

**MicroRNA vermittelte Regulation der Expression von Mtss1  
während der Entwicklung des Kleinhirns der Maus**

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades (Dr. rer.nat.)

an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Christian Markopoulos**

aus

Athen

Bonn 2017



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

1. Gutachter:	Prof. Dr. Karl Schilling
2. Gutachter:	Prof. Dr. Dieter Fürst
Tag der mündlichen Prüfung:	10.03.2017
Erscheinungsjahr:	2017



# ABSTRACT

---

*The development and differentiation of the cerebellum is critically dependent on concerted migration of all cerebellar cell types. This requires constant rearrangement of the cytoskeleton and regulation of cell shape. Recently, we could show that the expression of the actin-membrane linking IMD protein Mtss1 is developmentally regulated in cerebellar granule cells. Furthermore, neuronal maturation of the cerebellum is accompanied by a switch of Mtss1 splicing where exon 12 is replaced by the CNS-specific isoform 12a (Glassmann et al., 2007). How these processes are regulated is currently not known. Here, we asked whether microRNAs (miRNAs) may play a role in this scenario. Therefore we used microarray analysis to compare the relative expression levels of miRNAs in the cerebellum of P8 and adult mice. We identified several miRNAs to be differentially regulated in the developing cerebellum. Using TargetScan and other databases, we identified potential miRNA binding sites in the 3'UTRs of IMD-protein family members. For Mtss1 we could show regulation by several of the predicted microRNAs, especially the miR-182 cluster by using a sensor assay based on the Dual-Luciferase System. We also carried out pathway analysis of the verified miRNAs using miRPath to assess their biological function. Furthermore we could confirm the effect of miRNA targeting on arborization during primary granule cell differentiation.*



# Inhaltsverzeichnis

---

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>V</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>XI</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>XV</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Aufbau und Funktion des Kleinhirns (Mus Musculus) .....	1
1.1.1 Äußere Gestalt und Struktur des Kleinhirns des Maus.....	1
1.1.2 Zellschichten des Kleinhirns .....	3
1.1.3 Funktion.....	4
1.2 Die Körnerzelle des Kleinhirns der Maus als Modell neuronaler Entwicklung .....	5
1.2.1 Körnerzellentwicklung im Überblick.....	6
1.2.2 Regulation der Zellpolarität während der Migration von Körnerzellen.....	7
1.2.3 Aktin-abhängige Strukturen der Plasmamembran initiieren die Migration .....	9
1.3 Die IMD (I-BAR) Protein- Familie.....	10
1.3.1 Metastasis Suppressor 1 (Mtss1).....	11
1.3.1.1 Aufbau und Funktion von Mtss1 .....	12
1.3.1.2 Expression von Mtss1 im Kleinhirn .....	13
1.4 MicroRNAs .....	15
1.4.1 MicroRNA-Biogenese: Entstehung und Prozessierung.....	16
1.4.2 MicroRNA-Targeting: Mechanismus der mRNA-Erkennung und Prozessierung.....	17
1.4.3 MicroRNA Regulation in der neuronalen Entwicklung.....	19
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	20
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
2.1 Geräte .....	23
2.3 Chemikalien und Enzyme.....	25
2.4 Primersequenzen .....	26
2.5 siRNA/miRNA Sequenzen .....	27
2.6 Bakterienstämme .....	28
2.7 Zelllinien.....	28
2.8 Antikörper .....	28
2.9 Software.....	29
2.10 Allgemeine Lösungen und Puffer.....	31
2.10.1 Lösungen und Medien für die Zellkultur.....	31
2.10.2 Lösungen und Puffer (Klonierung).....	32
2.10.3 Lösungen und Puffer für die Proteinanalytik .....	33
2.11 Molekularbiologische Methoden.....	34
2.11.1 RNA Extraktion.....	34

2.11.2	Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA .....	34
2.11.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
2.11.4	Quantitative Real-Time PCR .....	35
2.11.5	Klonierungstechniken.....	36
2.11.5.1	Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	36
2.11.5.2	Modifikation von DNA Fragmentenden zur Klonierung.....	36
2.11.5.3	Ligation von DNA Fragmenten .....	37
2.11.5.4	Transformation von chemisch Kompetenten E.coli Bakterien mit Plasmid DNA .....	37
2.11.5.5	Transformation von elektrisch Kompetenten E.coli Bakterien mit Plasmid DNA.....	38
2.11.5.6	Präparation von Plasmid DNA.....	38
2.11.5.7	Sequenzierung doppelsträngiger DNA .....	38
2.12	Zellbiologische Methoden .....	39
2.12.1	Kultivierung von Zelllinien .....	39
2.12.2	Transfektion von Zelllinien .....	39
2.12.3	Stabile Selektion von mit Plasmid DNA transfizierten Zelllinien.....	40
2.12.4	Dual Luciferase Reporter Assay (DLA).....	41
2.12.5	Echtzeitanalyse von Zellkulturen über Impedanzmessung .....	41
2.12.6	Time-Lapse Videomikroskopie von Zellkulturen .....	42
2.12.7	Morphometrische Analyse eGFP-positiver Körnerzellen (Neuron-J).....	42
2.13	Tierexperimentelle Methoden.....	43
2.13.1	Tiere.....	43
2.13.2	Perfusion, Präparation und Nachfixierung.....	43
2.13.3	Vibratonschnitte (Dickschnitte).....	43
2.13.4	Anfertigung von primären Körnerzellkulturen.....	43
2.14	Biochemische Methoden.....	44
2.14.1	Proteinextraktion aus Gewebe und Zellkulturen .....	44
2.14.2	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
2.14.3	Western Blot Analyse.....	45
2.15	Histochemische und immunzytochemische Methoden .....	46
2.15.1	Immunfluoreszenzfärbungen an Zellkulturen.....	46
2.16	Datenauswertung.....	47
2.16.1	Analyse der Microarray Datensätzen von P8- und Adultcerebellum.....	47
2.16.2	MicroRNA Vorhersagen im 3'-untranslatierten Bereich von Mtss1.....	47
2.16.3	Analyse von Signalwegen ausgewählter miRNAs.....	49
2.16.4	Statistik .....	51
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>53</b>
3.1	Differentielle MicroRNA-Expressionsanalysen im Cerebellum der Maus .....	53
3.2	Analyse von MiRNA-Bindestellen im 3'-untranslatierten Bereich der Mtss1-mRNA.....	59
3.2.1	Mtss1 spezifische MiRNA-Expressionsanalysen im Cerebellum der Maus .....	63
3.2.2	Vergleichende Datenbankanalyse zur miRNA-Bindung bei IMD-Proteinen.....	64
3.3	Immunocytochemische Analysen zur Entwicklungsabhängigen Expression von Mtss1 und anderer IMD-Proteine im Kleinhirn der Maus.....	66
3.4	Klonierung des psiCHECK-2 basierten Luciferase Reportersystems.....	70



3.5	Funktionelle Analysen der Bindung von miRNAs an den 3'-UTR von Mtss1 mittels des Luciferase Reportersystems .....	72
3.5.1	Konzentrationsabhängigkeit der Repression der MiRNA-Bindung am 3'-UTR von Mtss1 .....	74
3.5.2	Expressionsanalyse Mtss1-3'UTR bindender miRNAs mittels qRT-PCR .....	78
3.6	Identifikation gemeinsamer Signalwege .....	79
3.6.1	DIANA-miRPath .....	79
3.6.2	Signalweganalyse kombinierter miRNAs (GO-Analyse) .....	81
3.6.3	Darstellung einzelner Zielgene der Aktincytoskelett Reorganisation .....	82
3.7	Mtss1-spezifische miRNAs regulieren Zell-Proliferation und Adhäsion .....	85
3.8	Immunfluoreszenzanalyse zur Untersuchung des Zellspreitens .....	88
3.9	Mtss1-spezifische MiRNAs regulieren Mtss1 mRNA in NIH3T3 - Zellen .....	92
3.10	MiRNA abhängige Reduktion von Mtss1 beeinflusst die Dendritogene von cerebellären Körnerzellen 93	93
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>99</b>
4.1	Identifikation von miRNA- Bindestellen im 3'UTR von Mtss1 .....	99
4.1.1	Verschiedene Algorithmen führen zur übereinstimmenden Identifikation von MicroRNAs die putativ die Mtss1 Expression regulieren können .....	100
4.1.2	Microarray Expressionsanalysen identifizieren wichtige microRNAs der postnatalen Entwicklung des Cerebellums bei der Maus .....	104
4.1.3	hochregulierte MicroRNAs könnten für die differentielle Regulation von Mtss1 in cerebellären Körnerzellen verantwortlich sein. ....	108
4.2	Expressionsmuster der IMD-Proteinfamilie im postnatalen Cerebellum der Maus .....	111
4.2.1	Zelltyp spezifische Expression der IMD-Mitglieder im Cerebellum der Maus .....	111
4.3	Validierung der Bindung vorhergesagter microRNAs im 3'UTR von Mtss1 durch Reporter .....	116
4.4	Die Regulation durch miRNAs am 3'UTR von Mtss1 ist Konzentrationsabhängig und teilweise kooperativ .....	119
4.5	Mtss1 spezifische miRNAs regulieren Signalwege die mit Cytoskelett Reorganisation und Zellmotilität assoziiert sind .....	124
4.6	postnatale Differenzierung von Körnerzellen .....	127
4.6.1	MiR-182 beeinflusst die Reifung cerebellärer Körnerzellen .....	128
4.6.2	Rolle der Aktin-regulierenden Proteine bei der Dendritogenese cerebellärer Körnerzellen .....	130
4.7	Differentiell exprimierte Mtss1-miRNAs beeinflussen die Zelladhäsion .....	132
4.7.1	MiR-182 beeinflusst die Proliferation .....	135
4.8	Ausblick .....	136
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>139</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>141</b>
<b>7</b>	<b>REFERENZEN .....</b>	<b>143</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>163</b>
8.1	Sequenzen .....	163
8.2	Plasmide .....	165
8.3	Abbildungen .....	167
8.4	Tabellen .....	172



# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abbildung 1  Das Cerebellum der adulten Maus.....	2
Abbildung 2  Zellschichten des Cerebellums und seine Verschaltung. ....	3
Abbildung 3  Entwicklung des Cerebellums: Migration von Körner- und Purkinje-Zellen .....	7
Abbildung 4  Strukturen und Mechanismen der tangentialen und radialen Migration .....	8
Abbildung 5  Funktion von IMD-Proteinen bei der Bildung von Filopodia .....	11
Abbildung 6  Mtss1: Struktur des Mtss-1 Proteins .....	13
Abbildung 7  Micro-RNA Biogenese (Verändert nach Winter et al., 2009) .....	17
Abbildung 8  Microarray Analyse: Differentielle Expression cerebellärer miRNAs .....	55
Abbildung 9  Vergleich der absoluten Zunahme zwischen P8 und Adult .....	56
Abbildung 10  MiRNAs mit starker Expression im Vergleich P8 zu Adult. ....	57
Abbildung 11  Vorhergesagte miRNA-Bindestellen im 3'UTR von Mtss1.....	59
Abbildung 12  Überschneidungen verschiedener Vorhersagemodelle für miRNA-Bindung. ....	60
Abbildung 13  Microarray Analyse: Mtss1 bindende MiRNAs. ....	63
Abbildung 14  Mtss1 Expression in der postnatalen Entwicklung des Cerebellums.....	66
Abbildung 15  Immunfluoreszenz Analyse: Cerebelläre Expression der IMD-Proteinfamilie. ....	69
Abbildung 16  Klonierung des DLA-Reporterkonstruktes (psiCHECK2.2) .....	70
Abbildung 17  Messung der funktionellen Wirksamkeit der miRNA-Bindestellen am 3'UTR von Mtss1 mittels Luciferase Reporteranalysen. ....	72
Abbildung 18  Konzentrationsabhängige Regulation der miRNA-abhängigen Repression. ....	74
Abbildung 19  Kombinatorische Wirkung miRNA-abhängiger Repression .....	75
Abbildung 20  Vergleichende Expressionsanalyse von miR-23, miR-182 und miR-206 .....	78
Abbildung 21  Enrichmentanalyse kombinierter miRNAs mittels DIANA miR-Path. ....	79
Abbildung 22  Enrichmentanalyse kombinierter miRNAs für verschiedene Krebsarten. ....	80
Abbildung 23  Enrichmentanalyse kombinierter miRNAs mittels DAVID.....	82
Abbildung 24  MiRNA regulierte Gene der Aktincytoskelett Regulation.....	84
Abbildung 25  Impedanzanalyse zur Messung des Zellspreitens. ....	85
Abbildung 26  Einfluss von miR-23, miR-182 und miR-206 auf das Zellspreiten .....	86
Abbildung 27  Einfluss kombinierter miRNAs auf das Zellspreiten .....	87
Abbildung 28  Immunfluoreszenzanalysen an NIH3T3 Zellen.....	89
Abbildung 29  Vergleich der Proliferationsraten miRNA behandelte Zellen mittels Impedanz.....	90
Abbildung 30  Quantifizierung der miRNA abhängigen Regulation von Mtss1 in NIH3T3-Zellen durch qRT-PCR. ....	92
Abbildung 31  MiR-182 behandelte Körnerzellkulturen weisen eine reduzierte Dendritenkomplexität auf. ....	94

Abbildung 32  Quantifizierung der miR-182 abhängigen Regulation von Mtss1 Protein durch Western-Blot Analysen.....	95
Abbildung 33  Dendritenkomplexität miR-182 behandelter cerebellärer Körnerzellkulturen.....	96
Abbildung 34  Bestimmung der Neuritenkomplexität einzelner Körnerzellen.....	97
Abbildung 35  Modell der sterischen Hinderung am 3'UTR.....	121
Abbildung 36  Einfluss von miR-182/ -206 auf Zielgene, welche die Dendritogenese regulieren.....	132
Abbildung 37  Potentieller Einfluss von miR-23, miR-182 und miR-206 auf das Zellspreiten.....	135

# TABELLENVERZEICHNIS

---

Tabelle 1  Verwendete Geräte .....	23
Tabelle 2  Bezugsquellen der verwendeten Substanzen .....	25
Tabelle 3  PCR Analyse zur Amplifikation der 3'UTR Sequenzen aus BL/6. ....	26
Tabelle 4  verwendete Primer(qRT-PCR).....	26
Tabelle 5  Verwendete siRNAs. ....	27
Tabelle 6  Verwendete miRNA-Mimics .....	27
Tabelle 7  Verwendete miRNA-Inhibitoren .....	27
Tabelle 8  Verwendete Bakterienstämme .....	28
Tabelle 9  Verwendete Zelllinien.....	28
Tabelle 10  Verwendete primäre Antikörper. WB: Western Blot, ICC: Immunzytochemie. ....	28
Tabelle 11  Verwendete Sekundäntikörper .....	29
Tabelle 12  Verwendete Software.....	29
Tabelle 13  PCR Ansatz.....	35
Tabelle 14  Temperaturprogramm für die Ermittlung der optimalen Annealing Temperatur:.....	35
Tabelle 15  Temperaturprogramm für die qRT-PCR .....	36
Tabelle 16  Transfektionsreagentien und optimierte Zelldichte .....	39
Tabelle 17  Messprogramm Luminometer für DLA .....	41
Tabelle 18  Zusammensetzung PAGE-Gele.....	45
Tabelle 19  Differentielle Expression von cerebellären miRNAs zwischen P8 und Adult.....	54
Tabelle 20  Vergleich der Vorhersagen zwischen TargetScan, PicTar und miRanda.....	62
Tabelle 21  Putative IMD-Protein spezifische miRNAs.....	65
Tabelle 22  Postnatale Expression der IMD Proteine in Zellschichten des Cerebellums .....	67
Tabelle 23  Untersuchung der miRNA Regulation auf Kooperativität.....	76
Tabelle 24  Zielgene Mtss1-regulierender miRNAs bei der Aktin Cytoskelett Reorganisation .....	83



# DANKSAGUNG

---

*Ich danke insbesondere Herrn Professor Dr. Karl Schilling für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, in einer hervorragend ausgestatteten wissenschaftlichen Einrichtung zu arbeiten. Des Weiteren möchte ich Britta Eiberger und ihren technischen Assistenten Helma Langmann und Andrea Christ für Ihre experimentelle Unterstützung danken.*

*Herrn Prof. Dr. Dieter Fürst danke ich für die Übernahme des Koreferats.*

*Für die Korrektur dieser Arbeit bedanke ich mich bei Frau Dr. Sabine Topka, Herrn Dr. Oliver Tress und Herrn Dr. Felix Tacke. Vor allem aber möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Karl Schilling bedanken, der in mühsamer Arbeit und Geduld auch in der Entwurfsphase der Schriftform immer konstruktiv zur Seite stand.*

*Schließlich möchte ich mich auch bei allen Kollegen des Anatomischen Institutes bedanken, die immer hilfreich und freundlich mit kompetenten Ratschlägen zur Seite standen.*

*Meinen ganz besonderen Dank, sowohl für die seelische Unterstützung, als auch für die nützlichen Diskussionen und Hilfestellungen gilt meiner Freundin Sabine Topka. Oliver Tress und Felix Tacke standen mir immer als gute Freunde zur Seite. Und letztlich möchte ich mich vor allem bei lieben Mitmenschen bedanken, die in dieser zeitweise sehr schwierigen Zeit einfach für mich da waren.*





# 1 EINLEITUNG

---

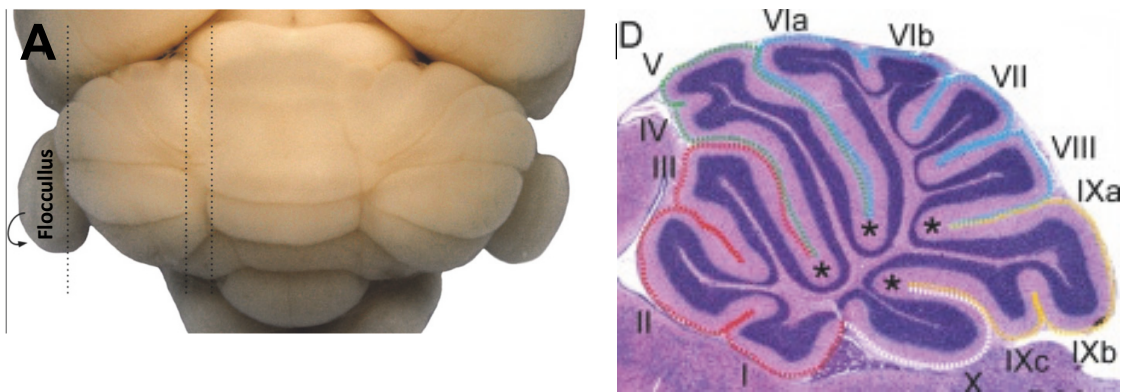
*Obwohl das Kleinhirn nur etwa 10% des gesamten Hirnvolumens ausmacht, enthält es ungefähr die Hälfte aller Neurone. Es ist daher nicht verwunderlich, dass es das wichtigste Integrationszentrum für die Verarbeitung von Signalen ist, die vorrangig eine Koordination und Feinabstimmung von Bewegungsabläufen gewährleisten. Mittlerweile weiß man, dass auch andere wichtige Prozesse wie Sprachfindung und Affektverhalten maßgeblich über das Kleinhirn gesteuert werden. Gerade die Entwicklung dieses Hirnanteils ist also von besonderem Interesse. Das Cerebellum ist eine der ersten Hirnregionen, die mit der Differenzierung beginnt – gleichzeitig schließt seine Reifung bei der Maus erst einige Wochen und beim Menschen sogar erst einige Monate postnatal ab. Seine klare histologische Struktur und diese lang andauernde Entwicklung machen das Kleinhirn zu einem der am meisten untersuchten Objekte neuronaler Differenzierung. Während der postnatalen Reifung des Cerebellums vollziehen Körnerzellen ein gut charakterisiertes sequenzielles Programm der Differenzierung. Dieses wird durch die Expression einer Vielzahl von Genen begleitet, die jeweils eindeutig einer Phase der Neurogenese zugeordnet werden können. Körnerzellen eignen sich in hervorragender Weise, um verschiedene Stadien der Neurogenese zu studieren. Darüber hinaus spiegelt sich die differentielle Expression einzelner Gene in ihrem eindeutigen räumlichen Expressionsmuster innerhalb des laminar aufgebauten Cerebellums wider.*

---

## 1.1 AUFBAU UND FUNKTION DES KLEINHIRNS (*MUS MUSCULUS*)

### 1.1.1 ÄUßERE GESTALT UND STRUKTUR DES KLEINHIRNS DES MAUS

Das Kleinhirn (lat. *cerebellum*) befindet sich in der hinteren Schädelgrube und sitzt dem Pons von dorsal her auf (siehe Abbildung 1B). Makroskopisch ist das Kleinhirn in zwei Hemisphären und den dazwischenliegenden Wurm (lat. *vermis*) aufgeteilt. Kaudal des Vermis findet man den *Flocculus*, der über eine stielartige Struktur, die man als *Nodus* bezeichnet, mit dem Vermis verbunden ist und als *Lobus flocculonodularis* zusammengefasst wird.



**Abbildung 1 | Das Cerebellum der adulten Maus.**

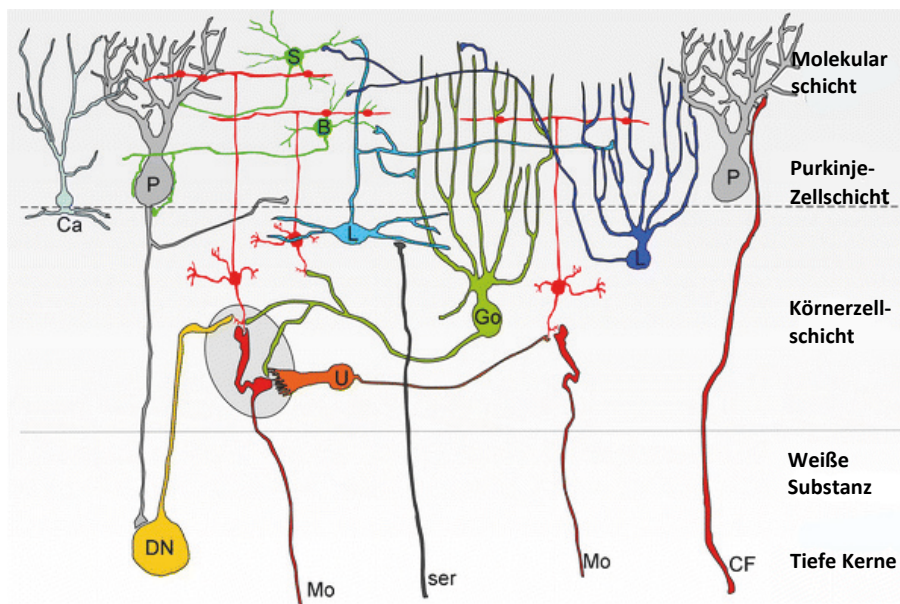
(A) Anatomisch wird das Kleinhirn der Maus in der mediolateralen Achse in drei Regionen unterteilt: *Vermis*, *Paravermis* und die Hemisphären. Ganz lateral befinden sich die *Paraflocculi* und *Flocculi* (Verändert nach White & Siltoe) (B) Sagittale Schnittebene und Lage des Cerebellums. Durch Bildung der Folia wird das Cerebellum in 10 distinkte Lobuli (I-X) eingeteilt; Hauptfissuren sind mit einem Stern gekennzeichnet (aus Sudarov & Joyner, 2007).

Zwei weitere *Lobi* sind erkennbar und werden entsprechend ihrer Lage als *lobus anterior* und *lobus posterior* bezeichnet. Die gesamte cerebelläre Oberfläche ist von feinen, parallel verlaufenden Einkerbungen gekennzeichnet, die eine fortlaufende Struktur der als Kleinhirnrinde bezeichneten Schicht gewährleisten. Die dadurch entstehenden Windungen werden als *Folia* bezeichnet und dienen der Oberflächenvergrößerung. Insgesamt bilden sich während der Entwicklung zehn *Lobuli*, die mit römischen Ziffern durchnummeriert werden (siehe Abbildung 1B). Die drei Kleinhirnstiele (lat. *pedunculus cerebellaris superior*, *pedunculus cerebellaris medius*, *pedunculus cerebellaris inferior*) enthalten die zu- und abführenden Bahnen des Cerebellums und verbinden dieses mit dem Hirnstamm. Aufgrund der Verschaltung kann man das Kleinhirn funktionell in folgende drei Anteile gliedern: *Vestibulocerebellum* (VCb), *Spinocerebellum* (SCb) und *Pontocerebellum* (PCb). Das VCb besteht im Wesentlichen aus *Nodulus* und *Flocculus* (*lobus flocculonodularis*) und erhält seine Afferenzen überwiegend aus den Vestibulariskernen des Innenohrs. Das SCb besteht vorwiegend aus dem *Vermis* und der intermediären Zone (siehe Abbildung 1A) und erhält seine Afferenzen hauptsächlich vom Rückenmark, welches vor allem Informationen über den Muskeltonus und die Lage von Rumpf und Extremitäten übermittelt. Das PCb besteht ausschließlich aus den beiden Hemisphären. Afferente Verbindungen erhält es hauptsächlich

aus den Brückenkernen (*nuclei pontis*) und zum Teil über den unteren Olivenkernkomplex (*nucleus olivares*).

### 1.1.2 ZELLSCHICHTEN DES KLEINHIRNS

Die nach außenliegende Schicht des Kleinhirns, die auch als Kleinhirnrinde oder *cortex cerebelli* bezeichnet wird, enthält im Wesentlichen drei erkennbare Zellschichten. Das *Stratum moleculare* (Molekularschicht; ML), das *Stratum purkinjense* (Purkinje-Zellschicht; Pj) und das *stratum granulosum* (Körnerzellschicht; IGL), welche die Korb-/Sternzellen (ML), Purkinje-Zellen und Bergmann Glia (Pj), beziehungsweise Körnerzellen, Golgizellen und Astrozyten (IGL) enthalten (siehe Abbildung 2). Über die innenliegende weiße Substanz erreichen afferente Fasern die Rinde. Hier finden sich auch Purkinje-Zellaxone. Sie enthält die Fasergänge, Astrozyten, Oligodendrozyten, und die tiefen Kerne und rundet somit die vollständige Struktur des Cerebellums ab (Altman and Bayer, 1987). Es gibt drei Arten von Afferenzen im Kleinhirn: Die Moosfasern, die exzitatorischen Kletterfasern und diffus organisierte, mono-aminerge und cholinerge Eingänge aus der *formatio reticularis*.



**Abbildung 2 | Zellschichten des Cerebellums und seine Verschaltung.**

Golgizellen werden als ein Zelltyp zusammengefasst (Go). Inhibitorische Golgi (G), Korb-(B), Sternzellen (S), inhibitorische Lugaro zellen (L), Klassische Lugaro-Zellen (Lu), exzitatorische Körnerzellen (Gc) und exzitatorische unipolare Bürstenzellen (U). Kletterfasern (CF), Moosfasern (Mo), (P) Purkinje-Zellen, (ser) serotoninerge Affrenzen. (Schema aus Schilling et al., 2008)

Die wesentlichen Neuronentypen im Cerebellum sind die Körnerzellen, die die größte neuronale Zellpopulation des Cerebellums darstellen; die großen Purkinje-Zellen und zwei inhibitorische Interneuronentypen, die Golgizellen und die Korb-/Sternzellen (Cajal, 1906; Mugnaini et al., 1988). Die multipolaren Körnerzellen sind relativ klein ( $\varnothing$  5-10 $\mu$ m), nutzen Glutamat als Neurotransmitter und gehören neben den unipolaren Bürstenzellen zu den erregenden Zellen der Kleinhirnrinde. Jeweils mehrere Körnerzellen werden durch eine Moosfasernendigung (Rosette) kontaktiert. Die dabei entstehenden komplexen Synapsen bezeichnet man als *glomeruli cerebellares*. Diese schließen auch den inhibitorischen Kontakt der Golgizellen mit ein. Die Axone von Körnerzellen sind unmyelinisiert und ascendieren durch die zellarme Molekularschicht, wo sie sich gabeln und Dendriten der Purkinje-Zellen kontaktieren. Purkinje-Zellen sind große, GABA-erge Neuronen, die als einzige efferente Zellen der Kleinhirnrinde mit den Kleinhirnkernen und dem *nucleus vestibularis* verschaltet sind. Die Verästelungen ihrer Dendritenbäume sind initial relativ glatt; während ihre distalen Verästelungen mit kleinen protrusionsartigen Strukturen, den so genannten *spines* überzogen sind. Die Parallelfasern bilden hier Kontakte und enden auch dort. Die proximalen glatten Äste sind ausschließlich durch inhibitorische Afferenzen (Crepel et al., 1976) innerviert. Golgizellen und Korb/Sternzellen zählen zu den inhibitorischen Interneuronen des Cerebellums. Golgizellen sind mit den Körnerzellen verschaltet und üben auf diese eine negative Rückkopplung aus. Die Anwesenheit zweier Transmitter; GABA und Glycin, und die unterschiedliche Lokalisation, Morphologie und neurochemischen Charakteristika, unterscheidet die Golgizellen deutlich von den Korb-/Sternzellen. Letztere sind GABA-erg und kommen nur in der Molekularschicht vor, wo sie eine negative Vorwärtskopplung zu den Purkinje-Zellen ausüben (Voogd et al., 1996). Neben den vier Haupttypen von Zellarten des Cerebellums gibt es auch andere seltener beschriebene Zelltypen (siehe Abbildung 2). Unter ihnen zu erwähnen sind die Candelabrum Zellen, Lugaro Zellen und die unipolaren Bürstenzellen.

### 1.1.3 FUNKTION

Das Cerebellum stellt ein Koordinationszentrum für sensorische Signale aus der Peripherie dar, die hier verarbeitet und moduliert werden, um Bewegung und Gleichgewicht zu gewährleisten. Dabei erreichen die sensorischen Informationen das so genannte - 'präcerebelläre System'—eine Gruppe von Kernen im Hirnstamm. Mit Ausnahme des unteren

Olivenkernkomplexes, projizieren diese Kerne ihre Information zu den Körnerzellen, die wiederum mit den Purkinje-Zellen kommunizieren. Die Axone des unteren Olivenkernkomplexes senden ihre Informationen auf direktem Weg zu den Purkinje-Zellen bzw. zu den tiefen Kernen des Kleinhirns. Während die Rolle des Kleinhirns bei sensomotorischen Funktionen und dem Gleichgewichtssinn seit langem bekannt sind (Ito, 2006), zeigen neuere Studien auch einen Einfluss auf kognitive Funktionen wie z.B. sensomotorisches Lernen, Sprache, räumliches Wahrnehmungsvermögen und sogar Affektverhalten (Boyden and Raymond, 2003; Fiez and Petersen, 1998; Fiez et al., 1996; du Lac, 1996; Schmahmann and Caplan, 2006; Timmann and Daum, 2010; De Zeeuw and Yeo, 2005).

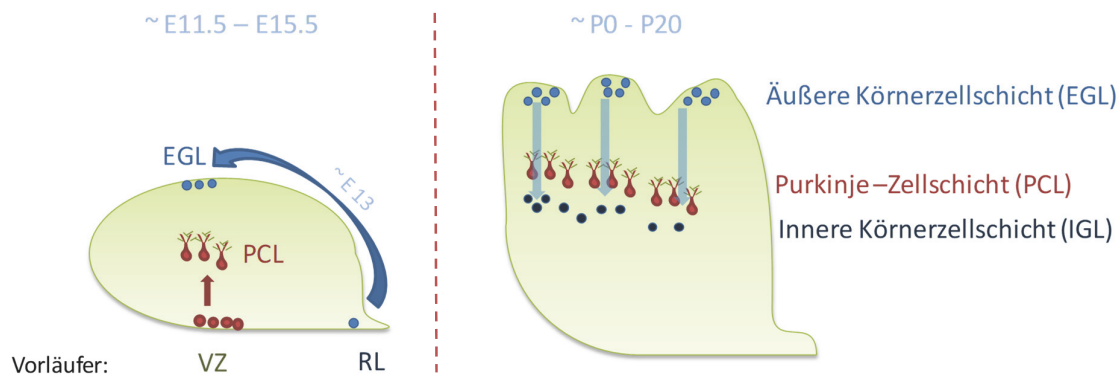
## 1.2 DIE KÖRNERZELLE DES KLEINHIRNS DER MAUS ALS MODELL NEURONALER ENTWICKLUNG

Die Körnerzellen des Kleinhirns sind die größte neuronale Population im ZNS von Vertebraten. Ihre äußere Struktur ist mit vier kurzen unverzweigten Dendriten relativ einfach aufgebaut. Sie stellen außerdem ein sehr gut untersuchtes System neuronaler Entwicklung dar und eignen sich daher in hervorragender Weise für Studien neuronaler Differenzierung. Auch für das Verständnis neuronaler Migration sind sie besonders interessant. Sie bilden hierbei eine Ausnahme, indem sie zwei verschiedene Migrationsarten nacheinander nutzen, um schließlich ihren Zielort, die innere Körnerzellschicht, zu erreichen (Saghatelian et al., 2004; Watanabe and Murakami, 2009). Eine weitere Besonderheit von Körnerzellen ist, dass sie erst später, sobald sie die äußere Körnerzellschicht (EGL) erreicht haben, damit beginnen massiv zu proliferieren bevor sie postmitotisch werden (Altman, 1972). Ihre maximale Proliferation ist bei der Maus erst postnatal um etwa P5-P8 erreicht. Zwischen ihrer Entstehung und dem Ende der zweiten postnatalen Woche beginnen die nun postmitotischen Körnerzellvorläufer, die äußere Körnerzellschicht zu verlassen und danach vertikal in die entstehende IGL einzuwandern. Diese außergewöhnlichen Vorgänge wurden durch S. Ramón y Cajal bereits Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben. In diesem Kapitel soll kurz erläutert werden, welche Faktoren und Mechanismen zu dieser speziellen dualen Migration und postnatalen Proliferation der Körnerzellen beitragen.

### 1.2.1 KÖRNERZELLENTWICKLUNG IM ÜBERBLICK

Körnerzellvorläufer (GCPs) entstehen an einer Struktur des Metencephalons - der so genannten Rautenlippe (RL), die sich am posterioren Teil der cerebellären Anlage befindet (siehe Abbildung 3) und dem vierten Ventrikel benachbart ist. Um den Embryonaltag 12.5 (E 12.5) beginnen GCPs entlang der äußeren Oberfläche der cerebellären Anlage tangential zu migrieren. Dabei entsteht eine sekundäre neurogene Zone an der Oberfläche der Kleinhirnanlage – die äußere Körnerzellschicht (EGL). Die Körnerzellidentität der Vorläufer in der oberen Rautenlippe wird maßgeblich von Transkriptionsfaktoren - insbesondere *Atoh1/Math1* (Machold and Fishell, 2005; Wang et al., 2005) - und sekretorischen Faktoren wie FGFs (engl. *fibroblast growth factors*) und BMPs (engl. *bone morphogenetic proteins*) reguliert (Hogan, 1996). Die größte Anzahl der Vorläufer ist an der Bildung der EGL beteiligt, während eine Subpopulation von *Math1*-positiven Vorläufern der Rautenlippe mit dem Pool von Vorläufern cerebellärer Kerne (*cerebellar nuclei progenitors*) in tiefere Regionen der cerebellären Anlage als Subpopulation der Neuronen der tiefen Kerne migriert (Fink et al., 2006; Morales and Hatten, 2006; Wang et al., 2005). In der EGL findet die sogenannte klonale Expansion statt, die in einer oberen Schicht teilungsaktiver GCPs und einer unteren Schicht mit neu generierten Körnerzellen resultiert. Diese Proliferation benötigt unter anderem die Expression des Morphogens *sonic hedgehog (Shh)* (Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999). Proteine der *Zic* Familie können die Aktivität des Transkriptionsfaktors *Gli2* modulieren (Mizugishi et al., 2001) und so die *Shh*-vermittelte Proliferation steuern. Zwar wird *Shh* endogen in Purkinje-Zellen erst ab E17 gebildet, steht aber wahrscheinlich schon vorher über die cerebrospinale Flüssigkeit im vierten Ventrikel zur Verfügung (Huang et al., 2010). Gene der Zellzyklus Regulation wie z.B. *Cycline* spielen ebenfalls eine wichtige Rolle hierbei. Damit Vorgänge wie der Zellzyklusarrest der Körnerzellvorläufer und die Migration regelgerecht ablaufen können, sind eine Reihe zeitlich gut abgestimmter Prozesse notwendig, einschließlich chemischer und elektrischer Signalprozesse. Um P0 beginnt sich die EGL aufzulösen - denn nun migrieren postmitotische Körnerzellvorläufer in einer nach innen gerichteten radialen Weise durch die Molekularschicht hindurch, wobei sie entlang der radialen Gliafasern wandern (Hatten, 2002; Rakic, 1971). Hierbei bekommen sie zunächst eine bipolare Form und bilden axonale Strukturen die man als Parallelfasern bezeichnet. Das Cerebellum gewinnt während dieser

Phase enorm an Volumen (mehr als 1000-fach) und wandelt sich von einem röhrenförmigen Gebilde zu einem komplexen neuronalen Organ mit fingerartigen Strukturen, die man als Foli bezeichnet, um. Mit Ende der dritten postnatalen Woche ist die Proliferation der GCPs abgeschlossen und ihre Migration in die innere Körnerzellschicht beendet.

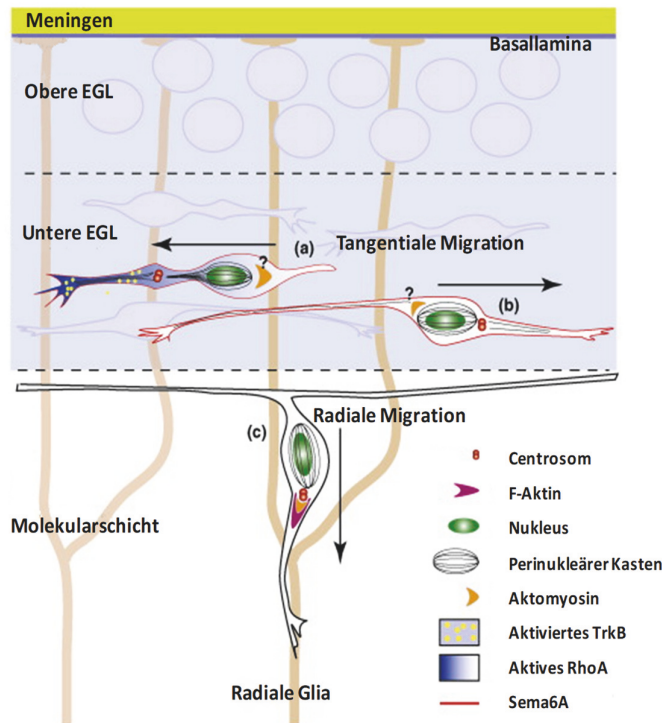


### Abbildung 3 | Entwicklung des Cerebellums: Migration von Körner- und Purkinje-Zellen

Körnerzellvorläufer entstehen an der Rautenlippe (RL) am posterioren Teil der cerebellären Anlage. Um E13-E14 beginnen diese Zellen aus der RL in Richtung Oberfläche zu migrieren (Pfeile), um dort die EGL zu bilden. Dort findet ihre klonale Expansion statt, die bis in die frühe postnatale Phase andauert. Anschließend beginnt ihre Differenzierung und sie migrieren radial nach innen, um dort die IGL zu bilden. Im Gegensatz hierzu bilden sich Vorläufer der Purkinje-Zellen in der Ventrikularzone (VZ). Diese Zellen stellen ihre Proliferation um die Phase E14 ein und beginnen dann zu differenzieren. Postmitotische Purkinje-Zellvorläufer migrieren radial.

## 1.2.2 REGULATION DER ZELLPOLARITÄT WÄHREND DER MIGRATION VON KÖRNERZELLEN

Körnerzellen des Kleinhirns machen während ihrer Entwicklung tiefgreifende morphologische Veränderungen durch und stellen dabei ein gut untersuchtes Beispiel der Zellpolarität während der neuronalen Migration dar. Die Moleküle welche die tangentielle Migration regulieren sind größtenteils noch unbekannt. Teilweise sind Faktoren beschrieben, die eine Regulation von diversen Prozessen der Zellpolarität, Zelladhäsion, Migration, und Differenzierung dieser Strukturen erklären könnten. Zu ihnen zählen unter anderem Chemokine wie *CXCL12* (*SDF-1 $\alpha$* ), Transkriptionsfaktoren wie *FOXO1*, Rezeptoren wie *Unc5h1-3* und Signalmoleküle wie die der Slit-Familie (Aldinger et al., 2009; Vilz et al., 2005; Zhu et al., 2004).



#### Abbildung 4 | Strukturen und Mechanismen der tangentialen und radialen Migration

(a) GCs der unteren EGL werden unipolar, migrieren tangential parallel zur Oberfläche mit einem führenden Fortsatz. Die Polarität wird durch Aktivierung des *TrkB* Rezeptors und *RhoA* Akkumulation im führenden Fortsatz reguliert.

(b) GCs werden bipolar und das Centrosom ist wieder in der gegenüberliegenden Seite der Zelle lokalisiert.

(c) GCs wechseln zur radialen Migration, indem sie einen weiteren Fortsatz bilden, der sich nun Richtung ML und IGL bewegt.

GC: Körnerzellen, EGL: äußere Körnerzellschicht, IGL: innere Körnerzellschicht, ML: Molekularschicht

Verändert nach Chedotal et al., 2010

Hier sollen vor allem die postnatalen Migrationsereignisse fokussiert werden, die mit drastischen Veränderungen der äußeren Zellform verbunden sind (siehe Abbildung 4). Sobald Körnerzellen die EGL erreicht haben, stellen sie vorerst die Migration ein. Hierbei müssen sie sich zunächst von der extrazellulären Matrix (ECM) der Meningen lösen (Sievers et al., 1994). Dabei bilden sich ihre Fortsätze zurück und sie nehmen vorübergehend eine runde Zellform ein (Altman, 1972). Danach setzt in der oberen EGL eine massive Proliferation ein. Das anschließende Umschalten von tangentialer auf radiale Migration wird von verändertem Substrat, Zellpolarität sowie Expression an Membranproteinen begleitet. Dabei verbleiben die neu gebildeten axonalen Strukturen, die man als Parallelfasern bezeichnet, stabil in der Molekularschicht (ML) während der vordere Anteil samt Nucleus durch die Molekular- und Purkinje-Zellschicht in die innere Körnerzellschicht migriert (Rakic and Sidman, 1973). Dies geht mit drastischen Veränderungen der Zellmorphologie der Körnerzellen einher (Komuro et al., 2001). Die Zellpolarität tangential migrierender Körnerzellen nimmt hierbei eine besondere Rolle ein (Umeshima et al., 2007). In diesem Prozess können Plexine und andere Proteine, *Rho*-GTPasen wie *Rac1* aktivieren und dadurch die Migration beeinflussen



(Kholmanskikh et al., 2003). Beim Umschalten auf radiale Migration scheint das Neurotrophin *BDNF* besonders wichtig zu sein. Zum Einen wird es von postmitotischen Körnerzellen der IGL exprimiert und wirkt autokrin, indem es die Motilität *TrkB*-abhängig stimuliert, andererseits führt die höhere Konzentration an *BDNF* in der IGL zur Gradientenbildung, die die Körnerzellen in Richtung IGL lenkt (Zhou et al., 2007). Die Migration ist um P20 abgeschlossen; zeitgleich mit der Bildung der Foli.

### 1.2.3 AKTIN-ABHÄNGIGE STRUKTUREN DER PLASMAMEMBRAN INITIIEREN DIE MIGRATION

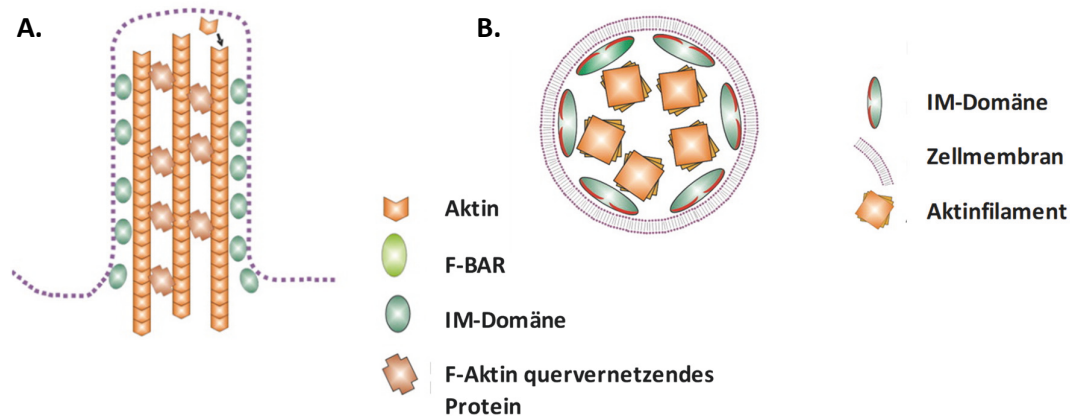
Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, erfordert die neuronale Migration von Körnerzellen eine dynamische und räumliche Reorganisation des Cytoskeletts. Insbesondere die Aktinfilamentreorganisation ist für die neuronale Migration, das Axon-wachstum und seine Steuerung essentiell (Dent and Gertler, 2003; Kawauchi and Hoshino, 2007; Luo, 2000; da Silva and Dotti, 2002; Witte and Bradke, 2008). Erste dynamische Strukturen, die dabei am Zellrand sichtbar werden, sind protrusionsartige Veränderungen der Membran, die je nach Form als Lamellipodia bzw. Filopodia bezeichnet werden. Jede dieser Strukturen trägt je nach Anforderung zur Migrationsbewegung der Zelle bei. Lamellipodia können sich beispielsweise über eine lange Distanz erstrecken und erlauben so den Durchtritt von Zellen in verschiedene Gewebe (Friedl and Gilmour, 2009). Filopodia hingegen erkunden die unmittelbare Umgebung von Zellen und sind insbesondere für die zielgerichteten Steuerungen verantwortlich, wie beispielsweise die Ausbildung von neuronalen Wachstumskegeln und Bildung angiogener Blutgefäße (Eilken and Adams, 2010; Gupton and Gertler, 2007). Beide Strukturen können koexistieren und sind typischerweise am fortlaufenden vorderen Zellrand zu finden. Wichtige Regulatoren dieser Prozesse sind die GTPasen, die hierbei wie Guanin Nukleotid gesteuerte molekulare Schalter wirken. *Cdc-42* vermittelt die Bildung von Filopodia und aktiviert *Rac1*, welches *PDGF*-abhängig Lamellipodia und Membranausstülpungen (*ruffles*) bildet (Nobes and Hall, 1995; Ridley and Hall, 1992). Beide GTPasen können die Bildung von Fokaladhäsionen induzieren. Die GTPase *Rho* fördert den Zusammenbau der kontraktilen Aktomyosin Filamente durch Lysophosphatidylsäure (LPA) vermittelte Antwort. Des Weiteren kann *Rac* durch aktiviertes Ras aktiviert werden, welches Wechselwirkungen zwischen *Ras* und *Rho*-GTPasen zeigt. Dabei wird *RhoA* am fortlaufenden Zellrand fortwährend aktiviert, während *Cdc42* und

*Rac1* zeitlich verzögert hinter dem Zellrand aktiv werden (Kraynov et al., 2000; Kurokawa and Matsuda, 2005; Nalbant et al., 2004; Pertz et al., 2006). Dies impliziert das *Rac1* und *RhoA* durch räumliche Trennung und präzises Timing antagonistisch arbeiten. *RhoA* scheint eine Rolle in der initialen Entwicklung der Protrusionen zu spielen, während *Rac1* und *Cdc42* Signalwege aktivieren die für den Wiederaufbau und Erhalt der neu gebildeten Strukturen sorgen. Interessanterweise scheint *Rac1* für die neuronale Differenzierung cerebellärer Körnerzellen und deren Migration essentiell zu sein. Bei *Rac1*-defizienten Mäuse sind die *WAVE/WASP* Komplexe nicht mehr mit der Plasmamembran assoziiert. Dies führt gleichzeitig zu einer gestörten Bildung von Lamellipodia und zu damit zusammenhängenden Migrationsdefekten von Körnerzellen (Tahirovic et al., 2010).

### 1.3 DIE IMD (I-BAR) PROTEIN- FAMILIE

Die dynamischen Formänderungen der Zelle erfordern wie bereits beschrieben das Zusammenspiel des Cytoskeletts sowohl mit äußeren Faktoren, als auch intrinsischen signalgebenden Faktoren. Dies setzt eine effektive Kopplung des Cytoskeletts an die Plasmamembran (PM) voraus, welches u.a. durch sogenannte Membran-deformierende Proteine, zu welchen auch die inverse Bin-Amphiphysin-Rvs (I-BAR) Proteinfamilie gehört, reguliert bzw. vermittelt werden kann. Insbesondere die Bildung von protrusionsartigen Strukturen wie Filopodia (siehe Abbildung 5) und Lamellipodia kann durch I-BAR Proteine induziert werden. Sie binden hierbei bevorzugt am inneren Faltblatt von Phosphoinositidreichen Membrandomänen (Saarikangas et al., 2010) und erzeugen dabei eine negative (konvexe) Verformung der Membran (Lee et al., 2007; Millard et al., 2005; Scita et al., 2008). Die I-BAR Proteinfamilie besteht aus insgesamt fünf Mitgliedern, die neben *Mtss1* und *Mtss1*-like (*Mtss1*; *Abba*) auch *Baiap2* und seine phylogenetischen Abkömmlinge *Baiap2-like1* (*Baiap2l1*) und *Baiap2-like2* (*Baiap2l2*) enthält. Die Anwesenheit unterschiedlicher Proteindomänen zeichnen sie als Proteine aus, die mit Aktin-assoziierten Prozessen während der Morphogenese und Migration beteiligt sind (Dawson et al., 2006; Frost et al., 2007; Itoh and De Camilli, 2006; Scita et al., 2008). Ihnen gemeinsam ist die IRSp53/MIM-Domäne (IMD) mit denen sie als Mediatoren zwischen Aktincytoskelett Reorganisation und der PM fungieren können. Dies geht mit einer kontrollierten Interaktion mit *Rho*-GTPasen einher, die

maßgeblich als Regulatoren dieser Prozesse fungieren (Heasman and Ridley, 2008). IMD-Proteine können auch Aktin-unabhängig eine Verformung der Membran induzieren (Nakagawa et al., 2003; Suetsugu et al., 2006). Inwieweit dies *in vivo* eine Rolle spielt, ist noch unklar. Die Mechanismen, durch welche diese Proteine die Zellmorphogenese steuern, und deren Rolle in verschiedenen Geweben und malignen Tumoren sind weitgehend unverstanden.



**Abbildung 5 | Funktion von IMD-Proteinen bei der Bildung von Filopodia**

**A.** Seitenansicht der IMD-induzierten Filopodiumbildung. **B.** Schematische Darstellung der Röhrenbildung durch die IM-Domäne an der Membran. MIM/IMD verformt die Membran, indem sie innen an die Röhre/Protrusion bindet. Dieser Prozess ist weitgehend von der Aktinregulation abhängig. (Abb. verändert nach Mattila et al., 2007)

### 1.3.1 METASTASIS SUPPRESSOR 1 (MTSS1)

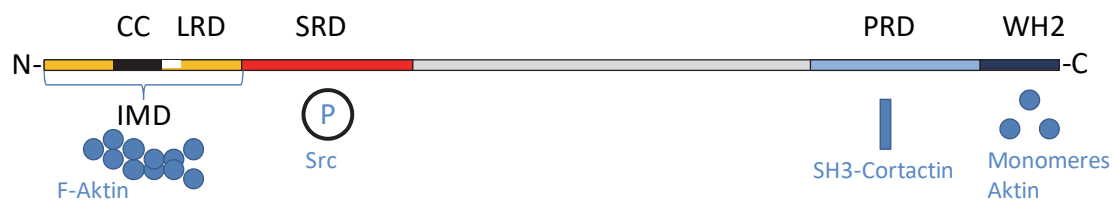
Interessanterweise wird ein prominenter Vertreter der IMD-Familie, *Mtss1*, während der Körnerzell-Migration im Cerebellum exprimiert. *Mtss1*, dessen Abkürzung für den Namen Metastasis suppressor 1 steht (auch als MIM für engl. *missing in metastasis* oder *BEG-4* engl. *basal enriched gene 4* bezeichnet), wurde erstmals durch Lee et al. 2002 als möglicher Suppressor der Metastasierung in Blasenkrebszelllinien beschrieben. *Mtss1* ist häufig in metastasierenden Zellen herunter reguliert (Wang et al. 2007), was oft mit einer reduzierten Motilität dieser Zellen verbunden ist (Callahan et al., 2004; Lee et al., 2002; Liu et al., 2010b). Mittlerweile wurde *Mtss1* in zahlreichen unterschiedlichen Krebsarten wie Brust-, Prostata- und Magenkrebs beschrieben (Loberg et al., 2005; Nixdorf et al., 2004a; Parr and Jiang, 2009). Metastasierende Tumore mit hoch regulierter *Mtss1* Expression sind weniger häufig zu finden

(Machesky and Johnston, 2007). Während der embryonalen Entwicklung wird *Mtss1* überwiegend im Herz, Muskel und im zentralen Nervensystem exprimiert. In der adulten Maus findet man es vor allem in der Leber, in Pukinje-Zellen des Cerebellums und in der Niere (Mattila et al., 2003). In der Epidermis wird *Mtss1 Shh*-abhängig exprimiert und moduliert hier die Gli-regulierte Transkription (Bershteyn et al., 2010; Callahan et al., 2004). Überexpression von *Mtss1* führt zur Auflösung von Aktinstressfasern und Bildung von „Microspikes“ und Membranausstülpungen (Woodings et al., 2003).

#### 1.3.1.1 AUFBAU UND FUNKTION VON *MTSS1*

Das Gen *Mtss1* befindet sich bei der Maus (*Mus musculus*) auf Chromosom 15 und besteht aus 15 Exonen. *Mtss1* ist bei Vertebraten hochkonserviert und die Homologie zwischen Mensch und Maus beträgt 96%. Bei der Maus wurden vier Isoformen beschrieben. Das hauptsächlich translatierte Protein besteht aus 759 Aminosäuren und besitzt C-terminal ein WASP-homology 2 (WH2) Motiv (siehe Abbildung 6), über welches monomeres GTP-Aktin gebunden werden kann (Mattila et al., 2003). N-terminal befindet sich die 250 Aminosäure lange Dimerisierungsdomäne, die die Bildung eines Homodimers erlaubt (Lee et al., 2007; Millard et al., 2005), welches über seine amphipathische Helix in das innere Blatt der Membran inserieren kann (Bhatia et al., 2009; Madsen et al., 2010; Saarikangas et al., 2009). Die *coiled-coil* Domäne (CC), welche sich innerhalb der IMD befindet, könnte in die *Mtss1* Dimerisierung und gleichzeitig in die Aktin Quervernetzung involviert sein und wäre somit essentiell für die Veränderungen des Cytoskelettes (Gonzalez-Quevedo et al., 2005). Die Serin-reiche Domäne (SRD) enthält zwei Phosphorylierungsstellen (Tyr-397 und Tyr-398), welche unter *PDGF* Behandlung zu einer *Src*-abhängigen Tyrosin Phosphorylierung führen (Wang et al., 2007). Die Prolin-reiche Domäne (PRD) interagiert mit der SH3 Domäne von Cortactin (Lin et al., 2005). Ko-lokalisations Studien zeigen, dass die AS 408-538 des *Mtss1*-Proteins eine *RPTP- $\delta$*  bindende Region enthalten (Gonzalez-Quevedo et al., 2005). Die MIM I-BAR Domäne vermag unter bestimmten Bedingungen in vitro an quervernetztes F-Aktin zu binden (Gonzalez-Quevedo et al., 2005) und ist direkt mit *Rac1* assoziiert (Bompard et al., 2005). Unter physiologischen Bedingungen konnte eine direkte Interaktion mit F-Aktin jedoch nicht bestätigt werden. Somit wird diese essentielle Funktion von *Mtss1* für die Aktincytoskelettorganisation kontrovers diskutiert und kann hinterfragt werden (Lee et al., 2007; Mattila et al., 2007a; Saarikangas et

al., 2009; Suetsugu et al., 2006). Die Überexpression von *Mtss1* und anderer rekombinanter I-BAR-Proteine führt zu einer erhöhten Zusammenlagerung von PI(4,5)P<sub>2</sub>-haltige Membranen (Mattila et al., 2007b) und schließlich zur Bildung von Lamellipodia und Membranprotrusionen mit Filopodia-förmigen Strukturen (Suetsugu et al., 2006; Yamagishi et al., 2004). *Mtss1* erhöht eine *Arp2/3*-vermittelte Aktin Polymerisation durch Interaktion mit *Cortactin*, während eine WASP-vermittelte Aktin Polymerisation gehemmt wird (Lin et al., 2005). Des Weiteren kolo-kalisiert *Mtss1* mit *E-Cadherin*, wodurch die *in vitro* Aktinpolymerisation gefördert wird (Lin et al., 2005; Saarikangas et al., 2011a). *Mtss1* ist außerdem in die Erhaltung von Zilien während der *de novo* Haarfollikel Bildung involviert (Bershteyn et al., 2010). *Mtss1* ist ebenfalls wichtig für die regelgerechte Entwicklung der Niere und B-Zellreifung bei Mäusen (Yu et al., 2012). Ein Gen Knock-Out des Gesamtproteins für *Mtss1* führte zu völlig normal entwickelten Tieren. In späteren adulten Stadien lag lediglich eine Prävalenz für abnormale Veränderungen der Nierentubuli vor. Allerdings vermuten die Autoren dieser Studie, dass weiterhin eine kürzere *Mtss1*-Variante transkribiert wird, wodurch eine gewisse Kompensation ohne vollständigen Funktionsverlust denkbar wäre (Saarikangas et al., 2011a).



#### Abbildung 6 | *Mtss1*: Struktur des *Mtss-1* Proteins

Schematische Darstellung der Proteinstruktur mit ausgewählten Funktionen (blaue Schrift). Die IMD-Domäne (IMD) ist die funktionelle Domäne des *Mtss1* Proteins. Die restlichen Domänen sind wichtig für Interaktionen oder chemische Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen. IMD: IRSp53/MIM-Domäne; CC: Coiled-Coiled; LRD: Lys-reiche-Domäne; SRD: Ser-reiche-Domäne; PRD: Pro-reiche Domäne; WH2: WASP homology 2 Domäne. (Verändert nach Lin et al., 2005)

Das Gen *Mtss1* wird im Kleinhirn entwicklungspezifisch reguliert: In postmitotischen, migrierenden Körnerzellen sind mehrere *Mtss1* Genprodukte (Spleißprodukte/Transkripte) nachweisbar. Sobald die Körnerzellen ihre Migration beendet haben und sich in der inneren Körnerzellschicht ansiedeln, stellen sie allmählich die Expression von *Mtss1* ein. Dabei kommt es bei zunehmender Differenzierung zum Wechsel der Spleißvariante, wobei Exon 12 durch Exon 12a ersetzt wird. Purkinje-Zellen exprimieren ebenfalls die Spleißvariante mit Exon 12a;

jedoch bleibt hier die *Mtss1* Expression im adulten Tier erhalten (Glassmann et al., 2007). Aktuelle Studien an *Mtss1* KO-Mäusen zeigen zudem eine reduzierte Dichte an dendritischen Protrusionen in Purkinje-Zellen und eine veränderte glutamaterge synaptische Übertragung, die mit Verhaltensänderungen assoziiert sind (Saarikangas et al., 2015). Für die cerebelläre Entwicklung ist *Mtss1* besonders interessant, da es neben der entwicklungsabhängigen Expression in Körnerzellen zusätzlich eine differentiell exprimierte Spleißvariante besitzt. Extrazelluläre Faktoren wie *Shh* und *PDGF* können in bestimmten Geweben dessen Expression induzieren. *Shh* ist ebenfalls essentiell für die Entwicklung des Cerebellums vor allem aufgrund seines Einflusses auf die Reifung und Proliferation von Körnerzellen. Auch eine regulatorische Wirkung von *Mtss1* auf die Aktivität von *Rho*-GTPasen ist bekannt (Yu et al., 2011; Zhan et al., 2016). Aufgrund der weiter oben beschriebenen Funktionen bei der Formänderung der Zellmembran und seiner Interaktionen mit Proteinen, die in der Aktincytoskelett Reorganisation und Zell-Adhäsion involviert sind, ist *Mtss1* ein hervorragender Kandidat, um die zelltypspezifische Expression von Körnerzellen zu regulieren. In welcher Weise die damit verbundenen morphologischen Veränderungen bei Migrations- und Motilitätsbewegungen mechanistisch erklärt werden können, ist noch völlig ungeklärt.

