder am axonalen (für die mitochondriale Fläche t-Test:  $p = 0,468$ ; für den mitochondrialen Durchmesser  $p = 0,572$ ), noch am dendritischen Zellpol (für die mitochondriale Fläche t-Test:  $p = 0,759$ ; für den mitochondrialen Durchmesser  $p = 0,433$ ).

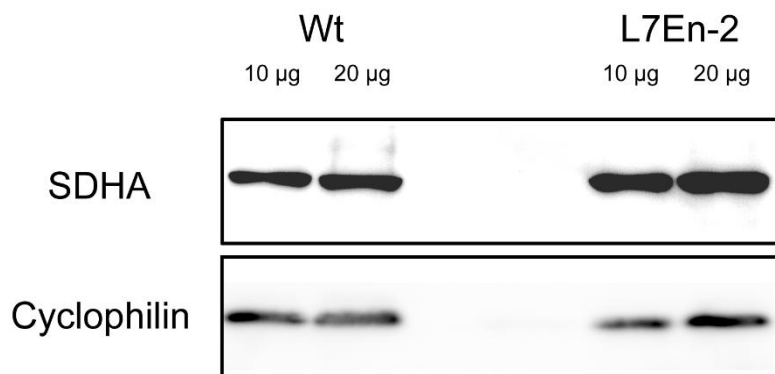
Die Zweifaktoren-Analyse zeigte, dass die Fläche und der Durchmesser von Mitochondrien nicht abhängig vom Genotyp variierten (für die mittlere mitochondriale Fläche  $p = 0,617$  und für den mittleren mitochondrialen Durchmesser  $p = 0,390$ ). Wohl aber differierten diese Parameter in Abhängigkeit der intrazellulären Lokalisation (für die mittlere mitochondriale Fläche  $p = 0,001$  und für den mittleren mitochondrialen Durchmesser  $p < 0,001$ ). In der Konsequenz wurden die mitochondriale Durchschnittsfläche sowie der Durchschnittsdurchmesser bezogen auf eine Purkinje-Zelle innerhalb der Genotypen vergleichend für die intrazelluläre Lokalisation der Mitochondrien untersucht. Im Zuge dieser Auswertung konnte ermittelt werden, dass im Wildtyp-Gewebe die Mitochondrien am axonalen Pol der bemessenen Purkinje-Zellen eine signifikant um 39 % größere Fläche aufwiesen als am dendritischen Pol (t-Test,  $p = 0,014$ ; für den axonalen Pol  $0,200 \pm 0,097 \mu\text{m}^2$ ; für den dendritischen Pol  $0,144 \pm 0,079 \mu\text{m}^2$ ); im transgenen Gewebe verhielt es sich ähnlich mit einer in Relation zum dendritischen Pol um 33 % größeren mitochondrialen Durchschnittsfläche am axonalen Pol (t-Test,  $p = 0,021$ ; für den axonalen Pol  $0,185 \pm 0,078 \mu\text{m}^2$ ; für den dendritischen Pol  $0,139 \pm 0,049 \mu\text{m}^2$ ). Abschließend konnte für den mittleren mitochondrialen Durchmesser gezeigt werden, dass er in Wildtyp-Mäusen am axonalen Zellpol um das 1,9-fache größer ist als am dendritischen Zellpol (t-Test,  $p < 0,001$ ; für den axonalen Pol  $0,176 \pm 0,136 \mu\text{m}$ ; für den dendritischen Pol  $0,061 \pm 0,047 \mu\text{m}$ ), während Mitochondrien in L7En-2-transgenen Mäusen in Relation zum dendritischen Pol am axonalen Pol einen zweifach

vergrößerten mittleren Durchmesser aufweisen (t-Test,  $p < 0,001$ ; für den axonalen Pol  $0,157 \pm 0,113 \mu\text{m}$ ; für den dendritischen Pol  $0,051 \pm 0,059 \mu\text{m}$ ).

### 3.5 SDHA-Western Blot-Analysen an Wildtyp- und L7En-2-Cerebella

Sollte die Ursache für die in den lichtmikroskopischen Auswertungen der Purkinje-Zellen aus L7En-2-transgenen Mäusen bei P7 gesehene unterschiedliche SDHA-Verteilung in der veränderten Verteilung oder Morphologie der Mitochondrien begründet sein, so wäre zu erwarten, dass sich am dendritischen Zellpol der Purkinje-Zellen eine größere mitochondriale Dichte oder Gesamtfläche findet, und/oder dass die einzelnen Mitochondrien dort eine größere Ausdehnung aufweisen als am axonalen Zellpol. Da sich dahingehende Veränderungen jedoch in den elektronenmikroskopischen Analysen nicht fanden, ist es wahrscheinlicher, dass die Beobachtungen der unterschiedlichen SDHA-Fluoreszenzintensitäten auf einer veränderten Proteinexpression der SDHA in L7En-2-transgenen Purkinjezellen zum Zeitpunkt P7 beruhen.

Um einen Anhalt auf eine mögliche veränderte SDHA-Expression zu erhalten, wurden Proteinextrakte aus Cerebella von sieben Tage alten Wildtyp- und L7En-2 Mäusen hergestellt. Die Extrakte wurden auf einem SDS-Gel aufgetragen und die SDHA Banden im Western Blot dargestellt (Abb. 20). Vergleicht man die Intensitäten der Banden, erscheinen die Banden in den L7En-2 Tieren deutlich intensiver. Es musste aber leider festgestellt werden, dass nach mehrmaliger Wiederholung des Versuchs diese Unterschiede nicht reproduzierbar waren. Da der Effekt von En-2 auf die Expression von SDHA nur in Purkinje-Zellen auftreten sollte, da Engrailed auch nur in Purkinje-Zellen in L7En-2 Tieren



**Abb. 20: SDHA-Western Blot-Analyse an cerebellären Gewebsextrakten aus sieben Tage alten Wildtyp- und L7En-2-transgenen Mäusen.** Es sind jeweils zwei unterschiedliche Proteinmengen aufgetragen. Molekulare Massen: SDHA 70 kDa, Cyclophilin (Kontrolle) 24 kDa

überexprimiert wird, im Western Blot aber eine Gesamtextrakt aufgetragen war, ist es unwahrscheinlich, dass Unterschiede mit dieser Technik identifiziert werden können.

## 4. Diskussion

Genetische Variationen des Transkriptionsfaktors Engrailed-2 werden mit dem Auftreten von autistischen Verhaltensweisen beim Menschen in Verbindung gebracht (Benayed et al., 2005; Benayed et al., 2009; Choi et al., 2012; Gharani et al., 2004; Hnoonal, et al., 2016; James et al., 2013; Sen et al., 2010), und auch im Tiermodell konnten bei *En2*-transgenen Mäusen Verhaltensänderungen nachgewiesen werden, die als ASD-ähnlicher Phänotyp interpretiert worden sind (Brielmaier et al., 2012; Brielmaier et al., 2014; Cheh et al., 2006). Außerdem finden sich bei *En2*-transgenen Mäusen Veränderungen in der Größe des Kleinhirns, im Überleben von PCs, und in der Verschaltung von Nervenzellen, die auch im Gehirn von Patienten mit einem autistischen Phänotyp gefunden wurden (Amaral et al., 2008; Hazlett et al., 2017; Pickett und London, 2005; Sui et al., 2018;). Da Verhaltensphänotypen meist mit Veränderungen der neuronalen Verschaltung assoziiert werden, und die Aktivität der Neurone ganz wesentlich vom Energiehaushalt der Zelle abhängig ist, erscheint es nachvollziehbar, dass bei zahlreichen neuropsychiatrischen Erkrankungen veränderte oder dysfunktionale Mitochondrien als Ursache der Erkrankung beschrieben wurden (Büttiker et al., 2023; Fízíková et al., 2023). Ziel dieser Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob sich in Purkinje-Zellen *En2*-transgener Mäuse eine veränderte mitochondriale Morphologie oder Verteilung finden lässt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das in der mitochondrialen Atmungskette lokalisierte Protein SDHA in den Purkinje-Zellen dieser Tiere im Vergleich zum Wildtyp eine verstärkte Lokalisation am dendritischen Zellpol aufwies. Dieser Effekt war gleichermaßen in *En2*-defizienten (ab dem dritten Postnataltag) wie in *En2*-überexprimierenden (L7En-2) Purkinje-Zellen (ab dem siebten Postnataltag) nachweisbar. Im Gegensatz dazu war in Schnittkulturen L7En-2-transgener Tiere diese veränderte Verteilung der mitochondrialen SDHA nicht vorhanden. Bei der Morphometrie der Mitochondrien in Purkinje-Zellen L7En-2-transgener Tiere in elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten sich am axonalen Pol der transgenen Tiere im Vergleich zum Wildtyp sowohl in der Fläche als auch im Durchmesser verkleinerte Mitochondrien, während diese am dendritischen Pol in transgenen Tieren im Vergleich zum Wildtyp im Durchmesser vergrößert waren. Wurden die Mitochondrien

gruppiert nach Purkinje-Zellen analysiert, fanden sich jedoch weder Unterschiede in der Anzahl oder Dichte, noch in der Fläche oder dem Durchmesser mitochondrialer Anschnitte zwischen axonalem und dendritischem Zellpol.

Diese Befunde zeigen in der Summe einerseits, dass die veränderte Expression von *En2* keinen direkten und intrinsischen Einfluss auf die Lokalisation der Mitochondrien besitzt, andererseits aber auch, dass die unterschiedliche Verteilung des SDHA-Signals auf eine veränderte Genexpression mitochondrialer Proteine zurückzuführen sein könnte.

#### 4.1. Kritische Auseinandersetzung mit dem Nachweis der zellulären Verteilung des mitochondrialen Proteins SDHA

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in *En2*-überexprimierenden Purkinje-Zellen am siebten Postnataltag das mitochondriale Protein SDHA vermehrt am dendritischen Zellpol lokalisiert war. Der Nachweis erfolgte durch eine immunhistochemische Färbung an Formaldehyd-fixierten Schnitten des Kleinhirns. Diese Methode ermöglicht es – im Gegensatz zu molekularbiologischen Methoden – die zelluläre Verteilung von Proteinen darzustellen und zu quantifizieren, da die zu vergleichenden Areale innerhalb einer Schnittebene und im vorliegenden Fall sogar innerhalb einer einzelnen Zelle liegen. So konnten Variabilitäten in den Färbeintensitäten von Färbung zu Färbung und von Schnittregion zu Schnittregion minimiert werden. Zudem wurden Referenzareale benachbart zu den ausgewählten Purkinje-Zellen genutzt, um Variabilitäten in der Hintergrundfärbungen herauszurechnen.

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen Wildtyp- und transgenen Tieren zu optimieren, wurde darauf geachtet, dass nur Purkinje-Zellen aus definierten Lobuli miteinander verglichen wurden. Dies ist wichtig, da sich die Purkinje-Zellen lagespezifisch in verschiedenen Entwicklungsstadien befinden (Inouye und Murakami, 1980; Jankowski et al. 2004). Zudem ist bekannt, dass der Energiestoffwechsel mit zunehmender Differenzierung von Neuronen zunimmt und entsprechend die Zahl der Mitochondrien, ihre Proteinmenge sowie die Anzahl der Crista-Einstülpungen im Laufe der neuronalen Entwicklung ansteigen (Erecinska et al. 2004). Deshalb wurden nur Purkinje-Zellen im anterioren Lobus des Cerebellums innerhalb der Fissuren zwischen dem zweiten und dritten, sowie

dritten und vierten Lobulus mikroskopisch dokumentiert und ausgewertet. Diese Purkinje-Zellen zeigten vergleichbare morphologische und molekulare Differenzierungscharakteristika wie Dendritendifferenzierung und Parvalbumin-Expression (Jankowski et al. 2004).

Ein weiterer kritischer Punkt der Auswertung ist die Wahl der konfokalen Ebene, die für die Analyse der SDHA Verteilung genutzt wurde. Es ist bekannt, dass die Mitochondrien nicht gleichmäßig in Neuronen verteilt, sondern insbesondere früh postnatal in höherer Dichte am dendritischen Pol lokalisiert sind (Altman, 1972; Landis, 1973). Die Wahl der konfokalen Ebene könnte also das Ergebnis einer genotypenspezifischen Umverteilung des mitochondrialen SDHA-Signals entscheidend beeinflussen. Um eine genotypenspezifische Verteilung des Signals in der SDHA-Färbung zeigen zu können, wurden die Auswertungen nur an Purkinje-Zellen getätigt, in denen der Zellkern mindestens 50 % des Somas ausfüllte, und in denen ein axonaler und dendritischer Zellpol klar morphologisch zu identifizieren waren.

