

# Untersuchungen zur Differenzierung von cerebellären Purkinjezellen nach Überexpression des Transkriptionsfaktors Engrailed-2

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr.rer.nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Christian Liebig

aus

Königswinter

Bonn 2007

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

1. Referent: Prof. Dr. Stephan L. Baader

2. Referent: Prof. Dr. Horst Bleckmann

Tag der Promotion: 26.10.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1 Cerebellum</b> .....	<b>4</b>
1.1.1 Der Aufbau des Cortex cerebelli.....	4
1.1.2 Parasagittale Kompartimentierung.....	6
1.1.3 Purkinjezellen.....	8
1.1.3.1 Entwicklung von Purkinjezellen.....	8
1.1.3.2 Zellkompartimente von Purkinjezellen.....	10
<b>1.2 Der Transkriptionsfaktor Engrailed-2</b> .....	<b>12</b>
1.2.1 Engrailed-2 Expression und Funktion.....	12
1.2.2 Engrailed-2 Expression während der Entwicklung des Cerebellum.....	13
1.2.3 Engrailed-2 und sein Einfluss auf neuropathologische Vorgänge.....	14
<b>1.3 Die Engrailed-2-Überexpressionsmutante L7En-2</b> .....	<b>14</b>
<b>1.4 Fragestellungen dieser Arbeit</b> .....	<b>15</b>
1.4.1 Projekt 1: Inwiefern beeinflusst die Engrailed-2 Überexpression in Purkinjezellen deren zelluläre Struktur?.....	15
1.4.2 Projekt 2: Spielt Engrailed-2 eine Rolle bei der axonalen Wegfindung von parasagittal orientierten Afferenzen des cerebellären Kortex?.....	15
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 Tiere</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2 Material</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3 Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.3.1 Tierzucht und Genotypisierung.....	18
2.3.2 Zellkultur.....	20
2.3.2.1 Schnittkultur-Präparation.....	20
2.3.2.2 Axotomien an Schnittkulturen.....	22
2.3.2.3 Fixierung und Verarbeitung von Schnittkulturen.....	23
2.3.3 Perfusion, Präparation und Nachfixierung von Gewebe.....	23
2.3.4 Herstellung von Gewebeschnitten.....	25
2.3.4.1 Paraffinschnitte.....	25
2.3.4.2 Vibratomschnitte.....	25
2.3.4.3 Semidünnschnitte, Dünnschnitte.....	25
2.3.5 Histochemische Färbungen.....	25
2.3.6 Immunhistochemische Färbungen.....	25
2.3.6.1 Erläuterungen zu technischen Abläufen.....	26
2.3.6.2 Primärantikörper.....	27
2.3.6.3 Sekundärantikörper.....	28
2.3.7 In situ Hybridisierung.....	29

2.3.8 Erfassung der mikroskopischen Präparate.....	29
2.3.8.1 Konfokale Laserscanmikroskopie.....	29
2.3.8.2 Digitale Mikrofotografie.....	30
2.3.8.3 Visuelle Erfassung von Daten anhand mikroskopischer Präparate.....	30
2.3.8.4 Elektronenmikroskopie.....	30
2.3.9 Visuelle Auswertung von Präparaten.....	31
2.3.9.1 Auszählen axonaler Torpedos von Purkinjezellen.....	31
2.3.9.2 Regeneration von läsionierten Purkinjellaxonen in vitro.....	32
2.3.9.3 Verteilung der Nissl-Substanz in Purkinjezellen von P09-Tieren.....	32
2.3.10 Auswertung von digitalem Bildmaterial.....	33
2.3.10.1 Prozessierung der Bilddaten.....	33
2.3.10.2 Erfassung der Überlebensrate von Purkinjezellen in cerebellären Schnittkulturen.....	34
2.3.10.3 Ausmessen des proximalen Axonabschnitts von Purkinjezellen in Schnittkulturen.....	35
2.3.10.4 Ausmessen der von einem Dendritenbaum umfassten Fläche.....	37
2.3.10.5 Einteilung der Purkinjezellen nach Differenzierungsstadien in cerebellären Schnittkulturen aufgrund ihrer Zellmorphologie.....	38
2.3.10.6 Einteilung der Purkinjezellen nach Differenzierungsstadien in cerebellären Schnittkulturen aufgrund ihrer Parvalbuminexpression.....	40
2.3.10.7 Kolokalisationsanalyse.....	40
2.3.10.8 Erfassung des Myelinisierungsgrades von cerebellären Schnittkulturen.....	41
2.3.10.9 Ermittlung der Dichte des Plexus infraganglionaris.....	42
2.3.10.10 Vergleich der Immunreaktivität von Antigenen am axonalen und dendritischen Pol von Purkinjezellen.....	43
2.3.10.11 3D-Rekonstruktion von konfokalen Bilderstapeln.....	44
2.3.11 Statistische Methoden.....	44
2.3.11.1 Signifikanztests.....	44
2.3.11.2 Angabe von Mittelwert oder Median.....	45
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Untersuchung von Reifemerkmalen der L7En-2 positiven Purkinjezellen in organotypischen cerebellären Schnittkulturen.....</b>	<b>46</b>
3.1.1 Das Überleben von Purkinjezellen in Kultur als Maß für den generellen Reifegrad von L7En-2 positiven Purkinjezellen.....	46
3.1.2 Die Somagröße von Purkinjezellen in L7En-2 Kulturen.....	48
3.1.3 Der morphologische Differenzierungsgrad von Purkinjezellen in L7En-2 Kulturen.....	49
3.1.4 Die Größe von Dendritenbäumen bei L7En-2 positiven Purkinjezellen.....	50
3.1.5 Die Parvalbuminexpression in Purkinjezellen von L7En-2 Kulturen.....	51
<b>3.2 Untersuchung des distalen Axonanteils von L7En-2 positiven Purkinjezellen....</b>	<b>52</b>
3.2.1 Die Myelinisierung in P00-Schnittkulturen.....	53
3.2.2 Die Verteilung von Ankyrin G in Purkinjellaxonen in vitro.....	55
3.2.3 Die Regenerationsfähigkeit von läsionierten Purkinjellaxonen in vitro.....	55
3.2.4 Die Dichte des Kollateralengeflechts von Purkinjellaxonen in vivo.....	57
3.2.5 Das Auftreten axonaler Torpedos in der Entwicklung von Purkinjezellen in vivo...	58
<b>3.3 Untersuchung des proximalen Axonabschnitts von L7En-2 positiven</b>	

<b>Purkinjezellen.....</b>	<b>59</b>
3.3.1 Die Grösse des proximalen Axonabschnitts in vitro.....	59
3.3.2 Das Auftreten von proximalen, verdickten Axonabschnitten in vivo.....	60
3.3.3 Die Morphologie des proximalen Axonabschnitts von L7En-2 Purkinjezellen: eine elektronenmikroskopische Studie.....	62
<b>3.4 Untersuchungen zur Kompartimentierung der Somata von L7En-2 positiven Purkinjezellen.....</b>	<b>63</b>
3.4.1 Anordnung Nissl-gefärbter Organellen.....	63
3.4.2 Die Verteilungsmuster von Zytoskelettproteinen in Purkinjezellen von Wildtyp- und L7En-2-Tieren.....	65
3.4.2.1 Das Verteilungsmuster von $\beta$ 2-Spectrin.....	65
3.4.2.2 Das Verteilungsmuster von $\beta$ III-Tubulin.....	66
3.4.2.3 Das Verteilungsmuster von Ankyrin G.....	67
3.4.3 Ultrastruktur von Purkinjezellsomata.....	69
3.4.3.1 Die Aufhebung der Zellkompartimentierung in L7En-2 positiven Purkinjezellen an P09.....	69
3.4.3.2 Veränderungen der Purkinjezelloberfläche in L7En-2 Tieren.....	69
<b>3.5 Untersuchungen zur Expression von parasagittalen Markern im Kleinhirnkortex von Wildtyp und L7En-2 Mäusen.....</b>	<b>69</b>
3.5.1 Verändertes Expressionsmuster von EphA4 im Kleinhirn von L7En-2-Mäusen....	71
3.5.2 Identisches Expressionsmuster von ephrinA2 im Kleinhirn von Wildtyp- und L7En-2 Mäusen.....	73
3.5.3 Verändertes Expressionsmuster von wnt7B im Kleinhirn von L7En-2-Mäusen....	73
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>75</b>
<b>4.1 Organotypische cerebelläre Schnittkulturen als Modellsystem für Untersuchungen zur Rolle von Engrailed-2 bei der Axono- und Dendritogenese.</b>	<b>75</b>
<b>4.2 Zellintrinsische versus zellextrinsische Effekte der L7En-2 Überexpression.....</b>	<b>77</b>
<b>4.3 Veränderungen bei intrazellulären Transportvorgängen als Erklärung für die gestörte zelluläre Kompartimentierung von L7En-2 Purkinjezellen .....</b>	<b>79</b>
<b>4.4 Differentieller Einfluss von Engrailed-2 auf parasagittal exprimierte Gene.....</b>	<b>84</b>
<b>4.5 Können die verschiedenen Effekte von engrailed-Genen mit einem gemeinsamen Modell erklärt werden?.....</b>	<b>87</b>
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>89</b>
<b>6 Anhang.....</b>	<b>91</b>
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	91
6.2 Farbabbildungen.....	93
6.3 Abbildungsverzeichnis.....	108
6.4 Literaturverzeichnis.....	109
6.5 Danksagung.....	118
6.6 Erklärung.....	119

# 1 Einleitung

Das Zentralnervensystem besteht aus Milliarden von Zellen, die miteinander in Kontakt stehen und dadurch komplexe Netzwerke aufbauen. Diese Netzwerke stellen die Basis für die Funktion des Gehirns als zentrale Steuerungseinheit des Organismus dar. Miteinander kommunizierende Zellen liegen oft weit voneinander entfernt, so dass sich während der Entwicklung zwei oder mehrere solcher Zellen erst finden müssen. Basis dieser Wegfindung ist zum einen das Anlegen von verschiedenen Fortsätzen an einem Neuron, in der Regel von Dendriten, die den Eingang von Informationen kontrollieren und von Axonen, die ausgehende Nachrichten verwalten. Zum anderen ist das zielgerichtete Auswachsen dieser Fortsätze in einem definierten zeitlichen und räumlichen Rahmen nötig, damit zwei bestimmte Zellen miteinander in Kontakt treten können. Es gibt Hinweise, dass die geschilderten Prozesse zum Teil unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors Engrailed-2 stehen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, auf welche Weise Engrailed-2 diesen Einfluss ausübt. Stellvertretend für das gesamte Zentralnervensystem wurde hierfür das Kleinhirn als Modellsystem gewählt.

## 1.1 Cerebellum

### 1.1.1 Der Aufbau des Cortex cerebelli

Die Neurone des Kleinhirns, insbesondere Purkinjezellen, gehören zu den am frühesten beschriebenen Zelltypen im Zentralnervensystem [1]. Diese Tatsache beruht sicherlich auch darauf, dass die Purkinjezellen sehr große Zellen sind und mit klassischen histologischen Techniken dargestellt werden können. Zum anderen zeichnet sich der Dendritenbaum, der u.a. durch Ramon y Cajal in seiner gesamten Ausdehnung beschrieben wurde [2], durch eine Ästhetik aus, die bereits früh das Interesse von Wissenschaftlern für seine Bedeutung geweckt hat. Diese frühen Untersuchungen waren letztendlich die Basis dafür, dass heute das Kleinhirn aus vielerlei Hinsicht als Modellsystem für entwicklungsneurobiologische Fragestellungen genutzt wird (z.B. [3][4][5][6]).

In den Schichten des cerebellären Kortex liegt ein wohl definiertes Verschaltungsmuster vor. Die einzigen efferenten Neurone des Kortex sind Purkinjezellen (Abbildung 1.1, [7], 1.1.3). Sie empfangen erregende Afferenzen über die Kletterfasern aus der unteren Olive und über die Parallelfasern von den Körnerzellen. Gehemmt werden Purkinjezellen durch Afferenzen von den in der Molekularschicht liegenden Korb- und Sternzellen und den in der Körnerzellschicht liegenden Golgizellen [8]. Purkinjezellen stellen sich durch ihre Größe und ihre Anordnung sehr prominent dar und sind daher schon mit histologischen

schmale Linien		Axone	
breite Linien		Dendriten	
grob gestrichelt		extracerebelläre Afferenzen	
schwarz	Moosfasern	grau	Kletterfasern
fein gestrichelt		inhibitorische Interneurone	
s	Sternzelle	k	Korbzelle
g	Golgzelle		
P, durchgezogen schwarz		Purkinjezellen	
K, durchgezogen grau		Körnerzellen	
M	Molekularschicht	P	Purkinjezellschicht
K	Körnerzellschicht	W	weisse Substanz
T	tiefe Kleinhirnkerne	T	Neuron der tiefen Kerne

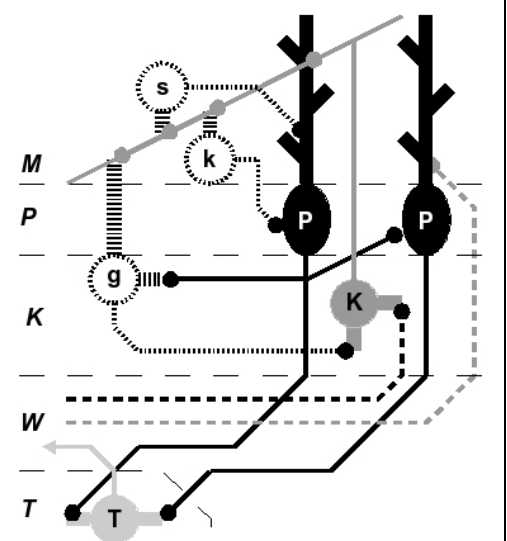


Abbildung 1.1: Vereinfachtes Verschaltungsschema der Neurone des cerebellären Kortex: Der wichtigste Schaltkreis ist der aus extracerebellären Afferenzen, Körnerzellen, Purkinjezellen und tiefen Kernen gebildete. Zusätzlich sind hier noch die Kollateralen der Purkinjezellen und die wichtigsten Verbindungen inhibitorischer Interneurone dargestellt. Es fehlen die nur in einigen Regionen vorkommenden Bürstenzellen und Lugarozellen.

Standardfärbemethoden leicht zu identifizieren. Darüberhinaus sind sie, wie auch alle anderen Hauptzelltypen des cerebellären Kortex, durch bestimmte immunhistochemische Marker selektiv anfärbbar. Einige dieser Marker werden in definierten Abschnitten der Entwicklung und -reifung exprimiert. Hier sind die Kalziumbindenden Proteine hervorzuheben. Mit Immunfärbungen derselben lässt sich die Zellmorphologie ähnlich gut darstellen, wie durch Golgifärbung [9]. Bei der Expression einiger kalziumbindender Proteine lassen sich außerdem Angaben über physiologische Eigenschaften der Zelle bzw. über den Entwicklungszustand der Zelle machen [10]. Für Parvalbumin konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es in Purkinjezellen erst ab einem bestimmten Zeitpunkt exprimiert wird und dass es in hippocampalen Interneuronen erst exprimiert wird, wenn diese hochfrequente Aktionspotentiale produzieren [10] und eine damit einhergehende erhöhte Stoffwechselrate aufweisen [11].

Die zahlenmässig stärkste Neuronenpopulation im Kleinhirn - und im Nervensystem überhaupt - stellen die Körnerzellen. Sie besitzen kurze Dendriten an denen sie erregende Afferenzen über die Moosfasern und inhibitorische Afferenzen von Golgizellen erhalten [7][8]. Körnerzellen liegen nach ihrer letzten Teilung zunächst oberhalb der Purkinjezellschicht in der äußeren Körnerzellschicht. Dort wachsen an jeder Körnerzelle zunächst 2 Fortsätze aus, je einer nach rechts und links. Die Körnerzellen wandern schließlich durch die Molekular- und Purkinjezellschicht zentripetal und lassen dabei einen Fortsatz hinter sich zurück, der sich an seinem distalen Ende in die beiden zuerst ausgewachsenen Fortsätze aufzweigt. Dieser sich

aufzweigende Fortsatz stellt das spätere Axon dar, welches in der Molekularschicht Kontakt zu den Dendriten von Korb-, Stern-, Golgi- und Purkinjezellen aufnimmt [12].

Golgizellen liegen verstreut in der Körnerzellschicht und sind morphologisch aufgrund ihrer Größe gut von den sehr kleinen Körnerzellen zu unterscheiden. Sie liefern durch ihr Verschaltungsmuster einen negativen Rückkopplungsmechanismus für die Körnerzellen (s.o. und Abbildung 1.1). Damit gehören Golgizellen zu den inhibitorischen Interneuronen des cerebellären Kortex. Dazu zählen außerdem die Korb- und Sternzellen, welche in der Molekularschicht liegen. Diese erhalten Afferenzen über die Parallelfasern und bilden hemmende Synapsen an Purkinjezeldendriten (Sternzellen) bzw. -somata (Korbzellen). Die inhibitorischen Interneurone stammen alle von einem gemeinsamen Pool aus Vorläuferzellen ab und wandern über die weisse Substanz in den Kortex ein (ca. P00 bis P15) [13][14].

Neben den beschriebenen morphologischen Eigenschaften des cerebellären Kortex ist ein weiteres Charakteristikum des Kleinhirns die gute Kultivierbarkeit. Kleinhirngewebe von Mäusen lässt sich sowohl als Schnittkultur [15], als Explantat [16] aber auch dissoziiert [17] gut in Zellkultur nehmen. Hierbei ist es möglich einzelne Zelltypen gezielt anzureichern [18] bzw. von der Kultur auszuschliessen [19]. Ein Vorteil von Zellkulturen ist die leichtere Manipulierbarkeit des Gewebes, sowohl in pharmakologischer Hinsicht [20], als auch in Bezug auf Läsionen [21]. Zusätzlich ist der cerebelläre Kortex bei Mäusen operativ gut zugänglich, sodass hier auch in vivo die Möglichkeit zu gezielten Läsionen [22] und anderen Manipulationen gegeben ist [23].

Die genannten Eigenschaften machen den cerebellären Kortex sowohl in vivo als auch in vitro zu einem idealen Untersuchungssystem für neuronenspezifische entwicklungs- und zellbiologische Fragestellungen.

### **1.1.2 Parasagittale Kompartimentierung**

Der cerebelläre Kortex kann als eine 3-dimensional kompartimentierte Struktur gesehen werden [24]. Hierbei entsprechen die grob-morphologisch sichtbaren Kompartimente (Lobus, Fissur, Vermis, Hemisphäre) nur eingeschränkt den funktionellen Kompartimenten. Vielmehr ist der cerebelläre Kortex sowohl anteroposterior als auch mediolateral in Organisationseinheiten eingeteilt, die sich nicht an den erwähnten morphologischen Grenzen orientieren, sondern durch eine Vielzahl von biochemischen Markern identifizierbar sind [25].



Diese Marker definieren von rostral nach kaudal 4 transversale Zonen<sup>1</sup>, die mediolateral in mehrere parasagittale Streifen aufgeteilt sind. Das resultierende Muster spiegelt auch die Innervation durch Moos- und Kletterfasern, sowie die Verschaltung von Parallelfasern mit inhibitorischen Interneuronen wider [27][28][29]. Als dritte Dimension der Kompartimentierung des cerebellären Kortex kommt die Schichtung hinzu (Abbildung 1.1, [24]).

Die erwähnten parasagittalen Muster lassen sich sowohl anhand der Innervationsmuster von Moos- und Kletterfasern als auch anhand einer ganzen Reihe von biochemischen Markern erkennen. Schon während ihrer Wanderung sind die Purkinjezellen in Clustern organisiert, aus denen sich später die Streifen entwickeln. Zu welchem Cluster eine Purkinjezelle gehört wird durch den Zeitpunkt der letzten Zellteilung festgelegt [23]. In den Clustern wird bereits Kontakt zu Kletterfasern aufgenommen, wodurch die topografische Zuordnung von Abschnitten der unteren Olive zu bestimmten Kleinhirnarealen erklärt werden kann [30]. Ebenfalls in diesen Clustern beginnt die Expression der „early onset“- Marker, deren Gene embryonal und früh postnatal in parasagittalen Streifen exprimiert werden. Dieses Muster verschwindet in der ersten Postnatalwoche, teils dadurch, dass Marker nicht mehr exprimiert werden, teils dadurch, dass Marker nicht mehr kompartimentiert sondern ubiquitär exprimiert werden. Typische Marker sind Calbindin-D28k, Engrailed-1 und -2, Wnt7b, L7 und Pax2 [25]. Die Expressionsmuster sind von Marker zu Marker unterschiedlich, z.B. wird Engrailed-2 in einem komplementären Muster zu Wnt7b bzw. L7 exprimiert, wobei Engrailed-2 und Wnt7b in Körner- und Purkinjezellen vorkommen, während L7 spezifisch für Purkinjezellen ist [31][32].

Ab Ende der zweiten Postnatalwoche werden die Marker der „late onset“-Gruppe in parasagittalen Kompartimenten exprimiert. Hierbei handelt sich um Marker, die entweder vorher gar nicht oder ubiquitär exprimiert wurden. Die klassischen „late onset“-Marker sind Zebrin I und II (Aldolase C) [33][34], daneben gibt es noch NADPH-Diaphorase und P-Path [35].

Es ist für die genannten Marker bisher nicht gelungen, einen konkreten Bezug zwischen „early onset“- und „late onset“- Mustern herzustellen. Lediglich für Neurogranin konnte kürzlich gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen Marker handelt, der über die Zeitspanne von „early“ und „late onset“- Mustern (E15 - P20) zumindest im kaudalen Bereich des Kleinhirns dieselbe parasagittale Expression zeigt [36]. Dass die Expressionsmuster

---

1 Hierbei werden die Lobi 1 bis 5 der Vermis mit dem Lobulus simplex der Hemisphäre zur anterioren Zone zusammengefasst, die Lobi 6 und 7 mit den Crura 1 und 2 zur zentralen Zone und die Lobi 8 und 9 mit den Lobuli paramedianus und copula pyramidis zur posterioren Zone. Lobus 10, Flocculus und Paraflocculus bilden die noduläre Zone [25]. Andere Autoren betrachten die zentrale und die posteriore Zone als eine Einheit, wichtig für die vorliegende Arbeit ist, dass funktionell betrachtet die hintere Grenze der anterioren Zone weit im distalen Bereich des hinteren Schenkels der Fissura prima liegt [26].

parasagittaler Marker nicht deckungsgleich sind, macht allerdings aus zwei Gründen durchaus Sinn. Zum Einen sind die funktionellen Einheiten des Kleinhirns wesentlich kleiner, als die durch einzelne parasagittale Marker definierten Areale [29]. Zum Anderen werden die beschriebenen Marker mit unterschiedlichen Entwicklungsvorgängen in Zusammenhang gebracht, z.B. mit Migration [37] oder der Ausbildung axonaler Verschaltungsmuster [38][29][27][39], wobei die funktionellen Zusammenhänge zwischen diesen Vorgängen und der Expression der erwähnten parasagittalen Markermoleküle bisher weitgehend unklar sind.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass unabhängig von der Entstehung der Kompartimente die Vorstellung existiert, dass diese unterschiedlichen, sich zeitlich und örtlich überlagernden Kompartimente eine Feineinteilung der Purkinjezellen definiert, die ganz wesentlich an der Verschaltung dieser Neurone beteiligt sind. Durch das Wissen um diese Kompartimentierungsprozesse ist die Purkinjezelle ein hervorragendes zelluläres Modell, um Verschaltungsmechanismen zu untersuchen. Daneben zeichnen sich Purkinjezellen aber auch durch ihre Zellstruktur aus, die einen in seinen Entwicklungsschritten gut charakterisierten Dendritenbaum und ein langes Axon erkennen lassen. Im folgenden ist die Morphologie der Purkinjezellen und deren Entwicklung beschrieben, wobei die zeitlichen Angaben auf den Mausstamm FVB/N bezogen sind. Die oft in der Literatur beschriebenen C57Bl/6 Mäuse reifen etwas früher, wodurch es zu Diskrepanzen mit Literaturdaten kommen kann.

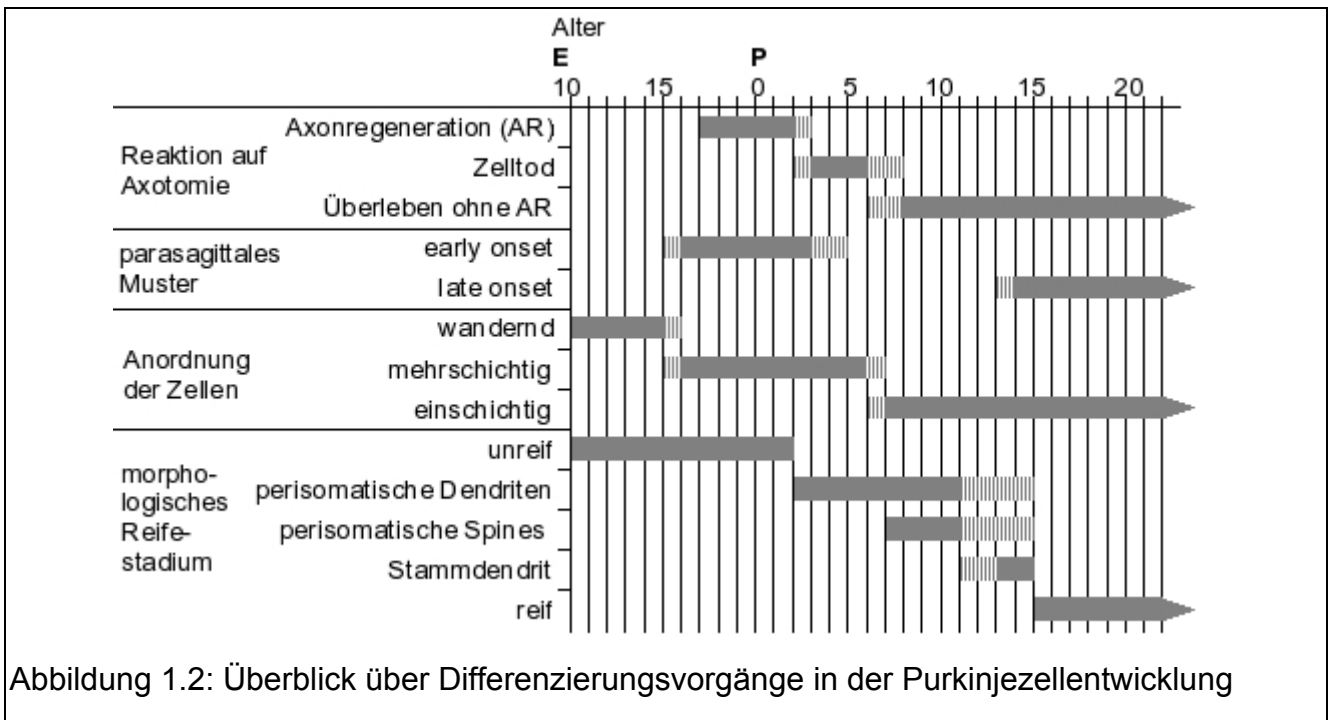
### **1.1.3 Purkinjezellen**

#### **1.1.3.1 Entwicklung von Purkinjezellen**

Purkinjezellen entstehen zwischen E10 und E13 in der Ventrikularzone der Rautenlippe und wandern radial in das Kleinhirn ein [40].

Die eingewanderten Purkinjezellen organisieren sich im Kleinhirn als eigenständige Schicht und exprimieren ab ca. E15 die „early-onset“-Marker in einem parasagittalen Streifenmuster [35] (s.o.). Zwischen E15 und P00 findet eine Phase erhöhter Apoptose statt [41]. Vermutlich aus dem „trailing process“ der eingewanderten Purkinjezellen bildet sich das Axon, das später Kontakt mit den tiefen Kernregionen des Kleinhirns aufnimmt. Ab P00 sind Kollaterale von Purkinjezellaxonen zu beobachten [42], die entweder zurück zu den Purkinjezellen ziehen oder andere Interneurone des Kleinhirns innervieren. In dieser Phase durchtrennte Axone können von Purkinjezellen wieder regeneriert werden [43].

Ab ca. P02 sind kurze, sog. perisomatische Dendriten zu beobachten [42]. Von diesen perisomatischen Dendriten gehen in der Regel zwei und mehr von einer Zelle aus, wobei

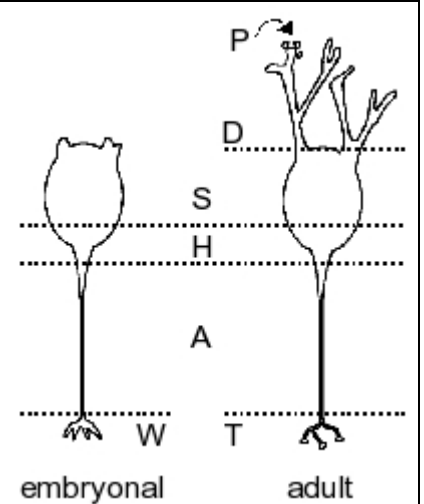


sich schnell einer oder zwei als potentieller Stammdendrit herauskristallisiert. Bis zum achten Postnataltag haben alle Purkinjezellen einen einheitlich aussehenden Dendritenbaum, der aus einem Stammdendrit und dichotom verzweigten Sekundär- und Tertiärdendriten besteht. Die bis dahin als early-onset Marker kompartimentiert exprimierten Gene nehmen in ihrer Expressionsstärke ab [31]. Gleichzeitig beginnt eine zweite Phase erhöhter Apoptose [41], begleitet von einer Änderung im Reaktionsverhalten bei einer Axonläsion: während Purkinjezellen vorher ein durchtrenntes Axon regenerieren können, sterben sie in dieser Phase bei einer Läsion ab [43]. Am Ende dieser Phase, also ungefähr bei P08, haben sich die Purkinjezellen als Monolayer angeordnet.

Mit der Reifung der Dendriten erscheinen auf den Dendritenausläufern, aber auch auf den Somata, zahlreiche Dornfortsätze (Spines). Die perisomatischen Spines bilden sich ab P03 ebenso wie die perisomatischen Dendriten zugunsten des Hauptdendritenstammes zum Teil zurück [42][45]. Erst ab P08 sind vielfältige Spines an den Dendriten sichtbar, die in Ihrer Morphologie klassische Spines repräsentieren. Die Entwicklung des Dendritenbaumes ist bei P15 abgeschlossen. Als molekulare Regulatoren der Dendritogenese sind sowohl intrinsische (z.B. ROR $\alpha$ -Expression, [45]) als auch extrinsische Faktoren (z.B. Kontakt mit Parallelfasern, Bergmann-Glia, [46]) beschrieben. Ebenso ist die Bildung der *Plexus infra-* und *supraganglionaris*, der Netzwerke aus den Kolateralen der Purkinjezellaxone, an P15 abgeschlossen [47]. Ab P08 erweisen sich Purkinjezellen wieder als weitgehend resistent gegen eine Axotomie, allerdings sind sie nicht mehr in der Lage, ein durchtrenntes Axon zu regenerieren [43]. Stattdessen bilden sie axonale Auftreibungen (Torpedos) und hypertrophe

Abbildung 1.3: Kompartimente von cerebellären Purkinjezellen nach Hannan et al. [44]:

A - Axon  
 D - Dendrit  
 H - Axonhügel und proximales Axon  
 P - postsynaptische Dornfortsätze  
 S - Soma (im adulten Soma kann man hier mit einigen Markern auch noch eine Unterteilung in einen axonalen und dendritischen Pol feststellen)  
 T - präsynaptische Terminale  
 W - Wachstumskegel



Kollateralen [48]. Am Ende dieser Phase (ab P14) beginnt eine Reihe von Markern (z.B. Zebrin) ein neues parasagittales Muster zu definieren, das „late onset“-Muster, welches bis zum Adultstadium beibehalten wird [49] (s.o.).

An P15 sind die wichtigsten Entwicklungsvorgänge bei Purkinjezellen abgeschlossen und man kann die Zellen als voll differenziert betrachten. Allerdings muss man die hier gemachten Angaben zu Zeitpunkten insgesamt kritisch betrachten, auch wenn sie im Grossen und Ganzen mit den Beobachtungen an den in dieser Arbeit verwendeten Tiere übereinstimmen. Es ist aber einerseits bekannt, dass die Entwicklungsschritte bei unterschiedlichen Mausstämmen durchaus unterschiedlichen Zeitplänen folgen, andererseits können sich sogar Tiere desselben Mausstammes unterschiedlich schnell entwickeln, je nach Ernährungslage<sup>2</sup>. In Abbildung 1.2 sind die wichtigsten Entwicklungsabläufe noch einmal auf einer Altersskala aufgetragen.

### 1.1.3.2 Zellkompartimente von Purkinjezellen

Nervenzellen sind polar aufgebaute Zellen, wie z.B. auch Epithelzellen, von denen sie sich herleiten und mit denen sie eine Reihe von Eigenschaften teilen. Während man bei Epithelzellen einen apikalen und einen basalen Pol in Abhängigkeit von der Orientierung zur Basalmembran definiert, werden Nervenzellen in ein Axon und einen Teil, der Soma und Dendrit umfasst, unterschieden [8]. Diese polare Aufteilung wird in Neuronen unmittelbar postmitotisch durch die Position des Zentrosoms festgelegt. An dieser Stelle wächst der erste Zellfortsatz aus und dieser entwickelt sich zum Axon, während die anderen Zellfortsätze zu Dendriten werden [50]. Nach der Determination des Axons reift dieser Fortsatz, indem er zunächst in die Länge wächst. Dabei werden typische Moleküle und Organellen in das Axon

<sup>2</sup> Diese hängt z.B. stark von der Grösse eines Wurfes ab. Tiere aus sehr kleinen Würfen (<3 Tiere) können innerhalb der ersten 2 Lebenswochen einen Entwicklungsvorsprung von bis zu 2 Tagen gegenüber Tieren aus sehr grossen Würfen (>12 Tiere) erreichen (eigene Beobachtung).

transportiert. Nach Abschluss der axonalen Differenzierung schaltet die Zelle irreversibel vom axonalen in den dendritischen „Wachstumsmodus“. Dabei büßen die Nervenzellen des ZNS i.d.R. ihre Kapazität zur Axonregeneration ein [51][52][53].

Die Unterteilung in Axon und Soma/ Dendrit ist für die vorliegende Arbeit nur eingeschränkt hilfreich, da sie die Verhältnisse nur vereinfacht wiedergibt. Ein ausführlicheres Modell zur Unterteilung von Nervenzellen in verschiedene Kompartimente ist von Hannan et al. aufgrund der subzellulären Verteilung bestimmter mRNAs in cerebellären Purkinjezellen beschrieben worden [44]. Die Ausprägung der Kompartimente ist altersabhängig und nur für embryonale und adulte Tiere genau beschrieben. Da ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf Untersuchungen zur Zellkompartimentierung liegen wird, wird die von Hannan et al. beschriebene Unterteilung in Abbildung 1.3 vorgestellt. Ergänzend kann man am Axon differenzierter Neurone noch das initiale Axonsegment gegen den Rest des Axons abgrenzen, da dieser Abschnitt sich z.B. dadurch abhebt, dass er als Diffusionsbarriere für Membranmoleküle fungiert [54].

Auch wenn die Ausbildung der Polarität als zentrale strukturelle Voraussetzung für die Funktion einer Zelle schon lange bekannt ist, ist über die Grundlagen der Entstehung von zellulären Kompartimenten sehr wenig bekannt. An der Selektion von Axonen aus einem Pool von unreifen Fortsätzen sind offensichtlich strukturelle Veränderungen des Zytoskeletts ganz entscheidend (z.B. im Hinblick auf die Orientierung von Mikrotubuli [55]). Hierfür wichtig sind offensichtlich PAR-Proteine, insbesondere der mPar6 $\alpha$ -Proteinkomplex. Wie die Expression dieser Proteine reguliert wird und über welche Mechanismen diese Proteine im Detail wirken und wie ihre Expression gesteuert wird ist noch weitgehend unbekannt [56]. Dasselbe gilt für Moleküle, die in die Entwicklung und Differenzierung von Dendriten involviert sind, wie z.B. ROR $\alpha$  [45] oder der Origin of recognition complex [57]. Von Bedeutung könnten hier auch Gene aus der Segment-Polaritäts-Familie sein. Die Tatsache, dass *Engrailed-2* embryonal in Purkinjezellen während der axonalen Wachstumsphase exprimiert wird, diese Expression aber zeitlich koinzident mit dem Beginn der Dendritenentwicklung abgeschaltet wird, legt die Vermutung nahe, dass *Engrailed-2* an der Ausprägung eines polar organisierten Zellphänotyps beteiligt ist.

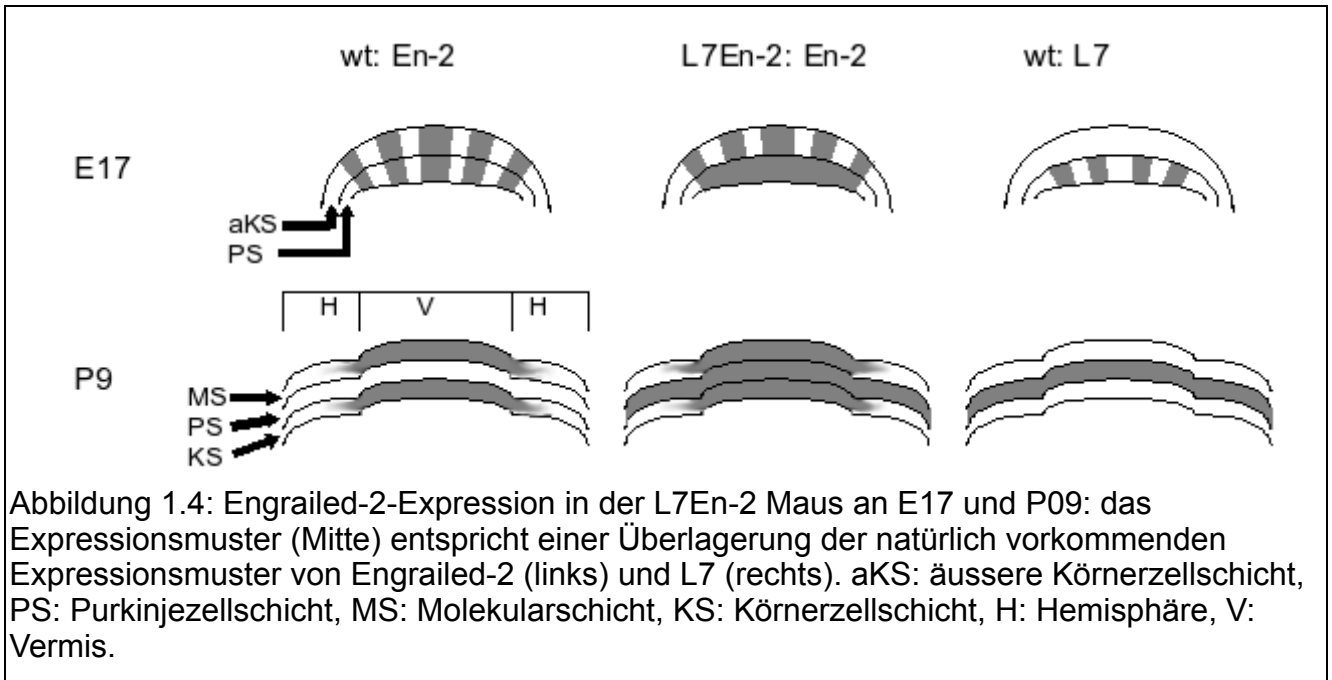
## 1.2 Der Transkriptionsfaktor Engrailed-2

### 1.2.1 Engrailed-2 Expression und Funktion

Engrailed-2 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Klasse der Segmentpolaritätsgene. Wie dieser Name schon implementiert, zeigen Mitglieder der Segmentpolaritätsgenfamilie eine enge Korrelation mit dem Auftreten von Segmenten und Kompartimenten in Invertebraten und Vertebraten. In *Drosophila* sind Segmentpolaritätsgene von entscheidender Bedeutung für die Festlegung von Segmentgrenzen im Thorax und Abdomen. Sie bestimmen, welche Anhangsgebilde an einem Segment gebildet werden und definieren den zeitlichen Ablauf der Segmentbildung. Sie bestimmen zudem, wo bei einem Segment vorne (anterior) und wo hinten (posterior) ist, und definieren dadurch Achsen als Form der Polarität in Tieren [58][59]. Zur Familie der Segmentpolaritätsgene gehören im Wesentlichen vier Klassen (I) engrailed und wnt Gene, (II) notch Gene, (III) hedgehog Gene, und (IV) BMPs. Viele dieser Gene spielen auch bei der Entwicklung von Vertebraten eine Rolle und insbesondere bei der Entwicklung des Kleinhirns in Säugetieren [24]. Hier werden Segmentpolaritätsgene (z.B. Engrailed-2, Wnt7b) während der Kleinhirnentwicklung in parasagittalen „early-onset“-Streifenmustern exprimiert [31] (siehe auch 1.1.3.1). Da sich in den Kleinhirnkortex einwachsende Fasern an den durch parasagittale Marker festgelegten Grenzen orientieren, beeinflussen die hier exprimierten Segmentpolaritätsgene möglicherweise axonale Wegfindung [35].

Experimentelle Hinweise auf einen Einfluss insbesondere der Engrailed Proteine auf axonale Wegfindung sind auch aus anderen Systemen bekannt. Im *tectum opticum* von Hühnern sind Engrailed-1 und -2 in einem Gradienten exprimiert und beeinflussen die Expression von axonalen Wegfindungsmolekülen (Ephrine). Über diese Ephrine und andere Moleküle wird der Weg retinaler Axone ins Tektum vorgegeben [60]. An Krallenfröschen wurde gezeigt, dass diese Wirkung auch durch extrazellulär vorhandenes Engrailed-2 vermittelt werden kann, welches von axonalen Wachstumskegeln aufgenommen und in intrazelluläre Signale umgewandelt wird [61].

Neben den extrazellulären Effekten scheinen Engrailed Proteine aber auch intrazellulär die Steuerung von neuronaler Differenzierung voranzutreiben. Bei Küchenschaben wurde festgestellt, dass die Engrailedexpression in bestimmten Neuronenpopulationen das Axonwachstum in eben diesen Neuronen beeinflusst [62][63]. Auf einen möglichen Einfluss von Engrailed-2 auf das Axonwachstum weist auch die Regulierung von MAP1b durch Engrailed-2 hin [64][65]. MAP1b ist ein mikrotubuliassoziertes Protein, welches charakteristisch für auswachsende Axone ist [66]. Neben einem Einfluss auf das



Axonwachstum belegen Untersuchungen an Überexpressionsmutanten, dass Engrailed-2 einen negativen Einfluss auf die Differenzierung von Dendriten hat [67] (siehe auch 1.3). Insgesamt betrachtet ist es also durchaus denkbar, dass Engrailed Proteine die polare Organisation von Zellen beeinflussen.

Neben den beschriebenen Effekten ist für Engrailed-Proteine auch ein starker Einfluss auf das Überleben von Neuronen beschrieben. Deletionsmutanten von Engrailed-1 oder -2 haben ein deutlich kleineres Kleinhirn [68][32], hervorgerufen durch ein massives Absterben von Zellen. Die Deletion beider engrailed Gene führt auch zu einer erhöhten Apoptoserate bei dopaminergen Zellen der *Substantia nigra*, wodurch man auf einen überlebensfördernden Einfluss von Engrailed Proteinen schließen kann [69][70].

### 1.2.2 Engrailed-2 Expression während der Entwicklung des Cerebellum

Nachdem die engrailed-Gene schon beim Aufbau der Isthmusregion, aus der die Vorläuferzellen für das Kleinhirn stammen, eine wichtige Rolle spielen [71], wird Engrailed-2 ungefähr ab E15 in Purkinjzellclustern in einem medialen Streifen und in 2 lateralen, parasagittalen Banden exprimiert [31] (siehe auch Abbildung 1.4 links). Diese Expression in einem strikt begrenzten Streifenmuster ist bis ca. E17 in Purkinjzellen und in der äusseren Körnerzellschicht zu erkennen [32]. Danach werden die Begrenzungen der Banden diffuser, die lateralen Banden verschwinden. An P00 ist die Engrailed-2-Expression auf einen vermalen Streifen reduziert [31][23]. Einige Tage nach der Geburt ist in Purkinjzellen keine En-2-Expression mehr feststellbar, lediglich Körnerzellen und Zellen der Molekularschicht sind in einem unscharf begrenzten vermalen Streifen Engrailed-2 positiv [31].

### 1.2.3 Engrailed-2 und sein Einfluss auf neuropathologische Vorgänge

Auch wenn es nicht Thema dieser Arbeit ist, soll hier kurz auf den Zusammenhang von Engrailed-2 und bestimmten pathologischen Vorgängen eingegangen werden, da sich das Interesse an der zellbiologischen Bedeutung von Engrailed-2 zum Teil auch aus diesen Zusammenhängen herleitet. Es gibt zur Zeit zwei neuropathologische Veränderungen, in deren Umfeld ein Einfluss von Engrailed-2 diskutiert wird.

Die Parkinsonsche Krankheit wird durch das Absterben dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra* verursacht. Für Engrailed-2 wurde gezeigt, dass es für das Überleben dieser Neuronen wichtig ist [69]. Die These, dass eine fehlerhafte Engrailed-2 Expression eine mögliche Ursache der Parkinsonschen Erkrankung ist, wird dadurch gestützt, dass bei einzelnen Parkinsonpatienten ein cerebellärer Phänotyp beschrieben worden ist [72][73].

Ausser bei Parkinson kann man auch bei autistischen Störungen eine Verbindung zu Engrailed-2 herstellen. Hier legen Genlocusanalysen einen Zusammenhang zwischen Mutationen des engrailed-2-Gens und bei autistischen Patienten gefundenen cerebellären Veränderungen nahe [74][75]. Vor kurzem konnten im Kleinhirn von Engrailed-2 *-/-* Mäusen Teilaspekte von Veränderungen nachgewiesen werden, wie sie von autistischen Patienten bekannt sind. Daher wird die Engrailed-2 *-/-* Maus zur Zeit als Modellorganismus für autistische Störungen diskutiert [76].

## 1.3 Die Engrailed-2-Überexpressionsmutante L7En-2

Das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell ist die Engrailed-2-Überexpressionsmutante L7En-2. In dieser Maus wird Engrailed-2 ausser in seinem natürlichen Expressionsmuster (1.2.2) zusätzlich unter Kontrolle des L7-Promotors exprimiert. L7 ist ein purkinjellspezifisches Protein, das embryonal komplementär zu Engrailed-2 exprimiert wird und später ubiquitär. Das Expressionsmuster von Engrailed-2 in der L7En-2 Maus entspricht also einer Überlagerung der natürlichen Expression und der L7-getriebenen Expression (Abbildung 1.4) [32]. Die ubiquitäre statt parasagittale Expression von Engrailed-2 während der Embryonalphase sowie die permanente Dauer statt der Herunterregulation in Purkinjellen hat Folgen für die Entwicklung des Kleinhirns in der L7En-2 Maus:

Das natürlicherweise auftretende und durch diverse Marker (z.B. Zebrin) erkennbare parasagittale "late onset"-Muster ist in der L7En-2-Maus verändert [35].

Korrelierend mit den veränderten biochemisch definierten Kompartimenten zeigen Moosfasern ein verändertes Innervationsmuster [35].



Das Kleinhirn ist insgesamt kleiner, enthält weniger Zellen [67], und besitzt eine in der ersten Postnatalwoche deutlich erhöhte Apoptoserate (Jankowski, unveröffentlichte Daten).

Die Purkinjezellen entwickeln sich nur reduziert, d.h. sie besitzen einen kleineren Somadurchmesser und einen deutlich kleineren Dendritenbaum. Daneben ist auch die Dicke der Molekularschicht deutlich geringer [67].

Die Purkinjezellen benötigen mehr Zeit, bis sie sich von einer mehrschichtigen Zelllage in die für sie typische Einzelzellschicht umsortiert haben [67].

Über welche Mechanismen diese Veränderungen hervorgerufen werden, ist bisher unklar. Dies liegt auch daran, dass über Zielgene des Transkriptionsfaktors Engrailed-2 bisher nur wenig bekannt ist [77].

## **1.4 Fragestellungen dieser Arbeit**

### **1.4.1 Projekt 1: Inwiefern beeinflusst die Engrailed-2 Überexpression in Purkinjezellen deren zelluläre Struktur?**

Nervenzellen im Allgemeinen und Purkinjezellen im Besonderen weisen eine deutliche Polarisierung auf. Es ist bekannt, dass En-2-überexprimierende Purkinjezellen deutliche morphologische Unterschiede im Bereich des Somas und Dendritenbaumes aufweisen.

Da Engrailed das Axonwachstum eher fördert, stellt sich die Frage, ob Engrailed-2 die Entwicklung der polaren Organisation von Purkinjezellen beeinflusst. Es musste also geklärt werden, ob Somata und Axone Unterschiede in der Entwicklung und der Ausprägung morphologischer Merkmale aufweisen. Aus diesen morphologischen Daten sollten dann auch Hypothesen aufstellbar sein, welche Mechanismen diesen Veränderungen zugrunde liegen.

### **1.4.2 Projekt 2: Spielt Engrailed-2 eine Rolle bei der axonalen Wegfindung von parasagittal orientierten Afferenzen des cerebellären Kortex?**

Engrailed-Gene können direkt oder indirekt Einfluss auf axonale Wegfindung nehmen. Es gibt auch Hinweise, dass Engrailed-2 Einfluß auf die parasagittale Kompartimentierung des Kleinhirnkortex nimmt. Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, ob Gene der axonalen Wegfindung in L7En-2 Mäusen verändert exprimiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiere

Alle hier verwendeten Mäuse wurden entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen in Typ II und Typ III Käfigen gehalten, sie hatten unbegrenzten Zugang zu Futter und Wasser.

Die Tiere der heterozygoten L7Engrailed-2-Zucht wurden in einem FVB/N-Hintergrund gehalten, die Gründertiere stammten aus dem Labor von John Oberdick (Columbus, USA, [32]). Die für die Zucht eingesetzten Wildtypiere stammten entweder aus der eigenen Nachzucht oder wurden über Elevage Janvier (Le Genest-St-Isle, F) bezogen. Alle hier verwendeten Tiere stammen aus Verpaarungen von heterozygoten Männchen mit Wildtyp-Weibchen. Für alle vergleichenden Untersuchungen wurden ausschließlich Tiere unterschiedlichen Genotyps aus einem Wurf verwendet, um entwicklungsbedingte Variationen in der Kleinhirnmorphologie zu minimieren.

### 2.2 Material

Dieser Abschnitt enthält ein Glossar zu den im Methodenteil nicht näher erklärten Lösungen, Reagenzien, Utensilien und Geräten.

Reagenzien, deren Herkunft nicht eindeutig beschrieben ist, wurden über die Firma Labomedic (Bonn, D) bezogen und stammten von wechselnden Herstellern (z.B. KMF (Lohmar, D), Merck (Darmstadt, D), Fluka (Buchs, CH), Sigma (Saint Louis, USA), Serva (Heidelberg, D), Biomol (Hamburg, D)).

Das Präparationsbesteck wurde, wenn nicht anders angegeben, über Fine Science Tools GmbH (Heidelberg) bezogen.

Die Zusammensetzungen der Lösungen sind für die Standardgebrauchslösungen angegeben. Einige Lösungen wurden auch in anderen Konzentrationen verwendet. Hier bedeutet ein vorangestelltes  $nx$ , dass die  $n$ -fache Konzentration der Standardgebrauchslösung verwendet wurde (z.B. SSC: 150mM NaCl und 15mM Natriumcitrat, 2xSSC: 300mM NaCl und 30mM Natriumcitrat).

