

Die Expression des Proteins TNIP1 während der Kleinhirnentwicklung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Michael Spoelgen

aus Düren

2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Stephan L. Baader
2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Matthias Eckhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Januar 2026

Aus dem Anatomischen Institut
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Diese Arbeit ist meiner Mutter, Susanne Spoelgen, gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	13
1.1 Die Störungen des Autismusspektrums	13
1.1.1 Morphologische Veränderungen des Gehirns bei Autismusspektrumstörungen.....	13
1.1.2 Pathogenese der Autismusspektrumstörungen	15
1.2 Das Protein TNIP1	17
1.2.1 Interaktion des Proteins TNIP1 mit dem Transkriptionsfaktor NFκB und dem ebenfalls mit diesem interagierenden Protein TNFAIP3	18
1.2.1.1 Der Transkriptionsfaktor NFκB	18
1.2.1.2 Das Protein TNFAIP3 als negativer Regulator der NFκB-abhängigen Signaltransduktion	19
1.2.1.3 Das Protein TNIP1 als negativer Regulator der NFκB-abhängigen Signaltransduktion	20
1.2.2 Potentielle Bedeutung des Proteins TNIP1 in der Pathogenese der Autismus-spektrumstörungen	21
1.3 Das Kleinhirn der Maus	22
1.3.1 Überblick und makroskopische Anatomie des Kleinhirnes	22
1.3.2 Neuronale Verschaltung des Kleinhirnes und mikroskopische Anatomie der Kleinhirnrinde	24
1.3.3 Ontogenese	26
1.3.3.1 Pränatale ontogenetische Entwicklung	26
1.3.3.2 Postnatale ontogenetische Entwicklung.....	28
1.4 Zielsetzung und Fragestellung	31
2 Material und Methoden	32
2.1 Geräte und Chemikalien	32
2.1.1 Geräte	32
2.1.2 Chemikalien.....	32
2.1.2.1 Lösungen	32
2.1.2.2 Antikörper	37
2.2 Versuchstierhaltung	38
2.3 Immunhistochemie	38
2.3.1 Perfusionsfixation des Versuchstieres	39

2.3.2	Präparation des Versuchstierkleinhirnes	40
2.3.3	Herstellung von Vibratomschnitten	41
2.3.4	Färbeprozedur	41
2.3.5	Auswertung	43
2.4	Immunzytochemie	44
2.4.1	Präparation der Versuchstierkleinhirne	44
2.4.2	Gemischte dissoziierte Primärzellkultur	44
2.4.3	Färbeprozedur	46
2.4.4	Auswertung	47
2.5	<i>In situ</i> -Hybridisierung	47
2.5.1	Präparation des Versuchstierkleinhirnes	48
2.5.2	Herstellung von Gefrierschnitten	48
2.5.3	Färbeprozedur	48
2.5.3.1	Herstellung der Ribosonden	48
2.5.3.2	Ribosondenhybridisierung	51
2.5.3.3	Färbereaktion	52
2.5.4	Auswertung	52
2.6	<i>Western Blot</i> -Analyse	52
2.6.1	Präparation und Konzentrationsbestimmung der Proteine	53
2.6.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	54
2.6.3	Antikörperinkubation und Chemilumineszenzentwicklung	55
2.6.4	Auswertung	56
2.7	Statistische Auswertung	56
3	Ergebnisse	58
3.1	Die Expression des Proteins TNIP1 in der Kleinhirnrinde der Maus	58
3.2	Die Expression des Proteins TNIP1 im Laufe der postnatalen Entwicklung der Kleinhirnrinde der Maus	70
3.2.1	Die Expression von TNIP1 in Purkinjezellen während der postnatalen Kleinhirnentwicklung	70
3.2.2	Die Expression von TNIP1 in Astrozyten während der postnatalen Kleinhirnentwicklung	77
3.2.3	Die Expression von TNIP1 in Oligodendrozyten während der postnatalen Kleinhirnentwicklung	80
3.3	Die Lokalisation des Proteins TNIP1 in Präsynapsen und Postsynapsen	83

4	Diskussion.....	86
4.1	Plausibilität der <i>Western Blot</i> -, der <i>in situ</i> -Hybridisierungs- sowie der Immunfluoreszenzsignale.....	86
4.2	TNIP1 als potentielles Schlüsselprotein zahlreicher zellulärer Entwicklungsprozesse.....	93
4.3	TNIP1 als potentieller Regulator synaptischer Kontakte	99
5	Zusammenfassung	101
6	Abbildungsverzeichnis	103
7	Tabellenverzeichnis	106
8	Literaturverzeichnis.....	107
9	Erklärung zum Eigenanteil	132
10	Danksagung	133

Abkürzungsverzeichnis

ABIN1	<i>TNFAIP3-binding inhibitor of NFκB 1</i>
ACTB	<i>Actin beta</i>
AHD1	<i>TNFAIP3-binding inhibitor of NFκB homology domain 1</i>
AHD2	<i>TNFAIP3-binding inhibitor of NFκB homology domain 2</i>
AHD3	<i>TNFAIP3-binding inhibitor of NFκB homology domain 3</i>
AHD4	<i>TNFAIP3-binding inhibitor of NFκB homology domain 4</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APID	<i>Agile Protein Interactomes DataServer</i>
ASD	<i>Autism spectrum disease</i>
Asp	Aspartat
ATOH1	<i>Atonal homolog 1</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BLBP	<i>Brain lipid-binding protein</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CALB1	Calbindin 1
CCNG1	<i>Cyclin G1</i>
cDNA	<i>Complementary DNA/Copy DNA</i>
CF	<i>Climbing fibre</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
CRHBP	<i>Corticotropin releasing hormone-binding protein</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG-NTP	Digoxygenin-Nukleosidtriphosphat
DLG4	<i>Discs large membrane-associated guanylate kinase scaffold protein 4</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGL	<i>External granule cell layer</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
Ex	x. embryonaler Tag

FABP7	<i>Fatty acid binding protein 7</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
GA	<i>Glutaraldehyd</i>
GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid</i>
GABARAPL1	<i>GABA receptor-associated protein-like 1</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GIT2	<i>G Protein-coupled receptor kinase-interactor 2</i>
GL	<i>Granule cell layer</i>
Glu	<i>Glutamat</i>
GRAP2	<i>GRB2-related adaptor protein 2</i>
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTF2B	<i>General transcription factor 2B</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICC	<i>Immunocytochemistry</i>
IGL	<i>Internal granule cell layer</i>
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
IKBKG	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa B-kinase regulatory subunit gamma</i>
IPAH9.8	<i>Invasion plasmid antigen H9.8</i>
ITGAM	<i>Integrin Alpha M</i>
LSM	<i>Laser scanning microscope</i>
M.	<i>Morbus</i>
MAB	<i>Maleic acid buffer</i>
MABT	<i>Maleic acid buffer with Tween® 20</i>
MAGEB	<i>Melanoma-associated antigen B</i>
MAGEB1	<i>Melanoma-associated antigen B1</i>
MAP1LC3A	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha</i>
MAP2	<i>Microtubule-associated protein 2</i>
MAPK1	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>
MBP	<i>Myelin basic protein</i>
MF	<i>Mossy fibre</i>

ML	<i>Molecular layer</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NA	<i>Numerische Apertur</i>
NAF1	<i>NEF-associated factor 1</i>
NBD	<i>NEMO-binding domain</i>
NDC80	<i>Nuclear division cycle 80</i>
NEF	<i>Negative regulatory factor</i>
NEMO	<i>NFKB essential modulator</i>
NFKB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NFKB1	<i>Nuclear factor kappa B 1</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
NME7	<i>Protein expressed in non-metastatic cells 7</i>
NTMT	<i>Natriumchlorid/TRIS-EDTA/Magnesiumchlorid-Puffer mit Tween® 20</i>
OLIG2	<i>Oligodendrocyte transcription factor 2</i>
OPTN	<i>Optineurin</i>
PAX2	<i>Paired box 2</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>Phosphate buffered saline with Tween® 20</i>
PEP	<i>Proteinextraktionspuffer</i>
PF	<i>Parallel fibre</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
PIN1	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase never in mitosis-gene A- interacting 1</i>
PL	<i>Purkinje cell layer</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PSD-95	<i>Postsynaptic density protein 95</i>
PTPRC	<i>Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C</i>
PVDF	<i>Polyvinylidenfluorid</i>
Px	<i>x. postnataler Tag</i>
RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>

RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNase	<i>Ribonuklease</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
scRNA	<i>Single cell ribonucleic acid</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
SSC	<i>Saline sodium citrate</i>
TANK	<i>TRAF family member-associated NFKB activator</i>
TAX1BP1	<i>Transient axonal glycoprotein 1-binding protein 1</i>
TBE	<i>TRIS-Borat-EDTA-Puffer</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i>
TBST	<i>TRIS-buffered saline with Tween® 20</i>
TCEA2	<i>Transcription elongation factor A2</i>
TGS	<i>TRIS-glycine-SDS running buffer</i>
TMEM119	<i>Transmembrane protein 119</i>
TNFAIP3	<i>TNF-interacting protein 3</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNIP	<i>TNFAIP3-interacting protein</i>
TNIP1	<i>TNFAIP3-interacting protein 1</i>
TNIP2	<i>TNFAIP3-interacting protein 2</i>
TNIP3	<i>TNFAIP3-interacting protein 3</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
TRIS	<i>Trishydroxymethylaminomethan</i>
tRNA	<i>Transfer RNA</i>
TUBB3	<i>Tubulin beta-3</i>
UBAN	<i>Ubiquitin-binding domain in TNFAIP3-binding inhibitor of NFKB proteins and NEMO</i>
UBC	<i>Ubiquitin C</i>

umap_1	<i>Uniform manifold approximation and projection-Algorithmus,</i> Dimension 1
umap_2	<i>Uniform manifold approximation and projection-Algorithmus,</i> Dimension 2
VAMP2	<i>Vesicle-associated membrane protein 2</i>
VAN	<i>Virion-associated nuclear matrix-interacting protein</i>
VPS33B	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 33B</i>
WM	<i>White matter</i>
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Die Störungen des Autismusspektrums

Bei den Autismusspektrumstörungen handelt es sich um eine Gruppe an neuropsychiatrischen Krankheitsbildern, denen das Vorhandensein von Defiziten in der sozialen Interaktion, des Verhaltens, der Kommunikation (Donovan und Basson, 2017), der Sprache und der Motorik (Reeber et al., 2013) gemein ist. Ein Autismus manifestiert sich typischerweise spätestens bis zur Vollendung des dritten Lebensjahres, wobei die konkrete Ausprägung des autistischen Syndroms sowohl initial als auch im chronischen Krankheitsverlauf beträchtlich zwischen den betroffenen Patienten variieren kann (Lord et al., 2000). Weltweit leiden ungefähr 0,76 % der Bevölkerung an einer autistischen Störung (Hodges et al., 2020). Als ursächlich für die Erkrankung wird eine Kombination aus genetischer Prädisposition in Gestalt von Genmutationen beziehungsweise Genpolymorphismen einerseits und Umweltfaktoren andererseits angesehen (Larsson et al., 2005). Unterschieden werden nach der Ätiologie idiopathische (primäre) und symptomatische (sekundäre) Autismusstörungen.

1.1.1 Morphologische Veränderungen des Gehirns bei Autismusspektrumstörungen

Morphologische Alterationen in Gehirnen autistischer Individuen werden bereits seit Jahrzehnten beleuchtet und sind somit gut bekannt. Als gesichert gilt, dass sich in der Großhirnrinde autistischer Patienten frontal, parietal sowie temporal betont eine erhöhte Dichte an vergrößerten dendritischen Dornen findet (Hutsler und Zhang, 2010). Bei genauerer Betrachtung zeigt sich, dass es sich bei diesen alterierten dendritischen Dornen in der Hauptsache um postsynaptische Endigungen glutamaterg-exzitatorischer Synapsen handelt (Penzes et al., 2011). Zu diesem Befund passt die Erkenntnis, dass einige ASD-Suszeptibilitätsgene für Genprodukte codieren, die letztlich funktionell auf zelluläre Signalwege konvergieren, welche insbesondere auf der postsynaptischen Seite glutamaterger Synapsen von Bedeutung sind (Bourgeron, 2009; Peça und Feng, 2012; Tang et al., 2014; Duan et al., 2020; Chaudry und Vasudevan, 2022). Aus diesen morphologischen Befunden ist geschlussfolgert worden, dass in den Großhirnrinden

autistischer Patienten eine Hyperkonnektivität hinsichtlich der glutamatergen synaptischen Transmission vorliegt (Penzes et al., 2011; Chaudry und Vasudevan, 2022). Ferner konnte gezeigt werden, dass eine verminderte GABA-erge Transmission unabhängig von einer vermehrten glutamatergen Transmission mit einem autistischen Phänotyp assoziiert ist (Chao et al., 2010; Zhao et al., 2022). Somit scheint eine Verschiebung des in der Großhirnrinde herrschenden Gleichgewichtes aus GABA-erger Inhibition und glutamaterger Exzitation, sei sie nun durch die Verminderung des einen oder die Vermehrung des anderen Neurotransmitters bedingt, pathogenetisch relevant für die Entstehung eines Autismus zu sein (El-Ansary und Al-Ayadhi, 2014; De Vries et al., 2018; Chaudry und Vasudevan, 2022; Zhao et al., 2022).

In bildgebenden Studien konnte darüber hinaus mittels Magnetresonanztomographie nachgewiesen werden, dass die Kleinhirnrinden autistischer Patienten signifikant dünner sind als diejenigen nicht-autistischer Patienten (Lord et al., 2000). Als mikroskopisches Korrelat zu diesem makroskopischen Befund wurde in postmortalen Studien gezeigt, dass sich in den Kleinhirnrinden autistischer Patienten signifikant weniger Purkinjezellen finden als in den Kleinhirnrinden gesunder Patienten (Ritvo et al., 1986; Kemper und Bauman, 1998; Palmen et al., 2004; Amaral et al., 2008; Reeber et al., 2013). Bei diesem Befund handelt es sich um die am häufigsten reproduzierbare und damit am besten gesicherte morphologische Alteration beim Autismus, während andere Befunde sich im Vergleich als eher variabel erweisen (Bauman und Kemper, 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass intrinsische und extrinsische Faktoren, die in der Pathogenese des Autismus von Bedeutung sind, sowohl unabhängig voneinander als auch miteinander zu autistischem morphologischen Alterationen der Purkinjezellen führen (Bahaaeldin et al., 2024). Somit liegt der Schluss nahe, dass morphologische und konsekutiv auch funktionelle Veränderungen in den Kleinhirnrinden autistischer Individuen, insbesondere der Purkinjezellen, relevante Korrelate autistischer Erkrankungen darstellen.

Die herabgesetzte Anzahl an Purkinjezellen beruht hierbei auf dem heutigen Wissensstand nicht auf einer primär verringerten Zahl ontogenetisch entstandener Purkinjezellen, sondern auf dem sekundären Untergang bereits entstandener und korrekt an ihren Zielort im *Cortex cerebelli* migrierter Purkinjezellen (Whitney et al., 2009). Neben der Anzahl an Purkinjezellen ist auch deren Morphologie verändert; so erscheinen die

Purkinjezellen autistischer Kleinhirne gegenüber denjenigen gesunder Kleinhirne beispielsweise verkleinert (Palmen et al., 2004).

1.1.2 Pathogenese der Autismusspektrumstörungen

Wie vorbeschrieben, liegt Autismusleiden eine gestörte Entwicklung des Gehirnes zugrunde (Lord et al., 2000; Palmen et al., 2004). Hierbei spielen sowohl intrinsische als auch extrinsische Faktoren eine Rolle; je nachdem, ob ein Autismus eigenständig besteht oder als Symptom einer zugrundeliegenden Erbkrankheit auftritt, überwiegt entweder der Einfluss umweltbezogener oder genetischer Faktoren. Einer etablierten Theorie zufolge führt zunächst eine *in utero* oder aber früh postnatal erworbene Schädigung des Gehirnes, die beispielsweise infektiös, konvulsiv oder autoimmun verursacht sein kann, zur Herausbildung einer neuroinflammatorischen Reaktion, im Rahmen derer es zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies kommt (Anderson et al., 2008). Diese Sauerstoffradikale schädigen die nukleäre und mitochondriale DNA (Anderson et al., 2008), welches anschließend die Bildung von aggressiven ROS unterhält sowie die Aktivierung von Astro- und Mikroglia bewirkt (Anderson et al., 2008). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass in den Groß- und Kleinhirnrinden von Autismuspatienten sowohl makrogliale (astrozytäre) als auch mikrogliale Zellen neuroinflammatorisch aktiviert sind (Vargas et al., 2005). Zudem konnten im *Liquor cerebrospinalis* sowie im Kleinhirn autistischer Individuen erhöhte Zytokinspiegel nachgewiesen werden, die ihren Ursprung in neuroglialem Gewebe haben (Vargas et al., 2005; Wei et al., 2011). Es ist somit nachvollziehbar, dass die Rolle einer pathologisch erhöhten neuroinflammatorischen Aktivität im Kleinhirn in der Pathogenese von Störungen des Autismusspektrums allgemein anerkannt wird (Anderson et al., 2008; Young et al., 2011; van der Heijden et al., 2021).

Hierzu passend konnten in postmortalem Hirngewebe verstorbener Autismuspatienten erhöhte NFκB-Spiegel nachgewiesen werden (Young et al., 2011). Der Transkriptionsfaktor NFκB wird ubiquitär exprimiert (Camandola und Mattson, 2007) und vermittelt die zelluläre Antwort auf extrazelluläre Signale; insbesondere kommt ihm bei der Regulation der Immunantwort eine zentrale proinflammatorische Rolle zu, denn er induziert inflammatorische Chemokine und Zytokine (Young et al., 2011; für weiterführende Informationen zum NFκB siehe Kapitel 1.2.1.1). Interessant ist die nachgewiesene aberrante NFκB-

Aktivität in Gehirnen autistischer Patienten deshalb, weil erhöhte NFkB-Spiegel experimentell zu autismusähnlichen morphologischen Veränderungen der dendritischen Dornendichte führen (Boersma et al., 2011) und weil sich über einen erhöhten NFkB-Spiegel eine pathogenetische Verbindung zwischen dem NFkB- und dem mTOR-Signaltransduktionsweg herstellen lässt, denn eine erhöhte mTOR-Aktivität führt in Neuronen zu einer erhöhten NFkB-Aktivität (Xu et al., 2021).

Der mTOR-Signalweg ist in Neuronen für die Regulation der synaptischen Proteinsynthese (Sahin und Sur, 2015; Pagani et al., 2021) und der synaptischen Protein-degradation mittels Makroautophagie von Bedeutung (Egan et al., 2011; Tang et al., 2014; Wu et al., 2020; Pagani et al., 2021). Bei autistischen Patienten liegt häufig eine Überaktivität von Genprodukten, die mit dem mTOR-Signalweg assoziiert sind, vor (Rosina et al., 2019). Ferner betreffen Mutationen, die mit einem erhöhten Autismus-Erkrankungsrisiko assoziiert sind, häufig Gene, deren Genprodukte in Verbindung mit dem mTOR-Signalweg stehen (Tang et al., 2014). Ein überaktiver mTOR-Signalweg führt im Mausmodell zu einem autistischen Phänotyp beziehungsweise zu morphologisch-funktionellen Veränderungen, die auch bei Autismusspektrumstörungen beobachtet werden – wie z. B. einer verringerten Anzahl an Purkinjezellen, einer alterierten Morphologie synaptischer Kontakte oder einer pathologisch gesteigerten Aktivität glutamaterg-exzitatorischer Schaltkreise (Tsai et al., 2012; Zoghbi und Bear, 2012; Russo et al., 2020; Chaudry und Vasudevan, 2022).

Ein aberrant aktiver mTOR-Signalweg kann jedoch nicht nur über eine Beeinflussung des NFkB-Signalweges an der Pathogenese des Autismus beteiligt sein, sondern auch über eine Beeinflussung der synaptischen Proteinhomöostase, welche für eine regelrechte synaptische Plastizität benötigt wird (Bingol und Sheng, 2011). Ist der mTOR-Signalweg übermäßig aktiv, so ist die synaptische Proteinsynthese erhöht (Auerbach et al., 2011), während die Degradierung synaptischer Proteine durch Autophagolysosomen erniedrigt ist (Egan et al., 2011). Passend dazu ist das autophagosomale Markerprotein MAP1LC3A in autistischen Gehirnen pathologisch vermindert nachweisbar (Yoshioka, 1992; Chaudry und Vasudevan, 2022). Somit kommt es zu einer pathologischen Akkumulation synaptischer Proteine, welche die neuronale Plastizität stört, da die Rückbildung einmal herausgebildeter synaptischer Kontakte erschwert ist (Tang et al., 2014), sodass es zu einer neuronalen Hyperkonnektivität kommt (Pagani et al., 2021; Chaudry und

Vasudevan, 2022). In diesem Zusammenhang konnte im Mausmodell bereits gezeigt werden, dass der Verlust der mTOR-regulierten Makroautophagie mit autismusähnlichen Defekten der ontogenetisch benötigten Synapseneliminierung einhergeht (Purves und Lichtman, 1980; Rakic et al., 1986; Tang et al., 2014; Pagani et al., 2021).

Während in der Literatur bislang zwar eigenständige pathogenetische Rollen eines aberrant aktiven NFkB- sowie eines überaktiven mTOR-Signalweges in der Entstehung des Autismus beschrieben werden, fehlt eine molekularbiologische Erklärung für die beobachtete Erhöhung der NFkB-Aktivität in Abhängigkeit einer aberranten mTOR-Aktivität (Xu et al., 2021). Eine mögliche Erklärung ergibt sich aus der näheren Betrachtung eines am NFkB-Signalweg beteiligten regulatorischen Proteins, des Proteins TNFAIP3 (für weitergehende Informationen zum TNFAIP3 siehe Kapitel 1.2.1.2). Dieses wirkt sowohl hemmend auf die NFkB-Aktivität als auch auf die des mTORs ein (Matsuzawa et al., 2015; Vettters et al., 2019; Chen et al., 2020); mit einer erniedrigten TNFAIP3-Aktivität in autistischen Gehirnen ist somit eine potentielle Verbindung in der Pathophysiologie des Autismus – zwischen der dysregulierten synaptischen Protein-homöostase (erhöhte mTOR-Aktivität) einerseits und der Neuroinflammation (erhöhte NFkB-Aktivität) andererseits – vorstellbar.

1.2 Das Protein TNIP1

TNIP1 (auch ABIN1, VAN oder NAF1 genannt) ist ein Protein von 72 kDa Molekulargewicht, welches außerhalb des Zentralnervensystems ubiquitär exprimiert zu werden scheint (G'Sell et al., 2015; Lei et al., 2020; Shamilov, Ackley et al., 2020). Das für TNIP1 codierende humane Gen ist auf Chromosom 5q32-33.1 lokalisiert (Shiote et al., 2006), das murine Gen liegt auf Chromosom 11 (Verstrepen et al., 2009). Es besteht jeweils aus 18 Exons (Verstrepen et al., 2009), wobei mehrere Spleißvarianten des TNIP1-Proteins nachgewiesen werden konnten, die sich jeweils durch die Deletion von Exons mit oder ohne alternative Insertion auszeichnen (Favre et al., 2003; Shiote et al., 2006).

Das Protein TNIP1 kommt in der Zelle sowohl in zytoplasmatischer als auch in nukleärer Lokalisation vor (Gurevich et al., 2011). Es pendelt fortwährend zwischen Zytosol und Zellkern (Gupta et al., 2000) und erfüllt eine ganze Reihe an unterschiedlichen Funktionen. So fungiert es im Zellkern als Corepressor ligandengebundener nukleärer

Rezeptoren, der Retinsäurerezeptoren auf der einen und der Peroxisomproliferator-aktivierten Rezeptoren auf der anderen Seite (Gurevich und Aneskievich, 2009; Flores et al., 2011); insbesondere Ersteres legt eine Beteiligung des TNIP1 an der Steuerung der embryonalen Entwicklung nahe, welche auch experimentell nachgewiesen werden konnte (Oshima et al., 2009). Im Zytosol interagiert TNIP1 zum einen mit HIV-Proteinen (Favre et al., 2003), hemmt zum anderen die ligandengesteuerte Aktivierung eines Opioidrezeptors (Zhou et al., 2018) und moduliert darüber hinaus die NFκB-abhängige Signaltransduktion (Nanda et al., 2011).

1.2.1 Interaktion des Proteins TNIP1 mit dem Transkriptionsfaktor NFκB und dem ebenfalls mit diesem interagierenden Protein TNFAIP3

1.2.1.1 Der Transkriptionsfaktor NFκB

NFκB-Proteine sind spezifische (regulatorische) Transkriptionsfaktoren, die eine bedeutende Schlüsselrolle für die Änderung der zellulären Genaktivität auf äußere Stimuli hin inne haben (Rothschild et al., 2018) und in fast allen Zelltypen exprimiert werden (Young et al., 2011), so auch in Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen (Camandola und Mattson, 2007).

NFκB-abhängig exprimierte Proteine sind im Allgemeinen für die Regulation der Entzündungsreaktion und der Immunantwort (Hoffmann et al., 2006) sowie für die Kontrolle der Zellproliferation, des Zellüberlebens und der Zellapoptose von Bedeutung (Pranski et al., 2012). Andererseits ist die NFκB-abhängige Genregulation darüber hinaus im Speziellen an der Steuerung der neuronalen Entwicklung sowie der synaptischen Plastizität beteiligt (O'Mahony et al., 2006).

Die Expression NFκB-abhängig transkribierter Gene wird hierbei durch die NFκB-abhängigen Signaltransduktionskaskaden gesteuert, deren transduktorische Aktivität – unter Berücksichtigung der in ebendiese eingreifenden NFκB-Regulationsmechanismen (siehe Kapitel 1.2.1.2 sowie 1.2.1.3) – das Ausmaß der NFκB-Aktivierung und damit der NFκB-abhängigen Genexpression festlegt.

1.2.1.2 Das Protein TNFAIP3 als negativer Regulator der NFkB-abhängigen Signaltransduktion

Die NFkB-Aktivität und damit die Aktivität der NFkB-abhängig transkribierten Gene kann sowohl positiv – im Sinne einer Erhöhung der Transkriptionsrate – als auch negativ – im Sinne einer Erniedrigung der Transkriptionsrate – reguliert werden (Oeckinghaus et al., 2011). Die negative Regulation der NFkB-abhängigen Genexpression erfolgt hauptsächlich vermittelt des Zinkfingerproteins TNFAIP3 (Momtazi et al., 2019), welches im Sinne einer negativen Rückkopplungsschleife NFkB-abhängig induziert wird (Abbasi et al., 2015; Urbano et al., 2018; Zhou et al., 2011). Die TNFAIP3-vermittelte NFkB-Deaktivierung beginnt hierbei jedoch erst nach dem Ablauf einer intrinsischen, für die NFkB-abhängige Biosynthese funktioneller TNFAIP3-Proteine erforderlichen Zeit, sodass zwischenzeitlich NFkB unbeeinträchtigt aktiv ist (Renner und Schmitz, 2009).

Bei TNFAIP3 (auch A20 genannt) handelt es sich um ein bifunktionelles Enzym, welches sowohl über eine K48-Polyubiquitin-Ligasefunktion als auch über eine K63-Polyubiquitin-Deubiquitinasefunktion verfügt und welches, wie NFkB auch, im Zentralnervensystem, insbesondere in Neuronen, exprimiert wird (Pranski et al., 2012; Malynn und Ma, 2019; Yu et al., 2020; Perga et al., 2021). K48-verknüpfte Polyubiquitylierungen fungieren typischerweise als Markierungen zur Degradation im Proteasom, während K63-verknüpfte Polyubiquitinierungen in der Regel zur Modulation der intermolekularen Bindungsaffinität zwischen verschiedenen Proteinen dienen (Pergolizzi et al., 2019). TNFAIP3 kann demnach, einerseits, an der NFkB-aktivierenden Signaltransduktionskaskade beteiligte Proteine durch K48-Polyubiquitinierung zum proteasomalen Abbau markieren und auf diese Weise die NFkB-Aktivität senken, andererseits kann es durch K63-Depolyubiquitylierung die Interaktion zwischen den an dem NFkB-aktivierenden Signalweg beteiligten Proteinen stören, wodurch ebenfalls die NFkB-Aktivität gesenkt werden kann (Vereecke et al., 2009). In beiden Fällen resultiert eine erniedrigte Transkriptionsrate der NFkB-abhängig exprimierten Gene; somit hat TNFAIP3 im Allgemeinen einen antiinflammatorischen Effekt (Onizawa et al., 2015), der auch daran zu erkennen ist, dass eine gestörte TNFAIP3-Funktion mit einer ganzen Reihe an (auto)inflammatorischen Krankheitsbildern außerhalb und innerhalb des Zentralnervensystems assoziiert ist (Zhai et al., 2018; Montarolo et al., 2020), so z. B. mit der Multiplen Sklerose (Wertz et al., 2015; Perga et al., 2017) oder dem systemischen Lupus

erythematodes (Musone et al., 2008; Ma und Malynn, 2012) mit neuropsychiatrischer Manifestation (Duan et al., 2019). Eine regelrechte TNFAIP3-Aktivität spielt folglich eine ganz wesentliche Rolle für die Vermeidung pathologischer (auto)inflammatorischer Prozesse (Dasgupta et al., 2004; Malynn und Ma, 2019). So geht eine erhöhte TNFAIP3-Aktivität mit einem geringeren Ausmaß an neuroinflammatorischer Schädigung einher (Wang et al., 2013; Amjad et al., 2019), während eine erniedrigte TNFAIP3-Aktivität zu einer ausgedehnteren Hirngewebeschädigung infolge einer Neuroinflammation führt (Meng et al., 2017; Voet et al., 2018; Momtazi et al., 2019; Mohebiany et al., 2020).

1.2.1.3 Das Protein TNIP1 als negativer Regulator der NFκB-abhängigen Signaltransduktion

TNIP1 besitzt die Fähigkeit, den NFκB-aktivierenden Signalweg entweder unabhängig von TNFAIP3 oder aber durch Interaktion mit TNFAIP3 zu beeinflussen, wobei die Wirkung von TNIP1 in Anwesenheit von TNFAIP3 verstärkt ist (Heyninck et al., 2003; Zhou et al., 2011; G'Sell et al., 2015; Shamilov, Vinogradova et al., 2020). Für diese Interaktion mit TNFAIP3 ist die TNIP1-Domäne AHD1 (siehe Abbildung 1) von Bedeutung (Samulevich et al., 2025). Umgekehrt wird auch der Effekt des TNFAIP3 durch das TNIP1 gesteigert, wobei TNFAIP3 seine Funktion ebenfalls sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit vom TNIP1 erfüllen kann (Heyninck et al., 1999; Zhou et al., 2011). Im Gegensatz zu TNFAIP3 verfügt TNIP1 nicht über eine eigenständige biokatalytische Aktivität (Shamilov und Aneskievich, 2018).



Abb. 1: Überblick über die Domänenstruktur des humanen/murinen Proteins TNIP1. Die Nummerierungen zeigen die jeweiligen Aminosäuresequenzpositionen an. Es finden sich im Wesentlichen fünf funktionelle Proteindomänen, vier autologe Homologiedomänen (AHD1 bis AHD4) und eine NEMO-bindende Domäne (NBD). Die AHD2 ist für die Bindung an Ubiquitinmotive zuständig und wird daher auch UBAN genannt (Le Guerroué et al., 2023).

TNIP1 bindet an ubiquitinierte Signalmoleküle (Wagner et al., 2008; Oshima et al., 2009; Verstrepen et al., 2009; Ramirez et al., 2012); es fungiert durch seine K48-Polyubiquitinketten-bindende Eigenschaft als Autophagierezeptor und dirigiert so die entsprechend ubiquitinylierten Moleküle zur autophagolysosomalen Degradation (Shinkawa et al., 2022). Für die ubiquitinbindende Eigenschaft von TNIP1 ist dessen Domäne AHD2, auch UBAN genannt, von Bedeutung (siehe Abbildung 1; Samulevich et al., 2025). Da TNFAIP3 am NFκB-Signalweg beteiligte Moleküle durch K48-Polyubiquitinylierung zum Abbau markiert (Malynn und Ma, 2019; Yu et al., 2020), beschleunigt TNIP1 als Autophagierezeptor den autophagolysosomalen Abbau ebendieser Moleküle. Somit ergänzen TNFAIP3 und TNIP1 einander jeweils in ihrer Funktionsweise ergänzen und dämpfen die NFκB-abhängige Signaltransduktion durchaus synergistisch (Kattah et al., 2018).

1.2.2 Potentielle Bedeutung des Proteins TNIP1 in der Pathogenese der Autismus-spektrumstörungen

TNIP1-Proteine werden als Schlüsselmediatoren inflammatorischer Signaltransduktion erkannt (Shamilov und Aneskievich, 2018), die antiinflammatorisch wirken (Lei et al., 2020). Sie ziehen im Falle verminderter Aktivität eine aberrante NFκB-Aktivität nach sich (Ippagunta et al., 2016; Rudraiah et al., 2018) und unterliegen einer NFκB-gesteuerten Induktion, sodass TNIP1-Proteine an einer Termination der NFκB-Aktivität im Sinne einer negativen Rückkopplungsschleife beteiligt sind (Verstrepen et al., 2009). Ferner ist TNIP1 mit einer pathologisch übersteigerten neuroinflammatorischen Aktivität in Verbindung gebracht worden (Zhou et al., 2020); beispielsweise zeigte sich für eine verminderte TNIP1-Expression eine Assoziation mit autoinflammatorischen Krankheitsbildern des Zentralnervensystems wie dem (neuropsychiatrischen) systemischen Lupus erythematoses (Gateva et al., 2009; Nanda et al., 2011; Zhou et al., 2011; Jiménez-Sousa et al., 2019; Brady et al., 2020; Shinkawa et al., 2022).

Ähnlich der Beteiligung einer pathologisch verminderten Expression des Proteins TNFAIP3 an der Entstehung des Autismus, ist eine solche Beteiligung ebenso für eine verminderte Expression des Proteins TNIP1 denkbar. Im Gegensatz zur Expression des TNFAIP3 ist diejenige des TNIP1 im Gehirn jedoch bislang nicht untersucht worden;

sämtliche verfügbaren Expressionsanalysen beziehen sich lediglich auf die *Tnip1*-mRNA. So konnte im Jahre 1999 mittels *Northern Blot*-Analyse gezeigt werden, dass die *Tnip1*-mRNA, verglichen mit anderen Geweben und Organen des Körpers, nur in geringen Mengen im Gehirn exprimiert wird (Fukushi et al., 1999). Dieses Forschungsergebnis steht im Widerspruch zur *in situ*-Hybridisierung der *Tnip1*-mRNA, die vom *Allen Institute for Brain Science* in Seattle, Washington, USA vorgenommen wurde und eine gut erkennbare Anfärbung der *Tnip1*-mRNA zeigt.

1.3 Das Kleinhirn der Maus

Das Kleinhirn der Maus ist aus mehreren Gründen ein hervorragendes Modell für morphologische Untersuchungen. Einerseits ist es aufgrund seiner Lage leicht für Präparationen zugänglich, was eine artefaktarme Gewinnung des Probematerials erlaubt. Andererseits sind die einzelnen Zelltypen des Kleinhirns gut beschrieben und es existieren, was von besonderer Wichtigkeit ist, geeignete Markerproteine, anhand derer die Identifikation der einzelnen Zelltypen möglich ist. Aus diesen strukturellen Gründen, aber auch aus funktionellen Erwägungen – die neuronalen Zellen des humanen und des murinen Kleinhirns sind identisch verschaltet –, fiel die Entscheidung zur Verwendung des Kleinhirns der Maus als Modell zur Untersuchung der Expression des Proteins TNIP1 im Gehirn leicht.

1.3.1 Überblick und makroskopische Anatomie des Kleinhirns

Das Kleinhirn sitzt dem Hirnstamm dorsal auf, wobei es über die paarig ausgeprägten Kleinhirnstiele seine sämtlichen Afferenzen erhält und Efferenzen entsendet. Die Kleinhirnstiele verbinden das Kleinhirn mit dem Hirnstamm und begrenzen seitlich den IV. Ventrikel, der sich zwischen Kleinhirn und Hirnstamm befindet. Das Dach des IV. Ventrikels wird durch das obere Marksegel gebildet, der Boden durch das untere; die beiden Marksegel verbinden ebenfalls Kleinhirn und Hirnstamm miteinander.

Beim Kleinhirn handelt es sich um ein analog zum Großhirn in Rinde und Mark gegliedertes Organ, wobei die Afferenzen jeweils über eine im Kleinhirnstiel verlaufende Bahn zur Kleinhirnrinde gelangen, dort sowie in den zentral im Marklager gelegenen

Kleinhirnkernen verrechnet werden (siehe Kapitel 1.3.2) und dann als Efferenzen das Kleinhirn wieder über eine ihrerseits im Kleinhirnstiel verlaufende Bahn verlassen.

Das Kleinhirn lässt sich strukturell entlang der mediolateralen Achse in drei Bereiche untergliedern, den mediansagittal gelegenen Kleinhirnwurm sowie die diesem beiderseits benachbart gelegenen Kleinhirnhemisphären; entlang der kraniokaudalen Achse können drei Lappen unterschieden werden, die *Lobi anterior, posterior* und *flocculonodularis*. Wie aus Abbildung 2 hervorgeht, kann der Kleinhirnwurm weiter untergliedert werden in zehn Lappchen, die *Lobuli I – X* (Larsell, 1952). Funktionell lassen sich ein *Spinocerebellum*, ein *Pontocerebellum* (*Cerebrocerebellum*) sowie ein *Vestibulocerebellum* unterscheiden, phylogenetisch ein *Palaeocerebellum*, ein *Archicerebellum* sowie ein *Neocerebellum*; hierbei entsprechen das *Spino-* bzw. das *Palaeocerebellum* den *Lobuli I – V* nach Larsell (in ihrer Gesamtheit zum *Lobus anterior* gehörig), das *Ponto-* bzw. das *Archicerebellum* den *Lobuli VI – IX* nach Larsell (zugehörig zum *Lobus posterior*) sowie das *Vestibulo-* bzw. das *Neocerebellum* dem *Lobulus X* nach Larsell (zum *Lobus flocculonodularis* gehörig) (Frantz et al., 1994; Altman und Bayer, 1997).

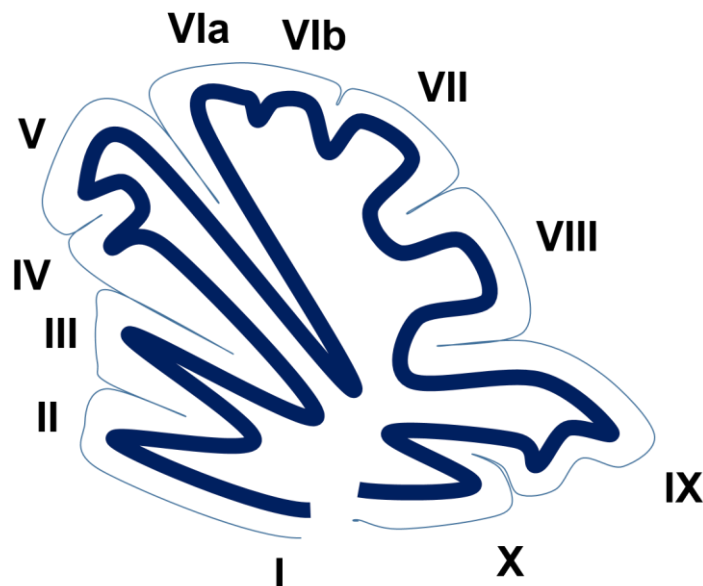


Abb. 2: Schematische Darstellung eines vermalen murinen Kleinhirnsagittalschnittes zur Veranschaulichung der Kleinhirnlobulierung nach Larsell.

Dem Kleinhirn wurden lange Zeit nur motorische Funktionen zugeschrieben (Beckinghausen und Sillitoe, 2019); inzwischen setzt sich aber zunehmend die Erkenntnis durch, dass das Kleinhirn auch eine wichtige Rolle in der Koordination der Aktivität der verschiedenen Großhirnrindenareale innehat und damit an weit mehr Gehirnfunktionen beteiligt ist (Reeber et al., 2013). So geht man davon aus, dass das Kleinhirn durch seine reichliche Verschaltung mit der Großhirnrinde die Kohärenz verschiedener Areale der Großhirnrinde koordinieren könnte, die *per se* unterschiedliche Funktionen erfüllen. Dem Kleinhirn kommt in dieser Theorie gewissermaßen die Rolle eines Schrittmachers zu, der die kognitive Integrationsleistung verbessern könnte (van der Heijden et al., 2021). Zu dieser Hypothese passen Forschungsergebnisse, die auf eine Beteiligung des Kleinhirnes an der Kognition hinweisen (Reeber et al., 2013; van der Heijden et al., 2021).

1.3.2 Neuronale Verschaltung des Kleinhirnes und mikroskopische Anatomie der Kleinhirnrinde

Afferenzen von extrazerebellär gelangen auf beiden Seiten jeweils einerseits über den *Tractus olivocerebellaris* und andererseits über die *Tractus spino-, ponto- und vestibulocerebellares* zum Kleinhirn. Die Axone, die die *Tractus olivocerebellares* bilden, werden „Kletterfasern“ genannt; diejenigen, die in den *Tractus spino-, ponto- und vestibulocerebellares* verlaufen, werden als „Moosfasern“ bezeichnet. Die Kletterfasern gelangen zunächst durch Marklager, Körnerschicht und Purkinjezellschicht (Ganglienzellschicht) hindurch in die Molekularschicht der dreischichtig aufgebauten Kleinhirnrinde. In dieser äußeren Schicht der Kleinhirnrinde winden sie sich rankend um die Äste des Dendritenbaumes der Purkinjezellen, auf die sie jeweils aspartaterg-exzitatorisch verschalten sind. Die Purkinjezellen, deren Perikaryen jeweils in der mittleren Ganglienzellschicht liegen (Binda et al., 2020), bilden hierbei zur Aufnahme exzitatorischer synaptischer Kontakte dendritische Dornen aus (Altman und Bayer, 1997) – dies entdeckte bereits Santiago Ramón y Cajal als Begründer der modernen Neurowissenschaften (Sotelo, 2003). Die Moosfasern hingegen gelangen durch das Marklager in die innere Körnerschicht, wo sie glutamaterg-exzitatorisch mit den dort ansässigen Körnerzellen verschalten sind (Delvendahl et al., 2013).