Trotz der getroffenen Maßnahmen zur Reduktion von technisch bedingten Fehlern in der Auswertung muss festgehalten werden, dass die Erfassung des Signales am axonalen Zellpol von Purkinje-Zellen drei Tage alter Mäuse schwieriger war als bei älteren Tieren. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Purkinje-Zellen hier nur einen sehr schmalen Zytoplasmasaum auf (vgl. z.B. mit dem Bildmaterial von P7 des gleichen Genotyps in Abb. 7 G), in dem nur eine vergleichsweise kleine Fläche gemessen werden konnte und die gemessenen Intensitäten entsprechend eine höhere Variabilität aufwiesen. Diese Flächenproblematik war jedoch zwischen den Genotypen vergleichbar. Die grundsätzliche Durchführbarkeit der Experimente konnte dadurch belegt werden, dass zu allen Zeitpunkten in beiden Genotypen das SDHA-Signal am dendritischen Pol im Mittel stets höher war als am axonalen Pol. Dieser Befund ist konsistent mit der Beobachtung, dass Mitochondrien aktivitätsabhängig transportiert werden und dort lokalisiert werden, wo ein erhöhter Energiebedarf vorhanden ist (Macaskill und Kittler, 2010). Gleichzeitig sind Mitochondrien im Dendriten stationärer, so dass arealspezifisch höhere Energiemengen für die Verrechnung der auf mehrere Tausend Eingänge geschätzten Informationen zur Verfügung gestellt werden können. Des Weiteren sind dendritisch lokalisierte Mitochondrien stoffwechselaktiver (Overly et al., 1996). Die in dieser Arbeit



gezeigten Befunde sind folglich konsistent mit Beobachtungen aus der Literatur, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Methodik plausible Ergebnisse liefert.

Der zeitliche Verlauf der mitochondrialen Signalverteilung unterschied sich bereits in den Wildtyp-Tieren zwischen den FVB/N-Mäusen (Hintergrundstamm der L7En-2-Mäuse) und den C58BL6-Mäusen (Hintergrundstamm der En-2<sup>-/-</sup>-Mäuse), wie es in den Abb. 8 und 10 zu sehen ist. Auf die genotypenvergleichenden Analysen hat dies insofern keinen Einfluss, als dass zu vergleichende Purkinje-Zellen immer im selben Hintergrund analysiert worden sind. Anzumerken ist, dass der globale Knockout bereits zum Zeitpunkt P3 einen Effekt auf die Verteilung des Signals zu haben scheint, während ein solcher Effekt für die Purkinje-Zell-spezifische Überexpression erst zu P7 nachweisbar wird. Es ist bekannt, dass sich im Laufe der neuronalen Entwicklung die mitochondriale Verteilung in diesen Zellen verändert. In frühen Entwicklungsstadien sind die Mitochondrien sehr stark auf den dendritischen Zellpol konzentriert, während sie mit zunehmender Reifung der Neurone gleichmäßiger verteilt werden (Altman, 1972). Dies ist konsistent mit den hier vorgelegten Daten. Vor diesem Hintergrund lässt sich die veränderte mitochondriale SDHA-Färbeintensität als Ausdruck der Entwicklungsverzögerung interpretieren, die für L7En-2-transgene Purkinje-Zellen beschrieben wurde (Jankowski et al., 2004).

Trotz der beschriebenen technischen Limitationen ist mit den getroffenen methodischen Maßnahmen die Aussage möglich, dass das SDHA-Signal in den Purkinje-Zellen von Wildtyp- und L7En-2 transgenen Tieren unterschiedlich auf die axonalen und dendritischen Pole verteilt war. Dies könnte zwei Ursachen haben: Einerseits könnten die SDHA-positiven Mitochondrien unterschiedlich verteilt sein, andererseits könnte die Proteinexpression in den Mitochondrien selbst verändert sein.

#### 4.2 Die Mitochondrienverteilung als mögliche Ursache des atypisch verteilten SDHA-Signals in *En2*-transgenen Purkinje-Zellen

Um herauszufinden, ob die atypische SDHA-Signalverteilung in Engrailed-2 transgenen Purkinje-Zellen auf der Lokalisation von Mitochondrien beruhen, wurden elektronenmikroskopische Analysen der Organellen in der zweidimensionalen Darstellung durchgeführt. Mitochondrien sind jedoch dreidimensionale Organellen mit einer sehr

variablen zylindrischen Form, die mehrere Mikrometer lang und auch stark im Raum gekrümmt sein können. Somit werden in einem Schnitt durch eine Purkinje-Zelle unterschiedlich viele und unterschiedlich geformte Anschnitte getroffen, die möglicherweise von einem einzigen Mitochondrium stammen könnten. Da diese technische Limitation für beide Genotypen gleichermaßen zutrifft, wurde die messbare Effektgröße durch die statistische Analyse von mehr als 40 Purkinje-Zellen pro Genotyp minimiert. Mit dieser Methode konnte eine Dichte von 0,9 Mitochondrien pro  $\mu\text{m}^2$  ermittelt werden, wobei der durchschnittliche Durchmesser eines Mitochondriums 0,26  $\mu\text{m}$  lag. Die erhaltenen Werte – sowohl für die Anzahl als auch für die Größe der Mitochondrien – sind mit Literaturdaten vergleichbar und sprechen für die Validität der Untersuchungen (0,1-1  $\mu\text{m}$  Durchmesser der Mitochondrien in Purkinje-Zellen bei Ratten in Lobanov et al., 2007; 0,8-1 Mitochondrien/ $\mu\text{m}^3$  in Baliatti et al., 2010).

Ein weiterer kritischer Punkt elektronenmikroskopischer Auswertungen ist die Wahl der Schnittebene durch die Purkinje-Zelle. Während in lichtmikroskopischen Schnitten Zellen ausgesucht werden konnten, bei denen der axonale und dendritische Pol angeschnitten sind, ist dies bei 70 nm dicken elektronenmikroskopischen Schnitten und 25  $\mu\text{m}$  dicken Zellen nur in seltenen Fällen möglich. Insofern wurden, anders als bei den immunhistochemischen SDHA-Färbungen, Zellpole aus verschiedenen Zellen miteinander verglichen. Eine Zuordnung zum dendritischen Pol konnte in allen Fällen getätigt werden. Als axonaler Pol wurde der gegenüberliegende Anteil des Somas gewählt, auch wenn typische Merkmale wie die „dreischichtige Membran“ und die Kompartimentierung der Organellen nicht zu sehen war. Auch hier sei aber erwähnt, dass die gemessenen Mitochondriendichten durchaus mit Daten aus der Literatur übereinstimmen (Baliatti et al., 2010; Lobanov et al., 2007).

Der Vergleich der mitochondrialen Dichte, der mitochondrialen Gesamtfläche und der Größe einzelner Mitochondrienanschnitte zeigte keinen Unterschied zwischen den Purkinje-Zellen aus Wildtyptieren und En-2-überexprimierenden Tieren. Auch war die Form der Mitochondrien nicht verändert, wie es beispielsweise für Purkinje-Zellen mit neurodegenerativem Phänotyp beschrieben wurde (Landis, 1973). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass andere morphologische Veränderung auftreten, die hier nicht untersucht wurden. Möglichkeiten wären zum Beispiel eine Veränderung der Cristae

innerhalb der Mitochondrien wie sie während der Entwicklung oder nach neurodegenerativen Veränderungen beobachtet wurden (Erecinska et al., 2004; Sasaki et al., 2004). Zu bedenken ist außerdem, dass im Rahmen der Arbeit nur zweidimensionale Schnitte analysiert wurden. Tatsächliche mitochondriale Volumenänderungen, wie sie nach der Fusion oder Teilung („fusion“ und „fission“) von Mitochondrien auftreten, wurden nicht analysiert.

Alternativ könnte auch der Transport der Mitochondrien in *En2*-transgenen Tieren betroffen sein. Der Transport der Mitochondrien innerhalb von Neuronen findet entlang von Mikrotubuli und unter Zuhilfenahme von ATP-abhängigen Motorproteinen statt. Dabei wird der Transport in anterograder Richtung durch Kinesine, und in retrograder Richtung durch Dyneine vermittelt (Mattson et al., 2008). Dieser Mitochondrientransport wird durch unterschiedliche Mechanismen reguliert (vgl. Detmer et al., 2007), wobei der Energiebedarf eine wichtige Komponente zu sein scheint. So finden sich sowohl in auswachsenden Axonen (Morris und Hollenbeck, 1993), als auch prä- und postsynaptisch (Chang et al., 2006) vermehrt Mitochondrien. Entsprechend ist die mitochondriale Lokalisation in Nervenzellen, beziehungsweise der Transport der Mitochondrien, von der synaptischen Aktivität abhängig (Macaskill et al., 2009). Ist die synaptische Aktivität hoch, so steigt der Calcium-Spiegel, und der mitochondriale Transport wird angehalten. Auf diese Weise kann eine höhere Anzahl Mitochondrien an Synapsen lokalisiert werden. Ähnliches könnte sich am dendritischen Pol von *En2*-transgenen Purkinje-Zellen abspielen. Kandidaten für eine solche synaptische Interaktion könnten Korbzellen und Kletterfasern sein. Beide Neuronen innervieren proximale Dendritenabschnitte. Der Vergleich der transgenen Tiere sowie die Befunde an Schnittkulturen sprechen am ehesten für die Kletterfasern. Tatsächlich konnte zumindest für die L7En-2 Tiere gezeigt werden, dass *Engrailed-2* die Polarität der Purkinje-Zell-Somata verändert und Synapsen atypisch lokalisiert (Hayn-Leichsenring et al., 2011). Bisher gibt es hierfür noch keine physiologischen Daten aus dem Mausmodell, allerdings konnte in *Drosophila* gezeigt werden, dass nach veränderter *En2*-Expression synaptische Verbindungen im auditorischen System verändert waren (Pézier et al., 2014).

Ein weiterer Faktor, der bekanntermaßen den Transport und damit auch die intrazelluläre Verteilung von Mitochondrien beeinflussen kann, ist ihr Membranpotential. Miller und Sheetz konnten 2004 zeigen, dass in kultivierten Neuronen 90% der Mitochondrien mit

hohem Membranpotential anterograd in Richtung des Wachstumskegels transportiert wurden, während die Mitochondrien mit niedrigem Potential eher retrograd Richtung Soma transportiert wurden (Miller und Sheetz 2004). Im Soma könnten dann transmitter-abhängig Prozesse wie Fusion, Teilung oder Autophagie stattfinden (Liu und Shio, 2008).

Diese Befunde könnten bedeuten, dass – eine geringere Anzahl von Mitochondrien am axonalen Pol der *En2*-transgenen Purkinje-Zellen vorausgesetzt – dies in einem verstärkten Transport von beschädigten Mitochondrien in Richtung des Somas begründet ist. Da bekannt ist, dass Engrailed durch die Regulation der Translation von Bestandteilen der Atmungskette protektiv auf Mitochondrien wirken kann, stellt dies eine mögliche Erklärung der veränderten SDHA-Signalverteilung in *En2*-transgenen Mäusen dar (Alvarez-Fischer et al., 2011).

Wie oben bereits ausgeführt, weisen die elektronenmikroskopischen Befunde jedoch darauf hin, dass das durch Engrailed-Überexpression veränderte, lichtmikroskopisch-nachweisbare dendritische SDHA-Signal nicht auf einer unterschiedlichen Verteilung und/oder unterschiedlichen Morphologie der Mitochondrien zurückzuführen ist. Deswegen sollen im Folgenden mögliche alternative Ansätze aufgezeigt werden, die eine Erklärung für die veränderte SDHA-Signalverteilung bieten könnten.