Die Regulation der zelltypspezifischen Expression könnte durch unterschiedliche Szenarien stattfinden. Denkbar wäre, dass *Mtss1* epigenetisch über Methylierung inhibiert werden kann, da Methylierungssequenzen im Promoterbereich vorhanden sind (Utikal et al., 2006). In einigen Zelllinien in denen *Mtss1* herunterreguliert ist, konnte jedoch keine Hypermethylierung der Promoterregion festgestellt werden (Nixdorf et al., 2004b). In Lebertumoren konnte gezeigt werden, dass *Mtss1* durch die Methylase *DNMT3B* über einen DNA-Methylierungs-unabhängigen Mechanismus gehemmt werden kann. *DNMT3B* bindet dabei direkt an die 5'-flankierende Region des *Mtss1* Locus und hemmt somit dessen Transkription (Fan et al., 2012). Eine weitere Möglichkeit der Regulation besteht durch eine posttranskriptionale Herunterregulation durch MicroRNAs (miRNAs). *Mtss1* besitzt mehrere Bindesequenzen für miRNAs im 3'-untranslatiertem Bereich (3'UTR) seiner mRNA. Entwicklungsspezifisch regulierte miRNAs im Cerebellum der Maus könnten daher für die Regulation der Expression von *Mtss1* verantwortlich sein und hierüber die Migration und Neuritogenese von Körnerzellen beeinflussen.

## 1.4 MICRORNAS

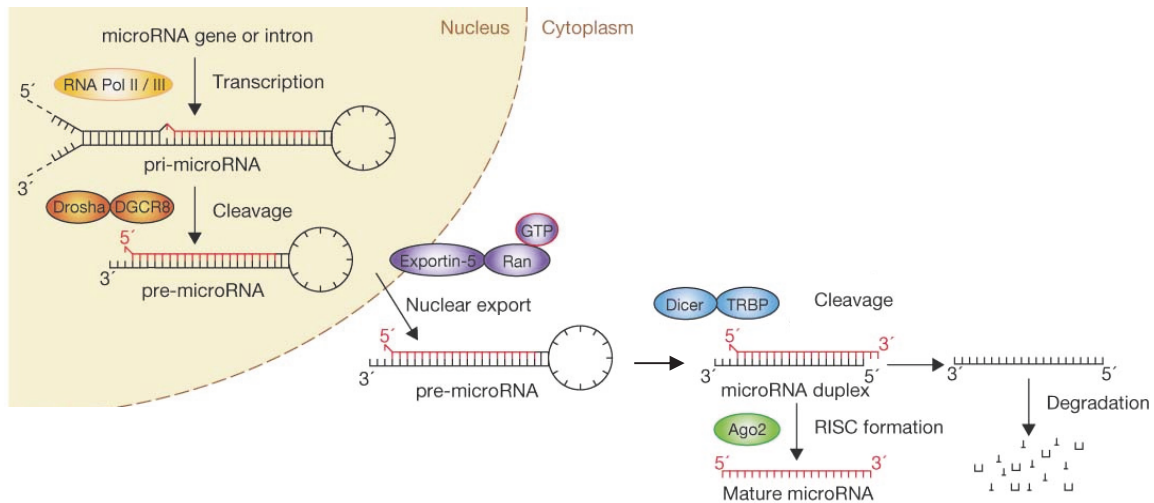
MicroRNAs (miRNAs) gehören einer mittlerweile großen Familie der „small non-coding RNAs“ an und besitzen eine Länge von ca. 21 bis 22 Nukleotiden. MiRNAs werden nicht translatiert und gehen somit nicht den klassischen Weg der Genexpression. Sie kommen als epigenetische Regulatoren der Genexpression in Metazoen und Pflanzen vor. Charakteristisch ist, dass sie aus einer Vorläufer Haarnadelstruktur-RNA hervorgehen, welche den Kern verlässt und weiter zum doppelsträngigen Endprodukt prozessiert wird. Das Prinzip ihrer Wirkung basiert auf der so genannten RNA-Interferenz (RNAi) (Fire et al., 1998). Diese baut auf der Beobachtung auf, dass von außen eingeführte RNA (Doppel- oder Einzelsträngig) durch komplementäre Anlagerung an die endogene mRNA zu einer Herunterregulation (oder „silencing“) eines Zielgens führen kann. Dies kann durch den direkten Abbau der mRNA durch RNAsen oder durch eine verzögerte Translation durch Inhibition des Translationskomplexes geschehen. Man spricht dann von einer induzierten posttranskriptionalen Herunterregulation (engl. *induced post-transcriptional gene silencing*; IPTGS).

Extensive Transkriptomanalysen aus 223 Spezies haben bis 06/2014 zur Identifikation von insgesamt 28645 pre-miRNAs geführt (miRBASE Datenbank Release 21 ; June2014; Griffiths-Jones 2006), die schließlich zur Expression von 35828 reifen miRNAs führen. Es sind 1881 miRNA Loci beim Menschen (lat. *homo sapiens*) annotiert und 1908 bei der Maus (lat. *mus musculus*). Das bedeutet, dass deutlich mehr als 1% des humanen Genoms für miRNAs kodieren; ferner wird geschätzt, dass mehr als die Hälfte unserer proteinkodierenden Gene über miRNAs reguliert werden (Friedman et al., 2009a; Lewis et al., 2005). Sie werden gewebespezifisch und/oder entwicklungsabhängig exprimiert und tragen daher im Wesentlichen zur Zellidentität bei. Ihre Interaktion mit der mRNA lässt kooperative Regulation zu, d.h. mehrere miRNAs können zugleich eine mRNA regulieren; umgekehrt kann eine miRNA an mRNAs unterschiedlicher Gene binden (Friedman et al., 2009a; Krek et al., 2005).

#### 1.4.1 MICRORNA-BIOGENESE: ENTSTEHUNG UND PROZESSIERUNG

MiRNAs leiten sich überwiegend aus RNA-Pol II spezifischen Transkripten unabhängiger Gene ab oder können aus Introns (MiRtrons) proteinkodierender Gene entstehen (Carthew and Sontheimer, 2009; Kim et al., 2009b). In wenigen Fällen werden miRNA Gene zusammen mit ihren Zielgenen transkribiert (Mraz et al., 2012 Lisse et al., 2013). Zunächst besteht jede miRNA aus einem unterschiedlich langen Primärtranskript, welches sich zu einer oder mehreren Haarnadelschleifenstrukturen (engl. *hairpin-loops*) faltet und wird daher als *primary microRNA* (pri-miRNA) bezeichnet (siehe Abbildung 7). Diese wird durch einen Proteinkomplex aus der RNase-Typ-III Endoribonuklease *Drosha* und dem dsRNA-bindenden Protein DGCR8 (Pasha) erkannt und zunächst in die so genannte *precursor miRNA* (pre-miRNA) weiterprozessiert. Diese hat nun eine Länge von ca. 70 Nukleotiden und besitzt einen 2-Nukleotid-Überhang am 3'-Ende sowie eine Schleife. Die pre-miRNA wird anschließend durch Exportin-5 (*XPO5*) aus dem Zellkern exportiert und durch eine weitere Typ-III Endonuklease namens *Dicer* zu einem etwa 22bp langen Doppelstrang ohne Schleife gespalten. Hierbei sind dsRNA-bindende Proteine (dsRBPs) und *transactivation-responsive RBPs* (TRBPs) beteiligt. Der so entstandene miRNA-Duplex wird durch eine Helicase entwunden und anschließend können entweder beide Stränge aktiv bleiben oder wie überwiegend stattfindend, der Komplementärstrang (engl. *passenger strand* oder miRNA\*) zügig abgebaut werden (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Daher entwickelt sich meistens nur ein Strang zur reifen miRNA (engl. *mature miRNA* oder *guide strand*). Zusammen mit der Argonaut-Proteinfamilie (AGO) wird nun der miRISC-Komplex (Du and Zamore, 2005) gebildet, der die Ansteuerung der Ziel-mRNA einleitet und schließlich die Spaltung der miRNA-gebundenen mRNA katalysiert. Dies führt letztlich zur Reduktion des „steady-state“ Levels an mRNA (Guo and Lu, 2010) und ist bis auf wenige Ausnahmen der vorwiegende Weg einer Inhibition der Genexpression bei Mammalia.





**Abbildung 7 | Micro-RNA Biogenese (Verändert nach Winter et al., 2009)**

Darstellung des kanonischen Weges der Micro-RNA-Biogenese in Mammalia. Neben dem hier dargestellten Weg gibt es auch andere Möglichkeiten der Micro-RNA Prozessierung, welche in mehreren Review Artikeln diskutiert und dargestellt wurden (Winter et al. 2009; Krol et al., 2010).

#### 1.4.2 MICRORNA-TARGETING: MECHANISMUS DER MRNA-ERKENNUNG UND PROZESSIERUNG

MiRNAs sind generell doppelsträngig und können erst in Einzelstrangform an ihre Zielsequenz binden. Sie können letztlich nur in komplexer Form als *miRNA induced silencing complex* (miRISC) mit ihrer Zielsequenz interagieren und somit die Genexpression beeinflussen. Üblicherweise findet bei Mammalia die Bindung im 3'UTR der Ziel-mRNA durch Watson-Crick Basenpaarung statt (Bartel, 2009a; Rigoutsos, 2009). Manchmal können Interaktionen im Exonbereich von Genen stattfinden und seltener sind Bindestellen im 5'-UTR der mRNA funktionell und nachgewiesen (Jopling et al., 2005; Luo et al., 2008; Tay et al., 2008). Das 5'-seitige Ende der miRNA Sequenz zwischen dem zweiten und siebten Nukleotid (Seedregion) ist von besonderer Bedeutung, da hier die Basenpaarung bis auf wenige Ausnahmen 100% komplementär und daher unerlässlich für die miRNA:mRNA-Interaktion ist (Lewis et al., 2003, 2005). In wenigen Ausnahmefällen kann eine nicht perfekte Basenpaarung an der „Seedregion“ 3'-seitig durch starke Bindungskräfte kompensiert werden. Bei der miRNA-Bindestelle (auch MRE bezeichnet: (engl.) *MiRNA recognition element*) gibt es verschiedene Parameter, die für die Affinität zwischen miRNA:mRNA verantwortlich sind. Diese können

daher zur Validierung der Bindewahrscheinlichkeit herangezogen werden. Generell gilt, dass in unstrukturierten und AU-reichen Regionen die Bindewahrscheinlichkeit erhöht ist und daher effizienter ist. Dies basiert auf energetische Aspekten wie der freien Enthalpie und der sterischen Hinderung durch Sekundärstrukturen. Mehrere Bindestellen erhöhen zusätzlich die Effizienz und verstärken somit das Ausmaß der Regulation.

Im Gegensatz zur miRNA-vermittelten Regulation in Pflanzen interagiert bei Mammalia nicht die vollständige miRNA. Dies führt dazu, dass es nicht zwangsläufig zum endonukleolytischen Abbau der Ziel-mRNA durch Argonaute (AGO-Proteine) als regulativen Mechanismus kommt (Llave, 2004; Yekta et al., 2004). Führt die miRNA:mRNA Interaktion zum direkten Abbau der Ziel-mRNA, können auch weitere Abbau-Zyklen durch die gleiche miRNA katalysiert werden (Hutvágner and Zamore, 2002). Die Bindung des miRISC, welcher neben RISC-Proteinen auch *Glycin-Tryptophan Protein mit 182kDa (GW182)* enthält, kann zur Rekrutierung von Deadenylierungsfaktoren führen, die den Poly-Adenin-Schwanz entfernen und somit die mRNA für einen exonucleolytischen Abbau zugänglich machen (Braun et al., 2011; Fabian et al., 2011; Giraldez et al., 2006; Wu et al., 2006). Neben Deadenylierungsfaktoren können auch andere Proteine rekrutiert werden, welche eine Degradation oder eine translationale Repression auslösen können. Der Mechanismus ist weitgehend unklar. Studien zeigen dass der von *GW182* rekrutierte *CCR4-NOT*-Komplex zum einen deadenyliert, aber auch zur Repression der Initiation der Translation führt (Braun et al., 2011; Fabian et al., 2011). Die translationale Repression kann über mRNA Degradation, translationale Inhibition oder eine Kombination aus beiden Mechanismen erfolgen. Weitere Studien an Zebrafischen (*miR-430*) und Drosophila Zellen (*miR-9*) zeigen, dass eine translationale Repression, unabhängig von mRNA-Deadenylierung, durch eine Unterbrechung der translationalen Initiation erfolgen kann (Bazzini et al., 2012; Djuranovic, 2012). Insgesamt werden neun Mechanismen der Repression diskutiert, die in ihrer Konsequenz entweder zum mRNA-Abbau oder Hemmung der Translation führen können. Es gibt deutliche Hinweise, dass diese Mechanismen auch parallel stattfinden; zudem kann sogar die Transfektionsmethode in Kulturzellen den vorwiegenden Mechanismus beeinflussen. Gelegentlich können miRNAs auch zu Histon Modifikationen und DNA Methylierung von Promotor-Regionen führen und hierdurch die Expression der betreffenden Zielgene beeinflussen (Hawkins and Morris, 2008; Zhang et al., 2009).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei Mensch und Maus (Mammalia) die teilweise komplementäre Basenpaarung mit nachfolgender Degradation der mRNA den überwiegenden miRNA Signalweg darstellt (Baek et al., 2008).

### 1.4.3 MICRORNA REGULATION IN DER NEURONALEN ENTWICKLUNG

Die neuronale Entwicklung ist ein besonders interessantes System für die Untersuchung der Genregulation durch miRNAs. Durch ihre entwicklungspezifische Expression sind miRNAs essentiell für die Neurogenese und die neuronale Reifung (Kapsimali et al., 2007). Bestimmte miRNAs sind außerdem neuronal angereichert und üben durch eine Repression von nicht-neuronalen Genen eine aktive Rolle bei der neuronalen Induktion und dem Erhalt der Zelltypspezifität aus. *MiR-124* beispielsweise ist im neuronalen Gewebe angereichert und fördert außerdem die neuronale Genexpression in Vorläuferzellen (Smirnova et al., 2005). Das Konzept der *de novo* Proteinsynthese in neuronalen Strukturen wie Dendriten und Synapsen sowie eine Anreicherung von spezifischen miRNAs und Proteinen der miRNA Regulation (*Dicer*, AGO-Proteine) in diesen Bereichen liefern starke Indizien für eine Regulation durch lokale Proteinsynthese (Barbee et al., 2006; Lugli et al., 2005). Eine der ersten miRNAs für die Regulation der Dendritengröße wurde im Labor von R. Goodman 2005 untersucht und beschrieben. Es handelt sich um *miR-132*, welche  $Ca^{2+}$ -abhängig vom Transkriptionsfaktor *Creb* reguliert wird. Im Einklang mit der beschriebenen Funktion von *Creb* ist *miR-132* in neuronalen Kulturen essentiell für die Bildung von Neuriten (Vo et al., 2005; Wayman et al., 2008). Dies konnte auch *in vivo* bestätigt werden (Magill et al., 2010). Interessanterweise haben *miR-124* und *miR-132* einen wachstumsfördernden Einfluss auf die Dendritenbildung, die über ihre spezifische Regulation der Aktivität von *Rho*-GTPasen moduliert wird. *Rho*-GTPasen sind essentielle Regulatoren des dendritischen Aktinzytoskelettes und üben daher eine Schlüsselrolle bei der Dendritenbildung aus.

Auch die Anreicherung bestimmter miRNAs in neuronalen Geweben kann Aufschluss über deren Rolle geben. So sind im Cerebellum unter anderem die miRNAs *miR-195*, *miR-497* und *miR-30b* gegenüber anderen Hirnregionen angereichert (Bak et al., 2008a). Eine kritische Rolle für miRNAs in der cerebellären Entwicklung konnte durch konditionale Deletion von *Dicer* in Purkinje Zellen demonstriert werden (Schaefer et al., 2007). Dies führte zum Absterben von

Purkinje-Zellen und insgesamt zur Degeneration des Cerebellums, welches phänotypisch mit Ataxie dieser Mäuse verbunden war. In Körnerzellen führte der konditionale K.O. von *Dicer* (Constantin and Wainwright, 2015) zu einer dünneren EGL und dezimierten IGL, welches insgesamt eine reduzierten Größe des anterioren Cerebellums zur Folge hatte. Deletion von *Dicer* in Astroglia führte zur Apoptose von Körnerzellen und Degeneration von Purkinje-Zell Dendriten in der späten postnatal Phase (P55–P65) (Tao et al., 2011). Ein genereller K.O. von *Dicer* ist bei Mäusen embryonal lethal (Bernstein et al., 2003). Die Ergebnisse dieser Studien legen nahe, dass miRNAs sowohl in Astrozyten als auch Neuronen essentiell für die Funktion und Entwicklung des Cerebellums sind und darüberhinaus die Wichtigkeit von RNA-Interferenz für die frühe embryonale Entwicklung.

## 1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss von MicroRNAs (miRNAs) auf die entwicklungsabhängige Regulation der Expression von *Mtss1* im Cerebellum der Maus untersucht. *Mtss1* wird in Körnerzellen des Cerebellums in einer recht kurz umrissenen Entwicklungsphase exprimiert und dessen Expression mit Beendigung ihrer Migrationsphase um P20 eingestellt. Der 3'-untranslatierte Bereich von *Mtss1* enthält zudem einige Bindestellen für miRNAs. Um diese zeitliche und zelltypspezifische Expression von *Mtss1* in cerebellären Körnerzellen (er)klären zu können, werden zunächst Expressionsdaten cerebellärer miRNAs ausgewertet. Die Expressions-Analyse umfasst Microarray-Daten zweier Entwicklungsstadien (P8/Adult) und soll zur Identifikation entwicklungsspezifischer miRNAs des Cerebellums führen. Hierbei wird angenommen, dass insbesondere gegenläufig zu *Mtss1* exprimierte cerebelläre miRNAs für dessen entwicklungsspezifische Regulation verantwortlich sein könnten. MiRNA-Bindestellen für die Regulation von *Mtss1* werden mit Hilfe dreier Vorhersagemodelle ermittelt und nur solche in Betracht gezogen, welche von allen Datenbanken vorhergesagt werden. Durch anschließende Klonierung des vollständigen 3'UTRs von *Mtss1* in das hier modifizierte Duale-Luciferasesystem können Reporteranalysen zur Bestätigung vorhergesagter miRNA Bindungen eingesetzt werden. Um zusammenhängend die Funktion dieser miRNAs für die Neuritogenese und insbesondere für die Migration von Körnerzellen nachvollziehen zu können, sollten anschließend

kombinierte Signalweganalysen durchgeführt werden. Durch funktionelle Experimente an primären Körnerzellkulturen könnten Rückschlüsse auf die Funktion *Mtss1*-regulierender miRNAs während der postnatalen cerebellären Entwicklung gewonnen werden und insbesondere ihr Einfluss auf die regelhafte Neurogenese von Körnerzellen im Cerebellum untersucht werden. Im Wesentlichen wird hierbei geklärt, ob dieser Einfluss über eine miRNA-vermittelte Reduktion der Expression von *Mtss1* ausgeübt werden könnte.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

Alle hier nicht näher aufgeführten Standardmethoden wurden nach allgemeinen Protokollen des Labors durchgeführt und sind u.a. in folgenden Dissertationen aufgeführt und ausführlich beschrieben (S. Topka (2014), M. Holst (2006) und C. Liebig (2007)). Zur Klonierung wurden Protokolle nach Molecular Cloning (3rd Edition; J.Sambrook & D.W. Russel; 2001) verwendet.

### 2.1 GERÄTE

**Tabelle 1 | Verwendete Geräte**

Gerät	Modell	Hersteller / Vertrieb
<b>Blotkammer</b>	NovaBlot Multiphor II System	Amersham, GE Healthcare Life Sciences
<b>Blotkammer</b>	Mini Trans-Blot	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<b>Digital-Kamera</b>	DT5	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
<b>Digital-Kamera</b>	DFC 350 FX	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
<b>Elektrophoresekammer</b>	SubCell Model 96	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<b>Elektrophoresekammer</b>	Minigel-Twin	Whatman Biometra, Göttingen
<b>Geldokumentation</b>	Geldoc 2000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<b>Geltrockner</b>	Model 583 Gel Dryer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<b>Hybridisierungs-Schrank</b>	BFD 53	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen
<b>Inkubator</b>	Innova 4000 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, New Jersey, USA
<b>Inkubator Zellkultur</b>	Hera Cell	Hereaus, Thermo Fisher Scientific
<b>Kaltlichtquelle</b>	KL1500LCD	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
<b>Luminometer (Mikroplatten)</b>	Orion	Berthold Detection Systems GmbH, Pfortzheim
<b>Mikroskop</b>	Axioskop 2 Mot	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
<b>Mikroskop</b>	Axiovert 135	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
<b>Mikroskop</b>	Axiovert 25	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena

<b>Mikroskop</b>	DM IRE2	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
<b>PCR-Thermocycler</b>	PTC-200 MJ Research Gradient Cycler	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
<b>PCR-Thermocycler</b>	Mastercycler egradient S	Eppendorf AG, Hamburg
<b>PH Meter</b>	350 pH/Temp/mV Meter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
<b>Photometer</b>	Life Science UV/Vis Spectrofotometer DU530	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
<b>Photometer</b>	µQuant Mikroplatten Spektralfotometer	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
<b>Real-Time PCR Cycler</b>	LightCycler 2.0 Instrument	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<b>Stereolupe</b>	Semi 200C	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
<b>Stromversorgung</b>	Electrophoresis Power Supply EPS 3501XL	Amersham, GE Healthcare Life Sciences
<b>Stromversorgung</b>	PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<b>Vortex-Schüttler</b>	Reagenzglasschüttler 444-1372	VWR International, Radnor, Pennsylvania (USA)
<b>Waagen</b>	Labstyle 303, AG204 Delta Range, PG503-S Delta Range	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
<b>Western Blot Detektor</b>	ImageQuant; LAS 4000 Mini	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, UK
<b>xCELLigence Real-Time-Cell-Analyzer</b>	RTCA DP Instrument	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<b>Zentrifugen</b>	Biofuge primo R, Biofuge primo, Biofuge pico, Multifuge 3 S-R	Hereaus, Thermo Fisher Scientific



## 2.3 CHEMIKALIEN UND ENZYME

Die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den folgenden Herstellern bezogen.

**Tabelle 2 | Bezugsquellen der verwendeten Substanzen**

<b>Firma</b>	<b>Vertrieb</b>	<b>Sitz</b>
<b>Abcam</b>	Abcam AG	Cambridge, UK
<b>AbD Serotec</b>	Molecular Probes Inc.	Eugene, USA
<b>ABgene</b>		Hamburg
<b>Agilent</b>	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
<b>Ambion</b>	Applied Biosystems	Darmstadt
<b>Amersham Biosciences</b>	GE Healthcare Europe GmbH	München
<b>Biomol</b>	Biomol GmbH	Hamburg
<b>BioRad</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
<b>Calbiochem</b>	Merck KGaA	Darmstadt
<b>Dako</b>	Dako Deutschland GmbH	Hamburg
<b>Dynal</b>	Invitrogen	Paisley, UK
<b>Eurogentec</b>	Eurogentec s.a.	Seraing, B
<b>Fermentas</b>	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
<b>Gibco</b>	Invitrogen	Paisley, UK
<b>Greiner</b>	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
<b>Hoechst</b>	Sanofi-Aventis	Frankfurt
<b>Invitrogen</b>	Invitrogen	Paisley, UK
<b>Macherey-Nagel</b>	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG	Düren
<b>Merck</b>	Merck KGaA	Darmstadt
<b>Millipore</b>	Millipore GmbH	Schwalbach
<b>Molecular Probes</b>	Invitrogen	Paisley, UK
<b>Nalgene</b>	Fisher Scientific GmbH	Schwerte
<b>New England Biolabs</b>	New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main
<b>Nunc</b>	Fisher Scientific GmbH	Schwerte
<b>Pierce, Perbio</b>	Perbio Science Deutschland	Bonn
<b>Promega</b>	Promega GmbH	Mannheim
<b>Qiagen</b>	Qiagen N.V.	Hilden
<b>Roche</b>	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim
<b>Serva</b>	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg
<b>Sigma</b>	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Seelze
<b>Stratagene</b>	Stratagene Europe	Amsterdam, NL
<b>Thermo Scintific</b>	Perbio GmbH	Bonn
<b>Upstate</b>	Millipore GmbH	Schwalbach
<b>Vector Laboratories</b>	Linaris Biologische Produkte GmbH	Wertheim

## 2.4 PRIMERSEQUENZEN

Oligonukleotidsequenzen für die PCR wurden mithilfe der Primer3 Software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/input.htm>) generiert und folgende Primer ausgewählt:

**Tabelle 3| PCR Analyse zur Amplifikation der 3'UTR Sequenzen aus BL/6.**

Primer Bezeichnung	Primer Sequenz 5' → 3'
Mtss1_Xba-3'UTR_fw	gctctagagcGGCGTGAAGAAGAC
Mtss1_Xba-3'UTR_rev	cgagatctcgGTTGGGGTTCAAGAGTCCAA
Abba1_3UTR_1_fw	AAACGCCCACTCCACCCCCT
Abba1_3UTR_1_rev	GAGGTGAGCGAAGCCGGCAG
Baiap2_3UTR_1_fw	TGGGCATGCATCTGGGCAGC
Baiap2_3UTR_1_rev	TGTGGCTTGGCCACACAGC

**Tabelle 4| verwendete Primer(qRT-PCR)**

Primer Bezeichnung	Primer Sequenz 5' → 3'
Mtss1_Ex11_mm_qPCR F	CCTGAACAGCGTCAACAG
Mtss1_Ex11_mm_qPCR R	AGGTTAGAGCTGCGGTAC
GAPDH_mm_qPCR F	ACCCAGAAGACTGTGGATGG
GAPDH_mm_qPCR R	ACACATTGGGGGTAGGAACA

Primer Bezeichnung	Product Nr. (Exiqon)
miR-23b LNA PCR primer set (reverse)	204790-01
miR-23b LNA PCR primer set (forward)	204790-02
miR-182 LNA PCR primer set (reverse)	205089-01
miR-182 LNA PCR primer set (forward)	205089-02
miR-206 LNA PCR primer set (reverse)	204616-01
miR-206 LNA PCR primer set (forward)	204616-02

## 2.5 siRNA/MIRNA SEQUENZEN

**Tabelle 5 | Verwendete siRNAs.**

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
<b>Mtss1_siRNA (sense)</b>	GGCGGAUGUCCAAGCCAATT
<b>Mtss1_siRNA1 (antisense)</b>	UUGGCUUGGAACAUCGCGCTG
<b>GAPDH_siRNA (sense)</b>	GGUCGGAGUCAACGGAUUUTT
<b>GAPDH_siRNA (antisense)</b>	AAAUCCGUUGACUCCGACCTT

siRNAs wurden über Qiagen und Thermo Scientific bezogen (FlexiTube siRNA).

**Tabelle 6 | Verwendete miRNA-Mimics**

miRNA		Sequenz (5' → 3')
mmu-miR-23b-3p	MIMAT0000125	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC
mmu-miR-206-3p	MIMAT0000239	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG
mmu-miR-182-5p	MIMAT0000211	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACCG
mmu-miR-96-5p	MIMAT0000541	UUUGGCACUAGCACAUUUUUUGCU
mmu-miR15b-5p	MIMAT0000124	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA
mmu-miR-195a-5p	MIMAT0000225	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC
mmu-miR-103-3p	MIMAT0000546	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGAG
mmu-miR-200a-5p	MIMAT0004619	CAUCUUACCGGACAGUGCUGGA
mmu-miR-200b-3p	MIMAT0000233	UAAUACUGCCUGGUAUUGAUGA
mmu-miR-135a-5p	MIMAT0000147	UAUGGCUUUUUUAUCCUAUGUGA
mmu-miR-135b-5p	MIMAT0000612	UAUGGCUUUUCAUCCUAUGUGA

MiRNA Mimics wurden über Thermo Scientific bezogen.

**Tabelle 7 | Verwendete miRNA-Inhibitoren**

miRNA-Inhibitor (Product Number)	Sequenz (5' → 3')
<b>mmu-miR-23b-3p (411462-00)</b>	GGTAATCCCTGGCAATGTGA
<b>mmu-miR-182-5p (426857-00)</b>	TGTGAGTTCTACCATTGCCAA
<b>mmu-miR-206-3p (410132-00)</b>	CACACACTTCCTTACATTCC

## 2.6 BAKTERIENSTÄMME

Tabelle 8| Verwendete Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp
<b>XL1-blue (Stratagene)</b>	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)].
<b>ElectroTen-Blue (Stratagene)</b>	Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Kanr [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]

## 2.7 ZELLINIEN

Tabelle 9| Verwendete Zelllinien

Name	Zelltyp, Referenz	Quelle	ATCC Nummer
<b>Hek293</b>	Embryonale Nierenzelle, (Graham et al., 1977)	hu	ATCC CRL-1573
<b>NIH3T3</b>	Fibroblastenzelllinie, (Jainchill et al., 1969)	ms	ATCC CRL-1658
<b>D283Med</b>	Medulloblastom, (Friedman et al., 1985)	hu	ATCC HTB-185
<b>Daoy</b>	Medulloblastom, (Jacobsen et al., 1985)	hu	ATCC HTB-186
<b>P19</b>	Teratokarzinom, (Andrews et al., 1984)	ms	ATCC CRL-1825

## 2.8 ANTIKÖRPER

Tabelle 10| Verwendete primäre Antikörper. WB: Western Blot, ICC: Immunzytochemie.

Antikörper	Verdünnung	Anwendung	Spezies	Klonalität	Bezugsquelle
<b>anti-Mtss1</b>	1:125	WB	rb	polyklonal	IMGENEX
	1:1000	WB	ms	monoklonal	Abcam/Abnova
	1:500	WB, IF	rb	polyclonal	Cell Signaling
<b>anti- Mtss1l (Abba)</b>	1:1000	WB, IF	rb	Polyklonal	AB2209
<b>anti-Baiap2</b>	1:10001	WB, IF	ms	monoklonal(3F3-1D3)	Abnova
<b>anti-Baiap2L1</b>	1:1000	WB, IF	ms	monoklonal(2A4)	Abnova
<b>anti-Baiap2L2</b>	1:100	IF	rb	polyklonal	Atlas (HPA003043)
<b>anti-Cortactin</b>	1:500	WB	ms	monoklonal	C. Rottner
<b>anti-Cyclophilin</b>	1:10000	WB	rb	polyklonal	Abcam
<b>anti-GAPDH</b>	1:2500	WB	rb	polyklonal	Abcam (ab9485)
<b>anti-PCNA</b>	1:200	ICC	ms	monoklonal	Abcam (ab29)
<b>Anti-Cleaved Caspase-3</b>	1:1000	ICC	rb	monoklonal	Cell Signaling Technology (9664)
<b>anti-βIII Tubulin</b>	1:250	ICC	ms	monoklonal	Sigma (T8578)

**Tabelle 11 | Verwendete Sekundärantikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Goat anti-rabbit IgG-HRP</b>	1:10000- 1:20000	WB	gt	polyklonal	DAKO (P0448)
<b>Goat anti- mouseIgG-HRP</b>	1:10000- 1:20000	WB	gt	polyklonal	DAKO (P0447)
<b>Goat anti-rabbit IgG-Alexa Fluor 546</b>	1:3000	ICC	gt	polyklonal	Invitrogen (A11010)
<b>Goat anti-mouse IgG-Alexa Fluor 488</b>	1:500	ICC	gt	polyklonal	Invitrogen (A11001)

## 2.9 SOFTWARE

**Tabelle 12 | Verwendete Software**

<b>Name</b>	<b>Hersteller/Bezugsquelle</b>
<b>BeaconDesigner</b>	Premier Biosoft, Palo Alto, USA
<b>BioEdit Sequence Alignment Editor, Version 7.1.3.0</b>	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html">http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html</a>
<b>CFX Manager</b>	Biorad
<b>Clone Manager Professional 9</b>	Scientific & Educational Software, Cary, USA
<b>CorelDraw</b>	Corel GmbH, München
<b>Excel 2007</b>	Microsoft Co., Redmond, USA
<b>Graphpad Prism</b>	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
<b>ImageJ</b>	<a href="http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html">http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html</a>
<b>LightCycler Software 4.0</b>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<b>LSM Image Browser</b>	Carls Zeiss Microimaging GmbH, Jena
<b>Mendeley Desktop</b>	<a href="http://www.mendeley.com/download-mendeley-desktop/">http://www.mendeley.com/download-mendeley- desktop/</a>
<b>PowerPoint 2007</b>	Microsoft Co., Redmond, USA
<b>Primer 3</b>	<a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/input.htm">http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/input.htm</a>
<b>R Software</b>	<a href="http://www.r-project.org/">http://www.r-project.org/</a>

---

<b>RTCA Analyzer</b>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<b>Simplicity 2.0</b>	Berhold Detection Systems GmbH, Pforzheim
<b>Snap Gene</b>	GSL Biotech
<b>Word 2007</b>	Microsoft Co., Redmond, USA

---

## 2.10 ALLGEMEINE LÖSUNGEN UND PUFFER

### 2.10.1 LÖSUNGEN UND MEDIEN FÜR DIE ZELLKULTUR

Lösung	Zusammensetzung
<b>PBS<sup>-</sup> (pH 7,2)</b>	145 mM NaCl 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,0 → Sterilfiltriert
<b>DMEM++</b>	DMEM (Gibco, 11965) +10 % FCS (v/v) Foetale Bovine Serum (Gibco, 16000044) +50 µg/ml Gentamycin (Gibco, 15710-049, c= 50 µg/ml)
<b>Trypsin-EDTA</b>	0,05 % Trypsin-EDTA in 1 x PBS aus 0,5 % Trypsin-EDTA (Invitrogen, 15400-054) verdünnt.
<b>Einfrriermedium</b>	DMEM (Gibco, 11965) 50 % FCS (Gibco, 16000044)
<b>Konservierungsmedium</b>	DMEM (Gibco, 11965) 20 % DMSO (Sigma, D-2651)
<b>Neurobasal++</b>	Neurobasal (Gibco,21103-049) + B27 + Glutamax
<b>PLL</b>	0,2 mg/ml PLL (Sigma, P6282), in ddH <sub>2</sub> O gelöst
<b>4% PFA/PBS-DEPC</b>	8g PFA wurden bei 60-70°C in 160 ml 1x PBS-DEPC, unter Zugabe einiger Tropfen 5N NaOH, gelöst und auf 200 ml mit 1x PBS-DEPC aufgefüllt
<b>Permeabilisierung</b>	0,5 % (v/v) Triton X-100 (Sigma, X100), in PBS
<b>Kernfärbung (Hoechst)</b>	Sigma (≥ 98 %, B2261), 20 µg/ml wurden in PBS gelöst

## 2.10.2 LÖSUNGEN UND PUFFER (KLONIERUNG)

Lösung	Zusammensetzung
<b>DNA Extraktionspuffer</b>	100 mM NaCl 10 mM TrisCl, pH 8,0 25 mM EDTA, pH 8,0 0.5 % SDS Vor dem Gebrauch wurde jeweils 0,1 mg/ml Proteinase K zugegeben.
<b>TE-Puffer</b>	10mM Tris-HCL, pH 8,0 1mM Na <sub>2</sub> EDTA
<b>1x TBE-Puffer</b>	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM Na-EDTA, pH 8,0
<b>DNA-Ladepuffer</b>	0,25% [w/v] Bromphenolblau 0,25 % [w/v] Xylencyanol 30% Glycerol
<b>LB-Medium</b>	1,0 % (w/v) Select Peptone 140, 0,5 % (w/v) Select Yeast Extrakt, 1,0 % (w/v) NaCl, autoklaviert.
<b>LB- Agar</b>	1,5 % (w/v) Agar 1,0 % (w/v) Select Peptone 140 0,5 % (w/v) Select Yeast Extrakt 0,5 % (w/v) NaCl, autoklaviert.
<b>LB-Zusätze</b>	Ampicillin: 100 µg/ml Tetracyclin: 12,5 µg/ml IPTG: 0,1 mM X-Gal: 20 µg/ml
<b>Glycerol-Stocklösung</b>	65% Glycerol 0,025 M Tris-HCl (pH 8,0) 0,1 M MgSO <sub>4</sub>

---



### 2.10.3 LÖSUNGEN UND PUFFER FÜR DIE PROTEINANALYTIK

Lösung	Zusammensetzung
<b>RIPA-Lysis-Puffer</b>	50 mM Tris, pH 8,0 150 mM NaCl 1% NP-40 0,1% SDS 0,5% Sodium Deoxycholate Protease-Inhibitor Cocktail (Roche) vor Gebrauch!
<b>Semi-dry Transferpuffer</b>	48 mM Tris, pH 8,0 38 mM Glycin 10 % MeOH
<b>10x TBS</b>	50 mM Tris 150 mM NaCl, pH 7,5
<b>TBST</b>	1 x TBS mit Zusatz von 0,1 % Tween20
<b>Ponceau S</b>	0,5 % Ponceau S 1 % Eisessig
<b>Coomassie Farbstoff</b>	50 % Methanol 0,05 % Coomassie R-250 25 % Eisessig
<b>Blockierungspuffer</b>	5 % Milchpulver in 1 x TBS gelöst, filtriert
<b>“Stripping- Buffer”</b>	62,5 mM Tris, pH 6,8 2 % SDS 100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
<b>Sammelgelpuffer</b>	0,5 M Tris, pH 6,8 0,4% SDS
<b>Trenngelpuffer</b>	1,5 M Tris, pH 8,8 0,4% SDS
<b>40% (w/v) Acrylamid/Bis-Acrylamid</b>	AccuGel 29:1 (National Diagnostics)
<b>SDS Elektrophorese-Puffer (10x)</b>	250 mM Tris 192 mM Glycin 1,0 % (w/v) SDS
<b>SDS Probenpuffer (2x)</b>	62,5 mM Tris / HCl pH 6,8 25 % (w/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 0,001 % (w/v) Bromphenolblau 2 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol

## 2.11 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

### 2.11.1 RNA EXTRAKTION

Für die miRNA Extraktion aus cerebellären Gewebe wurde das miRCURY RNA Isolation Kit-Cell & Plant (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die Extraktion von RNA aus Zellen bzw. Primärzellkultur wurde mit der üblichen Methode unter Verwendung von Trizol (Sigma) durchgeführt. Für eine Extraktion aus dem Cerebellum der Maus wurde das Homogenat mittels eines Precellys Homogenisierers gewonnen. Es wurde zweimal für 10 Sek. bei 5000 rpm unter Verwendung von Keramikkügelchen mit einem Durchmesser von 1,4 mm homogenisiert.

### 2.11.2 REVERSE TRANSKRIPTION ZUR HERSTELLUNG VON CDNA

Nach photometrischer Bestimmung der RNA Konzentration wurden jeweils 5 µg RNA mithilfe der Superscript III Polymerase (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde der RNA jeweils 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 1 µl 50 µM OligoD(T) zugegeben und auf 13 µl mit Ampuwa aufgefüllt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 65°C wurden die Proben auf 0°C herunter gekühlt. Anschließend wurden sie mit 4 µl 5x Puffer und 2 µl 0,1 M DTT versetzt und für 2 min bei 42°C inkubiert. Daraufhin wurde die Synthese durch Zugabe von 1 µl Superscript III Polymerase (200 U/ µl) gestartet und für 1 h bei 42°C vollzogen. Anschließend wurde die Reaktion durch eine 15-minütige Inkubation bei 70°C für 15 min gestoppt und die Proben bei -20°C gelagert.

### 2.11.3 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

PCR AN CDNA, PLASMID DNA UND GENOMISCHER DNA

Zum Nachweis der Expression der verschiedenen Gene im Cerebellum und verschiedenen Zelllinien bzw. zur Amplifikation verschiedener 3'UTR aus dem Mausgenom (BL/6) wurden PCR-Reaktionen unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tabelle 13 | PCR Ansatz**

Komponente	Konzentration	Einsatz	Endkonzentration
Template	50 ng/ $\mu$ l	1-5 $\mu$ l	50-250 ng
PCR Puffer, +KCl (w/o) MgCl <sub>2</sub> )	10x	5 $\mu$ l	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	-	-
dNTP	10 mM	1 $\mu$ l	200 $\mu$ M
Sense Primer	5 $\mu$ M	1,50 $\mu$ l	100 nM
Antisense Primer	5 $\mu$ M	1,50 $\mu$ l	100 nM
Taq(Phusion)	5 U/ $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	1 U
H <sub>2</sub> O <sub>Milliq</sub>		ad 50 $\mu$ l	

**Tabelle 14 | Temperaturprogramm für die Ermittlung der optimalen Annealing Temperatur:****Standard Cycle Bedingungen Eppendorf S**

Schritt	Temp	Zeit	
1	94°C	3min	
2	94°C	30 s	30 x
3	48-57°C	30 s	
4	72°C	90s	
5	72°C	7 min	
6	4°C	Pause	

Folgende Annealing Temperaturen wurden für die betreffenden 3'UTRs ermittelt: Mtss1l : 59,4°C, Baiap2 58,8°C, Cctn: 59,7°C

**2.11.4 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR**

Die quantitative real-time PCR Analyse, basierend auf der vergleichenden C<sub>T</sub> Methode (Schmittgen and Livak, 2008), wurde auf dem Biorad System durchgeführt. Hierbei wurde das SYBR Green qPCR Kit (Thermo Scientific, F-420L) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die PCR Reaktion wurde nach folgendem Schema angesetzt:

iTaq Universal SYBR Green Supermix (2x)	5 $\mu$ l
Forward and reverse primer mix (Exiqon)	1 $\mu$ l
cDNA template	3 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	1 $\mu$ l

7 $\mu$ l aus diesem Ansatz wurden zu 3 $\mu$ l cDNA (1:40 Verdünnung) hinzugegeben. Dies entsprach einer Endkonzentration der cDNA von 5 ng/ $\mu$ l.

**Tabelle 15| Temperaturprogramm für die qRT-PCR**

qRT-PCR BioRAD			
Schritt	Temp	Zeit	
1	95°C	30s	
2	95°C	5 s	39 x
3	64°C	30 s	
4	65°-95°C	5s	
5	12°C	30s	

Das *Gapdh* Gen aus der Maus wurde als interner Standard verwendet. Die auf den Real Time PCR Daten basierende Genexpressionsanalyse wurde mit der Bio-Rad CFX-Manager Software (Bio-Rad) ausgewertet und mittels Prism (Version5; GraphPad Software Inc.) visualisiert.

### 2.11.5 KLONIERUNGSTECHNIKEN

#### 2.11.5.1 ENZYMATISCHE SPALTUNG VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Die Spaltung von DNA Fragmenten mithilfe von Restriktionsenzymen wurde mit den laut Herstellernangaben vorgeschlagenen Puffern und Inkubationstemperaturen durchgeführt. Bei einem analytischen Restriktionsansatz wurde jeweils 500 ng DNA mit 10 U Restriktionsendonuklease in einem Endvolumen von 10-20 µl über 2 h inkubiert. Für präparative Ansätze wurden jeweils 5 µg DNA mit 20 U Restriktionsendonuklease in einem Endvolumen von 30-50 µl für einen Zeitraum von mindestens 2 h bis über Nacht inkubiert.

#### 2.11.5.2 MODIFIKATION VON DNA FRAGMENTENDEN ZUR KLONIERUNG

Blunten: Zur Herstellung glatter DNA Fragmentenden wurde die T4 DNA Polymerase bzw. das große Fragment der *E. coli* DNA Polymerase I (Klenow Fragment) genutzt. Bei Verwendung der T4 DNA-Polymerase wurden die DNA-Fragmente mit dem entsprechenden Puffer, 33 µM dNTPs, 100 µg/ml BSA und 5 Units T4 DNA-Polymerase bei 12°C für 15min inkubiert. Die Reaktion wurde nach Zugabe von 10 mM EDTA durch Inkubation bei 75°C für 20 min gestoppt. Die Reaktion des Klenow Fragmentes wurde unter Zugabe von Puffer 2 (NEB), 33µM dNTPs und 5 Units Polymerase für 15min bei RT durchgeführt und anschließend nach Zugabe von 10 mM EDTA durch eine Inkubation des Ansatzes bei 75°C für 20 min abgestoppt.

Dephosphorylieren: Um bei der Ligation eines linearisierten Vektors mit einem Insertmolekül die Wahrscheinlichkeit einer Religation des Vektorrückgrades zu minimieren, wurden die freien 5'-Phosphatenden des linearisierten Vektors mithilfe der alkalischen Phosphatase abgespalten. Hierzu wurden alkalische Phosphatasen aus dem Kalb (CIP) bzw. aus der Eismeergarnele (SAP) verwendet. Die Dephosphorylierung wurde mit 2,5 Units CIP in dem bei der vorherigen Restriktion verwendeten Puffer bzw. mit 1-2 Units SAP in speziell für dieses Enzym empfohlenen Puffer bei 37°C für 60 min durchgeführt. Die SAP Reaktion wurde durch anschließende Inkubation bei 75°C für 15 min abgestoppt. Da die CIP nicht mittels Hitze inaktivierbar ist, wurde nach einer Inkubation mit diesem Enzym eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.1.4) oder die DNA mittels des NucleoSpin Plasmid Quick Pure Kits (Macherey-Nagel) aufgereinigt.

#### 2.11.5.3 LIGATION VON DNA FRAGMENTEN

Zur Ligation eines linearisierten Vektors mit einem Insertmolekül wurden DNA Fragmente in einem Ligationsansatz von 20 µl in einem Verhältnis von 1:3 - 1:7 (Vektor: Insert) gemischt und mit 400 Units T4 DNA Ligase (NEB) und 1 x konzentriertem T4 DNA Ligase Puffer für 2 h bei RT bzw. bei 16°C über Nacht inkubiert. Die T4 DNA-Ligase wurde anschließend bei 65°C für 10 min inaktiviert und die Ligationsansätze bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 2.11.5.4 TRANSFORMATION VON CHEMISCH KOMPETENTEN E.COLI BAKTERIEN MIT PLASMID DNA

Zur Transformation wurden jeweils 10 µl des Ligationsansatzes mit 100 µl chemisch kompetenten *E. coli* Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem anschließenden Hitzeschock bei 42°C für 45 s wurden die Zellen für 2 min auf Eis abgekühlt und mit 900 µl LB-Medium versetzt. Der Transformationsansatz wurde daraufhin bei 37°C unter schütteln (250 rpm) für 30-60 min inkubiert. Zum Ausplattieren wurden die Zellen bei 3000 rpm für 5 min pelletiert, das Medium abgeschüttet und die Zellen im Mediumrückstand resuspendiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB Agar-Platten, die mit dem entsprechenden Antibiotikum sowie, im Falle einer Blau/Weiß Selektion, zusätzlich mit IPTG und X-Gal versetzt waren, ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

#### 2.11.5.5 TRANSFORMATION VON ELEKTRISCH KOMPETENTEN E.COLI BAKTERIEN MIT PLASMID DNA

Zur Transformation wurden jeweils 40 µl elektrokompetenter ElectroTen bzw. 50 µl XI1 blue (Agilent) in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Biozym, 748010) gegeben und bei 1,8 kV und einer Zeitkonstante von 4 ms - 5,5 ms elektroporiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit LB-Medium auf 1 ml aufgefüllt und für etwa 60 min bei 37°C und 250 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Zum Ausplattieren wurden die Zellen bei 3000 rpm für 5 min pelletiert, das Medium abgeschüttet und die Zellen im Mediumrückstand resuspendiert.

#### 2.11.5.6 PRÄPARATION VON PLASMID DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das „NucleoSpin Plasmid QuickPure“ Kit (Macherey-Nagel, 740588), bzw. das „NucleoBond Extra Midi“ Kit (Macherey-Nagel, 740410) nach Herstellerangaben verwendet.

#### 2.11.5.7 SEQUENZIERUNG DOPPELSTRÄNGIGER DNA

Zur Sequenzierung der generierten Plasmide wurde der Sequenzierungsservice der GATC Biotech AG (Schwalbach) genutzt.

## 2.12 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

### 2.12.1 KULTIVIERUNG VON ZELLINIEN

Die in Tabelle 16 aufgeführten Zelllinien wurden unter üblichen Standardbedingungen (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) in einem Inkubator kultiviert. Passagieren und Einfrieren der Zellen wurde mit den üblichen zellbiologischen Methoden durchgeführt. Zellen wurden in der Gasphase des flüssigen Stickstoffs eingefroren.

### 2.12.2 TRANSFEKTION VON ZELLINIEN

TRANSFEKTION VON siRNA/MIRNA

**Tabelle 16| Transfektionsreagentien und optimierte Zelldichte**

Zelllinie	Transfektionsreagenz	Zelldichte (24-well)
<b>Hek293</b>	DharmaFECT 1 (Dharmacon, T2001-01)	5 x 10 <sup>4</sup>
<b>NIH3T3</b>	DharmaFECT 1 (Dharmacon, T2001-01)	3 x 10 <sup>4</sup>
<b>D283Med</b>	DharmaFECT 2 (Dharmacon, T2002-01)	2 x 10 <sup>4</sup>
<b>Daoy</b>	DharmaFECT 4 (Dharmacon, T2004-01)	2 x 10 <sup>4</sup>
<b>P19</b>	DharmaFECT 4 (Dharmacon, T2004-01)	4 x 10 <sup>4</sup>

Die Transfektion von Zelllinien mit siRNAs/miRNAs wurde mit Reagenzien von Dharmacon bzw. Exiqon durchgeführt. Die Transfektionseffizienz wurde vorab durch Transfektion von siGLO Red (Thermo Scientific) bestimmt. Die Zelltoxizität wurde mittels alamarBlue-Assay (AbD Serotec) untersucht. Zur Transfektion der Zellen wurde jeweils die in der oberen Tabelle angegebenen Transfektionsreagenzien und Zelldichten verwendet. Die Transfektion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden 24 h zuvor ausgesät. Zur Transfektion wurden die verwendeten siRNAs/miRNAs in Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (Gibco, 31985070) jeweils in einer Gesamtkonzentration zwischen 2,5 und 200 nM eingesetzt.

## TRANSFEKTION MIT PLASMIDEN

Die Transfektion von Zelllinien mit Plasmid DNA wurde mit Lipofectamine LTX unter Verwendung des Plus Reagenz (Invitrogen, 15338-100) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden 24 h zuvor à  $2,5 \times 10^4$  Zellen pro Quadratzentimeter ausgesät. Die Plasmid DNA wurde jeweils in einer Konzentration von 300 ng pro Quadratzentimeter eingesetzt, und mit einem Verhältnis von 1:1 ( $\mu\text{l}:\mu\text{g}$  Plasmid DNA) mit dem Plus Reagenz vermischt. Das Lipofektamin LTX Reagenz wurde in einem Verhältnis von 1:2 ( $\mu\text{l}:\mu\text{g}$  Plasmid DNA) zugegeben. Alle Lösungen wurden in Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Gibco, 31985070) angesetzt. Während des Transfektionsprozesses wurde dem Zellkulturmedium kein Antibiotikum zugegeben. Ein Mediumwechsel mit dem Standardmedium erfolgte 6-8 h nach Zugabe des Transfektionsreagenz.

### 2.12.3 STABILE SELEKTION VON MIT PLASMID DNA TRANSFIZIERTEN ZELLINIEN

#### SELEKTION STABIL TRANSFIZIERTER MISCHKULTUREN

Zur Erzeugung stabil transfizierter Kulturen, die sich aus der Gesamtheit der vorhandenen Klone bilden (Mischkultur), wurde den Zellen 48 h nach der Transfektion mit dem jeweiligen Selektionsreagenz versetztes Medium zugegeben. Alle 2-3 Tage wurden das Medium abgesaugt um abgestorbene Zellen zu entfernen und frisches Selektionsmedium zugefügt. Die Zellen wurden für mindestens 14 Tage in Selektionsmedium weiter kultiviert und expandiert bevor sie für nachfolgende Experimente verwendet wurden.

#### STABILE SELEKTION VON EINZELZELLKLONEN

Zur Selektion stabil transfizierter Einzelzellklone wurden stabil transfizierte Mischkulturen (siehe vorheriger Abschnitt) mittels Trypsin abgelöst, die Zellen in einer Neubauer Zählkammer gezählt und eine Zellsuspension von 1000 Zellen / ml hergestellt. Aus dieser Suspension wurden 50  $\mu\text{l}$  abgenommen und dieses Volumen auf 30 Tropfen verteilt auf eine kleine Petrischale aufgebracht. Die Tropfen wurden mit der Pipettenspitze abgeflacht und unter dem Mikroskop betrachtet. Tropfen, die genau eine Zelle enthielten, wurden mit jeweils



50 µl Medium aufgenommen und in eine 96-Well Schale zu 50-100 µl vorgelegtem Medium hinzugegeben. Erfolgreich angewachsene Zellklone wurden anschließend weiter in Selektionsmedium expandiert.

#### 2.12.4 DUAL LUCIFERASE REPORTER ASSAY (DLA)

Luciferase Reporteranalysen wurden mittels des Dual-Glo Kits (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Messung der Lumineszenz wurde ein mit zwei Injektoren ausgestattetes Luminometer (Orion; Berthold Detection Systems GmbH) verwendet. Die Messung wurde erst gestartet nachdem alle Reagenzien RT erreicht hatten. Jeweils 20µl des Zellysats wurde pro well auf eine 96-well Messplatte aufgetragen und folgendes Messprotokoll durchgeführt (siehe Tabelle 17):

**Tabelle 17 | Messprogramm Luminometer für DLA**

Schritt	Zeit[s]	Volumen[µl]
Injektion LARII	1	90
Verzögerung	2,05	
Messung hLuc	9	
Verzögerung	12	
Injektion Stop & Glo	1	90
Messung hRLuc	9	

#### 2.12.5 ECHTZEITANALYSE VON ZELLKULTUREN ÜBER IMPEDAZMESSUNG

Das xCELLigence Real-Time Cell Analyzer System (Roche) erlaubt eine direkte Analyse zellulärer Vorgänge mittels Messung der elektrischen Impedanz mit einer maximalen zeitlichen Verzögerung von 150ms (Echtzeit-Analyse). Hierbei werden die Zellen in speziellen Kulturplatten (E-Plate 16) kultiviert. In jedem Well dieser Platten befindet sich ein integriertes sensorisches Elektrodenfeld, mit dessen Hilfe die Impedanz der einzelnen Wells gemessen wird. Je größer die Zelloberfläche auf den Elektroden ist, desto höher ist die Zunahme der gemessenen Impedanz. Somit kann diese zur Validierung der Zelloberfläche beim Zellspreiten und bei der Proliferation der Zellen eingesetzt werden. Sie wird hier als dimensionsloser Parameter, als sogenannter Zell-Index (CI) ausgegeben. Dieser ist wie folgt definiert:  $(R_n - R_b)$

/15; dabei ist  $R_n$  die Impedanz der Elektrodenoberfläche, wenn Zellen enthalten sind und  $R_b$  die Hintergrund-Impedanz ohne Zellen nur mit Medium.

Die Wells wurden mit Fibronectin beschichtet und anschließend mit PBS gewaschen. Je Well (100µl Volumen) wurden jeweils  $2,5 \times 10^3$  NIH-3T3 Zellen ausgesät. Zur Analyse von miRNA-vermittelten Effekten wurden die Zellen bereits 48h zuvor transfiziert. Nach dem Aussähen wurden die Zellen für einen Zeitraum von insgesamt 85h beobachtet. Für die Adhäsionsmessung wurde in den ersten acht Stunden ein Intervall von 2 min gewählt. Für die anschließende Proliferationsphase wurde das Intervall der Impedanzmessung auf 15min erhöht.

#### 2.12.6 TIME-LAPSE VIDEOMIKROSKOPIE VON ZELLKULTUREN

Zur Beobachtung des Migrationsverhaltens wurden die Zellen in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen/Well auf mit Fibronectin (10 µg/ml) beschichtete 24-Well Zellkulturschalen (TPP) ausplattiert. Zur Beschichtung der Zellkulturschalen wurde jeweils 2 µg Fibronectin pro  $\text{cm}^2$  in die Wells pipettiert und bei 37°C für 2 h oder bei RT über Nacht inkubiert. Anschließend wurde das Fibronectin abgesaugt und die Wells dreimal mit PBS gespült. Die Zellen wurden in einer Mikroskopierapparatur bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  über zehn Stunden alle 10 min fotografiert. Die Time-Lapse Aufnahmen wurden mittels des ImageJ Plugins MTrackJ (<http://www.imagescience.org/meijering/software/mtrackj/>) analysiert. Um die Motilität der Zellen zu bestimmen wurde die zeitabhängige Bewegung von 10 zufällig ausgewählten Zellen pro Position erfasst. Es wurde für jedes Einzelexperiment jeweils drei Positionen in zwei unterschiedlichen Wells analysiert. Die Migrationspfade wurden manuell mittels Image J nachverfolgt und ausgewertet.

#### 2.12.7 MORPHOMETRISCHE ANALYSE EGFP-POSITIVER KÖRNERZELLEN (NEURON-J)

Neuronale Zellfortsätze eGFP exprimierender Körnerzellen wurde mit Hilfe des ImageJ Plugins NeuronJ nach Anleitung des Entwicklers nachverfolgt. Diese ist unter folgender Adresse online verfügbar (<http://www.imagescience.org/meijering/software/neuronj/manual>). Anschließend wurden die Zellfortsätze durch manuelles markieren klassifiziert. Als primäre Fortsätze wurden Neurite klassifiziert, die direkt mit dem Zellsoma verbunden sind; sekundäre

Verzweigungen sind direkt mit den primären Neuriten verbunden. Die nachverfolgten Verzweigungen wurden in unterschiedlichen Farben dargestellt. Für die statistische Analyse wurden für jede Behandlung 10 Zellen nachverfolgt und die Daten anschließend in MS-Excel exportiert und mit Hilfe der Software Graphpad Prism ausgewertet.

## 2.13 TIEREXPERIMENTELLE METHODEN

### 2.13.1 TIERE

Falls nicht anderweitig ausgewiesen, wurde die Inzuchtlinie C57BL/6 (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, USA) verwendet. Math1-EGFP transgene Mäuse, welche EGFP in unreifen, proliferierenden Körnerzellvorläufer exprimieren, wurden bereits durch Gliem und Weisheit (2006) beschrieben. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden entsprechend der gesetzlichen Richtlinien durchgeführt (European Communities Council Directive 86/609/EEC).

### 2.13.2 PERFUSION, PRÄPARATION UND NACHFIXIERUNG

Anästhesie der Tiere und vollständige Präparation des Kleinhirns erfolgte nach standardisiertem Protokoll des Labors. Eine ausführliche Beschreibung der Einzelschritte ist z.B. in der Dissertation von C. Liebig (2007) verfügbar. Für die Herstellung von Vibratomschnitten wurden perfusionsfixierte Kleinhirne (4% PFA) in PBS mehrfach gewaschen. Anschließend wurden die Kleinhirne bei 4°C in PBS mit 2% PFA gelagert.

### 2.13.3 VIBRATOMSCHNITTE (DICKSCHNITTE)

Die Kleinhirndickschnitte wurden mittels des Vibratoms (VT1000S von Leica, Göttingen, mit Gillette „Super Silver“ Rasierhobelklingen) hergestellt. Frequenz und Geschwindigkeit wurden entsprechend angepasst und optimiert. Die Schnitte wurde in eisgekühltem PBS mit 2% PFA gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

### 2.13.4 ANFERTIGUNG VON PRIMÄREN KÖRNERZELLKULTUREN

Zellen für primäre Körnerzellkulturen wurden aus Cerebella von 8 Tage alten C57BL/6 und für Mischkulturen auch aus Math1-EGFP Mäusen gewonnen. Eine Math1-EGFP Expression wurde

mit Hilfe eines Mikroskops, welches mit einer UV-Lichtquelle und entsprechenden Filtern ausgestattet war (MZ FLIII; Leica, Bensheim, Germany) detektiert. Cerebella wurden unter sterilen Bedingungen präpariert und von Meningen befreit. Das Gewebe wurde mechanisch mit Hilfe einer sterilen, gebogenen Pinzette zerkleinert und anschließend mit Trypsin bei 37° C für 20 min verdaut. Der Verdau wurde in PBS (mit 0.5 mg/ml Trypsin und 1 mM EDTA) durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe an gleichem Volumen an PBS (mit 8 mg/ml soybean Trypsininhibitor und 8 mg/ml BSA (cell culture grade; Sigma) abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen mit einer Plastik Pipette trituriert und durch ein Gitternetz mit einer Porengröße von 400 µm, gefolgt von einer Passage durch ein Netz von 250 µm Porengröße pipettiert. Zellen wurden durch Zentrifugation für 8 min bei 270 g sedimentiert; das Pellet wurde in Neurobasal Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Germany; Zusätze: 2% B-27 (v/v); (Invitrogen) und 2mM Glutamax (Invitrogen)) resuspendiert. Die erfolgreiche Dissoziation wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie verifiziert. Zellen wurden gezählt und auf ein Volumen gebracht, welches zu einer finalen Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen per ml führte. Für Mischkulturen von Wildtyp und Math1-EGFP-Cerebella wurden die Zellen in einem Verhältnis von 7: 0,25 (wt/Math1) gemischt. Das entspricht einem Verhältnis von 28:1. Die Zellen wurden anschließend auf 2 cm<sup>2</sup>, 4-well Kulturschalen überführt (Nunc; 500 µl der Zellsuspension entsprechen  $5-6 \times 10^5$  Zellen per well), welche mit 1% (w/v) PLL beschichtet waren. Anschließend wurden sie in einem Inkubator bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert.