Die ebenfalls glutamatergen Körnerzellen senden ihrerseits exzitatorisch wirksamen Efferenzen über ihre Axone, die sogenannten „Parallelfasern“, zu den inhibitorischen Interneuronen der Kleinhirnrinde sowie den Purkinjezellen (Altman und Bayer, 1997). Korb-, Stern- und Golgi-Zellen bilden hierbei die Gruppe der GABAergen, inhibitorischen Interneurone der Kleinhirnrinde (Schilling et al., 2008). Stern- und Korbzellen sind in der Molekularschicht, Golgizellen hingegen in der Körnerzellschicht gelegen; während Stern- bzw. Korbzellen jeweils inhibitorisch auf den Dendritenbaum bzw. das Soma der Purkinjezellen verschalten sind, dämpfen die Golgi-Zellen im Sinne einer retrograden Inhibition die Körnerzellen. Nachdem letztlich durch die Purkinjezellen eine Integration deren verschiedenartiger exzitatorischer und inhibitorischer Afferenzen stattgefunden hat (Beckinghausen und Sillitoe, 2019), entsenden jene ihre Axone zu den im Marklager gelegenen Kleinhirnkernen, den jeweils paarigen *Nuclei dentati*, *Nuclei interpositi* (bei der Maus; entsprechen den paarigen *Nuclei globosi* und *Nuclei emboliformes* des Menschen) sowie *Nuclei fastigii* (Altman und Bayer, 1997). Mit diesen sind sie als einzige efferente Zellen der Kleinhirnrinde GABAerg-inhibitorisch verschalten (Dusart und Flamant, 2012; Binda et al., 2020). Die Neurone der Kleinhirnkern entsenden daraufhin über die in den Kleinhirnstielen jeweils beidseits verlaufenden *Tractus cerebellothalamici*, *-olivares* und *-rubrales* Efferenzen zu extrazerebellären Strukturen. Die intra- und extrazerebellären Verschaltungen des Kleinhirnkortex sind in Abbildung 3 skizziert.

Neben Neuronen finden sich in der Kleinhirnrinde auch neurogliale Zellen: außer den ubiquitär im Zentralnervensystem vorkommenden Mikrogliazellen als dessen geweberesidenten Makrophagen (Miron, 2017) einerseits astroglial differenzierte Zellen und andererseits Oligodendrozyten. In der Molekular- und Körnerschicht sitzen hierbei die Astrozyten, während sich in der Molekular- und in der Ganglienzellschicht die Zellen der Bergmannglia als spezialisierter Radialglia des Kleinhirnes finden (Dusart und Flamant, 2012). Das Vorkommen der Oligodendrozyten ist in der Kleinhirnrinde auf die Körnerschicht beschränkt, da sich nur dort in der Kleinhirnrinde myelinisierte Axone finden, nämlich Kletterfasern, Moosfasern (jeweils afferente Faserqualität) und Purkinjezellaxone (efferente Faserqualität). Zu beachten ist jedoch, dass nicht alle Axone in der Körnerzellschicht myelinisiert sind, so z. B. die Parallelfasern nicht.

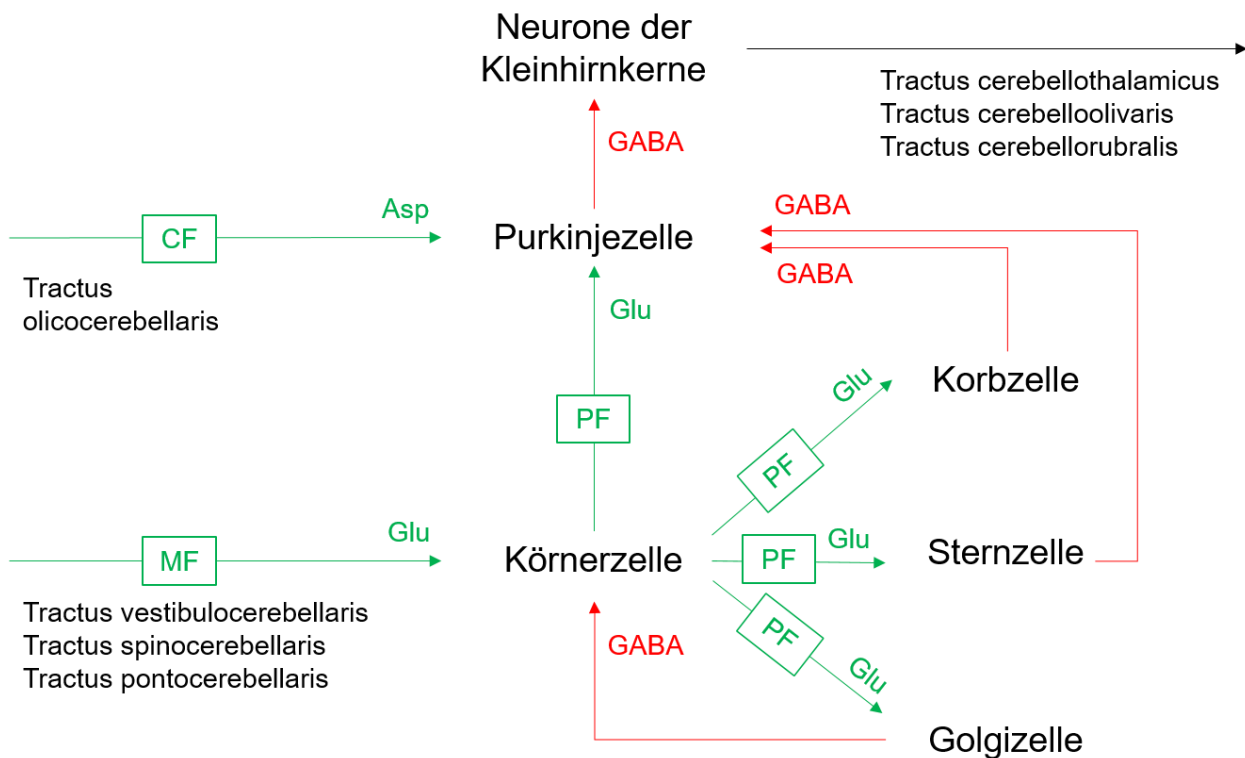


Abb. 3: Schematische Darstellung der neuronalen Verschaltung des Kleinhirns. Grün: exzitatorische Verschaltung; rot: inhibitorische Verschaltung. CF: Kletterfaser, MF: Moosfaser, PF: Parallelfaser. Die Abbildung verdeutlicht die zentrale Position der Purkinjezellen als einzigen efferenten Zellen der Kleinhirnrinde.

1.3.3 Ontogenese

1.3.3.1 Pränatale ontogenetische Entwicklung

Das zerebelläre *Primordium* erscheint zwischen dem zehnten (E10) und zwölften embryonalen Tag (E12) als verdickte Ausstülpung der dorsalen Wand des primitiven IV. Ventrikels, welche die Entstehung der primären Keimzonen anzeigt (Miale und Sidman, 1961). Diese primären Keimzonen werden in etwa um den Zeitpunkt E13 herum erkennbar; bei ihnen handelt es sich um definierte, mehrschichtige Areale des das Neuralrohr auskleidenden Neuroepithels beziehungsweise primitiven Ependyms (Miale und Sidman, 1961; Altman und Bayer, 1997). Man unterscheidet hier die beiderseits medial an der Hinterwand des künftigen IV. Ventrikels gelegenen Ventrikularzonen und die ebenfalls beiderseits jeweils lateral der Ventrikularzonen und damit an den Seitenwänden des

naszierenden IV. Ventrikels gelegenen Rautenlippen (van Essen et al., 2020). Erstere sind der Entstehungsort der (in dieser zeitlichen Reihenfolge, aber teils überlappend entstehenden) GABAergen Neurone des Kleinhirnes, namentlich der inhibitorischen Kleinhirnkernneurone, der Purkinjezellen und der inhibitorischen Interneurone, sowie sämtlicher astroglialer Zellen des Kleinhirnes (Altman und Bayer, 1997; Haldipur et al., 2018), während in Letzteren hingegen (ebenfalls in dieser zeitlichen Reihenfolge, aber teils überlappend) die glutamatergen Neurone des Kleinhirnes, exzitatorische Kleinhirnkernneurone sowie Körnerzellprogenitoren, entstehen (van Essen et al., 2020). Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass die Mikrogliazellen aus dem Knochenmark über die Blutbahn und die Oligodendrozyten ausgehend von extrazerebellären Strukturen über die *Vela medullaria* jeweils erst sekundär ins Kleinhirn immigrieren (Leto et al., 2016).

Die beiden Populationen an Körnerzellprogenitoren migrieren nach ihrer Entstehung in den lateralen rhombischen Lippen jeweils beiderseits entlang der Kleinhirnoberfläche – direkt tangential unter der entstehenden weichen Hirnhaut und damit näherungsweise parallel zur meningealen Oberfläche des Kleinhirnes – nach dorsal und proliferieren währenddessen weiter (Miale und Sidman, 1961; Altman und Bayer, 1997; Haldipur et al., 2018). So entsteht die äußere Körnerschicht; diese stellt eine sekundäre Keimzone dar, in der die Körnerzellprogenitoren nach ihrer Entstehung in den primären Keimzonen weiterproliferieren (Leto et al., 2016), und bedeckt ungefähr ab dem Zeitpunkt E15 die gesamte Oberfläche des primitiven Kleinhirnes (Miale und Sidman, 1961).

Die Purkinjezellen migrieren hingegen nach ihrer Entstehung in den medialen Ventrikularzonen hauptsächlich entlang der Zellen der Radialglia, die von innen nach außen gerichtete und nahezu senkrecht zur meningealen Oberfläche des Kleinhirnes stehende Leitschienen für die neuronale Migration darstellen, nach dorsal (Leto et al., 2016; Haldipur et al., 2018; Beckinghausen und Sillitoe, 2019). Bemerkenswerterweise ist die Entstehung der Purkinjezellen nach ihrem Beginn zum Zeitpunkt E11 mit dem Verschwinden der letzten der nur etwa 100-150 Purkinjezellprogenitoren in der Ventrikularzone schon zum Zeitpunkt E13 abgeschlossen (Miale und Sidman, 1961; Oberdick et al., 1988; Baader et al., 1996), sodass bereits zu diesem Zeitpunkt die gesamte Anzahl an jemals vorhandenen Purkinjezellen entstanden ist.

So entsteht in etwa bis E15 eine Kleinhirnplatte, die (von innen nach außen) aus dem primitiven Ependym mit Ventrikularzonen und Rautenlippen, einer Mantelzone mit mi-

grierenden Purkinjezellen, einer Molekularschicht sowie einer äußeren Körnerschicht besteht (Miale und Sidman, 1961). Bis zum Zeitpunkt E17 ist die Migration der Purkinjezellen abgeschlossen (Dusart und Flamant, 2012). Es hat sich eine mehrschichtige Purkinjezellschicht als Ganglienzellschicht herausgebildet, die von der äußeren Körnerschicht durch die dazwischenliegende Molekularschicht abgegrenzt wird (Leto et al., 2016); die Purkinjezellen stimulieren nun die Proliferation der über ihnen gelegenen Körnerzellprogenitoren (Wechsler-Reya und Scott, 1999).

Ebenfalls pränatal abgeschlossen sind die Neurogenese und die Migration der Neurone der Kleinhirnerneuronen, die hierzu in etwa während der Purkinjezellmigration die Ventrikularzonen und rhombischen Lippen verlassen und deren Migration entlang der Radialgliazellen dann, gewissermaßen „auf halbem Weg“, mitten in der Mantelzone (als zukünftigem Marklager) endet (Altman und Bayer, 1997). Die in den Ventrikularzonen entstandenen neuroglialen Progenitoren verlassen ebenso noch pränatal ihre Keimzonen und migrieren in das Kleinhirngewebe, in welchem sie anschließend weiterproliferieren (Altman und Bayer, 1997; Dusart und Flamant, 2012).

1.3.3.2 Postnatale ontogenetische Entwicklung

Zum Zeitpunkt der Geburt stellt sich die Entwicklung des Kleinhirnes folgendermaßen dar: Das Kleinhirn besteht noch immer aus einem primitiven Ependym, das die Ventrikularzonen mit den bereits entstandenen, aber noch nicht emigrierten Korbzellen, Sternzellen und Golgizellen (Beckinghausen und Sillitoe, 2019) beherbergt. Sowohl die Purkinjezellen und die inhibitorischen Kleinhirnerneuronen als auch die neuroglialen Progenitoren haben die Ventrikularzonen bereits verlassen. Die Körnerzellprogenitoren sind inzwischen alle vom primären ins sekundäre Keimzentrum, die äußere Körnerschicht, gewandert (Edwards et al., 1990) und die exzitatorischen Kleinhirnerneuronen sind ebenso aus den rhombischen Lippen emigriert, sodass diese verschwunden sind. Die Purkinjezellen haben sich in einer mehrschichtigen Ganglienzellschicht (sog. *multilayer*) angeordnet, welche durch eine Molekularschicht von der äußeren Körnerschicht abgegrenzt wird (Edwards et al., 1990). Eine innere Körnerschicht existiert (noch) nicht. Die ursprüngliche Mantelzone ist durch die Immigration der Kleinhirnerneuronen und der Gliazellen zum Marklager geworden.

Im Verlauf der postnatalen Entwicklung bis hin zum adulten Kleinhirn (vom Tag der Geburt (:= P0) bis zum einschließlich 59. postnatalen Tag (P59)) finden nun im Wesentlichen drei relevante Entwicklungsprozesse statt: i. die Differenzierung der Purkinjezellen unter Herausbildung einer einschichtigen Purkinjezellschicht, ii. die Beendigung der Proliferation der Körnerzellen mit anschließender Migration von der äußeren in die dadurch entstehende innere Körnerzellschicht (Kuhar et al., 1993) sowie iii. die Herausbildung der in Kapitel 1.3.2 beschriebenen zerebellären Schaltkreise, wobei sich die Punkte i. und ii. binnen der ersten drei postnatalen Wochen (P0 bis einschl. P21) ereignen, während sich der Punkt iii. über einen längeren Zeitraum erstreckt (Altman und Bayer, 1997). Im Folgenden soll auf die Entwicklungsprozesse während der ersten drei postnatalen Wochen näher eingegangen werden.

Die postnatale Entwicklung der Purkinjezellen beginnt mit der Ausbildung einer apikal gelegenen Zellschwellung als Somaausziehung am apikalen Zellpol, von welchem sich im Verlauf zunehmend verzweigende Fortsätze im Sinne einer Dendritogenese aussprossen (Holst et al., 2008). Die Purkinjezellen sind zu diesem Zeitpunkt multipolar. Im Rahmen der weiteren Entwicklung bildet sich aus dieser apikalen Schwellung der Stammdendrit der Purkinjezelle, von dem somit alle Dendriten der Zelle ausgehen; etwaige nicht von diesem Stammdendriten ausgehende dendritischen Zellfortsätze bilden sich zurück (Dusart und Flamant, 2012). Zugleich entsteht aus einer Zellkörperverdickung am basalen Zellpol ein aussprossendes Axon; die zunächst multipolare Purkinjezelle wird so bipolar. Die Aussprossung neuer Dendriten und die damit verbundene Herausbildung des charakteristischen Dendritenbaumes in der Molekularschicht dauert in der Folge noch bis zur Beendigung der Körnerzellmigration an (Sotelo und Dusart, 2009), wobei die Purkinjezellen sich zwischen dem Ende der ersten und dem Beginn der zweiten postnatalen Woche sowohl bedingt durch das Wachstum des Kleinhirnes und das damit zunehmende Platzangebot als auch bedingt durch eine postnatale Apoptoseaktivität, die etwa zum Zeitpunkt P3 ihr Maximum erreicht und zur Reduktion der Purkinjezellanzahl führt, strikt nebeneinander (und nicht mehr auch über- bzw. untereinander) im typischen *monolayer* anordnen (Jankowski et al., 2004; Jankowski et al., 2009; Dusart und Flamant, 2012).

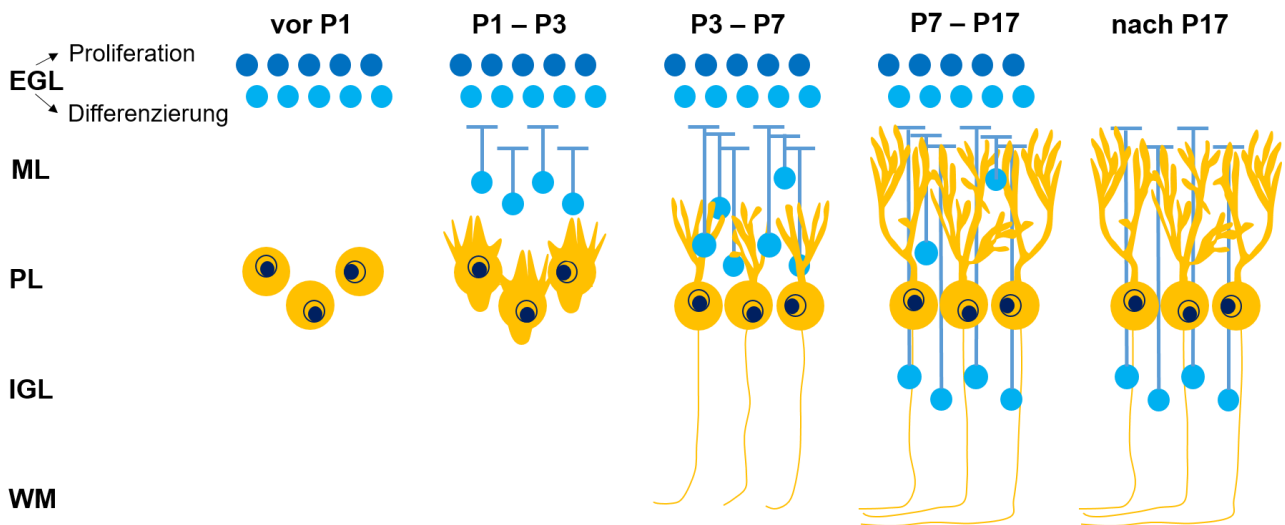


Abb. 4: Schematische Darstellung der postnatalen Entwicklung der Purkinjezellen sowie der Körnerzellen. Blau: Körnerzell(progenitor)en (dunkelblau: noch mitotisch aktiv, hellblau: bereits postmitotisch), orange: Purkinjezellen. EGL: äußere Körnerschicht, ML: Molekularschicht, PL: Purkinjezellschicht, IGL: innere Körnerschicht, WM: Marklager.

Gleichzeitig kommt es zur Proliferation (in der superfiziellen äußeren Körnerzellschicht als Proliferationszone) und zur Differenzierung (in der tiefen äußeren Körnerschicht als Differenzierungszone) der Körnerzellen (Haldipur et al., 2018). Die äußere Körnerschicht erreicht hierbei in der zweiten postnatalen Woche ihre maximale Ausdehnung (Miale und Sidman, 1961). Die Körnerzellen entsenden nach dem Austritt aus dem Zellzyklus und dem Übergang von der äußeren in die innere Zone der äußeren Körnerschicht als postmitotische Neurone zwei entlang einer imaginären Geraden verlaufende Fortsätze, die von gegenüberliegenden Zellpolen ausgehen (Schilling et al., 2008; Haldipur und Millen, 2019; van Essen et al., 2020). Hierbei orientieren sie sich an den senkrecht zur Kleinhirnoberfläche stehenden Bergmanngliazellen als ehemaligen Radialgliazellen (Hartfuss et al., 2001; Haldipur et al., 2018), zu denen ihre Fortsätze wiederum orthogonal stehen – und damit parallel zur Kleinhirnoberfläche. Anschließend migrieren sie zwischen P7 und P21 (Oberdick et al., 1988), im Sinne eines Prinzips der *glial guidance* geleitet von den Bergmanngliazellen (Sotelo et al., 1994), durch die Molekular- und die Purkinjezellschicht hindurch bis in das unter Letzterer gelegene Marklager und lassen sich dort nieder, sodass die (innere) Körnerschicht entsteht (Haldipur et al., 2018). Hierbei wandert der Zellkörper schneller als die Zellfortsätze, sodass sich die typische T-Form der

Körnerzellaxone herausbildet (Tharmalingam und Hampson, 2016). Die Proliferation in der äußeren Körnerschicht dauert bis zum Zeitpunkt P15 an (Haldipur et al., 2018), sodass die äußere Körnerschicht nach Abschluss der Körnerzellmigration im Laufe der dritten postnatalen Woche verschwindet (Miale und Sidman, 1961). Abbildung 4 gestattet einen Überblick über die postnatale Entwicklung der Kleinhirnrinde bezogen auf Purkinje- und Körnerzellen.

Die Myelinisierung der Kletterfasern, Moosfasern und Purkinjezellaxone in der Körnerschicht beginnt zum Ende der ersten postnatalen Woche hin und schreitet dann zusehends fort (Foran und Peterson, 1992).

1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Eine aberrant verminderte TNIP1-Aktivität ist – besonders in Anbetracht seiner bekannten Interaktion mit dem NF κ B-abhängigen Signaltransduktionsweg – als pathogenetischer Faktor sowohl bezogen auf autistische Störungen als auch in Bezug auf andere (auto)inflammatorische Krankheitsbilder des Zentralnervensystems möglich. Bislang ist jedoch noch nicht untersucht worden, ob das TNIP1-Protein überhaupt unter physiologischen Bedingungen in Zellen des Gehirns der Maus exprimiert wird. Da das murine Kleinhirn als Modell für die Erforschung der Gehirnentwicklung hervorragend geeignet ist (Oberdick et al., 1988; Schilling et al., 1991; Smeyne et al., 1995; Baader et al., 1998; Oberdick, 1998; Schilling et al., 2008) und insbesondere dessen Purkinjezellen als Modell für die Entwicklung der Dendriten und synaptischer Verschaltungen außerordentlich attraktiv sind (Kapfhammer und Gugger, 2012), soll in der vorliegenden Arbeit die TNIP1-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung des Kleinhirnes der Maus in verschiedenen Zellarten mittels immunchemischer Färbeverfahren untersucht werden. Dass das TNIP1-Protein im Kleinhirn der Maus exprimiert wird, lassen öffentlich zugängliche *in situ*-Hybridisierungsdaten des *Allen Brain Atlas* vermuten. Der Einsatz immunhistochemischer Doppelfärbungen an aldehydfixierten Vibratomschnitten als auch immunzytochemischer Doppelfärbungen an aldehydfixierten gemischten dissoziierten Primärzellkulturen soll hierbei einerseits die zelluläre Zuordnung der erhaltenen TNIP1-Färbesignale ermöglichen und andererseits die subzelluläre Lokalisation der TNIP1-Anfärbungen zeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Geräte

Zur pH-Einstellung wurde ein pH-Meter der Firma Mettler Toledo, zur Gewichtsermittlung wurde eine Waage der Firma Mettler Toledo verwendet. An Zentrifugen kamen sowohl Gerätschaften der Firma Heraeus als auch der Firma Thermo Fisher Scientific zum Einsatz.

Die darüber hinaus im Rahmen dieses Promotionsprojektes eingesetzten speziellen Gerätschaften werden grundsätzlich an den Stellen benannt, an denen sie erstmals Verwendung finden.

2.1.2 Chemikalien

2.1.2.1 Lösungen

Tabelle 1 listet die Zusammensetzung sämtlicher Lösungen auf, die für die in dieser Dissertation beschriebenen Experimente verwendet wurden und deren Bestandteile und/oder deren Herstellungsverfahren nicht in der zugehörigen Versuchsbeschreibung aufgeführt sind.

Tab. 1: Auflistung der Lösungen in alphabetischer Reihenfolge

Bezeichnung der Lösung	Herstellung	Zielkonzentrationen der gelösten Substanzen
DTT-Puffer	- 3,86 g DTT - <i>Aqua bidestillata ad 250 mL</i>	- 0,1 M DTT

Bezeichnung der Lösung	Herstellung	Zielkonzentrationen der gelösten Substanzen
Hank'sche Lösung	<ul style="list-style-type: none"> - 8 g Natriumchlorid - 0,375 g Kaliumchlorid - 0,350 g Natriumhydrogencarbonat - 0,125 g Dinatriumhydrogenphosphat - 0,368 g Calciumchlorid - 0,317 g Magnesiumchlorid - 1 g Glukose - Ampuwa® (Firma Fresenius Kabi) <i>ad</i> 1.000 mL <ul style="list-style-type: none"> • pH-Einstellung auf pH 7,2 durch Zugabe von Salzsäure oder Natronlauge • Sterilisierende Filtration • Aufbewahrung im Kühlschrank (+4 °C) 	<ul style="list-style-type: none"> - 140 mM Natriumchlorid - 5,2 mM Kaliumchlorid - 4,2 mM Natriumhydrogencarbonat - 0,9 mM Dinatriumhydrogenphosphat - 3,3 mM Calciumchlorid - 3,3 mM Magnesiumchlorid - 5,5 mM Glukose
Hybridisierungs-lösung	<ul style="list-style-type: none"> - 50 mL 100 % (w/v) Formamid - 7 mL Ultra Pure™ 20X SSC buffer (Firma Invitrogen) - 0,1 mL 0,5 M EDTA - 0,5 mL 1 % (w/v) Hefe-tRNA (Firma Invitrogen) - 0,2 mL Tween® 20 (Firma Roth) - 5 mL 10 % (w/v) CHAPS - 0,1 mL 5 % (w/v) Natriumheparin - PBS-DEPC <i>ad</i> 100 mL 	<ul style="list-style-type: none"> - 50 % (w/v) Formamid - 7 % (v/v) Ultra Pure™ 20X SSC buffer - 0,5 mM EDTA - 0,005 % (w/v) Hefe-tRNA - 0,2 % (v/v) Tween® 20 - 0,5 % (w/v) CHAPS - 0,005 % (w/v) Natriumheparin - 150 mM Natriumchlorid - 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat - 6 mM DEPC
Lämmli-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> - 747 mg TRIS - 2 g SDS - 10 mL Glyzerin - 5 mL 2-Mercaptoethanol - 100 mg Bromphenolblau - <i>Aqua bidestillata ad</i> 100 mL 	<ul style="list-style-type: none"> - 6,2 M TRIS - 6,9 M SDS - 10 % (v/v) Glyzerin - 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol - 0,1 M Bromphenolblau
MAB	<ul style="list-style-type: none"> - 50 mL 1 M Maleinsäure - 75 mL 1 M Natriumhydroxid - <i>Aqua bidestillata ad</i> 500 mL <ul style="list-style-type: none"> • pH-Einstellung auf pH 7,5 mit Salzsäure und Natronlauge 	<ul style="list-style-type: none"> - 0,1 M Maleinsäure - 0,15 M Natriumhydroxid
MABT	<ul style="list-style-type: none"> - 0,1 mL Tween® 20 - MAB <i>ad</i> 100 mL 	<ul style="list-style-type: none"> - 0,1 % (v/v) Tween® 20 - 0,1 M Maleinsäure - 0,15 M Natriumhydroxid

Bezeichnung der Lösung	Herstellung	Zielkonzentrationen der gelösten Substanzen
Natriumcitrat-puffer (pH 6,0)	<ul style="list-style-type: none"> - 2,94 g Trinatriumcitrat - <i>Aqua bidestillata</i> ad 1.000 mL <ul style="list-style-type: none"> • pH-Einstellung mittels Zugabe von Salzsäure/Natronlauge 	- 11,4 mM Trinatriumcitrat
Neurobasal-medium	<ul style="list-style-type: none"> - 96 mL Neurobasal™ Medium (Marke Gibco) - 2 mL B-27 Supplement (Marke Gibco) - 1 mL GlutaMAX™ (100X) (Marke Gibco) - 1 mL Penicillin/Streptomycin (100x) (Marke Gibco) 	<ul style="list-style-type: none"> - 96 % (v/v) Neurobasal™ Medium - 2 % (v/v) B-27 Supplement - 1 % (v/v) GlutaMAX™ (100X) - 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100x)
NTMT	<ul style="list-style-type: none"> - 10 mL 1 M TRIS-EDTA - 10 mL 1 M Natriumchlorid - 5 mL 1 M Magnesiumchlorid - 100 µL Tween® 20 - 10 mL 20 mM Levamisol - <i>Aqua bidestillata</i> ad 100 mL 	<ul style="list-style-type: none"> - 100 mM TRIS-EDTA - 100 mM Natriumchlorid - 50 mM Magnesiumchlorid - 0,1 % (v/v) Tween® 20 - 2 mM Levamisol
PBS (pH 7,4)	<ul style="list-style-type: none"> - 8,77 g Natriumchlorid - 1,38 g Dinatriumhydrogenphosphat - <i>Aqua bidestillata</i> ad 1.000 mL <ul style="list-style-type: none"> • pH-Einstellung mittels Zugabe von Salzsäure/Natronlauge 	<ul style="list-style-type: none"> - 150 mM Natriumchlorid - 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat
10x-PBS (pH 7,0)	<ul style="list-style-type: none"> - 87,7 g Natriumchlorid - 13,8 g Dinatriumhydrogenphosphat - <i>Aqua bidestillata</i> ad 1.000 mL <ul style="list-style-type: none"> • pH-Einstellung mittels Zugabe von Salzsäure/Natronlauge 	<ul style="list-style-type: none"> - 1,5 M Natriumchlorid - 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat
PBS ^(Ca/Mg) (pH 7,4)	<ul style="list-style-type: none"> - 8,77 g Natriumchlorid - 1,38 g Dinatriumhydrogenphosphat - 100 mg Magnesiumchlorid - 150 mg Calciumchlorid - <i>Aqua bidestillata</i> ad 1.000 mL <ul style="list-style-type: none"> • pH-Einstellung mittels Zugabe von Salzsäure/Natronlauge 	<ul style="list-style-type: none"> - 150 mM Natriumchlorid - 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat - 1,1 mM Magnesiumchlorid - 1,4 mM Calciumchlorid
PBS-DEPC	<ul style="list-style-type: none"> - 0,1 g DEPC - PBS ad 100 mL <ul style="list-style-type: none"> • Kräftiges Schütteln • Sterilisation durch Autoklavieren 	<ul style="list-style-type: none"> - 150 mM Natriumchlorid - 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat - 6 mM DEPC

Bezeichnung der Lösung	Herstellung	Zielkonzentrationen der gelösten Substanzen
PBST	- 0,1 mL Tween® 20 - PBS <i>ad</i> 100 mL	- 0,1 % Tween® 20 - 150 mM Natriumchlorid - 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat
PBST-DEPC	- 0,1 mL Tween® 20 - PBS-DEPC <i>ad</i> 100 mL	- 0,1 % Tween® 20 - 150 mM Natriumchlorid - 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat - 6 mM DEPC
4 % (w/v) PFA in PBS (pH 7,4)	4 g/133,3 mmol Paraformaldehyd unter Zugabe einiger Tropfen Natronlauge in 50 mL handwarmer <i>Aqua bidestillata</i> auflösen, anschließend ungelöste Paraformaldehydkristalle abfiltrieren. Dem Filtrat 10 mL 10x-PBS (pH 7,0) zusetzen und sodann mit <i>Aqua bidestillata ad</i> 100 mL auffüllen. pH-Einstellung mittels Zugabe von Salzsäure/Natronlauge.	- 1,33 M Paraformaldehyd - 150 mM Natriumchlorid - 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat
4 % (w/v) PFA/ 0,2 % (v/v) GA in PBS (pH 7,4)	4 g/133,3 mmol Paraformaldehyd und 0,8 mL 25 % (v/v) Glutaraldehyd unter Zugabe einiger Tropfen Natronlauge in 50 mL handwarmer <i>Aqua bidestillata</i> auflösen, anschließend ungelöste Paraformaldehydkristalle abfiltrieren. Filtrat 10 mL 10x-PBS (pH 7,0) zusetzen und sodann mit <i>Aqua bidestillata ad</i> 100 mL auffüllen. pH-Einstellung mittels Zugabe von Salzsäure/Natronlauge.	- 1,33 M Paraformaldehyd - 0,2 % (v/v) Glutaraldehyd - 150 mM Natriumchlorid - 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat
4 % (w/v) PFA/ 0,2 % (v/v) GA in PBS-DEPC (pH 7,4)	4 g/133,3 mmol Paraformaldehyd und 0,8 mL 25 % (v/v) Glutaraldehyd unter Zugabe einiger Tropfen Natronlauge in 100 mL handwarmem PBS-DEPC auflösen, anschließend ungelöste Paraformaldehydkristalle abfiltrieren. pH-Einstellung mittels Zugabe von Salzsäure/Natronlauge.	- 1,33 M Paraformaldehyd - 0,2 % (v/v) Glutaraldehyd - 150 mM Natriumchlorid - 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat - 6 mM DEPC

Bezeichnung der Lösung	Herstellung	Zielkonzentrationen der gelösten Substanzen
Proteinextraktionslösung	<ul style="list-style-type: none"> - 6 µL 0,1 % (w/v) Pefabloc® SC (Firma Roth) - 240 µL Proteinaseinhibitor (25x) (Marke cOmplete™, Firma Roche) - 600 µL Phosphataseinhibitor (10x) (Marke PhosphoSTOP™, Firma Roche) - Proteinextraktionspuffer <i>ad</i> 6 mL 	<ul style="list-style-type: none"> - 0,0001 % (w/v) Pefabloc® SC - 4 % (v/v) Proteinaseinhibitor (25x) - 10 % (v/v) Phosphataseinhibitor (10x) - 20 mM TRIS-EDTA - 150 mM Natriumchlorid - 2 mM Dinatrium-EDTA - 2 mM EGTA - 0,1 % (v/v) Triton® X-100
Proteinextraktionspuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 1 mL 1 M TRIS-EDTA - 440 mg Natriumchlorid - 18 mg Dinatrium-EDTA - 19 mg EGTA - 50 µL Triton® X-100 (Firma Roth) - <i>Aqua bidestillata ad</i> 50 mL 	<ul style="list-style-type: none"> - 20 mM TRIS-EDTA - 150 mM Natriumchlorid - 2 mM Dinatrium-EDTA - 2 mM EGTA - 0,1 % (v/v) Triton® X-100
TBE	<ul style="list-style-type: none"> - 10,8 g TRIS - 5,5 g Borsäure - 4 mL 0,5 M EDTA - <i>Aqua bidestillata ad</i> 1.000 mL <ul style="list-style-type: none"> • pH-Einstellung auf pH 8,0 durch Zugabe von Salzsäure oder Natronlauge 	<ul style="list-style-type: none"> - 90 mM TRIS - 90 mM Borsäure - 2 mM EDTA
TBS	<ul style="list-style-type: none"> - 2,4 g TRIS - 8,8 g Natriumchlorid - <i>Aqua bidestillata ad</i> 1.000 mL <ul style="list-style-type: none"> • pH-Adjustierung auf pH 7,6 mit Salzsäure und Natronlauge 	<ul style="list-style-type: none"> - 20 mM TRIS - 150 mM Natriumchlorid
TBST	<ul style="list-style-type: none"> - 100 µL Tween® 20 - TBS <i>ad</i> 100 mL 	<ul style="list-style-type: none"> - 0,1 % (v/v) Tween® 20 - 20 mM TRIS - 150 mM Natriumchlorid
TGS	<ul style="list-style-type: none"> - 3 g TRIS - 14,4 g Glycin - 1 g SDS - <i>Aqua bidestillata ad</i> 1.000 mL 	<ul style="list-style-type: none"> - 25 mM TRIS - 192 mM Glycin - 2,5 mM SDS
Transferpuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 1,21 g TRIS - 7,5 g Glycin - <i>Aqua bidestillata ad</i> 1.000 mL 	<ul style="list-style-type: none"> - 10 mM TRIS - 100 mM Glycin

2.1.2.2 Antikörper

Tabelle 2 listet sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Antikörper auf. Die verwendeten Antikörperkonzentrationen sind in den zugehörigen Methodenabschnitten genannt; weiterführende Informationen zu den verwendeten Antikörpern sind über die angegebenen Bestellnummern bei den Herstellern erhältlich.

Tab. 2: Auflistung der Antikörper in alphabetischer Reihenfolge

Antikörper	Spezies	Klonalität	Bezugsquelle
Primärantikörper			
anti-TNIP1	Kaninchen	polyklonal	Fa. Proteintech (15104-1-AP)
anti-ACTB, HRP-gekoppelt	Kaninchen	polyklonal	Fa. Thermo Fisher Scientific (PA1-183-HRP)
anti-TUBB3	Maus	monoklonal	Fa. Sigma-Aldrich (T8578)
anti-FABP7	Maus	monoklonal	Fa. Abcam (ab277622)
anti-CALB1	Maus	monoklonal	Fa. Sigma-Aldrich (C9848)
anti-Digoxigenin, AP-gekoppelt	Schaf	polyklonal	Fa. Roche (11093274910)
anti-GFAP	Maus	monoklonal	Fa. Merck Millipore (IF03L)
anti-MAP2	Maus	monoklonal	Fa. Sigma-Aldrich (M4403)
anti-MBP	Maus	monoklonal	Fa. Chemicon (MAB381)
anti-OLIG2	Maus	monoklonal	Fa. Merck Millipore (MABN50)
anti-DLG4	Maus	monoklonal	Fa. Thermo Fisher Scientific (MA1-045)
anti-VAMP2	Maus	monoklonal	Fa. Synaptic Systems (104 211)
Sekundärantikörper			
anti-Kaninchen, Alexa Fluor 488- gekoppelt	Ziege	polyklonal	Fa. Invitrogen (A-11008)
anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt	Ziege	polyklonal	Fa. Invitrogen (31460)
anti-Maus, Alexa Fluor 546- gekoppelt	Ziege	polyklonal	Fa. Invitrogen (A-11030)

2.2 Versuchstierhaltung

Alle zum Zwecke dieser Arbeit durchgeführten Versuche fanden mit Wildtypmäusen des Stammes C57BL/6J der Firma Janvier statt. Es kamen Tiere der Altersstufen P0, P3, P5, P8, P9, P15 und adult (> P59) zum Einsatz.

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte im Einklang mit den hierzu gültigen gesetzlichen Regelungen und unter Beachtung der auf deren Grundlage fußenden Vorgaben des städtischen Veterinäramtes und des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen im Tierstall des Anatomischen Institutes der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Die Tiere hatten stets Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*. In den Haltungsräumen wurde ein konstanter Tag-Nacht-Rhythmus im Verhältnis 1:1 sichergestellt; die Raumtemperatur wurde zwischen 20 und 24 °C, die relative Luftfeuchtigkeit des Tierstalles zwischen 40 und 70 % gehalten.

Die Perfusionsfixationen wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen genehmigt (Aktenzeichen 84-02.04.2017.A120) und fanden gemäß dem dem Tierversuchantrag beigefügten Protokoll in Allgemeinanästhesie statt. Sämtliche Perfusionsfixationen wurden vor Ablauf des 31. Mai 2022 durchgeführt.

2.3 Immunhistochemie

Das Prinzip der indirekten immunhistochemischen Färbung basiert auf der Anfärbung definierter Antigenepitope im Gewebe mittels primären und sekundären Antikörpern. Der primäre Antikörper markiert hierbei mit seinem Paratop das Antigenepitop, während der sekundäre Antikörper den primären Antikörper durch die Erkennung und Bindung dessen artspezifischen F_C-Teils markiert. Im Gegensatz zur direkten Immunhistochemie kommt die Antigendeterminante hier also nicht direkt durch einen fluoreszenzmarkierten oder enzymgekoppelten Primärantikörper zur Darstellung, sondern erst durch Erkennung des Erstantikörpers durch den seinerseits fluoreszenzmarkierten oder enzymgekoppelten Zweitantikörper. Bei diesem Experiment kamen fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper zum Einsatz.

Pro Doppelfärbeansatz und untersuchter Altersstufe sind jeweils vermale Sagittalschnitte dreier Individuen gefärbt worden. Das entsprechende Versuchsprotokoll umfasste die Perfusionsfixation, die anschließende Präparation und Herstellung von Vibrationschnitten sowie die Färbeprozedur samt anschließender mikroskopischer Auswertung.

2.3.1 Perfusionsfixation des Versuchstieres

Aus administrativen Gründen wurden die Perfusionsfixationen jeweils in Assistenz unter der Aufsicht der Tierversuchsleitung durchgeführt. Zunächst wurde das Tier mittels intra-peritonealer Injektion einer Kombination der veterinärmedizinisch zugelassenen Wirkstoffe Ketamin (Präparat: Ketamidol[®], Wirkstoffkonzentration: 100 mg/mL) und Xylazin (Rompun[®], Wirkstoffkonzentration: 20 mg/mL) in altersabhängiger Dosierung in Narkose versetzt (siehe Tabelle 3), wobei das Mischungsverhältnis jeweils 4 Volumeneinheiten Ketamidol[®] auf 1 Volumeneinheit Rompun[®] betrug. Die anästhetische und analgetische Komponente der Allgemeinanästhesie wird hierbei hauptsächlich durch das ebenfalls in der Humanmedizin mit gleicher Indikation zum Einsatz kommende Ketamin besorgt, während Xylazin skelettmuskelrelaxierend wirkt und in der Nebensache zusätzlich die anästhetische und analgetische Wirkung des Ketamins unterstützt. Das regelrechte Einsetzen der Narkose wurde durch die Testung einer reflektorischen Abwehrbewegung der Pfote bei Applikation eines Schmerzreizes überprüft.

Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde das Versuchstier zunächst an allen vier Extremitäten in Rückenlage fixiert. Sodann wurden Abdomen und Thorax durch eine mediansagittale Hautinzision mit medianer Sternotomie und Perikardiotomie eröffnet. Anschließend wurden der linke Ventrikel kanüliert und der rechte Vorhof inzidiert. Nach einer initialen Spülung des kardiovaskulären Systems mit einem altersadaptierten Volumen an Ringerlösung (Firma Fresenius Kabi) in altersabhängiger Flussgeschwindigkeit (siehe Tabelle 3) folgte schließlich die Perfusion des Tieres mit dem Perfusionsfixans, wobei hier ebenfalls ein altersadaptiertes Volumen und eine altersabhängige Flussgeschwindigkeit gewählt wurden (siehe Tabelle 3). Bei der eingesetzten Perfusionspumpe handelt es sich um ein Gerät der Firma meredos.

Tab. 3: Kenndaten zur Perfusionsfixation der Versuchstiere nach Altersstufe

Altersstufe	P0	P3	P5	P9	P15	adult
Volumen Ketamin/Xylazin	0,04 mL	0,05 mL	0,05 mL	0,1 mL	0,15 mL	0,3 mL
Volumen Ringerlösung	3,5 mL	3,5 mL	4 mL	6 mL	6 mL	8 mL
Flussrate Ringerlösung	7,0 mL/min	7,0 mL/min	8,0 mL/min	13,0 mL/min	13,0 mL/min	15,0 mL/min
Volumen Fixationslösung	14 mL	14 mL	20 mL	25 mL	30 mL	45 mL
Flussrate Fixationslösung	7,0 mL/min	7,0 mL/min	10,0 mL/min	12,0 mL/min	14,0 mL/min	17,0 mL/min
Dauer der Postfixation	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	4 h	über Nacht

Als Fixationsmittel kam zu Beginn des Projektes 4 % (w/v) PFA in PBS (pH 7,4) zum Einsatz; im Verlauf stellte sich jedoch heraus, dass ohne qualitative Veränderung der jeweiligen immunhistochemischen Färbesignale auch ein Kombinationsfixationsmittel aus 4 % (w/v) PFA und 0,2 % (v/v) GA in PBS (pH 7,4) verwendet werden konnte. Durch die so ausgeprägtere Härte des fixierten Präparates war die Herstellung der Vibratomschnitte erleichtert.