#### 4.3. Intrinsische Regulation der SDHA-Expression durch Engrailed-Proteine

Bereits vor über zehn Jahren konnte in dopaminergen Neuronen des Mittelhirns festgestellt werden, dass *En*-defiziente Neurone anfällig für Apoptose waren, und es wurde vermutet, dass diese Degeneration über Veränderungen am mitochondrialen Metabolismus vermittelt werden (Alavian et al., 2009). Im visuellen System von Hühnchen konnte gezeigt werden, dass Engrailed über die Aktivierung der mitochondrialen ATP-Synthese und deren Sekretion den Adenosin-Typ-1-Rezeptor aktiviert und zusammen mit Ephrin-Rezeptoren Einfluss auf das gerichtete Wachstum von retinalen Axonen nimmt (Alvarez-Fischer et al. 2011, Fuchs et al. 2012; Stettler et al. 2012, Wizenmann et al. 2015). Engrailed erhöhte die Expression nukleär kodierter mitochondrialer Proteine des Komplex I. In der Folge wurde vermehrt ATP synthetisiert und sezerniert. Diese Wirkung des Engrailed wurde *in vitro* gezeigt, indem exogen Engrailed zu neuronalen Kulturen zugegeben

worden war. Es wurde vermutet, dass das exogene Engrailed die Expression nukleär kodierter mitochondrialer Proteine steuert, d.h. auf die Transkription von Genen im Kern Einfluss nimmt (Prochiantz et al., 2014). Ob es hierbei allerdings einen Unterschied zwischen exogenem Engrailed und endogen synthetisiertem Engrailed gibt, wurde nicht untersucht. In mesencephalen Neuronen von *En2*-Knockout-Tieren konnte gezeigt werden, dass apoptotische Zellveränderungen nach Induktion von oxidativem Stress auftraten. Wurde in das Gehirn der Mäuse Engrailed injiziert, konnte die Apoptoserate deutlich reduziert werden (Rekaik et al., 2015). Dieser Effekt war abhängig von der Expression des transkriptionsaktiven Transposons LINE-1, das im Zellkern durch Engrailed reguliert wird (Blaudin de Thé et al., 2018) Allerdings konnte auch hier nicht gezeigt werden, dass Engrailed direkt die Expression mitochondrialer Gene steuert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand der *En2*-überexprimierenden und *En2*-defizienten Purkinje-Zellen untersucht werden, ob gegenläufige Effekte zu beobachten waren. Dies war offensichtlich nicht der Fall. Wie in den L7En-2 Purkinje-Zellen war auch in den Purkinje-Zellen der *En2*<sup>-/-</sup>-Tiere das mitochondriale SDHA-Signal auf den dendritischen Zellpol konzentriert. Dieser Effekt war schon am dritten Postnataltag nachweisbar, während die dendritische Lokalisation des SDHA Signals in L7En-2 Purkinje-Zellen erst an P7 zu beobachten war. Dieser Unterschied ist damit begründbar, dass der *En2*-Knockout bereits von Geburt an vorhanden ist und ein möglicher Effekt dieses Knockouts sich dementsprechend auch früh manifestieren kann. Die L7-getriebene Überexpression erfolgt demgegenüber frühestens an E14 und dann auch nur in geringen Mengen in einem parasagittalen Muster. Eine ubiquitäre Überexpression erfolgt zwischen P0 und P5 (Baader et al., 1998; Smeyne et al., 1991). Die Tatsache, dass die Lokalisation des SDHA-Signals im Vergleich zum Wildtyp gleichsinnig verändert ist, wie es auch in den *En2*-überexprimierten L7En-2-Purkinje-Zellen gezeigt werden konnte, legt nahe, dass es sich bei den beobachteten Auswirkungen auf die SDHA-Fluoreszenzintensität nicht um einen primären, durch *En2* direkt vermittelten Effekt handelt, sondern extrinsische Faktoren eine Rolle spielen.

#### 4.4 Extrinsische Faktoren als Ursache des atypisch verteilten SDHA-Signals

Diese Annahme ist konsistent mit der Beobachtung, dass in Purkinje-Zellen von Schnittkulturen, in denen Afferenzen teilweise durchtrennt wurden, keine Veränderung in der Mitochondrienverteilung zwischen Wildtyp- und L7En-2 Tieren zu sehen waren. Auffällig war bei den Auswertungen der Schnittkulturen, dass ein Vergleich der relativen Intensitäten am axonalen und dendritischen Pol durchaus mit denen an frischen Schnitten vergleichbar waren. Dies spricht für die Plausibilität der *in vitro*-Daten. Die Streuung der Werte war allerdings *in vitro* deutlich höher als bei den Gewebeschnitten. Eine Erklärung für diese höhere Variabilität könnte in der Kultivierung der Schnitte über einen Zeitraum von sieben Tagen - im Gegensatz zur sofortigen Fixierung der Schnitte aus dem lebenden Tier - liegen. Es ist denkbar, dass unterschiedliche Kulturbedingungen zu einer unterschiedlichen Differenzierung der Purkinje-Zellen führen, die, wie in 1.5 dargelegt, auch die Verteilung der Mitochondrien und/oder die Expression mitochondrialer Proteine beeinflussen kann. Darüber hinaus migrieren Purkinje-Zellen während der Kulturzeit innerhalb des Schnittes, sodass grundsätzlich eine genaue Zuordnung zu Lobuli und damit der Vergleich genetisch sehr ähnlicher Zellen erschwert wird. Ein weiteres Problem, welches sich durch die Migration und/oder die Kultivierung der Gewebe ergibt, ist die sehr unterschiedliche Lage der Zellpole. Um einem in Kultur variableren Ursprung von Axonen und Dendriten zu begegnen, wurden zum einen in der konfokalen Mikroskopie geeignete Schnittebenen ausgewählt und reproduzierbare Parameter am Mikroskop eingestellt, sodass Fluoreszenzintensitäten innerhalb einer Zelle verglichen werden konnten. Des Weiteren wurde als unabhängiger Faktor der statistischen Auswertung gruppiert vorliegende Purkinje-Zellen mit vereinzelt Zellen verglichen. Unabhängig von der Nachbarschaftsbeziehung zu anderen Zellen waren keine Unterschiede in der SDHA-Signalverteilung in den Purkinje-Zellen von Wildtyp- und L7En-2 Tieren nachzuweisen. Extrinsische Signale stammen in einer ersten naheliegenden Annahme von Zellen, die in einer direkten Zell-Zellverbindung mit den Purkinje-Zellen stehen. Da zwischen Wildtyp- und L7En-2-transgenen Purkinje-Zellen in Schnittkulturen, in denen extracerebelläre Afferenzen durchtrennt worden waren, keine Unterschiede in der Mitochondrienverteilung zu sehen waren, in Vibratomschnitten von Wildtyp und *En2*-transgenen Tieren aber Unterschiede nachweisbar waren, lässt sich vermuten, dass die für die SDHA-Verteilung verantwortlichen Kontaktzellen außerhalb des Kleinhirns liegen. Die einzigen

extracerebellären Zellen, die direkt mit Purkinje-Zellen kommunizieren, sind Neurone der unteren Olive. Diese Nervenzellen innervieren über die Kletterfasern proximale Dendritenabschnitte der Purkinje-Zellen.

#### 4.5 Der veränderte Succinatdehydrogenase-Transport als mögliche Ursache des atypisch verteilten SDHA-Signals

Wenn das SDHA-Signal durch extrinsische Signale reguliert wird, stellt sich die Frage, wie extrinsische Signale auf die Verteilung des SDHA-Signals Einfluss nehmen können. Mögliche Hypothesen wären eine lokal innerhalb der Purkinje-Zellen unterschiedliche Proteinexpression oder eine unterschiedliche Regulation des Transports und/oder der Aufnahme von SDHA in die Mitochondrien am axonalen und dendritischen Zellpol.

Die Succinatdehydrogenase (SDH) ist ein Enzym, welches in zwei Stoffwechselwegen des Energiehaushalts eine bedeutende Rolle einnimmt, nämlich im Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung. Bei der von ihr katalysierten Reaktion wird Succinat zu Fumarat oxidiert, während die Elektronen über FAD und Eisen-Schwefelcluster schließlich in die Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol einfließen. Letzteres wird in die Komplexe III und IV der oxidativen Phosphorylierung eingespeist und trägt schlussendlich zur Erzeugung des Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran bei, welcher die ATP-Synthase zur Herstellung von ATP befähigt. Die SDH ist in der inneren Mitochondrienmembran verankert und besteht aus vier Untereinheiten. Die Einheiten SDHA und SDHB bilden gemeinsam den katalytisch aktiven Anteil des Enzyms mit dem aktiven Zentrum. Hierbei handelt es sich um die lösliche (hydrophile) Domäne des Komplexes, welche aus der inneren Mitochondrienmembran in die Matrix hereinragt. Die Untereinheiten SDHC und SDHD bilden einen lipophilen Anker des Proteinkomplexes in der inneren Mitochondrienmembran (Cecchini, 2003). Im Gegensatz zu anderen Komplexen der oxidativen Phosphorylierung, die sowohl in nukleärer als auch in mitochondrialer DNA kodierte Anteile enthalten (Priesnitz und Becker, 2018), konstituiert sich der SDH-Proteinkomplex ausschließlich aus nukleär kodierten Untereinheiten (Hsu et al., 2016). Die Proteinexpression der SDH im Allgemeinen und der Untereinheit SDHA im Speziellen kann auf unterschiedliche Weisen reguliert werden. Die erste Ebene, auf

welcher eine solche Regulation stattfindet, ist die Transkription. So verstärkt beispielsweise der Nuclear Respiratory Factor 1 (NRF1) durch sein Binden an die Promotorregionen der Untereinheiten SDHA und SDHD deren Transkription in Kardiomyozyten und antagonisiert die Wirkung von HIF1 (Piantadosi und Suliman, 2008). Wird in Skelettmuskelzellen von Pferden Cortisol-abhängig Stress induziert, wird p53-vermittelt die SDHA Expression heraufreguliert (Sp et al., 2020). Außerdem wurde ein alternatives Spleißprodukt der SDHC-Untereinheit – SDHC  $\Delta 5$  – beschrieben, welches die Transkription der SDHC-mRNA unterdrückt, gleichzeitig jedoch auch die Aktivität des gesamten SDH-Komplexes mindert (Sato et al., 2015). An der Reprogrammierung des Metabolismus in Prostata-Krebszellen wurde gezeigt, dass der nukleäre ARRB1-Faktor eine Pseudohypoxie verursacht, die über den HIF1A-Transkriptionsfaktor und die Regulation von SDHA vermittelt wird (Zecchini et al., 2014).

Offenbar spielt auch die Regulation auf epigenetischer Ebene eine Rolle für die Expressionsstärke von mitochondrialen Proteinen. Wird die Deacetylierung von Histonen durch MS-275 blockiert, so wird die SDH-Expression heraufreguliert (Galmozzi et al., 2013). Ein ähnlicher Mechanismus, welcher in Bakterien beschrieben wurde, beinhaltet Histon-Succinylierung als epigenetische Regulation der Genexpression. Hier wurde zwar kein konkreter Einfluss auf die SDHA-Expression gezeigt, jedoch stammen die Beobachtungen interessanterweise aus SDH-Mangelmutanten, sodass durchaus auch ein Zusammenhang zur Regulation von Proteinen des Energiestoffwechsels bestehen könnte (Smestad et al., 2018). Durch seine Rolle als Transkriptionsfaktor wäre es denkbar, dass Engrailed-2 die SDHA-Expression auf Transkriptionsebene reguliert. Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse aus den Schnittkulturpräparationen L7En-2-transgener Tiere, aus denen sich schlussfolgern lässt, dass eine Beeinflussung der SDHA-Expression durch *En2* mittels eines allein in den Purkinje-Zellen intrinsisch ablaufenden Signalweges eher unwahrscheinlich ist.

