

**Die Tetraspanin-5 Expression in Mausmutanten mit Kleinhirndefizienzen:
eine Expressions-Funktions-Korrelationsstudie**

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

Katja Duffe
aus Lüdenscheid

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Stephan Baader
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schläpfer

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.05.2008

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Karl Schilling

Diese Arbeit ist meiner Großmutter Helga Baringhorst und meinen Eltern Annegret und Ulrich Duffe gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	7
2	Einleitung	9
2.1	Tetraspanine	10
2.2	Tetraspanin-5	13
2.3	Die Entwicklung des Kleinhirns	15
2.4	Die Dendritogenese der Purkinjezellen	16
2.5	Der Aufbau des Kleinhirns	17
2.6	Cerebelläre Mutationen bei der Maus	18
2.6.1	Die <i>weaver</i> Maus	19
2.6.2	Die <i>reeler</i> Maus	20
2.6.3	Die <i>staggerer</i> Maus	21
2.6.4	Die <i>Engrailed-1</i> und <i>Engrailed-2</i> -Deletionsmutanten	22
3	Material und Methoden	24
3.1	Geräte und Chemikalien	24
3.1.1	Geräte	24
3.1.2	Chemikalien	25
3.1.3	Allgemeine Stammlösungen und Puffer	28
3.2	Versuchstierhaltung	29
3.3	Genotypisierung der Versuchstiere	29
3.4	Gewebevorbereitung	34
3.5	In situ Hybridisierung (ISH)	35
3.6	Herstellung des polyklonalen Anti-Tetraspanin-5 Antikörpers	40
3.7	Immunhistochemische Färbung von paraffinfixierten Schnitten	44
3.8	Peptid-Bindungsassay mit Tetraspanin-5 an Vibratomschnitten	47

4	Ergebnisse	48
4.1	Die Tetraspanin-5 mRNA Expression in Wildtyp- und L7En-2 transgenen Mäusen	48
4.2	Die Tetraspanin-5 mRNA Expression in Wildtyp- und <i>Engrailed-2</i> -Nullmutationsmäusen	51
4.3	Die Tetraspanin-5 mRNA Expression entlang der mediolateralen Kleinhirnnachse	54
4.4	Die Tetraspanin-5 mRNA Expression in Mausmutanten mit einem cerebellären Phänotyp	57
4.4.1	Die <i>weaver</i> Mausmutante	57
4.4.2	Die <i>reeler</i> Mausmutante	63
4.4.3	Die <i>staggerer</i> Mausmutante	66
4.5	Nachweis von Peptidbindungsstellen des Peptids Tetraspanin-5-1 an Vibratonschnitten am Postnataltag P9 Peptid-Bindungsassay	70
4.6	Nachweis des polyklonalen Anti-Tetraspanin-5 Antikörpers mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	73
4.7	Etablierung der immunhistochemischen Färbung an Paraffinschnitten	74
5	Diskussion	78
5.1	Die Tetraspanin-5 Expression in Mausmutanten mit veränderter <i>Engrailed-2</i> Expression.	78
5.2	Tetraspanin-5 Expression in <i>weaver</i> , <i>reeler</i> und <i>staggerer</i> Mäusen	81
5.3	Ausblicke	84
6	Zusammenfassung	85
7	Literaturverzeichnis	87
8	Danksagung	99
9	Lebenslauf	100

1. Abkürzungsverzeichnis

-/-	Nullmutation
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AS	Aminosäure
BSA	bovines Serumalbumin
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag (Alter des Embryos in Tagen nach der Befruchtung)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGL	äußere Körnerzellschicht
En-1	<i>Engrailed-1</i>
En-2	<i>Engrailed-2</i>
IGL	innere Körnerzellschicht
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L7	L7/pcp-2, Purkinjezell-spezifisches Protein
Lb	Lobulus
M	molar (mol/l)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
ML	Molekularschicht
mRNA	Boten-RNA

Ncl.	Nucleus
NTP-Mix	Ribonukleosidtriphosphat-Gemisch
P3	Postnataltag 3 (Alter des Tieres in Tagen nach der Geburt)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PC	Purkinjenzelle
PCL	Purkinjenzellschicht
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
rl	<i>reeler</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sg	<i>staggerer</i>
SSC	Standard Citrat-Kochsalzlösung
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
Tspan 5	Tetraspanin-5
Vol.	Volumen
WM	weiße Substanz
wt	Wildtyp
wv	<i>weaver</i>
ZNS	Zentralnervensystem

2. Einleitung

Die Entwicklung von Neuronen kann allgemein zeitlich gegliedert werden in die Phasen der Generierung von Vorläuferzellen, der darauf folgenden Proliferation, der Migration und schließlich der postmigratorischen Differenzierung zu reifen, in funktionelle neuronale Regelkreise eingebundene Nervenzellen. Entscheidende Bedeutung bei der Steuerung dieser Entwicklungsschritte hat die zeitlich und örtlich nach striktem Muster erfolgende Expression spezifischer Gene. Die Expressionsmuster werden wiederum reguliert durch intrinsische Faktoren wie Transkriptionsfaktoren oder Signaltransduktionskaskaden, des Weiteren durch externe Faktoren wie lösliche Signalmoleküle und als Membranrezeptoren dienende Zelloberflächenproteine.

Zur Gruppe der Transkriptionsfaktoren, die bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems eine bedeutende Rolle spielen, gehören die *Engrailed*-Proteine. Erstmals genauer beschrieben wurde ihre Funktion als Transkriptionsfaktoren, die während der Entwicklung von Invertebraten und Vertebraten eine Rolle bei der Segmentierung und Kompartimentierung, aber auch bei Wachstumsprozessen spielen. Das Gen wurde bereits Anfang der 80er Jahre kloniert, aber erst vor zehn Jahren hat man begonnen, potentielle Zielgene von *Engrailed* aufzudecken.

Während Nullmutationen von *En-1* und *En-2* das Überleben von dopaminergen Neuronen und mutmaßlich auch anderer Neurone beeinflusst, zeigen *Engrailed* überexprimierende Neurone eine Defizienz in der Reifung. Im transgenen Mausmodell der spezifischen Überexpression von *Engrailed-2* in Purkinjezellen kommt es zu deutlichen phänotypischen Auffälligkeiten im Vergleich zum Wildtyp – auf zellulärer Ebene zu einer verlangsamten Reifung der Purkinjezellen und makroskopisch zu einer deutlichen Reduktion des Kleinhirnvolumens. Um die Rolle von *Engrailed* und den potentiellen Zielgenen während der Entwicklung des Kleinhirns der Maus genauer zu verstehen, wurde in der Folge nach Zielgenen von *Engrailed* gesucht, die im genannten transgenen Tiermodell der spezifischen Überexpression von *Engrailed-2* im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlich exprimiert werden. Mit Hilfe von Microarray-Analysen konnten etwa 600 Gene isoliert werden, die als potentielle Kandidatengene der neuronalen Reifung in Frage kommen. Tetraspanin-5 aus der Familie der Tetraspanine gehört zu diesen Kandidatengen, die im Microarray der *L7En-2* Überexpression verändert exprimiert werden.

Die Ergebnisse aus der Microarray-Untersuchung sollten im Weiteren mit Hilfe zellbiologischer Methoden überprüft und genauer untersucht werden.

Da über die Funktion der Tetraspanine im Kleinhirn nur wenig bekannt ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit anhand von Expressionsstudien in Wildtypmäusen und verschiedenen Mutanten mit cerebellärem Phänotyp erste Hinweise für potentielle Funktionen des Tetraspanin-5 gefunden werden.

2.1 Tetraspanine

Tetraspanine sind Transmembranproteine (von 25-50 kD), die dazu neigen, mit anderen Tetraspaninen oder zahlreichen anderen Proteinen Verbindungen einzugehen. Sie sind an der Koordination von verschiedenen intra- und interzellulären Prozessen, die von zellulärer Fusion und Adhäsion, zellulärer Migration und Proliferation über die Ausbildung von synaptischen Kontakten und Auswachsen von Neuriten reichen, beteiligt (10) (14) (43) (57) (68).

Wie man bereits aus dem Namen folgern kann, enthalten Tetraspanine vier transmembranöse Domänen. Zwischen der Transmembrandomäne 1 und 2 befindet sich extrazellulär die so genannte kleine Schleife (SEL), über die noch relativ wenig bekannt ist. Die so genannte große Schleife (LEL) findet man zwischen der Transmembrandomäne 3 und 4, die in ihrem Aufbau bei den unterschiedlichen Mitgliedern der Tetraspanin-Familie variiert. Gleichzeitig enthält sie bestimmte immer wiederkehrende charakteristische Motive, die sich in allen Tetraspaninen wieder finden, wie z. B. die Aminosäure-Sequenz Cystein-Cystein-Glycin, die eine zentrale Bedeutung in der Formation der Tertiärstruktur hat, da sie mit anderen Cysteinen innerhalb der großen Schleife Disulfidbrücken ausbildet (95). Es können sich insgesamt zwei bis vier dieser Disulfidbrücken ausbilden. Außerdem enthält die große Schleife konservierte hydrophobe Bereiche, die der Homodimerisation dienen, und eine Region höchster Variabilität, die leicht polar geladen ist und wahrscheinlich spezifischen Protein-Protein-Interaktionen dient. Über die große extrazelluläre Schleife können Tetraspanine als „Transmembran Linker Proteine“ wirken und Signale über den C-Terminus ins Zellinnere weiterleiten (41) (68) (109).

Ein weiteres Kennzeichen der Tetraspanine ist das Vorkommen von konservierten Cystein-Resten in den zytoplasmatischen Domänen, welche in palmitoylierter Form vorliegen und so eine entscheidende Rolle in der Ausbildung des so genannten Tetraspanin-Netzes spielen. Fast alle Tetraspanine haben mindestens an einer der vier zytoplasmatischen juxtamembranären Positionen einen Cysteinrest, der als Palmitoylierungsstelle dient. In CD9 und CD151 gibt es sogar an allen vier Positionen entsprechende Cysteinreste. Ein besonderes Charakteristikum der Tetraspanine ist die Fähigkeit, laterale Verbindungen mit anderen Tetraspaninen oder mit anderen Proteinen einzugehen. Diese Verbindungen führen zur Bildung des Tetraspanin-Netzes (89). Ein Verlust dieser Palmitoylierungsstellen geht mit dem Verlust lateraler Verbindungen zu anderen Tetraspaninen und damit mit der Auflösung des Tetraspanin-Netzes einher (109).

Das beschriebene Netz spielt eine Rolle bei Zell-Zell-Kontakten und der Zell-Fusion. Ein klassisches Beispiel für die Beteiligung an Zell-Zell-Kontakten ist Tetraspanin CD81 an Rezeptoren von B- und T-Lymphozyten (77). Ferner konnte gezeigt werden, dass CD81 und CD9 in die Spermatozyten-Oozyten-Fusion involviert sind (51) (59).

Die Sequenz der zytoplasmatischen Domäne und der kleinen Schleife (SEL) ist zu 72-78 % zwischen Zebrafisch und Säugern homolog, wahrscheinlich erfüllen diese Regionen wichtige konservierte Funktionen. Hingegen sind die zytoplasmatischen Termini in nur 21-38 % identisch, woraus man schließen kann, dass die Tetraspanine unterschiedliche Funktionen erfüllen. Der zytoplasmatische C-Terminus ist ausschlaggebend für die richtige Platzierung innerhalb der intrazellulären Kompartimente (88). Sowohl der C- als auch der N-Terminus dienen als Verbindung zum Zytoskelett und zu Signaltransduktionsmolekülen wie Proteinkinase C (PKC) und Phosphatidylinositol-4-Kinase (109).

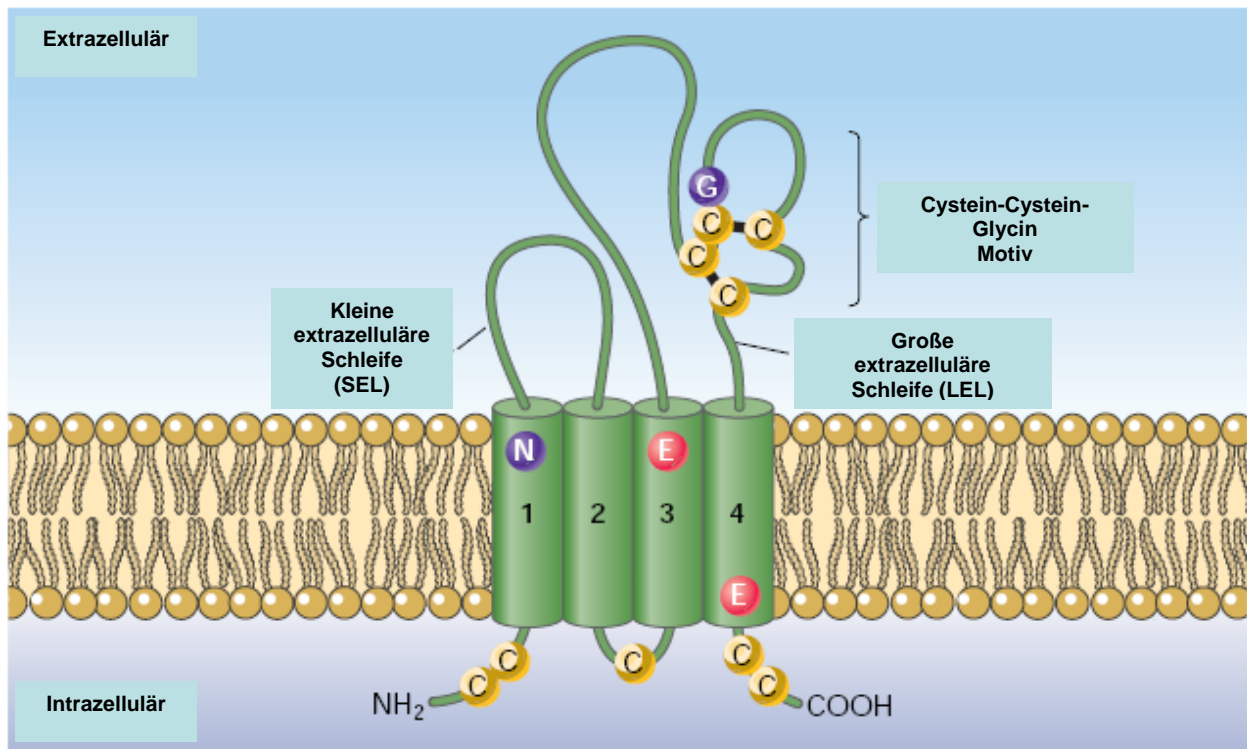


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Tetraspanins [nach: Levi S and Shoham T. Protein-Protein Interactions in the Tetraspanin Web. *Physiology* 2005; 20:218–224]

Da man für viele Interaktionen von Tetraspaninen keine spezifischen Interaktionsdomänen identifizieren kann, muss man davon ausgehen, dass die Bedeutung der Tetraspanine in der Rolle als molekulare Vermittler liegt. Sie sind an der Bildung größerer Molekülkomplexe in der Zellmembran beteiligt, ohne ein integraler Bestandteil zu sein (68). Die Verbindungen von Tetraspaninen können sowohl auf extrazellulärer als auch intrazellulärer Ebene geschlossen werden. Das Tetraspanin-Netz basiert auf der Ausbildung von Verbindungen auf unterschiedlichen Ebenen. Primäre Interaktionen zwischen Tetraspaninen und anderen Proteinen sind direkt und widerstandsfähig gegenüber Lösungsmitteln wie Brij-96, Digitonin und Triton X-100. Sekundäre Verbindungen, wie z. B. Tetraspanin-Tetraspanin-Interaktionen sind häufiger und indirekt. Sie reagieren viel sensibler auf die Lösung durch die genannten Lösungsmittel, während Verbindungen der dritten Ebene sich nicht mit CHAPS, Brij-99 oder Brij-58 lösen lassen und durch seitliche Anlagerung zu großen Komplexen fusionieren. Die Ausbildung von seitlichen Kontakten zu anderen Tetraspaninen ermöglicht eine umfassende Organisation in der Zellmembran, die gleichzeitig intrazelluläre Signalwege herstellt und zytoskeletale Strukturen bildet (42). Die häufigsten Bindungspartner von Tetraspaninen gehören zu der Familie der Integrine und der Immunglobuline (10) (15) (108).

Bisher bekannte Expressionsänderungen und Mutationen von Tetraspaninen, die bei Säugern eine klinische Relevanz besitzen, führen zu folgenden Veränderungen: eine Mutation im Peripherin/RDS führt beim Menschen zu schweren Veränderungen an der Retina (61), bei der Maus führt die Deletion von Peripherin/RDS zu einer Störung in der Photorezeptor-Morphogenese (90). Das humane Tetraspanin TM4SF2 wird vor allem stark im Hippocampus exprimiert und spielt vermutlich eine Rolle bei Lernvorgängen und Gedächtnisbildung (118). Mutationen von TM4SF2 werden bei Patienten mit starker mentaler Retardierung gefunden(42). Mutationen in CD81 resultieren in einer gestörten B-Zell-Funktion (23) (67) (79) (113) und einer beschleunigten T-Zell-Proliferation (79). Die Expression der Tetraspanine CO-029, PETA-3, SFA-1 und SAS sind positiv, die Expression der Tetraspanine CD9, CD63 und CD82 negativ mit Tumorzellmetastasierung assoziiert.

Manche Tetraspanine werden ubiquitär exprimiert, während andere sehr gewebsspezifisch sind oder nur in bestimmten Entwicklungsphasen exprimiert werden (68). Da das örtliche und zeitliche Expressionsmuster einen ersten Hinweis über die Funktion eines Proteins geben kann, wurden solche Analysen für das Tetraspanin-5 durchgeführt.

2.2 Tetraspanin-5

Northern Blot-Analysen haben ergeben, dass Tetraspanin-5 im Zentralnervensystem, Herz, Niere und Hoden stark exprimiert wird, während Lunge und Leber nur schwache, Milz und Skelettmuskel keine Banden zeigen (30).

Im ZNS kann Tetraspanin-5 mRNA zum ersten Mal am Embryonaltag E 10 nachgewiesen werden. Ein Vorkommen von Tetraspanin-5 findet man vor allem im Großhirn, hier insbesondere im Bulbus olfactorius, im Cortex, im Hippocampus, im Septum, in der Amygdala und im Kleinhirn. Im Cerebellum findet man zwischen E 14 und Postnataltag P0 in der Rautenlippe, in migrierenden externen Körnerzellen, in den tiefen Kleinhirnkernen und in migrierenden Purkinjezellen eine vorhandene Tetraspanin-5 Expression (31).

In einer dieser Arbeit vorausgegangenen Dissertation von Herrn Dr. Jünger wurde die Expression von Tetraspanin-5 mRNA während der postnatalen Entwicklung des Kleinhirns genauer

untersucht. Bei Mäuse Neugeborenen zeigt sich am Postnataltag P0 überall dort, wo Neuronenvorläufer lokalisiert sind, ein schwach ausgeprägtes Tetraspanin-5 Signal. Am Postnataltag P7 findet man ein deutliches Signal in der internen Körnerzellschicht (IGL) und ein im Vergleich abgeschwächtes Signal in der externen Körnerzellschicht (EGL). Gleichzeitig ist die Tetraspanin-5 mRNA Expression in den Purkinjezellen, die zu diesem Zeitpunkt den charakteristischen Dendritenbaum ausbilden, angestiegen. Zum Zeitpunkt P11 ist die Tetraspanin-5 Expression noch stärker ausgeprägt. Dies bedeutet, dass in den Purkinjezellen des cerebellären Cortex während der ersten zwei Wochen der Kleinhirnentwicklung während der Reifung der Purkinjezellen ein Anstieg der Tetraspanin-5 Expression zu verzeichnen ist. Der cerebrale Cortex, in dem die Neuronen wesentlich früher reifen, zeigt dagegen bereits zum Zeitpunkt P0 eine starke Tetraspanin-5 Expression.

Diese Korrelation zwischen Tetraspanin-5-Expression und neuronaler Reifung lässt sich an transgenen L7En-2 bestätigen. In den transgenen L7En-2 Mäusen wird das Gen *Engrailed-2* spezifisch in Purkinjezellen überexprimiert, was mit einer verzögerten Reifung der Purkinjezellen einhergeht. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass ab dem Postnataltag P7 die Tetraspanin-5 Expression in den Purkinjezellen deutlich vermindert ist.

Mechanistisch ist die Assoziation des Tetraspanin-5 mit neuronaler Reifung völlig ungeklärt. Vorstellbar wären allerdings Interaktionen mit Integrinen, wie bereits am Beispiel der Assoziation der alpha-3-Integrinuntereinheit mit Tetraspaninen gezeigt wurde. Integrine selbst, aber auch ihre Interaktion mit Tetraspaninen sind offensichtlich unabdingbar für Zellmigration (10) (14) (42) (57) (68) und spielen ebenfalls eine Rolle bei der Bildung von Zellfortsätzen. Das beschriebene Expressionsmuster von Tetraspanin-5 deutet auf eine mögliche Funktion bei der Dendritogenese der Purkinjezellen hin. Zhang et al. haben beschrieben, dass die Interaktion von Tetraspaninen mit der alpha-3-Integrinuntereinheit auf der extrazellulären Seite eine Signaltransduktion in das Zellinnere bewirkt, die in Purkinjezellen die Formation von Dendriten beeinflusst (119). Das Tetraspanin *late bloomer* hat bei *Drosophila* Einfluss auf die Ausbildung von synaptischen Dornfortsätzen (28). Für die funktionelle Aufgabe von Tetraspanin-5 könnte man daraus folgern, dass es ebenfalls an der Dendritogenese der Purkinjezellen beteiligt ist. Das Cerebellum eignet sich als Modell zur Untersuchung der potentiellen Funktion von Tetraspanin-5 an der Entwicklung von Neuronen, da es sich durch eine übersichtliche Anzahl von

Nervenzellpopulationen auszeichnet, deren morphologische Entwicklungsschritte bereits ausgiebig untersucht worden sind. Zudem existieren diverse Mausmutanten, die sich durch einen cerebellären Phänotyp auszeichnen, und in welchen unterschiedliche Prozesse der neuronalen Entwicklung gestört sind.

2.3 Die Entwicklung des Kleinhirns

Das Cerebellum der Maus entwickelt sich über einen sechs Wochen andauernden Reifungsprozess, der sich von Embryonaltag E7 bis zum Postnaltag P30 erstreckt.

Das Kleinhirn entsteht aus zwei Keimepithelien: einerseits aus der Ventrikulärzone, die die tiefen cerebellären Neurone, die Purkinjezellen und die Golgizellen generiert, und aus der Rautenlippe, die später die Körnerzellen, Korb- und Sternzellen bildet (2).

Während der Embryonaltage E 10-13 entstehen die tiefen nukleären Neurone und die Purkinjezellen. Sie migrieren aus der Ventrikulärzone in den cerebellären Cortex (2) (74) (84) wobei sie sich wahrscheinlich an den radiären glialen Fasern orientieren (25). Nahe der cerebellären Oberfläche verbleiben die postmitotischen Purkinjezellen in einer 10 bis 15 Zellen dicken Schicht. Anschließend wandern Körnerzellen ab E13 aus der Rautenlippe tangential an der cerebellären Oberfläche entlang in den Cortex ein und bilden die mitotisch-aktive externe Körnerzellschicht, die ab E15 vollständig ist. Gleichzeitig beginnen die Golgizellen mit ihrer Migration in den cerebellären Cortex (36) (55).

Die externe Körnerzellschicht kann man in zwei verschiedene Schichten unterteilen: in der piawärts gelegenen Schicht findet die klonale Vermehrung der Körnerzellen statt. Die postmitotischen Körnerzellen kommen danach in dem inneren Abschnitt der externen Körnerzellschicht zu liegen. Perinatal findet aus diesem Bereich der Körnerzellschicht die einwärts gerichtete Migration der Körnerzellen statt, die dann unterhalb der Purkinjezellschicht die interne Körnerzellschicht bilden. Die Proliferation der Körnerzellen dauert von Embryonaltag E 10 bis zum Postnaltag P15 an.

Bis zum 5. Postnaltag bildet sich die einschichtige Purkinjezellschicht vollständig aus. Der charakteristische Dendritenbaum der Purkinjezellen entsteht ebenfalls in dieser Zeit (55).

In der letzten Embryonalwoche beginnen die Moosfasern und die Kletterfasern in Richtung des Kleinhirncortex zu wandern und segregieren nach dem dritten Postnataltag in einzelnen parasagittal angeordneten Streifen. Die grobe morphologische Entwicklung des Kleinhirns ist nach der zweiten Postnatalwoche abgeschlossen (2) (114).

2.4 Die Dendritogenese der Purkinjezellen

Nachdem die Purkinjezellen zum Zeitpunkt P0 ihre Migration in den cerebellären Cortex abgeschlossen und begonnen haben sich in einer Monolayer anzuordnen, haben sie eine bipolare Zellform mit zwei langen Zellfortsätzen. In dieser Phase werden sie auch als „einfach-fusiforme Zellen“ beschrieben. Anschließend kommen zu den zwei bipolaren Fortsätzen zahlreiche weitere hinzu, wobei die bipolare Ausrichtung der Fortsätze erhalten bleibt. Die Purkinjezellen werden in diesem Stadium „komplex-fusiforme Zellen“ bezeichnet. Zwischen Postnataltag P3 und P6 kommt es zur Rückbildung der bisher ausgebildeten Zellfortsätze.

Nach P6 schließt sich die zweite Phase der dendritischen Entwicklung an; in diesem Abschnitt haben die Purkinjezellen ein sternförmiges Aussehen: zahlreiche Dendriten sprießen von allen Seiten des Perikaryons aus. In dieser Zeit bildet sich trotz der zahlreichen Dendriten zusätzlich der Stammdendrit, von dem später der für die Purkinjezellen charakteristische Dendritenbaum ausgeht. Der Stammdendrit wächst senkrecht in die Molekularschicht ein und teilt sich dort in sekundäre und tertiäre Zweige auf, die mit zahlreichen Filopodien ausgestattet sind, aus denen später die Dornfortsätze entstehen.

Am Postnataltag P30 hat der Dendritenbaum seine endgültige Höhe und Ausdehnung erreicht (12).

Bereits die einfach- und komplex fusiformen Purkinjezellen besitzen dendritische Dornfortsätze und haben synaptische Verbindungen zu Parallel- und Kletterfasern (20). Diese Synapsen sind allerdings, wie auch die dendritischen Purkinjezellfortsätze nur vorübergehend vorhanden und werden im Laufe der dendritischen Differenzierung wieder umgebaut und umgewandelt.

Nach Hendelman und Aggerwal (1980) und Armengol und Sotelo (1991) werden die Purkinjezellen während ihrer Differenzierung in drei verschiedene Stadien eingeteilt. Die Kategorie I umfasst die unreiferen fusiformen und die reiferen sternförmigen Purkinjezellen mit

zahlreichen lateral ausgerichteten Fortsätzen. Der Kategorie II werden Purkinjezellen, die eine klar zu erkennende apiko-basale Ausrichtung zeigen und an deren apikalen Pol der Zelle zwei bis drei Hauptdendriten ausstrahlen, zugeordnet. Purkinjezellen mit einem einzigen Stammdendriten und keinen weiteren dendritischen Fortsätzen gehören zur Kategorie III. Ein Stammdendrit ist dann vorhanden, wenn von ihm primäre Verzweigungen abgehen, von denen dann sekundäre und tertiäre Äste abzweigen (1) (4) (44).

An den Dendriten sind die Dornfortsätze lokalisiert, die über Synapsen den exzitatorischen Input der Purkinjezelle empfangen.

2.5 Der Aufbau des Kleinhirns

Das Cerebellum und insbesondere der cerebelläre Cortex ist hinsichtlich seines zellulären Aufbaus ein Organ hoher struktureller Regelmäßigkeit, dessen komplexe und gleichzeitig stereotype synaptische Verbindung sich im Laufe der Histogenese nach einem genau festgelegten Plan entwickeln.

Das Kleinhirn liegt in der hinteren Schädelgrube und ist der dorsale Teil des Metencephalons. Es sitzt dem Rhombencephalon auf und bildet so das Dach des vierten Ventrikels. Mit dem Hirnstamm ist es durch die drei Kleinhirnstiele verbunden.

Es ist bilateral symmetrisch aufgebaut und gliedert sich mediolateral in die beiden Hemisphären und die unpaarige Vermis. In rostrocaudaler Richtung wird die Kleinhirnoberfläche durch parallele Fissuren in einzelne Folia untergliedert. Die entwicklungsgeschichtlich ältesten Fissuren schneiden am tiefsten in die Kleinhirnoberfläche ein und bilden damit die Grundlage der anatomischen Einteilung in Lobuli. Diese werden in der vermalen Region entlang der Mittellinie von rostral nach caudal von I – X durchnummeriert. In den Hemisphären werden die einzelnen Lobuli mit Namen benannt, wobei ich mich in dieser Arbeit auf die Nomenklatur nach Altman und Bayer (1999) beziehen werde.

Auch das Kleinhirn ist in eine graue, die Zellsomata enthaltende, und eine weiße, die Fasertrakte enthaltende Substanz unterteilt. Außer den Zellsomata in der Kleinhirnrinde finden sich noch neuronale Zellsomata im Kleinhirnmarklager, dort liegen die vier Paare der tiefen Kleinhirnkerne.

Im adulten Cerebellum ist die Rinde zytoarchitektonisch in drei Schichten unterteilt. Als innerste Schicht, an das Mark angrenzend findet sich die Körnerschicht, darüber die Purkinjellschicht und oberflächlich gelegen die Molekularschicht.

Die Körnerzellschicht enthält überwiegend die im Verhältnis sehr kleinen Körnerzellen. Die Axone der Körnerzellen steigen in die Molekularschicht auf und verzweigen sich dort T-förmig. Mit den Dornfortsätzen der Purkinjellen gehen sie exzitatorische Synapsen ein. Die Körnerzellen erhalten ihre Afferenzen hauptsächlich über Moosfasern (114).