2.3.2 Präparation des Versuchstierkleinhirnes

Unmittelbar nach Abschluss der Perfusion wurde das Gehirn des Versuchstieres präpariert. Hierzu erfolgte zunächst die Dekapitation. Anschließend wurde die Kalotte mit der ihr aufsitzenden Kopfschwarte unter ständiger Benetzung mit Ringerlösung entfernt, indem eine beiderseits vom *Foramen magnum* ausgehende Kraniotomie mit jeweils okzipitotemporofrontaler Schnittführung vorgenommen wurde. Sodann wurde das Gehirn entnommen und anschließend in das jeweils bereits bei der Perfusionsfixation zum Einsatz gekommene Fixans eingelegt. Für diese Immersions-Postfixation wurde eine größenadaptierte Zeit gewählt, wobei eine Diffusionsgeschwindigkeit von 1 mm/h angenommen wurde (siehe Tabelle 3). Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Gehirn jeweils in PBS überführt und nachfolgend im Kühlschrank bei +4 °C gelagert.

2.3.3 Herstellung von Vibratomschnitten

Um die Herstellung von Vibratomschnitten zu ermöglichen, wurde das zu schneidende Gehirn zunächst in einem Agar (2 % (w/v) Agarose in PBS) eingebettet. Hierfür wurde die 2 %-ige Agaroselösung zunächst durch Erhitzen verflüssigt. Anschließend wurde abgewartet, bis die Agaroselösung während des Abkühlens zusehends visköser wurde und eine zunehmend gelartige Konsistenz annahm. Zu diesem Zeitpunkt wurde etwas Agar in ein Kunststoffgefäß gegeben, in welches anschließend auch das fixierte Gehirn eingebracht wurde.

Nach dem Aushärten des Agarosegels wurde der Gelblock auf dem Objektisch des Vibratoms (VT1000S, Firma Leica Biosystems) fixiert. Als Schnittdicke wurden 50 µm gewählt. Die erhaltenen sagittalen Vibratomschitte des Kleinhirnwurmes wurden sodann in 0,1 % (w/v) Natriumazid in PBS überführt und anschließend bei +4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.3.4 Färbeprozedur

Zur Färbung der Vibratomschnitte erfolgte zunächst eine Epitopdemaskierung, mit deren Hilfe für eine Antikörperbindung zuvor unzugängliche Epitope für Antikörper erkennbar gemacht werden können. Diese bestand in einer Inkubation der einzelnen Vibratomschnitte in einem Natriumcitratpuffer (pH 6,0) über 30 min bei +80 °C. Für diesen Schritt wurde ein ThermoMixer® der Firma Eppendorf genutzt. Nach einem Waschschrift in PBS wurden die Schnitte zur Permeabilisierung der Zellmembranen in 0,5 % (v/v) Triton® X-100 in PBS gegeben und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei jeweils 5-minütige Waschschriffe in PBS. Sodann erfolgte die Umbettung in die Blockierlösung, bei der es sich anfangs um eine Lösung von 0,2 % (w/v) Gelatine (Firma neoFroxx)/2 % (w/v) NGS (Marke Gibco) in PBS handelte. Im Laufe des Projektes ließ sich allerdings feststellen, dass die Permeationstiefe der Färbesignale ins Schnittpräparat durch die alternative Verwendung von 0,2 % (w/v) Gelatine/2 % (w/v) NGS/1 % (v/v) Tween® 20 in PBS als Blockierlösung verbessert werden konnte, ohne dass es hierbei zu Qualitätsalterationen des Färbeergebnisses gekommen wäre.

Als Ausnahme von der vorbeschriebenen Regel wurden für die TNIP1/CALB1-Doppelfärbungen aufgrund im Labor vorhandener, den Umgang mit dem CALB1-Antikörper betreffender Erfahrungen PBS^(Ca/Mg)- anstelle PBS-basierter Blockierlösungen verwendet. Nachdem die erhaltenen TNIP1-Signale sich in Testfärbungen, die im Rahmen der Etablierung des hier beschriebenen Färbeprotokolls durchgeführt wurden, gleichwertig zu denen, die mit der regulären Vorgehensweise erhalten werden konnten, dargestellt hatten, war diese Abweichung möglich.

Nach einer 2-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Schnitte in die Primärantikörperinkubationslösung überführt, in der sie anschließend über Nacht bei +4 °C inkubiert wurden. Die Primärantikörperinkubationslösung bestand aus den beiden zur Doppelfärbung verwendeten Primärantikörpern, die – abhängig von den verwendeten Antikörpern – in variablen v/v-Mischungsverhältnissen in der entsprechenden Blockierlösung gelöst waren; für die zugehörige Negativkontrolle wurde die entsprechende Blockierlösung ohne Primärantikörperzusatz genutzt. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die durchgeführten Doppelfärbungen, über die jeweiligen Volumenanteile, die die Antikörper an der Blockierlösung hatten, sowie über die Altersstufen, auf denen die Doppelfärbungen jeweils stattfanden.

Tab. 4: Antikörperverdünnungen und Altersstufen nach IHC-Doppelfärbung

Immunhisto- chemische Doppelfärbung	Verdünnung Primärantikörper 1 (Ursprung: Kaninchen)	Verdünnung Primärantikörper 2 (Ursprung: Maus)	Gefärbte Altersstufen
1. anti-TNIP1 2. anti-CALB1	1:100	1:1000	P0, P3, P5, P9, P15, adult
1. anti-TNIP1 2. anti-GFAP	1:100	1:500	P9, P15, adult
1. anti-TNIP1 2. anti-MBP	1:100	1:500	P9, P15, adult
1. anti-TNIP1 2. anti-TUBB3	1:100	1:300	adult
1. anti-TNIP1 2. anti-VAMP2	1:100	1:300	adult
1. anti-TNIP1 2. anti-DLG4	1:100	1:150	adult

Am nächsten Morgen wurden die Schnittpräparate zunächst dreimal hintereinander bei Raumtemperatur für jeweils 10 min in PBS gewaschen, um ungebundene Primärantikörper aus dem Präparat zu entfernen. Sodann erfolgte die Sekundärantikörperinkubation, die lichtgeschützt für 1 h bei Raumtemperatur erfolgte. Die hierfür benötigte Inkubationslösung bestand aus den beiden zur Doppelfärbung verwendeten Sekundärantikörpern (Alexa Fluor 488-gekoppelter *goat anti rabbit*-Antikörper sowie Alexa Fluor 546-gekoppelter *goat anti mouse*-Antikörper), die jeweils im Volumenverhältnis 1:500 in detergensfreier oder –haltiger Blockierlösung (vgl. oben) gelöst waren. Im Anschluss an die Sekundärantikörperinkubation folgten zur Beseitigung ungebundener Sekundärantikörper weitere drei Waschschrte in PBS zu je 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Zwecks Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte sodann bei Raumtemperatur die 10-minütige, lichtgeschützte Inkubation in Hoechst-Reagenz (1 µg/mL Hoechst 33258 in PBS), welche ihrerseits von drei anschließenden, lichtgeschützten Waschschrten in PBS (je 10 min, RT) begleitet wurde. Abschließend erfolgte das Aufbringen auf den Objektträger, wobei darauf geachtet wurde, dass das Präparat nicht austrocknete; zur Befestigung des Deckglases wurde Fluoromount GTM (Firma Invitrogen) verwendet. Die so erhaltenen mikroskopischen Präparate wurden lichtgeschützt im Kühlschrank bei +4 °C gelagert.

2.3.5 Auswertung

Zur Analyse der Färbeergebnisse wurden Aufnahmen mit einem konfokalen LSM (A1 HD25/ECLIPSE Ti2-E, Firma Nikon) angefertigt. Die Aufnahmen wurden hierbei unter Verwendung von Immersionsöl mit dem 60x-Objektiv (Plan Apo λ; NA: 1,40) aufgenommen.

Um eine möglichst hohe Auflösung zu erhalten, wurde anstelle des *resonant*-Modus der *galvano*-Modus gewählt, bei dem die Aufnahmeakquisitionsdauer zwar prolongiert ist, jedoch im Gegenzug die erreichte Auflösung höher ist. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit Lasern der Exzitationswellenlängen 561 nm (Alexa Fluor 546; rotes Emissionssignal), 488 nm (Alexa Fluor 488; grünes Emissionssignal) sowie 405 nm (Hoechst 33258; blaues Emissionssignal).

Als Parameter für das *pinhole* wurde stets ein Wert von 1,0 Airyeinheiten gewählt; die Laserintensität sowie die Parameter für *gain* und *offset* wurden für jede Altersstufe und Doppelfärbung hinsichtlich eines optimalen Kontrasts individuell festgelegt, wobei jedoch die Aufnahmen doppelgefärbter Schnitte verschiedener Individuen derselben Altersstufe stets mit identischen Einstellungen angefertigt wurden, um die Vergleichbarkeit der Färbesignale zu gewährleisten.

2.4 Immunzytochemie

Den immunzytochemischen Färbungen liegt ein zu dem der immunhistochemischen Färbungen analoges Prinzip zugrunde, wobei hier nicht Antigendeterminanten im Gewebe, sondern zelluläre Antigenepitope angefärbt werden.

Pro Doppelfärbeansatz und untersuchter Altersstufe sind jeweils drei Zellkulturen, die jeweils aus Kleinhirnen mindestens dreier Individuen angelegt worden waren, gefärbt worden. Das entsprechende Versuchsprotokoll umfasste die Präparation, das Anlegen einer gemischten dissoziierten Zellkultur sowie die Färbeprozedur samt anschließender mikroskopischer Auswertung.

2.4.1 Präparation der Versuchstierkleinhirne

Zunächst wurden die Tiere nacheinander dekapitiert. Es erfolgte sodann die Präparation der Gehirne in eiskalter Hank'scher Lösung, indem jeweils eine beidseits vom *Foramen magnum* ausgehende Kraniotomie mit beiderseits okzipitotemporofrontaler Schnittführung vorgenommen wurde. Daraufhin wurden die Meningen der Gehirne entfernt und die Kleinhirne schließlich an den Kleinhirnstielen von den Hirnstämmen abgesetzt. Die so erhaltenen hirnhautfreien Kleinhirne wurden im Anschluss für weniger als 30 min in einer Hank'schen Lösung auf Eis gelagert.

2.4.2 Gemischte dissoziierte Primärzellkultur

Nach dem Abnehmen der Hank'schen Lösung erfolgte zunächst die mechanische Dissoziation der Zellen des Kleinhirngewebes. Hierzu wurden die Kleinhirne mittels einer Pinzette möglichst fein mechanisch zerkleinert und anschließend in 10 mL Trypsinlösung

(bestehend aus 1 mL Trypsin-EDTA (10x) (Marke Gibco) und 9 mL Dulbecco's PBS (Marke Gibco)) suspendiert. Im Anschluss erfolgte eine 15-minütige Inkubation im Wasserbad bei +37 °C, wobei alle 2 min ein händisches Schwenken zur Durchmischung erfolgte. Nach dieser enzymatischen Dissoziation erfolgte ein 10-maliges Auf- und Abpipettieren zur weiteren mechanischen Lösung der nun bereits enzymatisch gelockerten Zell-Zell-Kontakte. Anschließend erfolgten die Blockade der Trypsinaktivität durch Zugabe von 10 mL Trypsininhibitorlösung (hergestellt aus 5 mg Trypsininhibitor (Marke Gibco) und 10 mL Dulbecco's PBS (Marke Gibco)) und die Filtration der Suspension mittels eines Kunststoffnetzes von 250 µm Maschengröße. Das erhaltene Filtrat wurde zentrifugiert (220 g; 10 min, RT) und das Zentrifugat daraufhin in 5 mL Neurobasalmedium resuspendiert. Sodann wurde die Zellkonzentration mittels einer Zählkammer nach Neubauer (Firma Marienfeld) bestimmt und anschließend durch Verdünnung mit einem Neurobasalmedium auf eine Zielzelldichte von 10^6 Zellen/mL gebracht. Pro Vertiefung der verwendeten 24-well-Kunststoffzellkulturplatte (Firma TRP Techno Plastic Products) wurden jeweils 400 µL Zellsuspension (entsprechend 4×10^5 Zellen) ausgebracht, wobei die Zellkulturen auf bereits in den Vertiefungen befindlichen Deckgläsern angelegt wurden. Die Ummantelung dieser Deckgläser war vorbereitend vorgenommen worden und bestand in einer mindestens 2-stündigen Inkubation der Deckgläser in Poly-L-Lysin-Lösung (0,02 mg/mL Poly-L-Lysin in Ampuwa®) bei +37 °C.

Die so angelegten, gemischten dissoziierten Zellkulturen wurden im Brutschrank (Heracell™ 150i, Firma Thermo Fisher Scientific) bei +37 °C in einer Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO₂ inkubiert. Das Nährmedium wurde stets am 1. Tag nach der Kulturanlage vollständig (400 µL/Vertiefung) bzw. am 4. Tag nach der Kulturanlage teilweise (200 µL/Vertiefung) ausgetauscht. Die Kulturen wurden jeweils eine Woche lang bebrütet und dann fixiert. Die Fixation erfolgte hierbei als Immersionsfixation, indem das Nährmedium jeweils abgenommen und durch 4 % (w/v) PFA/0,2 % (v/v) GA in PBS (pH 7,4) ersetzt wurde. Nach abgeschlossener Inkubation des Fixans (5 min, 37 °C) wurde dieses jeweils durch 0,1 % (w/v) Natriumazid in PBS ausgetauscht und wurden die fixierten Zellkulturen sodann im Kühlschrank bei +4 °C aufbewahrt.

2.4.3 Färbeprozedur

Zur immunzytochemischen Färbung wurden die Zellkulturen zunächst für 1 h bei Raumtemperatur permeabilisiert und blockiert. Dies geschah durch 60-minütige Inkubation in 10 % (v/v) FCS (Marke Gibco)/0,45 % (v/v) Triton® X-100 in PBS bei Raumtemperatur. Sodann fand die Erstantikörperinkubation über Nacht bei +4 °C statt. Die Erstantikörperinkubationslösung bestand hierbei aus den zur Doppelfärbung verwendeten Erstantikörpern, die jeweils in 10 % (v/v) FCS/0,45 % (v/v) Triton® X-100 in PBS gelöst worden waren; für die zugehörige Negativkontrolle wurde die vorgenannte Lösung ohne Erstantikörperzusatz herangezogen.

Für die TNIP1/OLIG2-Doppelfärbung wurde ein modifiziertes Protokoll genutzt, bei dem zunächst für 30 min bei Raumtemperatur mit 0,5 % (v/v) Triton® X-100 in PBS permeabilisiert, dann dreimalig mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,2 % (w/v) Gelatine in PBS blockiert wurde. Diese Blockierlösung kam hier auch als Lösungsmittel für die Erstantikörper zum Einsatz. Grund für dieses abweichende Vorgehen waren im Labor gesammelte Erfahrungen zum Umgang mit dem OLIG2-Antikörper; nachdem die erhaltenen TNIP1-Signale sich in vorbereitenden Testfärbungen gleichwertig zu denen, die mit der regulären Vorgehensweise erhalten werden konnten, dargestellt hatten, war diese Abweichung möglich.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die durchgeführten Doppelfärbungen, die jeweils eingesetzten Verdünnungen der Antikörper sowie die Altersstufen, auf denen die Tiere sich jeweils zum Zeitpunkt der Kulturanlage befanden.

Am darauffolgenden Morgen folgten drei Waschschriffe in PBS zu je 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend fand die Zweitantikörperinkubation statt; die Zweitantikörperinkubationslösung bestand aus dem Alexa Fluor 488-gekoppelten *goat anti rabbit*- und dem Alexa Fluor 546-gekoppelten *goat anti mouse*-Zweitantikörper, die jeweils im Verhältnis 1:800 in 10 % (v/v) FCS in PBS gelöst worden waren. Nach einer 1-stündigen lichtgeschützten Inkubation bei Raumtemperatur wurde einmalig für 5 min lichtgeschützt mit PBS gewaschen und anschließend die Hoechst-Reagenz (1 µg/mL Hoechst 33258 in PBS) zugesetzt. Nach einer 10-minütigen lichtgeschützten Inkubation bei Raumtemperatur folgte ein weiterer Waschschriff (PBS, 5 min, RT, lichtgeschützt). Anschließend

erfolgte das Eindeckeln in Fluoromount G™. Die so erhaltenen mikroskopischen Präparate wurden anschließend lichtgeschützt bei +4 °C im Kühlschrank gelagert.

Tab. 5: Antikörperverdünnungen und Altersstufen nach ICC-Doppelfärbung

Immunzyto- chemische Doppelfärbung	Verdünnung Primärantikörper 1 (Ursprung: Kaninchen)	Verdünnung Primärantikörper 2 (Ursprung: Maus)	Gefärbte Altersstufen
1. anti-TNIP1 2. anti-MAP2	1:800	1:500	P8
1. anti-TNIP1 2. anti-FABP7	1:800	1:1000	P8
1. anti-TNIP1 2. anti-OLIG2	1:800	1:200	P0, P8
1. anti-TNIP1 2. anti-TUBB3	1:800	1:1000	P8

2.4.4 Auswertung

Zur Analyse der Färbeergebnisse wurden Aufnahmen mit einem konfokalen LSM (A1 HD25/ECLIPSE Ti2-E, Firma Nikon) angefertigt. Die Bilder wurden hierbei unter Verwendung von Immersionsöl mit dem 60x-Objektiv (Plan Apo λ ; NA: 1,40) wie bereits in Kapitel 2.3.4 beschrieben aufgenommen.

2.5 *In situ*-Hybridisierung

Das Prinzip der *in situ*-Hybridisierung besteht in der Darstellung von mRNA-Molekülen mithilfe komplementärer Ribosondenmoleküle, welche unter Verwendung des modifizierten Nukleotids Digoxigenin-Uridintriphosphat anstelle des Nukleotids Uridintriphosphat *in vitro*-transkribiert worden sind. Wird im Anschluss an die Hybridisierung zwischen der zu markierenden mRNA und der markierenden komplementären Ribosonde deren Digoxigenin mittels eines enzymgekoppelten Antikörpers markiert, so findet nach Zusatz eines entsprechenden Enzymsubstrates überall dort, wo die zu markierende mRNA vorkommt, eine Färbereaktion statt.

Für den nachfolgend beschriebenen Versuch wurden zwei adulte Versuchstiere verwendet.

2.5.1 Präparation des Versuchstierkleinhirnes

Zunächst wurde das Gehirn des Versuchstieres präpariert. Nach der Dekapitation wurde die Kalotte mit der ihr aufsitzenden Kopfschwarte unter ständiger Benetzung mit Ringerlösung entfernt, indem eine Kraniotomie mit beiderseits vom *Foramen magnum* ausgehender okzipitotemporofrontaler Schnittführung vorgenommen wurde. Sodann wurde das Gehirn aus der Schädelhöhle entfernt, anschließend auf Trockeneis gelegt und sodann im Tiefkühlschrank bei -80 °C aufbewahrt.

2.5.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Zur Herstellung von Kryoschnitten wurde das Gehirn zuerst aus dem Tiefkühlschrank entnommen und anschließend auf dem Objektisch des Kryostaten (CryoStar™ HM 560, Firma Microm) fixiert. Sodann wurden bei -20 °C 16 µm dicke, sagittale Gefrierschnitte des Kleinhirnwurmes erzeugt und auf Objektträger aufgebracht. Die Aufbewahrung dieser Gefrierpräparate erfolgte anschließend im Tiefkühlschrank bei -80 °C.

2.5.3 Färbeprozedur

2.5.3.1 Herstellung der Ribosonden

Die zur Herstellung der Ribosonden verwendeten Vektorplasmide, in die die *Tnip1*- bzw. die *L7*-cDNA bereits zwischen zwei verschiedenen RNA-Polymerase-Startsequenzen kloniert worden waren, wurden zum Zwecke dieser Arbeit freundlicherweise von Herrn Dr. Sebastian Roeser aus der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Stephan Baader (Anatomisches Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

Zur Herstellung der Ribosonden wurden zunächst die beiden Vektorplasmide linearisiert. Zu diesem Zweck wurden die in Tabelle 6 beschriebenen Ansätze jeweils für 1 h bei +37 °C inkubiert, bevor anschließend die Restriktionsendonukleasen durch Hitzedenatu-

rierung in einem ThermoMixer® (Firma Eppendorf; 20 min, +80 °C) inaktiviert wurden. Sodann fand eine Kontrolle des Linearisierungserfolges durch 60-minütige gelelektrophoretische Auftrennung (PowerPac™ Basic Power Supply, Firma Bio-Rad Laboratories; 80 V, 66 mA) in einem Agarosegel (0,8 % (w/v) Agarose in TBE mit 5 µL/100 mL 1 %-iger (w/v) Ethidiumbromidlösung (Firma Sigma-Aldrich; entsprechend 0,5 µg/100 mL Ethidiumbromid)) statt. Zur Beladung der Geltaschen wurde jeweils 1 µL jeder Plasmidprobe mit jeweils 2 µL Ladefarbstoff (6X DNA loading dye, Firma Thermo Fisher Scientific) und 9 µL Ampuwa® vermischt.

Tab. 6: Linearisierungsansätze der klonierten cDNA-Vektorplasmide

Ansatz	Ansatz I	Ansatz II	Ansatz III	Ansatz IV
10 µg Plasmid	40 µL <i>Tnlp1</i> -Plasmidprobe	40 µL <i>Tnlp1</i> -Plasmidprobe	15 µL <i>L7</i> -Plasmidprobe	15 µL <i>L7</i> -Plasmidprobe
Restriktionsenzym	5 µL <i>NotI</i>	5 µL <i>Bam</i> HI	5 µL <i>Eco</i> RI	5 µL <i>Hind</i> III
10x-Puffer	10 µL rCut smart™	10 µL r3.1	10 µL rCut smart™	10 µL rCut smart™
DEPC-H ₂ O	ad 100 µL	ad 100 µL	ad 100 µL	ad 100 µL

Zur Aufreinigung der linearisierten Plasmide wurde ein kommerziell erhältliches Aufreinigungsset (NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up, Firma Macherey-Nagel) den Empfehlungen des Herstellers folgend verwendet. Zunächst wurden jeweils 100 µL der Linearisierungsansätze mit 200 µL Bindepuffer vermischt und anschließend auf je eine Siliciumdioxidgel-Säule gegeben. Nach einer 30-sekündigen Zentrifugation (11.000 rpm; RT) wurden jeweils 700 µL Waschpuffer auf die vier Säulen gegeben, anschließend erfolgte eine 1-minütige Zentrifugation (11.000 rpm; RT). Dieser Schritt wurde einmalig wiederholt. Darauf folgte eine Zentrifugation ohne vorherigen Waschpufferzusatz (11.000 rpm; 60s, RT). Sodann wurden jeweils 15 µL Elutionspuffer auf die Säulen gegeben; nach 60-sekündiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine weitere Zentrifugation (11.000 rpm; 60s, RT). Die DNA-Konzentration in den Eluat wurde daraufhin anhand einer Probe von je 1,5 µL Eluat bei 260 nm photometrisch bestimmt (BioPhotometer® D30, Firma Eppendorf).

Nach einer zwischenzeitlichen Aufbewahrung im Tiefkühlschrank bei -20 °C fand sodann die Synthese der Ribosondenmoleküle mittels *in vitro*-Transkription der linearisierten cDNA-Vektorplasmide statt (DIG RNA labeling kit (SP6/T7), Firma Roche). Zu den in Tabelle 7 beschriebenen Ansätzen wurden nach einer 2-stündigen Inkubation bei +37 °C jeweils 1 µL DIG-NTP, 1 µL 10x-Puffer, 1 µL RNA-Polymerase und 7 µL DEPC-H₂O (nukleasefreies, autoklaviertes, DEPC-behandeltes Wasser; Firma Roth) hinzugefügt.

Tab. 7: *in vitro*-Transkriptionsansätze der linearisierten cDNA-Vektorplasmide

Ansatz	Ansatz I	Ansatz II	Ansatz III	Ansatz IV
1 µg DNA-Plasmid	3,6 µL	3,5 µL	3,6 µL	3,6 µL
20x-RNase-Inhibitor	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
DIG-NTP	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
10x-Puffer	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
RNA-Polymerase	2 µL SP6	2 µL T7	2 µL SP6	2 µL T7
DEPC-H ₂ O	<i>ad</i> 20 µL	<i>ad</i> 20 µL	<i>ad</i> 20 µL	<i>ad</i> 20 µL

Es folgte eine 1-stündige Fortsetzung der Inkubation bei +37 °C. Sodann wurden die Ansätze auf Eis gestellt und jeweils 1,5 µL 0,4 M EDTA, 3,8 µL 4 M Lithiumchlorid sowie 100 µL 100 % (v/v) Ethanol hinzugegeben. Nach einer erneuten Aufbewahrung im Tiefkühlschrank (-20 °C) fand eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 20 min bei +4 °C statt. Das Zentrifugat wurde jeweils zunächst in 100 µL 80 % (v/v) Ethanol resuspendiert, dann erneut zentrifugiert, anschließend getrocknet und schließlich in 25 µL DEPC-H₂O gelöst.

Zur gelelektrophoretischen Kontrolle des Transkriptionserfolges wurde abschließend jeweils 1 µL aus jedem Ansatz entnommen und mit jeweils 5 µL RNA-Ladepuffer (Firma Fermentas) sowie 4 µL Ampuwa[®] versetzt. Nach Denaturierung der RNA (5 min, +95 °C) erfolgten das Einbringen in ein Agarosegel (1,2 % (w/v) Agarose in TBE mit 5 µL/100 mL 1 %-iger (w/v) Ethidiumbromidlösung (Firma Sigma-Aldrich; entsprechend 0,5 µg/100 mL Ethidiumbromid)) und die folgende gelelektrophoretische Auftrennung (PowerPac[™] Basic Power Supply, Firma Bio-Rad Laboratories; 60 min; 80 V, 66 mA). Die in DEPC-H₂O resuspendierten Ribosonden wurden bei -80 °C im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

2.5.3.2 Ribosondenhybridisierung

Zunächst wurden die in Kapitel 2.5.2 erhaltenen Gefrierschnitte in 4 % (w/v) PFA/0,2 % (v/v) GA in PBS-DEPC (pH 7,4) fixiert und nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur dreimal hintereinander in PBST-DEPC gewaschen. Sodann wurden die Schnitte in 50 % PBST-DEPC/50 % Hybridisierungslösung (5 min, RT) und Hybridisierungslösung (60 min, +45 °C) prähybridisiert.

Die Kryoschnitte wurden anschließend je nach Ansatz mit unterschiedlichen Sonden behandelt (siehe Tabelle 8). Für jeden Ansatz wurden jeweils 2,3 µL der in Kapitel 2.5.3.1 erhaltenen Ribosondenlösungen (Sondenkonzentration: 0,4 µg/µL) mit 100 µL Hybridisierungslösung vermischt und anschließend auf die Schnitte gegeben. Es folgte die Hybridisierung über Nacht bei +45 °C.

Am darauffolgenden Morgen wurden nichthybridisierte Ribosondenmoleküle durch dreimaliges Waschen zu je 30 min bei +60 °C mit Hybridisierungslösung entfernt. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung durch 50 % Hybridisierungslösung/50 % MABT ersetzt und für 15 min bei +60 °C inkubiert.

Tab. 8: Ansätze zur Ribosondenhybridisierung

Ansatz	Ansatz I	Ansatz II	Ansatz III	Ansatz IV
Durch <i>in vitro</i> -Transkription erhaltene Sonde	<i>sense</i> -Ribosonde zur <i>Tnip1</i> -cDNA	<i>antisense</i> -Ribosonde zur <i>Tnip1</i> -cDNA	<i>sense</i> -Ribosonde zur <i>L7</i> -cDNA	<i>antisense</i> -Ribosonde zur <i>L7</i> -cDNA
Sondenlänge nach Vektorsequenzkarte	623 Nukleotide	618 Nukleotide	440 Nukleotide	443 Nukleotide
Zweck	Negativkontrolle zur <i>Tnip1</i> -mRNA-Färbung	<i>Tnip1</i> -mRNA-Färbung	Negativkontrolle zur <i>L7</i> -mRNA-Färbung	<i>L7</i> -mRNA-Färbung als Positivkontrolle zur <i>Tnip1</i> -mRNA-Färbung

2.5.3.3 Färbereaktion

Zur Färbung der Schnitte wurde zunächst dreimal hintereinander bei Raumtemperatur mit MABT gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation in MABT (60 min, RT). Sodann wurden unspezifische Antikörperbindungen durch Inkubation in 2 % (w/v) Blockierungsreagenz (Firma Roche) in MABT (60 min, RT), im Anschluss wiederum durch Inkubation in 2 % (w/v) Blockierungsreagenz/2 % (v/v) NGS in MABT (60 min, RT) blockiert. Es folgte die Antikörperinkubation (über Nacht, +4 °C), wobei hierfür ein Alkalische Phosphatase-gekoppelter Digoxigenin-Antikörper im Verhältnis 1:2000 (v/v) in 2 % (w/v) Blockierungsreagenz/2 % (v/v) NGS in MABT gelöst worden war.

Am nächsten Morgen folgten zunächst sechs Waschschrte in MABT zu je 60 min bei Raumtemperatur. Sodann erfolgte die dreimal aufeinander folgende Inkubation in einem Färbepuffer (NTMT; je 15 min, RT). Anschließend wurden die Schnitte für 7 Tage in einer chromogenen AP-Substratlösung inkubiert (BM Purple, Firma Roche; lichtgeschützt, RT). Zum Schluss wurden die Gefrierschnitte mehrmalig in PBS gewaschen, bevor die Schnitte eingedeckt wurden (Kaiser's glycerol gelatine, Firma Roth).

2.5.4 Auswertung

Zur Auswertung wurden auflichtmikroskopische Aufnahmen mit einem Stereomikroskop (SMZ-745T, Firma Nikon) angefertigt. Hierbei wurde das 10x-Objektiv genutzt.

2.6 Western Blot-Analyse

Die *Western Blot*-Analyse erlaubt den semiquantitativen Nachweis eines mittels Immunglobulinen markierbaren Proteins. Das Prinzip dieses gelelektrophoretischen Verfahrens besteht in der Auftrennung der in einer Probe enthaltenen Proteine nach ihrer Größe, wobei elektrische Ladungen der Proteine neutralisiert werden und somit das Wanderungsverhalten im Gel nicht beeinflussen. Werden die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine im Anschluss auf eine Membran übertragen, kann mithilfe eines spezifischen Antikörpers die Lokalisation des zugehörigen Proteins als Bande dargestellt und können sodann anhand der Helligkeitsunterschiede verschiedener Banden die Mengen an in verschiedenen Proben enthaltenem Protein miteinander verglichen werden.

Für das hier vorliegende Experiment wurden zwei adulte Versuchstiere eingesetzt.

2.6.1 Präparation und Konzentrationsbestimmung der Proteine

Nach einer zervikalen Dislokation mit anschließender Dekapitation erfolgte die Präparation der Versuchstierkleinhirne in PBS. Hierzu wurde jeweils eine vom *Foramen magnum* ausgehende Kraniotomie mit beidseitiger okzipitotemporofrontaler Schnittführung gewählt. Nach der so jeweils möglich gewordenen Abhebung der Kalotte und der Kopfschwarte wurden die Gehirne aus der Schädelhöhle entnommen, woraufhin die Kleinhirne mittels Durchtrennung der Kleinhirnstiele von den Hirnstämmen abgesetzt werden konnten.

Anschließend wurden die Kleinhirne in jeweils 400 µL Proteinextraktionslösung eingelegt und im Gewebehomogenisator (Precellys® 24, Firma Bertin Technologies; 5.000 rpm; 10 s, RT) lysiert. Dann wurden die beiden so erhaltenen Proben für 30 min auf Eis gestellt, wobei das Proteingemisch währenddessen mehrfach intensiv durchmischt wurde. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation (13.000 rpm; 10 min, +4 °C). Der Überstand wurde sodann mittels eines Ultraschallhomogenisators (Bandelin Electronic™ Sonopuls™ HD 2070, Firma Thermo Fisher Scientific; 5 Zyklen zu je 5 s, RT) behandelt.

Jeweils 4 µL der beiden Proben wurden im Anschluss zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet, der übrige Rest wurde zwischenzeitlich im Tiefkühlschrank bei -20 °C gelagert. Die entnommenen 4 µL der Proben wurden zunächst mit jeweils 76 µL Proteinextraktionspuffer vermischt. Sodann wurden für jedes so erhaltene Gemisch jeweils drei Vertiefungen eines 96-well-Kunststoffplattennapfes (Firma TRP Techno Plastic Products) mit jeweils 25 µL Gemisch befüllt. Zur Erstellung einer Eichgeraden zwecks BCA-Analyse wurden darüber hinaus ebenfalls jeweils drei Vertiefungen mit jeweils 25 µL eines jeden hierfür benötigten Standards befüllt. Bei den verwendeten Standardlösungen handelte es sich um Lösungen von BSA (Pierce™ Albumin Standard (Konzentration: 2 mg/mL), Firma Thermo Fisher Scientific) in Proteinextraktionspuffer (siehe Tabelle 9).

Tab. 9: Standardlösungen für die Messungen der BCA-Analyse

Standard- lösung	Zusammensetzung		Aus der Zusammensetzung errechnete Proteinkonzentration der Standardlösung
A	160 µL BSA	0 µL PEP	2.000 µg/mL
B	180 µL BSA	60 µL PEP	1.500 µg/mL
C	152 µL BSA	152 µL PEP	1.000 µg/mL
D	80 µL BSA	80 µL PEP	750 µg/mL
E	144 µL BSA	144 µL PEP	500 µg/mL
F	128 µL BSA	128 µL PEP	250 µg/mL
G	96 µL BSA	96 µL PEP	125 µg/mL
H	32 µL BSA	128 µL PEP	25 µg/mL
I	0 µL BSA	160 µL PEP	0 µg/mL

Zur Durchführung des BCA-Tests (Smith et al., 1985) wurde ein kommerziell erhältliches Testset (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Firma Thermo Fisher Scientific) verwendet, dessen Reagenzien A und B im Verhältnis 49:1 eingesetzt wurden. Zunächst wurden jeweils 200 µL einer Mischung aus den Reagenzien A und B in jede Vertiefung hinzupipettiert; nach einer 30-minütigen Inkubation bei +37 °C wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen (µQuant™-Mikroplattenspektrophotometer, Firma BioTek Instruments).

Aus den Datenpunkten des Standards wurde anschließend mittels linearer Regression eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Proteinkonzentrationen in den Proben jeweils aus dem Mittelwert der drei gemessenen Extinktionswerte pro Probe errechnet werden konnten.

2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurde die SDS-Polyacrylamidelektrophorese genutzt. Hierbei wurde ein Polyacrylamidgel (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gel, Firma Bio-Rad Laboratories) mit jeweils rund 135,5 µg Probeproteingemisch beladen, welches zuvor mit jeweils 10,8 µL Lämmli-Puffer, 4,3 mL DTT-Puffer und Proteinextraktionspuffer ad 43 µL vermischt worden war. Sodann erfolgte die 60-minütige gelelektrophoretische Auftrennung (PowerPac™ Basic Power Supply, Firma Bio-Rad

Laboratories; 100 V, 400 mA) in einer mit TGS als Laufpuffer befüllten Gelelektrophoresekammer (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Firma Bio-Rad Laboratories). Zur Größeneinordnung der erhaltenen Proteinbanden kam ein kommerzielles Proteingemisch (PageRuler®, Firma Thermo Fisher Scientific) zum Einsatz.

Um die Proteinbanden im Anschluss auf eine PVDF-Membran (Firma Thermo Fisher Scientific) übertragen zu können, wurde diese zunächst über 5 min in Methanol aktiviert und anschließend für 5 min in Transferpuffer inkubiert. Sodann wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer genommen und in ein bereits mit der so vorbereiteten PVDF-Membran bestücktes Transfersystem (Trans-Blot® Turbo™, Firma Bio-Rad Laboratories) eingebracht, mit dessen Hilfe die Proteine anschließend auf die vorbereitete PVDF-Membran übertragen wurden (8 min, 25 V, 2,5 A).

2.6.3 Antikörperinkubation und Chemilumineszenzentwicklung

Im Anschluss wurde die Membran dreimalig für jeweils 15 min bei Raumtemperatur in TBS gewaschen, bevor ebenfalls bei Raumtemperatur eine 1-stündige Blockade unspezifischer Antikörperbindungen in 5 % (w/v) Milchpulver (Firma Roth) in TBST erfolgte. Nach dieser Inkubation in Blockierlösung wurde die Membran auf Höhe der 55 kDa-Bande geteilt, sodass obere (Molekulargewichte < 55 kDa) und untere Hälfte (Molekulargewichte > 55 kDa) getrennt gefärbt werden konnten. Die obere Hälfte sollte hierbei das ACTB von etwa 43 kDa Gewicht als Ladekontrolle enthalten (Gilda und Gomes, 2013), die untere das etwa 72 kDa schwere TNIP1 (G'Sell et al., 2015).

Die obere Hälfte wurde sodann über Nacht im Kühlschrank bei +4 °C in einem Gemisch aus einem HRP-gekoppelten ACTB-spezifischen Kaninchenantikörper, der im Volumenverhältnis 1:50.000 in Blockierlösung gelöst worden war, inkubiert und am nächsten Morgen dreimal über je 15 min bei Raumtemperatur in TBST gewaschen. Hier liegt eine direkte immunchemische Färbung vor. Die untere Hälfte hingegen wurde zunächst über Nacht im Kühlschrank bei +4 °C in einem Gemisch aus einem TNIP1-spezifischen Kaninchenantikörper, der in der Verdünnung 1:1.000 in Blockierlösung gelöst worden war, primärantikörperinkubiert. Nach drei Waschschritten in TBST am nächsten Morgen (je 15 min, RT) folgten die Sekundärantikörperinkubation in einem Gemisch aus einem HRP-gekoppelten *goat anti rabbit*-Antikörper, der im Verhältnis 1:30.000 (v/v) in Blockierlösung

gelöst worden war, sowie drei weitere Waschschritte in TBST (je 15 min, RT). Hier liegt eine indirekte immunchemische Färbung vor.

Im Anschluss wurden beide Membranen jeweils mit einem H₂O₂-haltigen Gemisch benetzt, wobei Wasserstoffperoxid das Substrat der HRP darstellt. Zur Herstellung dieses Gemisches wurden die beiden Reagenzien eines kommerziell verfügbaren Herstellers (SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Firma Thermo Fisher Scientific), im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das HRP-Substratgemisch jeweils abgenommen, ohne hierbei die Membranen austrocknen zu lassen.

2.6.4 Auswertung

Die Bildakquisition erfolgte unmittelbar nach der Entwicklung (ImageQuant™ LAS-4000, Firma GE Healthcare Technologies). Das erhaltene Bild wurde mithilfe eines Bildverarbeitungsprogramms (Fiji) ausgewertet, indem die Grauwerte der einzelnen Banden bestimmt wurden. Daran anschließend konnte die Helligkeit der TNIP1-Banden jeweils ins Verhältnis zur Helligkeit der zugehörigen ACTB-Bande als Ladekontrollbande gesetzt werden und konnte ferner das arithmetische Mittel aus den erhaltenen Messwerten für beide untersuchten Versuchstierkleinhirne gebildet werden.

2.7 Statistische Auswertung

Diese Arbeit hatte die Dokumentation der TNIP1-Expression zum Ziel. Da zur Beantwortung dieser Fragestellung ausschließlich die Verteilung von immunchemischen Färbesignalen im Gewebe beziehungsweise in der Zelle betrachtet werden musste, wurden keine morphometrischen Daten erhoben und folglich keine statistischen Analysen durchgeführt. Ferner sind quantitative Vergleiche der Färbeintensitäten in immunchemisch gefärbten Präparaten nur in Ausnahmefällen möglich, weshalb derartige Vergleiche in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden. Durch die *Western Blot*-Analyse sollte lediglich die Expression des TNIP1-Proteins im Kleinhirngewebe überprüft werden; auf eine densitometrische Expressionsanalyse auf verschiedenen Stufen der postnatalen Kleinhirnentwicklung wurde verzichtet, da aufgrund der zu erwarteten ubiquitären Expres-

sion von TNIP1 zelluläre Veränderungen der Proteinexpression absehbar nicht nachweisbar gewesen wären.

3 Ergebnisse

Zunächst sollte untersucht werden, ob und in welchen Zellen des Kleinhirngewebes TNIP1 exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurde die Expression von TNIP1 im Gesamtkleinhirngewebe mittels einer *Western Blot*-Analyse untersucht. Um im Anschluss die zelluläre Verteilung der TNIP1-Expression aufzuklären, folgten eine *in situ*-Hybridisierung sowie immunhistochemische Färbungen an Kleinhirngewebe adulter Versuchstierindividuen. Die so erhaltenen Färbeergebnisse wurden danach mit immunzytochemischen Färbungen gemischter dissoziierter Kleinhirnprimärzellkulturen verglichen (siehe Kapitel 3.1).

Anschließend wurde die TNIP1-Expression in Purkinjezellen sowie in Astrozyten und in Oligodendrozyten mittels immunhistochemischer Färbemethoden im zeitlichen Verlauf der postnatalen Kleinhirnentwicklung näher untersucht (siehe Kapitel 3.2).

Schließlich sollte mit Hilfe immunhistochemischer Verfahren auf subzellulärer Ebene untersucht werden, wo TNIP1 in einzelnen Zellen lokalisiert ist (siehe Kapitel 3.3).

3.1 Die Expression des Proteins TNIP1 in der Kleinhirnrinde der Maus

Die Expression des Proteins TNIP1 im Kleinhirn wurde zunächst mittels einer *Western Blot*-Analyse untersucht. Es zeigten sich in den beiden untersuchten zerebellären Proben adulter Versuchstierindividuen jeweils zwei auf unterschiedlicher Höhe gelegene TNIP1-Banden. Die Banden befanden sich, wie aus Abbildung 5 hervorgeht, dem Größenmarker nach zu urteilen in etwa auf Höhe von 70 bzw. 100 kDa. Bei der 70 kDa-Bande handelt es sich um die TNIP1-Bande, die rechnerisch und nach Angaben in der Literatur dem Molekulargewicht von TNIP1 entspricht (Verstrepen et al., 2009; G'Sell et al., 2015). Die in der vorliegenden Arbeit intensiver gefärbte Bande bei etwa 100 kDa wird in der Literatur zwar bildlich dargestellt, jedoch nicht näher beschrieben (Wagner et al., 2008; Medhavy et al., 2024).