Die SDH-Expression kann auch posttranskriptional reguliert werden. In unterschiedlichen Spezies wurden hier unterschiedliche Mechanismen beschrieben. Hierbei spielt die Stabilität bzw. Halbwertszeit der mRNA eine bedeutende Rolle. So konnten Metruccio et al. (2009) zeigen, dass in *Neisseria meningitidis* die sRNA NrrF gemeinsam mit dem Protein Hfq unter anderem abhängig vom Eisenstoffwechsel die Expression der Untereinheiten



SDHA und SDHC durch den Abbau ihrer mRNAs herunterregulieren kann. Auch gibt es aus Hefen Hinweise darauf, dass die zu SDHA und SDHB homologen Proteine abhängig von der Kohlenhydratquelle im Nährmedium in ihrer Expression reguliert werden und dies auf mRNA-Stabilitätsebene durch die Regulation des mRNA-Abbaus mittels einer 5'-Exonuklease geschieht (Cereghino et al. 1995). Schließlich gibt es auch Belege für die Beeinflussung der SDH-Expression auf posttranskriptionaler Ebene aus humanen Zellen. In Lungen-Adenokarzinomzellen späterer Stadien liegt eine Überexpression der miRNA miR-210 vor, welche nach Puisségur et al. (2011) die Expression von SDHD auf mRNA-Transkriptionsebene unterdrückt. Auch wurde eine posttranskriptionale Modifikation (Deaminierung von Cytidin zu Uracil) in menschlichen Monozyten beschrieben, welche die Menge an SDHB-mRNA-Transkripten negativ zu beeinflussen scheint (Baysal et al., 2013).

Grundsätzlich kann der SDH-Komplex auch auf posttranslationaler Ebene reguliert werden. Moosavi et al. (2019) nennen hier vier in der Literatur beschriebene Arten der Modifikation, nämlich Phosphorylierung, Deacetylierung, Succinylierung und Propionylierung. Diese Veränderungen des Proteinkomplexes regulieren die SDH jedoch nicht in ihrer Expression, sondern vielmehr in ihrer biochemischen Aktivität. Da es keine Hinweise darauf gibt, dass der hier verwendete Antikörper zwischen diesen posttranslational modifizierten Formen unterscheiden kann, wird auf die posttranslationale Modifikation nicht weiter eingegangen.

Schließlich ist es auch denkbar, dass das veränderte SDHA-Fluoreszenzsignal in L7En-2-transgenen Purkinje-Zellen nicht durch eine veränderte Regulation der Proteinexpression, sondern durch einen vermehrten Einbau der SDHA in den SDH-Proteinkomplex zustande kommt. Daher soll nun noch kurz auf den Vorgang des molekularen Zusammenbaus dieses Komplexes eingegangen werden. Die Vorgänge sind zum Teil besser in Hefen als in Säugetieren untersucht. Um dies kenntlich zu machen, wird an diesen Stellen die Nomenklatur der SDH-Untereinheiten in Hefen (Sdh1, 2, 3, 4 anstatt SDHA, B, C, D) verwendet.

Die Untereinheiten der SDH werden nach Transkription und Translation im Zytosol durch TOM- und TIM-Translocasen durch die innere und äußere Mitochondrienmembran transportiert (Sharma et al., 2019). Sdh1 liegt zu diesem Zeitpunkt als Apoprotein vor und

durchläuft einen Reifungsprozess. Zunächst wird der für die Funktion der katalytischen Domäne benötigte Co-Faktor FAD in Apo-Sdh1 integriert (Robinson et al., 1994). Die Bereitstellung von FAD in den Mitochondrien in Hefen erfolgt über drei Proteine: Riboflavin-Kinase (Fmn1), FAD-Synthetase (Fad1) und Flx1, wobei letzteres vermutlich als FAD-Transporter dient, die Funktion jedoch nicht vollständig verstanden ist (Van Vranken et al., 2015). Die Inkorporation von FAD in Sdh1 erfolgt mittels des Proteins Sdh5 (dem humanen SDHAF2 homolog), welches dafür sowohl essentiell notwendig, als auch alleinig ausreichend ist (Hao et al. 2009). Den nächsten Schritt im Laufe des Reifungsprozesses der Untereinheit Sdh1 stellt die Interaktion mit dem Faktor Sdh8 (dem humanen SDHAF4 homolog) dar. Bei diesem handelt es sich um ein Chaperon-ähnliches Protein, das einerseits die Dimerisierung von Sdh1 und Sdh2 zur löslichen Domäne des Sdh-Komplexes unterstützt (Belt et al., 2018) andererseits jedoch auch verhindert, dass unerwünschte Reaktionen am flavinylierten Sdh1 stattfinden, bei denen reaktive Sauerstoffspezies entstehen (Van Vranken et al., 2014). Neben dem Sdh1/Sdh2-Dimer liegt immer auch ein gewisser Anteil des Sdh1 ungebunden vor. Dieses wird durch Sdh8 in einem Zustand gehalten, in welchem es Sdh2 binden kann (Van Vranken et al., 2015). Demnach könnte das verstärkte SDHA-Signal am dendritischen Pol der Purkinje-Zellen nicht nur durch eine größere Menge des funktionalen SDH-Komplexes, sondern auch durch eine größere Menge der nicht alleine funktionsfähigen Untereinheit SDHA zustande kommen. Eine Differenzierung zwischen diesen beiden Möglichkeiten ist mit den für diese Arbeit verwendeten Methoden nicht möglich, wäre aber funktionell für die oxidative Phosphorylierung von großer Bedeutung.

Parallel findet der Import der beiden Untereinheiten Sdh3 und Sdh4 in die innere Mitochondrienmembran statt, wo sie ebenfalls einen Heterodimer bilden. Dazu werden auch sie durch Tom- und Tim-Komplexe transportiert; interessanterweise gehört Sdh3 selbst auch zu den Bestandteilen des Tim22-Komplexes (Dudek et al., 2013). Die Zusammenlagerung der Untereinheiten Sdh3 und Sdh4 ist abhängig von der Gegenwart des Dimers Sdh1/Sdh2 und somit funktionell mit dessen Entstehung verknüpft (Van Vranken et al., 2015). Schließlich lagern sich die beiden Dimere auf nicht näher bekannte Weise zusammen und bilden den vollständigen Sdh-Komplex.

Alternativ zu diesem Ablauf wurde kürzlich ein weiterer Modus des Zusammenbaus der SDH beschrieben. Der von Bezawork-Geleta et al. 2018 beschriebene Komplex CII<sub>low</sub> setzt sich aus den Bestandteilen SDHA, SDHAF2 und SDHAF4 zusammen und scheint unter Stressbedingungen vermehrt zu entstehen. Dieser wiederum beeinflusst den Energiestoffwechsel und den Zellzyklus, sodass angenommen wird, dass er das Zellüberleben unter metabolischem Stress unterstützt. Der CII<sub>low</sub>-Komplex findet sich auch vermehrt in menschlichem Paragangliomgewebe. Diese Funde eröffnen die Möglichkeit, dass es sich bei der verstärkten dendritisch lokalisierten SDHA-Expression in L7En-2-Purkinje-Zellen um in CII<sub>low</sub> gebundenes SDHA handelt, welches möglicherweise einen Hinweis für metabolischen Stress in diesen Zellen darstellen könnte.

Die Regulation des Energiestoffwechsels und des Zellzyklus durch CII<sub>low</sub> stellt ein Beispiel für retrograde Signalübertragung von den Mitochondrien zum Zellkern dar. In Hsu et al. (2016) finden sich weitere Beispiele dafür, wie die Dysregulation mitochondrialer Enzyme (u.a. auch der SDH) zelluläre Signalwege beeinflussen kann. Diese können durch reaktive Sauerstoffspezies, Calcium oder Onkometabolite wie Succinat oder Fumarat angestoßen werden. Ein Signalweg, welchen die Autoren beschreiben, beinhaltet den Hypoxie-induzierten Faktor HIF1A, der durch die oben genannten Onkometabolite stabilisiert wird und selbst durch Regulation des Energiestoffwechsels - beispielsweise der Umstellung der Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung auf die durch Glykolyse – das Überleben von Zellen unter Energieknappheit unterstützt. Dies spielt nicht zuletzt auch bei der Entstehung und Progression zahlreicher Tumorentitäten eine Rolle.

#### 4.6 Folgen atypisch verteilter Mitochondrien und einer veränderten mitochondrialen Aktivität auf die neuronale Funktion

Neben der Bereitstellung von ATP über die Reaktionen der Atmungskette übernehmen Mitochondrien in Nervenzellen vielfältige Aufgaben. Sie sind maßgeblich an der Verstoffwechslung reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt, nehmen an der Calcium-Homöostase teil und spielen eine bedeutende Rolle beim programmierten Zelltod, der Apoptose (Cheng et al., 2010). Zudem sind Mitochondrien keine starren Organellen, sondern befinden sich dauernd in Bewegung (Dukes et al. 2016) und ihr Volumen dauernd im Umsatz. So finden

ständig Teilungs- und Verschmelzungsvorgänge statt, die auch den Zweck erfüllen, sicherzustellen, dass sich stets genügend intakte Mitochondrien in Zellregionen mit erhöhtem Energiebedarf befinden (Twig et al., 2008).

Die mitochondriale Verteilung und Aktivität hat Einfluss auf zahlreiche Vorgänge bei der neuronalen Entwicklung und Funktion. Steigt die mitochondriale Fusion, wird vermehrt Calcium in Mitochondrien aufgenommen und neuronale Differenzierung kann stattfinden (Voccoli und Colombaioni 2009). Neuronale Differenzierung ist eng mit dem Auswachsen von Fortsätzen verbunden. Insofern ist es nicht verwunderlich, dass die Axogenese von mitochondrialen Bewegungsdynamiken abhängig ist: In dem Fortsatz einer Nervenzelle, welcher sich zum Axon entwickelt, findet sich zu Beginn und im Verlauf seiner Entwicklung eine erhöhte Mitochondrien-Konzentration (Ruthel und Hollenbeck, 2003). In einem experimentellen Ansatz, in dem die Mitochondriendichte durch Behandlung von Neuronen mit Ethidiumbromid verringert, die ATP-Versorgung jedoch aufrechterhalten wurde, war die Axogenese eingeschränkt (Mattson und Partin, 1999). Die Autoren gehen davon aus, dass die Mitochondrien durch ihre Funktion als Calcium-Reservoir die Polymerisation der Mikrotubuli unterstützen, und damit Transport antero- und retrograd steuern. Analog könnte in En-2-transgenen Tieren die Delokalisation von Mitochondrien die Axo- und Dendritogenese verändern. In L7En-2 Purkinje-Zellen konnte tatsächlich gezeigt werden, dass der infraganglionäre Plexus, der sich aus Axonkollateralen der Purkinje-Zellen zusammensetzt, komplexer ist als in Wildtyp-Purkinje-Zellen, die Dendriten aber weniger stark ausgeprägt sind (Liebig, 2007).

Jedoch ist der Einfluss der Mitochondrien auf neuronale Entwicklung und Plastizität nicht auf das Axon beschränkt; auch für einen Zusammenhang mit der dendritischen Entwicklung finden sich Hinweise. So konnten Li et al. (2004) demonstrieren, dass in kultivierten hippocampalen Neuronen, bei denen durch molekulare Manipulation der GTPase DRP1 die mitochondriale Masse in Dendriten verringert wurde, ein Verlust von dendritischen Synapsen und Spines resultierte. Andererseits beeinflusste auch die synaptische Plastizität von sich aus wiederum den mitochondrialen Umsatz und Transport, sodass an dieser Stelle sehr anschaulich die wechselseitige Verzahnung dieser Vorgänge illustriert wird. Nicht nur die Anzahl der Synapsen und Spines scheint mit von Mitochondrien vermittelten Mechanismen zusammenzuhängen, sondern auch die synaptische Aktivität: Nach der

Blockade mitochondrialer Porenproteine wiesen Levy et al. (2003) eine erhöhte basale synaptische Transmissionsrate und verringerte synaptische Plastizität in hippocampalen Neuronen nach. Auch postulierten Billups und Forsythe (2002) einen Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Calcium-Aufnahme und einer schnelleren präsynaptischen Regeneration nach synaptischer Aktivität. Interessanterweise ist außerdem bekannt, dass Mitochondrien durch die Aktivierung der Caspase-3, einem Mediator der Apoptose, die Dichte von postsynaptischen Neurotransmitter-Rezeptoren vermindern und damit auf den Prozess der Langzeitpotenzierung, dem eine zentrale Rolle bei Lernen und Gedächtnisbildung zugeschrieben wird, Einfluss nehmen kann (Li et al., 2010). Überhaupt scheint das lokale Durchlaufen von Bestandteilen der Apoptosekaskaden einer Rolle bei synaptischer Plastizität zu spielen (Mattson et al, 2008). Im Übrigen nehmen auch reaktive Sauerstoffspezies bei diesen Prozessen eine Rolle als Signalmoleküle ein (Kishida und Klann, 2007).