Die birnenförmigen Purkinjellen haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 23 μm und befinden sich in einer einzigen Zelllage von sehr regelmäßiger Anordnung. Die Dendriten der Purkinjellen verzweigen sich dreidimensional in der Molekularschicht. Die Verzweigungen werden in primäre, sekundäre und tertiäre Dendriten eingeteilt. Charakteristisch ist die Ausstattung der Dendriten mit Dornfortsätzen, den so genannten Spines, die eine spezialisierte Kontaktfläche für Synapsen darstellen. Die Axone der Purkinjellen stellen die einzige Efferenz des Kleinhirns dar und haben Kontakt zu den Kleinhirn- und Hirnstammkernen (114).

In der Molekularschicht befinden sich die Korb- und Sternzellen. Als nicht neuronales Element befindet sich in der Molekularschicht die Bergmann-Glia, die sich palisadenartig zwischen den Dendriten der Purkinjellen ausdehnt und eine wichtige Rolle bei der Histogenese spielt, da sie den Purkinjellen und Körnerzellen als wichtige Orientierungshilfe bei der Migration dient (65).

In der weißen Substanz des Kleinhirns verlaufen die Axone der Purkinjellen und sowie Moos- und Kletterfasern.

2.6 Cerebelläre Mutationen bei der Maus

Heute sind über 140 spontan aufgetretene Mutationen im ZNS der Maus bekannt, von denen bei mehr als 20 dieser Mutanten das Cerebellum mitbetroffen ist (99). Das Gehirn dieser Mäuse stellt ein ideales Studienobjekt dar, um die Funktion von diversen Genen während der Entwicklung des Cerebellums zu analysieren. Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte ich bei unterschiedlichen transgenen Mutanten die Expression von Tetraspanin-5, um eine weitere Aussage über die potentiellen Funktionen von Tetraspanin-5 treffen zu können.

2.6.1 Die *weaver* Maus

Für den Phänotyp der *weaver* Maus ist eine Punktmutation auf dem Chromosom 16 verantwortlich, die zu einem Austausch der Aminosäure Glycin durch Serin führt und eine Veränderung des Lumen bildenden H5 Segment im GIRK2 Kanals zur Folge hat (82).

Im ZNS der *weaver* Mäuse findet man eine Degeneration der cerebellären Körnerzellen, der Purkinjezellen (9) (13) (26) (45) (70) (86) und der zentralen Kleinhirnkerne (9) (69) (70) sowie der dopaminergen Zellen in der Substantia nigra (8) (32) (38) (87) (94) (112).

Außerdem sind Bulbus olfactorius und Hippocampus von strukturellen Veränderungen betroffen (92) (96).

Das Kleinhirn der *weaver* Maus ist makroskopisch kleiner als das der Wildtypmaus.

Das Ergebnis der *weaver* Mutation ist ein vollständiger Verlust der vermalen und paravermalen Körnerzellen in der externen Körnerzellschicht noch bevor sie mit der Migration in die interne Körnerzellschicht starten (49) (85) (106) (101). Dies führt zu einer stark ausgeprägten Atrophie des adulten Cerebellums.

Im *weaver* Kleinhirn gibt es schätzungsweise 40% weniger Purkinjezellen, allerdings ist bisher nicht bekannt, ob dieses Ergebnis durch Zelltod oder einen Fehler in der Genese entsteht (49).

Eine normale Purkinjezellentwicklung wird durch den exzitatorischen Input der Parallelfasern der Körnerzellen maßgeblich beeinflusst, so dass es im *weaver* Cerebellum zu einer gestörten Dendritogenese der Purkinjezellen kommt, welche sich durch verkümmerte, wenig differenzierte Dendritenbäume äußert, (35) (37) (40) (52) (101).

In der Ausprägung des Phänotyps gibt es eine mediolaterale Verteilung, die cerebellären Defizite findet man hauptsächlich in der vermalen Region und weniger in den Hemisphären (49) (85) (106) (5) (101).

So zeigen die Körnerzellen der Hemisphären weniger häufig Migrationstörungen und Zelltod als die vermalen Körnerzellen (13) (86) (49).

Erklärungen für diese Ergebnisse könnten sein, dass im gesamten *weaver* Cerebellum die Zellbewegung/-migration, die zur Fusion der bilateralen cerebellären Anlage führt, gestört ist.

Die Unfähigkeit, adäquate Zell-Zell-Kontakte auszubilden, führt wahrscheinlich zur unvollständigen Migration, so dass Zellen, die in der embryonalen Anlage eigentlich für die vermale Region bestimmt waren, im Bereich der Hemisphären zu liegen kommen und dort apoptotisch werden (69)

Der Phänotyp der homozygoten *weaver* Mäuse zeichnet sich durch eine Gangataxie aus. Der Phänotyp der heterozygoten Maus zeigt ebenso die beschriebenen Veränderungen – jedoch nicht in der Ausprägung wie beim Wildtyp. Das Kleinhirnvolumen ist geringer als beim Wildtyp, jedoch nicht so stark reduziert wie bei der homozygoten *weaver* Maus. Allerdings zeigt die heterozygote Maus keine motorischen Auffälligkeiten.

2.6.2 Die *reeler* Maus

Bei der *reeler* Maus besteht eine Mutation im *Reeler*-Gen. Es besteht die Hypothese, dass das Gen *Reeler* und das dazugehörige Protein Reelin für die Ausbildung/Formierung der kortikalen Schichten verantwortlich sei (21).

Studien von Caviness et al. beschreiben bei der *reeler* Maus eine während der Entwicklung fehlerhafte Ausbildung der Schichten des cerebralen und des cerebellären Cortex (19) (18).

Die Größe des *reeler* Cerebellums ist stark reduziert. Gleichzeitig kann man keine eindeutige Lobulierung erkennen, da die Ausbildung der Foliation/Lobulierung, die ab dem 17. Embryonaltag E17 erfolgt, gestört ist (33).

Der Hauptanteil der Purkinjezellen liegt in subkortikalen Zellaggregaten und ist nicht in der für sie typischen Monolayer angeordnet. Faserbündel unterteilen die Zellansammlungen in sieben parasagittal ausgerichtete Kompartimente (34).

Des Weiteren äußert sich die Mutation ebenfalls in einer Differenzierungsstörung der Dendriten. Die Dendritenbäume der Purkinjezellen sind ungerichtet und zeigen eine wenig ausgereifte Verzweigung.

Speziell im Kleinhirn vermutet man, dass das Gen *reeler* eine Rolle in der Entwicklung der Purkinjezellen spielt. Das Expressionsprodukt Reelin ist ein großes extrazelluläres Protein, welches in Zellen der Rand-/Marginalzone der cerebellären Anlage und des Cortex vorkommt (97) und in der Phase der neuronalen Migration im Kleinhirn stark exprimiert wird. Miyata et al. stellten die Hypothese auf, dass Reelin die initiale Migration von unreifen Purkinjezellen steuern könnte (78).

Die Purkinjezellvorläufer ordnen sich normalerweise in einer verbreiterten Zone im Cortex an, in der sie in Kontakt mit einwachsenden Axonen stehen(72). Im *reeler* Cerebellum schlägt diese Anordnung der Purkinjezellen fehl: die Neuronen verbleiben zufällig an Orten unterschiedlicher

Lage. Während dieser Phase der Migration und der Ausbildung des cerebellären Cortex wird im Wildtyp ein Großteil der synaptischen Kontakte gebildet, deren Nicht-Vorhandensein bei der *reeler*-Maus zu den entsprechenden neurologischen Ausfällen führen.

Die einwärts gerichtete Migration der Körnerzellen aus der externen Körnerzellschicht ist ebenfalls beeinträchtigt. Die Körnerzellen verbleiben locker arrangiert in einer Schicht oberhalb der ektopen Purkinjezellen. Anzunehmen ist, dass die Ektopie der Körnerzellen durch die fehlende Purkinjezellschicht und einen daraus resultierenden Mangel an Wachstumsfaktoren entsteht (80).

Weiterhin ist eine Mutation im *reeler* Gen mit Defekten im radiären glialen System assoziiert: die Gliazellen sind im Vergleich zum Wildtyp insgesamt kürzer und unorganisierter (103).

Der neurologische Phänotyp der *reeler* Maus äußert sich durch Koordinationsprobleme, Tremor und Ataxie.

2.6.3 Die staggerer Maus

Staggerer (Gensymbol *sg/sg*) ist eine autosomal rezessive Mutation auf Chromosom 9 (99). Den Störungen in der phänotypischen Differenzierung der Purkinjezellpopulation liegt eine Deletion im „retinoid-related orphan receptor alpha“ ($ROR\alpha$) Gen, das für einen nukleären Hormonrezeptor kodiert, zugrunde (39). Dieses Gen wird ab Embryonaltag 12,5 bis in die adulte Phase exprimiert und ist für die neuronale Differenzierung und Reifung mitverantwortlich (39) (91).

Das Cerebellum der homozygoten *sg*-Mutante weist so schwere Defekte auf, dass sie bereits makroskopisch ab Postnataltag P4 sichtbar sind. Die Größe des adulten Cerebellums beträgt weniger als ein Drittel der Normalgröße. Die Anzahl der Fissuren ist stark reduziert. Histologisch fallen kleine Foliae mit niedrigen Fissuren und eine schwer abgrenzbare Laminierung der grauen Substanz auf (99).

Der Gendefekt führt zu einer mangelnden Ausbildung von Purkinjezell-Dornfortsätzen an den Dendriten und zeigt eine unterschiedliche Ausprägung entlang der mediolateralen Achse des Kleinhirns (47) (48) (63) (106).

Die Anzahl der Purkinjezellen ist im Durchschnitt um 75% verringert. Der Vermis ist mit nur 60% verringerter Purkinjezellzahl weniger betroffen, als die Hemisphären (48).

Immunzytologisch findet man im *staggerer* Cerebellum eine mutationsbedingte parasagittale Kompartimentierung der Purkinjezellpopulation (81). Die Immunhistochemie mit Anti-Calbindin zeigt Purkinjezellen, die je nach Lage unterschiedlich differenziert sind. Die Purkinjezellen unterscheiden sich in ihrer Zellgröße/-ausrichtung und in der Differenzierung des Dendritenbaumes. Auffällig ist der rudimentäre Dendritenbaum, der nicht die übliche orthogonale Ausrichtung zum cerebellären Cortex zeigt und keinen Stammdendriten ausbildet. Stattdessen kommt es zur Formation multipolarer Dendriten, die wiederum durch eine nur transiente Ausbildung von Dornfortsätzen an den tertiären Dendriten gekennzeichnet sind. Die mangelnde Ausbildung von Dornfortsätzen führt dazu, dass Parallelfasern keine Synapsen bilden können. Initial ist das Wachstum von Parallelfasern ungestört, in der adulten Maus ist ihre Anzahl jedoch deutlich reduziert und es fällt eine starke Gliose auf (102) (53) (104).

Des Weiteren ist die Dichte der Purkinjezellen verändert. (47) (99).

Neben den Purkinjezellen degenerieren auch die Körnerzellen ab P16 und fehlen an P30 beinahe komplett. Die Körnerzellen degenerieren wahrscheinlich retrograd, nachdem die postnatale Migration aus der äußeren Körnerzellschicht abgeschlossen ist (63).

Im Gegensatz zu den Parallelfasern gelingt die Synaptogenese zwischen Kletterfasern und Purkinjezellen, wenn auch nur in reduzierter Anzahl (63).

Anhand des ataktischen Gangbildes, des verminderten Extremitätentonus und des verminderten Bewegungsdranges können die homozygoten Mutanten zwischen P8 und P12 eindeutig von den Normaltieren differenziert werden (50). Insgesamt sind die motorischen Defizite geringer ausgeprägt als bei der *weaver* (wv) Mutante. Die heterozygoten Tiere weisen keine Ataxie auf.

2.6.4 Die *Engrailed-1*- und *Engrailed-2*-Deletionsmutanten

Während der embryonalen Entwicklung haben die homeotischen Proteine *Engrailed-1* (En-1) und *Engrailed-2* (En-2) ihre spezifische Lokalisation im Bereich des Übergangs vom Mesencephalon zum Rhombencephalon. Sie werden in einem örtlich und zeitlich definierten Muster exprimiert und ihre Bedeutung liegt vermutlich in der Ausbildung einer bestimmten Anzahl von Neuronen

(6) (62). Allerdings werden die beiden Gene in unterschiedlichen Bereichen exprimiert. Am Embryonaltag E17 kann En-1 nur in wenigen Zellen des Kleinhirns nachgewiesen werden, En-2 hingegen wird in einem charakteristischen parasagittalen Muster exprimiert (75). Im adulten Tier ist die Expression von En-2 auf die Körnerzellschicht beschränkt (22). In den Purkinjezellen wird En-2 um den Tag der Geburt reprimiert (22).

Bei *Drosophila* spielt das *Engrailed* Gen eine Schlüsselrolle in der Segmentierung. Transplantationsexperimente an Vögeln haben gezeigt, dass das Expressionsmuster von En-1 und En-2 ausschlaggebend für die Anlage des Kleinhirns ist (3) (71). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *Engrailed* nicht nur eine Bedeutung für die Segmentierung eines Organismus hat, sondern auch für die Kompartimentierung und damit für die Entwicklung des Kleinhirns mit verantwortlich ist (46).

Eine Möglichkeit, die Funktion eines Gens zu untersuchen, ist die gezielte Deletion oder eine Überexpression des jeweiligen Gens. Entsprechend führt ein Bruch im Gen En-1 zu einem Verlust der Anlage des Cerebellums und des Mesencephalons, nachfolgend kommt es zum perinatalen Tod der Knock-out Mäuse (115). En-2 Knock-out Mäuse hingegen sind lebensfähig, zeigen aber ein in der Größe vermindertes Kleinhirn und eine veränderte Foliation (76). Die Ursache der Größenabnahme liegt wahrscheinlich in der abgenommenen Anzahl der Purkinjezellen, die normalerweise im Zeitraum zwischen E10 und E13 gebildet werden. Aufgrund der zeitlichen Übereinstimmung von En-2 und der Entstehung von Purkinjezellvorläufern wird vermutet, dass En-2 eine Rolle bei der Proliferation und Differenzierung der Purkinjezellen spielen könnte (76).

Da der Phänotyp der En-2 Nullmutation nur leichte Veränderungen mit sich bringt, kann man davon ausgehen, dass das Homologe Gen En-1 die Ausfälle von En-2 teilweise kompensiert (58).

3. Material und Methoden

3.1 Geräte und Chemikalien

3.1.1 Geräte

Bildverarbeitungsprogramm	Adobe Photoshop 6.0 Adobe Systems, Edinburgh, UK
Digitale Kamera Polaroid,	DM, DMC 1e, DT5
DNA/RNA – Gelelektrophoresekammer	ComPhor Midi, Biozym Diagnostik, Oldendorf
Protein Elektrophorese System	Biorad Modular Mini-PROTEAN II; No. 165-2940
Geldokumentationssystem	Gel Doc 2000, Bio-Rad, München
Perfusionspumpe	Schlauchpumpe TL, Meredos, Bovenden
Kühlzentrifuge	Biofuge primo R, Heraeus, Hanau
Mikroskop	aufrechtes Mikroskop: Axiokop 2 MOT, Zeiss, Jena
Mikrotom	Rotationsmikrotom HM 355 mit Schnitttransfersystem STS Microm Laborgeräte GmbH; Walldorf
Objektträger	1) Histobond® Adhäsions-Objektträger Marienfeld, Bad Mergentheim 2) SuperFrost® Plus Objektträger Menzelgläser, Braunschweig
pH-Meter	Beckmann Instruments, Fullerton, USA
Spektrometer UV/Vis Spectrophotometer	DU 530 Beckmann Instruments, Fullerton, USA
Thermocycler GeneAmp PCR System	2400 Perkin Elmer, Langen
Blotkammer	Tankblot, Biometra, Göttingen
Thermomixer	Thermomixer S 436, Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Biofuge Pico, Heraeus Instruments
Tischschüttler	IKA Schüttler MTS2, Ika-Labortechnik,

	Staufen
Whatman Blottingpapier	Amersham Pharmacia Biotech

3.1.2 Chemikalien

Antikörper

Anti-Digoxigenin (DIG)	Fab-Fragmente Roche, Mannheim
Anti-Calbindin D28-K	Clone CB 955, Sigma, Saint Louis, USA
Parvalbumin	Clone Parv-19, Sigma, Saint Louis, USA

Nukleinsäuren

1 Kilobase (kB)-Leiter	Live Technologies, Karlsruhe
dNTP	Roche, Mannheim
Oligonukleotidprimer für PCR	Live Technologies, Karlsruhe
Restriktionsendonuklease Pvu I	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Proteinase K	Live Technologies, Karlsruhe

Detektionsreagenz

5-Brom-4-Chlor-3-Ondolylphosphat (BCIP)	Sigma, Deisenhofen, Steinheim
---	-------------------------------

Peptid zur Herstellung des polyklonalen Antikörpers

CLAQNLVSDIEAVRASW; 17 Aminosäuren, MG 1875,11 g/mol

Cys-Leu-Ala-Gln-Asn-Leu-Val-Ser-Asp-Ile-Glu-Ala-Val-Arg-Ala-Ser-Trp

Über das N-terminale Ende an KLH (keyhole limpet hemocyanin) gekoppelt

Analytisches Zentrallabor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Peptid zur Detektion potentieller Bindungstellen von Tetraspanin-5

CTKDPAEDVINTQC; 14 Aminosäuren, MG 1536,67 g/mol

Cys-Thr-Lys-Asp-Pro-Ala-Glu-Asp-Val-Ile-Asn-Thr-Gln-Cys

Über die terminalen Cystein-Reste ist das Peptid zyklisiert und über einen Spacer mit einem Biotin-Tag versehen

Analytisches Zentrallabor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Primer

Invitrogen Life technologies, Karlsruhe

Primerpaar für die weaver-PCR Amplifikation:

F 5' CCA TAG AGA CAG AAA CCA CGA TC

R 3' CAT GAA GGC GTT GAC AAT GGA

Primerpaar für die L7En-2-PCR Amplifikation:

**F 5' Primer (L7 EN-F): 5' AAG AAT TCT AGG TAC TAG GAT TTA GGG GCA CTT
CTG AG-3'**

R 3' Primer (L7 EN-R): 5' AGT TGG TGA TGC GAT GTG GAT GCT C-3'

Restriktionsenzym

Pvu I CGA T[↓]CG Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Sonstige Chemikalien

Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex	Vectastain [®] ABC-Kit Vector Laboratories Inc Burlingame, GB
Agarose	Seakem [®] LE Agarose Biozym, Hessisch Oldendorf, FMC
Blockierungsreagenz	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen, Steinheim
BSA	Roche, Mannheim
Calciumchlorid-Dihydrat [CaCl ₂ .2H ₂ O]	Merck, Darmstadt

Chemoluminiszenz Kit	ECL Puls Western Blotting Dection System Amersham Biosciences, Freiburg
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma, Deisenhofen, Steinheim
Dextransulfat	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)[C ₆ H ₁₀ O ₅]	Sigma, Deisenhofen, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
1,4-Dithio-DL-threit (DTT)	Sigma, Deisenhofen, Steinheim
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure, 37%	Merck, Darmstadt
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid [C ₂₁ H ₂₀ N ₃ Br]	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Fluka, Seelze
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Freund'sches Adjuvant	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat [KH ₂ PO ₄]	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
3-(N morpholino) Propansulfonsäure (MOPS)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat [Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O]	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Propanol	Merck, Darmstadt
Sacharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure, rauchend	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat SDS	Serva, Heidelberg
SSC 20x	Sigma, Taufkirchen
Temed	Gibco/BRL
Tribromoethylalkohol (TBE)	Sigma, Deisenhofen, Steinheim

Triethanolamin (TEA)	Merck, Darmstadt
Triton-X 100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Fluka, Seelze
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

3.1.3 Allgemeine Stammlösungen und Puffer

10x TBE:

890 mM Tris-Cl

890mM Borsäure

20mM EDTA

pH 8,3

10x MOPS

0,2 M 3-(N morpholino) Propansulfonsäure (MOPS)

0,08 M Na-Acetat, pH 7,0

RNA-Arbeitstechniken:

Alle Arbeiten mit RNA wurden mit Handschuhen durchgeführt. Pipettenspitzen und Zentrifugenröhrchen wurden autoklaviert, Glaswaren bei 200°C in einem Wärmeschrank sterilisiert. Die Paraffinschnitte wurden mit einem nicht extra gereinigten Wasserrutschenmikrotom hergestellt, wobei aber die Objektträger nur mit Handschuhen angefasst wurden.

Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Behandlung von H₂O, PBS und SSC:

0,05 % (v/v) DEPC wurde in die Lösung gegeben und 12h bei 37°C inkubiert und anschließend zur Entfernung des DEPC autoklaviert.

Autoklavieren:

Alle Lösungen für Arbeiten mit RNA wurden 45 min bei 120°C und 1,1 bar autoklaviert und in sterilen Flaschen gelagert.

3.2 Versuchstierhaltung

Die für die Gewinnung der Gewebeproben benötigten Tiere wurden gemäß dem aktuellen Tierschutzgesetz und den Richtlinien der örtlichen Aufsichtsbehörden gehalten. Alle Gewebeproben wurden aus Kleinhirnen der Maus entnommen. Dazu wurden männliche heterozygote L7En-2 Tiere auf dem Hintergrund FVB/N gezüchtet und mit weiblichen FVB/N Mäusen verpaart. Die En-2^{ntd/ntd} knockout Mäuse wurden von Prof. Dr. Wolfgang Wurst (GSF, München) zur Verfügung gestellt und in einer homozygoten Zucht gehalten. Als Kontrolltiere dienten Mäuse aus der F1 Generation von Verpaarungen zwischen C57Bl/6 und C3H Mäusen. Weaver Zuchtpaare wurden freundlicherweise von Frau Dr. Isabelle Dusart (Université Pierre et Marie Curie, Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Die für Experimente genutzten Tiere stammten aus der Verpaarung von heterozygoten Tieren. Gewebematerial von staggerer und reeler Mausmutanten wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Michael Vogel (MPRC, Baltimore, USA) hergestellt und stammen ebenfalls aus Verpaarung von heterozygoten Tieren. Die Tiere hatten immer freien Zugang zu Futter und Wasser und hatten einen Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden Helligkeit und Dunkelheit. Die Schwangerschaft dauerte durchschnittlich 19 Tage. Der Tag der Geburt ist definitionsgemäß der sogenannte Postnataltag P0. Die Tiere galten als adult, wenn sie älter als 2 Monate waren.

3.3 Genotypisierung der Versuchstiere

DNA-Isolierung aus Schwanzspitzen

Von juvenilen Mäusen wurden 2 mm des Schwanzes kupiert, bei adulten Tieren musste aufgrund der stärkeren Verknöcherung und dem deswegen geringeren DNA -Gehalt ca. 4 mm abgenommen werden. Pro Schwanzspitze wurde dann 0,2 ml PCR-Puffer, 10 µl Proteinase K (Stammlösung 10 µg/µl) und 0,1% Triton-X zu gegeben. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 55 °C unter Schütteln inkubiert. Aus diesem Ansatz entnimmt man 2 µl für die PCR.

Charakterisierung L7En-2 positiver Tiere durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Der Genotyp der Mäuse wurde über einen PCR-Ansatz charakterisiert. Bei dieser PCR wurde ein DNA-Fragment amplifiziert, welches die Verbindungsstelle zwischen L7 Promotor und En-2 Gen enthielt. Transgene Tiere, die das L7En-2-Konstrukt im Genom integriert hatten, konnten in der PCR-Analyse durch ein 500 bp großes Fragment identifiziert werden. Für die Kontrolle der Ergebnisse wurde in jedem PCR Ansatz eine Negativkontrolle eingesetzt, bei der statt genomischer DNA Wasser verwendet wurde, sowie eine in einer früheren PCR als positiv getestete DNA. In jedem Reaktionsansatz wurde parallel zum L7En-2 Transgen das Gen für die Glyceraldehydphosphat-dehydrogenase (GAPDH) amplifiziert, um das Vorhandensein von DNA im Ansatz zu beweisen.

Da bekannt war, dass das verwendete Primerpaar für das L7En-2 Transgen unspezifische Bindungen mit genomischer DNA oder RNA eingeht, wurde eine HotStart PCR durchgeführt. Dabei wurden die PCR Primer sowie die genomische DNA (Mix 1 in Tab. 1) zunächst durch Erhitzen auf 94°C für 10 min denaturiert. Die lange Inkubationsdauer hatte gleichzeitig den Sinn, die Proteinase K aus dem Schwanzverdau zu inaktivieren. Die Lösung mit den denaturiert vorliegenden DNA-Strängen wurde dann auf 80°C abgekühlt und das Enzym zugegeben (Mix 2). Tabelle 1 zeigt den Reaktionsansatz für Mix 1 und Mix 2 für die Analyse jeweils eines Schwanzes.

Tabelle 1: PCR-Ansätze für die Analyse von L7En-2 Mauschwänzen. (Genannt sind die Volumina für jeweils eine Analyse.)

Mix 1:		Mix 2:	
Puffer, 10 x	1,5 µl	Puffer, 10 x	0,5 µl
5'Primer (L7En-F), 20 pmol/µl	0,5 µl	dNTP (dTTP, dGTG, dCTG,	
3'Primer (L7En-R), 20 pmol/µl	0,5 µl	dATP), 10mM	0,4 µl
5'GAPDH Primer, 2 pmol/µl	0,5 µl	Taq-DNA-Polymerase	0,2 µl
3'GAPDH Primer, 2 pmol/µl	0,5 µl	H ₂ O	3,9 µ
DMSO, 100 %	0,8 µl		
H ₂ O	8,7 µl		
DNA	2 µl		

Die Amplifikation der Gensequenzen fand anschließend innerhalb von 30 Zyklen statt, während denen die Lösung je 60 sec bei 90°C (Denaturierung), 60 sec bei 63°C (Anlagerung der Primer),

und von 90 sec bei 72°C (Synthesereaktion) inkubiert wurde. Den Abschluss der Zyklen bildete eine Synthesereaktion von 10 Minuten bei 72°C.

DNA-Gelelektrophorese

Für die Agarose -Gelelektrophorese wurden Apparaturen der Firma Biozym mit 50ml (ComPhor L Mini) oder 100 ml (ComPhor L Midi) Gelbettvolumen verwendet.

Zur Herstellung des Gels wurde eine 1%ige Agaroselösung mit 1x TBE-Puffer bereitete und in der Mikrowelle mehrmals kurz aufgeköcht, bis die gesamte Agarose gelöst war. Nach dem Abkühlen auf ca. 55°C wurde die Mischung 1:10000 (v/v) mit Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) versetzt und in eine mit einem Gelkamm versehene Gelkammer gegossen.

Die DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und in 1x TBE bei 100V /400mA in der Gelkammer elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn der schneller wandernde Farbstoff des Probenpuffers die Gelfront erreicht hatte. Schließlich wurden die aufgetrennten Banden mit Hilfe eines Transluminators bei 302 nm sichtbar gemacht.

Die transgenen Tiere sind durch eine etwa 500 bp große Bande zu identifizieren. Diffuse DNA Spuren in der Nähe der Geltaschen deuten auf hochmolekulare genomische DNA hin, die bei der DNA Präparation aus Schwanzgewebe gewonnen wurde. Die niedermolekularen DNA Banden resultieren von den eingesetzten Primern und Nukleotiden.

Ethidiumbromid-Stocklösung:

Ethidiumbromid wurde in der Konzentration von 10 mg/ml in H₂O angesetzt.

EDTA-Stocklösung:

0,5 M EDTA wurde mit NaOH gelöst und auf pH 8 eingestellt.

Charakterisierung von weaver Tieren durch die PCR

Um Mäuse mit der weaver Mutation zu identifizieren, wurde ein DNA-Fragment auf dem Chromosom 16 amplifiziert, welches bei den weaver Tieren eine Punktmutation an der Nukleotidposition 953 von Guanin zu Adenin trägt. Der forward-Primer enthält an Nukleotidposition 949 anstelle Cytosin Guanin, so dass bei Wildtyp-Tieren eine Palindromsequenz für die Restriktionsendonuklease Pvu I entsteht, die zur Charakterisierung der

Weaver-Mutanten genutzt werden kann. Tabelle 2 zeigt den Reaktionsansatz für Mix 1 und Mix 2 für jeweils einen Absatz.

Tabelle 2: PCR-Ansätze für die Analyse von *weaver* Mausschwänzen. (Genannt sind die Volumina für jeweils eine Analyse.)

Mix 1:

Mix 2:

10x Puffer	1,5 µl	10x Puffer	0,5 µl
5'Primer (weaver F)	0,5 µl	dNTP (10mM) (dTTP, dGTG, dCTG,	
3'Primer (weaver R)	0,5 µl	dATP)	0,4 µl
DMSO	0,8 µl	Taq-DNA-Polymerase	0,2 µl
H ₂ O	10,7 µl	H ₂ O	3,9 µl
DNA	1 µl		

Es wurde ebenfalls eine HotStart PCR durchgeführt. Anschließend wurden die Proben auf 80°C abgekühlt. In diesem Schritt wurde der Mix 2 hinzugefügt.

Die Amplifikation der Gensequenzen fand anschließend innerhalb von 30 Zyklen statt, während denen die Lösung je 60 sec bei 90°C (Denaturierung), 60 sec bei 55°C (Anlagerung der Primer), und von 90 sec bei 72°C (Synthesereaktion) inkubiert wurde. Den Abschluss der Zyklen bildete eine Synthesereaktion von 10 Minuten bei 72°C.