## 2.14 BIOCHEMISCHE METHODEN

### 2.14.1 PROTEINEXTRAKTION AUS GEWEBE UND ZELLKULTUREN

Zur Präparation von Gesamtprotein wurden konfluente Zellkulturen zunächst in PBS gewaschen. Anschließend wurde die Zellen durch Zugabe von 10 µl RIPA-Puffer/cm<sup>2</sup> lysiert und die Zelllysate in Eppendorf Cups übertragen. Danach wurden die Proben für 45 min bis 1,5 h bei 4°C auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Die Proben wurden dreimal für 15 s sonifiziert und daraufhin Kerne und Detergenz-unlösliche Membran-Fragmente für 30 min bei 15000 rpm, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels der BCA Methode. Hierfür wurde

das Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Die Proben wurden je nach Bedarf bei -20°C bzw. bei -80°C gelagert.

### 2.14.2 SDS POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde jeweils eine Proteinmenge zwischen 5-20 µg je Proben auf 7,5 % bzw. 8 % SDS-Polyacrylamidgele (s. Tabelle 18) aufgetragen.

**Tabelle 18| Zusammensetzung PAGE-Gele**

Trenngel	7,5%	8%	Sammelgel	
<b>Trenngel-Puffer</b>	5,0 ml	5,0 ml	Sammelgel-Puffer	<b>630 µl</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	9,6 ml	8,6 ml	H <sub>2</sub> O	<b>3,6 ml</b>
<b>Acrylamid</b>	5,0 ml	6,0 ml	Acrylamid	<b>625 µl</b>
<b>10 % SDS</b>	0,2 ml	0,2 ml	10 % SDS	<b>50 µl</b>
<b>10 % APS</b>	0,2 ml	0,2 ml	10 % APS	<b>50 µl</b>
<b>TEMED</b>	<b>8 µl</b>	<b>8 µl</b>	<b>TEMED</b>	<b>5 µl</b>

Die Proteinextrakte wurden vor dem Auftragen in 2-fachen Probenpuffer für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Separation der Proteine erfolgte im Gel zunächst bei einer Stromstärke von 10-15 mA, bis die Proben an der Grenze zum Trenngel aufkonzentriert waren. Anschließend wurde die Stromstärke auf 20-30 mA erhöht. Als Proteinstandard wurde der *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fermentas) aufgetragen.

### 2.14.3 WESTERN BLOT ANALYSE

Transfer: Der Transfer der im SDS-Gel aufgetrennter Proteine auf eine Membran erfolgte mit Hilfe des semi-dry Transfer System (Nova Blot, GE Healthcare). Es wurden PVDF Membranen (Millipore, IPVH00010) verwendet und nach Herstellerangaben behandelt. Der Transfer wurde für 1,5 h bei 4 W durchgeführt. Die Stromstärke wurde auf 1,5 mA/cm<sup>2</sup> Gel eingestellt.

Immunfärbung: Die Blockierung der Membranen erfolgte für 1,5-2 h bei RT in Blockierungs-Puffer. Die Inkubation mit dem jeweiligen Erstantikörper wurde über Nacht bei 4°C in Blockierungs-Puffer durchgeführt. Der Peroxidase gekoppelte Zweitantikörper wurde bei RT

für 2-4 h inkubiert. Die Waschschrirte erfolgten jeweils für 5-10 min in TBST und wurden mindestens drei Mal wiederholt.

ECL-Nachweisreaktion: Der Nachweis der gebundenen Zweitantikörper wurde mit dem SuperSignal West Pico (Thermo Scientific, 34077) bzw. dem SuperSignal West Femto (Thermo Scientific, 34095) ECL Substrat entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt und mit Hilfe des Epi-Illuminators (ImageQuant; LAS 4000 Mini) detektiert.

Stripping: Um gebundene Antikörper wieder von den Membranen zu entfernen, wurden diese für 30-60 min bei 60°C in „Stripping Buffer“ (siehe 2.9.3) inkubiert, dreimal in TBS-T gewaschen. Vor einer erneuten Verwendung wurde die Membran nochmals blockiert.

## 2.15 HISTOCHEMISCHE UND IMMUNZYTOCHEMISCHE METHODEN

### 2.15.1 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN AN ZELLKULTUREN

Für die Immunfluoreszenz wurden unterschiedlich behandelte Zellen in einer zuvor optimierten Zelldichte auf PLL-beschichtete Glas-Coverslips (Warner) in 4-Well Schalen (Nunc) ausgesät. Die Zellen wurden nach 24 h durch Zugabe von 4 % PFA für 5 min fixiert und dreimal mit PBS gespült. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte mittels PBS (0,5 % Triton X-100) für 5 min bei RT, anschließend wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen wurden die Zellen in 2 % BSA für 2 h bei RT inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem in 2% BSA verdünnten Erstantikörper bei 4°C über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurden ungebundene Reste des Erstantikörpers durch dreimaliges Waschen mit PBS für 5 min bei RT entfernt und die Zellen mit in Blockierlösung (2%BSA in PBS-TX-100(0,1%) verdünnten Zweitantikörper für 2h bei RT inkubiert. Dieser wurde wiederum durch dreimaliges Waschen mit PBS für 5 min bei RT entfernt. Die Zellkerne wurden mittels Hoechst33342 für 10 min bei RT gefärbt und die Coverslips in Mowiol 4-88 Eindeckelmedium (Fluka, #81381) eingebettet. Doppelfärbungen wurde sequentiell nacheinander durchgeführt.

## 2.16 DATENAUSWERTUNG

### 2.16.1 ANALYSE DER MICROARRAY DATENSÄTZEN VON P8- UND ADULTCEREBELLUM

Um die Expression von miRNAs in acht Tagen adulten Kleinhirnen zu vergleichen, nutzten wir ein Mikroarray-basiertes System. Dazu wurden aus jeweils zwei Cerebella von P8- und Adulttieren aus C57BL/6 Mäusen Gesamt-RNA Proben isoliert. Die Microarray Analyse und die quantitative Auswertung wurde von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) durchgeführt. Die Datenbereinigung geeigneter Signalintensitäten erfolgte vorab (Miltenyi Biotec; PIQOR Analyzer). Hierbei wurden für jeden Punkt des Microarrays Mittelwerte für Signal und Hintergrund berechnet. Es wurden nur Datenpunkte berücksichtigt, deren Signalintensität gleich oder größer als 50% der Hintergrundintensität war. Die hieraus berechnete Signalintensität wurde normalisiert und anschließend die Verhältnisse von Probe zur Referenzkontrolle (Hy5/Hy3) berechnet. Durch Referenzkontrollen bekannter miRNA Konzentrationen (UR: *universal control*) konnten die Signalintensitäten in femtomolare Konzentrationen umgerechnet werden. Die so generierten Datensätze dienten der anschließenden Identifikation von miRNAs die entwicklungsabhängig spezifisch und/oder verstärkt exprimiert werden. Die Expressionsdaten wurden grafisch als Heatmap dargestellt. Diese wurde mit Hilfe der *open source* Software R erstellt. Folgendes *plugin* wurden verwendet: Heatplus. In der so genannten Clusterdarstellung wurden die Expressionsdaten nach Pearson gruppiert.

### 2.16.2 MICRORNA VORHESAGEN IM 3'-UNTRANSLATIERTEN BEREICH VON *MTSS1*

Um potentielle miRNAs zu identifizieren, welche im 3'-untranslatierten Bereich (3'UTR) bestimmter Gene binden, wurden zahlreiche Prozeduren entwickelt. Drei dieser Methoden wurden hier verwendet, deren Algorithmus in den Programmen TargetScan (Friedman et al, 1999 / [www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)), PicTar (Krek et al., 2005; [www.pictar.mdc-berlin.de](http://www.pictar.mdc-berlin.de)) und miRanda (John et al. 2004; Betel et al., 2008; [www.microcosm.org](http://www.microcosm.org)) implementiert sind. Durch Auswahl mehrerer Datenbanken kann dabei die erzielte Identifikation mehrere miRNA-Gene kritisch überprüft werden. Dabei werden gemeinsam vorhergesagte miRNAs als solide Kandidaten bewertet. Gleichzeitig können jedoch auch einzelne miRNA Kandidaten außerhalb der Schnittmenge berücksichtigt werden, wenn eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Bindung

ausgegeben wurde. Somit kann die Auswahl optimiert werden und gleichzeitig die Stärken einzelner Vorhersagealgorithmen genutzt werden. Vorrangig wurden hier die Analysen mit TargetScanHuman (Version 5.1) durchgeführt.

**TargetScanHuman; → (<http://www.targetscan.org>)**

TargetScan wurde am MIT in Zusammenarbeit von Bartel- und Burge Lab im Jahre 2003 entwickelt. Seitdem wurde die Datenbank ständig weiterentwickelt und seit Juni 2016 ist die Vorhersage von miRNAs auf mittlerweile insgesamt zehn Spezies angewachsen. Hier wurde TargetScanHuman (Version 5.2) verwendet, welche alle miRNAs der humanen Annotierung berücksichtigt (miRBase), was zu einer höheren Gesamtzahl an miRNA Sequenzen gegenüber der Annotierung im Mausgenom führt. Die TargetScan Vorhersage beruht auf der Existenz konservierter 8-mer oder 7-mer Erkennungssequenzen am 3'-UTR, die komplementär zur Seed Region der entsprechenden miRNAs sind (Lewis et al., 2005). Des Weiteren werden auch Sequenzen mit Fehlbasenpaarungen innerhalb der Seed-Region toleriert, sofern eine entsprechend starke 3'-seitige kompensatorische Bindung vorhanden ist (Friedman et al., 1999). Die Vorhersagen werden optional nach dem sogenannten *context score* (Grimson et al., 2007) oder der *probability of conserved targeting* ( $P_{CT}$ ) sortiert und ausgegeben. Es werden auch nicht- oder weniger konservierte Sequenzen angezeigt. TargetScanHuman berücksichtigt auch Treffer zu annotierten UTRs und deren Orthologe, wie sie aus der UCSC Datenbank definiert sind.

**PicTar → (<http://www.pictar/mdc-berlin.de>)**

PicTar ist ebenfalls eine Seed-basierte Vorhersagedatenbank (Krek et al., 2005). Der Algorithmus berücksichtigt, neben einer vollständig komplementären Watson-Crick Basenpaarung (*perfect seed complementarity*), auch weniger komplementäre Basenpaarungen zu. Vollständige Seed-Basenpaarungen betreffen die sieben Nucleotide am 5'-seitigem Ende der miRNA. Die unvollständige Basenpaarung (*imperfect seed pairing*) erlaubt eine Insertion unter der Voraussetzung, dass die freie Energie der miRNA::mRNA Duplex nicht erhöht wird oder ein G•U Basenpaar enthält. Es werden statistische Tests verwendet die die evolutionäre Konservierung von acht Genomen von *Vertebraten* einbeziehen.



**miRanda** → (<http://www.microrna.org>)

Bei der Datenbank miRanda (Enright et al., 2003) ist die Gewichtung der Seed-Übereinstimmung am höchsten; erlaubt hier aber G•U „wobbles“ und Nukleotidnichtübereinstimmungen (sog. *Mismatches*). Evolutionäre Konservierung und die freie Energie des Heteroduplex werden hier ebenso berücksichtigt. Die miRNA Bindestellen die durch miRanda vorhergesagt wurden, werden nach der Wahrscheinlichkeit einer mRNA Runterregulation mittels mir-SVR ausgegeben. Bei miR-SVR (Betel et al., 2010) handelt es sich um ein Regressionsmodell, welches darauf trainiert wurde Sequenz- und kontext basierte Eigenschaften der vorhergesagten miRNA::mRNA Duplex zu integrieren.

**miRwalk** → (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>)

In Tabelle A1 (siehe Anhang) sind die wesentlichen Unterschiede zwischen den drei gewählten Algorithmen dargestellt. Die vergleichende Analyse der Vorhersagen der drei Datenbanken wurde mit Hilfe von miRwalk (Dweep et al., 2011) durchgeführt. Diese ist unter dem folgenden Link zu finden: (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>). Hierbei wurden die betreffenden Algorithmen ausgewählt, d.h. TargetScan, PicTar und miRanda. Die ausgegebenen Trefferlisten der drei ausgewählten Datenbanken zeigen alle identifizierten miRNAs an und stellen diese vergleichend gegenüber. Um die durchgeführten Analysen grafisch darzustellen, wurden diese Listen anschließend mit Hilfe von BioVenn (<http://www.cmbi.ru.nl/cdd/biovenn/>) bearbeitet und als Venn Diagramm dargestellt.

### 2.16.3 ANALYSE VON SIGNALWEGEN AUSGEWÄHLTER MIRNAS

#### **GO-Analyse (mittels DAVID)**

Mit Hilfe der David Bioinformatik Datenbank (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>; (Huang et al., 2009a, 2009b) wurde eine Gruppierung der durch TargetScan identifizierten Zielgene betreffender miRNAs durchgeführt. Diese wurden nach ihrer biologischen Funktion, basierend auf der Gene Ontology Kategorie „biological process“ (<http://www.geneontology.org/>), eingruppiert. Mit Hilfe von TargetScan Human (Version 5.2) wurden Zielgene der einzelnen miRNAs identifiziert und nach P<sub>CT</sub> Score sortiert. Gene mit einem P<sub>CT</sub> Score > 0,10 wurden berücksichtigt und als Listen in Microsoft Excel exportiert. Diese Listen wurden abschließend

in das DAVID-Analysesystem (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) hochgeladen und nach dem Protokoll von Huang (Huang et al., 2009c) ausgewertet.

#### **DIANA-mirPath(Version1):**

DIANA-mirPath ist eine Web-basierte (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/pathways/>) Anwendung zur Identifikation von Signalwegen welche über bestimmte miRNAs potentiell reguliert werden können (Papadopoulos et al., 2009). Hierzu müssen die zu untersuchenden miRNAs (hier: *miR-23b*, *miR-182*, *miR-206*) in die Suchmaske eingegeben werden und der entsprechende Algorithmus aus einer vorgegeben Auswahl angewählt werden (hier: TargetScan). Die Software führt eine sogenannte „Anreicherungs-Analyse“ durch, bei der die Zielgene mehrerer miRNAs mit den KEGG-Signalwegen (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) abgeglichen werden. Somit wird der kombinatorische Effekt ko-exprimierter miRNAs in der Regulation eines gegebenen Signalweges, durch die gleichzeitige Analyse mehrerer MicroRNAs berücksichtigt. Der Begriff „Anreicherungs-Analyse“ (engl.: *enrichment analysis*) beschreibt im Wesentlichen die verwendete Technik zur Interpretation mehrerer Genlisten durch Verwendung des Gene Ontology Systems. Hierbei werden Gene klassifiziert und in bestimmte Kategorien zugeteilt. Zum Beispiel ist das Gen FasR als „Rezeptor“ klassifiziert, der in der „Apoptose“ involviert ist und in der „Plasmamembran“ lokalisiert ist.

Die Anreicherung von Mitgliedern einzelner Signaltransduktionswege in den eingegebenen Daten wurde mit Hilfe eines Chi-Quadrat-Test überprüft. ( $\chi^2 = \sum [(O/E)^2]$ ), wobei O (*observed*) die Anzahl der Gene darstellt, die in dem gegebenen Signalweg identifiziert wurden und E (*expected*) die Anzahl der Gene darstellt, die zufällig Mitglieder des gegebenen Signalweges sein könnte. Der p-Wert dieses Chi-Quadrat Testes ist ein Maß für die Anreicherung, die nach Papadopoulos et al. (2009) als dessen negativer natürlicher Logarithmus (-lnP) dargestellt wird. Der Algorithmus führt auch eine Anreicherungsanalyse aller gemeinsamen Datensätze durch. Die Anreicherung, die hier als P- Wert des gemeinsamen Datensatzes (*Union*) dargestellt wird, stellt die koordinierte Herunterregulation des Stoffwechselweges durch ko-exprimierte miRNAs dar. Dagegen stellt die Kreuzung (*Intersection*) einen Überblick über die kooperative Herunterregulation einzelner Gene von

allen exprimierten miRNAs dar. Die Anzeige der Daten wird in DIANA - mirPath nach absteigendem Anreicherungs Score ( $-\ln P$ ) zusammen mit der Anzahl und den Namen beteiligter Zielgene aus jedem KEGG Signalweg dargestellt und ausgegeben. Die Daten wurden hier in Excel (MS-Office) exportiert und als Balkendiagramme dargestellt (siehe Abbildung 21).

#### 2.16.4 STATISTIK

Die Datenanalysen wurden mehrheitlich mit GraphPad Prism Version 5 (La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Fehlerbalken wurden entsprechend ausgegeben und kenntlich gemacht (SEM oder SD). Signifikanztests wurden mit dem Student's *t*-test (two-tailed) durchgeführt. *P*-Werte für durchgeführte Signifikanz wurden entsprechend kenntlich gemacht. Die Analysen zur Auswertung des Microarrays ist im Kapitel 2.15.1 erläutert. Die Signalweganalyse für miRNAs ist im Kapitel 2.15.3 erläutert und die Referenz zur Verwendung von DAVID angegeben.



# 3 ERGEBNISSE

---

## 3.1 DIFFERENTIELLE MICRORNA-EXPRESSIONSANALYSEN IM CEREBELLUM DER MAUS

Um den Einfluss von miRNAs auf die Entwicklung von cerebellären Körnerzellen und insbesondere deren mögliche Regulation des Aktin-assoziierten Gens *Mtss1* zeigen zu können, war es initial wichtig, einen Überblick der entwicklungspezifischen miRNA Expression des Cerebellums zu erhalten. Dazu wurde die miRNA Expression zweier Entwicklungsstadien im Cerebellum über Microarrays<sup>1</sup> (miRXplore, Miltenyi Biotec) miteinander verglichen. Es wurden Cerebella aus P8 (Postnataltag 8: P8) und adulten (Ad) C57/BL6 Mäusen untersucht, die alle einem Wurf entstammten. Das Stadium P8 repräsentiert den Zeitpunkt in der man sowohl Körnerzellen in der proliferierenden als auch migrierenden Phase findet. Des Weiteren sind zu diesem Zeitpunkt auch Körnerzellpopulationen vorhanden, die bereits mit der Neuritogenese begonnen haben. Die RNA-Proben aus jeweils zwei Gesamtcerebella wurden dazu fluoreszenzmarkiert und jeweils die gleiche Menge RNA auf einem DNA-CHIP hybridisiert, der LNA-modifizierte Sonden von 1124 miRNAs enthielt (miRBase miRNA Registry; Version 7.1); (Castoldi et al., 2006; Griffiths-Jones et al., 2006).

Die quantitative Analyse des Microarrays lieferte die vergleichende Expression von insgesamt 368 verschiedenen miRNAs. Die gemessenen Signalintensitäten konnten durch Normalisierung zu internen Kontrollen bekannter Konzentrationen in femto-molare Konzentrationen umgerechnet werden. Die Expressionsdaten cerebellärer miRNAs von P8 im Vergleich zu adult wurden grafisch als Heatmap dargestellt (siehe Abbildung 8). Hierbei wurden miRNAs berücksichtigt, deren differentielle Expression zwischen den beiden Vergleichsgruppen adult und P8 um mehr als das 1,5-fache variierte. Von diesen miRNAs zeigten 106 eine um mehr als 2-fach veränderte Expression. Diese miRNAs wurden daher als

---

<sup>1</sup> Der Microarray wurde bereits im Vorfeld zu dieser Dissertation von Dr. Britta Eiberger veranlasst. Da es sich hierbei um ein zentrales Experiment zu dieser Arbeit handelt sind wichtige Abläufe aufgeführt.

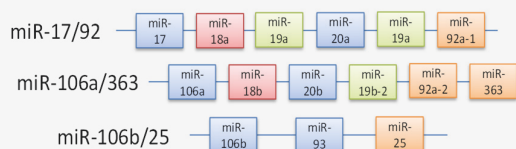
mögliche Regulatoren der Genexpression während der postnatalen Entwicklung des Cerebellums erachtet. Bei 52 miRNAs war die Expression im Adultstadium erhöht, während 54 miRNAs eine erhöhte Expression an P8 aufwiesen. Eine besonders starke Expressionsänderung um mehr als das 10-fache konnte bei 23 miRNAs festgestellt werden (siehe Tabelle 19). Diese miRNAs könnten daher mutmaßlich eine besondere Rolle bei der cerebellären Entwicklung einnehmen. Eine besonders starke Expression im P8 Stadium zeigten vor allem miRNAs der miRNA-Cluster *miR-17~92*, *miR-106b~25* und *miR-106a~363* (siehe Tabelle 19; vergleiche auch (Uziel et al., 2009)). Im Cerebellum der adulten Maus war die Expression der miRNAs *miR-29a*, *miR-29b*, *miR-29c*, *miR-34a* und *miR-132* besonders stark gegenüber P8 erhöht.

**Tabelle 19| Differentielle Expression von cerebellären miRNAs zwischen P8 und Adult**

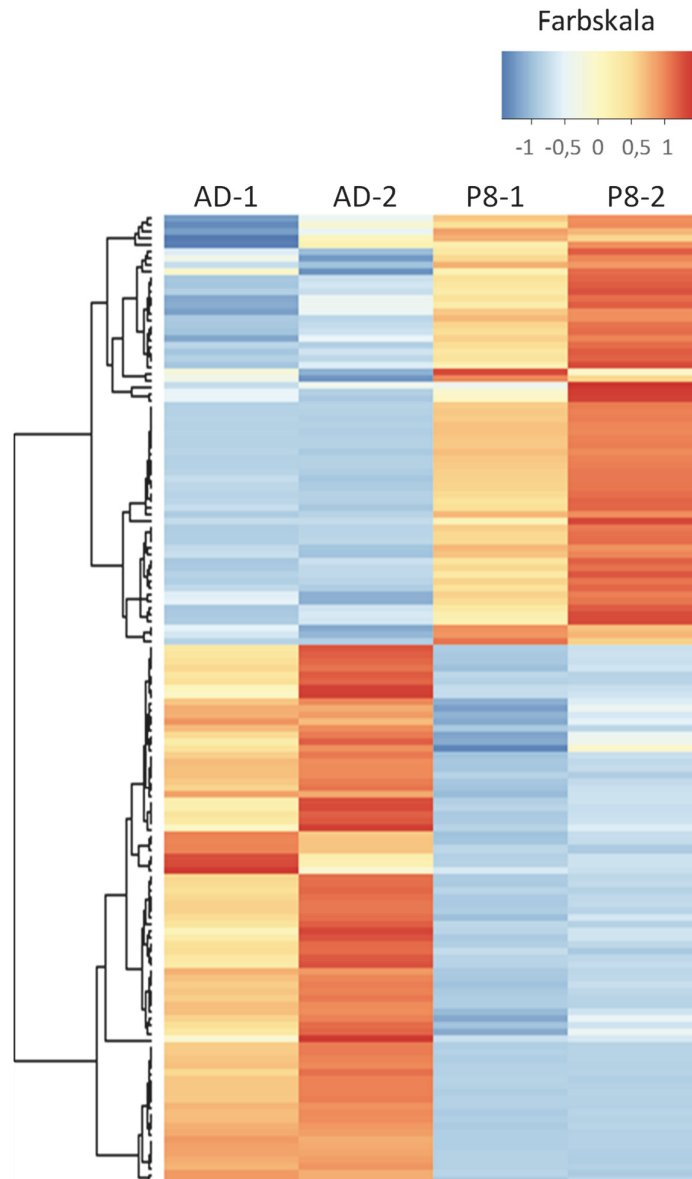
miRNA	P8 [fm]	AD [fm]	Regulation ↓ (MW)
MIR-20A	6,62	0,08	84,1
MIR-17	2,72	0,03	78,1
MIR-18A	0,98	0,03	36,8
MIR-106A	1,65	0,05	32,1
MIR-19A	4,21	0,31	31,0
MIR-92A	3,03	0,11	28,1
MIR-20B	1,31	0,06	26,0
MIR-25	2,66	0,11	24,4
MIR-93	3,26	0,14	23,5
MIR-216B	0,56	0,03	22,5
MIR-19B	17,40	0,85	20,7
MIR-216A	0,81	0,05	20,0
MIR-15B	3,80	0,29	13,1
MIR-106B	3,37	0,28	12,2
miRNA	P8 [fm]	AD [fm]	Regulation ↑ (MW)
MIR-222	0,09	0,97	10,7
MIR-154	0,05	0,48	10,6
MIR-378	0,02	0,21	11,4
MIR-150	0,05	0,57	12,6
MIR-132	0,13	2,52	19,9
MIR-34A	0,10	2,10	22,2
MIR-29C	0,45	16,00	35,5
MIR-29B	0,16	17,95	110,5
MIR-29A	0,12	15,66	129,1

Das **miR-17/92** Cluster besteht aus 6 miRNAs: *miR-17*, *miR-18a*, *miR-19a*, *miR-20a*, *miR-19b-1* und *miR-92a-1*.

Zwei paraloge Cluster von *miR-17/92* sind das **miR-106a/363** Cluster und das **106b/25** Cluster.

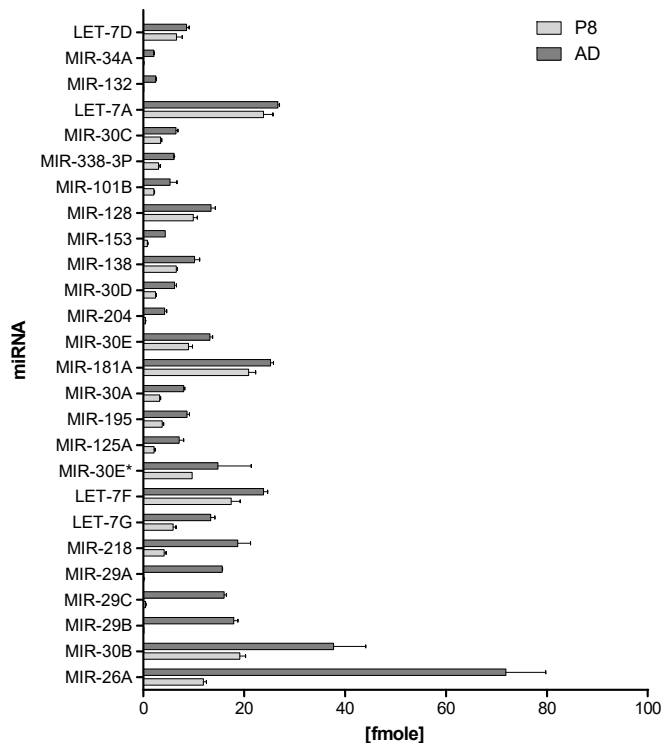


Hier dargestellt sind die Expressionswerte aus dem Microarray (Mittelwert aus n=2) der besonders stark differentiell regulierten miRNAs. Die obere Tabellenhälfte enthält miRNAs, die im Cerebellum von P8 Mäusen hoch reguliert sind; in der unteren Tabellenhälfte ist es umgekehrt. Die Signalintensitäten wurden normalisiert und sind als femtomolare Konzentrationen (fm) angegeben. Abk.:MW: Mittelwert, P8: Postnataltag8; AD: Adult.



**Abbildung 8 | Microarray Analyse: Differentielle Expression cerebellärer miRNAs**

Darstellung der differentiell regulierten miRNAs als *Heatmap*. Es wurden nur miRNAs mit einer Regulation zwischen P8 und adult >1,5-fach dargestellt. Die Proben wurden entsprechend ihrer entwicklungspezifischen Expression nach Pearson eingruppiert. Rot-Gelb graduierte Farbtöne zeigen eine Expressionszunahme (positive Werte) und Blau-Weiß Farbtöne eine abnehmende Expression (negative Werte) an. Jede Säule repräsentiert ein untersuchtes Cerebellum der angegebenen Entwicklungsphase (Postnataltag 8→P8; Adult→AD). In der oberen Hälfte befinden sich miRNAs, die eine höhere relative Expression an P8 zeigten; in der unteren Hälfte verhält es sich umgekehrt. Eine ausführliche *Heatmap* befindet sich im Anhang, da die einzelnen miRNAs hier namentlich nicht dargestellt werden konnten.



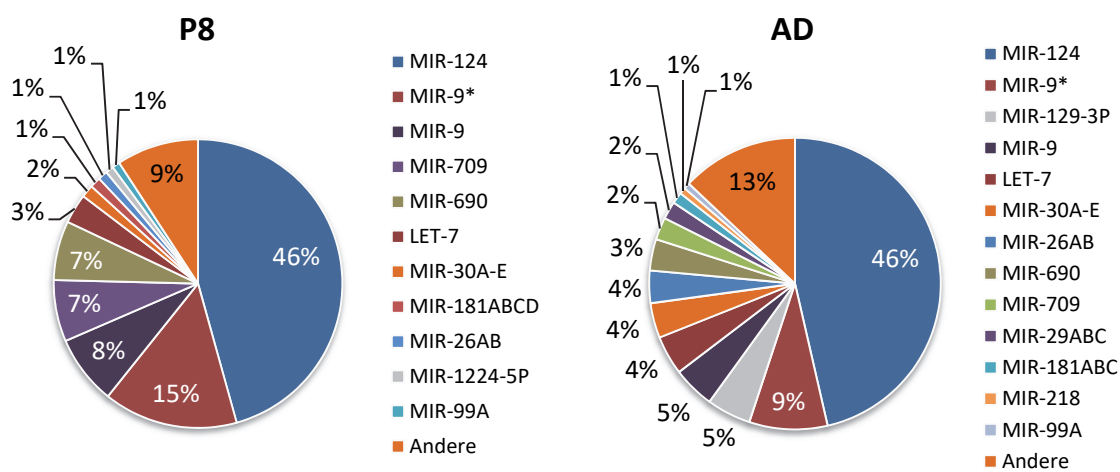
**Abbildung 9 | Vergleich der absoluten Zunahme zwischen P8 und Adult**

Die grafische Darstellung einer Heatmap stellt nur die starke differentielle Expression dar. Hier wird die absolute Zunahme von P8 zu Adult in fmol dargestellt. Dabei wurden zusätzlich miRNAs identifiziert, die trotz relativ geringer differentieller Expression eine starke absolute Zunahme der Expression aufwiesen. Darunter befinden sich die miRNAs *miR-30b*, *let-7G* und *let-7F*. (n=2; +/-SEM)

Ein weiterer Aspekt bei der Identifikation entwicklungspezifisch regulierter miRNAs ist die absolute Zunahme der Expression. Hier wurden die größten absoluten Expressionszunahmen von P8 zu Adult (>1fmol) angeschaut (siehe Abbildung 9). Vornehmliches Ziel dieser Analyse ist es, wichtige regulatorische miRNAs zu erfassen, die bei der relativen Expressionsanalyse im Microarray nicht berücksichtigt wurden. Eine große absolute Zunahme der Expression spricht ebenso dafür, dass diese miRNAs potentiell wichtige Regulatoren der cerebellären Entwicklung sein können. MiRNAs, wie beispielsweise *miR-30b*, *miR-218* und zwei Mitglieder der *let-7* Familie (*let-7F*, *let-7G*), wurden mittels dieser Analyse als zusätzliche Kandidaten identifiziert. Diese miRNAs werden bereits während der frühen postnatalen Entwicklung stark exprimiert, und ihre Konzentration steigt im adulten Cerebellum noch an. Dies legt eine wichtige, gewebespezifische Bedeutung dieser miRNAs für das Kleinhirn nahe.



Bei *miR-26a* konnte die größte absolute Zunahme der Expression von mehr als 60 fmol und bei *let-7d* die geringste hier dargestellte Zunahme mit ca. 2 fmol beobachtet werden. *MiR-30b* wies eine 1,9-fache relative Expression an P8 im Vergleich zu adult mit einer absoluten Zunahme von 19 fmol auf. Umgekehrt zeigte *MiR-132*, welche ein 20-fach hochreguliertes Expressionsniveau von P8 zu adult aufwies (0,12fmol → 2,5fmol), eine absolute Zunahme von 2,38 fmol. Ein Vergleich zu Expressionsdaten besonders stark differentiell exprimierter miRNAs (siehe Tabelle 19) verdeutlicht dies besonders. So war beispielsweise *miR-18a* im Vergleich adult zu P8 36,8-fach stärker exprimiert und die mittlere absolute Zunahme betrug 0,95 fmol. Von den insgesamt 25 hier dargestellten miRNAs mit einer absoluten Zunahme von mehr als 1 fmol (siehe Abbildung10), zeigten neun eine geringfügige differentielle Expression (< 2-fach).



**Abbildung 10| MiRNAs mit starker Expression im Vergleich P8 zu Adult.**

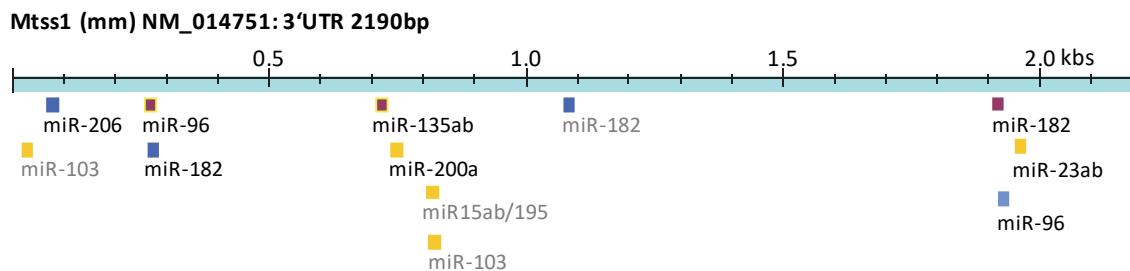
Die Kreisdiagramme zeigen den Anteil einzelner miRNAs, die einen Anteil von mindestens 1% an der Gesamtmenge der im Cerebellum exprimierten miRNAs aufweisen (Signalintensität Microarray), (MirXplore; Miltenyi Biotec). Bis auf wenige Ausnahmen (miR-1224-5P, miR-129-3P, miR-29abc) zeigen in beiden Entwicklungsstadien die gleichen miRNAs eine relativ starke Expression.

In diesem Abschnitt wird auf die Expressionsverteilung der cerebellären miRNAs im Stadium P8 im Vergleich zum adulten Tier eingegangen (siehe Abbildung 10). Hierbei wurde die im Microarray gemessene Expression aller in der jeweiligen Entwicklungsphase identifizierten miRNAs kombiniert und als 100% gesetzt. Vergleicht man die relativ stark exprimierten miRNAs, dann sind das bei Cerebella von Mäusen im Stadium P8 überwiegend die gleichen

wie bei adulten Tieren – und zwar unabhängig von der Tatsache, dass sich die absoluten Spiegel einzelner dieser miRNAs während der Entwicklung ändern. Dies lässt vermuten, dass die Zusammensetzung bestimmter miRNAs, zur Identität eines Gewebes beiträgt; ein Zusammenhang, der bereits beschrieben wurde und eine Korrelation zwischen dem miRNA Expressionsmuster und der Zellidentität zeigte (Kosik, 2010). Zu den am stärksten exprimierten miRNAs im Cerebellum der Maus zählen *miR-124*, *miR-9/9\**, *miR-26a* und *miR-30b* (*miR-124*: P8 = 1230 fmol/AD = 1520 fmol; *miR-9*: P8 = 158 fmol/AD = 124 fmol; *miR-26a*: P8 = 12 fmol/AD = 72 fmol; *miR-30b*: P8 = 19 fmol/AD = 38 fmol). Eine ebenfalls hohe Expression zeigten *miR-29abc*, *miR-26b* und die *let7*-Familie.

### 3.2 ANALYSE VON MIRNA-BINDESTELLEN IM 3'UNTRANSLATIERTEN BEREICH DER *MTSS1*-MRNA

Nachdem eine negative Korrelation der Expression ausgewählter cerebellärer Gene und deren putativer miRNA-Bindungspartner für die hier analysierten Microarray-Daten gezeigt werden konnte (siehe Anhang Abbildung A9), wurde der 3'UTR von *Mtss1* näher auf miRNA Bindestellen untersucht. Der 3'UTR des bei der Maus hauptsächlich translatierten Transkripts von *Mtss1* weist eine Länge von 2190bp auf (siehe Abbildung 11). Die *in silico* Analyse wurde vorrangig mit TargetScan5.1 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA) durchgeführt und führte zur Identifikation von insgesamt 229 miRNAs, die mutmaßlich am 3'UTR von *Mtss1* binden können.

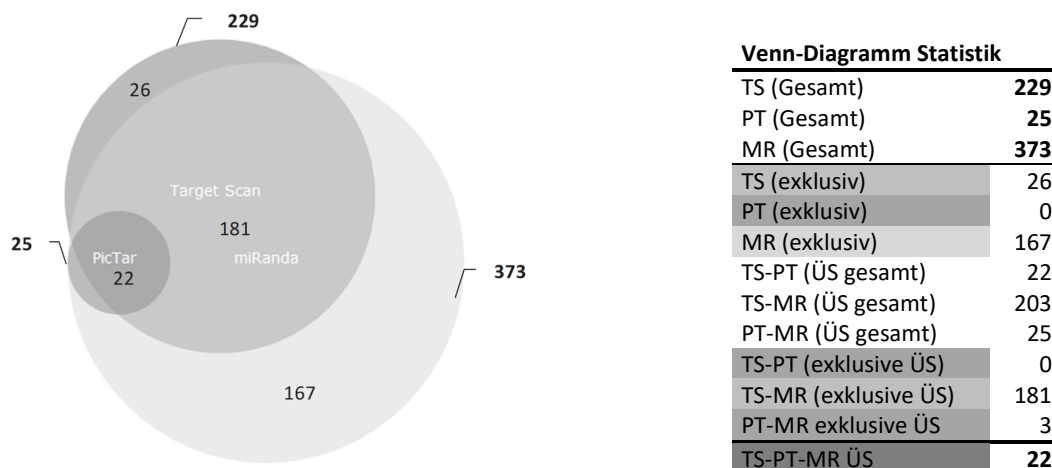


**Abbildung 11|Vorhergesagte miRNA-Bindestellen im 3'UTR von *Mtss1*.**

Schematische Darstellung des 3'-UTRs des Gens *Mtss1* bei der Maus mit den aus TargetScan identifizierten Bindestellen. Es sind miRNAs mit einer Bindewahrscheinlichkeit  $P_{CT} > 0,10$  dargestellt. Hochkonservierte miRNAs erhalten gegenüber weniger konservierten miRNAs eine höhere Bindewahrscheinlichkeit und überwiegen daher (graue Schrift: weniger hoch konservierte miRNAs). Eigenschaften der miRNA „Seed“-Bindung werden grafisch unterschieden: (grün) 8-mer; (blau) 7-mer1A; (orange); 7-mer-m8.

Um die Ergebnisse von TargetScan kritisch zu überprüfen wurden zwei weitere Datenbanken eingebunden. Dabei handelte es sich um PicTar (Max Delbrück Zentrum, Berlin) und miRanda-miRSV (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NY). Alle drei Datenbanken verwenden eigene Algorithmen, die vergleichbare Kriterien für ihre Berechnung anwenden (Friedman et al., 2009b). Zu diesen gehören vor allem die Sequenzübereinstimmung der miRNA-Erkennungssequenz (engl. *seed*) zur mRNA-Bindestelle, die Kalkulation der freien Energie des entstehenden RNA-Duplexes, die 3'-seitige Basenpaarung und schließlich die evolutionäre Konservierung unter verschiedenen Spezies. Unterschiede sind in technischen Einzelheiten wie zum Beispiel der Gewichtung der einzelnen Kriterien zu finden. Außerdem gibt es Unterschiede bei der Quelle der miRNA Datensätze sowie 3'UTR Sequenzen (siehe Tabelle A1

im Anhang) als auch bei der Darstellung der Ergebnisse. Diese werden jeweils als spezifischer Wert (Score) kalkuliert und ausgegeben. TargetScan und PicTar geben zusätzlich einen Wert an, der in eine prozentuale Wahrscheinlichkeit der miRNA-Bindung zum 3'UTR der Ziel-mRNA umgerechnet werden kann. Diese Ergebnisse werden als Listen nach Höhe der erzielten Werte sortiert und ausgegeben.



#### Abbildung 12 | Überschneidungen verschiedener Vorhersagemodelle für miRNA-Bindung.

Hier schematisch als Venn-Diagramm dargestellt sind die Ergebnisse der durchgeführten Datenbankanalysen für die Vorhersage von miRNA Bindungen am 3'UTR von *Mtss1*. Eine Schnittmenge von 22 miRNAs wurde von den drei hier verwendeten Algorithmen vorhergesagt. TargetScan(TS), PicTar(PT) und miRanda(MR). Das Venn-Diagramm wurde mit Hilfe von BioVenn (Hulsen et al., 2008) erstellt.

Durch Verwendung von drei unterschiedlichen Algorithmen konnten insgesamt 399 Sequenzen reifer miRNAs<sup>2</sup> identifiziert werden, die potentiell am 3'UTR von *Mtss1* binden. Viele miRNAs besitzen die gleiche oder eine sehr ähnliche Seed-Sequenz, d.h. es werden häufig gemeinsame oder überlappende Bindestellen verwendet. Um hieraus potentiell gute Kandidaten einer *Mtss1* Regulation herauszufiltern, wurde zunächst die Schnittmenge der Ergebnisse dieser drei Vorhersagemodelle gebildet. Dies führte zur Identifikation von 22 miRNAs (siehe Abbildung 12). Anschließend wurde diese Schnittmenge mit der Vorhersage von TargetScan abgeglichen. Für diesen Vergleich wurden lediglich solche miRNAs selektiert, welche in TargetScan einen P<sub>CT</sub> Score (engl. *probability of conserved targeting*; Friedmann et al., 2009) größer 0,10 besaßen und somit eine erhöhte Bindewahrscheinlichkeit aufwiesen.

<sup>2</sup> Unterschiedliche prä-miRNAs können zur gleichen prozessierten reifen miRNA führen.

In Tabelle 20 sind diese Ergebnisse zusammengefasst. Hierbei sind die ermittelten Vorhersagen für miRNAs aus der TargetScan Vorhersage ( $P_{CT}$ -Score > 0,10) aufgeführt und vergleichend gegenüber den Vorhersagen aus PicTar und miRanda gegenübergestellt. Die miRNAs sind hier nach abnehmender Bindewahrscheinlichkeit einer Bindung aufgelistet. Insgesamt waren dies 33 miRNAs, die sich in sieben Gruppen einteilen lassen, welche jeweils die gleiche Bindestelle – auch als MRE (engl. *miRNA recognition element*) bezeichnet erkennen. Diese werden hier nebeneinander aufgeführt und haben somit die gleiche Seed-Sequenz. Aus der ermittelten Schnittmenge 22 gemeinsamer miRNAs sind 19 hier vertreten. Unterschiede gab es lediglich bei der Reihenfolge der ausgegebenen Wahrscheinlichkeiten. Während eine Bindung von *miR-96*, *miR-182* und *miR-135ab* bei allen drei Datenbanken mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhergesagt wurde, war dies bei anderen miRNAs wie z.B. *miR-103* und *miR-23ab* anders. Die Bindestellen für *miR-103* befinden sich bei TargetScan an sechster Stelle, während bei PicTar diese bereits an dritter Stelle gelistet ist. Die Bindestellen miRNAs *miR-23ab* werden bei miRanda gemeinsam mit *miR-1/-206* an vierter Stelle gelistet.

Einige miRNAs besitzen zudem mehrere Bindestellen am 3'UTR von *Mtss1*, was zu einem höheren *Context Score* führt und folglich zu einer höheren Bindewahrscheinlichkeit ( $P_{CT}$ ). Dies betrifft hier die miRNAs *miR-96*, *miR-182* und *miR-103a/-107/-107ab*. MiRNAs, welche keine hoch konservierten Bindestellen besitzen (CBS: *conserved binding site*) bekommen daher einen geringeren  $P_{CT}$  –Wert und sind in der unteren Tabellenhälfte vertreten. Die Wahrscheinlichkeit einer Bindung wird bei TargetScan als Dezimalzahl ausgegeben, wobei das Intervall zwischen 0 und 1 (0=0% und 1=100%) liegt. Der  $P_{CT}$  Score berücksichtigt neben quantitativen biochemischen Eigenschaften, wie der freien Energie ( $-\Delta G$ ) des miRNA-Moleküls, Sequenzübereinstimmung der *seed*-Region zum 3'UTR und Vorkommen von AU-reichen Sequenzen. Hinzu kommt die evolutionäre Konservierung der putativen miRNA-3'UTR Interaktion unter 28 Vertebraten.

Tabelle 20| Vergleich der Vorhersagen zwischen TargetScan, PicTar und miRanda

MiRNA	CBS (TBS)	Vorhersagewahrscheinlichkeit		
		TargetScan*	PicTar#	miRanda^
<b>miR-96/507/1271</b>	2 (2)	0,96	0,93	-1,1653
<b>miR-182</b>	2 (3)	0,84	0,95	-1,2531
<b>miR-135ab/135a-5p</b>	1 (1)	0,81	0,86	-0,6982
<b>miR-1ab/206/613</b>	1 (1)	0,47	0,85	-0,4484
<b>miR-141/200a</b>	1 (1)	0,26	0,79	-0,0136
<b>miR-103a/107/107ab</b>	0 (2)	0,19	0,94	-0,0473
<b>miR-15abc/16/16abc</b>	0 (1)	0,15	0,86	-0,0435
<b>miR-195/322/424/497/1907</b>	0 (1)	0,15	0,86	-0,1454
<b>miR-23abc/23b-3p</b>	1 (1)	0,11	0,74	-0,4484

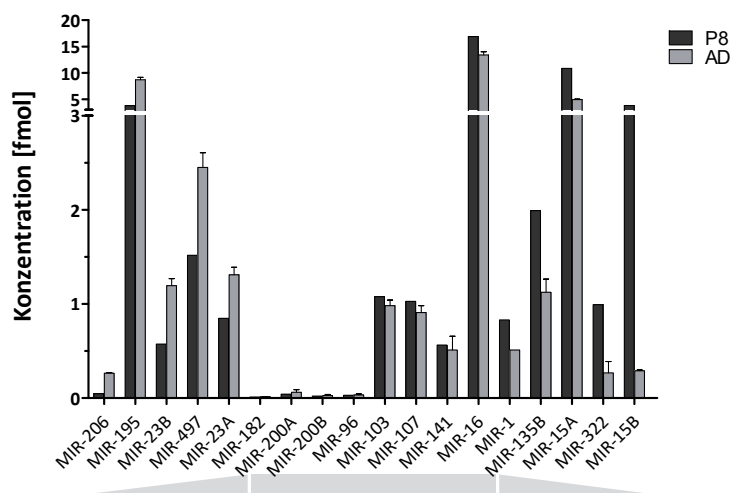
Drei gängige Algorithmen wurden für den Vergleich der miRNA Bindung am *Mtss1* 3'UTR herangezogen. Aufgeführt sind alle miRNAs mit einer Bindewahrscheinlichkeit > 0,10 (TargetScan). In fetter Schrift gekennzeichnet sind 19 miRNAs aus der gemeinsamen Schnittmenge. Nebeneinander aufgeführt sind miRNAs, die das gleiche MRE erkennen („seed-families“). In der zweiten Spalte sind die Anzahl an konservierten und Gesamt- miRNA-Bindestellen im 3'UTR von *Mtss1* angegeben. Daneben sind die Vorhersagewahrscheinlichkeiten bzw. Werte aufgeführt: \* P<sub>CT</sub> nach Friedmann et al., 2010; #PicTar nach Krek et al., 2009 und miR-SVR ^ nach Betel et al., 2010; CBS: conserved binding sites, TBS: total no. of binding sites, MRE: miRNA-recognition element.

Aus den vorhergehenden Überlegungen und Untersuchungen ergaben sich die folgenden Grundkriterien für eine weitere Charakterisierung der miRNA – *Mtss1* mRNA Interaktion durch Bindungsstudien:

1. Die miRNA Kandidaten müssen eine hohe Interaktionswahrscheinlichkeit mit der *Mtss1* mRNA in allen drei verwendeten Vorhersagemodellen aufweisen.
2. Die zu untersuchenden miRNAs müssen im Cerebellum exprimiert werden.
3. Alle miRNAs die zudem eine differentielle Expression zwischen P8 und Adultstadium, mit einem zu *Mtss1*-gegenläufigem Expressionsmuster zeigen, stellen ideale Kandidaten für eine entwicklungsabhängige Regulation der Expression von *Mtss1* dar. Diese miRNAs wurden mithilfe der Expressionsdaten des miRNA-Microarrays ermittelt und im nächsten Schritt näher analysiert.

### 3.2.1 *Mtss1* SPEZIFISCHE MIRNA-EXPRESSIONSANALYSEN IM CEREBELLUM DER MAUS

Führt man die Ergebnisse aus den vorherigen Abschnitten zusammen, so konnten mittels Datenbankanalysen mehrere miRNAs identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Bindung am 3'UTR von *Mtss1* eine regulative Funktion ausüben könnten. Der Abgleich aller hierbei ermittelten miRNAs mit den Expressionsdaten des miRNA-Microarrays führte zur Identifizierung von 18 miRNAs. Zehn dieser miRNAs wiesen eine differentielle Expression größer als 1,5-fach zwischen P8 und dem Adultstadium auf (siehe Abbildung 13; Tabelle A3 im Anhang). Bei fünf dieser miRNAs war die differentielle Expression gegensätzlich zum Expressionsverlauf von *Mtss1*. Hierbei handelte es sich um die miRNAs *miR-206* (5,6-fach), *miR-195* (2,3-fach), *miR-23a* (2,1-fach), *miR-23b* (1,6-fach) und *miR-497* (1,5-fach). Diese könnten daher maßgeblich in eine entwicklungsabhängige Herunterregulation von *Mtss1* involviert sein. Eine negative Korrelation zwischen der Expression gewebespezifischer Transkripte und deren regulierender miRNAs stellt generell einen guten Hinweis für diese Annahme dar (Farh et al., 2005; Ritchie et al., 2009; Sood et al., 2006). Diese Hypothese wurde hier für andere entwicklungsrelevante Gene des Cerebellums exemplarisch überprüft (siehe Abbildung A9 im Anhang). Dabei zeigte sich, dass auch deren Transkripte mutmaßlich durch miRNAs mit inversem Expressionsprofil reguliert werden können.



**Abbildung 13 | Microarray Analyse: *Mtss1* bindende MiRNAs.**

Hier dargestellt sind Expressionsniveaus aller *Mtss1* bindender miRNAs aus dem miRNA-Microarray (MirXplore; Miltenyi Biotec). Berücksichtigt sind alle miRNAs aus Tabelle 20 ( $P_{CT}$ -Score > 0,10). Die Expression ist hier in fmol angegeben. Verglichen wurden Gesamt-Cerebella von P8 und adulten Mäusen (n=2; Fehlerbalken  $\pm$ SEM).

Die Expressionsniveaus von *mir-182* und *miR-96* waren zu gering (< 0,1 fmol) um deren differentielle Expression zuverlässig bewerten zu können. Deren Expression wurde zusätzlich mittels qRT-PCR analysiert (siehe 0), mit welcher wesentlich präzisere Expressionsdaten ermittelt werden können.

### 3.2.2 VERGLEICHENDE DATENBANKANALYSE ZUR MIRNA-BINDUNG BEI IMD-PROTEINEN

Wie in der Einleitung beschrieben, gehört *Mtss1* zur IMD-Proteinfamilie, deren Mitglieder ähnliche Strukturen und biologische Funktionen aufweisen. In diesem Abschnitt geht es um die Frage, ob miRNAs, die mit hoher Wahrscheinlichkeit am *Mtss1*-3'UTR binden (Abschnitt 3.2; Tabelle 20), auch andere Mitglieder der IMD-Proteine theoretisch regulieren könnten. Daher wurden mittels TargetScan alle Mitglieder der IMD-Proteinfamilie auf mögliche miRNA-Bindung überprüft und miteinander verglichen. Dies ergab insgesamt 15 mögliche Szenarien einer Regulation mehrerer IMD-Proteine durch die gleichen miRNAs. Hieraus sind in Tabelle 21 die miRNA Interaktionen aufgelistet, bei denen der P<sub>CT</sub>-Score für beide Zielgene größer als 0,10 war. Zwei dieser Möglichkeiten betrafen *Mtss1*, welches mit *Baiap2* durch die miRNA-Gruppen *miR-1/-206/-613* (P<sub>CT</sub>: *Mtss1*=0,47; *Baiap2* = 0,55) und *miR-15abc/16/16abc/195/322/424/497/1907* zugleich reguliert werden könnte (P<sub>CT</sub> *Mtss1*=0,15; P<sub>CT</sub> *Baiap2*=0,49). Zwei weitere mögliche Interaktionen waren bei den miRNAs *miR-101ab* und *miR-29abcd* zu finden, welche putativ am 3'-UTR von *Mtss1l* (Abba) und *Baiap2* binden können. Die beiden miRNAs *miR-9ab* können möglicherweise am 3'-UTR von *Baiap2* und *Baiap2l1* binden.



**Tabelle 21 | Putative IMD-Protein spezifische miRNAs**

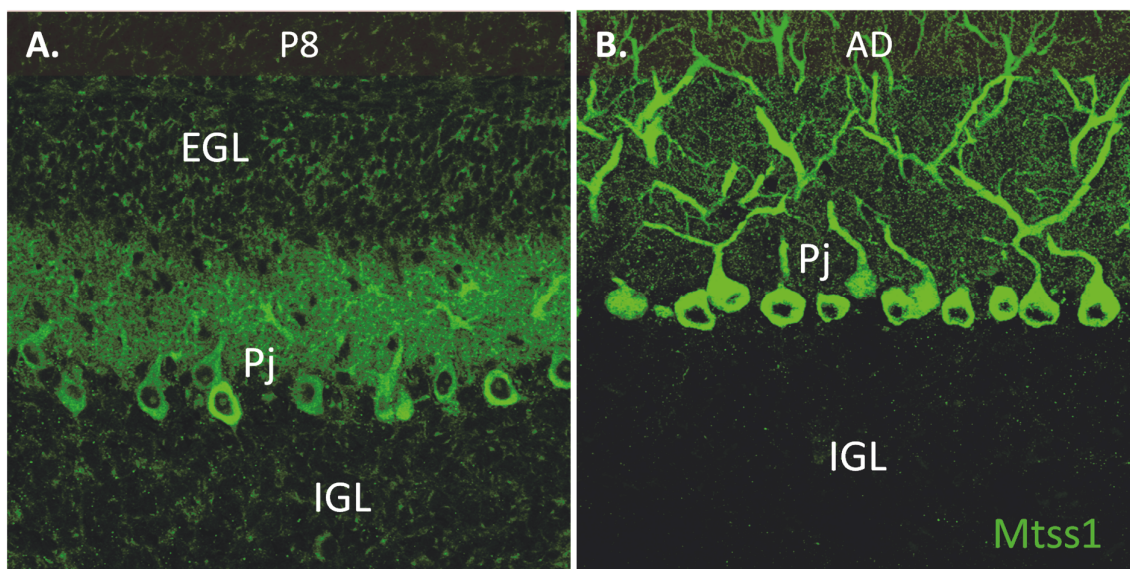
miRNA	P <sub>CT</sub>	Gen
<i>miR-101/101ab</i>	0,53	<i>Baiap2</i>
<i>miR-101/101ab</i>	0,31	<i>Mtss1l</i>
<i>miR-15abc/16/16abc/195/322/424/497/1907</i>	0,49	<i>Baiap2</i>
<i>miR-15abc/16/16abc/195/322/424/497/1907</i>	0,15	<i>Mtss1</i>
<i>miR-1ab/206/613</i>	0,55	<i>Baiap2</i>
<i>miR-1ab/206/613</i>	0,47	<i>Mtss1</i>
<i>miR-29abcd</i>	0,81	<i>Baiap2</i>
<i>miR-29abcd</i>	0,83	<i>Mtss1l</i>
<i>miR-9/9ab</i>	0,83	<i>Baiap2</i>
<i>miR-9/9ab</i>	0,39	<i>Baiap2l1</i>

Hier dargestellt sind die Bindewahrscheinlichkeiten von miRNAs (TargetScan), welche mehrere IMD-Proteine regulieren können. In einer Zeile werden miRNAs zusammengefasst, die dieselbe Seed-Sequenz erkennen. Berücksichtigt wurden auch hierbei nur miRNAs mit einem P<sub>CT</sub> Score > 0.10 (TargetScan).

Aus der Microarray Analyse (Abschnitt 3.1 und 3.2.1) ist bekannt, dass *miR-15ab* und *miR-1/-206* differentiell reguliert werden und dass es bei *miR-29ab* zu einer starken Zunahme im adulten Stadium kommt. Demnach könnten diese miRNAs an einer entwicklungspezifischen Regulation mehrerer IMD-Proteine zugleich beteiligt sein. Daher wurde als nächstes die Zelltyp-spezifische Expression der IMD-Proteine in den Stadien P8 und adult untersucht und miteinander verglichen.

### 3.3 IMMUNCYTOCHEMISCHE ANALYSEN ZUR ENTWICKLUNGSABHÄNGIGEN EXPRESSION VON *MTSS1* UND ANDERER IMD-PROTEINE IM KLEINHIRN DER MAUS

Die in Abschnitt 3.2.2 dargestellten bioinformatischen Analysen zeigen, dass es möglicherweise innerhalb der IMD-Proteinfamilie zur simultanen Regulation durch die gleichen miRNAs kommen könnte. Es wurden daher Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt, um die zelluläre Expression von Mitgliedern der IMD-Proteinfamilie im P8 und adulten Kleinhirn vergleichend zu *Mtss1* zu analysieren (siehe Abbildung 14 u. 15). Vorab wurde das Expressionsmuster der jeweiligen Gene im Allain Brain Atlas (siehe Abbildung A8 im Anhang) angeschaut. Bei Ko-Lokalisation im gleichen Zelltyp wäre die potentielle Regulation mehrere IMD-Proteine durch die gleichen miRNAs möglich.



#### Abbildung 14 | *Mtss1* Expression in der postnatalen Entwicklung des Cerebellums

Immunfluoreszenzanalyse (B. Eiberger) an Kleinhirndickschnitten der Maus. Schnitte wurden in 4% PFA fixiert und mit  $\alpha$ -*Mtss1* Antikörper und Alexa-488 gekoppeltem Zweitantikörper behandelt. **A.** *Mtss1* Expression an P8 war in der EGL, Purkinje-Zellschicht (Pj) und in der IGL zu erkennen. **B.** *Mtss1* Expression im Adultstadium ist auf die Pj begrenzt.

Die differentielle Expression von *Mtss1* in Körnerzellen des Cerebellums wurde vorab bereits von unserer Arbeitsgruppe beschrieben (Glassmann et al., 2007). Immunfluoreszenz-Analysen (Abbildung 14; von B. Eiberger zur Verfügung gestellt) zeigen die Expression von *Mtss1* im Cerebellum der Phase P8 und im Adultstadium. Hierbei ist *Mtss1* im P8 Stadium deutlicher in

Körnerzellen der EGL und in Purkinje-Zellen erkennbar. In der IGL sind ebenfalls *Mtss1*-positive Körnerzellen vorhanden. Im adulten Tier ist die Expression auf Perikarya und Dendritenäste von Purkinje-Zellen beschränkt.

Es wurden hier Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt (Abbildung 15), um die entwicklungspezifische cerebelläre Expression der restlichen IMD-Proteine in den Stadien P8 und adult vergleichend darzustellen. Zu diesen Proteinen gehören *Metastasis suppressor1 like protein (Mtss1)*, *Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associate protein 2 (Baiap2)*, *Baiap2-like1 (Baiap2L1)* und *Baiap2-like-2 (Baiap2L2)*. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse der vergleichenden Immunfluoreszenzanalyse sind in Tabelle 22 zusammengefasst. Hierbei sind die beobachteten Signalintensitäten der Immunfärbung jeweils in Zellschichten des Cerebellums vergleichend von P8 zu adult gegenübergestellt.