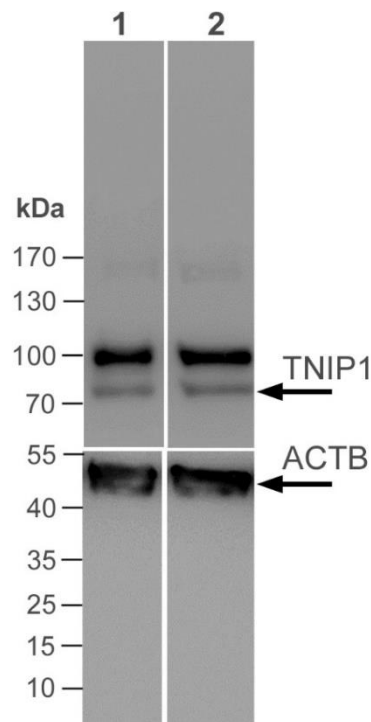


Abb. 5: *Western Blot*-Analyse des Proteins TNIP1 in zwei Kleinhirnen adulter Mäuse (1, 2). Es zeigten sich für jede Probe jeweils eine Bande auf Höhe von etwa 45 kDa, die dem markierten β -Aktin (ACTB) als Ladekontrolle entspricht, sowie jeweils zwei Banden auf Höhe von etwa 70 bzw. 100 kDa. Die 70 kDa-Bande korreliert mit dem Molekulargewicht des Proteins TNIP1.

Die *Immunoblot*-Analyse zeigte, dass das TNIP1-Protein im Kleinhirn der Maus exprimiert wird. Sie erlaubte jedoch keine zelluläre Zuordnung des TNIP1-Signals. Daher schloss sich im Folgenden eine *in situ*-Hybridisierung der *Tnip1*-mRNA an. Zur Einordnung der Ergebnisse der Anfärbung der *Tnip1*-mRNA mittels einer *Tnip1-antisense*-Ribosonde wurde eine Färbung mit einer zu deren Sequenz komplementären *Tnip1-sense*-Ribosonde genutzt. Da die Sequenz dieser Sonde identisch zur Sequenz der *Tnip1*-mRNA ist, war davon auszugehen, dass eine Interaktion mit der *Tnip1*-mRNA nicht stattfinden sollte, sodass artifizielle Färbungen als Hintergrundfärbungen identifiziert werden konnten. Durch Anfärbung der *L7*-mRNA mittels einer *L7-antisense*-Ribosonde konnte gezeigt werden, dass die *in situ*-Hybridisierungsprozedur grundsätzlich funktionierte. Aus den entsprechenden lichtmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 6 geht hervor, dass die *Tnip1*-mRNA in der Kleinhirnrinde der Maus exprimiert wird. Im Vergleich zur internen Kontrolle (Abb. 6A) wurden in der *Tnip1*-mRNA-Färbung vor allem

Perikaryen angefärbt, die auch in der *L7*-mRNA-Färbung (Abb. 6D) sichtbar waren. Basierend auf der Lage der Zellen und der Färbbarkeit der Perikaryen mit einer *L7-antisense*-Sonde ist am ehesten von einer Färbung der Purkinjezellen auszugehen (Abb. 6B). Des Weiteren zeigten sich in Abbildung 6B über das interne Kontrollsignal hinausgehende *Tnip1*-mRNA-Färbungen in Zellen der Körnerzellschicht und der Molekularschicht. Zur Einordnung der Färbesignale in der Molekularschicht sei darauf hingewiesen, dass die *L7*-mRNA in Purkinjezellen nicht bloß in den Zellkörpern, sondern auch in den von ihnen abgehenden dendritischen Zellfortsätzen vorkommt (Wanner et al., 1997).

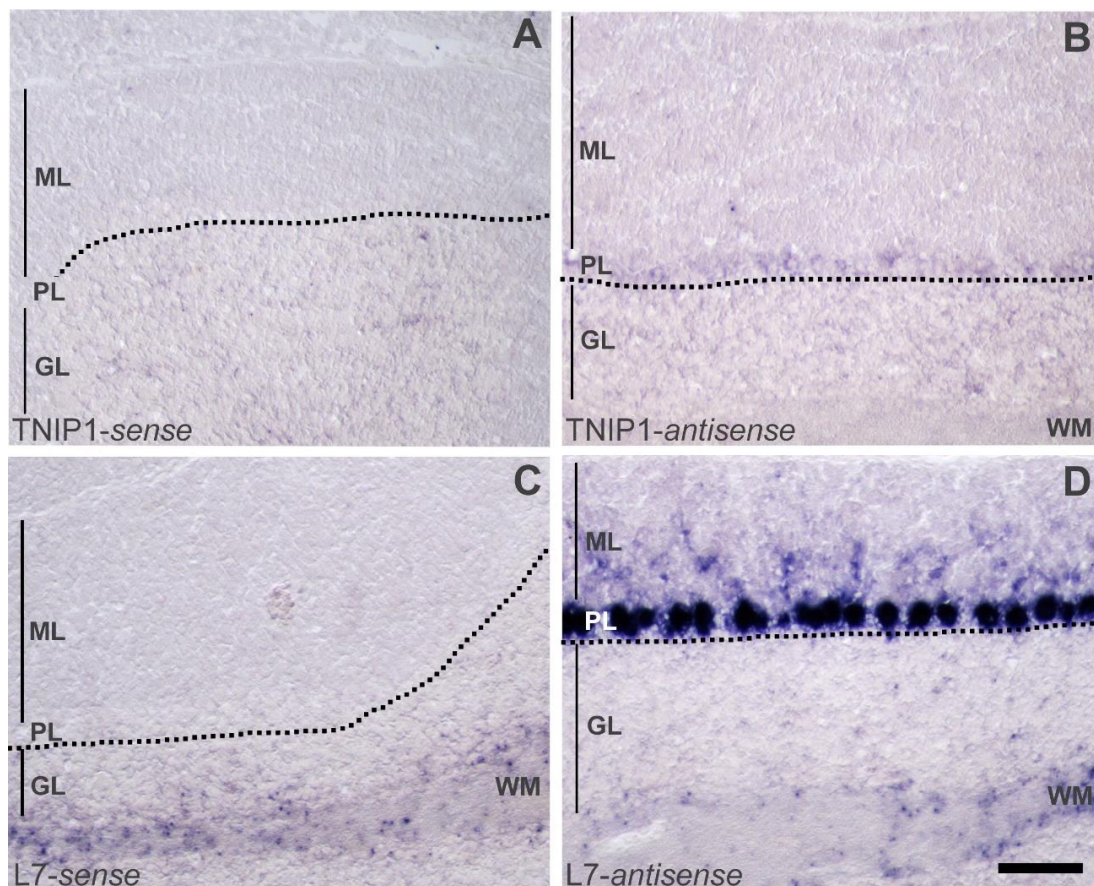


Abb. 6: *In situ*-Hybridisierungen an vermalen, sagittalen Kleinhirngefrierschnitten einer adulten Maus. Die eingezeichnete Strichlinie zeigt die Lage des Übergangs zwischen Purkinjezellschicht und Körnerzellschicht an. A: *In situ*-Hybridisierung mit einer *Tnip1-sense*-Ribosonde (Negativkontrolle der *Tnip1*-mRNA-Färbung); B: *Tnip1*-mRNA-Färbung mit einer *Tnip1-antisense*-Ribosonde; C: *In situ*-Hybridisierung mit einer *L7-sense*-Ribosonde (Negativkontrolle der *L7*-mRNA-Färbung); D: *L7*-mRNA-Färbung mit einer *L7-antisense*-Ribosonde (Positivkontrolle der *Tnip1*-mRNA-Färbung).

Während Purkinjezellen im zerebellären Kortex anhand der Lage ihrer Perikaryen sowie anhand der Größe ihrer Zellkörper morphologisch eindeutig zu identifizieren waren, war die zelluläre Zuordnung der übrigen Färbesignale nur eingeschränkt möglich. Daher sollte im Folgenden zunächst mittels immunzytochemischer Färbungen näher untersucht werden, in welchen der übrigen Zellen der murinen Kleinhirnrinde das TNIP1-Protein exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurde ein Färbeprotokoll genutzt, das freundlicherweise von Frau Dr. Carolina Götsche aus der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Stephan Baader (Anatomisches Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) zur Verfügung gestellt wurde. Diese hatte das entsprechende Färbeprotokoll im Rahmen ihres Promotionsprojektes etabliert (Götsche, 2025).

Um feststellen zu können, ob TNIP1 in Neuronen exprimiert wird, eignet sich der Nachweis immunchemischer TNIP1-Färbesignale in MAP2- bzw. TUBB3-positiven Zellen. Beim mikrotubulusassoziierten Protein 2 (MAP2) handelt es sich um ein spezifisch in Neuronen exprimiertes, zytoskelettal lokalisiertes Protein (Kosik und Finch, 1987; Kurtz et al., 1994; Sánchez et al., 2000), welches neben reifen auch unreife Neurone aufweisen (Dehmelt und Halpain, 2004). Beim β III-Tubulin (TUBB3) handelt es sich ebenfalls um ein in zytoskelettaler Lokalisation vorliegendes und neuronenspezifisches Protein (Roskams et al., 1998; Leterrier et al., 2010), welches jedoch nur in reifen Neuronen exprimiert wird (Ferreira und Caceres, 1992). Die TNIP1/TUBB3-Doppelfärbungen und die TNIP1/MAP2-Doppelfärbungen wurden hierbei an aldehydfixierten gemischten dissoziierten Zellkulturen durchgeführt (Abbildungen 7 und 8). Es zeigten sich *in vitro* sowohl in den MAP2- als auch in den TUBB3-Doppelfärbungen TNIP1-Färbungen, welche jeweils mit den MAP2- bzw. TUBB3-Färbesignalen kolokalisiert waren. TNIP1-Signale konnten sowohl in neuronalen Zellkörpern als auch -fortsätzen nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß zeigten sich Färbesignale sowohl intranukleär als auch extranukleär (Shamilov und Aneskievich, 2018). Da MAP2 im Gegensatz zu TUBB3 sowohl in reifen als auch in unreifen Neuronen vorkommt und da sich auch in der TNIP1/MAP2-Doppelfärbung TNIP1-Signale in Arealen fanden, die MAP2-negativ zur Darstellung kamen, konnte geschlussfolgert werden, dass TNIP1 sowohl in neuronalen Zellen als auch in nichtneuronalen Zellen vorkommt.

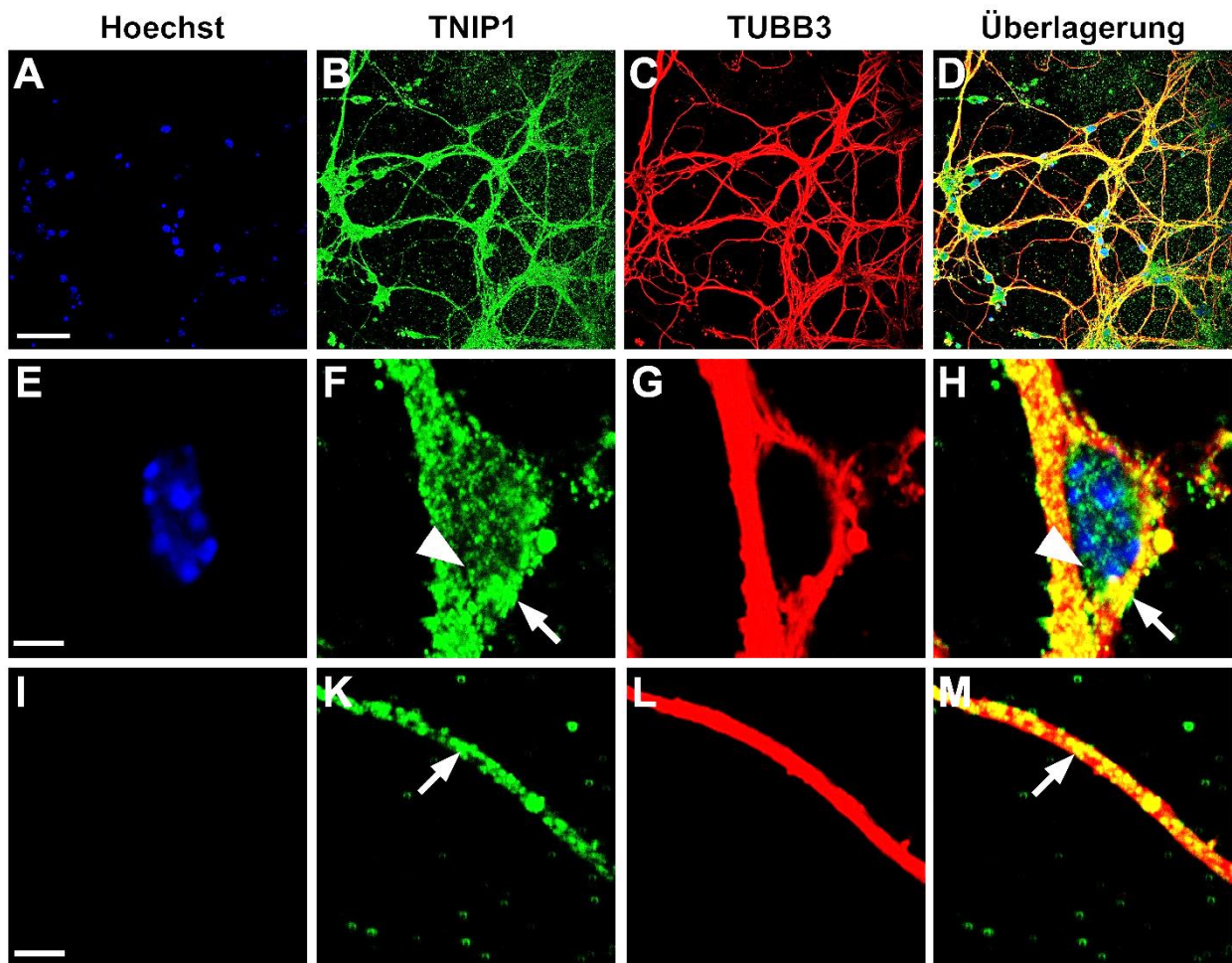


Abb. 7: TNIP1/TUBB3-Immunzytochemie einer aldehydfixierten, gemischten dissoziierten Primärzellkultur dreier Kleinhirne der Altersstufe P8 nach 7-tägiger Kultivierung. A bis D: Übersichtsaufnahme (Maßstab entspricht 50 µm); E bis H: Detailaufnahme eines neuronalen Zellkörpers (Maßstab entspricht 5 µm); I bis M: Detailaufnahme eines neuronalen Zellfortsatzes (Maßstab entspricht 5 µm). Die Pfeile zeigen jeweils zytoplasmatische TNIP1-Färbesignale, während die Pfeilspitzen nukleäre TNIP1-Färbesignale abgrenzen.

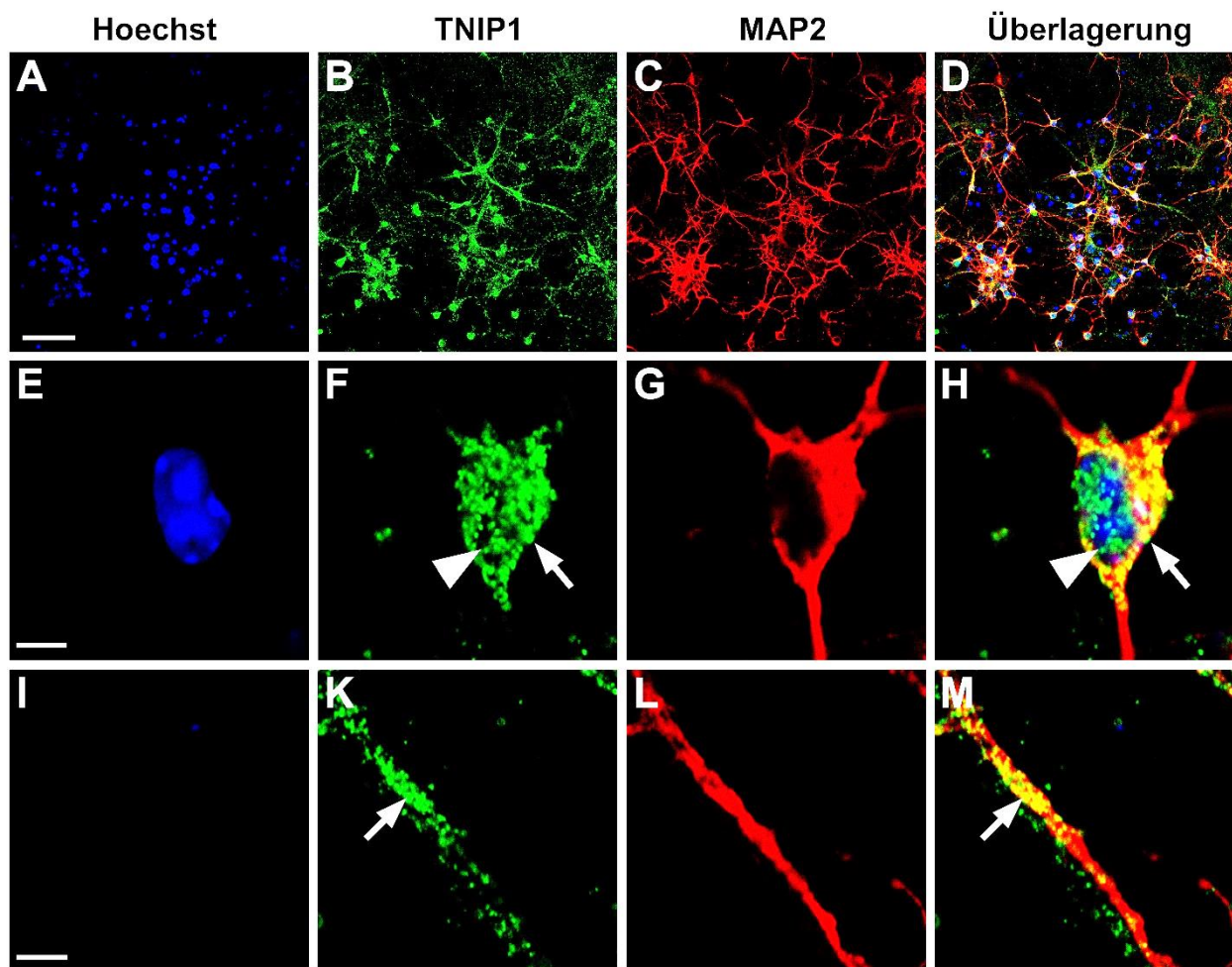


Abb. 8: TNIP1/MAP2-Immunzytochemie einer aldehydfixierten, gemischten dissoziierten Primärzellkultur dreier Kleinhirne der Altersstufe P8 nach 7-tägiger Kultivierung. A bis D: Übersichtsaufnahme (Maßstab entspricht 50 µm); E bis H: Detailaufnahme eines neuronalen Zellkörpers (Maßstab entspricht 5 µm); I bis M: Detailaufnahme eines neuronalen Zellfortsatzes (Maßstab entspricht 5 µm). Die Pfeile zeigen jeweils zytoplasmatische TNIP1-Färbungen, während die Pfeilspitzen nukleäre TNIP1-Anfärbungen demonstrieren.

Da sich aus den neuronalen Doppelfärbungen ergab, dass TNIP1 auch in nichtneuronalen Zellen exprimiert wird, war im Folgenden interessant, ob dies konkret für in gemischten dissoziierten Primärzellkulturen des Kleinhirnes zahlreich vorhandene astroglial sowie oligodendroglial differenzierte Zellen galt. Um eine astrozytäre Lokalisation von TNIP1 nachzuweisen, wurden zunächst immunzytochemische Doppelfärbungen mit dem bereits früh exprimierten Markerprotein BLBP (FABP7) durchgeführt (Feng et al., 1994; Kurtz et al., 1994; Hartfuss et al., 2001). Wie aus Abbildung 9 hervorgeht, waren TNIP1- und

FABP7-Färbesignale kolokalisiert. Somit werden TNIP1-Proteine in Zellen astroglialer Differenzierung *in vitro* exprimiert. Die immunfluoreszenten TNIP1-Anfärbungen fanden sich hierbei sowohl in Fortsätzen als auch in *Somata* von Astrozyten.

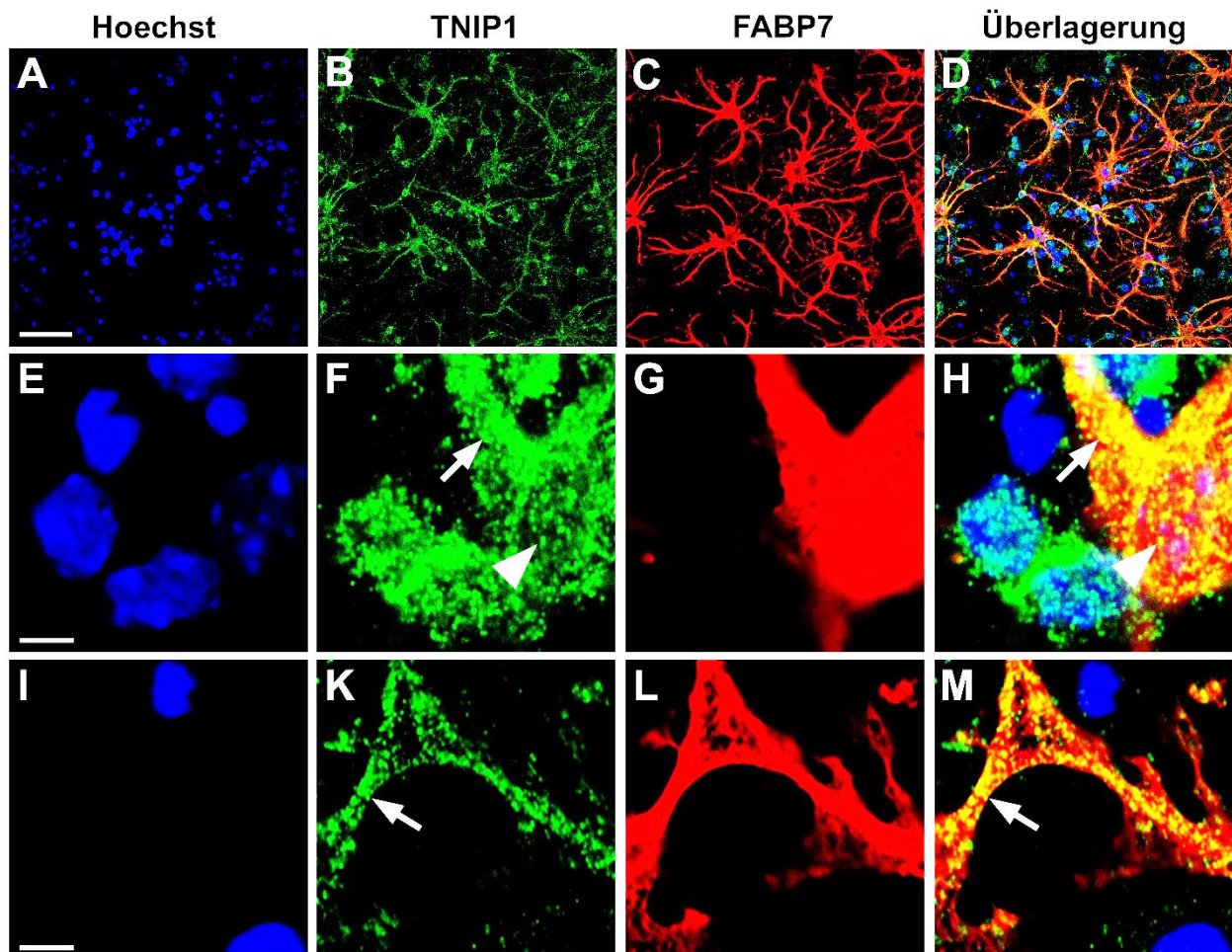


Abb. 9: TNIP1/FABP7-Immunzytochemie einer aldehydfixierten, gemischten dissoziierten Primärzellkultur dreier Kleinhirne der Altersstufe P8 nach 7-tägiger Kultivierung. A bis D: Übersichtsaufnahme (Maßstab entspricht 50 µm); E bis H: Detailaufnahme eines astroglialen Zellkörpers (Maßstab entspricht 5 µm); I bis M: Detailaufnahme eines astroglialen Zellfortsatzes (Maßstab entspricht 5 µm). Die Pfeile zeigen jeweils auf ein zytoplasmatisch lokalisiertes TNIP1-Signal, während die Pfeilspitzen auf nukleär lokalisierte TNIP1-Signale zeigen.

Ob TNIP1-Proteine in oligodendrozytär differenzierten Zellen exprimiert werden, wurde in der vorliegenden Arbeit anhand von TNIP1/OLIG2-Doppelfärbungen an aldehydfixierten

gemischten dissoziierten Primärzellkulturen immunzytochemisch untersucht. Beim OLIG2 handelt es sich um ein oligodendrozytäres Protein, das als Transkriptionsfaktor nur in den Kernen von Zellen oligodendrozytärer Differenzierung vorkommt. Es ist auch in noch nicht ausdifferenzierten und proliferierenden Oligodendrozytenprogenitoren immunchemisch nachweisbar (McQueen et al., 2014; Wei et al., 2021; Zhang et al., 2022). Da es sich bei der OLIG2-Färbung um eine nukleäre Färbung handelt, wurden für die Aufnahmen gezielt Zellen herausgesucht, die nur vereinzelt über Nachbarzellen verfügten und deren perinukleäre Zirkumferenz somit sicher als das Zytoplasma der OLIG2-positiven Zellen identifiziert werden konnte. Wie aus Abbildung 10 hervorgeht, fanden sich in oligodendrogialen Zellen sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch TNIP1-Signale. Somit konnte geschlossen werden, dass TNIP1 *in vitro* in oligodendrozytär differenzierten Zellen exprimiert wird.

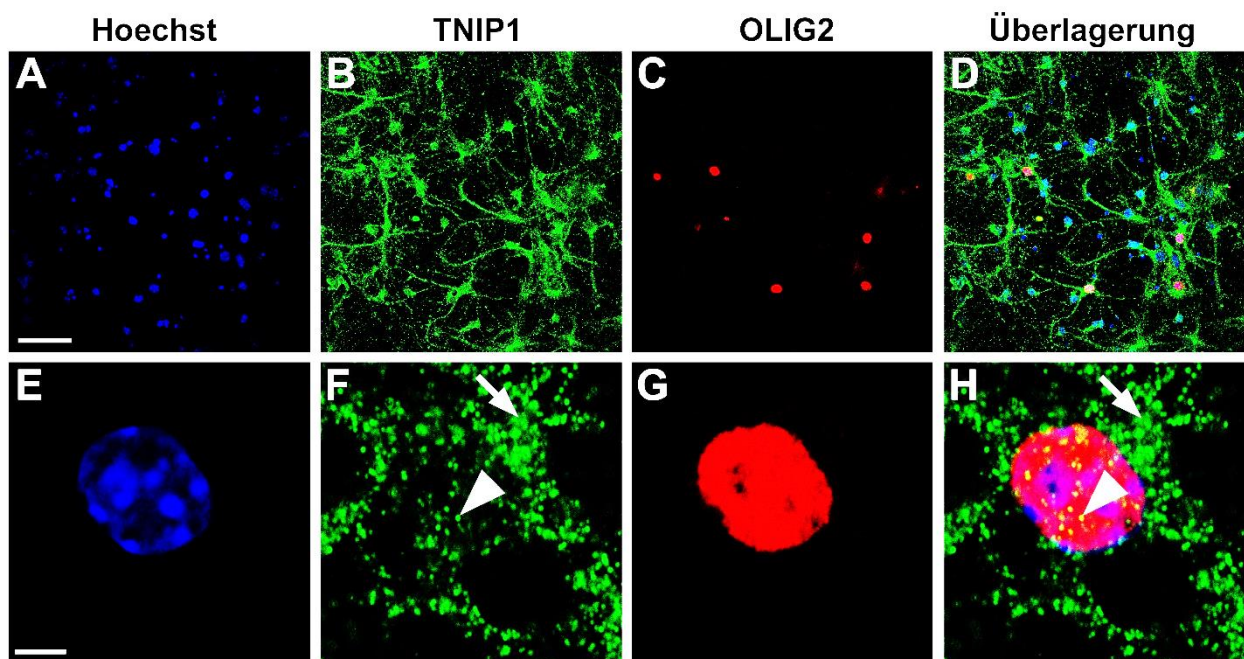


Abb. 10: TNIP1/OLIG2-Immunzytochemie einer aldehydfixierten, gemischten dissoziierten Primärzellkultur dreier Kleinhirne der Altersstufe P8 nach 7-tägiger Kultivierung. A bis D: Übersichtsaufnahme (Maßstab entspricht 50 µm); E bis H: Detailaufnahme (Maßstab entspricht 5 µm). Sowohl im markierten Zellkern (Pfeilspitzen) als auch im diesen umgebenden Zellplasma (Pfeile) finden sich TNIP1-Färbesignale.

Nachdem zuvor bereits nachgewiesen worden war, dass TNIP1 generell in Neuronen exprimiert wird, sollte im Folgenden näher betrachtet werden, ob diese Aussage auch bezogen auf die Purkinjezellen als die zentralen Neurone des zerebellokortikalen Schaltkreises gilt. Zu diesem Zweck wurden entsprechende Doppelfärbungen des TNIP1-Proteins und des purkinjezellspezifischen Proteins CALB1 (Baader et al., 1999; Whitney et al., 2008; Kapfhammer und Gugger, 2012) an aldehydfixierten Vibratomschnitten durchgeführt; aufgrund der allein anhand ihrer unverkennbaren Morphologie bereits eindeutig zuzuordnenden Purkinjezellen waren immunzytochemische Vergleichsfärbungen hier nicht erforderlich. Die Ergebnisse der TNIP1/CALB1-Immunhistochemie sind in Abbildung 11 dargestellt. Aus ihr geht hervor, dass TNIP1- und CALB1-Färbesignale kolokalisiert sind. TNIP1 wird somit von Purkinjezellen exprimiert.

Da TNIP1-Proteine *in vitro* auch in Astrozyten nachgewiesen werden konnten, wurden weiterführend TNIP1/GFAP-Doppelfärbungen an aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitten durchgeführt, um der Frage nachzugehen, ob TNIP1 auch *in vivo* von astrozytär differenzierten Zellen exprimiert wird. Beim GFAP handelt es sich um ein eher spät exprimiertes Markerprotein von Zellen astrozytärer Differenzierung (Bovolenta et al., 1984; Riol et al., 1992; Eng et al., 2000; Malatesta et al., 2008; Mamber et al., 2012). Wie aus der immunhistochemischen Färbung in Abbildung 12 hervorgeht, werden TNIP1-Proteine auch *in vivo* von Zellen astroglialer Differenzierung exprimiert. Die immunfluoreszenten TNIP1-Anfärbungen fanden sich sowohl in allgemeinen Astrozyten der Körnerschicht als auch in den spezialisierten Zellen der Bergmannglia.

Darüber hinaus fanden nach dem *in vitro* erbrachten Nachweis einer TNIP1-Expression in Oligodendrozyten immunhistochemische TNIP1/MBP-Doppelfärbungen an aldehydfixierten Vibratomschnitten statt, um zu untersuchen, ob TNIP1 auch *in vivo* in oligodendrozytär differenzierten Zellen exprimiert wird. Beim MBP handelt es sich um ein Markerprotein, welches in ausdifferenzierten Oligodendrozyten vorkommt (Barbarese et al., 1988; Mitchell et al., 1992); es stellt einen Bestandteil der Myelinscheiden dar (Barbarese et al., 1988). Wie aus Abbildung 13 hervorgeht, werden TNIP1-Proteine in Oligodendrozyten *in vivo* exprimiert, denn TNIP1- und OLIG2-Färbesignale zeigen sich kolokalisiert.

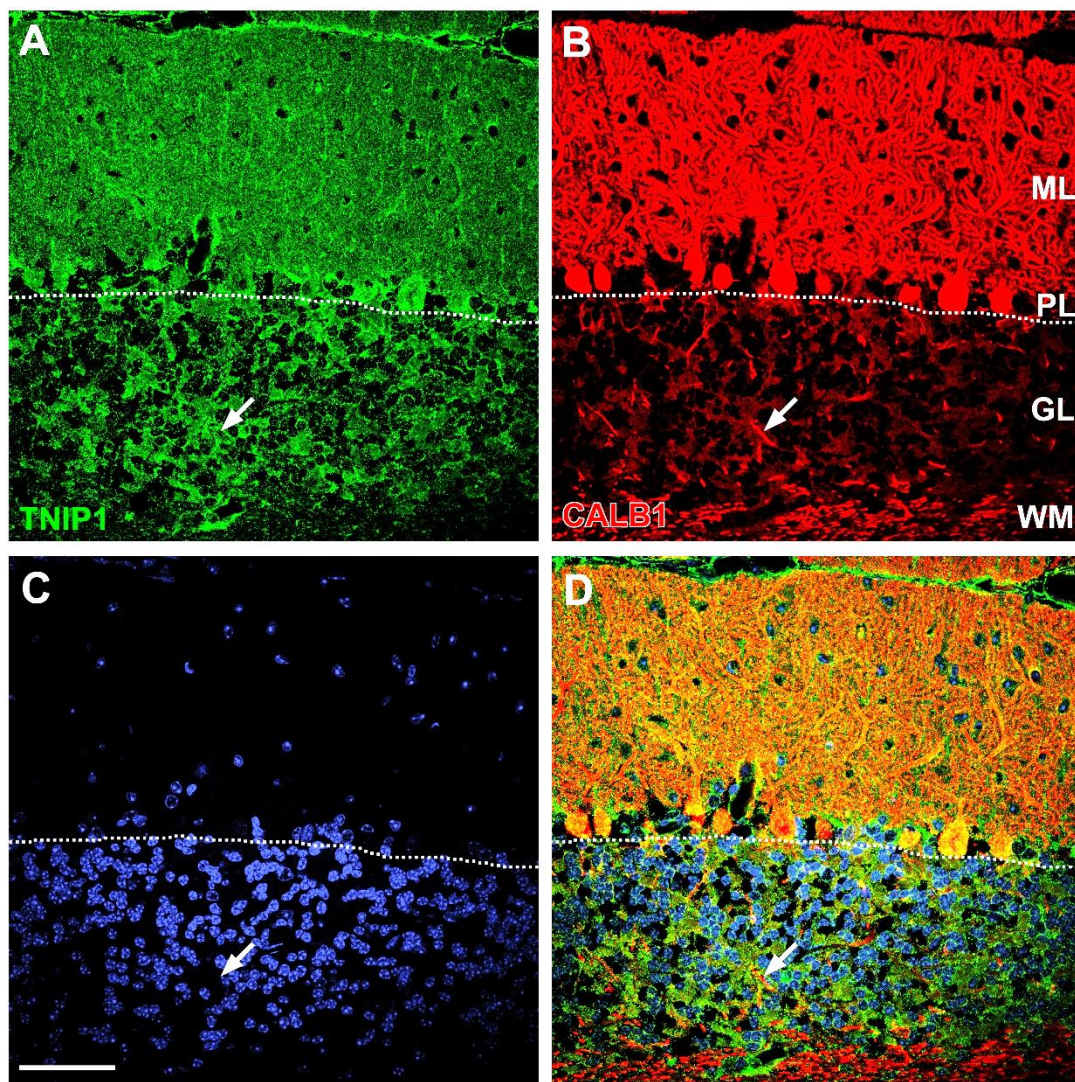


Abb. 11: TNIP1/CALB1-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratonschnitts einer adulten Maus. Übersichtsaufnahme (Maßstab entspricht 50 µm). Der Pfeil zeigt ein Purkinjezellaxon in der Körnerzellschicht.

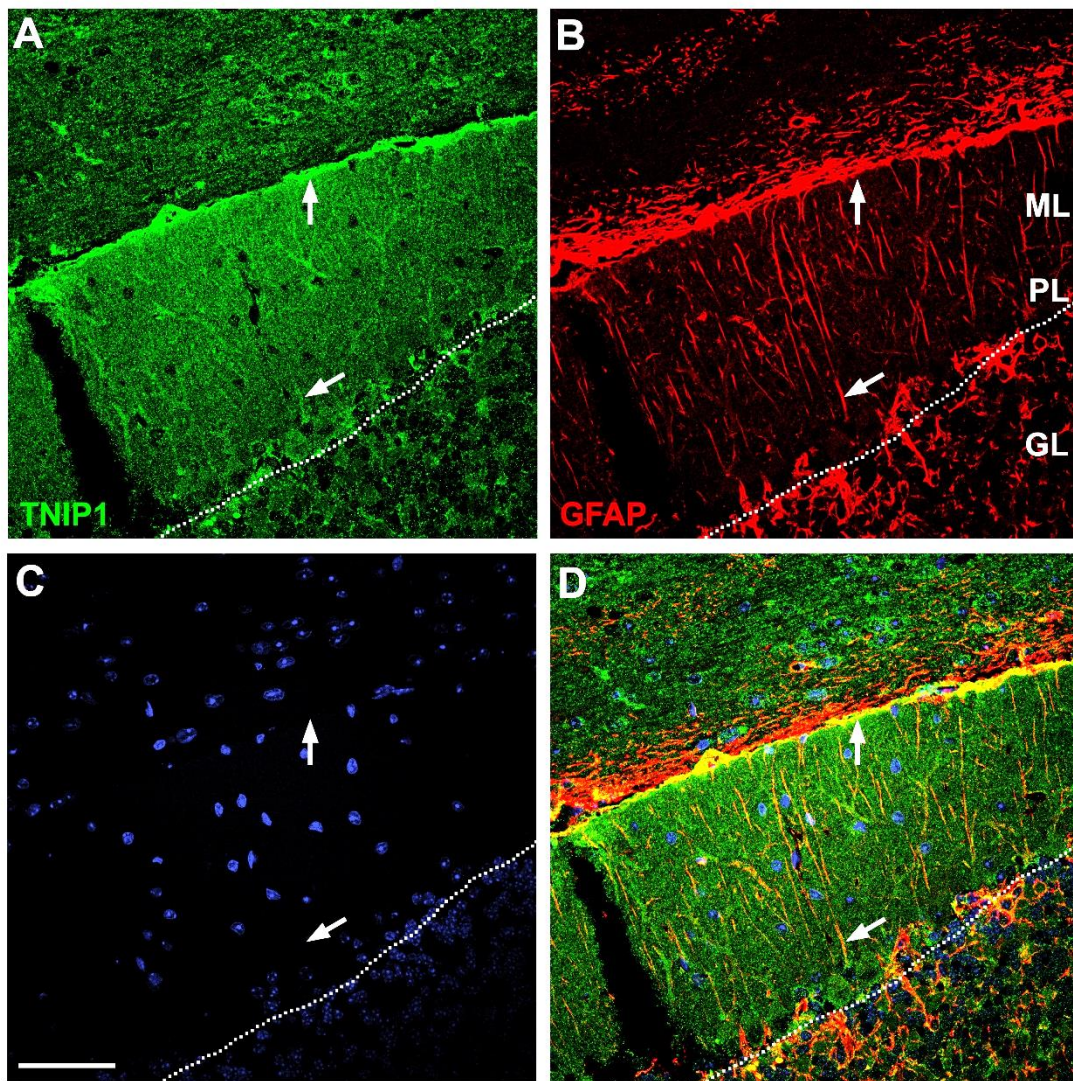


Abb. 12: TNIP1/GFAP-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer adulten Maus. Übersichtsaufnahme (Maßstab entspricht 50 µm). Die Pfeile zeigen die kräftig gefärbte *Membrana limitans glialis superficialis* sowie Bergmanngliazellfortsätze in der Molekularschicht (ML).

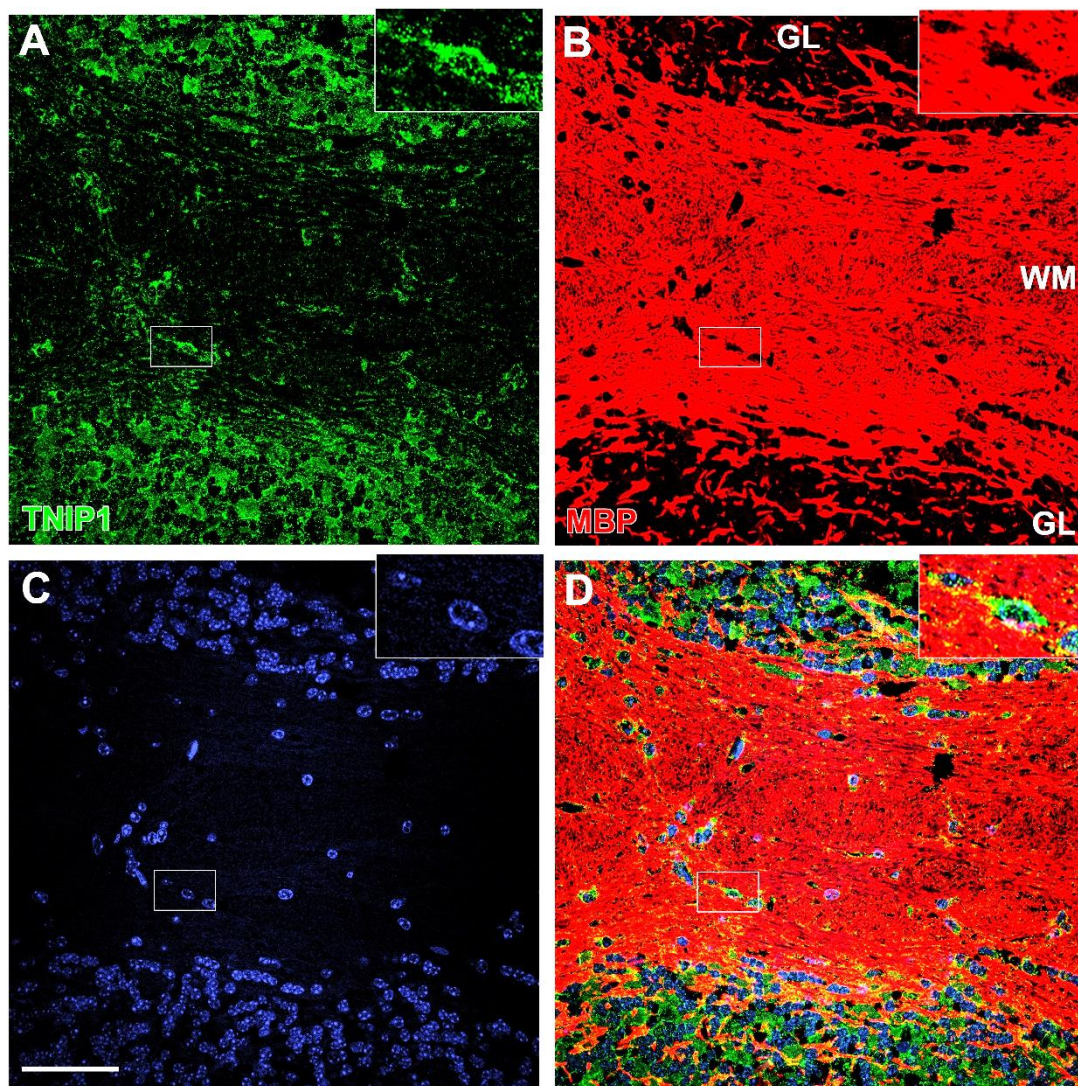


Abb. 13: TNIP1/MBP-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratome Schnitte einer adulten Maus. Übersichtsaufnahme (Maßstab entspricht 50 µm). Der Pfeil zeigt auf einen jeweils oben rechts herausvergrößerten MBP-negativen Zellkörper, der beispielsweise zu einem Oligodendrozyt gehören könnte, da Oligodendrozyten im Bereich des Zellkörpers kein in den Myelinscheiden vorkommendes MBP aufweisen. Der MBP-negative Zellkörper im Marklager erscheint kräftig TNIP1-positiv.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl in den gemischten dissoziierten Primärzellkulturen als auch in den Vibratome Schnitten der Kleinhirne TNIP1-Signale sowohl in neuronal als auch in makroglial differenzierten Zellen nachgewiesen werden konnten.