35x10-/ 60x15-Schale: Hersteller: nunc (Roskilde, DK); Produkt-Nr.153066/ 150288; die

Zahlen geben die Maße Durchmesser x Höhe in mm an

6er-/ 12er-/ 24er-Multischale: Hersteller: TPP; Vertrieb über Biochrom, Produkt-Nr. P 92060/ P 92120/ P 92240

Agarose: SeaKem LE Agarose von Cambrex (Rockland, USA), Vertrieb über Biozym (Hessisch Oldendorf, D), Produkt-Nr.: 84.0004

AMPUWA: Wasser zu Injektionszwecken, von Fresenius Kabi (Bad Homburg, D)

Anti-DIG-AP: Schaf Anti-Digoxigenin (DIG) F<sub>ab</sub>-Fragmente, Alkalische Phosphatase (AP) Konjugat von Roche (Mannheim, D)

Avertin: 100%<sub>w/v</sub> Tribromoethylalkohol in tert-Amylalkohol

BCIP-Isg.: 5%<sub>w/v</sub> 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) in Dimethylformamid

Clark`s Lösung: 95% Ethanol abs., 5% Eisessig

DEPC (Diethylpyrocarbonat) von Sigma (Saint Louis, USA); DEPC-Behandlung von Lösungen (zur Inaktivierung von RNAsen): Inkubation der Lösung mit 0,05%<sub>w/v</sub> DEPC (37°C, 12h), anschließend autoklavieren für 40min; Lösungen, die zumindest in Bestandteilen mit DEPC behandelt wurden, sind mit dem Subskript DEPC gekennzeichnet

DMSO (Dimethylsulfoxid) von Sigma (Saint Louis, USA), Produkt-Nr. D-2650

Entwicklungspuffer: 100 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH mit HCl/NaOH auf 9,5 eingestellt

Hämalaun: Mayers Hämalaun von Merck (Darmstadt), Produkt-Nr. 9249

Hank`s Lösung: 137mM NaCl, 5mM KCl, 0,7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5mM Glucose, 2,5mM CaCl<sub>2</sub>, 1,3mM MgSO<sub>4</sub> und 4,2mM NaHCO<sub>3</sub> in AMPUWA, pH mit HCl/NaOH auf 7,2 eingestellt, steril filtriert mit Steritop Filtereinheit von Millipore (Bedford, USA, Bestellnr.: SCGPT05RE)

ISH-Blockierlösung: 2%<sub>w/v</sub> Blocking Reagent von Boehringer (Mannheim, D) in MAB

Kulturschalen-Inserts: Hersteller: Millicell, Bestellnr.: PICM 030 50

Ladepuffer, 6-fach konzentriert: 3,7mM Bromphenolblau, 4,5mM Xylencyanol und 117mM Saccharose in ddH<sub>2</sub>O

MAB: maleinic acid buffer (Maleinsäurepuffer): 100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, pH mit HCl/NaOH auf 7,5 eingestellt

NBT-Isg.: 5%<sub>w/v</sub> Nitrobluetetrazolium (NBT) in 70%<sub>v/v</sub> Dimethylformamid mit 30%<sub>v/v</sub> ddH<sub>2</sub>O

Neurobasal<sup>++</sup>-Medium: Neurobasal-Medium (Produkt-Nr.: 21103-049) mit B27 Supplement ((Produkt-Nr.: 17504-044) und GlutaMax (Produkt-Nr.: 35050-038) bzw. 2mM Glutamin (Produkt-Nr.: 25030-024), alles von Invitrogen (Carlsbad, USA)

PBS: phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung); 150mM NaCl, 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in ddH<sub>2</sub>O, pH mit HCl/ NaOH eingestellt

PFA: Paraformaldehyd

L7En-2-forward-Primer (5'-3'): CTG GGA CCC TCA GCC CTC ACC  
 aus Exon 4 der für das purkinjezellspezifische L7-Protein codierenden Sequenz  
 L7En-2-reverse-Primer (5'-3'): TCC TTC TCC GTC TAC CGC AGG  
 aus der für den Transkriptionsfaktor Engrailed-2 codierenden Sequenz  
 GAPDH-forward-Primer (5'-3'): TGAAGG TCG GTG TGAACG GAT TTG GC  
 GAPDH-reverse-Primer (5'-3'): CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC

Tabelle 2.1: PCR-Primer (alle Primer wurden von Invitrogen (Carlsbad, USA) synthetisiert)

P-Puffer: Phosphatpuffer; 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in ddH<sub>2</sub>O, pH mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ NaOH auf 7,4  
 eingestellt

Proteinase K: von Sigma (Saint Louis, USA), Produkt-Nr. P-6556

Ringerlösung (für Mammalia, nach [78]): 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 12mM NaHCO<sub>3</sub> und  
 1,5mM CaCl<sub>2</sub> in ddH<sub>2</sub>O, pH mit HCl/NaOH auf 7,2 eingestellt, filtriert

SSC: saline sodiumcitrate buffer (Natriumcitrat-gepufferte Kochsalzlösung), 150mM NaCl,  
 15mM Natriumcitrat in ddH<sub>2</sub>O

Taq DNA Polymerase (rekombinant) von Fermentas (Burlington, CAN), Produkt-Nr.  
 EP0402

Taq Puffer (10x) mit KCl, ohne MgCl<sub>2</sub>, ohne (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> von Fermentas (Burlington, CAN),  
 mit Taq-Polymerase geliefert

TBE-Puffer (TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer): 89mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan,  
 89mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> und 2mM Ethylendiamintetraacetat in ddH<sub>2</sub>O, pH 8,0

Thermomixer: 5436, Eppendorf (Hamburg)

TBS: TRIS-buffered saline (TRIS-gepufferte Kochsalzlösung); 150mM NaCl, 50mM TRIS  
 in ddH<sub>2</sub>O, pH mit HCl/NaOH eingestellt

Triton X-100 von Sigma (Saint Louis, USA), Produkt-Nr.: T-9284

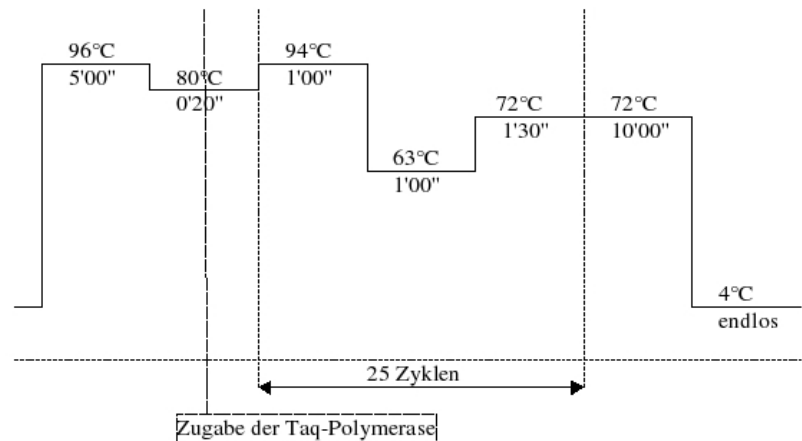
Zentrifuge: Biofuge Pico, Heraeus Instruments (Hanau)

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Tierzucht und Genotypisierung

Um die Experimente, für die bestimmte Altersstadien benötigt wurden (siehe z.B. 2.3.3, 2.3.2.1), planbar zu machen, wurden die Tiere zeitlich festgelegt verpaart. Dabei wurden jeweils am Spätnachmittag (zwischen 16h und 17h) 1 - 2 Weibchen zu einem Männchen gesetzt; am Folgetag wurden die Weibchen zwischen 9h und 10:30h wieder von den Männchen abgesetzt und auf vorhandene Inseminalpfröpfe untersucht. Dieser Tag wurde als

Abbildung 2.1:  
Programmschema für die  
L7En-2-PCR



Embryonaltag 0 (E00) gezählt. Die Jungtiere wurden entsprechend dieser Rechnung an E20 geboren. Dieser Tag wird im Folgenden als Postnataltag 0 (P00) bezeichnet, sofern es sich um bereits geborene Tiere handelt.

Schwangere Weibchen wurden grundsätzlich allein in einem Käfig gehalten, um eine eindeutige Zuordnung der Jungtiere zu einem Wurf sicherzustellen.

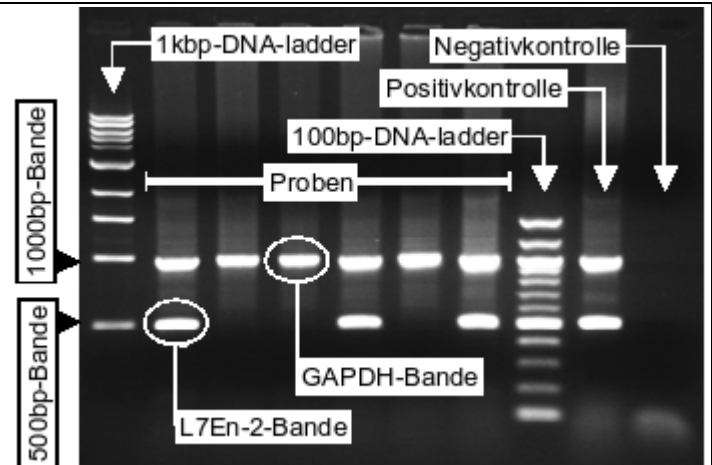
Die Tiere des L7En-2-Stammes wurden durch Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) charakterisiert. Dem zu charakterisierenden Tier wurde die Schwanzspitze abgenommen. Diese wurde über Nacht bei 55°C im Thermomixer mit Proteinase K verdaut (200µl PCR-Puffer mit 2,5mM MgCl<sub>2</sub> und 200µg/ml Proteinase K). Anschließend wurde der Verdau 2min bei 16000g zentrifugiert. Der Überstand diente in der PCR als Template.

Die PCR wurde mit 20µl Ansätzen durchgeführt, in denen 2µl Template enthalten waren. Der PCR-Mix auf der Basis des PCR-Puffers enthielt 2mM MgCl<sub>2</sub>, je 200µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 282mM DMSO, 50nM der GAPDH-Primer und 500nM der L7En-2-Primer (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Pro Ansatz wurde 0,5u Taq-Polymerase eingesetzt.

Es wurde eine Hotstart-PCR durchgeführt, bei der vor Zugabe der Taq-Polymerase das Template mit dem PCR-Mix für 5-10min auf 96°C erhitzt wurde. Auf diese Weise kann die Proteinase K inaktiviert und die DNA denaturiert werden. Nach dem Denaturierungsschritt wurde bei einer Temperatur von 80°C die Taq-Polymerase zugegeben. Anschließend wurden die Zyklen gestartet. Die Annealingtemperatur für das verwendete L7En-2 Primerpaar lag bei 63°C<sup>3</sup>. Am Ende der PCR wurde ein verlängerter Elongationsschritt angehängt (vollständiges Programmschema siehe Abbildung 2.1; Maschine: GeneAmp PCRSystem 2400 von Perkin-Elmer (Wellesley, USA)).

<sup>3</sup> Die entsprechende optimale Annealingtemperatur für das verwendete GAPDH-Primerpaar liegt bei 60°C, da diese Primer aber auch bei 63°C noch sehr gut gebunden haben wurde diese Temperatur verwendet.

Abbildung 2.2: Beispiel für ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel, auf dem 6 PCR-Proben zur Identifizierung L7En-2-positiver Tiere aufgetrennt wurden: die ungefähr auf Höhe der 1000bp-Marke erscheinende GAPDH-Bande zeigt, dass in allen Proben (ausser der Negativkontrolle) amplifizierbare DNA enthalten ist. Bei den Proben von L7En-2-positiven Tieren erscheint zusätzlich ungefähr auf Höhe der 500bp-Marke die L7En-2-Bande.



Bei jeder PCR wurde eine bekanntermaßen L7En-2-positive Probe sowie eine Wasserprobe als Positiv- bzw. Negativkontrolle mitamplifiziert.

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit Ladepuffer versetzt und zusammen mit DNA-Fragmenten bekannter Länge (1kb- und/oder 100bp-DNA-ladder von NEB, Frankfurt (Prod.-Nr.: N3232L bzw. N3231L)) auf einem 1%igen Agarosegel (1% Agarose in TBE-Puffer mit 0,0005% Ethidiumbromid) gelelektrophoretisch aufgetrennt (Gelkammer: ComPhor L Midi mit PowerPac 300, beides von Bio-Rad (Hercules, USA)). Anschließend wurden die Gele digital erfasst (GelDoc 2000 mit Quantity One (Version 4.1.1) von Bio-Rad (Hercules, USA); Beispiel siehe Abbildung 2.2).

## 2.3.2 Zellkultur

### 2.3.2.1 Schnittkultur-Präparation

Für den direkten Vergleich von Schnittkulturen aus Wildtyp- und L7En-2-Mäusen wurden ausschließlich Geschwistertiere aus einem Wurf verwendet. Dazu wurden L7En-2/wt-Männchen mit wt/wt-Weibchen verpaart (s.o.).

Die Tiere wurden dekapitiert (Zeitangaben sind ab diesem Zeitpunkt gerechnet), Haut und Muskeln wurden vom Schädel entfernt und die vordere Schädelhälfte mit einer spitzen Schere abgetrennt. Hierbei wurde eine Schneide der Schere von ventral auf Höhe der Austrittsstelle des Oesophagus in den Kopf geschoben, bis in die Schädelhöhle hinein. Dann wurden der Schädel mit einem ringförmig geführten Schnitt in der Frontalebene durchtrennt, sodass der Schädel in einen größeren vorderen Teil (mit dem Großteil des Vorder- und Zwischenhirns) und einen etwas kleineren hinteren Teil geteilt werden konnte. Der abpräparierte hintere Teil des Schädels - das Hinterhauptsbein mit Teilen von Schläfen- und Scheitelbein – enthielt das Kleinhirn und den Hirnstamm. Der Vorteil der geschilderten Präparationsmethode ist, dass hierbei kein größerer Druck auf die Schädelhöhle ausgeübt

wird, was entscheidend für die unversehrte Erhaltung des Kleinhirns ist. Die hintere Schädelhälfte wurde anschließend mit den darin enthaltenen Anteilen des ZNS in sterile Hank's Lösung (4°C, 5ml in einer 35x10-Schale) überführt (ca. 1min). Die folgenden Präparationsschritte wurden in einer Sterilbank und unter einer Stereolupe (Stemi 1000, Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Präpariert wurde mit 2 Pinzettensätzen die aus je einer geraden und einer gebogenen Pinzette bestanden. Bei jedem Flüssigkeitswechsel wurde der Pinzettensatz gewechselt; der gerade nicht in Gebrauch befindliche Satz wurde zwischenzeitlich nacheinander in ddH<sub>2</sub>O, 70% Propanol und 100% Propanol jeweils kurz abgespült und darauf in einem Instrumentensterilisator sterilisiert; dies diente dazu, eine möglichst hohe Sterilität der gesamten Prozedur zu gewährleisten. Die Schädelhöhle wurde nun von ventral weiter eröffnet und die darin enthaltenen Anteile des ZNS herauspräpariert. Diese wurden in eine 60x15 Schale mit Hank's Lösung (4°C) überführt (ca. 4min) um dort das Cerebellum freizupräparieren und von den Meningen zu befreien. Das Cerebellum wurde dann (ca. 9min) auf eine antihafbeschichtete Trägerplatte gebracht und auf einem McIlwain Tissue Chopper (FMI GmbH, Egelsbach) sagittal in 350µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden dann von der Trägerplatte in eine 35x10-Schale mit 5ml steriler Hank's Lösung (4°C) heruntergespült (ca. 11min). Anschließend wurden diejenigen Schnitte, die dabei nicht vereinzelt wurden, vorsichtig auseinandergezogen. Die Schnitte wurden mit einer stumpfen Glaspipette auf die Kulturschalen-Inserts (Millicell-CM PICM03050, Millipore, Bedford, USA) überführt (ca. 13min) und dort möglichst weiträumig verteilt, damit sich die Schnitte, die in Kultur abflachen und sich flächig ausdehnen, nicht berühren. Auf den Inserts waren 200-400µl Neurobasal<sup>++</sup>-Medium (37°C) vorgelegt, unter den Inserts, in einer Schale einer 6er-Multischale, war 1ml Medium (37°C) vorgelegt. In Schalen, in denen sich kein Insert befand, wurde zur Erhöhung der Luftfeuchte 2 - 3 ml AMPUWA pipettiert<sup>4</sup>. Nachdem die Schnitte positioniert waren, wurde sämtliche Flüssigkeit auf den Inserts abgesaugt um ein Aufschwimmen der Kulturen zu verhindern (ca. 16min). Anschließend wurde die 6er-Multischale in den Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% rel. Luftfeuchte) gestellt.

Am Folgetag sowie danach im Abstand von 2 - 3 Tagen wurde das Medium unter den Inserts gewechselt. Dabei wurde seitlich des Inserts soviel Medium abgesaugt, wie man mit einer 200µl-Pipette absaugen konnte, ohne das Insert anzuheben. Daraufhin wurden 350µl frisches Medium hinzupipettiert. Diese Menge hat sich bei den von mir verwendeten Schalen als sinnvoll herausgestellt (das Medium ist über 3 Tage haltbar, es ist genug, dass es nicht austrocknet, die Schnitte können aber auch nicht abschwimmen), bei einem für einige

---

<sup>4</sup> Es hat sich gezeigt, dass bei nicht voll belegten 6er-Multischalen ohne diese Maßnahme die belegten Schalen einen deutlich höheren Flüssigkeitsverlust (ca. 50-100µl in 2 Tagen) haben.

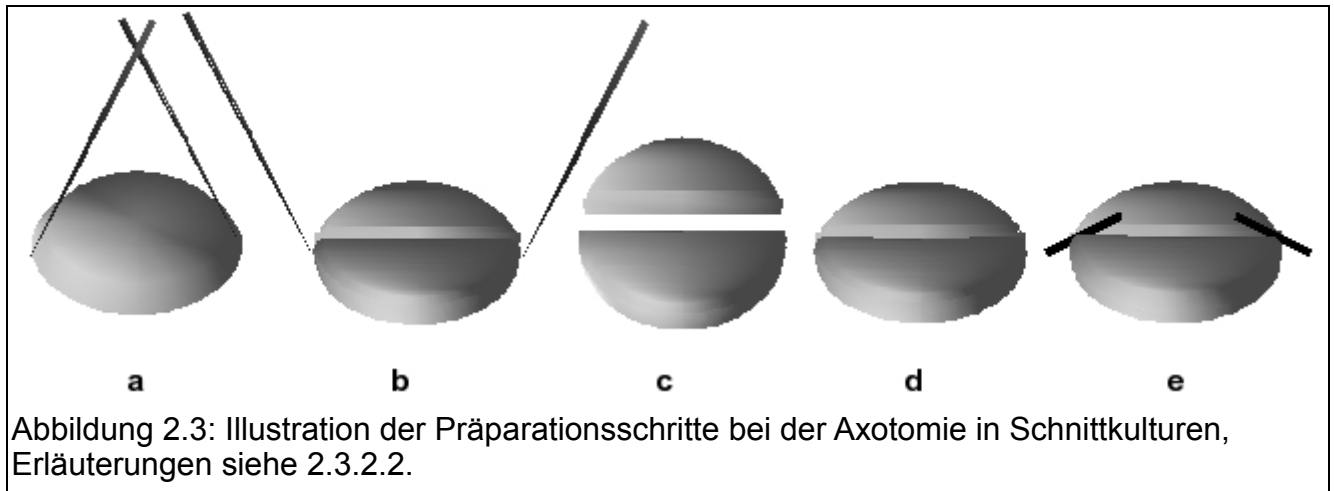


Abbildung 2.3: Illustration der Präparationsschritte bei der Axotomie in Schnittkulturen, Erläuterungen siehe 2.3.2.2.

anfängliche Kulturversuche verwendeten anderen Fabrikat (nunc (Roskilde, DK)) war die Menge 400 $\mu$ l.

### 2.3.2.2 Axotomien an Schnittkulturen

Für Regenerationsstudien wurden zwei Tage alte Kulturen (s.o.) verwendet und die Purkinjenzellaxone axotomiert. Bei den dabei verwendeten Kulturen war bei der Präparation darauf geachtet worden, dass die dorsoventrale Ausrichtung bei allen Schnitten auf einem Insert dieselbe war. Die Seite des Inserts, zu der die Dorsalseiten ausgerichtet waren, wurde markiert. Dies erleichterte die Orientierung, da die Schnitte später quer zur dorsoventralen Achse axotomiert wurden. Da die Axotomie und die anschließende Markierung der Schnittstelle pro Insert bis zu 10 Minuten dauerte, waren auf einer 6er-Multischale nur die mittleren beiden Schalen belegt und der Rest mit AMPUWA befüllt. Dadurch sollte die Zeit verkürzt werden, die die Kulturen auf einer Schale ausserhalb des Brutschranks und ohne Deckel verbringen, da dies die Gefahr des Austrocknens bzw. Auskühlens mit sich bringt.

Die Axotomie wurde mit 2 Präparationsnadeln<sup>5</sup> durchgeführt, die zu beiden Seiten des Schnittes auf das Insert aufgesetzt wurden (Abbildung 2.3a). Die Nadeln wurden dann aneinander vorbei, flach über den Schnitt gezogen. Durch den auf die Nadeln ausgeübten leichten Druck wurde der Schnitt dabei durchtrennt (Abbildung 2.3b). Um eine komplette Trennung der beiden Hälften des Schnittes zu gewährleisten, wurden die getrennten Stücke kurz auseinander- und dann wieder zusammengeschoben (Abbildung 2.3c,d). Anschließend wurde die Schnittstelle mit Faserstücken aus zerkleinertem sterilem Nahtmaterial markiert (Abbildung 2.3e). Es muss angemerkt werden, dass diese Markierung nur als Anhaltspunkt dafür dienen kann, wo die Läsion gesetzt wurde. Die Erfahrung hat gezeigt, dass sich die

<sup>5</sup> Nadelhalter mit Wironit-Nadeln, 50mmx1,5mm, Labomedic, Bonn. Es ist wichtig, dass die Nadeln eine absolut glatte Oberfläche ohne jede Verunreinigung haben, da die Schnitte sonst an den Nadeln haften. Für die hier durchgeführten Präparationen wurde für jedes Insert ein neues Paar Nadelspitzen verwendet und die Oberflächen der Spitzen vor jeder Präparation mit einem Schleifstein Körnung 8000 unter Mikroskopkontrolle gratfrei glattgeschliffen.



<i>Alter</i>	bis P3	bis P8	bis P12	bis P20	> P20
<i>Anästhesie [ml]</i>	0,1	0,15	0,2	0,3-0,4	0,5-0,8
<i>Flussrate [ml/min]</i>	7	10	12	14	17
<i>Ringerlsg. [ml]</i>	4	7	10	12	15
<i>Fixans [ml]</i>	20	30	35	40	50
<i>Kanüle</i>	S	k	K	K	K

Tabelle 2.2: Perfusion: Dosierung von Anästhesie, Ringerlösung und Fixans in Abhängigkeit vom Alter des perfundierten Tieres; S: Spritzenkanüle, k/ K: kleine/ grosse Knopfkanüle

Position der Faserstücke nach mehreren Tagen in Kultur relativ zum Gewebe ändert. Dies wird - vor dem Hintergrund, dass die Faserstücke wie in Abbildung 2.3e angegeben plaziert wurden (also nur zur Hälfte auf dem Schnitt liegend) - auch aus den Übersichten in den Abbildungen 6.10 und 6.11 deutlich.

### 2.3.2.3 Fixierung und Verarbeitung von Schnittkulturen

Nach Ende des Kulturzeitraums (5, 7, 10, 14 oder 21 Tage) wurde das Medium oberhalb und unterhalb des Zellkulturinserts vollständig abgesaugt und durch 4%<sub>w/v</sub> PFA in PBS ersetzt (pH 7,4, je 1ml ober- und unterhalb des Inserts). Nach 1h Fixierdauer wurde das Fixans abgesaugt und die Inserts wurden 3 mal für jeweils 10 min mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurden, immer noch in der 6-er Multischale, oberhalb und unterhalb des Inserts je 1ml PBS mit 0,1%<sub>w/v</sub> NaN<sub>3</sub> (pH 7,4) pipettiert, die Multischale mit Parafilm (American National Can, Menasha, USA) versiegelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Zur Herstellung DAB-gefärbter Präparate wurden die Membranen mit den Kulturen aus dem Insert herausgeschnitten und als Ganzes frei flottierend gefärbt. Zur Herstellung fluoreszent gefärbter Präparate wurden die Kulturen vorsichtig mit einem feinen Pinsel (Stärke 3/0, Synthetikborsten) von den Inserts gelöst und einzeln frei flottierend gefärbt.

### 2.3.3 Perfusion, Präparation und Nachfixierung von Gewebe

Die Tiere wurden mit intraperitoneal appliziertem Avertin (2,5%<sub>v/v</sub> in physiologischer Kochsalzlösung) entsprechend Tabelle 2.2 anästhesiert. Der Erfolg der Anästhesie wurde durch akustische und Schmerzreize überprüft. Erst wenn auf beide Reize keine Reaktion erfolgte wurde mit der Präparation begonnen.

Zunächst wurde das Tier mit Nadeln an den Extremitäten mit der Ventralseite nach oben fixiert und die Haut über Bauch und Brust aufgetrennt und zur Seite weggeklappt. Nachdem das Peritoneum mit einem T-förmigen Schnitt über die Bauchwand unterhalb des Rippenbogens eröffnet wurde, wurde der Brustraum durch Abtrennung des Zwerchfells vom Rippenbogen von kaudal eröffnet. Die unteren Rippenpaare wurden so durchtrennt, dass der

<i>Folge-experiment</i>	<i>Schneide-technik</i>	<i>Einbettung</i>	<i>Vor-perfusion</i>	<i>Perfusion</i>	<i>Nachfixierung (Dauer)</i>
IHC	Vibratom	PBS mit 0,1% <sub>ov/v</sub> NaN <sub>3</sub> , pH7,4, 4°C	Ringer	4% <sub>ov/v</sub> PFA in (P)-Puffer	4% <sub>ov/v</sub> PFA in (P)-Puffer (ÜN)
IHC	Mikrotom	Paraffin, 4°C	Ringer	Bouin	Bouin (ÜN)
ISH	Mikrotom	Paraffin, 4°C	Ringer	10% <sub>ov/v</sub> Formalin in PBS	10% <sub>ov/v</sub> Formalin in PBS (ÜN)
EM	(Semi-) Dünnschnitt	Celloidin, RT	Ringer	3% <sub>ov/v</sub> PFA, 3% <sub>ov/v</sub> GA in PBS, pH 7,4	3% <sub>ov/v</sub> PFA, 3% <sub>ov/v</sub> GA in PBS, pH 7,4 (6h)

Tabelle 2.3: Perfusion: Wahl von Fixans und Einbettungsmethode in Abhängigkeit vom Folgeexperiment

Brustkorb nach kranial weggeklappt werden konnte und das Herz frei zugänglich war. Anschließend wurde die Kanüle in der linken Herzkammer fixiert, die Peristaltikpumpe (meredos TL, meredos GmbH, Bovenden) angeschaltet und unmittelbar danach der rechte Vorhof eröffnet<sup>6</sup>. Dauer, Durchflussrate und verwendete Kanüle variierten mit dem Alter der Tiere und sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Die Tiere wurden mit Ringerlösung vorperfundiert, um das Blut weitgehend herauszuwaschen<sup>7</sup>. Das Fixans variierte mit den Folgeexperimenten, ebenso die Dauer der Nachfixierung (Immersionsfixierung) und die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung, siehe hierzu auch Tabelle 2.3. Vor der Nachfixierung wurde das benötigte Gewebe herauspräpariert. Dies war i.d.R. das Kleinhirn. Hierbei wurde zunächst der Kopf abgetrennt und die Haut von der Kalotte abgezogen. Der vordere Bereich der Schädelhöhle wurde mit einem horizontalen Schnitt auf Höhe der Orbitae eröffnet und von dort die Kalotte nach kaudal und lateral mit einer Pinzette abgetragen. Sobald das Gehirn in seiner Gesamtheit weitgehend zugänglich war, wurde es mit einer gebogenen Pinzette leicht von der Schädelbasis angehoben und die Hirnnerven wurden durchtrennt. Anschließend wurde das Gehirn komplett von der Schädelbasis abgehoben und in die Immersionsfixierung überführt. Während der Präparation wurde darauf geachtet, dass das Gewebe nicht aus- oder antrocknet, da dies zu einem massiven Hintergrundproblem bei der histologischen Aufarbeitung des Gewebes führt.

6 Führt man die Arbeitsschritte in dieser Reihenfolge durch, verhindert man vor dem Einschalten der Pumpe einen Druckabfall im Kreislaufsystem, welcher zum Kollaps kleinerer Gefäße führt. Diese werden dann oft nicht perfundiert, was zu einer ungleichmäßigen Fixierung führt.

7 Aufgrund der Druckschwankungen der Peristaltikpumpe können sich Blutgerinnsel bilden, welche bei der Immunhistochemie oft ein starkes aber unspezifisches Signal verursachen.

## **2.3.4 Herstellung von Gewebeschnitten**

### **2.3.4.1 Paraffinschnitte**

Fixierte Gehirne wurden nach dem Wässern in Leitungswasser in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 50, 60 und 70% je mindestens eine Stunde entwässert. Die anschließende Einbettung in Paraffin erfolgte im Einbettautomat (Tissue-Tek VIP 3000, Vogel, Giessen). Die in Paraffin eingebetteten Gehirne wurden mit flüssigem Paraffin in Plastikformen überführt und ausgerichtet. Nach dem Aushärten des Paraffins wurden die so hergestellten Blöckchen bei 4°C gelagert.

Die Blöckchen wurden auf einem Rotationsmikrotom (HM 355 von STS Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf) geschnitten und in etwa 35°C-40°C warmem Wasser aufgefangen. Nachdem die Schnitte sich gestreckt hatten, wurden sie aus dem Wasser auf Objektträger (SuperFrost Plus von Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Die Schnitte wurden für mehrere Tage bei 37°C im Trockenschrank getrocknet und anschließend in Objektträgerkästen bei RT gelagert.

### **2.3.4.2 Vibratomschnitte**

Für die Herstellung von Vibratomschnitten wurden perfusionsfixierte Gehirne zwei Tage in PBS gewaschen, wobei das PBS mehrfach gewechselt wurde. Anschließend wurden die Gehirne bei 4°C in PBS mit 0,1%<sub>w/v</sub> Natriumazid gelagert.

Zum Schneiden wurden die Gehirne auf dem Metallhalter des Vibratoms (VT1000S von Leica, Göttingen, mit Gillette „Super Silver“ Rasierhobelklingen) mit Sekundenkleber fixiert. Geschnitten wurde in eisgekühltem PBS. Die Schnitte wurden in PBS mit 0,1%<sub>w/v</sub> Natriumazid gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

### **2.3.4.3 Semidünnschnitte, Dünnschnitte**

Die Schnittserien für die Elektronenmikroskopie wurden von Frau Alice Ihmer hergestellt (Ultracut E von Reichert-Jung, Wien, A).

## **2.3.5 Histochemische Färbungen**

Die in dieser Arbeit gezeigten histochemischen Färbungen (Hämalaun, Nissl) sind nach Standardprotokollen aus [78] und [79] durchgeführt worden.

## **2.3.6 Immunhistochemische Färbungen**

Die verschiedenen Protokolle sind in Tabelle 2.4 und 2.5 zusammengefasst. Dieser Abschnitt enthält Erklärungen zu den Protokollen und eine Liste der verwendeten Antikörper. Die in den Tabellen verwendeten Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis erläutert.

Art	CaBP, Vib/ZS, DAB	PVA/CaBP, ZS, FL	MBP/CaBP, ZS, FL	AnkG/CaBP, ZS, FL
waschen	PBS, 5+10+15 min, RT	PBS, 5+10+15 min, RT	PBS, 5+10+15 min, RT	PBS, 5+10+15 min, RT
Vorbehandlung I	PBS, 30mM H2O2, 10min, RT	PBS, 0,5%(w/v) TX, 20min, RT	Clark's Lösung, 20min, 4°C	PBS, 0,5%(w/v) TX, 20min, RT
waschen	PBS+, 5+10+15 min, RT	PBS+, 5+10+15 min, RT	PBS+, 5+10+15 min, RT	PBS+, 5+10+15 min, RT
Vorbehandlung II	PBS+, 0,5%(w/v) TX, 20min, RT	-	-	-
waschen	PBS+, 5+10+15 min, RT	-	-	-
Blockieren	PBS+, 0,2%(w/v) Gelatine, 0,1%(w/v) TX, 1h, RT	PBS+, 0,2%(w/v) Gelatine, 0,1%(w/v) TX, 1h, RT	PBS+, 0,2%(w/v) Gelatine, 0,1M Lysin, 1h, RT	PBS+, 0,2%(w/v) Gelatine, 0,1%(w/v) TX, 1h, RT
1. AK	PBS+, 0,1%(v/v) ms>CaBP, 0,2%(w/v) Gelatine, 0,1%(w/v) TX, ÜN, RT	PBS+, 0,1%(v/v) ms>PVA, 0,1%(v/v) rb>CaBP, 0,2%(w/v) Gelatine, 0,1%(w/v) TX, ÜN, RT	PBS+, 0,2%(v/v) ms>MBP, 0,1%(v/v) rb>CaBP, 0,2%(w/v) Gelatine, ÜN, RT	PBS+, 0,2%(v/v) ms>AnkG, 0,1%(v/v) rb>CaBP, 0,2%(w/v) Gelatine, 0,1%(w/v) TX, ÜN, RT
waschen	PBS+, 5+10+15 min, RT	PBS+, 5+10+15 min, RT	PBS+, 5+10+15 min, RT	PBS+, 5+10+15 min, RT
2. AK	PBS+, 0,5%(v/v) biot>ms, 0,2%(w/v) Gelatine, 0,1%(w/v) TX, ÜN, 4°C	PBS+, 0,2%(v/v) Alexa488>ms, 0,2%(v/v) Alexa546>rb, 0,2%(w/v) Gelatine, 0,1%(w/v) TX, ÜN, 4°C	PBS+, 0,2%(v/v) Alexa488>ms, 0,2%(v/v) Alexa546>rb, 0,2%(w/v) Gelatine, ÜN, 4°C	PBS+, 0,2%(v/v) Alexa488>ms, 0,2%(v/v) Alexa546>rb, 0,2%(w/v) Gelatine, 0,1%(w/v) TX, ÜN, 4°C
waschen	PBS+, 5+10+15 min, RT	PBS, 5+10 min, RT	PBS, 5+10 min, RT	PBS, 5+10 min, RT
ABC	PBS, ABC 1:200, 0,1%(w/v) TX, 2h, RT	-	-	-
waschen	PBS, 5+10+15 min, RT	-	-	-
Entwickeln	PBS, 0,05%(w/v) DAB, 10mM H2O2, visuell, RT	-	-	-
waschen	PBS, 10+15+20 min, RT	TBS, 5+10+15 min, RT	TBS, 5+10+15 min, RT	TBS, 5+10+15 min, RT

Tabelle 2.4: Immunhistochemie I

## 2.3.6.1 Erläuterungen zu technischen Abläufen

Die Erläuterungen beziehen sich auf die in Tabelle 2.4 und 2.5 zusammengefassten Protokolle.

In der Zeile „Art“ stehen die angefärbten Antigene (z.B. CaBP für Calbindin-D28k), die Art des Präparates (z.B. ZS für Schnittkulturen) und die Art der Markierung (z.B. FL für fluoreszent) in ebendieser Reihenfolge.

Bei den einzelnen Arbeitsschritten werden zunächst die verwendeten Reagenzien aufgezählt (hierbei steht das verwendete Lösungsmittel an erster Stelle), darauf folgen die Reaktionszeit (visuell bedeutet hierbei, dass das Ende der Reaktion per Augenkontrolle festgelegt wurde), und die Reaktionstemperatur.

Art	b2Spec/CaBP, Vib, FL	bIIITub/CaBP, ZS, FL
waschen	PBS, 5+10+15 min, RT	PBS, 5+10+15 min, RT
Vorbehandlung I	PBS, 0,5%(w/v) TX, 20min, RT	PBS, 0,5%(w/v) TX, 20min, RT
waschen	-	-
Vorbehandlung II	-	-
waschen	-	-
Blockieren	PBS+, 0,2%(w/v) Gelatine, 1h, RT	PBS+, 0,2%(w/v) Gelatine, 1h, RT
1. AK	PBS+, 0,2%(v/v) ms>b2Spec, 0,1%(v/v) rb>CaBP, 0,2%(w/v) Gelatine, ÜN, RT	PBS+, 0,1%(v/v) ms>CaBP, 0,3%(v/v) rb>bIIITub, 0,2%(w/v) Gelatine, ÜN, RT
waschen	PBS+, 5+10+15 min, RT	PBS+, 5+10+15 min, RT
2. AK	PBS+, 0,1%(v/v) Alexa488>ms, 0,1%(v/v) Alexa546>rb, 0,2%(w/v) Gelatine, ÜN, 4°C	PBS+, 0,1%(v/v) Alexa488>rb, 0,1%(v/v) Alexa546>ms, 0,2%(w/v) Gelatine, ÜN, 4°C
waschen	PBS, 5+10 min, RT	PBS, 5+10 min, RT
ABC	-	-
waschen	-	-
Entwickeln	-	-
waschen	TBS, 5+10+15 min, RT	TBS, 5+10+15 min, RT

Tabelle 2.5: Immunhistochemie II

Die Antikörper stehen in dem jeweiligen Feld direkt nach dem Lösungsmittel und sind in der Form xx>yy kodiert, das bedeutet (Spezies des Primärantikörpers)-anti-(Antigen) beim 1. Antikörper und (Marker)-anti-(Spezies des Primärantikörpers) beim 2. Antikörper.

### 2.3.6.2 Primärantikörper

Rabbit anti-Calbindin-D28k von Swant (Bellinzona, CH), Produkt-Nr. CB-38 bzw. CB-38a  
 Mouse anti-Calbindin-D28k von Swant (Bellinzona, CH), Produkt-Nr. 300 bzw. von Sigma (Saint Louis, USA), Produkt-Nr. CB-955

Mouse anti-Parvalbumin von Sigma (Saint Louis, USA), Produkt-Nr. P3088

Rabbit anti-Parvalbumin von Swant (Bellinzona, CH), Produkt-Nr. PV-28

Mouse anti-Human-MBP von Serotec (Oxford, GB), Produkt-Nr. MCA685

Mouse anti-Ankyrin G von Zymed (San Francisco, USA), Produkt-Nr. 33-8800

Mouse anti- $\beta$ -Spectrin II von BD Biosciences (Heidelberg), Produkt-Nr. 612562

Rabbit anti- $\beta$ -tubulin III von Sigma (Saint Louis, USA), Produkt-Nr. T2200

<i>Zeit</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Substanz</i>
5+5+5min	RT	Xylol
5+5+5min	RT	Ethanol 100%
5min	RT	Ethanol 96%
5min	RT	Ethanol 90% DEPC
5min	RT	Ethanol 70% DEPC
5min	RT	Ethanol 50% DEPC
10min	RT	PBS <sub>DEPC</sub>
90min	4°C	4% <sub>ov/v</sub> PFA in PBS <sub>DEPC</sub>
5+5min	RT	PBS <sub>DEPC</sub>
15min	RT	1% <sub>ov/v</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 20% <sub>ov/v</sub> Methanol in PBS <sub>DEPC</sub>
5min	RT	PBS <sub>DEPC</sub>
4min	RT	10µg/ml Proteinase K in PBS <sub>DEPC</sub>
5min	RT	PBS <sub>DEPC</sub>
4min	RT	0,25% <sub>ov/v</sub> Triton X-100 in PBS <sub>DEPC</sub>
5+5+5min	RT	PBS <sub>DEPC</sub>
8min	RT	0,2M HCl in ddH <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>
10min	RT	0,25% <sub>ov/v</sub> Acetanhydrit, 0,1M Triethanolamin in ddH <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>
10+10min	70°C	2x SSC <sub>DEPC</sub>
ÜN	70°C	Hybridisierungslösung (siehe Text)
5min	60°C	2x SSC
30min	60°C	2x SSC
20min	60°C	50% <sub>ov/v</sub> Formamid in SSC
45min	70°C	10% <sub>ov/v</sub> SSC in ddH <sub>2</sub> O
20min	RT	MAB
60min	RT	ISH-Blockierlösung
ÜN	4°C	0,02% <sub>ov/v</sub> Anti-DIG-AP in ISH-Blockierlösung
5x60min	RT	MAB
20min	RT	Entwicklungspuffer
2-5d (visuell)	RT	0,35% <sub>ov/v</sub> BCIP-Isg., 0,45% <sub>ov/v</sub> NBT-Isg. in Entwicklungspuffer
5min	RT	Entwicklungspuffer
5+5min	RT	PBS

Tabelle 2.6: Protokoll zur In-situ-Hybridisierung

## 2.3.6.3 Sekundärantikörper

Alexa488 goat anti-mouse von Molecular Probes (Eugene, USA), Produkt-Nr. A11029

Alexa488 goat anti-rabbit von Molecular Probes (Eugene, USA), Produkt-Nr. A-11034

Alexa546 goat anti-mouse von Molecular Probes (Eugene, USA), Produkt-Nr. A-11030

Alexa546 goat anti-rabbit von Molecular Probes (Eugene, USA), Produkt-Nr. A-11035

biotinyliert goat anti-mouse von Vector Laboratories (Burlingame, USA), Produkt-Nr. BA-9200

biotinyliert goat anti-rabbit von Vector Laboratories (Burlingame, USA), Produkt-Nr. BA-1000

### 2.3.7 In situ Hybridisierung

Die ISH-Untersuchungen wurden an Geschwisterpaaren (je ein Wildtyp und ein L7En-2-Tier) von P00-Tieren durchgeführt. Bei der Herstellung der verwendeten Paraffinschnitte und bei der ISH selbst wurde mit grosser Sorgfalt darauf geachtet, eine Kontamination mit RNAsen zu vermeiden (z.B. alle Schritte mit Handschuhen, teilw. mit Mundschutz).

Das hier verwendete Protokoll für In-situ-Hybridisierung und die verwendeten Sonden wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Julia Martini [80] etabliert. Das Protokoll ist in Tabelle 2.6 zusammengefasst.

Es wurden DIG-markierte RNA-Sonden verwendet. Bei jedem Durchgang wurden neben der jeweiligen Antisense-Sonde zur Detektion der nachzuweisenden RNA auf je einem Schnitt die entsprechende Sense-Sonde als Negativkontrolle sowie eine Antisense-Sonde gegen Calbindin-D28k-RNA als Positivkontrolle mitgeführt.

Für die Hybridisierung wurde die Sonde zunächst im Hybridisierungspuffer<sup>8</sup> auf 2-10 µg/ml verdünnt, bei 80°C fünf Minuten denaturiert und dann auf Eis gestellt. Die Objektträger wurden um die Schnitte herum trockengewischt um die Hybridisierungsrähmchen (Gene Frame von ABgene, Ebsom, UK; Produkt-Nr.: AB-0578) aufkleben zu können. Anschließend wurde pro Rahmen 180µl der oben beschriebenen Hybridisierungslösung pipettiert und luftblasenfrei eingedeckelt.

### 2.3.8 Erfassung der mikroskopischen Präparate

#### 2.3.8.1 Konfokale Laserscanmikroskopie

Geräte (alles Leica, Wetzlar): DM IRE2 inverses Mikroskop TCS SP/2 Scanner und LCS Software; Objektive: 10x (Luft, NA:0,3), 20x (Luft, NA:0,7), 40x (Luft, NA:0,85), 63x (Öl, NA:0,6-1,4); Lichtquellen: 1 Argonionen-Laser (488nm), 1 Helium/Neon-Laser (543nm), 106Z 50W HBO, 100W Halogenlampe; Filtersets: BP450-490/LP515, BP515-560/LP590

Die Bilderstapel einer Serie, die zusammen ausgewertet wurden, wurden immer mit denselben Einstellungen (Laser, AOBS, Pinhole, PMT, Offset, etc., siehe unten) aufgenommen.

Vor der Aufnahme einer Serie, bei der beide Kanäle detektiert werden sollten, wurde überprüft, ob das Signal des einen Kanals in den anderen einstrahlt. War dies der Fall, wurden die Kanäle nicht parallel sondern getrennt aufgenommen.

Es wurde i.d.R. ein Pinhole von 1 airy benutzt. Bei einigen Bilderstapeln, bei denen es um eine besonders genaue 3-dimensionale Auflösung ging, wurde ein kleineres Pinhole gewählt,

---

<sup>8</sup> 300mM NaCl, 20mM TRIS-HCl, 5mM EDTA, 80mM DTT, 250µg/ml Hefe tRNA, 250µg/ml DNA aus Heringsperma, 100mg/ml Dextransulfat, 0,2%<sub>w/v</sub> SDS, 2%<sub>v/v</sub> Denhards Lösung, 50%<sub>v/v</sub> Formamid

sofern es die Signalstärke zuließ. Bei den Aufnahmen zu 2.3.10.3, 2.3.10.4 und 2.3.10.5 wurde ein Pinhole von 2 gewählt. Aufgrund des grossen Probenumfangs wurde hier der Verlust an z-Auflösung zugunsten einer geringeren Aufnahmezeit hingenommen [81].

Die Parameter für AOBS, PMT und Offset wurden bei jeder Serie angepasst. Je nach Stärke des Signals bzw. des Hintergrunds wurden die Werte so angeglichen, dass der Bereich der Helligkeitswerte (0 - 255) optimal genutzt wurde. Dadurch ergeben sich keine Auswirkungen auf die Auflösung. Da bei den in dieser Arbeit verwendeten Auswertemethoden die Helligkeitswerte in den Bilderstapeln nie absolut betrachtet werden, sondern ausschließlich relativ (i.d.R. Vergleich Wildtyp - L7En-2), hat die Anpassung der Detektionsparameter an die Signalstärke auch keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

#### 2.3.8.2 Digitale Mikrofotografie

Mikroskop: Axioskop 2 MOT Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, D); Objektive: 2,5x (Luft, NA:0,075), 5x (Luft NA: 0,15), 10x (Luft, NA:0,3), 20x (Luft, NA: 0,5), 40x (Luft, NA: 0,75), 100x (Öl, NA1,3); Lichtquellen: HAL 100 und HBO 100 (Zeiss, Oberkochen); Filtersets: BP365/FT395/LP397, BP546/FT580/LP590, 470/20/FT493/505-530

Kamera für Durchlicht: DT5 (Olympus, Hamburg, D) mit analySIS 5.0 (SIS, Münster, D)

Kamera für Fluoreszenz: MicroMAX Digital CCD Kamerasystem mit Metamorph 4.6r9 (Visitron Systems GmbH, Puchheim, D)

Die Bilder einer Serie, die zusammen ausgewertet wurden, wurden immer mit denselben Beleuchtungs- und Kameraparametern und mit derselben Vergrößerung und Auflösung aufgenommen.

#### 2.3.8.3 Visuelle Erfassung von Daten anhand mikroskopischer Präparate

Mikroskop: wie 2.3.8.2 oder Orthoplan (Leitz, Wetzlar, D); Objektive: 2,5x (Luft, NA:0,08), 4x (Luft, NA:0,1), 10x (Luft, NA:0,25), 25x (Luft, NA:0,5), 40x (Luft, NA:0,65)

Quantitative Auswertungen erfordern in vielen Fällen das Auszählen struktureller Merkmale. Da diese Zählungen über einen längeren Zeitraum erfolgen, wurden hierfür i.d.R. Dauerpräparate angefertigt. Für die Auszählung wurden dann die Präparate nicht einzeln aufgenommen, sondern nur die Ergebnisse dokumentiert.

#### 2.3.8.4 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskop: EM 910 mit integrierter SSCCD Kamera (1k•1k) (Zeiss, Oberkochen) und ITEM Software (SIS, Münster)

Die Aufnahmen der elektronenmikroskopischen Präparate wurden von PD Dr. Andreas Miething gemacht. Es handelte sich um von der ITEM Software erstellte, automatisch



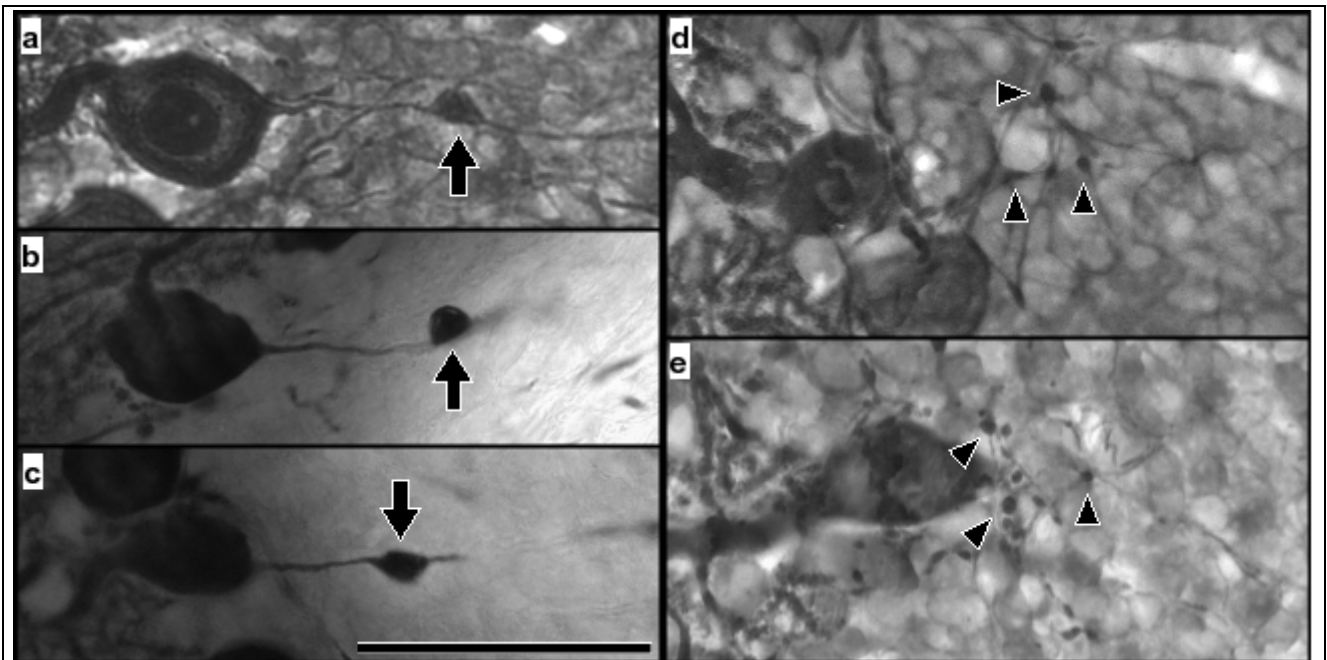


Abbildung 2.4: Axonale Torpedos von Purkinjezellen: a - c: Beispiele für axonale Torpedos (Pfeile, a: Wildtyp, P15, b/c: L7En-2, adult); d/e: Beispiele für den *Plexus infraganglionaris* (hier ventraler Lobus 9), dessen synaptische Boutons (Pfeilspitzen) nicht mit Torpedos verwechselt werden dürfen (d: Wildtyp, P15, e: L7En-2, P15). Mit DAB gegen Calbindin-D28k immungefärbte Präparate; Orientierung: links Molekularschicht, rechts Körnerzellschicht; Balken: 50µm.

zusammengesetzte Aufnahmen von Einzelbildern. Von der Software nicht passgenau zusammengesetzte Bilder wurden in GIMP (siehe 2.3.10.1) von Hand nachkorrigiert.

### 2.3.9 Visuelle Auswertung von Präparaten

#### 2.3.9.1 Auszählen axonaler Torpedos von Purkinjezellen

Es wurden Geschwisterpaare untersucht, von denen je ein Tier transgen und eines nicht transgen war. Von jedem Tier wurden 10 - 20 Sagittalschnitte aus dem vermalen und paravermalen Bereich ausgezählt; es handelte sich dabei um mit DAB gegen Calbindin-D28k angefärbte Paraffinschnitte. Es wurde für jeden Schnitt die Anzahl der Torpedos ermittelt und dann über die Schnitte eines Gehirns der Mittelwert pro Schnitt errechnet. Als Torpedo wurden die Auftreibungen der Axone gewertet,

- bei denen beidseitig ein Übergang in ein normales Axon erkennbar war, um Verwechslungen mit seitlich angeschnittenen, ektopischen Purkinjezellen zu vermeiden.
- die mindestens den 5-fachen Durchmesser des Axons hatten; die Kollateralen von Purkinjezellaxonen besitzen häufig dicht aneinandergereihte Synapsen (siehe auch Abbildung 2.4) und die Axone von absterbenden Purkinjezellen bilden oft

Präparationsalter Läsion nach DIV Kulturrende nach DIV Genotyp	0		0		0		0		0	
	wt	en	wt	en	wt	en	wt	en	wt	en
	4 (10)	5 (13)	6 (13)	3 (12)	1 (9)	2 (10)	4 (9)	3 (8)	6 (11)	6 (13)
ausgewertete Kulturen (von insgesamt präparierten)		4 (11)	2 (14)	5 (12)	5 (14)	4 (14)			6 (13)	2 (11)
			4 (13)		4 (12)	3 (13)				
					3 (13)	5 (12)				
					6 (11)	5 (12)				
				4 (12)	5 (13)					

Tabelle 2.7: Fallzahlen für die in vitro Läsionen an Purkinjenzellaxonen: jedes Zahlenpaar x(y) repräsentiert jeweils ein präpariertes Tier, bei Tieren aus getrennten Würfen sind die Zahlenpaare durch waagerechte Striche getrennt (nur bei 10 Tagen Kulturdauer).

perlschnurartige Auftreibungen; beide Strukturen besitzen aber einen Durchmesser, der i.d.R. maximal dem 3-fachen Durchmesser des Axons entspricht.

### 2.3.9.2 Regeneration von läsionierten Purkinjenzellaxonen in vitro

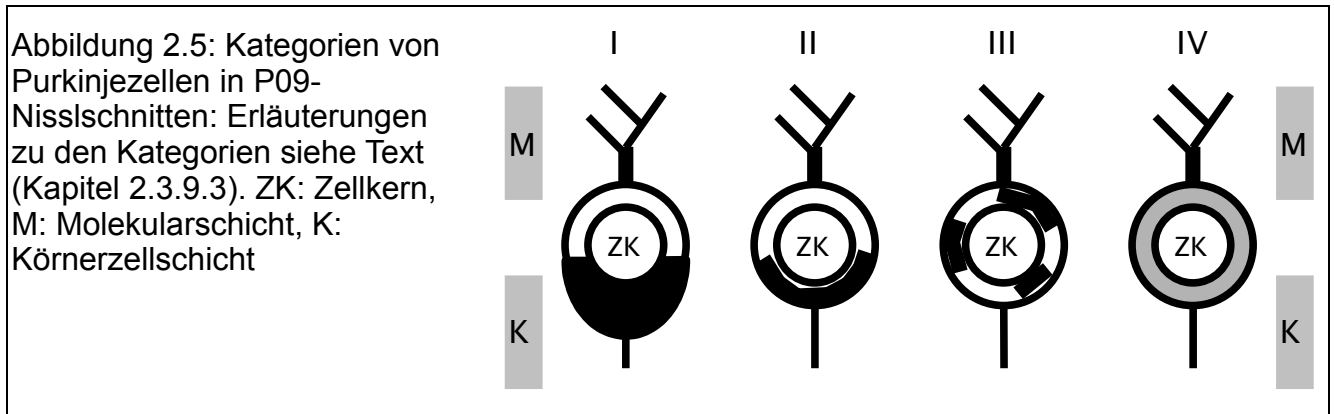
Es wurden nur Kulturen ausgewertet, bei denen die Läsionsstrecke eindeutig zugeordnet werden konnte. Tabelle 2.7 gibt einen Überblick, wieviele Kulturen pro Altersstufe ausgewertet wurden. Bei der Lokalisation der Läsion dienten die in 2.3.2.2 erwähnten Faserstücke als grober Anhalt, die genaue Läsionsstrecke lässt sich mit etwas Erfahrung anhand zusätzlicher Parameter rekonstruieren:

- Bei nicht läsionierten Schnitten stellen sich die tiefen Kerne immer als zusammenhängendes Konglomerat dar, sind in läsionierten Kulturen zwei getrennte Konglomerate erkennbar, ist dies ein sicherer Hinweis, dass die Läsion zwischen diesen verläuft.
- Besonders bei den jüngeren Altersstadien kann man den Bereich der Läsion beim durchfokussieren daran erkennen, dass das Gewebe hier Aufwölbungen aufweist.
- Bei den mit Hämalaun gegengefärbten Kulturen befinden sich entlang der Läsionsstrecke deutlich mehr pyknotische Kerne als auf dem Rest des Schnittes.
- Der Rand der Kulturen ist im Bereich der Läsion oft unregelmäßiger geformt und es gibt hier mehr aus dem Schnitt ausgewanderte Zellen als im restlichen Randbereich.