**Tabelle 22 | Postnatale Expression der IMD Proteine in Zellschichten des Cerebellums**

IMD-Protein	P8					AD			
	Zellschicht					Zellschicht			
	Pj	IGL	EGL	ML	WS	Pj	IGL	ML	WS
<i>Mtss1</i>	(++)	(++)	(++)	0	0	(+++)	0	0	0
<i>Mtss1l</i>	(+++)	(+)	0	0	0	(++)	(+)	(++)	0
<i>Baiap2</i>	0	(+)	0	0	0	(+++)	0	0	0
<i>Baiap2l1</i>	0	(+)	0	(++)	(++)	0	0	0	0
<i>Baiap2l2</i>	0	0	0	0	(++)	0	(++)	0	0

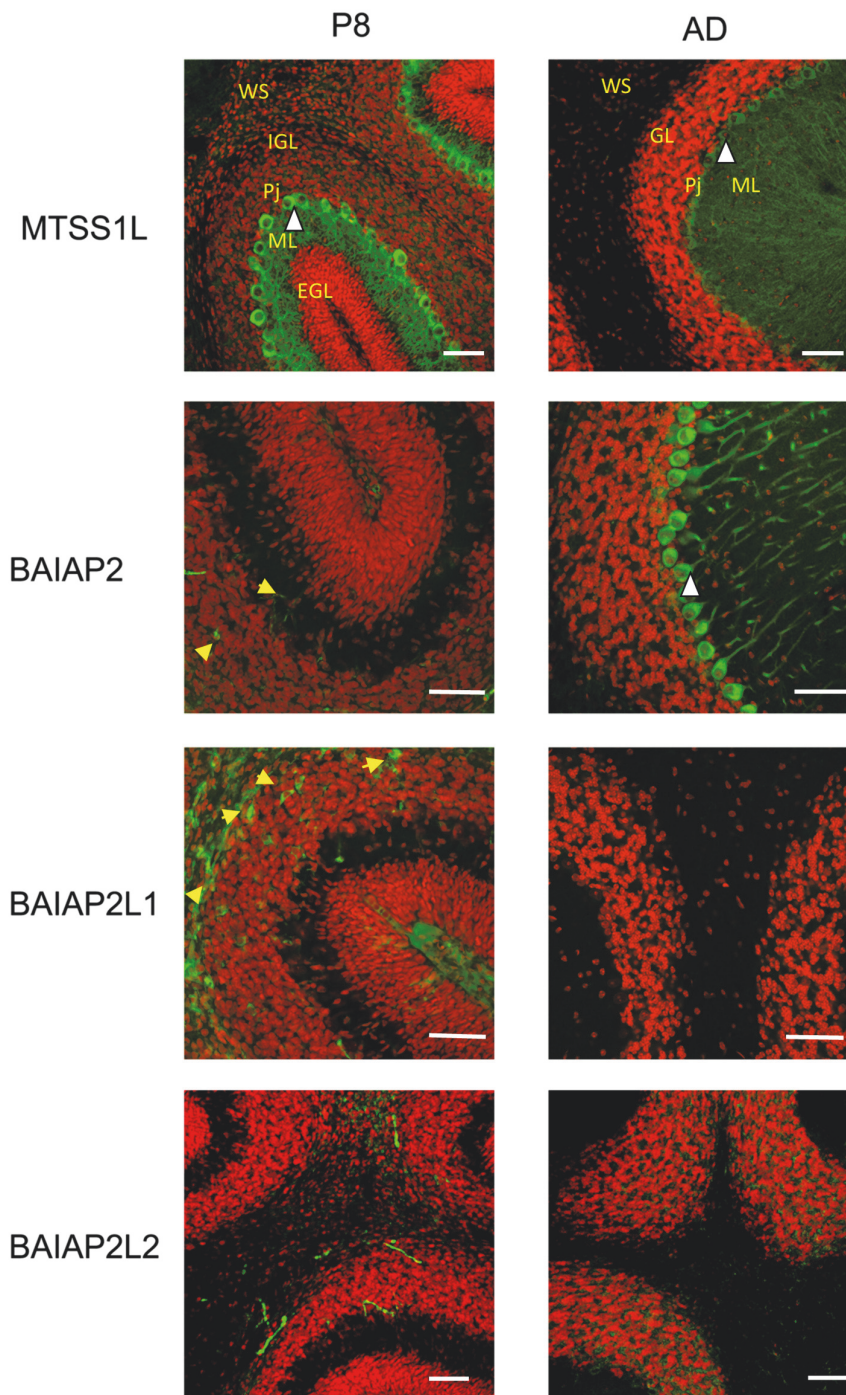
Expression der IMD Proteine in verschiedenen Zellschichten des Cerebellums von P8 und adulten Mäusen. Die Signalintensitäten der Immunfärbungen sind wie folgt zu interpretieren: (+) schwach, (++) deutlich, (+++) sehr deutlich. Abk.: Pj (Purkinje-Zellschicht), IGL (innere Körnerzellschicht), EGL (äußere Körnerzellschicht), ML (Molekularschicht), WS (weiße Substanz).

Bei *Mtss1l* (Abba) war eine starke Expression in Purkinje-Zellen im P8-Stadium erkennbar, die in den Perikarya der Zellen gleichmäßig verteilt war. Die Dendritenbäume waren ebenfalls deutlich *Mtss1l*-positiv. In der inneren Körnerzellschicht (IGL) war eine cytoplasmatische Expression erkennbar, während die EGL negativ für *Mtss1l* war. Im Adultstadium waren die Purkinje-Zellen nur noch sehr schwach angefärbt und zeigten dabei das gleiche Verteilungsmuster wie bei P8. Im Adulttier waren in der Molekularschicht (ML) einzelne Zellen *Mtss1l* positiv und zeigten eine Morphologie, die vermutlich auf Korb-/Sternzellen schließen

lässt. In Körnerzellen adulter Tiere war eine schwache Anfärbung erkennbar, die den Zellkern ausspart und gleichmäßig im Soma verteilt ist.

Bei *Baiap2* war an P8 eine schwache Färbung in der IGL zu erkennen. Purkinje-Zellen zeigten im diesem Stadium keine *Baiap2* Expression. In der Molekularschicht waren einzelne Zellen erkennbar angefärbt. In Schnitten von adultem Cerebellum war eine deutliche Expression in Purkinje-Zellen nachweisbar, während in der Körnerzellschicht keine Expression beobachtet werden konnte. Die Purkinje-Zellen waren mit Ausnahme des Zellkerns vollständig angefärbt.

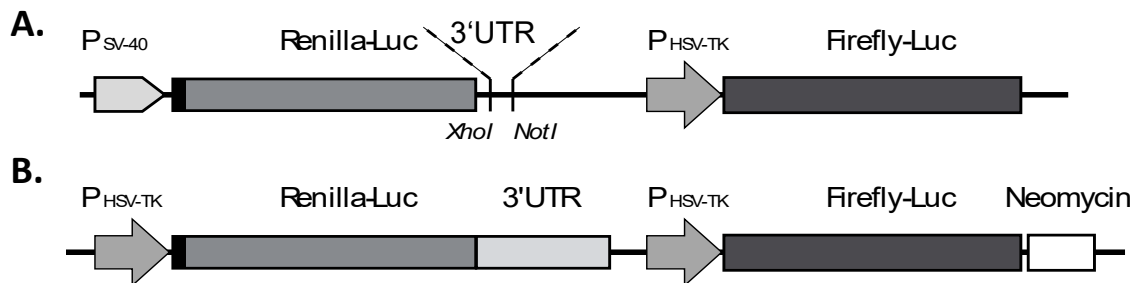
Immunfärbungen *Baiap2*-ähnlicher Proteine (*Baiap2/1* und *Baiap2/2*) zeigten keine Expression in Purkinje-Zellen. Dies galt sowohl für P8 als auch für das Adultstadium. Bei *Baiap2/1* war die Expression im P8 Stadium auf einzelne Zellen in der weißen Substanz und der Molekularschicht beschränkt. Diese Zellen wurden hier nicht näher charakterisiert. Bei *Baiap2/2* konnte eine geringe Expression in Körnerzellen des Adultstadiums beobachtet werden.



**Abbildung 15 | Immunfluoreszenz Analyse: Cerebelläre Expression der IMD-Proteinfamilie.**  
 Vergleichende Expression der IMD-Proteinfamilie im Cerebellum der Maus von P8 (li.) zu Adult (re). Die Kleinhirndickschnitte (25µm) sind mit entsprechenden Antikörpern des IMD-Proteins gefärbt (Zweitantikörper: Alexa-488; grün). In rot dargestellt sind die Perikaryen (Propidiumiodid-Färbung); weiße Dreiecke zeigen eindeutig positive Signale betreffender Zellschichten an. Gelbe Pfeile markieren eindeutig positive Signale einzelner Zellen. Balken entspricht 50µm.

### 3.4 Klonierung des psiCHECK-2 basierten Luciferase Reportersystems

Mittels Datenbankanalysen (Abschnitt 3.2) konnten im 3'UTR von *Mtss1* zehn miRNA-Bindestellen identifiziert werden, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Interaktion von miRNA zur mRNA führen. Um diese putativen miRNA-Bindemotive biologisch zu bestätigen, wurde ein Luciferase Reportersystem verwendet, welches auf dem psiCHECK-2 Vektor (Promega) basiert. Der Vektor psiCHECK-2 bietet durch Verwendung zweier Luciferase-Reportergene (Quallen- und Glühwürmchen-Luciferase) die Möglichkeit zur schnellen und quantitativen Expressionsanalyse einer Zielgenesequenz ohne Normalisierung durch Ko-Transfektion. Durch Klonierung des aus C57BL/6-DNA amplifizierten *Mtss1*-3'UTRs stromabwärts des Renilla-Luciferase-Gens wurde ein Fusionskonstrukt hergestellt, dessen Expression bei Bindung von miRNA-Molekülen reprimiert wird. Dabei wird die Glühwürmchen-Luciferase zur Normalisierung verwendet. Die Signalintensitäten der Luciferasen sollten im unbehandeltem Zustand idealerweise nicht zu stark voneinander abweichen. Deshalb wurde der SV-40 Promotor durch den HSV-TK (aus pRL-TK) Promotor ersetzt und somit beide Luciferasegene unter den gleichen Promotor gestellt. Dies führte zu einer vergleichbaren Expression beider Luciferaseaktivitäten (relative Lumineszenz Einheit: RLUs). Des Weiteren wurde eine Neomycin-Selektionskassette einkloniert, welche eine stabile Selektion nach Transfektion ermöglichte (siehe Abbildung 16).



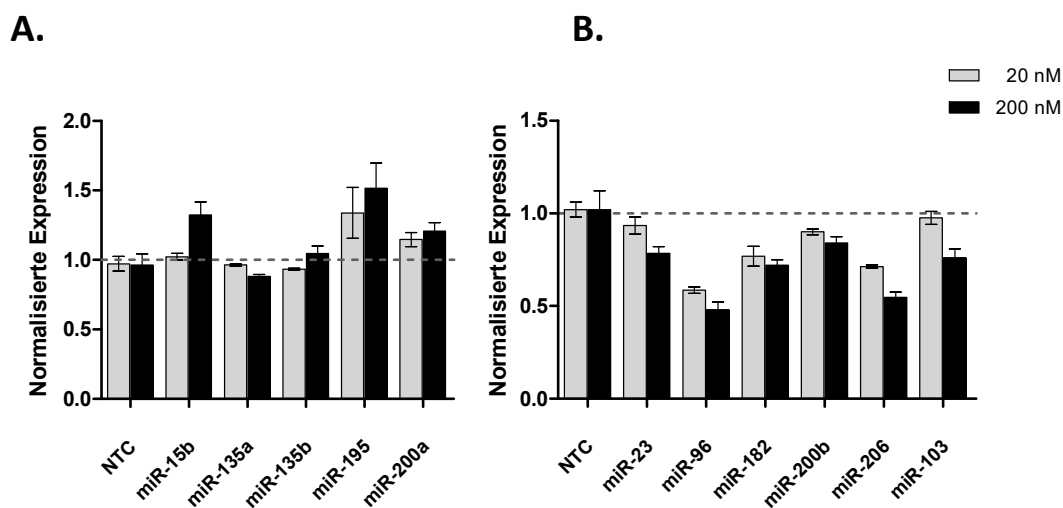
**Abbildung 16 | Klonierung des DLA-Reporterkonstruktes (psiCHECK2.2)**

**A.** Der Vektor psiCHECK-2 (Promega) wurde wie hier dargestellt verändert. **B.** Zunächst wurden beide Promotoren angeglichen, so dass beide Luciferasegene unter einem HSV-TK Promotor-Einfluss stehen. Zusätzlich wurde eine Resistenzkassette für Neomycin einkloniert, um eine stabile Selektion zu ermöglichen. Im letzten Schritt wurde der 3'UTR von *Mtss1* mit den dargestellten Schnittstellen (*XhoI/NotI*) 3'-seitig der Renilla-Luciferase (Renilla-Luc) einkloniert. P: Promotor

Das so generierte *Mtss1*-3'UTR DLA-Reporterkonstrukt wurde stabil in Hek293 Zellen eingebracht und Einzelzellklone selektioniert. Klone mit geeigneter Grundexpression (Glühwürmchenluciferase) wurden zur Validierung herangezogen. Für die hier durchgeführten Reporteranalysen wurden zwei unabhängige Klone mit unterschiedlicher Reporterexpression aus der Hek293-Zelllinie (E5 und E9) ausgewählt. Somit konnten Messungen mit unterschiedlicher Sensitivität durchgeführt werden bzw. Messungen unabhängig voneinander reproduziert werden.

### 3.5 FUNKTIONELLE ANALYSEN DER BINDUNG VON MIRNAS AN DEN 3'-UTR VON *Mtss1* MITTELS DES LUCIFERASE REPORTERSYSTEMS

Die hier verwendete Duale-Luciferase-Reporteranalyse (DLA) ermöglicht den Nachweis einer funktionellen miRNA-Bindung, indem die Interaktion zwischen einer miRNA mit dem hier einklonierten 3'-UTR von *Mtss1* zu einer verminderten Expression der Renilla Luciferase führt (siehe Abbildung 17A, B). Die Expression der Glühwürmchenluciferase dient hierbei zur internen Normalisierung. Es wurden zwei definierte Konzentrationen (20nM, 200nM) synthetischer miRNA-Moleküle (MiRNA Mimics, Dharmacon) eingesetzt und über Lipofektion in die Hek293-Zelllinie eingebracht, welche stabil das *Mtss1*-3'UTR-Reporterkonstrukt exprimiert. Als Kontrolle wurden nicht mit miRNA behandelte Zellen und Zellen verwendet, die mit einer so genannten Non-Targeting-Control (NTC) miRNA transfiziert wurden. Diese aus *C. elegans* stammende miRNA Sequenz bindet an keinem bekannten 3'UTR bei Mammalia.



**Abbildung 17| Messung der funktionellen Wirksamkeit der miRNA-Bindestellen am 3'UTR von *Mtss1* mittels Luciferase Reporteranalysen.**

Mit dem Reporterkonstrukt stabile transfizierte Hek293-Zellen wurden mit miRNAs (20nM; 200nM) transfiziert und die relative Luciferase Aktivität (RLU) 48h später gemessen. Zur Normalisierung wurden unbehandelte Zellen genommen bzw. als Kontrolle eine Non-Targeting Control miRNA (NTC). **A.** MiRNAs, die zu keiner maßgeblichen Repression der Luciferaseaktivität führten. **B.** MiRNAs, die am 3'UTR von *Mtss1* binden und zu einer maßgeblichen Repression des Reporterkonstruktes führten. (n=3; Fehlerbalken ± SEM)

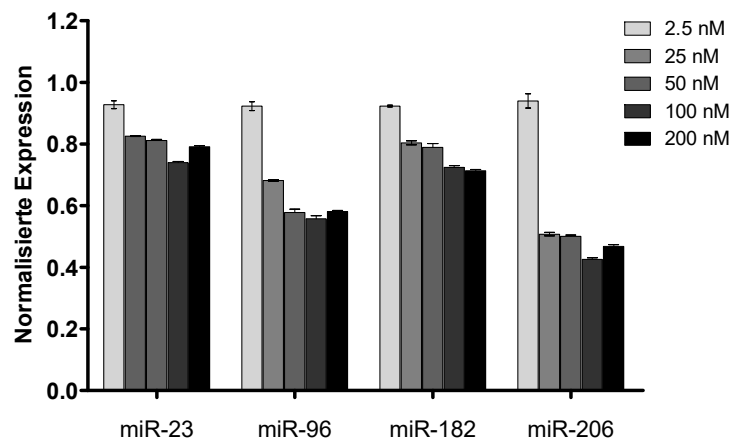


Die funktionelle Wirksamkeit einzelner durch TargetScan identifizierter miRNAs am 3'UTR von *Mtss1* wurde hier untersucht (siehe Abbildung 17). Von insgesamt elf untersuchten miRNAs führten sechs miRNAs zu einer maßgeblichen Repression der Luciferaseaktivität im Vergleich zur NTC-Kontrolle. Es handelt sich um folgende, der Repressionsstärke entsprechend (200nM: von stark nach schwach) aufgeführte miRNAs: *miR-96*, *miR-206*, *miR-182*, *miR-103*, *miR-23b* und *miR-200b*. Die miRNAs *miR-96* und *miR-182* vermögen an die gleiche mRNA-Sequenz am 3'UTR zu binden. Sie besaßen jedoch unterschiedliches Repressionsvermögen (*miR-96*: 51,9% und *miR-182*: 28,0%). Beide miRNAs stammen aus einem Cluster, wobei die Erkennungssequenz am 3'UTR um eine Base verschoben ist. *MiR-206* führte zu einer Repression von 45,4% und bei *miR-23b* betrug diese 21,6%. Schließlich waren die Repressionswerte von *miR-103* und *miR-200b* bei maximal 23,8% bzw. 16,0%. Bei *miR-103* konnte bei 20nM Konzentration keine signifikante Repression gemessen werden. Bei fünf miRNAs konnte keine maßgebliche Herunterregulation der Luciferaseaktivität gegenüber *miR*-NTC nachgewiesen werden. Zu ihnen zählen *miR-15b/-195* (gleiche Bindesequenz), *miR-135ab* und *miR200a*. *MiR-135a* führte bei 200nM zu einer leichten Repression, die jedoch nicht signifikant war.

### 3.5.1 KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DER REPRESSION DER MIRNA-BINDUNG AM 3'-UTR VON *Mtss1*

Im vorhergehenden Abschnitt wurden sechs miRNAs identifiziert, die zu einer signifikanten Repression durch Bindung des 3'UTRs von *Mtss1* führten. Im Folgenden stellte sich die Frage, ob die hier regulierenden miRNAs in Kombination zu einer höheren Wirkung bei der Repression führen. Dieses als synergistische Regulation bekannte Prinzip wurde bereits bei miRNAs beschrieben (Ivanovska and Cleary, 2008; Krek et al., 2005).

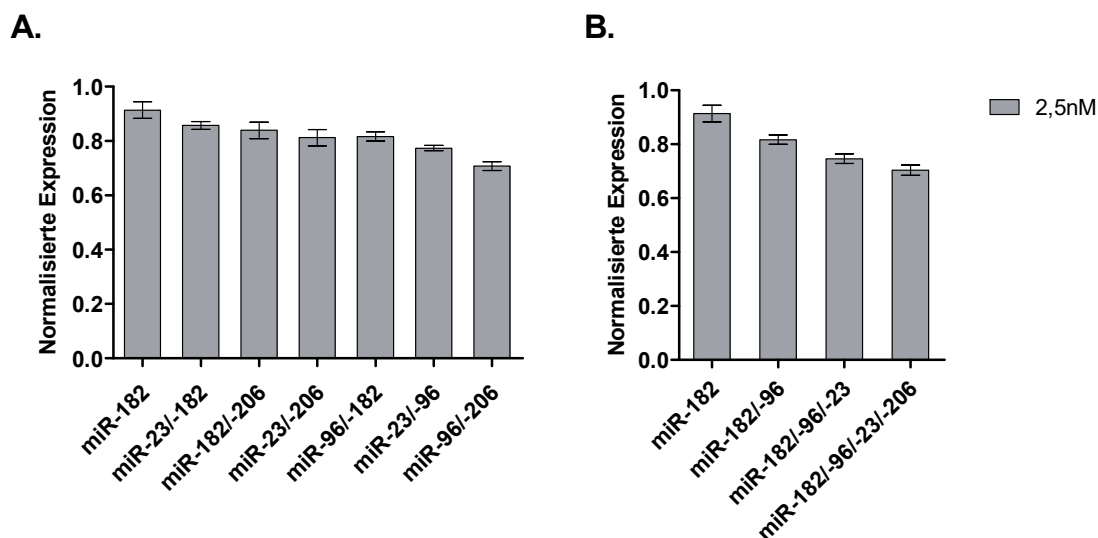
Zunächst wurde die konzentrationsabhängige Regulation einzelner miRNAs untersucht (siehe Abbildung 18). Folgende miRNAs wurden dabei näher untersucht: *miR-23b*, *miR-182* (*miR-96*) und *miR-206*. Diese miRNAs erwiesen sich als potente Kandidaten einer miRNA-Repression durch Bindung am 3'UTR von *Mtss1* (siehe 3.5) und weisen darüber hinaus eine gegensätzliche Expression zu *Mtss1* an P8 verglichen zum Adultstadium auf (siehe 3.2.1 und 3.5.2). Fünf unterschiedliche Konzentrationen an miRNA-Mimics wurden transfiziert (2,5nM; 25nM; 50nM; 100nM und 200nM) und jeweils zur entsprechenden Konzentration an miR-NTC normalisiert.



**Abbildung 18 | Konzentrationsabhängige Regulation der miRNA-abhängigen Repression.**

Das Luciferase-Reporterkonstrukt stabil exprimierende Hek293-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (2,5nM, 25nM, 50nM, 100nM, 200nM) der *Mtss1*-regulierenden miRNAs transfiziert und die Luciferase Aktivität 48h später gemessen. Als Kontrolle wurden Non-Targeting Control miRNA behandelte Zellen verwendet. (n=2; Fehlerbalken  $\pm$  SEM)

Eine 2,5nM Konzentration führte bei allen untersuchten miRNAs bereits zu einer erkennbaren Repression des Renilla-Luciferase Reportergens gegenüber der Kontrolle (miR-NTC). Die Reduktion betrug für *miR-23b* 7,2%, für *miR-96* 7,7%, für *miR-182* 7,7% und für *miR-206* 6,0%. Bei 25nM miRNA-Konzentration waren die Unterschiede unter den miRNAs deutlicher (*miR-23*: 17,4%; *miR-96*: 31,8%; *miR-182*: 19,6%; *miR-206*: 49,2%). Eine weitere Verdopplung auf 50nM Konzentration führte zu einer schwächeren Zunahme der Repression (*miR-23*: 19,8%; *miR-96*: 42,3%; *miR-182*: 21,1%; *miR-206*: 49,9%). Bei jeweiliger Behandlung mit *miR-23b*, *miR-96* und *miR-206* führte unter den hier gemessenen Konzentrationen die 100nM Konzentration zur maximal gemessenen Repression. Diese lag bei *miR-23b* bei 26%, bei *miR-96* bei 44,3% und schließlich bei *miR-206* bei 57,4%. Bei *miR-182* betrug die Repression bei 100nM Konzentration 27,6%. Eine weitere Verdopplung der Konzentration auf 200 nM führte teilweise zu einer abgeschwächten bzw. keiner weiteren Erhöhung der Repression der Reporterexpression (*miR-23*: 21,9%; *miR-96*: 41,9%; *miR-182*: 28,6% und *miR-206*: 53,3%). Dies lässt auf einen Sättigungscharakter der miRNA-Bindungen am 3'UTR von *Mtss1* schließen.



#### Abbildung 19 | Kombinatorische Wirkung miRNA-abhängiger Repression

Das Luciferase-Reporterkonstrukt stabil exprimierende Hek293-Zellen wurden mit jeweils 2,5nM Konzentrationen der *Mtss1*-regulierenden miRNAs transfiziert und die Luciferase Aktivität 48h später gemessen. Als Kontrolle wurden mit Non-Targeting Control miRNA behandelte Zellen verwendet. **A.** Vergleichende Repression der Luciferaseexpression in Zweierkombinationen. **B.** Kombinationen von bis zu vier miRNAs (n=2; Fehlerbalken  $\pm$ SEM)

Die Daten der konzentrationsabhängigen Regulation zeigten, dass es bei *miR-23b*, *miR-96*, *miR-182* und *miR-206* bereits ab 2,5nM Konzentration zu einer messbaren Repression kommt,

die gleichzeitig deutlich unter dem gemessenen Maximalwert. Daher wurden die sechs möglichen Kombinationen aus jeweils zwei miRNAs miteinander verglichen (siehe Abbildung 19A). Die stärkste Repression wurde mit der Kombination von *miR-96/-206* erzielt, wobei Konzentrationen von jeweils 2,5nM zu einer Gesamtrepression von 29,6% führten. Die Kombination aus den miRNAs *miR-23/-182* führte zu der schwächsten Repression von 14,3%.

**Tabelle 23|Untersuchung der miRNA Regulation auf Kooperativität**

miRNA		<i>miR-23</i>	<i>miR-96</i>	<i>miR-182</i>	<i>miR-206</i>
	<i>Repression</i>	<i>0,07</i>	<i>0,08</i>	<i>0,08</i>	<i>0,06</i>
<i>miR-23</i>	<i>0,07</i>		0,23	0,14	0,19
<i>miR-96</i>	<i>0,08</i>	0,15		0,19	0,29
<i>miR-182</i>	<i>0,08</i>	0,15	0,16		0,16
<i>miR-206</i>	<i>0,06</i>	0,13	0,14	0,14	

Manche miRNA-Kombinationen zeigten eine synergistische Wirkung bei der Repression am 3'UTR von *Mtss1*. Die Werte der Repression (Rp) einzelner miRNAs bei 2,5nM Konzentration (*miR-23*, *miR-96*, *miR-182* und *miR-206*) sind *kursiv* dargestellt. Diese sind hier gegen NTC normalisiert und als Dezimalwert angegeben (Wertebereich zwischen 0-1; 1=100%). Die experimentell gemessenen Werte der Repression der miRNA-Kombinationen sind in der oberen rechten Tabellenhälfte dargestellt. In der unteren linken Tabellenhälfte ist die Summe der Einzelrepressionen (theoretischer Erwartungswert) unter Annahme einer additiven Wirkung dargestellt. Je höher der Wert, desto höher die Repression und desto heller die Graustufe.

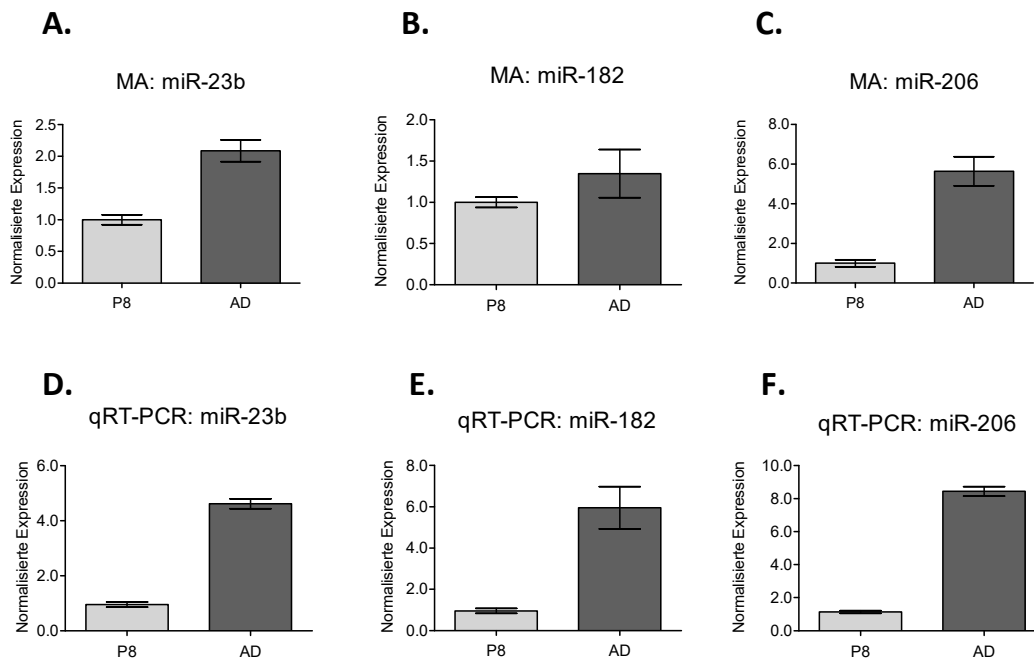
Um die kooperative Wirkung von miRNA-Bindungen zu untersuchen, wurden Kombinationsexperimente durchgeführt. Hierbei wurde die Summe der Einzelwirkung betreffender miRNAs als Referenz genommen. War die kombinierte Repression zweier miRNAs signifikant höher als die Addition der einzelnen Repressionen, lag eine kooperative Wirkung vor. War der Wert gleich oder kleiner, so lag ein rein additiver Effekt vor.

Um die Kooperativität aller Kombinationen vergleichend darzustellen, wurden die gemessenen Werte (Mittelwerte) in Tabelle 23 vergleichend gegenübergestellt. Die untere linke Tabellenhälfte zeigt die theoretischen Erwartungswerte, also die Summe der Einzelwerte der Repression. Dem gegenüber sind in der oberen rechten Tabellenhälfte die tatsächlichen gemessenen Repressionswerte der jeweiligen Kombinationen dargestellt. Einen positiven kooperativen Effekt zeigten folgende Kombinationen: *miR-96/-206*, *miR-96/-23* und *miR-23/-206*. Bei mit *miR-96/-206* behandelten Zellen war ein eindeutiger Synergieeffekt erkennbar, der deutlich die Summe der Einzelwirkungen übertraf. Hierbei wurde der angenommene additive Wert der Repression annähernd verdoppelt (+93,3%). Die Kombination aus *miR-96/-23* führte zur Steigerung um 53,3% (von 0,15 auf 0,23) gegenüber der Summe der Einzelwirkungen. Bei *miR-23/-206* war die Repression von 0,13 auf 0,19 erhöht (+46,2%). Die Steigerung der kombinierten Repression war bei der Kombination aus *miR-96/-182* mit 18,75% (0,16 auf 0,19) und bei *miR-182/-206* mit 14,3% (0,14 auf 0,16) relativ gering. Bei *miR-23/miR-182* Behandlung wird die Summe der einzelnen Repressionen etwas unterschritten.

In Abbildung 19B wurde ausgehend von *miR-182*, zusätzlich die Kombination aus drei bzw. aus allen vier beteiligten miRNAs gegenübergestellt. Die Repression bei gleichzeitiger Behandlung mehrerer miRNAs war additiv. Der Erwartungswert aus den Einzelrepressionen aller vier hier untersuchten miRNAs betrug 0,29. Die hier gemessene Repression betrug 0,31. Jeweils 2,5nM Konzentrationen von *miR-96* und *miR-206* (siehe Abbildung 19A) können durch weitere Zugabe von jeweils 2,5nM von *miR-23b* und *miR-182* in ihrer Repression nicht merklich verstärkt werden. Vielmehr stellte sich hier eine Repression ein, die dem Mittelwert der Repressionswerte entsprach.

### 3.5.2 EXPRESSIONSANALYSE *Mtss1*-3'UTR BINDENDER MIRNAs MITTELS qRT-PCR

Nach der Validierung der Bindung ausgewählter miRNAs am 3'UTR von *Mtss1* wurden zusätzlich Expressionsanalysen mittels qRT-PCR vorgenommen, um die relative Expression dieser miRNAs von P8 zu adult genauer zu ermitteln. Auch hierbei wurden die im Reporterexperiment hauptsächlich als regulierender identifiziertes miRNAs *miR-23b*, *miR-206* und *miR-182* untersucht. Dabei zeigte sich, dass die in der Microarray Analyse beobachtete Zunahme der Expression im adulten Cerebellum grundsätzlich durch die qRT-PCR bestätigt werden konnte. Die Zunahme der Expression von P8-Stadium verglichen zum Adulttier unterschied sich bei *miR-23b* und *miR-182* signifikant vom Microarray (siehe Abbildung 20). *MiR-23b* ist in den RT-qPCR Analysen 4,6-fach hochreguliert, während im Microarray eine 2,3-fache Regulation detektiert wurde. *MiR-182* zeigte eine 5,9-fach höhere Expression im Adultstadium verglichen mit einer 1,3-fachen im Microarray. Bei *miR-206* war die Abweichung am geringfügigsten mit einer 5,6-fachen Expression im Microarray gegenüber einer 8,4-fachen Regulation in der qRT-PCR.



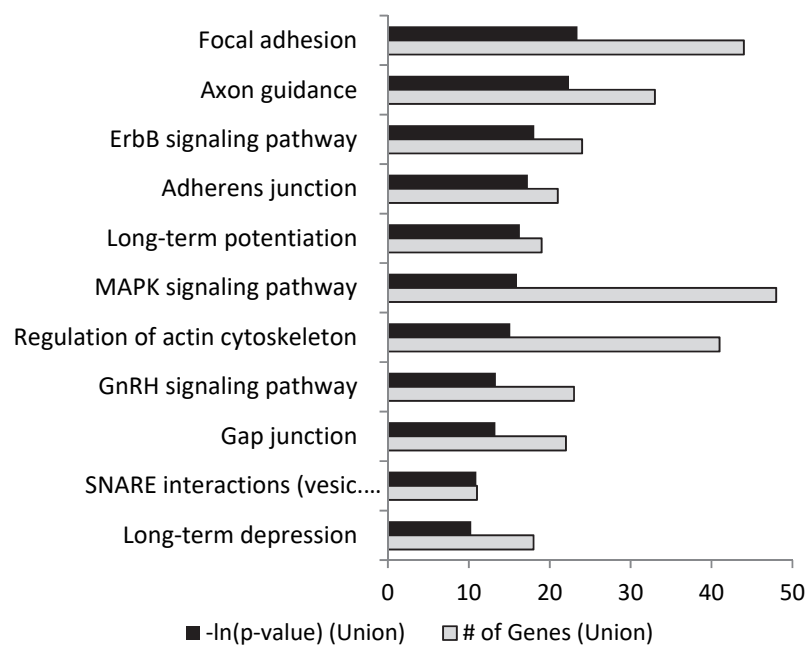
**Abbildung 20 | Vergleichende Expressionsanalyse von *miR-23*, *miR-182* und *miR-206***

Expressionsdaten aus dem Microarray (A-C) wurden für die differentiell regulierten miRNAs *miR-23*, *miR-182* und *miR-206* zusätzlich mittels qRT-PCR(D-F) analysiert. Die dargestellte miRNA Expression wurde gegen 5s-RNA als Referenzgen normalisiert. Die relative Expression wurde nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode bestimmt ( $n=2$ , Fehlerbalken  $\pm$  SEM).

## 3.6 IDENTIFIKATION GEMEINSAMER SIGNALWEGE

### 3.6.1 DIANA-MIRPATH

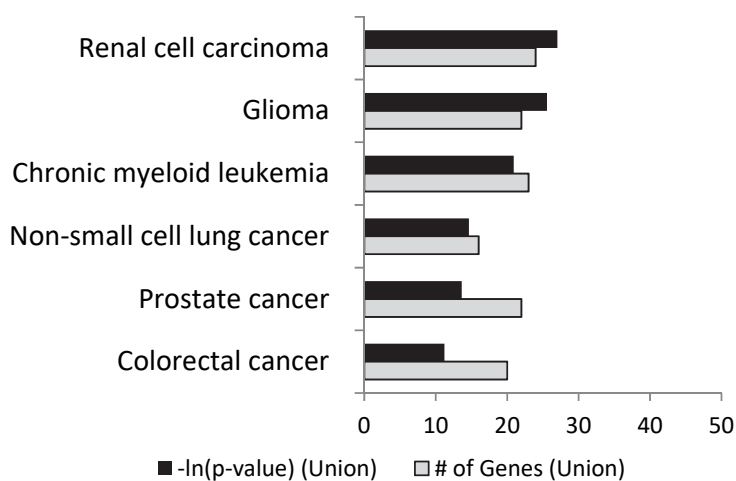
Die funktionelle Bestätigung der miRNAs, welche am 3'UTR von *Mtss1* binden und dessen Expression herunterregulieren (Kapitel 3.4), ermöglicht eine gezielte Suche nach Signalwegen, die möglicherweise gemeinsam durch mehrere dieser *Mtss1* spezifischen miRNAs reguliert werden können. Für diese Untersuchung wurde ein web-basiertes Analysewerkzeug verwendet (DIANA miRPath v1.0), welches Signalwege einzelner sowie kombinierter miRNAs identifizieren kann. Dies wird durch eine sog. Anreicherungsanalyse (engl. *Enrichmentanalysis*) bewerkstelligt, in der die Bindewahrscheinlichkeiten aller Zielgene betreffender miRNAs aufsummiert werden. Die hierbei identifizierten Gene werden mit allen bekannten KEGG Signalwegen (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Kanehisa und Goto, 2000) abgeglichen.



**Abbildung 21 | Enrichmentanalyse kombinierter miRNAs mittels DIANA miR-Path.**

Ergebnis der Anreicherungsanalyse von Zielgenen folgender miRNAs: *miR-23*; *miR-96*, *miR-182* und *miR-206*. Die Signalwege sind nach der Gesamtzahl der p-Values (cut-off  $-\ln(p\text{-Value}) > 10$ ), also der additiven Bindewahrscheinlichkeit aller beteiligten Gene in einem Signalweg sortiert. Die Bindewahrscheinlichkeiten stammen aus TargetScan5. Zusätzlich (grau) ist die Anzahl der putativ regulierten Gene in dem jeweiligen Signalweg angegeben. (Einzelwerte befinden sich in Tabelle A5 im Anhang).

In der hier durchgeführten Analyse wurden die differentiell exprimierten miRNAs *miR-23*, *miR-96/-182* und *miR-206* untersucht. Die Anreicherungsanalyse umfasste 1522 Gene, von denen 382 in 141 Signalwegen annotiert waren. In Abbildung 21 sind Signalwege dargestellt, deren Zielgene gemeinsam durch *miR-23b*, *miR-96*, *miR-182* und *miR-206* reguliert werden könnten. Hierbei wurde die Mindestgrenze (Summe der Bindewahrscheinlichkeiten)  $-\ln(\text{P-Wert})$  größer als 10 gewählt. Es wurden zwei Kriterien gewählt, welche wichtig für eine Beurteilung der Signalwege waren: die Anzahl der in diesen Signalwegen durch betreffende miRNAs regulierten Gene (graue Balken) und die Summe der Bindewahrscheinlichkeiten (P-Values; schwarze Balken; Werte als negativer Logarithmus dargestellt). Die Signalwege sind hier nach der Summe der P-Werte (aus TargetScan) sortiert, somit sind auch Kriterien, wie die phylogenetische Konservierung und die biochemische Bindeeigenschaft einzelner miRNAs einbezogen.



**Abbildung 22 | Enrichmentanalyse kombinierter miRNAs für verschiedene Krebsarten.**

Die Enrichmentanalyse (DIANA miRPath) von Zielgenen der miRNAs *miR23*, *miR-96*, *miR-182* und *miR-206* ist hier dargestellt. Die Tumor-spezifischen Signalwege sind nach der Gesamtzahl der p-Werte (cut-off  $-\ln(\text{p-Value}) > 10$ ), also der additiven Bindewahrscheinlichkeit aller beteiligten Gene in einem Signalweg sortiert. Die Bindewahrscheinlichkeiten stammen aus TargetScan5. Zusätzlich (grau) sind die Anzahl der putativ regulierten Gene in dem jeweiligen Signalweg angegeben.

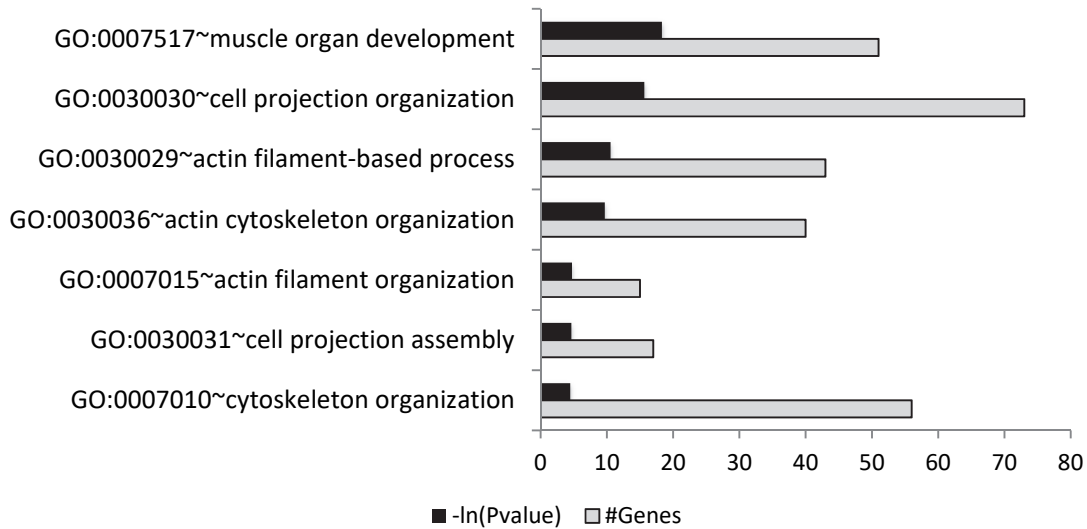
Interessanterweise konnten hierbei vor allem Signalwege identifiziert werden, die mit Zellmotilität, Adhäsion, Migration und Aktincytoskelettorganisation assoziiert sind (siehe Abbildung 21). Von großer Bedeutung waren hierbei mit jeweils über 30 beteiligten Genen die Fokaladhäsion, die Wuchsrichtungsbestimmung von Axonen (engl. *axon guidance*), der MAPK-



Signalweg und die Aktincytoskelett Regulation. Des Weiteren sind Adhärenzverbindungen (engl. *adherens junction*) und der *ErbB*-Signalweg zu nennen, welche beide zwar eine geringere Anzahl beteiligter Gene aufwiesen, dennoch über die additive Bindewahrscheinlichkeit als relevante Signalwege zugeordnet werden konnten. Tumor-assoziierten Signalwege wurden gesondert aufgeführt, um eine bessere Übersicht zu erhalten (siehe Abbildung 22). Hier sind Signalwege, die in der Pathogenese des Nierenzellkarzinoms, des Glioms, der chronisch myeloischen Leukämie, bei Lungenkrebs, sowie Prostata- und Kolorektalkarzinom eine Rolle spielen, hervorzuheben.

### 3.6.2 SIGNALWEGANALYSE KOMBINierter MIRNAS (GO-ANALYSE)

Parallel hierzu wurde eine GeneOntology-Analyse (GO-Analyse) durchgeführt. Im Unterschied zu den durchgeführten Signalweganalysen mittels DIANA-miRPath, konnten hierbei aufgrund der Annotierung der GO-Analyse ausschließlich *Mtss1* relevante Signalwege erfasst werden. Hierzu wurden die gleichen miRNAs wie bei der unter 3.6.1 beschriebenen Methode mit DIANA-miRPath untersucht. Dies waren die differentiell exprimierten miRNAs, für die vorab eine Bindung an *Mtss1* gezeigt werden konnte (*miR-23b*, *miR-96*, *miR-182*, und *miR-206*). Mittels Target Scan konnten Gene identifiziert werden, welche putativ durch jeweils eine dieser miRNAs reguliert werden können. Hieraus wurden Gene, deren Bindungswahrscheinlichkeit zur jeweiligen miRNA einen  $P_{CT}$ -Wert größer als 0,10 besaßen, erfasst und anschließend mittels DAVID Datenbanksystem (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) untersucht. Insgesamt waren dies 1444 Gene. Im letzten Schritt wurden diese Genlisten zusammengeführt, um so die Signalwege der *Mtss1*-regulierenden miRNAs zu identifizieren. Hier dargestellt (siehe Abbildung 23) sind Signalwege, in denen *Mtss1* über die GO-Datenbank (<http://geneontology.org/>) als beteiligtes Gen geführt wird. Diese sieben Signalwege sind hier ebenfalls nach Summe der Bindewahrscheinlichkeiten (P-Werte; schwarzer Balken) sortiert; gleichzeitig ist die Summe der putativ durch diese miRNAs regulierten Gene in dem jeweiligen Signalweg dargestellt (hellgrauer Balken).



**Abbildung 23 | Enrichmentanalyse kombinierter miRNAs mittels DAVID**

Hier dargestellt ist das Ergebnis der Anreicherungsanalyse von Zielgenen folgender miRNAs: *miR-23*; *miR-96*; *miR-182*; und *miR-206*. Die über TargetScan identifizierte Gene der betreffenden miRNAs wurden in das DAVID Analysesystem eingepflegt und die *Mtss1* relevanten Signalwege dargestellt (GO: Accession number).

Ziel dieser Analyse war es, gemeinsame Signalwege der *Mtss1* regulierenden miRNAs zu identifizieren. Dabei sollte ihre putativ regulative Funktion mit der differentiellen Expression von *Mtss1* im Cerebellum korreliert werden. Hierbei ist deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 23), dass wenn die Anreicherungsanalyse ausschließlich für *Mtss1* relevante Signalwege vorgenommen wird, vor allem Aktin-dynamische Prozessen und der Cytoskelettorganisation stark repräsentiert sind.

**3.6.3 DARSTELLUNG EINZELNER ZIELGENE DER AKTINCYTOSKELETT REORGANISATION**

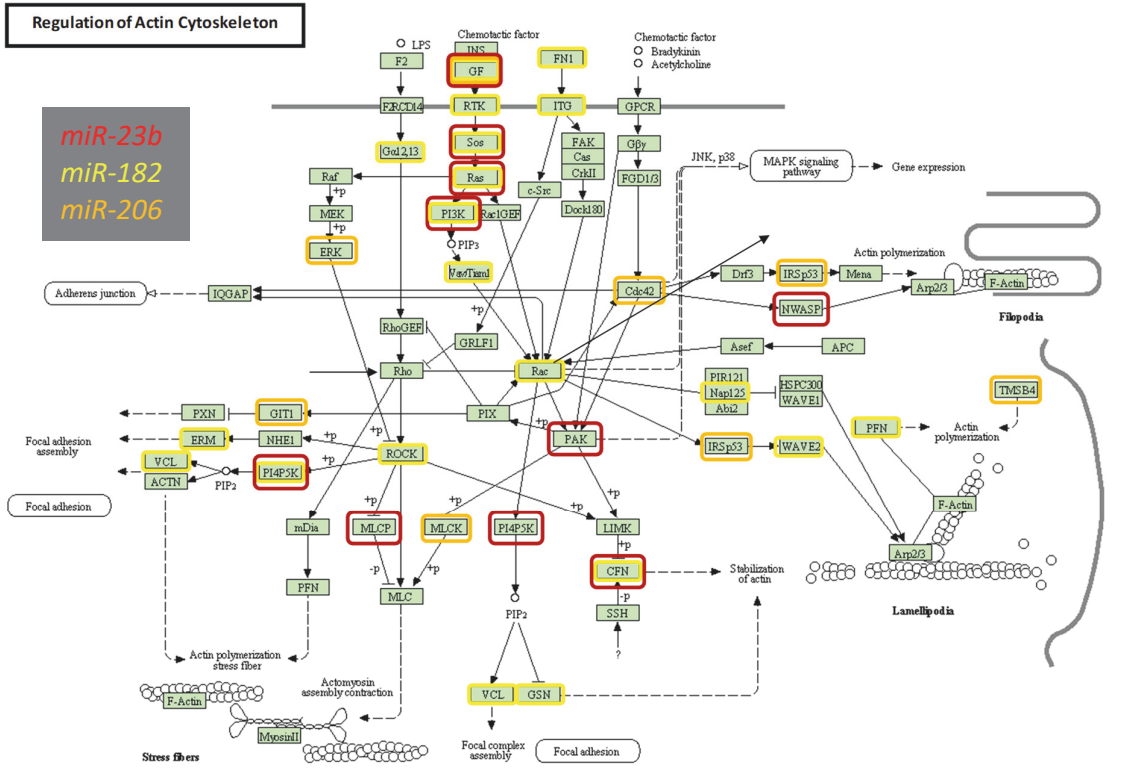
Als nächstes wurden alle putativ regulierten Gene angeschaut, die sich im zentralen Signalweg der Aktincytoskelett Regulation befanden. Hierbei war es wichtig, einen direkten Zusammenhang zu *Mtss1* und dessen Interaktionspartnern herzustellen. Bemerkenswert ist hierbei, dass direkte Interaktionspartner von *Mtss1*, wie z.B. *Cortactin* und *Rac1*, durch die gleichen miRNAs reguliert werden wie *Mtss1* selbst. Die durch DIANA-miRPath identifizierten Gene der Aktincytoskelett Regulation können als KEGG-Signalweg dargestellt werden (siehe

Abbildung 24). Hierbei sind die gemeinsam durch *miR-23b*, *miR-182* und *miR-206* regulierten Gene für diesen Signalweg explizit gekennzeichnet. Interessanterweise besitzen Zielgene der Aktincytoskelett Reorganisation hochkonservierte Bindestellen für mehrere *Mtss1*-relevante miRNAs (Tabelle 24). Herauszustellen sind unter diesen die GTPasen *RhoA* und *Rac1*, einige Aktin-bindende Proteine wie *Cortactin (Cttn)*, *Baiap2* und *Cofilin1 (Cfl1)*, Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise *Foxo3* sowie Rezeptoren für Wachstumsfaktoren wie *Pdgf- $\alpha$* .

**Tabelle 24 | Zielgene *Mtss1*-regulierender miRNAs bei der Aktin Cytoskelett Reorganisation**

Funktion	Zielgen	miRNAs
Aktin Cytoskelett Reorganisation	<i>Rac1</i>	<i>miR-182(1); miR-96(1); miR-200bc(1)</i>
	<i>Cdc42</i>	GTPasen
	<i>RhoA</i>	<i>miR-206 (1); miR-200a</i>
		<i>miR-200bc</i>
	<i>Cttn</i>	<i>miR-182 (2)</i>
	<i>Baiap2</i>	AIP
	<i>Cfl1</i>	<i>miR-206 (1); miR-15(1)</i>
	<i>Wave</i>	<i>miR-182(1), miR-96(1)</i>
		<i>miR-23ab(1); miR-200bc(1)</i>
	<i>ArhGEF7</i>	GEFs
	<i>RapGEF5</i>	<i>miR-182 (3), miR-96 (1), miR200bc (2)</i>
	<i>miR-182 (1), miR-96 (2)</i>	
<i>Fgf9</i>	GF	<i>miR-182 (2), miR-96 (2)</i>
<i>Pdgfa</i>	RC	<i>miR-206 (1)</i>
<i>Foxo3</i>	TF	<i>miR-182 (2), miR-96 (2)</i>

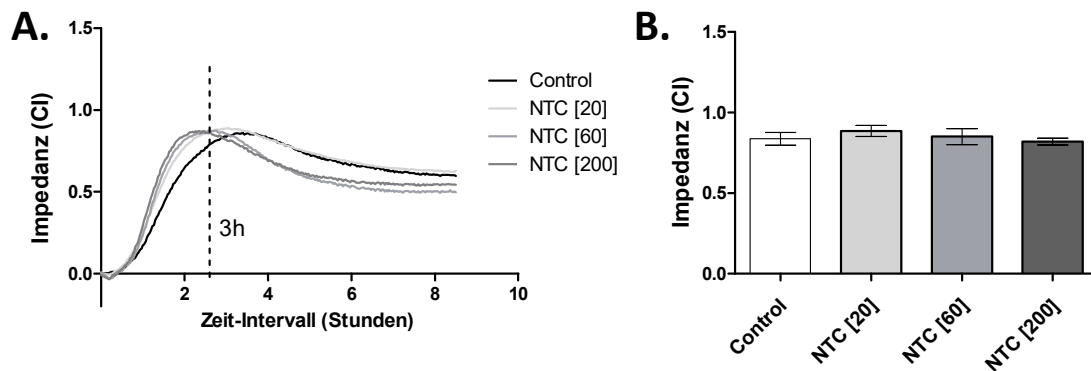
MiRNAs die mit hoher Wahrscheinlichkeit den 3'UTR von *Mtss1* regulieren, können möglicherweise auch andere Gene der Aktin Cytoskelett Reorganisation regulieren. Die hier ausgewählten Gene sind hoch konservierte Zielgene mit einem  $P_{CT} > 0.10$  (Target Scan). In Klammern ist zusätzlich die Anzahl der Bindestellen angegeben. *Abk.*: AIP - Aktin-interagierendes Protein, TF- Transkriptionsfaktor, GF - Wachstumsfaktor, GTPase, GEF- Guanin exchange Factor, RC – Rezeptor.



**Abbildung 24 | MiRNA regulierte Gene der Aktinzytoskelett Regulation.**  
 Hier dargestellt ist der KEGG Signalweg für die Regulation des Aktinzytoskeletts. Die über TargetScan identifizierte Gene von *miR23b*, *miR-182* und *miR-206* wurden hier kenntlich gemacht (rot: *miR-23*, gelb: *miR-182* und orange: *miR-206*).

### 3.7 *MTSS1*-SPEZIFISCHE MIRNAS REGULIEREN ZELL-PROLIFERATION UND ADHÄSION

Um die Effekte der differentiell regulierenden miRNAs (*miR-23b*, *miR-182* und *miR-206*) auf die Zelladhäsion (speziell das sog. Zellspreiten) und anschließende Proliferation in Echtzeit zu messen, wurden funktionelle Analysen mittels Impedanzmessungen (XCELLigence<sup>3</sup>) durchgeführt. Anhand der gemessenen Impedanz kann auf die Grösse und Zahl der im jeweiligen well der Messplatte vorhandenen Zellen geschlossen werden. Hierzu wurde die Maus-Fibroblastenzelllinie NIH3T3 gewählt, da sie eine deutliche und gut charakterisierte Morphologie bei Zelladhäsions- und Wanderungsprozessen zeigt und daher eine standardisierte Zelllinie darstellt. NIH3T3 Zellen wurden mit oben genannten miRNAs transfiziert und 48 h später auf einer mit Fibronectin-Matrix beschichteten Elektroden Platte (E-Platte) ausgesät. Pro Bedingung wurden jeweils parallel zwei unabhängige Messungen durchgeführt. Die Impedanz wurde für das Zellspreiten in einem Intervall von zwei Minuten gemessen. Zur Kontrolle dienten nicht mit miRNA transfizierte Zellen (nur mit Lipofektionsmittel) und mit NTC behandelte Zellen.

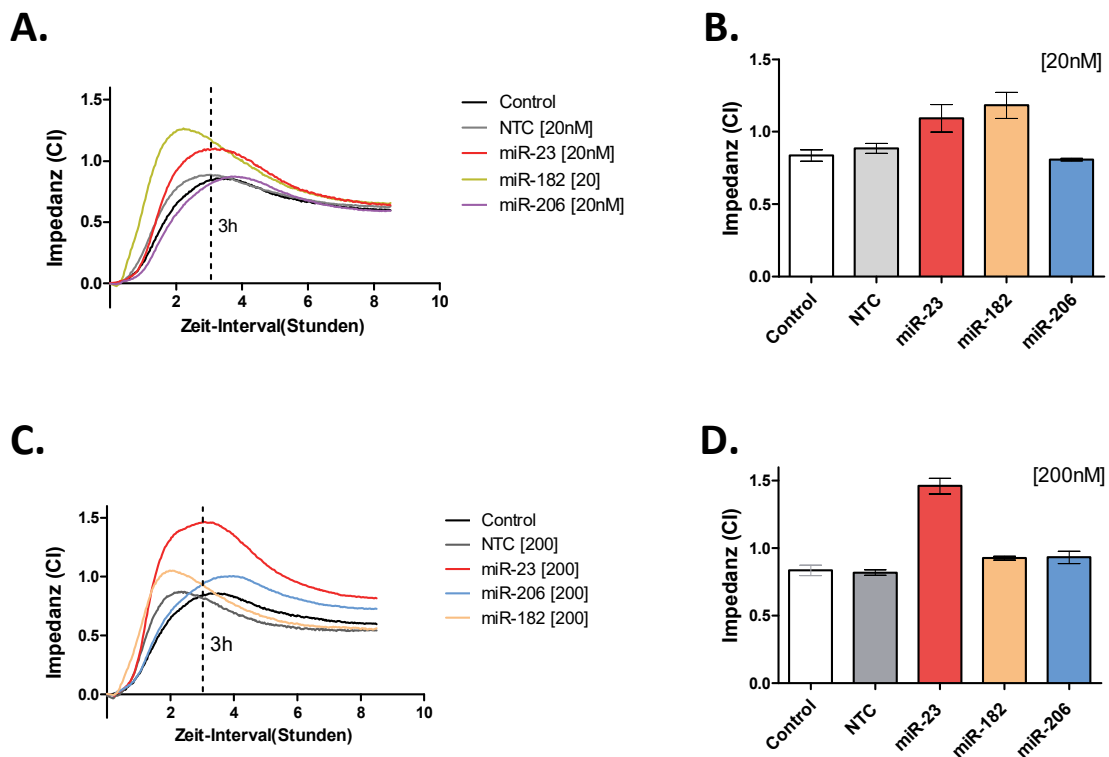


**Abbildung 25 | Impedanzanalyse zur Messung des Zellspreitens.**

**A.** Das experimentelle Setup wurde mit mehreren Kontrollen untersucht. Hier dargestellt ist das Zellspreiten unbehandelter Zellen (Control) im Vergleich zu Zellen, welche mit unterschiedlichen Konzentrationen von miR-NTC behandelt wurden. **B.** Das Balkendiagramm zum Kurvenverlauf 3h nach dem Aussähen. (n=2;  $\pm$ SD)

<sup>3</sup> Das xCELLigence System misst zelluläre Abläufe in Echtzeit durch Impedanz. Hierdurch kann quantitativ erfasst werden, ob Veränderungen in Morphologie, Vitalität und Zellzahl (Proliferation) stattfinden.

Beim Zellspreiten konnten zwischen den Kontrollen nur minimale Unterschiede gemessen werden. Unterschiedliche Konzentrationen von miR-NTC behandelten Zellen hatten keinen Einfluss auf das Zellspreiten (siehe Abbildung 25). Die maximale gemessene Abweichung (Mittewert) betrug ~ 7,75%. Die Balkendiagramme zeigen die nach drei Stunden gemessenen Impedanzwerte (gestrichelte Linie) als **Zell-Index (CI)** an (siehe 2.12.5). Nach dieser Zeitspanne hatten die Kontrollzellen ihr Maximum beim Zellspreiten erreicht. Im Kurven-Diagramm ist zu erkennen, dass die Maximalwerte zeitlich voneinander verschoben sind.



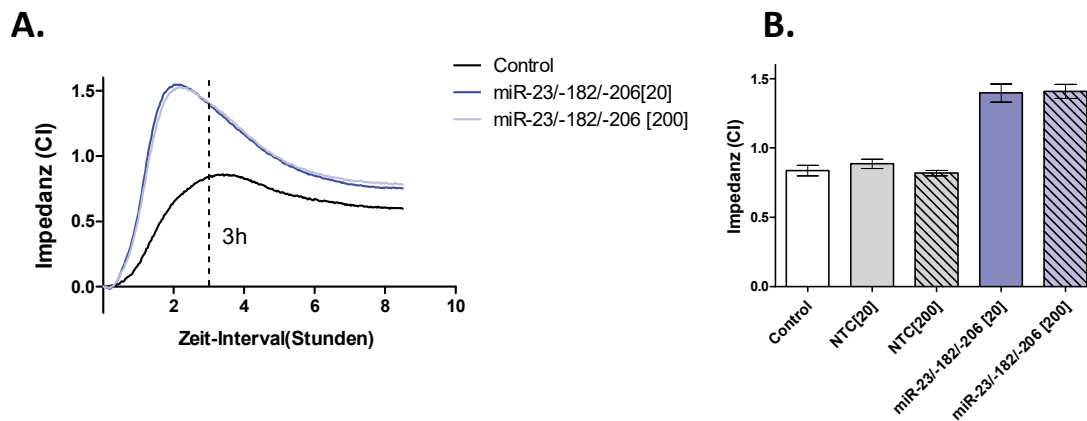
**Abbildung 26 | Einfluss von *miR-23*, *miR-182* und *miR-206* auf das Zellspreiten**

**A.** Impedanzmessung bei NIH-3T3 Zellen, welche mit miRNAs *miR-23*, *miR-182* und *miR-206* bei (20nM bzw. 200nM) behandelt wurden, zeigten Unterschiede beim Zellspreiten.

**B.** In der Quantifizierung nach 3h (Balkendiagramm) war zu erkennen, dass *miR-23* und *miR-182* zu einem verstärkten Zellspreiten führten. (n=2, Fehlerbalken ±SD)

Der Einfluss auf das Zellspreiten, wurde durch Behandlung von NIH3T3 Zellen mit zwei verschiedenen Konzentrationen an miRNAs (*miR-23b*, *miR-182* und *miR-206*) und durch die anschließende Messung der Impedanz (siehe Abbildung 26) bestimmt. Die Balkendiagramme (Abbildung 26 B, 26 D) repräsentieren hier ebenfalls den nach drei Stunden gemessenen Wert.

Bei 20nM Konzentration führte eine Behandlung mit *miR-23b* und *miR-182* zu deutlichen Adhäsions- bzw. Spreiteffekten. Die Zunahme der Impedanz entsprach bei *miR-23b* gegenüber miR-NTC behandelten Zellen 19,9% (maximaler Zell-Index = 1,09). *MiR-182* transfizierte Zellen hatten einen maximalen CI von 1,26, was einer Zunahme um 29,6% entsprach. *MiR-206* zeigte bei Behandlung mit 20nM Konzentration keine nennenswerte Veränderung (-1,8%) im Vergleich zu miR-NTC (Abbildung 26 A, B). Bei 200nM miRNA Konzentration war die Zunahme der Impedanz bei *miR-23b* sehr deutlich mit 72,2% gegenüber den Kontrollen (Abbildung 26 C, D). *MiR-182* führte bei dieser Konzentration zu einer Zunahme der Impedanz von +23,7%. Bei *miR-206* nahm der Zell-Index von 0,87 nach 1,0 zu, was eine Erhöhung der Impedanz um +18,1% entspricht.