3.2 Die Expression des Proteins TNIP1 im Laufe der postnatalen Entwicklung der Kleinhirnrinde der Maus

3.2.1 Die Expression von TNIP1 in Purkinjezellen während der postnatalen Kleinhirnentwicklung

Nachdem TNIP1 in Purkinjezellen adulter Mäuse nachgewiesen worden war (siehe Kapitel 3.1), wurde nun die Expression des Proteins TNIP1 im zeitlichen Verlauf der postnatalen Purkinjezellentwicklung untersucht. Zu diesem Zweck erfolgten immunhistochemische TNIP1/CALB1-Doppelfärbungen an aldehydfixierten Vibratomschnitten der Kleinhirne neugeborener bzw. 3, 5, 9 und 15 Tage alter sowie erwachsener Mäuse. Die folgenden Abbildungen 14 bis 19 dokumentieren die Färbeergebnisse.

Unmittelbar postnatal (P0) ließ sich eine TNIP1-Expression in Dendriten und Zellkörpern nachweisen, die in Geweben aller anderen Altersstufen ebenfalls dargestellt werden konnte. Auffällig war auf der Altersstufe P0 die prominente Anfärbung des Axonhügels (siehe Abbildung 14O, 14P und 14Q), die sich auch am dritten postnatalen Tag noch nachweisen ließ (siehe Abbildung 15K, 15M und 15N). Die Axone selbst konnten erst ab P9 sicher abgrenzbar dargestellt werden; ab diesem Zeitpunkt ließen sich auch in ihnen TNIP1-Färbesignale nachweisen (siehe Abbildung 17O, 17P und 17Q sowie 18O, 18P und 18Q). Somit kann zusammenfassend festgestellt werden, dass TNIP1 sowohl in axonalen als auch in dendritischen Fortsätzen sowie in Perikaryen der Purkinjezellen vorkommt. Innerhalb der Zellkörper war das TNIP1-Färbesignal zytoplasmatisch ausgeprägter als nukleoplasmatisch (siehe Abbildung 15O, 15P und 15Q).

Darüber hinaus ergaben sich nebenbefundlich Hinweise auf eine TNIP1-Expression auch in Körnerzellen und deren Progenitoren (siehe Abbildung 16K, 16L und 16M sowie 19O, 19P und 19Q).

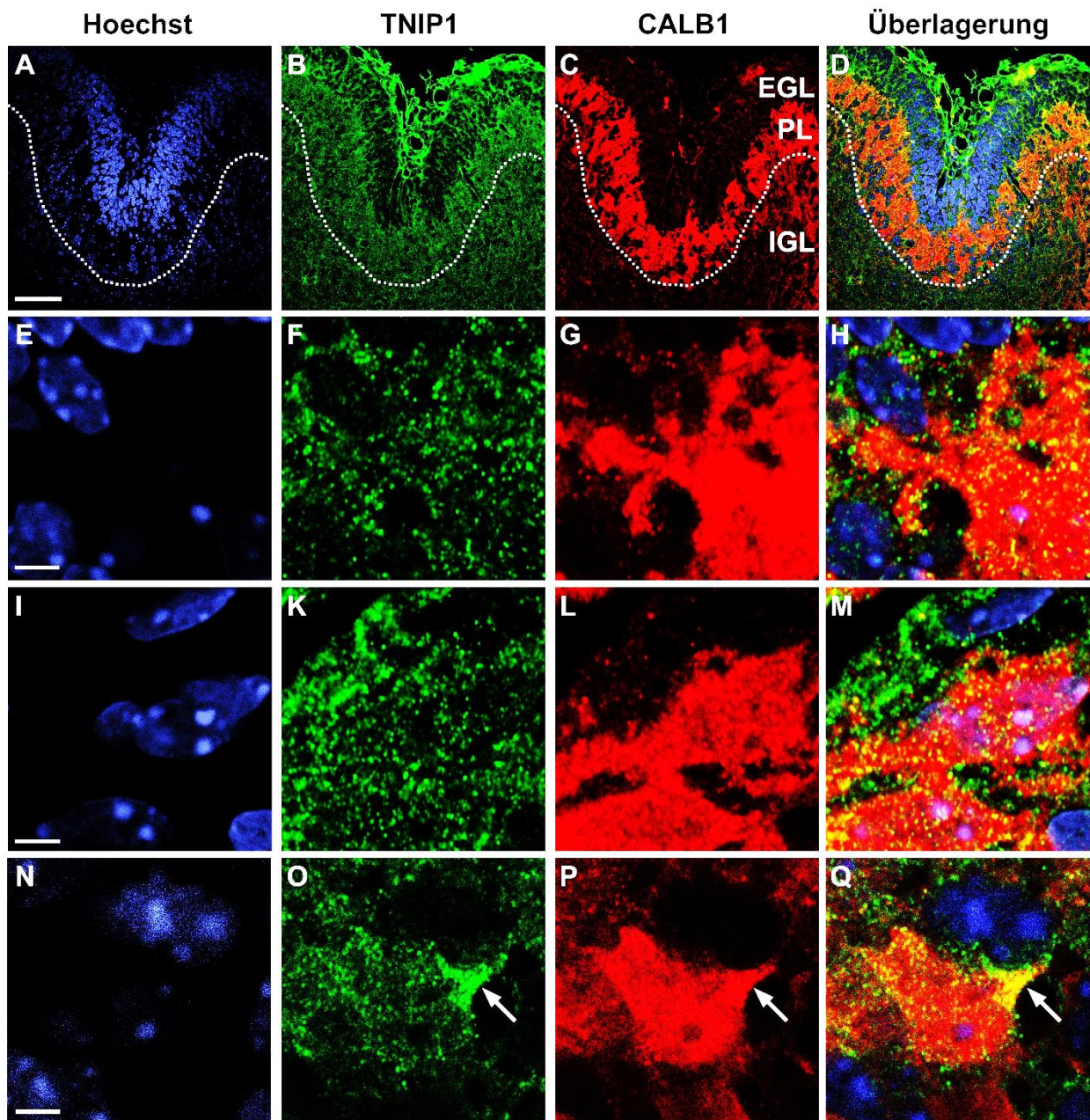


Abb. 14: TNIP1/CALB1-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer neugeborenen Maus (**Altersstufe P0**). A bis D: Übersichtsaufnahme (Maßstab entspricht 50 µm); E bis H: Detailaufnahme eines dendritischen Zellpoles (Maßstab entspricht 5 µm); I bis M: Detailaufnahme eines Zellkörpers (Maßstab entspricht 5 µm); N bis Q: Detailaufnahme eines axonalen Zellpoles (Maßstab entspricht 5 µm). Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen Purkinjezellschicht und Körnerschicht an. Die Pfeile zeigen auf ein kräftig positives TNIP1-Signal im Bereich eines entstehenden axonalen Zellfortsatzes (sog. *basal swelling*). Es fällt in Abbildung 14B auf, dass unmittelbar postnatal die TNIP1-Anfärbung im Bereich der Hirnhäute stärker ist als diejenige im daruntergelegenen Kleinhirngewebe.

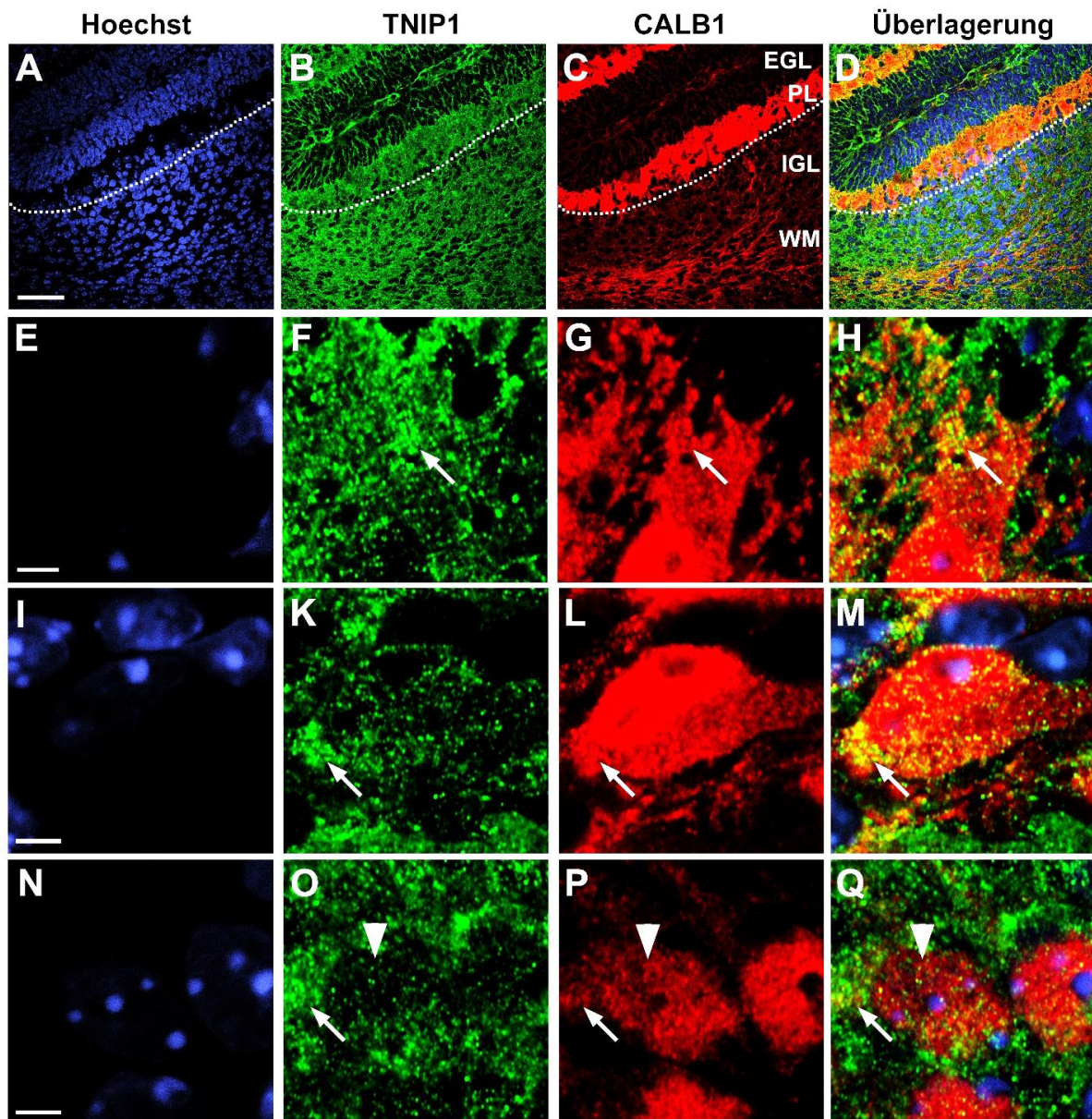


Abb. 15: TNIP1/CALB1-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer drei Tage alten Maus (**Altersstufe P3**). A bis D: Übersichtsaufnahme (Maßstab entspricht 50 µm); E bis H: Detailaufnahme eines dendritischen Zellpoles (Maßstab entspricht 5 µm); I bis M: Detailaufnahme eines Zellkörpers (Maßstab entspricht 5 µm); N bis Q: Detailaufnahme eines axonalen Zellpoles (Maßstab entspricht 5 µm). Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen Purkinjenzellschicht und Körnerschicht an. TNIP1 wird auch auf der Altersstufe P3 im Bereich des Axonhügels der postnatalen Purkinjezelle ausgeprägter als im übrigen Teil des Perikaryons exprimiert (Pfeile in Zeile 3). Zudem fällt auf, dass im Bereich vom *apical swelling* abgehender dendritischer Verästelungen ebenfalls eine ausgeprägtere TNIP1-Expression als im übrigen Teil des Somas imponiert (Pfeile in Zeile 2). Im Zytoplasma der apikalen Zellschwellung (Pfeile in Zeile 4) ist die TNIP1-Expression ausgeprägter als im Nukleoplasma (Pfeilspitzen).

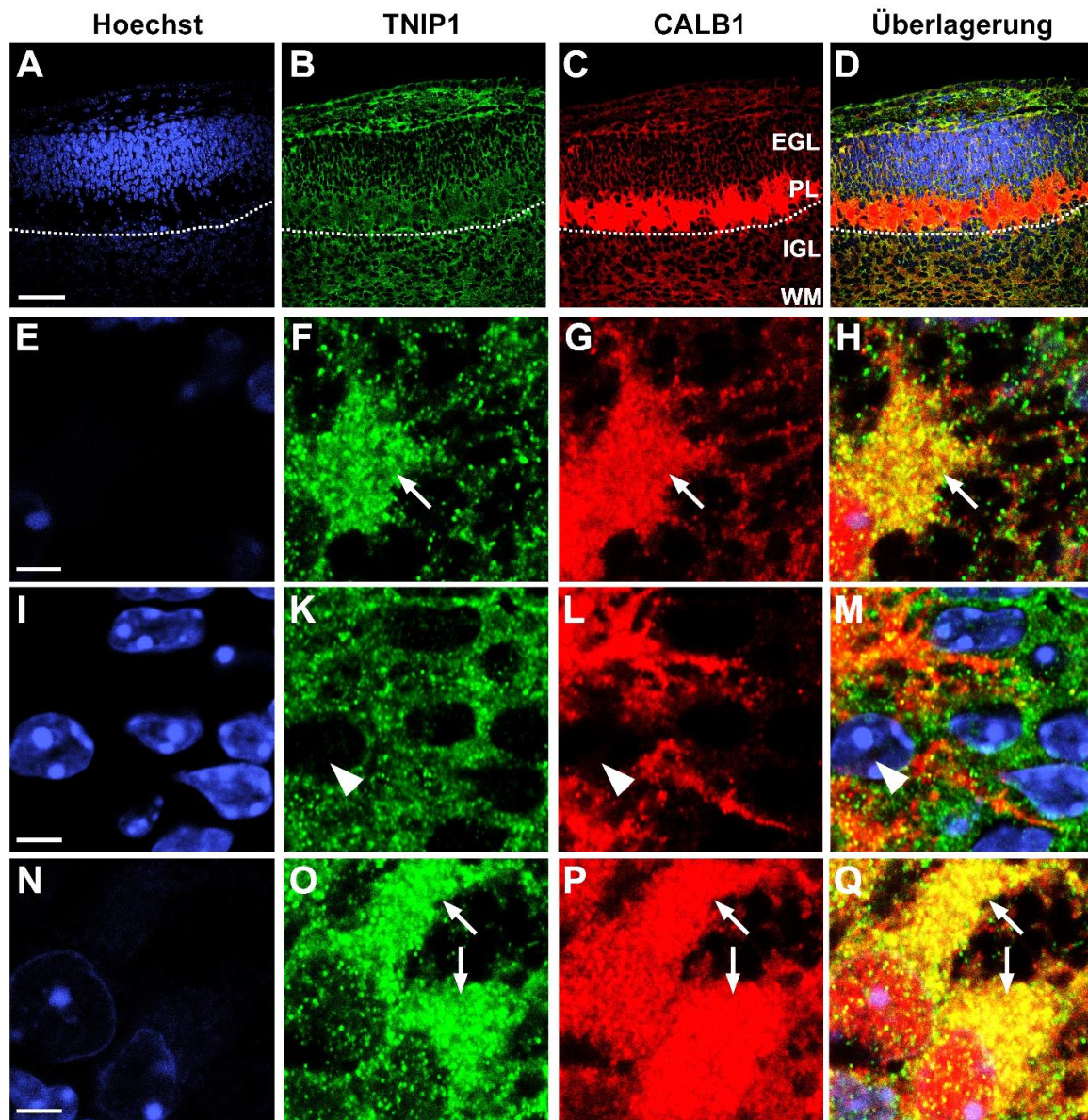


Abb. 16: TNIP1/CALB1-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer fünf Tage alten Maus (**Altersstufe P5**). A bis D: Übersichtsaufnahme (Maßstab entspricht 50 µm); E bis H: Detailaufnahme eines dendritischen Zellpoles (Maßstab entspricht 5 µm); I bis M: Detailaufnahme mehrerer auswachsender Dendriten, die in die äußere Körnerschicht hineinragen (Maßstab entspricht 5 µm); N bis Q: Detailaufnahme zweier Zellkörper (Maßstab entspricht 5 µm). Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen Purkinjezellschicht und Körnerschicht an. Die Pfeile in Zeile 4 zeigen auf kräftig positive TNIP1-Signale im Bereich zweier Purkinjezellkörper. Die Pfeilspitzen zeigen einen TNIP1-signalfreien Zellkern in der äußeren Körnerschicht, der zu einer äußeren Körnerzelle gehören dürfte; dies ist insofern bemerkenswert, als die späteren Zellen der (inneren) Körnerschicht TNIP1-Signale in ihren Kernen aufweisen (vgl. Abb. 17Q). Die Pfeile in Zeile 2 zeigen, dass sich auch am fünften postnatalen Tag ein deutliches TNIP1-Signal im Bereich der apikalen Zellverdickung findet, von der die auswachsenden Purkinjezeldendriten abgehen.

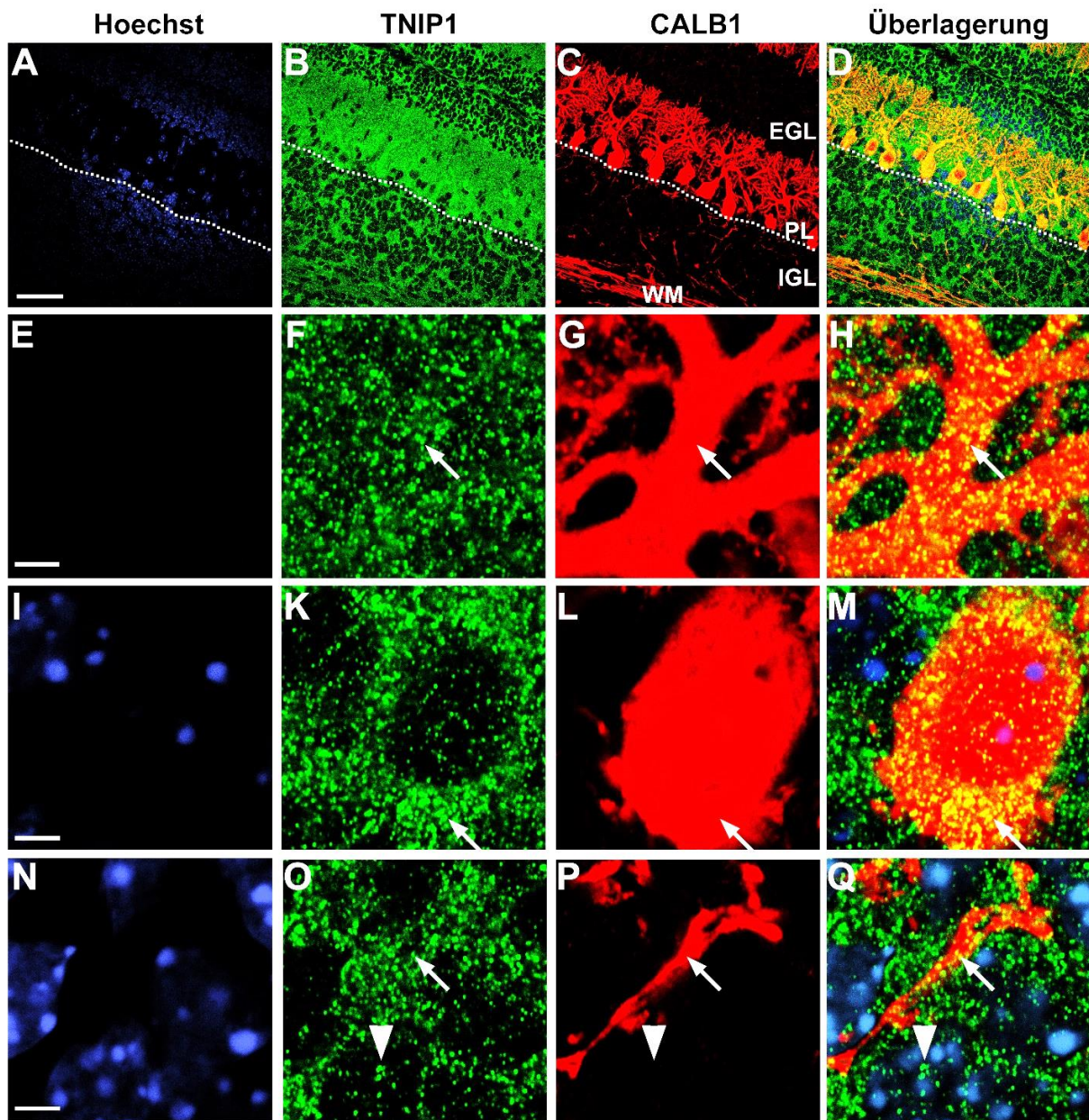


Abb. 17: TNIP1/CALB1-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomechnitts einer neun Tage alten Maus (**Altersstufe P9**). A bis D: Übersichtsaufnahme (Maßstab entspricht 50 µm); E bis H: Detailaufnahme eines Purkinjezeldendriten in der Molekularschicht (Maßstab entspricht 5 µm); I bis M: Detailaufnahme eines Purkinjezellkörpers in der Ganglienzellschicht (Maßstab entspricht 5 µm); N bis Q: Detailaufnahme eines Purkinjezellaxons in der Körnerschicht (Maßstab entspricht 5 µm). Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen Purkinjezellschicht und Körnerschicht an. Die Pfeile zeigen auf TNIP1-Proteine in Dendriten, Zellkörpern und Axonen von Purkinjezellen. Beachten Sie die inzwischen nachweisbaren TNIP1-Färbesignale in den Kernen der Zellen der Körnerschicht (Pfeilspitzen). Nehmen Sie ferner zur Kenntnis, dass in Abbildung 17K erneut das zytoplasmatische TNIP1-Färbesignal intensiver ist als das karyoplasmatische (vgl. Abbildung 15Q).

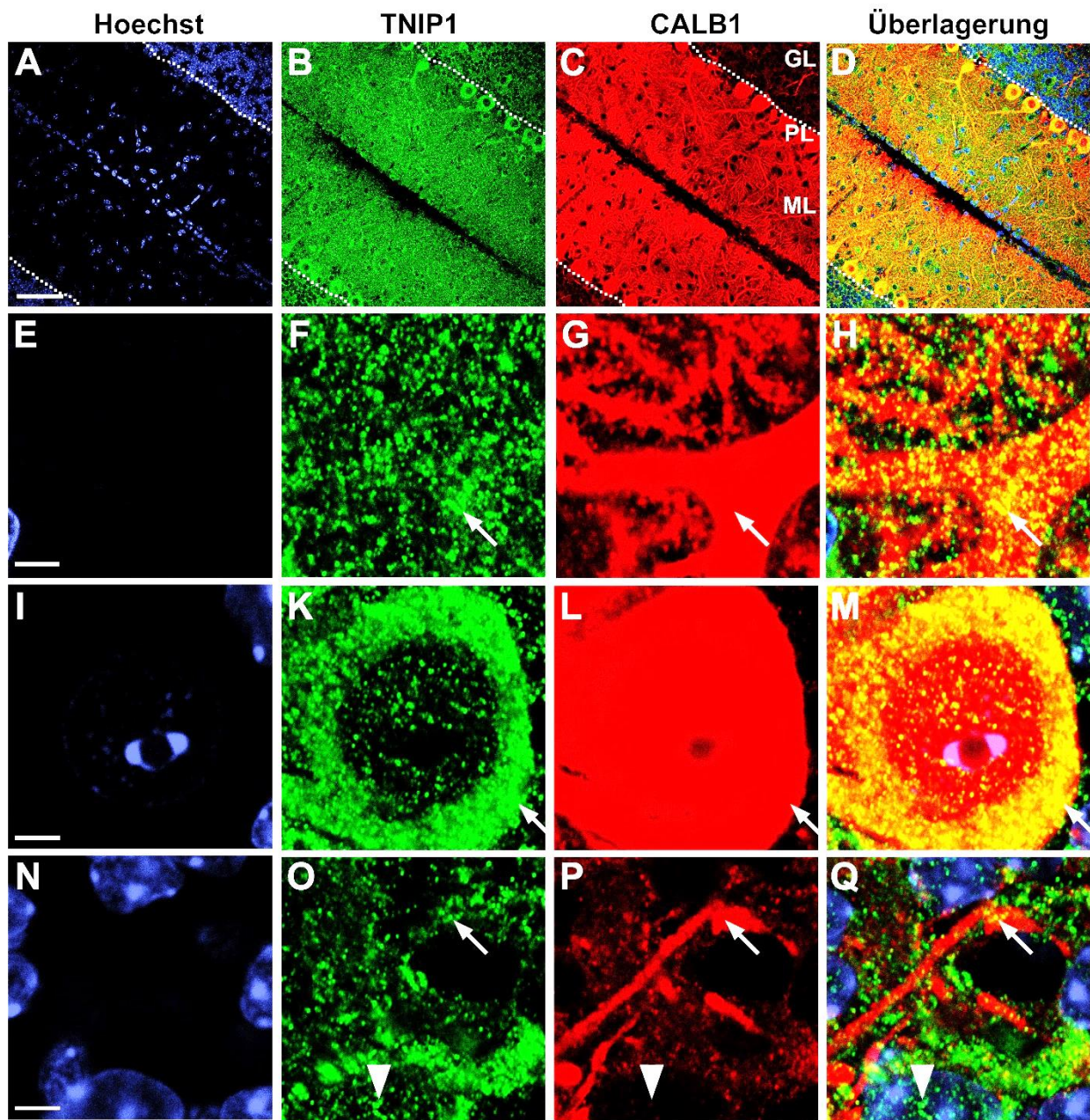


Abb. 18: TNIP1/CALB1-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratome Schnitte einer fünfzehn Tage alten Maus (**Altersstufe P15**). A bis D: Übersichtsaufnahme (Maßstab entspricht 50 µm); E bis H: Detailaufnahme eines Purkinjezell dendriten in der Molekularschicht (Maßstab entspricht 5 µm); I bis M: Detailaufnahme eines Purkinjezellkörpers in der Ganglienzellschicht (Maßstab entspricht 5 µm); N bis Q: Detailaufnahme eines Purkinjezellaxons in der Körnerschicht (Maßstab entspricht 5 µm). Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen Purkinjezellschicht und Körnerschicht an. Die Pfeile zeigen jeweils kolokalisierte TNIP1- und CALB1-Färbesignale an. Die Pfeilspitzen zeigen die nachweisbaren TNIP1-Färbesignale in Zellen der Körnerschicht. Gut zu erkennen sind die inzwischen reichlich ausgebildeten dendritischen Dornen des Dendritenbaumes der Purkinjezellen (Abbildung 18G).

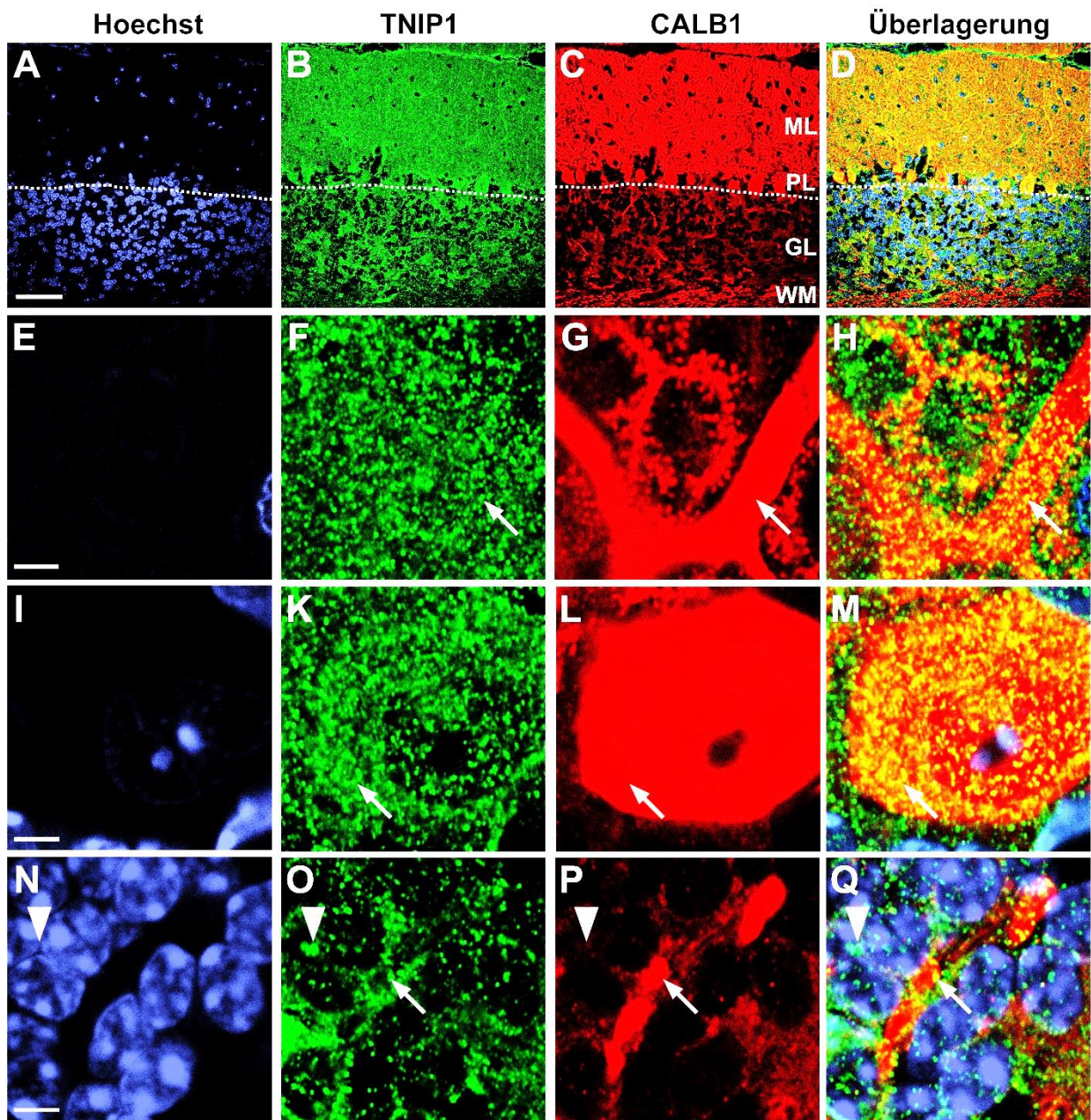


Abb. 19: TNIP1/CALB1-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratonschnitts einer erwachsenen Maus (**Altersstufe adult**). A bis D: Übersichtsaufnahme (Maßstab entspricht 50 µm); E bis H: Detailaufnahme eines Purkinjezeldendriten in der Molekularschicht (Maßstab entspricht 5 µm); I bis M: Detailaufnahme eines Purkinjezellkörpers in der Ganglienzellschicht (Maßstab entspricht 5 µm); N bis Q: Detailaufnahme eines Purkinjezellaxons in der Körnerschicht (Maßstab entspricht 5 µm), welches in seinem Verlauf mehrfach angeschnitten zur Darstellung kommt. Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen Purkinjezellschicht und Körnerschicht an. Die Pfeile zeigen jeweils kolokalisierte TNIP1- und CALB1-Färbesignale an. Die Pfeilspitzen zeigen die nachweisbaren TNIP1-Färbesignale in Zellen der Körnerschicht.

3.2.2 Die Expression von TNIP1 in Astrozyten während der postnatalen Kleinhirnentwicklung

Nachdem TNIP1 in Astrozyten adulter Versuchstierindividuen nachgewiesen worden war (siehe Kapitel 3.1), wurde nachfolgend die Expression des Proteins TNIP1 im Laufe der postnatalen Entwicklung der Astrozyten näher untersucht. Zu diesem Zweck erfolgten immunhistochemische TNIP1/GFAP-Doppelfärbungen an aldehydfixierten Vibratomschnitten der Kleinhirne verschiedenalter Mäuse. Da aussagekräftige GFAP-Färbungen erst ab Altersstufe P9 zu erwarten waren (Bignami und Dahl, 1973; Zawia und Harry, 1996), wurden hier nur die Altersstufen P9, P15 sowie adult untersucht und die erhaltenen Färbeergebnisse miteinander verglichen. Die folgenden Abbildungen 20 und 21 zeigen die entsprechenden Doppelfärbungen.

TNIP1- und GFAP-Färbesignale sind teils kolokalisiert, teils auch direkt benachbart liegend. Beim GFAP handelt es sich um ein gliales Intermediärfilament, das naturgemäß nur Teile des Zellplasmas im Bereich des Zellkörpers und der Zellfortsätze ausfüllt. Ein Nachweis der TNIP1-Expression in GFAP-positiven Zellen ist also auch dann gegeben, wenn TNIP1- und GFAP-Signale direkt benachbart gegeben sind. Nachvollziehbar wird dies vor allem in Regionen, in denen Fortsätze von GFAP-positiven Gliazellen verlaufen, welche über einen weiten Verlauf von TNIP1-Signalen begleitet sind (vgl. Abbildung 20F und Abbildung 20G). Wie die Abbildungen 20 und 21 dokumentieren, werden TNIP1-Proteine in Zellen astroglialer Differenzierung spätestens ab P9 exprimiert. Die räumliche Lokalisation der astrozytären TNIP1-Färbungen veränderte sich im hier betrachteten Zeitabschnitt der Kleinhirnentwicklung nicht. Da sich die TNIP1-Signale auf der Altersstufe adult identisch zu denjenigen darstellten, die auf der Altersstufe P15 erhalten werden konnten, wird auf eine vollständige Darstellung der TNIP1-Färbeergebnisse auf der Altersstufe adult verzichtet.

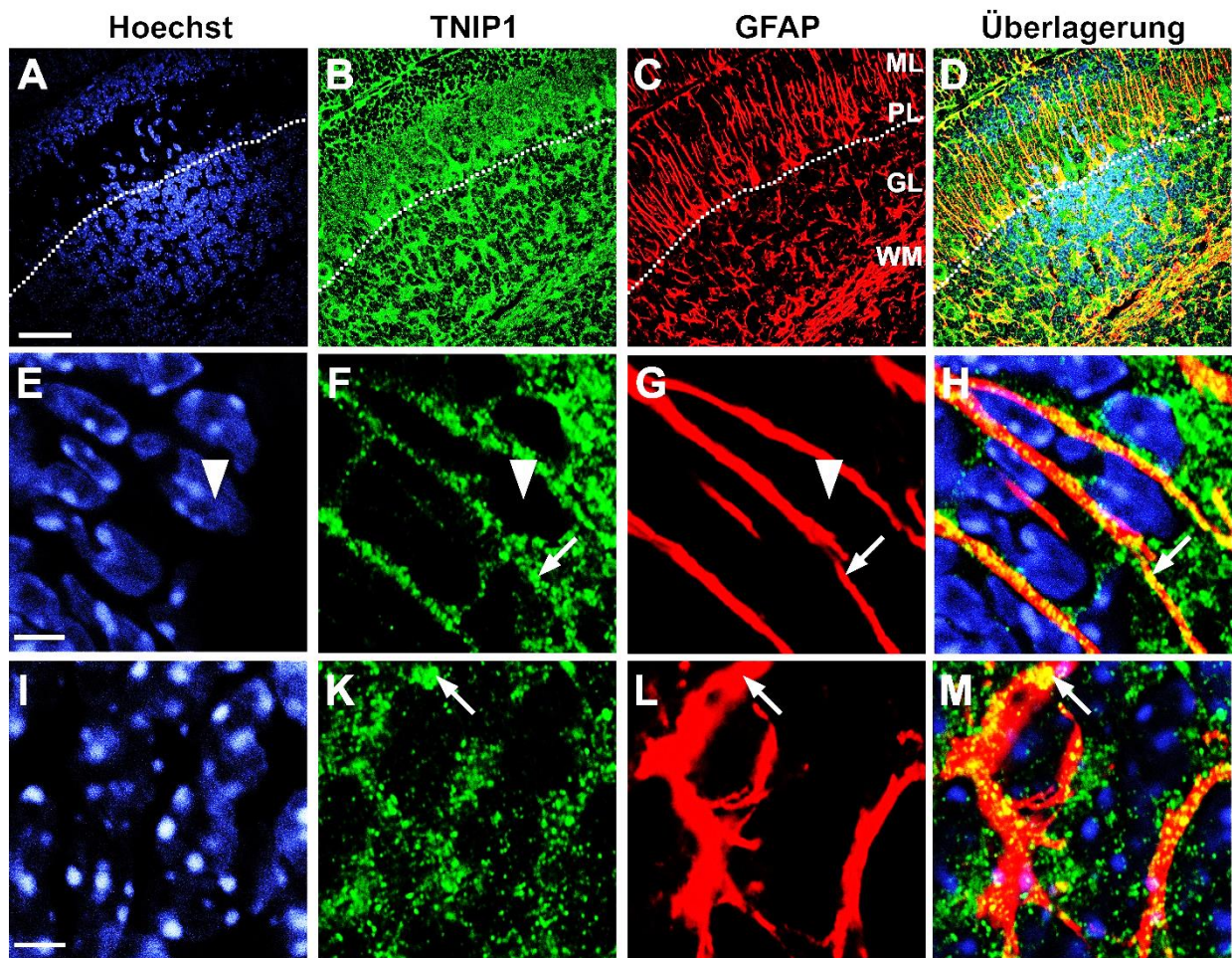


Abb. 20: TNIP1/GFAP-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer neun Tage alten Maus (**Altersstufe P9**). A bis D: Übersichtsaufnahme (Maßstab entspricht 50 µm); E bis H: Detailaufnahme von Zellen der Bergmannglia in der Molekularschicht (Maßstab entspricht 5 µm); I bis M: Detailaufnahme von Astrozyten in der Körnerschicht (Maßstab entspricht 5 µm). Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen Purkinjezellschicht und Körnerschicht an. Es zeigt sich, dass in astrozytär differenzierten, da GFAP-positiven, Zellen auf der Altersstufe P9 TNIP1-Proteine exprimiert werden (Pfeile). Die Pfeilspitzen zeigen TNIP1-signalfreie Kerne von Zellen, die von der äußeren Körnerschicht durch die Molekularschicht in Richtung der inneren Körnerschicht migrieren.

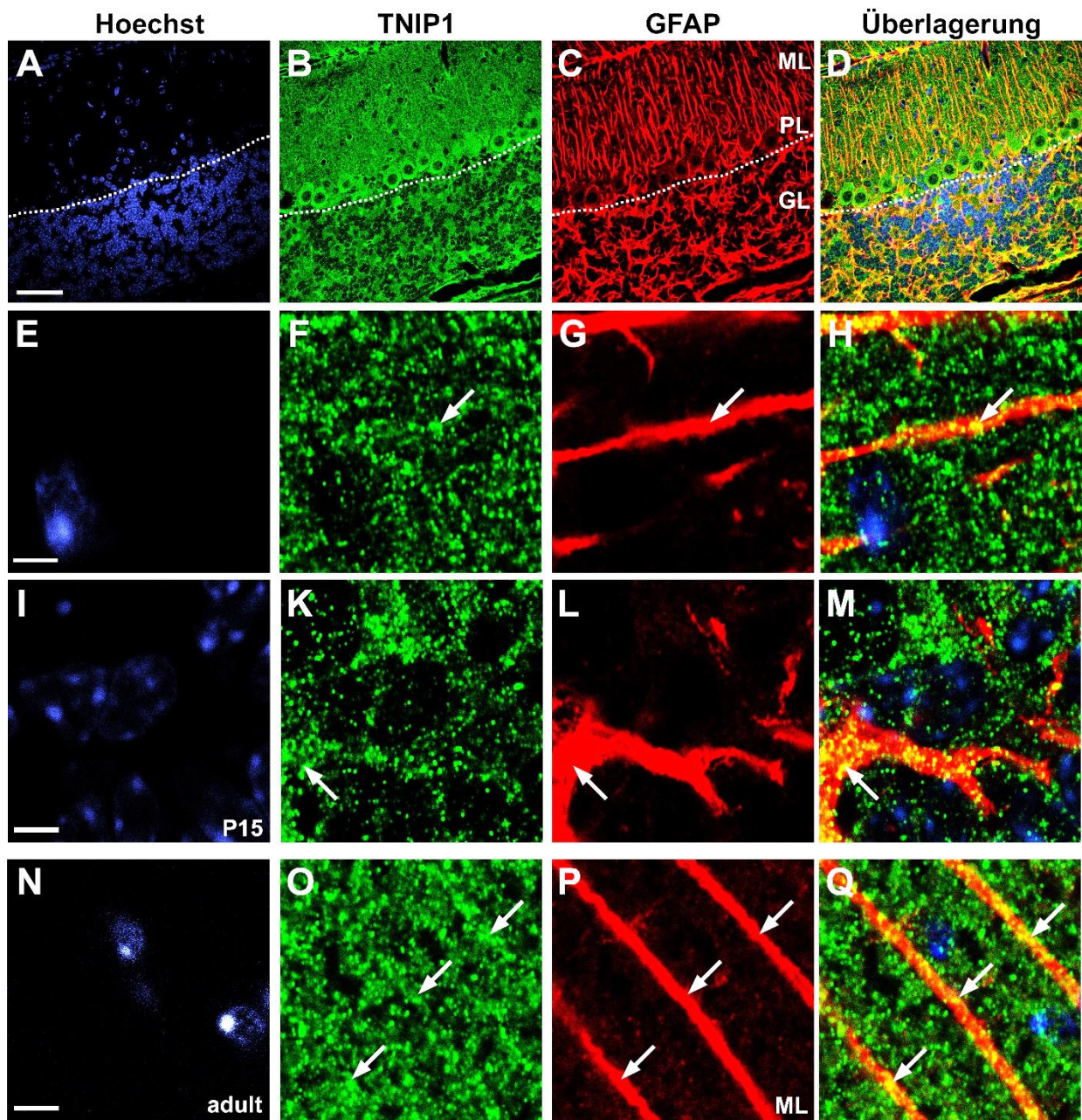


Abb. 21: TNIP1/GFAP-Immunhistochemie zweier aldehydfixierter Kleinhirnvibratomschnitte. A bis M: **Altersstufe P15**; N bis Q: **Altersstufe adult**. A bis D: Übersichtsaufnahme (Maßstab entspricht 50 µm); E bis H sowie N bis Q: Detailaufnahmen von Zellen der Bergmannglia in der Molekularschicht (Maßstäbe entsprechen jeweils 5 µm); I bis M: Detailaufnahme von Astrozyten in der Körnerschicht (Maßstab entspricht 5 µm). Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen Purkinjezellschicht und Körnerschicht an. Es zeigt sich, dass in astrozytär differenzierten, da GFAP-positiven, Zellen auf der Altersstufe P15 sowie auf der Altersstufe adult TNIP1-Proteine exprimiert werden (Pfeile). Ein signifikanter Unterschied zeigt sich im Vergleich der beiden Altersstufen nicht.