### 2.3.9.3 Verteilung der Nissl-Substanz in Purkinjenzellen von P09-Tieren

Entsprechend dem Verteilungsmuster der Nisslsubstanz in den Purkinjenzellen wurden die Zellen einer von 4 Kategorien zugeordnet (siehe auch Abbildung 2.5):

- I. Purkinjenzellen, an deren axonalem Pol sich eine Vorwölbung mit einer massiven Akkumulation von Nisslsubstanz befindet.
- II. Purkinjenzellen, bei denen die Nisslsubstanz auf der dem axonalen Pol zugewandten Seite des Cytoplasmas akkumuliert ist, aber nicht innerhalb einer Vorwölbung.




III. Purkinjezellen mit Akkumulationen von Nisslsubstanz, die sich aber nicht auf der dem axonalen Pol zugewandten Seite des Cytoplasmas konzentrieren.


IV. Purkinjezellen mit diffus verteilter Nisslsubstanz im Cytoplasma.


### 2.3.10 Auswertung von digitalem Bildmaterial

#### 2.3.10.1 Prozessierung der Bilddaten

Bei fluoreszenten Bildern, besonders bei hochauflösenden konfokalen Bilderstapeln, tritt das Problem der chromatischen Verschiebung auf, d.h. die einzelnen Farbkanäle sind gegeneinander in den 3 Raumrichtungen verschoben [82]. Daher wurden die konfokalen Bilderstapel, welche der Untersuchung der Lokalisation subzellulärer Strukturen dienen, in Bezug auf die Wellenlängenverschiebungen zwischen den einzelnen Kanälen in allen 3 Raumrichtungen korrigiert, außer wenn z-Projektionen ausgewertet wurden. In letzterem Fall wurde wie bei den konventionellen Fluoreszenzbildern nur in x-y-Richtung korrigiert.

Zur Bildbearbeitung und -vermessung diene in erster Linie das Programm ImageJ  (Version 1.34s, Projektleiter: Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA; frei erhältlich über [rsb.info.nih.gov/ij/](http://rsb.info.nih.gov/ij/)) mit dem WCIF-PlugIn-Paket (Projektleiter: Tony Collins, Wright Cell Imaging Facility, Toronto, Canada; frei erhältlich über [www.uhnres.utoronto.ca/facilities/wcif/](http://www.uhnres.utoronto.ca/facilities/wcif/)), die weiter unten erwähnten Plugins sind in diesem Paket enthalten, soweit nicht anders angegeben. ImageJ wird für viele Anwendungen im Bereich der biomedizinischen Bildauswertung als plattformunabhängige Standardsoftware eingesetzt [83].

Für einige Aufgaben wurde das Bildbearbeitungsprogramm GIMP  verwendet (GNU Image Manipulation Program, Version 2.2, frei erhältlich über [www.gimp.org](http://www.gimp.org), plattformunabhängig).

Die statistische Auswertung wurde mit OpenOffice.org 1.1 bzw. 2.0  (frei erhältlich über [www.openoffice.org](http://www.openoffice.org), plattformunabhängig) durchgeführt.

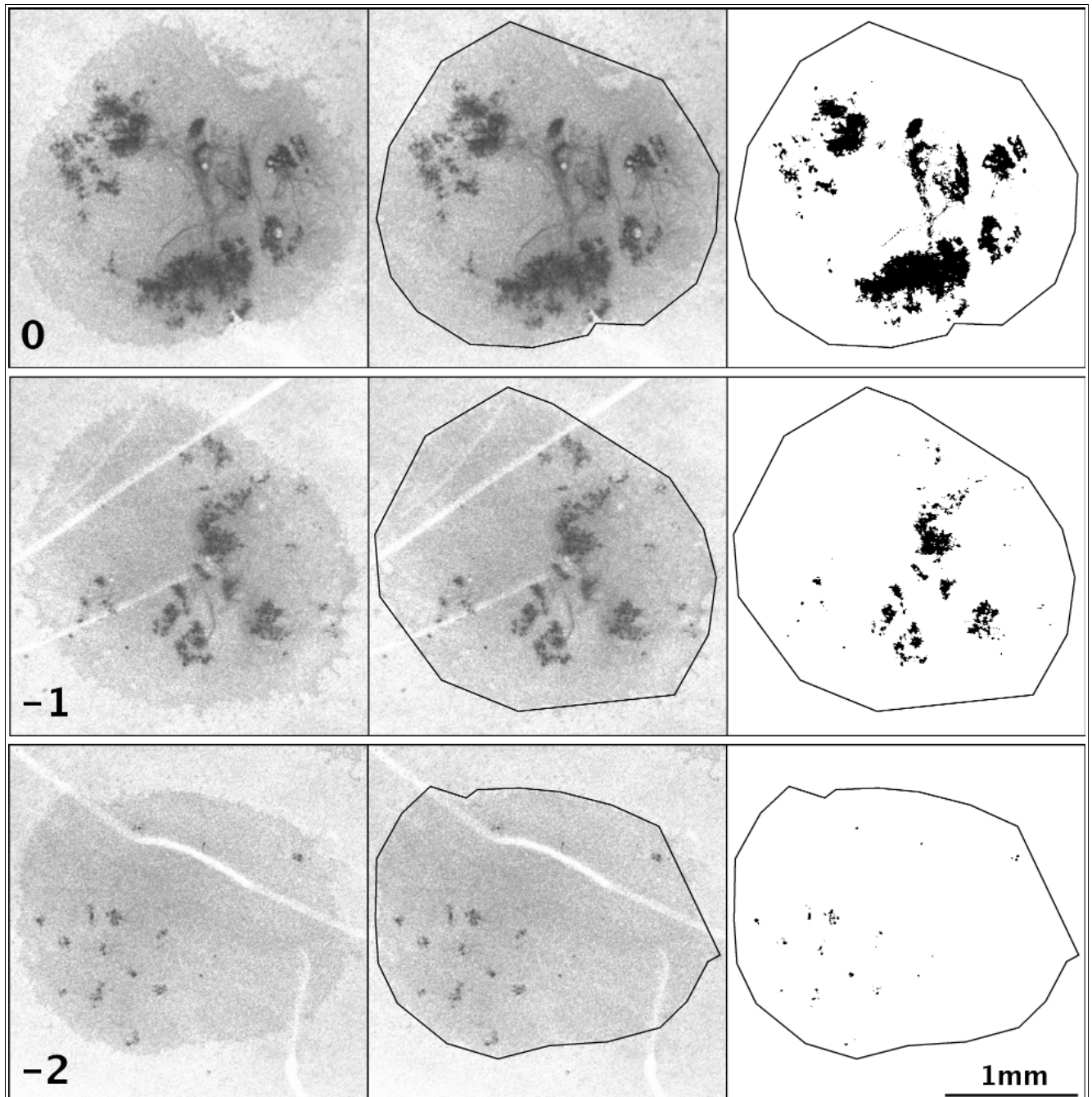


Abbildung 2.6) Bildverarbeitungsprozess bei der Ermittlung der Überlebensrate von Purkinjezellen in cerebellären Schnittkulturen, von links: Originalbild (als 8-bit-Grauwert), daneben dasselbe mit markierter ROI (mit „segmented line“-Werkzeug gezeichnet), rechts als 1-bit-Bild nach Bestimmung des Helligkeitsgrenzwertes; von oben nach unten ist je ein Beispiel für jede Gruppen (0, -1, -2) dargestellt.

### 2.3.10.2 Erfassung der Überlebensrate von Purkinjezellen in cerebellären Schnittkulturen

Zur Erfassung der Überlebensrate von Purkinjezellen in cerebellären Schnittkulturen wurden die Kulturen als Ganzes fotografiert. Die Purkinjezellen in den Kulturen waren mit DAB gegen Calbindin-D28k immunhistochemisch fluoreszent angefärbt, ausserdem waren die Kulturen mit Mayers Hämalaun gegengefärbt (nach [78]). Für die vergleichenden Untersuchungen wurden immer Schnittkulturen verwendet, die

- von 2 Tieren aus demselben Wurf stammten, um die Einflüsse genetischer Variabilität und unterschiedlicher Tierhaltungsbedingungen<sup>9</sup> gering zu halten.
- in derselben Präparation in Kultur genommen worden waren, um Einflüsse unterschiedlicher Präparations- und Kulturbedingungen auszuschließen.
- in demselben (immun-)histochemischen Färbeprozess bearbeitet wurden, um Unterschiede in der Färbequalität zu minimieren.

Die Aufnahmen wurden für die Präparate einer vergleichenden Untersuchung immer mit demselben Objektiv, mit derselben Beleuchtungsstärke und Belichtungszeit aufgenommen. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit ImageJ. Zunächst wurde ein Schnitt mit einer Linie umfahren und die Grösse der so erhaltene „region of interest“ (ROI) in Pixeln ausgemessen. Anschließend wurde ein Helligkeitsgrenzwert so festgelegt, dass die mit DAB angefärbten Purkinjezellen in Schwarz vor einem weissen Hintergrund hervorgehoben wurden<sup>10</sup> und die Anzahl der in der ROI befindlichen schwarzen Pixel wurde gemessen (siehe auch Abbildung 2.6). Der Quotient aus der Anzahl der schwarzen Pixeln und der Gesamtanzahl der Pixel in einer ROI wurde als Maßzahl für die Überlebensrate verwendet. Die Schnitte wurden anschließend anhand des dekadischen Logarithmus des Quotienten in 3 Gruppen eingeteilt. Der Wert des Logarithmus gibt dabei die Obergrenze des Quotienten in der jeweiligen Gruppe an:

- 2: alle Schnitte mit einem Quotienten kleiner 0,01 > kaum überlebende Zellen.
- 1: alle Schnitte mit einem Quotienten zwischen 0,01 und 0,1 > einige überlebende Zellen.
- 0: alle Schnitte mit einem Quotienten zwischen 0,1 und 1 > viele überlebende Zellen.

### 2.3.10.3 Ausmessen des proximalen Axonabschnitts von Purkinjezellen in Schnittkulturen

Es wurden Purkinjezellen aus P00-Schnittkulturen untersucht, die gegen Calbindin-D28k immunhistochemisch angefärbt waren. In konfokalen Aufnahmen wurde der proximale Axonanteil dieser Zellen vermessen. Hierbei fanden nur Aufnahmen von Zellen Verwendung, bei denen das Axon das Soma parallel zu den aufgenommenen Bildebenen verläßt und in seinem weiteren (relevanten) Verlauf nicht stark nach oben oder unten abknickt.

Die Purkinjezellen wurden mit einer Voxel-Auflösung ( $x*y*z$ ) von  $0,4\mu\text{m}*0,4\mu\text{m}*0,5\mu\text{m}$  aufgenommen. Die aufgenommenen Bilderstapel wurden mit der "Average"-Funktion von LCS auf eine Bildebene projiziert. In wenigen Fällen wurde bei besonders schwach gefärbten Zellen alternativ die "Maximum"-Funktion gewählt, wenn das dadurch erhaltene Bild eher dem im Mikroskop gesehenen entsprach.

<sup>9</sup> z.B. entwickeln sich Tiere aus unterschiedlich grossen Würfen z.T. unterschiedlich schnell

<sup>10</sup> Da die Bedingungen für Präparation, Kultur, Färbung und Aufnahme bei einer vergleichenden Untersuchung möglichst invariabel gehalten wurden (s.o.), konnten die entsprechenden Schnitte immer mit demselben Grenzwert ausgewertet werden.

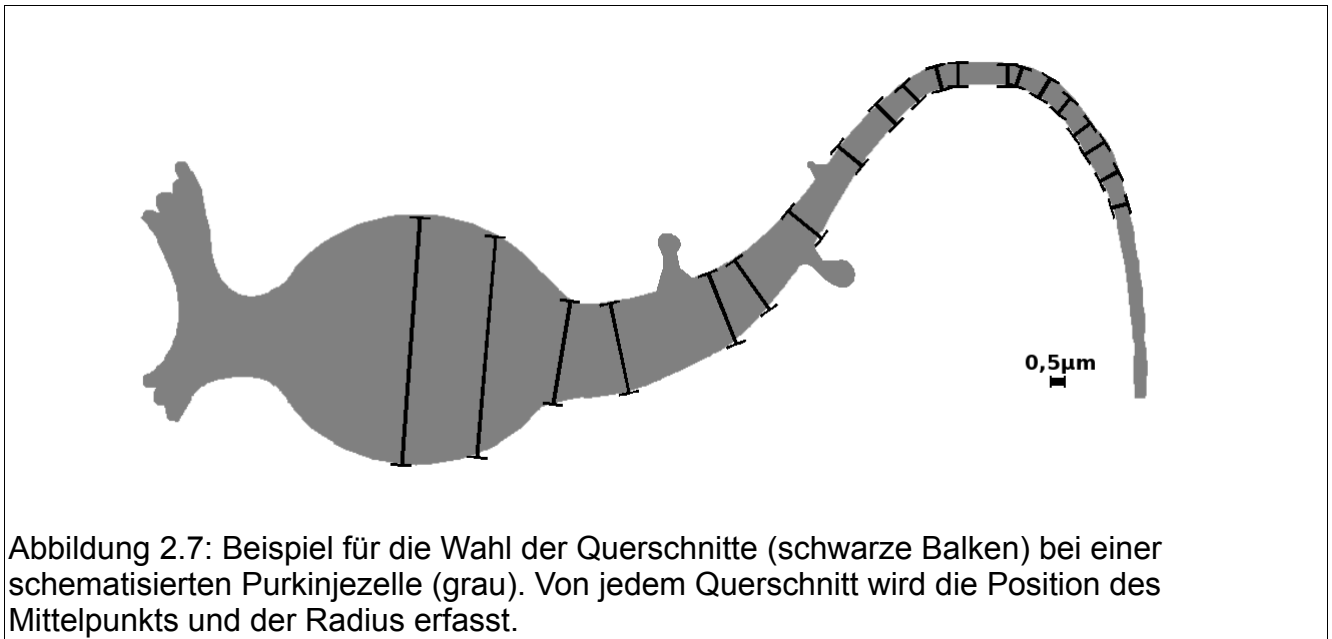


Abbildung 2.7: Beispiel für die Wahl der Querschnitte (schwarze Balken) bei einer schematisierten Purkinjezelle (grau). Von jedem Querschnitt wird die Position des Mittelpunkts und der Radius erfasst.

Die Zellen wurden mithilfe des Neuron\_Morpho-PlugIns von ImageJ vermessen (Neuron\_Morpho 1.1.5 von Giampaolo D'Alessandro, Southampton, UK; frei erhältlich über [rsb.info.nih.gov/ij/](http://rsb.info.nih.gov/ij/).html). Entlang des verdickten Abschnitts wurden nach folgenden Regeln Querschnitte gelegt (siehe auch Abbildung 2.7):

- Als verdickt wurde der Teil des Axons bezeichnet, der bei der beschriebenen Bildaquisition einen Durchmesser grösser als 1 Pixel (ca. 0,6 µm) aufwies.
- Der erste Querschnitt wurde senkrecht zur Achse des abgehenden Axons durch das Soma gelegt.
- Der letzte Querschnitt wurde an der Stelle des Axons gelegt, an welcher das Axon nicht mehr verdickt (also im Durchmesser 0,5 µm oder kleiner) war und im weiteren Verlauf des Axons, sofern dieser über mindestens 10 µm weiterverfolgbar war, auch keine Vergrößerung des Durchmessers auf mehr als 0,6 µm mehr aufwies.
- Zwischen dem ersten und dem letzten Querschnitt wurden weitere eingefügt. Die Stellen hierfür wurden so gewählt, dass durch Verbinden der äußeren Enden der Querschnittslinien die Querschnittsfläche des proximalen, verdickten Axonabschnitts möglichst genau begrenzt wurde.
- Seitliche Protrusionen wurden nicht berücksichtigt.

Das Programm gibt für jede vermessene Zelle eine Tabelle aus, die für jeden Querschnitt dessen Radius und den Mittelpunkt als xy-Koordinaten angibt. Daraus wurden folgende Größen berechnet:

- Durchmesser des Soma: der Wert für den Radius des ersten Querschnittes (s.o.) wurde verdoppelt.

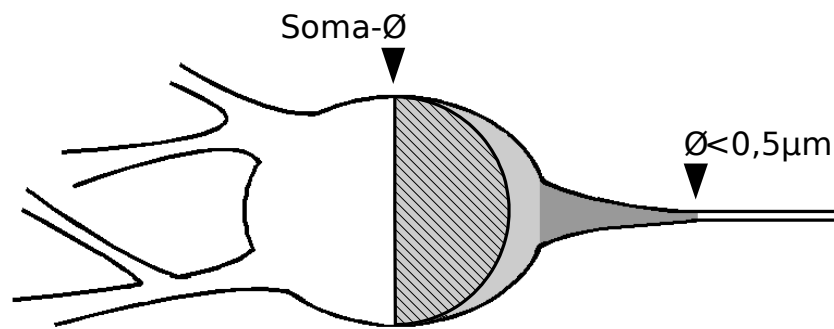


Abbildung 2.8: Berechnung der Fläche und des durchschnittlichen Durchmessers der proximalen Anteile der Purkinjezellaxone (siehe auch Kapitel 2.3.10.3 und Fußnote auf Seite 37): von der aus den Querschnitten berechneten Gesamtfläche (grau) wird ein aus dem Somadurchmesser berechneter Halbkreis (schraffiert) abgezogen; die verbleibende Fläche ist eine gute Näherung an die tatsächliche Fläche des verdickten Axonabschnittes (dunkelgrau).

- Länge des proximalen, verdickten Axonabschnittes: Summe der Längen der gemessenen Einzelabschnitte abzüglich des Radius des Soma; die Längen der Einzelabschnitte lassen sich aus den xy-Koordinaten der Mittelpunkte der markierten Querschnitte (s.o.) berechnen
- Querschnittsfläche des proximalen, verdickten Axonabschnittes: die Längen der Einzelabschnitte multipliziert mit dem mittleren Durchmesser auf dem jeweiligen Abschnitt ergeben Querschnittsflächen der Einzelabschnitte des als gestreckt angenommenen proximalen, verdickten Axonabschnittes; aus der Summe dieser Flächen errechnet sich nach Abzug der halben Fläche des Soma (berechnet aus dem Somadurchmesser) die Gesamtquerschnittsfläche des als gestreckt angenommenen proximalen, verdickten Axonabschnittes; diese geteilt durch die Länge des proximalen, verdickten Axonabschnittes (s.o.) ergibt eine gute Annäherung an den durchschnittlichen Durchmesser<sup>11</sup> (siehe auch Abbildung 2.8).

Für die erhaltenen Werteverteilungen der ausgemessenen Wildtyp- und L7En-2-Zellen wurde ein K-S-Test zur Überprüfung der Signifikanz der gefundenen Unterschiede durchgeführt (Erläuterungen zum K-S-Test in Kapitel 2.3.11).

#### 2.3.10.4 Ausmessen der von einem Dendritenbaum umfassten Fläche

Die Flächen, die von den Dendritenbäumen eingefasst werden, wurden in den Aufnahmen vermessen, die auch zum Ausmessen der proximalen, verdickten Axonabschnitte verwendet

<sup>11</sup> Eine gute Annäherung deswegen, weil bei der Berechnung auch Flächen miteinbezogen werden, die nicht direkt dem proximalen, verdickten Axonabschnitt zuzuordnen sind (Abbildung 2.8: hellgrau, nicht schraffiert); der hierdurch entstehende Fehler ist aber relativ gering und größer, je größer das Soma ist. Durch diese Art Fehler wurde die Signifikanz der Ergebnisse (bei L7En-2-Zellen ist das Soma kleiner als in Wildtypzellen, aber das proximale, verdickte Axonabschnitt größer, siehe Ergebnisse) verringert. Da die betroffenen Ergebnisse trotz des Fehlers hoch signifikant waren, wurde der Fehler als vernachlässigbar betrachtet.

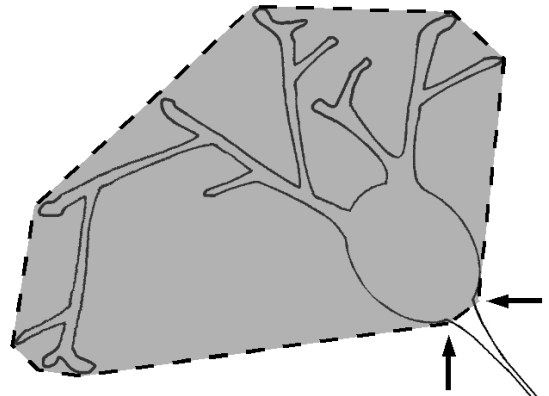


Abbildung 2.9: Ausmessen des Bereiches, der vom Dendritenbaum eingefasst wird: beginnend am senkrechten Pfeil wird der Dendritenbaum entlang der gestrichelten Linie bis zum waagerechten Pfeil umfahren, es ergibt sich die graue Fläche.

wurden. Ausgehend von der Stelle, an der das Axon das Soma verlässt, wurden die äußeren Enden der einzelnen Äste des Dendritenbaumes mit einer Linie verbunden („polygon selections“-Werkzeug in ImageJ), die am Ende wieder mit dem Ausgangspunkt verbunden wurde<sup>12</sup> [84](siehe Abbildung 2.9). Von der auf diese Weise umfahrenen Fläche wurde mithilfe der "Measure"-Funktion von ImageJ die Fläche in Pixeln berechnet. Bei den in  $\mu\text{m}^2$  umgerechneten Werteverteilungen wurde mittels K-S-Test die Signifikanz der Unterschiede überprüft.

#### 2.3.10.5 Einteilung der Purkinjezellen nach Differenzierungsstadien in cerebellären Schnittkulturen aufgrund ihrer Zellmorphologie

Diese Auswertung wurde ebenfalls anhand der Aufnahmen durchgeführt, die auch zum Ausmessen der proximalen, verdickten Axonabschnitte verwendet wurden.

Die Einteilung von Purkinjezellen in Reifestadien anhand morphologischer Parameter erfolgte in Anlehnung an die von Boukhtouche et al. ([45]) beschriebene Methode, die hier kurz skizziert wird (siehe auch Abbildung 2.10):

Stadium I: hierzu wurden Zellen gezählt, die nur einen kurzen unverzweigten Dendriten i.d.R. ohne Spines besitzen, außerdem - und dies im Unterschied zu Boukhtouche et al. - auch Zellen ohne erkennbare Dendriten, die keine morphologischen Charakteristika von apoptotischen Zellen zeigten.

Stadium II: Zellen mit zahlreichen kurzen und unverzweigten Dendriten mit Spines.

Stadium III: Zellen mit mindestens einem verzweigten Dendriten mit Spines; Stadium 3 und 4 nach Boukhtouche et al. wurden zu einem Stadium zusammengefasst, da die

<sup>12</sup> Dies entspricht im Prinzip dem Vorgehen des „convex-hull“-Algorithmus, der in diversen Bildanalyseprogrammen eingesetzt wird, allerdings nicht zwischen Axonen und Dendriten unterscheiden kann.



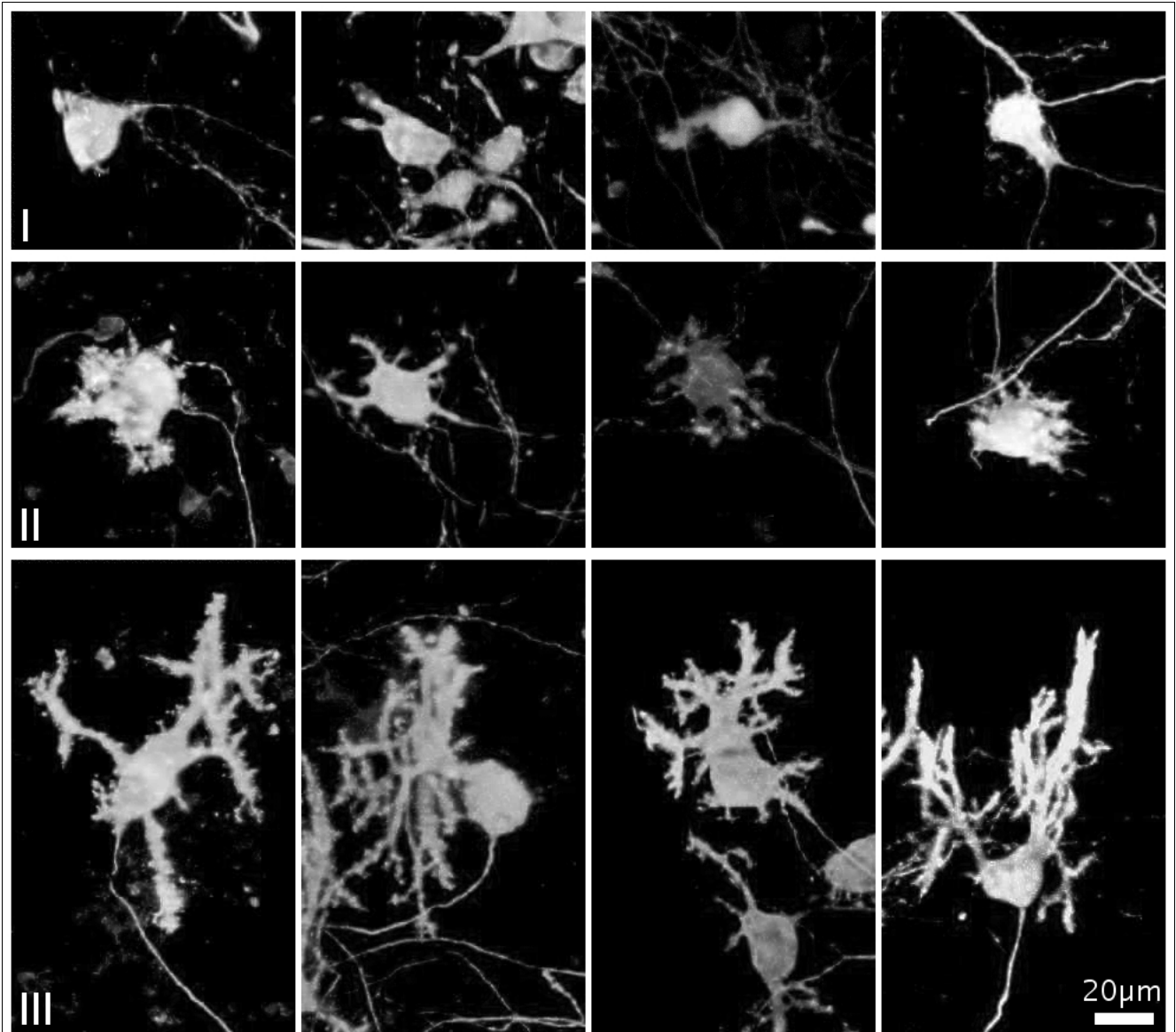


Abbildung 2.10) Beispiele für Purkinjezellen der Stadien I bis III in cerebellären Schnittkulturen: in einer Reihe sind jeweils Zellen desselben morphologischen Differenzierungsstadiums dargestellt. Die beiden linken Bilder in jeder Reihe sind aus Wildtypkulturen, die beiden rechten aus L7En-2-Kulturen.

Dendritenbäume von Purkinjezellen in P00-Schnittkulturen nach meiner Beobachtung unabhängig vom Genotyp oft dazu neigen sich im Raum so zu orientieren, dass eine einwandfreie Unterscheidung zwischen den beiden Stadien (in Stadium 4 haben die Zellen nur noch einen Stammdendriten) selbst in konfokalen Aufnahmen (ausser hochauflösenden) oft nicht möglich ist. Ausserdem, wie in Jankowski et al. [67] diskutiert, zeigen Purkinjezellen in Schnittkulturen oft die Tendenz, auch voll ausdifferenziert mehr als einen Stammdendriten zu besitzen.

Tabelle 2.8: Anzahl der untersuchten Schnitte bei der Klassifizierung von Schnittkulturen anhand der Parvalbuminexpression in Purkinjezellen, aufgeschlüsselt nach Kulturdauer (Alter) und Genotyp (wt: Wildtyp; en: L7En-2)

Alter	Anzahl	
	wt	en
7	14	7
10	11	11
14	8	9
21	6	12

### 2.3.10.6 Einteilung der Purkinjezellen nach Differenzierungsstadien in cerebellären Schnittkulturen aufgrund ihrer Parvalbuminexpression

Es wurden Übersichtsaufnahmen von cerebellären Schnittkulturen untersucht, in denen Parvalbumin und Calbindin-D28k immunhistochemisch fluoreszent markiert waren. Parvalbumin diente hierbei als Marker für die Purkinjezellendifferenzierung [67], Calbindin als Gegenfärbung, um die Gesamtheit der Purkinjezellen unabhängig von ihrem Differenzierungsgrad darzustellen.

Es wurden jeweils die Purkinjezellen und die Parvalbuminexpression auf einem gesamten Schnitt betrachtet und dann Punkte in folgenden Kategorien vergeben (Beispiel siehe Abbildung 6.1):

- Parvalbuminexpression im Soma
- Parvalbuminexpression in den Dendriten
- Parvalbuminexpression im Axon

Es wurden in jeder Kategorie 0 - 3 Punkte vergeben und zwar nach folgendem Schema:

0 - trifft auf keine Purkinjezelle zu

1 - trifft auf weniger als 1/3 der Purkinjezellen zu

2 - trifft auf mehr als 1/3 aber auf weniger als 2/3 der Purkinjezellen zu

3 - trifft auf mehr als 2/3 der Purkinjezellen zu

Aus den Punktzahlen aller Schnitte derselben Altersstufe und desselben Genotyps wurde der Median gebildet, sowohl für die Punktzahl insgesamt als auch für die Punktzahlen der einzelnen Zellkompartimente (Soma, Dendrit, Axon). Der Median wurde hier als die bei geringer Probengrösse (siehe Tabelle 2.8) aussagekräftigere Masszahl gegenüber dem Mittelwert gewählt.

### 2.3.10.7 Kolokalisationsanalyse

Es wurden dieselben Aufnahmen ausgewertet, die in 2.3.10.6 beschrieben wurden, da zu dem Zeitpunkt dieser Versuche noch kein konfokales Mikroskop zur Verfügung stand. Um eine Kolokalisation zweifelsfrei nachzuweisen sind Durchlichtaufnahmen aber nur eingeschränkt geeignet [85]. Daher wurden nachträglich konfokale Aufnahmen von Stichproben aus 2 Altersstufen (10 und 14 DIV) angefertigt und ebenfalls ausgewertet.

Die Aufnahmen wurden mit dem „Manders Coefficients“-Plugin von ImageJ ausgewertet. Das Programm gibt für zwei 8-bit Grauwertbilder (je eins für jeden Kanal) eine Tabelle und 2 Streudiagramme aus. In der Tabelle werden sowohl der Korrelationskoeffizient nach Pearson als auch der Überlappungskoeffizient nach Manders, sowie die Kolokalisationskoeffizienten  $M_1$  und  $M_2$  nach Manders ausgegeben. Ein Streudiagramm stellt die Farbverteilung dar, in dem anderen ist die Häufigkeit von bestimmten Farbwerten helligkeitskodiert dargestellt. Wegen der besseren Anschaulichkeit wurde bei den Streudiagrammen im Anhang die Überlagerung der beiden gewählt (Abbildung 6.4). Als ausschlaggebendes Maß für die Kolokalisation wurde der Kolokalisationskoeffizient  $M$  gewählt. Dieser liefert aus folgenden Gründen die für die Interpretation der Daten brauchbarsten Werte [85][86]:

- Der Korrelationskoeffizient nach Pearson bewertet die Ähnlichkeit zweier Bilder, wobei die Signalintensität nicht berücksichtigt wird; er ist bei der Mustererkennung hilfreich, aber weniger zur Kolokalisationsanalyse geeignet.
- Der Überlappungskoeffizient nach Manders ist relativ anfällig für starke Unterschiede in der Anzahl der gefärbten Pixel; in den ausgewerteten Bildern war die Anzahl der gefärbten Pixel in den zu vergleichenden Kanälen aber i.d.R. sehr unterschiedlich.
- Der Kolokalisationskoeffizient  $M$  stellt die Kolokalisation zweier Kanäle in einem Bild bezogen auf die Gesamtheit der in einem der Kanäle gefärbten Pixel dar, eine sinnvolle Wahl des Bezugskanals ergibt sich aus der jeweiligen Fragestellung; der Koeffizient ist unempfindlich gegenüber unterschiedlichen Färbeintensitäten (Beispiel siehe Abbildung 6.1).

Bei den Auswertungen der Durchlichtaufnahmen wurden jeweils sämtliche Bilder eines Genotyps und Alters zu einem Stapel zusammengefasst und als Ganzes berechnet, daher liegen zu dieser Auswertung keine Angaben über die Streuung der Werte vor.

#### 2.3.10.8 Erfassung des Myelinisierungsgrades von cerebellären Schnittkulturen

Es wurden Schnittkulturen ausgewertet, die gegen MBP und CaBP fluoreszent immunhistochemisch angefärbt waren. Es wurden konfokale Stapel von den ganzen Schnitten aufgenommen und diese mit der „Average“-Funktion der LCS-Software übereinanderprojiziert. Die so erhaltenen Bilder wurden auf 2 Weisen untersucht:

Messen: Es wurde der Quotient gebildet aus der myelinisierten Fläche und der Gesamtfläche des Schnittes. Als myelinisierte Fläche wurde die Fläche als ROI markiert, auf der gegen MBP immunhistochemisch angefärbte Internodienpakete erkennbar waren. Da in fluoreszenten Aufnahmen die Grenzen eines Schnittes in der Regel nicht erkennbar sind, wurde als Gesamtfläche die Fläche als ROI markiert, auf

der gegen CaBP immunhistochemisch angefärbte Purkinjezellen erkennbar waren (Beispiel siehe Abbildung 6.2).

Zählen: Es wurden die gegen MBP immunhistochemisch angefärbten Internodienpakete pro Schnitt gezählt (Beispiel siehe Abbildung 6.2); anhand der Anzahl der gezählten Pakete wurden die Schnitte einer von 3 Gruppen zugeordnet (<15, 15-20, >20). Diese Methode erscheint auf den ersten Blick sehr ungenau und subjektiv, vor allem in den Bereichen starker Myelinisierung, in denen die Internodienpakete überlappen<sup>13</sup>. Trotz der möglichen Ungenauigkeiten wurde auf diese Methode zurückgegriffen, da mit dieser Methode erhaltene Ergebnisse in renommierten Fachzeitschriften veröffentlicht wurden und die Gelegenheit bestand diese Methode in der Arbeitsgruppe von Isabel Dusart zu erlernen (PROCOPE-Austauschprogramm 2003, D/0205705) [19][5].

#### 2.3.10.9 Ermittlung der Dichte des *Plexus infraganglionaris*

Zur Quantifizierung des aus den Kollateralen der Purkinjezellaxone gebildeten *Plexus infraganglionaris* ist in der Literatur bisher keine Methode beschrieben worden.

Mit DAB gegen Calbindin gefärbte Vibratomschnitte wurden im konfokalen Mikroskop mit den Einstellungen für die Durchlichtdetektion aufgenommen. Aus den aufgenommenen Bilderstapeln wurde jeweils ein Stapel von 15 Bildern für die weitere Auswertung ausgewählt. Dies entspricht bei einem Ebenenabstand von 0,5 µm einer Tiefe von 7µm. Die Stapel wurden so ausgewählt, dass in allen Stapeln ein vergleichbarer Fokusbereich im Präparat dargestellt wurde, also nicht der bei der Aufnahme objektivferne Bereich, der bei dieser Aufnahmetechnik weniger scharf abgebildet wird, aber auch nicht die Präparatoberfläche, wo die Hintergrundfärbung i.d.R. deutlich stärker ist und wo DAB-Präzipitate abgelagert sein können. Aus diesen Stapeln wurden wiederum Boxen ausgeschnitten, deren oberer Rand vom Unterrand der Purkinjezellschicht gebildet wurde. Die Boxen waren 60 µm hoch und ein ganzzahliges Vielfaches von 20 µm breit (Abbildung 6.3b). Die Areale für die Boxen wurden folgendermassen ausgewählt (siehe auch Abbildung 6.3a):

- Die am Oberrand der Box liegenden Purkinjezellen liegen im Bereich der Box alle in einer geraden Reihe und tangieren möglichst alle den Rand der Box (letzteres ist bei L7En-2 Tieren schwieriger, da die Bildung der Einzelzellschicht verzögert ist [67], siehe auch 1.3).

---

<sup>13</sup> Um eine gewisse Einheitlichkeit der Bewertungskriterien zu gewährleisten wurden die Zählungen für eine Altersstufe „in einem Aufwasch“ gemacht, also ohne Pause. Ausserdem wurden die Bilddateien von Wildtyp und L7En-2 bei den Zählungen gemischt ausgewertet.

- Der Abstand zwischen Purkinjezellschicht und weisser Substanz ist im Bereich der Box grösser als 60  $\mu\text{m}$ , sodass ausschließlich in der Körnerzellschicht liegende Axone erfasst werden.
- Die Boxen überschneiden sich nicht.

Die Boxen wurden dann in Streifen von 60 $\mu\text{m}$  Höhe und 20 $\mu\text{m}$  Breite eingeteilt. Auf einer Projektion des Streifens („Stack Focuser“-Plugin von ImageJ) wurden alle Purkinjezellaxone und deren Kollateralen als Linie kartiert<sup>14</sup>, die im Bereich des Streifens im Fokus lagen (Abbildung 6.3c). Dabei diente die Projektion nur als Orientierungshilfe, entscheidend für die Kartierung einer Struktur war deren Erscheinungsbild im Bilderstapel des Streifens. Von dem so erhaltenen Linienmuster wurden anschließend die Pixel ausgezählt. Dabei wurde getrennt nach oberem (direkt unter der Purkinjezellschicht liegendem), mittlerem und unterem (an der weissen Substanz liegendem) Abschnitt des Streifens (Abbildung 6.3d).

Auf die geschilderte Weise werden die Axone und Axonkollateralen in einem Areal der Grösse 20  $\mu\text{m}$  x 20  $\mu\text{m}$  x 7  $\mu\text{m}$  unabhängig von ihrer Stärke erfasst. Die Dichte der Purkinjezellen selbst - und damit die Dichte ihrer Hauptaxone – ist in Wildtyp- und L7En-2 Tieren in vergleichbaren Regionen nahezu gleich (18-21 $\mu\text{m}$  Zellabstand, eigene Messung in den untersuchten Aufnahmen). Daher sind Änderungen in der Dichte der hier erfassten Fasern ausschließlich auf Veränderungen in der Quantität von Axonkollateralen zurückzuführen. Die hier geschilderte Methode ist damit geeignet, Vergleiche der Dichte des *Plexus infraganglionaris* durchzuführen.

#### 2.3.10.10 Vergleich der Immunreaktivität von Antigenen am axonalen und dendritischen Pol von Purkinjezellen

Die Untersuchungen wurden an konfokalen Bilderstapeln vorgenommen, bei denen das untersuchte Antigen so gefärbt war, dass es im Grünkanal detektiert wurde, während im Rotkanal die gegen CaBP gegengefärbten Purkinjezellen detektiert wurden. Bei den untersuchten Somata wurde jeweils nahe dem Axonabgang und nahe dem Abgang des Stammdendriten ein immer gleich grosses, kreisförmiges Areal von 10 Pixel Durchmesser festgelegt. In diesem wurde mit Hilfe des „Measure“-Werkzeuges von ImageJ die Helligkeit beider Kanäle in den beiden Arealen gemessen. Um Unterschiede in der Gesamthelligkeit auszugleichen wurden die Werte in jedem Areal in Relation zur CaBP-IR gesetzt. Aus den daraus erhaltenen Werten wurde dann der Quotient aus der Helligkeit am dendritischen Pol

---

<sup>14</sup> Dies geschah auf einer zusätzlichen transparenten Bildebene in GIMP, sodass die markierten Linien naher einfach isoliert werden konnten.

und der Helligkeit am axonalen Pol berechnet. Zur Erläuterung siehe auch Abbildung 6.14

und folgende Formel: 
$$\frac{(Dendrit_{grün} / Dendrit_{rot})}{(Axon_{grün} / Axon_{rot})} .$$

### 2.3.10.11 3D-Rekonstruktion von konfokalen Bilderstapeln

Es wurden Bilderstapel verwendet, die mit 0,5 Airy aufgenommen wurden. Diese Stapel wurden mit dem SurfaceJ-Plugin von ImageJ bearbeitet. Dabei werden die Grenzflächen zwischen gefärbten und nicht-gefärbten Bereichen in Abhängigkeit vom Abstand zur Grenzfläche farblich codiert, sodass man durch Isolierung des Blaukanals die äußere Hülle eines gefärbten Bereiches erhält. So kann z.B. von einer komplett CaBP-immunreaktiven Purkinjezelle die Zelloberfläche dargestellt werden. Der von SurfaceJ berechnete Bilderstapel wurde anschließend mit dem VolumeViewer-Plugin von ImageJ 3D-rekonstruiert. Da bei diesen Bildern der Abbildungsmaßstab in verschiedenen Regionen des Bildes unterschiedlich ist, ist die Verwendung eines Maßstabsbalkens hier wenig sinnvoll. Bei den entsprechenden Abbildungen werden daher relative Angaben gemacht.

## 2.3.11 Statistische Methoden

### 2.3.11.1 Signifikanztests

In der Regel wurde bei Untersuchungen, in denen die Signifikanz des Unterschiedes zwischen zwei Mittelwerten bzw. zwischen zwei Verteilungen gezeigt werden sollte, der Kolmogoroff-Smirnoff-Test (K-S-Test) als Methode der Wahl durchgeführt. Dies geschah aus folgenden Gründen:

- Es lagen unabhängige Stichproben vor.
- Im Gegensatz zum t-Test kann der K-S-Test auch angewendet werden, wenn die zu vergleichenden Wertemengen nicht normalverteilt sind.
- Im Gegensatz zum U-Test kann der K-S-Test auch angewendet werden, wenn die Probengrößen der zu vergleichenden Wertemengen ungleich groß sind.
- Der K-S-Test gilt als schärfster Homogenitätstest [87]. Das heisst, selbst wenn z.B. Mittelwerte und Standardabweichungen zweier Wertemengen sehr ähnlich sind, können mit dem K-S-Test eventuell vorhandene Unterschiede in der Verteilungsfunktion aufgespürt werden.

Die genaue Durchführung ist in [87] beschrieben. Der Test überprüft, ob zwei Wertemengen bei einer tolerierten Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  einer Grundgesamtheit angehören. Hierbei muss ein von den Werteverteilungen abhängiges  $\hat{D}$  grösser sein, als ein von  $\alpha$  abhängiges

$D_\alpha$ , um zu zeigen, dass die gezeigten Unterschiede zwischen den Wertemengen bei der gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit signifikant sind. Die Ergebnisse sind in der Form  $\hat{D} > D_\alpha$  für  $\alpha=x$  angegeben, wobei der für die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  angegebene Wert  $x$  hier dem Signifikanzniveau des Unterschiedes der Wertemengen entspricht.

In Einzelfällen wurde, wenn die entsprechenden Voraussetzungen erfüllt waren, der t-Test zur Überprüfung der Signifikanz von Verteilungsunterschieden angewandt.

#### 2.3.11.2 Angabe von Mittelwert oder Median

Bei einigen Ergebnissen sind die Angaben von Mittelwerten mit den dazugehörigen Standardabweichungen bzw. SEM (standard error of the mean, Standardabweichung des Mittelwertes) weggelassen, da die Angabe dieser Werte nur bei zumindest annähernd normalverteilten Werten sinnvoll ist. Bei nicht normalverteilten Werten oder bei geringen Probengrößen wird der in solchen Fällen geeignetere [87] Median (und die entsprechende Standardabweichung des Medians) angegeben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchung von Reifemerkmale der L7En-2 positiven Purkinjezellen in organotypischen cerebellären Schnittkulturen

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Beantwortung der Frage, welchen Einfluß Engrailed-2 auf die polare Organisation von Purkinjezellen hat. Hierzu sollten die Zellen, insbesondere auch das Axon, morphologisch charakterisiert werden. Neben den transgenen in vivo-Modellen sind Schnittkulturen ein ideales Modell, in denen die Morphologie einzelner Zellen gut identifiziert und analysiert werden kann. Damit dieses Modell genutzt werden konnte, musste aber zunächst untersucht werden, ob definierte Parameter der neuronalen Morphogenese in Kultur und in vivo ähnlich ablaufen. Dazu wurden Parameter untersucht, die Aussagen über den Entwicklungs- bzw. Reifezustand von Purkinjezellen zulassen.

##### 3.1.1 Das Überleben von Purkinjezellen in Kultur als Maß für den generellen Reifegrad von L7En-2 positiven Purkinjezellen

In vivo Studien an L7En-2 Tieren haben gezeigt, dass Purkinjezellen mit erhöhter Engrailed-2 Expression langsamer reifen als solche ohne Engrailed-2 Expression [67]. Diese Daten beruhen auf Analysen von Zellmorphologie und Verteilung im Gewebeschnitt. Unter in

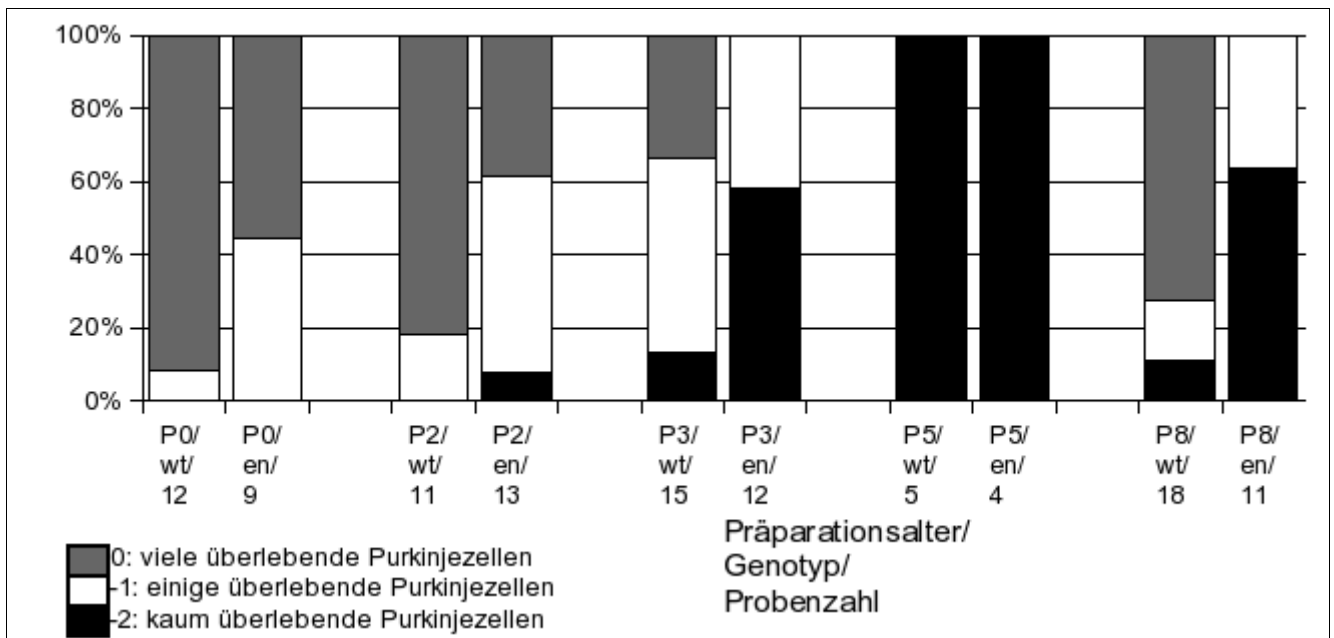
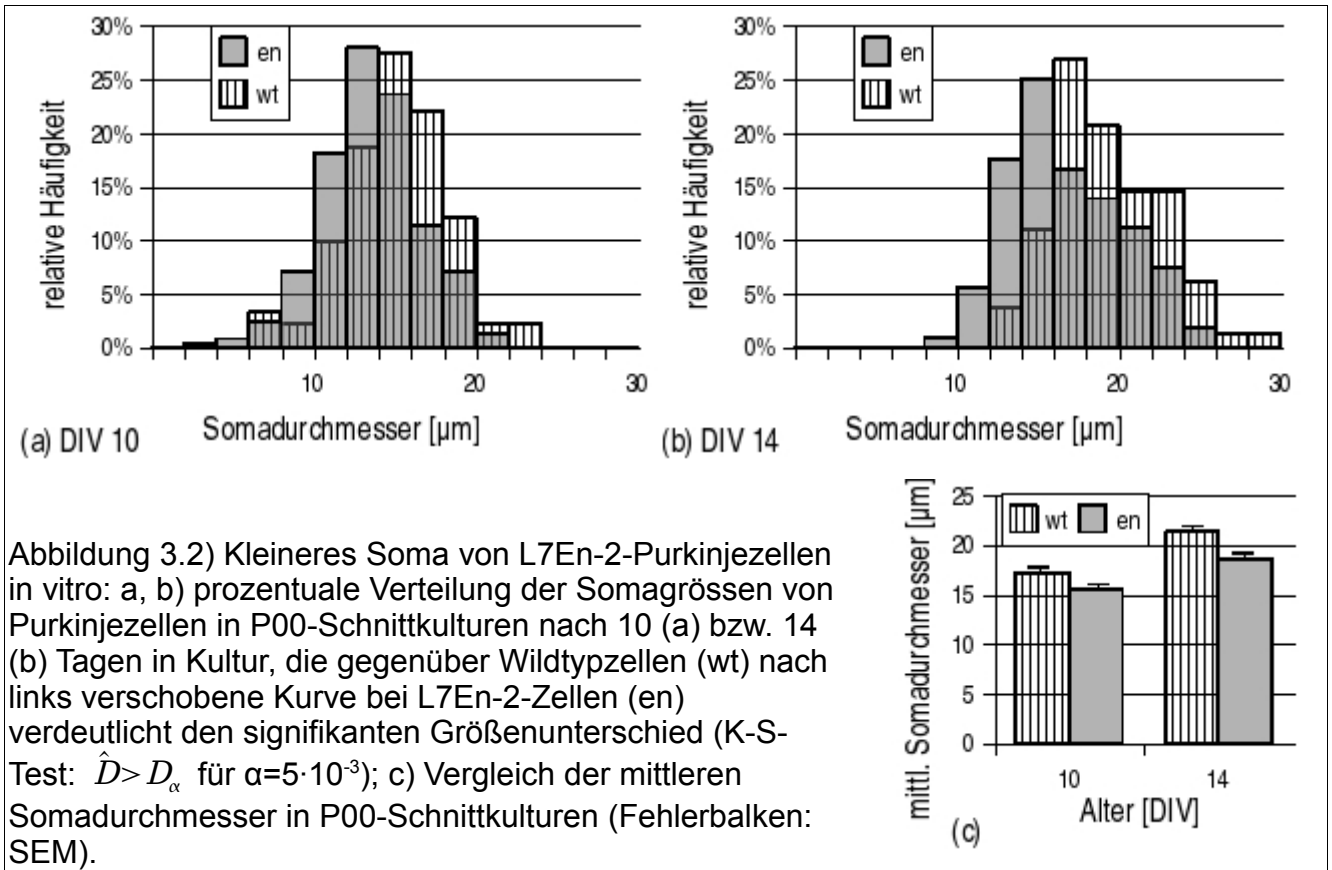


Abbildung 3.1) Überlebensrate von Purkinjezellen in Schnittkulturen: die in Klassen eingeteilten Schnittkulturen sind hier nach dem Alter, zu dem die Präparation stattfand aufgeschlüsselt (Details zur Klasseneinteilung siehe 2.3.10.2). Es wird deutlich, dass das Überleben von Purkinjezellen bis P05 mit zunehmendem Präparationsalter abnimmt, während es sich später wieder verbessert. Das Überleben in Kulturen von L7En-2-Tieren (en) fällt immer geringer aus, als in solchen von Wildtyptieren (wt).



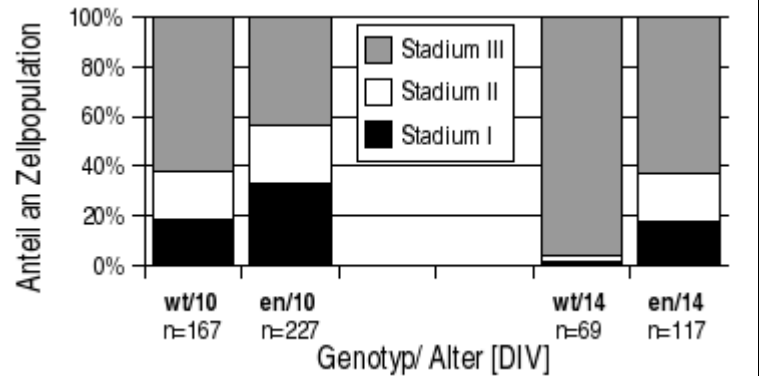


in vitro Bedingungen kann diese Reifung eindrucksvoll durch das Absterben von Purkinjezellen verfolgt werden, da Purkinjezellen, die zwischen P03 und P05 aus einem Tier entnommen und in Kultur gehalten wurden, zu einem Großteil absterben, solche von jüngeren oder älteren Tieren aber zum Großteil überleben [21]. Für L7En-2-Tiere wurde gezeigt, dass Purkinjezellen von acht Tage alten Mäusen genauso schlecht überlebten, wie Purkinjezellen von drei Tage alten Wildtyptieren. In Kulturen aus älteren Tieren verbesserte sich das Überleben der L7En-2-Purkinjezellen allmählich, bis es sich in Kulturen von P15 Tieren schließlich auf einem Niveau befand, wie es in Wildtyptieren gefunden wird ([67] und Jankowski, unveröffentlichte Daten). Diese Daten lassen zweierlei Interpretation zu: zum Einen kann die Überexpression von Engrailed-2 zu einem generell höheren Absterben der Purkinjezellen in Kultur führen, zum Anderen kann sich in den geschilderten Ergebnissen auch die Entwicklungsverzögerung der L7En-2-Purkinjezellen widerspiegeln. Zur Klärung dieser Frage sollten auch Kulturen von früheren Kulturzeitpunkten bezüglich der Purkinjezell-Überlebensrate untersucht werden.