Restriktionsanalyse

Für die Restriktionsendonuklease PVU I wurde folgender Puffer verwendet:

MgCl ₂ , 1M	200 µl
Tris, 1M,	300 µl
DTT, 0,5M,	60 µl
BSA, 10 mg/ml,	100 µl
H ₂ O	340 µl

Der Restriktionsansatz für eine Schwanzprobe setzte sich folgendermaßen zusammen:

Pvu I Puffer,	1 µl
PVU I	0,4 µl
H ₂ O	8,6 µl

Aus dem jeweiligen PCR Produkt wurde jeweils 10 µl entnommen und zu dem Restriktionsansatz gegeben. Die Ansätze wurden für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und die entstandenen Fragmente anschließend auf einem 2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Wildtiere unterschieden sich von den Mutanten durch eine Pvu I Schnittstelle, folglich waren in der Gelelektrophorese zwei Fragmente von 119 und 97 bp zu erkennen. Da die weaver Maus aufgrund der Punktmutation von Guanin zu Adenin keine Pvu I Schnittstelle mehr trug, erkannte man auch nur ein Fragment in der Gelelektrophorese. Für die Kontrolle der Ergebnisse wurde in jedem PCR Ansatz eine Negativkontrolle eingesetzt, bei der statt genomischer DNA Wasser verwendet wurde.

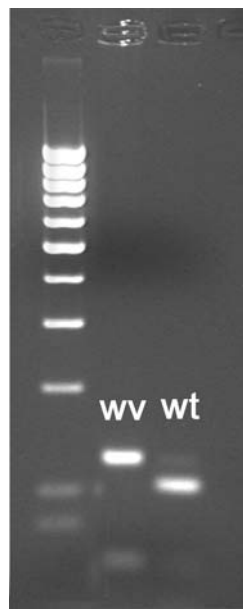


Abb. 2: Gelelektrophorese: Auftrennung von Wildtyp (wt)- und weaver (wv)-DNA. Bei der *weaver* Maus zeigt sich nur eine Bande, bei der Wildtypmaus hingegen zeigen sich zwei Banden.

3.4 Gewebevorbereitung

Fixierung und Präparation von Gewebeproben

Perfusionsfixierung

Für die Perfusionsfixierung wurden die Tiere je nach Altersstufe mit 0,1- 0,5 ml Avertin (2,5%) intraperitoneal narkotisiert und das Herz nach Präparation des Thorax freigelegt. Bei den jüngeren Tieren, Postnataltag 0-15 (P0-P15), wurde erst das rechte Herzohr eröffnet und dann eine Kanüle in die Spitze des linken Ventrikel eingeführt. Bei älteren Tieren wurde das Herz am linken Ventrikel eingeschnitten, eine Rundkopfkanüle eingeführt und festgeklemmt. Dann wurde für den Abfluß das rechte Atrium angeschnitten. Über eine Perfusionspumpe mit einer Durchflussrate von 10 ml/min bei P0-P5 und 12 ml/min bei P7-P15 erfolgte der Blutaustausch durch Fixans. Zunächst wurde mit 30ml Ringerlösung perfundiert, dann erfolgte die eigentliche Fixierung durch das jeweilige Fixans (etwa 60 ml PFA, FA, Bouin-Lösung). Im Anschluss wurde das Gehirn aus dem Schädel präpariert und anhand der Gehirnmorphologie der Erfolg der Perfusion überprüft. Das Gehirn wurde im Anschluss in dasselbe Fixans überführt und vier Stunden immersionsfixiert. Nach dieser Postfixierung mussten die formaldehydfixierten Gewebe noch einen Tag in Leitungswasser gewässert werden, um das Fixans herauszuwaschen.

Ringer-Lösung:

NaCl 8,00g

KCl 20g

NaHCO₃ 1,00g

CaCl₂ 0,22g

in 1000ml H₂O bidest lösen

Histologische Schnitte

Einbettung von Mausgehirmen in Paraffin:

Die Gehirne wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 50 und 60% je eine Stunde entwässert. Das Einbetten fand in dem Einbettautomat Tissue-Tek III statt. In ihm wurde das Gewebe weiter entwässert und über Methylbenzoat in flüssiges Paraplast überführt, welches dann noch dreimal ersetzt wurde, um das Methylbenzoat zu entfernen. Nach dieser Prozedur wurde das Gehirn in einem Plastikförmchen in die gewünschte Position ausgerichtet und das Förmchen vorsichtig mit Paraplast aufgefüllt. Nach langsamen Herabkühlen auf Raumtemperatur wurden die Blöckchen bei 4°C gelagert.

Einbettprotokoll für die Einbettung von Mausgehirnen in Paraffin:

- | | |
|-------------------------|-------------------------------|
| 1. 70% Ethanol, 30 min | 8. Methylbenzoat I, 45 min |
| 2. 70% Ethanol, 30 min | 9. Methylbenzoat II, 45 min |
| 3. 80% Ethanol, 30 min | 10. Methylbenzoat III, 45 min |
| 4. 80% Ethanol, 30 min | 11. Paraplast I, 45 min |
| 5. 96% Ethanol, 45 min | 12. Paraplast II, 45 min |
| 6. 100% Ethanol, 20 min | 13. Paraplast III, 45 min |
| 7. 100% Ethanol, 20 min | |

Die festen Paraffinblöckchen wurden auf Holzklötzchen so aufgeblockt, dass sie sich mit Hilfe des Mikrotoms in frontaler Ebene schneiden ließen. Die 5 oder 10 µm dünnen Schnitte wurden einige Minuten auf ca. 40°C warmen Wasser gestreckt und auf Adhäsionsobjektträger aufgenommen. Danach wurden sie für mindestens 24 Stunden bei 37 °C getrocknet.

3.5 In situ Hybridisierung (ISH)

Gewebevorbehandlung

Paraffinschnitte

Um das Gewebe für die Sonden in der ISH frei zugänglich zu machen, mussten die auf den Objektträgern haftenden Paraffinschnitte zunächst entparaffiniert werden. Hierzu wurden sie dreimal 10 min in Xylol inkubiert und dann durch die absteigende Alkoholreihe (3 mal 100%, 96%, 90%, 75% und 50% Propanol) geführt, bei der die Schnitte für jeweils fünf Minuten in den einzelnen Lösungen verblieben. Anschließend wurden sie in PBS-Puffer gewaschen. Um die

Schnitte besser an die Objektträger zu haften und das Abschwimmen während der langen Prozedur zu verhindern, wurden sie 45-90 min in kaltem 4% PFA postfixiert. Nach der Fixierung wurden die Schnitte zweimal 5 min in PBS gewaschen und in einer Lösung mit 1% H₂O₂, 20% Methanol in 1x PBS inkubiert. Danach wurde wieder in PBS gewaschen und die Membran der Zellen durch Proteinase K-Verdau, TritonX-100 und HCl-Behandlung permeabilisiert.

Der Proteinase K-Verdau wurde mit 10 µg/ml Enzym in PBS bei RT für vier Minuten durchgeführt. Nach dem Waschen wurden dann die Schnitte in einer 0,25% TritonX 100 Lösung in PBS-Puffer wiederum für 4 min inkubiert und im Anschluss daran gründlich (insgesamt dreimal 5min) in PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde durch eine achtminütige 0,2 M HCl Behandlung die Membran permeabilisiert.

Im letzten Schritt der Vorbehandlung der Schnitte wurden positive Ladungen im Gewebe und auf dem Objektträger durch Acetylierung neutralisiert, wodurch unspezifische Interaktionen mit den negativen Ladungen der Nukleinsäuren verhindert wurden. Dazu wurde das Material 10 min mit 0,25 % Essigsäureanhydrid in 0,1M Triethanolaminlösung inkubiert. Vor der Inkubation in der viskösen Hybridisierungslösung wurden die Schnitte in 50°C warmen 2x SSC 10 min äquilibriert.

Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde der Hybridisierungspuffer mit 100 mM DTT (2 µl 5M DTT auf 100 µl Hybridisierungspuffer) und der Sonde (5ng/ml) bei 80°C fünf Minuten denaturiert und dann auf Eis gestellt. Auf die leicht angetrockneten Objektträger wurde pro Schnitt ca. 25 µl Hybridisierungslösung pipettiert, luftblasenfrei ein Deckglas aufgelegt und dieses mit Fixogum abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 70 °C in einer feuchten Kammer.

Posthybridisierungswaschen

Nach der Hybridisierung wurden das Fixogum und das Deckgläschen vorsichtig mit einer Pinzette abgezogen. Die unspezifisch gebundenen Sonden wurden mit 2xSCC-Puffer mit Hilfe einer Pasteurpipette abgespült. Danach wurden die Objektträger in eine Küvette gestellt und nach folgendem Protokoll gewaschen:

1. 2x SCC, 5 min, Temperatur 60 °C
2. 2x SCC, 30 min, Temperatur 60 °C
3. 50 % Formamid in 1x SCC, 20 min, 60 °C

4. 0,1x SSC, 45 min, 70 °C

Detektion

Für die chromogene Detektion wurde die Alkalische Phosphatase als Reporterenzym verwendet. Bei dieser Nachweisreaktion binden die Anti-DIG-F_{ab}-AP-Konjugate an die hybridisierten DIG-RNA-Moleküle. Der AP-vermittelte Substratumsatz der Reportermoleküle NBT und BCIP führt zu einem braunen NBT-Diformazanpräzipitat.

Das Protokoll wurde weitestgehend nach den Angaben des Herstellers des Anti-DIG-F_{ab}-AP-Konjugats durchgeführt. Dazu wurden die Objektträger nach dem Waschen in SCC in MABT-Puffer äquilibriert und dann für 60 min in der Blockierlösung inkubiert. Die Inkubation erfolgte mit Anti-DIG-AP, 1:5000 in Blockierlösung verdünnt, bei 4 °C über Nacht. Dazu wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einem Fettstift umrandet und die Lösung auf den Objektträger pipettiert.

Nach der Inkubation wurden die Schnitte fünfmal jeweils eine Stunde in MABT-Puffer bei Raumtemperatur gewaschen. Danach wurden sie für die Detektion in dem Entwicklungspuffer äquilibriert. Die Detektion erfolgte in frisch angesetztem AP-Substrat für 24 bis 48 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Die Reaktion wurde nach optischer Kontrolle der Signalintensität durch Waschen in TE Puffer abgestoppt.

Puffer und Lösungen, die für die In situ Hybridisierung benötigt wurden:

10xPBS:

1,37 M NaCl

0,02 M KCl

0,1 M Na₂HPO₄

0,02 M KH₂PO₄, pH 7,4

10x Phosphate-buffered saline⁻ (PBS⁻):

150 mM NaCl (87,6 g/l), 10 MM NaH₂PO₄·H₂O (13,8 g/l) in 1l Bidest, der pH wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt

1x Phosphate-buffered saline⁺ (PBS⁺):

890 ml H₂O, 10 ml 10 MgCaCl₂, 100 ml 10x PBS⁻, pH 7,4

100x Mg/CaCl₂:

1,5 g CaCl₂·H₂O, 1,0 g MgCl₂ in 100 ml H₂O

20x SSC:

3M NaCl

300mM Na-Citrat

10x Hybridisierungssalz:

3 M NaCl

200 mM Tris-HCl

50 mM EDTA, pH 7,5

Hybridisierungspuffer (100 ml):

Hybridisierungssalz 10x	10 ml
Formamid	50 ml
Denhards' Lösung	2 ml
10 % SDS	2 ml
Hefe t-RNA, 10 mg/ml	10 mg/ml
Heringssperma DNA, 10 mg/ml	10 mg/ml
Dextransulfat	10 g

Membrandestabilisierungslösung I:

0,2 M HCl

in 1000ml H₂O bidest lösen

Membrandestabilisierungslösung II:

0,5 % (v/v) oder 1 % (v/v) Triton X-100 in PBS

BCIP-Stocklösung:

50mg BCIP wurde in 1 ml Dimethylformamid (DMFA) gelöst und bei -20°C gelagert.

NBT-Stocklösung:

Für eine 2%ige 8(w/v) Lösung wurden 2 g Blockierungsreagenz in 1000 mM MABT- Puffer gelöst und portioniert bei -20°C gelagert.

Maleinsäurepuffer (MABT)

100 mM Maleinsäure

150 mM NaCl

Der Puffer wurde mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt.

Blockierungslösung:

2 % (w/v) blocking Reagent (Boehringer) in MABT-Puffer

Entwicklungspuffer:

100mM Tris HCl, pH 9,5

100 mM NaCl

50 mM MgCl₂

Farblösung:

45 µl NBT Lösung,

5 µl BCIP Lösung in 10 ml Entwicklungspuffer

Paraformaldehydstocklösung:

20% (w/v) Paraformaldehyd wurden in H₂O bidest mit NaOH auf 55°C erwärmt und unter Rühren gelöst. Anschließend wurde 1/10 Volumen 10x PBS zugegeben und ein pH-Wert von 7,4 mit HCl eingestellt.

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert. Bei Verwendung wurde die gewünschte Konzentration mit 1x PBS hergestellt.

3.6 Herstellung des polyklonalen Anti-Tetraspanin-5 Antikörpers

Da uns bisher nur die In situ Hybridisierung zum Nachweis von Tetraspanin-5 zur Verfügung stand, war es unser Ziel, einen polyklonalen Antikörper gegen Tetraspanin-5 herzustellen.

Dazu wurde ein gereinigtes 17-Aminosäuren langes Peptid der extrazellulären Domäne von Tetraspanin-5 synthetisiert, das am N-terminalen Ende an KLH (keyhole hemocyanin) gekoppelt war. Dieses Peptid wurde benutzt, um vier Neuseeland-Kaninchen (Lammers, Euskirchen) zu immunisieren.

Zur ersten Immunisierung wurden 250 µg des Proteins in Freund'schem Adjuvanz gelöst und subkutan in die Halsregion injiziert. Jedes Tier wurde nach der ersten Immunisierung noch insgesamt zweimal im Abstand von vier Wochen nachimmunisiert. Das Serum wurde nach 12 Wochen durch Ausbluten des Kaninchens gewonnen.

SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

SDS-Gelelektrophorese

In der SDS-Page nach Laemmli werden Proteine nach Größe aufgetrennt. Zur Herstellung des Gels wurden zunächst 10ml des 10%igen Trenngels hergestellt und luftblasenfrei in die Elektrophoresekammer gegossen. Das Gel wurde mit der Overlay -Lösung beschichtet, um eine gerade Trennlinie zwischen den Gelschichten zu erzielen. Nach der Polymerisation (etwa 30 min) wurden 8 ml des Sammelgels hergestellt, der Overlaypuffer entfernt und die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen. Dieses polymersisierte ebenfalls für 30 Minuten aus.

Vorbereitung der Proteinproben

Für jede zu befüllende Geltasche wurden 10µg Proteinextrakt (4µl), 1µl Proteinextraktionspuffer und 5µl Probenpuffer pipettiert. Die Protein-Proben wurden zunächst für 5 Minuten bei 95°C erhitzt, dann kurz zentrifugiert. Das Gel wurde in die zugehörige Elektrophoresekammer gespannt. Der Elektrophorese-Puffer wurde jeweils in den oberen und unteren Tank gefüllt. Jede Geltasche wurde mit 10µl der Proteinproben befüllt. Als Marker wurde der Wide Range Color Marker (MW 29 000-205 000) von Sigma benutzt.

Für die Auftrennung im Sammelgel wurde eine Stromstärke von 30mA angelegt, die bei Erreichen des Trenngels auf 40 mA erhöht wurde.

Elektro-Blotting (Western Blot)

Zum Blotten wurde das *Tank Blot System* von Biomatra benutzt. In der Vorbereitung wurde eine Nitrozellulose-Membran für 15 min in Blotpuffer eingeweicht.

In die Gelhalterkassette wurden folgende Lagen an Blotmaterial aufgeschichtet, hier in der Reihenfolge von der Kathode zur Anode. Zu beachten ist, dass das gesamte Blotmaterial in Transfer-Puffer getränkt sein muss und luftblasenfrei aufeinander gelegt wird: ein mit Puffer getränktes Fließ, drei Lagen Puffer getränkte Whatman 3MM Filter, das in Puffer aequilibrierte Gel, die in Puffer aequilibrierte Nitrozellulose-Membran, drei Lagen Whatman 3MM Papier und zum Abschluss wiederum ein Puffer getränktes Fließ. Der Kassettenhalter wurde in den Blottank gehängt, und der Tank mit eisgekühltem Transfer-Puffer gefüllt. Anschließend wurde bei 400 mA für 1-2 Stunden bei 4 °C geblottet. Durch das Blotten auf die Nitrozellulosemembran werden die aufgetrennten Proteine für den anschließend zugegebenen spezifischen ersten Antikörper leichter zugänglich. Nach dem Blotten wurde das Gel verworfen und die Membran je nach Anwendung in Streifen geschnitten.

Detektion

Als erster Schritt der Detektion wurden die unspezifischen Bindungen mit einer 5 %igen Milchpulver-Lösung eine Stunde blockiert. Darauf folgten zwei Waschschrte mit PBS Tween. Dann wurde sowohl das Präimmun-Serum, als auch das Immun-Serum als erster Antikörper zu den jeweiligen Nitrozellulosestreifen gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das Serum wurde in Konzentrationen von 1:2000, 1:4000 und 1:6000 in 5% Milchpulver PBS Tween Lösung verdünnt. Anschließend erfolgte ein fünfmaliger Waschvorgang von 15 minütigen und viermal fünfminütigen Schritten. Als nächstes wurden die Nitrozellulosestreifen mit dem HRP-konjugierten zweiten Antikörper (goat α rabbit) für eine Stunde inkubiert. Der zweiten Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:5000 in 1% BSA/PBST verdünnt.

Der anschließende Waschvorgang erfolgte genau so wie nach Zugabe des ersten Antikörpers.

Das HRP Enzym wurde zur Detektion mit Luminol Lösung von Amersham Biosciences (ECL Puls Western Blotting Detection System) versetzt. Dazu wird die Luminollösung für 5 min auf den Membranen inkubiert. Darauf lässt man die Lösung abtropfen und legt die Membran in Haushaltsfolie ein. Durch Belichtung und Entwicklung eines autoradiographischen Films können Proteine, die durch das Serum erkannt worden sind sichtbar gemacht werden. Belichtet wurden

die Filme zwischen einer und 30 Minuten. Die Tetraspanin-5 Bande wurde aufgrund der Nukleinsäure und Aminosäuresequenz auf mindestens 35 kD geschätzt.

Puffer und Lösungen, die für die Gelelektrophorese und den Western Blot benötigt wurden:

4x Tris/SDS-Puffer:

6,05g Tris wird in 40 ml H₂O gelöst, der pH wird auf 6,8 mit 5 N HCl eingestellt.
Die Lösung wird auf 100 ml aufgefüllt, dann wird noch 0,4 g SDS hinzugefügt.

Proben-Puffer:

für 100 ml benötigt man: 50 ml 4 x Tris/SDS
10 ml 100 % β-Mercaptoethanol-stock-Lösung
2 % (w/v) SDS (20 ml 10 % SDS)
10 % (w/v) Sucrose (10 g Sucrose)
20 µg/ml Bromphenol Blau (2 mg Bromphenol-Blau)
in 100ml H₂O lösen.

Tris Puffer (4x):

für 100 ml des "**Trenngel**" **1,5 M -Tris -Puffers** benötigt man:
18,17 g Tris in 70 ml H₂O, der pH wird mit HCl_{cc} auf 8,8 eingestellt.
Die Lösung wird auf 100 ml aufgefüllt.

für 100 ml des "**Sammelgel**" **0,5 M Tris -Puffers** benötigt man:
6,06 g Tris in 70 ml H₂O, der pH wird mit HCl_{cc} auf 6,8 eingestellt.
Die Lösung wird auf 100 ml aufgefüllt.

Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (30%)

30g Acrylamid
1 g Bisacrylamid
gelöst in 100 ml H₂O.

Acrylamid ist neurotoxisch. Deshalb werden während der Arbeit mit Acrylamid Handschuhe und Mundschutz getragen.

10 % Ammoniumpersulfat-Lösung (APS)

0,1 g in 1 ml Bidest

Overlay-Lösung

5 ml des "Trenngel" 1,5 M Puffers

15 ml H₂O

10 µl 10 % SDS

Elektrophorese-Puffer (10x)

250 mM Tris (30.29 g Tris)

1,92 M Glycin (144,13g)

1% (w/v) SDS 10 g

in 1000ml H₂O bidest lösen, pH 8,3

Trenngel (10 %):

4 ml "Trenngel" 1,5 M Tris Puffer

6,5 ml H₂O

5,34 ml 30 % Acrylamid

160 µl 10 % SDS

80 µl 10 % APS

TEMED 16 µl

Sammelgel:

1 ml "Sammelgel" 0,5 M Tris Puffers

5,28 ml H₂O

1,6 ml 30 % Acrylamid

80 µl 10 % SDS

40 µl 10 % APS

8 µl TEMED

10 % SDS (Na-Dodecylsulfat)

10 g SDS in 100ml Bidest

Transfer-Puffer:

25 mM Tris (6g)

192 mM Glycin (28,6g)

20 % Methanol 400 ml,

die Lösung wird mit H₂O auf zwei Liter aufgefüllt.

Phosphate-buffered saline with Tween 20 (PBS-Tween):

1 x PBS (50 ml 10 x PBS), 0,05 % Tween 20 (0,25ml),

aufgefüllt mit H₂O auf 500 ml.

Anfertigung der Protein-Proben

0,5 ml des Proben-Puffers werden zu einem adulten Mäuse Cerebellum gegeben. Das Gewebe wird im Homogenisator zerkleinert. Danach wird es für zehn Minuten zentrifugiert. Die Proteinkonzentration wird mittels BCA bestimmt. Die Proteinextrakt-Proben sollten bei -70 °C gelagert werden.

3.7 Immunhistochemische Färbung von paraffinfixierten Schnitten

Die Immunhistochemie macht sich die spezifische Bindung von Antikörpern, die gegen bestimmte Gewebs- bzw. Zellantigene gerichtet sind, zunutze. Dabei werden meist mehrere Antikörper nacheinander verwendet: Der primäre Antikörper ist gegen das darzustellende Antigen gerichtet. Der Sekundärantikörper richtet sich gegen das F_c-Fragment von Immunglobulinen der Tierspezies, in welchem der Primärantikörper hergestellt worden war.

Stammt der Primärantikörper aus dem Kaninchen, verwendet man einen Sekundärantikörper, der gegen das F_c-Fragment von Kaninchen-Immunglobulinen gerichtet ist.

Gewebevorbehandlung

Verwendet wurden für die Immunhistochemie Paraffinschnitte, die aus Bouin- oder Paraformaldehyd-fixierten Geweben gewonnen worden sind. Zunächst wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert. Dazu wurden sie dreimal für zehn Minuten in Xylol inkubiert und dann durch die absteigende Alkoholreihe (3 mal 100%, 90%, und 70% Ethanol) geführt, bei der die Schnitte für jeweils etwa fünf Minuten in den einzelnen Lösungen verblieben.

Danach wurden sie in Phosphat gepufferte Salzlösung (1x PBS⁺) gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation in 2x SSC für 20 Minuten bei Raumtemperatur (bei Schnitten mit Anti-Tetraspanin-5 Antikörper und Parvalbumin als Primärantikörper). Handelte es sich um Calbindin als ersten Antikörper, so wurden die Schnitte für 30 Minuten in 2x SSC gekocht. Es folgte wieder ein Waschvorgang mit 1x PBS⁺. Um die endogenen Peroxidasen zu blockieren, wurden die Schnitte mit 1% H₂O₂ (2 ml H₂O₂ in 58 ml 1x PBS⁺) für 10 Minuten inkubiert. Nach einem zweimaligen Waschschrift in 1x PBS⁺ wurden die Membranen mit 0,5% TritonX-100 in PBS⁺ permeabilisiert (300 µl in 59,7 ml 1x PBS⁺). Im nächsten Schritt wurden unspezifische Bindungen mit 2 % BSA-Lösung oder 2 % Goat Serum-Lösung für 30 Minuten blockiert (bei Calbindin, Parvalbumin als ersten AK: 2 % Goat Serum; bei Anti-Tetraspanin-5 als ersten AK: 2 % BSA).

Inkubation mit dem Primärantikörper

Nun wurden über Nacht die Schnitte mit dem Primärantikörper inkubiert. Calbinbin und Parvalbumin wurden in einer Verdünnung von 1:1000 in 2 % GS eingesetzt, der Anti-Tetraspanin-5 Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:200, 1:500 und 1:1000 verdünnt und in 2% BSA verdünnt. Erneut erfolgte ein dreimaliges Waschen mit 1x PBS⁺.

Inkubation mit dem Sekundärantikörper

Dann erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, hier wurden entsprechend des ersten Antikörpers verschiedene Antikörper eingesetzt: für Calbinbin und Parvalbumin wurde ein Ziege-anti-Maus Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 verwendet, für den Anti-Tetraspanin-5 Antikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen Antikörper ebenfalls in einer Verdünnung von 1:200 benutzt. Es folgte ein Waschschrift mit PBS⁺, danach wurden die Schnitte mit TBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC-Kit,

Vector) in einer Konzentration von 1:100 in TBS verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen in TBS, wurden zum Nachweis der Peroxidase die Präparate schließlich mit einer Substratlösung aus Diaminobenzidin (DAB, 0.5%) und H₂O₂ (0.3 %) inkubiert. Die Reaktion wurde über einen Waschgang mit TBS abgestoppt. Abschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt. Nachdem sie eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90 %, 96%, 2x 100 %) und dreimalige Inkubation mit Xylol durchlaufen hatten, konnte die Eindeckelung mit Depex[®] erfolgen.

Puffer und Lösungen, die für die Immunhistochemie benötigt wurden:

Bouin'sche Lösung (Ansatz zu 105 ml):

25ml 37%igen Formaldehyd

75ml gesättigte Picrinsäure

5ml konzentrierte Essigsäure

Vor der Anwendung wurde die Lösung filtriert, um grobe Präzipitate zu entfernen. Sie kann bei Raumtemperatur gelagert werden.

1x Tris-buffered saline (1x TBS):

150 mM NaCl (8,76 g/l), 50 mM Tris (6,06g/l) in 1l Bidest
der pH wurde mit HCl auf 8,6 eingestellt.

0,05 % Diaminobenzidin-(DAB)-Lösung

Vorverdünnung von 0,5 %, weitere Verdünnung von 1:10 in TBS

Zugabe von 0,03 % H₂O₂

Blockierung endogener Peroxidasen:

1 % (v/v) H₂O₂ in 20 % (v/v) Methanol

Eosin:

0,5% ige wässrige Lösung mit einem Tropfen Essigsäure

3.8 Peptid-Bindungsassay mit Tetraspanin-5 an Vibratomschnitten

Gewebevorbehandlung

Das Kleinhirn von neun Tage alten Wildtypmäusen wurde am Vibratom in 40 µm dicke Sagittal-Schnitte geschnitten. Diese geschnittenen Präparate wurden als schwimmende Schnitte zunächst zweimal mit 1x PBS⁻ für jeweils fünf Minuten gewaschen. Dann erfolgte eine Blockierung endogener Peroxidase mit einer 1 % H₂O₂ -Lösung für zehn Minuten. Nach dem erneuten dreimaligen Waschen in 1x PBS wurden die unspezifischen Bindungen für 30 Minuten mit 4 % Goat-Serum (GS) blockiert.

Inkubation mit Peptid

Anstelle eines Antikörpers wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bindung eines Peptides, das eine potentielle Bindungsdomäne des Tetraspanin-5 simulieren sollte, an Gewebeschnitten untersucht. Das verwendete Peptid bestand aus 14 Aminosäuren, das über die zwei terminalen Cystein-Gruppen durch Bildung von Disulfidbrücken zyklisiert wurde. Die Vibratomschnitte wurden für eine Stunde mit dem Peptid in Verdünnungen von 1:200, 1:500 und 1:1000 in 4 % GS inkubiert. Die Verdünnung des Peptids 1: 200 wurde zweimal angesetzt; zu einem Ansatz wurde zusätzlich noch Dithio-DL-threit (DTT) gegeben. DTT zerstört die native Tertiärstruktur von Proteinen, die über eine Disulfidbrücke ausgebildet ist und sollte in unserem Fall die Tertiärstruktur des Peptides zerstören.

Detektion

Nach der Inkubation mit dem Peptid wurden die Vibratomschnitte zweimal für zehn Minuten mit 1x PBS⁻ gewaschen. Nun folgte ein Waschschrift mit 1x TBS für fünf Minuten. Dann wurde der Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Lösung) in einer Konzentration von 1:100 in TBS verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Avidin bindet sich in diesem Experiment an den Biotin-Rest, der an eines der Peptid-Cysteine gekoppelt war.

Erneut wurde dreimal in 1x TBS gewaschen und dann die Farbreaktion mit DAB (0,5 %) durchgeführt. Die Farbreaktion nach Zugabe von DAB wurde durch Waschen mit PBS⁻ abgestoppt. Die Präparate wurden mit Mowiol eingedeckelt.

4. Ergebnisse

4.1 Die Tetraspanin-5 mRNA Expression in Wildtyp- und L7En-2 Überexpressions-Mäusen

In einer dieser Arbeit vorangegangenen Dissertation von Herrn Dr. Jünger konnte gezeigt werden, dass die Tetraspanin-5 mRNA Expression während der ersten beiden Postnatalwochen einer Maus ansteigt und, dass die Expression der Tetraspanin-5 mRNA mit der Reifung der Neurone im Kleinhirn korreliert. Im Anschluss an die vorangegangene Arbeit war es ein Fokus der vorliegenden Arbeit, die Tetraspanin-5 mRNA Expression nach Beendigung der neuronalen Reifung zu untersuchen. Deshalb lag zunächst ein Schwerpunkt auf der Analyse des Kleinhirns adulter Mäuse. Definiert wurde Adoleszenz mit 2 Monaten, da hier die morphologische und physiologische Reifung abgeschlossen ist. Methodisch wurde diese Fragestellung wie in der vorigen Arbeit mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung untersucht.

Wurden Schnitte durch das Kleinhirn von elf Tage alten Jungtieren aus einer Wildtypzucht untersucht, so zeigte sich eine deutliche Expression von Tetraspanin-5 mRNA in der Purkinjellschicht und der inneren Körnerzellschicht. Die Expression in der äußeren Körnerzellschicht (EGL) war damit verglichen sehr gering und auf postmitotische Neurone beschränkt (Abb. 4). Wurde dieses Färbemuster mit dem von L7En-2 transgenen Tieren verglichen, so zeigte sich, dass die Expression der Tetraspanin-5 mRNA in den Körnerzellen äquivalent war, die in der Purkinjellen aber fast völlig fehlte. Dieser Rückgang in der Expression war in den Lobuli I-IX deutlich ausgeprägt, nicht aber im Lobus X. Damit stimmten diese Befunde mit den von Herrn Dr. Jünger erhobenen überein.