#### Abbildung 27 | Einfluss kombinierter miRNAs auf das Zellspreiten

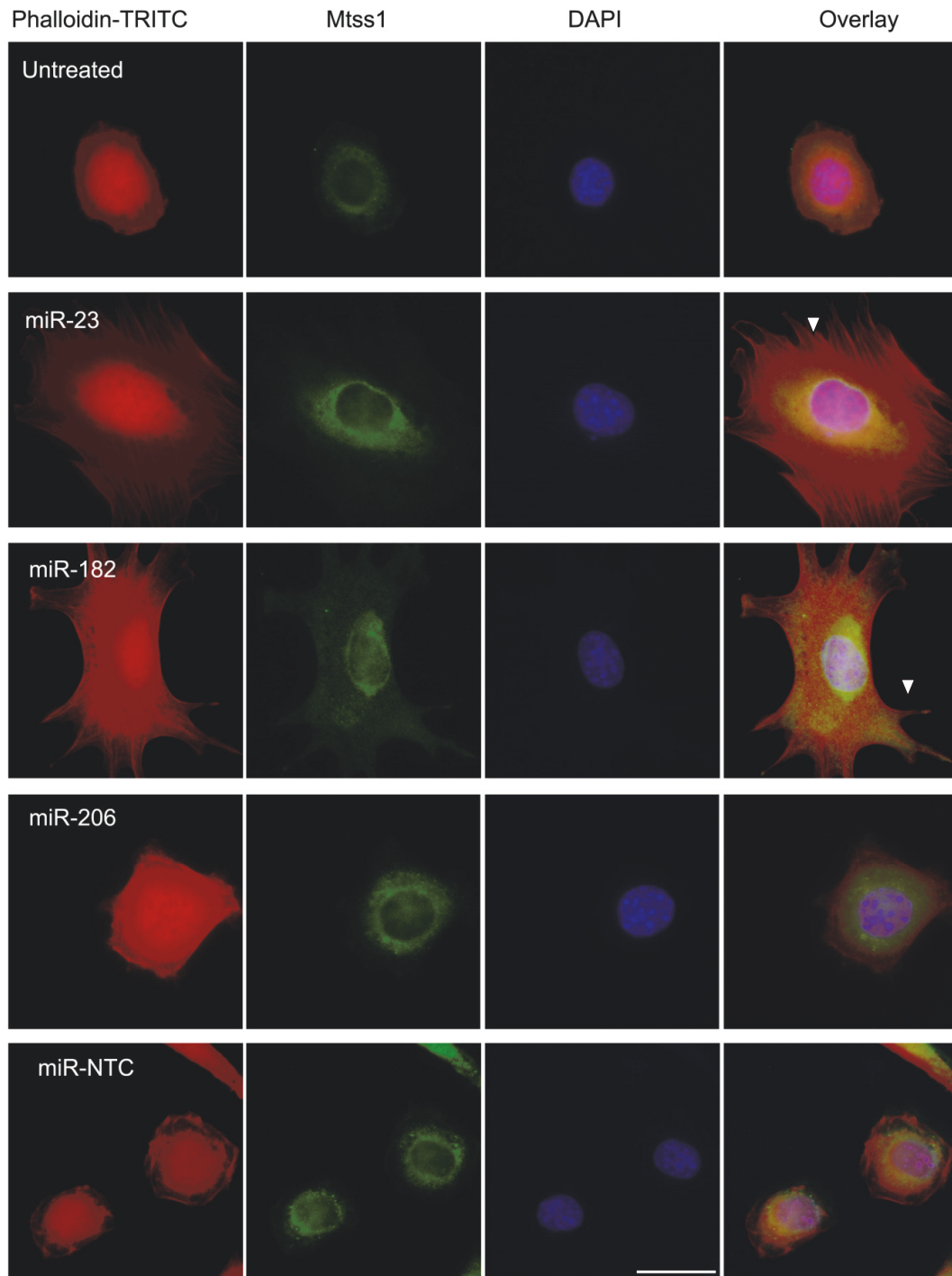
**A.** Echtzeitmessung der Impedanz bei 20nM bzw. 200 nM Konzentration der miRNA-Kombination aus *miR-23/-182/-206* im Kurvenverlauf dargestellt; **B.** Alternative vergleichende Darstellung im Balkendiagramm nach 3h (gestrichelte Linie Kurvendiagramm). (n=2, Fehlerbalken  $\pm$ SD)

Da *miR-23*, *miR-182* und *miR-206* einzeln Einfluss auf die Zelladhäsion und das Zellspreiten nehmen, wurde diesbezüglich die Wirkung der Kombination dieser drei miRNAs untersucht (siehe Abbildung 27). Hierbei zeigten die bei 20nM Konzentration behandelten Zellen eine sehr deutliche Zunahme des Zell-Index um 1,55. Dies entsprach einer Zunahme von 82,1% und entsprach dem hier gemessenen Maximalwert. Diese maximale Wirkung konnte auch bei 200nm Konzentration nicht mehr übertroffen werden.

### 3.8 IMMUNFLUORESZENZANALYSE ZUR UNTERSUCHUNG DES ZELLSPREITENS

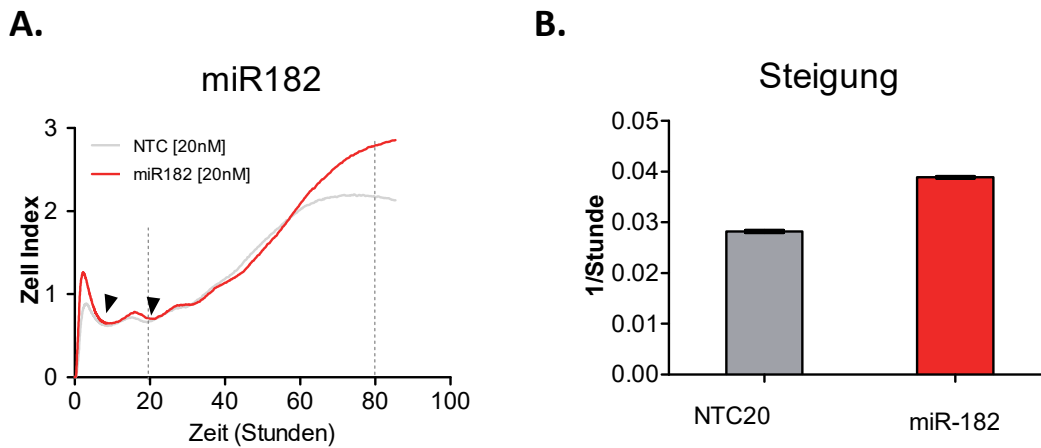
Um den bei der Impedanzanalyse gemessenen Einfluss dieser miRNAs auf das Zellspreiten über Immunfluoreszenzanalysen zu bestätigen, wurden NIH3T3 Zellen nach 1,5 Stunden fixiert und anschließend mit Phalloidin gefärbt. Hierdurch wurde das Aktin-Cytoskelett spezifisch angefärbt. Die zusätzliche Immunfärbung gegen *Mtss1* ermöglichte die gleichzeitige Lokalisation der *Mtss1* Expression in diesen Zellen (siehe Abbildung 28). Als Kontrollen dienten hierbei unbehandelte Zellen und mit miR-NTC behandelte Zellen. Die Signalintensitäten für *Mtss1* waren unterschiedlich und wurden hier zur besseren Übersicht angeglichen. Nach *miR-23* und *miR-182* Behandlung war eine veränderte Zellgröße und -form zu erkennen. Dies war zudem durch Bildung von Stressfaserbündeln begleitet. *MiR-23* Behandlung führte vermehrt zu Zellen mit deutlichen Membranausstülpungen (sog. *ruffles*). Im Unterschied hierzu waren bei *miR-182* behandelten NIH3T3-Zellen häufig Filopodia-artige Strukturen erkennbar. *MiR-206* behandelte Zellen waren bezüglich Zellgröße und -Form unauffällig und vergleichbar mit den Kontrollzellen. Diese waren nach 1,5 Stunden eher gleichförmig konzentrisch um den Zellkern und daher rund. Die Lokalisation von *Mtss1* ist hier durch eine Immunfärbung (grün, Alexa488) dargestellt. Es ist erkennbar, dass diese konzentrisch um den Zellkern verläuft. Zum Zellrand hin nimmt die Signalstärke von *Mtss1* Signal ab und ist diffus in der Zelle verteilt, was für seine eher cytosolische Lokalisation spricht. Interessanterweise ist keine eindeutige Ko-Lokalisation mit cytoskelettalen Strukturen wie beispielsweise den Aktinstressfaserbündeln erkennbar. Die Höchstfärbung (blau) zeigt den Chromatin/Euchromatin Anteil der dargestellten Zellen, der unter den gewählten Zellen ähnlich ist. Vereinzelt waren Fibroblasten zu finden, die bereits polarisiert sind und ihre Migration begonnen haben. Hierbei war unter allen Behandlungen keine auffällige Veränderung der Zellform erkennbar.





**Abbildung 28 | Immunfluoreszenzanalysen an NIH3T3 Zellen.**

Die Phalloidin-Färbung des Aktinzytoskeletts zeigt die veränderte Zellmorphologie 1,5 Stunden nach dem Aussäen. Die NIH3T3-Zellen wurden 48h vorab mit 20nM der angegebenen miRNAs behandelt und auf mit Fibronektin-beschichteten (10µg/ml) Platten ausgesät. Zellen wurden mit 4%PFA fixiert und mit Phalloidin (rot), mit DAPI (blau) und gegen *Mtss1* (AK: CellSignaling) angefärbt. Bilder wurden mit ImageJ bearbeitet und Signalintensitäten angepasst. (Größenbalken = 20µm). miR-NTC: Non targeting control.



**Abbildung 29 | Vergleich der Proliferationsraten miRNA behandelter Zellen mittels Impedanz.**  
**A.** NIH3T3 Zellen wurden 72h nach MiRNA-Behandlung ausgesät und danach die Änderung der Impedanz über 85 Stunden gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die *miR-182* behandelten Zellen im Abschnitt zwischen 20h-80h (gestrichelte Linie) eine erhöhte Proliferation aufwiesen.  
**B.** Durch den Vergleich der Steigungen der Regressionsgeraden (Bereich 20-80h) konnte dieser Unterschied quantifiziert werden. (n=2, ± SD)

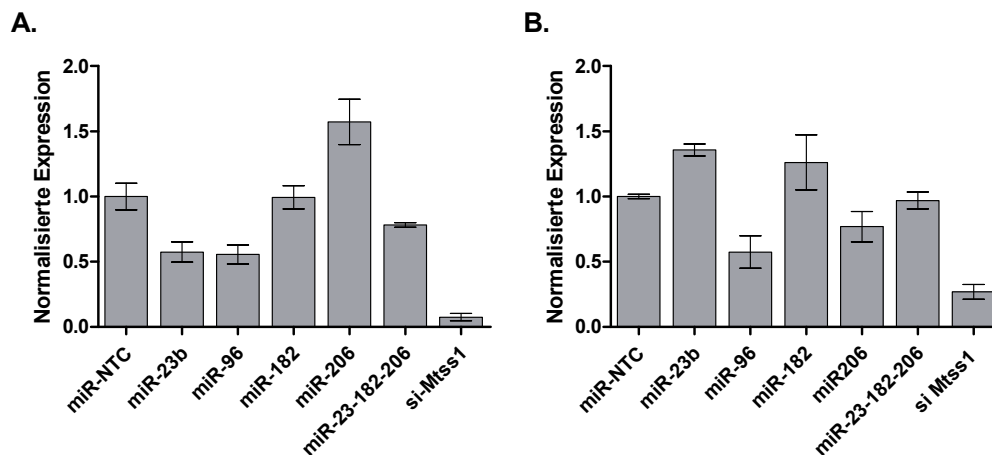
Das Zellspreiten ist ein vorübergehender Effekt, der bei NIH3T3 Zellen nach ca. vier bis maximal sechs Stunden abgeschlossen war (Abbildung 29A, erster Pfeil). Dieser vorübergehende initiale Prozess, bei dem die Zelloberfläche zunimmt, wurde durch Messung der Impedanz in kurzzeitigen Intervallen bewertet. Die Impedanz wird hier als Maß der Zelloberfläche genutzt, bei welcher insbesondere Änderungen in Echtzeit analysiert werden (siehe 2.11.5). Anschließend, nachdem die Zellen mit der Matrix interagiert haben, setzt ihre Proliferation ein (Abbildung 29A, zweiter Pfeil). Dabei erzeugt bei konstanter Zellzahl jede Zelllinie ihr eigenes Profil. Dieses ist von der Zellgröße, Zellform und der Proliferationsrate abhängig. Hier setzte bei NIH3T3 Zellen ab ca. 20 Stunden eine stetige Erhöhung der Impedanz ein. Dies war sowohl in der unbehandelten Kontrolle als auch in den mit miRNAs-Mimics behandelten Zellen der Fall. Um die Proliferationsrate dieser Zellen miteinander vergleichen zu können, wurden die Steigungen der Regressionsgeraden von 20 bis 80 Stunden (Abbildung B) dargestellt. Dieser Zeitraum repräsentierte die stetige Wachstumsphase der NIH3T3 Zellen und konnte somit als Maß der Proliferationsrate genommen werden. Die *miR-182* behandelten NIH3T3 Zellen führten zu einer stärkeren Zunahme des Zellindex pro Zeiteinheit. Dies war beim Vergleich der Steigungen der Regressionsgeraden miR-NTC und *miR-182* behandelter Zellen deutlich (+27,5%) zu erkennen. Im Abschnitt zwischen 60 Stunden und 80 Stunden war der Unterschied am größten. Die Sättigung wurde bei miR-NTC bei ca. 70 Stunden

erreicht, während *miR-182* behandelte Zellen auch nach 85 Stunden keine absolute Sättigung (kein Plateau) erkennen ließen. Die Proliferationsraten bei den mit *miR-23b* und *miR-206* behandelten Zellen waren vergleichbar mit der miR-NTC transfizierten Kontrolle (hier nicht gezeigt).

### 3.9 *Mtss1*-SPEZIFISCHE MIRNAS REGULIEREN *Mtss1* MRNA IN NIH3T3 - ZELLEN

Um die durch *miR-23*, *miR-182* und *miR-206* beobachteten Effekte beim Zellspreiten und bei der Proliferation mit der Regulation von *Mtss1* zu korrelieren, wurde der Effekt dieser miRNAs auf die Konzentration der mRNA von *Mtss1* in entsprechend behandelten NIH3T3 Zellen mittels qPCR bestimmt. Die qPCR Analysen wurden in Zusammenarbeit mit A. Christ und B. Eiberger gemacht. Es wurden zwei biologische Experimente untersucht und ausgewertet. Die Normalisierung wurde mit der Expression miR-NTC behandelter Zellen vorgenommen.

Hierbei führten die beiden unabhängig durchgeführten Experimente zu unterschiedlichen Ergebnissen. Diese sind hier gegenübergestellt (siehe Abbildung 30A, B). Beim ersten Experiment wurde nach Behandlung mit *miR-23b* eine Reduktion der *Mtss1* mRNA Expression um ca. 43% nachgewiesen. Die Behandlung mit *miR-96* verringerte die Expression um 44%. Die kombinierte Behandlung aus den drei in Cerebellum differentiell regulierten miRNAs *miR-23b*, *miR-182* und *miR-206* bewirkte eine Reduktion der Transkriptmenge um 22%. *MiR-182* behandelte Zellen waren im ersten Experiment gegenüber miR-NTC unverändert. *MiR-206* führte zu einer Erhöhung der *Mtss1* Transkriptmenge um ca. 57%.



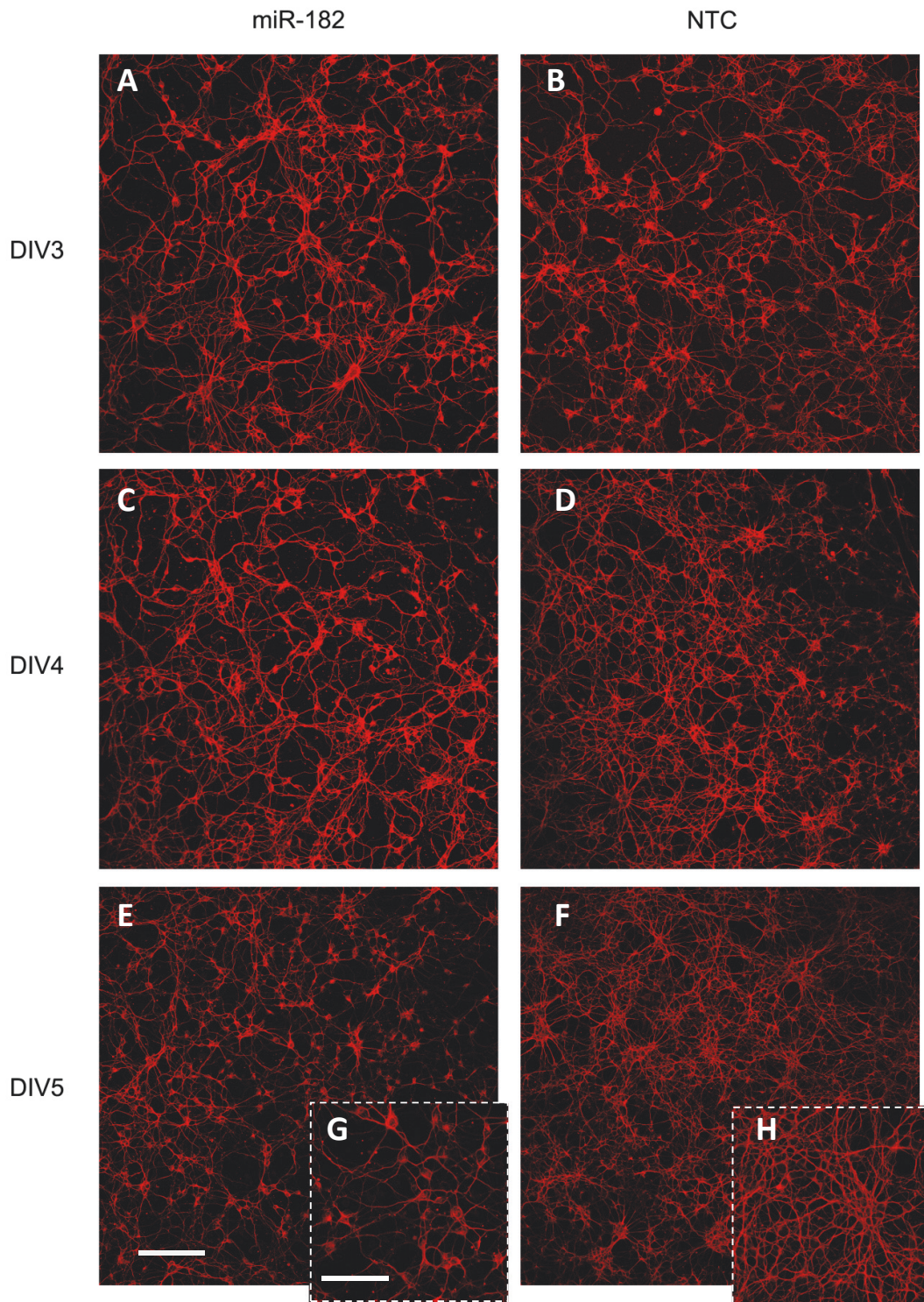
**Abbildung 30 | Quantifizierung der miRNA abhängigen Regulation von *Mtss1* in NIH3T3-Zellen durch qRT-PCR.**

RNA wurde aus NIH3T3 Zellen 48h nach miRNA-Behandlung [200nM] extrahiert, in cDNA umgeschrieben und diese mittels qRT-PCR quantifiziert. Einzelne miRNAs zeigten hierbei einen unterschiedlichen Einfluss auf die Expression von *Mtss1* (A.:15.07.2013, B.:24.01.2014). Die miR-NTC Proben wurden =1 gesetzt. Die Konzentration an siRNA gegen *Mtss1* betrug 60nM (n=2; Fehlerbalken  $\pm$ SEM).

Im zweiten Experiment war eine Reduktion der Transkriptmenge nur bei *miR-96* und *miR-206* behandelten Zellen erkennbar (*miR-96*: 43% und *miR-206*: 23%). Bei *miR-182* behandelten Zellen zeigte sich eine Erhöhung der *Mtss1* Transkriptmenge um 26%. Als Positivkontrolle dienten mit gegen *Mtss1* gerichteter si-RNA behandelte NIH3T3 Zellen. Im ersten Experiment war eine Absenkung um 93% zu sehen. Im zweiten Experiment war diese um 73% herabgesenkt.

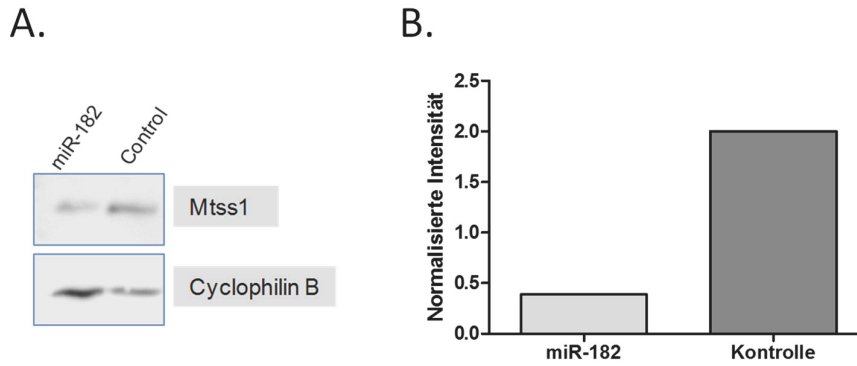
### 3.10 MIRNA ABHÄNGIGE REDUKTION VON *MTSS1* BEEINFLUSST DIE DENDRITOGENE VON CEREBELLÄREN KÖRNERZELLEN

Um den Einfluss *Mtss1* spezifischer miRNAs auf die morphologische Entwicklung cerebellärer Körnerzellen zu untersuchen, wurden primäre Körnerzellkulturen mit den entsprechenden miRNAs (*miR-23*, *miR-182* und *miR-206*) transfiziert und über mehrere Tage weiter kultiviert (*days in vitro*: DIV). Anschließend wurden die Zellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert (DIV3-DIV5) und mit einem Antikörper gegen den neuronalen Marker Beta-III-Tubulin gefärbt (siehe Abbildung 31). Hierdurch wurden Cytoskelett-Bestandteile der Neurone spezifisch angefärbt, was eine Beurteilung der Zellmorphologie und insbesondere der Dendritenbildung der Körnerzellkulturen erlaubte. Nach Transfektion mit *miR-182* zeigten die Kulturen nach 72h (DIV3) eine leicht verminderte Dichte der Dendritenkomplexität gegenüber den mit miR-NTC behandelten Kontrolle (siehe Abbildung 31A, B). Dieser Effekt wurde nach 96 Stunden (DIV4) deutlicher (siehe Abbildung 31 C, D) und verstärkte sich im weiteren Verlauf, so dass nach weiteren 24 Stunden (DIV5) eine drastisch reduzierte Dichte in der Komplexität der Dendritenbildung vorlag (siehe Abbildung 31 E, F). Die vierfach digitale Vergrößerung (siehe Abbildung 31 G, H) zeigt diesen Befund noch eindrucksvoller. Um einen Hinweis zu erhalten, ob die hier beobachtete veränderte Zellmorphologie in cerebellären Körnerzellen mit einer durch *miR-182* induzierten *Mtss1* Regulation zusammenhängen könnte, wurde zusätzlich die *Mtss1* Proteinexpression gemessen. Hierzu wurden Proteinlysate dieser Körnerzellkulturen aus parallel durchgeführten Experimenten für eine Western-Blot-Analyse angefertigt. Nach 96 Stunden (DIV4) war eine deutliche Reduktion der *Mtss1* Proteinmenge zu erkennen (siehe Abbildung 32A). Da unterschiedliche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurde die Quantifizierung der Signale mittels ImageJ vorgenommen (siehe Abbildung 32 B) und jeweils zur Kontrolle (Cyclophilin) normalisiert.



**Abbildung 31 | *MiR-182* behandelte Körnerzellkulturen weisen eine reduzierte Dendritenkomplexität auf.**

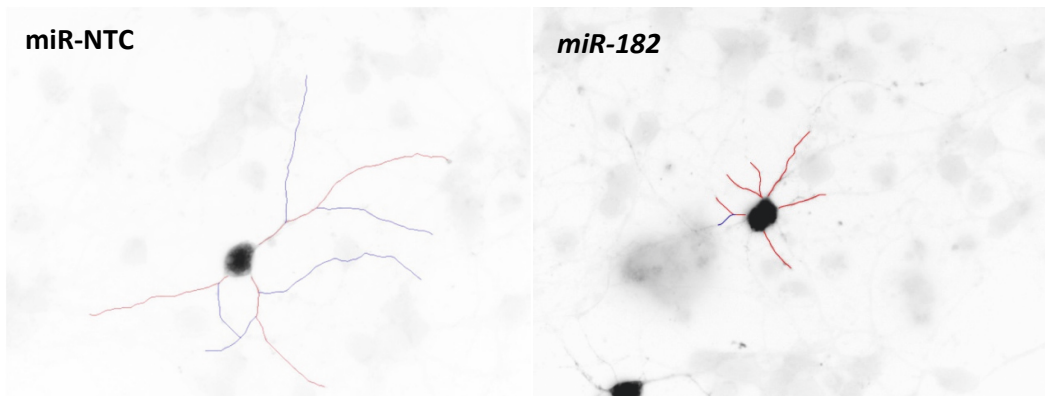
Körnerzellen ( $1 \times 10^6/24$ -well) wurden ausgesät und 24h später mit *miR-182* und miR-NTC transfiziert. Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (DIV3-DIV5) mit 4% PFA fixiert und immuncytochemisch mit *Beta-III-Tubulin* gefärbt. Balken = 150  $\mu\text{m}$  für A-F; für G-H = 37  $\mu\text{m}$



**Abbildung 32| Quantifizierung der *miR-182* abhängigen Regulation von *Mtss1* Protein durch Western-Blot Analysen.**

*MiR-182* behandelte Körnerzellkulturen wiesen eine reduzierte *Mtss1*-Proteinmenge gegenüber mit miR-NTC behandelten Zellen auf. **A.** Proteinlysate aus primären Körnerzellen wurden (DIV4) 96h nach miRNA-Behandlung angefertigt und mittels WB analysiert (anti-*Mtss1*; anti-Cyclophilin). **B.** Eine Quantifizierung der Signalintensität wurde mittels ImageJ durchgeführt.

Um die an Körnerzellen beobachtete veränderte Zellfortsatzdichte besser quantifizieren zu können, wurden primäre Körnerzellkulturen (P8) angefertigt, welche sowohl Wildtyp- als auch *Math1-eGFP* positive Zellen (Mischverhältnis 28:1) enthielten. Dies erlaubte eine Quantifizierung der Zellfortsätze einzelner Körnerzellen. In diesem u.a. in unserer Arbeitsgruppe etablierten Mausmodell steht *eGFP* unter der Kontrolle des *Math1* Genpromotors (Gliem et al., 2006; Lumpkin et al., 2003). Der Transkriptionsfaktor *Math1* ist der früheste bekannte Marker für Körnerzellvorläufer und diente in der hier angefertigten Mischkultur der Identifikation einzelner Körnerzellen. Primäre Körnerzellkulturen wurden 96 Stunden nach Transfektion von *miR-182* und miR-NTC fixiert und *eGFP* positive Zellen aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe von ImageJ prozessiert und es wurden anschließend jeweils zehn Zellen untersucht. Hierbei wurden die Zellfortsätze eGFP positiver Zellen mittels der Plugins NeuronJ nachverfolgt und vermessen (siehe Abbildung 33).



**Abbildung 33 | Dendritenkomplexität *miR-182* behandelter cerebellärer Körnerzellkulturen.**

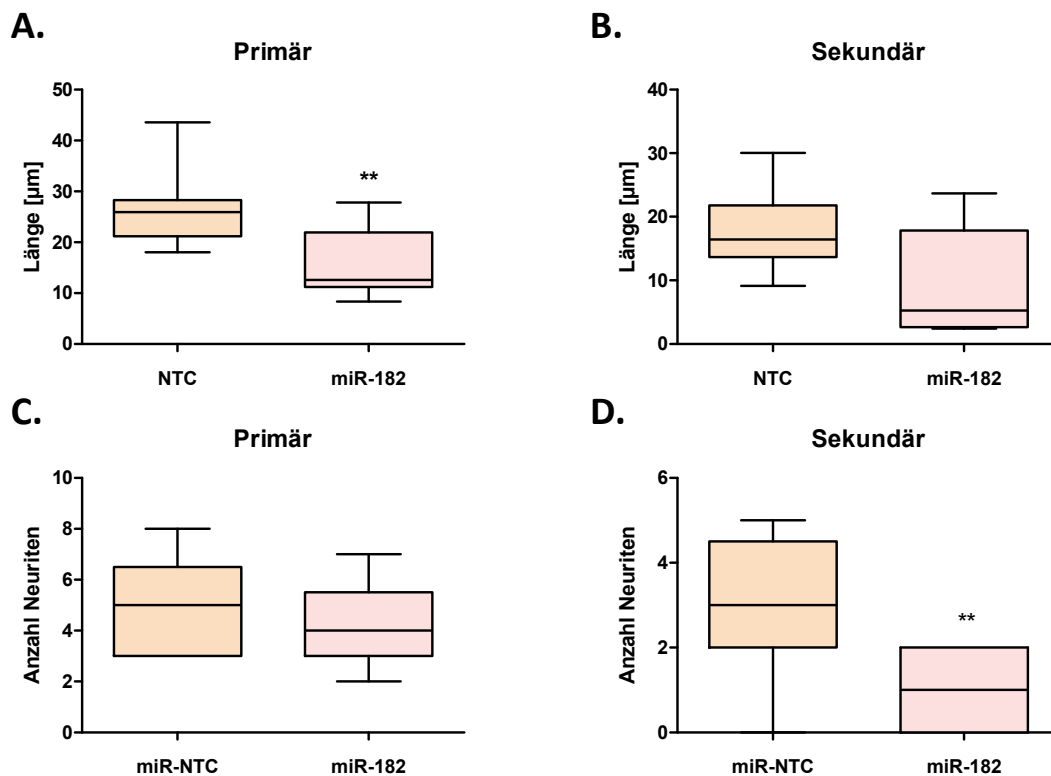
Anzahl und Länge der Fortsätze einzelner eGFP-positiver Körnerzellen wurden quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass *miR-182* behandelte Körnerzellen eine reduzierte Dendritenkomplexität besaßen. Hier in rot dargestellt sind die primären Verzweigungen, die direkt mit dem Zellsoma verbunden sind. Sekundäre Verzweigungen sind in blau dargestellt. Vermessen wurden die Länge der Verzweigungen, sowie deren Anzahl pro Zelle. (Vergrößerung 630X)

In Abbildung 33 sind repräsentative Aufnahmen von Körnerzellen zu sehen, welche 96 Stunden nach Transfektion mit *miR-182* gegenüber *miR-NTC* behandelten Zellen eine veränderte Morphologie zeigten. Es wurden Anzahl und Länge der Verzweigungen (auch als Neuriten bezeichnet) einzelner Körnerzellen vermessen. Primäre Verzweigungen sind dabei als Neuriten definiert, die direkt mit dem Zellsoma verbunden sind (rot). Die sekundären Verzweigungen leiten sich aus den primären ab (blau). *MiR-182* behandelte Körnerzellen zeigten sehr häufig ein reduziertes Dendritenwachstum. Dies war durch einen verminderten Verzweigungsgrad und geringere Länge der Fortsätze charakterisiert. Der Durchmesser der Fortsätze war ebenfalls deutlich verringert (Beobachtung; wurde hier nicht vermessen).

Die primären Verzweigungen *miR-NTC* behandelter Körnerzellkulturen hatten eine durchschnittliche Länge von 26,19µm mit einer Ausprägung zwischen 18,04µm und 43,58µm. Bei *miR-182* behandelten Kulturen wurde eine durchschnittliche Länge der Neuriten von 16,03µm gemessen. Die Ausprägung der Verzweigungslänge besaß einem Minimalwert von 8,33µm bis maximal 27,81µm (siehe Abbildung 34A). Die durchschnittliche Länge der sekundären Verzweigungen war ebenfalls unterschiedlich. *MiR-182* behandelte Körnerzellen besaßen sekundäre Verzweigungen mit durchschnittlich 9,25µm Länge, welche gegenüber *miR-NTC* mit durchschnittlich 18,83µm um ca. 41,6% reduziert waren (siehe Abbildung 34B). Die grafische Darstellung in Form eines Whisker-Plots verdeutlicht diese Zusammenhänge



(siehe Abbildung 34). Hierbei ist zu erkennen, dass die Länge der primären Neuriten bei mit *miR-182* behandelten Kulturen signifikant gegenüber miR-NTC verändert war. Die sekundären Neuriten wiesen ebenfalls eine reduzierte Länge auf, die jedoch nicht signifikant gegenüber den Kontrollzellen verändert war. Die Anzahl der primären Verzweigungen war nur leicht unterschiedlich; miR-NTC wies durchschnittlich 5,0 gegenüber *miR-182* behandelte Körnerzellen mit 4,33 primären Verzweigungen pro Körnerzelle auf (siehe Abbildung 34C). Bei den sekundären Verzweigungen zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied, da miR-NTC behandelte Zellen durchschnittlich 3,11 Verzweigungen pro Körnerzelle hatten, während bei *miR-182* transfizierten Körnerzellen durchschnittlich nur 0,89 sekundäre Verzweigungen pro Körnerzelle vorhanden waren (siehe Abbildung 34D).



**Abbildung 34| Bestimmung der Neuritenkomplexität einzelner Körnerzellen.**

Darstellung der Neuritenkomplexität (inklusive Axon) bei Körnerzellen die mittels NeuronJ vermessen wurden als Whisker-Plot (inklusive Minimal- und Maximalwerte). Es wurde nur zwischen primären Verzweigungen und sekundären Verzweigungen unterschieden. Die Länge primärer Neuriten *miR-182* behandelter Körnerzellkulturen und die Anzahl sekundärer Neuriten war signifikant gegenüber miR-NTC reduziert. **A.** Länge der primären Neuriten. **B.** Länge der sekundären Neuriten. **C.** Anzahl primärer Neuriten **D.** Anzahl sekundärer Neuriten. Es wurden n=10 Körnerzellen pro Bedingung analysiert. (Students-t test; two tailed, \*\*P < 0,01).



## 4 DISKUSSION

---

*Mtss1* ist ein während der Entwicklung von cerebellären Körnerzellen differentiell exprimiertes Gen, welches aufgrund von Cytoskelett-assoziierten Funktionen eine wichtige regulatorische Rolle bei der Zellmigration und Morphogenese einnehmen könnte. Da seine Expressionsänderung parallel zur Migration von Körnerzellen des Cerebellums abläuft, war eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit in welcher Weise die entwicklungsabhängige Expression des Gens *Mtss1* reguliert wird. Da *Mtss1* mehrere putative Bindestellen für miRNAs in seinem 3'-UTR besitzt, lag es nahe nach einer möglichen posttranskriptionalen Regulation durch miRNAs zu fragen. Mögliche Zusammenhänge in der Beteiligung von miRNAs während der cerebellären Entwicklung sind durch mehrere Beispiele belegt. So scheinen bestimmte miRNAs essentiell für die Erhaltung von Purkinje-Zellen zu sein. Dies geschieht durch Regulation von *Ataxin1*, welches durch mehrere miRNAs (*miR-19*, *miR-101* und *miR-130*) reguliert wird (Lee et al., 2008; Schaefer et al., 2007). Ein weiteres Beispiel betrifft die Regulation von Körnerzellvorläufern bei ihrer Differenzierung. Hierbei wird über eine negative Regulation von *Smoothend* und *Gli* durch die miRNAs *miR-125b* und *miR-326* ihre Differenzierung gefördert (Ferretti et al., 2008).

### 4.1 IDENTIFIKATION VON MIRNA- BINDESTELLEN IM 3'UTR VON *MTSS1*

Der 3'UTR einer mRNA ist üblicherweise der hauptsächliche Bindungsort einer miRNA, um die Regulation des Transkriptes zu initiieren. In den meisten Fällen und besonders bei entwicklungsspezifischen Genen, ist diese Sequenz zu umfangreich und damit die Anzahl theoretisch bindender miRNAs zu groß. Um eine mögliche posttranskriptionale Regulation eines Gens durch miRNAs untersuchen zu können, ist es daher unerlässlich, auf Datenbank-basierte Algorithmen zuzugreifen. Als nächstes ist man damit konfrontiert eine Datenbank auszuwählen, die falls möglich zu geringen falschpositiven Ergebnissen führt, um auf diese Weise finanzielle Mittel und Zeit einsparen zu können.

#### 4.1.1 VERSCHIEDENE ALGORITHMEN FÜHREN ZUR ÜBEREINSTIMMENDEN IDENTIFIKATION VON MICRORNAs DIE PUTATIV DIE *MTSS1* EXPRESSION REGULIEREN KÖNNEN.

Um eine möglichst solide Vorhersage *Mtss1* regulierender miRNAs zu erzielen, wurde zur Analyse des 3'UTRs der Algorithmus von TargetScan verwendet. Dieser bietet die Möglichkeit, miRNAs nach verschiedenen Kriterien zu filtern und darzustellen. Um die Ergebnisse kritisch zu überprüfen, wurden die Vorhersagen zweier weiterer Algorithmen (PicTar, miRanda) mit eingebunden und mit denen von TargetScan verglichen. Dies ermöglichte es, bestimmte miRNAs in verschiedene Vorhersagekategorien einzuordnen. Von besonderem Interesse dabei war die gemeinsame Schnittmenge der drei Algorithmen, welche miRNAs enthält, die unabhängig voneinander vorhergesagt wurden. Über diese wurden hier 22 miRNAs identifiziert, welche eine hohe Bindungswahrscheinlichkeit zum 3'UTR von *Mtss1* aufweisen. Diese Herangehensweise erlaubte es zum einen, die Vorhersagen einer gewählten Datenbank kritisch zu überprüfen, während einzelne miRNA Kandidaten anderer Datenbanken, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit am 3'UTR von *Mtss1* binden, gezielt für weitere Untersuchungen herangezogen werden konnten. Die Ergebnisse der Vergleichenden Analyse sind grafisch als Venn-Diagramm (Kapitel 3.2; siehe Abbildung 12) dargestellt. Hierbei waren folgende Zusammenhänge ersichtlich:

- Die verwendeten Datenbanken sagen jeweils eine unterschiedliche Anzahl von miRNAs, die an den 3'UTR von *Mtss1* binden können, voraus.
- Die paarweisen Überschneidungen der Vorhersagen sind relativ groß (TS-MR ~ 86%; TS-PT~88%; PT-MR 100%).
- Die gemeinsame Schnittmenge von 22 aus insgesamt 399 vorhergesagten miRNAs ist relativ klein und entspricht in etwa 5,5% der Gesamtheit der für *Mtss1* vorhergesagten miRNAs.

Aus den oben genannten Zusammenhängen kann bei der Bewertung der miRNA Bindungen am 3'UTR abgeleitet werden, dass diesen Unterschieden die Anwendung bestimmter Kriterien mit unterschiedlicher Toleranz zugrunde liegt. So werden z.B. bei PicTar gering konservierte miRNAs nicht in Betracht gezogen, was letztlich zu einer deutlich geringeren Gesamtanzahl vorhergesagter miRNAs gegenüber TargetScan und miRanda führte. Berücksichtigt man bei

der TargetScan-Vorhersage nur hochkonservierte miRNAs, so reduziert sich die Menge vorhergesagter miRNAs von 229 auf lediglich 28. Hochkonservierte miRNAs zeigen unter den hier verwendeten Datenbanken eine große Übereinstimmung. Von den 28 bei TargetScan hochkonservierten miRNAs gehörten 19 zur gemeinsamen Schnittmenge. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Arbeitsweisen der verwendeten Algorithmen nach ähnlichen Kriterien ablaufen. Im Folgenden sollen Unterschiede und Gemeinsamkeiten nur kurz skizziert werden, es sei jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, dass hier keine ausführliche Diskussion über miRNA Vorhersagealgorithmen beabsichtigt ist. Es gibt zahlreiche Arbeiten und Publikationen, die sich ausführlich mit dieser Thematik auseinandergesetzt haben (Bartel, 2009a).

Die hier verwendeten Algorithmen sind ausschließlich Seed-Sequenz basierend. Das bedeutet, dass miRNAs, welche nicht der kanonischen miRNA:mRNA Interaktion folgen, nicht berücksichtigt werden (Bartel, 2009b; Rigoutsos, 2009). Dies betrifft vor allem Interaktionen mit einer Bindestelle außerhalb des 3'UTRs (5'UTR, ORFs) und Interaktionen zwischen der Seed-Region und mRNA, welche eine Übereinstimmung von weniger als sechs Nukleotiden besitzen. Bei Mammalia erfolgt eine miRNA Bindung mit großer Mehrheit am 3'UTR und Interaktionen am ORF oder 5'UTR bilden eher eine Ausnahme, die zudem durch eine geringe Wirksamkeit einer nachfolgenden Regulation der betreffenden mRNA gekennzeichnet ist (Kloosterman et al., 2004; Lytle et al., 2007). Ferner haben schätzungsweise 93% der Seed-Basenpaarungen eine perfekte Übereinstimmung in der Seed-Region, wie mittels moderner experimenteller Techniken wie PAR-CLIP gezeigt werden konnte (Hafner et al., 2010). Ein genereller Vergleich verschiedener Algorithmen zeigte, dass die hier verwendeten Seed-basierten Algorithmen eine höhere Spezifität und Sensitivität besaßen (Rajewsky, 2006; Sethupathy et al., 2006).

Um hier kurz auf die Arbeitsweisen der Algorithmen einzugehen, werden im Folgenden vergleichend einige wichtige Kriterien vorgestellt, die für die Vorhersage herangezogen werden. Das wohl wichtigste Merkmal der Vorhersagen beruht auf der Watson-Crick Basenpaarung zwischen der 5'-seitigen Position der miRNA zwischen Nukleotid 2-7 (Seed) mit dem 3'UTR der mRNA (Doench and Sharp, 2004; Grimson, 2010; Krek et al., 2005; Nielsen et al., 2007). Allerdings wäre die Anzahl vorhergesagter miRNA-Kandidaten mit diesem Kriterium

alleine sehr groß und durch eine Vielzahl an Fehlinterpretationen gekennzeichnet. Daher sind zusätzliche Kriterien zur Beurteilung notwendig, sodass die Menge an miRNA-Kandidaten weiter gefiltert und minimiert werden kann. Zu diesen Kriterien zählen z.B. die evolutionäre Konservierung der miRNA-Bindestelle (MRE; engl. *microRNA-recognition element*), die *freie Energie* der sich bildenden Sekundärstrukturen zwischen miRNA und mRNA und zusätzliche Bindungen im 3'-seitigen Bereich der miRNA (Lal et al., 2009; Mayr et al., 2007). Unterschiede zwischen den verwendeten Algorithmen sind hauptsächlich in der Gewichtung einzelner Kriterien zu finden. Dies betrifft etwa die Toleranz der miRNA:mRNA-Interaktion, die Anzahl an komplementären Basenpaarungen und der tolerierten Fehlbasenpaarungen (Mismatches). So setzt TargetScan eine Übereinstimmung in der Seed-Region von  $\geq 7$  Nukleotiden voraus, während PicTar auch geringere Nukleotidübereinstimmungen zulässt. Zugleich besitzt PicTar eine stringenterer Höchstgrenze bei der freien Energie der passenden Sequenz (Thomas et al., 2010). Bei der Datenbank MiRanda ist die Gewichtung der Seed-Übereinstimmung am höchsten; sie erlaubt jedoch G•U „wobbles“ und Nukleotidnichtübereinstimmungen (sog. „*Mismatches*“). Evolutionäre Konservierung und die freie Energie des Heteroduplex werden hier ebenso berücksichtigt. Der PicTar Algorithmus verwendet einen kombinierten Ansatz, bei dem die Mehrfach-Bindung einer miRNA einkalkuliert und zusätzlich die Wahrscheinlichkeit anderer miRNAs für die Bindung am MRE berücksichtigt wird.

Die vergleichende Analyse zeigte, dass die von TargetScan vorhergesagten miRNAs, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit am 3'UTR von *Mtss1* binden, größtenteils übereinstimmend waren. Alle drei hier verwendeten Datenbanken gehören zu den populären Vorhersagemodellen für miRNA Bindestellen. Die bevorzugte Verwendung von TargetScan basierte insbesondere auf der Darstellung der Ergebnisse, die hierbei eine Unterscheidung nach bestimmten Merkmalen erlaubt. Es werden zwei unterschiedliche Werte ausgegeben, die verschiedene Kriterien zur Bewertung heranziehen. Der *total context score* basiert auf biochemischen Eigenschaften, die die Affinität der miRNA zur mRNA unter Einbeziehung der Topologie der Bindestelle wie z.B. AU-reiche Elemente (Garcia et al., 2013) bewerten. Bei dem sogenannten P<sub>CT</sub> Score (*probability of conserved targeting*) wird zusätzlich die phylogenetische Konservierung unter 28 Vertebraten einbezogen und hieraus eine Wahrscheinlichkeit der Bindung berechnet (Friedman et al., 2009b). Die Vorhersageergebnisse sind zudem in

unterschiedliche Tabellen gruppiert, die miRNAs mit ähnlicher Konservierung darstellen. Hoch konservierte Bindestellen besitzen eine wesentlich höhere Wahrscheinlichkeit. Weniger konservierte Bindestellen werden gesondert dargestellt. TargetScan lässt somit eine Vorhersage für miRNAs mit hoher Konservierung zu, ohne gleichzeitig speziesspezifische miRNAs mit geringer Konservierung zu vernachlässigen.

Bei der hier angewandten Methode zur Optimierung geeigneter Vorhersagen für miRNA Bindestellen war es wichtig, die Algorithmen vorab so zu selektieren, dass eine ähnliche Arbeitsweise bei den Vorhersagekriterien vorlag. Daher führten die hier dokumentierten Vorhersagen unabhängig voneinander zu einem vergleichbaren Ergebnis. Große Unterschiede bei den Vorhersagen hätten zwangsläufig die Menge vorhergesagter miRNAs ungünstig vergrößert. Die Algorithmen werden zudem ständig weiterentwickelt und optimiert. Ältere Vergleiche der hier verwendeten Datenbanken, zeigten deutlich größere Unterschiede (Alexiou et al., 2009). Somit dokumentiert der hier vorgenommene Vergleich zusätzlich, dass die Weiterentwicklungen zu einer zunehmenden Übereinstimmung bei der Vorhersage von miRNA Bindestellen geführt haben. Dies gilt insbesondere für die höher konservierten miRNAs, da diese generell eine höhere Wahrscheinlichkeit zugewiesen bekommen.

#### 4.1.2 MICROARRAY EXPRESSIONSANALYSEN IDENTIFIZIEREN WICHTIGE MICRORNAs DER POSTANATALEN ENTWICKLUNG DES CEREBELLUMS BEI DER MAUS

Mit Hilfe von Vorhersagealgorithmen konnten miRNAs identifiziert werden, welche möglicherweise *Mtss1* durch Bindung an dessen 3'UTR regulieren könnten. Um deren Expression im Cerebellum zu untersuchen, wurden hier die vorab durch Microarray Hybridisierungstechnik generierten Daten (B. Eiberger) verwendet und ausgewertet. Diese Datensätze erlaubten die Expressionsanalyse aller in der miRBase Datenbank (Jahr 2008) annotierten miRNAs. Durch Vergleich der hier gewählten Entwicklungsstadien P8 und Adult konnten somit differentiell exprimierte miRNAs im Cerebellum der Maus identifiziert werden. Diese miRNAs könnten somit in die cerebelläre Entwicklung involviert sein. Hier wurden miRNAs untersucht, welche für die Regulation von *Mtss1* verantwortlich sein könnten. Wie einleitend beschrieben, wird die Expression von *Mtss1* in Körnerzellen um P20, zeitgleich mit der Beendigung ihrer Migrationsphase, eingestellt.

Die Microarray-Analyse lieferte Expressionswerte für insgesamt 368 miRNAs. 106 dieser miRNAs zeigten eine differentielle Expression ( $\geq 2$ -fach) zwischen dem Postnataltag 8 und dem Adultstadium. Zu den am stärksten exprimierten miRNAs im Cerebellum der Maus gehören *miR-124*, *miR-9/9\**, *miR-26a* und *miR-30b* (siehe Abbildung 10). Hierbei war auffällig, dass es diesbezüglich in beiden untersuchten Stadien eine große Übereinstimmung gab. Dies lässt vermuten, dass diese miRNAs zur Identität des Cerebellums beitragen. Dieser Zusammenhang ist generell beschrieben. Dabei konnte eine Korrelation zwischen dem miRNA Expressionsmuster und der Zellidentität gezeigt werden (Kosik et al., 2010). *Mir-9*, *miR-124* und *let-7* gelten als sehr wichtige Regulatoren der neuronalen Entwicklung, insbesondere der Neurogenese und der Differenzierung (Cheng et al., 2009; Packer et al., 2008). *Mir-9* und *miR-124* können Mitglieder des REST Komplexes, welcher die Expression neuronaler Gene inhibiert, regulieren und so die Expression neuronaler Gene fördern (Conaco et al., 2006; Packer et al., 2008).

Kontrastiert man die Expressionsdaten von P8 mit adult, so fällt auf, dass unter den hoch exprimierten miRNAs der Phase P8 (siehe Tabelle 19), vor allem miRNAs des *miR-17~92* Clusters zu finden sind. Wie einleitend im Kapitel 1.2 erwähnt, ist bei der Körnerzellreifung die



Phase zwischen P5 und P8 durch eine massive Proliferation gekennzeichnet. Wichtig ist an dieser Stelle der Hinweis, dass der Transkriptionsfaktor *Myc* über direkte Bindung an die Promotorregion des *miR-17~92* Clusters, dessen Expression induzieren kann (O'Donnell et al., 2005). Dieses Cluster kodiert für sechs miRNAs (*miR-17*, *-18*, *-19*, *-20* und *miR-92*), die maßgeblich auch Proteine regulieren, die die Proliferation fördern. Unter ihnen befinden sich der Transkriptionsfaktor *E2F-1*, die Phosphatase *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) und das Mikrotubuli bindende Protein *Bcl2l11*. Im Einklang mit diesen Ergebnissen steht auch die hohe Expression dieses miRNA-Clusters in Medulloblastomen (Kleinhirntumore, die sich aus Körnerzellvorläufern ableiten), wo es mit einer hohen Expression von *c-Myc* und *Mycn* verbunden ist (Northcott et al., 2009; Uziel et al., 2009). Eine Überexpression des *miR-17~92* Clusters in Körnerzellen ist nicht ausreichend, um Medulloblastome zu induzieren. Neuere Studien zeigen jedoch, dass die Inhibierung von *miR-17* und *miR-19a* Seed-Sequenzen durch Antagonisten wie *anti-miR-17* und *anti-miR-19* zu einer reduzierten Zellproliferation und schließlich zu einer reduzierten Tumorgroße führen kann (Murphy et al., 2013).

Im Adultstadium hingegen waren im hier durchgeführten Microarray vor allem die miRNAs *miR-29a*, *miR-29b*, *miR-29c*, *miR-34a*, *miR-129-3P* und *miR-132* hoch gegenüber P8 exprimiert. Die miRNAs *miR-129-3P*, *miR-29a*, *miR-29b* und *miR-29c* scheinen dabei wichtig für die spätere postnatale Entwicklung des Cerebellums zu sein, da diese an P8 keine wesentliche Expression zeigten. Hingegen war beispielsweise für *miR-29a* im Adulttier die Expression bis zu 130-fach auf ca. 16 fmol hochreguliert. Im Hinblick auf die zuvor diskutierte Wirkung von *Myc* auf das *miR-17~92* Cluster sei darauf verwiesen, dass *miR-29* grundsätzlich die Expression von *N-Myc* inhibieren kann (Rostas et al., 2014) und somit dazu beitragen könnte, die proliferative Phase von Körnerzellen zu beenden. Des Weiteren ist *miR-29* wichtig für die neuronale Entwicklung und ein bestimmender Faktor bei der Aufrechterhaltung neuronaler Zellen (Roshan et al., 2014). Dementsprechend führt eine Herunterregulation von *miR-29* zu massivem Absterben von neuronalen Zellen – auch im Cerebellum. *Mir-34a* war von P8 zu adult 22-fach hochreguliert auf eine Konzentration von 2 fmol. Somit besitzt diese miRNA im Vergleich zu den vorher genannten eine relativ moderate Expression. *Mir-34a* wird ubiquitär exprimiert; zählt aber zu den im Großhirn angereicherten miRNAs. Interessanterweise wird *miR-34a* direkt über den Transkriptionsfaktor *p53* reguliert, der zu Apoptose und Zellzyklusarrest beiträgt

(Tarasov et al., 2007). Des Weiteren reguliert *miR-34a* miRNA *Mycn* und ist somit in die neuronale Differenzierung involviert. *MiR-132* hatte eine mehr als 20-fache Hochregulation im Adulttier gegenüber P8, wo es eine relativ geringe Expression aufwies. Wie bereits in der Einleitung beschrieben ist *miR-132* wichtig für die Bildung und Aufrechterhaltung von Dendriten. Die Dendritogenese von Körnerzellen setzt erst nach ihrer migratorisch aktiven Phase ein und liefert somit eine plausible Erklärung für die später einsetzende Expression von *miR-132*. Interessant in diesem Zusammenhang wäre es zu wissen, ob die *miR-132* Expression in den unterschiedlichen Zelltypen, parallel zur Bildung der Dendriten, einsetzt.

Vergleicht man die hier durchgeführte Analyse mit anderen Microarray Analysen neuronaler Gewebe und insbesondere des Cerebellums sind große Übereinstimmungen erkennbar. Der Vergleich der miRNA Expression unterschiedlicher Hirnregionen der Maus (Bak et al., 2008) zeigte, dass bestimmte miRNAs besonders im zentralen Nervensystem angereichert waren. Darunter befanden sich *miR-9*, *miR-124a*, *miR-125b*, *miR-127*, *miR-128* und Mitglieder der *let-7* Familie (Babak et al., 2004; Barad et al., 2004; Miska et al., 2004; Sempere et al., 2004; Shingara et al., 2005). Die meisten dieser miRNAs waren auch im hier erstellten Expressionsprofil des Cerebellums (siehe Abbildung 10) wiederzufinden (*miR-9*, *miR-124*, *miR-128* und die *let-7* Familie). Des Weiteren scheinen bestimmte miRNAs spezifisch für entsprechende neuronale Regionen zu sein, da sie dort angereichert waren (Tusher et al., 2001). Im Cerebellums der Maus angereichert (mehr als 3-fach gegenüber anderen Hirnregionen) waren die miRNAs *miR-195*, *miR-497* und *miR-30b* (Bak et al., 2008b; Hohjoh and Fukushima, 2007). Diese miRNAs waren auch im hier durchgeführten Microarray mit einer überdurchschnittlichen Konzentration (> 2fmol) vertreten (*miR-195*: 8,7fmol; *miR-497*: 2,5 fmol; *miR-30b*: 37,7fmol). *MiR-30b* ist im adulten Cerebellum angereichert und zeigte darüber hinaus, zusammen mit anderen Mitgliedern der *miR-30* Familie, eine starke absolute Zunahme der Konzentration von P8 zu adult. *MiR-30b* vermag u.a. *Sema3A* zu regulieren, indem es an dessen 3'UTR bindet und damit dessen Interaktion mit dem *NRP1/PlexA1* Rezeptorkomplex inhibiert (Han et al., 2015). *Sema3A* ist ein wichtiges Signalmolekül der Axonpfadfindung, welches eine kritische Rolle bei der ZNS Regeneration einnimmt. Die eigentliche Funktion von *Sema3A*, nämlich neuronales Wachstum zu hemmen (Zylbersztejn et al., 2012), wird hier also

unterbunden und führt folglich zur Axonelongation und fördert die Bildung neuronaler Wachstumkegel.

Limitationen der hier durchgeführten Analyse sind durch die nicht vorhandene Zelltypspezifität gegeben. Hier hätte man sicherlich durch Verwendung der im Hause vorhandenen *Math1*-eGFP Mäuse gezielt nach Körnerzellen sortieren können (FACS) und diese für die Microarray Analyse früher Körnerzellvorläufer verwenden können. Zusätzlich würde die Verwendung von vereinigten Proben aus jeweils mehreren Kleinhirnen zu einem weniger fehlerbehafteten Ergebnis führen. Die hier vorliegende Analyse aus jeweils zwei Tieren führte zwangsläufig zu teilweise inkonsistenten Aussagen. So werden manche miRNAs unterschiedlich unter den männlichen Geschwistertieren exprimiert. In diesen Fällen ist keine eindeutige Aussage für die betreffende miRNA möglich. Dies kann bedeuten, dass hier tatsächlich zwischen den beiden Tieren differentiell exprimierte miRNAs vorliegen oder dass es sich um einen technischen Messfehler (Ausreißer) handelt. Sicherlich gibt es Vor- und Nachteile für beide Ansätze und man muss in Anbetracht der nicht ganz kostengünstigen Methode Kompromisse eingehen. Die zuvor genannten Beispiele zeigen, dass die differentielle Expressionsanalyse der beiden Entwicklungsstadien wertvolle Einblicke in die regelhafte Neurogenese des Cerebellums erlaubt. Viele der hier ermittelten angereicherten miRNAs üben offensichtlich neuronal-assoziierte Funktionen aus, die essentiell für die regelhafte Entwicklung auch für Neuronen des Cerebellums sind.

Für jedes der hier untersuchten Gene konnte mindestens eine miRNA identifiziert werden, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit am 3'UTR des Transkriptes bindet und zudem eine gegensätzliche Expression im Cerebellum aufweist. Dieser Zusammenhang unterstützt somit auch die hier formulierte These, dass eine Korrelation zwischen den Expressionsniveaus von „Regulator“-miRNA zur Ziel-mRNA in der postnatalen Entwicklung des Cerebellums vorhanden ist. Dies ist ein Indiz dafür, dass auch die differentielle Expression von *Mtss1* in Körnerzellen des Cerebellums möglicherweise durch gegensätzlich exprimierte miRNAs reguliert werden kann.

#### 4.1.3 HOCHREGULIERTE MICRORNAs KÖNNTEN FÜR DIE DIFFERENTIELLE REGULATION VON *MTSS1* IN CEREBELLÄREN KÖRNERZELLEN VERANTWORTLICH SEIN.

Die hier vorgenommene Untersuchung stellt die Synthese der vorhergehenden Ergebnisse dar. Zuvor wurde gezeigt, welche miRNAs vermutlich zur Regulation von *Mtss1* beitragen können. Des Weiteren wurde das Expressionsprofil cerebellärer miRNAs in den Phasen P8 und adult untersucht und insbesondere die differenziell regulierten miRNAs identifiziert. Unsere Vermutung, dass miRNAs mit gegensätzlichem Expressionsmuster für die maßgebliche Regulation von ihrem Ziel-Transkript (hier *Mtss1*) verantwortlich sein können, ist als allgemeines Prinzip der miRNA Regulation bereits beschrieben worden (Lim et al., 2005; Selbach et al., 2008). Unabhängig davon konnte hier für das Cerebellum dargelegt werden, dass dies theoretisch auch für andere entwicklungspezifisch regulierte Transkripte zutreffend ist (siehe Abbildung A9 im Anhang).

Hier wurden nun explizit solche miRNAs identifiziert, welche eine differentielle Expression besaßen und mit hoher Wahrscheinlichkeit *Mtss1* regulieren können. Aus den ursprünglich für die hier durchgeführte Untersuchung ausgewählten 22 miRNAs konnte für 18 eine Expression im Cerebellum ermittelt werden. Fünf dieser miRNAs wiesen zudem ein gegensätzliches Expressionsprofil zu *Mtss1* auf und waren mehr als 2-fach differentiiell exprimiert. Dies wurde zusätzlich durch qRT-PCR bestätigt. Es handelte sich um die miRNAs *miR-23b*, *miR-182*, *miR-195*, *miR-206* und *miR-497*. Einige dieser miRNAs wurden zuvor in anderen Arbeiten für eine angereicherte Expression im Cerebellum beschrieben (siehe Kapitel 4.1.2). Im Folgenden wird kurz auf die bisher beschriebene Rolle dieser miRNAs eingegangen und ein Zusammenhang zu der hier beobachteten cerebellären Expression hergestellt.

Die stärkste differentielle Expression unter den potentiell *Mtss1* regulierenden miRNAs zeigte *miR-206*. Diese war von P8 zu adult 5,6-fach hochreguliert. Die Vorhersage bei TargetScan mit einem P<sub>CT</sub> Score von 0,47 war überdurchschnittlich und listete *miR-206* an vierter Stelle. *MiR-206* ist bisher vor allem als Muskelskelett-spezifische miRNA beschrieben, die als bicistronisches Transkript zusammen mit *miR-133b* transkribiert wird (Rao et al., 2006). Es gibt zwei andere homologe miRNA-Paare, die die gleichen regulativen Sequenzen erkennen können: *miR1-1/133a-2* und *miR1-2/133a-1*. Für die neuronale Entwicklung interessant ist,

dass eine Anreicherung von *miR-206* (damals nicht-kodierenden RNA 7H4) in der neuromuskulären Synapse beschrieben wurde (Velleca et al., 1994). Und nicht zuletzt ist *miR-206* im Cerebellum gegenüber anderen Hirnregionen angereichert (Panwalkar et al., 2015). Interessanterweise ist die Expression in allen Medulloblastomen-Subtypen herunterreguliert und eine Überexpression von *miR-206 in vivo* führt zur Inhibition der Proliferation verschiedener Medulloblastome, auch in von Medulloblastom abgeleiteten Zellkulturlinien (Panwalkar et al., 2015).