3.2.3 Die Expression von TNIP1 in Oligodendrozyten während der postnatalen Kleinhirnentwicklung

Zur Darstellung von TNIP1 in Oligodendrozyten im zeitlichen Verlauf der postnatalen Kleinhirnentwicklung erfolgten TNIP1/MBP-Doppelfärbungen an aldehydfixierten Vibratomschnitten der Kleinhirne neun und fünfzehn Tage alter sowie erwachsener Mäuse. Die MBP-Färbungen setzen – wie bereits die GFAP-Färbungen – erst ab Altersstufe P9 ein, da erst zu diesem Zeitpunkt ein sicheres MBP-Färbesignal oligodendrozytärer Zellen zu erwarten war (Verity und Campagnoni, 1988; Zawia und Harry, 1996; Ghoumari et al., 2003). Die folgenden Abbildungen 22 und 23 dokumentieren die Ergebnisse der entsprechenden immunhistochemischen Färbungen.

Es stellte sich heraus, dass TNIP1 spätestens ab dem Erreichen der Altersstufe P9 in Oligodendrozyten exprimiert wird. Da MBP sowohl im Bereich des Zellkörpers als auch in den Zellfortsätzen der Oligodendrozyten vorkommt, lässt eine Kolo-kalisation von TNIP1- und MBP-Färbungen eine TNIP1-Expression in Oligodendrozyten vermuten. Wie bereits für die Astrozyten vorbeschrieben (siehe Kapitel 3.2.2), verändert sich auch in Oligodendrozyten die räumliche Lokalisation der Anfärbungen im Laufe der Entwicklung nicht. Die Verteilung der TNIP1-Signale auf der Altersstufe adult war identisch zu derjenigen in den Kleinhirnen fünfzehn Tage alter Mäuse.

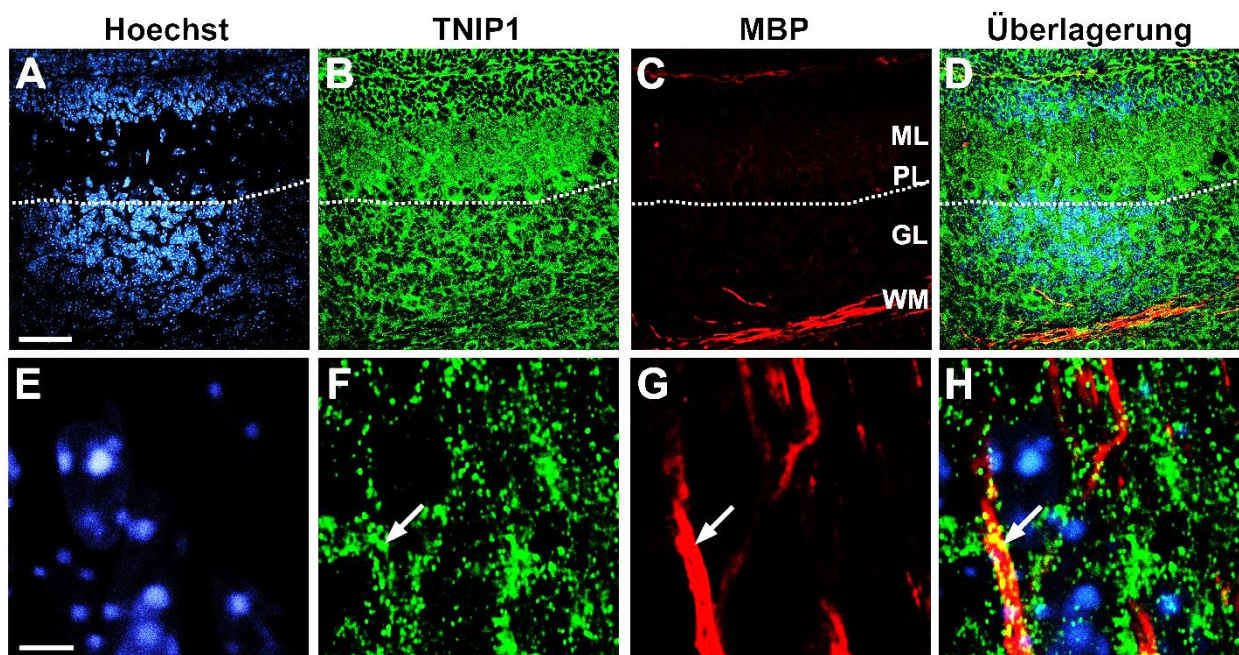


Abb. 22: TNIP1/MBP-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer neun Tage alten Maus (**Altersstufe P9**). A bis D: Übersichtsaufnahme (Maßstab entspricht 50 µm); E bis H: Detailaufnahme (Maßstab entspricht 5 µm). Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen Purkinjezellschicht und Körnerschicht an. MBP-Signale sind auf der Altersstufe P9 mit TNIP1-Färbungen kolokalisiert (Pfeile).

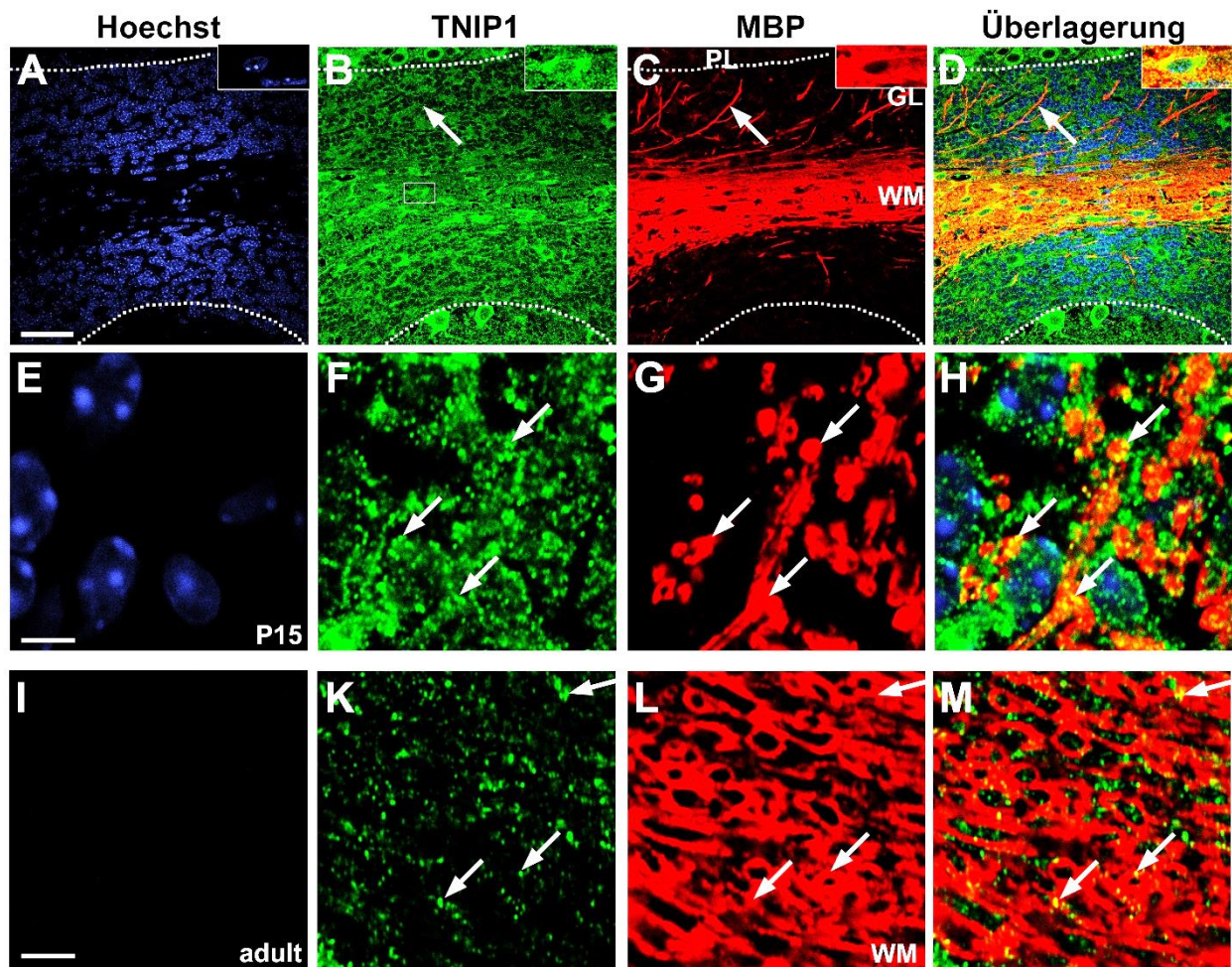


Abb. 23: TNIP1/MBP-Immunhistochemie zweier aldehydfixierter Kleinhirnvibratome. A bis H: **Altersstufe P15**; I bis M: **Altersstufe adult**. A bis D: Übersichtsaufnahme (Maßstab entspricht 50 µm); E bis H sowie I bis M: Detailaufnahmen aus dem Marklager (Maßstäbe entsprechen jeweils 5 µm). Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen Purkinjezellschicht und Körnerschicht an. MBP-Signale sind auf der Altersstufe P15 sowie auf der Altersstufe adult mit TNIP1-Färbungen kolokalisiert (Pfeile in Zeilen 2 und 3). Die Pfeile in Zeile 1 zeigen die Myelinscheide eines in der Körnerschicht in Richtung Marklager verlaufenden Axons. Rechts oben ist der MBP-negative Körper einer Zelle im Marklager herausvergrößert dargestellt; er könnte zu einem Oligodendrozyt gehören, da MBP als Myelinscheidenprotein nicht im Bereich des Zellkörpers vorkommt, und weist ein kräftiges TNIP1-Signal auf.

3.3 Die Lokalisation des Proteins TNIP1 in Präsynapsen und Postsynapsen

Allen bisher gezeigten Färbungen war gemein, dass das TNIP1-Signal unabhängig vom Alter des Versuchstieres und unabhängig vom doppelgefärbten Zelltyp stets punktförmig erschien. Diese punktförmige Erscheinung könnte auf eine vesikuläre Lokalisation von TNIP1 hinweisen. Da auf Grundlage der Erkenntnis, dass sich TNIP1-Färbesignale in dendritischen und axonalen Zellfortsätzen von Neuronen nachweisen ließen (siehe Kapitel 3.1 sowie 3.2.1), eine synaptische Lokalisation von TNIP1 nahelag und da Neurone als Knotenstrukturen neuronaler Netzwerke eine zentrale funktionelle Rolle im Kleinhirn spielen, wurde im Folgenden versucht, die Lokalisation von TNIP1 in prä- und postsynaptischen Zellbereichen nachzuweisen. Hierzu wurden die TNIP1-Signale in der Molekularschicht der Kleinhirnrinde näher betrachtet und auf eine etwaige Kolo­kalisation mit dem präsynaptisch vorkommenden Protein Synaptobrevin 2 (VAMP2) (Salpietro et al., 2019) beziehungsweise dem postsynaptisch lokalisierten Protein PSD-95 (DLG4) (Keith und El-Husseini, 2008) hin untersucht. Die Aufnahmen der entsprechenden Doppel­färbungen finden sich in Abbildung 24 bzw. Abbildung 25.

Es ließen sich Kolo­kalisationen von TNIP1-Signalen sowohl mit VAMP2-Signalen als auch mit DLG4-Signalen nachweisen. VAMP2 ist in der Molekularschicht der Kleinhirnrinde in vielen knöpfchenartigen Strukturen lokalisiert, was mit einer Anfärbung axonaler synap­ti­scher Endigungen vereinbar wäre. VAMP2 scheint in vielen dieser präsynaptischen Endigungen kolo­kalisiert mit TNIP1 zu sein. Damit kommt TNIP1 in vielen präsynap­ti­schen Endigungen vor. Die DLG4-Signale sind allerdings nur vereinzelt mit TNIP1-Signalen assoziiert, sodass TNIP1 nur in wenigen postsynaptischen Endigungen dendri­ti­scher Zellfortsätze vorkommt. Dieser Befund wird auch dadurch gestützt, dass sich TNIP1-Signale jeweils nicht nur kolo­kalisiert mit, sondern auch unmittelbar benachbart zu VAMP2- bzw. DLG4-Signalen nachweisen ließen.

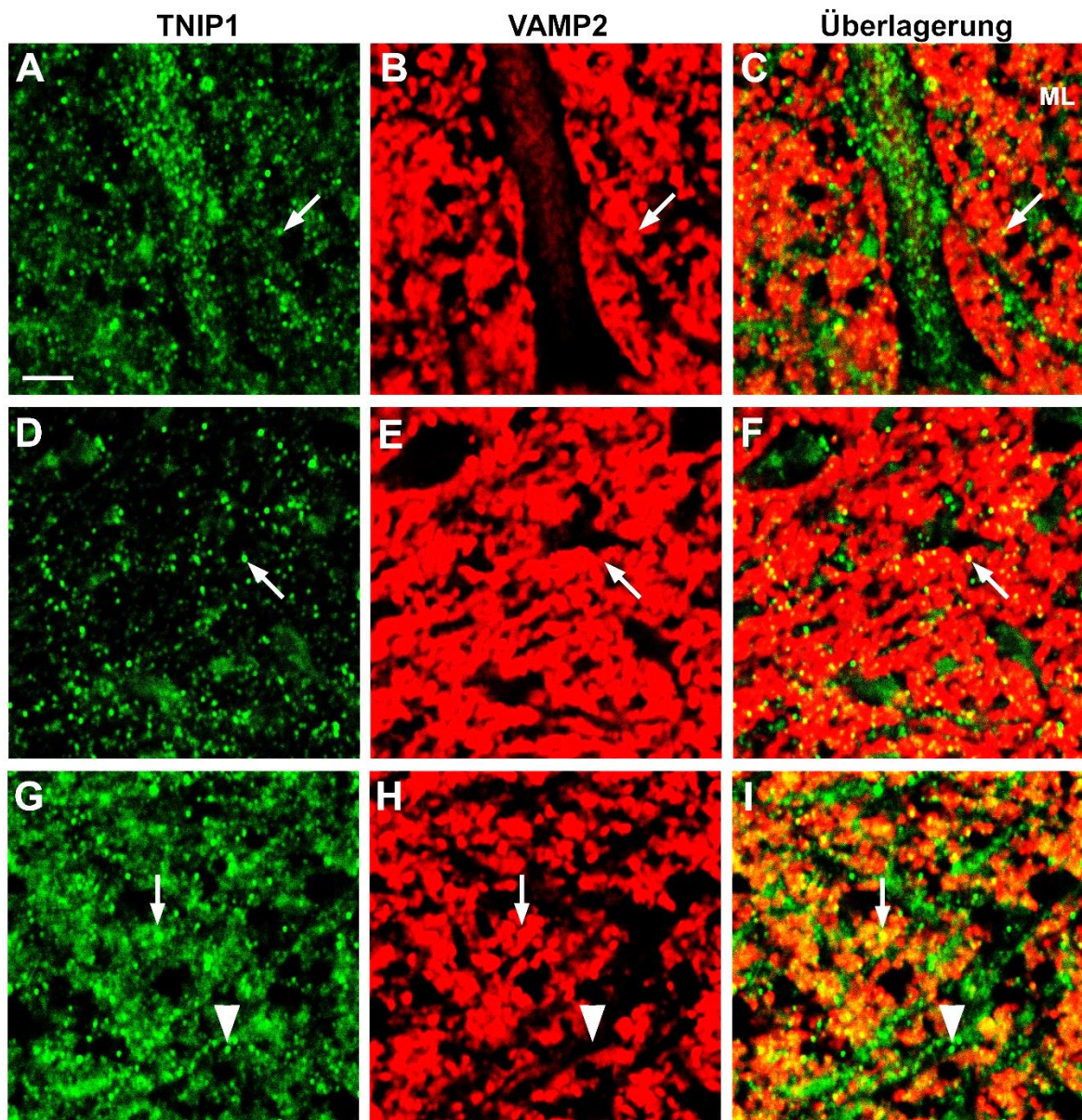


Abb. 24: TNIP1/VAMP2-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratonschnitts einer adulten Maus. Mehrere Aufnahmen aus der Molekularschicht (Maßstab entspricht 50 µm). Die Pfeile zeigen jeweils mit VAMP2-Signalen kolokalisierte, die Pfeilspitzen nicht mit VAMP2-Signalen kolokalisierte TNIP1-Färbesignale. In Zeile 1 ist deutlich zu erkennen, wie sich ein größerer Purkinjezeldendrit von den umgebenden präsynaptischen VAMP2-Signalen abhebt. In ihm finden sich TNIP1-Signale. Aus Zeilen 2 und 3 geht hervor, dass dies auch für kleinere Dendriten gilt (Pfeile).

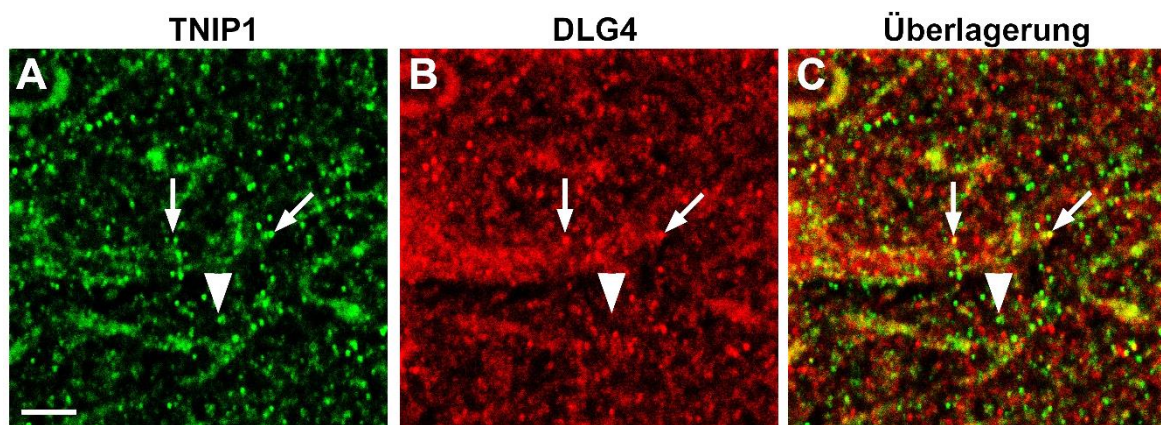


Abb. 25: TNIP1/DLG4-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomechnitts einer adulten Maus. Aufnahme aus der Molekularschicht. Die Abbildung zeigt, dass TNIP1-Färbungen teilweise mit DLG4-Färbesignalen kolokalisiert sind (Pfeile), aber teilweise auch unmittelbar neben DLG4-Signalen gelegen sind (Pfeilspitzen).

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, ein räumlich-zeitliches Expressionsprofil des TNIP1-Proteins in Zellen der Kleinhirnrinde der Maus zu erstellen und dieses funktionell zu interpretieren. In der vorliegenden Dissertationsschrift konnte gezeigt werden, dass das TNIP1-Protein in allen eindeutig identifizierbaren Zelltypen der Kleinhirnrinde der Maus exprimiert wird. Unabhängig vom betrachteten Zelltyp wurden TNIP1-Proteine auf allen in dieser Arbeit untersuchten Altersstufen in allen untersuchten Zellen exprimiert. Das erhaltene immunhistochemische und immunzytochemische TNIP1-Färbesignal war sowohl in den jeweiligen Zellkörpern als auch in den jeweiligen Zellfortsätzen als punktförmiges Signal erkennbar.

Die ubiquitäre Verteilung von TNIP1 in verschiedenen Zelltypen des Zentralnervensystems und die Kolo­kalisierung mit synaptischen Strukturen zeigen, dass TNIP1-Proteine zahlreiche Funktionen im Zentralnervensystem innehaben dürften. Die vorliegende Promotionsarbeit stellt die erste detaillierte Expressionsstudie von TNIP1 im Zentralnervensystem unter physiologischen Bedingungen dar und postuliert erstmals eine Rolle von TNIP1 in der synaptischen Signaltransmission.

4.1 Plausibilität der *Western Blot*-, der *in situ*-Hybridisierungs- sowie der Immunfluoreszenzsignale

Sämtliche in dieser Arbeit vorgestellten TNIP1-Expressionsanalysen beruhen auf der antikörperbasierten Anfärbung, entweder von Proteinextrakten oder von Zellen beziehungsweise Geweben. Die Spezifität der antikörperbasierten Färbung hängt ganz wesentlich von der Epitopbindungsaffinität der verwendeten Antikörper ab, die wiederum abhängig von den jeweiligen Paratopen der verwendeten Antikörper sowie von den Bedingungen des jeweiligen Versuchsprotokolls ist.

Im *Immunoblot* des murinen Kleinhirnes zeigte sich eine Bande bei etwa 70 kDa. Da das Molekulargewicht von TNIP1 72 kDa beträgt (Verstrepen et al., 2009; G'Sell et al., 2015), kann davon ausgegangen werden, dass diese Bande das TNIP1-Protein repräsentiert. Zusätzlich zeigte sich eine Bande bei etwa 100 kDa, die in der Literatur und auf den Internetseiten verschiedener TNIP1-Antikörperhersteller zwar bildlich dargestellt wird, bisher jedoch noch nicht charakterisiert worden ist (Wagner et al., 2008; Medhavy et al.,

2024). Eine naheliegende Erklärung für die Darstellung einer Bande bei etwa 100 kDa mag das Vorliegen einer Spleißvariante der *Tnip1*-mRNA sein; alternative Insertionen im Rahmen der Reifung der *Tnip1*-mRNA sind jedenfalls bereits nachgewiesen worden (Shiote et al., 2006). Allerdings weisen alle bekannten Spleißvarianten ein geringeres Molekulargewicht als 72 kDa auf (Verstrepen et al., 2009). Als Erklärung wahrscheinlicher erscheinen somit posttranslationale Proteinmodifikationen, die eine Zunahme des Molekulargewichtes des modifizierten Proteins um bis zu 200 Da pro Modifikation ermöglichen können (Bagwan et al., 2021). Konkret nachgewiesen wurden diesbezüglich funktionell relevante Phosphorylierungen von TNIP1 (Le Guerroué et al., 2023). Dass neben dem TNIP1 auch andere Proteine der TNIP-Familie angefärbt worden und so für die zusätzliche Bande verantwortlich sein könnten, ist nicht anzunehmen, denn die Molekulargewichte der anderen Proteine der TNIP-Proteinfamilie betragen rund 49 kDa (TNIP2) bzw. etwa 39 kDa (TNIP3; Verstrepen et al., 2009). Zur Klärung der Herkunft der 100 kDa-Bande im *Western Blot* sind insgesamt gesehen weitere Untersuchungen erforderlich, beispielsweise TNIP1-Expressionsstudien an gentechnisch veränderten Zellen oder an Gewebe transgener Tiere.

Im Rahmen der vorbereitenden Probefärbungen zu Beginn dieses Promotionsprojektes war neben dem letztendlich verwendeten TNIP1-Antikörper der Firma Proteintech auch einer der Firma Invitrogen getestet worden. Mit beiden Antikörpern ließen sich vergleichbare immunchemische Färbungen erhalten. Der Invitrogen-Antikörper richtet sich hierbei gegen Epitope, die am N-Terminus des TNIP1-Proteins gelegen sind – als Immunogen kam hier ein die Aminosäuren 1 bis einschließlich 75 des TNIP1-Proteins umfassendes Polypeptid zum Einsatz –, während sich der Proteintech-Antikörper gegen Determinanten richtet, die am C-Terminus des TNIP1-Proteins gelegen sind – als Immunogen fand hier ein die Aminosäuren 287 bis einschließlich 636 des TNIP1-Proteins umfassendes Polypeptid seine Verwendung. Prinzipiell wäre zwar vorstellbar gewesen, dass der TNIP1-Antikörper Epitope markiert, die nicht spezifisch für TNIP1 sind, da sie auch in den beiden anderen Proteinen der TNIP-Proteinfamilie, TNIP2 und TNIP3, vorkommen (Verstrepen et al., 2009). Konkret wäre dies für zwei hochkonservierte und in allen drei TNIP-Proteinen vorkommende autologe Homologiedomänen (AHD) denkbar gewesen, die jeweils am N-Terminus gelegene AHD1 sowie die jeweils am C-Terminus gelegene AHD4 (Verstrepen et al., 2009). Da die beiden verwendeten Antikörper jedoch unterschiedliche Bereiche des

TNIP1-Proteins markieren und dennoch identische Färbemuster in Zellen und Geweben erkennen lassen, liegt die Vermutung nahe, dass der verwendete Antikörper TNIP1 sowohl in der *Western Blot*-Analyse als auch in den immunhisto- und –zytochemischen Färbungen spezifisch erkennt. Für die Spezifität der antikörpervermittelten TNIP1-Färbung spricht in Ermangelung der Verfügbarkeit hinreichend lang lebensfähiger *Tnip1-knock-out*-Versuchstiere (Oshima et al., 2009) ferner, dass Frau Dr. Carolina Götttsche aus der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Stephan Baader (Anatomisches Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) in ihrem Promotionsprojekt zeigen konnte, dass eine im Vergleich zum Wildtyp vermehrte oder verminderte Expression des Proteins TNIP1 in HEK-Zellen unter Verwendung des auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzten TNIP1-Antikörpers der Firma Proteintech mit einer entsprechend erhöhten oder erniedrigten immunchemischen Färbeintensität einhergeht (Götttsche, 2025).

Ein weiterer Hinweis auf die Plausibilität der gezeigten immunchemischen Färbungen ergibt sich aus dem Vergleich mit den in dieser Arbeit präsentierten Färbeergebnissen der *Tnip1*-mRNA-*in situ*-Hybridisierung sowie mit öffentlich einsehbaren *Tnip1*-mRNA-*in situ*-Hybridisierungsdaten des *Allen Brain Atlas*. *In situ*-Hybridisierungen basieren auf der sequenzspezifischen Hybridisierung zwischen zellulärer mRNA und markierten Ribosonden. Da für derartige Hybridisierungen hinreichend lange komplementäre Sequenzbereiche vorhanden sein müssen, ist die Spezifität der Färbung entsprechend hoch. Sowohl aus den öffentlich verfügbaren *in situ*-Hybridisierungsdaten als auch aus den hier vorgestellten *in situ*-Hybridisierungen geht hervor, dass die *Tnip1*-mRNA sowohl in Purkinjezellen als auch in weiteren Zellen der Molekular- und Körnerzellschicht exprimiert wird. Darüber hinaus deutet auch der Vergleich der immunhistochemischen Färbungen mit den immunzytochemischen Färbeergebnissen auf eine erfolgreiche Immundarstellung von TNIP1 durch den eingesetzten Antikörper hin.

Die Annahme einer spezifischen TNIP1-Färbung wird ebenso durch die Untersuchung öffentlich zugänglicher Datensätze einer Transkriptomanalyse der Zellen des murinen Kleinhirngewebes gestützt. Diese Datensätze beruhen auf einem Einzelzell-mRNA-Sequenzierungsverfahren, das die Sequenzierung sämtlicher exprimierter mRNA einzelner Zellen ermöglicht (Tang et al., 2009; Haque et al., 2017; Hwang et al., 2018); die entsprechenden Sequenzierungsdaten sind über das Internet frei verfügbar (Vladoiu et al., 2018). Wertet man diese Daten im Hinblick auf die Coexpression der *Tnip1*-mRNA sowie

der mRNA jeweils zelltypspezifisch exprimierter Gene aus (Hao et al., 2024), ergibt sich, dass die *Tnfr1*-mRNA auf den Altersstufen P0, P5 und P14 in neuronalen Zellen exprimiert wird, die zusätzlich die *Calb1*-mRNA, die *Atoh1*-mRNA beziehungsweise die *Pax2*-mRNA exprimieren (Abbildung 26), und dass die *Tnfr1*-mRNA auf denselben Altersstufen in glialen Zellen exprimiert wird, die wiederum die *Gfap*-mRNA, die *Olig2*-mRNA beziehungsweise die *Itgam*-mRNA exprimieren (Abbildung 27).

Zu beachten ist, dass die einzelnen (mehrdimensionalen) Datenpunkte der scRNA-Analyse der Zellen des Kleinhirnes der Maus unter Verwendung des UMAP-Algorithmus im Sinne einer Dimensionalitätsreduktion in eine zweidimensionale Darstellung überführt worden sind (McInnes et al., 2020). Der Algorithmus wählt diese zwei Dimensionen eigenständig so aus, dass nah benachbart gelegene Punkte auf der erhaltenen zweidimensionalen Datenpunktkarte auf Transkriptomebene viele Gemeinsamkeiten aufweisen und weit entfernt voneinander gelegene Datenpunkte entsprechend viele Unterschiede aufweisen. Es gilt damit näherungsweise, dass eine jede Datenpunktwolke auf der Karte jeweils Zellen eines bestimmten Zelltyps (mit hoher Transkriptomübereinstimmung) repräsentiert und dass verschiedene Datenpunktwolken auf der Karte Zellen verschiedener Zelltypen (mit dementsprechend niedriger Transkriptomübereinstimmung) repräsentieren.

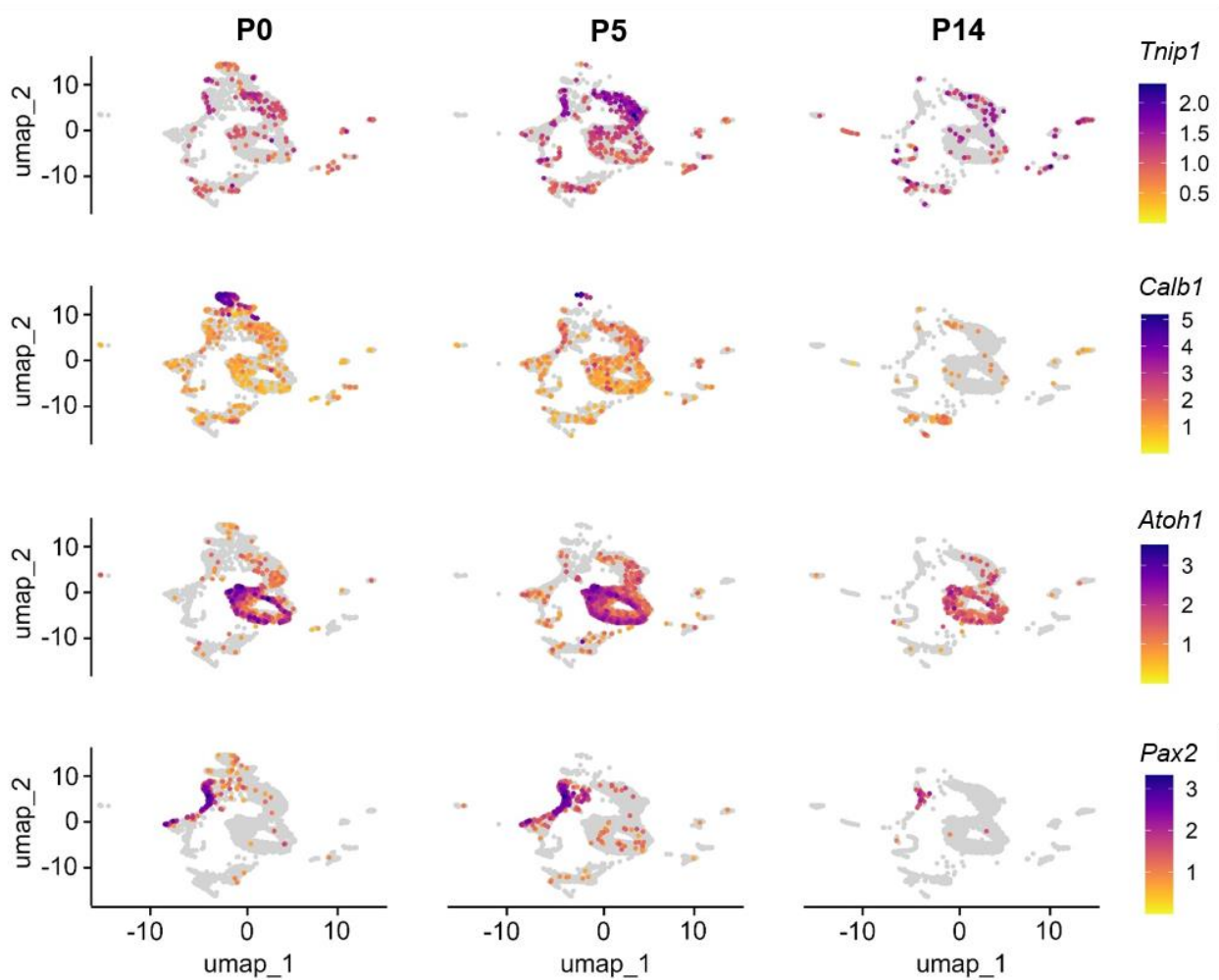


Abb. 26: Zweidimensionale Darstellung der Analyse eines öffentlich zugänglichen mehrdimensionalen Datensatzes einer scRNA-Analyse des murinen Kleinhirnes mittels eines UMAP-Algorithmus. Untersuchung der Expression der *Tnfr1*-mRNA sowie der Expression zu **neuronalen Markergenen** gehöriger mRNA. umap_1: Dimension 1 der UMAP-generierten Datenpunktkarte, umap_2: Dimension 2 der UMAP-generierten Datenpunktkarte; die Abszissen und die Ordinaten zeigen jeweils die Abstände der einzelnen Datenpunkte in den jeweiligen Dimensionen in relativen Einheiten. Die einzelnen Datenpunkte sind jeweils in grau dargestellt und entsprechen einzelnen Zellen des Kleinhirngewebes; farbig sind jeweils diejenigen Datenpunkte markiert, die Zellen repräsentieren, welche die zum jeweils bezeichneten Gen gehörige mRNA exprimieren. Die Farbkodierung repräsentiert die Expressionsstärke der jeweils betrachteten mRNA. Diese Abbildung ist freundlicherweise von Herrn Professor Dr. Karl Schilling sowie Herrn Professor Dr. Stephan Baader (beide Anatomisches Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) zur Verfügung gestellt worden und darf mit der vorliegenden Arbeit veröffentlicht werden.

Die *Calb1*-mRNA wird von Purkinjezellen exprimiert (Baader et al., 1999; Whitney et al., 2008; Kapfhammer und Gugger, 2012), die *Atoh1*-mRNA von Körnerzellen, (Ben-Arie, 1996; Butts et al., 2024), die aus den rhombischen Lippen hervorgegangen sind, und die *Pax2*-mRNA von inhibitorischen Interneuronen (Maricich und Herrup, 1999), die aus den Ventrikularzonen hervorgegangen sind. Wie Abbildung 26 zeigt, exprimieren die *Tnip1*-exprimierenden Zellen jeweils auch die zum neuronalen Markergen gehörige mRNA. Zu beachten ist hierbei, dass die postnatal zunehmend fehlende Datenpunktwolke für die Purkinjezellen ein Artefakt darstellt: Bedingt durch die postnatale Entwicklung des Dendritenbaumes überleben Purkinjezellen mit zunehmendem Alter den Zelldissoziierungsprozess im Rahmen der Vorbereitung der Einzelzell-RNA-Sequenzierung schlechter. Der hier erhobene Befund bestätigt nicht nur das *Tnip1*-mRNA-Färbeergebnis im *Allen Brain Atlas* und in der vorliegenden Promotionsarbeit bezogen auf die Purkinjezellen, sondern ermöglicht darüber hinaus auch eine Aussage hinsichtlich der in der hiesigen Dissertationsschrift nicht spezifisch immunfluoreszenzbasiert angefärbten Körnerzellen und inhibitorischen Interneurone, die offenbar ebenfalls die *Tnip1*-mRNA exprimieren. Die *Gfap*-mRNA wird hingegen von astroglial differenzierten Zellen (Bovolenta et al., 1984; Riolo et al., 1992; Eng et al., 2000; Malatesta et al., 2008; Mamber et al., 2012) und die *Olig2*-mRNA von oligodendroglial differenzierten Zellen exprimiert (McQueen et al., 2014; Wei et al., 2021; Zhang et al., 2022). Die zu dem Gen *Itgam* gehörigen mRNA-Moleküle werden von mikroglial differenzierten Zellen exprimiert (Satoh et al., 2016; Honarpisheh et al., 2020).

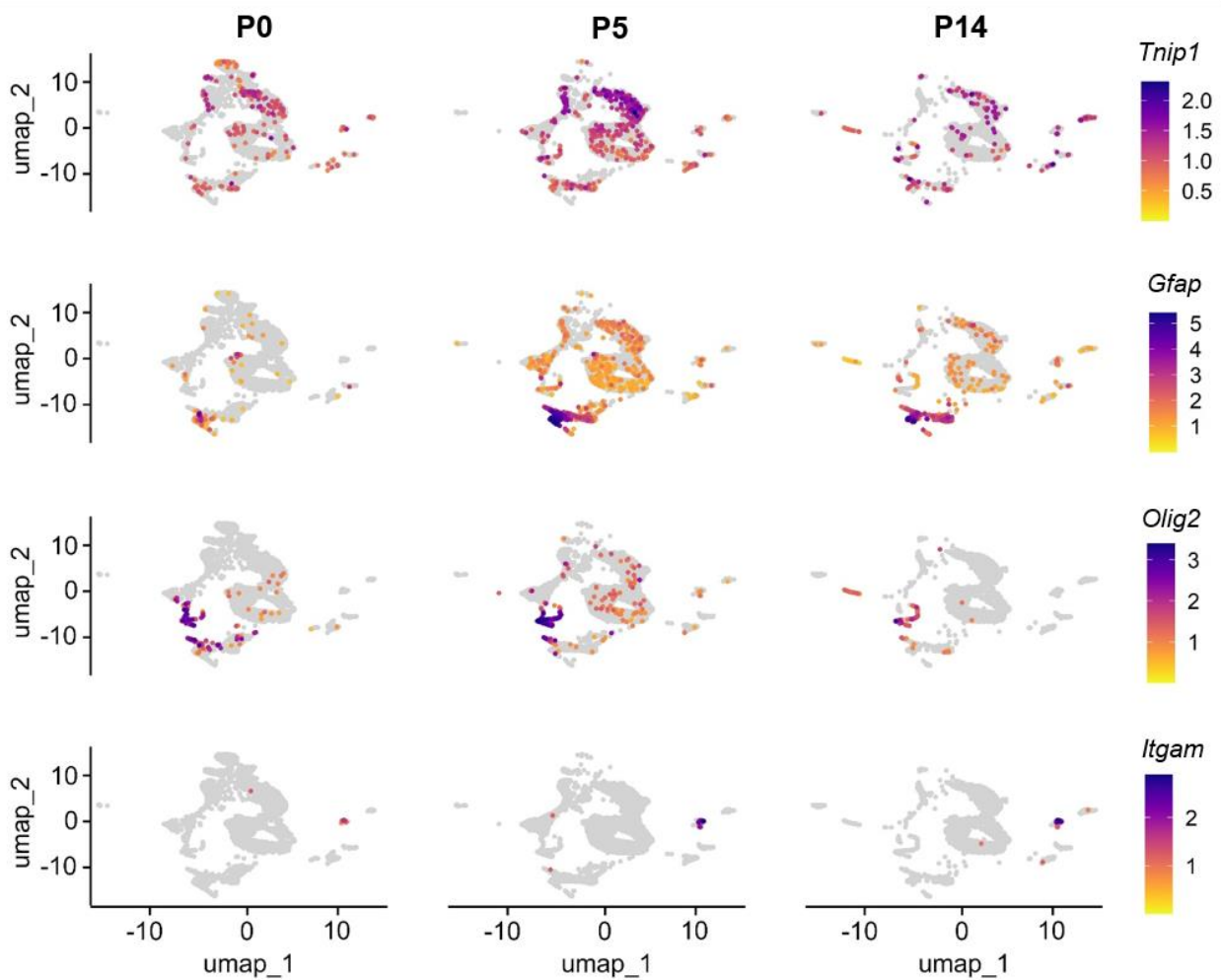


Abb. 27: Zweidimensionale Darstellung der Analyse eines öffentlich zugänglichen mehrdimensionalen Datensatzes einer scRNA-Analyse des murinen Kleinhirnes mittels eines UMAP-Algorithmus. Untersuchung der Expression der *Tnfr1*-mRNA sowie der Expression zu **glialen Markergenen** gehöriger mRNA. umap_1: Dimension 1 der UMAP-generierten Datenpunktkarte, umap_2: Dimension 2 der UMAP-generierten Datenpunktkarte; die Abszissen und die Ordinaten zeigen jeweils die Abstände der einzelnen Datenpunkte in den jeweiligen Dimensionen in relativen Einheiten. Die einzelnen Datenpunkte sind jeweils in grau dargestellt und entsprechen einzelnen Zellen des Kleinhirngewebes; farbig sind jeweils diejenigen Datenpunkte markiert, die Zellen repräsentieren, welche die zum jeweils genannten Gen gehörige mRNA exprimieren. Die Farbkodierung repräsentiert die Expressionsstärke der jeweils betrachteten mRNA. Diese Abbildung ist freundlicherweise von Herrn Professor Dr. Karl Schilling sowie Herrn Professor Dr. Stephan Baader (beide Anatomisches Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) zur Verfügung gestellt worden und darf mit der vorliegenden Arbeit veröffentlicht werden.

Wie aus Abbildung 27 hervorgeht, kommt die *Tnip1*-mRNA nicht nur in neuronalen Zellen, sondern auch in Zellen der Makroglia sowie der Mikroglia vor. Dieser Befund ist einerseits insofern bedeutsam, als er das immunfluoreszenzbasiert erhaltene Ergebnis dieser Arbeit hinsichtlich der TNIP1-Expression in makroglialen Zellen stützt und als auf ihm basierend glaubhaft postuliert werden kann, dass die lediglich schwache (aber über das interne Kontrollsignal hinaus gehende) *Tnip1*-mRNA-Färbung der Molekular- und Körnerschicht in Abbildung 6B spezifisch ist und damit kein Widerspruch zur starken *Tnip1*-mRNA-Färbung im *Allen Brain Atlas* gegeben ist. Andererseits ist der Befund auch dahingehend erwähnenswert, als sich hier eine Expression der *Tnip1*-mRNA in mikroglial differenzierten Zellen nachweisen lässt, die im Rahmen dieser Arbeit nicht spezifisch immunfluoreszenzbasiert angefärbt worden sind (siehe auch Kapitel 4.2).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die in dieser Dissertation vorgestellten Forschungsergebnisse auch unter kritischer Würdigung der ihnen jeweils zugrundeliegenden Methodik plausibel erscheinen und im Einklang mit anderweitig erhobenen Befunden stehen.

4.2 TNIP1 als potentielltes Schlüsselprotein zahlreicher zellulärer Entwicklungsprozesse

Die in dieser Arbeit gezeigte Expression des Proteins TNIP1 in verschiedenen Zellen des Kleinhirnes, sowohl neuronalen als auch glialen Ursprungs, und in allen untersuchten postnatalen Differenzierungsstadien dieser Zellen legt den Schluss nahe, dass TNIP1-Proteine an zahlreichen unterschiedlichen Vorgängen in der Zelle beteiligt sind.