Es wurden Schnittkulturen von Kleinhirnen aus unterschiedlich alten Tieren hergestellt, die Purkinjezellen immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen Calbindin dargestellt und nach der Überlebensrate in Klassen eingeteilt. Dabei wurde die Calbindin-positive Fläche in Relation zur Gesamtfläche der Schnittkultur gesetzt und der Logarithmus dieses Quotienten

Abbildung 3.3: Ausprägung morphologischer Reifemerkmale von Purkinjezellen in P00-Schnittkulturen: der Grad der Differenzierung nimmt von Stadium I nach III zu. Nach 10 DIV ist der Anteil der Stadium III-Zellen in Wildtypkulturen schon deutlich grösser als in L7En-2-Kulturen; nach 14 DIV gibt es in Wildtypkulturen nahezu keine nicht voll differenzierten Zellen mehr, während diese in L7En-2-Schnitten

noch über ein Drittel der Population stellen; in der Tat ist die Verteilung nach 14 DIV in L7En-2 Kulturen nahezu identisch mit der Verteilung nach 10 DIV in Wildtypkulturen; K-S-Test:  $\hat{D} > D_\alpha$  für  $\alpha = 5 \cdot 10^{-3}$  bei 10 DIV bzw.  $\alpha = 5 \cdot 10^{-4}$  bei 14 DIV.



als Klasse definiert. Solche der Klasse 0 haben folglich eine gute, solche der Klasse -1 eine mittlere und solche der Klasse -2 eine schlechte Überlebensrate der Purkinjezellen (siehe auch 2.3.10.2).

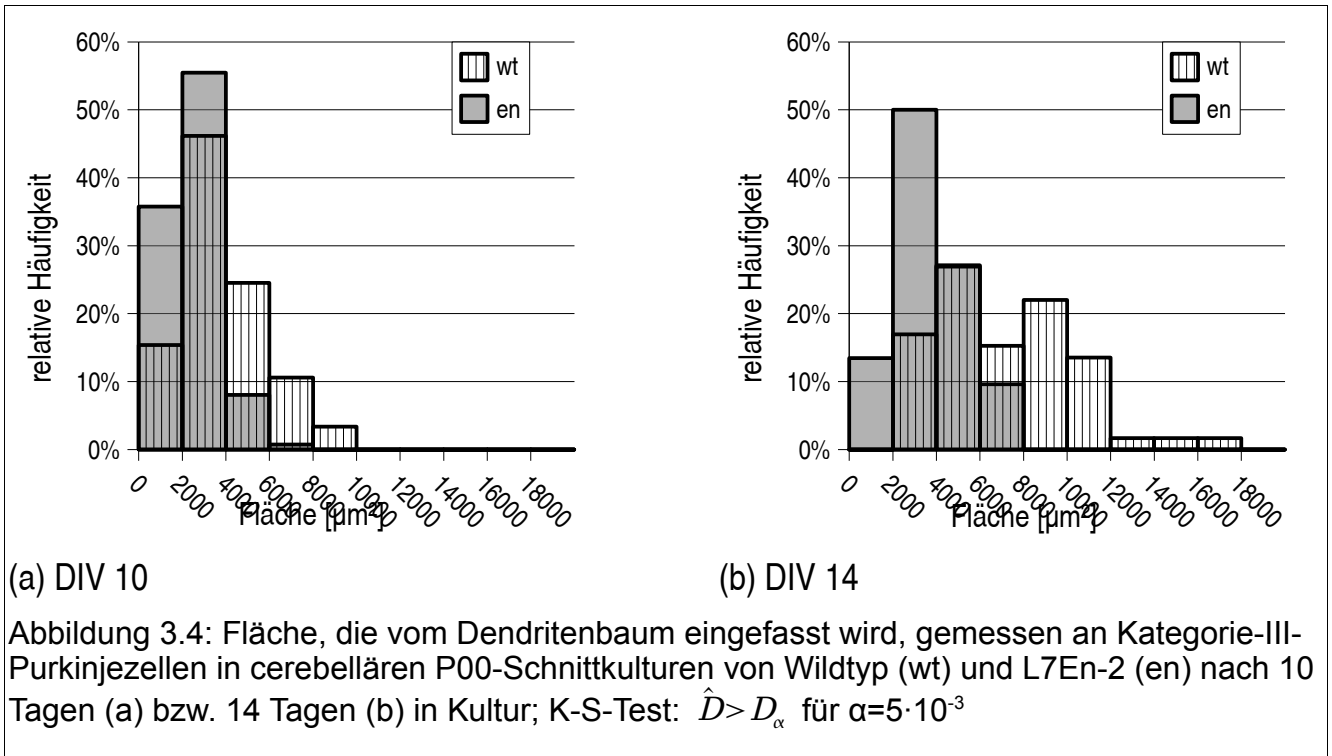
In Abbildung 3.1 ist zu sehen, dass das Absterben der Purkinjezellen bis zum Zeitpunkt P05 in Wildtyp- und L7En-2-Tieren zunahm, danach aber in Kulturen aus beiden Genotypen wieder abnahm. Generell war in L7En-2-Tieren ein stärkeres Absterben von Purkinjezellen zu beobachten als in Wildtyptieren.

### 3.1.2 Die Somagröße von Purkinjezellen in L7En-2 Kulturen

Ein weiterer Parameter, der einen Aufschluss über den Entwicklungszustand der Zelle gibt, ist die Grösse des Somas. Für Somata von L7En-2-Purkinjezellen ist es bekannt, dass sie in vivo kleiner sind als die von gleichaltrigen Wildtypzellen [67]. Daher wurde der Durchmesser von Purkinjezellsomata als Vergleichsgrösse zur Bestimmung des Reifegrades von Purkinjezellen in vitro herangezogen.

Es wurde der Somadurchmesser von Calbindin-gefärbten Purkinjezellen in Wildtyp- und L7En-2-Kulturen auf Höhe des Zellkerns bestimmt. Der Durchmesser wurde dabei senkrecht zu der Achse gemessen, welche durch Axonabgang und Abgang des Stammdendriten vorgegeben ist.

Es konnte gezeigt werden, dass der Durchmesser der Somata von L7En-2-Purkinjezellen nach 10 DIV mit durchschnittlich  $15,5 \mu\text{m}$  (SEM:  $0,2 \mu\text{m}$ ) kleiner ist als der der Wildtyp-Zellen ( $17,2 \mu\text{m}$ , SEM:  $0,3 \mu\text{m}$ ). Nach weiteren 4 Tagen Kulturdauer fällt dieser Unterschied noch etwas größer aus (wt:  $21,3 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ; L7En-2:  $18,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ). Die Werteverteilung ist in Abbildung 3.2 dargestellt.



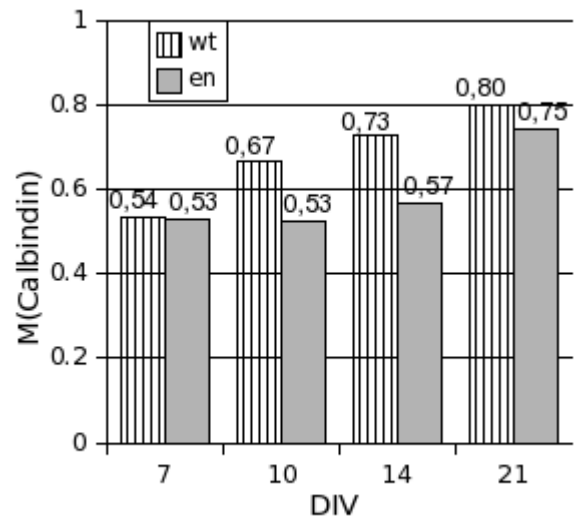
### 3.1.3 Der morphologische Differenzierungsgrad von Purkinjezellen in L7En-2 Kulturen

Ein für Purkinjezellen charakteristisches Merkmal ist der auffallend stark und hoch komplex entwickelte Dendritenbaum, der sich in den ersten Tagen nach der Geburt ausbildet. Daher ist die Untersuchung des Differenzierungsgrades des Dendritenbaumes eine oft benutzte Methode um den Reifegrad der Zellen zu bestimmen (z.B. [45], [84]). Für L7En-2-Purkinjezellen in vivo ist bekannt, dass sich ihr Dendritenbaum gegenüber Wildtypzellen verzögert entwickelt [67].

Um die in vivo zu beobachtende verzögerte Ausbildung des Dendritenbaumes bei L7En-2 Purkinjezellen auch in vitro nachweisen zu können, wurden gegen Calbindin angefärbte Purkinjezellen in P00-Schnittkulturen entsprechend des morphologischen Differenzierungsgrades ihrer Dendriten in Kategorien eingeteilt (Stadium I, II und III, von I nach III zunehmende Differenzierung, siehe auch Kapitel 2.3.10.5). Der Differenzierungsgrad der Dendritenbäume wurde nach 10 und 14 Tagen in Kultur bestimmt.

Die Häufigkeit des Auftretens von Purkinjezellen mit unterschiedlichen Reifegraden sind in Abbildung 3.3 gegliedert nach Kulturdauer und Genotyp gezeigt. Der Anteil wenig differenzierter Purkinjezellen in L7En-2-Schnittkulturen lag im Verhältnis zu gleichaltrigen Wildtyp-Kulturen bei beiden untersuchten Kultur Dauern deutlich höher. Die Verteilung von Purkinjezellen im L7En2- Tier auf die verschiedenen Differenzierungsstadien entsprach nach 14 Kulturtagen der Verteilung, die in Wildtypkulturen nach 10 Kulturtagen beobachtet wurde.

Abbildung 3.5) Parvalbuminexpression in Purkinjezellen von P00-Schnittkulturen: gegen Parvalbumin und Calbindin-D28k doppelgefärbte Schnittkulturen wurden als Übersicht fotografiert, die Aufnahmen wurden einer Kolokalisationsanalyse nach Manders unterzogen; Calbindin diente hierbei als Marker für Purkinjezellen, daher wurde als Bezugskanal für den Kolokalisationskoeffizient M der Farbkanal der Calbindin-IR gewählt. Außer nach 7 DIV zeigen Schnittkulturen vom Wildtyp immer eine höhere Kolokalisation der Parvalbumin- mit der Calbindin-IR, wodurch eine höhere Expression von Parvalbumin in Wildtyp-Purkinjezellen angezeigt wird. Während M in Wildtypkulturen kontinuierlich ansteigt, ist ein deutlicher Anstieg in L7En-2-Kulturen erst nach 3 Wochen in Kultur erkennbar. Wie bereits erwähnt (2.3.10.7) sind die hier gezeigten Daten aus nicht konfokalen Bildern entstanden. Eine Analyse konfokaler Bilder von Stichproben von 10 und 14 DIV Kulturen bestätigte aber die hier gezeigten Ergebnisse (10 DIV: wt 0,73; en 0,44; 14 DIV: wt 0,71; en 0,5).

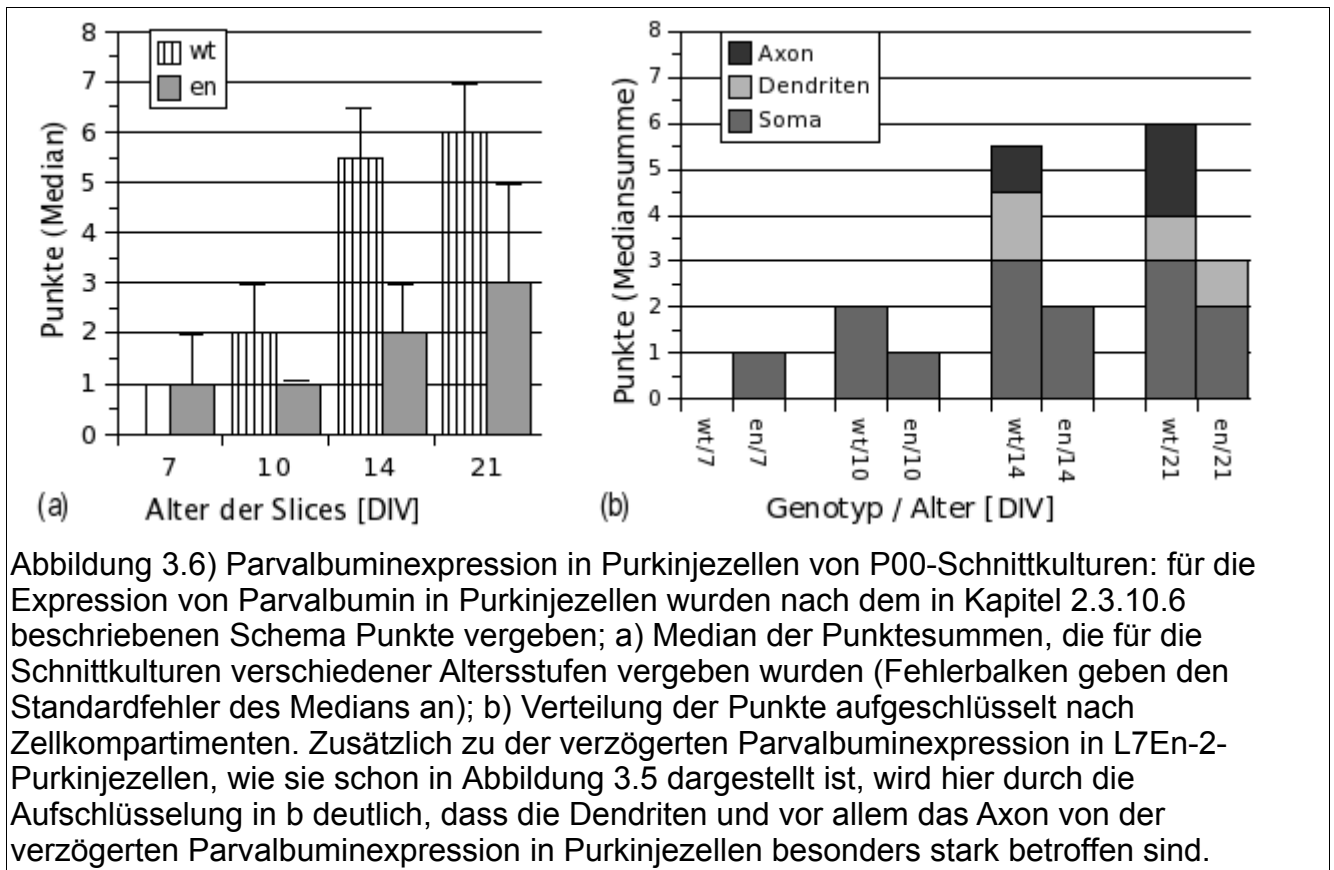


### 3.1.4 Die Grösse von Dendritenbäumen bei L7En-2 positiven Purkinjezellen

Neben der Komplexität des Dendritenbaums ist seine flächenhafte Ausdehnung ein weiterer Parameter für die Reifung einer Purkinjezelle [84]. In vivo [67] ist eine deutlich geringere Ausprägung des Dendritenbaums von L7En-2-Purkinjezellen nicht nur im Hinblick auf morphologische Differenzierungsstadien beschrieben, sondern L7En-2-Tiere besitzen bis ins Adultstadium eine deutlich schmalere Molekularschicht, was auf eine geringere flächenhafte Ausdehnung von Dendritenbäumen auch bei differenzierten Purkinjezellen hinweist.

Um dies ebenfalls in vitro nachzuweisen wurde die Fläche vermessen, die von Dendritenbäumen von Kategorie-III-Purkinjezellen in P00-Schnittkulturen umfasst wird (siehe auch 2.3.10.4). Auch hier wurden die Messungen wieder sowohl nach 10 als auch nach 14 Tagen in Kultur durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die Dendritenbäume von differenzierten Purkinjezellen in Kulturen von L7En-2-Tieren eine deutlich geringere Ausdehnung haben als die bei Wildtyptieren. Der Median der umfassten Flächen war bei L7En-2-Zellen nach 10 DIV nur ca. 2/3 des beim Wildtyptier gemessenen, nach 14 Kulturtagen sogar nur noch halb so groß. Der Unterschied wird auch durch die Form der Häufigkeitsverteilung der gemessenen Werte, dargestellt in Abbildung 3.4, deutlich.

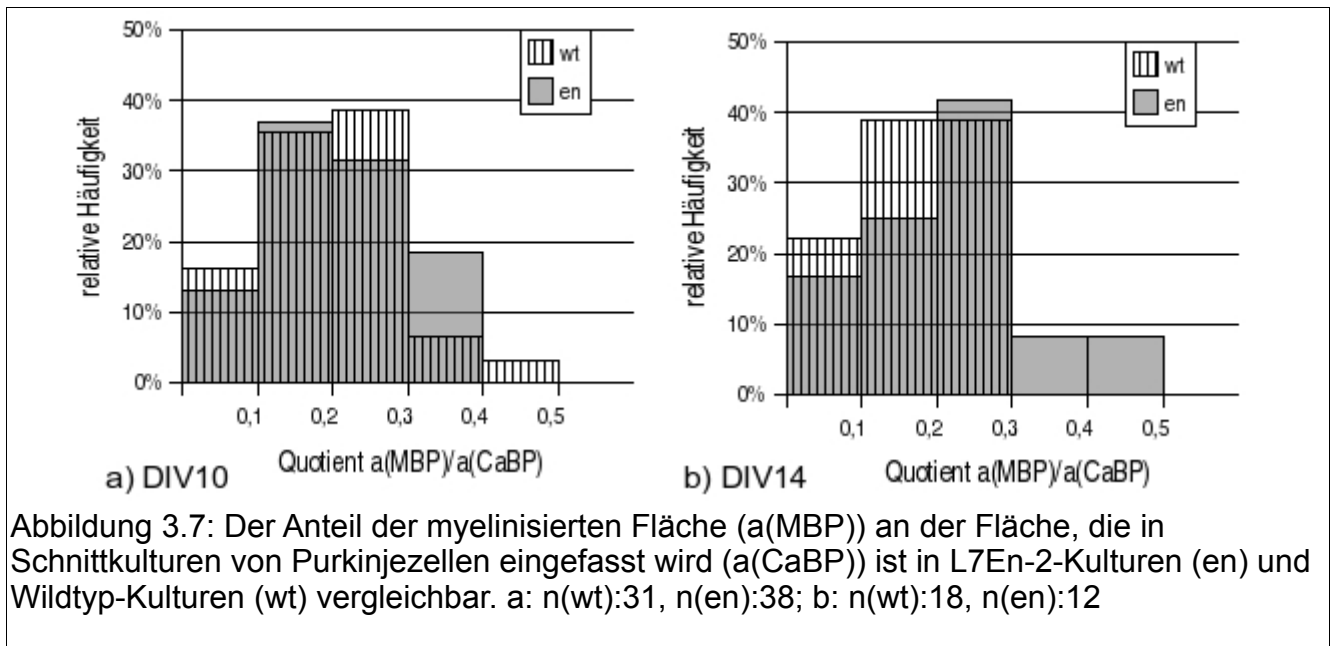


### 3.1.5 Die Parvalbuminexpression in Purkinjezellen von L7En-2 Kulturen

Außer den in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Parametern sollte auch ein nicht-morphologischer Parameter untersucht werden, um zu überprüfen, ob die aus der in vivo Situation bekannten Effekte der Engrailed-2-Überexpression auf die Purkinjezellreifung auch in vitro auftreten. Aus in vivo-Untersuchungen an Purkinjezellen von Wildtyp- und L7En2-Mäusen ist bekannt, dass die Expression von Parvalbumin in diesen Zellen im L7En-2-Tier verzögert auftritt [67]. Daher wurde die Parvalbuminexpression in P00-Schnittkulturen von Wildtyp- und L7En-2-Tieren zu verschiedenen Kulturzeitpunkten untersucht.

Um eine verzögerte Parvalbuminexpression in L7En-2-Purkinjezellen nachweisen zu können wurden gegen Calbindin und Parvalbumin doppelgefärbte Kulturen ausgewertet. Dabei wurde zunächst eine Kolokalisationsanalyse durchgeführt (siehe 2.3.10.7). Anschließend wurden die Schnittkulturen nach einem Punkteschema klassifiziert, wodurch auch die subzelluläre Verteilung der Parvalbuminexpression berücksichtigt wurde (siehe dazu 2.3.10.6).

Im Wildtyp war schon ab 10 DIV eine deutliche Kolokalisation der beiden Antigene zu beobachten, welche durch Parvalbumin-exprimierende Purkinjezellen zustande kommt. Die durchgeführten Kolokalisationsanalysen zeigten, dass eine vergleichbar starke Parvalbuminexpression in Purkinjezellen im L7En-2-Tier erst deutlich später zu beobachten



war (Abbildung 3.5, 6.4). Dieses Ergebnis wurde durch die Punkteverteilung unterstützt (Abbildung 3.6a). Aus dem in Abbildung 3.6b gezeigten Diagramm geht ausserdem hervor, dass die geringere Parvalbuminexpression in L7En-2-Purkinjezellen bei 14 und 21 DIV vor allem durch die verzögerte Expression in Dendriten bzw. durch die fehlende Expression in Axonen zustande kam.

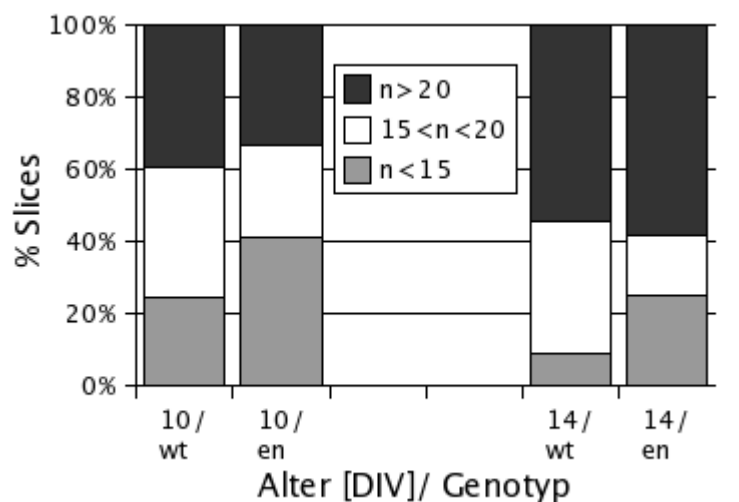
Abgesehen von dem insgesamt geringeren Überleben von L7En-2-Purkinjezellen in cerebellären Schnittkulturen zeigten L7En-2-Purkinjezellen in diesem Kultursystem dieselben Veränderungen in ihrer Differenzierung wie sie bisher nur in vivo beschrieben sind [67]. Damit ist die Voraussetzung gegeben, dass das hier vorgestellte in vitro System geeignet ist, weitergehende Untersuchungen bezüglich der Effekte der Engrailed-2 Überexpression auf die Differenzierung von Purkinjezellen durchzuführen (siehe dazu auch 4.1).

### 3.2 Untersuchung des distalen Axonanteils von L7En-2 positiven Purkinjezellen

Unter dem Begriff des distalen Axonanteils sind im folgenden Abschnitt Zellkompartimente zusammengefasst, die in mit den Buchstaben A, T und W gekennzeichnet sind.

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass Engrailed-2 einen negativen Effekt auf die Reifung von Soma und Dendriten hat (s.o. und [67]). Eine Wirkung auf die Reifung des Purkinjezellaxons wurde noch nicht eingehend untersucht. Mit der Etablierung von cerebellären Schnittkulturen steht nun neben in vivo Beobachtungen ein System zur Verfügung, mit welchem verschiedene Parameter der axonalen Entwicklung untersucht werden können (siehe auch Kapitel 4.1). Untersucht wurden die Myelinisierung, die

Abbildung 3.8: Prozentuale Verteilung von Schnittkulturen auf verschiedene Klassen, Klassifizierung anhand der Anzahl identifizierbarer Oligodendrozyten (n) pro Schnitt. In beiden untersuchten Altersstufen sind die Unterschiede in der Klasse mit >20 Oligodendrozyten pro Schnitt minimal, bei den restlichen beiden Klassen zeigt sich bei den L7En-2 Kulturen (en) ein Trend zu der Klasse mit <15 Oligodendrozyten.



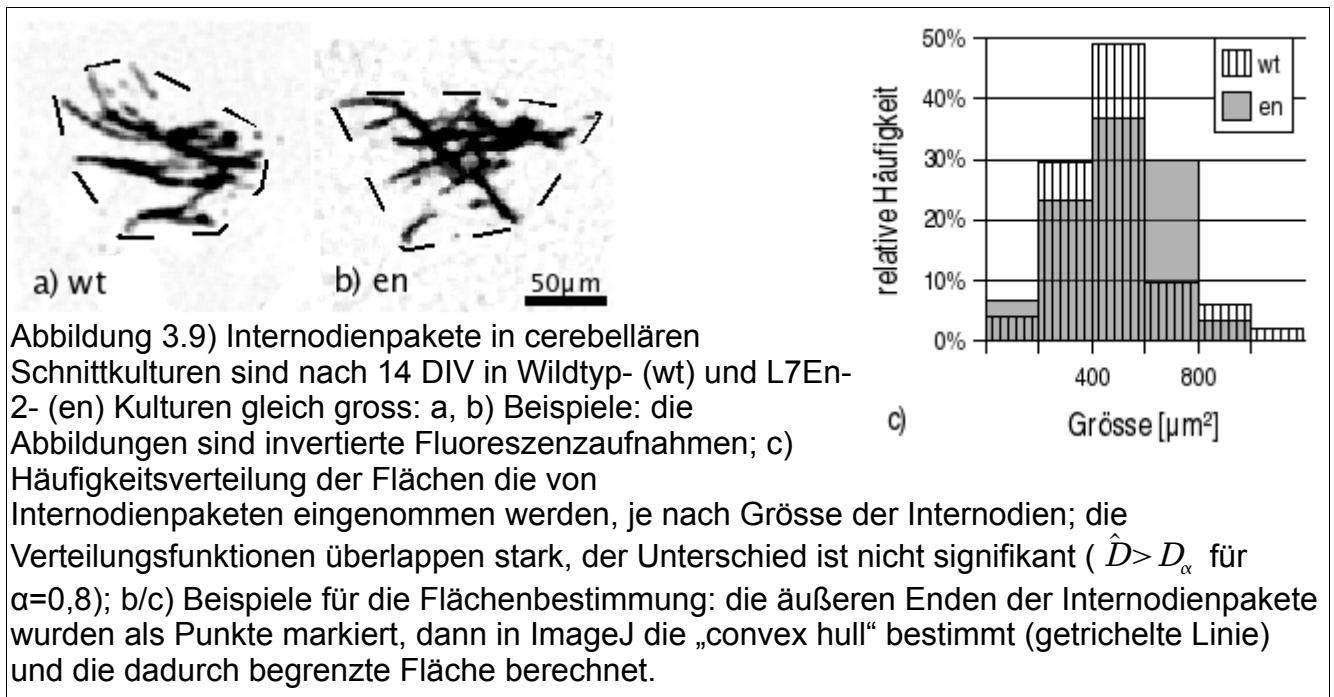
Expression von Ankyrin G und die Regenerationsfähigkeit von läsierten Purkinjezellen, Prozesse, die sich am distalen Abschnitt des Axons abspielen. Zusätzlich wurden in vivo Beobachtungen zur Entwicklung und Lokalisation des *Plexus infraganglionaris* und zum Auftreten von Torpedos ausgewertet.

### 3.2.1 Die Myelinisierung in P00-Schnittkulturen

Nicht nur für das Kleinhirnsystem ist bekannt, dass die Myelinisierung ein Prozess ist, der in engem zeitlichem Zusammenhang mit der Reifung der myelinisierten Axonen einhergeht [8]. In cerebellären Schnittkulturen sind die Purkinjezellen die einzigen Neurone, deren Axone myelinisiert werden [5]. Wenn die Purkinjezellreifung in L7En-2-Mäusen retardiert ist, und die Myelinisierung von der Reifung ebendieser Axone abhängt, dann sollte die Myelinisierung in cerebellären Schnittkulturen von L7En-2-Tieren ebenfalls verzögert ablaufen. Der Fortschritt der Myelinisierung diente also als Indikator für den Entwicklungszustand der Purkinjezellen und ihrer Axone.

Zur Untersuchung der Myelinisierung wurden Schnittkulturen unterschiedlichen Alters mit einem Antikörper gegen MBP, einem Myelinmarker, gefärbt und die Färbung mit der gegen Calbindin-D28k verglichen. Der Grad der Myelinisierung ist durch den Anteil der Fläche mit MBP-Immunreaktivität im Verhältnis zur Fläche mit CaBP-Immunreaktivität gegeben.

Abbildung 3.7a zeigt, dass die Verteilungskurven für Wildtyp- und L7En-2-Kulturen nach 10 DIV nicht gegeneinander verschoben waren, sondern überlappten. Die Form der Kurve war für beide Genotypen ähnlich. Statistisch war hier kein Unterschied auszumachen (K-S-Test:  $\hat{D} > D_\alpha$  für  $\alpha=1$ ). Nach 14 DIV schien die L7En-2-Kurve gegenüber der Wildtypkurve etwas nach rechts verschoben (Abbildung 3.7b), ein Unterschied in der Myelinisierung konnte aber



durch die weiteren Untersuchungen (s.u.) nicht bestätigt werden und war auch statistisch nicht signifikant (K-S-Test:  $\hat{D} > D_\alpha$  für  $\alpha=0,7$ ).

In einer weiteren Untersuchung wurden die Kulturen entsprechend der Anzahl identifizierbarer reifer Oligodendrozyten in Klassen eingeteilt. Die Oligodendrozyten wurden hierbei durch MBP-Immunreaktivität identifiziert, entsprechend der in [19] beschriebenen Methode (siehe auch 2.3.10.8). In beiden Altersstufen konnte gezeigt werden, dass der Anteil stark myelinisierter Schnittkulturen ( $n > 20$  in Abbildung 3.8) nahezu gleich war. Der Anteil der Kulturen mit einer geringen Anzahl ( $n < 15$ ) Oligodendrozyten lag bei L7En-2-Tieren zwar geringfügig höher als in Wildtyp-Tieren, die Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung waren aber nicht signifikant (K-S-Test:  $\hat{D} > D_\alpha$  für  $\alpha=1$ ).

Die Ergebnisse zeigen, dass es bei den ausgewerteten Parametern beim L7En-2-Tier keine erkennbaren Unterschiede zum Wildtyp-Tier gibt. Beim Vergleich der myelinisierten Flächen nach 14 DIV ist zwar ein leichter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung festzustellen, bei näherer Betrachtung der Kulturen kann man aber auch hier von einer durchaus vergleichbaren Entwicklung sprechen, wie die folgenden Beobachtungen zeigen:

- bei den Schnitten mit einer fortgeschrittenen Myelinisierung ( $n > 20$  in Abbildung 3.8) ist in beiden Genotypen dasselbe Ausbreitungsmuster in der MBP-Immunreaktivität zu sehen (Abbildung 6.5).

- die Oligodendrozyten sind ähnlich weit differenziert, da einzeln liegende Internodienpakete vergleichbare Grössen haben (Abbildung 3.9).



### 3.2.2 Die Verteilung von Ankyrin G in Purkinjellaxonen in vitro

Ankyrine sind Proteine, die einerseits an Spectrine, andererseits an verschiedene membranständige Proteine (z.B. Natriumkanäle, Zelladhäsionsmoleküle) binden und dadurch das Cytoskelett an Membranen verankern [88]. Ankyrin G ist in unreifen Neuronen, die noch keinen Kontakt mit Oligodendrozyten oder Schwannzellen hatten, gleichmässig über das Axon verteilt. Nach Kontakt mit den erwähnten myelinbildenden Zellen sammeln sich die Ankyrin G-Moleküle in den Bereichen der Ranvier'schen Schnürringe und am initialen Axonsegment. Ankyrin ist wichtig für die Konzentration von spannungsgesteuerten Natriumkanälen in diesen Bereichen [89][90]. Am initialen Axonsegment ist es zudem am Aufbau der Diffusionsbarriere zwischen Axonmembran und restlicher Zellmembran beteiligt [91]. Während Ankyrin G als Marker für das initiale Axonsegment von differenzierten Purkinjellen oft als Standardmarker verwendet wird [3][92][93], gibt es über das genaue Verteilungsmuster von Ankyrin G bei nicht myelinisierten Purkinjellen nur wenig Daten.

Die Verteilung von Ankyrin G in Purkinjellen wurde in cerebellären Schnittkulturen von P00 Tieren zu verschiedenen Kulturzeitpunkten untersucht. Da die Färbequalität der zur Verfügung stehenden Antikörper relativ inhomogen war, konnte eine quantitative Analyse (wie z.B. für  $\beta$ 2-Spectrin, siehe 3.4.2.1) nicht durchgeführt werden. Daher wird auch auf das Vorkommen bzw. die Verbreitung von nur sehr schwach oder gar nicht AnkG-ir Purkinjellen, die in beiden Genotypen in allen Altersstadien beobachtet wurden (Beispiel in Abbildung 6.6, x) nicht weiter eingegangen. Es werden also nur Untersuchungen vorgestellt, in denen das Verteilungsmuster von Ankyrin G in qualitativ gut gefärbten Zellen ausgewertet wurde.

Das Verteilungsmuster von Ankyrin G im Axon von Purkinjellen stellte sich sowohl in Wildtyp- als auch in L7En-2-Kulturen folgendermassen dar: ab der in (relativer) Somanähe gelegenen schmalsten Stelle des Axons war dieses gleichmässig über seinen ganzen Durchmesser gefärbt (Abbildung 6.6c). Nur die Endverzweigungen im Bereich der tiefen Kerne waren Ankyrin G-negativ (Abbildung 6.7). Dies entspricht einer Verteilung, wie man sie bei einer korrekten Ausbildung der Kompartimentgrenze zwischen den Kompartimenten A und W/T aus erwarten würde. Der vor der schmalsten Stelle gelegene, proximale Abschnitt des Axons zeigte diffuse bzw. schlierenförmige Ankyrin G-IR, wie sie für das Soma und die proximalen Dendriten typisch ist (Abbildung 6.6).

### 3.2.3 Die Regenerationsfähigkeit von läsionierten Purkinjellaxonen in vitro

Es ist bekannt, dass läsionierte Purkinjellaxone früh postnatal (vor P03) regenerieren können [21]. Diese Regenerationsfähigkeit ist in der Folgezeit deutlich erniedrigt. Deshalb

wurden für die hier durchgeführten Experimente Schnittkulturen aus P00 Mäusen präpariert und nach 2 Tagen axotomiert. Nach weiteren 3, 5, 8 und 12 Tagen in Kultur wurden die Schnittkulturen fixiert, immunhistochemisch gegen Calbindin-D28k gefärbt und unter dem Mikroskop ausgewertet<sup>15</sup>.

Die läsionierten Kulturen zeigten bei Wildtyp- und L7En-2-Tieren dasselbe Verhalten. Nach 3 Tagen konnte man bereits Axone beobachten, welche die Läsionsstelle durchwachsen hatten. Andere Axone bildeten für auswachsende Axone typische filopodienartige Strukturen<sup>16</sup> [95] (Abbildung 6.8). Nach 5 Tagen hatten schon zahlreiche Axone die Läsion durchwachsen, regelmässig fand man auswachsende Axone (Abbildung 6.9). 8 Tage nach der Läsion (und später) konnte man in fast allen Schnitten ein etabliertes Netzwerk von Axonen sehen, das den Bereich der Läsion überspannte, die Stärke der Ausprägung dieses Netzwerks hing von der Überlebensrate der Purkinjezellen zu beiden Seiten der Läsion ab. In die Läsion einwachsende Axone waren nicht mehr zu beobachten (Abbildung 6.10 und 6.11).

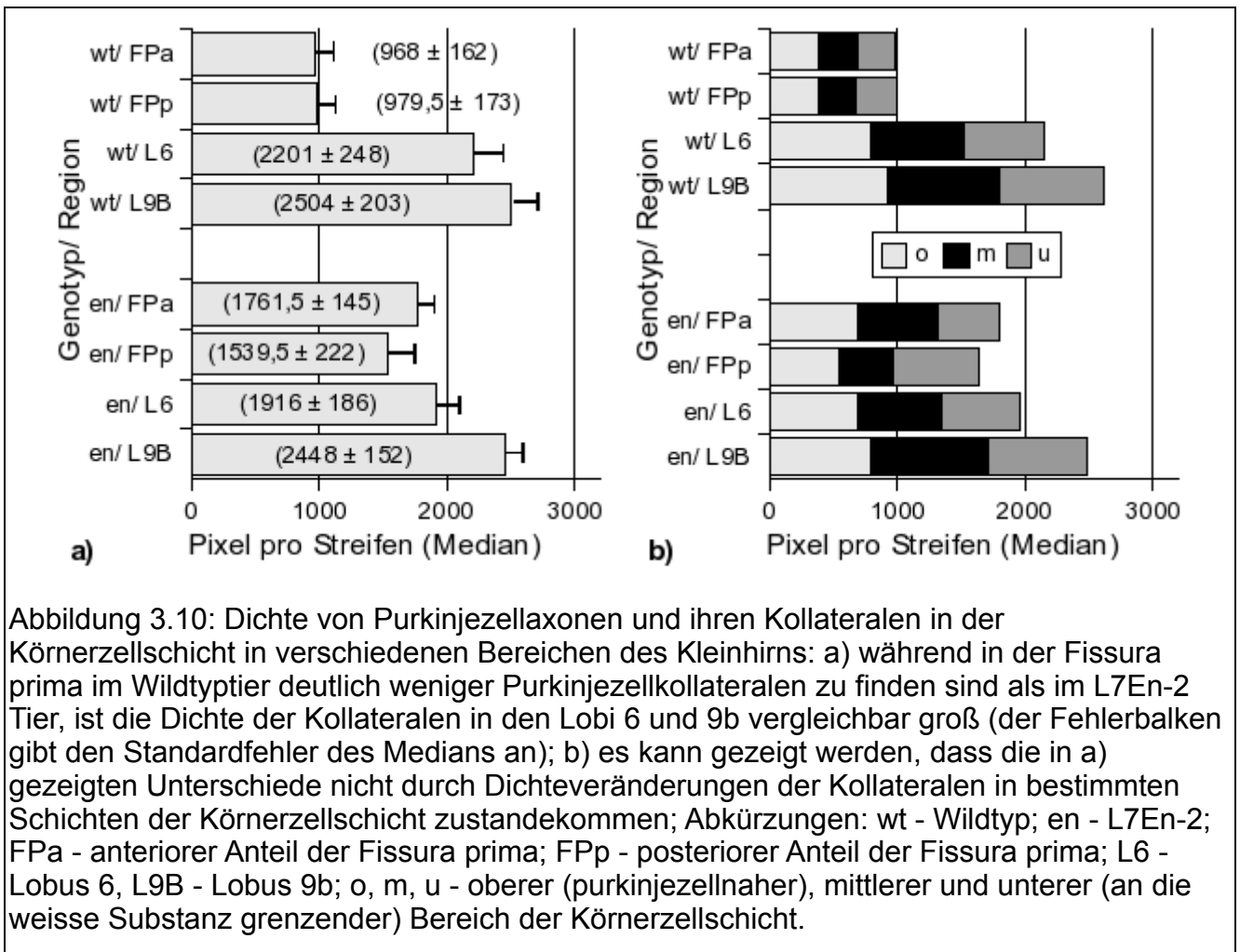
Die beschriebenen Regenerationsvorgänge fanden bei allen beobachteten Altersstufen im Bereich zwischen den Resten der tiefen Kerne zu beiden Seiten der Läsion statt. Die tiefen Kerne konnten dabei an den für diese Region typischen Endverzweigungen der Purkinjezellen identifiziert werden. Fehlen diese Endverzweigungen auf einer Seite der Läsion, ging das immer mit 2 anderen Merkmalen einher: Die Purkinjezellen derselben Seite waren stark verkümmert, in älteren Kulturen waren i.d.R. gar keine Purkinjezellen mehr vorhanden. Zusätzlich wuchsen von der gegenüberliegenden Seite keine Fortsätze ein. Eine Hypothese, die dieses Phänomen erklärt, wäre, dass Purkinjezellen nur überleben, wenn ipsilateral der Läsion Zellen der tiefen Kleinhirnkernkerne liegen. Das wiederum könnte bedeuten, dass die beobachtete Regeneration keine „echte“ Regeneration in dem Sinne war, dass hier nicht vollständig durchtrennte Axone wieder auswachsen, sondern dass es sich um Kollateralen von Axonen handelte, die vor der Läsion Kontakt zu den ipsilateral der Läsion gelegenen tiefen Kernen hatten und demzufolge nicht durchtrennt wurden. Dies lässt aber trotzdem eine Interpretation der Ergebnisse dahingehend zu, dass hier ein axonaler Differenzierungsprozess in Wildtyptieren und L7En-2 Tieren zeitlich und räumlich demselben Muster folgte. Dies wurde auch durch das im folgenden beschriebene Kontrollexperiment bestätigt.

Zusätzlich zu den beschriebenen Läsionen an P00-Schnittkulturen nach 2 Tagen in Kultur wurden die Axone in einem Kontrollexperiment erst nach 7 Tagen in Kultur durchtrennt und

---

<sup>15</sup> Nähere Angaben zu Auswerteparametern und Fallzahlen siehe .

<sup>16</sup> Diese Filopodien sind in Abbildung 6.7 nur zu erahnen. Die in diesem Alter noch verhältnismässig schwache CaBP-Expression erzeugt nur eine schwache IR [94]. Das erschwert die fotografische Dokumentation, ebenso wie die Tatsache, dass die Schnittkulturen zu diesem Kulturzeitpunkt noch nicht besonders stark abgeflacht sind und oft nur sehr kurze Abschnitte von Axonen in der Fokusebene liegen.

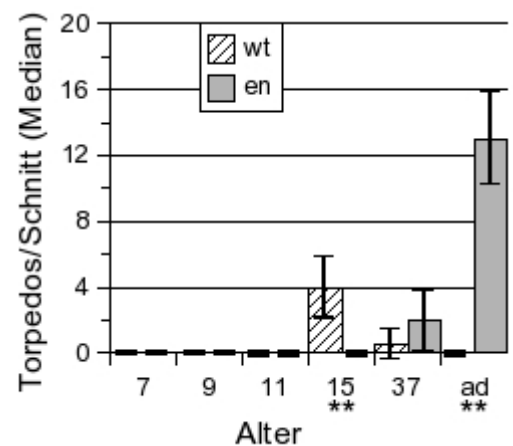


dann für weitere 7 Tage in Kultur gehalten. Der Zeitpunkt der Axotomie fiel hier in ein Zeitfenster, in dem Wildtyp-Purkinjellaxone nicht mehr in der Lage sind, Axone zu regenerieren [96]. In dem durchgeführten Experiment zeigten die L7En-2 Purkinjellaxone dasselbe Verhalten wie die Wildtyp-Axone: in keiner Kultur konnten in die Läsion einwachsende Axone nachgewiesen werden, oder Axone, die die Läsion überwachsen hatten (Bsp.: Abbildung 6.12).

### 3.2.4 Die Dichte des Kollateralengeflechts von Purkinjellaxonen in vivo

Als *Plexus infraganglionaris* bezeichnet man das Geflecht aus Axonkollateralen von Purkinjellaxonen, welches sich ab P00 in der Purkinje- und Körnerzellschicht ausbildet. Ein Teil des Kollateralengeflechts reicht dabei auch in die Molekularschicht hinein und wird dort als *Plexus supraganglionaris* bezeichnet [76]. Die Kollateralen der Purkinjellaxone bilden Synapsen mit anderen Purkinjellaxonen in der Umgebung der Ausgangszelle und zwar sowohl sagittal als auch transversal [39]. Von den zunächst sehr zahlreichen Kollateralen bilden sich die meisten ab P05 zurück. Ungefähr an P15 ist die Differenzierung des *Plexus infraganglionaris* abgeschlossen [96]. Unterschiede in der Differenzierung bzw. in deren

Abbildung 3.11: Häufigkeit axonaler Torpedos in Abhängigkeit vom Alter der Tiere: Dargestellt ist die Anzahl von Torpedos pro Schnitt als Median. Ausgewertet wurden vermale und paravermale Schnitte; die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Medians an; in den mit \*\* gekennzeichneten Altersstufen besteht ein hoch signifikanter Unterschied in der Anzahl der Torpedos zwischen Wildtyp- und L7En-2-Tieren. Alter in Postnataltagen, ad: adult (ca. 6 Monate)



zeitlichem Ablauf sollten während dieser Phase (P05 - P15) erkennbar sein und anhand der Dichte des Plexus auch messbar. Daher wurde die Dichte des *Plexus infraganglionaris* zum Zeitpunkt P09 in Vibratomschnitten untersucht.

Es wurden aus je 2 Tierpaaren (je ein Wildtyp-Tier und ein L7En-2-Tier pro Paar) vermale Schnitte visuell untersucht. Hierbei fiel zunächst kein Unterschied zwischen den Genotypen auf. Die Verteilung von Regionen mit einem typischerweise stärker entwickelten Plexus (z.B. Lobus 3 (anteriorer Bereich), Lobus 6, Lobus 9b) bzw. schwächer entwickelten Plexus (z.B. Fissura prima) ist vergleichbar. Da eine genauere Beurteilung im Hinblick auf die Dichte der rekurrenten Kollateralen per Auge nicht möglich ist, wurde eine Methode entwickelt, die eine quantitative Betrachtung des *Plexus infraganglionaris* erlaubt (2.3.10.9). Mit dieser Methode wurden bei einem Paar Tiere in bestimmten Arealen (zwei in der Fissura prima, je eins im Lobus 6 und Lobus 9b) die Dichte der Purkinjenzellaxone und ihrer Kollateralen gemessen.

Hierbei fiel auf, dass in den beiden Bereichen der Fissura prima im Wildtyp-Tier die Dichte der Kollateralen deutlich geringer war als im L7En-2-Tier (Abbildung 3.10, Bsp.: Abbildung 6.13). In den beiden anderen Bereichen waren die Unterschiede jedoch nur marginal, die Werte im L7En-2-Tier lagen hier leicht unter denen des Wildtyp-Tiers.

### 3.2.5 Das Auftreten axonaler Torpedos in der Entwicklung von Purkinjenzellen in vivo

Das Auftreten axonaler Torpedos ist ein spezifisches Merkmal von cerebellären Purkinjenzellen. Als Torpedos werden fusiforme Anschwellungen des Purkinjenzellaxons bezeichnet, welche vor allem in der Körnerzellschicht, oft im Bereich vor der ersten Kollateralverzweigung, vorkommen. Torpedos treten unter physiologischen Bedingungen in geringer Zahl auf. Eine massive Häufung konnte bei bestimmten Erkrankungen wie Prionerkrankungen oder bei Schwermetallvergiftungen beobachtet werden [97]. Als Ursache der Torpedoentstehung werden Veränderungen im axonalen Transport angenommen [98][48]. Sie werden zum Einen mit Purkinjenzelldegeneration in Zusammenhang gebracht

[99], die sich z.B. durch eine gleichzeitig auftretende Atrophie von Purkinjezellsomata oder -dendriten manifestiert [100]. Zum Anderen sind Vorgänge im Rahmen der Umorganisation von Zellen oder der Regeneration als Ursache für Torpedos denkbar [101], da das physiologische Auftreten von Torpedos während einer Phase der Purkinjezellentwicklung stattfindet, in der kein Absterben von Purkinjezellen mehr zu beobachten ist.

Bei der Untersuchung von Vibratomschnitten von je 2 Geschwisterpaaren (je ein Wildtyp- und ein L7En-2-Geschwister) war aufgefallen, dass a) bei P09 weder in Wildtyp- noch in L7En-2-Tieren Torpedos in nennenswertem Umfang auftraten, b) bei P15 in Wildtyp-Tieren einige Torpedos pro Schnitt erkennbar waren, die in L7En-2-Tieren fehlten, und c) in adulten Wildtyp-Tieren fast keine Torpedos auftraten, während bei L7En-2-Mäusen zahlreiche vorhanden waren. Daraufhin wurde das Auftreten von Torpedos in gegen Calbindin-D28k angefärbten Paraffinschnitten von je einem Geschwisterpaar pro Altersstufe genau quantifiziert (Abbildung 3.11, siehe auch 2.3.9.1, die gefärbten Paraffinpräparate wurden von Jakob Jankowski zur Verfügung gestellt).

Bei den untersuchten Tieren zeigte sich, dass bei Wildtyp-Tieren eine Häufung von Torpedos am Beginn der dritten Lebenswoche auftrat. Vergleichbare Daten sind aus der Literatur bekannt [101]. Dieses transiente, verstärkte Auftreten von Torpedos blieb bei L7En-2-Tieren aus. Im Gegensatz dazu entwickelten zahlreiche Purkinjezellen von adulten L7En-2-Tieren Torpedos (Abbildung 3.11). Eine solche Häufung trat in Wildtyp-Tieren nicht auf.

### **3.3 Untersuchung des proximalen Axonabschnitts von L7En-2 positiven Purkinjezellen**

Unter dem Begriff des proximalen Axonanteils sollen hier Ergebnisse zusammengefasst werden, die sich auf das Kompartiment H aus Abbildung 1.3 beziehen.

#### **3.3.1 Die Grösse des proximalen Axonabschnitts in vitro**

Während der Übergang vom Purkinjezellsoma in das Axon in vivo sehr eng ist, ist dieser Übergang in vitro eher trichterförmig. Dieser Trichter kann mehr oder weniger flach ausgebildet sein. Das Ende des Trichters mündet in die schmalste Stelle des Axons, welche den Beginn des eigentlichen Axons markiert, also die Stelle, an der sich das initiale Axonsegment entwickelt. Der trichterförmige Übergang zwischen Soma und Axon kann folglich als Axonhügel/ proximales Axonsegment aufgefasst werden (Abbildung 1.3, [44]). Beim Blick in das Mikroskop fällt auf, dass dieses proximale Axonsegment bei den Purkinjezellen aus L7En-2 Kulturen stark vergrössert erscheint (Abbildung 3.12). Die Länge des proximalen Axonanteils ist in P00-Schnittkulturen nach 10 Tagen mit durchschnittlich 33,4 µm in L7En-2-Purkinjezellen fast doppelt so lang wie im Wildtyp (17,8). Nach 14 Tagen

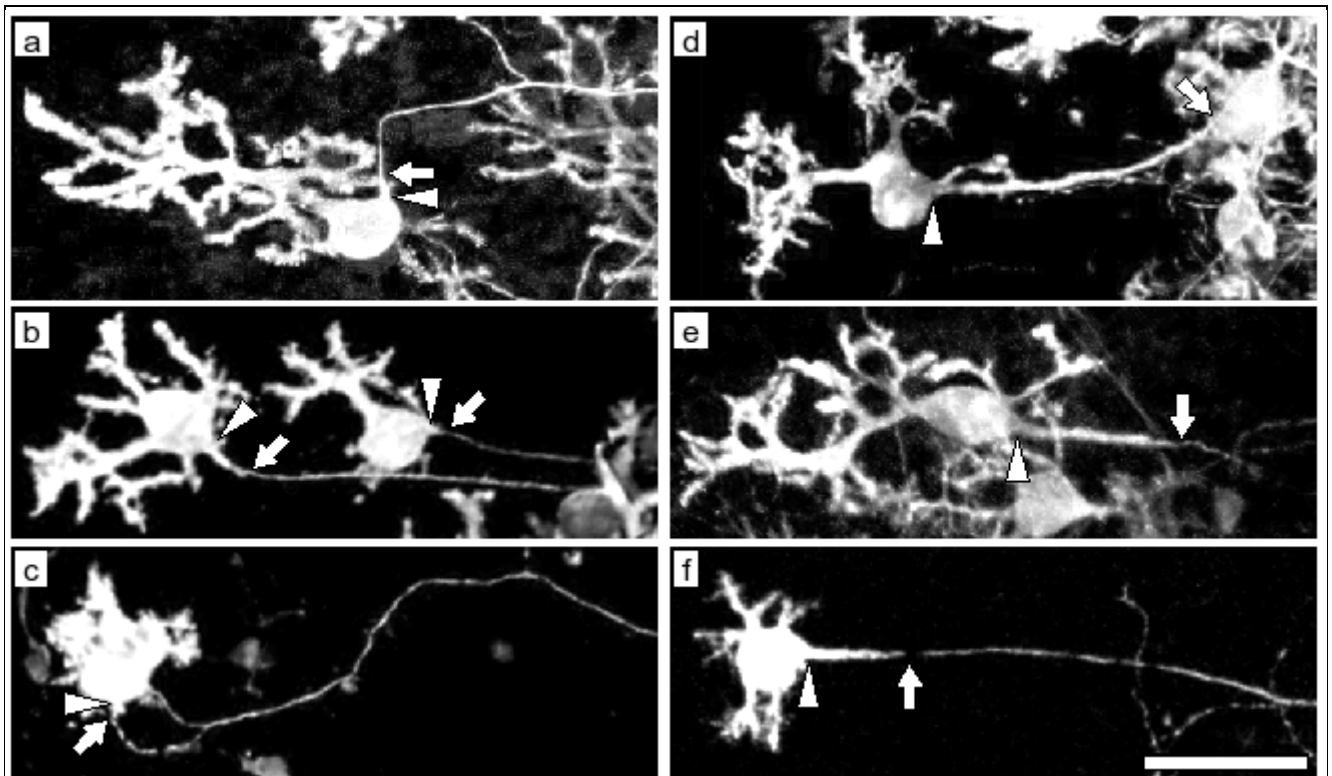


Abbildung 3.12: Purkinjezellen in Schnittkulturen von P00 nach 14 DIV: a-c) Wildtypzellen, d-f) L7En-2-Zellen. Während bei den Wildtypzellen der Abstand zwischen dem Ursprung des Axons (Pfeilspitze) und dem Punkt, wo das Axon seine normale Stärke hat (Pfeil) verhältnismässig kurz ist, ist dieser Bereich bei L7En-2-Zellen deutlich länger. Proximale Axonsegmente wie in (d), die ein Vielfaches des Somadurchmessers lang sind und grössere seitliche Protrusionen aufweisen, sind im Wildtyp nicht auffindbar. Die beschriebenen Unterschiede sind bei Zellen aller Differenzierungsstadien zu sehen (a,b,d,e: Stadium III; c,f: Stadium II; siehe 2.3.10.5). Maximumprojektionen von konfokalen Bildern, CaBP-IR, Balken: 50µm.