In adulten Tieren konnte im Rahmen dieser Arbeit nun gezeigt werden, dass die Untersuchung der Tetraspanin-5 mRNA Expression ein ähnliches Bild ergab (Abb. 3). Die Expression von Tetraspanin-5 mRNA war in allen Neuronen des Wildtyp-Kleinhirns hoch (Abb. 3 A, C). In den L7En-2 Tieren dagegen konnte wiederum nur in den Körnerzellen und Korb/Sternzellen ein vergleichbares Signal gefunden werden, während die Purkinjellen wesentlich weniger Tetraspanin-5 mRNA exprimierten (Abb. 3 B, D). Der Unterschied in der Expression zwischen

Wildtyp und L7En-2 Purkinjezellen fiel im Vergleich mehrerer Tiere allerdings etwas schwächer als bei P11-Tieren aus.

Engrailed-2 (En-2) wird im Wildtyptier am Tag der Geburt (P0) herunterreguliert. Zu diesem Zeitpunkt ist die Expression der Tetraspanin-5 mRNA noch gering. Postnatal, wenn kein En-2 mehr in Purkinjezellen vorhanden ist, nimmt die Tetraspanin-5 Expression schnell zu. In Analogie finden wir in Purkinjezellen, in denen wir die Expression des *Engrailed-2* durch transgene Überexpression hochhalten, eine verminderte Tetraspanin-5 Expression. Es lässt sich also vermuten, dass eine direkte, inverse Verbindung zwischen der Tetraspanin-5 mRNA Expression und der *Engrailed-2* Expression in cerebellären Purkinjezellneuronen existiert.

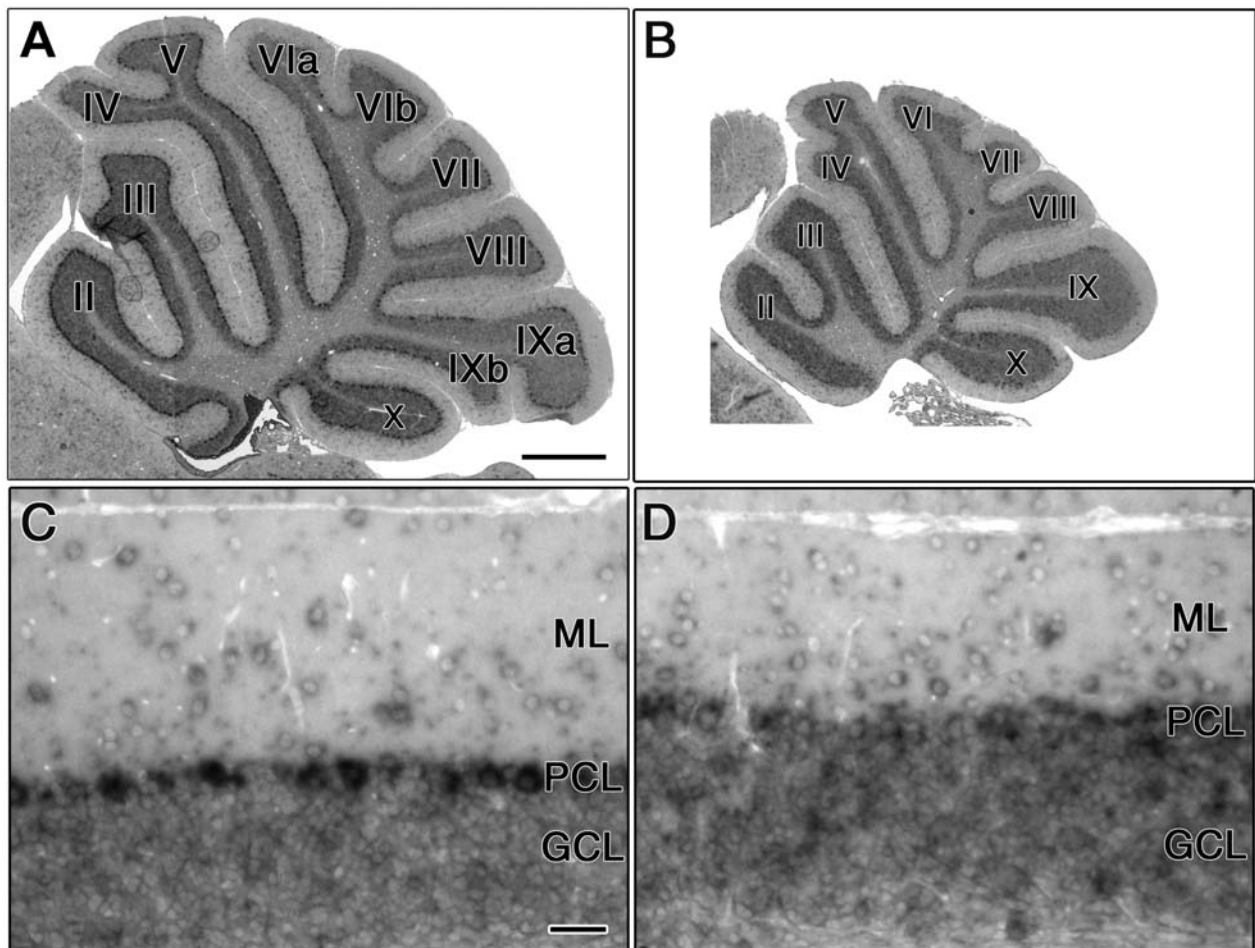


Abb. 3: Vergleich von adulten Schnitten aus Wildtyp Mäusen (A, C) mit solchen aus L7En-2 Tieren (B, D) im Hinblick auf Unterschiede in der Tetraspanin-5 Expression: Übersichtsaufnahme (A, B): die Balkenlänge entspricht 500 μm . Die römischen Ziffern entsprechen der Nummerierung nach Larsell (1951). Detailaufnahmen aus den gekennzeichneten Bereichen aus Lb IV (C, D): die Balkenlänge entspricht 50 μm . ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjezellschicht, GCL: Körnerzellschicht

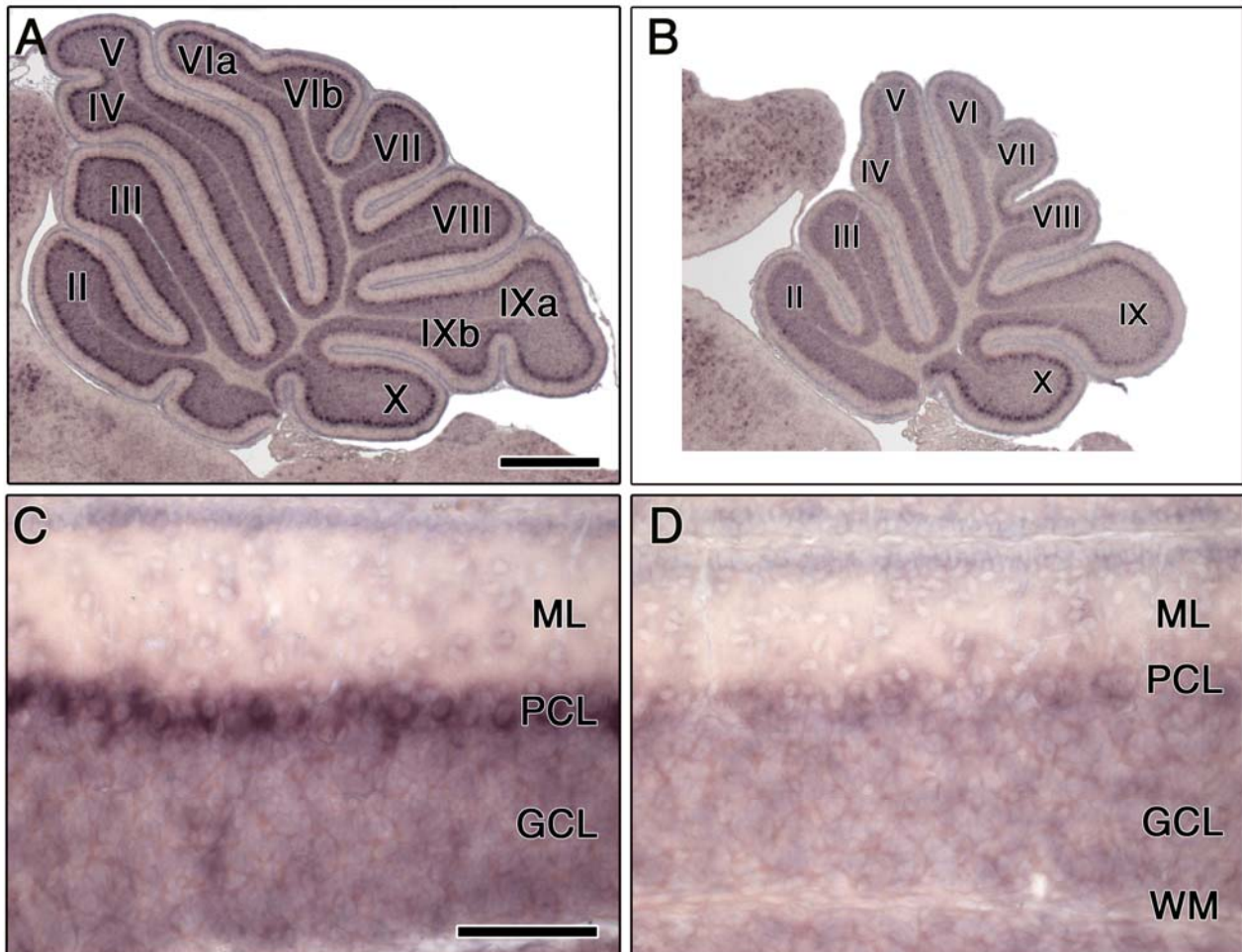


Abb. 4: Vergleich von P11 Schnitten aus Wildtyp Mäusen (A,C) mit solchen aus L7En-2 Tieren (B, D) im Hinblick auf Unterschiede in der Tetraspanin-5 Expression: Übersichtsaufnahme (A, B): die Balkenlänge entspricht 500 μm . Detailaufnahmen aus den gekennzeichneten Bereichen aus Lb IV (C, D): die Balkenlänge entspricht 50 μm . ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjezellschicht, GCL: Körnerzellschicht, WM: weiße Substanz

4.2 Die Tetraspanin-5 mRNA Expression in Wildtyp- und *Engrailed-2*-Nullmutationsmäusen

Der reduzierten Expression von Tetraspanin-5 in L7En-2 Purkinjezellen könnten zwei Ursachen zugrunde liegen: entweder wird Tetraspanin-5 in Purkinjezellen durch *Engrailed-2* reguliert und die in L7En-2 transgen hochregulierte *Engrailed-2* Expression würde so zu einer Repression von Tetraspanin-5 führen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Tetraspanin-5 indirekt reguliert würde und parallel mit der Differenzierung der Purkinjezellneuronen einhergeht.

Da die *Engrailed-2* und Tetraspanin-5 Expression in Körnerzellen nicht in entsprechender Weise korrelieren, die Tetraspanin-5 Expression aber mit der Körnerzellendifferenzierung entsprechend einhergeht, besteht die Vermutung, dass von *Engrailed-2* nicht direkt die Tetraspanin-5 Expression reguliert wird.

Getestet wurde diese Hypothese durch die Untersuchung einer *Engrailed-2* Nullmutationsmaus (En-2^{ntd/ntd}), in der aufgrund einer Deletion des Startkodon-Bereichs keine *Engrailed-2* Expression mehr stattfinden kann. Da *Engrailed-2* physiologischerweise am Tag der Geburt in Purkinjezellen exprimiert wird, diese Expression in En-2-defizienten Mäusen aber nicht mehr stattfindet, sollte bei einer direkten Regulation des Tetraspanin-5 durch En-2 die Expression des Tetraspanin-5 an P0 erhöht sein. Da die Nullmutationsmäuse durch Inzucht gewonnen wurden, wurden als Wildtyp-Kontrolltiere Tiere der F1 Generation aus einer Verpaarung von C3H und C57Bl/6 Tieren gewählt.

Wie bei Neugeborenen Wildtyp-Tieren zu vermuten, war die Expression der Tetraspanin-5 mRNA im gesamten cerebellären Kortex sehr gering (Abb. 5 A, B). Dies betraf sowohl die äußere Körnerzellschicht, als auch die schwach ausgeprägte Molekularschicht und die innen sich anlagernde Purkinjezellschicht. In Analogie zu vorangegangenen Arbeiten zeigte sich wiederum eine relativ starke Färbung im posterioren Lobus. Die vergleichsweise stärkste Färbung im anterioren und zentralen Lobus wurde etwas posterior von der primären Fissur gefunden. Das Kleinhirn der En-2 Knockout Maus zeigte im Vergleich zum Wildtyp-Tier keine Unterschiede in der Tetraspanin-5 mRNA Expression (Abb. 5 B). Weder die Purkinjezellen zeigten eine Zunahme oder Abnahme in der Signalintensität für Tetraspanin-5 mRNA, noch konnte ein Unterschied in

den Körnerzellen nachgewiesen werden. Dies konnte sowohl an Sagittalschnitten durch den Kleinhirnkortex als auch an Frontalschnitten demonstriert werden (Abb. 6). Der Größenunterschied der beiden Kleinhirne ist auf eine stark verringerte Zahl an Purkinjezellen zurückzuführen, die im Kleinhirn von Knock-out Tieren bereits in der frühen Embryonalentwicklung vermisst werden (6) (76).

Am neunten Tag nach der Geburt (P9) hatte die Tetraspanin-5 mRNA Expression im Wildtypier wie erwartet deutlich zugenommen. Sowohl die Purkinjezellen als auch die Körnerzellen zeigten nun ein deutliches *in situ* Hybridisierungssignal. Die Tetraspanin-5 mRNA Expression im Kleinhirn der *Engrailed-2* defizienten-Maus zeigte ein vergleichbares Expressionsmuster, so dass durch die En-2 Defizienz kein Einfluss auf die Tetraspanin-5 mRNA Expression festgestellt werden konnte (Abb. 5 C, D, E, F).

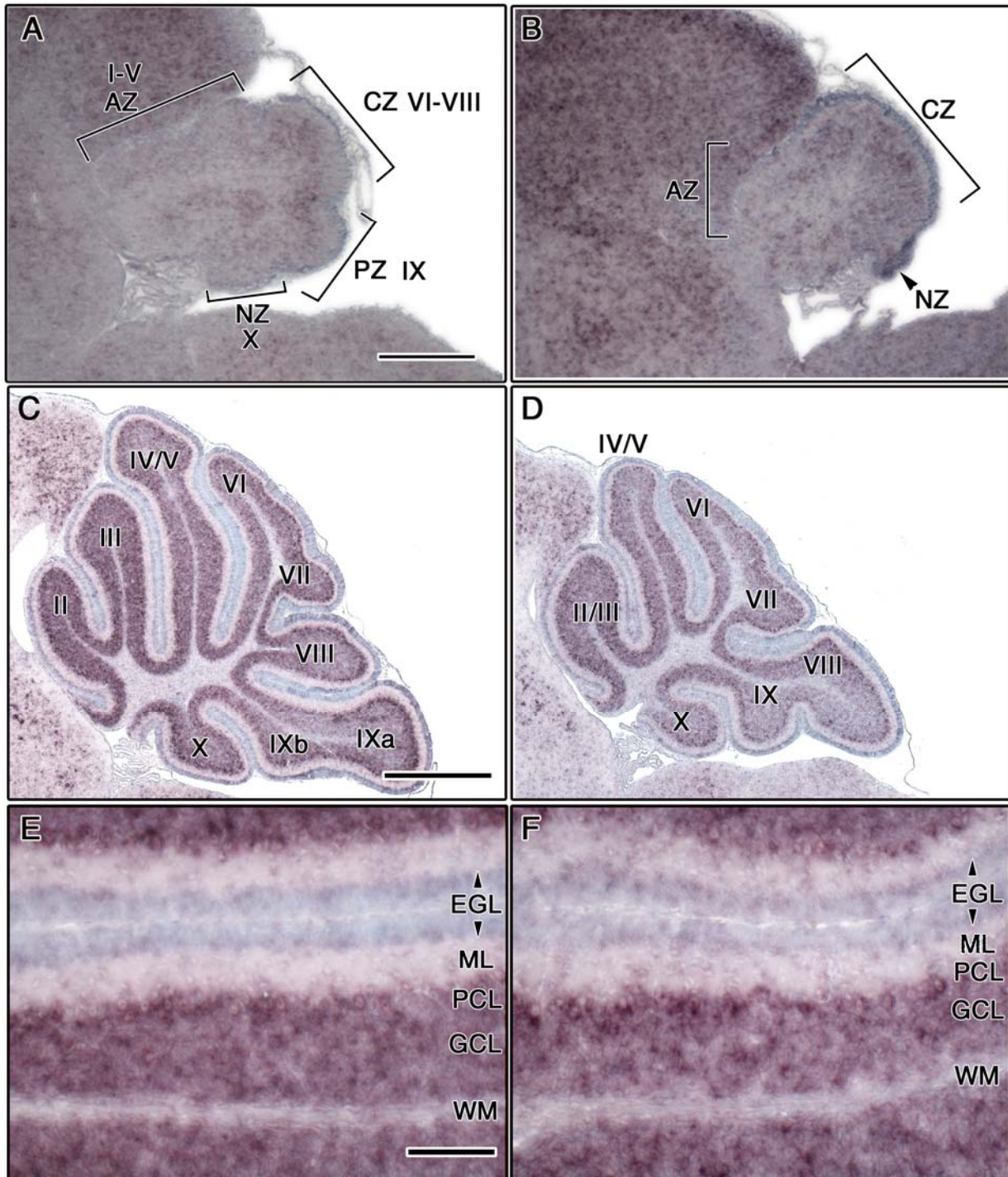


Abb. 5: Vergleich eines Sagittalschnitts einer Wildtyp Maus (A) mit dem entsprechenden Schnitt der En-2 Deletionsmutante (B) im Hinblick auf Unterschiede in der Tetraspanin-5 Expression: Übersichtsaufnahme (A, B): die Balkenlänge entspricht 250 µm. Die Einteilung der Zonen entspricht der Nomenklatur nach Armstrong und Hawkes (2000): AZ: anterior zone, Lobuli I-V; CZ: central zone, Lobuli VI-VIII; PZ: posterior zone, Lobulus IX; NZ: nodular zone: Lobulus X). **Vergleich von P9 Sagittalschnitten von der Wildtyp Maus (C) mit entsprechenden Schnitten der En-2 Deletionsmutante (D),** die Balkenlänge entspricht 500 µm. Die

Detailaufnahmen stammen aus Lb IV (E, F): die Balkenlänge entspricht 50 μm . EGL: externe Körnerzellschicht ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjezellschicht, GCL: innere Körnerzellschicht, WM: weiße Substanz

4.3 Die Tetraspanin-5 mRNA Expression entlang der mediolateralen Kleinhirnachse

Vergleichende Expressionstudien an Sagittalschnitten durch das Kleinhirn müssen insofern unter Vorbehalt interpretiert werden, als viele Gene in Subpopulationen von Purkinje- und/oder Körnerzellen exprimiert werden (46), die sich in parasagittalen Streifen entlang der anterioposterioren Ausdehnung des Kleinhirns gruppieren. Um eine eventuelle parasagittale Expression von Tetraspanin-5 RNA herauszufinden wurden deshalb Frontalschnitte durch den Kleinhirnkortex mit *in situ* Hybridisierungen untersucht (Abb. 6).

Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, konnte das zelluläre Tetraspanin-5 Expressionsmuster an Frontalschnitten reproduziert werden. Alle cerebellären Neurone zeigten eine dezente, aber sichtbare Expression am Tag der Geburt. Diese Färbung war über den gesamten Kortex von der Vermis bis zu den Hemisphären verteilt. Auffällig war jedoch, dass es in den Hemisphären Lücken in der Purkinjezellschicht gab, die sich nicht oder deutlich schwächer anfärben ließen. Diese Lücken können zum einen durch eine veränderte Expression in Zellen hervorgerufen werden, zum anderen aber auch durch das einfache Fehlen von Zellen. Um diese Frage zu beantworten, habe ich Frontalschnitte mit Sonden für den Purkinjezellmarker CalbindinD28K angefärbt. Dieses Calcium-bindende Protein wird während der späten embryonalen Entwicklung, wenn auch in unterschiedlichen Stärken, in allen Purkinjezellen exprimiert. Tatsächlich zeigte sich ein der Tetraspanin-5 Färbung vergleichbares Muster mit der Calbindin Sonde, so dass daraus geschlossen werden kann, dass die Lücken in der Purkinjezellschicht nach Tetraspanin-5 Färbung durch das Fehlen von Purkinjezellen in diesen Regionen zustande kommen. Es liegt also keine parasagittale Expression von Tetraspanin-5 vor.

Es sei hier noch angemerkt, dass das Kleinhirn des *Engrailed-2*-defizienten Tieres das gleiche Expressionsmuster wie das des Wildtyp-tieres zeigte (Abb. 7). Also zeigen sich auch entlang der mediolateralen Achse des Kleinhirns keine Unterschiede in der Tetraspanin-5 mRNA Expression nach En-2 Deletion (Abb. 7C, D) oder Überexpression (Abb. 7A, B).

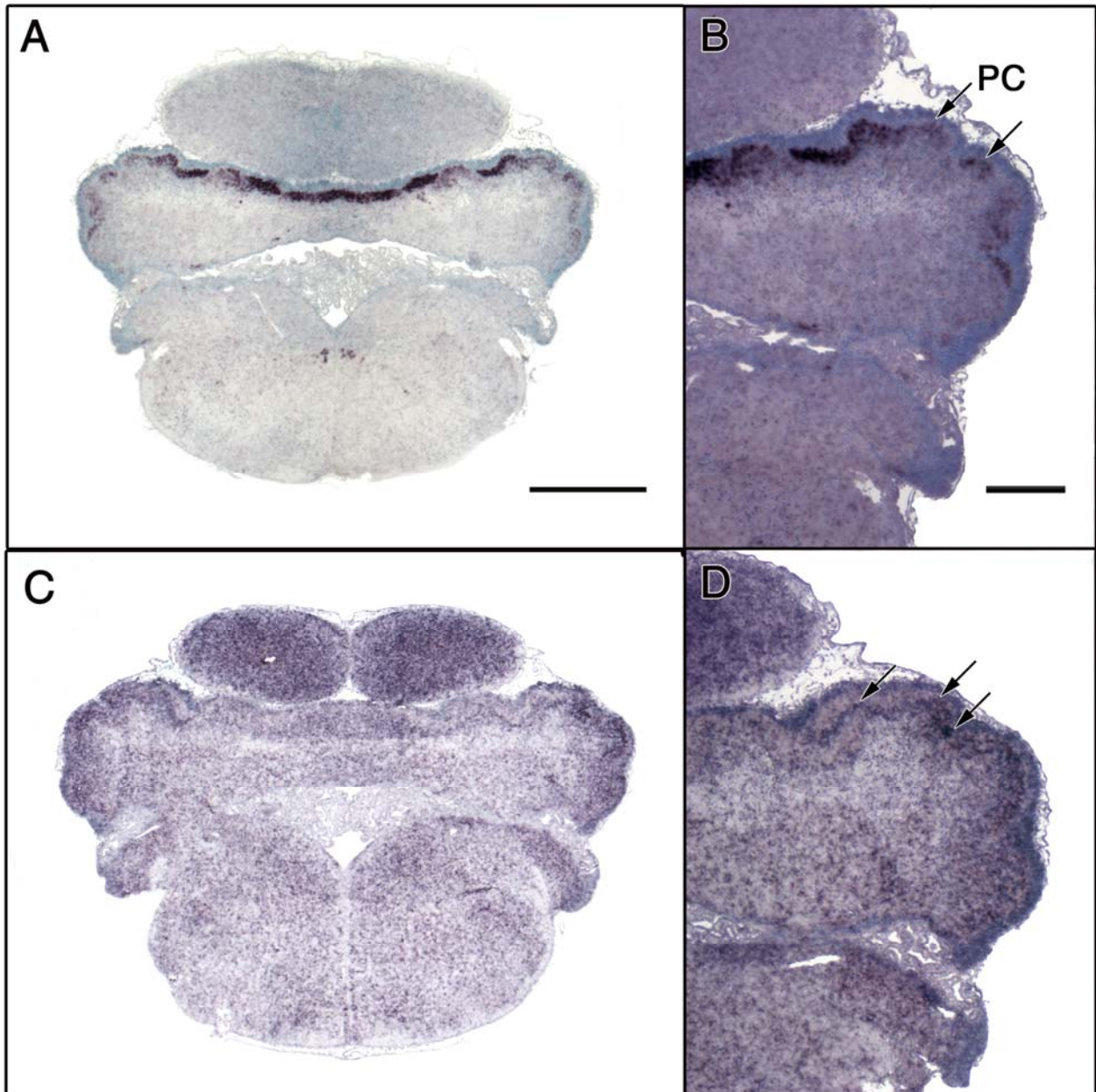


Abb. 6: Vergleich der Expression von Calbindin D28K (A, B) mit Tetraspanin-5 (C, D) zum Zeitpunkt P0 an Frontalschnitten von Wildtyp Mäusen im Hinblick auf eine mögliche parasagittale Färbung:

Übersichtsaufnahme (A, C): die Balkenlänge entspricht 500 µm. Detailaufnahmen (B, D): die Balkenlänge entspricht 100 µm. Pfeile: Purkinjezellen. Es zeigt sich keine parasagittale Streifung.

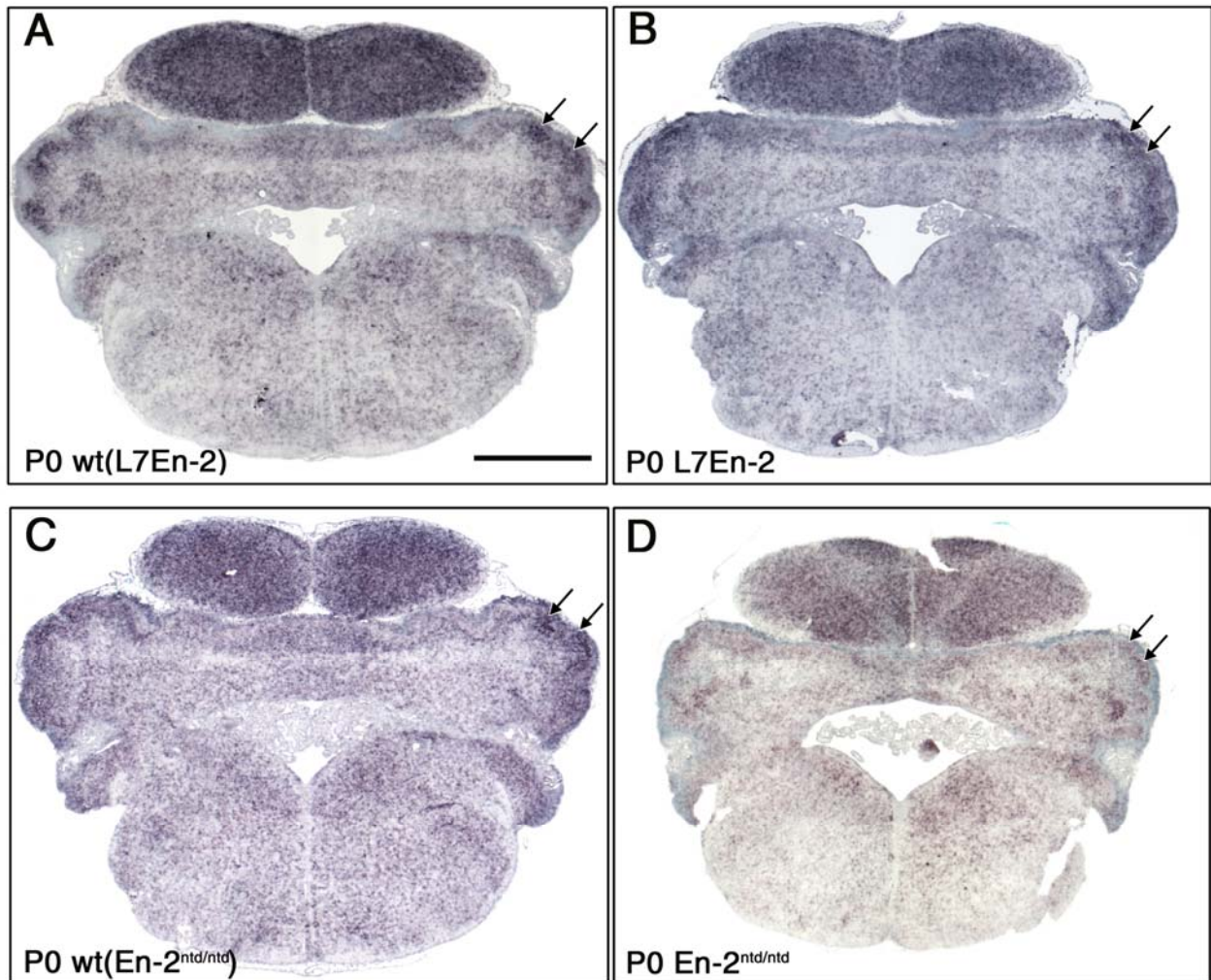


Abb. 7: Vergleich von P0 Frontalschnitten aus Wildtyp Mäusen (A) mit solchen aus L7En-2 Tieren (B) und Wildtyp Mäusen (C) mit entsprechenden aus En-2 defizienten Mäusen (D) im Hinblick auf Unterschiede im Tetraspanin-5 Expressionsmuster: Übersichtsaufnahme (A, B, C, D): die Balkenlänge entspricht 500 μm . Die Pfeile zeigen auf Purkinjezellen. Es zeigen sich keine Unterschiede in der Tetraspanin-5 mRNA Expression bei Überexpression und En-2 Deletion.