Wie einleitend bereits beschrieben, ist der Transkriptionsfaktor NFκB ein zentrales Zielprotein, dessen Aktivität durch TNIP1 reguliert wird. Insofern ist es nicht verwunderlich, dass zahlreiche Funktionen, mit denen NFκB assoziiert ist, auch mit TNIP1 assoziiert sind. NFκB gilt als wichtiger Transkriptionsfaktor, der unter anderem die Entzündungsreaktion und die Immunantwort reguliert (Hoffmann et al., 2006) sowie für die Kontrolle der Zellproliferation, des Zellüberlebens und der Zellapoptose von Bedeutung ist (Pranski et al., 2012). Außerdem ist NFκB an der Steuerung der neuronalen Entwicklung sowie der synaptischen Plastizität beteiligt (O'Mahony et al., 2006). Den vielfältigen Funktionen von NFκB entsprechend, wird TNIP1 eine Rolle in der Steuerung der Inflammation und

der Immunantwort sowie in der Kontrolle des Zellüberlebens und des Zelltodes sowie der Zellproliferation zugeschrieben (siehe Kapitel 1.2). Unter physiologischen Bedingungen wirken TNIP1-Proteine antiinflammatorisch, sie verhindern so eine überschießende Immunantwort; ist die TNIP1-Aktivität jedoch vermindert, so wird die Entstehung (auto)inflammatorischer Krankheitsbilder begünstigt (Gateva et al., 2009; Zhou et al., 2011; Ippagunta et al., 2016; Rudraiah et al., 2018; Shamilov und Aneskievich, 2018; Jiménez-Sousa et al., 2019; Brady et al., 2020; Zhou et al., 2020; Shinkawa et al., 2022; Medhavy et al., 2024). Zu dieser empirischen Erkenntnis passen mehrere molekularbiologische Befunde: So ist TNIP1 Teil eines Proteinkomplexes, welcher die intrazelluläre Signaltransduktion nach Bindung des extrazellulär lokalisierten Tumornekrosefaktors (TNF) an seinen Membranrezeptor dämpft (Van Quickelberghe et al., 2018). TNF gilt als ein wichtiger proinflammatorischer Mediator (Van Loo und Bertrand, 2023). Ferner interagiert TNIP1 bei bakterieller Infektion einer Wirtszelle mit dem bakteriellen Protein IPA9.8. Dieses Protein hat eine Ubiquitinligasefunktion inne und fördert durch seine Interaktion mit TNIP1 den Abbau des Schlüsselproteins des kanonischen NF κ B-Weges, I κ BKG (auch NEMO genannt), wodurch die NF κ B-abhängige Signaltransduktion gehemmt wird (Ashida et al., 2010). Es resultiert jeweils ein antiinflammatorischer Effekt. Wie NF κ B-Proteine, so werden auch TNIP1-Proteine mit physiologischen Prozessen in Verbindung gebracht. Die oben beschriebenen zellulären Funktionen von TNIP1 werden durch die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zur Expression von TNIP1 unter physiologischen Bedingungen gestützt und durch die Analyse von TNIP1-Proteinwechselwirkungen untermauert. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine TNIP1-Expression in der Kleinhirnrinde sowohl in den proliferierenden Körnerzellprogenitoren der äußeren Körnerschicht als auch in den migrierenden Körnerzellen der Molekularschicht sowie in den ausdifferenzierten Körnerzellen der inneren Körnerschicht (siehe auch Abbildung 4). Dabei scheinen nukleäre TNIP1-Färbungen vorwiegend in den ausdifferenzierten postmitotischen Körnerzellen aufzutreten, während zytoplasmatische TNIP1-Signale im Laufe der gesamten postnatalen Körnerzellentwicklung zu beobachten sind (siehe Abbildungen 16K und 17Q).

Bisher bekannte und nukleär lokalisierte Interaktionspartner von TNIP1 sind, neben dem bereits erwähnten NF κ B (Catrysse et al., 2014), die nukleären Retinsäure- (RAR; Gurevich und Aneskievich, 2009) und Peroxisomproliferator-aktivierten Rezeptoren

(PPAR; Flores et al., 2011) sowie der Transkriptionselongationsfaktor A2 (TCEA2) und der Transkriptionsfaktor GTF2B (Abbildung 28).

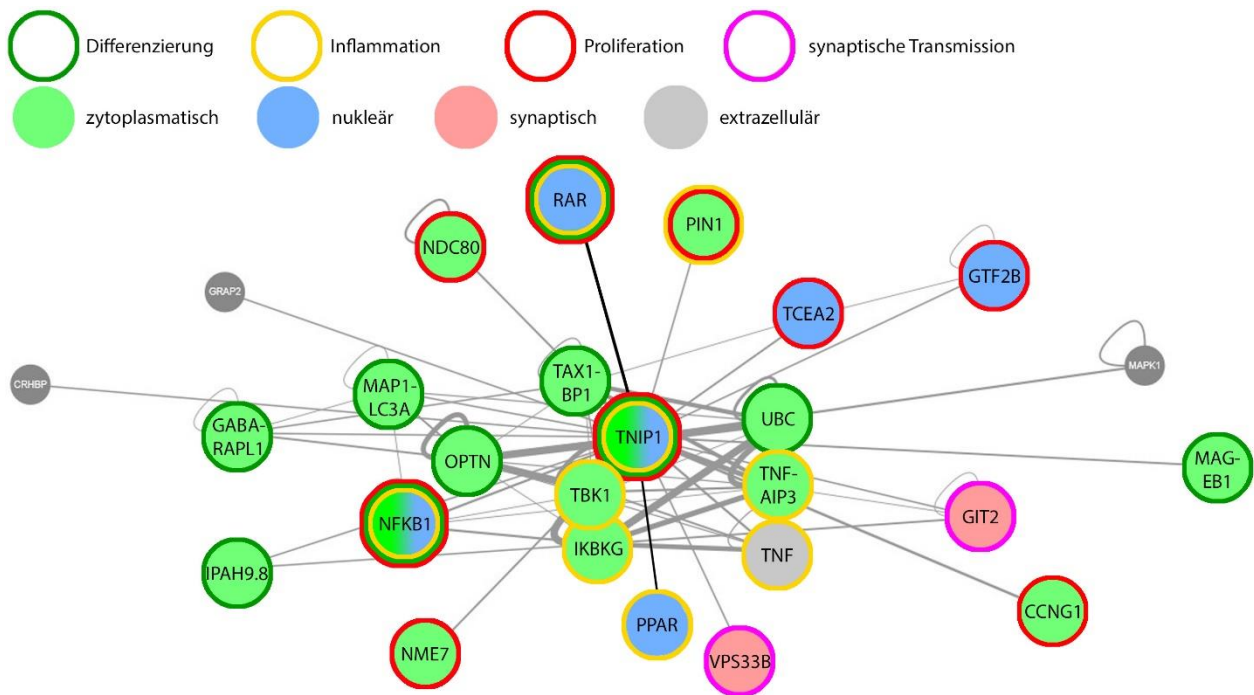


Abb. 28: Interaktionsnetzwerk des Proteins TNIP1. Die Farben der Kreisflächen zeigen jeweils die intrazelluläre (zytoplasmatische, nukleäre und/oder synaptische) beziehungsweise die extrazelluläre Lokalisation des Proteins an, während die Farben der Kreisränder jeweils die Funktion des Proteins einordnen (Differenzierung, Inflammation, Proliferation und/oder synaptische Transmission). Die zugrundeliegende Interaktomanalyse wurde anhand der öffentlich zugänglichen APID-Datenbank, die auf einer Metaanalyse unterschiedlicher Interaktomstudien beruht, durchgeführt (Rolland et al., 2014; Alonso-López et al., 2019). Als mit TNIP1 interagierende Proteine wurden nur solche in die Darstellung einbezogen, deren Interaktion mit TNIP1 in mindestens drei experimentellen Studien mit mindestens zwei unterschiedlichen Methoden nachgewiesen worden ist und deren Interaktion in mindestens vier Interaktionsdatenbanken beschrieben wird sowie in mindestens einer Publikation erwähnt ist. Unter Anwendung dieser Entscheidungsregel sind nur 24 von insgesamt 207 bekannten Interaktionspartnern in dieser Abbildung vertreten. Zusätzlich wurden die beiden bekannten TNIP1-Interaktionspartner RAR sowie PPAR zu den so erhaltenen 24 Interaktionspartnern hinzugefügt (Gurevich und Aneskievich, 2009; Flores et al., 2011). Die zugrundeliegenden Literaturangaben finden sich an den jeweiligen Stellen im Diskussionstext.

Hinweise darauf, dass die nukleären Interaktionen von TNIP1 unter physiologischen Bedingungen tatsächlich eine Rolle in der Entwicklung spielen oder für die Pathogenese defi-

nierter Krankheitsbilder von Bedeutung sind, ergeben sich bislang nur indirekt und sind damit spekulativer Natur. So führt die Bindung von Retinsäure an Retinsäurerezeptoren zu einer TNIP1-Induktion (Gurevich et al., 2013) und zu einer Aktivierung des NFκB-Weges (Trinh et al., 2020). Umgekehrt hemmt TNIP1 als Corepressor die Aktivität ligandengebundener Retinsäurerezeptoren (Gurevich und Aneskievich, 2009). Somit könnte TNIP1 durch seine RAR-Interaktion an der Termination retinsäurevermittelter NFκB-Aktivierungen beteiligt sein. Da es sich bei der Retinsäure um ein ontogenetisch wichtiges Signalmolekül handelt, liegt der Schluss einer Beteiligung von TNIP1 an NFκB-vermittelten Zelltodes-, -überlebens- und -proliferationsprozessen nahe. Konkret könnte dies insbesondere für die Differenzierung von Neuronen im Zentralnervensystem gelten (Maden, 2007). Neben der Interaktion mit RAR-Proteinen lässt sich jedoch auch eine Interaktion mit PPAR-Proteinen nachweisen, denen antiinflammatorische Wirkungen zugeschrieben werden (Youssef und Badr, 2004). TNIP1-Proteine fungieren hier als Corepressoren von PPAR (Flores et al., 2011; Singh und Chaudhary, 2025).

TNIP1-Färbungen waren jedoch nicht nur im Zellkern, sondern auch im Zellplasma lokalisiert. Zytoplasmatische TNIP1-Signale konnten in der vorliegenden Arbeit zu allen untersuchten Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung der Neurone nachgewiesen werden. Dies galt sowohl für proliferierende Körnerzellprogenitoren der äußeren Körnerschicht als auch für migrierende Körnerzellvorläufer in der Molekularschicht sowie für am Zielort der Migration angelangte Körnerzellen in der inneren Körnerschicht der Kleinhirnrinde.

In Anbetracht seiner Interaktionspartner (Abbildung 28) könnte zytoplasmatisch lokalisiertes TNIP1 über eine Beteiligung an der Steuerung der Zellproliferation postnatale neuronale Entwicklungsprozesse beeinflussen; so haben beispielsweise seine Interaktionspartner NME7 und NDC80 mitoseassoziierte mikrotubuläre Funktionen inne (Liu et al., 2014; Polley et al., 2023). Sein Interaktionspartner PIN1 ist für seine proliferationsstimulierenden Effekte in der Pathogenese onkologischer Erkrankungen bekannt (Maggio et al., 2023), ebenso seine Interaktionspartner GTF2B und RAR (Cai et al., 2022; Testa und Pelosi, 2024). Darüber hinaus wirkt das bereits erwähnte nukleär lokalisierte Protein TCEA2 als relevanter Akteur in der DNA-Replikation maßgeblich an der Vorbereitung der Mitose mit (Schweikhard et al., 2014); das Zyklin G1 (CCNG1) wirkt als TNIP1-interagierendes Protein an der Steuerung des Zellzyklus mit (Russell et al., 2012). Für die

Beteiligung von TNIP1 an der Regulation der Zellzahl spricht auch dessen Rolle als ubiquitinbindendes Protein: TNIP1 erkennt K48-Polyubiquitinierungen von Zielproteinen und kann so die ubiquitinierten Proteine in seiner Funktion als Autophagierezeptor zum autophagolysosomalen Abbau dirigieren (Shinkawa et al., 2022). Ist die Ubiquitinierung von Proteinen gestört, so ist die Proliferation und Differenzierung von Körnerzellen beeinträchtigt (Vriend et al., 2015).

Aus dieser Beobachtung ergibt sich, dass TNIP1 über seine ubiquitinbindende Eigenschaft neben der Regulation der Zellzahl auch an der Regulation der Zelldifferenzierung beteiligt sein könnte. Purkinjezellen beispielsweise differenzieren sich im Wesentlichen postnatal durch die Ausbildung ihres typischen Dendritenbaumes aus; während dieser gesamten postnatalen Entwicklung ist TNIP1 unter physiologischen Bedingungen präsent. Da die Ausbildung von Purkinjezellsynapsen bei einer alterierten Proteinubiquitinierung gestört ist (Valnegri et al., 2017), könnte TNIP1 also auch auf die Ausbildung neuronaler Fortsätze einwirken. Dafür spricht, dass die Interaktion von TNIP1 mit dem Protein GABARAPL1 und dem Autophagierezeptor TAX1BP1 die Rückbildung neuronaler Fortsätze zu erschweren und die synaptische Plastizität zu stören scheint (Le Guerroué et al., 2023). Selbiges liegt für die Interaktion mit dem Autophagierezeptor Optineurin nahe (Ying und Yue, 2016). Die Bedeutung von TNIP1 für die zelluläre Differenzierung ergibt sich jedoch nicht bloß aus Beobachtungen im Nerven-, sondern auch im Immunsystem. So ist die Differenzierung der fortsatzfreien Monozyten des Blutes zu ausgesprochen stark verzweigten dendritischen Zellen TNIP1-abhängig veränderlich (Khanolkar et al., 2016). Zudem ist die Polarisierung von Makrophagen bei Hochregulation von TNIP1 gestört (Fan et al., 2015). Schließlich deutet auch die Interaktion von TNIP1 mit dem unter physiologischen Bedingungen lediglich in Keimzellen exprimierten MAGEB1 darauf hin, dass TNIP1 die Zelldifferenzierung beeinflussen könnte, denn MAGEB-Proteinen wird eine Rolle in der Steuerung der Keimzelldifferenzierung zugeschrieben (Lee und Potts, 2018). Ferner könnte TNIP1 auch an der Steuerung der Zellmigration beteiligt sein. Beobachtungen einer gestörten Wundreepithelisation bei verminderter TNIP1-Aktivität (Shamilov, Ackley et al., 2020) sowie einer scheinbar gesteigerten Metastasierungstendenz von Tumoren bei vermehrter TNIP1-Aktivität (Ren et al., 2017) unterstützen diesen Schluss. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die postkapilläre Leukozytenmigration über eine Modifikation zellulärer Kontakte TNIP1-abhängig gesteigert werden kann (Wang et

al., 2007), welches überdies auch einen Bezug zu einer TNIP1-abhängig pathologisch gesteigerten neuroinflammatorischen Aktivität herstellen lässt (Gateva et al., 2009; Zhou et al., 2011; Ippagunta et al., 2016; Rudraiah et al., 2018; Shamilov und Aneskievich, 2018; Jiménez-Sousa et al., 2019; Brady et al., 2020; Zhou et al., 2020; Shinkawa et al., 2022; Medhavy et al., 2024).

In der Zusammenschau deutet der potentielle Einfluss des Proteins TNIP1 auf verschiedene Prozesse der zellulären Entwicklung darauf hin, dass TNIP1 eine Schlüsselrolle als Signalmolekül in der Zellentwicklung einnehmen könnte. Diese Vermutung einer breiten funktionellen Bedeutung der TNIP1-Proteine für zelluläre Entwicklungsprozesse wird durch unterschiedliche klinische Beobachtungen gestützt: Einerseits scheint TNIP1 pathophysiologisch bedeutsam für die Entstehung der *Psoriasis vulgaris* zu sein, bei der die Zellteilung und –differenzierung der Keratinozyten gestört ist (Baurecht et al., 2015). Andererseits ist eine aberrante TNIP1-Aktivität als pathophysiologischer Faktor in der Entstehung von Gliomen nachgewiesen worden, in denen ebenfalls Zellteilung und –differenzierung gestört sind (Lei et al., 2020). Darüber hinaus spielt TNIP1 eine Rolle in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen (Restuadi et al., 2022; Enduru et al., 2024), bei denen das Zellüberleben gestört ist. Über seinen Interaktionspartner PIN1 könnte TNIP1 neben der Entstehung neurodegenerativer Krankheitsbilder auch an der Entstehung autoimmunologischer Erkrankungen beteiligt sein (Maggio et al., 2023); insbesondere ist wegen seiner Interaktion mit RAR eine Beteiligung an der Pathogenese der Multiplen Sklerose vorstellbar, denn die orale Gabe von Retinsäure reduziert die Demyelinisierung bei einer Multiplen Sklerose (Moura et al., 2023).

Zusammenfassend kann glaubhaft postuliert werden, dass TNIP1 im Zentralnervensystem an der Steuerung der zellulären Proliferation, Differenzierung und Migration sowie an der Regulation der Inflammation beteiligt ist. Vor dem Hintergrund einer analogen funktionellen Bedeutung mikroglialer Zellen stellt sich somit die weiterführende Frage, ob TNIP1-Proteine unter physiologischen Bedingungen auch in Mikrogliazellen vorkommen.

Mikrogliazellen sind einerseits an der Herausbildung, Erhaltung und Rückbildung neuronaler Kontakte (Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012; Miyamoto et al., 2016) sowie andererseits, als die geweberesidenten Makrophagen des Zentralnervensystems, an neuroinflammatorischen Prozessen beteiligt. Da eine Störung der Funktion des

Proteins TNFAIP3 in Mikrogliazellen zu autismusähnlichen Störungen der synaptischen Konnektion führt (Voet et al., 2018; Mohebiany et al., 2020) und es sich beim TNFAIP3 um einen Interaktionspartner des Proteins TNIP1 handelt (Heyninck et al., 2003; Mauro et al., 2006; Ramirez et al., 2012; Jiménez-Sousa et al., 2019), wäre eine analoge mikrogliavermittelte Veränderung der synaptischen Kontaktarchitektur auch bei einer TNIP1-Funktionsstörung zu erwarten. Da eine pathologische mikrogliale Aktivierung in autistischen Gehirnen bereits nachgewiesen worden ist (Vargas et al., 2005; Anderson et al., 2008), wäre somit eine Störung der mikroglialen Funktion infolge einer TNIP1-Funktionsstörung als pathogenetischer Mechanismus hinter der bei Autistischen veränderten synaptischen Kontaktarchitektur vorstellbar. Einen Hinweis darauf, dass TNIP1 auch in Mikrogliazellen exprimiert werden könnte, liefern die Ergebnisse von Forschungen an Ratten, in denen die TNIP1-Expression unterdrückt wurde und die hierunter eine pathologisch gesteigerte mikrogliale inflammatorische Aktivität aufwiesen (Zhou et al., 2020), sowie die in Kapitel 4.1 vorgestellte scRNA-Analyse.

4.3 TNIP1 als potentieller Regulator synaptischer Kontakte

Wenn das Protein TNIP1 über seine Interaktionspartner an der Differenzierung von Neuronen beteiligt ist, dann liegt es nahe, zu vermuten, dass Alterationen der TNIP1-Expression auch die synaptische Transmission beeinflussen. Aus der vorliegenden Arbeit ergeben sich erste Hinweise darauf, dass TNIP1 in Synapsen lokalisiert ist; dabei zeigten sich TNIP1-Signale deutlich häufiger mit dem präsynaptischen Markerprotein VAMP2 kolokalisiert als mit dem postsynaptischen Markerprotein DLG4.

Synaptisch lokalisiertes TNIP1 könnte einerseits zusammen mit seinem Interaktionspartner TNFAIP3 die Ausbildung dendritischer Dornen modifizieren und damit Einfluss auf die neuronale/synaptische Plastizität nehmen (Mei et al., 2020). Andererseits interagiert TNIP1 mit Ubiquitin C (UBC) (Abbildung 28); da die Herausbildung glutamaterger Synapsen, welche in autistischen Gehirnen gestört ist, wesentlich von der posttranskriptionellen Ubiquitylierung von Proteinen abhängig ist (Mabb, 2021), erscheint ein direkter Zusammenhang zwischen TNIP1-Lokalisation und TNIP1-Funktion in Synapsen plausibel. Darüber hinaus ist bekannt, dass TNIP1 auch mit dem Protein VPS33B interagiert (Abbildung 28), welches an der SNARE-vermittelten Membranfusion beteiligt ist (Gissen

et al., 2004). Die SNARE-Komplexe sind von entscheidender funktioneller Bedeutung für die synaptische Signaltransmission, insbesondere an den präsynaptischen Membranen (Jahn et al., 2024). Auch hier ist ein direkter Zusammenhang zwischen Lokalisation und Funktion des Proteins TNIP1 denkbar.

Ferner wurde nachgewiesen, dass TNIP1-Proteine mit dem Makroautophagosomenkennzeichnenden Protein MAP1LC3A interagieren (Tang et al., 2014; Shinkawa et al., 2022; Le Guerroué et al., 2023). MAP1LC3A wird in autistischen Gehirnen vermindert exprimiert (Yoshioka, 1992; Chaudry und Vasudevan, 2022), wodurch es zu einem verringerten Abbau und damit einer pathologischen Akkumulation synaptischer Proteine kommt. Diese Proteinakkumulation scheint die neuronale Plastizität zu stören, da die Rückbildung einmal herausgebildeter synaptischer Kontakte erschwert ist (Tang et al., 2014). In der Folge entsteht eine autistustypische neuronale Hyperkonnektivität (Pagani et al., 2021; Chaudry und Vasudevan, 2022). Da es sich beim MAP1LC3A um einen TNIP1-Interaktionspartner handelt, wäre eine analoge pathogenetische Rolle auch für TNIP1 vorstellbar.

Dass TNIP1 eine wichtige Rolle in der synaptischen Transmission spielt, ist abschließend auch vor dem Hintergrund anzunehmen, dass TNIP1 mit dem synaptisch lokalisierten Protein GIT2 interagiert (Abbildung 28). Ist die GIT2-Funktion gestört, so verändert sich die Morphologie der dendritischen Dornen sowie der synaptischen Kontakte (Van Gastel et al., 2018). Damit könnte TNIP1 über diese Interaktion an der Entstehung einer korrekten synaptischen Verschaltung und insbesondere an der Herausbildung der hierfür in der Kleinhirnrinde zahlreich ausgebildeten *dendritic spines* beteiligt sein, womit autismusähnliche morphologische Alterationen auch bei einer TNIP1-Funktionsstörung zu erwarten sein dürften.

Weiterführend wären somit Untersuchungen der TNIP1-Expression in autistisch veränderten Gehirnen interessant, um die Frage einer pathogenetischen Beteiligung von TNIP1 an der Entstehung des Autismus experimentell zu adressieren.

5 Zusammenfassung

Bei den Autismusspektrumstörungen handelt es sich um eine Gruppe von neuropsychiatrischen Krankheitsbildern, denen das Vorhandensein von Defiziten in der sozialen Interaktion, des Verhaltens, der Kommunikation, der Sprache und der Motorik gemein ist. Ätiologisch sind einerseits Genmutationen und –polymorphismen sowie andererseits Umweltfaktoren für die Entstehung eines Autismus bedeutsam. Relevante neuromorphologische Befunde in autistischen Gehirnen sind eine pathologisch verminderte Purkinjezellzahl sowie Alterationen der synaptischen Konnektion und Kontaktarchitektur. Pathophysiologisch werden eine erhöhte neuroinflammatorische Aktivität sowie eine gestörte ontogenetische Entwicklung für Autismen verantwortlich gemacht.

Bisherige Studien weisen darauf hin, dass das für TNIP1 codierende Gen Gegenstand einer genetischen Prädisposition für autistische Störungen sein könnte. TNIP1 ist ein Protein mit vielfältigen bekannten Funktionen, von denen zwei besonders hervorzuheben sind: Es interagiert einerseits mit nukleären Rezeptoren, die an der Steuerung der embryonalen Entwicklung beteiligt sind, und moduliert andererseits NFkB-abhängige Signaltransduktionskaskaden, die an der Steuerung inflammatorischer Prozesse beteiligt sind. Vor diesem Hintergrund liegt die Möglichkeit einer pathogenetischen Beteiligung an autistischen Störungen nahe, wenngleich die Expression des TNIP1-Proteins im Gehirn bislang nicht untersucht worden ist. In der vorliegenden Arbeit sollte daher als erster Ansatz zur Untersuchung der potentiellen Funktion des Proteins TNIP1 im Gehirn dessen Expression im Laufe der postnatalen Kleinhirnentwicklung untersucht werden.

Mit Hilfe immunhistochemischer Doppelfärbungen aldehydfixierter Kleinhirnschnitte von Mäusen unterschiedlichen Alters sowie immunzytochemischer Doppelfärbungen aldehydfixierter gemischter dissoziierter Primärzellkulturen von Mäusekleinhirnen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das TNIP1-Protein im Kleinhirn der Maus in Purkinjezellen, in Körnerzellen, in astrozytär differenzierten Gliazellen sowie in glialen Zellen oligodendrozytärer Differenzierung exprimiert wird. Während sich die Lokalisation des TNIP1-Proteins in Purkinjezellen im zeitlichen Verlauf veränderte, erwies sie sich in den untersuchten Zellen des Gliagewebes als konstant.

Das räumlich-zeitliche Expressionsprofil des Proteins TNIP1 lässt vermuten, dass dem Protein TNIP1 eine Schlüsselrolle bei verschiedenen zellulären Prozessen zukommt und

dass TNIP1 – je nach Interaktionspartner – sowohl auf die Zellproliferation als auch die Zellmigration und/oder die Zelldifferenzierung Einfluss nehmen kann. Die in der hiesigen Dissertation erstmals beschriebene präsynaptische und postsynaptische Lokalisation von TNIP1 weist darauf hin, dass das Protein TNIP1 auch für die synaptische Transmission von Bedeutung sein könnte. Dieses Wissen um die synaptische TNIP1-Lokalisation könnte helfen, ontogenetische Alterationen der synaptischen Kontaktarchitektur von neurodegenerativ bedingten Veränderungen abzugrenzen.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Überblick über die Domänenstruktur des humanen/murinen Proteins TNIP1	Seite 20
Abbildung 2:	Schematische Darstellung eines vermalen murinen Kleinhirnsagittalschnittes zur Veranschaulichung der Kleinhirnlobulierung nach Larsell	Seite 23
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der neuronalen Verschaltung des Kleinhirnes	Seite 26
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der postnatalen Entwicklung der Purkinjezellen sowie der Körnerzellen	Seite 30
Abbildung 5:	<i>Western Blot</i> -Analyse des Proteins TNIP1 in zwei Kleinhirnen adulter Mäuse	Seite 59
Abbildung 6:	<i>In situ</i> -Hybridisierungen an vermalen, sagittalen Kleinhirngefrierschnitten einer adulten Maus	Seite 60
Abbildung 7:	TNIP1/TUBB3-Immunzytochemie einer aldehydfixierten, gemischten dissoziierten Primärzellkultur dreier Kleinhirne der Altersstufe P8 nach 7-tägiger Kultivierung	Seite 62
Abbildung 8:	TNIP1/MAP2-Immunzytochemie einer aldehydfixierten, gemischten dissoziierten Primärzellkultur dreier Kleinhirne der Altersstufe P8 nach 7-tägiger Kultivierung	Seite 63
Abbildung 9:	TNIP1/FABP7-Immunzytochemie einer aldehydfixierten, gemischten dissoziierten Primärzellkultur dreier Kleinhirne der Altersstufe P8 nach 7-tägiger Kultivierung	Seite 64
Abbildung 10:	TNIP1/OLIG2-Immunzytochemie einer aldehydfixierten, gemischten dissoziierten Primärzellkultur dreier Kleinhirne der Altersstufe P8 nach 7-tägiger Kultivierung	Seite 65
Abbildung 11:	TNIP1/CALB1-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer adulten Maus	Seite 67
Abbildung 12:	TNIP1/GFAP-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer adulten Maus	Seite 68

Abbildung 13:	TNIP1/MBP-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer adulten Maus	Seite 69
Abbildung 14:	TNIP1/CALB1-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer neugeborenen Maus (<u>Altersstufe P0</u>)	Seite 71
Abbildung 15:	TNIP1/CALB1-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer drei Tage alten Maus (<u>Altersstufe P3</u>)	Seite 72
Abbildung 16:	TNIP1/CALB1-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer fünf Tage alten Maus (<u>Altersstufe P5</u>)	Seite 73
Abbildung 17:	TNIP1/CALB1-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer neun Tage alten Maus (<u>Altersstufe P9</u>)	Seite 74
Abbildung 18:	TNIP1/CALB1-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer fünfzehn Tage alten Maus (<u>Altersstufe P15</u>)	Seite 75
Abbildung 19:	TNIP1/CALB1-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer erwachsenen Maus (<u>Altersstufe adult</u>)	Seite 76
Abbildung 20:	TNIP1/GFAP-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer neun Tage alten Maus (<u>Altersstufe P9</u>)	Seite 78
Abbildung 21:	TNIP1/GFAP-Immunhistochemie zweier aldehydfixierter Kleinhirnvibratomschnitte (<u>Altersstufe P15</u> sowie <u>Altersstufe adult</u>)	Seite 79
Abbildung 22:	TNIP1/MBP-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer neun Tage alten Maus (<u>Altersstufe P9</u>)	Seite 81
Abbildung 23:	TNIP1/MBP-Immunhistochemie zweier aldehydfixierter Kleinhirnvibratomschnitte (<u>Altersstufe P15</u> sowie <u>Altersstufe adult</u>)	Seite 82

Abbildung 24:	TNIP1/VAMP2-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer adulten Maus	Seite 84
Abbildung 25:	TNIP1/DLG4-Immunhistochemie eines aldehydfixierten Kleinhirnvibratomschnitts einer adulten Maus	Seite 85
Abbildung 26:	Zweidimensionale Darstellung der Analyse eines öffentlich zugänglichen mehrdimensionalen Datensatzes einer scRNA-Analyse des murinen Kleinhirnes mittels eines UMAP-Algorithmus. Untersuchung der Expression der <i>Tnip1</i> -mRNA sowie der Expression zu <u>neuronalen Markergenen</u> gehöriger mRNA.	Seite 90
Abbildung 27:	Zweidimensionale Darstellung der Analyse eines öffentlich zugänglichen mehrdimensionalen Datensatzes einer scRNA-Analyse des murinen Kleinhirnes mittels eines UMAP-Algorithmus. Untersuchung der Expression der <i>Tnip1</i> -mRNA sowie der Expression zu <u>glialen Markergenen</u> gehöriger mRNA.	Seite 92
Abbildung 28:	Interaktionsnetzwerk des Proteins TNIP1	Seite 95

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Auflistung der Lösungen in alphabetischer Reihenfolge	Seite 32
Tabelle 2:	Auflistung der Antikörper in alphabetischer Reihenfolge	Seite 37
Tabelle 3:	Kenndaten zur Perfusionsfixation der Versuchstiere nach Altersstufe	Seite 40
Tabelle 4:	Antikörperverdünnungen und Altersstufen nach IHC-Doppelfärbung	Seite 42
Tabelle 5:	Antikörperverdünnungen und Altersstufen nach ICC-Doppelfärbung	Seite 47
Tabelle 6:	Linearisierungsansätze der klonierten cDNA-Vektorplasmide	Seite 49
Tabelle 7:	<i>in vitro</i> -Transkriptionsansätze der linearisierten cDNA-Vektorplasmide	Seite 50
Tabelle 8:	Ansätze zur Ribosondenhybridisierung	Seite 51
Tabelle 9:	Standardlösungen für die Messungen der BCA-Analyse	Seite 54

8 Literaturverzeichnis

Abbasi A, Forsberg K, Bischof F. The role of the ubiquitin-editing enzyme A20 in diseases of the central nervous system and other pathological processes. *Front Mol Neurosci* 2015; 8: 21

Alonso-López D, Campos-Laborie FJ, Gutiérrez MA, Lambourne L, Calderwood MA, Vidal M, De Las Rivas J. APID database: redefining protein–protein interaction experimental evidences and binary interactomes. *Database* 2019; 1-8

Altman J, Bayer SA. Development of the cerebellar system in relation to its evolution, structure and functions. In: Boca Raton – New York – London – Tokio: CRC Press, 1997

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

Amjad N, Yang R, Li L, Fu J, Yang B, Xu B, Tan C, Chen H, Wang X. Decrease of miR-19b-3p in Brain Microvascular Endothelial Cells Attenuates Meningitic Escherichia coli-Induced Neuroinflammation via TNFAIP3-Mediated NF-κB Inhibition. *Pathogens* 2019; 8: 268

Anderson MP, Hooker BS, Herbert MR. Bridging from Cells to Cognition in Autism Pathophysiology: Biological Pathways to Defective Brain Function and Plasticity. *Am J Biochem Biotechnol* 2008; 4: 167–176

Ashida H, Kim M, Schmidt-Supprian M, Ma A, Ogawa M, Sasakawa C. A bacterial E3 ubiquitin ligase IpaH9.8 targets NEMO/IKKγ to dampen the host NF-κB-mediated inflammatory response. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 66–69

Auerbach BD, Osterweil EK, Bear MF. Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature* 2011; 480: 63–68

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, Schilling ML, Rosengarten B, Pretsch W, Teutsch HF, Oberdick J, Schilling K. Purkinje Cell Lineage and the Topographic Organization of the Cerebellar Cortex: A View from X Inactivation Mosaics. *Dev Biol* 1996; 174: 393–406

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

Bagwan N, El Ali HH, Lundby A. Proteome-wide profiling and mapping of post translational modifications in human hearts. *Sci Rep* 2021; 11: 2184

Bahaaeldin M, Bülte CV, Lüsberg F, Kumar S, Kappler J, Völker C, Schilling K, Baader SL. Engrailed-2 and inflammation convergently and independently impinge on cerebellar Purkinje cell differentiation. *J Neuroinflammation* 2024; 21: 306

Barbarese E, Barry C, Chou C-HJ, Goldstein DJ, Nakos GA, Hyde-DeRuyscher R, Scheld K, Carson JH. Expression and Localization of Myelin Basic Protein in Oligodendrocytes and Transfected Fibroblasts. *J Neurochem* 1988; 51: S. 1737–1745

Bauman ML, Kemper TL. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *Int J Dev Neurosci* 2005; 23: 183–187

Baurecht H, Hotze M, Brand S, Büning C, Cormican P, Corvin A, Ellinghaus D, Ellinghaus E, Esparza-Gordillo J, Fölster-Holst R, Franke A, Gieger C, Hubner N, Illig T, Irvine AD, Kabesch M, Lee YAE, Lieb W, Marenholz I, McLean WHI, Morris DW, Mrowietz U, Nair R, Nöthen MM, Novak N, O’Regan GM, Schreiber S, Smith C, Strauch K, Stuart PE, Trembath R, Tsoi LC, Weichenthal M, Barker J, Elder JT, Weidinger S, Cordell HJ, Brown SJ. Genome-wide Comparative Analysis of Atopic Dermatitis and Psoriasis Gives Insight into Opposing Genetic Mechanisms. *Am J Hum Genet* 2015; 96: 104–120

Beckinghausen J, Sillitoe RV. Insights into cerebellar development and connectivity. *Neurosci Lett* 2019; 688: 2–13

Ben-Arie N. Evolutionary conservation of sequence and expression of the bHLH protein Atonal suggests a conserved role in neurogenesis. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1207–1216

Bignami A, Dahl D. Differentiation of astrocytes in the cerebellar cortex and the pyramidal tracts of the newborn rat. An immunofluorescence study with antibodies to a protein specific to astrocytes. *Brain Res* 1973; 49: S. 393–402

Binda F, Pernaci C, Saxena S. Cerebellar Development and Circuit Maturation: A Common Framework for Spinocerebellar Ataxias. *Front Neurosci* 2020; 14: 293

Bingol B, Sheng M. Deconstruction for Reconstruction: The Role of Proteolysis in Neural Plasticity and Disease. *Neuron* 2011; 69: 22–32

Boersma MCH, Dresselhaus EC, De Biase LM, Mihalas AB, Bergles DE, Meffert MK. A Requirement for Nuclear Factor- κ B in Developmental and Plasticity-Associated Synaptogenesis. *J Neurosci* 2011; 31: 5414–5425

Bourgeron T. A synaptic trek to autism. *Curr Opin Neurobiol* 2009; 19: 231–234

Bovolenta P, Liem RKH, Mason CA. Development of cerebellar astroglia: Transitions in form and cytoskeletal content. *Dev Biol* 1984; 102: 248–259

Brady MP, Korte EA, Caster DJ, Powell DW. TNIP1 /ABIN1 and lupus nephritis: review. *Lup Sci Med* 2020; 7: 1-8

Butts JC, Wu S-R, Durham MA, Dhindsa RS, Revelli J-P, Ljungberg MC, Saulnier O, McLaren ME, Taylor MD, Zoghbi HY. A single-cell transcriptomic map of the developing Atoh1 lineage identifies neural fate decisions and neuronal diversity in the hindbrain. *Dev Cell* 2024; 59: 2171-2188

Cai F, Chen Shasha, Yu X, Zhang Jing, Liang W, Zhang Y, Chen Y, Chen Sheng, Hong Y, Yan W, Wang W, Zhang Jianmin, Wu Q. Transcription factor GTF2B regulates AIP protein expression in growth hormone-secreting pituitary adenomas and influences tumor phenotypes. *Neuro Oncol* 2022; 24: 925–935

Camandola S, Mattson MP. NF- κ B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 123–132

Catrysse L, Vereecke L, Beyaert R, van Loo G. A20 in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol* 2014; 35: 22–31

Chao H-T, Chen H, Samaco RC, Xue M, Chahrour M, Yoo J, Neul JL, Gong S, Lu H-C, Heintz N, Ekker M, Rubenstein JLR, Noebels JL, Rosenmund C, Zoghbi HY. Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature* 2010; 468: 263–269

Chaudry S, Vasudevan N. mTOR-Dependent Spine Dynamics in Autism. *Front Mol Neurosci* 2022; 15: 877609

Chen J, Ma Y, Yang Z, Lan H, Liu G, Zhang Y, Xia H, Wang X, Han F, Tu X, Liu B. TNFAIP3 ameliorates the degeneration of inflammatory human nucleus pulposus cells by inhibiting mTOR signaling and promoting autophagy. *Aging* 2020; 12: 24242–24254

Dasgupta S, Jana M, Zhou Y, Fung YK, Ghosh S, Pahan K. Antineuroinflammatory Effect of NF- κ B Essential Modifier-Binding Domain Peptides in the Adoptive Transfer Model of Experimental Allergic Encephalomyelitis. *J Immunol* 2004; 173: 1344–1354

De Vries PJ, Wilde L, De Vries MC, Moavero R, Pearson DA, Curatolo P. A clinical update on tuberous sclerosis complex-associated neuropsychiatric disorders (TAND). *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2018; 178: 309–320

Dehmelt L, Halpain S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 2004; 6: 204

Delvendahl I, Weyhersmüller A, Ritzau-Jost A, Hallermann S. Hippocampal and cerebellar mossy fibre boutons – same name, different function. *J Physiol* 2013; 591: 3179–3188

Donovan APA, Basson MA. The neuroanatomy of autism - a developmental perspective. *J Anat* 2017; 230: 4–15

Duan R, Liu Qi, Li J, Bian X, Yuan Q, Li Y, Long F, Gao S, Wei S, Li P, Gao F, Sun W, Li X, Liu Qiji. A De Novo Frameshift Mutation in TNFAIP3 Impairs A20 Deubiquitination Function to Cause Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Immunol* 2019; 39: 795–804

Duan W, Wang K, Duan Y, Chu X, Ma R, Hu P, Xiong B. Integrated Transcriptome Analyses Revealed Key Target Genes in Mouse Models of Autism. *Autism Res* 2020; 13: 352–368

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

Edwards MA, Yamamoto M, Caviness VS. Organization of radial glia and related cells in the developing murine CNS. An analysis based upon a new monoclonal antibody marker. *Neurosci* 1990; 36: 121–144

Egan D, Kim J, Shaw RJ, Guan K-L. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy* 2011; 7: 643–644

El-Ansary A, Al-Ayadhi L. GABAergic/glutamatergic imbalance relative to excessive neuroinflammation in autism spectrum disorders. *J Neuroinflammation* 2014; 11: 189

Enduru N, Fernandes BS, Bahrami S, Dai Y, Andreassen OA, Zhao Z. Genetic overlap between Alzheimer's disease and immune-mediated diseases: an atlas of shared genetic determinants and biological convergence. *Mol Psychiatry* 2024; 29: 2447–2458

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969-2000). *Neurochem Res* 2000; 25: 1439–1451

Van Essen MJ, Nayler S, Becker EBE, Jacob J. Deconstructing cerebellar development cell by cell. *PLoS Genet* 2020; 16: 4

Fan C, Zhang Y, Zhou Y, Li B, He Y, Guo Y, Jia Z. Up-regulation of A20/ABIN1 contributes to inefficient M1 macrophage polarization during Hepatitis C virus infection. *Virol J* 2015; 12: 147

Favre M, Buttica C, Stevenson B, Jongeneel V, Telenti A. High Frequency of Alternative Splicing of Human Genes Participating in the HIV-1 Life Cycle. A Model Using TSG101, β TrCP, PPIA, INI1, NAF1, and PML. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 34: 127–133

Feng L, Hatten ME, Heintz N. Brain lipid-binding protein (BLBP): A novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 1994; 12: 895–908

Ferreira A, Caceres A. Expression of the Class III β -tubulin isotype in developing neurons in culture. *J Neurosci Res* 1992; 32: 516–529

Flores AM, Gurevich I, Zhang C, Ramirez VP, Devens TR, Aneskievich BJ. TNIP1 is a corepressor of agonist-bound PPARs. *Arch Biochem Biophys* 2011; 516: 58–66

Foran D, Peterson A. Myelin acquisition in the central nervous system of the mouse revealed by an MBP-Lac Z transgene. *J Neurosci* 1992; 12: 4890–4897

Frantz D, Weimann M, Levin E, McConnell K. Otx1 and Otx2 Define Layers and Regions in Developing Cerebral Cortex and Cerebellum. *J Neurosci* 1994; 14: 5725–5740

Fukushi M, Dixon J, Kimura T, Tsurutani N, Dixon MJ, Yamamoto N. Identification and cloning of a novel cellular protein Naf1, Nef-associated factor 1, that increases cell surface CD4 expression. *FEBS Lett* 1999; 442: 83–88

Van Gastel J, Boddaert J, Jushaj A, Premont RT, Luttrell LM, Janssens J, Martin B, Maudsley S. GIT2—A keystone in ageing and age-related disease. *Ageing Res Rev* 2018; 43: 46–63