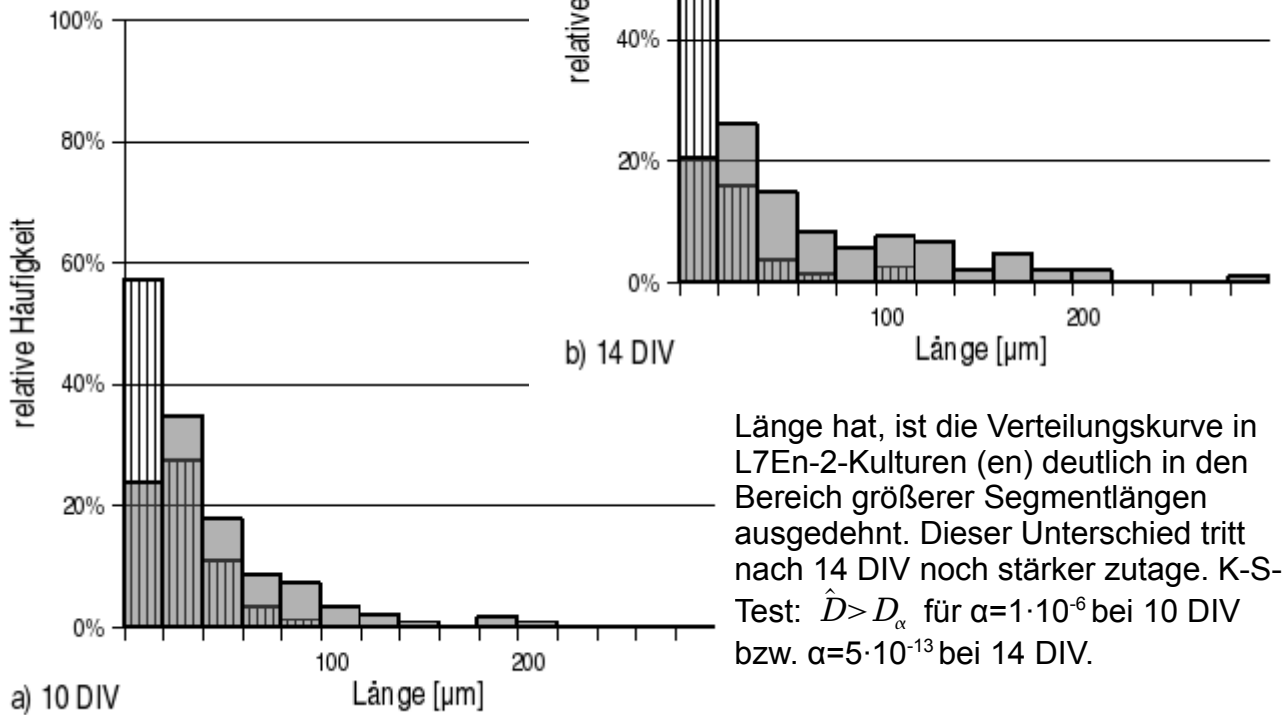
ist die Länge dieses Abschnitts in L7En-2 im Schnitt sogar fast 4 mal so lang wie im Wildtyp (45,6 gegenüber 12,5, alle Werte Median, Werteverteilung siehe Abbildung 3.13).

Der Vollständigkeit halber soll noch erwähnt werden, dass die Berechnung der Schnittflächen (Längsschnitt) des proximalen Axonabschnitts eine ähnliche Form der Werteverteilung auf einem vergleichbaren Signifikanzniveau lieferte.

### 3.3.2 Das Auftreten von proximalen, verdickten Axonabschnitten in vivo

Ein Phänomen, das dem im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen in vitro Phänotyp entspricht, ist aus bisherigen Studien zur L7En-2-Maus in der in vivo Situation nicht bekannt [67]. Dies macht die Interpretation der in vitro Daten schwierig, da es sich um ein reines Zellkulturartefakt handeln kann, welches für die in vivo Situation ohne Bedeutung ist. Daher wurden in sagittalen Vibratomschnitten von verschiedenen Altersstufen (P09, P15, adult) die proximalen Axonabschnitte von Purkinjezellen genauer untersucht.

Abbildung 3.13) Prozentuale Verteilung der Längen der proximalen, verdickten Axonanteile in cerebellären Schnittkulturen nach 10 (a) bzw. 14 (b) Tagen in Kultur, Klasseneinteilung in 20µm-Intervallen. Während in Wildtypkulturen (wt) die Mehrheit der Purkinjezellen einen verdickten proximalen Abschnitt von unter 40 µm



Im Wildtypier konnte in der Tat zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein morphologisches Korrelat zu den beobachteten Auftreibungen im proximalen Bereich des Axons gefunden werden, obwohl diese in vitro in auftraten, wenn auch in wesentlich kleinerem Massstab als in L7En-2-Kulturen. Im Gegensatz zu den Wildtypieren fanden sich in L7En-2-Tieren auch in vivo Purkinjezellen, die ein proximal aufgetriebenes Axon aufwiesen (Beispiele in Abbildung 3.14). Allerdings stellen sie nur eine Minderheit in der Purkinjezellpopulation und ihre Zahl nimmt mit dem Alter ab. Während man z.B. bei P09 oft mehr als 5 Zellen pro Lobus findet sind es im Adulttier selten mehr als 10 pro Schnitt. Seitliche Protrusionen, wie sie in vitro an den proximalen verdickten Axonabschnitten beobachtet werden können, wurden in vivo nicht gefunden.

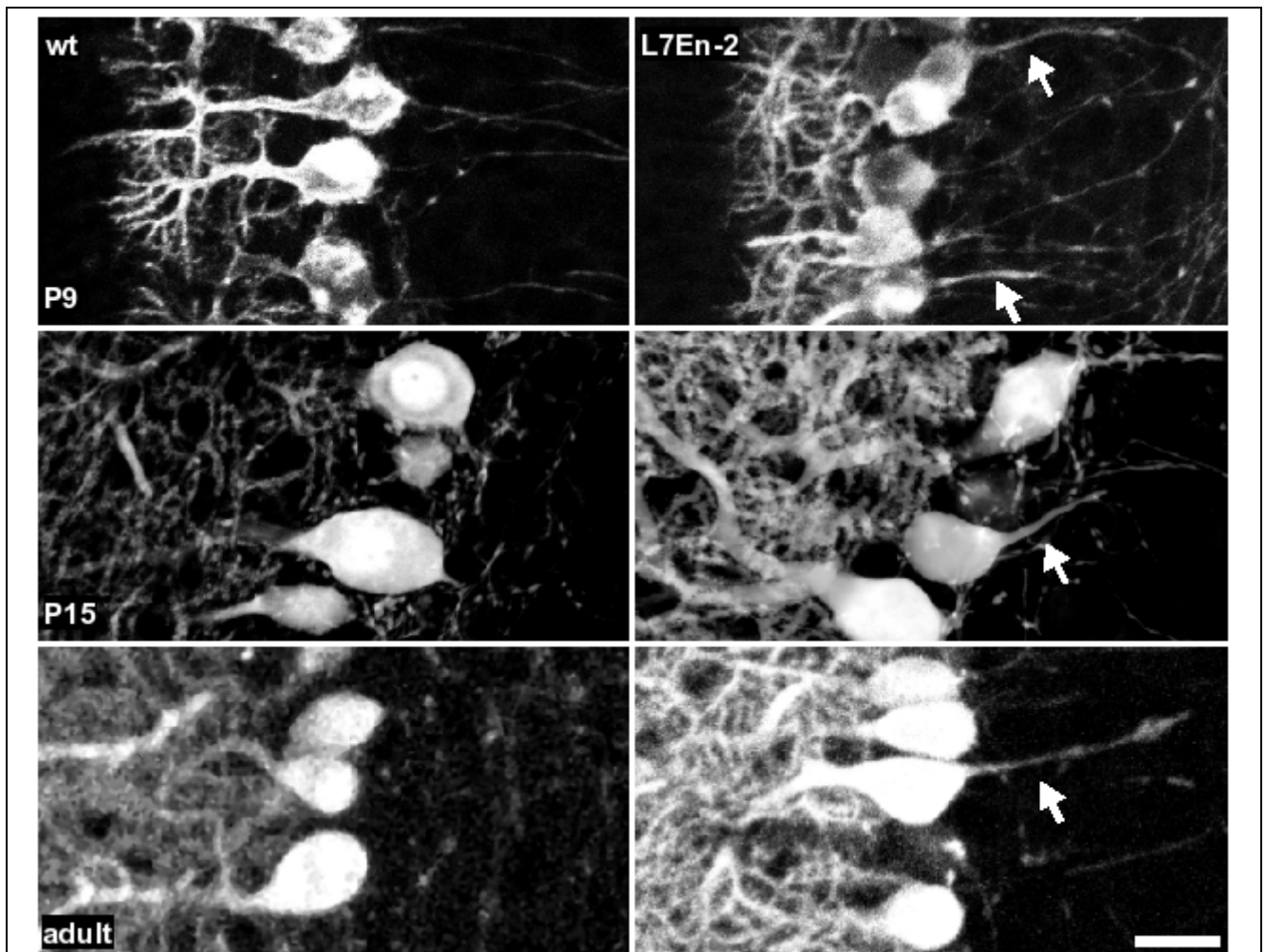


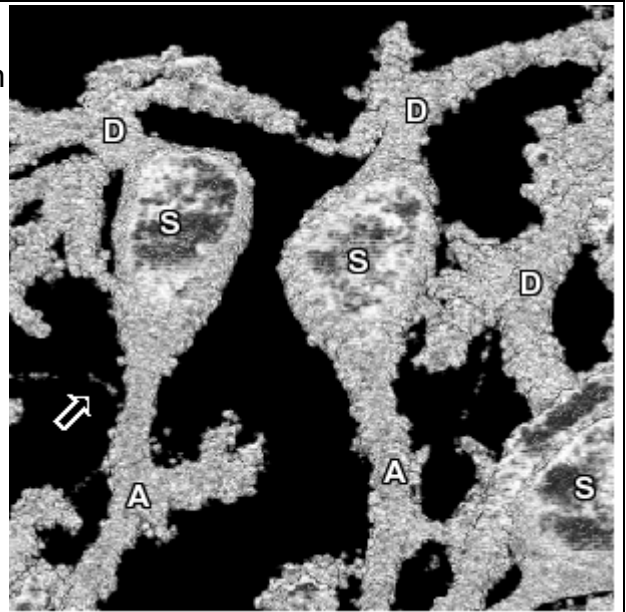
Abbildung 3.14: Proximale Axonabschnitte in Vibratomschnitten zu verschiedenen Altersstufen: in allen untersuchten Altersstufen sind im L7En-2-Tier bei einigen Purkinjezellen proximal verdickte Axonabschnitte (Pfeile) zu erkennen, ihre Anzahl nimmt mit dem Alter ab; im Wildtyp (wt) tauchen keinerlei Verdickungen am proximalen Axon von Purkinjezellen auf; CaBP-IR, Maximum- (P09/adult) bzw. Summen- (P15) Projektion von konfokalen Bilderstapeln, Balken: 20µm

### 3.3.3 Die Morphologie des proximalen Axonabschnitts von L7En-2 Purkinjezellen: eine elektronenmikroskopische Studie

In hochauflösenden lichtmikroskopischen Aufnahmen von L7En-2-Purkinjezellen in cerebellären Schnittkulturen konnte demonstriert werden, dass sich der proximale Axonanteil vieler dieser Zellen morphologisch wie ein Dendrit darstellte. Abgesehen von den schon beschriebenen Eigenschaften (Verdickung des Bereichs, seitliche Protrusionen) waren auch dornfortsatzähnliche Strukturen zu erkennen (Abbildung 3.15). Es sollte untersucht werden, ob vergleichbare Strukturen auch in vivo auftauchen und ob diese als Dornfortsätze charakterisiert werden können. Dazu wurden Dünnschnitte von Wildtyp- und L7En-2-Cerebella angefertigt und elektronenmikroskopisch ausgewertet. Die Analyse wurde an neun Tage alten Tieren durchgeführt, da für diesen Zeitpunkt eine charakteristische



Abbildung 3.15: 3D-Rekonstruktion von Purkinjezellen in cerebellären Schnittkulturen von L7En-2 Mäusen nach immunhistochemischer Färbung gegen Calabindin-D28k: der proximale Axonabschnitt (A) ist verdickt, hat seitliche Fortsätze und trägt dornfortsatzähnliche Protrusionen. Er gleicht damit morphologisch einem Dendriten (D). Als Grössenvergleich zu einem distalen Axonabschnitt ist eine rekurrente Kollaterale (Pfeil) gezeigt. Die gezeigten Somata (S) haben einen Durchmesser von 12-15  $\mu\text{m}$ .



Kompartimentierung zellulärer Organellen im Bereich des Axonhügels beschrieben ist [102], deren Ausbildung ebenfalls untersucht wurde (siehe 3.4.3.1).

Wie in vitro fielen auch in vivo bei den L7En-2-Tieren Protrusionen im Bereich des proximalen Axons auf. Diese Protrusionen waren ca. 0,3 bis wenige Mikrometer lang und wiesen teilweise eine Morphologie auf, wie sie für dendritische Dornfortsätze typisch ist (Abbildung 3.16, u.l.). Regelmäßig waren synaptische Strukturen zu erkennen (Abbildung 3.16, u.l./u.r.). Bei keiner der untersuchten Wildtypzellen wurden solche Protrusionen in diesem Teil der Purkinjezelle beobachtet.

### 3.4 Untersuchungen zur Kompartimentierung der Somata von L7En-2 positiven Purkinjezellen

Hier soll in erster Linie auf das Kompartiment S aus eingegangen werden.

#### 3.4.1 Anordnung Nissl-gefärbter Organellen

Unter Nisslfärbung werden einige histochemische Färbungen zusammengefasst, denen dasselbe Färbprinzip zugrundeliegt und die daher identische Ergebnisse liefern: ein basischer Teerfarbstoff lagert sich an im Gewebe vorhandene saure Moleküle an und färbt diese blau. Die hier vorgestellten Färbungen wurden mit Methylblau oder Kresylviolett durchgeführt. Es handelt sich bei den angefärbten Molekülen i.d.R. um Nukleinsäuren, die stärkste Färbung tritt also an Stellen auf, an denen Nukleinsäuren akkumuliert vorkommen. Im Zellkern wären das die Nukleoli, im Cytoplasma Stellen, an denen Polyribosomen oder raues endoplasmatisches Retikulum dicht gepackt vorliegen [79][8].

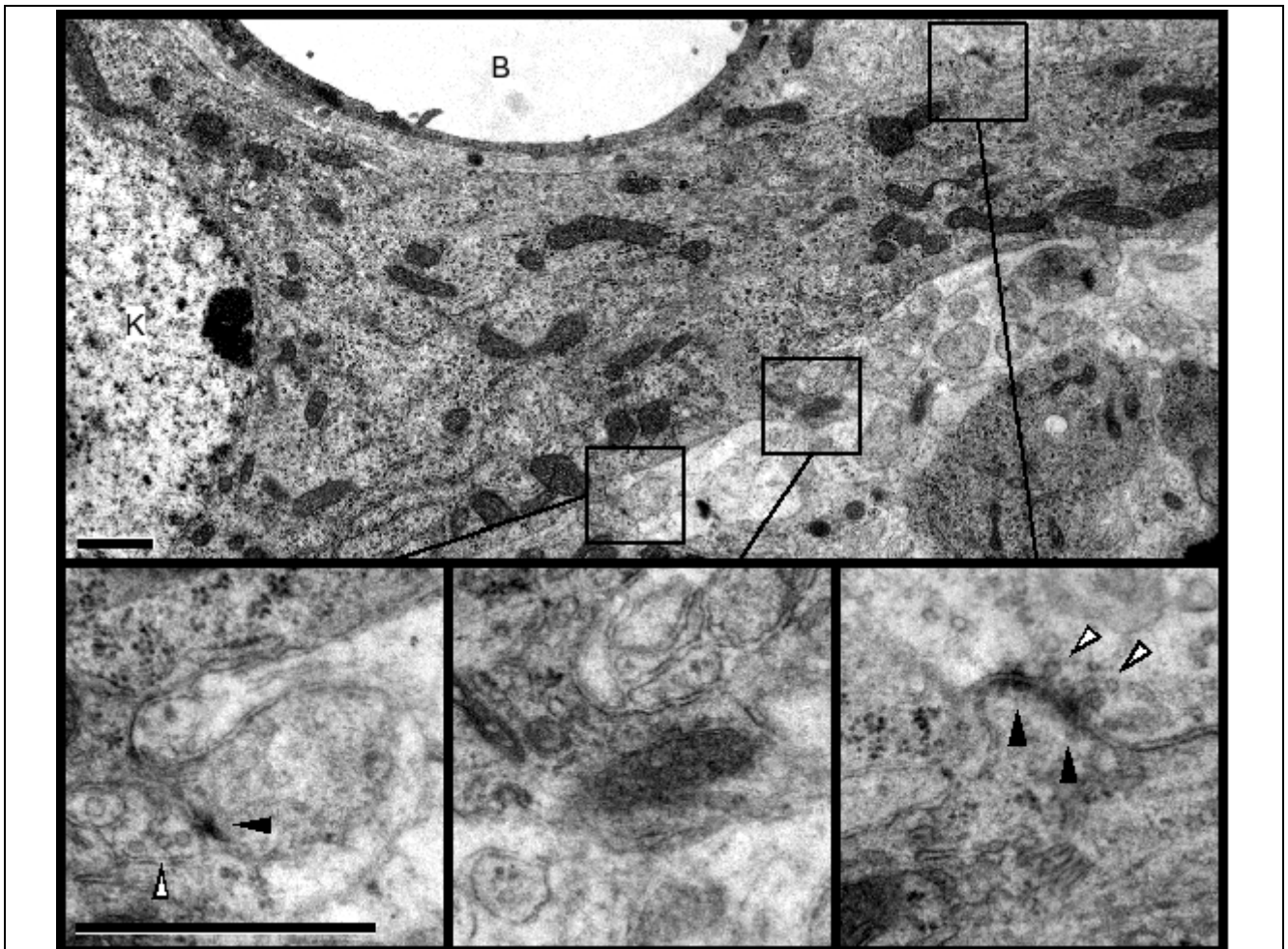


Abbildung 3.16: EM-Aufnahme von Dornfortsatz-ähnlichen Strukturen an P09-Purkinjezellen von L7En-2-Tieren: In der Übersicht ist der axonale Pol des Somas (links) mit dem proximalen Teil des Axons (rechts) dargestellt. Purkinjezellen in L7En-2-Tieren tragen in diesem Bereich oft seitliche Protrusionen. Die in den Vergrößerungen erkennbaren präsynaptischen Vesikel und postsynaptischen Dichten weisen auf das Vorhandensein von Synapsen hin. Ein Teil der Protrusionen zeigt die typische Hals-und-Kopf Struktur von dendritischen Dornfortsätzen, wie in der linken Detailaufnahme gezeigt. K: Zellkern, B: Blutgefäß, Balken: 1 $\mu$ m.

Bei der Untersuchung von Nissl-gefärbten Paraffinschnitten von P09-Tieren (2 Paare aus unterschiedlichen Würfen) fiel auf, dass die Nisslsubstanz in den Purkinjezellen der jeweiligen Wildtypiere zum grossen Teil eine charakteristische Verteilung aufwies. Der Grossteil der Substanz war am axonalen Pol der Zelle akkumuliert, i.d.R. mit einem Nissl-negativen Fleck in der direkten Nachbarschaft des Zellkerns. Bei zahlreichen Zellen war der diese Akkumulation beherbergende axonale Pol kappenförmig in die Körnerzellschicht vorgewölbt. Im Gegensatz zu der Situation im Wildtyp wies nur eine geringe Population von Purkinjezellen von L7En-2 Tieren diese Verteilung von Nisslsubstanz auf. Viel häufiger war die Nisslfärbung diffus über das Soma verteilt. Daraufhin wurden von je einem Tier auf je einem vermalen Schnitt die Purkinjezellen in 4 Kategorien eingeteilt, in Abhängigkeit von der

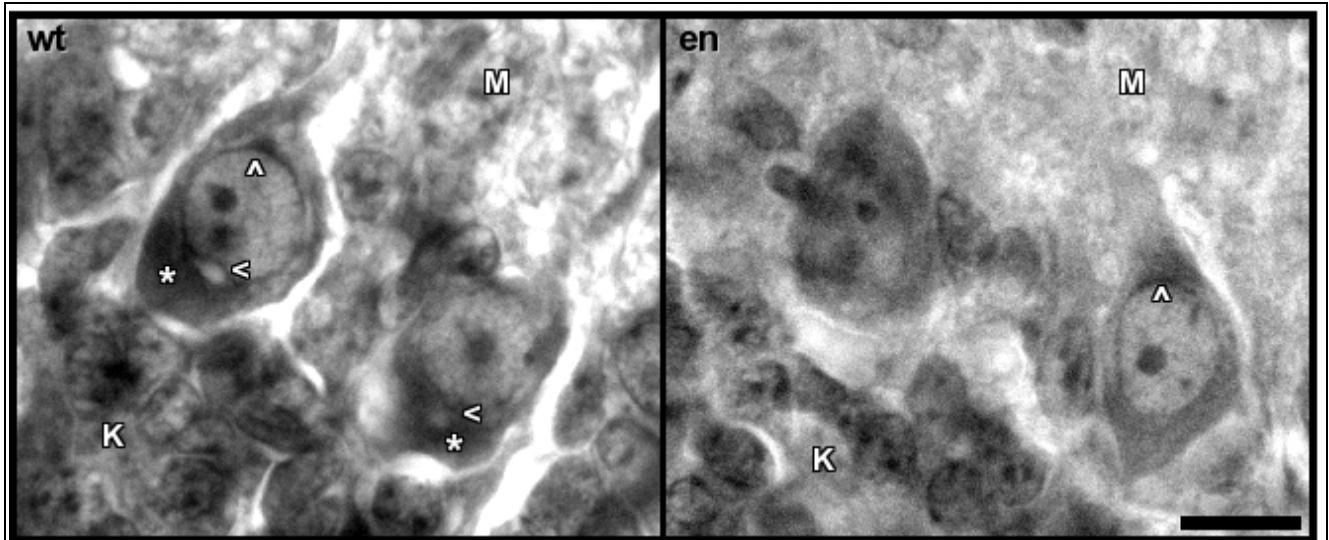
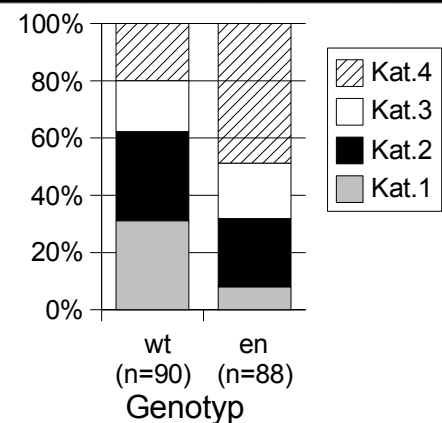


Abbildung 3.17: Nisslfärbung von Purkinjezellen an P09: im Wildtyp (wt) kann man i.d.R. eine Konzentration von Nisslsubstanz am axonalen Pol der Zelle erkennen (\*), das Zytoplasma ist an dieser Stelle oft aufgewölbt, wie bei der linken Zelle zu sehen (Kategorie 1); in die „Nisslkappe“ eingebettet findet man häufig einen hellen Fleck in unmittelbarer Kernnähe (<math>\triangleleft</math>); im L7En-2-Tier (en) fehlt i.d.R. eine deutlich ausgebildete „Nisslkappe“, Nisslsubstanz ist entweder fleckig (linke Zelle, Kategorie 3), oder diffus (rechte Zelle, Kategorie 4) verteilt; bei nahezu allen Wildtyp- und L7En-2-Zellen findet man eine unmittelbar dem Kern aufsitzende kleine Nisslverdichtung am dendritischen Pol (<math>\triangleleft</math>). Das Diagramm zeigt die Verteilung auf die in Abbildung 2.5 beschriebenen Kategorien. K - Körnerzellschicht, M - Molekularschicht, Balken: 10µm



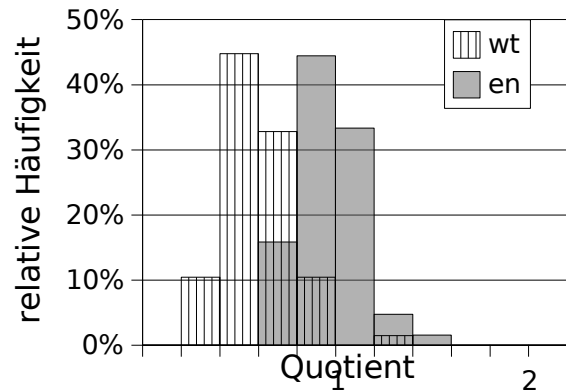
Verteilung der Nisslsubstanz (siehe 2.3.9.3 und Abbildung 2.5). Diese Auswertung bestätigte die visuell gemachten Beobachtungen. Der Vollständigkeit halber muss noch erwähnt werden, dass bei Wildtyp und L7En-2 in zentralen Anschnitten von Purkinjezellen regelmässig eine kleine Akkumulation von Nisslsubstanz am dendritischen Pol der Zelle in unmittelbarer Nähe des Kerns zu finden war. Aufgrund der geringen Grösse war die Identifizierung dieser Struktur aber unsicher und, wie erwähnt, sehr stark von der Schnittebene abhängig. Daher wurde hier auf eine weitere quantitative Auswertung verzichtet.

### 3.4.2 Die Verteilungsmuster von Zytoskelettproteinen in Purkinjezellen von Wildtyp- und L7En-2-Tieren

#### 3.4.2.1 Das Verteilungsmuster von $\beta$ 2-Spectrin

Spectrine sind Strukturproteine, die eine Rolle bei der Verbindung des Cytoskeletts mit der Zellmembran spielen. Für  $\beta$ 2-Spectrin ist das Vorkommen von 2 Isoformen in Purkinjezellen

Abbildung 3.18 Verteilung von  $\beta$ 2-Spectrin im Purkinjezellsoma in vivo: Quotient aus der  $\beta$ 2-Spectrin-Immunreaktivität am dendritischen und axonalen Pol von Purkinjezellen an P09; im Wildtyp (wt) liegt der Quotient i.d.R. deutlich unter 1, ein Zeichen für die Konzentration der  $\beta$ 2-Spectrin-Immunreaktivität am axonalen Pol; ein Quotient von ca. 1 im L7En-2-Tier (en) weist auf eine gleichmässig über das Soma verteilte Immunreaktivität hin.  $n(\text{wt})=68$ ,  $n(\text{en})=64$ , t-Test:  $\alpha < 10^{-20}$ ; zur Erläuterung siehe auch Abbildung 6.14



bekannt, von denen eine hauptsächlich in dendritischen Spines ( $\beta\text{SpII}\Sigma 1$ ) und eine andere eher im Soma lokalisiert ist ( $\beta\text{SpII}\Sigma 2$ ). Letztere Form kommt auch in Körnerzellen vor. Bisherige Untersuchungen zum Verteilungsmuster von  $\beta$ 2-Spectrin-Isoformen [103][104] haben sich auf adultes Material bzw. dissoziierte Zellkulturen konzentriert. Das hier beobachtete Verteilungsmuster ist nach diesen Beschreibungen keiner der Isoformen eindeutig zuzuordnen, sondern entspricht eher beiden Isoformen (Abbildung 6.14). Nach Herstellerangaben handelt es sich bei dem verwendeten Antikörper allerdings um einen, welcher die Isoform  $\beta\text{SpII}\Sigma 1$  erkennt.

Es wurden Schnittserien zweier Geschwisterpaare von P09-Tieren untersucht. Beide Paare zeigten bei mikroskopischer Betrachtung den hier beschriebenen Phänotyp. Für die Messungen wurden von einem der Paare aus je einem vermalen Schnitt 4 sich entsprechende Regionen ausgewertet.

In Wildtyp-Präparaten von P09 fällt eine starke Konzentration der Immunreaktivität am axonalen Pol von Purkinjezellen auf. Diese Konzentration fehlt in L7En-2-Purkinjezellen,  $\beta$ 2-Spectrin erscheint hier eher diffus über das Soma verteilt (Abbildung 3.18, 6.14). Auch wenn nicht genau geklärt werden kann, um welche Isoform es sich handelt, kann gezeigt werden, dass hier ein membranassoziierter Bestandteil des Zytoskeletts im L7En-2-Tier eine deutlich andere Verteilung in der Zelle aufweist als im Wildtyp.

### 3.4.2.2 Das Verteilungsmuster von $\beta$ III-Tubulin

$\beta$ III-Tubulin ist ein neuronenspezifischer Grundbaustein von Mikrotubuli, der in der Regel in den Mikrotubuli von differenzierenden Zellfortsätzen eingebaut wird [105][106]. An je 3 kultivierten Schnitten (P00, 14 DIV) aus einem Wildtyp- und einem L7En-2-Tier wurde die Immunreaktivität für  $\beta$ III-Tubulin zunächst visuell untersucht. Für den Wildtyp und L7En-2 wurden daraufhin je 5 Zellen (alle Stadium III, siehe Kapitel 2.3.10.5) repräsentativ ausgewählt, die hochauflösend konfokal dargestellt wurden.

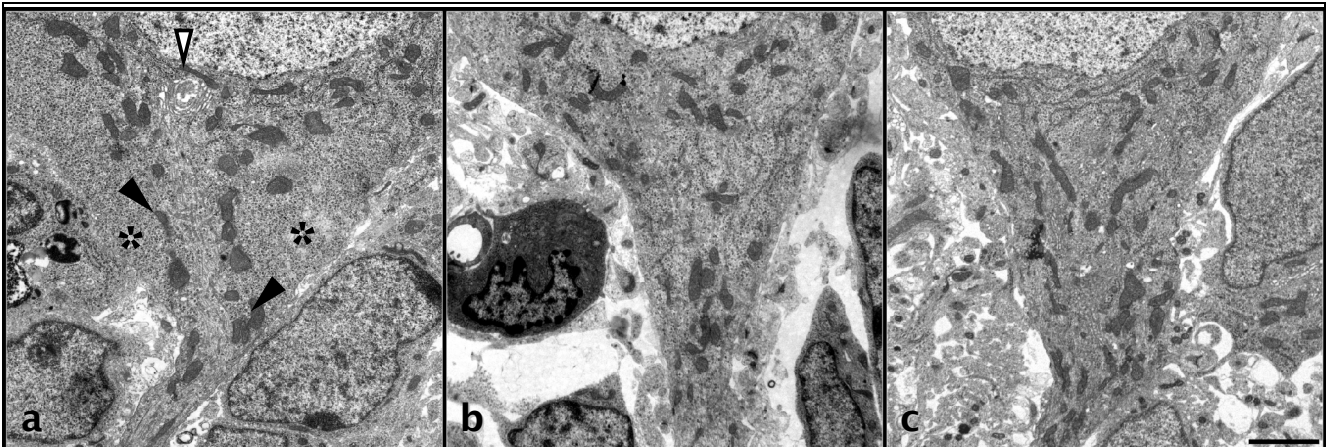


Abbildung 3.19: Kompartimentierung des axonalen Pols von P09-Purkinjezellen in EM-Aufnahmen: a) das Soma einer Wildtyp-Purkinjezelle weist am axonalen Pol eine deutliche Kompartimentierung auf: ausgehend von einem paranukleär gelegenen Golgistapel (weisse Pfeilspitze) zieht sich ein Schlauch aus Mitochondrien (schwarze Pfeilspitzen) bis zum Axon; innerhalb dieses Schlauches befinden sich zahlreiche Neurofilamente und Mikrotubuli; Gesäumt wird der Schlauch von akkumulierten Ribosomen (\*). b) Am axonalen Pol von L7En-2-Purkinjezellen findet sich eine solche Anordnung von Organellen nicht; der axonale Pol ist eher vergleichbar mit dem dendritischen Pol von Purkinjezellen dieses Alters, wie er in c) dargestellt ist (dieselbe Zelle wie in a, gegenüber a um 180° gedreht); Balken: 2µm.

Aufgrund der sehr geringen Anzahl von Proben, die untersucht wurden, können (und dürfen) die in diesem Abschnitt beschriebenen Ergebnisse nicht eigenständig interpretiert werden. Da sie sich aber sehr gut in den Kontext der mit anderen Methoden gewonnenen Ergebnisse einfügen, werden sie der Vollständigkeit halber hier aufgeführt.

In den Wildtypzellen ist die  $\beta$ III-Tubulin-IR auf die Dendriten konzentriert, das Soma ist nur schwach immunreaktiv. Außer bei einer der untersuchten Zellen weist das Axon, auch proximal, keine Färbung auf. Im Gegensatz dazu erzeugt  $\beta$ III-Tubulin in den untersuchten L7En-2-Purkinjezellen im Soma und sämtlichen Fortsätzen ein Immunsignal (siehe Abbildung 6.15).

### 3.4.2.3 Das Verteilungsmuster von Ankyrin G

Zur Biologie von Ankyrin G und zum verwendeten Antikörper siehe 3.2.2.

Da Ankyrin G im Soma und in den Dendriten keine Funktion ausübt, zeigte die in diesen Bereichen beobachtete Immunreaktivität vermutlich die Transportwege vom Synthese- zum Funktionsort. Darauf wiesen auch das schlierenförmige Verteilungsmuster und der Ankyrin G-negative Zytoplasmasaum unterhalb der Zellmembran hin. Der Zellkern war immer als Ankyrin G-freie Entität in der Zelle identifizierbar (Abbildung 6.6,\*). Bei den meisten Wildtyp-Purkinjezellen konnte man in vitro am axonalen Pol in direkter Nähe des Axonabgangs einen zusätzlichen Ankyrin G-negativen Bereich erkennen, der sich aus dem Ankyrin G-freien Zytoplasmasaum buckelförmig in die Zelle vorwölbte (Abbildung 6.6, wt:a,b). Eine solche

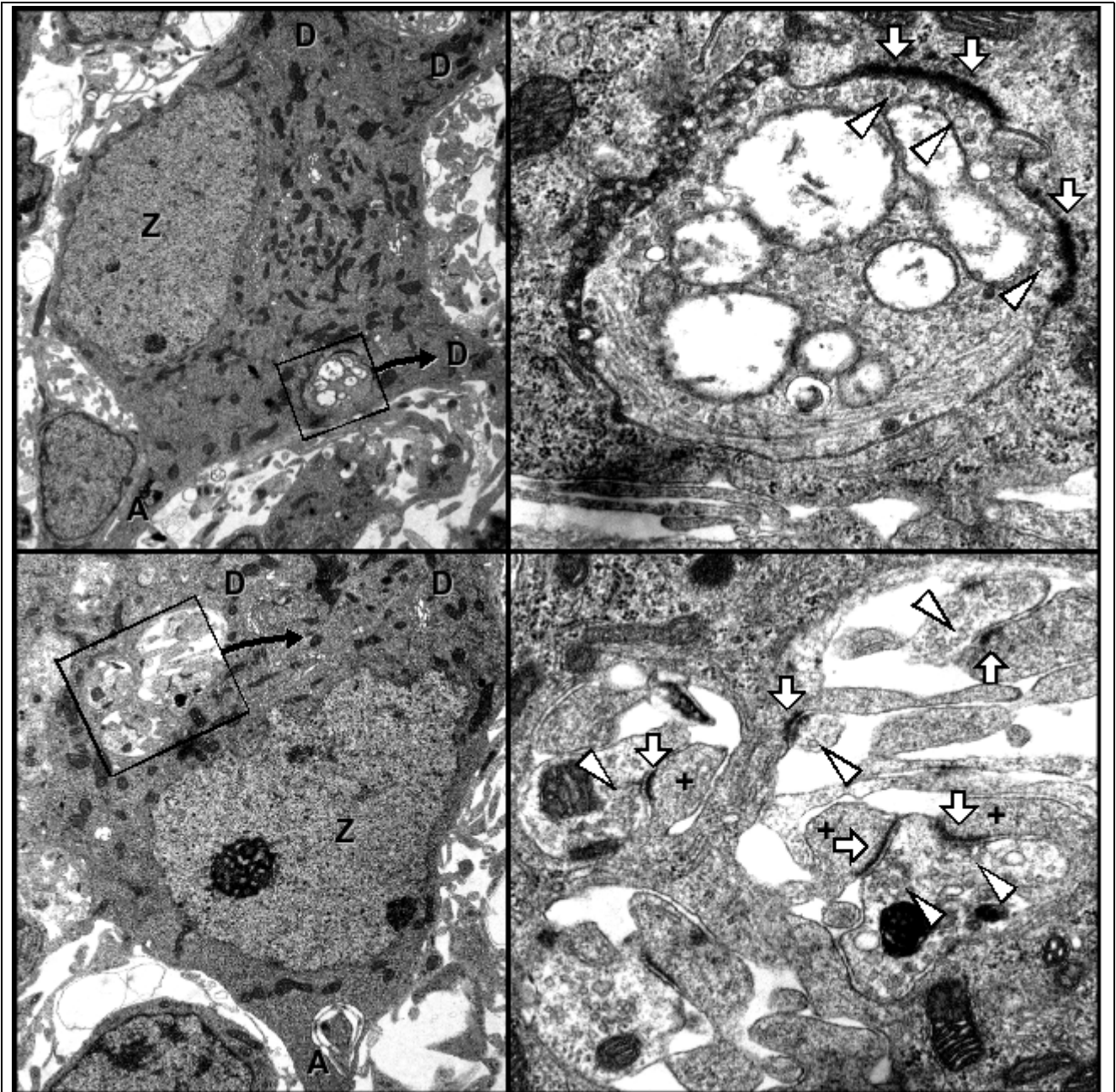


Abbildung 3.20: Intrusionen in Purkinjellsomata von L7En-2-Tieren an P09: an den Intrusionen sind i.d.R. Synapsen zu beobachten, wobei sich die postsynaptische Dichte (Pfeile) immer auf Seiten der Purkinjelle befindet, wogegen im gegenüberliegenden Bereich des in die Intrusion eingewachsenen Zellfortsatzes immer synaptische Vesikel zu erkennen sind (Pfeilspitzen). In der unteren Vergrößerung ist auch zu erkennen, dass die postsynaptischen Dichten teilweise auf Fortsätzen der Purkinjelle liegen, die sich Spine-ähnlich in die Intrusion vorwölben (+). A: Axonabgang, D: Dendritenabgang, Z: Zellkern.

Aussparung in der Ankyrin G-IR wurde bei keiner Purkinjelle aus L7En-2-Kulturen beobachtet.

### **3.4.3 Ultrastruktur von Purkinjzellsomata**

#### **3.4.3.1 Die Aufhebung der Zellkompartimentierung in L7En-2 positiven Purkinjzellen an P09**

Während der Entwicklung von Purkinjzellen gibt es eine Phase, während der im Übergangsbereich zwischen Soma und Axon eine definierte Kompartimentierung vorliegt. Bei Ratten beginnt sich diese ab P03 zu entwickeln und ist bis nach P10 nachzuweisen [102]. Die Zellen weisen dabei dieselbe Ultrastruktur auf, wie sie in Abbildung 3.19a für Wildtypmäuse beschrieben ist. Zentraler Bestandteil dieser Strukturierung sind von Mitochondrien umgebene Bündel aus Neurofilamenten und Mikrotubuli, welche sich von einem in der Kernperipherie liegenden, dem Axon zugewandten Golgistapel bis in das proximale Axon hinein erstreckt. Flankiert wird das Ganze von einem Bereich, in dem außer freien Ribosomen nahezu keine anderen Strukturen erkennbar sind. In den L7En-2 Tieren fehlte die beschriebene Kompartimentierung. Der ultrastrukturelle Bau des somatoaxonalen Übergangs ähnelte hier einem somatodendritischen Übergang (Abbildung 3.19b, c).

#### **3.4.3.2 Veränderungen der Purkinjzelloberfläche in L7En-2 Tieren**

Neben der fehlenden Kompartimentierung konnten bei der Untersuchung der EM-Präparate von L7En-2-Purkinjzellen aus P09-Tieren in vielen Anschnitten von Purkinjzellsomata Intrusionen erkannt werden, welche an kleine, umgestülpte Dendriten mit zahlreichen Synapsen erinnerten. Diese waren an den postsynaptischen Dichten auf Purkinjzellseite und seitens der jeweils anderen Zelle an dem Vorhandensein von Ansammlungen präsynaptischer Vesikel zu erkennen (Abbildung 3.20). Solche Strukturen wurden bei keiner der untersuchten Wildtyp-Zellen beobachtet. Bei grösseren Intrusionen waren Strukturen zu erkennen, die sich von der Purkinjzelle in die Intrusion vorwölbten (Abbildung 3.20, unten). Diese Strukturen trugen Postsynapsen und zeigten i.d.R. eine typische Unterteilung in Kopf und Hals. Sie konnten daher morphologisch als Dornfortsätze klassifiziert werden.

### **3.5 Untersuchungen zur Expression von parasagittalen Markern im Kleinhirnkortex von Wildtyp und L7En-2 Mäusen**

Neben der Untersuchung der Wirkung der Engrailed-2 Überexpression in Purkinjzellen auf die Morphologie der Purkinjzellen selbst, wurde in einem zweiten Projekt die Wirkung auf die parasagittale Kompartimentierung des Kleinhirns untersucht. Vorangegangene Experimente [80] hatten Hinweise auf eine Veränderung parasagittaler Muster im Kleinhirn von L7En-2-Mäusen geliefert.

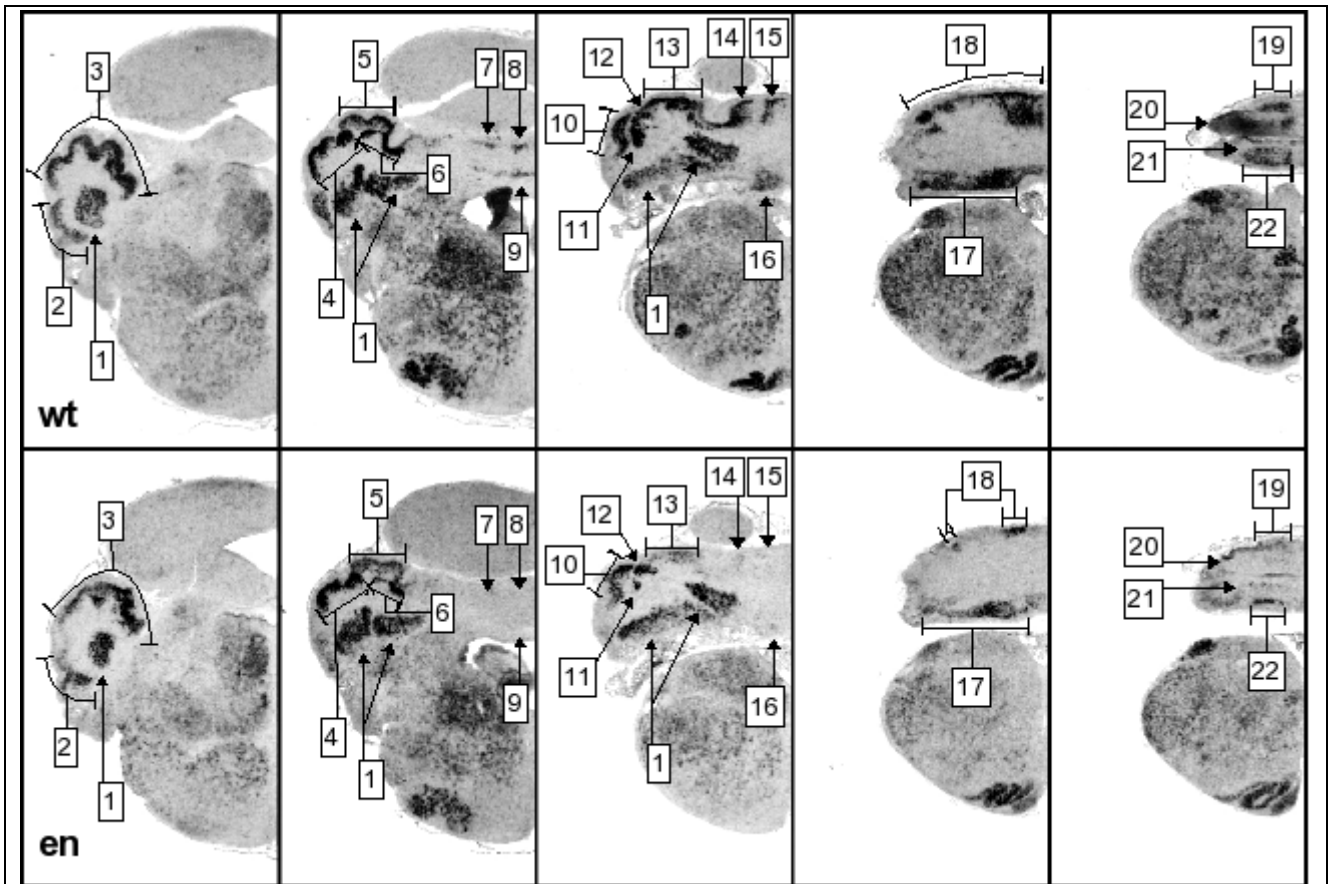


Abbildung 3.21: EphA4-Expression in P00-Frontalschnitten: das RNA-Signal ist bei beiden Genotypen im Kleinhirn auf die Purkinjzellschicht und die tiefen Kerne (1) begrenzt. In der Purkinjzellschicht kann man parasagittale Banden erkennen, die vor allem im rostralen Bereich der Hemisphären in den Wildtyp- (wt) und L7En-2-Schnitten (en) mehr oder weniger vergleichbar ausgeprägt sind (2-6, 10-13). In der rostralen Vermis sind dagegen im Wildtyp Banden sichtbar, die nicht mit Banden im L7En-2-Tier korreliert werden können (7-9, 14-16), auch unter Berücksichtigung der Intensitätsunterschiede in der Färbung. Unterschiede fallen auch im kaudalen Bereich auf: während im ventralen Lobus 9 (17, 22) vergleichbare EphA4-positive Banden in beiden Genotypen erscheinen, fehlt im L7En-2-Tier die EphA4-Expression im dorsalen Lobus 9 (21) und im darüberliegenden Lobus 8 (19, 20). Die im Wildtyptier durchgehende Expression im Lobus 7 und lateral davon (18) ist im L7En-2-Tier auf 2 schmale Banden reduziert, die durch ein EphA4-negatives Areal getrennt sind. v.l.n.r.: von rostral nach kaudal.

Die Expressionsmuster von 3 Markern wurden mittels In situ Hybridisierung bei neugeborenen Mäusen untersucht. Dabei stand für die Untersuchung von *wnt7B* und *ephrinA2* je ein Paar Tiere zur Verfügung, für die Untersuchung der EphA4-Expression wurden 2 Paare aus unterschiedlichen Würfen bearbeitet. Bei der Betrachtung der Abbildungen muss berücksichtigt werden, dass die Färbequalität innerhalb einer Schnittserie sehr heterogen war. Daher können hier keine quantitativen Aussagen über die Stärke einer Expression getroffen werden, sondern es sollte lediglich qualitativ untersucht werden, wo ein Marker exprimiert wird und wo nicht. Man kann die Signalstärke der Banden im Kleinhirn allerdings einigermaßen beurteilen, wenn man die Färbeintensität der tiefen Kleinhirnerne



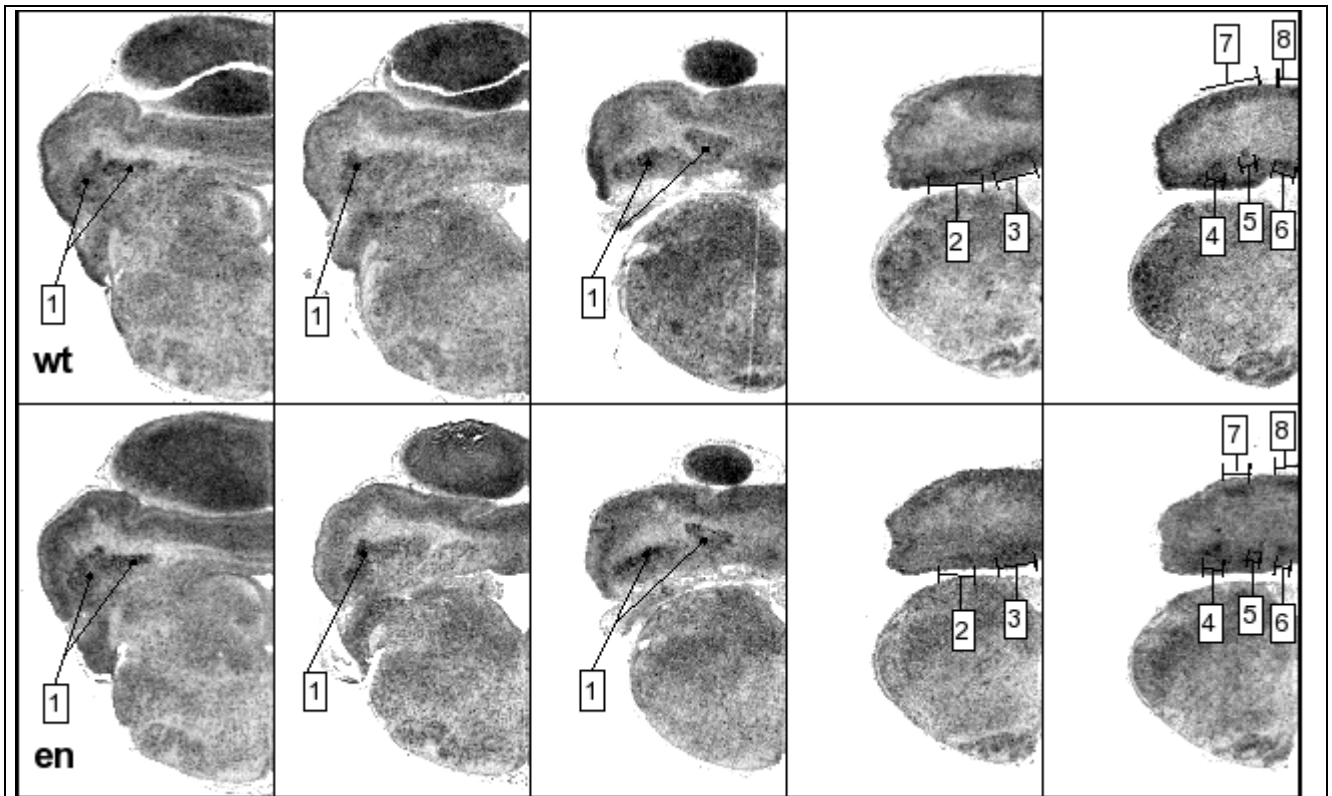


Abbildung 3.22: ephrinA2-Expression in P00-Frontalschnitten: das ephrinA2-ISH-Signal ist mehr oder weniger diffus im Kortex und in den tiefen Kernen des Kleinhirns verteilt, wobei das Signal in den tiefen Kernen etwas intensiver ist (1). Dort wo im Kortex des Wildtypieres (wt) leichte Verdichtungen des Signals erkennbar sind (vor allem kaudal), treten diese mit einem vergleichbaren Muster auch im L7En-2 Tier (en) auf (2-8). Dabei waren die Banden im dorsalen Bereich (7,8) im untersuchten L7En-2 Tier deutlicher abgrenzbar als im Wildtypier. v.l.n.r.: von rostral nach kaudal.

bzw. des Hirnstamms als Referenz nimmt. Die Expression der untersuchten Marker sollte in diesen Strukturen keine Unterschiede zwischen Wildtypier und L7En-2-Tier aufweisen. Auf den Abbildungen ist immer nur eine Gehirnhälfte abgebildet, da die Verteilungsmuster bei allen untersuchten Schnitten links und rechts identisch waren<sup>17</sup>.

### 3.5.1 Verändertes Expressionsmuster von EphA4 im Kleinhirn von L7En-2-Mäusen

EphA4 ist ein Transmembranprotein aus der Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Als Liganden fungieren Ephrine. Hierbei kann EphA4 alle Ephrine der A-Klasse binden (ephrinA1-5, membranständig über GPI-Anker) sowie ephrinB2 und ephrinB3 (B-Klasse Ephrine, Transmembranproteine) [107]. Die Gene der Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden stehen unter der Kontrolle von Homeobox-Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Engrailed oder Wnt [108]. Daraus ergibt sich das Interesse an der Untersuchung des Eph-Ephrin-Systems im Zusammenhang mit der Engrailed-2-Überexpressionsmutante L7En-2.

<sup>17</sup> Das gilt selbstverständlich mit der Einschränkung, dass linke und rechte Hälfte eines Schnittes Präparation und Färbevorgang in demselben Erhaltungszustand überstanden haben.