4.4 Die Tetraspanin-5 mRNA Expression in Mausmutanten mit einem cerebellären Phänotyp

Eine wichtige Erkenntnis aus den bisher beschriebenen Experimenten war, dass die Tetraspanin-5 Expression mit der Reifung der Purkinjezellen einher geht. Diese Befunde sollten im Folgenden durch die Analyse weiterer Mausmutanten mit einem cerebellären Phänotyp untermauert werden. Stimmt die Vermutung, dass Tetraspanin-5 an der Purkinjezellreifung beteiligt ist, dann sollte es auch nur in ausgereiften Neuronen exprimiert werden. In reifungsdefizienten Purkinjezellen, wie wir sie in der L7En-2 Maus gefunden haben, sollte die Expression dagegen verringert sein. Als erste Mutante wurde die *weaver* Mutante untersucht.

4.4.1 Die *weaver* Mausmutante

Die *weaver* Mutante zeichnet sich durch ein drastisches Absterben von Purkinje- und infolgedessen auch der Körnerzellen nach der zweiten Postnatalwoche aus (85). Dementsprechend konnte mit immunhistochemischen Färbungen gegen das Purkinjezell-spezifische Markerprotein CalbindinD28K sowohl eine Desorganisation des cerebellären Kortex als auch eine Abnahme der Purkinjezellen zwischen dem Postnataltag 15 und 30 nachgewiesen werden (Abb. 8 und Abb. 10). Viele Purkinjezellen lagen ektop und vereinzelt im Bereich der internen Körnerzellschicht, zum Teil waren sie aber auch bis ins Mark des Kleinhirns versprengt. Die Größe der Cerebella von *weaver* Mäusen waren infolgedessen wesentlich kleiner im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Auffällig waren diese Effekte insbesondere in vermalen Abschnitten des Kleinhirnkortex.

Die Dendritenbäume der Purkinjezellen in der Monolayer waren verkleinert und nicht radial in Richtung Pia ausgerichtet, sondern eher zufällig in ihrer Richtung verteilt. Die Purkinjezellen zeigten aber, soweit erkennbar, primär einen Stammdendriten und mehrfache Aufzweigungen. Die Zellsomata der Purkinjezellen sind bei den *weaver* Tieren kleiner als im Vergleich zum Wildtyp.

Diese Beobachtungen lassen sich sowohl für die homozygoten *weaver* Tiere zum postnatalen Tag P15 als auch zum postnatalen Tag P30 machen. Am Tag P30 sind die Unterschiede zum Wildtyptier bezüglich der Clusterbildung der PC und der Wachstumshemmung der Dendriten noch ausgeprägter.

Verglichen mit der Tetraspanin-5 *in situ* Hybridisierung des Wildtyps zeigten die *weaver* Mäuse grundsätzlich keine Unterschiede in der Tetraspanin-5-Expressionsstärke. Zum Zeitpunkt P15 konnte man in den Frontalschnitten eine starke Tetraspanin-5-Expression in der Purkinjzellschicht beobachten. Gleichzeitig zeigte die interne Körnerzellschicht eine Färbung, allerdings war diese schwächer als die der Purkinjzellschicht. Die externe Körnerzellschicht wies kaum eine Tetraspanin-5-Expression auf. Die fehlende Färbung an Schnittträgern beruht auf Austrocknungseffekten während der Perfusion und/oder *in situ* Hybridisierung und nicht auf Unterschieden in der Tetraspanin-5 Expression (Abb. 9).

Zum Zeitpunkt P30 zeigte sich im Wildtyp und im *weaver* Tier ein ähnliches Expressionsmuster wie zum Zeitpunkt P15. Auch hier gab es zwischen der *weaver* Maus und dem Wildtyp keine Unterschiede in der Tetraspanin-5 Expression (Abb. 11).

In beiden Altersstufen und in beiden Genotypen zeigte der Lobus X sowohl für Purkinjzellen als auch für die interne Körnerzellschicht die stärkste Färbung. Dieses Ergebnis mit einer erhöhten Expression im Lobus X entspricht den bereits beschriebenen Expressionsanalysen.

Allerdings kann man am Tag P30 innerhalb des *weaver* Cerebellums leichte Unterschiede in der Tetraspanin-5-Expression bei Purkinjzellen erkennen, die in Zellclustern liegen und die gleichzeitig verkümmerte Dendritenbäume aufweisen. Sie zeigen im Vergleich zu Purkinjzellen, die in der Purkinjzellschicht angeordnet sind, eine geringere Farbintensität (Abb. 11 B, D).

Die *weaver* Mutation scheint keinen Einfluss auf die Tetraspanin Expression zu haben.

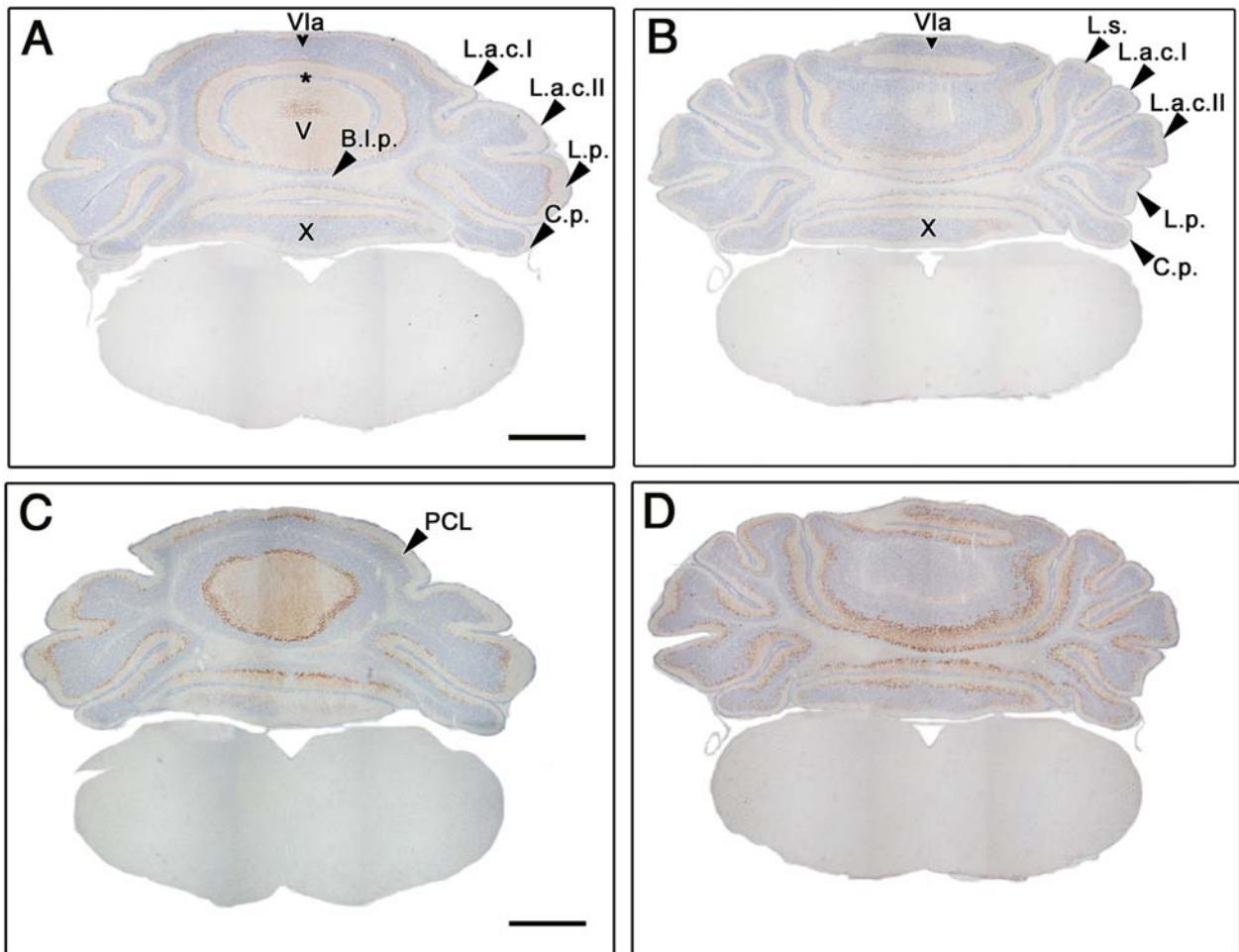


Abb. 8: Vergleich von Frontalschnitten zum Zeitpunkt P15 von Wildtyp Mäusen (A, C) und *weaver* Mäusen (B, D) mittels immunhistochemischer Färbungen durch Calbindin D28K (A, B) und Parvalbumin (C, D) (Darstellung der Purkinjenzellmorphologie): Übersichtsaufnahmen: die Balkenlänge entspricht 500 μm . Beschriftung: L. a. c. I: Lobus ansiforme c I, L. a. c. II: Lobus ansiforme c. II, L. p.: Lobus paramedianus, C. p.: Copula pyramis, B. l. p.: Basis lobus posterior, L.s.: Lobus simplex, *: Fissura prima, V: Lb. V, V1a: Lb. V1a, X: Lb. X

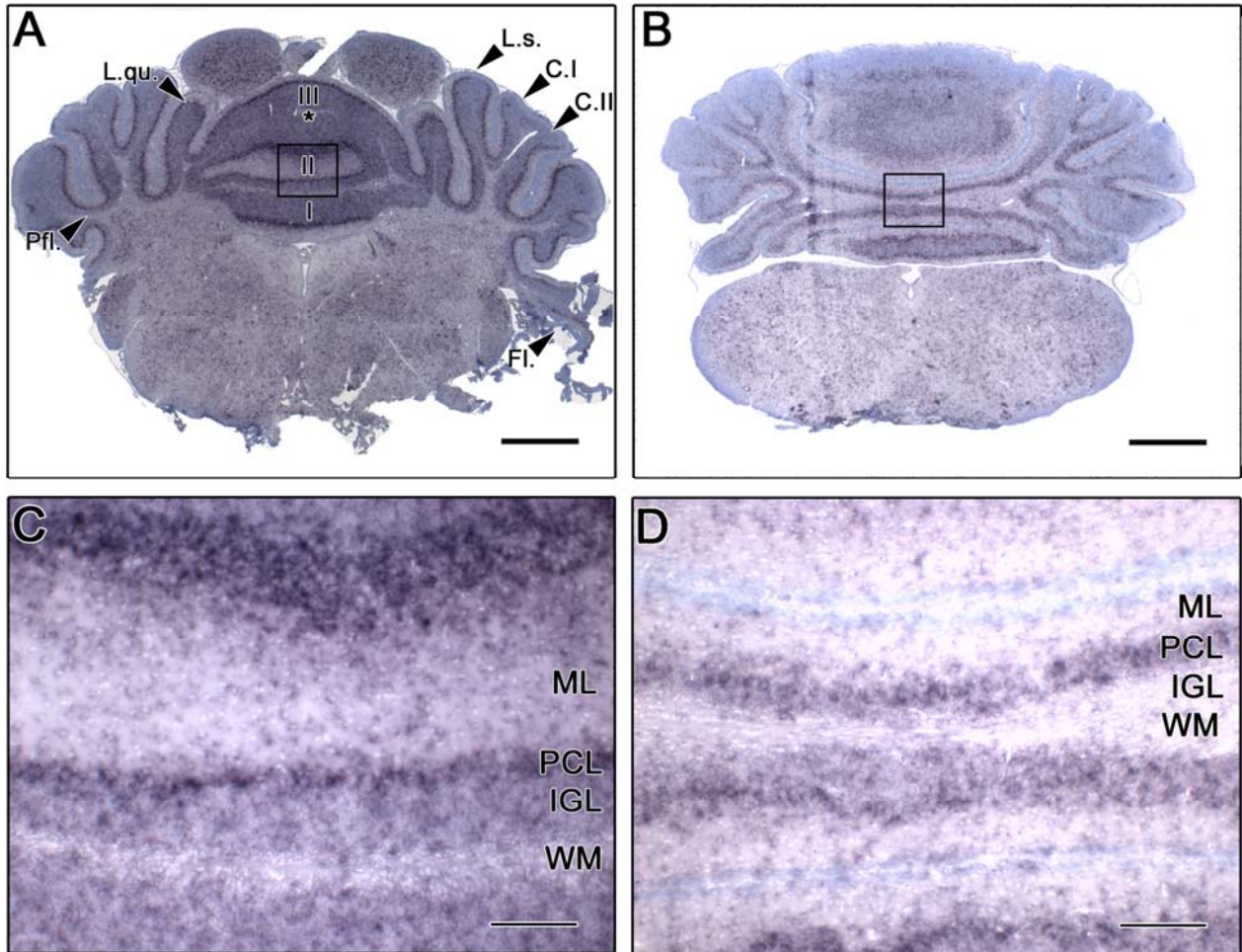


Abb. 9: Vergleich von Frontalschnitten zum Zeitpunkt P15 von Wildtyp Maus (A, C) und *weaver* Maus (B, D) im Hinblick auf Unterschiede in der Tetraspanin-5 Expression: Es bestehen keine Unterschiede in der Tetraspanin-5 Expression. Übersichtsaufnahmen (A, B): die Balkenlänge entspricht 500 µm. Detailaufnahmen aus den gekennzeichneten Bereichen aus Lb II. (C, D): die Balkenlänge entspricht 50 µm. Beschriftung: L. s.: Lobus simplex, C. I: Crus I, C. II: Crus II, Fl: Flocculus, Pfl.: Paraflocculus, *: Fissura praecentralis, L. qu.: Lobus quadrangularis, ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjzellschicht, IGL: innere Körnerzellschicht, WM: weiße Substanz

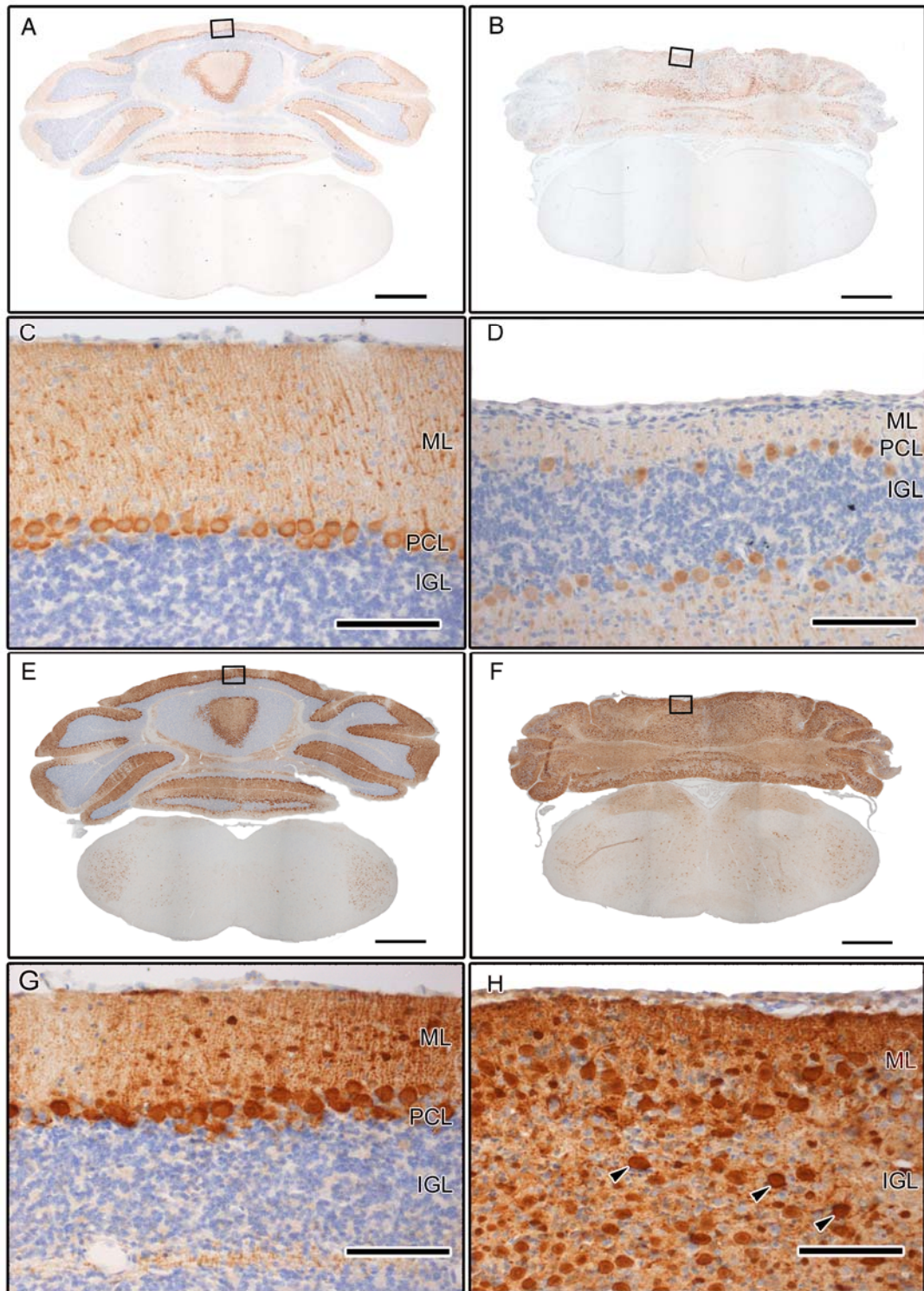


Abb. 10: Vergleich von Frontalschnitten zum Zeitpunkt P30 von Wildtyp Mäusen (A, C, E, G) und *weaver* Mäusen (B, D, F, H) mittels immunhistochemischer Färbungen durch Calbindin D28K (A-D) und Parvalbumin (E-H) (Darstellung der Purkinjenzellmorphologie): Übersichtsaufnahmen: die Balkenlänge entspricht 500 μm . Detailaufnahmen aus den gekennzeichneten Bereichen aus Lb III. (C, D, G, H): die Balkenlänge

entspricht 50 μm . Pfeilspitzen: ektope Purkinjezellen, ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjezellschicht, IGL: innere Körnerzellschicht

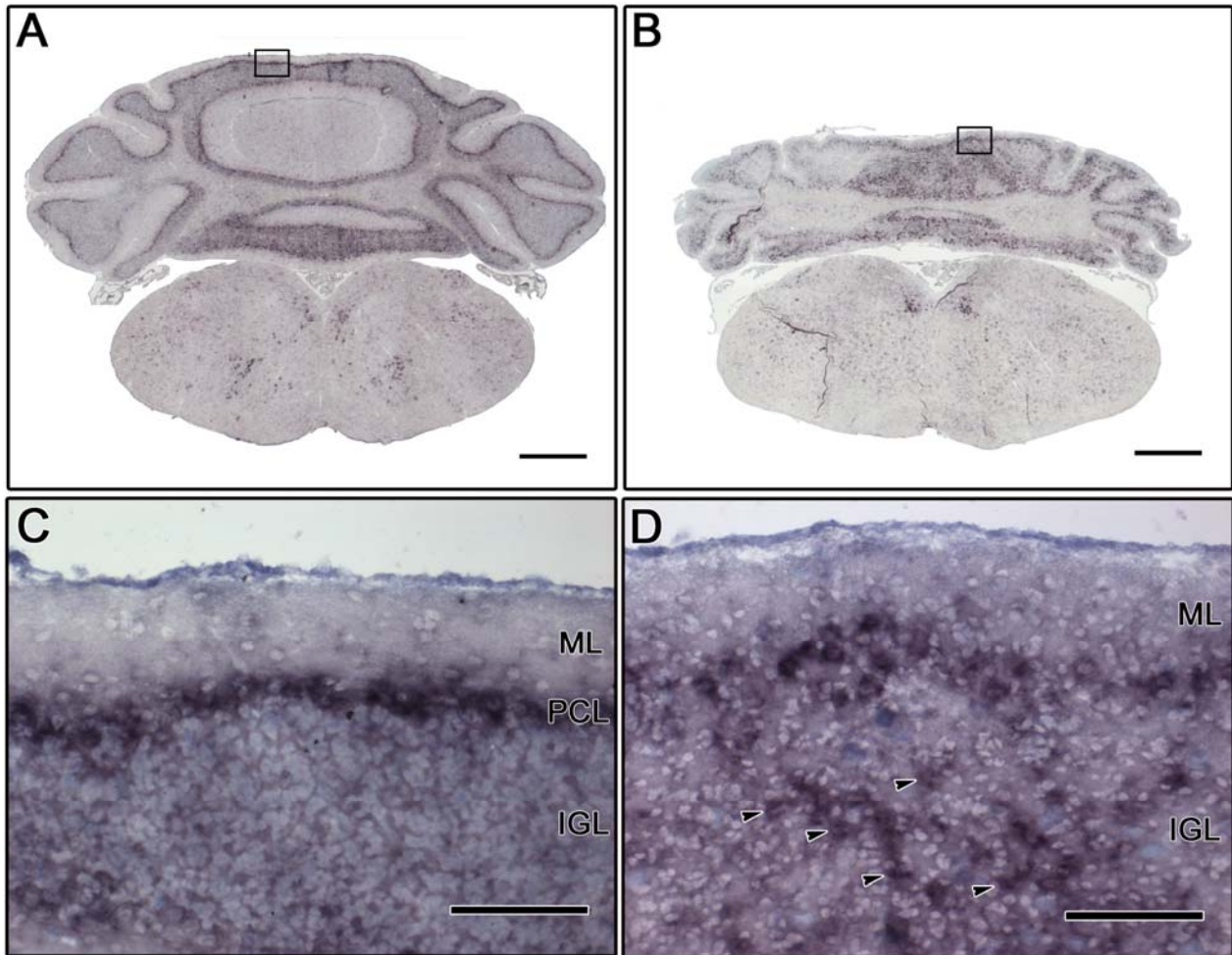


Abb. 11: Vergleich von Frontalschnitten zum Zeitpunkt P30 von Wildtyp Maus (A, C) und *weaver* Maus (B, D) im Hinblick auf Unterschiede in der Tetraspanin-5 Expression: Es bestehen grundsätzlich keine Unterschiede in der Tetraspanin-5 Expression. Dezentere Unterschiede in der Tetraspanin-5 Expression finden sich in ektopen Purkinjezellen in *weaver* Mäusen (Pfeilspitzen in D). Übersichtsaufnahmen (A, B): die Balkenlänge entspricht 500 μm . Detailaufnahmen aus den gekennzeichneten Bereichen aus Lb III. (C, D): die Balkenlänge entspricht 50 μm . Beschriftung: ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjezellschicht, IGL: innere Körnerzellschicht

4.4.2 Die *reeler* Mausmutante

Die *reeler* Mäuse tragen eine Mutation im Reelin Gen, dessen Genprodukt für die korrekte Wanderung der Purkinjezellen zu ihren Zielorten und für die Bildung der Monolayer verantwortlich gemacht wird. Entsprechend der fehlenden Anordnung der Purkinjezellen waren die *reeler* Cerebella wesentlich kleiner. Eine Lobulierung des Kleinhirns in den *reeler* Tieren war nur rudimentär ausgebildet. Die immunhistochemische Färbung der Purkinjezellen mit Calbindin und Parvalbuminantikörpern ergab entsprechend einen desorganisierten Kleinhirnkortex mit subkortikalen Purkinjezellaggregaten im Bereich der tiefen Kerne und einer nur vereinzelt ausgebildeten Monolayer. Die Zellkörper bildeten überwiegend unreif aussehende Dendritenfortsätze mit teilweise mehreren Stammdendriten und kurzen wenig verzweigten Baumstrukturen. Ein vergleichbares Bild zeigte sich in der immunhistochemischen Färbung mit Parvalbumin. Festzuhalten ist allerdings, dass sich die Purkinjezellen mit Parvalbumin anfärben ließen, was für eine gewisse Reifung der Zellen spricht. Kleine Zellsomata, die in der Molekularschicht und vereinzelt in der inneren Körnerzellschicht, aber auch zwischen den ektopen Purkinjezellen zu finden sind, gehören zu den Korb-Sternzellen, die sich wie Purkinjezellen mit Parvalbumin anfärben lassen.

Ähnlich der Parvalbumin Färbung, kann auch die Expression des L7/*pcp*-2 Gens als Marker für die Reifung eines Purkinjezellneurons herangezogen werden (93). L7/*pcp*-2 ist ein Purkinjezell-spezifisches Protein, dessen mRNA ab dem achten Postnataltag in allen Purkinjezellen sowohl im Soma als auch im Dendritenbaum nachweisbar ist. L7/*pcp*-2 wird in den meisten Purkinjezellen der *reeler* Mutante exprimiert, unabhängig von dessen Lage (siehe *in situ* Signal in der Körnerzellschicht und im Bereich der tiefen Kerne in Abb. 13 C, D).

Ähnlich wie L7/*pcp*-2, exprimierten die Purkinjezellen, die einen ausgebildeten, wenn auch verkümmerten Dendritenbaum hatten, auch Tetraspanin-5. Die Tetraspanin-5-Expression war unabhängig von der Lage der Purkinjezellen und ebenfalls unabhängig von Ausrichtung und Komplexität des Dendritenbaums. Im Vergleich zwischen Wildtyp und transgenen Tieren konnte kein Unterschied in der Farbintensität und somit in der Tetraspanin-5-Expression festgestellt werden (Abb 13 E-H).

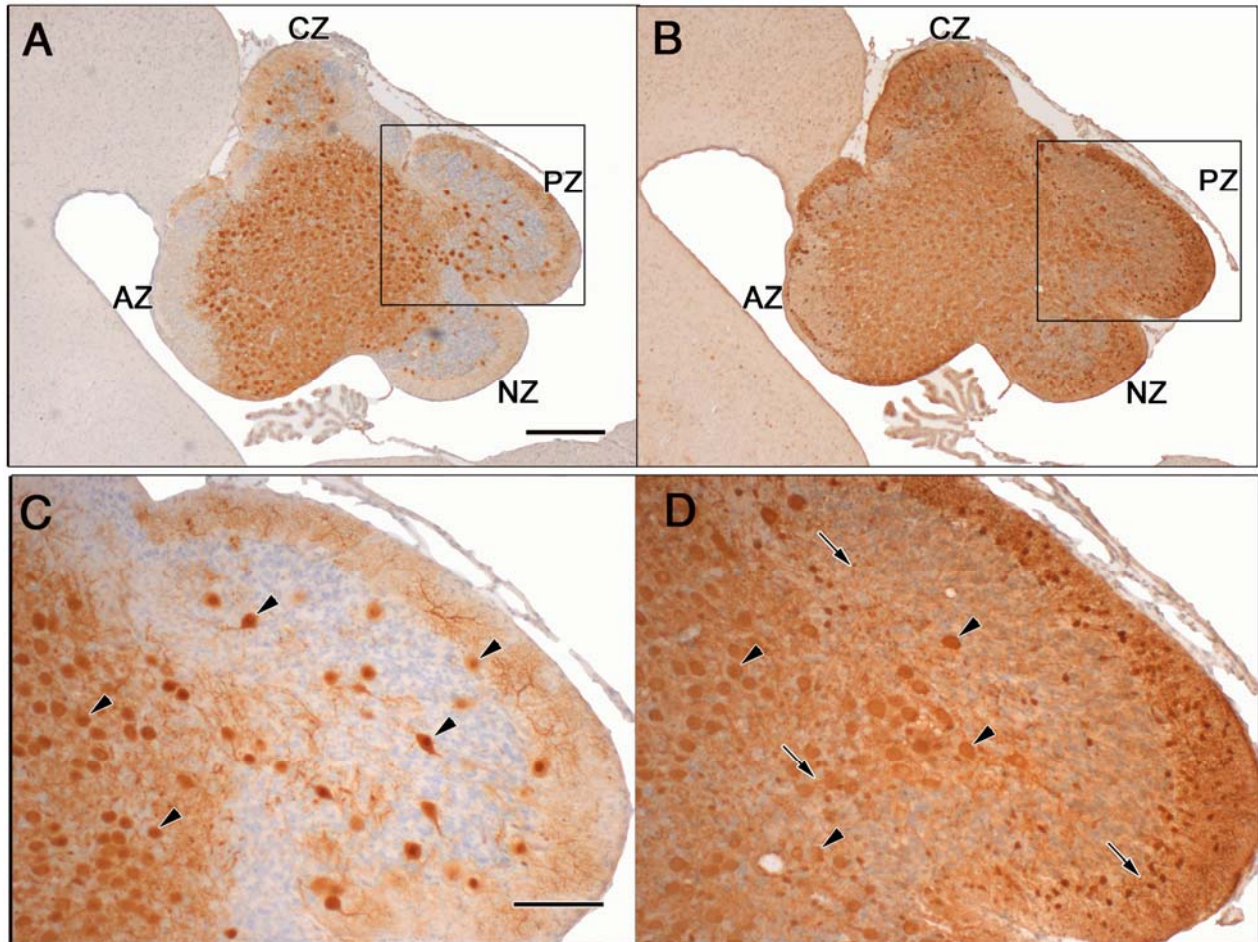


Abb. 12: Darstellung der Anordnung und Morphologie von Purkinjezellen bei *reeler* Mäusen anhand von Sagittalschnitten zum Zeitpunkt P15. Färbung mit Anti-Calbindin D28K (A, C), Färbung mit Anti-Parvalbumin (B, D): Übersichtsaufnahmen (A, C): die Balkenlänge entspricht 250 μm . Detailaufnahmen aus den gekennzeichneten Bereichen der PZ (C, D): die Balkenlänge entspricht 50 μm . Beschriftung: AZ: anterior zone, CZ: central zone, PZ: posterior zone, NZ: nodular zone; Pfeilspitzen in C, D: Purkinjezellen, Pfeile in D: Korb- und Sternzellen