## 5. Zusammenfassung

Das Homöodomainprotein Engrailed-2 spielt eine wichtige Rolle in Kompartimentierungsprozessen der Mittelhirn-/Nachhirnregion und des Kleinhirns, der Neurogenese und neuronalen Differenzierung sowie der axonalen Wegfindung und kann das Überleben mensencephaler dopaminergere Neurone regulieren. Engrailed-2-transgene Mausmutanten zeigen Verhaltensauffälligkeiten, die sich als Autismus-ähnlicher Phänotyp interpretieren lassen. Auch beim Menschen sind genetische Variationen des Engrailed-2-Gens mit autistischem Verhalten assoziiert worden. Durch Expressions-Analysen wurde gezeigt, dass ein mögliches Ziel einer veränderten Genexpression durch Engrailed-2 Mitochondrien sein könnten. Obwohl es viele funktionelle Überschneidungen zwischen Engrailed-2 und Mitochondrien in Neurogenese und neuronalem Überleben gibt, und Mitochondrien in der Pathophysiologie zahlreicher neuropsychiatrischer Erkrankungen eine Rolle spielen, wurden die Folgen einer veränderten Engrailed-2-Expression auf die mitochondriale Verteilung und Morphologie bisher nicht untersucht. Daher sollte in dieser Arbeit in Purkinje-Zellen einer Engrailed-2-überexprimierenden und einer Engrailed-2-Knockout-Maus die Verteilung und Morphologie der Mitochondrien charakterisiert werden.

In immunhistochemischen Färbungen der Untereinheit A des mitochondrialen Enzyms Succinatdehydrogenase zeigte sich in den Engrailed-2-transgenen Tieren ein vermindertes Intensitätsverhältnis zwischen axonalem und dendritischem Zellpol. In cerebellären Schnittkulturen konnte diese differente Verteilung nicht nachgewiesen werden. Bei morphometrischen Untersuchungen aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen waren keine Unterschiede in der mitochondrialen Anzahl, Dichte, Fläche oder dem Durchmesser im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar. Engrailed scheint folglich nicht die Morphologie der Mitochondrien oder deren Lage zu verändern, sondern eher die Expression oder den Transport von mitochondrialen Proteinen über die Mitochondrienmembran zu steuern.

Über welche Mechanismen diese Steuerung stattfindet ist bisher nicht bekannt. Da in cerebellären Schnittkulturen keine Veränderungen in der zellulären Verteilung der Mitochondrien nachgewiesen werden konnten, ist von einem nicht-intrinsischen Effekt auszugehen. Diese Arbeit zeigt, dass Mitochondrien mögliche Zielstrukturen von Engrailed Proteinen sind. Dieses Ergebnis kann einen möglichen Hinweis darauf geben, über welchen

Mechanismus die in Engrailed-überexprimierenden Purkinje-Zellen beobachtete früh postnatale Entwicklungsverzögerung zu Stande kommen könnte.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau und Verschaltung des Kleinhirnkortex.	21
Abbildung 2: Genotypisierung L7En-transgener Mäuse mittels PCR und Gelelektrophorese.	42
Abbildung 3: Genotypisierung En-2 <sup>-/-</sup> -transgener Mäuse mittels PCR und Gelelektrophorese.	44
Abbildung 4: Immunhistochemische Färbung von Mitochondrien im Kleinhirnkortex	58
Abbildung 5: Etablierung der immunhistochemischen SDHA-Färbung.	59
Abbildung 6: Analyse des mitochondrialen Signals in Purkinje-Zellen sieben Tage alter Mäuse.	62
Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung der Mitochondrien in Purkinje-Zellen bei P3, P7 und adulten Wildtyp- und L7En-2-transgenen Mäusen.	63
Abbildung 8: SDHA-Intensitätsverhältnisse des axonalen zum dendritischen Zellpol der Purkinje-Zellen aus Wildtyp- und L7En-2-transgenen Tieren.	66
Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung der Mitochondrien in Purkinje-Zellen bei P3 (oben), P7 (Mitte) und adulten (unten) Wildtyp- und En-2 <sup>-/-</sup> -Mäusen.	68
Abbildung 10: SDHA-Intensitätsverhältnisse des axonalen zum dendritischen Zellpol der Purkinje-Zellen aus Wildtyp- und En-2 <sup>-/-</sup> -Tieren.	70
Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung der Mitochondrien in Purkinje-Zellen in cerebellären Schnittkulturen aus Wildtyp- und L7En-2-transgenen Mäusen.	72



Abbildung 12: SDHA-Intensitätsverhältnisse des axonalen zum dendritischen Zellpol der Purkinje-Zellen aus Schnittkulturen Wildtyp- und L7En-2-transgener Tiere.	73
Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien in Purkinje-Zellen.	75
Abbildung 14: Morphometrie an Mitochondrien in elektronenmikroskopischen Aufnahmen.	75
Abbildung 15: Mittelwerte der Fläche und des Durchmessers einzelner Mitochondrien in Wildtyp- und L7En-2-Purkinje-Zellen.	77
Abbildung 16: Verteilung der Dichte mitochondrialer Anschnitte pro zytoplasmatischer Flächeneinheit am axonalen und dendritischen Zellpol.	79
Abbildung 17: Mittelwerte der mitochondrialen Fläche pro zytoplasmatischer Flächeneinheit am axonalen und dendritischen Zellpol.	80
Abbildung 18: Verteilung der pro Purkinje-Zelle gemittelten Fläche mitochondrialer Anschnitte am axonalen und dendritischen Zellpol.	81
Abbildung 19: Verteilung des pro Purkinje-Zelle gemittelten Durchmessers mitochondrialer Anschnitte.	82
Abbildung 20: SDHA-Western Blot-Analyse an cerebellären Gewebsextrakten aus sieben Tage alten Wildtyp- und L7En-2-transgenen Mäusen.	84

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.	32
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.	33
Tabelle 3: Verwendete Lösungen.	35
Tabelle 4: Verwendete Antikörper.	38

## 8. Literaturverzeichnis

Adusumilli VS, Walker TL, Overall RW, Klatt GM, Zeidan SA, Zocher S, Kirova DG, Ntitsias K, Fischer TJ, Sykes AM, Reinhardt S, Dahl A, Mansfeld J, Rünker AE, Kempermann G. ROS Dynamics Delineate Functional States of Hippocampal Neural Stem Cells and Link to Their Activity-Dependent Exit from Quiescence. *Cell stem cell* 2021; 28: 300-314

Agostini M, Romeo F, Inoue S, Niklison-Chirou MV, Elia AJ, Dinsdale D, Morone N, Knight RA, Mak TW, Melino G. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell Death Differ* 2016; 23: 1502–1514

Ahn AH, Dziennis S, Hawkes R, Herrup K. The cloning of zebrin II reveals its identity with aldolase C. *Development* 1994; 120: 2081–2090

Alavian KN, Sgadò P, Alberi L, Subramaniam S, Simon HH. Elevated P75NTR expression causes death of engrailed-deficient midbrain dopaminergic neurons by Erk1/2 suppression. *Neural Dev* 2009; 4: 11

Albéri L, Sgadò P, Simon HH. Engrailed genes are cell-autonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons. *Development* 2004; 131: 3229–3236

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, Bayer SA. *Development of the cerebellar system: in relation to its evolution, structure, and functions*. Boca Raton: CRC Press, 1997

Alvarez-Fischer D, Fuchs J, Castagner F, Stettler O, Massiani-Beaudoin O, Moya KL, Bouillot C, Oertel WH, Lombès A, Faigle W, Joshi RL, Hartmann A, Prochiantz A. Engrailed protects mouse midbrain dopaminergic neurons against mitochondrial complex I insults. *Nat Neurosci* 2011; 14: 1260–1266

Amaral DG, Schumann CM, Nordahl CW. Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci* 2008; 31: 137–145

Araki I, Nakamura H. Engrailed defines the position of dorsal di-mesencephalic boundary by repressing diencephalic fate. *Development* 1999; 126: 5127–5135

- Armengol JA, Sotelo C. Early dendritic development of Purkinje cells in the rat cerebellum. A light and electron microscopic study using axonal tracing in 'in vitro' slices. *Brain Res Dev Brain Res* 1991; 64: 95–114
- Baader SL, Sanlioglu S, Berrebi AS, Parker-Thornburg J, Oberdick J. Ectopic Overexpression of Engrailed-2 in Cerebellar Purkinje Cells Causes Restricted Cell Loss and Retarded External Germinal Layer Development at Lobule Junctions. *J Neurosci* 1998; 18: 1763–1773
- Baader SL, Vogel MW, Sanlioglu S, Zhang X, Oberdick J. Selective disruption of "late onset" sagittal banding patterns by ectopic expression of engrailed-2 in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 1999; 19: 5370–5379
- Baliatti M, Giorgetti B, Di Stefano G, Casoli T, Platano D, Solazzi M, Bertoni-Freddari C, Aicardi G, Lattanzio F, Fattoretti P. A ketogenic diet increases succinic dehydrogenase (SDH) activity and recovers age-related decrease in numeric density of SDH-positive mitochondria in cerebellar Purkinje cells of late-adult rats. *Micron* 2010; 41: 143–148
- Bally-Cuif L, Alvarado-Mallart RM, Darnell DK, Wassef M. Relationship between Wnt-1 and En-2 expression domains during early development of normal and ectopic met-mesencephalon. *Development* 1992; 115: 999–1009
- Barrientos SA, Martinez NW, Yoo S, Jara JS, Zamorano S, Hetz C, Twiss JL, Alvarez J, Court FA. Axonal degeneration is mediated by the mitochondrial permeability transition pore. *J Neurosci* 2011; 31: 966–978
- Baysal BE, Jong K de, Liu B, Wang J, Patnaik SK, Wallace PK, Taggart RT. Hypoxia-inducible C-to-U coding RNA editing downregulates SDHB in monocytes. *PeerJ* 2013; 1: e152
- Belt K, van Aken O, Murcha M, Millar AH, Huang S. An Assembly Factor Promotes Assembly of Flavinated SDH1 into the Succinate Dehydrogenase Complex. *Plant Physiol* 2018; 177: 1439–1452
- Benayed R, Choi J, Matteson PG, Gharani N, Kamdar S, Brzustowicz LM, Millonig JH. Autism-associated haplotype affects the regulation of the homeobox gene, ENGRAILED 2. *Biol Psychiatry* 2009; 66: 911–917

- Benayed R, Gharani N, Rossman I, Mancuso V, Lazar G, Kamdar S, Bruse SE, Tischfield S, Smith BJ, Zimmerman RA, DiCicco-Bloom E, Brzustowicz LM, Millonig JH. Support for the Homeobox Transcription Factor Gene ENGRAILED 2 as an Autism Spectrum Disorder Susceptibility Locus. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 851–868
- Bernstein BW, Bamberg JR. Actin-ATP hydrolysis is a major energy drain for neurons. *J Neurosci* 2003; 23: 1–6
- Berry M, Bradley P. The growth of the dendritic trees of Purkinje cells in irradiated agranular cerebellar cortex. *Brain Res* 1976; 116: 361–387
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2000; 3: 1301–1306
- Bezawork-Geleta A, Wen H, Dong L, Yan B, Vider J, Boukalova S, Krobova L, Vanova K, Zabalova R, Sobol M, Hozak P, Novais SM, Caisova V, Abaffy P, Naraine R, Pang Y, Zaw T, Zhang P, Sindelka R, Kubista M, Zuryn S, Molloy MP, Berridge MV, Pacak K, Rohlena J, Park S, Neuzil J. Alternative assembly of respiratory complex II connects energy stress to metabolic checkpoints. *Nat Commun* 2018; 9: 2221
- Billups B, Forsythe ID. Presynaptic mitochondrial calcium sequestration influences transmission at mammalian central synapses. *J Neurosci* 2002; 22: 5840–5847
- Blaudin de Thé F-X, Rekaik H, Peze-Heidsieck E, Massiani-Beaudoin O, Joshi RL, Fuchs J, Prochiantz A. Engrailed homeoprotein blocks degeneration in adult dopaminergic neurons through LINE-1 repression. *EMBO J* 2018; 37: e97374
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MCJ, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003; 299: 256–259
- Brielmaier J, Senerth JM, Silverman JL, Matteson PG, Millonig JH, DiCicco-Bloom E, Crawley JN. Chronic desipramine treatment rescues depression-related, social and cognitive deficits in Engrailed-2 knockout mice. *Genes Brain Behav* 2014; 13: 286–298