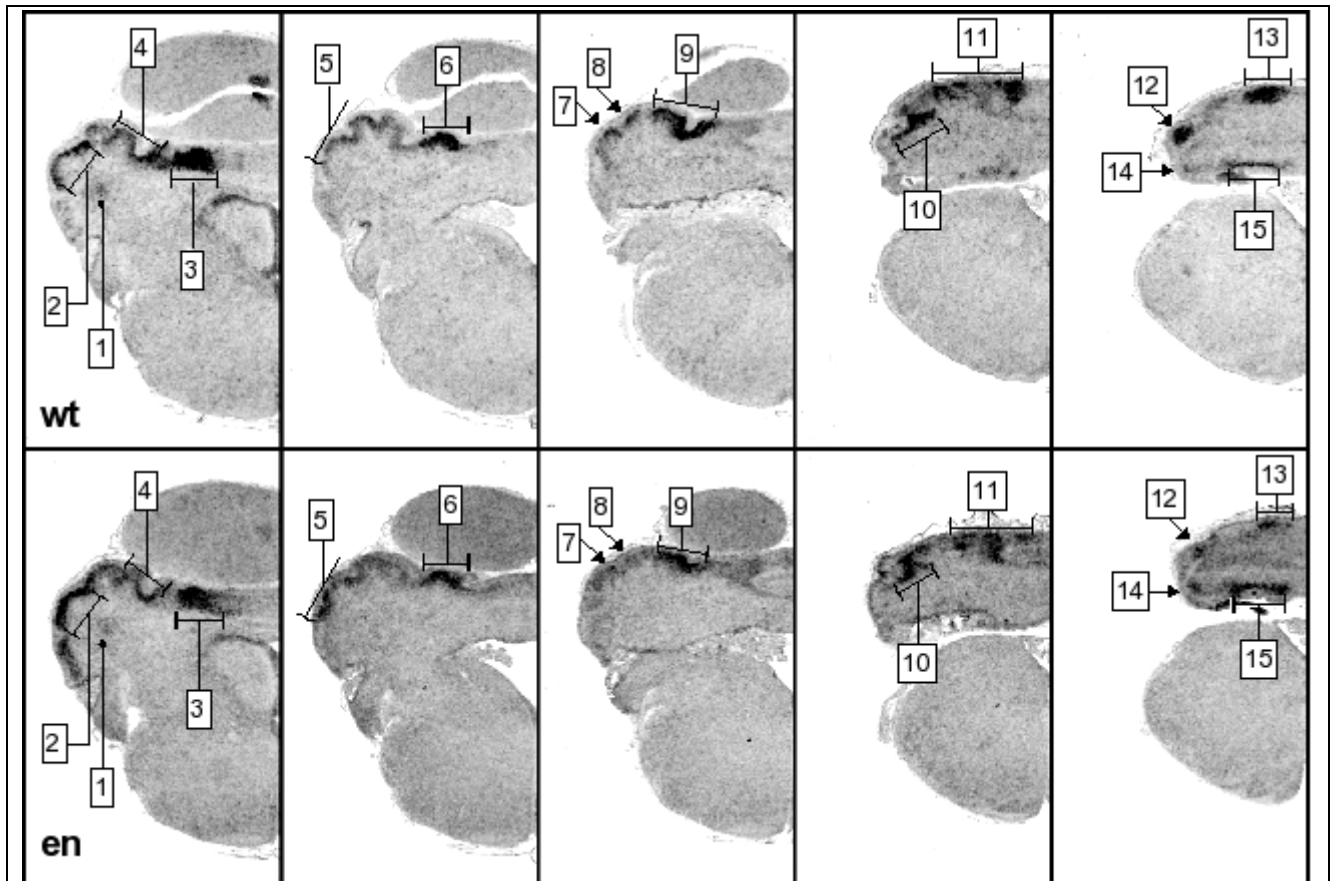


Abbildung 3.23: Wnt7b-Expression in P00-Frontalschnitten: ausser einer schwachen Expression in einem Anteil der tiefen Kerne (1) ist die *wnt7B*-Expression im P00-Kleinhirn auf die Purkinjezellschicht beschränkt. Im vorderen Bereich des Kleinhirns lassen sich die Bandenmuster im Grossen und Ganzen vom Wildtyp (*wt*) auf das L7En-2-Tier übertragen (2-7,9-11), wenngleich bei L7En-2 vereinzelte Banden nicht scharf abgrenzbar erscheinen (8). Die Verschiebung der unter 11 zusammengefassten Muster kann damit erklärt werden, dass aus diesem Bereich des Kleinhirns keine korrespondierenden Schnitte zur Verfügung standen, der *wt*-Schnitt liegt im Verhältnis zum *en*-Schnitt etwas weiter kaudal. Im äussersten kaudalen Bereich fällt auf, dass sich im Wildtyp dorsal 2 stark *wnt7b*-exprimierende Banden befinden, die im L7En-2-Tier nur schwach ausgeprägt sind (12, 13), während es sich mit den beiden ventralen Banden genau umgekehrt verhält (14, 15); v.l.n.r.: von rostral nach kaudal.

EphA4 ist im Zusammenspiel mit seinen Ephrin-Liganden an Musterbildungsprozessen in verschiedenen Hirnregionen, u. A. in der frühen Entwicklung des Kleinhirns, sowie an Zellmigration und axonaler Wegfindung beteiligt [4]. Ausserdem spielt EphA4 eine Rolle bei der Bildung von Dornfortsätzen [109] und wird bekanntermassen in cerebellären Purkinjezellen exprimiert [110].

In der Expression von EphA4 traten an P00 deutliche Unterschiede auf, wobei diese in den Hemisphären kaum zu bemerken waren. Im rostralen Bereich waren hier alle Banden im L7En-2 Tier im gleichen Muster und in der gleichen Ausdehnung zu finden wie im Wildtypier (Abbildung 3.21, 2-6), weiter kaudal blieb zumindest das Muster erhalten (Abbildung 3.21, 10-13). Im äussersten kaudalen Bereich fiel in Wildtypgehirnen eine Bande auf, die sich

durchgehend über Vermis und Hemisphäre erstreckte und welche in L7En-2-Tieren unterbrochen war (Abbildung 3.21, 18), sodass in dieser Region im Gegensatz zum Wildtyp-Tier mehrere Banden identifizierbar waren.

Im Vergleich zu den Hemisphären traten die Unterschiede zwischen Wildtyp- und L7En-2-Tieren in der Vermis deutlicher zutage. Viele der im Wildtyp-Tier z.T. sehr stark ausgeprägten Banden waren im L7En-2-Tier nur sehr schwach ausgeprägt (Abbildung 3.21, 17, 19, 21, 22). Banden, die im Wildtyp-Tier weniger stark gefärbt waren, fehlten im L7En-2-Tier i.d.R. völlig (Abbildung 3.21, 7 - 9, 15, 16). Auch hier waren die Unterschiede im kaudalen Bereich besonders auffallend, da hier auch im Wildtyp-Tier stark exprimierte Banden im L7En-2-Tier nicht zu erkennen waren (Abbildung 3.21, 14, medialer Anteil von 18, 20; alle geschilderten Unterschiede wurden in dieser Form in beiden untersuchten Paaren festgestellt). Die beschriebenen Ergebnisse bestätigten damit vergleichbare Beobachtungen aus einer vorangegangenen Untersuchung [80].

### **3.5.2 Identisches Expressionsmuster von ephrinA2 im Kleinhirn von Wildtyp- und L7En-2 Mäusen**

Auf die Gründe für ein Interesse am Eph-Ephrin-System im Zusammenhang mit der Engrailed-2-Überexpressionsmutante wurde im vorangegangenen Abschnitt schon eingegangen. Als Vertreter der Ephrin-Liganden wurde ephrinA2 ausgewählt, weil zum Einen eine dem Engrailed-2 Muster ähnliche Expression im Kleinhirn beschrieben ist [4], zum Anderen, weil auch hier ein Zusammenhang mit axonaler Wegfindung bei der Ausbildung topografischer Verschaltungsmuster bekannt ist [111].

In der Expression von ephrinA2 wurde kein Unterschied zwischen Wildtyp-Tier und Engrailed-2-Tier festgestellt (Abbildung 3.22). Das Signal war mehr oder weniger diffus über den ganzen Kortex verteilt, lediglich im kaudalen Bereich liessen sich bei beiden Genotypen einige stärker gefärbte Banden abgrenzen. Zwar liessen sich diese Banden im L7En-2-Tier prägnanter darstellen als im Wildtyp-Tier (Abbildung 3.22, 4-6, 8), es konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hier um einen Färbeartefakt gehandelt hat.

### **3.5.3 Verändertes Expressionsmuster von wnt7B im Kleinhirn von L7En-2-Mäusen**

Wnt7B gehört, wie Engrailed, zu den Segmentpolaritätsgenen. Es sind zahlreiche Interaktionen zwischen wnt-Genprodukten und den engrailed-Genprodukten beschrieben, die für eine gegenseitige Regulation von Transkriptionsfaktoren aus diesen beiden Gruppen sprechen [32][68][112][113][31]. Darüberhinaus gibt es Hinweise auf einen Einfluss von Wnt auf axonale Wegfindung [114]. Für die hier vorgestellte Untersuchung wurde Wnt7b gewählt,

da es im Kleinhirn in einem parasagittalen Muster exprimiert wird, welches normalerweise komplementär zum Engrailed-2 Muster ist [23].

Das Signal der wnt7b-Sonde erzeugte klar abgrenzbare Banden im Kleinhirnkortex. Diese Banden zeigten in Wildtyp- und L7En-2-Tieren im vorderen Bereich ein vergleichbares Muster (Abbildung 3.23, 1-11). Unterschiede in der Expression von Wnt7B waren allerdings im kaudalen Bereich erkennbar. Es war zwar kein Unterschied im Bandenmuster an sich zu erkennen, aber die Expression war in verschiedenen Banden unterschiedlich stark<sup>18</sup> (Abbildung 3.23, 12-15). Während im Wildtyp-Tier die dorsalen Banden (12, 13) deutlich stärker exprimiert waren als die ventralen (14, 15), war im L7En-2 Tier das genaue Gegenteil der Fall. Abgesehen von dem geschilderten Unterschied im kaudalen Bereich unterschied sich auch die Stärke der Expression von wnt7B zwischen den beiden Genotypen nur marginal.

---

<sup>18</sup> In diesem speziellen Fall kann man durchaus auch die Stärke des Signals vergleichend beurteilen, da im wt stark exprimierende Banden im en schwach ausgeprägt sind und umgekehrt. Würde es sich um einen färbetechnisch bedingten Unterschied handeln, müssten alle Banden im wt im Verhältnis zum en im selben Maße stärker oder schwächer ausgeprägt sein.

## 4 Diskussion

### 4.1 Organotypische cerebelläre Schnittkulturen als Modellsystem für Untersuchungen zur Rolle von Engrailed-2 bei der Axono- und Dendritogenese

Cerebelläre Schnittkulturen sind ein häufig genutztes System zur Untersuchung von Entwicklungsvorgängen im Kleinhirn (z.B. [45][115][42]). Fragestellungen zur Entwicklung von Purkinjezellaxonen bzw. deren Regeneration wurde hierbei ebenso untersucht [21][19] wie zu Mechanismen der Dendritogenese [116][117]. Je nach Kulturbedingungen stirbt ein großer Teil der Purkinjezellen im Laufe der Kultivierung der Schnitte ab. Dadurch hat man eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Zellen soweit vereinzelt sind, dass sich die Morphologie einzelner Zellen gut auflösen lässt. Dies ist in situ kaum möglich, da bei dünnen Schnitten (<20µm) eine Purkinjezelle inklusive ihres vollständigen Dendritenbaumes nie vollständig auf einem Schnitt erhalten ist, und weil bei dickeren Schnitten (>30µm) die Dendritenbäume benachbarter Zellen stark überlappen. Einen zweiten Vorteil von Kulturen stellt die Begrenzung der Wuchsrichtung von Zellfortsätzen auf gewissermaßen zwei Dimensionen dar. Die zunächst einmal ca. 350µm dicken, kultivierten Schnitte flachen durch den oben erwähnten Verlust von Zellen, durch Wachstums- und Wanderungsprozesse und letzten Endes auch durch die Schwerkraft im Kulturverlauf stark ab<sup>19</sup>. Durch diese Abflachung in vertikaler Richtung verbleiben die Dendriten in einer etwa 50-100 µm dicken Schicht, in der sie mittels konfokaler Mikroskopie sehr gut als Gesamtstruktur dargestellt werden können. Für regenerative Prozesse haben Schnittkulturen den Vorteil, dass sowohl die Ausgangszelle (Purkinjezelle) von läsierten Axonen als auch die Zielzelle (Neurone der tiefen Kerne) auf einem Schnitt lokalisiert sind. Auch wenn hier keine Vorgänge auf der Ebene der Verschaltung einzelner Neurone aufgelöst werden können, so ist doch eine grobe topografische Zuordnung möglich. Ein wichtiger genereller Vorteil von Zellkultursystemen ist ihre Zugänglichkeit für Manipulationen jeglicher Art: pharmakologisch, molekularbiologisch oder mechanisch. Im vorliegenden Fall wurden cerebelläre Schnittkulturen eingesetzt, um definierte Läsionen im Verlauf von Purkinjezellaxonen setzen und den Verlauf regenerierender Fasern nachvollziehen zu können. Vergleichbare Experimente sind aus der Literatur bekannt [21]. Ein letzter, aber für diese Arbeit zentraler Punkt ist die zwangsläufige Veränderung extrinsischer Faktoren in cerebellären Schnittkulturen. Allein durch die Präparation des Gewebes für die Herstellung der Kulturen werden die Meningen entfernt, sowie die Moos- und Kletterfasern durchtrennt. Für die Meningen und die Moosfasern ist

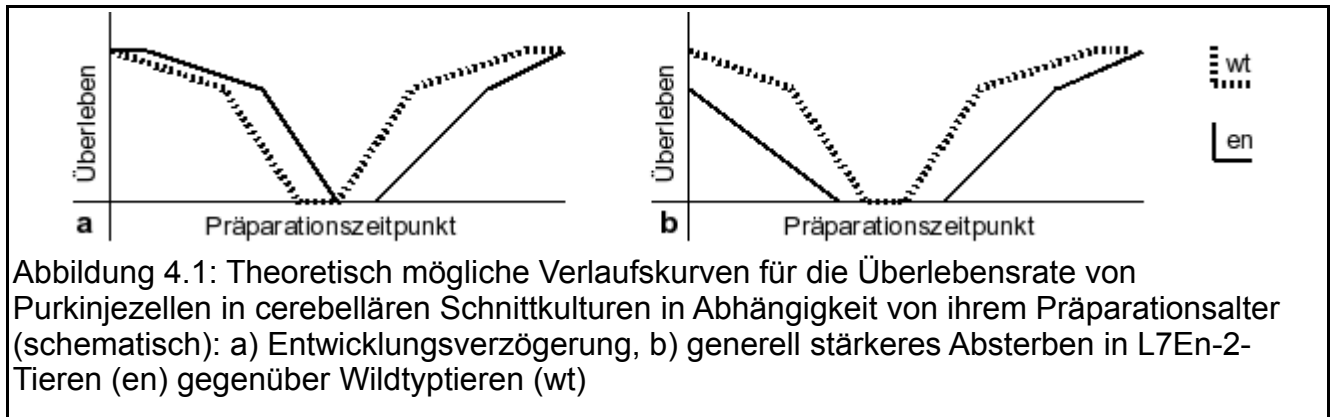
---

<sup>19</sup> bei gleichzeitiger leichter Flächenzunahme, alles eigene, nicht genau quantifizierte Beobachtungen

bekannt, dass sie zumindest indirekt Einfluss auf die Purkinjzellentwicklung nehmen können. Von den Meningen sezernierte Stoffe beeinflussen das Wachstum von Bergmannglia [118] und nehmen möglicherweise auch direkten Einfluss auf das Purkinjzellwachstum [6]. Moosfasern stellen die Hauptafferenzen der Körnerzellen dar und haben in L7En-2-Mäusen ein verändertes Innervationsmuster [35]. Sowohl Bergmannglia als auch Körnerzellen werden als Modulatoren in der Purkinjzelldifferenzierung diskutiert und spielen eine Rolle bei der Ausbildung des Dendritenbaumes [46]. Dasselbe gilt für die Kletterfasern. In cerebellären Schnittkulturen sind die genannten Zellen bzw. Fasersysteme nicht vorhanden oder anders ausgeprägt, sodass deren Einfluss auf die Purkinjzellentwicklung nicht zum Tragen kommt. Vor diesem Hintergrund muss man von einer doch recht massiven Einflußnahme auf die direkte Umgebung der Purkinjzellen ausgehen. Das bedeutet aber auch, dass zelluläre Effekte, die in vivo und in vitro ähnlich ablaufen, zu einem Großteil intrinsisch reguliert sein müssen [119][120].

Abgesehen von den Vorteilen gibt es bei einem in vitro System aber auch eine Reihe von Veränderungen, die im einzelnen nicht vorhersehbar sein können. Bei dissoziierten Kulturen von Purkinjzellen ist es beispielsweise bekannt, dass diese eine abweichende Morphologie besitzen, die sich in einem weitgehenden Verlust des normalerweise streng bipolaren Zellaufbaus äußert [121][17]. Aus diesem Grund muss zunächst geprüft werden, ob cerebelläre Schnittkulturen für die in dieser Arbeit anstehenden Fragestellungen ein geeignetes System darstellen. Um cerebelläre Schnittkulturen als geeignetes Untersuchungssystem im Rahmen dieser Arbeit zu validieren, wurde überprüft, ob aus in vivo Studien bekannte Veränderungen in der Reifung von L7En-2-Purkinjzellen [67] in Kultur rekapituliert werden.

Für die Parameter, welche den morphologischen Reifezustand von Purkinjzellen beschreiben (Somagröße, Ausprägung des Dendritenbaums), und für die Parvalbuminexpression konnte gezeigt werden, dass Veränderungen, die durch die Engrailed-2-Überexpression hervorgerufen werden, in cerebellären Schnittkulturen rekapituliert werden. Die genannten Parameter spiegelten sowohl in vivo als auch in vitro die verzögerte Entwicklung von L7En-2-Purkinjzellen wider. Allerdings konnte die Vermutung, dass die verzögerte Purkinjzellreifung auch der Grund für die veränderte Überlebensrate von Purkinjzellen in Schnittkulturen in Abhängigkeit vom Präparationsalter ist, nicht bestätigt werden. Wäre die verzögerte Purkinjzellreifung der Grund für die veränderte Überlebensrate hätte die Kurve für L7En-2-Tiere gegenüber der Wildtypkurve insgesamt nach rechts verschoben sein müssen (Abbildung 4.1a), sie erschien aber insgesamt breiter (Abbildung 4.1b bzw. 3.1). Die Tatsache, dass dieses Ergebnis nicht mit bisher bekannten Daten über



die Entwicklung von L7En-2-Purkinjezellen korreliert werden konnte, lässt 2 Interpretationen zu. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass es sich dabei um einen kulturspezifischen Effekt der Engrailed-2-Überexpression gehandelt hat. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die bisherige Hypothese, nach dem die Überexpression von Engrailed-2 eine Entwicklungsverzögerung verursacht, zumindest zum Teil korrigiert werden muss. Die im Folgenden diskutierten Ergebnisse zeigen, dass Letzteres in der Tat der Fall ist. Es kann gezeigt werden, dass die beobachtete Verzögerung der Dendritenentwicklung ein Symptom der Manipulation von zellulären Mechanismen ist, welche durch die Engrailed-2-Überexpression hervorgerufen werden.

## 4.2 Zellintrinsische versus zellextrinsische Effekte der L7En-2 Überexpression

Dass sich die bisher aus in vivo bekannten Effekte der Engrailed-2 Überexpression auch an Purkinjezellen in vitro nachweisen liessen, zeigt, dass diese Effekte unabhängig sind von den in vitro fehlenden Zellen bzw. Fasersystemen, wie sie weiter oben beschrieben wurden. Dies passt zu dem Modell, dass das Schicksal von Purkinjezellen schon sehr früh in ihrer Entwicklung bestimmt wird, ohne dass dafür ein Kontakt mit anderen cerebellären Zellen notwendig ist [25]. Allerdings sind in cerebellären Schnittkulturen Körnerzellen, inhibitorische Interneurone und Gliazellen als potentielle Interaktionspartner für die Vermittlung der Engrailed-2-Effekte vorhanden. Eine solche Vermittlung ist durchaus denkbar, da bekannt ist, dass Engrailed-2 sezerniert wird [122] und zum Beispiel direkten Einfluss auf das Wachstum von Axonen ausüben kann [61]. Hier wäre ein Einfluss auf das Wachstum von afferenten Axonen (in dem hier verwendeten System z.B. Parallelfasern, Purkinjezellkollateralen und Axone der inhibitorischen Interneurone) theoretisch möglich. Es bleibt folglich die Frage, ob die beobachteten Effekte der Engrailed-2 Überexpression tatsächlich rein intrinsische oder extrinsisch vermittelte Reaktionen darstellen. Gegen einen extrinsischen Effekt durch Körnerzellen spricht die Tatsache, dass die morphologische Differenzierung der

Purkinjezellendriten auch ohne synaptische Aktivität der Parallelfasern unverändert abläuft [116]. Auch können inhibitorische Interneurone als Interaktionspartner weitgehend ausgeschlossen werden, da die beobachteten Veränderungen schon zu Zeitpunkten eintraten, zu denen diese Zellen z.T. noch migrieren<sup>20</sup> (in vitro z.B. P00 DIV10). Weiterhin kann ausgeschlossen werden, dass das geringere Dendritenwachstum, welches bei L7En-2 in vivo zu beobachten ist, ein passiver Effekt ist, der durch die geringere Höhe der Molekularschicht zustandekommt. In cerebellären Schnittkulturen von P00 entwickelte sich keine strenge Schichtung und somit fehlte auch eine definierte räumliche Begrenzung für das Dendritenwachstum. Trotzdem entwickelten L7En-2-Purkinjezellen deutlich kleinere Dendritenbäume als ihre Wildtyp-Pendants.

Ein in dieser Arbeit nicht untersuchter potentieller Interaktionspartner sind die Astrozyten. Es ist bekannt, dass zwischen der Entwicklung des Dendritenbaumes von Nervenzellen und der Entwicklung der umgebenden Astroglia eine enge Beziehung herrscht [51]. Dies gilt insbesondere für die Beziehung zwischen Purkinjezellen und der radiären Glia der Molekularschicht, der Bergmannglia [46]. Allerdings sind in Bezug auf die Bergmannglia aus in vivo Untersuchungen bisher keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und L7En-2 Tieren bekannt (Jakob Jankowski, unveröffentlichte Daten). Die in vitro Untersuchung der Bergmannglia gestaltet sich schwierig, da sie nur morphologisch von den restlichen Astrozyten des Kleinhirns zu unterscheiden ist. Diese Unterscheidung gelingt nur in Kulturen in denen die kortikale Schichtung erhalten bleibt und sich die Zellen radiär anordnen (z.B. P11 Kulturen [46]). Allerdings können über die Bergmannglia nicht die Effekte auf das Purkinjezellaxon und seine Kollateralen geklärt werden. Die Anzahl der Torpedos in der Körnerzellschicht und die Dichte der Axonkollateralen von Purkinjezellaxonen sind die einzigen axonalen Parameter, bei denen Unterschiede zwischen Wildtyp-Tier und L7En-2 Tier auftraten (3.2.4, 3.2.5). Nimmt man aber an, dass hier andere Astrozyten (also nicht-Bergmannglia) an der Vermittlung dieser Effekte beteiligt sind, stellt sich die Frage, warum dann keine weiteren Veränderungen, z.B. an Axonen, zu beobachten sind. Das einfachere Erklärungsmodell – und damit die bessere Arbeitshypothese – wäre hier eine direkte Interaktion zwischen Purkinjezellen. Dieses Modell wird auch dadurch unterstützt, dass eine Sekretion von Engrailed-2 ebenso beschrieben ist [122] wie eine Wirkung von Engrailed-2 auf das Wachstum von Axonen [61]. Die genannten Effekte auf die Purkinjezellaxone liessen sich so erklären, zumal am distalen Axon, also in räumlicher Ferne zur Purkinjezellschicht, keine Effekte beobachtet wurden.

---

<sup>20</sup> Korb- und Sternzellen sind in cerebellären Schnittkulturen von P00 ab 10DIV durch Parvalbumin-IR identifizierbar, sie erscheinen auch nach 14DIV noch spindelförmig und ohne Neuriten, die typische Form migrierender Zellen; Daten nicht gezeigt.



Ob die Gesamtheit der Effekte, die an Purkinjezellen in der L7En-2 Maus beobachtet wurden nun auf intrazelluläre Vorgänge (z.B. Transkriptionskontrolle) und/oder auf einen auto- bzw. parakrinen Mechanismus durch sezerniertes Engrailed-2 zurückzuführen sind, kann hier nicht abschließend beurteilt werden. Es kann aber festgestellt werden, dass es vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse unwahrscheinlich erscheint, dass andere Zellen als Purkinjezellen in die Vermittlung dieser Effekte involviert sind.

Ein Hauptziel dieser Arbeit war, mögliche Einflüsse der prolongierten Engrailed-2 Expression in cerebellären Purkinjezellen auf deren zelluläre Struktur aufzuspüren und zu charakterisieren und Hypothesen zu deren Erklärung aufzustellen. Die hier und in anderen Arbeiten [67] beschriebenen Veränderungen an L7En-2 Purkinjezellen zeigen, dass die Überexpression von Engrailed-2 einen deutlichen Einfluss auf die Morphologie dieser Zellen hat. Eine mögliche Ursache wäre ein Einfluss von Engrailed-2 auf das Zytoskelett oder die an ihm orientierten zellulären Transportvorgänge. Dies liegt nahe, da diese Funktionseinheiten maßgeblich die Struktur und Morphologie der Zellen beeinflussen [123]. Im Folgenden sollen die morphologischen Veränderungen an L7En-2 Purkinjezellen genauer charakterisiert werden (z.B. im Hinblick auf Zellpolarität) und es soll überprüft werden, ob ein veränderter intrazellulärer Transportapparat als Ursache dafür in Frage kommt.

### **4.3 Veränderungen bei intrazellulären Transportvorgängen als Erklärung für die gestörte zelluläre Kompartimentierung von L7En-2 Purkinjezellen**

Die in der Literatur beschriebenen Funktionen von Engrailed-2 (siehe 1.2.1), lassen den Schluss zu, dass eine veränderte Expression von Engrailed-2 unterschiedliche Wirkungen auf das Dendritenwachstum und die axonale Entwicklung haben kann. Die bisherigen Daten für das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell L7En-2 deuteten auf eine Entwicklungsverzögerung von Purkinjezellen hin [67]. Diese kann man u.a. an einer gegenüber dem Wildtyp massiv veränderten Morphologie von Soma und Dendriten in L7En-2-Purkinjezellen festmachen (siehe 3.1 und 4.1). Demgegenüber sind solche auffälligen morphologischen Unterschiede an den Axonen von Purkinjezellen nicht zu beobachten. Dies weist darauf hin, dass Axon und Dendrit in unterschiedlicher Weise von der spätembryonalen und postnatalen Engrailed-2 Überexpression betroffen sind. Primäre Ursache hierfür ist sicher, dass die Determination des Axons und dessen Auswachsen zu den tiefen Kernen Vorgänge sind, die sich pränatal zu Zeiten abspielen, bevor die Engrailed-2 Überexpression zum Tragen kommt (siehe 1.1.3.1 und 1.3). Um die Hypothese einer generellen Entwicklungsverzögerung von Purkinjezellen bei einer Überexpression von

Engrailed-2 gegen die Hypothese unterschiedlicher Effekte auf Axon und Dendrit zu prüfen, wurden also Parameter untersucht, die postnatale Entwicklungsprozesse am Axon widerspiegeln. Dazu gehören die Myelinisierung (3.2.1), die axonale Verteilung von Ankyrin G (3.2.2), das Regenerationsvermögen von Purkinjellaxonen (3.2.3), die Ausprägung des *Plexus infraganglionaris* (3.2.4) und das Vorkommen von axonalen Torpedos (3.2.5). Die *in vitro* Experimente (3.2.1, 3.2.2, 3.2.3) dienen hierbei in erster Linie der Untersuchung des distalen Teils des Axons, da dieser *in vivo* bzw. *in situ* nur eingeschränkt beobachtet werden kann (siehe auch 4.1).

*In vivo* zeigten Axonkollateralen der Purkinjellen in der Fissura prima von L7En-2 Tieren an P09 eine deutlich stärkere Ausprägung als in Wildtyp-Tieren. Da ab P05 die Rückbildung von überschüssigen Axonkollateralen stattfindet, spricht diese Beobachtung für eine Entwicklungsverzögerung der Purkinjellen. Da sich der anteriore Anteil des Kleinhirns vor dem posterioren entwickelt [124], wobei die Grenze zwischen dem hier untersuchten posterioren Anteil der Fissura prima und dem im Lobus 6 untersuchten Areal verläuft [26], ist zu erwarten, dass die zwischen P05 und P15 stattfindende Reduktion von Kollateralen [96] an P09 im anterioren Bereich (Fissura prima) weiter vorangeschritten ist als im posterioren Bereich (Lobus 6, Lobus 9B). Im Wildtyp-Tier war dies der Fall, im L7En-2 Tier war diese Reduktion im anterioren Bereich deutlich weniger stark ausgeprägt. Dies kann wiederum mit einer Verzögerung der Purkinjellentwicklung erklärt werden (siehe auch Abbildung 6.16).

Auch die Bildung von Torpedos fand im L7En-2 Tier später statt als dies im Wildtyp-Tier der Fall ist. Ob das Fehlen von Torpedos in der 2. Postnatalwoche und das massive Auftreten im Adulttier in transgenen Tieren mit einer verzögerten Purkinjellentwicklung gedeutet werden kann, ist allerdings fraglich. Zunächst ist die Interpretation schwierig aufgrund der widersprüchlichen Erkenntnisse zur biologischen Bedeutung - regenerativ oder degenerativ - von Torpedos (zusammengefasst in 3.2.5). Nimmt man aber an, dass das Auftreten von Torpedos in adulten L7En-2 Tieren ein verspätetes Auftreten der im Wildtyp-Tier beobachteten Torpedo-Phase war, so muss hier ein anderer Mechanismus zugrunde liegen als bei der retardierten Soma- und Dendritenentwicklung, da sich bei Letzterer die Verzögerung im Zeitraum weniger Tage abspielt ([67], 3.1.3, 3.1.5). Das Auftreten von Torpedos war in den L7En-2 Tieren dagegen um Wochen verschoben. Darüberhinaus waren die im L7En-2 Tier auftretenden Torpedos wesentlich zahlreicher und es schien sich nicht um eine vorübergehende Phase zu handeln wie im Wildtyp-Tier, sondern um ein persistierendes Phänomen. Man kann dies also eher als Hinweis werten, dass die zellulären Mechanismen, über die das überexprimierte Engrailed-2 in die Purkinjellentwicklung eingreift, den axonalen und den somatodendritischen Zellanteil unterschiedlich beeinflussen. Diese

Überlegung wird durch die in vitro Studien unterstützt. In der Entwicklung des distalen axonalen Abschnitts zeigten sich keinerlei Unterschiede in Kulturen von Wildtyp- und L7En-2 Tieren (3.2.1, 3.2.2, 3.2.3). Zwar zeigten die in vitro Daten zur Entwicklung der Parvalbumin-IR (3.1.5), dass Parvalbumin auch im Axon von L7En-2 Purkinjezellen deutlich später nachzuweisen war als in Axonen von Wildtypzellen (Abbildung 3.6b). Da Parvalbumin aber in differenzierten Zellen ubiquitär in der Zelle vorkommt und es keine Hinweise auf eine kompartimentspezifische Regulation gibt, ist Parvalbumin kein geeigneter Marker für die axonale Differenzierung. Es kann also festgestellt werden, dass die Überexpression von Engrailed-2 in cerebellären Purkinjezellen zu einer Entwicklungsverzögerung der Dendriten und des Somas führt, es am Axon aber im distalen Bereich zu keinerlei Veränderungen kommt und im proximalen Bereich zu Veränderungen, die nur zum Teil durch eine Entwicklungsverzögerung erklärt werden können. Die Überexpression von Engrailed-2 scheint also Entwicklungsmechanismen zu beeinflussen, die in Soma und Dendrit andere Effekte hervorrufen als im Axon.

Unklar ist bis hierhin allerdings, auf welche Weise die Engrailed-2 Überexpression verschiedene Teile der Zelle unterschiedlich beeinflusst. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Polarität der Purkinjezellen gestört ist. Dabei kann ein Ausbleiben der Entwicklung von Polarität als Folge der Engrailed-2 Überexpression ausgeschlossen werden, da die Determination des Axons, und damit die Determination von Polarität, schon viel früher als die Überexpression stattfindet (siehe 1.1.3.1). Eine nicht vorhandene Polarität in der Folge der Engrailed-2 Überexpression müsste, wenn vorhanden, auf eine Rückbildung von Polarität zurückgeführt werden. Auf eine möglicherweise gestörte Polarität wies das Auftreten von dendritischen Charakteristika im axonalen Bereich von L7En-2 Purkinjezellen hin (siehe 3.3.3, außerdem AnkyrinG-IR in Abbildung 6.6b (L7En-2)). Allerdings war hiervon nur der unmittelbar an das Soma anschließende, proximale Abschnitt des Axons betroffen (siehe 3.3.1 und 3.3.2). Distal dieses morphologisch (Abbildung 3.12 und 3.14) und immunhistochemisch (Abbildung 6.6, Hohlpfeil) klar abgrenzbaren Bereichs war immer ein völlig normal erscheinendes Axon ausgebildet (siehe 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3). Damit ist gezeigt, dass die Polarität der L7En-2 Purkinjezellen nicht gestört ist, da in der gängigen Literatur der Begriff „Polarität“ auf Neurone angewandt wird, bei denen sich eine klare Trennung in axonalen und somatodendritischen Zellanteil entwickelt und aufrechterhalten wird (z.B. [125][126][127][128][54]). Es wird auch deutlich, dass es nicht genügt, die betroffenen Zellen lediglich in ein axonales und ein somatodendritisches Kompartiment zu gliedern, will man die vorhandenen morphologischen Veränderungen genau charakterisieren. Bei gemeinsamer Betrachtung der oben diskutierten Ergebnisse mit Abbildung 1.3 wird klar, dass bisher nicht

berücksichtigt wurde, dass der Übergang vom somatodendritischen Teil der Zelle zum Axon in mehrere voneinander abgrenzbare subzelluläre Kompartimente unterteilt werden kann [44][54]. Dabei entwickelt sich die im Adulttier vorliegende Kompartimentierung früh postnatal, zeitlich koinzident mit dem Umschalten von einem axonalen zu einem dendritischen Wachstumsmodus der Zelle ([52], siehe auch 1.1.3.1.) In der Tat konnte in dieser Arbeit für die Wildtyptiere gezeigt werden, dass im Purkinjzellsoma an P09 eine Differenzierung zwischen zwei Kompartimenten, einem zum Axon orientierten und einem zum Dendriten orientierten, vorgenommen werden kann, wie dies für adulte Zellen beschrieben ist (3.4.1, 3.4.2.1, [44]). Parallel dazu ist der Umbauprozess in cerebellären Purkinjzellen dadurch charakterisiert, dass sich in dem dem Axon zugewandten Teil des Somas eine charakteristische Anordnung von Zellorganellen ausbildet ([102], 3.4.3.1). Hierbei ist der typische Ankyrin G-negative Fleck in Wildtypzellen in Schnittkulturen ebenso ein Hinweis darauf, dass diese subzelluläre Kompartimentierung des Purkinjzellsoma auch *in vitro* stattfindet (3.4.2.3), wie der Ausschluss von  $\beta$ III-Tubulin aus den nicht dendritenassoziierten Kompartimenten (3.4.2.2). Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse haben deutlich gezeigt, dass die beschriebenen Organisationsprozesse in L7En-2 Purkinjzellen ausbleiben und die subzelluläre Kompartimentierung im Bereich des Soma, des Axonhügels und des proximalen Axonabschnitts massiv gestört ist (3.3, 3.4).

Es stellt sich die Frage, welche zellulären Mechanismen durch den Transkriptionsfaktor Engrailed-2 reguliert werden, die die beschriebenen Unterschiede zwischen Wildtyp- und L7En-2-Purkinjzellen hervorrufen? Es ist naheliegend, zu vermuten, dass Engrailed-2 auf irgendeine Weise intrazelluläre Transportmechanismen beeinflusst, da ein organisiert ablaufender intrazellulärer Transport eine Grundvoraussetzung für eine korrekt ausgebildete Zellkompartimentierung ist [129][44][130]. Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise, die für diese Hypothese sprechen. Zum Einen konnte gezeigt werden, dass Zytoskelettelemente bzw. deren Transportwege in L7En-2 Purkinjzellen weniger geordnet vorliegen (3.4.2). Zum Anderen zeigten L7En-2-Purkinjzellen ein komplett anderes zeitliches Muster im Auftreten von axonalen Torpedos (3.2.5), für die ein Zusammenhang mit Transportvorgängen diskutiert wird [98][48]. Wichtige Argumente für die Hypothese eines veränderten intrazellulären Transports in L7En-2 Purkinjzellen sind auch die elektronenmikroskopischen Beobachtungen. Es konnte gezeigt werden, dass in einer Phase intensiven zellulären Umbaus Leitstrukturen des zellulären Transports, die im Wildtyptier hoch organisiert vorliegen, im L7En-2-Tier in dieser Form nicht zu finden sind (3.4.3.1). Zusätzlich wurden bei L7En-2-Purkinjzellen am Soma und im somanahen Bereich des Axons Veränderungen der Zellmembran beobachtet, die mit einer falschen Lokalisation von Oberflächenstrukturen

erklärt werden können (3.3.3, 3.4.3.2). Die erwähnten Bereiche zeigten dendritische Charakteristika und erfuhren eine massive Oberflächenvergrößerung. Diese Beobachtungen stellen auch eine Erklärungsmöglichkeit für das verminderte Dendritenwachstum dar (3.1.4, [67]). Im Rahmen dieser Arbeit kann allerdings nicht abschließend geklärt werden, ob der Einfluss von Engrailed-2 auf intrazelluläre Transportvorgänge auf die Funktion als Transkriptionsfaktor zurückzuführen ist, oder ob es sich um einen Effekt des nicht nukleären Engrailed-2 handelt. Da das ausserhalb des Kerns vorkommende Engrailed-2 mit Caveolae-ähnlichen Vesikeln assoziiert ist, ist hier eine Funktion als targeting-Molekül zumindest grundsätzlich denkbar [131]. Allerdings konnte für das Vesikel-assoziierte Engrailed-2 bisher nicht gezeigt werden, dass Engrailed-2 eine Funktion in Bezug auf die Vesikel ausübt. Vielmehr scheinen die Vesikel der Sekretion von Engrailed-2 zu dienen [122].

Die These, dass Engrailed-2 eher auf der Ebene der Genregulation eingreift, rückt z.B. dadurch in den Fokus, dass Engrailed-2 die Expression von MAP1b reguliert [65]. MAP1b ist als Mikrotubuli-assoziiertes Protein an zellulären Transportvorgängen beteiligt und im Rahmen der neuronalen Differenzierung wichtig beim Auswachsen von Fortsätzen [132][133]. In der Tat gibt es aber auch molekularbiologische Daten, die die These eines transkriptionellen Einflusses von Engrailed-2 auf intrazelluläre Transportmechanismen direkt unterstützen. An der L7En-2-Maus konnte gezeigt werden, dass Engrailed-2 während der frühen Kleinhirnentwicklung ein wichtiger Regulator von Genen ist, die für Proteine des intrazellulären Transportapparates kodieren [77]. Als Beispiel sei hier Schwannomin (Merlin) aufgeführt, dessen Interaktion mit  $\beta$ 2-Spectrin möglicherweise wichtig für die Ausbildung und die Membranverankerung des Aktinzytoskeletts ist [103]. Das für Schwannomin kodierende Gen *nf2* ist in L7En-2 Tieren an P07 gegenüber Wildtyp-Tieren heraufreguliert. Ein zweites Beispiel ist Rab3a, welches in der L7En-2 Maus perinatal herunterreguliert ist. Rab3a ist im adulten Tier an der Membranfusion synaptischer Vesikel beteiligt, nimmt aber während der Entwicklung generell Aufgaben beim gerichteten Transport von Vesikeln wahr [134].

Wie auch immer die Effekte von Engrailed-2 auf den zellulären Transportapparat vermittelt werden, diese Effekte bewirken, dass bestimmte zelluläre Umbauprozesse, die in Wildtyp-Purkinjezellen stattfinden und die mit dem Umschalten der Zellen von einem axonalen zu einem dendritischen Wachstumsmodus [51][53] erklärt werden können, in L7En-2-Purkinjezellen nicht stattfinden. Daher kann basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit die These formuliert werden, dass das physiologische Ende der Engrailed-2 Expression in Purkinjezellen um den Zeitpunkt der Geburt ein wichtiger Vorgang im Rahmen des Umschaltens von einem axonalen zu einem dendritischen Wachstumsmodus ist.

Es wurde gezeigt, dass die Kompartimentierung der Engrailed-2 überexprimierenden Purkinjezellen gestört ist, was unter anderem mit einer Dislokation von postsynaptischen Membrandomänen einhergeht. Es stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob es möglicherweise auch Veränderungen bei den Afferenzen von Purkinjezellen gibt. Das in einer vorangegangenen Arbeit aufgefallene veränderte Expressionsmuster von EphA4 kann als ein Hinweis auf ein verändertes Verschaltungsmuster im Kleinhirnkortex der L7En-2 Maus gewertet werden, da Eph-Rezeptoren und ihre Ephrin-Liganden Molekülgruppen sind, die im Zusammenhang mit axonaler Wegfindung stehen und von denen einige Vertreter auf der Oberfläche von Purkinjezellen exprimiert werden [4][23]. Einige Moleküle, die direkt (z.B. die genannten Ephrine und Eph-Rezeptoren) oder indirekt (z.B. Transkriptionsfaktoren wie Engrailed, Wnt) Einfluss auf axonale Wegfindung nehmen, werden im Kleinhirn in parasagittalen Mustern exprimiert [23], an welchen sich die afferenten [38][29] sowie die intrinsischen [27][39] Fasersysteme des Kleinhirnkortex orientieren. In dieser Arbeit wurden exemplarisch die Expressionsmuster dreier solcher parasagittaler Marker untersucht.

#### **4.4 Differentieller Einfluss von Engrailed-2 auf parasagittal exprimierte Gene**

Im Kleinhirn der Maus sind neben den ursprünglich charakterisierten Genen Zebrin und L7/pcp-2 mittlerweile über ein Dutzend Gene bekannt, die als molekulare Basis parasagittaler Musterung im Kleinhirn angesehen werden [23][26][24]. Unter den parasagittal exprimierten Proteinen sind die Eph-Rezeptoren und ihre Liganden, die Ephrine, klassische Vertreter von axonalen Wegfindungsmolekülen [108][4]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass EphA4 im Kleinhirnkortex von L7En-2 Mäusen zwar noch in parasagittal angeordneten Streifen exprimiert wird, die Expression aber in distinkten Arealen verändert bzw. nicht mehr nachweisbar ist (Abbildung 3.21). Wenn auch - trotz der Anfertigung von Serienschnitten - Unterschiede in der Schnittführung als Ursache der Musteränderung nicht ausgeschlossen werden können, ist dies für die Veränderungen der Expression im kaudalen Bereich nicht mehr plausibel. Dies gilt ebenso für die, ebenfalls überwiegend im kaudalen Bereich gelegenen, Änderungen im Expressionsmuster des diffusiblen Moleküls wnt7B (Abbildung 3.23).

Neben einer tatsächlichen Änderung in der Expression der untersuchten Proteine ist als Ursache für die veränderten Muster auch eine differentielle Apoptose denkbar. Dann würde man allerdings erwarten, dass alle untersuchten Marker in den gleichen Regionen ein ähnlich verändertes Muster aufweisen. Dies ist aber zum Zeitpunkt P00 nicht der Fall, wie das in dieser Arbeit untersuchte Muster von EphrinA2 gerade für den kaudalen Teil des Kleinhirns

zeigt und wie dies auch schon in früheren Arbeiten anhand des Expressionsmusters von Calbindin-D28k gezeigt wurde [80]. Darüberhinaus haben Untersuchungen gezeigt, dass der Hauptteil der L7En-2-induzierten Apoptosen, welche letztendlich zu einem Verlust von 40% Purkinjezellen gegenüber Wildtyp-Tieren führen, erst um P03 stattfindet, also nach dem in dieser Arbeit untersuchten Zeitpunkt (Jakob Jankowski, unpublizierte Ergebnisse). An P00 gibt es dagegen nur marginale Unterschiede in Purkinjezellzahl und Kleinhirngröße. Dies ist auch an der vergleichbaren Größe der Kleinhirne in den Abbildungen 3.21 bis 3.23 erkennbar. Von daher ist es wahrscheinlicher, dass durch die Engrailed-2-Überexpression die Expression parasagittaler Marker beeinflusst wird und sich auf diese Weise parasagittale Segmentgrenzen verschieben oder sogar auflösen, wie dies für die „late onset“-Muster bereits beschrieben wurde [35].

Die Tatsache, dass bei den untersuchten parasagittalen Markern die beobachteten Veränderungen besonders stark (EphA4, 3.5.1) bzw. ausschließlich (Wnt7B, 3.5.3) im kaudalen Bereich des Kleinhirns auftraten, zeigt, dass man bei den durch die Engrailed-2-Überexpression verursachten Effekten neben der parasagittalen auch eine starke antero-posteriore Komponente berücksichtigen muss. Dies wird auch durch die Ergebnisse bei der Untersuchung des *Plexus infraganglionaris* unterstrichen. Dieser wies Entwicklungsunterschiede zwischen Wildtyp- und L7En-2-Tier auf, die entlang der antero-posterioren Achse variierten (3.2.4). Für einen Zusammenhang zwischen der parasagittalen Expression axonaler Wegfindungsproteine und der Entwicklung des *Plexus infraganglionaris* spricht, dass sich die Verschaltung der Axonkollateralen der Purkinjezellen an parasagittalen Kompartimenten orientiert [39]. Es stellt sich die Frage nach weiteren Afferenzen, die durch die - infolge der Engrailed-2-Überexpression - veränderte Expression axonaler Wegfindungsproteine zum untersuchten Zeitpunkt (P00) betroffen sein können. Die Kletterfasern sind dabei aussen vor, da ihr Verschaltungsmuster schon vor dem in dieser Arbeit untersuchten Zeitpunkt festgelegt ist [135]. Im Gegensatz dazu ist für die Moosfasern ein verändertes Innervationsmuster beschrieben [35]. Dieses kann durchaus durch Kontakt mit axonalen Wegfindungsproteinen auf der Oberfläche von Purkinjezellen zustande kommen, da im fraglichen Zeitfenster<sup>21</sup> ein transienter Kontakt zwischen Moosfasern und Purkinjezellen beschrieben ist [136]. Die von den Körnerzellen ausgehenden Parallelfasern können ebenfalls durch die veränderten Expressionsmuster axonaler Wegfindungsproteine beeinflusst sein, da auch sie perinatal auswachsen und ihr Verschaltungsmuster anhand der

---

<sup>21</sup> Zwischen Ankunft der Moosfasern im Kleinhirnkortex und deren Kontakt zu Körnerzellen. Bei Mäusen fällt der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Zeitpunkt P00 in dieses Zeitfenster.

parasagittalen Kompartimentgrenzen ausrichten [27]. Konkrete Daten, die diese Hypothese für die L7En-2-Maus bestätigen, liegen allerdings nicht vor.

Insgesamt betrachtet weisen die erhobenen Befunde auf einen konkreten Zusammenhang zwischen der veränderten Expression von axonalen Wegfindungsproteinen bzw. Proteinen der Wnt-Familie und dem Einwachsen von Afferenzen in den Kleinhirnkortex hin. Dieses Ergebnis kann nun als Basis für weitergehende Untersuchungen dienen, deren Ziel die Aufklärung der funktionellen Zusammenhänge ist, welche den gemachten Beobachtungen zugrundeliegen. Aufgrund von Literaturdaten sind hier lediglich Spekulationen möglich. Für Wnt7b kann man einen direkten Einfluss auf das Axonwachstum zwar vermuten [114], es kann aber in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor auch indirekt Einfluss auf die Verschaltung von Neuronen nehmen, zum Beispiel indem es an der Definition von Kompartimentgrenzen im Kleinhirn mitwirkt. Hierbei ist eine gegenseitige Regulation von Wnt7B und Engrailed-2 möglich, wie sie für Engrailed und Wnt in *Drosophila* beschrieben wurde [58]. Die Herunterregulation von Wnt7B im Kleinhirn von L7En-2-Tieren [77] macht dies plausibel. Für EphA4 und EphrinA2 ist bekannt, dass bei der Extremitätenentwicklung beide auf auswachsenden Axonen exprimiert werden, EphrinA2 aber zusätzlich im Zielgebiet der Fasern diffus exprimiert wird und so zu einer kleinräumigen Modulation der Wegfindungssignale beiträgt [137]. Dies wäre auch im Kleinhirn denkbar, da die beschriebenen parasagittalen Kompartimente mit Sicherheit nicht die kleinsten funktionellen Module des Kleinhirns darstellen [29]. Auch aus anderen Systemen ist eine Koexpression von Eph-Rezeptoren und den zu ihnen passenden Ephrinen auf derselben Zelle bekannt, um die Wirkung von Ephrin-Liganden im Zielgebiet von auswachsenden Axonen zu modulieren [111]. Andererseits kann auf postsynaptischer Seite auch EphA4 Einfluss auf die Synapsenentwicklung von Afferenzen nehmen [109]. Auch ein Effekt von EphA4 auf Gliazellen ist beschrieben [138].

Man kann sehen, dass gerade die Funktion des Eph-Rezeptor/Ephrin-Systems sehr stark davon abhängt, wie die jeweiligen Komponenten auf der Zelloberfläche verteilt sind. Dabei muss man auch in Betracht ziehen, dass sich die subzelluläre Lokalisation im Laufe der Zelldifferenzierung verändern kann [51]. Um einordnen zu können, ob die in dieser Arbeit beschriebenen Expressionsmuster etwas mit auswachsenden Purkinjenzellaxonen oder mit Purkinjenzell- bzw. anderen kortikalen Afferenzen zu tun haben (im Falle des *Plexus infraganglionaris* wäre sogar beides parallel denkbar) benötigt man also Erkenntnisse über die subzelluläre Verteilung von Vertretern des Eph-Rezeptor/Ephrin-Systems im Verlaufe der Zelldifferenzierung. Dies ist insbesondere im vorliegenden Fall wichtig, da weiter oben gezeigt wurde, dass es in der Entwicklung der Purkinjenzellen von L7En-2-Mäusen massive



Veränderungen in der subzellulären Organisation gibt, von denen besonders Strukturen betroffen sind, die mit der Zelloberfläche assoziiert sind.

In 4.3 wurde gezeigt, dass Engrailed-2 auf transkriptioneller Ebene, möglicherweise auch direkt, in Vorgänge des zellulären Transports eingreift. In 4.4 habe ich diskutiert, dass die Wirkung der Engrailed-2-Expression auf parasagittale Marker möglicherweise nicht nur von deren direkter transkriptioneller Kontrolle abhängt, sondern auch durch deren subzelluläre Verteilung beeinflusst werden kann. Der Einfluss von Engrailed auf zelluläre Transportmechanismen rückt also auf der Suche nach der biologischen Funktion von Engrailed-2 sehr stark in den Fokus und es stellt sich die Frage, ob die Beeinflussung von zellulären Transportmechanismen auch in anderen Modellsystemen als dem murinen Kleinhirn zur Erklärung von Engrailed-Effekten dienen kann.

#### **4.5 Können die verschiedenen Effekte von engrailed-Genen mit einem gemeinsamen Modell erklärt werden?**

Es ist bekannt, dass engrailed-Gene funktionell weitgehend redundant sind und speziesübergreifend ausgetauscht werden können, wenn sie unter dem entsprechenden Promotor exprimiert werden [139][140][141]. Dies spricht dafür, dass alle engrailed-Genprodukte mehr oder weniger dieselben zellulären Mechanismen steuern. In dieser Arbeit wurde die Regulation bzw. Organisation des zellulären Transportapparates als Mechanismus postuliert, durch den Engrailed-Effekte vermittelt werden. Die durch Engrailed hervorgerufenen Effekte können allerdings in verschiedenen Spezies und zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten unterschiedlich ausgeprägt sein (siehe 1.2.1). Wirken die Produkte von engrailed-Genen, wie oben postuliert, speziesübergreifend als Organisator zellulärer Transportvorgänge, sollte es gelingen, zelluläre Transportmechanismen als mögliche Ursache dieser Engrailed-Effekte herauszuarbeiten. Einer der am längsten untersuchten Engrailed-Effekte ist die Wirkung der Engrailed-Expression in Drosophila im Zusammenhang mit der Segmentierung des Embryos [59]. Ein wichtiger Faktor in der Ausbildung der Segmente ist die Expression von Hedgehog in Abhängigkeit von Engrailed. Für Hedgehog ist ein asymmetrischer Wirkgradient im Verhältnis zur sezernierenden Zelle bekannt, für den ein asymmetrisches Verteilungsmuster als Ursache diskutiert wird [58]. Ein solches asymmetrisches Verteilungsmuster könnte durch eine gerichtete Sekretion erklärt werden. Diese könnte ebenfalls bei der Etablierung der Mittelhirn-Nachhirngrenze vorliegen, da hier vergleichbare Mechanismen zugrundeliegen wie bei der Segmentierung des Drosophilaembryos [68][8][25]. In verschiedenen Gruppen von schalentragenden Mollusken

wird eine Engrailed-Expression in Zellen beschrieben, die für die Bildung der Schale verantwortlich sind. Auch wenn ein Zusammenhang noch nicht im Detail untersucht worden ist, so liegt in diesen Zellen zumindest eine räumliche und zeitliche Koinzidenz von Engrailed-Expression und gerichtetem Transport bzw. gerichteter Sekretion vor [142][143]. Deutlicher ist der Zusammenhang bei cercalen Neuronen von Schaben, deren axonale Differenzierung durch die Engrailed-Expression reguliert wird. Engrailed ist hier in allen Phasen der Entwicklung entscheidend für eine korrekte Ausbildung des Axons. Es scheint also nicht die Expression von Molekülen zu steuern, die transient für die axonale Entwicklung wichtig sind, wie Faktoren, die für die Wegfindung oder für die Ausbildung von Synapsen benötigt werden. Wahrscheinlicher ist, dass Engrailed hier einen Mechanismus reguliert, der in allen Phasen der axonalen Differenzierung eine grundlegende Rolle spielt [62][63]. Da dies auf den gerichteten Transport von axonalen Komponenten zutrifft [54], erscheint ein Einfluss von Engrailed auf zelluläre Transportmechanismen auch hier eine plausible Erklärung für die beobachteten Symptome. Ein aus Vertebraten bekannter Effekt, der durch eine Engrailed-Defizienz hervorgerufen wird, ist das Absterben dopaminerger Neurone in der Substantia nigra. Auch hier kann ein Einfluss auf den axonalen Transport und damit die Axonentwicklung die Ursache sein, da dem Tod der betroffenen Neurone eine vollständige Degeneration der Axone vorausgeht [141]. Der irreversible Verlust eines Axons verursacht aber in der Regel das Absterben der Zelle [8].