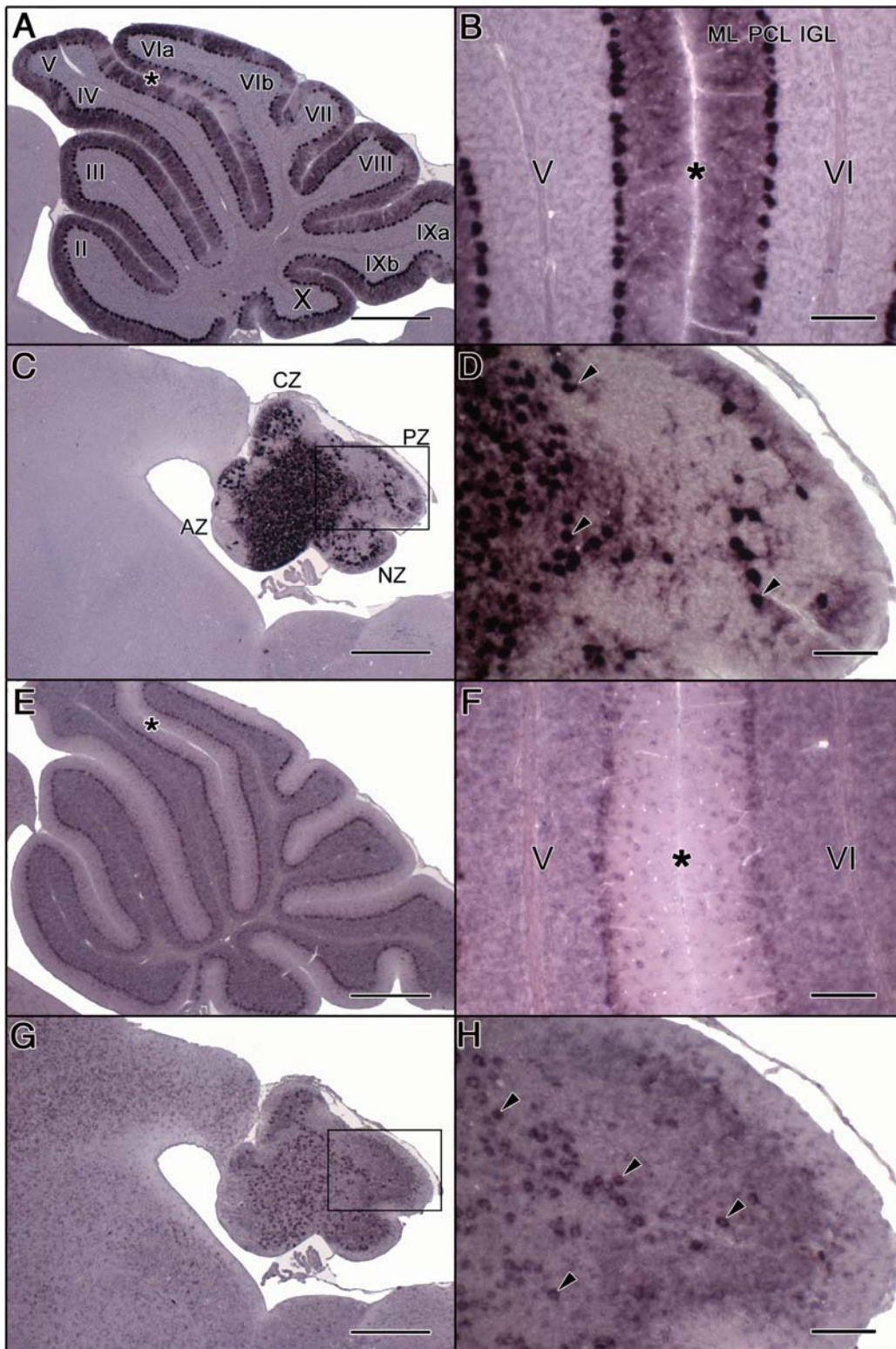


Abb. 13: Vergleich von Sagittalschnitten zum Zeitpunkt P15 von Wildtyp- (A, B, E, F) und *reeler* Mäusen (C, D, G, H) im Hinblick auf Unterschiede in der L7/pcp-2 und Tetraspanin-5 Expression: in der *reeler* Mutante wird in allen Purkinjezellen L7/pcp-2 exprimiert. Es lassen sich keine Unterschiede in der Tetraspanin-5-Expression feststellen. Übersichtsaufnahmen (A, C, E, G): die Balkenlänge entspricht 500 μm . Detailaufnahmen aus den

gekennzeichneten Bereichen der PZ (B, D, F, H): die Balkenlänge entspricht 50 µm. Beschriftung: *: Fissura prima, Pfeilspitzen in D, H: Purkinjezellen

4.4.3 Die *staggerer* Mausmutante

Die *staggerer* Maus trägt eine autosomal-rezessive Mutation in einem Gen, das für den nukleären Hormonrezeptor ROR α kodiert. In 16 Tage alten Mäusen vom *staggerer* Genotyp konnte eine lückenlose Immunreaktivität mit Calbindin und Parvalbumin in der Purkinjezellschicht gefunden werden. Die Purkinjezellen der *staggerer* Mutanten waren deutlich kleiner im Vergleich zu ihren Wildtypomologen und in ihrer Anzahl offensichtlich reduziert. Dendritenbäume waren zwar vorhanden, deren Differenzierung aber rudimentär ausgeprägt. Normalerweise weisen Purkinjezellen nur einen Stammdendriten auf, in der *staggerer* Mutante besaßen sie mehrere Stammdendriten (Abb. 14 und 15).

Ähnlich der *reeler* Mutante konnte auch bei der *staggerer* Mutante in den Purkinjezellen eine deutliche immunhistochemische Färbung mit Parvalbumin gezeigt werden. Kleinere Zellen, die sich in der Molekularschicht, aber auch zwischen den ektopen PCs nachweisen lassen, sind aufgrund ihrer Größe und Differenzierung als Korb/Sternzellen zu identifizieren (Abb. 15).

In der *in situ* Hybridisierung mit Tetraspanin-5 der *staggerer* Maus zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp, dass die Purkinjezellen kein Tetraspanin-5 im Kleinhirn exprimierten. Dieses Fehlen der Expression muss auf eine echte Regulation zurückzuführen sein, da andere Zelltypen, sowohl innerhalb des Kleinhirns als auch außerhalb (Hippocampusformation) eine deutliches *in situ* Signal in der Tetraspanin-5 ISH erkennen ließen (Abb. 16).

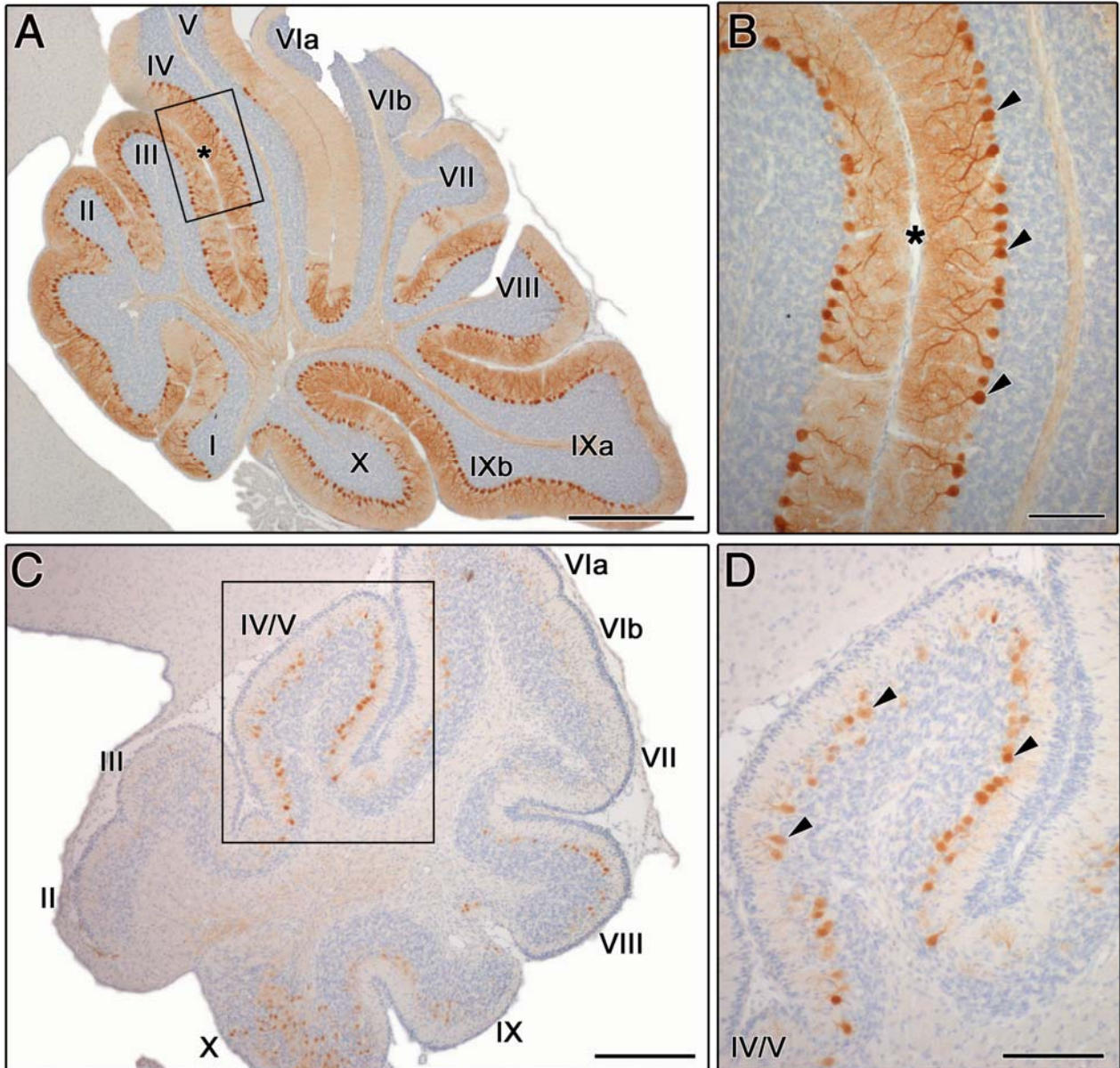


Abb. 14: Darstellung der Anordnung und Morphologie von Purkinjezellen bei *staggerer* Mäusen anhand von Sagittalschnitten zum Zeitpunkt P16. Färbung mit Anti-Calbindin D28K: Übersichtsaufnahme A: die Balkenlänge entspricht 500 µm. Übersichtsaufnahmen C: die Balkenlänge entspricht 100 µm. Detailaufnahmen B, D: die Balkenlänge entspricht 50 µm. Pfeilspitzen in B, D: Purkinjezellen, *: Fissura prima

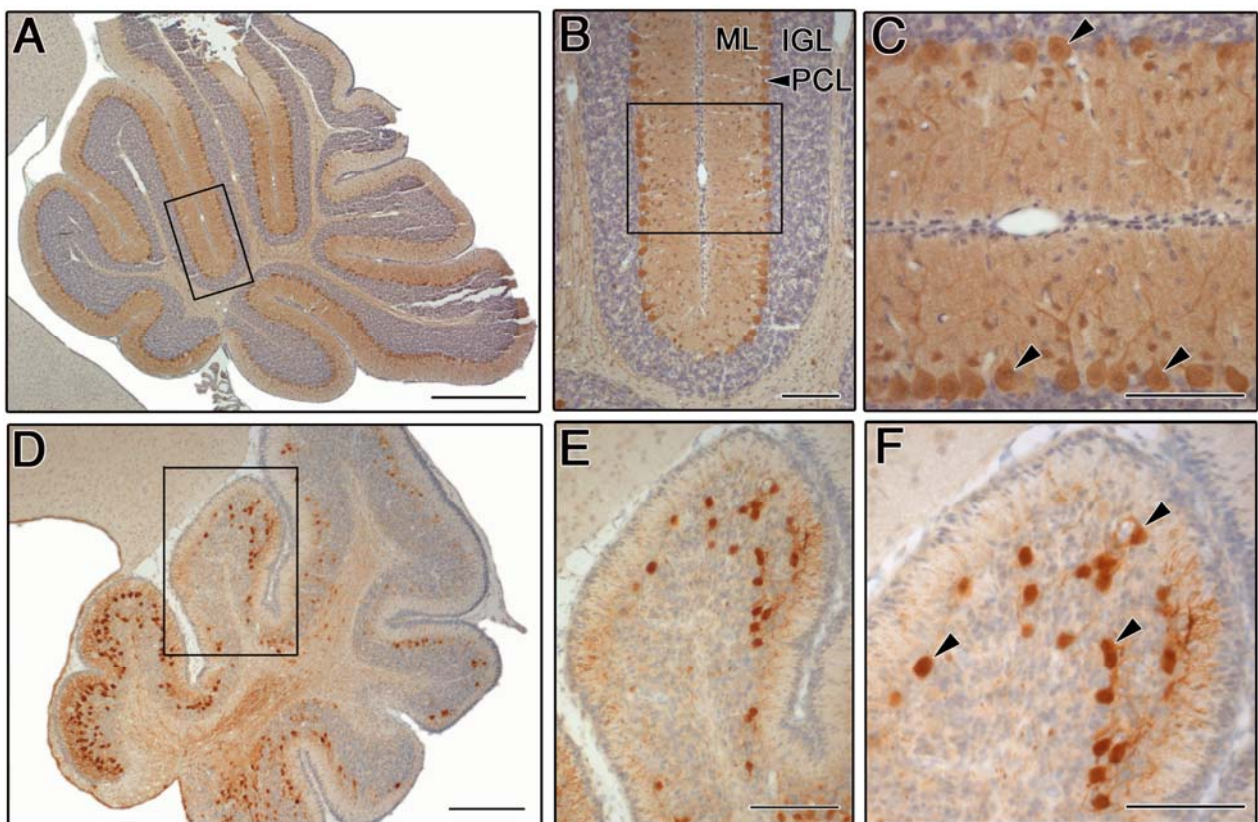


Abb. 15: Darstellung der Anordnung und Morphologie von Purkinjezellen bei *staggerer* Mäusen anhand von Sagittalschnitten zum Zeitpunkt P16. Färbung mit Anti-Parvalbumin: Übersichtsaufnahmen A: die Balkenlänge entspricht 500 μm . Detailaufnahmen aus den gekennzeichneten Bereichen B, C: die Balkenlänge entspricht 50 μm . Übersichtsaufnahme D: die Balkenlänge entspricht 100 μm . Detailaufnahmen E, F: die Balkenlänge entspricht 50 μm . Pfeilspitzen in B, C und F: Purkinjezellen

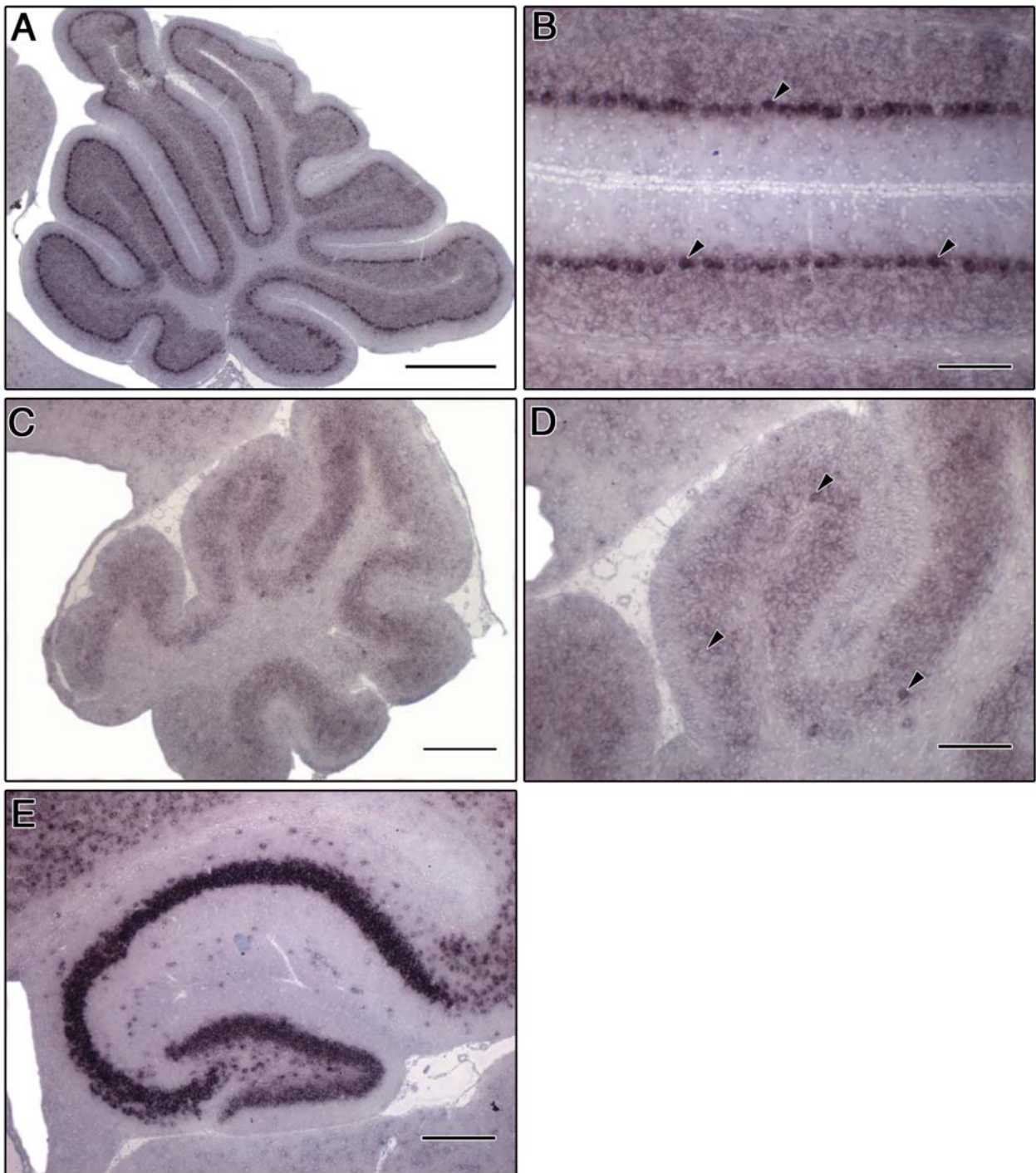


Abb. 16: Vergleich von Sagittalschnitten zum Zeitpunkt P16 von Wildtyp- (A, B) und *staggerer* Mäusen (C, D) im Hinblick auf Unterschiede in der Tetraspanin-5 Expression im Kleinhirn. Die Detailaufnahme E zeigt die Tetraspanin-5 Expression im Hippocampus einer *staggerer* Maus. Die *staggerer* Mäuse zeigen eine verminderte Tetraspanin-5-Expression in den Kleinhirnen, im Hippocampus (E) hingegen ist die Tetraspanin-5-Expression unverändert. Übersichtsaufnahme A: die Balkenlänge entspricht 500 μm . Übersichtsaufnahmen C, E: die Balkenlänge entspricht 100 μm . Detailaufnahmen B, D: die Balkenlänge entspricht 50 μm .

4.5 Nachweis von Peptidbindungsstellen des Peptids Tetraspanin-5-1 an Vibratomschnitten am Postnataltag P9 - Peptid-Bindungsassay

In dieser Versuchsserie wurde die große extrazelluläre Schleife (LEL) von Tetraspanin-5 für uns synthetisiert und über die zwei endständigen Aminosäuren Cystein cyclisiert. Zusätzlich wurde das sogenannte Peptid Tetraspanin-5-1 über eine der endständigen Aminosäuren Cystein an Biotin gekoppelt.

Über die Familie der Tetraspanine weiß man, dass sie extrazellulär mit einer alpha-3-Integrinuntereinheit kommunizieren und so eine Signalweiterleitung ins Zellinnere bewirken. Das Peptid Tetraspanin-5-1 wurde zu Mikotomschnitten gegeben, um mit diesem Experiment eine Aussage über die Lokalisation von spezifischen Bindungspartnern von Tetraspanin-5 machen zu können.

Hierzu habe ich das Peptid in verschiedenen Konzentrationen (1:200, 1:500, 1:1000) eingesetzt. Über den Biotin-Rest konnte das gebundene Peptid färberisch mit Hilfe des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes nachgewiesen werden. Gleichzeitig erfolgte ein Versuchsdurchlauf mit der Zugabe von Dithiothreitol (DTT), welches die Tertiärstruktur von Peptiden und Proteinen zerstört. In unserem Fall sollte es die Tertiärstruktur des Peptid Tetraspanin-5-1 aufheben. Fraglich war, ob das Peptid auch in der linearisierten Form an seine Rezeptoren binden kann oder ob dies nur bei erhaltener Tertiärstruktur möglich ist.

In der Abbildung 17 sieht man die Präparate, die in unterschiedlichen Verdünnungen mit dem Peptid (1:200, 1:500, 1:1000) und ohne Peptid inkubiert wurden. Gleichzeitig wurde eine Negativkontrolle durchgeführt und zu einem Präparat kein Peptid gegeben. Die Präparate mit der Verdünnung des Peptids 1:200 und 1:500 zeigten die stärkste Färbung und unterschieden sich kaum.

Die Stärke des Farbsignal der Präparate mit dem Peptid in der Verdünnung 1:1000 war kaum schwächer als die des Präparats mit der Peptid Verdünnung 1:500.

Das stärkste Signal fand sich auf zellulärer Ebene bei den Purkinjezellen. Die innere Körnerzellschicht zeigte ebenfalls eine recht starke Färbung. Die äußere Körnerzellschicht hingegen war nur schwach gefärbt. Die Färbung entsprach dem uns bereits bekannten Tetraspanin-5 Nachweis auf mRNA-Ebene.

Die Abbildung 18 zeigte den Vergleich von der Zugabe des Peptids in einer Verdünnung von 1:200 mit und ohne DTT-Inkubation. Das Präparat nach Inkubation mit DTT zeigte keine

Färbung mehr. Daraus konnten wir schließen, dass die Färbung durch das Peptid durch die Behandlung mit DTT aufgehoben werden konnte. Die Ringform des Peptids führte auf zellulärer Ebene zur Bindung. Das linearisierte Peptid hingegen konnte nicht mehr mit seinen Bindungspartner kommunizieren.

Die Abbildung 19 zeigt einen Ausschnitt der Kleinhirnrinde in 63- und 100facher Vergrößerung. Hier erkennt man, dass nicht nur extrazellulär eine Bindung des Peptids vorhanden war. Auch in der Zelle konnte man eine Färbung nachweisen. Allerdings kann man keine Aussage über die Spezifität der Bindung machen und beurteilen, an welche zellulären Kompartimente das Peptid bindet.

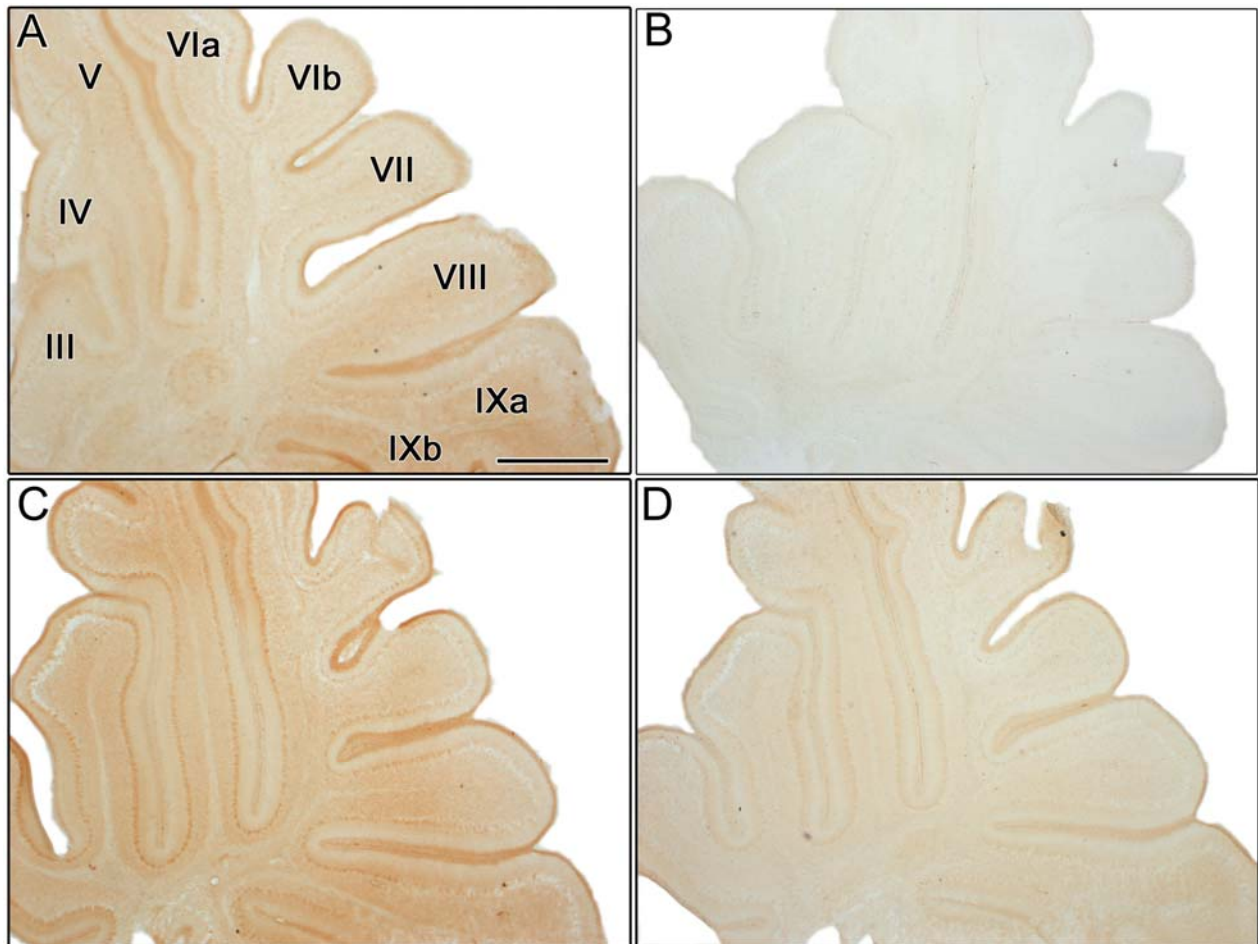


Abb. 17 Nachweis von Peptidbindungsstellen an Sagittalschnitten zum Zeitpunkt P9: Peptid in Verdünnung 1:200 (A), kein Peptid (B), Peptid in Verdünnung 1:500 (C), Peptid in Verdünnung 1:1000(D). Die Balkenlänge entspricht 500 μm .

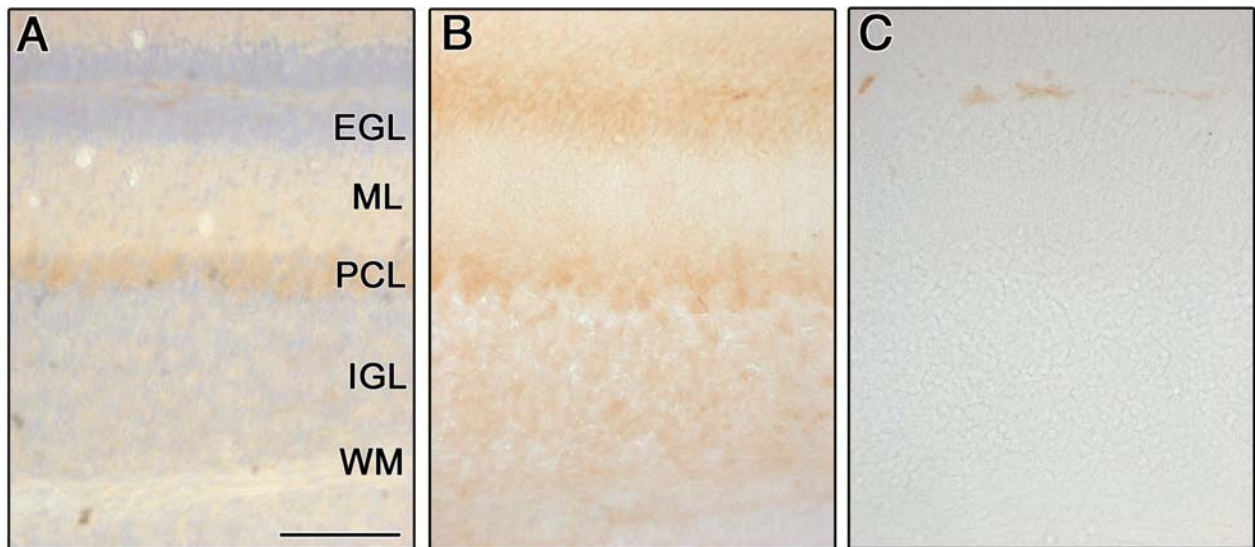


Abb. 18 Nachweis von Peptidbindungsstellen an Sagittalschnitten zum Zeitpunkt P9 mit und ohne DTT-Inkubation: Peptid in Verdünnung 1:200 ohne DTT (A,B). Das Präparat nach der Inkubation mit DDT zeigt keine Färbung mehr (C). Die Ringform des Peptids führt auf zellulärer Ebene zur Bindung (A, B), das linearisierte Peptid kann nicht mehr mit seinen Bindungspartnern kommunizieren (C). Die Balkenlänge entspricht 50 μm .