- Briellmaier J, Matteson PG, Silverman JL, Senerth JM, Kelly S, Genestine M, Millonig JH, DiCicco-Bloom E, Crawley JN. Autism-relevant social abnormalities and cognitive deficits in engrailed-2 knockout mice. *PLoS one* 2012; 7: e40914
- Brunet I, Weinl C, Piper M, Trembleau A, Volovitch M, Harris W, Prochiantz A, Holt C. The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* 2005; 438: 94–98
- Büttiker P, Weissenberger S, Esch T, Anders M, Raboch J, Ptacek R, Kream RM, Stefano GB. Dysfunctional mitochondrial processes contribute to energy perturbations in the brain and neuropsychiatric symptoms. *Front Pharmacol* 2023; 13: 1095923
- Bundesministerium der Justiz, 2023: Tierschutzgesetz. <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html> (Zugriffsdatum: 28.07.2023)
- Carlier M-F. Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Adv Biophys* 1990; 26: 51–73
- Carratala-Marco F, Andreo-Lillo P, Martinez-Morga M, Escamez-Martínez T, Botella-López A, Bueno C, Martinez S. Clinical Phenotypes Associated to Engrailed 2 Gene Alterations in a Series of Neuropediatric Patients. *Front Neuroanat* 2018; 12: 61
- Cecchini G. Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu Rev Biochem* 2003; 72: 77–109
- Cereghino GP, Atencio DP, Saghbini M, Beiner J, Scheffler IE. Glucose-dependent turnover of the mRNAs encoding succinate dehydrogenase peptides in *Saccharomyces cerevisiae*: sequence elements in the 5' untranslated region of the *Ip* mRNA play a dominant role. *Mol Biol Cell* 1995; 6: 1125–1143
- Chang DTW, Honick AS, Reynolds IJ. Mitochondrial trafficking to synapses in cultured primary cortical neurons. *J Neurosci* 2006; 26: 7035–7045
- Chatterjee D, Sanchez DS, Quansah E, Rey NL, George S, Becker K, Madaj Z, Steiner JA, Ma J, Escobar Galvis ML, Kordower JH, Brundin P. Loss of One Engrailed1 Allele Enhances Induced  $\alpha$ -Synucleinopathy. *J Parkinsons Dis* 2019; 9: 315–326
- Chedotal A, Sotelo C. The 'creeper stage' in cerebellar climbing fiber synaptogenesis precedes the 'pericellular nest'--ultrastructural evidence with parvalbumin immunocytochemistry. *Brain Res Dev Brain Res* 1993; 76: 207–220

- Cheh MA, Millonig JH, Roselli LM, Ming X, Jacobsen E, Kamdar S, Wagner GC. En2 knockout mice display neurobehavioral and neurochemical alterations relevant to autism spectrum disorder. *Brain Res* 2006; 1116: 166–176
- Cheng A, Hou Y, Mattson MP. Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro* 2010; 2: 243–256
- Choi J, Ababon MR, Matteson PG, Millonig JH. Cut-like homeobox 1 and nuclear factor I/B mediate ENGRAILED2 autism spectrum disorder-associated haplotype function. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 1566–1580
- Chugani DC, Muzik O, Behen M, Rothermel R, Janisse JJ, Lee J, Chugani HT. Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children. *Ann Neurol* 1999; 45: 287–295
- Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* 1996; 271: 18188–18193
- Desclin JC. Histological evidence supporting the inferior olive as the major source of cerebellar climbing fibers in the rat. *Brain Res* 1974; 77: 365–384
- Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 870–879
- Dubnau J, Struhl G. RNA recognition and translational regulation by a homeodomain protein. *Nature* 1996; 379: 694–699
- Dudek J, Rehling P, van der Laan M. Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833: 274–285
- Dukes AA, Bai Q, van Laar VS, Zhou Y, Ilin V, David CN, Agim ZS, Bonkowsky JL, Cannon JR, Watkins SC, Croix CMS, Burton EA, Berman SB. Live imaging of mitochondrial dynamics in CNS dopaminergic neurons in vivo demonstrates early reversal of mitochondrial transport following MPP(+) exposure. *Neurobiol Dis* 2016; 95: 238–249
- Dupont E, Prochiantz A, Joliot A. Identification of a signal peptide for unconventional secretion. *J Biol Chem* 2007; 282: 8994–9000

- Ekstrand MI, Terzioglu M, Galter D, Zhu S, Hofstetter C, Lindqvist E, Thams S, Bergstrand A, Hansson FS, Trifunovic A, Hoffer B, Cullheim S, Mohammed AH, Olson L, Larsson NG. Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 1325–1330
- Enderlin S, Norman AW, Celio MR. Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl)* 1987; 177: 15–28
- Erecinska M, Cherian S, Silver IA. Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog Neurobiol* 2004; 73: 397–445
- Essa MM, Braidy N, Waly MI, Al-Farsi YM, Al-Sharbaty M, Subash S, Amanat A, Al-Shaffaee MA, Guillemin GJ. Impaired antioxidant status and reduced energy metabolism in autistic children. *Res Autism Spectr Disord* 2013; 7: 557–565
- Fizíková I, Dragašek J, Račay P. Mitochondrial Dysfunction, Altered Mitochondrial Oxygen, and Energy Metabolism Associated with the Pathogenesis of Schizophrenia. *Int J Mol Sci* 2023; 24:7991
- Friedman GC, O'Leary DD. Retroviral misexpression of engrailed genes in the chick optic tectum perturbs the topographic targeting of retinal axons. *J Neurosci* 1996; 16: 5498–5509
- Fuchs J, Stettler O, Alvarez-Fischer D, Prochiantz A, Moya KL, Joshi RL. Engrailed signaling in axon guidance and neuron survival. *Eur J Neurosci* 2012; 35: 1837–1845
- Galmozzi A, Mitro N, Ferrari A, Gers E, Gilardi F, Godio C, Cermenati G, Gualerzi A, Donetti E, Rotili D, Valente S, Guerrini U, Caruso D, Mai A, Saez E, Fabiani E de, Crestani M. Inhibition of class I histone deacetylases unveils a mitochondrial signature and enhances oxidative metabolism in skeletal muscle and adipose tissue. *Diabetes* 2013; 62: 732–742
- Gandhi S, Muqit MMK, Stanyer L, Healy DG, Abou-Sleiman PM, Hargreaves I, Heales S, Ganguly M, Parsons L, Lees AJ, Latchman DS, Holton JL, Wood NW, Revesz T. PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain* 2006; 129: 1720–1731
- Garcia-Bellido A, Santamaria P. Developmental analysis of the wing disc in the mutant engrailed of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1972; 72: 87–104



- Gemel J, Jacobsen C, MacArthur CA. Fibroblast growth factor-8 expression is regulated by intronic engrailed and Pbx1-binding sites. *J Biol Chem* 1999; 274: 6020–6026
- Gharani N, Benayed R, Mancuso V, Brzustowicz LM, Millonig JH. Association of the homeobox transcription factor, ENGRAILED 2, 3, with autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 474–484
- Gherbassi D, Simon HH. The engrailed transcription factors and the mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neural Transm Suppl* 2006: 47–55
- Gu F, Chauhan V, Kaur K, Brown WT, LaFauci G, Wegiel J, Chauhan A. Alterations in mitochondrial DNA copy number and the activities of electron transport chain complexes and pyruvate dehydrogenase in the frontal cortex from subjects with autism. *Transl Psychiatry* 2013; 3: e299
- Guevara-Campos J, González-Guevara L, Puig-Alcaraz C, Cauli O. Autism spectrum disorders associated to a deficiency of the enzymes of the mitochondrial respiratory chain. *Metab Brain Dis* 2013; 28: 605–612
- Han SM, Baig HS, Hammarlund M. Mitochondria Localize to Injured Axons to Support Regeneration. *Neuron* 2016; 92: 1308–1323
- Hanks M, Wurst W, Anson-Cartwright L, Auerbach AB, Joyner AL. Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2. *Science* 1995; 269: 679–682
- Hantraye P, Brouillet E, Ferrante R, Palfi S, Dolan R, Matthews RT, Beal MF. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. *Nat Med* 1996; 2: 1017–1021
- Hao H-X, Khalimonchuk O, Schraders M, Dephoure N, Bayley J-P, Kunst H, Devilee P, Cremers, Cor W R J, Schiffman JD, Bentz BG, Gygi SP, Winge DR, Kremer H, Rutter J. SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science* 2009; 325: 1139–1142
- Hawkes R, Gravel C. The modular cerebellum. *Prog Neurobiol* 1991; 36: 309–327
- Hayn-Leichsenring G, Liebig C, Miething A, Schulz A, Kumar S, Schwalbe M, Eiberger B, Baader SL. Cellular distribution of metastasis suppressor 1 and the shape of cell bodies

are temporarily altered in Engrailed-2 overexpressing cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience* 2011; 189: 68–78

Hazlett HC, Gu H, Munsell BC, Kim SH, Styner M, Wolff JJ, Elison JT, Swanson MR, Zhu H, Botteron KN, Collins DL, Constantino JN, Dager SR, Estes AM, Evans AC, Fonov VS, Gerig G, Kostopoulos P, McKinstry RC, Pandey J, Paterson S, Pruett JR, Schultz RT, Shaw DW, Zwaigenbaum L, Piven J. Early brain development in infants at high risk for autism spectrum disorder. *Nature* 2017; 542: 348–351

Hirokawa N, Sato-Yoshitake R, Kobayashi N, Pfister KK, Bloom GS, Brady ST. Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo. *J Cell Biol* 1991; 114: 295–302

Hnoonual A, Sripo T, Limprasert P. Whole-exome sequencing identifies a novel heterozygous missense variant of the EN2 gene in two unrelated patients with autism spectrum disorder. *Psychiatr Genet* 2016; 26: 297–301

Höglinger GU, Carrard G, Michel PP, Medja F, Lombès A, Ruberg M, Friguet B, Hirsch EC. Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2003; 86: 1297–1307

Holst MI, Maercker C, Pintea B, Masseroli M, Liebig C, Jankowski J, Miething A, Martini J, Schwaller B, Oberdick J, Schilling K, Baader SL. Engrailed-2 regulates genes related to vesicle formation and transport in cerebellar Purkinje cells. *Mol Cell Neurosci* 2008; 38: 495–504

Homem CCF, Steinmann V, Burkard TR, Jais A, Esterbauer H, Knoblich JA. Ecdysone and mediator change energy metabolism to terminate proliferation in *Drosophila* neural stem cells. *Cell* 2014; 158: 874–888

Hsu C-C, Tseng L-M, Lee H-C. Role of mitochondrial dysfunction in cancer progression. *Exp Biol Med (Maywood)* 2016; 241: 1281–1295

Inouye M, Murakami U. Temporal and spatial patterns of Purkinje cell formation in the mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 1980; 194: 499–503

Iwata R, Casimir P, Vanderhaeghen P. Mitochondrial dynamics in postmitotic cells regulate neurogenesis. *Science* 2020; 369: 858–862

Iwata R, Vanderhaeghen P. Regulatory roles of mitochondria and metabolism in neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 2021; 69: 231–240

Iwata R, Casimir P, Erkol E, Boubakar L, Planque M, Gallego López IM, Ditekowska M, Gaspariunaite V, Beckers S, Remans D, Vints K, Vandekerke A, Poovathingal S, Bird M, Vlaeminck I, Creemers E, Wierda K, Corthout N, Vermeersch P, Carpentier S, Davie K, Mazzone M, Gounko NV, Aerts S, Ghesquière B, Fendt S-M, Vanderhaeghen P. Mitochondria metabolism sets the species-specific tempo of neuronal development. *Science* 2023; 379: eabn4705

James SJ, Shpyleva S, Melnyk S, Pavliv O, Pogribny IP. Complex epigenetic regulation of engrailed-2 (EN-2) homeobox gene in the autism cerebellum. *Transl Psychiatry* 2013; 3: e232