Es wird deutlich, dass durchaus eine Reihe von Engrailed-Effekten über intrazelluläre Transportmechanismen erklärt werden können. Gemeinsam mit der bekannten, speziesübergreifenden, funktionellen Redundanz von engrailed-Genprodukten [139][140][141] spricht dies für die Hypothese, dass Engrailed als Regulator von zellulären Transportmechanismen fungiert. Diese Hypothese bietet eine theoretische Grundlage für weitergehende - idealerweise speziesübergreifende - Untersuchungen, welche die Aufklärung der involvierten Transportmechanismen auf molekularer Ebene zum Ziel haben.

Die Funktion der natürlichen Expression von Engrailed-2 in Purkinjenzellen lässt sich mit der vorgestellten Hypothese so erklären, dass in der Phase bis zur Herunterregulation von Engrailed-2 zelluläre Transportmechanismen so beeinflusst werden, dass bestimmte Strukturen, die später für ein Umschalten vom axonalen zum dendritischen Wachstumsmodus notwendig sind [51], nicht ausgebildet werden. Da Engrailed-2 natürlicherweise nicht in allen Purkinjenzellen exprimiert wird [35], impliziert dies, dass es noch einen weiteren Regulator für diese Vorgänge geben muss. Wird Engrailed-2, wie im L7En-2-Tier, prolongiert in allen Purkinjenzellen exprimiert, führt dies dann zu dem in dieser Arbeit beschriebenen zellulären Phänotyp.

## 5 Zusammenfassung

Engrailed-2 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Gruppe der Segmentpolaritätsgene und spielt im Nervensystem zahlreicher untersuchter Bilateria ausser bei der Ausbildung von Segmentgrenzen eine wichtige Rolle beim Zellüberleben, bei der Zelldifferenzierung und der axonalen Wegfindung von Neuronen. Über die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen ist allerdings nur wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, solche Mechanismen aufzuspüren. Dies sollte anhand vergleichend-morphologischer Untersuchungen des Kleinhirnkortex in Wildtyptieren und dem transgenen Tiermodell L7En-2 geschehen. In letzterem wird Engrailed-2 in cerebellären Purkinjezellen in einem zeitlich und räumlich definierten Muster überexprimiert.

Die physiologische Expression von Engrailed-2 im Rahmen der Kleinhirnentwicklung lässt sich in 2 Phasen gliedern. Frühembryonal wird Engrailed-2 in dem Bereich des Hirnstamms exprimiert, in dem sich die Vorläuferzellen des Kleinhirns entwickeln, und ist hier wichtig für das Überleben dieser Zellen. Spätembryonal wird Engrailed-2 im sich entwickelnden cerebellären Kortex in einem parasagittalen Streifenmuster exprimiert, welches u.a. wichtig für die parasagittale Orientierung von afferenten Fasersystemen des cerebellären Kortex ist. In der L7En-2 Maus wird Engrailed-2 in den normalerweise Engrailed-2-negativen Bereichen des cerebellären Kortex exprimiert. Dies führt zu einer Verschiebung parasagittaler Kompartimentgrenzen, welche sich auch auf afferente Fasersysteme des cerebellären Kortex auswirkt. Da aus anderen Modellsystemen eine Wirkung von Engrailed auf axonales Wachstum und axonale Wegfindung bekannt ist, könnte dies auch für die L7En-2-Maus zutreffen. Durch In-situ-Hybridisierungen konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass im Kleinhirn von L7En-2-Tieren in der Tat Expressionsmuster von axonalen Wegfindungsmolekülen verändert vorliegen. Deren Einfluss auf afferente Fasersysteme wird möglicherweise zusätzlich durch eine veränderte subzelluläre Lokalisation moduliert, da die Engrailed-2-Überexpression die Kompartimentierung von Purkinjezellen beeinflusst (s.u.).

Die physiologische Expression von Engrailed-2 in Purkinjezellen nimmt perinatal ab. Dieser Zeitpunkt koinzidiert mit dem Beginn des Dendritenwachstums von Purkinjezellen. Demgegenüber wird Engrailed-2 in L7En-2-Tieren zeitlebens in allen Purkinjezellen exprimiert. Dies hat zur Folge, dass sich Purkinjezeldendriten in L7En-2-Mäusen retardiert entwickeln. Engrailed-2 scheint also ein negativer Regulator des Dendritenwachstums und seine physiologische Herunterregulation essentiell für die normale Entwicklung des Dendritenbaums zu sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein Modellkultursystem etabliert werden, in dem definierte Schritte der Purkinjezellreifung analog der in vivo Situation

ablaufen. Mit diesem System konnte gezeigt werden, dass die beschriebene retardierte Entwicklung der Purkinjezellendriten von L7En-2-Tieren in vitro rekapituliert wird. Da in Schnittkulturen extrinsische Einflüsse massgeblich verändert sind, bedeutet dies, dass es sich bei den beobachteten morphologischen Veränderungen um einen Purkinjezell-intrinsischen Effekt von Engrailed-2 handelt. Die retardierte Dendritenentwicklung ging in vitro mit einer stark hypertrophen Entwicklung des proximalen Axons einher, welche auch in vivo nachweisbar, dort aber wesentlich subtiler ausgeprägt war. Hochauflösende mikroskopische Aufnahmen der hypertrophen proximalen Axonabschnitte bei L7En-2-Purkinjezellen in vitro zeigten, dass diese eine dendritenähnliche Morphologie aufwiesen und dornfortsatzähnliche Strukturen trugen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an vergleichbar alten L7En-2-Purkinjezellen in vivo belegten diese Befunde. Konsistent mit diesen proximal gelegenen Veränderungen des Purkinjezellaxons, erschien der zeitliche Verlauf der Entwicklung des *Plexus infraganglionaris* in L7En-2 Tieren verzögert. Zudem neigten adulte L7En-2-Purkinjezellen verstärkt zur Bildung von Torpedos, Auftreibungen des Axons, die sonst nur transient in jungen Purkinjezellen anzutreffen sind. Demgegenüber wiesen die distalen Anteile von L7En-2-Purkinjezellaxonen keine Auffälligkeiten auf, wie durch Untersuchungen der Ankyrin G-Expression, der Myelinisierung und des Regenerationsverhaltens gezeigt werden konnte. Weiterführende elektronenmikroskopische Untersuchungen, die sich auf den axonalen Pol von L7En-2-Purkinjezellen konzentrierten, zeigten am axonalen Pol von L7En-2 Purkinjezellsomata zahlreiche synapsentragende Membranintrusionen. Ebenso war die postnatal auftretende, charakteristische Kompartimentierung von Purkinjezellsomata in L7En-2-Mäusen nicht nachweisbar. Eine wahrscheinliche Ursache für die beschriebenen Charakteristika von L7En-2-Purkinjezellen sind Veränderungen im zellulären Transport, eine Hypothese, die durch die immunhistochemisch nachgewiesene, veränderte Verteilung von Zytoskelettelementen unterstützt wird.

Wie bereits erwähnt sind eine Vielzahl von Effekten beschrieben, die durch die Expression von engrailed-Genprodukten reguliert werden. Darüberhinaus sind mittlerweile auch einige Zielgene dieser Transkriptionsfaktoren bekannt. Im Kontext der bisher über Engrailed-2 bekannten Daten kann aufgrund der vorliegenden Arbeit die Hypothese formuliert werden, dass Engrailed-2 als Organisator von intrazellulären Transportmechanismen fungiert, deren Regulation u.a. für das Umschalten von einem axonalen zu einem dendritischen Wachstumsmodus von Neuronen wichtig ist. Die vorliegende Arbeit liefert damit erstmals funktionelle Hinweise darauf, durch welche zellulären Mechanismen Effekte von engrailed-Genprodukten vermittelt werden.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

5+10min: derselbe Schritt wird einmal 5 Minuten und anschließend noch einmal 10 Minuten durchgeführt

ABC: ABC-Kit

AK: Antikörper

AnkG: Ankyrin G

b2Spec:  $\beta$ 2-Spectrin

bIIITub:  $\beta$ III-Tubulin

CaBP: Calbindin-D28k

DAB: Diaminobenzidin

DIV: days in vitro (Tage in Zellkultur)

ddH<sub>2</sub>O: bidestilliertes Wasser bzw. Reinstwasser

EM: Elektronenmikroskop(-ie), elektronenmikroskopisch

en: siehe L7En-2

En-2: Engrailed-2

Exx: Embryonaltag xx

FL: fluoreszent

GA: Glutaraldehyd

IHC: Immunhistochemie

ISH: In-situ-Hybridisierung

ir: immunreaktiv

IR: Immunreaktivität

MBP: Myelin Basic Protein

ms: Maus

NiCl: Nickelchlorid

L7En-2: L7-Engrailed-2

PBS: phosphatgepufferte Kochsalzlösung

PBS+: PBS mit 0,5 mM Magnesiumchlorid und 1 mM Calciumchlorid

PFA: Paraformaldehyd

PVA: Parvalbumin

Pxx: Postnataltag xx

rb: Kaninchen

ROI: „region of interest“ (für die Auswertung oder weiterführende Bildverarbeitung  
markierter Bereich eines Bildes)

RT: Raumtemperatur

SEM: standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)

TBS: Tris-gepufferte Kochsalzlösung

TX: Triton X 100

ÜN: Reaktion läuft über Nacht

Vib: Vibratomeschnitte

wt: Wildtyp

ZS: Schnittkultur

## 6.2 Farbabbildungen

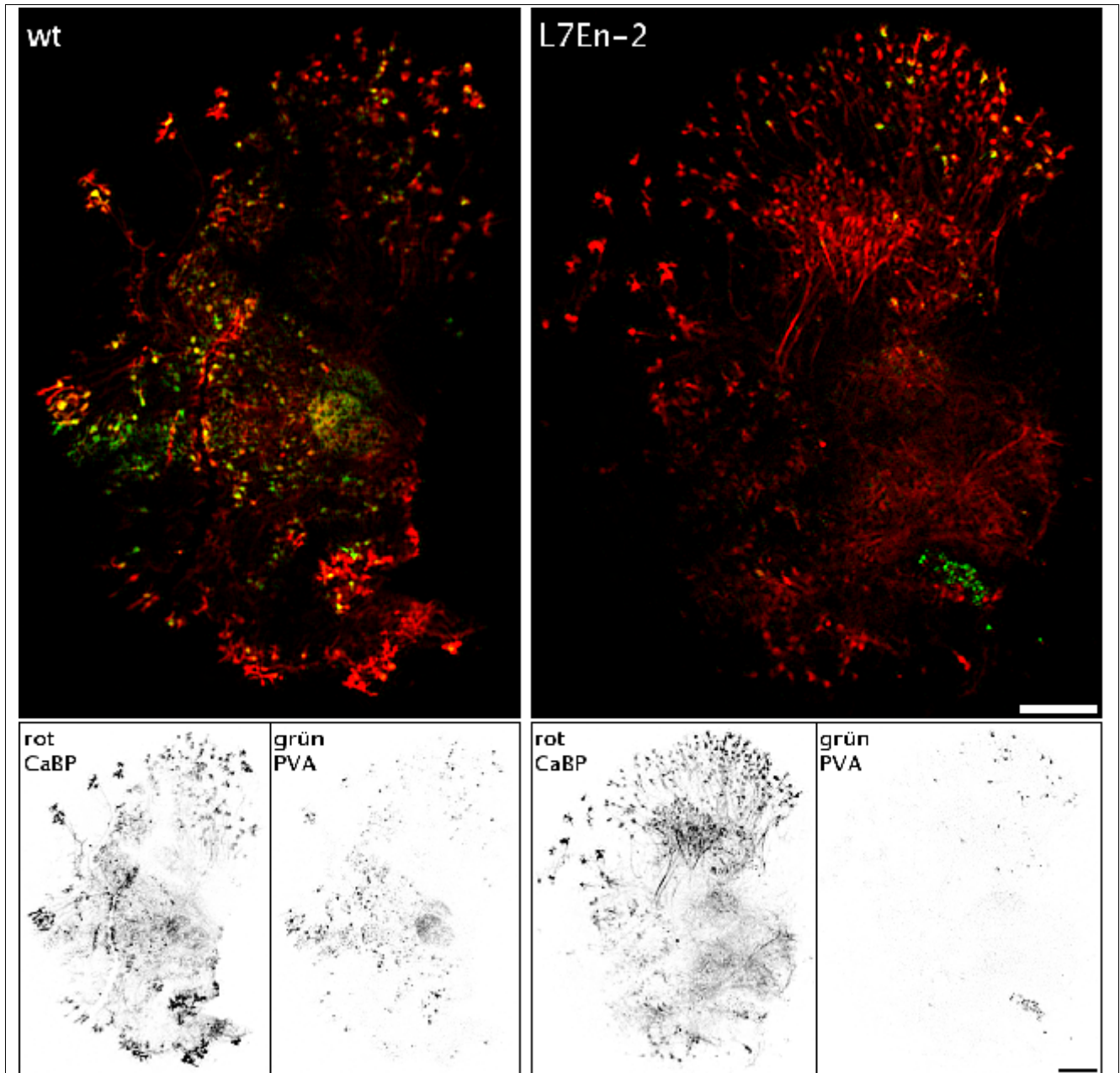
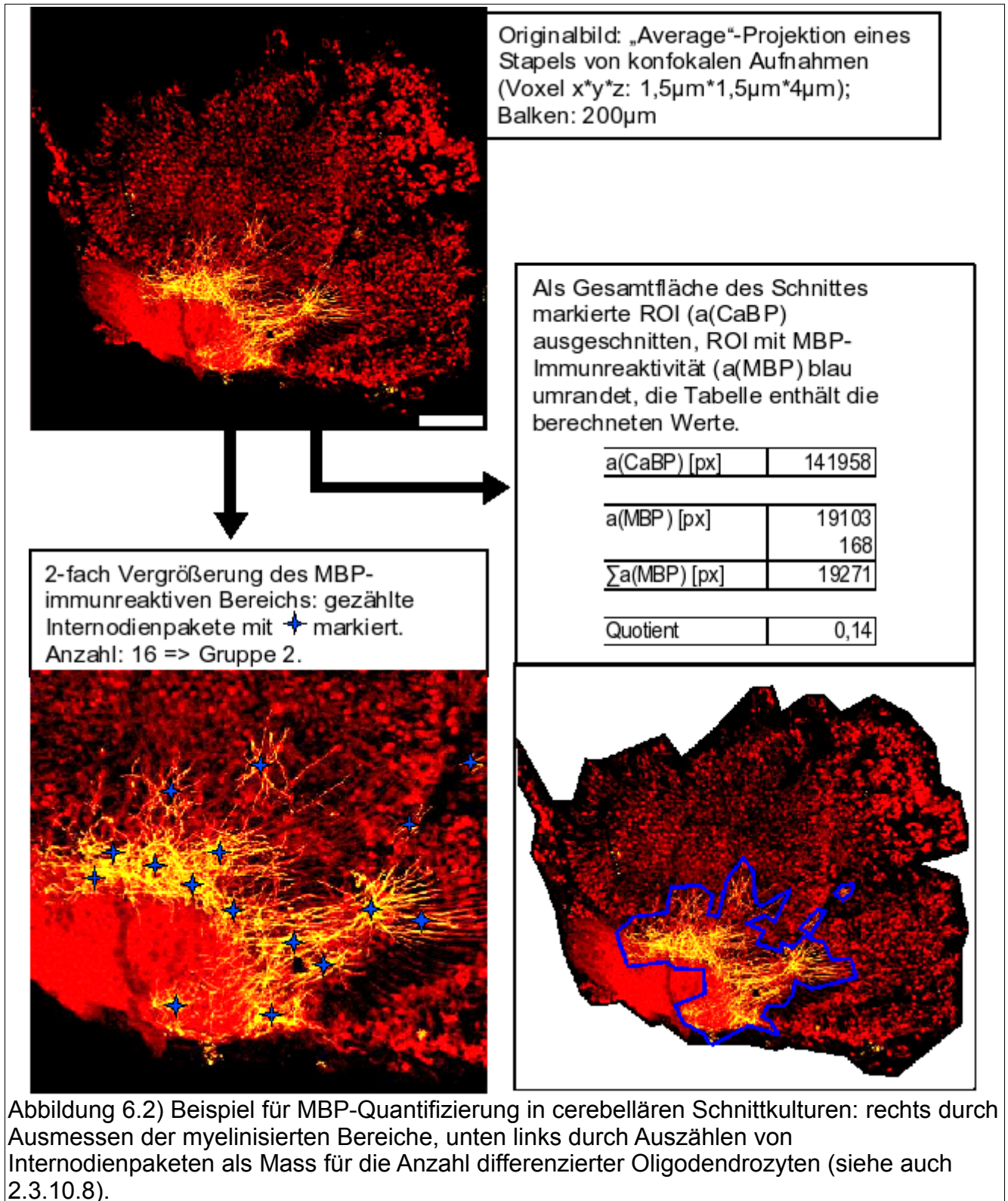


Abbildung 6.1) Beispiel für die unterschiedliche Parvalbuminexpression in cerebellären Schnittkulturen nach 10 DIV: gezeigt ist je ein Überlagerungsbild, in dem die Parvalbuminexpression in den Calbindin-ir Purkinjezellen an der Gelbfärbung erkennbar ist. Darunter sind die Immunfärbungen jeweils als Grauwertbilder dargestellt. Die Tabelle zeigt die nach den beiden Auswertemethoden (2.3.10.6, 2.3.10.7) ermittelten Werte für die beiden Beispielbilder. Konventionelle Fluoreszenzaufnahmen; Balken: 200µm.

Beispielbild	wt	L7En-2
Kolokalisationsanalyse nach Manders		
M(Calbindin)	0,684	0,481
Punkte für PVA-Expression in Purkinjezellen		
Somata	2	1
Dendriten	1	0
Axone	2	0
Schnitt gesamt	5	1





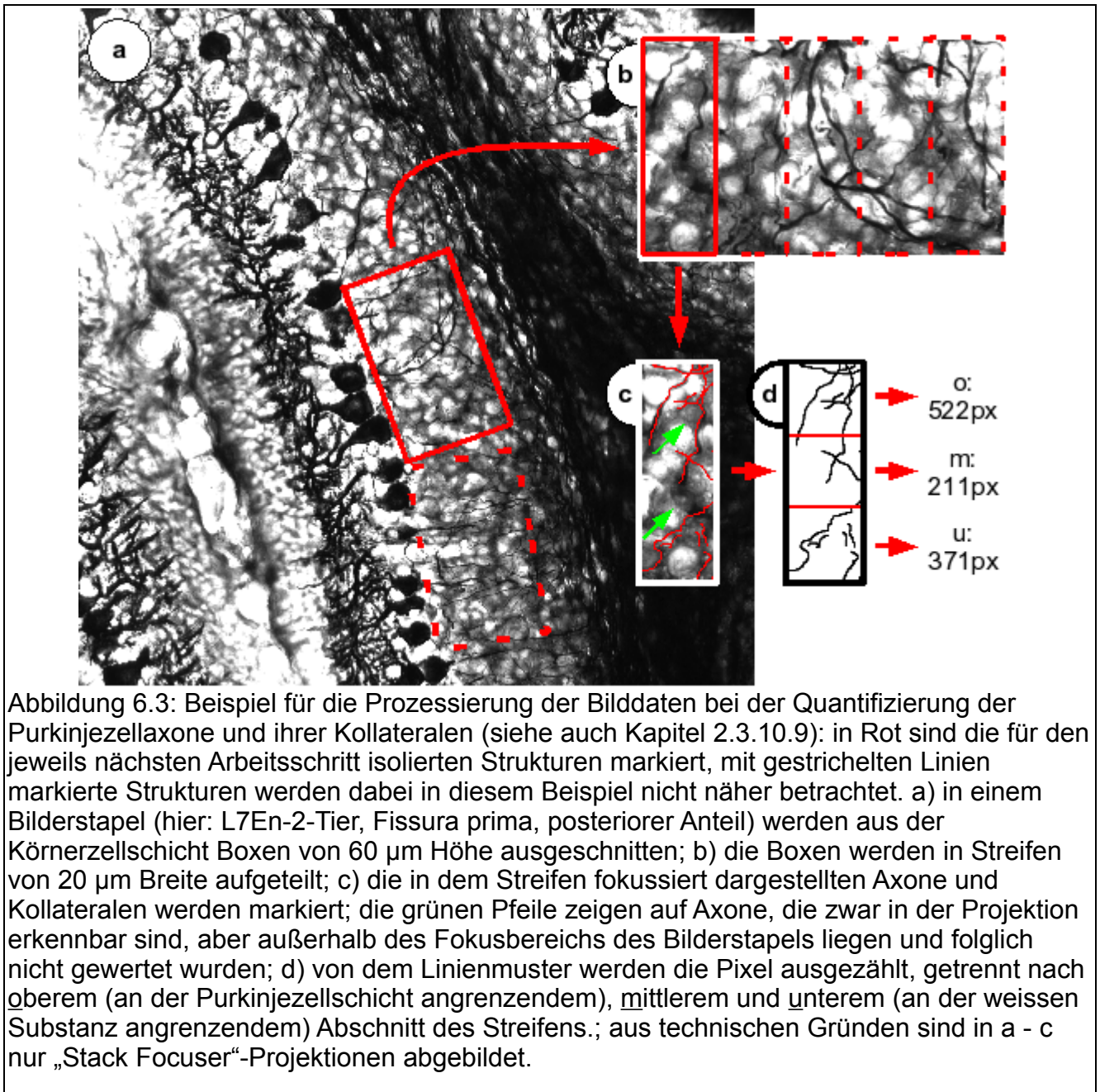
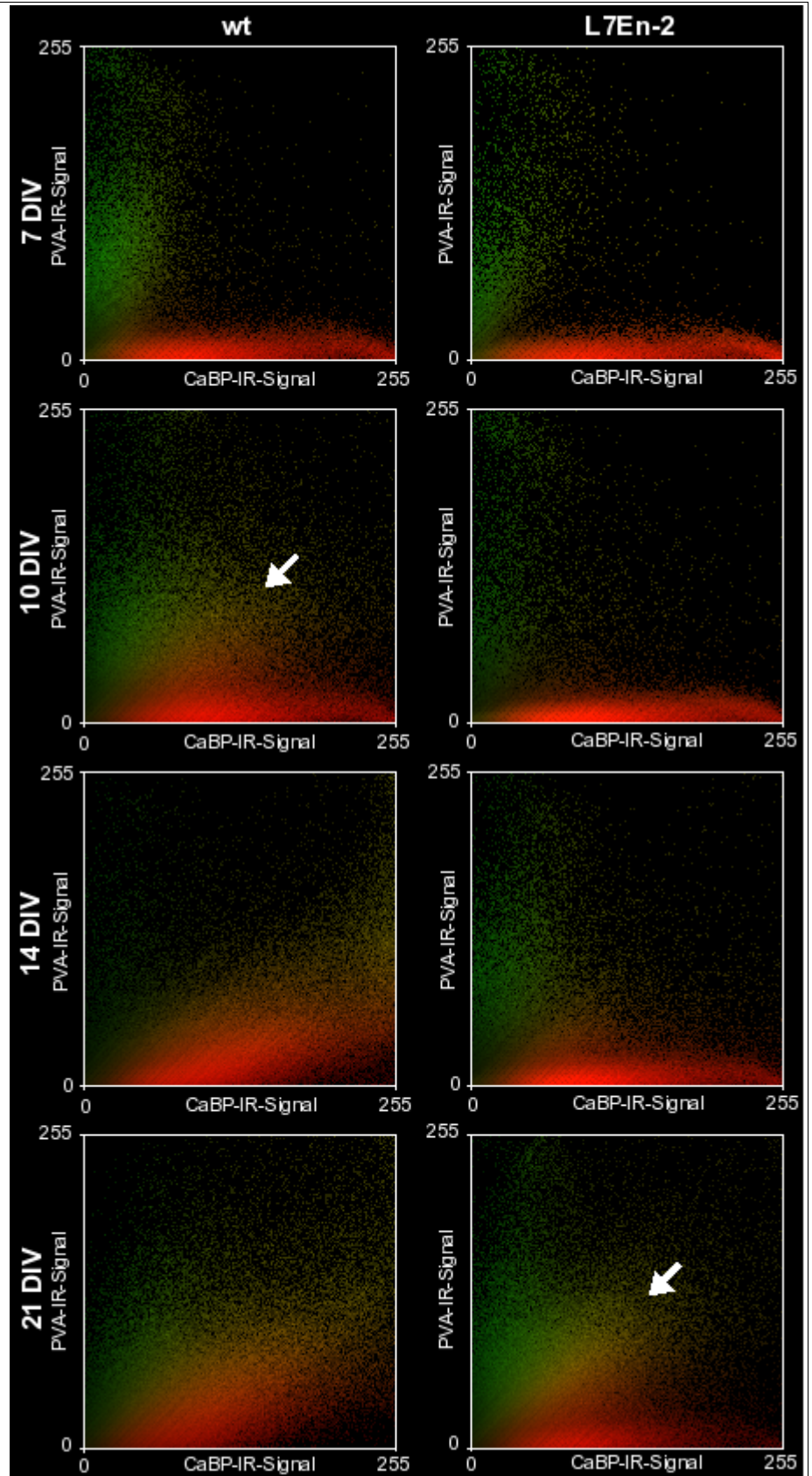


Abbildung 6.4:  
 Kolokalisationsanalyse für Parvalbumin- (PVA, grün) und Calbindin- (CaBP, rot) Immunreaktivität in Übersichtsaufnahmen von cerebellären Schnittkulturen: auf den Achsen sind die Helligkeitserte (0-255) für das jeweilige Immunsignal aufgetragen, die im Diagramm dargestellten Pixel geben durch ihre Helligkeit die relative Häufigkeit von Pixeln dieser Farbe wieder. Es ist erkennbar, dass in Wildtypkulturen (wt) deutlich früher (10 DIV) eine profunde Kolokalisation (gelbe Färbung, Pfeil) vorhanden ist, ein ähnliches Muster ist in Kulturen von L7En-2-Tieren erst ca. 10 Tage später zu beobachten. Die frühe nicht kolokalisierte Parvalbuminexpression wird durch eine bisher nicht identifizierte Gruppe von Zellen hervorgerufen, die regelmässig in jüngeren cerebellären Schnittkulturen in der Nähe der tiefen Kerne gefunden wird und auch in vivo transient vorhanden ist. Die bei 21 DIV verstärkt auftretende nicht kolokalisierte Parvalbuminexpression wird durch Korb-/Sternzellen hervorgerufen, die Parvalbumin, aber nicht Calbindin, exprimieren.



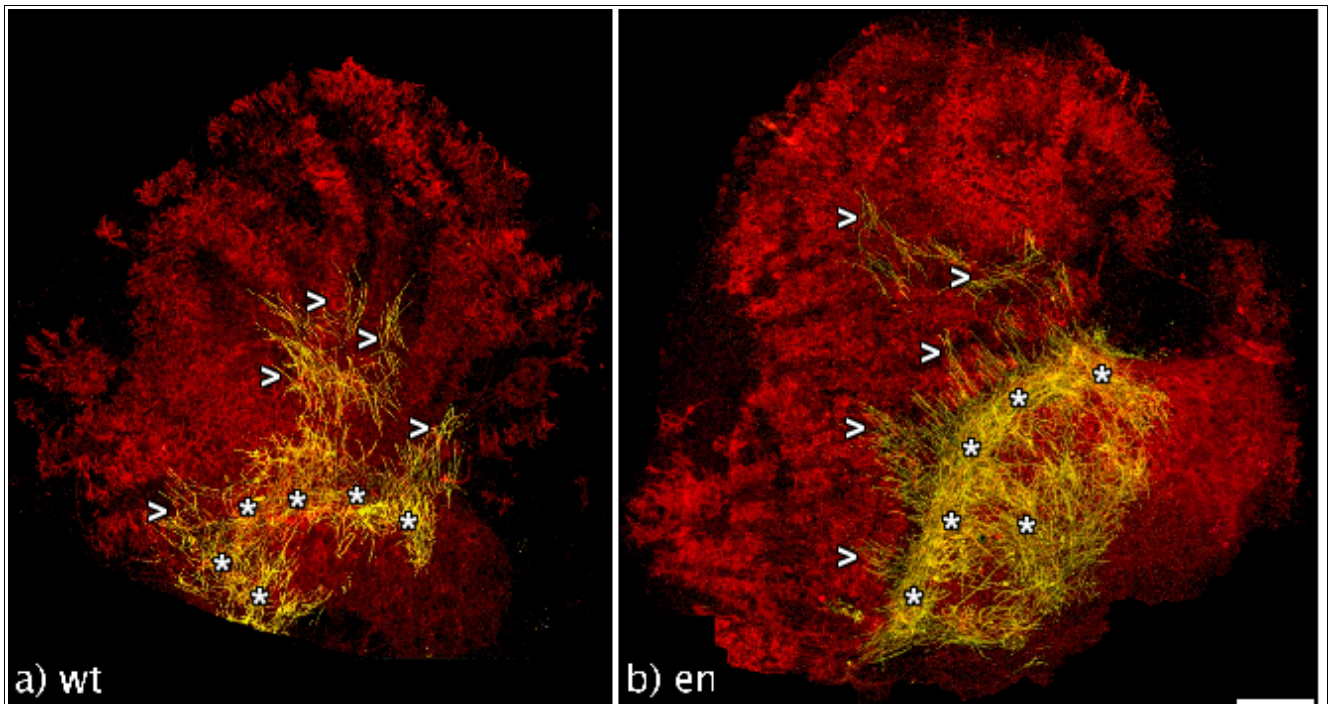


Abbildung 6.5) Verbreitungsmuster von Myelin auf Schnittkulturen (14 DIV): die höchste MBP-Dichte ist im Bereich der tiefen Kerne zu finden (\*) vor allem in deren Peripherie, von dort breiten sich MBP-immunreaktive Bahnen in Richtung der Gebiete mit Purkinjezellsomata aus (>), die Dichte der Internodien nimmt an den Enden der Bahnen ab. Dieses Muster ist sowohl in Wildtypkulturen (wt) als auch bei Kulturen aus L7En-2-Tieren (en) zu beobachten. „Average“-Projektion von konfokalen Aufnahmen, grün: MBP-IR, rot: CaBP-IR, Balken: 200µm.

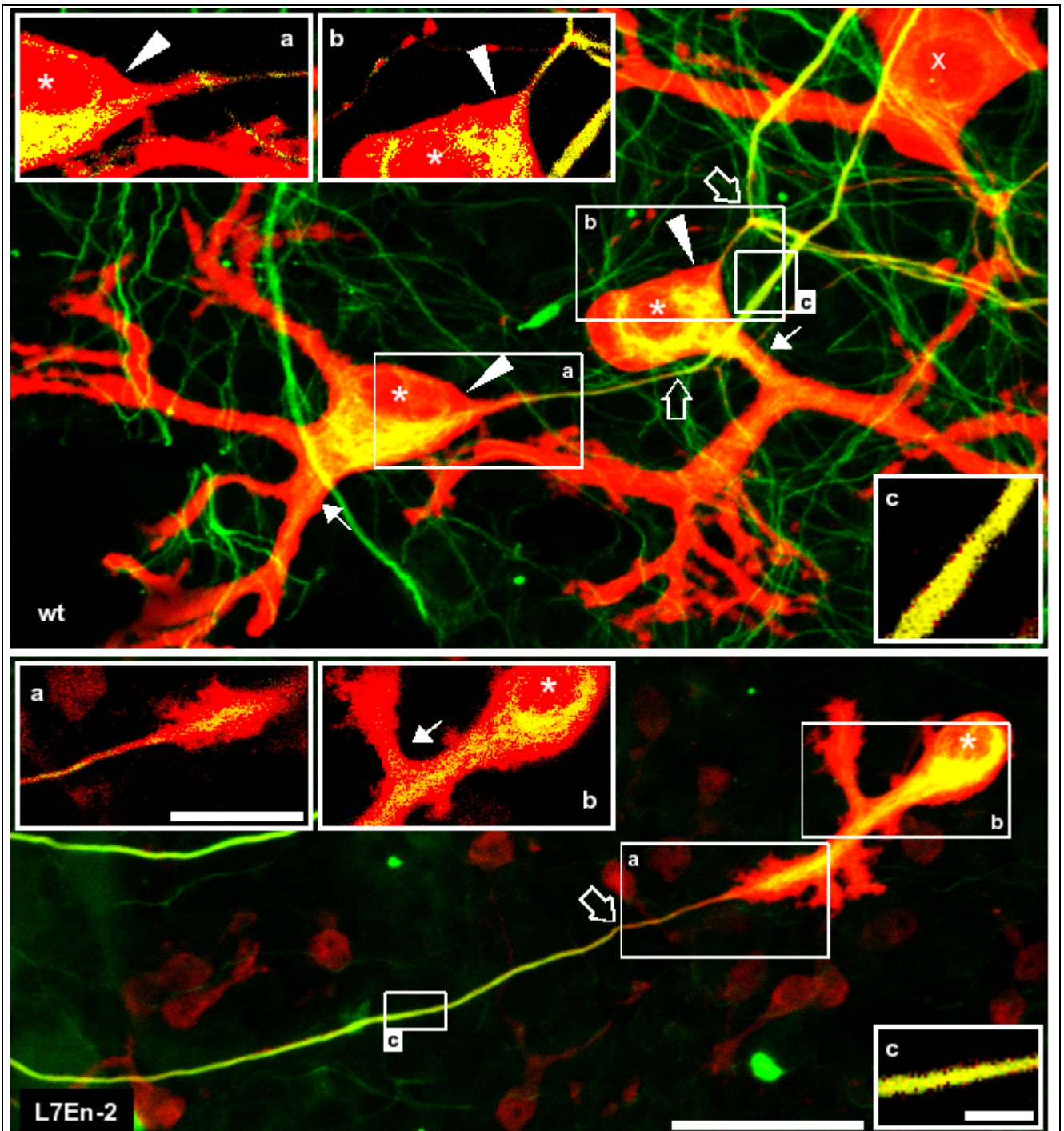


Abbildung 6.6: Ankyrin G-IR (grün) in Purkinjezellen (CaBP-IR: rot) in cerebellären P00-Schnittkulturen nach 14 DIV: Im Soma und proximalen Axon (a,b) ist die AnkG-IR schlierenförmig verteilt. Sie ist in Kernnähe (\*Zellkern) am stärksten und zieht in die proximalen Dendriten bzw. morphologisch ähnliche Strukturen in L7En-2-Zellen hinein (Pfeile). Das Zytoplasma weist überall einen unterschiedlich dicken AnkG-IR-freien Saum auf (Übersicht, a, b), während das Axon hinter seiner schmalsten Stelle (Hohlpfeil) über die volle Ausdehnung gefärbt ist (c). Nur in Wildtypkulturen fällt bei AnkG-positiven Zellen eine charakteristische größere Lücke der IR am axonalen Pol des Somas auf (Pfeilspitze). x: AnkG-negative Purkinjezelle; Übersicht: Maximum-Projektion von konfokalen Bilderstapeln (Balken: 40 $\mu$ m); Details: jeweils einzelne konfokale Ebene (Balken: a, b: 20 $\mu$ m, c: 5 $\mu$ m)

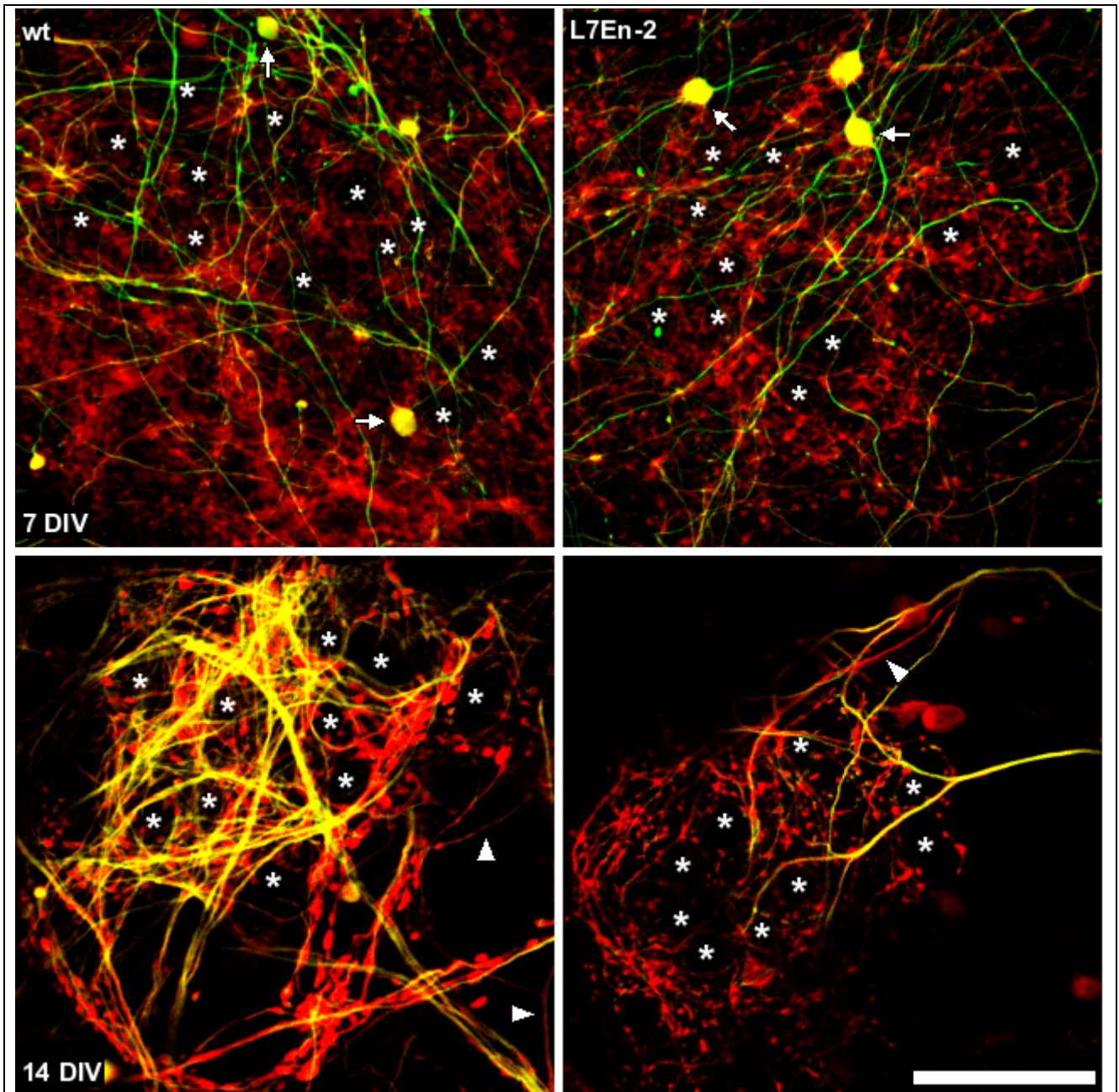


Abbildung 6.7: Ankyrin-G-IR in Purkinjezellaxonen in den tiefen cerebellären Kernen in P00 Schnittkulturen: sowohl in Wildtypkulturen (wt) als auch bei Kulturen von L7En-2-Tieren ist ein dichtes Netzwerk aus Purkinjezellaxonen mit ihren Terminalen (in rot: CaBP-IR) um die Zellen der tiefen Kerne (z.B. \*) erkennbar. Die AnkG-IR (grün) erstreckt sich in beiden Genotypen bei allen untersuchten Altersstadien lediglich auf das Axon, die Terminalen zeigen keine AnkG-IR. Es sind nicht alle Purkinjezellaxone AnkG-positiv (Pfeilspitzen), in AnkG-positiven Axonen sind Torpedos (Pfeile) immer AnkG- und CaBP-positiv. Für 14 DIV ist nur kolokalisierte AnkG-IR dargestellt, da zu diesem Zeitpunkt auch andere Axonen (z.B. von den tiefen Kernen) AnkG-ir sind. Balken: 50µm.

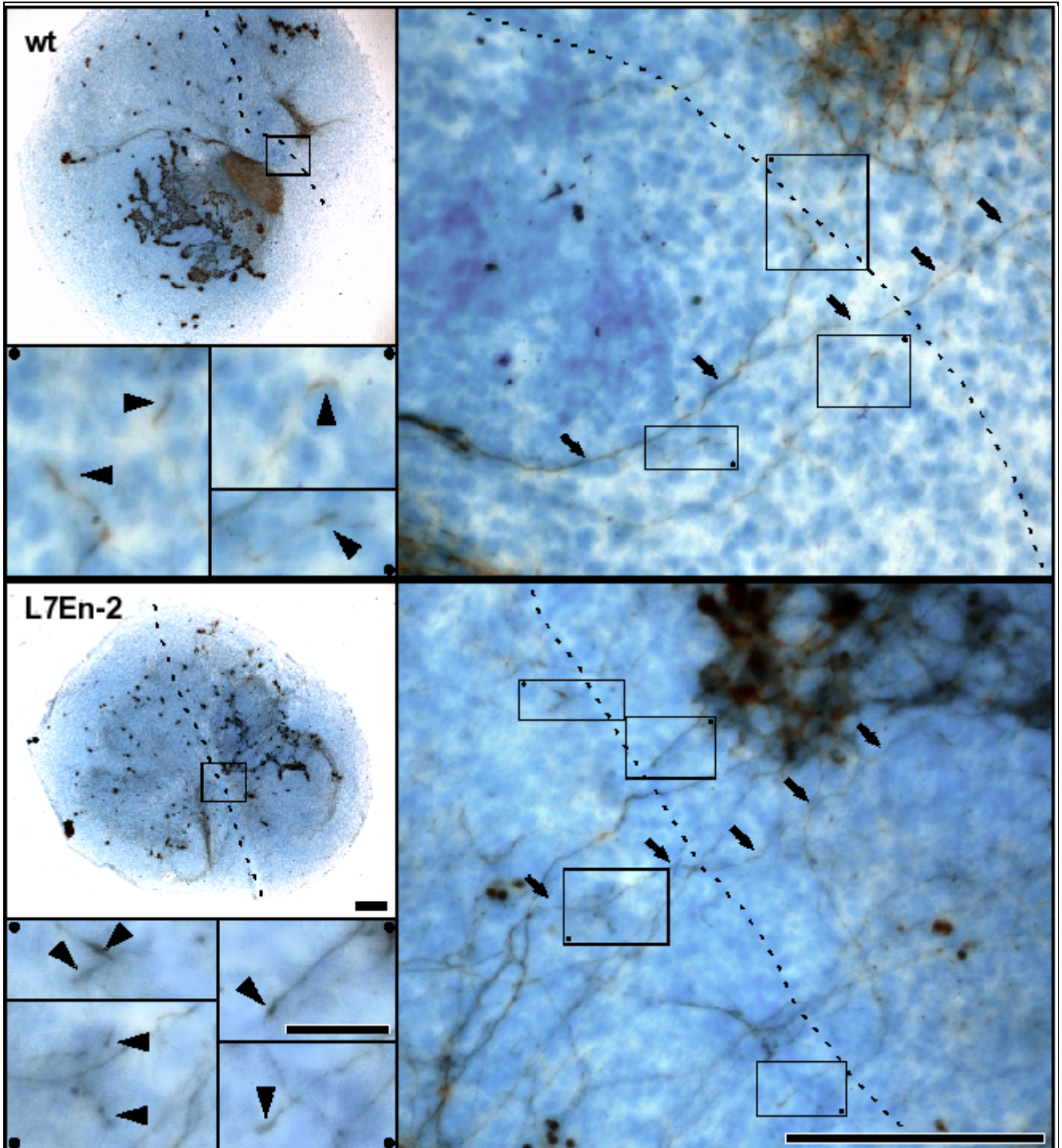


Abbildung 6.8: CaBP-IR in Schnittkulturen 3 Tage nach Axotomie (5 DIV; Axotomie: 2 DIV). Der Bereich der Läsion (gestrichelte Linie) ist zu diesem Kulturzeitpunkt gut zu identifizieren. In Kulturen von beiden Genotypen wachsen bereits Axone in den Läsionsbereich ein (Details, Pfeilspitzen), vereinzelt überbrücken sie auch schon die komplette Läsion (Pfeile). Der vergrößerte Bildausschnitt rechts ist in der Übersicht (jeweils links oben) gerahmt; die Detailvergrößerungen entsprechen den schwarzen Rahmen im Ausschnitt (Zuordnung über die Punkte). Balken: Übersicht: 200µm, Ausschnitt: 100µm, Details: 20µm.

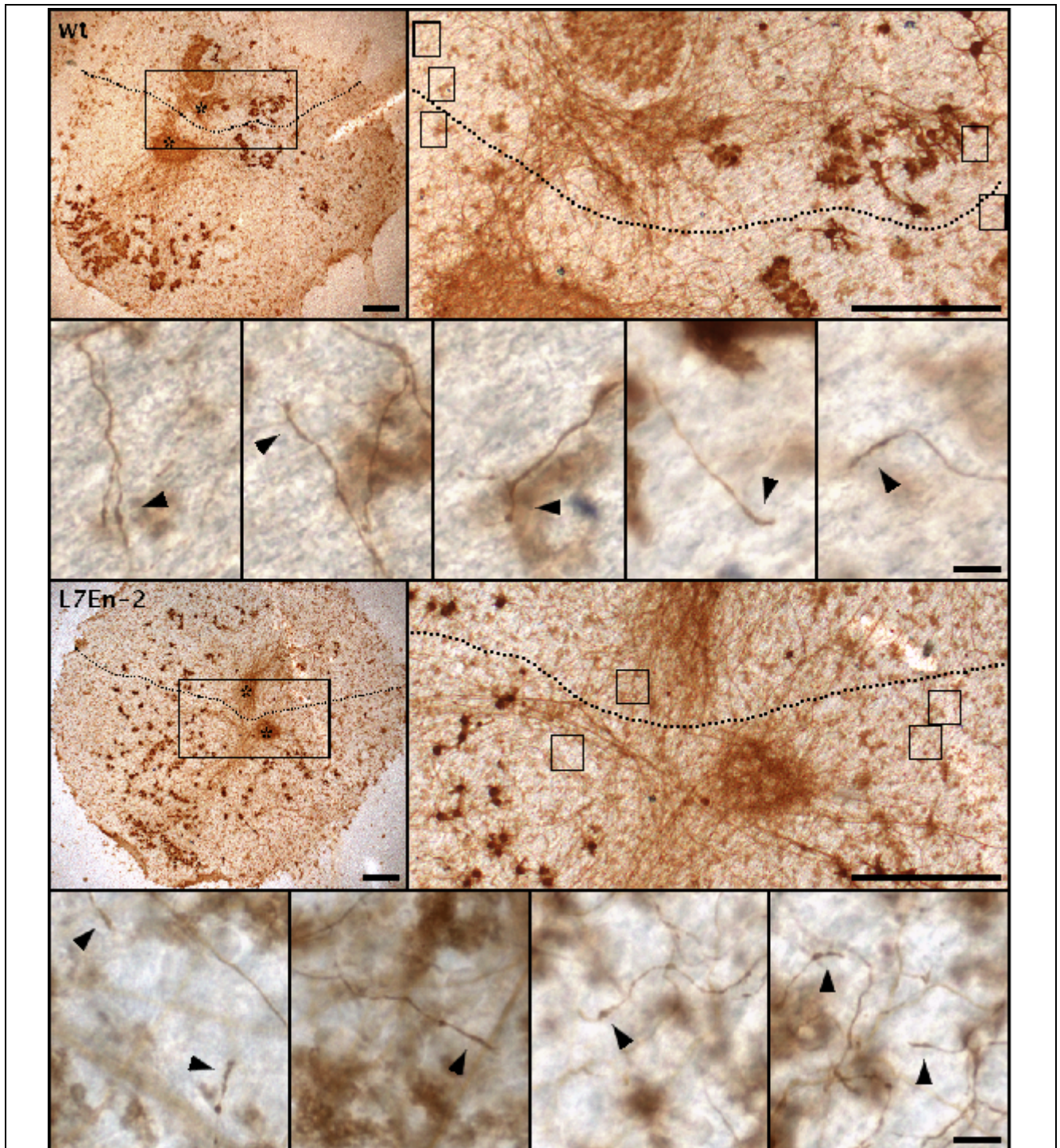


Abbildung 6.9: CaBP-IR in Schnittkulturen 5 Tage nach Axotomie (7 DIV; Axotomie: 2 DIV): Bei Kulturen von Wildtyptieren (wt) und L7En-2-Tieren zeigt sich ein vergleichbares Bild: Besonders im Bereich zwischen den tiefen Kernen (\*) sind zahlreiche Purkinjezellaxone erkennbar, die die Läsion überbrücken; Die Detailvergrößerungen zeigen Axonausläufer im Umfeld der Läsion, welche filopodienartige Strukturen (Pfeile) aufweisen, wie sie für auswachsende Axone typisch sind. Der vergrößerte Bildausschnitt ist in der Übersicht gerahmt; die Detailvergrößerungen entsprechen den schwarzen Rahmen im vergrößerten Ausschnitt (v.l.n.r.); gepunktete Linie: Läsion; CaBP-IR: braun (DAB); Balken: 200µm (Details: 10µm).

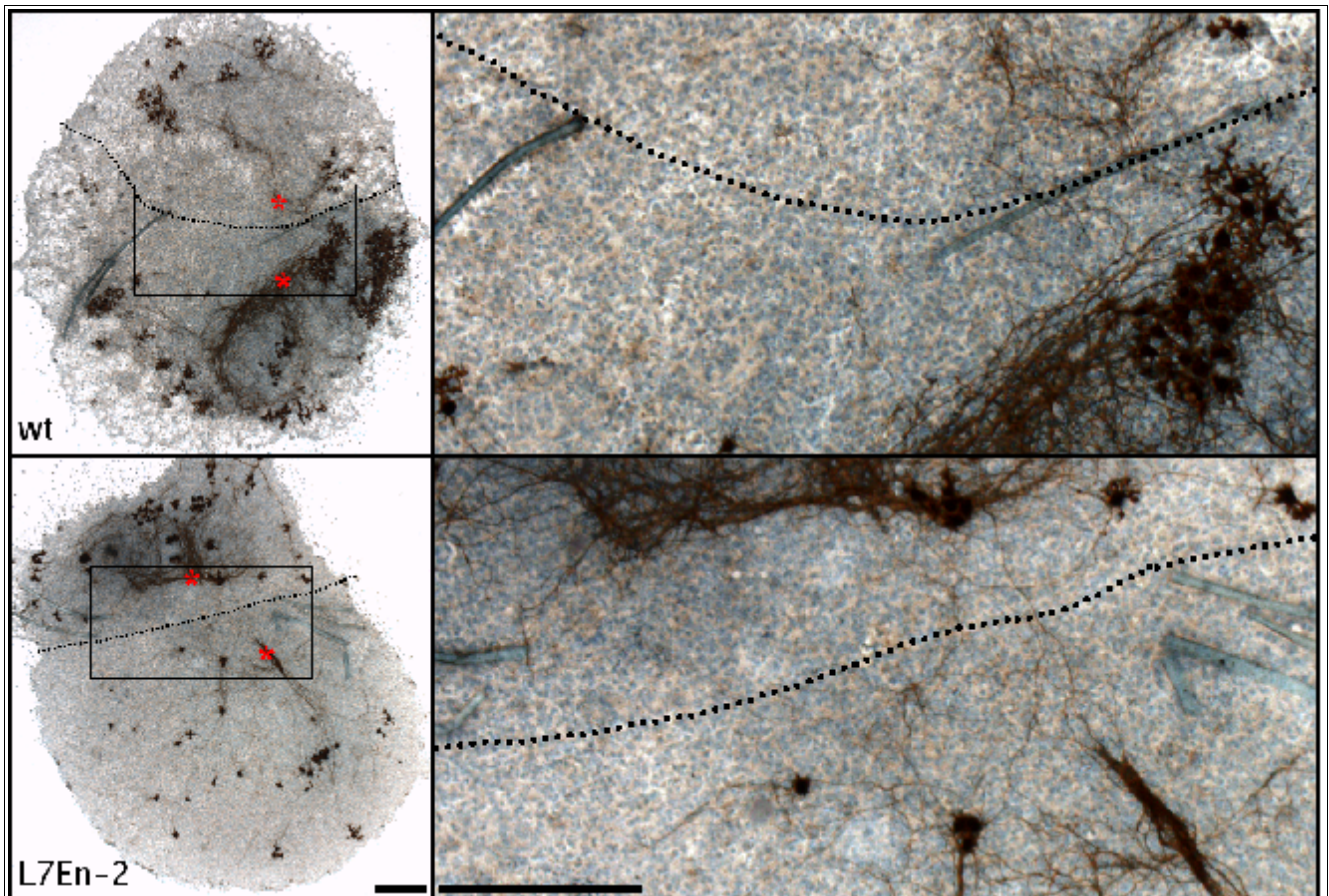


Abbildung 6.10: CaBP-IR in cerebellären Schnittkulturen 8 Tage nach Axotomie (10 DIV; Axotomie: 2 DIV): Besonders im Bereich zwischen den Bereichen, in denen aufgrund der charakteristischen Endverzweigungen der Purkinjezellen die tiefen Kerne lokalisiert werden können (\*), hat sich ein Netzwerk aus Axonen gebildet, welches die Läsion überspannt. Dieses Netzwerk weist keinen erkennbaren Unterschied zwischen Wildtypkultur (wt) und L7En-2-Kultur auf. Der vergrößerte Bildausschnitt entspricht dem gerahmten Bereich in der Übersicht; gepunktete Linie: Läsion; CaBP-IR: schwarzbraun (DAB), Zellkerne blau (Hämalaun); Balken: 250µm.