Gateva V, Sandling JK, Hom G, Taylor KE, Chung SA, Sun X, Ortmann W, Kosoy R, Ferreira RC, Nordmark G, Gunnarsson I, Svenungsson E, Padyukov L, Sturfelt G, Jönsen A, Bengtsson AA, Rantapää-Dahlqvist S, Baechler EC, Brown EE, Alarcón GS, Edberg JC, Ramsey-Goldman R, McGwin G, Reveille JD, Vilá LM, Kimberly RP, Manzi S, Petri MA, Lee A, Gregersen PK, Seldin MF, Rönnblom L, Criswell LA, Syvänen A-C, Behrens TW, Graham RR. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nature Genet* 2009; 41: 1228–1233

Ghoumari AM, Ibanez C, El-Etr M, Leclerc P, Eychenne B, O'Malley BW, Baulieu EE, Schumacher M. Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein

expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum: Progesterone and CNS myelination. *J Neurochem* 2003; 86: 848–859

Gilda JE, Gomes AV. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to β -actin for Western blots. *Anal Biochem* 2013; 440: 186–188

Gissen P, Johnson CA, Morgan NV, Stapelbroek JM, Forsheew T, Cooper WN, McKiernan PJ, Klomp LWJ, Morris AAM, Wraith JE, McClean P, Lynch SA, Thompson RJ, Lo B, Quarrell OW, Di Rocco M, Trembath RC, Mandel H, Wali S, Karet FE, Knisely AS, Houwen RHJ, Kelly DA, Maher ER. Mutations in VPS33B, encoding a regulator of SNARE-dependent membrane fusion, cause arthrogryposis–renal dysfunction–cholestasis (ARC) syndrome. *Nature Genet* 2004; 36: 400–404

Göttsche CEC. TNIP1 affects proliferation, apoptosis and migration of Human Embryonic Kidney 293 cells. Dissertationsschrift aus der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 2025

G'Sell RT, Gaffney PM, Powell DW. Review: A20-Binding Inhibitor of NF- κ B Activation 1 Is a Physiologic Inhibitor of NF- κ B: A Molecular Switch for Inflammation and Autoimmunity. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67: 2292–2302

Gupta K, Ott D, Hope TJ, Siliciano RF, Boeke JD. A Human Nuclear Shuttling Protein That Interacts with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Matrix Is Packaged into Virions. *J Virol* 2000; 74: 11811–11824

Gurevich I, Aneskievich BJ. Liganded RAR α and RAR γ interact with but are repressed by TNIP1. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 389: 409–414

Gurevich I, Zhang C, Francis N, Aneskievich BJ. TNIP1, a Retinoic Acid Receptor Corepressor and A20-binding Inhibitor of NF- κ B, Distributes to Both Nuclear and Cytoplasmic Locations. *J Histochem Cytochem* 2011; 59: 1101–1112

Gurevich I, Zhang C, Francis N, Struzynsky CP, Livings SE, Aneskievich BJ. Human TNF α -induced protein 3-interacting protein 1 (TNIP1) promoter activation is regulated by retinoic acid receptors. *Gene* 2013; 515: 42–48

Haldipur P, Dang D, Millen KJ. Embryology. *Handb Clin Neurol* 2018; 154: 29–44

Haldipur P, Millen KJ. What cerebellar malformations tell us about cerebellar development. *Neurosci Lett* 2019; 688: 14–25

Hao Y, Stuart T, Kowalski MH, Choudhary S, Hoffman P, Hartman A, Srivastava A, Molla G, Madad S, Fernandez-Granda C, Rahul S. Dictionary learning for integrative, multimodal and scalable single-cell analysis. *Nat Biotechnol* 2024; 42: 293–304

Haque A, Engel J, Teichmann SA, Lönnberg T. A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications. *Genome Med* 2017; 9: 75

Hartfuss E, Galli R, Heins N, Götz M. Characterization of CNS Precursor Subtypes and Radial Glia. *Dev Biol* 2001; 229: 15–30

Van der Heijden ME, Gill JS, Sillitoe RV. Abnormal Cerebellar Development in Autism Spectrum Disorders. *Dev Neurosci* 2021; 43: 181–190

Heyninck K, Kreike MM, Beyaert R. Structure-function analysis of the A20-binding inhibitor of NF- κ B activation, ABIN-1. *FEBS Lett* 2003; 536: 135–140

Heyninck K, Valck DD, Berghe WV, Crieckinge WV, Contreras R, Fiers W, Haegeman G, Beyaert R. The Zinc Finger Protein A20 Inhibits TNF-induced NF- κ B-dependent Gene Expression by Interfering with an RIP- or TRAF2-mediated Transactivation Signal and Directly Binds to a Novel NF- κ B-inhibiting Protein ABIN. *J Cell Biol* 1999; 145: 1471–1482

Hodges H, Fealko C, Soares N. Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. *Transl Pediatr* 2020; 9: 55–65

Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module. *Oncogene* 2006; 25: 6706–6716

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

Honarpisheh Pedram, Lee J, Banerjee A, Blasco-Conesa MP, Honarpisheh Parisa, d'Aigle J, Mamun AA, Ritzel RM, Chauhan A, Ganesh BP, McCullough LD. Potential caveats of putative microglia-specific markers for assessment of age-related cerebrovascular neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 2020; 17: 366

Hutsler JJ, Zhang H. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res* 2010; 1309: 83–94

Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med* 2018; 50: 1–14

Ippagunta SK, Gangwar R, Finkelstein D, Vogel P, Pelletier S, Gingras S, Redecke V, Häcker H. Keratinocytes contribute intrinsically to psoriasis upon loss of Tnfr1 function. *Proc Natl Acad Sci* 2016; 6162–6171

Jahn R, Cafiso DC, Tamm LK. Mechanisms of SNARE proteins in membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2024; 25: 101–118

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

Jankowski J, Miething A, Schilling K, Baader SL. Physiological Purkinje Cell Death Is Spatiotemporally Organized in the Developing Mouse Cerebellum. *Cerebellum* 2009; 8: 277–290

Jiménez-Sousa M, Fadrique A, Liu P, Fernández-Rodríguez A, Lorenzo-López M, Gómez-Sánchez E, Gómez-Sanz A, Heredia-Rodríguez M, Gómez-Pesquera E, Martínez I, Tamayo E, Resino S. TNFAIP3, TNIP1, and MyD88 Polymorphisms Predict Septic-Shock-Related Death in Patients Who Underwent Major Surgery. *J Clin Med* 2019; 8: 283

Kapfhammer JP, Gugger OS. The Analysis of Purkinje Cell Dendritic Morphology in Organotypic Slice Cultures. *J Vis Exp* 2012; 61: 3637

Kattah MG, Shao L, Rosli YY, Shimizu H, Whang MI, Advincula R, Achacoso P, Shah S, Duong BH, Onizawa M, Tanbun P, Malynn BA, Ma A. A20 and ABIN-1 synergistically preserve intestinal epithelial cell survival. *J Exp Med* 2018; 215: 1839–1852

Keith D, El-Husseini A. Excitation control: balancing PSD-95 function at the synapse. *Front Mol Neurosci* 2008; 1: 4

Kemper TL, Bauman M. Neuropathology of Infantile Autism. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 645–652

Khanolkar RC, Kalogeropoulos M, Lawrie A, Roghanian A, Vickers MA, Young NT. Leukocyte Ig-Like receptor B1 restrains dendritic cell function through increased expression of the NF- κ B regulator ABIN1/TNIP1. *J Leukoc Biol* 2016; 100: 737–746

Kosik S, Finch A. MAP2 and Tau Segregate into Dendritic and Axonal Domains After the Elaboration of Morphologically Distinct Neurites: An Immunocytochemical Study of Cultured Rat Cerebrum. *J Neurosci* 1987; 7: 3142–3153

Kuhar SG, Feng L, Vidan S, Ross ME, Hatten ME, Heintz N. Changing patterns of gene expression define four stages of cerebellar granule neuron differentiation. *Development* 1993; 117: 97–104

Kurtz A, Zimmer A, Schnütgen F, Brüning G, Spener F, Müller T. The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development* 1994; 120: 2637–2649

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

Larsson HJ, Eaton WW, Madsen KM, Vestergaard M, Olesen AV, Agerbo E, Schendel D, Thorsen P, Mortensen PB. Risk Factors for Autism: Perinatal Factors, Parental Psychiatric History, and Socioeconomic Status. *Am J Epidemiol* 2005; 161: 916–925

Le Guerroué F, Bunker EN, Rosencrans WM, Nguyen JT, Basar MA, Werner A, Chou T-F, Wang C, Youle RJ. TNIP1 inhibits selective autophagy via bipartite interaction with LC3/GABARAP and TAX1BP1. *Mol Cell* 2023; 83: 927-941

Lee AK, Potts PR. A comprehensive guide to the MAGE family of ubiquitin ligases. *J Mol Biol* 2018; 429: 1114–1142

Lei Q, Gu H, Li L, Wu T, Xie W, Li M, Zhao N. TNIP1-mediated TNF- α /NF- κ B signalling cascade sustains glioma cell proliferation. *J Cell Mol Med* 2020; 24: 530–538

Leterrier C, Brachet A, Fache M-P, Dargent B. Voltage-gated sodium channel organization in neurons: Protein interactions and trafficking pathways. *Neurosci Lett* 2010; 486: 92–100

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

Liu P, Choi Y-K, Qi RZ. NME7 is a functional component of the γ -tubulin ring complex. *Mol Biol Cell* 2014; 25: 2017–2025

Van Loo G, Bertrand MJM. Death by TNF: a road to inflammation. *Nat Rev Immunol* 2023; 23: 289–303

Lord C, Cook EH, Leventhal BL, Amaral DG. Autism Spectrum Disorders. *Neuron* 2000; 28: 355–363

Ma A, Malynn BA. A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 774–785

Mabb AM. Historical perspective and progress on protein ubiquitination at glutamatergic synapses. *Neuropharmacology* 2021; 196: 108690

Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 755–765

Maggio J, Armando R, Balcone L, Vilarullo R, Casco M, Mengual Gomez D, Gomez D. Role of PIN1 in human pathology: Cellular regulation, pathogenesis and therapeutic implications (Review). *World Acad Sci J* 2023; 6: 5

Malatesta P, Appolloni I, Calzolari F. Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res* 2008; 331: 165–178

Malyann BA, Ma A. A20: A multifunctional tool for regulating immunity and preventing disease. *Cell Immunol* 2019; 340: 103914

Mamber C, Kamphuis W, Haring NL, Peprah N, Middeldorp J, Hol EM. GFAP δ Expression in Glia of the Developmental and Adolescent Mouse Brain. *PLoS One* 2012; 7: e52659

Maricich SM, Herrup K. Pax-2 expression defines a subset of GABAergic interneurons and their precursors in the developing murine cerebellum. *J Neurobiol* 1999; 41: 281–294

Matsuzawa Y, Oshima S, Takahara M, Maeyashiki C, Nemoto Y, Kobayashi M, Nibe Y, Nozaki K, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Ma A, Watanabe M. TNFAIP3 promotes survival of CD4 T cells by restricting MTOR and promoting autophagy. *Autophagy* 2015; 11: 1052–1062

Mauro C, Pacifico F, Latorgna A, Mellone S, Iannetti A, Acquaviva R, Formisano S, Vito P, Leonardi A. ABIN-1 Binds to NEMO/IKK γ and Co-operates with A20 in Inhibiting NF- κ B. *J Biol Chem* 2006; 281: 18482–18488

McInnes L, Healy J, Melville J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. *arXiv* 2020; 1802: 03426

McQueen J, Reimer MM, Holland PR, Manso Y, McLaughlin M, Fowler JH, Horsburgh K. Restoration of Oligodendrocyte Pools in a Mouse Model of Chronic Cerebral Hypoperfusion. *PLoS One* 2014; 9: 87227

Medhavy A, Athanasopoulos V, Bassett K, He Y, Stanley M, Enosi Tuipulotu D, Cappello J, Brown GJ, Gonzalez-Figueroa P, Turnbull C, Shanmuganandam S, Tummala P, Hart G, Lea-Henry T, Wang H, Nambadan S, Shen Q, Roco JA, Burgio G, Wu P, Cho E, Andrews TD, Field MA, Wu X, Ding H, Guo Q, Shen N, Man SM, Jiang SH, Cook MC, Vinuesa CG. A TNIP1-driven systemic autoimmune disorder with elevated IgG4. *Nat Immunol* 2024; 25: 1678–1691

Mei S, Ruan H, Ma Q, Yao W-D. The ubiquitin-editing enzyme A20 regulates synapse remodeling and efficacy. *Brain Res* 2020; 1727: 146569

Meng Z, Zhao T, Zhou K, Zhong Q, Wang Y, Xiong X, Wang F, Yang Y, Zhu W, Liu J, Liao M, Wu L, Duan C, Li J, Gong Q, Liu L, Xiong A, Yang M, Wang J, Yang Q. A20 Ameliorates Intracerebral Hemorrhage–Induced Inflammatory Injury by Regulating TRAF6 Polyubiquitination. *J Immunol* 2017; 198: 820–831

Miale IL, Sidman RL. An Autoradiographic Analysis of Histogenesis in the Mouse Cerebellum. *Exp Neurol* 1961; 4: 277–296

Miron VE. Microglia-driven regulation of oligodendrocyte lineage cells, myelination, and remyelination. *J Leukoc Biol* 2017; 101: 1103–1108

Mitchell LS, Gillespie SC, McAllister F, Fanarraga ML, Kirkham D, Kelly B, Brophy PJ, Griffiths IR, Montague P, Kennedy PGE. Developmental expression of major myelin protein genes in the CNS of X-Linked hypomyelinating mutant rumpshaker. *J Neurosci Res* 1992; 33: 205–217

Miyamoto A, Wake H, Ishikawa AW, Eto K, Shibata K, Murakoshi H, Koizumi S, Moorhouse AJ, Yoshimura Y, Nabekura J. Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nature Commun* 2016; 7: 12540

Mohebiany AN, Ramphal NS, Karram K, Di Liberto G, Novkovic T, Klein M, Marini F, Kreutzfeldt M, Härtner F, Lacher SM, Bopp T, Mittmann T, Merkler D, Waisman A. Microglial A20 Protects the Brain from CD8 T-Cell-Mediated Immunopathology. *Cell Rep* 2020; 30: 1585-1597

Montazi G, Lambrecht BN, Naranjo JR, Schock BC. Regulators of A20 (TNFAIP3): new drug-able targets in inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2019; 316: 456–469

Montarolo F, Perga S, Tessarolo C, Spadaro M, Martire S, Bertolotto A. TNFAIP3 Deficiency Affects Monocytes, Monocytes-Derived Cells and Microglia in Mice. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 2830

Moura RP, Carvalho ED, Martins C, Des Rieux A, Pêgo AP, Sarmento B. Functionalized retinoic acid lipid nanocapsules promotes a two-front attack on inflammation and lack of demyelination on neurodegenerative disorders. *J Control Release* 2023; 358: 43–58

Musone SL, Taylor KE, Lu TT, Nititham J, Ferreira RC, Ortmann W, Shifrin N, Petri MA, Ilyas Kamboh M, Manzi S, Seldin MF, Gregersen PK, Behrens TW, Ma A, Kwok P-Y, Criswell LA. Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. *Nature Genet* 2008; 40: 1062–1064

Nanda SK, Venigalla RKC, Ordureau A, Patterson-Kane JC, Powell DW, Toth R, C. Arthur JS, Cohen P. Polyubiquitin binding to ABIN1 is required to prevent autoimmunity. *J Exp Med* 2011; 208: 1215–1228

Oberdick J. From zebra stripes to postal zones: deciphering patterns of gene expression in the cerebellum. *Trends Neurosci* 1998; 9: 21: 383–390

Oberdick J, Levinthal F, Levinthal C. A Purkinje Cell Differentiation Marker Shows a Partial DNA Sequence Homology to the Cellular sis/PDGF2 Gene. *Neuron* 1988; 18: 367–376

Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol* 2011; 12: 695–708

O'Mahony A, Raber J, Montano M, Foehr E, Han V, Lu S, Kwon H, LeFevour A, Chakraborty-Sett S, Greene WC. NF- κ B/Rel Regulates Inhibitory and Excitatory Neuronal Function and Synaptic Plasticity. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 7283–7298

Onizawa M, Oshima S, Schulze-Topphoff U, Oses-Prieto JA, Lu T, Tavares R, Prodhomme T, Duong B, Whang MI, Advincula R, Agelidis A, Barrera J, Wu H, Burlingame A, Malynn BA, Zamvil SS, Ma A. The ubiquitin-modifying enzyme A20 restricts ubiquitination of the kinase RIPK3 and protects cells from necroptosis. *Nat Immunol* 2015; 16: 618–627

Oshima S, Turer EE, Callahan JA, Chai S, Advincula R, Barrera J, Shifrin N, Lee B, Yen B, Woo T, Malynn BA, Ma A. ABIN-1 is a ubiquitin sensor that restricts cell death and sustains embryonic development. *Nature* 2009; 457: 906–909

Pagani M, Barsotti N, Bertero A, Trakoshis S, Ulysse L, Locarno A, Miseviciute I, De Felice A, Canella C, Supekar K, Galbusera A, Menon V, Tonini R, Deco G, Lombardo MV, Pasqualetti M, Gozzi A. mTOR-related synaptic pathology causes autism spectrum disorder-associated functional hyperconnectivity. *Nat Commun* 2021; 12: 6084

Palmen SJMC, von Engeland H, Hof PR, Schmitz C. Neuropathological findings in autism. *Brain* 2004; 127: 2572–2583

Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT. Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science* 2011; 333: 1456–1458

Peça J, Feng G. Cellular and synaptic network defects in autism. *Curr Opin Neurobiol* 2012; 22: 866–872

Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen J-E, Woolfrey KM. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 2011; 14: 285–293

Perga S, Martire S, Montarolo F, Navone ND, Calvo A, Fuda G, Marchet A, Leotta D, Chiò A, Bertolotto A. A20 in Multiple Sclerosis and Parkinson's Disease: Clue to a Common Dysregulation of Anti-Inflammatory Pathways? *Neurotox Res* 2017; 32: 1–7

Perga S, Montarolo F, Martire S, Bonaldo B, Bono G, Bertolo J, Magliozzi R, Bertolotto A. Overexpression of the ubiquitin-editing enzyme A20 in the brain lesions of Multiple Sclerosis patients: moving from systemic to central nervous system inflammation. *Brain Pathol* 2021; 31: 283–296

Pergolizzi B, Bozzaro S, Bracco E. Dictyostelium as model for studying ubiquitination and deubiquitination. *Int J Dev Biol* 2019; 63: 529–539

Polley S, Müschenborn H, Terbeck M, De Antoni A, Vetter IR, Dogterom M, Musacchio A, Volkov VA, Huis In 't Veld PJ. Stable kinetochore-microtubule attachment requires loop-dependent Ndc80-Ndc80 binding. *EMBO J* 2023; 42: 112504

Pranski EL, Van Sanford CD, Dalal NV, Orr AL, Karmali D, Cooper DS, Costa N, Heilman CJ, Gearing M, Lah JJ, Levey AI, Betarbet RS. Comparative distribution of protein

components of the A20 ubiquitin-editing complex in normal human brain. *Neurosci Lett* 2012; 520: 104–109

Purves D, Lichtman JW. Elimination of Synapses in the Developing Nervous System. *Science* 1980; 210: 153–157

Van Quickenberghe E, De Sutter D, Van Loo G, Eyckerman S, Gevaert K. A protein-protein interaction map of the TNF-induced NF- κ B signal transduction pathway. *Sci Data* 2018; 5: 180289

Rakic P, Bourgeois J-P, Eckenhoff MF, Zecevic N, Goldman-Rakic PS. Concurrent Overproduction of Synapses in Diverse Regions of the Primate Cerebral Cortex. *Science* 1986; 232: 232–235

Ramirez VP, Gurevich I, Aneskievich BJ. Emerging roles for TNIP1 in regulating post-receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2012; 23: 109–118

Reeber SL, Otis TS, Sillitoe RV. New roles for the cerebellum in health and disease. *Front Syst Neurosci* 2013; 7: 1–11

Ren D, Yang Q, Dai Y, Guo W, Du H, Song L, Peng X. Oncogenic miR-210-3p promotes prostate cancer cell EMT and bone metastasis via NF- κ B signaling pathway. *Mol Cancer* 2017; 16: 117

Renner F, Schmitz ML. Autoregulatory feedback loops terminating the NF- κ B response. *Trends Biochem Sci* 2009; 34: 128–135

Restuadi R, Steyn FJ, Kabashi E, Ngo ST, Cheng F-F, Nabais MF, Thompson MJ, Qi T, Wu Y, Henders AK, Wallace L, Bye CR, Turner BJ, Ziser L, Mathers S, McCombe PA, Needham M, Schultz D, Kiernan MC, Van Rheenen W, Van Den Berg LH, Veldink JH, Ophoff R, Gusev A, Zaitlen N, McRae AF, Henderson RD, Wray NR, Giacomotto J, Garton FC. Functional characterisation of the amyotrophic lateral sclerosis risk locus GPX3/TNIP1. *Genome Med* 2022; 14: 7

Riol H, Fages C, Tardy M. Transcriptional regulation of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-mRNA expression during postnatal development of mouse brain. *J Neurosci Res* 1992; 32: 79–85

Ritvo ER, Freeman BJ, Scheibel AB, Duong T, Robinson H, Guthrie D, Ritvo A. Lower Purkinje cell counts in the cerebella of four autistic subjects: initial findings of the UCLA-NSAC Autopsy Research Report. *Am J Psychiatry* 1986; 143: 862–866

Rolland T, Taşan M, Charloteaux B, Pevzner SJ, Zhong Q, Sahni N, Yi S, Lemmens I, Fontanillo C, Mosca R, Kamburov A, Ghiassian SD, Yang X, Ghamsari L, Balcha D, Begg BE, Braun P, Brehme M, Broly MP, Carvunis A-R, Convery-Zupan D, Corominas R, Coulombe-Huntington J, Dann E, Dreze M, Dricot A, Fan C, Franzosa E, Gebreab F, Gutierrez BJ, Hardy MF, Jin M, Kang S, Kiros R, Lin GN, Luck K, MacWilliams A, Menche J, Murray RR, Palagi A, Poulin MM, Rambout X, Rasla J, Reichert P, Romero V, Ruyssinck E, Sahalie JM, Scholz A, Shah AA, Sharma A, Shen Y, Spirohn K, Tam S, Tejada AO, Wanamaker SA, Twizere J-C, Vega K, Walsh J, Cusick ME, Xia Y, Barabási A-L, Iakoucheva LM, Aloy P, De Las Rivas J, Tavernier J, Calderwood MA, Hill DE, Hao T, Roth FP, Vidal M. A Proteome-Scale Map of the Human Interactome Network. *Cell* 2014; 159: 1212–1226

Rosina E, Battan B, Siracusano M, Di Criscio L, Hollis F, Pacini L, Curatolo P, Bagni C. Disruption of mTOR and MAPK pathways correlates with severity in idiopathic autism. *Transl Psychiatry* 2019; 9: 50

Roskams AJI, Cai X, Ronnett GV. Expression of neuron-specific beta-III tubulin during olfactory neurogenesis in the embryonic and adult rat. *Neuroscience* 1998; 83: 191–200

Rothschild DE, McDaniel DK, Ringel-Scaia VM, Allen IC. Modulating inflammation through the negative regulation of NF- κ B signaling. *J Leukoc Biol* 2018; 103: 1131–1150

Rudraiah S, Shamilov R, Aneskievich BJ. TNIP1 reduction sensitizes keratinocytes to post-receptor signalling following exposure to TLR agonists. *Cellular Signal* 2018; 45: 81–92

Russell P, Hennessy BT, Li J, Carey MS, Bast RC, Freeman T, Venkitaraman AR. Cyclin G1 regulates the outcome of taxane-induced mitotic checkpoint arrest. *Oncogene* 2012; 31: 2450–2460

Russo C, Nastro A, Cicala D, De Liso M, Covelli EM, Cinalli G. Neuroimaging in tuberous sclerosis complex. *Childs Nerv Syst* 2020; 36: 2497–2509

Sahin M, Sur M. Genes, circuits, and precision therapies for autism and related neurodevelopmental disorders. *Science* 2015; 350: 6263

Salpietro V, Malintan NT, Llano-Rivas I, Spaeth CG, Efthymiou S, Striano P, Vandrovcova J, Cutrupi Maria C., Chimenz R, David E, Di Rosa G, Marce-Grau A, Raspall-Chaure M, Martin-Hernandez E, Zara F, Minetti C, Bello OD, De Zorzi R, Fortuna S, Dauber A, Alkhawaja M, Sultan T, Mankad K, Vitobello A, Thomas Q, Mau-Them FT, Faivre L, Martinez-Azorin F, Prada CE, Macaya A, Kullmann DM, Rothman JE, Krishnakumar SS, Houlden H, Salpietro V, Efthymiou S, Kriouile Y, El Khorassani M, Aguenouz M, Karashova B, Avdjieva D, Kathom H, Tincheva R, Van Maldergem L, Nachbauer W, Boesch S, Arning L, Timmann D, Cormand B, Pérez-Dueñas B, Di Rosa G, Pironti E, Goraya JS, Sultan T, Kirmani S, Ibrahim S, Jan F, Mine J, Banu S, Veggiotti P, Ferrari MD, Verrotti A, Marseglia GL, Savasta S, Garavaglia B, Scuderi C, Borgione E, Dipasquale V, Cutrupi Maria Concetta, Portaro S, Sanchez BM, Pineda-Marfa' M, Munell F, Macaya A, Boles R, Heimer G, Papacostas S, Manole A, Malintan N, Zanetti MN, Hanna MG, Rothman JE, Kullmann DM, Houlden H. Mutations in the Neuronal Vesicular SNARE VAMP2 Affect Synaptic Membrane Fusion and Impair Human Neurodevelopment. *Am J Hum Genet* 2019; 104: 721–730

Samulevich ML, Carman LE, Shamilov R, Aneskievich BJ. Conformational Analyses of the AHD1-UBAN Region of TNIP1 Highlight Key Amino Acids for Interaction with Ubiquitin. *Biomolecules* 2025; 15: 453

Sánchez C, Días-Nido J, Avila J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* 2000; 61: 133–168

Satoh J, Kino Y, Asahina N, Takitani M, Miyoshi J, Ishida T, Saito Y. TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology* 2016; 36: 39–49

Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* 2012; 74: 691–705

Schilling K, Dickinson MH, Connor JA, Morgan JI. Electrical activity in cerebellar cultures determines Purkinje cell dendritic growth patterns. *Neuron* 1991; 7: 891–902

Schilling K, Oberdick J, Rossi F, Baader SL. Besides Purkinje cells and granule neurons: an appraisal of the cell biology of the interneurons of the cerebellar cortex. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 601–615

Schweikhard V, Meng C, Murakami K, Kaplan CD, Kornberg RD, Block SM. Transcription factors TFIIF and TFIIS promote transcript elongation by RNA polymerase II by synergistic and independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci* 2014; 111: 18

Shamilov R, Ackley TW, Aneskievich BJ. Enhanced Wound Healing- and Inflammasome-Associated Gene Expression in TNFAIP3-Interacting Protein 1- (TNIP1-) Deficient HaCaT Keratinocytes Parallels Reduced Reepithelialization. *Mediators Inflamm* 2020; 2020: 5919150

Shamilov R, Aneskievich BJ. TNIP1 in Autoimmune Diseases: Regulation of Toll-like Receptor Signaling. *J Immunol Res* 2018; 2018: 3491269

Shamilov R, Vinogradova O, Aneskievich BJ. The Anti-Inflammatory Protein TNIP1 Is Intrinsically Disordered with Structural Flexibility Contributed by Its AHD1-UBAN Domain. *Biomolecules* 2020; 10: 1531

Shinkawa Y, Imami K, Fuseya Y, Sasaki K, Ohmura K, Ishihama Y, Morinobu A, Iwai K. ABIN1 is a signal-induced autophagy receptor that attenuates NF- κ B activation by recognizing linear ubiquitin chains. *FEBS Lett* 2022; 596: 1147–1164

Shiote Y, Ouchida M, Jitsumori Y, Ogama Y, Matsuo Y, Ishimaru F, Tanimoto M, Shimizu K. Multiple splicing variants of Naf1/ABIN-1 transcripts and their alterations in hematopoietic tumors. *Int J Mol Med* 2006; 18: 917–923

Singh A, Chaudhary R. Potentials of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α , β/δ , and γ : An in-depth and comprehensive review of their molecular mechanisms, cellular Signalling, immune responses and therapeutic implications in multiple diseases. *Int Immunopharmacol* 2025; 155: 114616

Smeyne RJ, Chu T, Lewin A, Bian F, Sanlioglu S, Kunsch C, Lira SA, Oberdick J. Local Control of Granule Cell Generation by Cerebellar Purkinje Cells. *Mol Cell Neurosci* 1995; 6: 230–251

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76–85

Sotelo C. Viewing the brain through the master hand of Ramon y Cajal. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 71–77

Sotelo C, Alvarado-Mallart R, Frain M, Vernet M. Molecular plasticity of adult Bergmann fibers is associated with radial migration of grafted Purkinje cells. *J Neurosci* 1994; 14: 124–133

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

Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, Wang X, Bodeau J, Tuch BB, Siddiqui A, Lao K, Surani MA. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* 2009; 6: 377–384

Tang G, Gudsnuk K, Kuo S-H, Cotrina ML, Rosoklija G, Sosunov A, Sonders MS, Kanter E, Castagna C, Yamamoto A, Yue Z, Arancio O, Peterson BS, Champagne F, Dwork AJ, Goldman J, Sulzer D. Loss of mTOR-Dependent Macroautophagy Causes Autistic-like Synaptic Pruning Deficits. *Neuron* 2014; 83: 1131–1143

Testa U, Pelosi E. Function of PML-RARA in Acute Promyelocytic Leukemia. In: Borggrefe T, Giaimo BD, Hrsg. Transcription factors in blood cell development. Cham: Springer Nature Switzerland, 2024: 321–339

Tharmalingam S, Hampson DR. The Calcium-Sensing Receptor and Integrins in Cellular Differentiation and Migration. *Front Physiol* 2016; 7: 190

Trinh T-A, Hoang TX, Kim JY. All-trans retinoic acid increases NF- κ B activity in PMA-stimulated THP-1 cells upon unmethylated CpG challenge by enhancing cell surface TLR9 expression. *Mol Cell Biochem* 2020; 473: 167–177

Tsai PT, Hull C, Chu Y, Greene-Colozzi E, Sadowski AR, Leech JM, Steinberg J, Crawley JN, Regehr WG, Sahin M. Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature* 2012; 488: 647–651

Urbano PCM, Aguirre-Gamboa R, Ashikov A, van Heeswijk B, Krippner-Heidenreich A, Tijssen H, Li Y, Azevedo VF, Smits LJT, Hoentjen F, Joosten I, Koenen HJPM. TNF- α -induced protein 3 (TNFAIP3)/A20 acts as a master switch in TNF- α blockade-driven IL-17A expression. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 142: 517–529

Valnegri P, Huang J, Yamada T, Yang Y, Mejia LA, Cho HY, Oldenborg A, Bonni A. RNF8/UBC13 ubiquitin signaling suppresses synapse formation in the mammalian brain. *Nat Commun* 2017; 8: 1271

Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* 2005; 57: 67–81

Vereecke L, Beyaert R, van Loo G. The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends Immunol* 2009; 30: 383–391

Verity AN, Campagnoni AT. Regional expression of myelin protein genes in the developing mouse brain: In situ hybridization studies. *J Neurosci Res* 1988; 21: 238–248

Verstrepen L, Carpentier I, Verhelst K, Beyaert R. ABINs: A20 binding inhibitors of NF- κ B and apoptosis signaling. *Biochem Pharmacol* 2009; 78: 105–114

Vetters J, van Helden MJ, Wahlen S, Tavernier SJ, Martens A, Fayazpour F, Vergote K, Vanheerswynghels M, Deswarte K, Van Moorlegghem J, De Prijck S, Takahashi N, Vandenabeele P, Boon L, van Loo G, Vivier E, Lambrecht BN, Janssens S. The ubiquitin-editing enzyme A20 controls NK cell homeostasis through regulation of mTOR activity and TNF. *J Exp Med* 2019; 216: 2010–2023

Vladoiu MC, El-Hamamy I, Donovan LK, Farooq H, Holgado BL, Ramaswamy V, Mack SC, Lee JJ, Kumar S, Przelicki D, Michealraj A, Juraschka K, Skowron P, Luu B, Suzuki H, Morrissy AS, Cavalli FM, Garzia L, Daniels C, Wu X, Qazi MA, Singh SK, Chan JA, Marra MA, Malkin D, Dirks P, Pugh T, Notta F, Kleinman CL, Joyner A, Jabado N, Stein L, Taylor MD. Childhood Cerebellar Tumors Mirror Conserved Fetal Transcriptional Programs. *Nature* 2018; 572: 67–73

Voet S, Mc Guire C, Hagemeyer N, Martens A, Schroeder A, Wieghofer P, Daems C, Staszewski O, Vande Walle L, Jordao MJC, Sze M, Vikkula H-K, Demeestere D, Van Imschoot G, Scott CL, Hoste E, Gonçalves A, Guilliams M, Lippens S, Libert C, Vandenbroucke RE, Kim K-W, Jung S, Callaerts-Vegh Z, Callaerts P, de Wit J, Lamkanfi M, Prinz M, van Loo G. A20 critically controls microglia activation and inhibits inflammasome-dependent neuroinflammation. *Nat Commun* 2018; 9: 2036

Vriend J, Ghavami S, Marzban H. The role of the ubiquitin proteasome system in cerebellar development and medulloblastoma. *Mol Brain* 2015; 8: 64

Wagner S, Carpentier I, Rogov V, Kreike M, Ikeda F. Ubiquitin binding mediates the NF- κ B inhibitory potential of ABIN proteins. *Oncogene* 2008; 27: 3739–3745

Wang H-B, Wang J-T, Zhang L, Geng ZH, Xu W-L, Xu T, Huo Y, Zhu X, Plow EF, Chen M, Geng J-G. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation. *Nat Immunol* 2007; 8: 882–892

Wang X, Deckert M, Xuan NT, Nishanth G, Just S, Waisman A, Naumann M, Schlüter D. Astrocytic A20 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting NF- κ B- and STAT1-dependent chemokine production in astrocytes. *Acta Neuropathol* 2013; 126: 711–724

Wanner I, Baader SL, Brich M, Oberdick J, Schilling K. Subcellular localization of specific mRNAs and their protein products in Purkinje cells by combined fluorescence in situ hybridization and immunocytochemistry. *Histochem Cell Biol* 1997; 108: 345–357

Wechsler-Reya RJ, Scott MP. Control of Neuronal Precursor Proliferation in the Cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 1999; 22: 103–114

Wei H, Dong X, You Y, Hai B, Duran RC-D, Wu X, Kharas N, Wu JQ. OLIG2 regulates lncRNAs and its own expression during oligodendrocyte lineage formation. *BMC Biol* 2021; 19: 132

Wei H, Zou H, Sheikh AM, Malik M, Dobkin C, Brown WT, Li X. IL-6 is increased in the cerebellum of autistic brain and alters neural cell adhesion, migration and synaptic formation. *J Neuroinflammation* 2011; 8: 52

Wertz IE, Newton K, Seshasayee D, Kusam S, Lam C, Zhang J, Popovych N, Helgason E, Schoeffler A, Jeet S, Ramamoorthi N, Kategaya L, Newman RJ, Horikawa K, Dugger D, Sandoval W, Mukund S, Zindal A, Martin F, Quan C, Tom J, Fairbrother WJ, Townsend M, Warming S, DeVoss J, Liu J, Dueber E, Caplazi P, Lee WP, Goodnow CC, Balazs M, Yu K, Kolumam G, Dixit VM. Phosphorylation and linear ubiquitin direct A20 inhibition of inflammation. *Nature* 2015; 528: 370–375

Whitney ER, Kemper TL, Rosene DL, Bauman ML, Blatt GJ. Calbindin-D28k is a more reliable marker of human Purkinje cells than standard Nissl stains: A stereological experiment. *J Neurosci Methods* 2008; 168: 42–47

Whitney ER, Kemper TL, Rosene DL, Bauman ML, Blatt GJ. Density of cerebellar basket and stellate cells in autism: Evidence for a late developmental loss of Purkinje cells. *J Neurosci Res* 2009; 87: 2245–2254

Wu Y-F, Li Z-Y, Dong L-L, Li W-J, Wu Y-P, Wang J, Chen H-P, Liu H-W, Li M, Jin C-L, Huang H-Q, Ying S-M, Li W, Shen H-H, Chen Z-H. Inactivation of MTOR promotes autophagy-mediated epithelial injury in particulate matter-induced airway inflammation. *Autophagy* 2020; 16: 435–450

Xu T, Liu J, Li X, Yu Y, Luo X, Zheng X, Cheng Y, Yu P, Liu Y. The mTOR/NF- κ B Pathway Mediates Neuroinflammation and Synaptic Plasticity in Diabetic Encephalopathy. *Mol Neurobiol* 2021; 58: 3848–3862

Ying H, Yue BYJT. Optineurin: The autophagy connection. *Exp Eye Res* 2016; 144: 73–80

Yoshioka. LC3, an autophagosome marker, is highly expressed in gastrointestinal cancers. *Int J Oncol* 1992; 33: 461–468

Young AMH, Campbell E, Lynch S, Suckling J, Powis SJ. Aberrant NF-KappaB Expression in Autism Spectrum Condition: A Mechanism for Neuroinflammation. *Front Psychiatry* 2011; 2: 27

Youssef J, Badr M. Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Inflammation Control. *Biomed Res Int* 2004; 2004: 3

Yu H, Lin L, Zhang Z, Zhang H, Hu H. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduct Target Ther* 2020; 5: 209

Zawia NH, Harry GJ. Developmental Exposure to Lead Interferes with Glial and Neuronal Differential Gene Expression in the Rat Cerebellum. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 138: 43–47

Zhai Y, Lin P, Feng Z, Lu H, Han Q, Chen J, Zhang Y, He Q, Nan G, Luo X, Wang B, Feng F, Liu F, Chen Z, Zhu P. TNFAIP3-DEPTOR complex regulates inflammasome secretion through autophagy in ankylosing spondylitis monocytes. *Autophagy* 2018; 14: 1629–1643

Zhang K, Chen S, Yang Q, Guo S, Chen Q, Liu Z, Li L, Jiang M, Li H, Hu J, Pan X, Deng W, Xiao N, Wang B, Wang Z, Zhang L, Mo W. The Oligodendrocyte Transcription Factor 2 OLIG2 regulates transcriptional repression during myelinogenesis in rodents. *Nat Commun* 2022; 13: 1423

Zhao H, Mao X, Zhu C, Zou X, Peng F, Yang W, Li B, Li G, Ge T, Cui R. GABAergic System Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Dev Biol* 2022; 9: 781327

Zhou J, Wu R, High AA, Slaughter CA, Finkelstein D, Rehg JE, Redecke V, Häcker H. A20-binding inhibitor of NF- κ B (ABIN1) controls Toll-like receptor-mediated CCAAT/enhancer-binding protein β activation and protects from inflammatory disease. *Proc Natl Acad Sci* 2011; 108: 44

Zhou P, Jiang J, Yan H, Li Y, Zhao J, Wang X, Su R, Gong Z. ABIN-1 Negatively Regulates μ -Opioid Receptor Function. *Mol Pharmacol* 2018; 93: 36–48

Zhou X, Lu W, Wang Y, Li J, Luo Y. A20-Binding Inhibitor of NF- κ B 1 Ameliorates Neuroinflammation and Mediates Antineuroinflammatory Effect of Electroacupuncture in Cerebral Ischemia/Reperfusion Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020; 2020: 6980398

Zoghbi HY, Bear MF. Synaptic Dysfunction in Neurodevelopmental Disorders Associated with Autism and Intellectual Disabilities. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4: a009886

9 Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde am Anatomischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Stephan Baader als Doktorvater angefertigt.

Die Konzeption des Promotionsprojektes erfolgte durch den Verfasser sowie Herrn Professor Dr. Stephan Baader und Herrn Dr. Sebastian Roeser aus dessen Arbeitsgruppe.

Die in dieser Dissertation vorgestellten Versuche wurden grundsätzlich vom Verfasser selbst durchgeführt; eine Ausnahme von dieser Regel stellen die Perfusionsfixationen dar, die aus administrativen Gründen jeweils in Assistenz unter der Aufsicht der Tierversuchsleitung durchgeführt wurden. Die Anleitung zur Durchführung der beschriebenen Experimente erfolgte durch Herrn Professor Dr. Stephan Baader sowie Herrn Dr. Sebastian Roeser aus dessen Arbeitsgruppe.

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde vom Verfasser selbstständig abgefasst; andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel fanden hierbei keine Verwendung.

10 Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt zuvorderst meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Stephan Baader. Ihm möchte ich für die Überlassung dieses besonders interessanten Promotionsthemas sowie die kontinuierliche und intensive Betreuung über die letzten Jahre hinweg herzlich danken. Jeder Versuch, zu beschreiben, mit welcher großen Hilfsbereitschaft und welchem außergewöhnlichem Engagement Du, lieber Stephan, mir stets zur Seite standest – mit Rat und mit Tat –, griffe zu kurz. Daher belasse ich es an dieser Stelle dabei, festzustellen, dass dieses Promotionsvorhaben mit Sicherheit nicht so verlaufen wäre, wie es schlussendlich verlaufen ist, wenn es Dich nicht gegeben hätte. Dafür werde ich Dir stets tief verbunden sein.

Auch möchte ich Herrn Dr. Sebastian Roeser sehr für die ausdauernde und geduldige Betreuung zu Beginn meines Promotionsprojektes danken. Du, lieber Sebastian, hast durch unsere regelmäßigen Besprechungen und Deine Anleitung im Labor ganz wesentlich zur Grundsteinlegung dieses Projektes beigetragen und damit die Vorlage und Veröffentlichung der inzwischen fertiggestellten Dissertation maßgeblich mitermöglicht. Dafür gebührt Dir mein Dank.

Ich habe allerdings nicht nur meinem Doktorvater und meinem Betreuer zu danken, sondern auch den vielen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Stephan Baader und Angehörigen des Anatomischen Instituts, ohne die dieses Promotionsvorhaben niemals so reibungslos hätte umgesetzt werden können. Beispielhaft möchte ich Frau Dr. Carolina Götsche nennen, die mir ihre Färbeprotokolle und Forschungsergebnisse freundlicherweise bereits vor Veröffentlichung zur Verfügung stellte. Weiter Frau Stefanie Ramrath und Frau Sabine Molly-Klumbies, die mir stets mit einem offenen Ohr und einer helfenden Hand begegneten und so zur schnellen Lösung so mancher Probleme beitrugen. Vergessen werden dürfen auch Frau Manuela Bolz und Herr Narziss Haias nicht, die durch ihre Tätigkeit im Tierstall des Anatomischen Instituts die Planung und Durchführung der zu diesem Projekt gehörigen Tierversuche überhaupt erst möglich machten. Und schlussendlich Frau Iboika Haias, die stets von frühmorgens an im Labor für Ordnung sorgte und die benutzten Versuchsgegenstände reinigte – wer selbst einmal im Labor gearbeitet hat, liebe Ibi, weiß den Wert Deiner Tätigkeit umso mehr zu schätzen.