Jande SS, Tolnai S, Lawson DE. Immunohistochemical localization of vitamin D-dependent calcium-binding protein in duodenum, kidney, uterus and cerebellum of chickens. *Histochemistry* 1981; 71: 99–116

Janickova L, Rechberger KF, Wey L, Schwaller B. Absence of parvalbumin increases mitochondria volume and branching of dendrites in inhibitory Pvalb neurons in vivo: a point of convergence of autism spectrum disorder (ASD) risk gene phenotypes. *Mol Autism* 2020; 11: 47

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

Jayaraman D, Bae B-I, Walsh CA. The Genetics of Primary Microcephaly. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2018; 19: 177–200

Journiac N, Gilabert-Juan J, Cipriani S, Benit P, Liu X, Jacquier S, Faivre V, Delahaye-Duriez A, Csaba Z, Hourcade T, Melinte E, Lebon S, Violle-Poirsier C, Oury J-F, Adle-Biassette H, Wang Z-Q, Mani S, Rustin P, Gressens P, Nardelli J. Cell Metabolic Alterations due to Mcph1 Mutation in Microcephaly. *Cell Rep* 2020; 31: 107506

Joyner AL, Herrup K, Auerbach BA, Davis CA, Rossant J. Subtle cerebellar phenotype in mice homozygous for a targeted deletion of the En-2 homeobox. *Science* 1991; 251: 1239–1243

Kapfhammer JP. Cellular and molecular control of dendritic growth and development of cerebellar Purkinje cells. *Prog Histochem Cytochem* 2004; 39: 131–182

Ketschek A, Gallo G. Nerve growth factor induces axonal filopodia through localized microdomains of phosphoinositide 3-kinase activity that drive the formation of cytoskeletal precursors to filopodia. *J Neurosci* 2010; 30: 12185–12197

Khacho M, Clark A, Svoboda DS, Azzi J, MacLaurin JG, Meghaizel C, Sesaki H, Lagace DC, Germain M, Harper M-E, Park DS, Slack RS. Mitochondrial Dynamics Impacts Stem Cell Identity and Fate Decisions by Regulating a Nuclear Transcriptional Program. *Cell stem cell* 2016; 19: 232–247

Kishida KT, Klann E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 233–244

Knobloch M, Pilz G-A, Ghesquière B, Kovacs WJ, Wegleiter T, Moore DL, Hruzova M, Zamboni N, Carmeliet P, Jessberger S. A Fatty Acid Oxidation-Dependent Metabolic Shift Regulates Adult Neural Stem Cell Activity. *Cell Rep* 2017; 20: 2144–2155

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007; 87: 99–163

Landis SC. Ultrastructural changes in the mitochondria of cerebellar Purkinje cells of nervous mutant mice. *J Cell Biol* 1973; 57: 782–797

Legué E, Gottshall JL, Jaumouillé E, Roselló-Díez A, Shi W, Barraza LH, Washington S, Grant RL, Joyner AL. Differential timing of granule cell production during cerebellum development underlies generation of the foliation pattern. *Neural Dev* 2016; 11: 17

Levy M, Faas GC, Saggau P, Craigen WJ, Sweatt JD. Mitochondrial regulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem* 2003; 278: 17727–17734

Li Z, Jo J, Jia J-M, Lo S-C, Whitcomb DJ, Jiao S, Cho K, Sheng M. Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. *Cell* 2010; 141: 859–871

- Li Z, Okamoto K-I, Hayashi Y, Sheng M. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 2004; 119: 873–887
- Liebig C. Untersuchungen zur Differenzierung von cerebellären Purkinjezellen nach Überexpression des Transkriptionsfaktors Engrailed-2. Dissertationsschrift aus der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (2007)
- Lin M-Y, Sheng Z-H. Regulation of mitochondrial transport in neurons. *Exp Cell Res* 2015; 334: 35–44
- Liu A, Joyner AL. EN and GBX2 play essential roles downstream of FGF8 in patterning the mouse mid/hindbrain region. *Development* 2001; 128: 181–191
- Liu QA, Shio H. Mitochondrial morphogenesis, dendrite development, and synapse formation in cerebellum require both Bcl-w and the glutamate receptor delta2. *PLoS Genet* 2008; 4: e1000097
- Lobanov SA, Danilov AV, Danilov EV, Asaeva SK, Arslanova GF. Morphofunctional changes in mitochondria during stress. *Bull Exp Biol Med* 2007; 144: 849–852
- Logan C, Hanks MC, Noble-Topham S, Nallainathan D, Provart NJ, Joyner AL. Cloning and sequence comparison of the mouse, human, and chicken engrailed genes reveal potential functional domains and regulatory regions. *Dev Genet* 1992; 13: 345–358
- Logan C, Wizenmann A, Drescher U, Monschau B, Bonhoeffer F, Lumsden A. Rostral optic tectum acquires caudal characteristics following ectopic Engrailed expression. *Curr Biol* 1996; 6: 1006–1014
- Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27: 441–464
- Macaskill AF, Rinholm JE, Twelvetrees AE, Arancibia-Carcamo IL, Muir J, Fransson A, Aspenstrom P, Attwell D, Kittler JT. Miro1 is a calcium sensor for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses. *Neuron* 2009; 61: 541–555
- Macaskill AF, Kittler JT. Control of mitochondrial transport and localization in neurons. *Trends Cell Biol* 2010; 20: 102–112

- Maizel A, Bensaude O, Prochiantz A, Joliot A. A short region of its homeodomain is necessary for engrailed nuclear export and secretion. *Development* 1999; 126: 3183–3190
- Martinez S, Wassef M, Alvarado-Mallart RM. Induction of a mesencephalic phenotype in the 2-day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene *en*. *Neuron* 1991; 6: 971–981
- Mason CA, Gregory E. Postnatal maturation of cerebellar mossy and climbing fibers: transient expression of dual features on single axons. *J Neurosci* 1984; 4: 1715–1735
- Mattson MP, Partin J. Evidence for mitochondrial control of neuronal polarity. *J Neurosci Res* 1999; 56: 8–20
- Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in Neuroplasticity and Neurological Disorders. *Neuron* 2008; 60: 748–766
- Mehler MF, Purpura DP. Autism, fever, epigenetics and the locus coeruleus. *Brain Res Rev* 2009; 59: 388–392
- Metruccio MME, Fantappiè L, Serruto D, Muzzi A, Roncarati D, Donati C, Scarlato V, Delany I. The Hfq-dependent small noncoding RNA NrrF directly mediates Fur-dependent positive regulation of succinate dehydrogenase in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 2009; 191: 1330–1342
- Millen KJ, Hui CC, Joyner AL. A role for *En-2* and other murine homologues of *Drosophila* segment polarity genes in regulating positional information in the developing cerebellum. *Development* 1995; 121: 3935–3945
- Millen KJ, Wurst W, Herrup K, Joyner AL. Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse *Engrailed-2* mutants. *Development* 1994; 120: 695–706
- Miller KE, Sheetz MP. Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J Cell Sci* 2004; 117: 2791–2804
- Miotto B, Graba Y. Control of DNA replication: a new facet of Hox proteins?. *Bioessays* 2010; 32: 800–807

- Mitra K, Wunder C, Roysam B, Lin G, Lippincott-Schwartz J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 11960–11965
- Miyazaki T, Yamasaki M, Hashimoto K, Yamazaki M, Abe M, Usui H, Kano M, Sakimura K, Watanabe M. Cav2.1 in cerebellar Purkinje cells regulates competitive excitatory synaptic wiring, cell survival, and cerebellar biochemical compartmentalization. *J Neurosci* 2012; 32: 1311–1328
- Moosavi B, Berry EA, Zhu X-L, Yang W-C, Yang G-F. The assembly of succinate dehydrogenase: a key enzyme in bioenergetics. *Cell Mol Life Sci* 2019; 76: 4023–4042
- Morgan R. Engrailed: complexity and economy of a multi-functional transcription factor. *FEBS Lett* 2006; 580: 2531–2533
- Morris RL, Hollenbeck PJ. The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. *J Cell Sci* 1993; 104: 917–927
- Nedelescu H, Abdelhack M. Comparative morphology of dendritic arbors in populations of Purkinje cells in mouse sulcus and apex. *Neural Plast* 2013; 2013: 948587
- Oberdick J, Schilling K, Smeyne RJ, Corbin JG, Bocchiaro C, Morgan JI. Control of segment-like patterns of gene expression in the mouse cerebellum. *Neuron* 1993; 10: 1007–1018
- O'Brien LC, Keeney PM, Bennett JP. Differentiation of Human Neural Stem Cells into Motor Neurons Stimulates Mitochondrial Biogenesis and Decreases Glycolytic Flux. *Stem Cells Dev* 2015; 24: 1984–1994
- Oscarsson O. Functional units of the cerebellum - sagittal zones and microzones. *Trends Neurosci* 1979; 2: 143–145
- Overly CC, Rieff HI, Hollenbeck PJ. Organelle motility and metabolism in axons vs dendrites of cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci* 1996; 109: 971–980
- Pacelli C, Giguère N, Bourque M-J, Lévesque M, Slack RS, Trudeau L-É. Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Curr Biol* 2015; 25: 2349–2360

- Peltenburg LT, Murre C. Specific residues in the Pbx homeodomain differentially modulate the DNA-binding activity of Hox and Engrailed proteins. *Development* 1997; 124: 1089–1098
- Peng Z, Li X, Fu M, Zhu K, Long L, Zhao X, Chen Q, Deng DYB, Wan Y. Inhibition of Notch1 signaling promotes neuronal differentiation and improves functional recovery in spinal cord injury through suppressing the activation of Ras homolog family member A. *J Neurochem* 2019; 150: 709–722
- Perier C, Tieu K, Guégan C, Caspersen C, Jackson-Lewis V, Carelli V, Martinuzzi A, Hirano M, Przedborski S, Vila M. Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 19126–19131
- Pernas L, Scorrano L. Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu Rev Physiol* 2016; 78: 505–531
- Pézier A, Jezzini SH, Marie B, Blagburn JM. Engrailed alters the specificity of synaptic connections of *Drosophila* auditory neurons with the giant fiber. *J Neurosci* 2014; 34: 11691–11704
- Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* 2001; 292: 504–507
- Piantadosi CA, Suliman HB. Transcriptional Regulation of SDHa flavoprotein by nuclear respiratory factor-1 prevents pseudo-hypoxia in aerobic cardiac cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 10967–10977
- Pickett J, London E. The neuropathology of autism: a review. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 925–935
- Priesnitz C, Becker T. Pathways to balance mitochondrial translation and protein import. *Genes Dev* 2018; 32: 1285–1296
- Prochiantz A, Fuchs J, Di Nardo AA. Postnatal signalling with homeoprotein transcription factors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; 369
- Puisségur M-P, Mazure NM, Bertero T, Pradelli L, Grosso S, Robbe-Sermesant K, Maurin T, Lebrigand K, Cardinaud B, Hofman V, Fourre S, Magnone V, Ricci JE, Pouysségur J,



Gounon P, Hofman P, Barbry P, Mari B. miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell Death Differ* 2011; 18: 465–478

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing 2023

Rampon C, Gauron C, Lin T, Meda F, Dupont E, Cosson A, Ipendey E, Frerot A, Aujard I, Le Saux T, Bensimon D, Jullien L, Volovitch M, Vríz S, Joliot A. Control of brain patterning by Engrailed paracrine transfer: a new function of the Pbx interaction domain. *Development* 2015; 142: 1840–1849

Rekaik H, Blaudin de Thé F-X, Fuchs J, Massiani-Beaudoin O, Prochiantz A, Joshi RL. Engrailed Homeoprotein Protects Mesencephalic Dopaminergic Neurons from Oxidative Stress. *Cell Rep* 2015; 13: 242–250

Ristoratore F, Carl M, Deschet K, Richard-Parpaillon L, Boujard D, Wittbrodt J, Chourrout D, Bourrat F, Joly JS. The midbrain-hindbrain boundary genetic cascade is activated ectopically in the diencephalon in response to the widespread expression of one of its components, the medaka gene *OI-eng2*. *Development* 1999; 126: 3769–3779

Robinson KM, Rothery RA, Weiner JH, Lemire BD. The covalent attachment of FAD to the flavoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase is not necessary for import and assembly into mitochondria. *Eur J Biochem* 1994; 222: 983–990