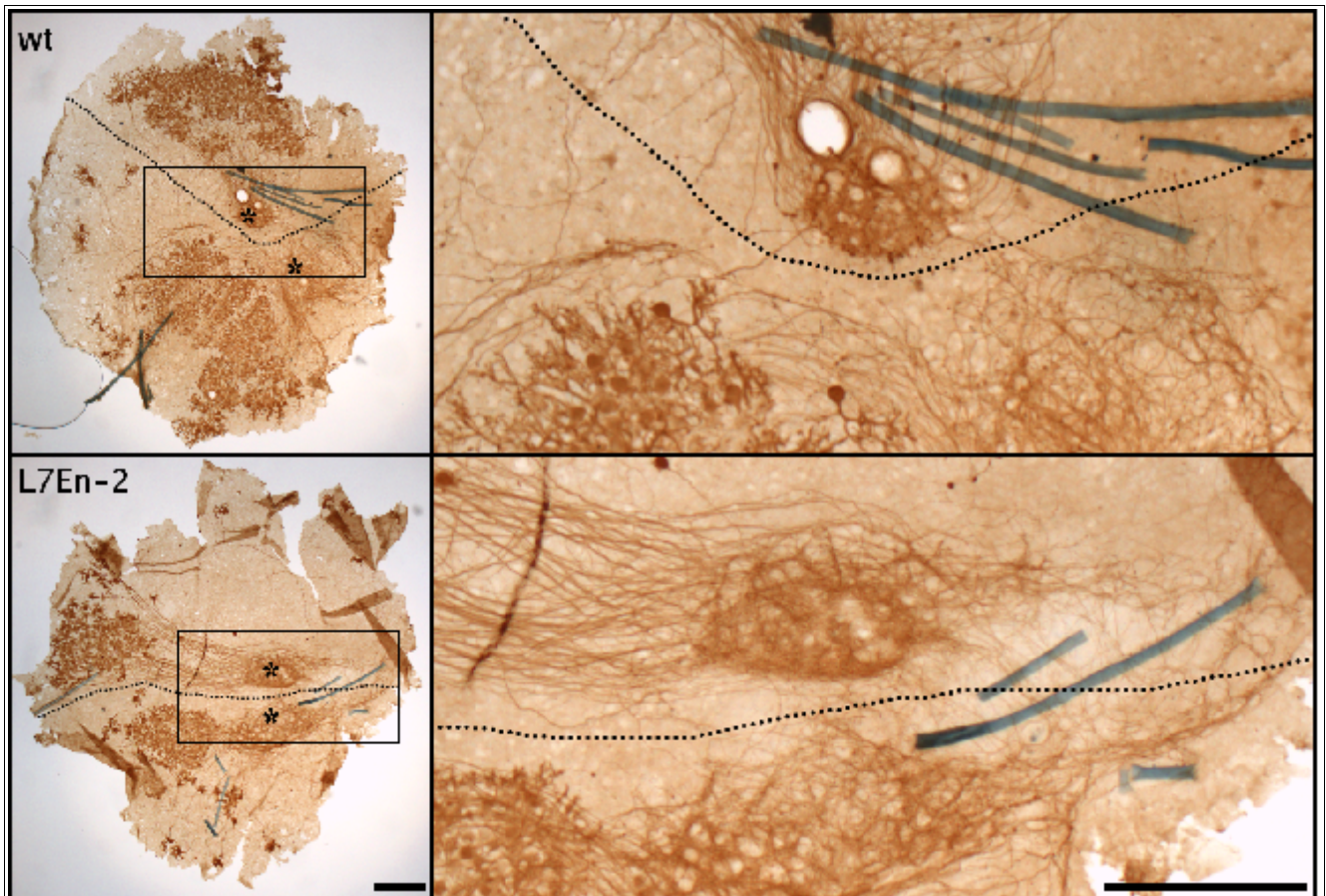


Abbildung 6.11: CaBP-IR in cerebellären Schnittkulturen 12 Tage nach Axotomie (14 DIV; Axotomie: 2 DIV): wie bei den jüngeren Entwicklungsstadien (Abbildungen 6.9 und 6.10) zeigt sich auch 12 Tage nach der Läsion vor allem zwischen den Bereichen der tiefen Kerne (\*) ein Netzwerk von Axonen, welches die Läsion überspannt. Dieses Netzwerk ist bei Kulturen von Wildtyptieren (wt) und L7En-2-Tieren gleichermassen ausgebildet. Der vergrößerte Bildausschnitt entspricht dem gerahmten Bereich in der Übersicht; die gepunktete Linie gibt die Läsionsstrecke an; CaBP-IR: braun (DAB); Balken: 250µm.

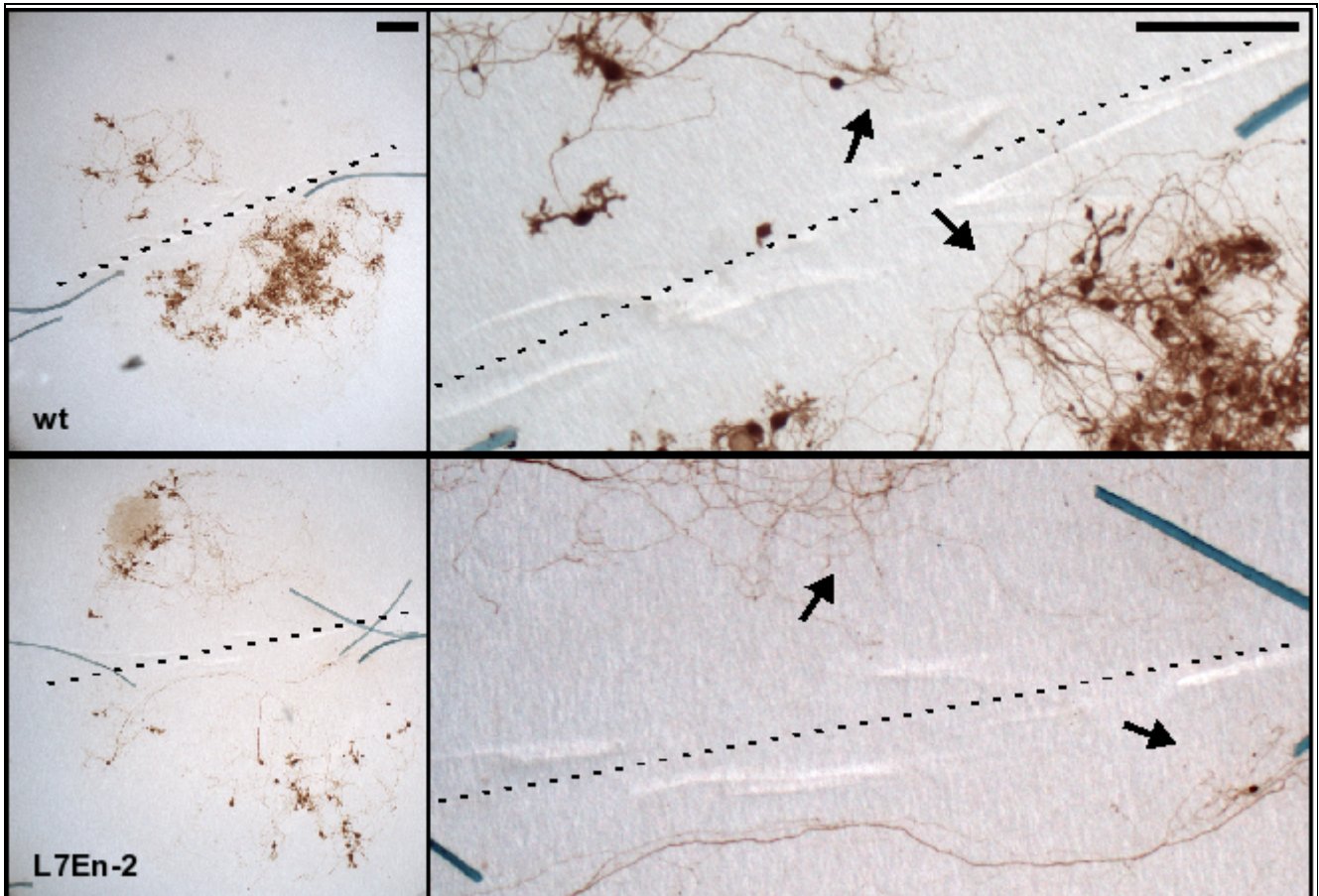


Abbildung 6.12: CaBP-IR in cerebellären Schnittkulturen 7 Tage nach Axotomie (14 DIV; Axotomie: 7 DIV): Weder in Wildtypkulturen (wt) noch in Kulturen von L7En-2-Tieren sind Axone zu erkennen, die die Läsion (gestrichelte Linie) überwachsen haben, auch nicht zwischen den Bereichen, denen man aufgrund charakteristischer Purkinjezellaxonverzweigungen die tiefen Kerne zuordnen kann (Pfeile). Balken: 200µm

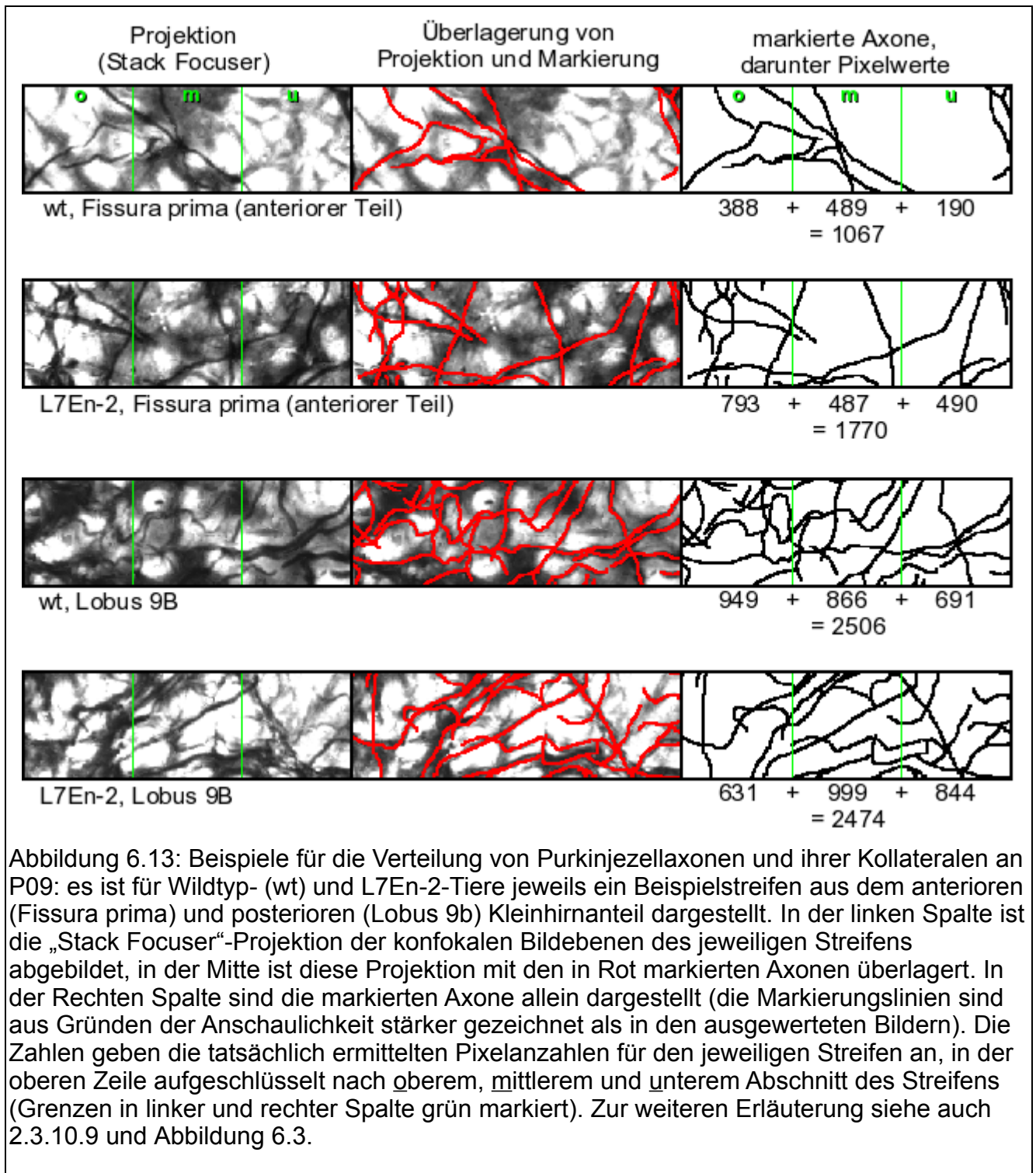


Abbildung 6.14: Unterschiedliche Verteilung der  $\beta$ 2-Spectrin-IR in Purkinjezellen an P09: während sich die  $\beta$ 2-Spectrin-IR im Wildtyp (a) am axonalen Pol des Somas konzentriert (im Bild jeweils oben), ist die IR beim L7En-2-Tier (b) gleichmässig über das Soma verteilt. Die blauen Kreise zeigen Beispiele für Areale, die zur Berechnung des Quotienten (2.3.10.10) vermessen wurden. Die Bilder zeigen Ausschnitte einer Ebene aus einem konfokalen Bilderstapel von einem Sagittalschnitt, grün:  $\beta$ 2-Spectrin, rot: CaBP, Balken: 20 $\mu$ m. Der Antikörper gegen  $\beta$ 2-Spectrin erkennt Antigene in Körnerzellen (grüne Zellen im oberen Bildbereich), im Purkinjezellsoma und erzeugt eine punktförmige IR auf den Purkinjezeldendriten, wie sie für postsynaptische Proteine typisch ist. Dieses Verteilungsmuster würde auf eine Spezifität für beide bekannten Isoformen von  $\beta$ 2-Spectrin hinweisen.

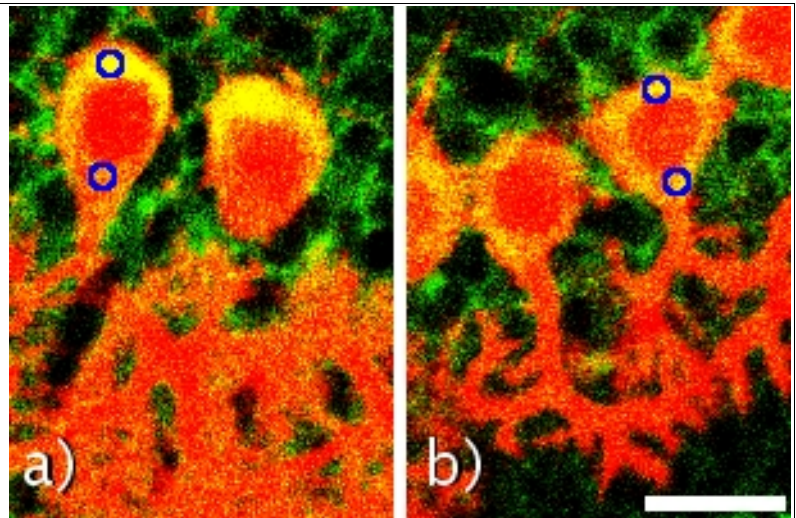
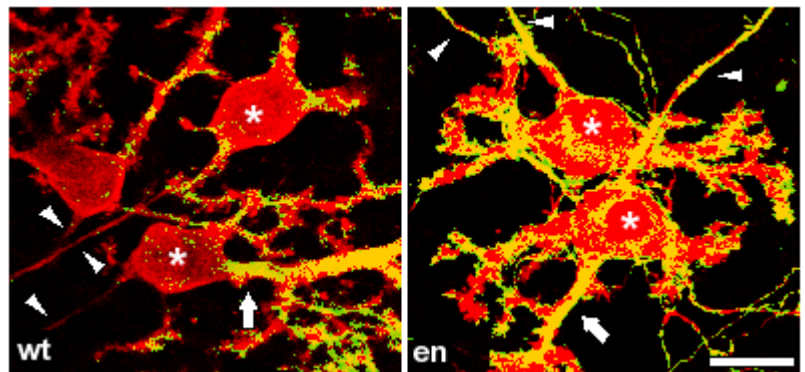


Abbildung 6.15:  $\beta$ III-Tubulin-IR in Purkinjezellen in cerebellären P00-Schnittkulturen nach 14 DIV: im Wildtyp (wt) ist die IR fast ausschließlich auf die Dendriten (Pfeile) konzentriert, während in der L7En-2-Mutante (en) auch in den Axonen (Pfeilspitzen) und im Soma (mit Ausnahme des Kerns (\*)) ein starkes Immunsignal zu



beobachten ist. Maximum-Projektion von konfokalen Bilderstapeln; Rot: Calbindin-D28k-IR, grün: kolokalisierte  $\beta$ III-Tubulin-IR ( $\beta$ III-Tubulin kommt in fast allen Neuronen vor, daher ist aus Gründen der Anschaulichkeit nur die kolokalisierte IR gezeigt); Balken: 20 $\mu$ m

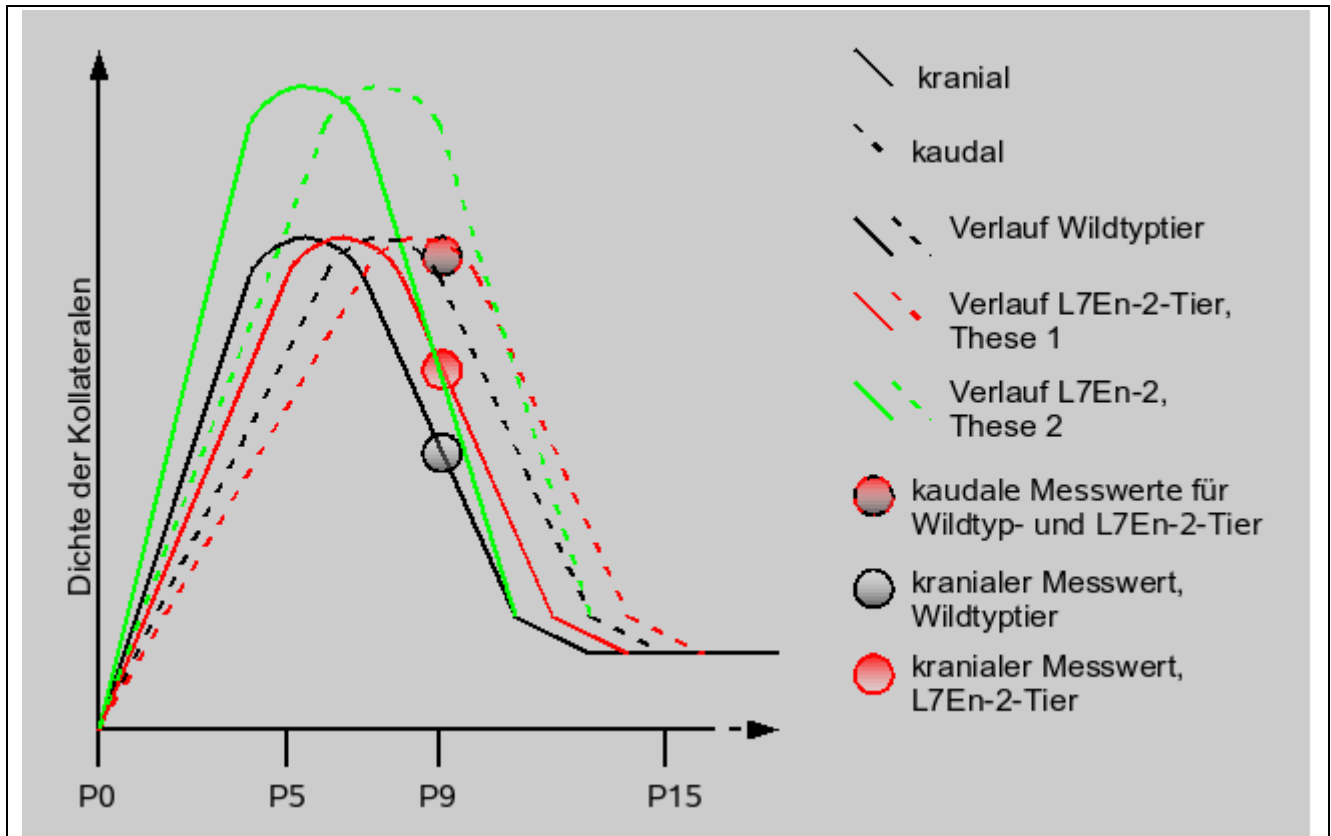


Abbildung 6.16: Dichte der Purkinjezellkollateralen in der frühen postnatalen Entwicklung: die kranialen Messwerte liegen im Wildtyp-Tier deutlich unter den im L7En-2-Tier gemessenen, die kaudalen Messwerte sind bei beiden Genotypen vergleichbar (siehe auch Abbildung 3.10). Aus Literaturdaten [26][96] kann man aufgrund erhaltenen Messwerte die hier dargestellten Kurven für Wildtyp-Tiere ableiten. Zieht man zunächst nur den kranialen Messwert für die Entwicklung im L7En-2-Tier heran, sind folgende Szenarien denkbar:

These 1: Der von den Axonen der Purkinjezellen gebildete Kollateralplexus entwickelt sich gegenüber dem Wildtyp-Tier verzögert.

These 2: Der Kollateralplexus entwickelt sich in L7En-2-Tieren nach demselben Zeitmuster wie im Wildtyp-Tier, aber insgesamt wesentlich stärker.

Bei einer protrahierten oder insgesamt geringeren Entwicklung des Kollateralplexus im L7En-2-Tier würde man Werte erwarten, die unter denen des Wildtyps liegen. Diese Szenarien können also ausgeschlossen werden. Gegen These 2 spricht, dass im kaudalen Bereich die Messwerte in beiden Genotypen vergleichbar sind. Man würde hier einen höheren Wert für L7En-2-Tiere erwarten. Mit These 1 hingegen kann man die vergleichbar grossen kaudalen Werte erklären. Es kann aufgrund der vorliegenden Daten natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Engrailed-2-Überexpression im kranialen und kaudalen Bereich des Kleinhirns unterschiedlich auf die Differenzierung der Purkinjezellkollateralen auswirkt. Das einfachere Erklärungsmodell stellt aber These 1 dar. These 1 ist damit die geeignetere Arbeitshypothese, bis genauere Daten zur Entwicklung des Plexus infraganglionaris eine weitergehende Interpretation zulassen.

## 6.3 Abbildungsverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.....	5	Abbildung 3.14.....	62
Abbildung 1.2.....	9	Abbildung 3.15.....	63
Abbildung 1.3.....	10	Abbildung 3.16.....	64
Abbildung 1.4.....	13	Abbildung 3.17.....	65
Abbildung 2.1.....	19	Abbildung 3.18.....	66
Abbildung 2.2.....	20	Abbildung 3.19.....	67
Abbildung 2.3.....	22	Abbildung 3.20.....	68
Abbildung 2.4.....	31	Abbildung 3.21.....	70
Abbildung 2.5.....	33	Abbildung 3.22.....	71
Abbildung 2.6.....	34	Abbildung 3.23.....	72
Abbildung 2.7.....	36	Abbildung 4.1.....	77
Abbildung 2.8.....	37	Abbildung 6.1.....	93
Abbildung 2.9.....	38	Abbildung 6.2.....	94
Abbildung 2.10.....	39	Abbildung 6.3.....	95
Abbildung 3.1.....	46	Abbildung 6.4.....	96
Abbildung 3.2.....	47	Abbildung 6.5.....	97
Abbildung 3.3.....	48	Abbildung 6.6.....	98
Abbildung 3.4.....	49	Abbildung 6.7.....	99
Abbildung 3.5.....	50	Abbildung 6.8.....	100
Abbildung 3.6.....	51	Abbildung 6.9.....	101
Abbildung 3.7.....	52	Abbildung 6.10.....	102
Abbildung 3.8.....	53	Abbildung 6.11.....	103
Abbildung 3.9.....	54	Abbildung 6.12.....	104
Abbildung 3.10.....	57	Abbildung 6.13.....	105
Abbildung 3.11.....	58	Abbildung 6.14.....	106
Abbildung 3.12.....	60	Abbildung 6.15.....	106
Abbildung 3.13.....	61	Abbildung 6.16.....	107

## 6.4 Literaturverzeichnis

### Literaturverzeichnis

1. Purkinje, J.E. (1838) Neueste Untersuchungen aus der Nerven- und Hirnanatomie. in: Bericht über die Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte im September 1837.
2. Ramon y Cajal, S. (1911) Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres. Paris: Maloine.
3. Ango, F., di Cristo, G., Higashiyama, H., Bennett, V., Wu, P., Huang, Z.J. (2004) Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at Purkinje axon initial segment. *Cell* 119: 257-272.
4. Karam, S.D., Burrows, R.C., Logan, C., Koblar, S., Pasquale, E.B., Bothwell, M. (2000) Eph receptors and ephrins in the developing chick cerebellum: relationship to sagittal patterning and granule cell migration. *J Neurosci* 20: 6488—6500.
5. Bouslama-Oueghlani, L., Wehrle, R., Sotelo, C., Dusart, I. (2005) Heterogeneity of NG2-expressing cells in the newborn mouse cerebellum. *Developmental Biology* 285: 409—421.
6. Zhang, J., Smith, D., Yamamoto, M., Ma, L., McCaffery, P. (2003) The meninges is a source of retinoic acid for the late-developing hindbrain. *J Neurosci* 23: 7610-7620.
7. Voogd, J., Glickstein, M. (1998) The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci* 21: 370-375.
8. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (2000) Principles of neural science, 4/e. London: McGraw-Hill.
9. Andressen, C., Blümcke, I., Celio, M.R. (1993) Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res* 271: 181-208.
10. Baimbridge, K.G., Celio, M.R., Rogers, J.H. (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 15: 303-308.
11. Blümcke, I., Celio, M.R. (1992) Parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivities coexist within cytochrome oxidase-rich compartments of squirrel monkey area 18. *Exp Brain Res* 92: 39-45.
12. Millen, K.J., Millonig, J.H., Wingate, R.J.T., Alder, J., Hatten, M.E. (1999) Neurogenetics of the cerebellar system. *J Child Neurol* 14: 574-582.
13. Maricich, S.M., Herrup, K. (1999) Pax-2 expression defines a subset of GABAergic interneurons and their precursors in the developing murine cerebellum. *J Neurobiol* 41: 281-294.
14. Schilling, K. (2000) Lineage, development and morphogenesis of cerebellar interneurons. *Prog Brain Res* 124: 51-68.
15. Aggerwal, A.S., Hendelman, W.J. (1980) The Purkinje neuron: II. Electron microscopic analysis of the mature Purkinje neuron in organotypic culture. *J Comp Neurol* 193: 1081-1096.
16. Miyata, T., Nakajima, K., Mikoshiba, K., Ogawa, M. (1997) Regulation of Purkinje cell alignment by reelin as revealed with CR-50 antibody. *J Neurosci* 17: 3599-3609.
17. Dunn, M.E., Schilling, K., Mugnaini, E. (1998) Development and fine structure of murine

- Purkinje cells in dissociated cerebellar cultures: dendritic differentiation, synaptic maturation, and formation of cell-class specific features. *Anat Embryol* 197: 31-50.
18. Powell, S.K., Rivas, R.J., Rodriguez-Boulan, E., Hatten, M.E. (1997) Development of polarity in cerebellar granule neurons. *J Neurobiol* 32: 223-236.
  19. Bouslama-Oueghlani, L., Wehrle, R., Sotelo, C., Dusart, I. (2003) The developmental loss of the ability of Purkinje cells to regenerate their axons occurs in the absence of myelin: an in vitro model to prevent myelination. *J Neurosci* 23: 8318-8329.
  20. Ghoumari, A.M., Dusart, I., El-Etr, M., Tronche, F., Sotelo, C., Schumacher, M., Baulieu, E.E. (2003) Mifepristone (RU486) protects Purkinje cells from cell death in organotypic slice cultures of postnatal rat and mouse cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7953-7958.
  21. Dusart, I., Airaksinen, M.S., Sotelo, C. (1997) Purkinje cell survival and axonal regeneration are age dependent: an in vitro study. *J Neurosci* 17: 3710-3726.
  22. Dusart, I., Morel, M.P., Wehrle, R., Sotelo, C. (1999) Late axonal sprouting of injured Purkinje cells and its temporal correlation with permissive changes in the glial scar. *J Comp Neurol* 408: 399-418.
  23. Hashimoto, M., Mikoshiba, K. (2003) Mediolateral compartmentalization of the cerebellum is determined on the "birth date" of Purkinje cells. *J Neurosci* 23: 11342-11351.
  24. Oberdick, J., Baader, S.L., Schilling, K. (1998) From zebra stripes to postal zones: deciphering patterns of gene expression in the cerebellum. *Trends Neurosci* 21: 383-390.
  25. Larouche, M., Hawkes, R. (2006) From clusters to stripes: the developmental origins of adult cerebellar compartmentation. *Cerebellum* 5: 77-88.
  26. Herrup, K., Kuemerle, B. (1997) The compartmentalization of the cerebellum. *Annu Rev Neurosci* 20: 61-90.
  27. Gao, W., Chen, G., Reinert, K.C., Ebner, T.J. (2006) Cerebellar cortical molecular layer inhibition is organized in parasagittal zones. *J Neurosci* 26: 8377-8387.
  28. Sugihara, I., Shinoda, Y. (2004) Molecular, topographic, and functional organization of the cerebellar cortex: a study with combined Aldolase C and olivocerebellar labeling. *J Neurosci* 24: 8785-8771.
  29. Gravel, C., Hawkes, R.B. (1990) Parasagittal organization of the rat cerebellar cortex: direct comparison of Purkinje cell compartments and the organization of the spinocerebellar projection. *J Comp Neurol* 291: 79-102.
  30. Paradies, M.A., Eisenman, L.M. (1993) Evidence of early topographic organization in the embryonic olivocerebellar projection: a model system for the study of pattern formation processes in the central nervous system. *Dev Dyn* 197: 125-145.
  31. Millen, K.J., Hui, C.C., Joyner, A.L. (1995) A role for En-2 and other murine homologues of *Drosophila* segment polarity genes in regulating positional information in the developing cerebellum. *Development* 121: 3935-3945.
  32. Baader, S.L., Sanlioglu, S., Berrebi, A.S., Parker-Thornburg, J., Oberdick, J. (1998) Ectopic overexpression of engrailed-2 in cerebellar Purkinje cells causes restricted cell loss and retarded external germinal layer development at lobule junctions. *J Neurosci* 18: 1763-1773.
  33. Hawkes, R., Colonnier, M., Leclerc, N. (1985) Monoclonal antibodies reveal sagittal banding in the rodent cerebellar cortex. *Brain Res* 333: 359-365.
  34. Brochu, G., Maler, L., Hawkes, R. (1990) Zebrin II: a polypeptide antigen expressed



- selectively by Purkinje cells reveals compartments in rat and fish cerebellum. *J Comp Neurol* 291: 538-552.
35. Baader, S.L., Vogel, M.W., Sanlioglu, S., Zhang, X., Oberdick, J. (1999) Selective disruption of "late onset" sagittal banding patterns by ectopic expression of engrailed-2 in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 19: 5370-5379.
  36. Larouche, M., Che, P.M., Hawkes, R. (2006) Neurogranin expression identifies a novel array of Purkinje cell parasagittal stripes during mouse cerebellar development. *J Comp Neurol* 494: 215-227.
  37. Karam, S.D., Kim, Y.S., Bothwell, M. (2001) Granule cells migrate within raphes in the developing cerebellum: an evolutionarily conserved morphogenic event. *J Comp Neurol* 440: 127-135.
  38. Gravel, C., Eisenman, L.M., Sasseville, R., Hawkes, R. (1987) Parasagittal organization of the rat cerebellar cortex: direct correlation between antigenic Purkinje cell bands revealed by mabQ113 and the organization of the olivocerebellar projection. *J Comp Neurol* 265: 294-310.
  39. Hawkes, R., Leclerc, N. (1989) Purkinje cell axon collateral distributions reflect the chemical compartmentation of the rat cerebellar cortex. *Brain Res* 476: 279-290.
  40. Inouye, M., Murakami, U. (1980) Temporal and spatial patterns of Purkinje cell formation in the mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 194: 499-503.
  41. Zanjani, H.S., Vogel, M.W., Delhaye-Bouchaud, N., Martinou, J.C., Mariani, J. (1996) Increased cerebellar Purkinje cell numbers in mice overexpressing a human bcl-2 transgene. *J Comp Neurol* 374: 332-341.
  42. Hendelman, W.J., Aggerwal, A.S. (1980) The Purkinje neuron: I. A Golgi study of its development in the mouse and in culture. *J Comp Neurol* 193: 1063-1079.
  43. Dusart, I., Ghomari, A., Wehrle, R., Morel, M.P., Bouslama-Oueghlani, L., Camand, E., Sotelo, C. (2005) Cell death and axon regeneration of Purkinje cells after axotomy: challenges of classical hypotheses of axon regeneration. *Brain Res Brain Res Rev* 49: 300-316.
  44. Hannan, A.J., Gunning, P., Jeffrey, P.L., Weinberger, R.P. (1998) Structural compartments within neurons: developmentally regulated organization of microfilament isoform mRNA and protein. *MCN* 11: 289-304.
  45. Boukhtouche, F., Janmaat, S., Vodjdani, G., Gautheron, V., Mallet, J., Dusart, I., Mariani, J. (2006) Retinoid-related orphan receptor alpha controls the early steps of Purkinje cell dendritic differentiation. *J Neurosci* 26: 1531-1538.
  46. Lordkipanidze, T., Dunaevsky, A. (2005) Purkinje cell dendrites grow in alignment with Bergmann glia. *Glia* 51: 229-234.
  47. Gianola, S., Savio, T., Schwab, M.E., Rossi, F. (2003) Cell-autonomous mechanisms and Myelin-associated factors contribute to the development of Purkinje axon intracortical plexus in the rat cerebellum. *J Neurosci* 23: 4613-4624.
  48. Dusart, I., Sotelo, C. (1994) Lack of Purkinje cell loss in adult rat cerebellum following protracted axotomy: degenerative changes and regenerative attempts of the severed axons. *J Comp Neurol* 347: 211-232.
  49. Hawkes, R., Herrup, K. (1995) Aldolase C/zebrin II and the regionalization of the cerebellum. *J Mol Neurosci* 6: 147-158.
  50. Calderon de Anda, F., Pollarolo, G., Santos Da Silva, J., Camoletto, P.G., Feiguin, F.,

- Dotti, C.G. (2005) Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature* 436: 704-708.
51. Jan, Y.N., Jan, L.Y. (2003) The control of dendrite development. *Neuron* 40: 229-242.
  52. Goldberg, J.L. (2003) How does an axon grow?. *Genes Dev* 17: 941-958.
  53. Goldberg, J.L., Klassen, M.P., Hua, Y., Barres, B.A. (2002) Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells. *Science* 296: 1860-1864.
  54. Horton, A.C., Ehlers, M.D. (2003) Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* 40: 277-295.
  55. Yu, W., Cook, C., Sauter, C., Kuriyama, R., Kaplan, P.L., Baas, P.W. (2000) Depletion of a microtubule-associated motor protein induces the loss of dendritic identity. *J Neurosci* 20: 5782-5791.
  56. Hatten, M.E. (2006) Neuronal Polarity. *J Neurosci* 26: 10623.
  57. Huang, Z., Zang, K., Reichardt, L.F. (2005) The origin recognition core complex regulates dendrite and spine development in postmitotic neurons. *JCB* 170: 527-535.
  58. Sanson, B. (2001) Generating patterns from fields of cells. *EMBO reports* 2: 1083-1088.
  59. Garcia-Bellido, A. (1998) The Engrailed story. *Genetics* 148: 539-544.
  60. Friedman, G.C., O'Leary, D.D.M. (1996) Retroviral misexpression of Engrailed genes in the chick optic tectum perturbs the topographic targeting of retinal axons. *J Neurosci* 16: 5498-5509.
  61. Brunet, I., Weinl, C., Piper, M., Trembleau, A., Volovitch, M., Harris, W., Prochiantz, A., Holt, C. (2005) The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* 438: 94-98.
  62. Marie, B., Blagburn, J.M. (2003) Differential roles of Engrailed paralogs in determining sensory axon guidance and synaptic target recognition. *J Neurosci* 23: 7854-7862.
  63. Marie, B., Cruz-Orengo, L., Blagburn, J.M. (2002) Persistent Engrailed expression is required to determine sensory axon trajectory, branching, and target choice. *J Neurosci* 22: 832-841.
  64. Foucher, I., Montesinos, M.L., Volovitch, M., Prochiantz, A., Trembleau, A. (2003) Joint regulation of the MAP1B promoter by HNF3beta/Foxa2 and Engrailed is the result of a highly conserved mechanism for direct interaction of homeoproteins and Fox transcription factors. *Development* 130: 1867-1876.
  65. Montesinos, M.L., Foucher, I., Conradt, M., Mainguy, G., Robel, L., Prochiantz, A., Volovitch, M. (2001) The neuronal microtubule-associated protein 1B is under homeoprotein transcriptional control. *J Neurosci* 21: 3350-3359.
  66. Ulfing, N., Feldhaus, C., Setzer, M., Bohl, J. (2000) Expression of MAP1a and MAP1b in the ganglionic eminence and the internal capsule of the human fetal brain. *Neuroscience Research* 38: 397-405.
  67. Jankowski, J., Holst, M.I., Liebig, C., Oberdick, J., Baader, S.L. (2004) Engrailed-2 negatively regulates the onset of perinatal Purkinje cell differentiation. *J Comp Neurol* 472: 87-99.
  68. Joyner, A.L. (1996) Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain-hindbrain development. *Trends Genet* 12: 15-20.
  69. Albéri, L., Sgadò, P., Simon, H.H. (2004) Engrailed genes are cell-autonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons. *Development* 131: 3229-3236.

70. Sgadò, P., Albéri, L., Gherbassi, D., Galasso, S.L., Ramakers, G.M.J., Alavian, K.N., Smidt, M.P., Dyck, R.H., Simon, H.H. (2006) Slow progressive degeneration of nigral dopaminergic neurons in postnatal Engrailed mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 15242-15247.
71. Wang, V.Y., Zoghbi, H.Y. (2001) Genetic regulation of cerebellar development. *Nature Reviews Neuroscience* 2: 484-491.
72. Mori, F., Piao, Y.S., Hayashi, S., Fujiwara, H., Hasegawa, M., Yoshimoto, M., Iwatsubo, T., Takahashi, H., Wakabayashi, K. (2003) Alpha-synuclein accumulates in Purkinje cells in Lewy body disease but not in multiple system atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 812-819.
73. Boudin, G., Guillard, A., Mikol, J., Galle, P. (1976) [Striato-nigral degeneration. Apropos of a clinical, therapeutic, and anatomic study of 2 cases]. *Rev Neurol (Paris)* 132: 137-156.
74. Bartlett, C.W., Gharani, N., Millonig, J.H., Brzustowicz, L.M. (2005) Three autism candidate genes: a synthesis of human genetic analysis with other disciplines. *Int J Devl Neuroscience* 23: 221-234.
75. Benayed, R., Gharani, N., Rossman, I., Mancuso, V., Lazar, G., Kamdar, S., Bruse, S.E., Tischfield, S., Smith, B.J., Zimmerman, R.A., DiCicco-Bloom, E., Brzustowicz, L.M. (2005) Support for the homeobox transcription factor gene Engrailed-2 as an autism spectrum disorder susceptibility locus. *Am J Hum Genet* 77: 851-868.
76. Chan-Palay, V. (1971) The recurrent collaterals of Purkinje cell axons: a correlated study of the rat's cerebellar cortex with electron microscopy and the Golgi method. *Z Anat Entwicklungsgesch* 134: 200-234.
77. Holst, M.I. (2007) Identifikation und Charakterisierung differenziell exprimierter Gene in einer Mausmutanten mit prolongierter Engrailed-2 Expression mithilfe der Array Technologie. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
78. Romeis, B. (1989) *Mikroskopische Technik*. München: Urban & Schwarzenberg.
79. Burck, H.C. (1988) *Histologische Technik*. Stuttgart: Thieme.
80. Martini, J. (2001) Untersuchungen zur Expression spezifischer interzellulärer Signalmoleküle der axonalen Wegfindung im Kleinhirn der L7En-2 Überexpressionsmutante. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
81. Conchello, J.A., Lichtman, J.W. (2005) Optical sectioning microscopy. *Nat Methods* 2: 920-931.
82. Manders, E.M.M. (1997) Chromatic shift in multicolour confocal microscopy. *Journal of Microscopy* 185: 321-328.
83. Girish, V., Vijayalakshmi, A. (2004) Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer* 41: 47.
84. Metzger, F., Kapfhammer, J.P. (2000) Protein kinase C activity modulates dendritic differentiation of rat Purkinje cells in cerebellar slice cultures. *Eur J Neurosci* 12: 1993-2005.
85. Bolte, S., Cordelières, F.P. (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224: 213-232.
86. Manders, E.M.M., Verbeek, F.J., Aten, J.A. (1993) Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy* 169: 375-382.
87. Sachs, L. (2004) *Angewandte Statistik*. Berlin: Springer.

88. Jenkins, S.M., Bennett, V. (2001) Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments. *JCB* 155: 739-745.
89. Bennett, V., Lambert, S. (1999) Physiological roles of axonal ankyrins in survival of premyelinated axons and localization of voltage-gated sodium channels. *J Neurocytol* 28: 303-318.
90. Peles, E., Salzer, J.L. (2000) Molecular domains of myelinated axons. *Curr Opin Neurobiol* 10: 558-565.
91. Fache, M.P., Moussif, A., Fernandes, F., Giraud, P., Garrido, J.J., Dargent, B. (2004) Endocytotic elimination and domain-selective tethering constitute a potential mechanism of protein segregation at the axonal initial segment. *JCB* 166: 571-578.
92. Clark, B.A., Monsivais, P., Branco, T., London, L., Häusser, M. (2005) The site of action potential initiation in cerebellar Purkinje neurons. *Nature Neuroscience* 8: 137-139.
93. Boiko, T., Van Wart, A., Caldwell, J.H., Levinson, S.R., Trimmer, J.S., Matthews, G. (2003) Functional specialization of the axon initial segment by isoform-specific sodium channel targeting. *J Neurosci* 23: 2306-2313.
94. Dusart, I., Guenet, J.L., Sotelo, C. (2006) Purkinje cell death: Differences between developmental cell death and neurodegenerative death in mutant mice. *Cerebellum* 5: 163-173.
95. Gianola, S., Rossi, F. (2001) Evolution of the Purkinje cell response to injury and regenerative potential during postnatal development of the rat cerebellum. *J Comp Neurol* 430: 101-117.
96. Rossi, F., Gianola, S., Corvetto, L. (2006) The strange case of Purkinje axon regeneration and plasticity. *Cerebellum* 5: 174-182.
97. Mann, D.M.A., Stamp, J.E., Yates, P.O., Bannister, C.M. (1980) The fine structure of the axonal torpedo in Purkinje cells of the human cerebellum. *Neurological Research* 1: 369-378.
98. Takahashi, N., Iwatsubo, T., Nakano, I., Machinami, R. (1992) Focal appearance of cerebellar torpedoes associated with discrete lesions in the cerebellar white matter. *Acta Neuropathol (Berl)* 84: 153-156.
99. Matsumoto, R., Nakano, I., Arai, N., Suda, M., Oda, M. (1996) Progressive supranuclear palsy with asymmetric lesions in the thalamus and cerebellum, with special reference to the unilateral predominance of many torpedoes. *Acta Neuropathol (Berl)* 92: 640-644.
100. Kato, T., Hirano, A. (1985) A Golgi study of the proximal portion of the human Purkinje cell axon. *Acta Neuropathol (Berl)* 68: 191-195.
101. Gravel, C., Leclerc, N., Plioplys, A., Hawkes, R.B. (1986) Focal axonal swellings in rat cerebellar Purkinje cells during normal development. *Brain Res* 363: 325-332.
102. Altman, J., Bayer, S.J. (1997) Development of the cerebellar system: in relation to its evolution, structure and functions. : 398-411.
103. Chen, Y., Yu, P., Lu, D., Tagle, D.A., Cai, T. (2001) A novel isoform of beta-Spectrin II localizes to cerebellar Purkinje-cell bodies and interacts with neurofibromatosis type 2 gene product Schwannomin. *Journal of Molecular Neuroscience* 17: 59-70.
104. Hayes, N.V., Scott, C., Heerkens, E., Ohanian, V., Maggs, A.M., Pinder, J.C., Kordeli, E., Baines, A.J. (2000) Identification of a novel C-terminal variant of beta II spectrin: two isoforms of beta II spectrin have distinct intracellular locations and activities. *J Cell Sci* 113

( Pt 11): 2023-2034.

105. Joshi, H.C., Cleveland, D.W. (1989) Differential utilization of beta-tubulin isotypes in differentiating neurites. *J Cell Biol* 109: 663-673.
106. Oblinger, M.M., Kost, S.A. (1994) Coordinate regulation of tubulin and microtubule associated protein genes during development of hamster brain. *Brain Res Dev Brain Res* 77: 45-54.
107. Karam, S.D., Dottori, M., Ogawa, K., Henderson, J.T., Boyd, A.W., Pasquale, E.B., Bothwell, M. (2002) EphA4 is not required for Purkinje cell compartmentation. *Dev Brain Res* 135: 29-38.
108. Frisén, J., Holmberg, J., Barbacid, M. (1999) Ephrins and their Eph receptors: multitasking directors of embryonic development. *EMBO J* 18: 5159-5165.
109. Klein, R. (2004) Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 16: 580-589.
110. Martone, M.E., Holash, J.A., Bayardo, A., Pasquale, E.B., Ellisman, M.H. (1997) Immunolocalization of the receptor tyrosine kinase EphA4 in the adult rat central nervous system. *Brain Res* 771: 238-250.
111. Hornberger, M.R., Dütting, D., Ciossek, T., Yamada, T., Handwerker, C., Lang, S., Weth, F., Huf, J., Wessel, R., Logan, C., Tanaka, H., Drescher, U. (1999) Modulation of EphA receptor function by coexpressed ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Neuron* 22: 731-742.
112. Kuemerle, B., Zanjani, H., Joyner, A., Herrup, K. (1997) Pattern deformities and cell loss in Engrailed-2 mutant mice suggest two separate patterning events during cerebellar development. *J Neurosci* 17: 7881-7889.
113. McGrew, L.L., Takemaru, K., Bates, R., Moon, R.T. (1999) Direct regulation of the *Xenopus* engrailed-2 promoter by the Wnt signaling pathway, and a molecular screen for Wnt-responsive genes, confirm a role for Wnt signaling during neural patterning in *Xenopus*. *Mech Dev* 87: 21-32.
114. Charron, F., Tessier-Lavigne, M. (2005) Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Development* 132: 2251-2262.
115. Fink, A.J., Englund, C., Daza, R.A.M., Pham, D., Lau, C., Nivison, M., Kowalczyk, T., Hevner, R.F. (2006) Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *J Neurosci* 26: 3066-3076.
116. Adcock, K.H., Metzger, F., Kapfhammer, J.P. (2004) Purkinje cell dendritic tree development in the absence of excitatory neurotransmission and of brain-derived neurotrophic factor in organotypic slice cultures. *Neuroscience* 127: 137-145.
117. Gundlfinger, A., Kapfhammer, J.P., Kruse, F., Leitges, M., Metzger, F. (2003) Different regulation of Purkinje cell dendritic development in cerebellar slice cultures by protein kinase Calpha and -beta. *J Neurobiol* 57: 95-109.
118. Hartmann, D., Ziegenhagen, M.W., Sievers, J. (1998) Meningeal cells stimulate neuronal migration and the formation of radial glial fascicles from the cerebellar external granular layer. *Neurosci Lett* 244: 129-132.
119. Seil, F.J. (1996) Neural plasticity in cerebellar cultures. *Prog Neurobiol* 50: 533-556.
120. Seil, F.J. (2001) Interactions between cerebellar Purkinje cells and their associated astrocytes. *Histol Histopathol* 16: 955-968.

121. Dunn, M.E., Schilling, K., Mugnaini, E. (1998) Development and fine structure of murine Purkinje cells in dissociated cerebellar cultures: neuronal polarity. *Anat Embryol* 197: 9-29.
122. Maizel, A., Bensaude, O., Prochiantz, A., Joliot, A. (1999) A short region of its homeodomain is necessary for engrailed nuclear export and secretion. *Development* 126: 3183-3190.
123. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.
124. Altman, J. (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol* 136: 269-293.
125. Dotti, C.G., Sullivan, C.A., Banker, G.A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8: 1454-1468.
126. Colman, D.R. (1999) Neuronal polarity and the epithelial metaphor. *Neuron* 23: 649-651.
127. Foletti, D.L., Prekeris, R., Scheller, R.H. (1999) Generation and maintenance of neuronal polarity: mechanisms of transport and targeting. *Neuron* 23: 641-644.
128. Winckler, B., Mellman, I. (1999) Neuronal polarity: controlling the sorting and diffusion of membrane components. *Neuron* 23: 637-640.
129. Bian, F., Chu, T., Schilling, K., Oberdick, J. (1996) Differential mRNA transport and the regulation of protein synthesis: selective sensitivity of Purkinje cell dendritic mRNAs to translational inhibition. *Mol Cell Neurosci* 7: 116-133.
130. Craig, A.M., Banker, G. (1994) Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* 17: 267-310.
131. Joliot, A., Trembleau, A., Raposo, G., Calvet, S., Volovitch, M., Prochiantz, A. (1997) Association of Engrailed homeoproteins with vesicles presenting caveolae-like properties. *Development* 124: 1865-1875.
132. Domínguez-Giménez, P., Brown, N.H., Martín-Bermudo, M.D. (2007) Integrin-ECM interactions regulate the changes in cell shape driving the morphogenesis of the *Drosophila* wing epithelium. *J Cell Sci* 120: 1061-1071.
133. Teng, J., Takei, Y., Harada, A., Nakata, T., Chen, J., Hirokawa, N. (2001) Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *J Cell Biol* 155: 65-76.
134. Stettler, O., Moya, K.L., Zahraoui, A., Tavitian, B. (1994) Developmental changes in the localization of the synaptic vesicle protein rab3A in rat brain. *Neuroscience* 62: 587-600.
135. Sugihara, I. (2006) Organization and remodeling of the olivocerebellar climbing fiber projection. *Cerebellum* 5: 15-22.
136. Takeda, T., Maekawa, K. (1989) Transient direct connection of vestibular mossy fibers to the vestibulocerebellar Purkinje cells in early postnatal development of kittens. *Neuroscience* 32: 99-111.
137. Eberhart, J., Barr, J., O'Connell, S., Flagg, A., Swartz, M.E., Cramer, K.S., Tosney, K.W., Pasquale, E.B., Krull, C.E. (2004) Ephrin-A5 exerts positive or inhibitory effects on distinct subsets of EphA4-positive motor neurons. *J Neurosci* 24: 1070-1078.
138. Goldshmit, Y., Galea, M.P., Wise, G., Bartlett, P.F., Turnley, A.M. (2004) Axonal regeneration and lack of astrocytic gliosis in EphA4-deficient mice. *J Neurosci* 24: 10064-10073.

139. Hanks, M.C., Wurst, W., Anson-Cartwright, L., Auerbach, A.B., Joyner, A.L. (1995) Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2. *Science* 269: 679-682.
140. Hanks, M.C., Loomis, C.A., Harris, E., Tong, C.X., Anson-Cartwright, L., Auerbach, A., Joyner, A.L. (1998) *Drosophila* engrailed can substitute for mouse Engrailed1 function in mid-hindbrain, but not limb development. *Development* 125: 4521-4530.
141. Simon, H.H., Thuret, S., Alberi, L. (2004) Midbrain dopaminergic neurons: control of their cell fate by the engrailed transcription factors. *Cell Tissue Res* 318: 53-61.
142. Jacobs, D.K., Wray, C.G., Wedeen, C.J., Kostriken, R., DeSalle, R., Staton, J.L., Gates, R.D., Lindberg, D.R. (2000) Molluscan engrailed expression, serial organization, and shell evolution. *Evol Dev* 2: 340-347.
143. Wanninger, A., Haszprunar, G. (2001) The expression of an engrailed protein during embryonic shell formation of the tusk-shell, *Antalis antalis* (Mollusca, Scaphopoda). *Evol Dev* 3: 312-321.





## 6.5 Danksagung

Für die Überlassung des Themas und vor allem für die nicht nur fachlich exzellente Betreuung und Unterstützung möchte ich mich bei Prof. Dr. Stephan L. Baader ganz herzlich bedanken.

Ebenfalls möchte ich Prof. Dr. Karl Schilling für die fortwährende Unterstützung meines Projekts danken und für die Möglichkeit, diese Arbeit am Anatomischen Institut anfertigen zu können.

Ein besonderer Dank geht an Alice Ihmer für ungezählte Arbeitserleichterungen.

Bei den genannten und allen anderen Kollegen aus dem Anatomischen Institut, die in irgendeiner Form am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren, möchte ich mich für anregende Diskussionen, gute Ideen, praktische Unterstützung und für die gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Bei Prof. Dr. Horst Bleckmann bedanke ich mich für die Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Darüberhinaus möchte ich mich auch noch bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und die Geduld bedanken, insbesondere bei meiner Frau, ohne die diese Arbeit in der vorliegenden Form wahrscheinlich nicht möglich gewesen wäre.

## 6.6 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Untersuchungen zur Differenzierung von cerebellären Purkinjezellen nach Überexpression des Transkriptionsfaktors Engrailed-2“ selbst und ohne jede unzulässige Hilfe, abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln, angefertigt habe. Ferner erkläre ich, dass diese oder eine ähnliche Arbeit noch an keiner anderen Stelle als Dissertation eingereicht worden ist. Ich habe früher noch keinen Promotionsversuch unternommen. Teile dieser Dissertation sind an den nachstehend aufgeführten Stellen veröffentlicht worden.

Jankowski, J., Holst, M.I., Liebig, C., Oberdick, J., Baader, S.L. (2004) Engrailed-2 negatively regulates the onset of perinatal Purkinje cell differentiation. Originalarbeit. J.Comp.Neurol. 472: 87–99.

Liebig, C., Holst, M.I., Baader, S.L.(2006) Different effects of prolonged Engrailed-2 expression in cerebellar Purkinje cells on axon and dendrite maturation. Vortrag. Ann. Anat. 188 Suppl..

Liebig, C., Jankowski, J., Holst, M.I., Dusart, I., Baader, S.L. (2004) Engrailed-2 differentially affects axonal and dendritic maturation of cerebellar Purkinje cells. Poster. Ann. Anat. 186 Suppl.: 127-128.

Bonn, 6.6.2007

Christian Liebig