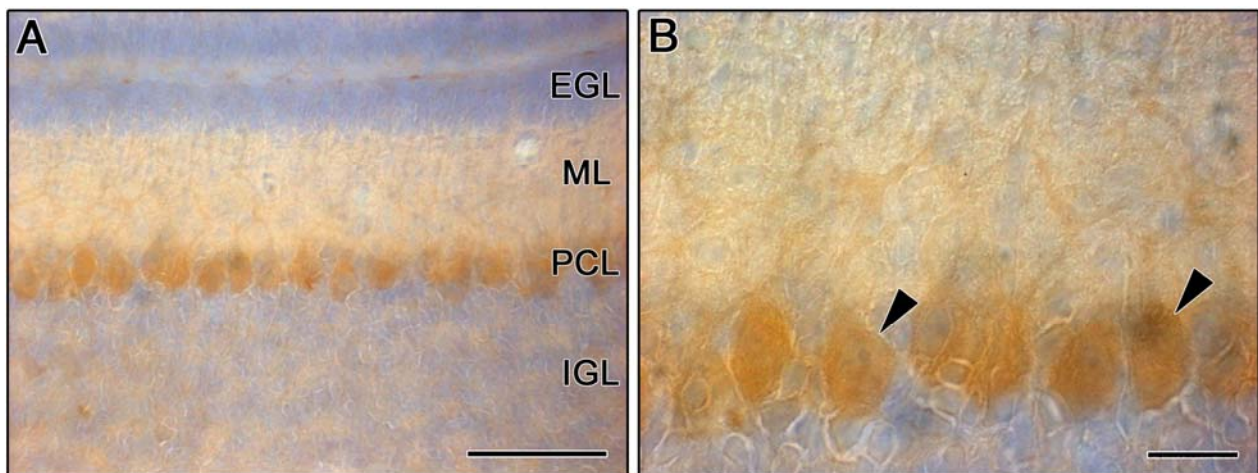


Abb. 19 Nachweis von subzellulären Peptidbindungsstellen zum Zeitpunkt P9: eine Peptidbindung findet sich nicht nur extrazellulär, sondern auch zellulär. Es lässt sich keine Aussage über die Spezifität der Bindung treffen. Pfeilspitzen: Somata der Purkinjezellen. Die Balkenlänge in Bild A beträgt 50 μm , die Balkenlänge in Bild B beträgt 20 μm .

4.6 Nachweis des polyklonalen Anti-Tetraspanin-5 Antiserums mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

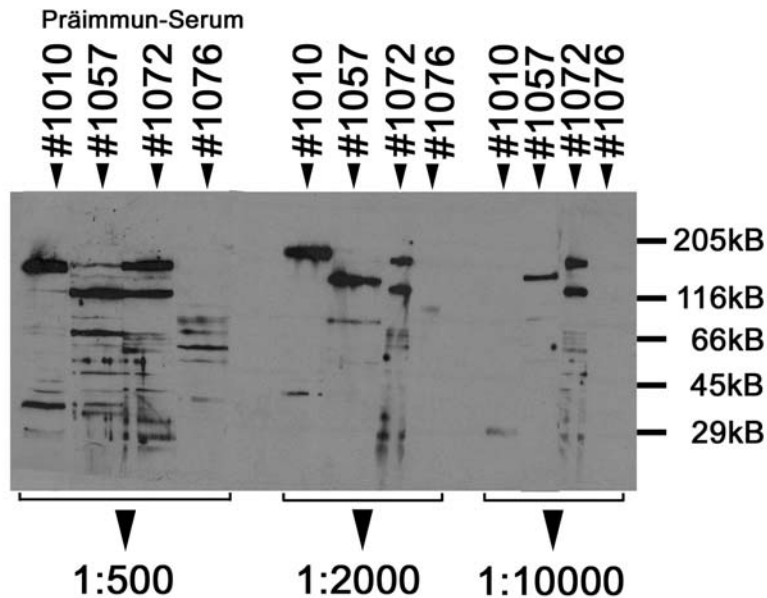


Abb.20: Western Blot mit Präimmunsereum der Kaninchen #1010, #1057, #1072, #1076; Serumverdünnung 1:10000 in 1 %BSA/PBST, Kaninchen #1057 und #1072 zeigten im Western Blot bereits noch vor der ersten Immunisierung im Präimmunsereum zu viele unspezifische Banden, so dass sie erst gar nicht immunisiert werden konnten. Belichtungszeit 1 Minute.

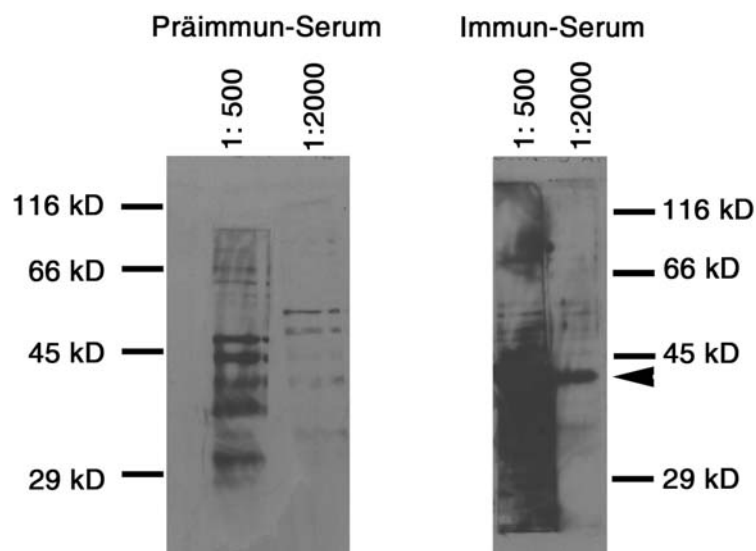


Abb.21: Western Blot mit Präimmun-Serum und Immunsereum des Kaninchen #1076 nach zweimaliger Immunisierung. Blockade mit 5 % Milchpulver-Lösung. Verdünnung des Serums 1:500, 1:2000 und 1: 10 000 in 1 % BSA in PBST. Im Immunsereum zeigt sich bei 45 kD eine neue Bande, die im Präimmunsereum nicht vorhanden war. Belichtungszeit 1 Minute.

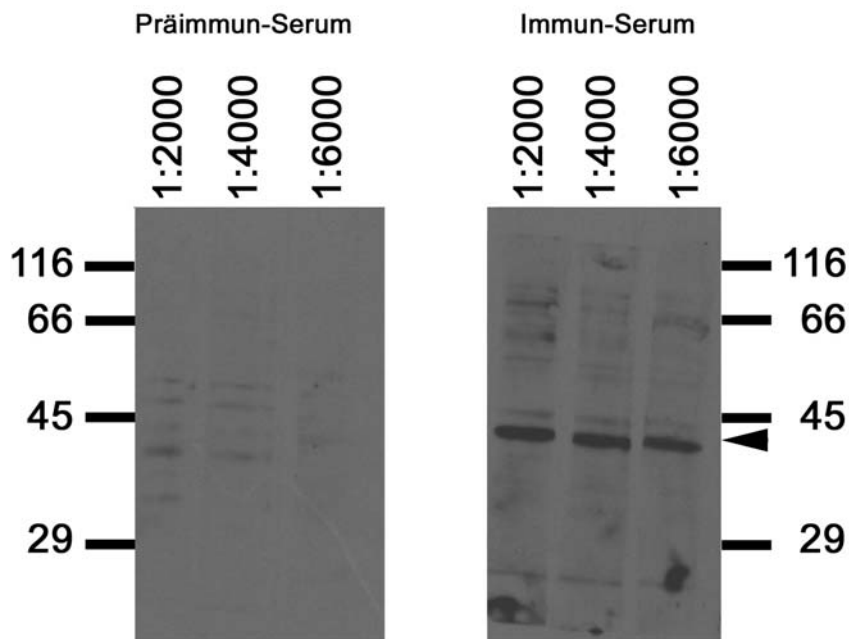


Abb.22: Western Blot mit Präimmun-Serum und Immuns serum des Kaninchen #1076 nach zweimaliger Immunisierung. Blockade mit 5 % Milchpulver-Lösung. Verdünnung des Serums 1:2000, 1:4000 und 1:6000 in 5 % Milchpulver-Lösung. 2. AK (goat α rabbit) Verdünnung in 1:5000 in 1% BSA/PBST. Belichtungszeit 1 Minute.

4.7 Etablierung der immunhistochemischen Färbung an Paraffinschnitten

Antikörper besitzen je nach Typ und Erkennungssequenz unterschiedliche Eigenschaften, die die Nutzbarkeit in immunhistochemischen und molekularbiologischen Analysen bestimmen. Zudem unterscheidet sich jede Antikörperpräparation in ihrem Gehalt an spezifischem Antikörper und damit in der Verdünnung, die für Experimente optimal ist. Insbesondere bei Verwendung von polyklonalen Seren ist zudem die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen. Deswegen müssen vor den eigentlichen Experimenten die optimalen Bedingungen für jeden Antikörper und für jede Antikörperpräparation ermittelt werden.

Erster Schritt in der Etablierung einer immunhistochemischen Färbung ist die Wahl eines geeigneten Fixans. Routinemäßig werden hierfür vernetzende, präzipitierende oder Kombinationen aus beiden Agenzien eingesetzt. In dieser Arbeit wurde die Bouin'sche Fixierlösung und ein rein vernetzenden Agens, das Formalin eingesetzt. Die Nutzung von Paraffinschnitten begründet sich in der sehr guten morphologischen Erhaltung des Gewebes und

damit in einer detaillierteren Analysemöglichkeit. Sowohl an Formalin- als auch an Bouin-fixierten Schnitten zeigte sich eine schichtspezifische Färbung. Allerdings zeigten die Färbungen an den Formalin-fixierten Schnitten eine bessere Differenzierung in Präimmun-Serum und Immuns serum.

Das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung hängt stark von der Qualität und Konzentration der Antikörperlösung ab. Es ist wichtig eine Antikörperkonzentration zu wählen, mit der zum einen ein ausreichendes Signal gewährleistet ist, dabei sollte aber das Signal im Vergleich zum Hintergrundverhältnis möglichst hoch ausfallen. Zusätzlich sollte bei einer ausreichend starken Farbintensität eine Differenzierung des unterschiedlichen Proteingehalts anhand der Farbeintensität möglich sein. In unserem Falle wurde das Präimmun-Serum und das Immun-Serum in Verdünnungen 1:200, 1:500 und 1:1000 eingesetzt. Das stärkste Signal erhielt man nach Inkubation des Antikörpers in einer Konzentration von 1:200 (siehe Tabelle 3 und 4).

Jede Herstellung eines Antikörpers ist mit der Überprüfung seiner Qualität und Spezifität verbunden, d.h. der spezifischen Bindung des Antikörpers an das gewünschte Antigen. Eine erste Überprüfung der Qualität einer Antikörperherstellung ist der Vergleich des Serums vor der Immunisierung des Kaninchens mit dem Serum des Kaninchens nach der Immunisierung mit dem spezifischen Antigen mit der immunhistochemischen Färbung. Dadurch kann ermittelt werden, ob überhaupt ein Antikörper auf Grund der Immunisierung produziert worden ist.

Nach der Färbung mit dem Präimmun-Serum zeigte sich eine ubiquitäre Färbung, sowohl in den zellulären als auch in den Faserregionen des Kleinhirnkortex (Abb. 23 A-C). Die immunhistochemische Färbung mit dem Immun-Serum zeigte eine deutliche Zunahme der Farbeintensität, allerdings konnte man noch keine zellspezifische Färbung erkennen (Abb. 23 D-F). Als nächster Schritt wäre hier die Affinitätsaufreinigung mittels Affinitäts säule erforderlich.

Tabelle 3: Fixans Formalin

Präimmun-/ Immun Serum	Kochen mit 2x SSC	AK- Verdünnung	EGL	ML&PCL	IGL	WM
Immun	-	1: 200	+	++	++	++
Präimmun	-	1:200	+/-	+	+/-	+/-
Immun	-	1:500	+	+/-	-	+
Präimmun	-	1:500	-	-	-	-
Immun	+	1:200	+++	+++	+++	+++
Präimmun	+	1:200	++	+	+	+
Immun	+	1:1000	+/-	+	+	+
Präimmun	+	1:1000	-	-	-	-

EGL: externe Körnerzellschicht; ML: Molekularschicht; PCL: Purkinjzellschicht; IGL: interne Körnerzellschicht, WM: Corpus medullare

+++ = am stärksten gefärbt, ++ = stark gefärbt, + = gefärbt, +/- = kaum gefärbt, - = nicht gefärbt

Tabelle 3: Fixans Bouin

Präimmun-/ Immun Serum	Kochen mit 2x SSC	AK- Verdünnung	EGL	ML&PCL	IGL	WM
Immun	-	1: 200	+/-	+	+	++
Präimmun	-	1:200	-	+	+	+
Immun	-	1:500	+	+/-	-	+
Präimmun	-	1:500	-	+/-	+/-	+
Immun	+	1:200	+++	+++	+++	+++
Präimmun	+	1:200	+/-	+	+	++
Immun	+	1:1000	+/-	+	+	++
Präimmun	+	1:1000	-	-	-	+/-

EGL: externe Körnerzellschicht; ML: Molekularschicht; PCL: Purkinjzellschicht; IGL: interne Körnerzellschicht, WM: Corpus medullare

+++ = am stärksten gefärbt, ++ = stark gefärbt, + = gefärbt, +/- = kaum gefärbt, - = nicht gefärbt

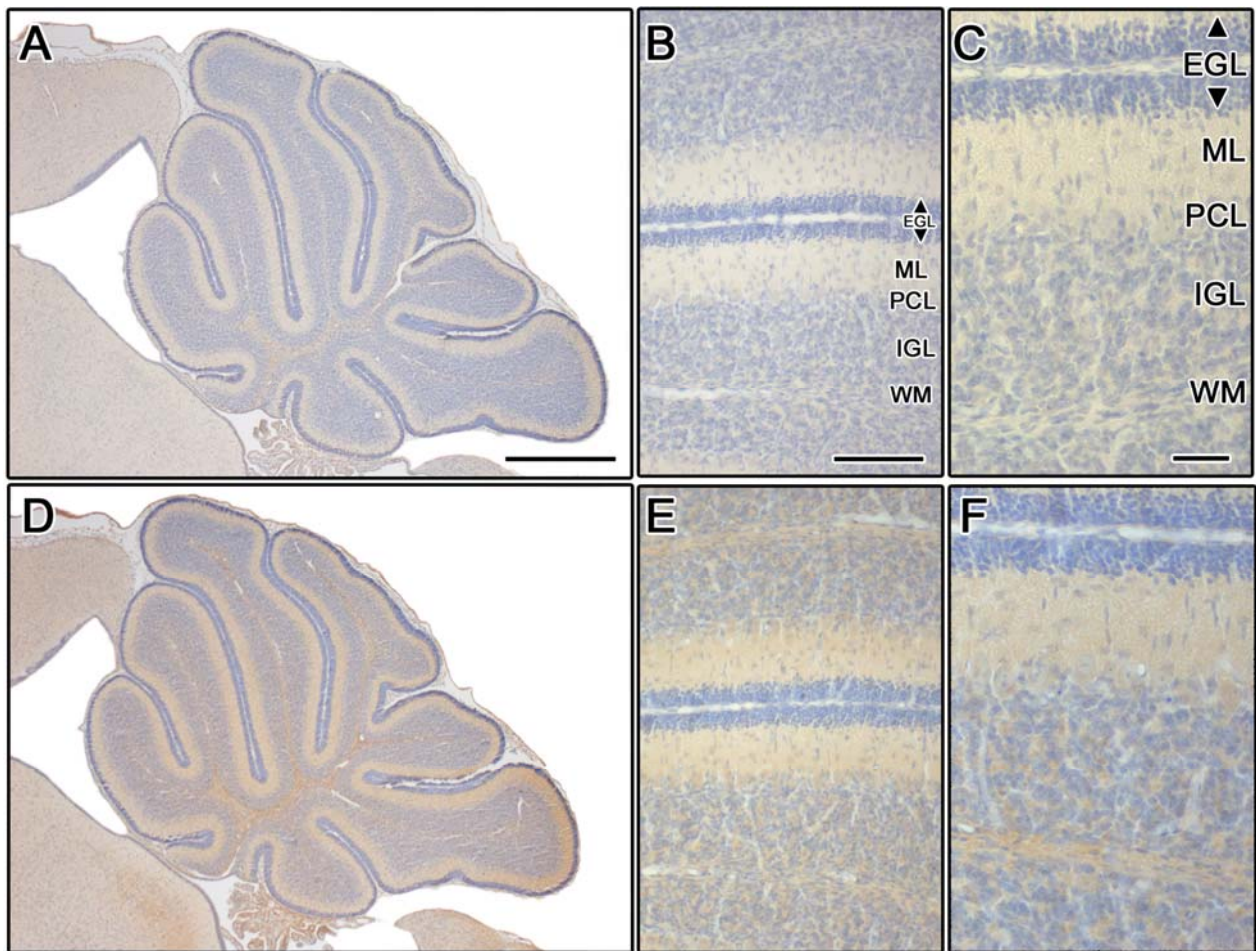


Abb. 23: Vergleich von immunhistochemischen Färbungen mit Präimmun-Serum (A-C) und Immun-Serum (D-F): Übersichtsaufnahme (A, D): die Balkenlänge entspricht 500 μm , Detailaufnahmen (B, E): die Balkenlänge entspricht 100 μm , Detailaufnahmen (C, F): die Balkenlänge entspricht 50 μm . Die Färbung mit dem Präimmun-Serum zeigt eine ubiquitäre Färbung. Die Färbung mit dem Immun-Serum zeigt eine Zunahme der Farbintensität, aber keine zellspezifische Färbung. ML: Molekularschicht, PCL: Purkinjezellschicht, GCL: Körnerzellschicht, WM: weiße Substanz

5. Diskussion

Tetraspanin-5 ist ein membranständiges Signalmolekül, dessen Organ-spezifische Expression bereits beschrieben wurde (30), von dem aber eine exakte Zelltyp-spezifische Expression in ausgewählten Organen noch fehlte. Die Funktion von Tetraspanin-5 während der Entwicklung des zentralen Nervensystems ist noch nicht bekannt – über sie kann bislang nur anhand des Wissens über einzelne der etwa 30 weiteren Mitglieder der Tetraspaninfamilie spekuliert werden. Die wesentliche Fragestellung dieser Arbeit war es, mit Hilfe von Expressionsuntersuchungen am Kleinhirn der Maus Hinweise auf die Tetraspanin-5 Funktion während der Entwicklung des ZNS zu erhalten. Dazu wurden Gehirne verschiedener Entwicklungsstadien von Wildtyptieren und unterschiedlichen transgenen Mausmutanten mit einem cerebellären Phänotyp untersucht.

Als erstes Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit zeigte der Vergleich von Wildtyp und Mutanten mit veränderter *Engrailed-2* Expression, dass eine vermehrte Expression von Tetraspanin-5 mit der zunehmenden Reifung von Neuronen einhergeht. Weiterhin konnte hier gezeigt werden, dass im Vergleich zur unveränderten Expression in *reeler* und *weaver* Mutanten eine verminderte Expression des Tetraspanin-5 in *staggerer* Mutanten vorliegt. Dies deutet darauf hin, dass Tetraspanin-5 an der Ausbildung und Reifung von Dornfortsätzen beteiligt ist.

5.1 Die Tetraspanin-5 Expression in Mausmutanten mit veränderter *Engrailed-2* Expression.

Vorangegangene Arbeiten von Herrn Dr. Jünger haben gezeigt, dass die Stärke der Tetraspanin-5 Expression mit der Reifung von Neuronen im Kleinhirn zunimmt. Jünger beschreibt in allen Neuronen des frühpostnatalen Kleinhirns eine schwache, gerade an der Nachweisgrenze liegende Tetraspanin-5 Expression. Während der zweiten Postnatalwoche steigt die Expression dann in allen postmitotischen Neuronen massiv an, so dass spekuliert wurde, dass die Tetraspanin-5 Expression mit der Reifung von Neuronen positiv korreliert. Dies gilt sowohl für Purkinjezellen als auch für die Körnerzellen des Kleinhirns. Unterstützung fand diese Hypothese durch die Untersuchung einer *Engrailed-2* Überexpressionsmutante, in der die Purkinjezellen aufgrund der *Engrailed-2* Überexpression verzögert reifen, und in denen im Vergleich zum Wildtyp eine

erniedrigte Tetraspanin-5 Expression gefunden werden konnte. Dieses Ergebnis konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit für Kleinhirngewebe aus der zweiten Postnatalwoche bestätigt werden. Es zeigte sich weiterhin, dass in Purkinjezellen von adulten Wildtypmäusen und denen der Überexpressionsmutante kaum noch ein Unterschied in der Tetraspanin-5 Expression erkennbar ist. Dieses Ergebnis ist kein Widerspruch zur unterschiedlichen Expression während der frühen postnatalen Entwicklung – Jankowski et al. zeigten, dass die Dendritenmorphologie der Purkinjezellen in adulten Wildtyptieren und adulten Tieren mit *Engrailed-2* Überexpression nur noch geringgradig ausgeprägte Unterschiede zeigt (55).

Die starke Korrelation zwischen neuronaler Reifung und Tetraspanin-5 Expression wirft die Frage auf, ob der Transkriptionsfaktor *Engrailed-2* die Tetraspanin-5 Expression maßgeblich und direkt reguliert, und ob diese Regulation damit kausal mit der Reifung von Neuronen im Kleinhirn assoziiert ist. In unserem Modell würde dies bedeuten, dass *Engrailed-2* die Expression von Tetraspanin-5 unterdrückt bzw. negativ reguliert. Im Wildtyp exprimieren Purkinjezellen bereits zum Zeitpunkt P0 *Engrailed-2* – ein spezifischer knock-out mit Deletion von *Engrailed-2* müsste dann bei der postulierten negativen Regulation des Tetraspanin-5 durch *Engrailed-2* zu einem merklichen Anstieg in der Expression von Tetraspanin-5 führen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an der *Engrailed-2* Deletionsmutante haben aber eindeutig gezeigt, dass es *nicht* zu einer vermehrten Tetraspanin-5 Expression kommt. Vielmehr zeigten sich postnatal keine Unterschiede in der Expression von Tetraspanin-5 im Vergleich zwischen Wildtyp und Deletionsmutante, weder in den Purkinjezellen noch in den Körnerzellen. Zudem zeigten Experimente an Wildtyptieren, dass in den Körnerzellen der inneren Körnerzellschicht des Kleinhirnkortex massiv Tetraspanin-5 exprimiert wird, obwohl zeitgleich eine starke *Engrailed-2* Expression nachgewiesen wurde. Dies bedeutet, dass eine starke Expression von *Engrailed-2* nicht immer mit einer niedrigen Expression von Tetraspanin-5 korreliert und umgekehrt. Eine direkte eindeutige Regulation liegt nicht vor, *Engrailed-2* fungiert also nicht als „Master“-Regulator für die Expression des Tetraspanin-5, sondern es scheint in seiner Funktion auf bisher noch nicht bekannte Kofaktoren angewiesen zu sein.

Dass die Genexpressionsregulation durch En-2 komplex und von vielfältigen Faktoren abhängig sein kann, wurde bereits zuvor in mehreren Modellorganismen untersucht. In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass die DNA-Binderegion für *Engrailed-2* nicht nur von diesem Faktor, sondern von *fushi-tarazu* und anderen Transkriptionsfaktoren in ähnlicher Stärke gebunden wird. Es liegt

also eine regelrechte Konkurrenz um die Bindungsstelle vor, dessen Ergebnis letztendlich die Regulation in cis liegender Gene beeinflusst (24). Wird folglich eine große Menge an *Engrailed-2* exprimiert, sollte *Engrailed-2* mit einer höheren Affinität an DNA-Domänen binden und damit dominant über andere Faktoren wirken. Dies konnte für die Differenzierung von dopaminergen und serotonergen Neuronen im Mittel- und Nachhirn, sowie für die Flügeldefinition in *Drosophila* gezeigt werden (66) (100). Zudem ist die Anzahl der Bindungsstellen entscheidend für die Stärke der Bindung und damit die Effizienz der Repression (24). Die Expressionsstärke von *Engrailed-2* und die Bindungsstellen kooperieren also, um Genexpression zu regulieren. Neben der Regulation der Genexpression und der DNA-Bindungsstellen spielen posttranslationale Modifikationen für die *Engrailed-2* Funktion eine wichtige Rolle. Wird *Engrailed* phosphoryliert, bindet der Transkriptionsfaktor schlechter an die DNA-Bindedomäne und ist damit wenig aktiv (54).

Bindet *Engrailed-2* an die DNA, besitzt es allerdings im Unterschied zu anderen Homeodomain Proteinen die Fähigkeit, aktivierende Transkriptionsfaktoren durch nicht-kompetitive Mechanismen auszuschalten (56). *Engrailed-2* kann mit einer Reihe von weiteren Faktoren interagieren, um die Expression bestimmter Gene zu unterdrücken. In *Drosophila* interagiert es mit *groucho*, *extradenticle* und *homothorax* (60) (111) in Säugetieren ist eine Interaktion mit dem *groucho* Homolog TLE (transducin-like enhancer of split), Pbx-Proteinen und Fox-Transkriptionsfaktoren bekannt (27) (83) (110).

Basierend auf diesen komplexen Funktionsmechanismen darf ein Zusammenhang zwischen der *Engrailed-2* und der Tetraspanin-5 Expression nur zelltyp-spezifisch und entwicklungsabhängig betrachtet werden, was in den hier beschriebenen Versuchen auch so auch der Fall war.

Unabhängig von einer vermuteten komplexen indirekten Regulation des Tetraspanin-5 durch *Engrailed-2* sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit eindeutig dafür, dass die Tetraspanin-5 Expression mit der Differenzierung von Neuronen einhergeht. Diese Korrelation trifft sowohl für Purkinje- als auch für Körnerzellen zu. In der Deletionsmutante zeigen die *Engrailed-2* defizienten Körnerzellen im Vergleich zum Wildtyp keine morphologischen Veränderungen in Bezug auf ihre Differenzierung. Konsistenterweise ist hier eine unverändert starke Tetraspanin-5 Expression zu beobachten. Auch wenn ohne funktionelle Zellkultur-basierte, experimentelle Ansätze kein Beweis für einen kausalen Zusammenhang zwischen Tetraspanin-5 Expression und neuronaler Reifung hergestellt werden kann, so kann durch die Expressionsanalyse ein erster

Hinweis auf zelluläre Prozesse der neuronalen Reifung erhalten werden, bei denen Tetraspanin-5 eine Rolle spielen könnte.

5.2 Tetraspanin-5 Expression in *weaver*, *reeler* und *staggerer* Mäusen

Würde Tetraspanin-5 die Ausbildung und Reifung von Fortsätzen steuern, sollte in allen Neuronen, deren normale Differenzierung gestört ist, eine verminderte Tetraspanin-5 Expression vorliegen. *Weaver* und *reeler* Mäuse zeigten dagegen eine sehr starke Expression von Tetraspanin-5 in Purkinjezellen, obwohl deren Dendritogenese massiv beeinträchtigt ist (33) (35). Die Zellen zeigen zwar in der Regel einen einzigen Stammdendriten, der Verzweigungsgrad der feinen Fortsätze ist jedoch deutlich verringert. Interessanterweise zeigten aber Purkinjezellen von *staggerer* Mutanten eine deutlich verringerte Expression von Tetraspanin-5. Gemeinsam ist allen drei Mausmutanten eine gestörte Morphologie des Cerebellums, insbesondere des cerebellären Cortex, die sich in einer fehlenden oder nur unvollständigen Ausbildung der typischen Schichtung äußert. Die Purkinjezellen sind in ihrer Anzahl stark verringert und liegen ektopt im Cortex verteilt. Charakteristisch ist in allen Mutanten der wenig differenzierte Dendritenbaum. Was unterscheidet nun den *staggerer* Phänotyp vom *reeler* und *weaver* Phänotyp?

Dem cerebellären Phänotyp von *staggerer* Tieren liegt eine Deletion des nukleären ROR α -Rezeptors zugrunde. In dieser Mausmutante kommt es zunächst zu einem Absterben der Purkinjezellen, was sekundär zu einem Verlust der Körnerzellen führt (107). Die Verästelung der Dendriten in der Molekularschicht zeigt nicht das typisch diffus feingliedrige Bild des Purkinjezellendendritenbaums, sondern verdickte Dendritenabschnitte, die sich mit dünneren, eher strichförmigen Bereichen abwechseln. Von den anderen zwei Mausmutanten unterscheidet sich der *staggerer* Phänotyp besonders durch fehlende Dornfortsätze an den distalen Dendriten. Die Dornfortsätze sind kleine Vorwölbungen, die an Dendriten lokalisiert sind und über Synapsen den exzitatorischen Input der Purkinjezelle empfangen. Die Purkinjezellen der *weaver* Maus entwickeln, obwohl die Körnerzellen als präsynaptische Partner fehlen, Dornfortsätze, deren Anzahl und Morphologie nicht gestört ist (52) (63) (85) (104). Auch in der *reeler* Maus, in der eine Vielzahl von Purkinjezellen ektopt angeordnet ist und ohne Kontakt zu Körnerzellen verbleibt, ist die Entwicklung von Dornfortsätzen normal. Im *staggerer* Cerebellum ist die Bildung der distalen Dornfortsätze schwer gestört, die proximal gelegenen Dornfortsätze sind

hingegen in der Lage synaptische Kontakte mit Kletterfasern auszubilden. Diese Tatsache führt zu der Überlegung, dass die Mutation der *staggerer* Maus einen spezifischen Effekt auf die distalen Dendriten ausübt (117).

Laut Larramendi entwickeln sich die Dornfortsätze an distalen Dendritenabschnitten schon bevor sie synaptische Kontakte mit Parallelfasern knüpfen (64). Das Sotelo-Modell unterstreicht diese Aussage und beschreibt die initiale Entwicklung und Formierung von Dornfortsätzen als intrinsischen, zellautonomen Prozess, der nicht vom präsynaptischen Axon abhängig ist (105). Entsprechend entwickeln sich die Dornfortsätze an den distalen Abschnitten der Dendriten unbeeinflusst von neuronaler Aktivität des synaptischen Partners und des Neurons selbst. Dies steht im Gegensatz zu den proximalen Dornfortsätzen, die durch Kletterfasern innerviert werden. Zunächst haben die Kletterfasern nur Kontakt zum Soma der Purkinjezelle und orientieren sich erst später zum proximalen Abschnitt der Dendriten. Hier bilden sie mit den Dornfortsätzen synaptische Kontakte aus. Die Kletterfasern wirken vermutlich über ihre neuronale Aktivität direkt oder indirekt regulierend auf die Anzahl und Entwicklung von proximalen Dornfortsätzen (104) (16).