Rodrigues DC, Harvey EM, Suraj R, Erickson SL, Mohammad L, Ren M, Liu H, He G, Kaplan DR, Ellis J, Yang G. Methylglyoxal couples metabolic and translational control of Notch signalling in mammalian neural stem cells. *Nat Commun* 2020; 11: 2018

Rubin E, Wu X, Zhu T, Cheung JCY, Chen H, Lorincz A, Pandita RK, Sharma GG, Ha HC, Gasson J, Hanakahi LA, Pandita TK, Sukumar S. A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair. *Cancer Res* 2007; 67: 1527–1535

Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, Eliceiri KW. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 2017; 18: 529

Ruthel G, Hollenbeck PJ. Response of mitochondrial traffic to axon determination and differential branch growth. *J Neurosci* 2003; 23: 8618–8624

Sasaki S, Warita H, Murakami T, Abe K, Iwata M. Ultrastructural study of mitochondria in the spinal cord of transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol* 2004; 107: 461–474

Satoh N, Yokoyama C, Itamura N, Miyajima-Nakano Y, Hisatomi H. Alternative splicing isoform in succinate dehydrogenase complex, subunit C causes downregulation of succinate-coenzyme Q oxidoreductase activity in mitochondria. *Oncol Lett* 2015; 9: 330–334

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1990; 54: 823–827

Schapira AH. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1995; 21: 3–9

Schapira AHV. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2008; 7: 97–109

Scholpp S, Brand M. Morpholino-induced knockdown of zebrafish engrailed genes *eng2* and *eng3* reveals redundant and unique functions in midbrain–hindbrain boundary development. *Genesis* 2001; 30: 129–133

Scholpp S, Lohs C, Brand M. Engrailed and *Fgf8* act synergistically to maintain the boundary between diencephalon and mesencephalon. *Development* 2003; 130: 4881–4893

Schwarz LA, Miyamichi K, Gao XJ, Beier KT, Weissbourd B, DeLoach KE, Ren J, Ibanes S, Malenka RC, Kremer EJ, Luo L. Viral-genetic tracing of the input-output organization of a central noradrenaline circuit. *Nature* 2015; 524: 88–92

Sen B, Singh AS, Sinha S, Chatterjee A, Ahmed S, Ghosh S, Usha R. Family-based studies indicate association of Engrailed 2 gene with autism in an Indian population. *Genes Brain Behav* 2010; 9: 248–255

Sharma P, Maklashina E, Cecchini G, Iverson TM. Maturation of the respiratory complex II flavoprotein. *Curr Opin Struct Biol* 2019; 59: 38–46

Shigetani S, Funahashi J, Nakamura H. En-2 regulates the expression of the ligands for Eph type tyrosine kinases in chick embryonic tectum. *Neurosci Res* 1997; 27: 211–217

Silvestri L, Caputo V, Bellacchio E, Atorino L, Dallapiccola B, Valente EM, Casari G. Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 3477–3492

Simon HH, Scholz C, O'Leary DDM. Engrailed genes control developmental fate of serotonergic and noradrenergic neurons in mid- and hindbrain in a gene dose-dependent manner. *Mol Cell Neurosci* 2005; 28: 96–105

Smestad J, Erber L, Chen Y, Maher LJ3. Chromatin Succinylation Correlates with Active Gene Expression and Is Perturbed by Defective TCA Cycle Metabolism. *iScience* 2018; 2: 63–75

Smeyne RJ, Oberdick J, Schilling K, Berrebi AS, Mugnaini E, Morgan JI. Dynamic organization of developing Purkinje cells revealed by transgene expression. *Science* 1991; 254: 719–721

Smith GM, Gallo G. The role of mitochondria in axon development and regeneration. *Dev Neurobiol* 2018; 78: 221–237

Sonnier L, Le Pen G, Hartmann A, Bizot J-C, Trovero F, Krebs M-O, Prochiantz A. Progressive loss of dopaminergic neurons in the ventral midbrain of adult mice heterozygote for *Engrailed1*. *J Neurosci* 2007; 27: 1063–1071

Sotelo C. Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog Neurobiol* 2004; 72: 295–339

Sp N, Kang DY, Kim DH, Lee HG, Park Y-M, Kim IH, Lee HK, Cho B-W, Jang K-J, Yang YM. Methylsulfonylmethane inhibits cortisol-induced stress through p53-mediated SDHA/HPRT1 expression in racehorse skeletal muscle cells: A primary step against exercise stress. *Exp Ther Med* 2020; 19: 214–222

Spatazza J, Di Lullo E, Joliot A, Dupont E, Moya KL, Prochiantz A. Homeoprotein signaling in development, health, and disease: a shaking of dogmas offers challenges and promises from bench to bed. *Pharmacol Rev* 2013; 65: 90–104

Spillane M, Ketschek A, Jones SL, Korobova F, Marsick B, Lanier L, Svitkina T, Gallo G. The actin nucleating Arp2/3 complex contributes to the formation of axonal filopodia and branches through the regulation of actin patch precursors to filopodia. *Dev Neurobiol* 2011; 71: 747–758

Spillane M, Ketschek A, Merianda TT, Twiss JL, Gallo G. Mitochondria coordinate sites of axon branching through localized intra-axonal protein synthesis. *Cell Rep* 2013; 5: 1564–1575

Steketee MB, Moysidis SN, Weinstein JE, Kreymerman A, Silva JP, Iqbal S, Goldberg JL. Mitochondrial dynamics regulate growth cone motility, guidance, and neurite growth rate in perinatal retinal ganglion cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53: 7402–7411

Stettler O, Joshi RL, Wizenmann A, Reingruber J, Holcman D, Bouillot C, Castagner F, Prochiantz A, Moya KL. Engrailed homeoprotein recruits the adenosine A1 receptor to potentiate ephrin A5 function in retinal growth cones. *Development* 2012; 139: 215–224

Sui YV, Donaldson J, Miles L, Babb JS, Castellanos FX, Lazar M. Diffusional kurtosis imaging of the corpus callosum in autism. *Mol Autism* 2018; 9: 62

Sydnor LM, Aldinger KA. Structure, Function, and Genetics of the Cerebellum in Autism. *J Psychiatr Brain Sci* 2022; 7

Taketo M, Schroeder AC, Mobraaten LE, Gunning KB, Hanten G, Fox RR, Roderick TH, Stewart CL, Lilly F, Hansen CT. FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 2065–2069

Tang G, Gutierrez Rios P, Kuo S-H, Akman HO, Rosoklija G, Tanji K, Dwork A, Schon EA, Dimauro S, Goldman J, Sulzer D. Mitochondrial abnormalities in temporal lobe of autistic brain. *Neurobiol Dis* 2013; 54: 349–361

Tolkunova EN, Fujioka M, Kobayashi M, Deka D, Jaynes JB. Two distinct types of repression domain in engrailed: one interacts with the groucho corepressor and is preferentially active on integrated target genes. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 2804–2814

Topisirovic I, Kentsis A, Perez JM, Guzman ML, Jordan CT, Borden KLB. Eukaryotic translation initiation factor 4E activity is modulated by HOXA9 at multiple levels. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1100–1112

- Twig G, Hyde B, Shirihai OS. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1777: 1092–1097
- van den Aamele J, Brand AH. Neural stem cell temporal patterning and brain tumour growth rely on oxidative phosphorylation. *Elife* 2019; 8: e47887
- van Spronsen M, Mikhaylova M, Lipka J, Schlager MA, van den Heuvel DJ, Kuijpers M, Wulf PS, Keijzer N, Demmers J, Kapitein LC, Jaarsma D, Gerritsen HC, Akhmanova A, Hoogenraad CC. TRAK/Milton motor-adaptor proteins steer mitochondrial trafficking to axons and dendrites. *Neuron* 2013; 77: 485–502
- van Vranken JG, Bricker DK, Dephoure N, Gygi SP, Cox JE, Thummel CS, Rutter J. SDHAF4 promotes mitochondrial succinate dehydrogenase activity and prevents neurodegeneration. *Cell Metab* 2014; 20: 241–252
- van Vranken JG, Na U, Winge DR, Rutter J. Protein-mediated assembly of succinate dehydrogenase and its cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2015; 50: 168–180
- Voccoli V, Colombaioni L. Mitochondrial remodeling in differentiating neuroblasts. *Brain Res* 2009; 1252: 15–29
- Vogel MW, Ji Z, Millen K, Joyner AL. The Engrailed-2 homeobox gene and patterning of spinocerebellar mossy fiber afferents. *Brain Res Dev Brain Res* 1996; 96: 210–218
- Voogd J, Broere G, van Rossum J. The medio-lateral distribution of the spinocerebellar projection in the anterior lobe and the simple lobule in the cat and a comparison with some other afferent fibre systems. *Psychiatr Neurol Neurochir* 1969; 72: 137–151
- Whitaker-Azmitia PM. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull* 2001; 56: 479–485
- Wizenmann A, Brunet I, Lam J, Sonnier L, Beurdeley M, Zarbalis K, Weisenhorn-Vogt D, Weinl C, Dwivedy A, Joliot A, Wurst W, Holt C, Prochiantz A. Extracellular Engrailed participates in the topographic guidance of retinal axons in vivo. *Neuron* 2009; 64: 355–366
- Wizenmann A, Stettler O, Moya KL. Engrailed homeoproteins in visual system development. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72: 1433–1445

Wurst W, Auerbach AB, Joyner AL. Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* 1994; 120: 2065–2075

Yao C, Wang R, Wang Y, Kung C, Weber JD, Patti GJ. Mitochondrial fusion supports increased oxidative phosphorylation during cell proliferation. *Elife* 2019, 8: e41351

Ye W, Shimamura K, Rubenstein JL, Hynes MA, Rosenthal A. FGF and Shh Signals Control Dopaminergic and Serotonergic Cell Fate in the Anterior Neural Plate. *Cell* 1998; 93: 755–766

Yirmiya N, Pilowsky T, Nemanov L, Arbelle S, Feinsilver T, Fried I, Ebstein RP. Evidence for an association with the serotonin transporter promoter region polymorphism and autism. *Am J Med Genet* 2001; 105: 381–386

Yokota T, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, Ariga H, Mizusawa H. Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 1342–1348

Zecchini V, Madhu B, Russell R, Pértega-Gomes N, Warren A, Gaude E, Borlido J, Stark R, Ireland-Zecchini H, Rao R, Scott H, Boren J, Massie C, Asim M, Brindle K, Griffiths J, Frezza C, Neal DE, Mills IG. Nuclear ARRB1 induces pseudohypoxia and cellular metabolism reprogramming in prostate cancer. *EMBO J* 2014; 33: 1365–1382

Zhou W, Zhao T, Du J, Ji G, Li X, Ji S, Tian W, Wang X, Hao A. TIGAR promotes neural stem cell differentiation through acetyl-CoA-mediated histone acetylation. *Cell Death Dis* 2019; 10: 198

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben. Zuallererst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Stephan Baader, der sich in jeder Phase meines Projektes tatkräftig und hilfsbereit für mich eingesetzt hat. Ich hatte stets seine Unterstützung, sei es durch Anregungen zur Konzeption der Experimente, durch Diskussion und konstruktiv-kritisches Feedback oder durch Motivation auf meinem Weg als Wissenschaftler. Einen besseren Betreuer hätte ich mir nicht wünschen können!

Ganz herzlich danke ich auch der Arbeitsgruppe Baader, in der ich von Anfang an in einer tollen zwischenmenschlichen Atmosphäre arbeiten und forschen durfte. Besonders hervorzuheben sind hier Stefanie Ramrath und Sabine Molly-Klumbies, von deren großem Erfahrungsschatz ich im Labor sehr profitiert habe. Mein Dank gilt weiterhin Prof. Dr. med. Karl Schilling und allen weiteren Mitarbeitenden des Anatomischen Institutes für die herzliche Aufnahme ins Team.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich von Herzen für ihre Ruhe, Geduld und ihr Durchhaltevermögen dabei, mich während dieser langen Zeit immer wieder zu ermutigen und zu unterstützen.

Ich danke Christa Buchholz-Oelmeier und Johannes Buchholz für die Durchsicht der Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung des Projektes danke ich dem Bonner Promotionskolleg „Neuroimmunology“ sowie der Studienstiftung des deutschen Volkes für die Förderung meines Studiums.