*MiR-195* hatte unter den hier gewählten miRNAs mit 8 fmol die stärkste Expression im adulten Tier und war gegenüber P8 2,3-fach hoch reguliert (Tabelle A3; Anhang). Diese miRNA ist, ebenso wie *miR-206*, im Cerebellum im Vergleich zu anderen Hirnregionen angereichert. Zielgene von *miR-195*, wie z.B. *Cyclin D1*, stehen oft in Zusammenhang mit der Zellzyklus-Regulation und hier insbesondere der Regulation der Proliferation (Zhou et al., 2014). Eine weitere beschriebene Funktion ist die Regulation der Zellmigration in Lungenkrebszelllinien (Yongchun et al., 2014). In der neuronalen Entwicklung ist *miR-195* in einem *Feedback loop* assoziiert, indem es das DNA Methyl-bindende Protein *Mdb1* reprimiert. *Mdb1* wiederum vermag die Expression der beiden miRNAs *miR-195* und *miR-184*, welche die neuronale Differenzierung fördern, zu reprimieren (Liu et al., 2010a, 2013). Somit ist *miR-195* aufgrund des auffälligen Expressionsprofils und den hier beschriebenen Funktionen eine geeignete miRNA, um die Expression von *Mtss1* während der postnatalen Entwicklung des Cerebellums modulieren zu können. Dies gilt insbesondere für das bei *Mtss1* beobachtete neuronale Spleißen in cerebellären Körnerzellen. Diese Regulation könnte möglicherweise indirekt über Zielgene wie z.B. *Mdb1* erfolgen und wäre somit unabhängig von einer direkten Bindung am 3'UTR von *Mtss1*.

Für die miRNAs *miR-23a* und *miR23b* konnte hier im Cerebellum der adulten Maus eine 2-fach hochregulierte Expression gegenüber P8 festgestellt werden. Sie befinden sich mit *miR-27* und *miR-24* in einem gemeinsamen Genlocus und werden als Cluster exprimiert. *MiR-23ab* werden vorzugsweise mit Signalwegen der Cytoskelett-Reorganisation und -Motilität assoziiert (Pellegrino et al., 2013). Neuronal spielen sie in Oligodendrozyten eine Rolle, wo ihre Anreicherung (Budde et al., 2010; Lau et al., 2008) die Entwicklung dieser Zellen über den

*Akt/mTOR* Signalweg beeinflusst (Lin and Fu, 2009). Obwohl *bis dato* kein direkter Hinweis auf eine Funktion von *miR-23ab* bei der Entwicklung des Cerebellums vorhanden ist, sind Zielgene dieser miRNAs, wie beispielsweise *Lamin B1* oder auch *Pten* (Lin et al., 2014), für die gesamte neuronale Entwicklung von Bedeutung.

Das *miR-182er*-Cluster besteht aus den drei miRNAs *miR-182*, *mir-96* und *miR-183* und war trotz geringer Expression dieser miRNAs von erhöhtem Interesse. Zum einen sind drei Bindestellen für diese miRNAs im 3'UTR von *Mtss1* vorhanden und zum anderen besitzen *miR-96* und *miR-182* die höchste Vorhersagewahrscheinlichkeit einer Bindung (siehe Tabelle 20). Des Weiteren vermögen beide miRNAs bevorzugt Gene der Cytoskelett Reorganisation zu regulieren, wie hier mittels TargetScan bzw. DIANA-miR-Path gezeigt werden konnte. Zudem ist eine *miR-182* abhängige Regulation von *Mtss1* bereits in diversen Krebsarten beschrieben worden (Hirata et al., 2013a; Wang et al., 2012).

Die differentielle Expression der hier beschriebenen miRNAs im Cerebellum und deren Rolle in den oben genannten Signalwegen machen diese zu sehr vielversprechenden Kandidaten zur Beantwortung der hier gestellten Frage, inwiefern *Mtss1* miRNA abhängig reguliert werden kann und dadurch in die Körnerzellentwicklung eingreift. Die Cytoskelett Reorganisation ist als zentraler Signalweg mit vielen anderen zellulären Prozessen, wie Differenzierung und Reifung von Neuronen und deren Morphogenese, assoziiert. Darüber hinaus zeigen die zuvor beschriebenen Beispiele, dass diese miRNAs ebenfalls andere Gene innerhalb der gleichen Signalwege regulieren können. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch die Regulation verschiedener Ebenen der Signalkaskade eine Wirkung erzielt werden kann. Dies ist davon abhängig, welche Funktion das betreffende Gen in dem zu regulierenden Pfad einnimmt. Hier besonders interessant sind die *Rho*-GTPasen, die wie molekulare Schalter Vorgänge der Cytoskellett-Reorganisation, Adhäsion und Migration regulieren können. Dieser Zusammenhang wird an geeigneter Stelle dieser Diskussion noch genauer erörtert.

## 4.2 EXPRESSIONSMUSTER DER IMD-PROTEINFAMILIE IM POSTNATALEN CEREBELLUM DER MAUS

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, üben Mitglieder der IMD-Proteinfamilie (*IRSp53/MIM*-Domäne) ähnliche Funktionen aus, was unter Anderem auf die gemeinsame IM-Domäne zurückzuführen ist. Daher wurde deren cerebelläre Expression über vergleichende Immunfluoreszenzanalysen von Gesamthirnpräparaten acht Tage alter Mäuse (P8) und adulter Mäuse analysiert und mit Daten des Allen Brain Atlas verglichen. Hierbei sollte insbesondere eine mögliche Ko-Expression einzelner Mitglieder der IMD-Familie in Körnerzellen des P8-Stadiums und in Purkinje-Zellen beider Stadien überprüft werden.

Vorab wurden mittels TargetScan die 3'UTRs der IMD-Proteine vergleichend analysiert, um hierbei gemeinsame miRNAs zu identifizieren. Dabei konnten fünf miRNAs identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit ( $P_{CT} > 0,10$ ) gleichzeitig mehrere IMD-Mitglieder regulieren könnten. Eine mögliche Ko-Regulation durch miRNAs war für *Mtss1* und *Mtss1l* (*Abba*) durch *miR-200b* gegeben. Des Weiteren bestand die Möglichkeit einer Ko-Regulation zwischen *Mtss1* und *Baiap2* (*IRSp53*) durch *miR-206*.

### 4.2.1 ZELLTYP SPEZIFISCHE EXPRESSION DER IMD-MITGLIEDER IM CEREBELLUM DER MAUS

Interessanterweise zeigten die IMD-Proteine im Cerebellum relativ unterschiedliche Expressionsmuster. Dies gilt sowohl für die zeitliche Regulation, als auch für die Zelltypspezifität. In der postnatalen Entwicklung der Purkinje-Zellen konnte hier eine gegenläufige Expression von *Mtss1l* (*Abba*) und *Baiap2* (*IRSp53*) beobachtet werden. *Mtss1l* zeigte eine starke Expression am P8, die im Adultstadium deutlich reduziert war. Bisher wurde die Expression von *Mtss1l* im Cerebellum nur in der Molekularschicht (Bergmann Glia) des adulten Cerebellums und insbesondere in radialen Gliazellen verschiedener Hirnregionen nachgewiesen (Saarikangas et al., 2008). Dabei wurde eine starke Expression von *Mtss1l* auf Proteinebene in radialen Gliazellen und primären Gliazellkulturen detektiert, hingegen keine Expression in neuronalen Zellen und neuronalen Primärzellen. Die hier durchgeführten

Immunfluoreszenz Analysen im postnatalen Stadium (P8) zeigten eine deutliche Expression von *Mtss1l* in Purkinje-Zellen. Dies impliziert eine wichtige entwicklungspezifische Funktion von *Mtss1l* in der Purkinje-Zellentwicklung und somit seine wichtige Rolle auch im neuronalen Zelltyp. Letztendlich fehlen weitere Hinweise, die sich mit der entwicklungspezifischen Regulation von *Mtss1l* in neuronalen Zellen auseinandersetzen. Hier wäre es sinnvoll, die einsetzende Expression beispielsweise über ISH zu ermitteln. Dies würde wertvolle Hinweise auf eine regulative Funktion dieses Gens in der cerebellären Entwicklung liefern. So wie andere Mitglieder der IMD-Familie agiert *Mtss1l* als Regulator aktindynamischer Prozesse, welche durch Aktivierung von GTPasen zu verändertem Zellspreiten führen (Zeng et al., 2013).

Die differentielle Expression der beiden IMD-Proteine *Mtss1l* und *Baiap2*, die in den untersuchten Stadien gegenläufig ist, wirft neue Fragen auf. Sie könnten somit wichtig für die Steuerung der Purkinje-Zellentwicklung sein, während *Mtss1* hier in beiden Stadien, also konstitutiv, exprimiert wird. Die entwicklungspezifische bzw. reduzierte Expression von *Mtss1l* (*Abba*) sollte demnach genauer untersucht werden, um den Zeitpunkt der einsetzenden Herunterregulation besser eingrenzen zu können. Analog zu den hier durchgeführten Analysen zu *Mtss1* könnte auch die miRNA abhängige regulierte Expression von *Mtss1l* während der cerebellären Entwicklung untersucht werden. Die hier gemachten bioinformatischen Analysen aller IMD Proteine zeigten, dass die Herunterregulation von *Mtss1l* durch die cerebellär hoch angereicherten miRNAs *miR-128*, *miR-29a*, *miR-29b* und *miR-29c* im Adultstadium der Maus grundsätzlich möglich ist (Vergleiche Abbildung 10). Allerdings müsste auch hier vorab analysiert werden, welche Bindestellen am 3'UTR von *Mtss1l* tatsächlich funktional sind. Durch Vergleichende Analyse von Zellkultur Zellen mit neuronalen Zellen des Cerebellums könnte man auf mRNA Ebene bzw. Proteinebene schauen, ob es *in vivo* durch exogene Überexpression dieser miRNAs zur veränderten Expression kommt. In Neuronen würde sich eine Überexpression bestimmter miRNAs mit Hilfe lentiviraler Transduktion durchführen lassen. Idealerweise wäre dies mit einem fluoreszenten Reporter (z.B. eGFP) kombiniert. Dies würde zudem detaillierte Studien insbesondere der Zellmorphologie zulassen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass die endogene Expression der miRNAs unter Einbeziehung der vollständigen Prozessierungs-Maschinerie stattfindet. Nicht zuletzt ist die gezielte Prozessierung durch *Dicer* mitentscheidend, wenn es



darum geht, ob eine pre-miRNA auch tatsächlich zur reifen miRNA umgewandelt wird und damit ihr Potential als Regulator der Genexpression entfalten kann. Gerade dies ist im neuronalen System von Bedeutung, wo innerhalb der Zellen z.B. an der Synapse bestimmte miRNAs angereichert sind, um dort ihre Funktion zu erfüllen. Die hohe Expression der hier genannten miRNAs ist zumindest ein Indiz dafür, dass die Transkripte von *Mtss1l* im Cerebellum der Maus einer starken Regulation durch miRNAs ausgesetzt sein könnten. Dies könnte auch die Ursache dafür sein, warum in den hier gezeigten Immunfluoreszenzen eine relativ schwache Expression von *Mtss1l* in Körnerzellen detektiert wurde. Die abnehmende Expression von *Mtss1l* in Purkinje-Zellen könnte hierdurch ebenfalls interpretiert werden. Mittlerweile sind zur Identifikation von miRNAs auch zelltypspezifische Methoden beschrieben worden. Beispielsweise die sogenannte miRAP-Methode (He et al., 2012), wobei miRAP für **miRNA tagging and affinity-purification** steht. Hierbei wird die Immunpräzipitation von mit einem „TAG“ versehenen AGO2 mit dem Zelltyp-spezifischen Cre/LoxP System in Mäusen kombiniert, um miRNA-„Fingerabdrücke“ verschiedener Neuronentypen zu analysieren. In Purkinje-Zellen waren hierbei *miR-29b* und *miR-29c* tatsächlich vielfach gegenüber Gesamt-Cerebellum hochreguliert (*miR29b*: 5,4-fach; *miR29c*: 2,6-fach). Dies ist ein Indiz dafür, dass diese miRNAs wichtig für die entwicklungspezifische Regulation von Purkinje-Zellen sind. Darüber hinaus ist eine Regulation von *Mtss1l* (*Abba*) durch diese miRNAs wahrscheinlich und könnte somit die stark abnehmende Expression von P8 zu adult in Purkinje-Zellen erklären.

An P8 konnten für *Baiap2* in den hier gefertigten Immunfluoreszenzanalysen einzelne Zellen in der Molekularschicht detektiert werden. Vermutlich handelt es sich um Korb-/Sternzellen. In der IGL waren einzelne Zellen positiv für *Baiap2*- hierbei handelt es sich nicht um Körnerzellen. Im Adulttier konnte eine deutliche Expression in Purkinje-Zellen detektiert werden. Diese differentielle Expression impliziert auch für *Baiap2* eine wichtige entwicklungspezifische Funktion für Purkinje-Zellen des Cerebellums. Auch hierbei wäre es sehr interessant, den Zeitpunkt der einsetzenden *Baiap2* Expression in Purkinje-Zellen näher einzugrenzen. Dies könnte über ISH verschiedener Stadien erfolgen. Die differentielle Expression der IMD-Proteine ist Gegenstand aktueller Forschung in unserem Labor und wird daher entsprechend in anderen Arbeiten ausführlich behandelt (B. Eiberger et al.;

unveröffentlicht) und diskutiert werden. Interessant für diese Arbeit war insbesondere die Expression der IMD-Proteine in Körnerzellen der beiden Stadien P8 und Adult und deren mögliche Ko-Regulation durch miRNAs.

In adulten Purkinje-Zellen konnte eine deutliche *Baiap2* Expression detektiert werden, d.h. es wird in diesem Zelltypentwicklungsspezifisch reguliert. Die *Baiap2* spezifischen miRNAs *miR-181*, *miR-29abc*, *miR-9* und *miR-206* werden im Cerebellum differentiell exprimiert. Allerdings sind laut He et al., 2012 hierbei die Purkinje-Zellspezifischen miRNAs vielfach stärker im adulten Tier exprimiert (*miR-29c*: ~ 32x) und können somit keine plausible Erklärung einer miRNA induzierten *Baiap2* Regulation liefern.

*Baiap2l1* zeigte ein völlig anderes Expressionsmuster, welches morphologisch auf eine Expression in Interneuronen des Cerebellums der Phase P8 hindeutete. Dies wurde im Rahmen dieses Projektes nicht näher untersucht. Eine Expression dieses Gens ist in Organen wie Blase, Leber, Hoden, Herz, Lunge und in sehr geringen Mengen in der Milz, Hirn und im Skelettmuskel beschrieben (Millard et al., 2007).

Für *Baiap2l2* konnte eine geringe Expression in Körnerzellen des Adultstadiums beobachtet werden. Bei Purkinje-Zellen konnte in beiden Phasen keine Expression detektiert werden. Der Vergleich zur ISH aus dem Allan Brain Atlas bestätigte die Ergebnisse der hier angefertigten Immunfluoreszenz Analysen. In den Transkriptomanalysen von Pal et al. 2011 konnte im Cerebellum in allen untersuchten Stadien eine vergleichsweise schwache Expression von *Baiap2l2* detektiert werden. Die bis dato veröffentlichten Ergebnisse (Pykäläinen et al., 2011) zeigen für *Baiap2l2* eine eher nicht-neuronale Rolle dieses Gens im adulten Stadium und zeigen, dass eine deutliche Expression exklusiv in Zellen des Interstitiums und in Nierenepithelzellen zu finden war. Dort ko-lokalisiert *Baiap2l2* mit *Rab13*-positiven Vesikeln an der Plasmamembran von intrazellulären Verbindungen.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass hier eine differenzierte Regulation und Expression der IMD-Proteinfamilie beobachtet werden konnte. In Körnerzellen des P8 Stadiums wird *Mtss1* als überwiegendes Protein der IMD-Familie exprimiert. Dies bestärkt unsere Annahme, dass *Mtss1* eine besondere Rolle für die Entwicklung der Körnerzellen dieser

Entwicklungsphase einnimmt. Neuere Untersuchungen in unserem Labor liefern Hinweise darauf, dass *Mtss1l* (*Abba*) eine gegensätzliche Expression zu *Mtss1* in Körnerzellen zeigt und somit im Adultstadium fortwährend exprimiert wird. Somit ist denkbar, dass IMD-Proteine sich als Mediatoren zwischen Plasmamembran und Molekülen der Aktin Cytoskelett Reorganisation gegenseitig ersetzen können bzw. eine zelltypspezifische Regulation ausüben. Hierdurch ergeben sich neue Fragen: Welche Veränderungen werden theoretisch durch den hier beobachteten Austausch erzielt? Werden dadurch andere Faktoren rekrutiert und wenn ja welche? Gibt es strukturell bedingte Veränderungen der Plasmamembran und wie unterscheiden sich diese? D.h. erlangt die Membran eine andere Fähigkeit ihre Form zu ändern? Interessant hierbei wäre eine vergleichende Funktion der IMD-Proteine bei der Formgebung neuronaler Zellen. Während die Rolle von *Baiap2* bei der Dornfortsatzentwicklung der Dendriten in Purkinje-Zellen bereits eingehend beschrieben ist (Burette et al., 2014; McEvoy et al., 2007; Sekerková et al., 2003), ist die entwicklungspezifische Regulation der restlichen IMD-Proteine hierbei noch nicht genauer erörtert. Veränderungen der Spine Morphologie werden u.a. durch Änderungen des Aktincytoskeletts induziert.

In Purkinje-Zellen zeigten die hier durchgeführten Immunfluoreszenz Analysen eine deutliche Ko-Expression von IMD Proteinen. Im P8 Stadium war eine solche zwischen *Mtss1* und *Mtss1l* (*Abba*) vorhanden. Im Adultstadium zeigten die beiden IMD-Proteine *Mtss1* und *Baiap2* eine deutliche Expression in diesem Zelltyp, während die *Mtss1l* Expression in dieser Phase deutlich reduziert gegenüber P8 war. Interessanterweise ist bei Purkinje-Zellen die Ausbildung von protrusionsartigen Strukturen an Dendritenästen den sog. *dendritic Spines* sehr stark ausgeprägt. Die Funktion der IMD-Proteine bei der Röhrenbildung (engl. *tubule-formation*) ist mittlerweile genau beschrieben und könnte daher nützliche Hinweise auf die Rolle der Spine-Entwicklung bieten. Weiterhin könnte die zeitliche und räumliche Ko-Expression der IMD-Proteine eine wichtige Rolle bei der Initiation und Bildung der unterschiedlichen Morphologien ausüben. IMD-Proteine üben einen direkten Einfluss auf den Durchmesser und die Form der Dornfortsätze aus, wie bereits bei Röhrenbildungsexperimenten gezeigt werden konnte (Saarikangas et al., 2009). Hierbei gibt es signifikante Unterschiede unter den verschiedenen IMD-Proteinen. Daher könnte die zeitliche und Zelltyp-spezifische Verteilung

Einblicke in die mechanistische Regulation dieser Proteinfamilie in diesem selektiven Prozess liefern.

### 4.3 VALIDIERUNG DER BINDUNG VORHERGESAGTER MICRORNAS IM 3'UTR VON *MTSS1* DURCH REPORTER

Um den Einfluss vorhergesagter miRNAs auf die Proteinexpression zu messen, wurde der 3'UTR von *Mtss1* in das in dieser Arbeit modifizierte Duale Luciferase Reportersystem (siehe Kapitel 3.4) einkloniert und es wurden stabile mit diesem Vektor transfizierte Hek293 Zellen hergestellt. Hierdurch konnten elf miRNAs, welche eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine Bindung am 3'UTR von *Mtss1* aufwiesen, näher auf ihre funktionelle Bindung untersucht werden. Fünf dieser miRNAs zeigten zuvor im Microarray eine differentiell hochregulierte Expression im Adultstadium gegenüber P8 (*miR-23a*, *miR-23b*, *miR-195/miR-497* und *miR-206*) und waren somit geeignete Kandidaten einer möglichen entwicklungspezifischen Regulation. Die hierbei erzielten Ergebnisse und deren Interpretation werden im Zusammenhang vorhandener Modelle diskutiert.

Sechs der elf putativ bindenden miRNAs zeigten in der Reportgenanalyse eine eindeutige Reduktion der Renilla-Luciferase Aktivität. Dies bedeutet, dass mehr als die Hälfte der hier vorhergesagten miRNAs auch tatsächlich eine funktionelle Bindung aufwiesen. Des Weiteren konnte hier gezeigt werden, dass zwei miRNAs des *miR-182*er Clusters (*miR-182* und *miR-96*), maßgeblich an einer Regulation von *Mtss1* über dessen 3'UTR beteiligt sind. Vier weitere miRNAs, *miR-23b*, *miR-200b*, *miR-103* und *miR-206* konnten als Regulatoren des *Mtss1*-3'UTRs identifiziert werden. Für *miR-103* konnte jedoch bei 20nM Konzentration kein reprimierender Einfluss gemessen werden, womit eine generelle regulative Funktion hinterfragt werden kann. Grundsätzlich muss man die Ergebnisse bei der exogenen Überexpression von miRNAs in diesem artifiziellen System vorsichtig interpretieren. Nachteile sind zum einen die endogene Expression von miRNAs in der betreffenden Zelllinie und zum anderen das Maß der Überexpression. Mittlerweile gibt es mit HITS-CLIP und PAR-CLIP in Kombination mit RNA-Sequenzierung deutlich genauere Methoden zur Identifizierung der miRNA:mRNA Interaktionen. Die hierbei nachgewiesene Bindung zur mRNA und zum AGO-Proteinkomplex liefern durch die anschließende Immunpräzipitation eindeutige Argumente für eine echte

Interaktion (Pasquinelli, 2012). Vorteil der Reporter-basierten Expressionsanalyse ist der messbare Einfluss der miRNA Interaktion auf die Translation und damit die Proteinexpression des regulierten Transkriptes.

Die miRNAs *miR-182* und *miR-96* des miRNA-182er Clusters hatten unter allen zur Identifizierung verwendeten Datenbanken durchweg hohe Vorhersagen. Sie werden gemeinsam mit *miR-183* polycistronisch transkribiert. *MiR-96* und *miR-182* besitzen die gleiche Seed-Sequenz und weisen lediglich einen Unterschied in der ersten Base an Position 8 auf (*miR-96:C; miR-182:A*). Sie erkennen somit potentiell die gleichen Bindeelemente, auch am 3'UTR von *Mtss1*. Die unterschiedliche Repressionsfähigkeit dieser miRNAs hängt also unmittelbar mit ihrer unterschiedlichen Affinität zusammen. Unterschiede im 3'-seitigen Bereich beider miRNAs könnten für einen unterschiedlichen 3'-seitigen kompensatorischen Effekt verantwortlich sein. Daher sind für *miR-182* und *miR-96*, trotz gleicher Bindestellen, unterschiedliche Context Scores berechnet (TargetScan; Garcia et al., 2011). Demnach wird laut Target Scan die Bindestelle in der Nähe des Stop-Codons bevorzugt von miR-96 reguliert, während am gegenüberliegenden Ende des 3'UTRs eine verstärkte Regulation über *miR-182* vorliegt. Dies ist überwiegend auf die Art der Seed-Bindung zurückzuführen, da hier jeweils eine 8-mer Interaktion vorliegt. Es gibt Hinweise, dass auch der geringe Unterschied in der *Seed* einen deutlichen Unterschied bei der Repressionsfähigkeit von *miR-96* und *miR-182* ausmachen kann (Jalvy-Delville et al., 2012). Denkbar wäre auch, dass *miR-96* und *miR-182* einen unterschiedlichen Mechanismus der Repression nutzen. Hierzu müsste man quantitativ mRNA und Proteinexpression miteinander vergleichen. Dies könnte über kombinierte qPCR und Western Blot Analysen gemacht werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wird die Effizienz der jeweiligen Bindestelle, also die Affinität der miRNA zum 3'UTR, einen maßgeblichen Unterschied bei der Herunterregulation ausüben. Die miRNA mit der höheren Affinität besitzt eine höhere Wahrscheinlichkeit und wird daher mit größerer Effizienz an die mRNA binden und dadurch die Transkripte regulieren. Um dieser Fragestellung explizit nachzugehen, könnte man durch *in vitro*-Mutagenese unterschiedliche Bindestellen untersuchen. Die 3'UTRs könnten durch Deletion bestimmter Bindestellen vergleichend untersucht werden. Ein anderer Weg wäre die Bindestellen isoliert in das hier erstellte Reportersystem einzuklonieren und getrennt voneinander auf die Bindung von *miR-96* und *miR-182* zu untersuchen.

Die miRNAs *miR-135a* und *miR-135b* besaßen auch eine erhöhte vorhergesagte Wahrscheinlichkeit einer Bindung am 3'UTR von *Mtss1*, es konnte jedoch in den hier durchgeführten Reporteranalysen keine signifikante Herunterregulation der Reporterexpression nachgewiesen werden. Bei *miR-135a* konnte lediglich bei 200nM eine geringfügige Repression gemessen werden. Somit konnten wir die in einer Publikation bereits veröffentlichte *Mtss1*-spezifische Regulation durch *miR-135a* hier nicht bestätigen (Zhou et al., 2012). Allerdings wurden unterschiedliche Zelllinien verwendet und daher könnten die divergenten Resultate durch Unterschiede in der endogenen Expression von *miR-135a* und *miR-135b* begründet sein. Die endogene Expression von *miR-135a* in der Hek293 Zelllinie wurde hier nicht charakterisiert. Das Luciferase-basierte System ist insofern limitiert, als es eine positive Bindung nur im Falle des kanonischen miRNA-Weges nachweisen kann, welcher sich auf Proteinebene auswirkt. Im Falle einer Sättigung der miRNA Bindung durch endogene miRNAs wäre somit eine Regulation am 3'UTR experimentell nicht nachweisbar. *MiR-206* führte bei 100nm Konzentration zu einer Reduktion der Reporterexpression um ca. 60% und war somit ein sehr effizienter Regulator des *Mtss1*-3'UTRs. Die miRNA-Bindestelle liegt optimal im Randbereich des 3'UTRs und besitzt mit 75 Nukleotiden einen genügend großen Abstand zum Stop Codon (Lewis et al., 2005).

*MiR-206* war in den Vorhersagen aller Datenbanken durchweg als miRNA mit hoher Wahrscheinlichkeit für eine Bindung am 3'UTR von *Mtss1* eingestuft. Durch qRT-PCR Analysen wurde eine ungefähr 6-fache Hochregulation im Cerebellum der adulten Maus gegenüber P8 festgestellt. *MiR-206* zählt, zusammen mit *miR-497*, zu einer im Vergleich zu anderen Hirnregionen cerebellär angereicherten miRNA (Hohjoh and Fukushima, 2007; Olsen et al., 2009).

Insgesamt konnten mit diesem Ansatz miRNAs identifiziert werden, welche eine mögliche Regulation am 3'UTR von *Mtss1* bewirken. Einige dieser miRNAs werden zudem differentiell exprimiert und tragen somit verstärkt zu einer möglichen entwicklungspezifischen Regulation von *Mtss1* bei. Neuere Publikationen bestätigen den hier gezeigten direkten Zusammenhang zwischen der Expression des *miR-182* Clusters zur Expression von *Mtss1*. Auffällig dabei scheint, dass sich insbesondere bei diversen Krebsarten die miRNA vermittelte Expression

dieses Clusters auf die Expression von *Mtss1* auswirkt (Hirata et al., 2013b; Wang et al., 2012). Darüber hinaus ist *miR-182* in die Pathogenese des Kleinhirns involviert. In der Gruppe der *MYC*-amplifizierten Medulloblastome ist das *miR-183~96~182* Cluster hochreguliert (Weeraratne et al., 2012), welches vor allem Auswirkungen auf die Regulation des *PI3K/AKT/mTor* Signalwegs zu haben scheint. Letztlich kann aus den hier gewonnenen Ergebnissen nicht abgeleitet werden, ob es wahrscheinlich erscheint, dass die *Mtss1* regulierenden miRNAs für die entwicklungspezifische Regulation dieses Gens in Körnerzellen des Cerebellums verantwortlich sind. Mit Ausnahme von *miR-206* erscheinen zudem die Expressionsmengen im Cerebellum zu gering, um diesen Effekt manifestieren zu können. Dies bedeutet, dass nur starke Konzentrationsänderungen mehrerer miRNAs, welche zudem kooperativ zusammenarbeiten, diese entwicklungspezifische Herunterregulation von *Mtss1* erklären könnten.

#### 4.4 DIE REGULATION DURCH MIRNAS AM 3'UTR VON *MTSS1* IST KONZENTRATIONSABHÄNGIG UND TEILWEISE KOOPERATIV.

Als nächstes wurde die reprimierende Wirkung kombinierter miRNAs auf die Regulation des 3'UTRs von *Mtss1* untersucht. Wie im vorherigen Kapitel erörtert genügt die Einzelwirkung bestimmter miRNAs nicht, um die vollständige Repression von *Mtss1* in Körnerzellen des Cerebellums erklären zu können. Daher wurden hierbei insbesondere miRNAs untersucht, welche von P8 zu adult hochreguliert waren und damit besonders zur entwicklungsabhängigen Regulation beitragen könnten. Des Weiteren wird die Regulation am 3'UTR außer der miRNA-Sequenz auch maßgeblich über die Lage der einzelnen Bindestellen beeinflusst. Die Länge des 3'UTRs ist ebenfalls ein wichtiges Kriterium und liefert Hinweise, ob ein Transkript dieses Gens entwicklungspezifisch reguliert werden kann.

Der 3'UTR von *Mtss1* ist mit 2190bp deutlich größer als der Durchschnitt (ca. 800bp beim Menschen) und lässt daher vermuten, dass es sich hier um ein durch miRNAs reguliertes Gen handelt. Entwicklungsspezifisch regulierte Gene tendieren dazu, eine längere 3'UTR-Sequenz zu besitzen als sogenannte Haushaltsgene, welche kürzere 3'UTRs haben, da sie vermutlich so evolutionär einer miRNA Regulation ausweichen konnten (Stark et al., 2005). Die relative Lage der miRNA-Bindesequenzen und deren Häufigkeit haben ebenfalls einen starken Einfluss auf

die Repressionsfähigkeit von miRNAs. Im 3'UTR von *Mtss1* konnten über TargetScan insgesamt 118 Bindestellen für 229 miRNAs identifiziert werden. Das bedeutet, dass einzelne Bindestellen überwiegend von mehreren miRNAs erkannt werden können. So wird die Bindestelle von *miR-15b* (Position 816-822) theoretisch von mindestens elf weiteren miRNAs erkannt. Des Weiteren existieren auch Bindestellen, welche sich in ihrer Nucleotidsequenz überschneiden und demnach nicht gleichzeitig reguliert werden können. Dies ist zum Beispiel bei den miRNAs *miR-182* und *miR-96* der Fall.

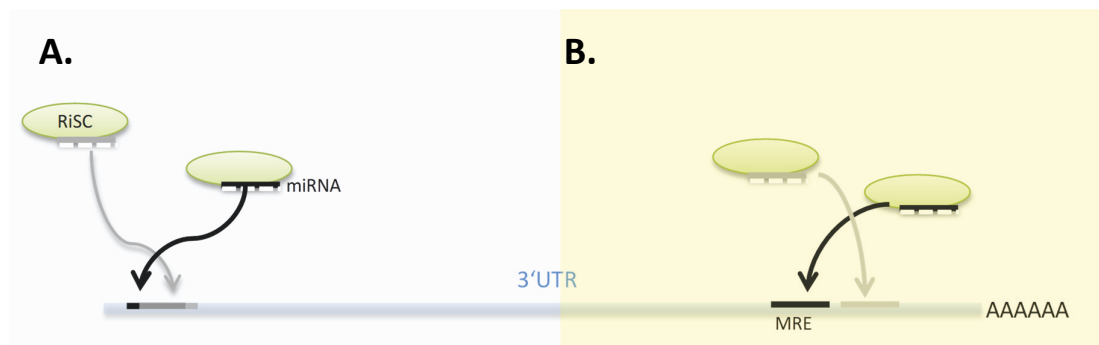
Nachdem die Validierung für einzelne miRNAs abgeschlossen war, wurde insbesondere die Konzentrationsabhängigkeit und Kooperativität der Wirkung der hier gewählten differentiell exprimierten miRNAs (*miR-23b*, *miR-182*, *miR-96* und *miR-206*) näher untersucht. *MiR-96* gehört zum *miR-182*er Cluster und wird daher polycistronisch mit *miR-182* exprimiert. Außerdem besitzen beide miRNAs die gleiche Seed-Sequenz und teilen sich dadurch theoretisch die Bindestellen; eine Tatsache die häufiger auftritt und auf Genduplikationen dieser Loci hinweist.

In den hier durchgeführten Dosisabhängigkeitsexperimenten konnte die miRNA-abhängige Repression untersucht werden. Hierbei war erkennbar, dass eine Sättigung der miRNA-Bindung bereits im Bereich einer Konzentration von 25nM erreicht wurde. Durch Erhöhung der Konzentration auf 50nM konnte meistens nur eine geringfügigere Steigerung erreicht werden. Eine maximale Repression wurde bei 100nM Konzentration beobachtet. Eine weitere Verdopplung der Konzentration auf 200nM führte mit Ausnahme von *miR-182* sogar zu einer geringfügigen Reduktion der Repressionsfähigkeit. Ein wichtigerer Unterschied hierbei ist, dass *miR-182* als einzige miRNA drei Bindestellen im 3'UTR von *Mtss1* besitzt. Daher kommt es vermutlich zu einer späteren Sättigung als bei den anderen hier untersuchten miRNAs.

Der 3'-seitige Teil der miRNA liefert oft keinen Beitrag zur Interaktion bzw. Regulation. Konsequenterweise muss es wie einleitend angedeutet auch andere Eigenschaften am 3'UTR geben, die die unterschiedliche Wirksamkeit der jeweiligen Bindestelle erklären können. Zu ihnen zählen die Position innerhalb des 3'UTRs (Grimson et al., 2007), Lokalisation außerhalb des mittleren Bereiches langer UTR Sequenzen, AU-reiche Sequenzen nahe der Bindestelle und die relative Nähe zu anderen Bindestellen ko-exprimierter miRNAs. Die hier näher



untersuchten miRNA-Bindestellen zeigten in der Tat eine bevorzugte Lokalisation am Randbereich des 3'UTRs; ein Phänomen welches häufiger auftritt und durch Gaidatzis et al., 2007 beschrieben wurde. *MiR-206* besitzt eine relative Nähe zum Stopcodon, während die miRNAs *miR-23ab*, *miR-96* und *miR-182* sich in relativer Nähe zum polyA-Schwanz befinden. Eine von insgesamt drei *miR-182* Bindestellen befindet sich im zentralen Bereich des 3'UTRs. Diese ist außerdem weniger konserviert und trägt daher vermutlich geringer zur Regulation bei. Ein weiterer Aspekt für die regulative Wirkung von miRNAs ist die relative Nähe der Bindestellen zueinander. Am polyA-seitigem Ende beträgt der Abstand zwischen *miR-23b* und der *miR-182/96* Bindestelle nur 15 bp. Die *miR-182/96* Bindestelle überlappt fast vollständig mit nur einer Base Abstand.



**Abbildung 35 | Modell der sterischen Hinderung am 3'UTR.**

**A.** Überlappende oder gleiche Bindesequenzen von miRNAs führen dazu, dass der miRISC nicht zur gleichen Zeit am 3'UTR des zu regulierenden Transkriptes binden kann. **B.** Relative Nähe der Bindestellen (<15 bp) kann ebenfalls zu einer sterischen Hinderung des miRISC führen, was folglich zu einer reduzierten Effizienz der miRNA induzierten Repression führen kann. *Abk:* miRNA: microRNA, RiSC: RNA induced silencing Complex; MRE: miRNA recognition element.

Zusammengefasst ergeben sich folgende Annahmen:

- *MiR-96* und *miR-182* konkurrieren um die gleichen Bindestellen, von denen insgesamt drei im 3'UTR von *Mtss1* vorhanden sind. Mehrere Bindestellen sind insgesamt effizienter als einzelne (Saetrom et al., 2009). Der Effekt des post-transkriptionalen Genesilencings wird sich daher solange aufsummieren, bis eine Sättigung erreicht ist. Danach sinkt die Effizienz aufgrund der Konkurrenz und der sterischen Hinderung der RISC-Komplexe.
- *MiR-96* zeigt eine deutlichere Silencing-Aktivität im Vergleich zu *miR-182*. Beide miRNAs besitzen je eine 7mer-A1 und 8mer-Bindung (siehe Anhang Tabelle A2) zur Erkennungssequenz. *MiR-182* hat zusätzlich 3'-kompensatorische Bindungen am 5'-seitigen UTR Ende, die die Affinität zur mRNA deutlich erhöhen können (Bartel, 2009), während *miR-96* AU-reichere Sequenzen besitzt und damit insgesamt eine höhere Bindewahrscheinlichkeit.
- Die *miR-23b* Bindestelle besitzt mit 15bp einen relativ geringen Abstand zur *miR-182/-96* Bindestelle. Das bedeutet, dass es bei Ko-Expression entweder zu sterischen Hinderungen der RISC-Komplexe kommen könnte oder andererseits die Effizienz der Kooperativität durch die relative Nähe gesteigert werden könnte.

Die Kombination aus den miRNAs *miR-182* und *miR-23* zeigten einen additiven Effekt der Repression. Die Effekte im Sättigungsbereich wurden hier nicht näher angeschaut, es ist jedoch zu erwarten, dass es durch Konkurrenz eher zu einer Regulation unterhalb des additiven Effektes kommen wird. Dies kann man im Kombinationsexperiment von *miR-96/-206* im Vergleich zur Viererkombination aus *miR-23/-96/-182/-206* erkennen. Die Kombination aus den vier miRNAs konnte keine höhere Repression bewirken als die kooperative Zweierkombination. Wie schon vorab diskutiert können vermutlich die RISC-Komplexe von *miR-23*, *miR-96* und *miR-182* nicht unabhängig voneinander eine mRNA-Bindung eingehen und somit kommt es auch nicht zu einer verstärkten Repression. Ein eindeutiges Modell lässt sich aus den hier gewonnenen Daten nicht definieren.

Wie bereits erwähnt können die putativen *miR-15* Bindestellen von insgesamt mindestens 12 unterschiedlichen miRNAs angesteuert werden. Zwei dieser miRNAs wurden hier untersucht

(*miR-15b* und *miR-195*) und zeigten keine Repression der Reporterexpression. Durch Konkurrenz der endogen exprimierten miRNAs könnte eine Sättigung der Bindestelle vorliegen. Dies würde keinen Nachweis einer funktionellen Bindung ermöglichen. Andererseits ist die Bindestelle nur geringfügig konserviert und weist eine geringe Affinität der jeweiligen miRNAs auf. Des Weiteren ist die Lage der Bindestelle in der Mitte des über 2kb langen 3'UTRs von *Mtss1*. Dies ist zusätzlich ein ungünstiger Faktor für eine Bindung des miRISC am 3'UTR (Gaidatzis et al., 2007).

*MiR-206* nimmt im Vergleich zu den anderen differentiell exprimierten miRNAs eine Sonderrolle ein, da es nur geringfügig zur direkten Konkurrenz kommen kann. Die Bindestelle weist eine genügend große Entfernung zum Stop Codon auf. Die relative Lage der Bindestelle am Anfang des 3'UTRs trägt positiv für eine Bindung des RISC bei. Die nächste benachbarte Bindestelle ist 48bp entfernt (*miR-103*) und besitzt zudem eine geringe Bindewahrscheinlichkeit. Somit ist eine sterische Hinderung benachbarter RISC-Komplexe unwahrscheinlich. Außerdem besteht die Seed-Familie aus lediglich zwei Mitgliedern (*miR-1* und *miR-206*). Dies bedeutet, dass es bei einer Ko-Expression beider miRNAs lediglich durch eine maximale Sättigung der Bindestelle zu einer direkten Konkurrenz kommen könnte.

Somit lässt sich die Untersuchung einer kooperativen Wirkung (siehe Abbildung 19) der miRNAs nachfolgend an zwei Beispielen zusammenfassen. Der Effekt bestimmter miRNA Kombinationen geht über den additiven Effekt der Einzeldosis hinaus. Dies kann zum Beispiel für die Kombination *miR-96/miR-206* (je 2,5nM) dargestellt werden, die kombiniert eine 30%-ige Reduktion bewirkte. Einzelne wird jeweils eine Reduktion von 7,5% erreicht und somit wäre additiv eine 15%-ige Reduktion zu erwarten gewesen. Gemäß den oben dargestellten Argumenten kommt es hier wahrscheinlich zu keiner sterischen Hinderung. Als Gegenbeispiel kann die Kombination aus den miRNAs *miR-182/-23b* betrachtet werden. Hierbei wurde eine Repression erreicht die dem additiven Effekt entsprach. Zwei Argumente sind hier zutreffend. Die Gesamtwirkung dieser miRNAs ist prinzipiell schwächer; dies wurde auch aufgrund der Vorhersagen durch TargetScan und der Repressionwerte bei den Dosisexperimenten erwartet. Hinzu kommt der geringe Abstand der *miR-23ab* Bindestelle zu den benachbarten

*miR-182* Bindestellen. Die Kooperativität ist hier wahrscheinlich durch eine nicht gleichzeitig stattfindende Bindung des RISC an der mRNA (sterische Hinderung) herabgesetzt.

Ziel dieser Untersuchung war es den kooperativen Effekt der differentiell exprimierten miRNAs zu untersuchen. Die kooperative Bindung wurde untersucht, um beurteilen zu können, inwiefern im Zusammenspiel der *Mtss1*-3'UTR regulierenden miRNAs ein vollständiges Genesilencing zu erwarten ist. Zusammen mit den hier ermittelten Expressionsdaten zwischen P8 und adult im Cerebellum der Maus (Microarray) ergeben sich die folgenden möglichen Konsequenzen:

- *Mtss1* wird über dessen 3'UTR teilweise kooperativ über entwicklungspezifisch exprimierte miRNAs reguliert.
- Insgesamt regulieren hierbei mindestens sechs identifizierte miRNAs, von denen vier eine deutliche Expression im Adulttier zeigten.
- Durch Synergie und kooperative Effekte kann demnach über IPTGS (*induced posttranscriptional gene silencing*) eine entwicklungspezifische Herunterregulation von *Mtss1* erklärt werden – ein vollständiges Silencing *in vivo* ist jedoch mit den hier gegebenen Expressionsniveaus aus der Microarray Analyse eher unwahrscheinlich.

Als nächstes war es wichtig nach gemeinsamen Signalwegen der *Mtss1* regulierenden miRNAs zu schauen, um deren mutmaßliche Funktion nachvollziehen zu können. Dies erlaubt eine Einordnung dieser Signalwege in die cerebelläre Entwicklung. Darüber hinaus kann die mutmaßliche miRNA induzierte *Mtss1* abhängige Regulation der migratorischen Aktivität von Körnerzellen besser nachvollzogen und erklärt werden.

#### 4.5 *MTSS1* SPEZIFISCHE MIRNAS REGULIEREN SIGNALWEGE DIE MIT CYTOSKELETT REORGANISATION UND ZELLMOTILITÄT ASSOZIIERT SIND.

Eine bioinformatische Funktionsanalyse (sog. *Enrichmentanalysis*) der differentiell exprimierten miRNA-Kombination aus *miR-23b*, *miR-182* (*miR-96*) und *miR-206* mit DIANA-mirPath identifizierte mehrere Signalwege die mit Zellmotilität und Zellmorphologie assoziiert sind. Insgesamt umfasste die Analyse 1522 Gene, von denen 382 in 141 Signalwegen (KEGG-Datenbank) annotiert waren. An oberster Stelle wurden Signalwege identifiziert, die in Zell-

Zellmatrix und Zell-Zelladhäsion involviert sind. Zu ihnen zählen die Fokaladhäsion, die Axonpfadfindung und die Adhärenz-Verbindungen. Die *MAPK* Kaskade stellt mit 48 möglicherweise durch diese miRNAs regulierten Genen einen wichtigen zentralen Signalweg dar. Sie ist konserviert und als solche an Zellproliferation, Differenzierung und Migration beteiligt. Des Weiteren enthält die *MAPK* Signalkaskade einige interessante Gene, wie *Egfr* und *Pdgfr*. Änderungen in der Signaltransduktion könnten einen wesentlichen Einfluss auf *Mtss1* haben. Beispielsweise kann der Phosphorylierungsstatus von *Mtss1* über *Pdgfr* beeinflusst werden (Wang et al., 2007). Ein weiterer zentraler Signalweg der hier untersuchten miRNAs war die Aktin-Cytoskelett Regulation. Von hier aus gibt es Verbindungen zu spezialisierten Signalwegen wie der Fokaladhäsion, der Bildung von Stressfasern und schließlich der Bildung von Lamellipodia und Filopodia. Neuronal war die Axonwuchsrichtungsbestimmung und die Langzeitpotenzierung als Signalweg auffällig.

Ein Nachteil der hier angewandten Methode war, dass hierbei nicht spezifisch nach Signalwegen geschaut werden konnte, bei denen *Mtss1* involviert ist. Des Weiteren ist die Annotierung für *Mtss1* in den KEGG-Signalwegen eher unterrepräsentiert. Daher wurde parallel eine Anreicherungsanalyse mittels DAVID (siehe Kapitel 3.5.2) vorgenommen und die Ergebnisse mit der GO-Datenbank abgeglichen. Die Annotierung der GO-Datenbank ist gegenüber der Darstellung der KEGG-Signalwege umfangreicher und eignet sich daher auch zur Darstellung von unterrepräsentierten Genen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass vor allem Signalwege der Aktincytoskelett-Reorganisation von Bedeutung sind. DIANA-mirPath (Version 3; 2015) wurde mittlerweile so modifiziert, indem es dem Benutzer ermöglicht, wahlweise eine der beiden Strategien anzuwenden. Hierbei können Ergebnisse aus TargetScan implementiert werden und die Signalwege aus der KEGG-Datenbank oder wahlweise über die GO-Datenbank abgeglichen werden. Dies zeigt, dass die hier zuvor angewandte Strategie zur Ermittlung von gemeinsamen Signalwegen über unterschiedliche Herangehensweisen durchaus plausibel ist. Bevor die gemeinsamen Signalwege diskutiert werden, wird kurz auf Signalwege eingegangen, bei welchen diese miRNAs im Einzelnen beschrieben wurden.

Interessanterweise spielt *miR-23b*, neben *miR-182* eine wichtige Rolle in der Medulloblastom Pathogenese (Kunder et al., 2013). Dabei ist *miR-23b* in der *Wnt* Subgruppe mit vier anderen

miRNAs überexprimiert. Insgesamt ist *miR-23b* überwiegend in Signalwege involviert, welche ebenfalls für *Mtss1* relevant sind. Diese sind vor allem die Cytoskelett-Reorganisation, Zell-Zell-Verbindungen und die Zelladhäsion (Pellegrino et al., 2013). Des Weiteren ist *miR-23b* insbesondere in Krebsarten angereichert, in denen eine Herunterregulation von *Mtss1* beschrieben wurde. Dazu zählen Prostatakarzinom, Nierenzellkarzinom und vor allem Blasenkrebs. Hierbei fungiert *miR-23b* als Tumorsuppressor indem es wichtige Tumorsuppressoren wie *Src*-Kinase und *Akt*-Kinase reguliert (Majid et al., 2012). Dies wiederum hat eine verminderte Proliferation und Migration zur Folge und senkt daher die Invasivität dieser Tumore. *MiR-182* hingegen ist in einer Subpopulation der heterogenen Medulloblastom Subgruppe 4 überexprimiert (Gokhale et al., 2010). Eine *miR-182* Überexpression wird oft mit erhöhter Proliferation assoziiert und fördert zudem die Invasivität vieler Tumorarten. In Brustkrebszelllinien konnte gezeigt werden, dass über eine Herunterregulation von *Mtss1* ein antimetastatischer Effekt über Inaktivierung von *RhoA* aufgehoben wird (Lei et al., 2014). Die Expression von *miR-206* wurde in Medulloblastomen untersucht. Für diese wurde eine Herunterregulation in desmoplastischen Medulloblastomen gegenüber Normalcerebellum bereits beschrieben (Lucon et al., 2013; Panwalkar et al., 2015). Außerdem reguliert diese miRNA Gene der Zellzyklusregulation wie beispielsweise *Cyclin D1* und beeinflusst damit die Zellproliferation, was insgesamt mit der Rolle als Tumorsuppressor einher geht (Alteri et al., 2013; Elliman et al., 2014).

Somit nehmen die differentiell exprimierten, am *Mtss1*-3'UTR bindenden miRNAs eine wichtige Rolle in der Tumorgenese von Medulloblastomen und anderen Krebsarten ein. Außerdem könnten sie über ihre entwicklungspezifische Expression im Cerebellum wichtige Funktionen bei den vorhergesagten Signalwegen übernehmen, die mit Zelladhäsion, Motilität und Migration assoziiert sind. Auffällig hierbei war insbesondere, dass auch Gene reguliert werden können, welche durch *Mtss1* selbst moduliert werden. Von zentraler Bedeutung sind in diesem Zusammenhang die kleinen GTPasen *RhoA* und *Rac1*. Diese stellen zentrale Regulatoren der Aktin Cytoskelett Reorganisation dar. Ihre Bedeutsamkeit für die cerebelläre Entwicklung, insbesondere der Körnerzellentwicklung, die Kontrolle der Morphogenese, Migration und Bildung der Foli, ist eindeutig nachgewiesen (Mulherkar et al., 2014). Es bleibt jedoch offen, inwiefern die zeitliche und räumliche Expression der *Mtss1* regulierenden

miRNAs diese selektiven Prozesse der postnatalen Entwicklung des Cerebellums steuern. Einerseits besitzt *Mtss1* die Funktion, bevorzugt an bestimmte Membrandomänen zu binden und hierbei Veränderungen zu induzieren, die für eine Aktivierung der komplexen Signalkaskade der Aktincytoskelett-Reorganisation erforderlich sind. Die genauen Mechanismen hierbei sind allerdings nicht geklärt und die Rolle von *Mtss1* in diesem Prozess nicht eindeutig nachgewiesen. In diesem Zusammenhang plausibel erscheint, dass *Mtss1* durch seine selektiv vorhandenen Proteindomänen verschiedene Mediatoren der Cytoskelett Reorganisation genau an bestimmte Bereiche der Membran rekrutieren und dadurch die zellulären Prozesse, die mit Motilität und Migration assoziiert sind, steuern könnte. Ein bekanntes Beispiel belegt, dass *Mtss1* gerichtete Migration durch einen anti-Endozytotischen Mechanismus steuern kann (Quinones et al., 2010). Dabei bindet *Mtss1* *Egf*-abhängig an *Cortactin* und inhibiert dadurch die Endozytose-vermittelte Rezeptoraufnahme und die damit verbundene Signalkaskade, welche die Aktin Polymerisation fördert. Die Aktin Cytoskelett Reorganisation und assoziierte Prozesse wie Fokaladhäsion sind essentielle Prozesse, die für die Formgebung, sowie Polarisierung als auch die Migration von Zellen wichtig sind. Diese zellulären Prozesse gehen ineinander über und müssen daher sowohl zeitlich als auch räumlich genau gesteuert werden. In neuronalen Zellen sind diese Prozesse ähnlich, wie im Folgenden anhand der postnatalen Entwicklung in Körnerzellen diskutiert wird.

#### 4.6 POSTNATALE DIFFERENZIERUNG VON KÖRNERZELLEN

Wie bereits in der Einleitung dargestellt ist die Reifung der Körnerzellen von einer Vielzahl genau abgestimmter Prozesse und der mechanistischen Umsetzung genetischer Programme abhängig. Nach Einstellung ihrer migratorischen Aktivität und Erreichen der IGL um P21 werden Körnerzellen multi-polar und bilden Dendriten, welche afferente Verbindungen zu Moosfasern herstellen. Die Dendritogenese von Körnerzellen ist ein sehr gut untersuchtes und komplexes System, wobei hier explizit auf die Rolle der Aktin Cytoskelett interagierenden Proteine eingegangen wird. Nachdem hier die miRNA vermittelte Regulation des Gens *Mtss1* untersucht wurde, und Signalwege dieser miRNAs ermittelt werden konnten stellte sich die Frage, welche Funktion diese in der Neurogenese von Körnerzellen innehaben. Der Einfluss von miRNAs auf die Neurogenese ist bereits einleitend dargestellt und nochmal detaillierter im Rahmen der Microarray Analyse (Kapitel 4.1.2) diskutiert worden. Die Signalweganalysen

konnten bestätigen, dass *Mtss1* regulierende miRNAs bevorzugt mit zellulären Prozessen assoziiert werden, in denen *Mtss1* selbst involviert ist. Um hier diesen Einfluss *Mtss1*-regulierender miRNAs messbar untersuchen zu können, wurde diese durch Transfektion von miRNA-Mimics in cerebellären Körnerzellkulturen aus Bl6 Mäusen eingebracht. Anschließend wurde die Neurogenese über mehrere Tage nachverfolgt. Bei zwei der vier untersuchten miRNAs (*miR-182*, *miR-206*) konnte eine drastische Veränderung der Körnerzellreifung festgestellt werden. Diese manifestierte sich in einer veränderten Komplexität der Dendritenbildung. Hier näher dargestellt und untersucht wurde die durch *miR-182* induzierte veränderte Komplexität der Dendritenbildung, da sie insbesondere mit einer verminderten Expression der *Mtss1* Proteinmenge in diesen Körnerzellkulturen verbunden war.

#### 4.6.1 *MIR-182* BEEINFLUSST DIE REIFUNG CEREBELLÄRER KÖRNERZELLEN

Wie schon zuvor in Kapitel 4.5 ausführlicher dargestellt ist die Rolle von *miR-182* und der restlichen Mitglieder dieses Clusters (*miR-96*, *-183*) bereits bei einer Reihe von biologischen Vorgängen beschrieben worden, hauptsächlich in der Muskelentwicklung und der Sinneszellentwicklung der Retina und des Innenohrs (Krol et al., 2009). Über den Einfluss von *miR-182* in der neuronalen Entwicklung ist wenig beschrieben. In der Amygdala scheint *miR-182* in die Gedächtnisbildung involviert zu sein, indem es zur Regulation der lokalen Proteinsynthese in Synapsen beiträgt (Griggs et al., 2013). Interessanterweise konnte in einer Studie die Anreicherung von *miR-182* in Synaptoneurosomen gezeigt werden (Lugli et al., 2008). Diese kleinen vesikulären Strukturen sind u.a. in dendritischen Dornfortsätzen von Neuronen zu finden. Die Bildung von dendritischen Dornfortsätzen wird maßgeblich mit Hilfe von IMD-Proteinen reguliert. Dies konnte erst kürzlich in Purkinje-Zellen des Cerebellums für *Mtss1* gezeigt werden (Saarikangas et al., 2015).

Anhand der in dieser Arbeit analysierten Daten des Microarrays für die Expression von miRNAs im Cerebellum der Maus war zu erkennen, dass *miR-182* und *miR-96* dort eine relativ geringe Expression aufweisen. Im adulten Stadium war die Expression gegenüber P8 dennoch vielfach hochreguliert. Des Weiteren konnten die miRNAs *miR-96* und *miR-182* auch bei geringen Konzentrationen maßgeblich die Reporterexpression durch Bindung am 3'UTR von *Mtss1* herunterregulieren. Darüber hinaus konnte hier *in vitro* gezeigt werden, dass bestimmte



miRNAs einen Einfluss auf die Neurogenese von Körnerzellen nehmen. Behandlung von primären Körnerzellkulturen mit *miR-182* führte zu einer reduzierten Komplexität des Dendritenwachstums. Dabei wurde dieser Effekt umso sichtbarer, je länger die Körnerzellen in Kultur waren. Dieser phänotypische Einfluss ging mit einer Herunterregulation der *Mtss1*-Proteinexpression einher. Zusätzlich wurden hier Körnerzellkulturen untersucht, welche *Math1*-eGFP positive Körnerzellen enthielten. Diese konnten anschließend nachverfolgt und quantifiziert werden, um diesen Effekt auf Einzelzellebene zu messen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Länge der Neuriten *miR-182* behandelter Körnerzellen signifikant reduziert war. Die Anzahl der Neurite war ebenfalls reduziert. Diese Daten konnten somit die vorab beobachtete reduzierte Dendritenkomplexität durch Vermessung einzelner Körnerzellen bestätigen.

Um sicherstellen zu können, dass der hier beobachtete Effekt durch eine verminderte Expression von *Mtss1* zustande kommt, wurden siRNAs, welche spezifisch *Mtss1* herunterregulierten, in primären Körnerzellkulturen untersucht (B. Eiberger, unveröffentlicht). Diese Experimente zeigten vergleichbare Auswirkungen auf die Dendritogenese von primären Körnerzellen. Dies legte die Vermutung nahe, dass die Expression von *Mtss1* direkt in diesen Prozess involviert ist. In welcher Weise dies mechanistisch reguliert wird, ist noch nicht eindeutig gezeigt worden. Es gibt wie später dargestellt wird, Hinweise, die einen Einblick in diese Regulation vermitteln.

Während Körnerzellen in späteren Stadien keine extensiven Veränderungen der Dendritengröße vollziehen, ist dies anders in Purkinje-Zellen, welche *Mtss1* fortwährend exprimieren. Diese verändern Größe und Komplexität ihrer Dendriten proportional zum Wachstum des Kleinhirns. Die Kontrolle des Dendritenwachstums auf molekularer Ebene wird maßgeblich über den den *PI3K-mTor* Kinase Signalweg beeinflusst (Jaworski et al., 2005; Kumar et al., 2005), der hierbei mit der *MAPK* Signalkaskade interagiert. *BDNF* vermag beide Signalwege zu aktivieren und induziert somit die Bildung primärer Dendriten (Dijkhuizen and Ghosh, 2005). Nachweislich interagiert *Mtss1* mit der GTPase *Rac1* (Bompard et al., 2005) und ein indirekter Einfluss von *Mtss1* auf die Aktivierung einer weiteren Rho-GTPase, *RhoA* (Lei et al., 2014), lässt vermuten, dass der in dieser Arbeit gezeigte Einfluss auf die Zellmorphologie

(Zellspreiten und Neuritenwachstum) maßgeblich über eine Regulation der Expression der *Rho*-GTPasen moduliert werden kann. Die Frage, ob dies *Mtss1*-abhängig auch in cerebellären Körnerzellen geschieht, muss allerdings noch beantwortet werden. Mechanistisch müsste in erster Linie gezeigt werden, ob die Expression der *Rho*-GTPasen von *Mtss1* abhängig ist und wenn ja, ob eine Herunterregulation durch Hemmung ihrer Expression (z.B. über siRNA) die gezeigten Effekte wieder aufheben kann. Der intrazelluläre Nachweis von *miR-182* in Körnerzellen durch miR-ISH würde Hinweise für den hier vermuteten Effekt liefern. Inwieweit ein Nachweis dieser geringen Expression mit dieser Methode möglich ist, muss experimentell überprüft werden. Gliazellen bzw. Glia-ähnliche Zellen innerhalb primärer neuronaler Körnerzellkulturen wurden hier nicht untersucht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die hier gemachten Beobachtungen indirekt auch über Veränderungen der Genexpression in Gliazellen induziert bzw. verstärkt werden.

#### 4.6.2 ROLLE DER AKTIN-REGULIERENDEN PROTEINE BEI DER DENDRITOGENESE CEREBELLÄRER KÖRNERZELLEN

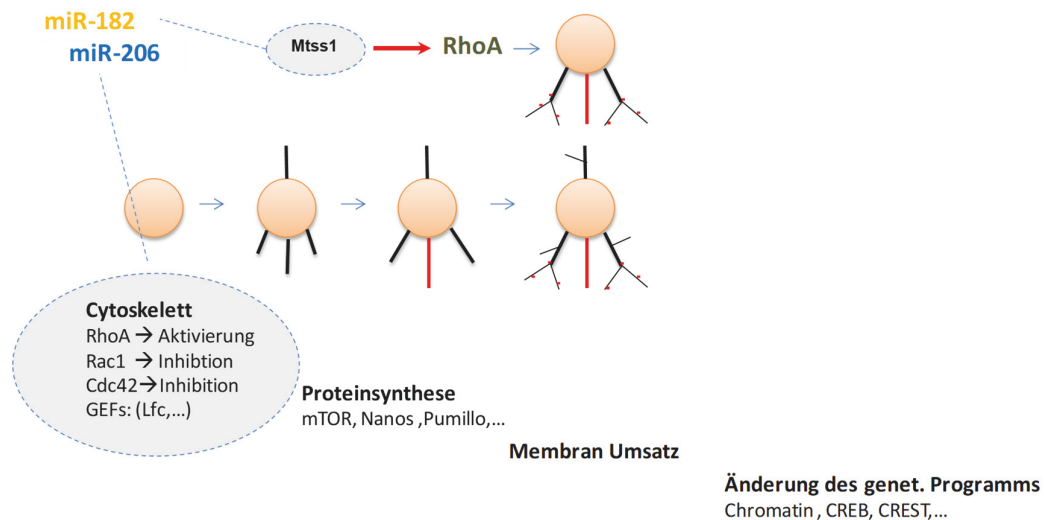
Das Aktinnetzwerk ist eine fundamentale cytoskelettale Komponente bei der Dendritenbildung und Bildung von dendritischen Dornfortsätzen. Seine Polymerisation trägt zur synaptischen Plastizität und damit auch zur Gedächtnisbildung bei (Fischer et al., 2004; Gavin et al., 2012; Mantzur et al., 2009; Rehberg et al., 2010). Wie hier in den Signalweganalysen gezeigt werden konnte, werden viele andere Aktin-regulierende Proteine (ARPs) putativ durch *miR-182* reguliert. Zu ihnen gehören unter anderem *Cortactin*, *Rac1*, *Profilin* und *Cdc42*. Dabei sind *Cortactin* und *Rac1* direkte Interaktionspartner von *Mtss1*. Des Weiteren wird möglicherweise auch Cofilin (*Cfl1*) reguliert, welches maßgeblich die cytoskelettale Reorganisation steuert. Ein Verlust von *Cofilin* führt bei der Maus zur Reduktion der Anzahl von reifen Dornfortsätzen der Dendriten (Hotulainen et al., 2009; Rust et al., 2010).