Die Ausführung lassen also vermuten, dass Tetraspanin-5 einen Einfluss auf die Synaptogenese als Teil der Dendritenentwicklung innehat. Konsistent damit wird Tetraspanin-5 in den Kleinhirnen von adulten Mäusen weiterhin ausgeprägt exprimiert. Eine Funktion bei der Synaptogenese wurde auch von dem Drosophila-Homolog *late bloomer* vermutet. Bei einer Deletion von *late bloomer* kommt es in Drosophila zum Verlust der Dornfortsätze an den Dendriten (28). Hier könnte der Schwerpunkt besonders in der ersten Phase der Entwicklung der distalen Dornfortsätze liegen, da diese zellautonom gesteuert wird und nicht von den synaptischen Kontakten der Kletterfasern abhängig ist. Tetraspanin-5 hat wahrscheinlich keinen Einfluss auf die proximale Synaptogenese, da diese bei der *staggerer* Mutante nicht gestört ist.

Für die Beteiligung von Tetraspanin-5 am Aussprossen von Nervenzellfortsätzen sprechen auch molekularbiologische Experimente, die Mitglieder der Tetraspaninfamilie als Teil von Rezeptorkomplexen der Zellmembran, deren Funktion in der Signalübertragung liegt, nachweisen konnten. Bekannt ist, dass entsprechende Rezeptorkomplexe eine wesentliche Rolle bei der Kommunikation zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix, aber auch bei Zell-Zell-Kontakten spielen. Beide Prozesse sind bedeutungsvoll beim Aussprossen von neuronalen Fortsätzen. Tetraspanine tragen demnach mit Hilfe von Integrinen in spezifischen an der Zellmembran

lokalisierten Komplexen zu einer Brückenbildung und somit Signalübermittlung aus dem extrazellulären Raum zum Cytoskelett bei (10) (17) (42) (68) . Das Tetraspanin CD63 erleichtert so zum Beispiel die Signaltransduktion über die Phospho-Inositol-4-Kinase, indem es zusammen mit der Phospho-Inositol-4-Kinase (11) (29) (116) und dem $\alpha_3\beta_1$ -Integrin einen Komplex bildet. Des Weiteren wurde ebenfalls eine Interaktion des Tetraspanin CD9 mit der α -Integrin-Untereinheit beschrieben, die die Proteinkinase C direkt aktiviert (119). Die Proteinkinase C wiederum beeinflusst die Reifung von Dendriten (73). Über andere Interaktionen von Tetraspaninen und Integrinen ist ebenfalls bekannt, dass sie eine modulierende Wirkung auf das Aussprossen von Neuriten an sympathischen Ganglien haben (7). Weiterhin sind Wachstumsfaktoren, die das Aussprossen von Neuriten fördern, Bindungspartner von Tetraspaninen (98).

Meine Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass mit Tetraspanin-5 einem weiteren Mitglied der Tetraspaninfamilie eine Funktion im Rahmen der Dendritogenese zukommt. Insbesondere der Prozess der Bildung von Dornfortsätzen am distalen Dendriten scheint dabei von Tetraspanin-5 positiv beeinflusst zu werden. Es ist davon auszugehen, dass Tetraspanin-5 nicht als alleiniger Faktor ursächlich für die Dendritogenese ist, sondern eher eine Rolle als Teilstück in einer funktionellen Kaskade verschiedener Schritte und Faktoren spielt.

5.3 Ausblicke

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten erstmals Hinweise darauf liefern, dass Tetraspanin-5 definierte Schritte der Dendritogenese cerebellärer Neurone beeinflusst. Damit ist Tetraspanin-5 an wesentlichen Schritten der Entwicklung des Zentralnervensystems beteiligt. Der hier erstmals eingeführte Antikörper gegen Tetraspanin-5 ermöglicht es nun, die Expression des Proteins zu untersuchen, und durch entsprechende Manipulation der Tetraspanin-5 Expression die postulierten Funktionen experimentell zu untermauern. Da Tetraspanine nicht nur in physiologischen Prozessen eingebunden sind, sondern ihre deregulierte Expression auch mit pathologischen Prozessen wie der Tumorpathogenese, Metastasierungsvorgängen oder Retinopathien assoziiert wurde, lassen die hier beschriebenen Befunde im weiteren wichtige Erkenntnisse für die medizinische Forschung erwarten.

6. Zusammenfassung

Tetraspanine sind Transmembranproteine, die sowohl mit intrazellulären Signaltransduktionsmolekülen als auch mit der extrazellulären Matrix interagieren. Sie sind in unterschiedlichen Organen an vielen Entwicklungsprozessen, wie zum Beispiel der Zellproliferation und –migration, beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression eines Mitglieds dieser Proteinfamilie, dem Tetraspanin-5, während der Entwicklung des ZNS näher charakterisiert.

Zunächst wurde die Tetraspanin-5-Expression im Wildtyp mit der Expression an *L7En-2* Überexpressions- und Nullmutationstieren verglichen. Es wurde gezeigt, dass die Tetraspanin-5 Expression mit der Reifung von Neuronen positiv korreliert. Ein wichtiges Ergebnis hierzu war, dass in den *L7En-2* Überexpressionstieren, in denen eine verzögerte Reifung der Purkinjezellen in der Kleinhirnrinde vorliegt, eine verminderte Tetraspanin-5 Expression beobachtet wurde. Die Ergebnisse dieser Versuche sprechen also dafür, dass die Tetraspanin-5 Expression mit der Differenzierung von Neuronen einhergeht. In einem Folgeversuch zeigte die Tetraspanin-5 Expression zu gegebenen Zeitpunkten der Entwicklung in *L7En-2* Deletionsmutanten keine Unterschiede zum Wildtyp. Dies bedeutet, dass eine starke Expression von *Engrailed-2* nicht immer mit einer niedrigen Expression von Tetraspanin-5 einhergeht und umgekehrt. Wir schlussfolgern, dass der Transkriptionsfaktor *Engrailed-2* die Tetraspanin-5 Expression nicht direkt reguliert und bezüglich der Tetraspanin-5 Expression nicht als „Master“-Regulator fungiert, sondern dass von einer komplexen indirekten Regulation des Tetraspanin-5 durch *Engrailed-2* ausgegangen werden muss.

Um die Funktion des Tetraspanin-5 während der Nervenzelldifferenzierung genauer zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit die Tetraspanin-5 Expression in weiteren Mausmutanten mit einem cerebellären Phänotyp untersucht. Hier zeigte sich, dass eine starke Tetraspanin-5 Expression in Purkinjezellen von *weaver* und *reeler*-Mäusen vorliegt, obwohl deren Dendritogenese massiv beeinträchtigt ist. Hingegen zeigten Expressionsuntersuchungen am Kleinhirn der *staggerer*-Mutante, dass in deren Purkinjezellen eine deutlich verminderte

Expression von Tetraspanin-5 vorliegt. Gemeinsam ist allen drei Mausmutanten eine gestörte Morphologie des cerebellären Cortex, insbesondere die Ausrichtung und Reifung der Purkinjezellen betreffend. In allen Mutanten findet man einen wenig differenzierten Dendritenbaum. Das Besondere am *staggerer* Phänotyp ist jedoch, dass hier ein Fehlen der Dornfortsätze an den distalen Dendriten, welche über Synapsen den exzitatorischen Input der Purkinjezellen empfangen, vorliegt. Laut Larramendi und Sotelo ist die Formierung von Dornfortsätzen im Bereich der distalen Dendriten ein intrinsischer, zellautonomer Prozess. Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen daher, dass Tetraspanin-5 wahrscheinlich eine Funktion im Rahmen der Ausbildung von Dornfortsätzen und damit auch einen Einfluss auf die Synaptogenese hat. Damit liefern meine Ergebnisse erste Hinweise auf eine spezifische Funktion des Tetraspanin-5 während der Nervenzelldifferenzierung .

Mit dem im Rahmen meiner experimentellen Arbeit hergestellten polyklonalen Antikörper gegen Tetraspanin-5 wird es in Zukunft möglich sein, durch entsprechende Manipulation der Tetraspanin-5 Expression die postulierten Funktionen experimentell zu überprüfen.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Aggerwal AS, Hendelman WJ. The Purkinje neuron: II. Electron microscopic analysis of the mature Purkinje neuron in organotypic culture. *J Comp Neurol* 1980; 193: 1081-1096.
- (2) Altman J, Bayer SA. Prenatal development of the cerebellar system in the rat. I. Cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum. *J Comp Neurol* 1978; 179: 23-48.
- (3) Alvarado-Mallart RM, Martinez S, Lance-Jones CC. Pluripotentiality of the 2-day-old avian germinative neuroepithelium. *Dev Biol* 1990; 139: 75-88.
- (4) Armengol JA, Sotelo C. Early dendritic development of Purkinje cells in the rat cerebellum. A light and electron microscopic study using axonal tracing in 'in vitro' slices. *Brain Res Dev Brain Res* 1991; 64: 95-114.
- (5) Armstrong C, Hawkes R. Selective Purkinje cell ectopia in the cerebellum of the weaver mouse. *J Comp Neurol* 2001; 439: 151-161.
- (6) Baader SL, Sanlioglu S, Berrebi AS, Parker-Thornburg J, Oberdick J. Ectopic overexpression of engrailed-2 in cerebellar Purkinje cells causes restricted cell loss and retarded external germinal layer development at lobule junctions. *J Neurosci* 1998; 18: 1763-1773.
- (7) Banerjee SA, Hadjiargyrou M, Patterson PH. An antibody to the tetraspan membrane protein CD9 promotes neurite formation in a partially alpha3beta1 integrin-dependent manner. *J Neurosci* 1997; 17: 2756-2765.
- (8) Bayer SA, Wills KV, Triarhou LC, Thomas JD, Ghetti B. Systematic differences in time of dopaminergic neuron origin between normal mice and homozygous weaver mutants. *Exp Brain Res* 1995; 105: 200-208.
- (9) Bayer SA, Wills KV, Wei J, Feng Y, Dlouhy SR, Hodes ME et al. Phenotypic effects of the weaver gene are evident in the embryonic cerebellum but not in the ventral midbrain. *Brain Res Dev Brain Res* 1996; 96: 130-137.

- (10) Berditchevski F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci* 2001; 114: 4143-4151.
- (11) Berditchevski F, Tolias KF, Wong K, Carpenter CL, Hemler ME. A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase. *J Biol Chem* 1997; 272: 2595-2598.
- (12) Berry M, Bradley P. The growth of the dendritic trees of Purkinje cells in irradiated agranular cerebellar cortex. *Brain Res* 1976; 116: 361-387.
- (13) Blatt GJ, Eisenman LM. A qualitative and quantitative light microscopic study of the inferior olivary complex of normal, reeler, and weaver mutant mice. *J Comp Neurol* 1985; 232: 117-128.
- (14) Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 1189-1205.
- (15) Bradbury LE, Kansas GS, Levy S, Evans RL, Tedder TF. The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *J Immunol* 1992; 149: 2841-2850.
- (16) Bravin M, Morando L, Vercelli A, Rossi F, Strata P. Control of spine formation by electrical activity in the adult rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 1704-1709.
- (17) Bronstein JM. Function of tetraspan proteins in the myelin sheath. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10: 552-557.
- (18) Caviness VS. Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain Res* 1982; 256: 293-302.
- (19) Caviness VS, Jr., Rakic P. Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice. *Annu Rev Neurosci* 1978; 1: 297-326.
- (20) Chedotal A, Sotelo C. The 'creeper stage' in cerebellar climbing fiber synaptogenesis precedes the 'pericellular nest'--ultrastructural evidence with parvalbumin immunocytochemistry. *Brain Res Dev Brain Res* 1993; 76: 207-220.

- (21) D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant *reeler*. *Nature* 1995; 374: 719-723.
- (22) Davis CA, Joyner AL. Expression patterns of the homeo box-containing genes *En-1* and *En-2* and the proto-oncogene *int-1* diverge during mouse development. *Genes Dev* 1988; 2: 1736-1744.
- (23) Deng J, Yeung VP, Tsitoura D, DeKruyff RH, Umetsu DT, Levy S. Allergen-induced airway hyperreactivity is diminished in CD81-deficient mice. *J Immunol* 2000; 165: 5054-5061.
- (24) Desplan C, Theis J, O'Farrell PH. The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. *Cell* 1988; 54: 1081-1090.
- (25) Edwards MA, Yamamoto M, Caviness VS. Organization of radial glia and related cells in the developing murine CNS. An analysis based upon a new monoclonal antibody marker. *Neuroscience* 1990; 36: 121-144.
- (26) Eisenman LM, Gallagher E, Hawkes R. Regionalization defects in the weaver mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 1998; 394: 431-444.
- (27) Foucher I, Montesinos ML, Volovitch M, Prochiantz A, Trembleau A. 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* 2003; 130: 1867-1876.
- (28) Fradkin LG, Kamphorst JT, DiAntonio A, Goodman CS, Noordermeer JN. Genomewide analysis of the *Drosophila* tetraspanins reveals a subset with similar function in the formation of the embryonic synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13663-13668.
- (29) Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 481-507.

- (30) Garcia-Frigola C, Burgaya F, Calbet M, de Lecea L, Soriano E. Mouse Tspan-5, a member of the tetraspanin superfamily, is highly expressed in brain cortical structures. *Neuroreport* 2000; 11: 3181-3185.
- (31) Garcia-Frigola C, Burgaya F, de Lecea L, Soriano E. Pattern of expression of the tetraspanin Tspan-5 during brain development in the mouse. *Mech Dev* 2001; 106: 207-212.
- (32) Ghetti B, Triarhou LC. Degeneration of mesencephalic dopamine neurons in weaver mutant mice. *Neurochem Int* 1992; 20: 305S-307S.
- (33) Goffinet AM. The embryonic development of the cerebellum in normal and reeler mutant mice. *Anat Embryol (Berl)* 1983; 168: 73-86.
- (34) Goffinet AM. Events governing organization of postmigratory neurons: studies on brain development in normal and reeler mice. *Brain Res* 1984; 319: 261-296.
- (35) Goldowitz D. The weaver granulo-prival phenotype is due to intrinsic action of the mutant locus in granule cells: evidence from homozygous weaver chimeras. *Neuron* 1989; 2: 1565-1575.
- (36) Goldowitz D, Hamre K. The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci* 1998; 21: 375-382.
- (37) Goldowitz D, Mullen RJ. Granule cell as a site of gene action in the weaver mouse cerebellum: evidence from heterozygous mutant chimeras. *J Neurosci* 1982; 2: 1474-1485.
- (38) Gupta M, Felten DL, Ghetti B. Selective loss of monoaminergic neurons in weaver mutant mice--an immunocytochemical study. *Brain Res* 1987; 402: 379-382.
- (39) Hamilton BA, Frankel WN, Kerrebrock AW, Hawkins TL, FitzHugh W, Kusumi K et al. Disruption of the nuclear hormone receptor RORalpha in staggerer mice. *Nature* 1996; 379: 736-739.

- (40) Hatten ME, Liem RK, Mason CA. Weaver mouse cerebellar granule neurons fail to migrate on wild-type astroglial processes in vitro. *J Neurosci* 1986; 6: 2676-2683.
- (41) Hemler ME. Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 578-585.
- (42) Hemler ME. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol* 2001; 155: 1103-1107.
- (43) Hemler ME. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19: 397-422.
- (44) Hendelman WJ, Aggerwal AS. The Purkinje neuron: I. A Golgi study of its development in the mouse and in culture. *J Comp Neurol* 1980; 193: 1063-1079.
- (45) Herrup K. Roles of cell lineage in the developing mammalian brain. *Curr Top Dev Biol* 1987; 21: 65-97.
- (46) Herrup K, Kuemerle B. The compartmentalization of the cerebellum. *Annu Rev Neurosci* 1997; 20: 61-90.
- (47) Herrup K, Mullen RJ. Regional variation and absence of large neurons in the cerebellum of the staggerer mouse. *Brain Res* 1979; 172: 1-12.
- (48) Herrup K, Mullen RJ. Staggerer chimeras: intrinsic nature of Purkinje cell defects and implications for normal cerebellar development. *Brain Res* 1979; 178: 443-457.
- (49) Herrup K, Trenkner E. Regional differences in cytoarchitecture of the weaver cerebellum suggest a new model for weaver gene action. *Neuroscience* 1987; 23: 871-885.
- (50) Heuze P, Feron C, Baudoin C. Early behavioral development of mice is affected by staggerer mutation as soon as postnatal day three. *Brain Res Dev Brain Res* 1997; 101: 81-84.
- (51) Higginbottom A, Takahashi Y, Bolling L, Coonrod SA, White JM, Partridge LJ et al. Structural requirements for the inhibitory action of the CD9 large extracellular domain in sperm/oocyte binding and fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311: 208-214.

- (52) Hirano A, Dembitzer HM. Cerebellar alterations in the weaver mouse. *J Cell Biol* 1973; 56: 478-486.
- (53) Hirano A, Dembitzer HM. Aberrant development of the Purkinje cell dendritic spine. *Adv Neurol* 1975; 12: 353-360.
- (54) Hjerrild M, Stensballe A, Jensen ON, Gammeltoft S, Rasmussen TE. Protein kinase A phosphorylates serine 267 in the homeodomain of engrailed-2 leading to decreased DNA binding. *FEBS Lett* 2004; 568: 55-59.
- (55) Jankowski J, Holst MI, Liebig C, Oberdick J, Baader SL. Engrailed-2 negatively regulates the onset of perinatal Purkinje cell differentiation. *J Comp Neurol* 2004; 472: 87-99.
- (56) Jaynes JB, O'Farrell PH. Active repression of transcription by the engrailed homeodomain protein. *EMBO J* 1991; 10: 1427-1433.
- (57) Jennings LK, Crossno JT, Jr., Fox CF, White MM, Green CA. Platelet p24/CD9, a member of the tetraspanin family of proteins. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 714: 175-184.
- (58) Joyner AL, Herrup K, Auerbach BA, Davis CA, Rossant J. Subtle cerebellar phenotype in mice homozygous for a targeted deletion of the En-2 homeobox. *Science* 1991; 251: 1239-1243.
- (59) Kaji K, Oda S, Miyazaki S, Kudo A. Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81; polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion. *Dev Biol* 2002; 247: 327-334.
- (60) Kobayashi M, Fujioka M, Tolkunova EN, Deka D, Abu-Shaar M, Mann RS et al. Engrailed cooperates with extradenticle and homothorax to repress target genes in *Drosophila*. *Development* 2003; 130: 741-751.
- (61) Kohl S, Giddings I, Besch D, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Wissinger B. The role of the peripherin/RDS gene in retinal dystrophies. *Acta Anat (Basel)* 1998; 162: 75-84.

- (62) Kuemerle B, Zanjani H, Joyner A, Herrup K. Pattern deformities and cell loss in Engrailed-2 mutant mice suggest two separate patterning events during cerebellar development. *J Neurosci* 1997; 17: 7881-7889.
- (63) Landis DM, SIDMAN RL. Electron microscopic analysis of postnatal histogenesis in the cerebellar cortex of staggerer mutant mice. *J Comp Neurol* 1978; 179: 831-863.
- (64) Larramendi LM. Electron microscopic studies of cerebellar interneurons. *UCLA Forum Med Sci* 1969; 11: 289-307.
- (65) Levitt P, Rakic P. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol* 1980; 193: 815-840.
- (66) Locke J, Hanna S. Engrailed gene dosage determines whether certain recessive cubitus interruptus alleles exhibit dominance of the adult wing phenotype in *Drosophila*. *Dev Genet* 1996; 19: 340-349.
- (67) Maecker HT, Levy S. Normal lymphocyte development but delayed humoral immune response in CD81-null mice. *J Exp Med* 1997; 185: 1505-1510.
- (68) Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 1997; 11: 428-442.
- (69) Maricich SM, Soha J, Trenkner E, Herrup K. Failed cell migration and death of purkinje cells and deep nuclear neurons in the weaver cerebellum. *J Neurosci* 1997; 17: 3675-3683.
- (70) Marti J, Wills KV, Ghetti B, Bayer SA. Evidence that the loss of Purkinje cells and deep cerebellar nuclei neurons in homozygous weaver is not related to neurogenetic patterns. *Int J Dev Neurosci* 2001; 19: 599-610.
- (71) Martinez S, Wassef M, Alvarado-Mallart RM. Induction of a mesencephalic phenotype in the 2-day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene *en*. *Neuron* 1991; 6: 971-981.

- (72) Mason CA, Christakos S, Catalano SM. Early climbing fiber interactions with Purkinje cells in the postnatal mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 1990; 297: 77-90.
- (73) Metzger F, Kapfhammer JP. Protein kinase C activity modulates dendritic differentiation of rat Purkinje cells in cerebellar slice cultures. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 1993-2005.
- (74) Miale IL, Sidman RL. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol* 1961; 4: 277-296.
- (75) Millen KJ, Hui CC, Joyner AL. A role for En-2 and other murine homologues of *Drosophila* segment polarity genes in regulating positional information in the developing cerebellum. *Development* 1995; 121: 3935-3945.
- (76) Millen KJ, Wurst W, Herrup K, Joyner AL. Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse *Engrailed-2* mutants. *Development* 1994; 120: 695-706.
- (77) Mittelbrunn M, Yanez-Mo M, Sancho D, Ursa A, Sanchez-Madrid F. Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC. *J Immunol* 2002; 169: 6691-6695.
- (78) Miyata T, Nakajima K, Aruga J, Takahashi S, Ikenaka K, Mikoshiba K et al. Distribution of a reeler gene-related antigen in the developing cerebellum: an immunohistochemical study with an allogeneic antibody CR-50 on normal and reeler mice. *J Comp Neurol* 1996; 372: 215-228.
- (79) Miyazaki T, Muller U, Campbell KS. Normal development but differentially altered proliferative responses of lymphocytes in mice lacking CD81. *EMBO J* 1997; 16: 4217-4225.
- (80) Nagata I, Terashima T. Migration behavior of granule cells on laminin in cerebellar microexplant cultures from early postnatal reeler mutant mice. *Int J Dev Neurosci* 1994; 12: 387-395.

- (81) Nakagawa S, Watanabe M, Isobe T, Kondo H, Inoue Y. Cytological compartmentalization in the staggerer cerebellum, as revealed by calbindin immunohistochemistry for Purkinje cells. *J Comp Neurol* 1998; 395: 112-120.
- (82) Patil N, Cox DR, Bhat D, Faham M, Myers RM, Peterson AS. A potassium channel mutation in weaver mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation. *Nat Genet* 1995; 11: 126-129.
- (83) Peltenburg LT, Murre C. Specific residues in the Pbx homeodomain differentially modulate the DNA-binding activity of Hox and Engrailed proteins. *Development* 1997; 124: 1089-1098.
- (84) Pierce ET. Histogenesis of the deep cerebellar nuclei in the mouse: an autoradiographic study. *Brain Res* 1975; 95: 503-518.
- (85) Rakic P, SIDMAN RL. Organization of cerebellar cortex secondary to deficit of granule cells in weaver mutant mice. *J Comp Neurol* 1973; 152: 133-161.
- (86) Rezai Z, Yoon CH. Abnormal rate of granule cell migration in the cerebellum of "Weaver" mutant mice. *Dev Biol* 1972; 29: 17-26.
- (87) Roffler-Tarlov S, Martin B, Graybiel AM, Kauer JS. Cell death in the midbrain of the murine mutation weaver. *J Neurosci* 1996; 16: 1819-1826.
- (88) Rous BA, Reaves BJ, Ihrke G, Briggs JA, Gray SR, Stephens DJ et al. Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 1071-1082.
- (89) Rubinstein E, Le Naour F, Lagaudriere-Gesbert C, Billard M, Conjeaud H, Boucheix C. CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol* 1996; 26: 2657-2665.
- (90) Sanyal S, De Ruitter A, Hawkins RK. Development and degeneration of retina in rds mutant mice: light microscopy. *J Comp Neurol* 1980; 194: 193-207.

- (91) Sashihara S, Felts PA, Waxman SG, Matsui T. Orphan nuclear receptor ROR alpha gene: isoform-specific spatiotemporal expression during postnatal development of brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; 42: 109-117.
- (92) Schein JC, Hunter DD, Roffler-Tarlov S. *Girk2* expression in the ventral midbrain, cerebellum, and olfactory bulb and its relationship to the murine mutation weaver. *Dev Biol* 1998; 204: 432-450.
- (93) Schilling K, Dickinson MH, Connor JA, Morgan JI. Electrical activity in cerebellar cultures determines Purkinje cell dendritic growth patterns. *Neuron* 1991; 7: 891-902.
- (94) Schmidt MJ, Sawyer BD, Perry KW, Fuller RW, Foreman MM, Ghetti B. Dopamine deficiency in the weaver mutant mouse. *J Neurosci* 1982; 2: 376-380.
- (95) Seigneuret M, Delaguillaumie A, Lagaudriere-Gesbert C, Conjeaud H. Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *J Biol Chem* 2001; 276: 40055-40064.
- (96) Sekiguchi M, Nowakowski RS, Nagato Y, Tanaka O, Guo H, Madoka M. Morphological abnormalities in the hippocampus of the weaver mutant mouse. *Brain Res* 1995; 696: 262-267.
- (97) Sheppard AM, Pearlman AL. Abnormal reorganization of preplate neurons and their associated extracellular matrix: an early manifestation of altered neocortical development in the reeler mutant mouse. *J Comp Neurol* 1997; 378: 173-179.
- (98) Shi W, Fan H, Shum L, Derynck R. The tetraspanin CD9 associates with transmembrane TGF-alpha and regulates TGF-alpha-induced EGF receptor activation and cell proliferation. *J Cell Biol* 2000; 148: 591-602.
- (99) Sidman RL, Lane PW, Dickie MM. Staggerer, a new mutation in the mouse affecting the cerebellum. *Science* 1962; 137: 610-612.
- (100) Simon HH, Scholz C, O'Leary DD. Engrailed genes control developmental fate of serotonergic and noradrenergic neurons in mid- and hindbrain in a gene dose-dependent manner. *Mol Cell Neurosci* 2005; 28: 96-105.

- (101) Smeyne RJ, Goldowitz D. Development and death of external granular layer cells in the weaver mouse cerebellum: a quantitative study. *J Neurosci* 1989; 9: 1608-1620.
- (102) Soha JM, Kim S, Crandall JE, Vogel MW. Rapid growth of parallel fibers in the cerebella of normal and staggerer mutant mice. *J Comp Neurol* 1997; 389: 642-654.
- (103) Soriano E, Alvarado-Mallart RM, Dumesnil N, Del Rio JA, Sotelo C. Cajal-Retzius cells regulate the radial glia phenotype in the adult and developing cerebellum and alter granule cell migration. *Neuron* 1997; 18: 563-577.
- (104) Sotelo C. Dendritic abnormalities of Purkinje cells in the cerebellum of neurologic mutant mice (weaver and staggerer). *Adv Neurol* 1975; 12: 335-351.
- (105) Sotelo C. Purkinje cell ontogeny: formation and maintenance of spines. *Prog Brain Res* 1978; 48: 149-70.
- (106) Sotelo C, Changeux JP. Bergmann fibers and granular cell migration in the cerebellum of homozygous weaver mutant mouse. *Brain Res* 1974; 77(3): 484-491.
- (107) Steinmayr M, Andre E, Conquet F, Rondi-Reig L, Delhaye-Bouchaud N, Auclair N et al. staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3960-3965.
- (108) Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME. EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. *J Biol Chem* 2001; 276: 40545-40554.
- (109) Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 106-112.
- (110) Tolkunova EN, Fujioka M, Kobayashi M, Deka D, Jaynes JB. Two distinct types of repression domain in engrailed: one interacts with the groucho corepressor and is preferentially active on integrated target genes. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 2804-2814.
- (111) Tolkunova EN, Fujioka M, Kobayashi M, Deka D, Jaynes JB. Two distinct types of repression domain in engrailed: one interacts with the groucho corepressor and is preferentially active on integrated target genes. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 2804-2814.

- (112) Triarhou LC, Low WC, Ghetti B. Layer-specific innervation of the dopamine-deficient frontal cortex in weaver mutant mice by grafted mesencephalic dopaminergic neurones. *Cell Tissue Res* 1988; 254: 11-15.
- (113) Tsitsikov EN, Gutierrez-Ramos JC, Geha RS. Impaired CD19 expression and signaling, enhanced antibody response to type II T independent antigen and reduction of B-1 cells in CD81-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10844-10849.
- (114) Voogd J, Glickstein M. The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci* 1998; 21: 370-375.
- (115) Wurst W, Auerbach AB, Joyner AL. Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* 1994; 120: 2065-2075.
- (116) Yauch RL, Hemler ME. Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase. *Biochem J* 2000; 351: 629-637.
- (117) Yuste R, Urban R. Dendritic spines and linear networks. *J Physiol Paris* 2004; 98: 479-486.
- (118) Zemni R, Bienvenu T, Vinet MC, Sefiani A, Carrie A, Billuart P et al. A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nat Genet* 2000; 24: 167-170.
- (119) Zhang XA, Bontrager AL, Hemler ME. Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem* 2001; 276: 25005-25013.

8. Danksagung

Zu ganz besonderem Dank bin ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Stephan Baader, für die hervorragende Betreuung während der experimentellen Arbeiten und der Anfertigung dieser Arbeit verpflichtet: für die Überlassung des Themas, die vielfältigen inhaltlichen Anregungen und vor allem seine ständige Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit.

Herrn PD Dr. Joachim Kappler danke ich für die freundliche Hilfestellung im Zusammenhang mit der Herstellung des polyklonalen Antikörpers. Mein herzlicher Dank gilt den Mitarbeiterinnen des Anatomischen Instituts Alice Ihmer, Helma Langmann und Sabine Molly; sie standen mir stets mit großer Hilfsbereitschaft bei der praktischen Erstellung der Arbeit im Labor zur Seite.

Ich möchte mich bei meinen Eltern für ihren nicht zu ersetzenden Anteil an meiner Ausbildung danken, sie haben durch ihre immerwährende liebevolle Förderung und Unterstützung zum Gelingen und Fertigstellen der Arbeit beigetragen.