Zweifelsohne sind die Mitglieder der *Rho*-GTPasen-Familie und Proteinkinasen die Schlüsselregulatoren bei der Kontrolle der Aktin Cytoskelett Reorganisation. Des Weiteren sind die *Rho* GTPasen an der Regulation des Dendritenwachstums und der Dendritenverzweigung beteiligt (Chen and Firestein, 2007; Leemhuis et al., 2004). Durch

nachgeschaltete Effektoren wie *Arp2/3* und *mDia* können diese maßgeblich in die Aktinpolymerisation eingreifen. In den überwiegenden Studien führte eine erhöhte Aktivität von *RhoA* und Inhibition von *Rac1* oder *Cdc42* zu einer signifikanten Reduktion der Komplexität bei der Dendritenbildung (Hayashi et al., 2002; Nakayama et al., 2000; Threadgill et al., 1997). *RhoA* vermag die Aktinpolymerisation durch direkte Bindung an das Formin *mDia* zu regulieren, welches zur linearen Elongation von Aktinfilamenten führt. *Rac1* und *Cdc42* sind möglicherweise für die Aktivierung von *Arp2/3* verantwortlich, was zur Bildung von verzweigten Aktinfilamenten führt (Chhabra and Higgs, 2007). *N-WASP* und *Arp2/3* spielen dabei eine wichtige Rolle bei der Formgebung von dendritischen Verzweigungen (Pinyol et al., 2007; Rocca et al., 2008).

Diese Beispiele zeigen, wie möglicherweise Effektoren beeinflusst werden und letztlich in die Regulation der Dendritenbildung eingreifen. Letztlich bedarf es noch intensiver Studien um weiterer stromaufwärts Regulatoren und stromabwärts Effektoren zu identifizieren. Die zuvor beschriebene Reduktion der Dendritenkomplexität konnte in dieser Arbeit durch *miR-182* in cerebellären Körnerzellen induziert werden. Diese war mit einer reduzierten Expression von *Mtss1* verbunden. Demnach ist es wahrscheinlich, dass es hierbei zur *Mtss1* abhängigen Regulation der *Rho*-GTPasen kommt, die wiederum über Regulation der Effektoren die Dendritenbildung steuern. Dass eine *miR-182* vermittelte Reduktion von *Mtss1* zur Aktivierung von *RhoA* führen kann wurde bereits gezeigt (Lei et al., 2014). Ob dies hier in Körnerzellen genauso vermittelt wird muss noch bestätigt werden. Maßgeblich wird dies über das Expressionsniveau der GTPasen oder durch ihre Überführung in die aktivierte Form reguliert. Hierzu sollten GST-pulldown Experimente mit der GTP-gebunden Form von *Rac1*, *Cdc42* und *RhoA* gemacht und mit der Gesamtproteinmenge verglichen werden. Dies würde mehrere mechanistische Fragen dieser Regulation gleichzeitig beantworten. Reguliert *miR-182* auch gleichzeitig das Expressionsniveau von *Rac1*? Ist dies *Mtss1*-abhängig? Wird hierbei die Aktivität der GTPase beeinflusst (GTP-Form) oder nur die Proteingesamtmenge oder sogar beides? Der Aktivitätszustand wird maßgeblich über GAPs und GEFs reguliert. Manche GEFs interagieren mit Glutamat-Rezeptoren, wie dem *NMDA*-Rezeptor, die zu einer *Rac1* Aktivierung führen und damit GEFs rekrutieren (Tolias et al., 2005; Xie and Haslam, 2008).

Diese können während des Dendritenwachstums stromabwärts von *BDNF* und *CaMKI-gamma* agieren.



**Abbildung 36 | Einfluss von miR-182/ -206 auf Zielgene, welche die Dendritogenese regulieren.**  
 Die Dendritogenese unterliegt einer strikten genetischen Regulation, die durch extrazelluläre Signale moduliert werden kann. MiRNAs, die *Mtss1* und weitere Gene der Cytoskelett Reorganisation regulieren, könnten somit an der Reifung der Körnerzellen beteiligt sein. *MiR-182* und *miR-206* Überexpression führten zu einer reduzierten Neuritenkomplexität in primären Körnerzellen. Bei *miR-182* wurde dies durch eine Reduktion des *Mtss1* Proteinlevels begleitet. Die Reduktion von *Mtss1* kann zu einer Aktivierung von RhoA führen. Dieses kann wiederum zu einer verminderten Komplexität der Dendriten führen.

#### 4.7 DIFFERENTIELL EXPRIMIERTE *MTSS1*-MIRNAS BEEINFLUSSEN DIE ZELLADHÄSION

Nachdem miRNAs, die am 3'UTR von *Mtss1* binden, identifiziert wurden und hinsichtlich ihrer Regulation validiert werden konnten, haben kombinierte Signalweg-Analysen der differentiell exprimierten miRNAs *miR-23b*, *miR-182* und *miR-206* gezeigt, dass insbesondere auch Gene der Fokaladhäsion reguliert werden können. Insgesamt waren es 44 Gene, die in diesem Signalweg im KEGG Pathway Fokaladhäsion (ID mmu04510; siehe Tabelle A5) annotiert waren. Wie schon in Kapitel 4.5 diskutiert regulieren diese miRNAs vorzugsweise Gene, die in Signalwege involviert sind, in denen auch *Mtss1* eine regulative Funktion einnehmen könnte. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *Mtss1* mit Adhäsionsvorgängen assoziiert ist und dabei in Nierenepithelzellen mit *E-Cadherin* ko-lokalisiert (Saarikangas et al., 2011b). Cadherine

vermitteln die Bindung der Adhärenz-Verbindungen zum Cytoskelett. Dabei spielt die GTPase *Rac1* in diesem Signalweg ebenfalls eine zentrale Rolle. *Mtss1* induziert die Aktivierung der GTPase *Rac1* über seine IMD. Dabei wird angenommen, dass dieses über einen Recycling Mechanismus funktioniert, der die Rac-GEFs reguliert. Letztlich kommt es durch einen anti-endocytotischen Mechanismus zur Zunahme an F-Aktin, welches zur Stabilisierung von E-Cadherin beiträgt.

Hier wurde die hochadhärente Mausfibroblastenzelllinie NIH3T3 untersucht, die sich hervorragend für Studien zu einem Vorgang, bei dem der erste Kontakt zur ECM erfolgt, eignet. Echtzeitanalysen durch Impedanzmessung und anschließende Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass *miR-23b* und *miR-182* die Adhäsion dieser Zellen maßgeblich beeinflussen können. Dies wird zudem durch sichtbare Veränderungen des Aktin-Cytoskelettes begleitet, wie z.B. durch Bildung von Aktin Stressfaserbündeln und von Membran-Kräuselungen (engl. *ruffles*). Hierin unterschieden sich die *miR-182*-induzierten Veränderungen, die eine Bildung von Stressfaserbündeln zeigten, während der Zellrand eine glatte Struktur ohne jegliche Bildung von Ruffles aufwies. *MiR-23b* übt ebenfalls einen Einfluss auf die Adhäsion aus, jedoch mit einer deutlichen Zunahme der Membran- Kräuselungen.

Eine erhöhte Expression der GTPase *RhoA* fördert die Bildung von Stressfaserbündeln. Es kann angenommen werden, dass die miRNA vermittelte Reduktion von *Mtss1* die Bildung von Stressfasern begünstigt. Diese Annahme wird durch folgende Untersuchungen gestützt.

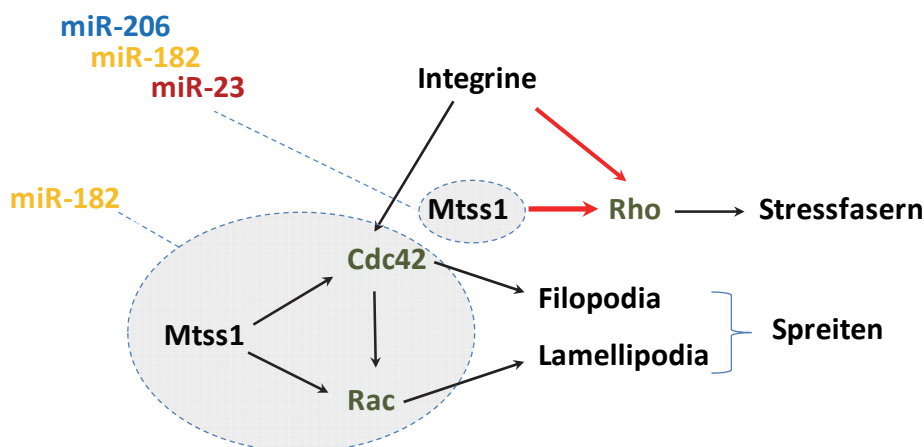
- Eine Überexpression von *Mtss1* führt zur Eliminierung von Stressfaserbildung (Mattila et al., 2003).
- *Mtss1* kann die GTPase *Rac 1* aktivieren (Dawson et al., 2012).
- *Mtss1* hat einen Einfluss auf die GTPase *RhoA* und eine Reduktion von *Mtss1* kann zu einer Erhöhung an *RhoA* führen (Lei et al., 2014).
- *RhoA* ist maßgeblich an der Regulation von Stressfaserbündeln beteiligt.

Zusammenfassend lässt sich annehmen, dass auch in diesem Fall die Effekte beim Zellspreiten zum Teil durch miRNA-vermittelte Regulation von *Mtss1* induziert werden. Diese können auch indirekt über eine durch verminderte Expression an *Mtss1* vermittelte Aktivierung von *RhoA* ausgelöst werden. Die in qRT-PCR Analysen beobachtete Abnahme der *Mtss1*

Transkriptmenge nach Behandlung mit *miR-23b* (siehe Abbildung 30) legt nahe, dass ein wesentlicher Schritt der *miR-23b* induzierten Veränderung über den Abbau der *Mtss1* mRNA zustande kommen kann. Inwiefern der Mechanismus der mRNA Degradation hier greift, ließ sich mittels qRT-PCR nicht eindeutig bestätigen. In einem späteren Experiment führte die über Transfektion induzierte Überexpression von *miR-23b* zu einer Erhöhung der mRNA Menge von *Mtss1*. *MiR-182* zeigte keine Reduktion der Transkriptmenge. Im zweiten Experiment kam es sogar zu einer Erhöhung der *Mtss1*-mRNA. Das passt zu der gemachten Beobachtung, dass *miR-182* keine Membrankräuselungen verursacht. Dieser Effekt könnte einerseits direkt durch eine Repression von *Rac1* erklärt werden oder indirekt durch eine Repression von *Mtss1*, welches *Rac1* aktivieren kann. Inwieweit die unterschiedlichen Transkripte dieser Signalwege um *miR-182* konkurrieren und inwiefern ein von *Mtss1* unabhängiger Weg wahrscheinlich ist, kann hieraus nicht beurteilt werden. Letztlich sind die Transkriptmengen und die Affinität der miRNA zur mRNA zwei Faktoren, die entscheidend dazu beitragen welches Transkript maßgeblich reguliert wird. Wie bereits dargelegt ist dabei die zeitliche- und zelltypspezifische Expression wichtig. In Neuronen ist neben der Zelltypspezifität auch die lokale Proteinsynthese interessant. *MiR-206* führte zu einer Erhöhung der Transkriptmenge im ersten Experiment und einer Reduktion im zweiten. Somit lässt sich der zugrundeliegende Mechanismus der Regulation auf mRNA Ebene nicht eindeutig festlegen. Möglicherweise führt die Transfektion zu einer unterschiedlichen Prävalenz der Genregulation, d.h. dass jeweils ein anderer Mechanismus der miRNA abhängigen Regulation vorherrschend sein kann. Dies könnte auch Zellzyklusabhängig geschehen und könnte somit die Unterschiede auf die Regulation der mRNA von *Mtss1* erklären.

Zusammenfassend ist erkennbar, dass viele Transkripte eines Signalweges durch die gleichen miRNAs reguliert werden können. Das bedeutet, dass häufig funktionsverwandte Ziel-Gene einer miRNA oder einer Gruppe von miRNAs vorhanden sind und somit die Rolle eines einzelnen Gens nicht eindeutig interpretiert werden kann. Dynamische Veränderungen der Konzentration an mRNA können durch Regulation über miRNAs generell moduliert werden. Diese würden als eine Art Puffer unterschiedlich auf die mRNA Regulation eingreifen. Schließlich werden miRNAs selbst durch die Konzentration an Transkripten reguliert. Abbildung 37 zeigt diesen Zusammenhang zumindest für den Einfluss der *Mtss1* regulierenden miRNAs

auf die *Rho*-GTPasen. Hiermit wird auf mögliche Regulationen hingedeutet die direkt oder indirekt über *Mtss1* vermittelt werden könnten.



**Abbildung 37 | Potentieller Einfluss von *miR-23*, *miR-182* und *miR-206* auf das Zellspreiten**  
 Dieses schematische Diagramm stellt den potentiellen Einfluss einer durch miRNA induzierten *Mtss1* Repression auf die Regulation der *Rho* Familien GTPasen im Integrin-abhängigen Prozess der Stressfaserbildung und des Zellspreitens dar. Hierbei kann *Mtss1* abhängig die Aktivität der GTPasen moduliert werden. Andererseits können *Cdc42* und *Rac1* theoretisch selbst durch *miR-182* reguliert werden. (Verändert nach Price et al., 1998).

#### 4.7.1 *MIR-182* BEEINFLUSST DIE PROLIFERATION

Da hier schon ausgiebig auf die Funktion von *miR-182* eingegangen wurde wird der hier beobachtete Effekt der Proliferationssteigerung in nicht-neuronalen NIH3T3 Zellen nur kurz diskutiert. Wundverschlussexperimente (hier nicht gezeigt) an NIH3T3 Zellen bestätigten diesen hier mittels Impedanz in Echtzeit gemessenen Einfluss auf die Proliferation. In einer kürzlich erschienenen Publikation konnte die hier formulierte Annahme, dass die *miR-182*-vermittelte Herunterregulation von *Mtss1* zu einer erhöhten RhoA Aktivität führt, bestätigt werden (Lei et al., 2014). Diese modulierende Wirkung der *miR-182* abhängigen *Mtss1* Herunterregulation wird bisweilen überwiegend bei der malignen Entartung und Metastasierung diskutiert (Hirata et al., 2013b; Wang et al., 2012). In Lungenkrebszelllinien wurde in einem Fall der umgekehrte Effekt einer unterdrückten Proliferation (Sun et al., 2010) beschrieben – dies stellt aber insgesamt eher eine Ausnahme dar. Sicherlich benötigen wir eine umfassendere Charakterisierung der einzelnen Zelltypen bezüglich ihrer miRNA-Expression, um Rückschlüsse auf die in malignen Zellen veränderte Expression näher zu

verstehen. Erst wenn die genauen zelltypspezifischen Gene, die über *miR-182* reguliert werden und deren Mechanismen in Bezug auf die Regulation bestimmter Signalwege verstanden sind, können solche Unterschiede auch mechanistisch erklärt werden.

## 4.8 AUSBLICK

Wenn auch die Expression der hier untersuchten miRNAs im Cerebellum zum Teil gering ist, zeigten die meisten miRNAs bereits bei geringer Konzentration eine gute Repressionsfähigkeit. In dem hier gewählten experimentellen Ansatz konnte man allerdings nur den „globalen“ Zustand der miRNA Expression im Cerebellum beschreiben. In den letzten Jahren wurden vermehrt Studien vergleichender miRNA Analysen in verschiedenen Geweben oder sogar diverser Zellspezies wie beispielsweise in Purkinje-Zellen (He et al., 2012) vorgenommen. In neuronalen Populationen ist auch die subzelluläre Lokalisation von miRNAs interessant. Gerade im sich entwickelnden neuronalen System, in dem die lokale Proteinsynthese ein durchaus plausibles Konzept ist (Sutton and Schuhman 2006), erscheinen kurzzeitige Modulationen über posttranslationale Modifikationen und epigenetische Mechanismen wie miRNA-induzierte Repression sinnvoll. Arbeiten im Labor von G. Schratt haben sich intensiv mit der Lokalisation von miRNAs innerhalb der Neurone beschäftigt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Loop-Strukturen der pre-miRNAs eine wichtige Rolle spielen. Sie fungieren als eine Art Adressschild, welches über den MTOC (Microtubuli-organisierendes Zentrum) der Zelle zu dem passenden Wirkungsort transportiert werden kann. Der zweite Prozessierungsschritt durch die RNase-III Dicer kann dementsprechend lokal stattfinden und eine miRNA-Repression somit auch lokal wirken. Durch Vertauschen der Loop-Strukturen war man experimentell in der Lage die Lokalisation neuronaler miRNAs entsprechend zu ändern (Bicker et al., 2013). Insofern liefert unser Konzept der „globalen“ miRNA Transfektion erst einmal nur die generelle Möglichkeit einer Einflussnahme auf die dargestellten Prozesse wie z.B. die Dendritenreifung bei Körnerzellen oder die Adhäsion in NIH3T3 Zellen. Mittlerweile konzentrieren sich die Forschungen in diesem Feld eher auf die komplexe Proteinmaschinerie, die diese Vorgänge ausführt. Die miRNA-Expression ist bei vielen Prozessen ein erster Schritt der Analyse. So werden zum Beispiel in der weiblichen Eizelle miRNAs nachgewiesen, jedoch fehlen hier wichtige Proteine der miRNA-Prozessierung und somit kann hier keine miRNA-modulierte Genexpression stattfinden. In der späteren Eizellentwicklung ändert sich dies und



bereits im Blastocystenstadium kommt es zu einer miRNA-regulierten Genexpression. Somit müssten wichtige Ergebnisse dieser Arbeit, wie beispielsweise der Einfluss von *miR-182* und *miR-206* auf die Dendritogenese von Körnerzellen, durch endogene Expression von pre-miRNAs als funktionellen Assay validiert werden. Dabei könnte eine effiziente lentivirale Transduktion entsprechender Expressionskonstrukte einen guten Ansatz für morphologische Studien liefern. Wichtig dabei ist, dass man zum einen über virale Transduktion einzelne Zellen für die Untersuchung der Morphologie und zum anderen eine möglichst effiziente Gesamttransduktion benötigt, um auf Proteinebene eine miRNA Regulation nachweisen zu können. Des Weiteren ist die Isolierung diverser Zellspezies des Cerebellums (insbesondere Purkinje-Zellen und Körnerzellen) und anschließende Analyse durch RNA-Seq nach wie vor ein sehr attraktiver Ansatz, um die entwicklungsspezifische Regulation durch miRNAs in Körnerzellen des Cerebellums nachvollziehen zu können.

Mittlerweile erlaubt die Verwendung der CRISPR/Cas Technologie, gezielte Manipulationen im Genom direkt vorzunehmen. Hier werden nur kurz einige Beispiele skizziert, um zumindest im Ansatz die Möglichkeiten dieser recht neuen Technologie aufzuzeigen. Geeignete Modifikation können sowohl in Kulturzellen als auch Stammzellen direkt durch Ko-Transfektion sogenannter *guide-RNAs* mit einem die Nuclease Cas9 exprimierenden Plasmid vorgenommen werden. Die Überexpression bestimmter miRNAs könnte beispielsweise durch Änderungen am endogenen Promoter moduliert werden. Der K.O. von miRNAs stellt aufgrund der meist relativ geringen Sequenzgröße ebenfalls eine attraktive Möglichkeit dieser Methode dar, indem die Region gezielt deletiert wird. Auch die Zielgene von miRNAs lassen sich verändern. Hierbei können insbesondere die UTR Sequenzen ausgewählter Gene gezielt verändert werden. Induzierbare CRISPR/Cas Mausmodelle sind mittlerweile ebenfalls beschrieben worden. Limitationen sind teilweise im Vorhandensein der PAM-Sequenzen und *Off-Target* Effekten, die nicht ganz auszuschließen sind.

Abschließend sollte auf die hier beschriebene Einflussnahme einer *miR-182* vermittelten Reduktion von *Mtss1* auf die Dendritenbildung in Körnerzellkulturen eingegangen werden. Hier wäre ein Vergleich zu primären Körnerzellkulturen aus *Mtss1*<sup>-/-</sup> Tieren erstrebenswert. Eine anschließende Anreicherung von subzellulären Strukturen oder Fraktionen (z.B.

Synaptosomen, Mitochondrien, Zellkerne) diverser Zellspezies könnte hierbei wichtige Informationen zur lokalen miRNA Regulation liefern. Mit den mittlerweile zur Verfügung stehenden verfeinerten Methoden (HITS-CLIP, PAR-CLIP) und den immer effizienter werdenden Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethoden werden recht bald neue Erkenntnisse über den Einfluss der „kleinen RNA-Biologie“ (piRNAs, lincRNAs,...) auf das Transkriptom gewonnen werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

---

Die differentielle Expression des Aktin-interagierenden Proteins *Mtss1* in cerebellären Körnerzellen endet um P21 – zeitgleich mit der Beendigung der Migration der Körnerzellen und Bildung der Foli. Aufgrund von Cytoskelett-assoziierten Funktionen könnte *Mtss1* eine wichtige regulatorische Rolle bei der Zellmigration und Morphogenese von Körnerzellen einnehmen. Die Regulation der entwicklungsabhängigen Expression von *Mtss1* ist weitgehend ungeklärt. Da *Mtss1* mehrere putative Bindestellen für microRNAs in seinem 3'UTR besitzt, lag es nahe nach einer möglichen posttranskriptionalen Regulation durch microRNAs zu fragen. 22 potentielle microRNA Kandidaten einer *Mtss1*-spezifischen Regulation konnten durch Einbindung unterschiedlicher Vorhersagemodelle ermittelt werden. Durch Microarray Daten aus jeweils zwei Cerebella aus P8 und adulter BL6-Tiere konnte die differentielle Expression von microRNAs im Cerebellum der Maus untersucht werden. Dies zeigte eine besonders starke differentielle Expression von microRNAs des miR-17~92 Clusters in der proliferativen Phase von Körnerzellen um P8 und eine besonders starke differentielle Expression der neuronalen microRNAs *miR-29abc* in der Adultphase. Unter den differentieell exprimierten microRNAs konnten fünf *Mtss1*-spezifische Kandidaten mit gegensätzlicher Expression ermittelt werden. Durch Reporteranalysen konnten insgesamt sechs miRNAs identifiziert werden, welche maßgeblich zu einer Herunterregulation durch Bindung am 3'UTR von *Mtss1* führten. Kombinierte miRNA Transfektionen in Hek293 Zellen haben gezeigt, dass microRNAs synergistisch zur verstärkten Regulation der Reportergenexpression führen können. Des Weiteren konnten wichtige Signalwege identifiziert werden, indem gemeinsam regulierte Gene *Mtss1*-spezifischer microRNAs ermittelt wurden. Hieraus konnten wichtige Funktionen dieser microRNAs für die Reifung von Körnerzellen abgeleitet werden. Dabei zeigte sich, dass insbesondere Signalwege vorherrschend waren, die für die Aktincytoskelett-Reorganisation von Zellen wichtig sind. Durch *in vitro* Experimente an primären Körnerzellen konnte gezeigt werden, dass *Mtss1* Einfluss auf die Dendritenbildung von Körnerzellen des Cerebellums nehmen kann. Eine *miR-182* vermittelte Herunterregulation von *Mtss1* führte zu einer reduzierten Dendritenkomplexität, die sich in einer reduzierten Länge und Anzahl der

Ausläufer manifestierte. Dies konnte auch über siRNA vermittelte Experimente an Körnerzellen bestätigt werden. Der Einfluss dieser miRNAs auf die Adhäsion wurde in Experimenten mit Hilfe der Fibroblastenzelllinie NIH3T3 untersucht, wobei gezeigt werden konnte, dass *Mtss1* regulierende microRNAs zu einem veränderten Zellspreiten führen. Dabei war die äußere Zellform je nach miRNA unterschiedlich. Die Interpretationen der hier generierten Ergebnisse führen zusammen mit zahlreichen anderen Studien zu der Hypothese, dass die Expression von *Mtss1* microRNA abhängig reguliert werden kann und dadurch Einfluss auf die Aktivität der *Rho*-GTPasen *RhoA* und *Rac1* nehmen kann. Diese regulieren bekanntlich Stromabwärts-Effektoren, die an Adhäsion, Migration und Neuritogenese beteiligt sind. Somit trägt diese Studie dazu bei, eine wichtige Funktion des entwicklungspezifisch exprimierten Gens *Mtss1* während der postnatalen Neuritogenese cerebellärer Körnerzellen zu ergründen.

## 6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

°C	Grad Celsius
α	anti
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
Abb.	Abbildung
βIIITub	Beta-III-Tubulin
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
Cas9	<b><i>CRISPR associated protein 9</i></b>
cDNA	komplementäre DNA
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
d.h.	das heißt
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	Bidestilliertes Wasser bzw. Reinstwasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
E	embryonal Tag
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
eGFP	verstärktes grün fluoreszierendes Protein
EGL	äußere Körnerzellschicht
EtOH	Ethanol
g	Schleuderziffer
g	Gramm
GCL	Körnerzellschicht
GCP	Körnerzellvorläufer
h	Stunde
hs	Homo Sapiens
IGL	innere Körnerzellschicht
ISH	in-situ-Hybridisierung
Kb	Kilobasen
M	mol pro Liter
min	Minute(n)
mm	Mus Musculus
MTOC	Mikrotubuli organisierendes Zentrum
n	Anzahl
nM	nanomolare Konzentration
OD	optische Dichte
P	Postnataltag

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte-Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RA	Retinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
Shh	Sonic Hedgehog
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
U	Enzym Aktivitätseinheit
UTR	nicht translatierter Bereich
(v/v)	Volumen / Volumen
Wnt	Zusammensetzung aus Wg (wingless) und Int1 (heute Wnt1)
wt	Wildtyp
(w/v)	Gewichtsanteil / Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## 7 REFERENZEN

---

- Aldinger, K.A., Lehmann, O.J., Hudgins, L., Chizhikov, V. V, Bassuk, A.G., Ades, L.C., Krantz, I.D., Dobyns, W.B., and Millen, K.J. (2009). FOXC1 is required for normal cerebellar development and is a major contributor to chromosome 6p25.3 Dandy-Walker malformation. *Nat. Genet.* *41*, 1037–1042.
- Alexiou, P., Maragkakis, M., Papadopoulos, G.L., Reczko, M., and Hatzigeorgiou, A.G. (2009). Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification. *Bioinformatics* *25*, 3049–3055.
- Alteri, A., De Vito, F., Messina, G., Pompili, M., Calconi, A., Visca, P., Mottolese, M., Presutti, C., and Grossi, M. (2013). Cyclin D1 is a major target of miR-206 in cell differentiation and transformation. *Cell Cycle* *12*, 3781–3790.
- Altman, J. (1972). Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. III. Maturation of the components of the granular layer. *J. Comp. Neurol.* *145*, 465–513.
- Altman, J., and Bayer, S.A. (1987). Development of the precerebellar nuclei in the rat: IV. The anterior precerebellar extramural migratory stream and the nucleus reticularis tegmenti pontis and the basal pontine gray. *J. Comp. Neurol.* *257*, 529–552.
- Andrews, P.W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G.S., Carlin, C., Dracopoli, N.C., and Føgh, J. (1984). Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab. Invest.* *50*, 147–162.
- Babak, T., Zhang, W., Morris, Q., Blencowe, B.J., and Hughes, T.R. (2004). Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference. *RNA* *10*, 1813–1819.
- Bak, M., Silaharoglu, A., Møller, M., Christensen, M., Rath, M.F., Skryabin, B., Tommerup, N., and Kauppinen, S. (2008a). MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA* *14*, 432–444.
- Barad, O., Meiri, E., Avniel, A., Aharonov, R., Barzilai, A., Bentwich, I., Einav, U., Gilad, S., Hurban, P., Karov, Y., et al. (2004). MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: System establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res.* *14*, 2486–2494.
- Barbee, S.A., Estes, P.S., Cziko, A.M., Hillebrand, J., Luedeman, R.A., Collier, J.M., Johnson, N., Howlett, I.C., Geng, C., Ueda, R., et al. (2006). Staufen- and FMRP-Containing Neuronal RNPs Are Structurally and Functionally Related to Somatic P Bodies. *Neuron* *52*, 997–1009.
- Bartel, D.P. (2009a). MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* *136*, 215–233.

- Bazzini, A.A., Lee, M.T., and Giraldez, A.J. (2012). Ribosome Profiling Shows That miR-430 Reduces Translation Before Causing mRNA Decay in Zebrafish. *Science* (80- ). 336, 233–237.
- Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M. a, Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A. a, Elledge, S.J., Anderson, K. V, and Hannon, G.J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.* 35, 215–217.
- Bershteyn, M., Atwood, S.X., Woo, W.-M., Li, M., and Oro, A.E. (2010). MIM and cortactin antagonism regulates ciliogenesis and hedgehog signaling. *Dev. Cell* 19, 270–283.
- Betel, D., Koppal, A., Agius, P., Sander, C., and Leslie, C. (2010). Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol.* 11, R90.
- Bhatia, V.K., Madsen, K.L., Bolinger, P.-Y., Kunding, A., Hedegård, P., Gether, U., and Stamou, D. (2009). Amphipathic motifs in BAR domains are essential for membrane curvature sensing. *EMBO J.* 28, 3303–3314.
- Bicker, S., Khudayberdiev, S., Weiß, K., Zocher, K., Baumeister, S., and Schratt, G. (2013). The DEAH-box helicase DHX36 mediates dendritic localization of the neuronal precursor-microRNA-134. *Genes Dev.* 27, 991–996.
- Bompard, G., Sharp, S.J., Freiss, G., and Machesky, L.M. (2005). Involvement of Rac in actin cytoskeleton rearrangements induced by MIM-B. *J. Cell Sci.* 118, 5393–5403.
- Borovkov, A.Y., and Rivkin, M.I. (1997). XcmI-containing vector for direct cloning of PCR products. *Biotechniques* 22, 812–814.
- Boyden, E.S., and Raymond, J.L. (2003). Active reversal of motor memories reveals rules governing memory encoding. *Neuron* 39, 1031–1042.
- Braun, J.E., Huntzinger, E., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2011). GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol. Cell* 44, 120–133.
- Budde, H., Schmitt, S., Fitzner, D., Opitz, L., Salinas-Riester, G., and Simons, M. (2010). Control of oligodendroglial cell number by the miR-17-92 cluster. *Development* 137, 2127–2132.
- Burette, A.C., Park, H., and Weinberg, R.J. (2014). Postsynaptic distribution of IRSp53 in spiny excitatory and inhibitory neurons. *J. Comp. Neurol.* 522, 2164–2178.
- Cajal, S.R. y (1906). The structure and connexions of neurons. In *Nobel Lectures: Physiology or Medicine 1901-1921* (1976), pp. 220–253.
- Callahan, C.A., Ofstad, T., Horng, L., Wang, J.K., Zhen, H.H., Coulombe, P.A., and Oro, A.E. (2004). MIM/BEG4, a Sonic hedgehog-responsive gene that potentiates Gli-dependent transcription. *Genes Dev.* 18, 2724–2729.



- Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642–655.
- Castoldi, M., Schmidt, S., Benes, V., Noerholm, M., Kulozik, A.E., Hentze, M.W., and Muckenthaler, M.U. (2006). A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA* 12, 913–920.
- Chen, H., and Firestein, B.L. (2007). RhoA regulates dendrite branching in hippocampal neurons by decreasing cypin protein levels. *J. Neurosci.* 27, 8378–8386.
- Chen, X.R., Heck, N., Lohof, A.M., Rochefort, C., Morel, M.-P., Wehrlé, R., Doulazmi, M., Marty, S., Cannaya, V., Avci, H.X., et al. (2013). Mature Purkinje cells require the retinoic acid-related orphan receptor- $\alpha$  (ROR $\alpha$ ) to maintain climbing fiber mono-innervation and other adult characteristics. *J. Neurosci.* 33, 9546–9562.
- Cheng, L.-C., Pastrana, E., Tavazoie, M., and Doetsch, F. (2009). miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat. Neurosci.* 12, 399–408.
- Chhabra, E.S., and Higgs, H.N. (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.* 9, 1110–1121.
- Conaco, C., Otto, S., Han, J.-J., and Mandel, G. (2006). Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2422–2427.
- Constantin, L., and Wainwright, B.J. (2015). MicroRNAs Promote Granule Cell Expansion in the Cerebellum Through Gli2. *Cerebellum* 14, 688–698.
- Crepel, F., Mariani, J., and Delhaye-Bouchaud, N. (1976). Evidence for a multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the immature rat cerebellum. *J. Neurobiol.* 7, 567–578.
- Dahmane, N., and Ruiz i Altaba, A. (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126, 3089–3100.
- Dawson, J.C., Legg, J.A., and Machesky, L.M. (2006). Bar domain proteins: a role in tubulation, scission and actin assembly in clathrin-mediated endocytosis. *Trends Cell Biol.* 16, 493–498.
- Dawson, J.C., Bruche, S., Spence, H.J., Braga, V.M.M., and Machesky, L.M. (2012). Mtss1 promotes cell-cell junction assembly and stability through the small GTPase Rac1. *PLoS One* 7, e31141.
- Dent, E.W., and Gertler, F.B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and guidance. *Neuron* 40, 209–227.
- Dijkhuizen, P.A., and Ghosh, A. (2005). BDNF regulates primary dendrite formation in cortical neurons via the PI3-kinase and MAP kinase signaling pathways. *J. Neurobiol.* 62, 278–288.
- Djuranovic, S. (2012). miRNA-Mediated Gene Silencing by Translational Repression Followed by mRNA deadenylation. *Science* (80-. ). 237, 237–240.

- Doench, J.G., and Sharp, P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18, 504–511.
- Du, T., and Zamore, P.D. (2005). microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 132, 4645–4652.
- Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P., and Gretz, N. (2011). MiRWalk - Database: Prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.* 44, 839–847.
- Eilken, H.M., and Adams, R.H. (2010). Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 617–625.
- Elliman, S.J., Howley, B. V, Mehta, D.S., Fearnhead, H.O., Kemp, D.M., and Barkley, L.R. (2014). Selective repression of the oncogene cyclin D1 by the tumor suppressor miR-206 in cancers. *Oncogenesis* 3, e113.
- Enright, A.J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D.S. (2003). MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.* 5, R1.
- Fabian, M.R., Svitkin, Y. V, and Sonenberg, N. (2011). An efficient system for let-7 microRNA and GW182 protein-mediated deadenylation in vitro. *Methods Mol. Biol.* 725, 207–217.
- Fan, H., Chen, L., Zhang, F., Quan, Y., Su, X., Qiu, X., Zhao, Z., Kong, K.L., Dong, S., Song, Y., et al. (2012). MTSS1, a novel target of DNA methyltransferase 3B, functions as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 31, 2298–2308.
- Farh, K.K.-H., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B.P., Johnston, W.K., Lim, L.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 310, 1817–1821.
- Ferretti, E., De Smaele, E., Miele, E., Laneve, P., Po, A., Pelloni, M., Paganelli, A., Di Marcotullio, L., Caffarelli, E., Screpanti, I., et al. (2008). Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. *EMBO J.* 27, 2616–2627.
- Fiez, J.A., and Petersen, S.E. (1998). Neuroimaging studies of word reading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 914–921.
- Fiez, J. a, Raife, E. a, Balota, D. a, Schwarz, J.P., Raichle, M.E., and Petersen, S.E. (1996). A positron emission tomography study of the short-term maintenance of verbal information. *J. Neurosci.* 16, 808–822.
- Fink, A.J., Englund, C., Daza, R.A.M., Pham, D., Lau, C., Nivison, M., Kowalczyk, T., and Hevner, R.F. (2006). Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *J. Neurosci.* 26, 3066–3076.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806–811.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Schrick, C., Spiess, J., and Radulovic, J. (2004). Distinct roles of hippocampal de novo protein synthesis and actin rearrangement in extinction of contextual fear. *J. Neurosci.* *24*, 1962–1966.
- Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 445–457.
- Friedman, H.S., Burger, P.C., Bigner, S.H., Trojanowski, J.Q., Wikstrand, C.J., Halperin, E.C., and Bigner, D.D. (1985). Establishment and characterization of the human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft D283 Med. J. *Neuropathol. Exp. Neurol.* *44*, 592–605.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009a). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* *19*, 92–105.
- Frost, A., De Camilli, P., and Unger, V.M. (2007). F-BAR Proteins Join the BAR Family Fold. *Structure* *15*, 751–753.
- Gaidatzis, D., van Nimwegen, E., Hausser, J., and Zavolan, M. (2007). Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. *BMC Bioinformatics* *8*, 69.
- Garcia, I., Crowther, A.J., Gama, V., Ryan Miller, C., Deshmukh, M., and Gershon, T.R. (2013). Bax deficiency prolongs cerebellar neurogenesis, accelerates medulloblastoma formation and paradoxically increases both malignancy and differentiation. *Oncogene* *32*, 2304–2314.
- Gavin, C.F., Rubio, M.D., Young, E., Miller, C., and Rumbaugh, G. (2012). Myosin II motor activity in the lateral amygdala is required for fear memory consolidation. *Learn. Mem.* *19*, 9–14.
- Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A.J., and Schier, A.F. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* *312*, 75–79.
- Glassmann, A., Molly, S., Surchev, L., Nazwar, T. a, Holst, M., Hartmann, W., Baader, S.L., Oberdick, J., Pietsch, T., and Schilling, K. (2007). Developmental expression and differentiation-related neuron-specific splicing of metastasis suppressor 1 (Mtss1) in normal and transformed cerebellar cells. *BMC Dev. Biol.* *7*, 111.
- Gliem, M., Weisheit, G., Mertz, K.D., Endl, E., Oberdick, J., and Schilling, K. (2006). Expression of classical cadherins in the cerebellar anlage: quantitative and functional aspects. *Mol. Cell. Neurosci.* *33*, 447–458.

- Gokhale, A., Kunder, R., Goel, A., Sarin, R., Moiyadi, A., Shenoy, A., Mamidipally, C., Noronha, S., Kannan, S., and Shirsat, N.V. (2010). Distinctive microRNA signature of medulloblastomas associated with the WNT signaling pathway. *J. Cancer Res. Ther.* *6*, 521–529.
- Gonzalez-Quevedo, R., Shoffer, M., Horng, L., and Oro, A.E. (2005). Receptor tyrosine phosphatase-dependent cytoskeletal remodeling by the hedgehog-responsive gene MIM/BEG4. *J. Cell Biol.* *168*, 453–463.
- Griffiths-Jones, S. (2006). miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol. Biol.* *342*, 129–138.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., and Enright, A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* *34*, D140–D144.
- Griggs, E.M., Young, E.J., Rumbaugh, G., and Miller, C.A. (2013). MicroRNA-182 regulates amygdala-dependent memory formation. *J. Neurosci.* *33*, 1734–1740.
- Grimson, A. (2010). A targeted approach to miRNA target identification. *Nat. Methods* *7*, 795–797.
- Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* *27*, 91–105.
- Guo, L., and Lu, Z. (2010). The fate of miRNA\* strand through evolutionary analysis: Implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule? *PLoS One* *5*.
- Gupton, S.L., and Gertler, F.B. (2007). Filopodia: the fingers that do the walking. *Sci. STKE* *2007*, re5.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jungkamp, A.C., Munschauer, M., et al. (2010). Transcriptome-wide Identification of RNA-Binding Protein and MicroRNA Target Sites by PAR-CLIP. *Cell* *141*, 129–141.
- Han, F., Huo, Y., Huang, C.J., Chen, C.L., and Ye, J. (2015). MicroRNA-30b promotes axon outgrowth of retinal ganglion cells by inhibiting Semaphorin3A expression. *Brain Res.* *1611*, 65–73.
- Hatten, M.E. (2002). New directions in neuronal migration. *Science* *297*, 1660–1663.
- Hawkins, P.G., and Morris, K. V. (2008). RNA and transcriptional modulation of gene expression. *Cell Cycle* *7*, 602–607.
- Hayashi, K., Ohshima, T., and Mikoshiba, K. (2002). Pak1 is involved in dendrite initiation as a downstream effector of Rac1 in cortical neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* *20*, 579–594.
- He, M., Liu, Y., Wang, X., Zhang, M.Q., Hannon, G.J., and Huang, Z.J. (2012). Cell-type-based

analysis of microRNA profiles in the mouse brain. *Neuron* 73, 35–48.

Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 690–701.

Hirata, H., Ueno, K., Shahryari, V., Deng, G., Tanaka, Y., Tabatabai, Z.L., Hinoda, Y., and Dahiya, R. (2013a). MicroRNA-182-5p Promotes Cell Invasion and Proliferation by Down Regulating FOXF2, RECK and MTSS1 Genes in Human Prostate Cancer. *PLoS One* 8.

Hirata, H., Ueno, K., Shahryari, V., Deng, G., Tanaka, Y., Tabatabai, Z.L., Hinoda, Y., and Dahiya, R. (2013b). MicroRNA-182-5p Promotes Cell Invasion and Proliferation by Down Regulating FOXF2, RECK and MTSS1 Genes in Human Prostate Cancer. *PLoS One* 8, e55502.

Hogan, B.L.M. (1996). Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10, 1580–1594.

Hohjoh, H., and Fukushima, T. (2007). Expression profile analysis of microRNA (miRNA) in mouse central nervous system using a new miRNA detection system that examines hybridization signals at every step of washing. *Gene* 391, 39–44.

Hotulainen, P., Llano, O., Smirnov, S., Tanhuanpää, K., Faix, J., Rivera, C., and Lappalainen, P. (2009). Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during Dendritic spine morphogenesis. *J. Cell Biol.* 185, 323–339.

Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009a). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 37, 1–13.

Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009b). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4, 44–57.

Huang, X., Liu, J., Ketova, T., Fleming, J.T., Grover, V.K., Cooper, M.K., Litingtung, Y., and Chiang, C. (2010). Transventricular delivery of Sonic hedgehog is essential to cerebellar ventricular zone development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8422–8427.

Hulsen, T., de Vlieg, J., and Alkema, W. (2008). BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics* 9, 488.

Hutvagner, G., and Zamore, P.D. (2002). RNAi: Nature abhors a double-strand. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 225–232.

Ito, M. (2006). Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog. Neurobiol.* 78, 272–303.

Itoh, T., and De Camilli, P. (2006). BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1761, 897–912.

- Ivanovska, I., and Cleary, M.A. (2008). Combinatorial microRNAs: Working together to make a difference. *Cell Cycle* 7, 3137–3142.
- Jacobsen, P.F., Jenkyn, D.J., and Papadimitriou, J.M. (1985). Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44, 472–485.
- Jalvy-Delville, S., Maurel, M., Majo, V., Pierre, N., Chabas, S., Combe, C., Rosenbaum, J., Saggiocco, F., and Grosset, C.F. (2012). Molecular basis of differential target regulation by miR-96 and miR-182: the Glypican-3 as a model. *Nucleic Acids Res.* 40, 1356–1365.
- Jaworski, J., Spangler, S., Seeburg, D.P., Hoogenraad, C.C., and Sheng, M. (2005). Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J. Neurosci.* 25, 11300–11312.
- Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., and Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309, 1577–1581.
- Kapsimali, M., Kloosterman, W.P., de Bruijn, E., Rosa, F., Plasterk, R.H. a, and Wilson, S.W. (2007). MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biol.* 8, R173.
- Kawauchi, T., and Hoshino, M. (2007). Molecular pathways regulating cytoskeletal organization and morphological changes in migrating neurons. *Dev. Neurosci.* 30, 36–46.
- Kholmanskikh, S.S., Dobrin, J.S., Wynshaw-Boris, A., Letourneau, P.C., and Ross, M.E. (2003). Disregulated RhoGTPases and actin cytoskeleton contribute to the migration defect in Lis1-deficient neurons. *J. Neurosci.* 23, 8673–8681.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209–216.
- Kim, K.K., Adelstein, R.S., and Kawamoto, S. (2009a). Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J. Biol. Chem.* 284, 31052–31061.
- Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009b). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 126–139.
- Kloosterman, W.P., Wienholds, E., Ketting, R.F., and Plasterk, R.H.A. (2004). Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. *Nucleic Acids Res.* 32, 6284–6291.
- Komuro, H., Yacubova, E., Yacubova, E., and Rakic, P. (2001). Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J. Neurosci.* 21, 527–540.
- Kosik, K.S. (2010). MicroRNAs and cellular phenotypy. *Cell* 143, 21–26.

- Kraynov, V.S., Chamberlain, C., Bokoch, G.M., Schwartz, M. a, Slabaugh, S., and Hahn, K.M. (2000). Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* 290, 333–337.
- Krek, A., Grün, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., et al. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 37, 495–500.
- Kumar, V., Zhang, M.-X., Swank, M.W., Kunz, J., and Wu, G.-Y. (2005). Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J. Neurosci.* 25, 11288–11299.
- Kunder, R., Jalali, R., Sridhar, E., Moiyadi, A., Goel, N., Goel, A., Gupta, T., Krishnatry, R., Kannan, S., Kurkure, P., et al. (2013). Real-time PCR assay based on the differential expression of microRNAs and protein-coding genes for molecular classification of formalin-fixed paraffin embedded medulloblastomas. *Neuro. Oncol.* 15, 1644–1651.
- Kurokawa, K., and Matsuda, M. (2005). Localized RhoA activation as a requirement for the induction of membrane ruffling. *Mol. Biol. Cell* 16, 4294–4303.
- du Lac, S. (1996). Candidate cellular mechanisms of vestibulo-ocular reflex plasticity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 781, 489–498.
- Lal, A., Pan, Y., Navarro, F., Dykxhoorn, D.M., Moreau, L., Meire, E., Bentwich, Z., Lieberman, J., and Chowdhury, D. (2009). miR-24-mediated downregulation of H2AX suppresses DNA repair in terminally differentiated blood cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 492–498.
- Lau, P., Verrier, J.D., Nielsen, J. a, Johnson, K.R., Notterpek, L., and Hudson, L.D. (2008). Identification of dynamically regulated microRNA and mRNA networks in developing oligodendrocytes. *J. Neurosci.* 28, 11720–11730.
- Lee, S.H., Kerff, F., Chereau, D., Ferron, F., Klug, A., and Dominguez, R. (2007). Structural basis for the actin-binding function of missing-in-metastasis. *Structure* 15, 145–155.
- Lee, Y., Samaco, R.C., Gatchel, J.R., Thaller, C., Orr, H.T., and Zoghbi, H.Y. (2008). miR-19, miR-101 and miR-130 co-regulate ATXN1 levels to potentially modulate SCA1 pathogenesis. *Nat. Neurosci.* 11, 1137–1139.
- Lee, Y.-G., Macoska, J. a, Korenchuk, S., and Pienta, K.J. (2002). MIM, a potential metastasis suppressor gene in bladder cancer. *Neoplasia* 4, 291–294.
- Leemhuis, J., Mayer, U., Barth, H., Schmidt, G., and Meyer, D.K. (2004). The small GTPase Rac is involved in clustering of hippocampal neurons and fasciculation of their neurites. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 370, 211–222.
- Lei, R., Tang, J., Zhuang, X., Deng, R., Li, G., Yu, J., Liang, Y., Xiao, J., Wang, H.-Y., Yang, Q., et al. (2014). Suppression of MIM by microRNA-182 activates RhoA and promotes breast cancer metastasis. *Oncogene* 33, 1287–1296.

- Lewis, B.P., Shih, I., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* *115*, 787–798.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* *120*, 15–20.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* *433*, 769–773.
- Lin, S.-T., and Fu, Y.-H. (2009). miR-23 regulation of lamin B1 is crucial for oligodendrocyte development and myelination. *Dis. Model. Mech.* *2*, 178–188.
- Lin, J., Liu, J., Wang, Y., Zhu, J., Zhou, K., Smith, N., and Zhan, X. (2005). Differential regulation of cortactin and N-WASP-mediated actin polymerization by missing in metastasis (MIM) protein. *Oncogene* *24*, 2059–2066.
- Lin, S.-T., Heng, M.Y., Ptáček, L.J., and Fu, Y.-H. (2014). Regulation of Myelination in the Central Nervous System by Nuclear Lamin B1 and Non-coding RNAs. *Transl. Neurodegener.* *3*, 4.
- Liu, C., Teng, Z.-Q., Santistevan, N.J., Szulwach, K.E., Guo, W., Jin, P., and Zhao, X. (2010a). Epigenetic regulation of miR-184 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell Stem Cell* *6*, 433–444.
- Liu, C., Teng, Z.-Q., McQuate, A.L., Jobe, E.M., Christ, C.C., von Hoyningen-Huene, S.J., Reyes, M.D., Polich, E.D., Xing, Y., Li, Y., et al. (2013). An epigenetic feedback regulatory loop involving microRNA-195 and MBD1 governs neural stem cell differentiation. *PLoS One* *8*, e51436.
- Liu, K., Wang, G., Ding, H., Chen, Y., Yu, G., and Wang, J. (2010b). Downregulation of metastasis suppressor 1(MTSS1) is associated with nodal metastasis and poor outcome in Chinese patients with gastric cancer. *BMC Cancer* *10*, 428.
- Llave, C. (2004). MicroRNAs: More than a role in plant development? *Mol. Plant Pathol.* *5*, 361–366.
- Loberg, R.D., Logothetis, C.J., Keller, E.T., and Pienta, K.J. (2005). Pathogenesis and treatment of prostate cancer bone metastases: targeting the lethal phenotype. *J. Clin. Oncol.* *23*, 8232–8241.
- Lucon, D.R., Rocha, C. de S., Craveiro, R.B., Dilloo, D., Cardinali, I.A., Cavalcanti, D.P., Aguiar, S.D.S., Maurer-Morelli, C., and Yunes, J.A. (2013). Downregulation of 14q32 microRNAs in Primary Human Desmoplastic Medulloblastoma. *Front. Oncol.* *3*, 254.
- Lugli, G., Larson, J., Martone, M.E., Jones, Y., and Smalheiser, N.R. (2005). Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *J. Neurochem.* *94*, 896–905.



- Lugli, G., Torvik, V.I., Larson, J., and Smalheiser, N.R. (2008). Expression of microRNAs and their precursors in synaptic fractions of adult mouse forebrain. *J. Neurochem.* *106*, 650–661.
- Lumpkin, E.A., Collisson, T., Parab, P., Omer-Abdalla, A., Haeberle, H., Chen, P., Doetzlhofer, A., White, P., Groves, A., Segil, N., et al. (2003). Math1-driven GFP expression in the developing nervous system of transgenic mice. *Gene Expr. Patterns* *3*, 389–395.
- Luo, L. (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* *1*, 173–180.
- Luo, Q., Zhou, Q., Yu, X., Lin, H., Hu, S., and Yu, J. (2008). Genome-wide mapping of conserved microRNAs and their host transcripts in *Tribolium castaneum*. *J. Genet. Genomics* *35*, 349–355.
- Lytle, J.R., Yario, T.A., and Steitz, J.A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 9667–9672.
- Machesky, L.M., and Johnston, S. a. (2007). MIM: a multifunctional scaffold protein. *J. Mol. Med.* *85*, 569–576.
- Machold, R., and Fishell, G. (2005). Math1 is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors. *Neuron* *48*, 17–24.
- Madsen, K.L., Bhatia, V.K., Gether, U., and Stamou, D. (2010). BAR domains, amphipathic helices and membrane-anchored proteins use the same mechanism to sense membrane curvature. *FEBS Lett.* *584*, 1848–1855.
- Magill, S.T., Cambronne, X.A., Luikart, B.W., Liroy, D.T., Leighton, B.H., Westbrook, G.L., Mandel, G., and Goodman, R.H. (2010). microRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 20382–20387.
- Majid, S., Dar, A.A., Saini, S., Arora, S., Shahryari, V., Zaman, M.S., Chang, I., Yamamura, S., Tanaka, Y., Deng, G., et al. (2012). miR-23b represses proto-oncogene Src kinase and functions as methylation-silenced tumor suppressor with diagnostic and prognostic significance in prostate cancer. *Cancer Res.* *72*, 6435–6446.
- Mantzur, L., Joels, G., and Lamprecht, R. (2009). Actin polymerization in lateral amygdala is essential for fear memory formation. *Neurobiol. Learn. Mem.* *91*, 85–88.
- Mattila, P.K., Salminen, M., Yamashiro, T., and Lappalainen, P. (2003). Mouse MIM, a tissue-specific regulator of cytoskeletal dynamics, interacts with ATP-actin monomers through its C-terminal WH2 domain. *J. Biol. Chem.* *278*, 8452–8459.
- Mattila, P.K., Pykäläinen, A., Saarikangas, J., Paavilainen, V.O., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Lappalainen, P. (2007a). Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P<sub>2</sub>-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism. *J. Cell Biol.* *176*, 953–964.

- Mayr, C., Hemann, M.T., and Bartel, D.P. (2007). Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* 315, 1576–1579.
- McEvoy, M., Cao, G., Montero Llopis, P., Kundel, M., Jones, K., Hofler, C., Shin, C., and Wells, D.G. (2007). Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1-mediated mRNA translation in Purkinje neurons is required for cerebellar long-term depression and motor coordination. *J. Neurosci.* 27, 6400–6411.
- Millard, T.H., Bompard, G., Heung, M.Y., Dafforn, T.R., Scott, D.J., Machesky, L.M., and Fütterer, K. (2005). Structural basis of filopodia formation induced by the IRSp53/MIM homology domain of human IRSp53. *EMBO J.* 24, 240–250.
- Millard, T.H., Dawson, J., and Machesky, L.M. (2007). Characterisation of IRTKS, a novel IRSp53/MIM family actin regulator with distinct filament bundling properties. *J. Cell Sci.* 120, 1663–1672.
- Mintz, I., Adams, M., and Bean, B.P. (1992). P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 9, 85–95.
- Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Townsend, M., Yoshii, A., Šestan, N., Rakic, P., Constantine-Paton, M., and Horvitz, H.R. (2004). Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol.* 5, R68.
- Mizugishi, K., Aruga, J., Nakata, K., and Mikoshiba, K. (2001). Molecular properties of Zic proteins as transcriptional regulators and their relationship to GLI proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 2180–2188.
- Morales, D., and Hatten, M.E. (2006). Molecular markers of neuronal progenitors in the embryonic cerebellar anlage. *J. Neurosci.* 26, 12226–12236.
- Mugnaini, E., Dahl, A.L., and Morgan, J.I. (1988). Cerebellin is a postsynaptic neuropeptide. *Synapse* 2, 125–138.
- Mulherkar, S., Uddin, M.D., Couvillon, A.D., Sillitoe, R. V, and Tolia, K.F. (2014). The small GTPases RhoA and Rac1 regulate cerebellar development by controlling cell morphogenesis, migration and foliation. *Dev. Biol.* 394, 39–53.
- Murphy, B.L., Obad, S., Bihannic, L., Ayrault, O., Zindy, F., Kauppinen, S., and Roussel, M.F. (2013). Silencing of the miR-17~92 cluster family inhibits medulloblastoma progression. *Cancer Res.* 73, 7068–7078.
- Nakagawa, H., Miki, H., Nozumi, M., Takenawa, T., Miyamoto, S., Wehland, J., and Small, J.V. (2003). IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *J. Cell Sci.* 116, 2577–2583.
- Nakayama, A.Y., Harms, M.B., and Luo, L. (2000). Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 20, 5329–5338.

- Nalbant, P., Hodgson, L., Kraynov, V., Touthkine, A., and Hahn, K.M. (2004). Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells. *Science* (80- ). *305*, 1615–1619.
- Nielsen, C.B., Shomron, N., Sandberg, R., Hornstein, E., Kitzman, J., and Burge, C.B. (2007). Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA* *13*, 1894–1910.
- Nixdorf, S., Grimm, M.-O., Loberg, R., Marreiros, A., Russell, P.J., Pienta, K.J., and Jackson, P. (2004a). Expression and regulation of MIM (Missing In Metastasis), a novel putative metastasis suppressor gene, and MIM-B, in bladder cancer cell lines. *Cancer Lett.* *215*, 209–220.
- Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* *81*, 53–62.
- Northcott, P.A., Nakahara, Y., Wu, X., Feuk, L., Ellison, D.W., Croul, S., Mack, S., Kongkham, P.N., Peacock, J., Dubuc, A., et al. (2009). Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma. *Nat. Genet.* *41*, 465–472.
- O'Donnell, K. a, Wentzel, E. a, Zeller, K.I., Dang, C. V, and Mendell, J.T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* *435*, 839–843.
- Olsen, L., Klausen, M., Helboe, L., Nielsen, F.C., and Werge, T. (2009). MicroRNAs show mutually exclusive expression patterns in the brain of adult male rats. *PLoS One* *4*, e7225.
- Packer, A.N., Xing, Y., Harper, S.Q., Jones, L., and Davidson, B.L. (2008). The Bifunctional microRNA miR-9/miR-9\* Regulates REST and CoREST and Is Downregulated in Huntington's Disease. *J. Neurosci.* *28*, 14341–14346.
- Panwalkar, P., Moiyadi, A., Goel, A., Shetty, P., Goel, N., Sridhar, E., and Shirsat, N. (2015). MiR-206, a Cerebellum Enriched miRNA Is Downregulated in All Medulloblastoma Subgroups and Its Overexpression Is Necessary for Growth Inhibition of Medulloblastoma Cells. *J. Mol. Neurosci.* *56*, 673–680.
- Papadopoulos, G.L., Alexiou, P., Maragkakis, M., Reczko, M., and Hatzigeorgiou, A.G. (2009). DIANA-mirPath: Integrating human and mouse microRNAs in pathways. *Bioinformatics* *25*, 1991–1993.
- Parr, C., and Jiang, W.G. (2009). Metastasis suppressor 1 (MTSS1) demonstrates prognostic value and anti-metastatic properties in breast cancer. *Eur. J. Cancer* *45*, 1673–1683.
- Pasquinelli, A.E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 271–282.
- Pellegrino, L., Stebbing, J., Braga, V.M., Frampton, A.E., Jacob, J., Buluwela, L., Jiao, L.R., Periyasamy, M., Madsen, C.D., Caley, M.P., et al. (2013). miR-23b regulates cytoskeletal remodeling, motility and metastasis by directly targeting multiple transcripts. *Nucleic Acids Res.* *41*, 5400–5412.

- Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R.L., and Hahn, K.M. (2006). Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* *440*, 1069–1072.
- Pinyol, R., Haeckel, A., Ritter, A., Qualmann, B., and Kessels, M.M. (2007). Regulation of N-WASP and the Arp2/3 complex by Abp1 controls neuronal morphology. *PLoS One* *2*, e400.
- Pykäläinen, A., Boczkowska, M., Zhao, H., Saarikangas, J., Rebowski, G., Jansen, M., Hakanen, J., Koskela, E. V., Peränen, J., Vihinen, H., et al. (2011). Pinkbar is an epithelial-specific BAR domain protein that generates planar membrane structures. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 902–907.
- Rajewsky, N. (2006). microRNA target predictions in animals. *Nat. Genet.* *38 Suppl*, S8–S13.
- Rakic, P. (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J. Comp. Neurol.* *141*, 283–312.
- Rakic, P., and Sidman, R.L. (1973). Weaver mutant mouse cerebellum: defective neuronal migration secondary to abnormality of Bergmann glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *70*, 240–244.
- Randall, A., and Tsien, R.W. (1995). Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* *15*, 2995–3012.
- Rao, P.K., Kumar, R.M., Farkhondeh, M., Baskerville, S., and Lodish, H.F. (2006). Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 8721–8726.
- Rehberg, K., Bergado-Acosta, J.R., Koch, J.C., and Stork, O. (2010). Disruption of fear memory consolidation and reconsolidation by actin filament arrest in the basolateral amygdala. *Neurobiol. Learn. Mem.* *94*, 117–126.
- Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* *70*, 389–399.
- Rigoutsos, I. (2009). New tricks for animal micrnas: Targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. *Cancer Res.* *69*, 3245–3248.
- Ritchie, W., Rajasekhar, M., Flamant, S., and Rasko, J.E.J. (2009). Conserved expression patterns predict microRNA targets. *PLoS Comput. Biol.* *5*, e1000513.
- Rocca, D.L., Martin, S., Jenkins, E.L., and Hanley, J.G. (2008). Inhibition of Arp2/3-mediated actin polymerization by PICK1 regulates neuronal morphology and AMPA receptor endocytosis. *Nat. Cell Biol.* *10*, 259–271.

- Roshan, R., Shridhar, S., Sarangdhar, M.A., Banik, A., Chawla, M., Garg, M., Singh, V.P.A.L., and Pillai, B. (2014). Brain-specific knockdown of miR-29 results in neuronal cell death and ataxia in mice. *RNA* 20, 1287–1297.
- Rostas, J.W., Pruitt, H.C., Metge, B.J., Mitra, A., Bailey, S.K., Bae, S., Singh, K.P., Devine, D.J., Dyess, D.L., Richards, W.O., et al. (2014). microRNA-29 negatively regulates EMT regulator N-myc interactor in breast cancer. *Mol. Cancer* 13, 200.
- Rust, M.B., Gurniak, C.B., Renner, M., Vara, H., Morando, L., Görlich, A., Sassoè-Pognetto, M., Banchaabouchi, M. Al, Giustetto, M., Triller, A., et al. (2010). Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *EMBO J.* 29, 1889–1902.
- Saarikangas, J., Hakanen, J., Mattila, P.K., Grumet, M., Salminen, M., and Lappalainen, P. (2008). ABBA regulates plasma-membrane and actin dynamics to promote radial glia extension. *J. Cell Sci.* 121, 1444–1454.
- Saarikangas, J., Zhao, H., Pykäläinen, A., Laurinmäki, P., Mattila, P.K., Kinnunen, P.K.J., Butcher, S.J., and Lappalainen, P. (2009). Molecular mechanisms of membrane deformation by I-BAR domain proteins. *Curr. Biol.* 19, 95–107.
- Saarikangas, J., Zhao, H., and Lappalainen, P. (2010). Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol. Rev.* 90, 259–289.
- Saarikangas, J., Mattila, P.K., Varjosalo, M., Bovellan, M., Hakanen, J., Calzada-Wack, J., Tost, M., Jennen, L., Rathkolb, B., Hans, W., et al. (2011a). Missing-in-metastasis MIM/MTSS1 promotes actin assembly at intercellular junctions and is required for integrity of kidney epithelia. *J. Cell Sci.* 124, 1245–1255.
- Saarikangas, J., Kourdougli, N., Senju, Y., Chazal, G., Segerstråle, M., Minkeviciene, R., Kuurne, J., Mattila, P.K., Garrett, L., Hölter, S.M., et al. (2015). MIM-Induced Membrane Bending Promotes Dendritic Spine Initiation. *Dev. Cell* 33, 644–659.
- Saghatelian, A., de Chevigny, A., Schachner, M., and Lledo, P.-M. (2004). Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain. *Nat. Neurosci.* 7, 347–356.
- Schaefer, A., O’Carroll, D., Tan, C.L., Hillman, D., Sugimori, M., Llinas, R., and Greengard, P. (2007). Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J. Exp. Med.* 204, 1553–1558.
- Schmahmann, J.D., and Caplan, D. (2006). Cognition, emotion and the cerebellum. *Brain* 129, 290–292.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199–208.

- Scita, G., Confalonieri, S., Lappalainen, P., and Suetsugu, S. (2008). IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. *Trends Cell Biol.* *18*, 52–60.
- Sekerková, G., Loomis, P.A., Changyaleket, B., Zheng, L., Eytan, R., Chen, B., Mugnaini, E., and Bartles, J.R. (2003). Novel espin actin-bundling proteins are localized to Purkinje cell dendritic spines and bind the Src homology 3 adapter protein insulin receptor substrate p53. *J. Neurosci.* *23*, 1310–1319.
- Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., and Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* *455*, 58–63.
- Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., and Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.* *5*, R13.
- Sethupathy, P., Megraw, M., and Hatzigeorgiou, A.G. (2006). A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. *Nat. Methods* *3*, 881–886.
- Shingara, J., Keiger, K., Shelton, J., Laosinchai-Wolf, W., Powers, P., Conrad, R., Brown, D., and Labourier, E. (2005). An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling. *RNA* *11*, 1461–1470.
- Sievers, J., Pehlemann, F.W., Gude, S., and Berry, M. (1994). A time course study of the alterations in the development of the hamster cerebellar cortex after destruction of the overlying meningeal cells with 6-hydroxydopamine on the day of birth. *J. Neurocytol.* *23*, 117–134.
- da Silva, J.S., and Dotti, C.G. (2002). Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 694–704.
- Smirnova, L., Gräfe, A., Seiler, A., Schumacher, S., Nitsch, R., and Wulczyn, F.G. (2005). Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur. J. Neurosci.* *21*, 1469–1477.
- Sood, P., Krek, A., Zavolan, M., Macino, G., and Rajewsky, N. (2006). Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2746–2751.
- Stark, A., Brennecke, J., Bushati, N., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* *123*, 1133–1146.

- Suetsugu, S., Murayama, K., Sakamoto, A., Hanawa-Suetsugu, K., Seto, A., Oikawa, T., Mishima, C., Shirouzu, M., Takenawa, T., and Yokoyama, S. (2006). The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation. *J. Biol. Chem.* *281*, 35347–35358.
- Sun, Y., Fang, R., Li, C., Li, L., Li, F., Ye, X., and Chen, H. (2010). Hsa-mir-182 suppresses lung tumorigenesis through down regulation of RGS17 expression in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *396*, 501–507.
- Sutton, K.G., McRory, J.E., Guthrie, H., Murphy, T.H., and Snutch, T.P. (1999). P/Q-type calcium channels mediate the activity-dependent feedback of syntaxin-1A. *Nature* *401*, 800–804.
- Tahirovic, S., Hellal, F., Neukirchen, D., Hindges, R., Garvalov, B.K., Flynn, K.C., Stradal, T.E., Chrostek-Grashoff, A., Brakebusch, C., and Bradke, F. (2010). Rac1 regulates neuronal polarization through the WAVE complex. *J. Neurosci.* *30*, 6930–6943.
- Tao, J., Wu, H., Lin, Q., Wei, W., Lu, X.-H., Cattle, J.P., Ao, Y., Olsen, R.W., Yang, X.W., Mody, I., et al. (2011). Deletion of astroglial Dicer causes non-cell-autonomous neuronal dysfunction and degeneration. *J. Neurosci.* *31*, 8306–8319.
- Tarasov, V., Jung, P., Verdoodt, B., Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Meister, G., and Hermeking, H. (2007). Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle* *6*, 1586–1593.
- Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A.M., Lim, B., and Rigoutsos, I. (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* *455*, 1124–1128.
- Thomas, M., Lieberman, J., and Lal, A. (2010). Desperately seeking microRNA targets. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 1169–1174.
- Threadgill, R., Bobb, K., and Ghosh, A. (1997). Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron* *19*, 625–624.
- Timmann, D., and Daum, I. (2010). How consistent are cognitive impairments in patients with cerebellar disorders? *Behav. Neurol.* *23*, 81–100.
- Tolias, K.F., Bikoff, J.B., Burette, A., Paradis, S., Harrar, D., Tavazoie, S., Weinberg, R.J., and Greenberg, M.E. (2005). The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron* *45*, 525–538.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 5116–5121.
- Umeshima, H., Hirano, T., and Kengaku, M. (2007). Microtubule-based nuclear movement occurs independently of centrosome positioning in migrating neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 16182–16187.

- Utikal, J., Gratchev, A., Muller-Molinet, I., Oerther, S., Kzhyshkowska, J., Arens, N., Grobholz, R., Kannookadan, S., and Goerdts, S. (2006). The expression of metastasis suppressor MIM/MTSS1 is regulated by DNA methylation. *Int. J. Cancer* *119*, 2287–2293.
- Uziel, T., Karginov, F. V., Xie, S., Parker, J.S., Wang, Y.-D., Gajjar, A., He, L., Ellison, D., Gilbertson, R.J., Hannon, G., et al. (2009). The miR-17~92 cluster collaborates with the Sonic Hedgehog pathway in medulloblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 2812–2817.
- Velleca, M.A., Wallace, M.C., and Merlie, J.P. (1994). A novel synapse-associated noncoding RNA. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 7095–7104.
- Vilz, T.O., Moepps, B., Engele, J., Molly, S., Littman, D.R., and Schilling, K. (2005). The SDF-1/CXCR4 pathway and the development of the cerebellar system. *Eur. J. Neurosci.* *22*, 1831–1839.
- Vo, N., Klein, M.E., Varlamova, O., Keller, D.M., Yamamoto, T., Goodman, R.H., and Impey, S. (2005). A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 16426–16431.
- Voogd, J., Gerrits, N.M., and Ruigrok, T.J. (1996). Organization of the vestibulocerebellum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *781*, 553–579.
- Wang, J., Li, J., Shen, J., Wang, C., Yang, L., and Zhang, X. (2012). MicroRNA-182 downregulates metastasis suppressor 1 and contributes to metastasis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* *12*, 227.
- Wang, V.Y., Rose, M.F., and Zoghbi, H.Y. (2005). Math1 expression redefines the rhombic lip derivatives and reveals novel lineages within the brainstem and cerebellum. *Neuron* *48*, 31–43.
- Wang, Y., Liu, J., Smith, E., Zhou, K., Liao, J., Yang, G.-Y., Tan, M., and Zhan, X. (2007). Downregulation of missing in metastasis gene (MIM) is associated with the progression of bladder transitional carcinomas. *Cancer Invest.* *25*, 79–86.
- Watanabe, H., and Murakami, F. (2009). Real time analysis of pontine neurons during initial stages of nucleogenesis. *Neurosci. Res.* *64*, 20–29.
- Wayman, G.A., Davare, M., Ando, H., Fortin, D., Varlamova, O., Cheng, H.-Y.M., Marks, D., Obrietan, K., Soderling, T.R., Goodman, R.H., et al. (2008). An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 9093–9098.
- Weeraratne, S.D., Amani, V., Teider, N., Pierre-Francois, J., Winter, D., Kye, M.J., Sengupta, S., Archer, T., Remke, M., Bai, A.H.C., et al. (2012). Pleiotropic effects of miR-183~96~182 converge to regulate cell survival, proliferation and migration in medulloblastoma. *Acta Neuropathol.* *123*, 539–552.



- Witte, H., and Bradke, F. (2008). The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Curr. Opin. Neurobiol.* *18*, 479–487.
- Woodings, J.A., Sharp, S.J., and Machesky, L.M. (2003). MIM-B, a putative metastasis suppressor protein, binds to actin and to protein tyrosine phosphatase delta. *Biochem. J.* *371*, 463–471.
- Wu, J.-Q., Sirotkin, V., Kovar, D.R., Lord, M., Beltzner, C.C., Kuhn, J.R., and Pollard, T.D. (2006). Assembly of the cytokinetic contractile ring from a broad band of nodes in fission yeast. *J. Cell Biol.* *174*, 391–402.
- Xie, J.W., and Haslam, S.Z. (2008). Extracellular matrix, Rac1 signaling, and estrogen-induced proliferation in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* *110*, 257–268.
- Yamagishi, A., Masuda, M., Ohki, T., Onishi, H., and Mochizuki, N. (2004). A novel actin bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missing in metastasis protein. *J. Biol. Chem.* *279*, 14929–14936.
- Yekta, S., Shih, I.-H., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* *304*, 594–596.
- Yongchun, Z., Linwei, T., Xicai, W., Lianhua, Y., Guangqiang, Z., Ming, Y., Guanjian, L., Yujie, L., and Yunchao, H. (2014). MicroRNA-195 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting MYB. *Cancer Lett.* *347*, 65–74.
- Yu, D., Zhan, X.H., Niu, S., Mikhailenko, I., Strickland, D.K., Zhu, J., Cao, M., and Zhan, X. (2011). Murine missing in metastasis (MIM) mediates cell polarity and regulates the motility response to growth factors. *PLoS One* *6*, e20845.
- De Zeeuw, C.I., and Yeo, C.H. (2005). Time and tide in cerebellar memory formation. *Curr. Opin. Neurobiol.* *15*, 667–674.
- Zeng, X.-C., Luo, X., Wang, S.-X., and Zhan, X. (2013). Fibronectin-mediated cell spreading requires ABBA-Rac1 signaling. *J. Cell. Biochem.* *114*, 773–781.
- Zhan, T., Cao, C., Li, L., Gu, N., Civin, C.I., and Zhan, X. (2016). MIM regulates the trafficking of bone marrow cells via modulating surface expression of CXCR4. *Leukemia* *30*, 1327–1334.
- Zhang, X., Graves, P.R., and Zeng, Y. (2009). Stable Argonaute2 overexpression differentially regulates microRNA production. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* *1789*, 153–159.
- Zhou, P., Porcionatto, M., Pilapil, M., Chen, Y., Choi, Y., Tolia, K.F., Bikoff, J.B., Hong, E.J., Greenberg, M.E., and Segal, R.A. (2007). Polarized Signaling Endosomes Coordinate BDNF-Induced Chemotaxis of Cerebellar Precursors. *Neuron* *55*, 53–68.
- Zhou, W., Li, X., Liu, F., Xiao, Z., He, M., Shen, S., and Liu, S. (2012). MiR-135a promotes growth and invasion of colorectal cancer via metastasis suppressor 1 in vitro. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. *44*, 838–846.

Zhou, Y., Tian, L., Wang, X., Ye, L., Zhao, G., Yu, M., Li, G., Lei, Y., and Huang, Y. (2014). MicroRNA-195 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting MYB. *Cancer Lett.*

Zhu, Y., Yu, T., and Rao, Y. (2004). Temporal regulation of cerebellar EGL migration through a switch in cellular responsiveness to the meninges. *Dev. Biol.* 267, 153–164.

Zylbersztein, K., Petkovic, M., Burgo, A., Deck, M., Garel, S., Marcos, S., Bloch-Gallego, E., Nothias, F., Serini, G., Bagnard, D., et al. (2012). The vesicular SNARE Synaptobrevin is required for Semaphorin 3A axonal repulsion. *J. Cell Biol.* 196, 37–46.

# 8 ANHANG

---

## 8.1 SEQUENZEN

3'UTR Sequenz von *Mtss1* (Ensembl Database)

>ENSMUSG00000022353 | ENSMUST00000080371

GTTCTCCTGGTCCCAGGAGATGCTGCCAGCGCGAACGAACTCTTAATTAATAAAGCCT

*miR-103*

AATTTGCTTGATCCATTCCAGTCTATAATCAAGCAAACGATTTTGTAGGCAATTCGGAA

*miR-1/-206*

TCCTGCTCTTTCAAAGTATTCGACATCTTTAGATAAGAATTAAGCAACATATGTAAT

TGACATAACCTTGATCTTTAATTTGTAATATTGACGGTTTCTTCTGCATACTTTAAT

CTTAGTTCCCTTTGATTTTCTGAAGGTGCCAAATTCCATTAACCTTTTTACAGGTC

*miR-96/-182*

TTTGTAATAATTTAAAGCATAAAGGGGAGGGGGTGGGTTGGGATGGGAACCTTGGAGT

AATTCACAAGAGGATTACATACTTAGTTGTTTTCTTTTTTTTTCTCCCCTCAGCCT

TTGTAGATGCATTGTAGTTGTCTAGTTTAGAAGCAAATCAAGTATTTAATGGATAAA

CACAACGGATAAGGGGTGAAACCTCACTCACATATACTGTGTTCTGGAGGAGAAACGCA

GGAGTAACAGTTGAGCAGTACGCAGAGAAGGAAACCGGACATGGTGGACTGTGTGGGGAT

TGGGGGAGGGCTGGGGGAGGGGCACACTGTCAACATAGCCAATCCTGTTACATTTAAGA

GTAGCCTGTAGGTTGAATTTCCAGTAGCTTCATGGTTAACGCATCTGAATAAGCCATAC

*miR-135ab*

TAGATTGCAGTGTGTTTCTGTAAGTTTTAAGGACTTCCTTCTCCCGCATTCTC

TTGACCGCACACAGCATCCACACCCGGTCTGCGCATGCTGCTGCCATGGGTAGACAT

*miR-103*

AGTCCCTTCTTACTTTCTCGTCTCTTATACTCACTTCCACTGAATCCAAATACATCAA

AGGGGTAAGGCAATTCAGAAAACGTGCAAACATTTAAAATGATAGCAGGGAATCTTAG

ATATAGAAAATGCCTTTTACTTAACTGTGCCAGCAGGCTGGGTGCGTTGAAAAGCCCAG  
ATATTTTGAAGAAAAAATTCAAACAGATTTATCAAGGGTAACCAGCTTGGAGTCTA  
GCAATTTTGCCAATGTGCTTACCAATTTGGGGGCTTGTTCCTTCCCTTCTTACATAA

*miR-182*

GGACAGTTGATTGGCTTCTAAACACCGGAGCAAAGTGGATTTATTTACTGTCAACTGGGA  
GTCTGACTTCAATTCAGGCAATGTTTTTCTCTTTTTCTTTTTCTTTAAAAGTGAAT  
TTGTCCTTTCTTTCTTAAGTGAAGTTAAATTTGTTAAAATGCCCATCCCTAAAGTCAA  
CAGAGAACTGTAGATTTCAAGAGCTCACATTTAAAGACAGCTGTTCAAAGGGCAAGGCC  
TCGGCAGCACAGCAGCTGACAGTACACGCCTGACATTTTGGGCAGGAGACTTGGTGGGTC  
CCATGTGCTCCGCAGATCTCCCGTTGGCTCTAGCCTCTGATGACGTAATCTTCTACTTTA  
ACACCTACCACCTCGGATGTGAGAGTACCGTTCCTCTAGTCATTGCTCTATAGATTAAC  
ATTTAACTGCTGTGACTGATTGCTCAAAGGACATTTATGTTATGGCTTTAAAGCAGA  
GGCATGATTATTAGAAATGACTTAAGCTCTTTCTTTGAAAAACAAGCTCCTTTTGCAGA

*miR-200b*

CGAAGCAAACAGTAGTGCCTGTGGTTTAGCCCGCCAATCTTGACGACTCAAAGTAGCTGA  
TGCATTGTGCATATGATGCTTGAGATGGTTTTGCAGATGCAGACATCGCTGCAAGGTCAT  
TCTAATAGAGACAAGCGGTATTTTAAACCTTTGAAAGGAATGGATGTAAGTGTACGTTGG  
TACAGCTTTTCACTTGTTTAGTTTTTAAACGTTAGTATAATCTGAATAAAGTTAATATAA  
ACTGTTGCCAAATTCAATGTAGAAAAGAATGTGACAAAACCTTGGGTAGTTCTGTTTGTG

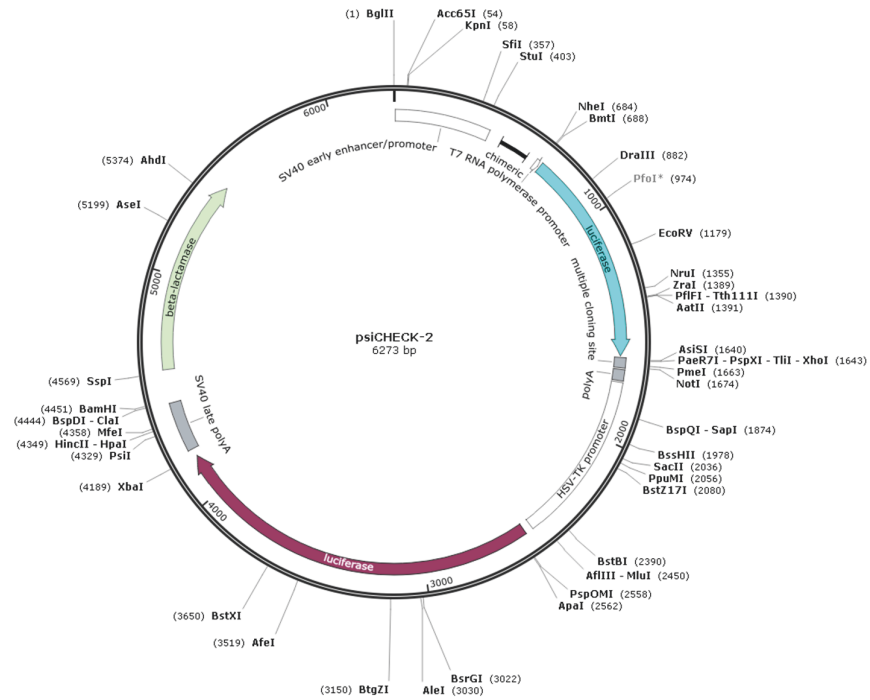
*miR-96/-182*

*miR-23ab*

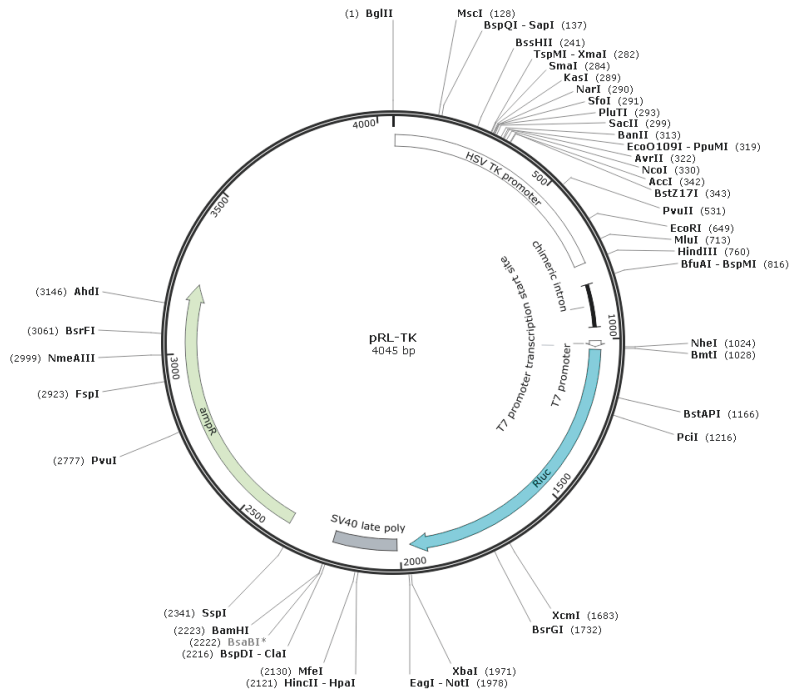
TTTTTGCATATTGAAAAGCAGTGTACAGCTGAAAATGAACCCTTTCTAAAGGTAAATT  
ATTGTGATTTAGTTGCTAGTTTGTATTGAGAGTTGACCTCTCCCTGTGCAGTTTTTGTTT  
GGAACCTGTATAGATAACAGCGTGAATGTGTCCCCTTCTACACTGTAACAGTTGCTTCT  
GCCTACCTTATAAATAAAGAATCACT

Sequenz des 3'UTRs von *Mtss1*. Dargestellt sind die komplementäre Bindestellen der Seed-Sequenz aller hier im Luciferase Reporterassay untersuchten miRNAs. Die Richtung ist von 5' nach 3'.

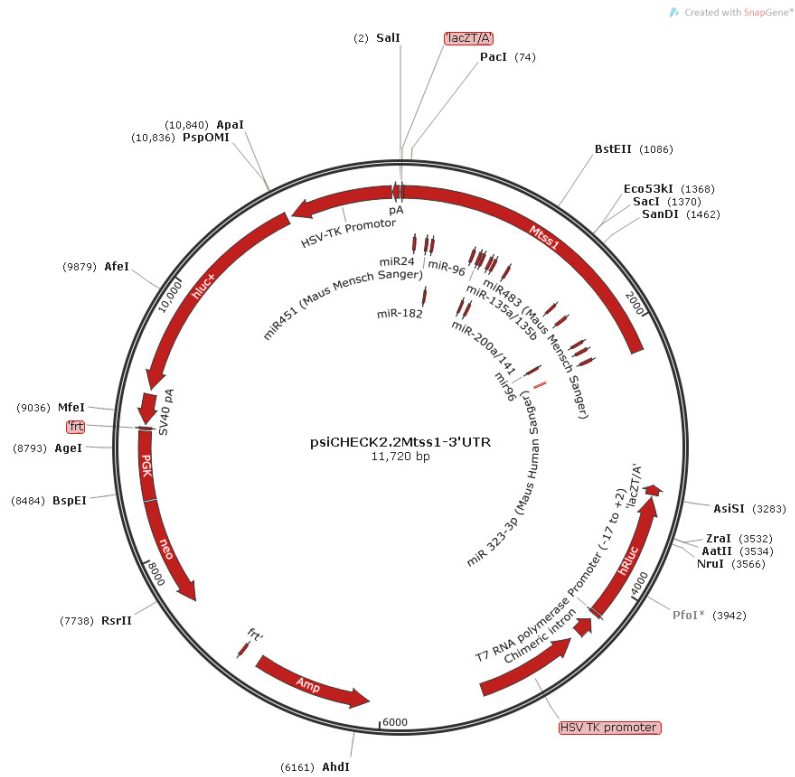
## 8.2 PLASMIDE



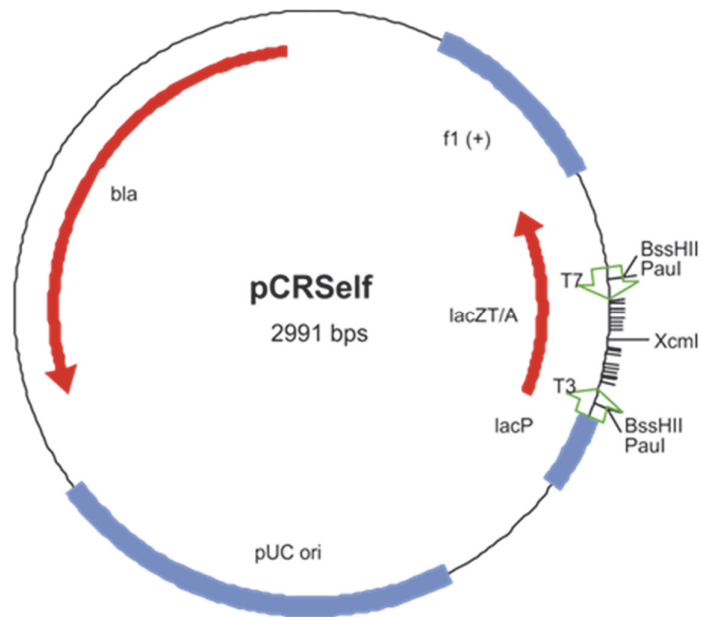
**Abb. A1 psiCHECK-2:** Dieser Vektor enthält zwei Luciferasen (Firefly und Renilla Luciferase) und erlaubt die Messung einer mi-/siRNA induzierten Repression mit gleichzeitiger Normalisierung im selben Konstrukt.



**Abb.A2: pRL-TK Vektor (Promega).** Verwendet zur Generierung von Überexpressionsklonen und stabiler Selektion in Zellkultur.



**Abb. A3: psiCHECK2.2Mtss1-3'UTR** Verwendet zur Messung der miRNA induzierten Luciferase Expression durch den 3'UTR von *Mtss1* und stabilen Selektion in Zellkultur.



**Abb. A4 pCRSelf Vektor.** Dieser Klonierungsvektor zur Insertion von PCR Fragmenten stellt ein Derivat des pBluescript II SK (+) Vektors (Stratagene) dar, der zur T/A Klonierung modifiziert wurde (Borovkov and Rivkin, 1997).

### 8.3 ABBILDUNGEN

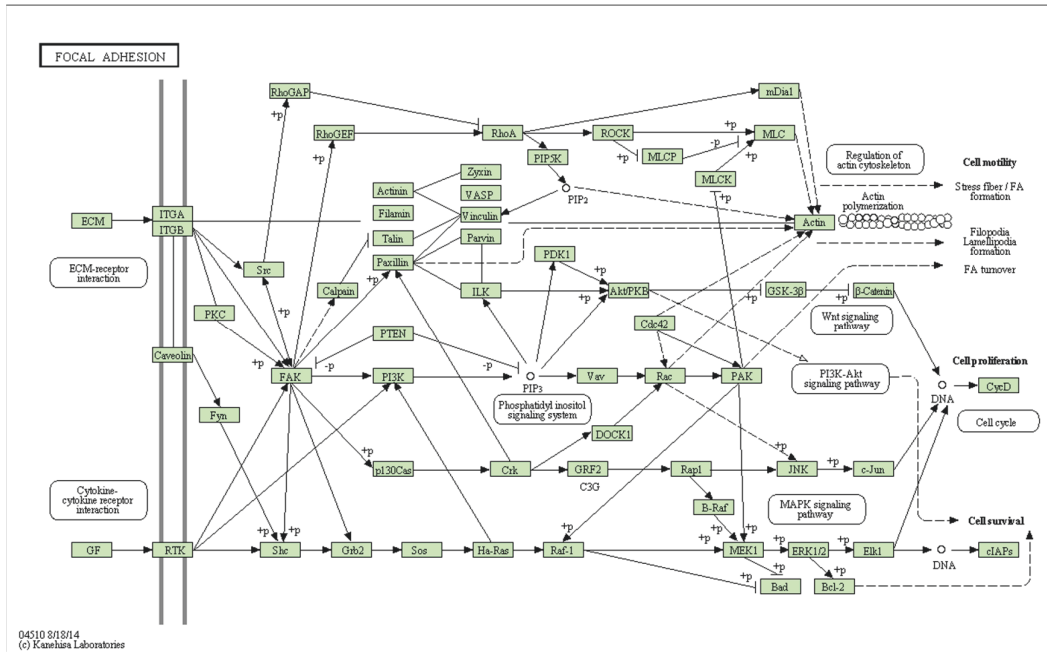


Abb. A5: Schematische Darstellung des KEGG-Signalwegs – Fokaladhäsion

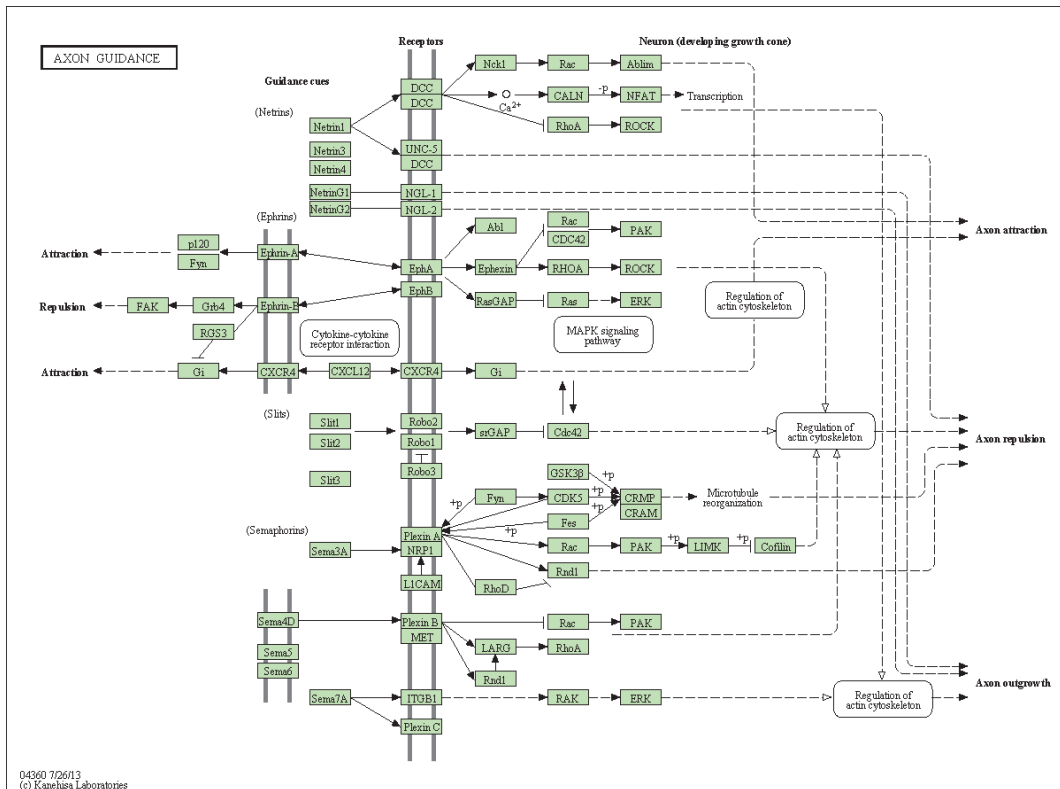
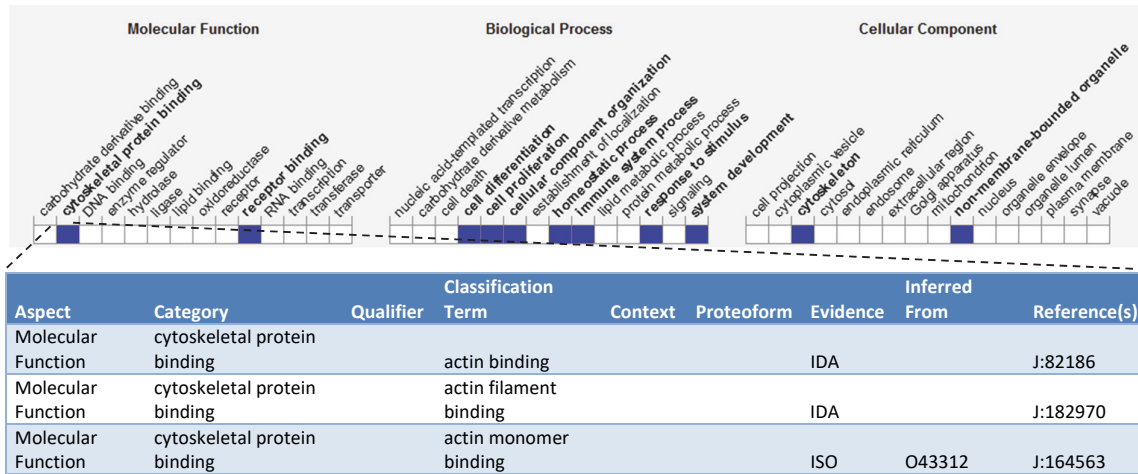


Abb. A6: Schematische Darstellung des KEGG Signalwegs – Axonpfadfindung

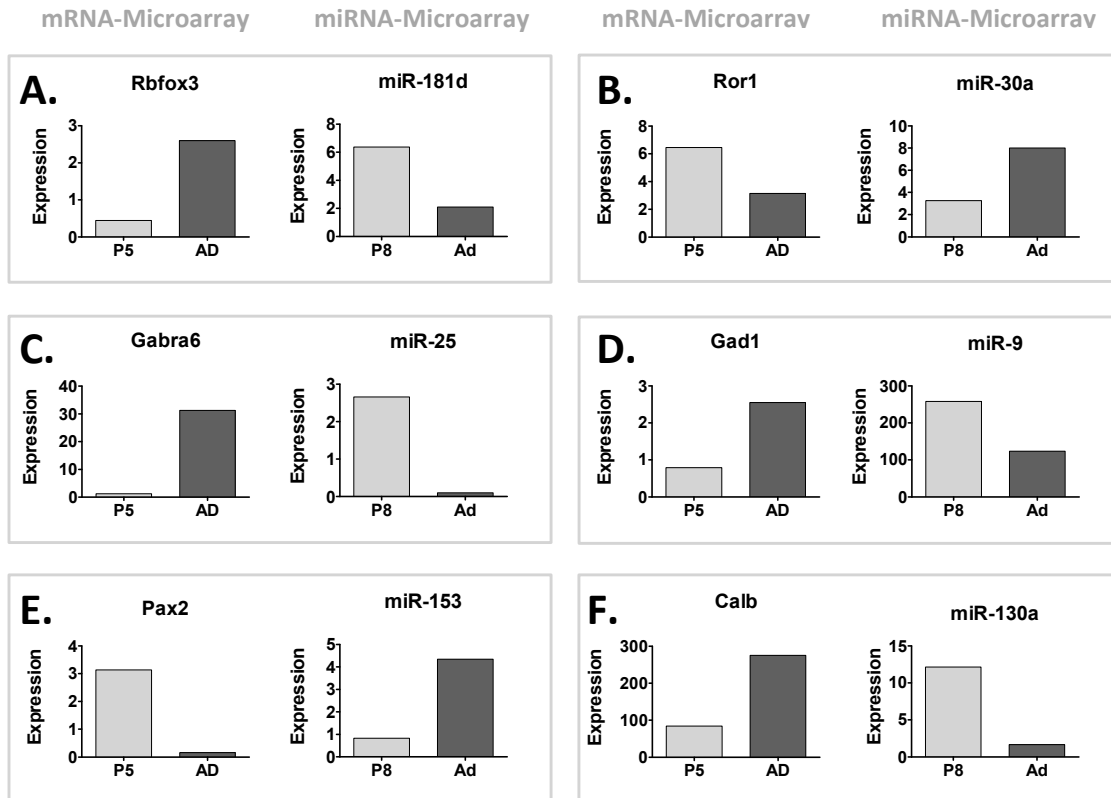


**Abb. A7:** GO-Klassifikation für *Mtss1* (MGI). Ausgewähltes Beispiel für die Funktion „cytoskelettale Proteinbindung“. Abk: IDA - Inferred from direct assay; ISO - Inferred from sequence orthology.



**Abb. A8:** Vergleichende Expression (ISH) der IMD-Proteine im Cerebellum adulter Mäuse (aus Allan Brain Atlas).

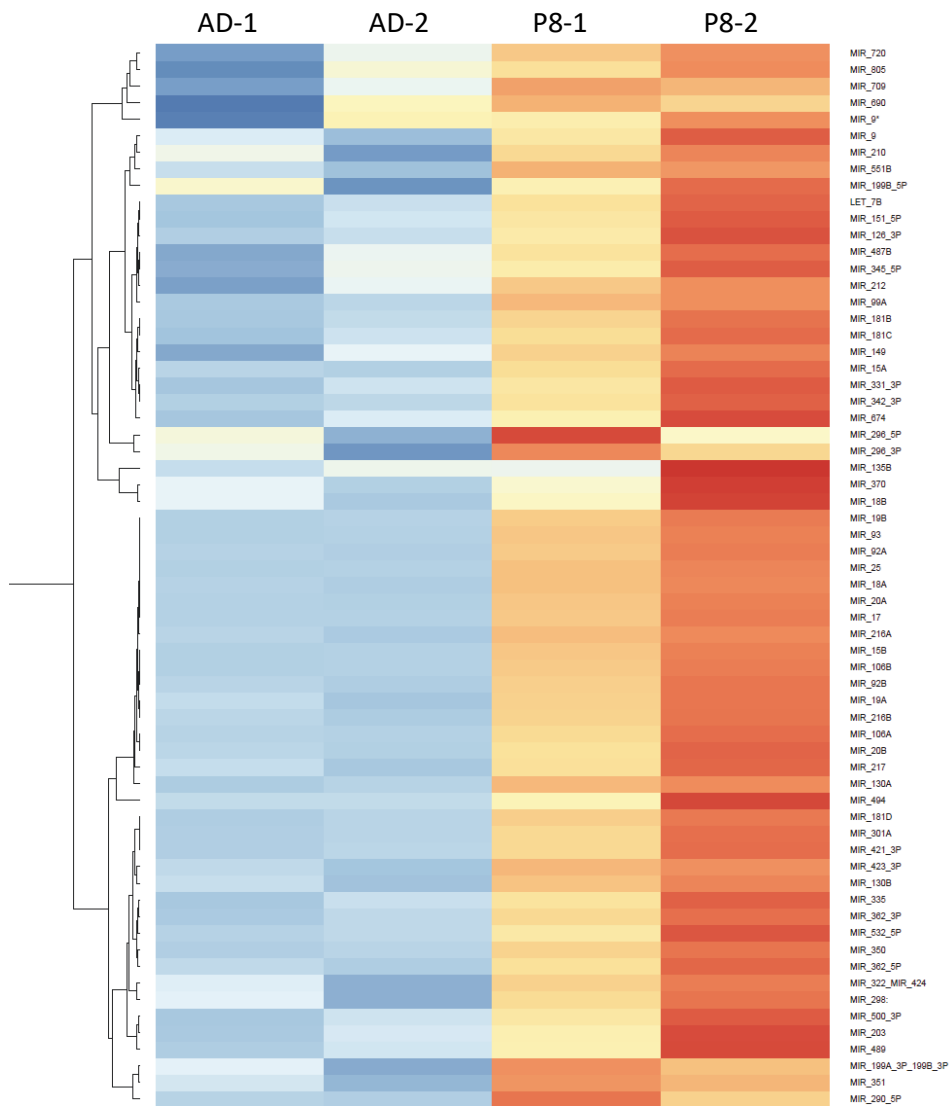
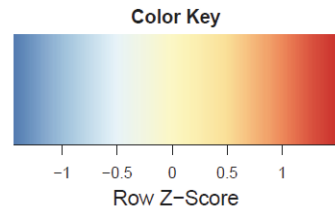


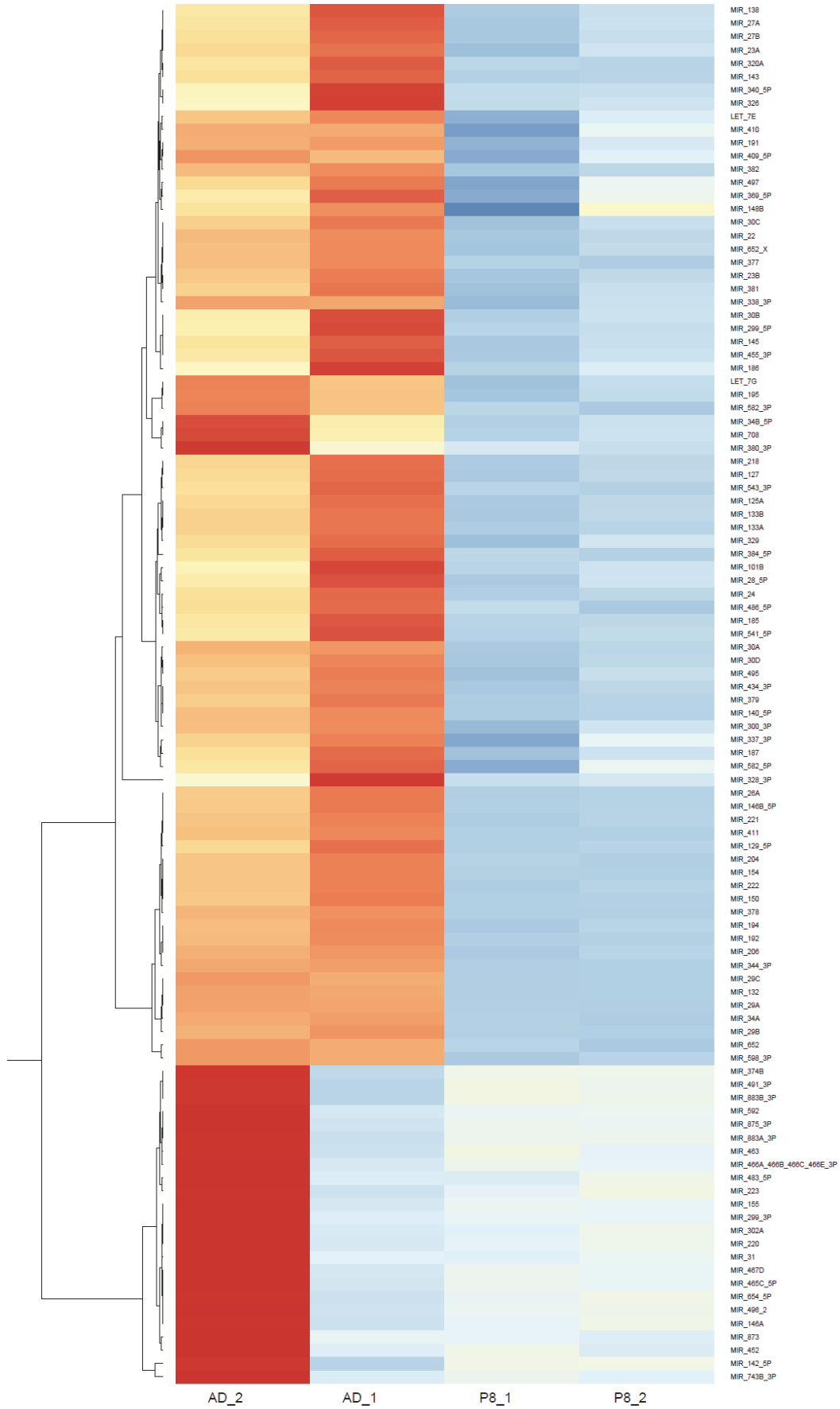


**Abb. A9: Expressionsprofil ausgewählter cerebellärer Gene mit reziprok regulierten miRNAs**

Vergleichende Expression (P5/Ad; Mittelwerte) hier gewählter differentiell regulierter Transkripte (Microarray Analyse aus Pal et al., 2011) zu mutmaßlich regulierenden miRNAs (TargetScan) mit umgekehrtem Expressionsprofil (P8/Ad - miRxplore; Miltenyi Biotec) dargestellt. Für alle hier gezeigten Transkripte (A-F) konnten jeweils putative miRNAs mit entgegengesetztem Expressionsprofil identifiziert werden. Vergleiche mit Tabelle A4 (Anhang).

Die hier verwendeten Expressionsdaten der ausgewählten Transkripte stammen aus der Microarray Analyse von Pal et al., (2011), wobei eine Transkriptom Analyse für verschiedene postnatale Entwicklungsstadien (P0, P5, P15 und AD) des Cerebellums der Maus durchgeführt wurde. Diese umfasste 61.525 Transkripte, inklusive alternativer Spleißvarianten. Interessanterweise konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass jedes Gen im Cerebellum im Durchschnitt ca. 2,5 Transkriptvarianten besitzt, welche zudem differentiell, während der postnatalen Entwicklung des Cerebellums exprimiert werden. Aus dem Datensatz wurden für diese Arbeit Expressionsdaten mehrerer cerebellärer Gene zwischen P5 und Adult verglichen, welche eine differentielle Expression zeigten. Die Phase P5 wurde gewählt, da sie den näherungsweise günstigsten Messpunkt für einen Vergleich zur Phase P8, der von uns durchgeführtem Microarray Analyse darstellte. Anschließend wurde mittels TargetScan für jedes dieser Transkripte miRNAs identifiziert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit an deren 3'UTR binden. Die vorhandenen Expressiondaten unserer Microarray Analyse (MirXplore P8/AD; Miltenyi Biotek) erlaubte es, aus den hier identifizierten miRNAs, nach solchen mit einem gegenläufigem Expressionsprofil zu ihrem Transkript zu suchen.





## 8.4 TABELLEN

**Tabelle A1 | Vergleich verwendeter Algorithmen**

Algorithmus	Untersuchte Regionen	Spezies Konservierung	Spezies	Kurzbeschreibung der Vorhersage Methode	Implementation	Download/web server	Referenz
<b>miRanda</b>	3'-UTR	Ja	Mensch, Maus, Ratte, Fliege und Wurm	Vorhersage basiert auf Regeln:(i) Sequenz Komplementarität, (ii) Bindungsenergie und (iii) evolutionäre Konservierung.	C/open source	<a href="http://www.microrna.org">http://www.microrna.org</a>	Enright et al., 2004
<b>mirSVR</b>	keine Einschränkung	Ja	Mensch, Maus, Ratte, Fliege und Wurm	Treffer und Rangfolge der von miRanda-vorhergesagten miRNA-Bindestellen werden mit einem <i>supervised vector regression (SVR) model</i> bestimmt, welches Eigenschaften wie Zugänglichkeit der Sekundärstrukturen der Bindestelle und Konservierung berücksichtigt.	C/open source	<a href="http://www.microrna.org">http://www.microrna.org</a>	Betel et al., 2005
<b>PicTar</b>	3'-UTR	Ja	Vertebraten, Fliege und Wurm	Filter werden an thermodynamischer Stabilität angepasst, anschließend werden die Treffer und die Rangfolge der vorhergesagten Ziele durch ein <i>hidden Markov model</i> der Maximalwahrscheinlichkeit angepasst.	Web-gesteuerte Applikation	<a href="http://pictar.mdc-berlin.de/">http://pictar.mdc-berlin.de/</a>	Krek et al., 2010
<b>TargetScan</b>	8mer und 7mer sites, und ORFs	Ja	Mensch, Maus, Ratte, Hund und Huhn	Sagt Zielgene vorher, indem nach der Präsenz konservierter 8mer und 7mer Stellen gesucht wird. Vorhersagen werden nach unterschiedlichen Kombinationen an Scores, welche auf Anzahl an Bindestellen, Bindestelle und Kontext basieren.	PerlScript/open source	<a href="http://www.targetscan.org/">http://www.targetscan.org/</a>	Lewis et al., 2003

**Tabelle A2 | TargetScan: Bindestellen nach Position im 3'UTR von *Mtss1* (Maus)**

MicroRNA	Position of MTSS1 3' UTR	seed match	site-type contribution	3' pairing contribution	local AU contribution	position contribution	TA contribution	SPS contribution	context + score	context+ score percentile	conserved branch length	PCT
mmu-miR-1a	75-81	7mer-1A	-0.074	-0.006	-0.019	-0.042	0.006	0.000	-0.14	74	1.795	<b>0.47</b>
mmu-miR-206	75-81	7mer-1A	-0.074	-0.006	-0.019	-0.042	0.006	0.000	-0.14	74	1.795	<b>0.47</b>
mmu-miR-96	269-276	8mer	-0.247	0.003	-0.021	-0.046	0.009	-0.060	-0.36	96	2.092	<b>0.89</b>
mmu-miR-182	270-276	7mer-1A	-0.074	-0.013	-0.019	-0.021	0.010	-0.027	-0.14	70	2.092	<b>0.74</b>
mmu-miR-686	447-454	8mer	-0.247	0.003	-0.086	-0.001	0.034	0.022	-0.28	97	1.096	<b>N/A</b>
mmu-miR-135a	709-716	8mer	-0.247	-0.018	-0.028	0.065	-0.004	-0.001	-0.23	90	1.856	<b>0.81</b>
mmu-miR-135b	709-716	8mer	-0.247	-0.018	-0.028	0.065	-0.004	-0.001	-0.23	90	1.856	<b>0.81</b>
mmu-miR-200a	725-731	7mer-m8	-0.120	-0.007	-0.024	0.041	0.015	0.020	-0.08	56	1.573	<b>0.26</b>
mmu-miR-141	725-731	7mer-m8	-0.120	-0.007	-0.024	0.041	0.015	0.020	-0.08	55	1.573	<b>0.26</b>
mmu-miR-370	989-995	7mer-m8	-0.120	0.012	0.061	0.078	0.020	-0.064	> -0.02	10	1.523	<b>N/A</b>
mmu-miR-742	1603-1610	8mer	-0.247	0.013	-0.061	0.033	0.029	0.005	-0.23	91	1.078	<b>N/A</b>
mmu-miR-28	1663-1669	7mer-m8	-0.120	0.003	-0.064	0.012	-0.003	-0.049	-0.22	86	1.542	<b>N/A</b>
mmu-miR-708	1663-1669	7mer-m8	-0.120	0.003	-0.064	0.012	-0.003	-0.049	-0.22	86	1.542	<b>N/A</b>
mmu-miR-320	1860-1866	7mer-m8	-0.120	0.030	-0.053	-0.016	0.019	0.023	-0.12	79	1.340	<b>N/A</b>
mmu-miR-871-5p	1898-1905	8mer	-0.247	0.013	-0.104	-0.042	0.023	0.071	-0.29	97	1.016	<b>N/A</b>
mmu-miR-182	1922-1929	8mer	-0.247	0.013	-0.031	-0.048	0.017	0.004	-0.29	93	1.604	<b>0.68</b>
mmu-miR-96	1923-1929	7mer-1A	-0.074	-0.002	-0.025	-0.021	0.005	-0.027	-0.14	68	1.604	<b>0.66</b>
mmu-miR-23b	1944-1950	7mer-m8	-0.120	0.003	-0.014	-0.028	0.024	0.049	-0.09	66	1.491	<b>0.11</b>
mmu-miR-23a	1944-1950	7mer-m8	-0.120	0.003	-0.014	-0.028	0.024	0.049	-0.09	66	1.491	<b>0.11</b>
mmu-miR-338-5p	1985-1992	8mer	-0.247	0.045	0.022	-0.064	0.031	0.147	-0.07	72	1.574	<b>N/A</b>
mmu-miR-1897-3p	2067-2073	7mer-1A	-0.074	0.008	0.016	-0.037	-0.033	0.001	-0.12	62	1.696	<b>N/A</b>

Vorhersage aus TargetScan Human (Version6.1). MiRNAs die umfassend unter 28 Vertebraten konserviert sind sind hier dargestellt. Die miRNAs sind nach Position der Bindestellen aufgeführt und die einzelnen Faktoren die zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit einer Bindung beitragen. Die berechneten Wahrscheinlichkeiten sind hier gesondert für jede einzelne Bindestelle dargestellt

**Tabelle A3 | Vergleichende Expression putativer miRNAs**

miRNA	P8-1	P8-2	AD1	AD2	Regulation
MIR-206	0,0407	0,0524	0,2709	0,2540	<b>5,629</b>
MIR-195	3,4698	4,0635	8,2088	9,1672	<b>2,300</b>
MIR-23B	0,5410	0,6045	1,2685	1,1210	<b>2,078</b>
MIR-497	1,2956	1,7373	2,6049	2,2935	<b>1,609</b>
MIR-23A	0,7987	0,8951	1,3899	1,2316	<b>1,542</b>
MIR-182	0,0099	0,0108	0,0110	0,0169	<b>1,287</b>
MIR-200A	0,0425	0,0406	0,0348	0,0880	<b>1,202</b>
MIR-200B	0,0200	0,0188	0,0162	0,0363	<b>1,159</b>
MIR-96	0,0290	0,0298	0,0241	0,0427	<b>1,046</b>
MIR-103	0,9255	1,2282	1,0401	0,9218	<b>1,102</b>
MIR-107	0,9203	1,1337	0,9809	0,8345	<b>1,139</b>
MIR-141	0,6331	0,4925	0,3640	0,6569	<b>1,201</b>
MIR-16	15,6942	18,0879	12,7662	14,0053	<b>1,265</b>
MIR-1	0,9461	0,7120	0,5097	N/A	<b>1,627</b>
MIR-135B	1,2595	2,7191	1,2628	0,9832	<b>1,799</b>
MIR-15A	9,7100	11,9974	4,8499	5,0114	<b>2,202</b>
MIR-322	0,8894	1,0925	0,1465	0,3886	<b>4,657</b>
MIR-15B	3,4045	4,1887	0,2967	0,2821	<b>13,127</b>

Expressionwerte (Microarray) der miRNAs, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit am 3'UTR von *Mtss1* binden können. Die Expressionsdaten sind in fmol angegeben. Die differentielle Expression ist als Mittelwert angegeben. In rot dargestellt sind hochregulierte- bzw. in blau herunterregulierte miRNAs (Vergleich P8 zu adult). Die beiden waagerechten schwarzen Linien begrenzen mutmaßlich geringer differentiell expriemierte miRNAs (<1,5-fach).

**Tabelle A4| Mögliche differentielle miRNA-Regulation wichtiger Gene des Cerebellums.**

Name	mRNA	Expression		miRNA	Expression[fmol]	
		P5	Ad		P8	Ad
Calb1	ENSMUST00000029876	84,01	274,76	130a	12,14	1,66
Gabra6	OTTMUST00000014423	1,2	31,29	203	0,13	0,05
				181bcd	6,24*	2,3*
				25	2,66	0,1
Gad1	OTTMUST00000083435	0,79	2,55	9	258,12	123,5
				24	0,76	1,99
Pax2	NM_003989	3,14	0,16	153	0,83	4,35
				218	4,12	18,74
				204	0,47	4,23
Rbfox3	NM_001039167	0	34,32	181d	6,37	2,1
Rora	ENSMUST00000039630	6,5	3,1	29abc	0,48*	16*
				30a	3,27	8,01
				30b	19,16	37,73
				30c	3,45	6,46
				30d	2,46	6,21
				384-5P	0,14	0,71
				101b	2,10	5,3
				23b	0,57	1,19
				206	0,05	0,26

Ausgewählte Gene der Kleinhirnentwicklung mit differentieller Expression. Eine gegenläufige Expression von miRNA zum Transkript ist ein guter Hinweis, um eine entwicklungsabhängige Regulation durch miRNAs annehmen zu können. Hier sind Expressionsdaten der mRNAs (Pal et al., 2011) mit miRNA Daten aus dem hier analysierten Microarray (miRXplore; Miltey Biotec) gegenübergestellt und solche miRNAs aufgeführt, die gegenläufig exprimiert werden. Mögliche miRNA-3'UTR Interaktion wurden mittels TargetScan analysiert. Die hier aufgeführten Gene sind näher in Tabelle A4 im Anhang beschrieben. \*Mittelwerte mehrerer miRNAs.

**Tabelle A5 | Wichtige Gene der Kleinhirnentwicklung**

Symbol	Name	Quelle	Ensembl:	Andere Namen:	Expression Cerebellum
<b>Rbfox3</b>	RNA binding protein, fox-1 homolog (C. elegans)	MGI:106368	ENSMUSG00000025576	NeuN; Fox-3; Hrnbp3; Neuna60; D11Bwg0517e; RP23-159O6.5	postmit. GC
<b>Gabra6</b>	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 6	MGI:95618	ENSMUSG00000020428	alpha6; Gabra-6	postmit. GC
<b>Pax2</b>	paired box gene 2	MGI:97486	ENSMUSG00000004231	Opdc; Pax-2	inhibitorische Interneurone
<b>Rora</b>	RAR-related orphan receptor alpha	MGI:104661	ENSMUSG00000032238	sg; ROR1; ROR2; ROR3; Nr1f1; nmf267; tmgc26; staggerer; 9530021D13Rik	PC, (b/s) erhalt
<b>Pvalb</b>	parvalbumin	MGI:97821	ENSMUSG00000005716	PV; Pva; Parv	PC, (b/s) erhalt
<b>Pcp2</b>	Purkinje cell protein 2 (L7)	MGI:97508	ENSMUSG00000004630	L7; Pcp-2	reife PC
<b>Calb1</b>	calbindin 1	MGI:88248	ENSMUSG00000028222	CB; Calb; Calb-1; Brain-2	reife PC; früh
<b>Gad1</b>	glutamate decarboxylase 1	MGI:95632	ENSMUSG00000070880	EP10; GAD25; GAD44; GAD67; Gad-1	Alle GABA (+) Zellen

Tabelle A5 gibt eine kurze Beschreibung der in Kapitel 1.1.1 gewählten Gene der Kleinhirnentwicklung. Darüberhinaus ist die Expression im Cerebellum spezifiziert.

**Gad1:** Der Neurotransmitter GABA wird durch das Enzym Glutamat Decarboxylase (GAD) synthetisiert, welches durch die Gene *Gad1* und *Gad2*, welche auch im Cerebellum gebildet werden, kodiert.

**Gabra6** steht für „gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 6“ und kodiert für ein Gen welches am Aufbau von ligandengesteuerten Calciumkanälen in neuronalen Zellen fungiert und teilweise (CaV2.1) sehr stark im Cerebellum exprimiert werden. Ca<sub>v</sub>2.1-Kanäle sind für 85–95% und 50% der Gesamt Ca<sup>++</sup>-Konzentration in Purkinje-Zellen und in cerebellären Körnerzellen (CGCs) verantwortlich (Mintz et al., 1992; Randall and Tsien, 1995). Des Weiteren sind sie an der Steuerung von Neurotransmitterfreisetzung und Genexpression beteiligt (Sutton et al., 1999).

**Pax2:** Der Transkriptionsfaktor wird in allen cerebellären Interneuronen wie Golgi-, Stern-, Korbzellen und in Interneuronen der tiefen Kernen (DCN) exprimiert.

**Rbfox:** Die RNA bindenden Proteine der *Rbfox*-Familie regulieren das alternative Splicing wichtiger neuronaler Transkripte. *Rbfox3* wird ausschließlich in Neuronen gebildet (Kim et al., 2009a) und dient als Marker für postmitotische Körnerzellen.

**RORα** (retinoic acid-related orphan receptor α) ist für die frühe Purkinje Zelle (PC) Reifung notwendig und wird auch fortwährend im Adultstadium exprimiert, wo er für die Aufrechterhaltung der Purkinje-Zell Dendriten verantwortlich ist (Chen et al., 2013).

**Calbindin** wird in Purkinje Zellen des Cerebellums als Calcium-Puffer Protein (Calbindin-D28K) exprimiert.

**Tabelle A6 | Analyse der Signalwege mittels DIANA-miR-Path**

<b>KEGG Pathway</b>	<b>Pathway ID</b>	<b># of Genes (Union)</b>	<b>-ln(p-value) (Union)</b>
Renal cell carcinoma	mmu05211	24	27,03
Glioma	mmu05214	22	25,58
Focal adhesion	mmu04510	44	23,44
Axon guidance	mmu04360	33	22,39
Chronic myeloid leukemia	mmu05220	23	20,91
ErbB signaling pathway	mmu04012	24	18,1
Adherens junction	mmu04520	21	17,3
Long-term potentiation	mmu04720	19	16,31
MAPK signaling pathway	mmu04010	48	15,95
Regulation of actin cytoskeleton	mmu04810	41	15,11
Non-small cell lung cancer	mmu05223	16	14,63
Prostate cancer	mmu05215	22	13,64
GnRH signaling pathway	mmu04912	23	13,34
Gap junction	mmu04540	22	13,3
Colorectal cancer	mmu05210	20	11,23
SNARE interactions (vesicular transport)	mmu04130	11	10,93
Long-term depression	mmu04730	18	10,3
Dorso-ventral axis formation	mmu04320	9	9,94
Pancreatic cancer	mmu05212	17	9,42
Fc epsilon RI signaling pathway	mmu04664	17	8,39
Melanoma	mmu05218	16	8,29
Melanogenesis	mmu04916	20	8,16
Acute myeloid leukemia	mmu05221	14	8,15
Tight junction	mmu04530	24	7,52
VEGF signaling pathway	mmu04370	15	6,76
Natural killer cell mediated cytotoxicity	mmu04650	21	6,6
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	mmu05030	6	5,62
Phosphatidylinositol signaling system	mmu04070	14	5,39