

Einfluss der zellspezifischen Deletion des miR-17~92-Clusters auf die Entwicklung des Kleinhirns

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Antonia Agnes Elisabeth van Rienen

aus Bonn

Bonn 2022

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Karl Schilling
2. Gutachter: Prof. Dr. Walter Witke

Tag der Promotion: 05.05.2022

Erscheinungsjahr: 2022

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
1 EINLEITUNG	6
1.1 Das Kleinhirn	6
1.1.1 Makroskopische Einteilung und Topografie des Kleinhirns	6
1.1.2 Mikroskopische Struktur der Kleinhirnrinde	7
1.1.3 Funktionelle Verschaltung der Kleinhirnrinde	8
1.2 Histogenese des Kleinhirns der Maus	9
1.2.1 Migration der Nervenzellen in der Kleinhirnentwicklung	9
1.2.2 Faltung des Kleinhirns und Bildung der Fissuren	11
1.3 Biogenese und Funktionen von microRNAs	12
1.3.1 Wirkmechanismen von miRNAs	14
1.3.2 Natürliche Formen der miRNA-Modifikation	14
1.3.3 Das miR-17-92-Cluster	15
1.4 Ziel der Arbeit	16
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Geräte und Chemikalien	17
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Chemikalien	18
2.1.3 Verwendete Oligonukleotide	20
2.2 Versuchstiere	21
2.2.1 Erzeugung, Haltung und Handhabung transgener Mäuse	21
2.2.2 Zucht- und Haltungsbedingungen von Mäusen	22
2.2.3 Narkose der Mäuse.....	22
2.2.4 Ganzkörperfixierung von Mäusen durch Perfusion	22
2.2.5 Bestimmung des Nass- und Trockengewichts des Gehirngewebes	23
2.3 Molekularbiologische Methoden	23
2.3.1 Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-Isolation aus Schwanzbiopsien der Maus	23
2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	24
2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese	26
2.4 Nachweis der miRNA-Expression	27
2.4.1 Ribonukleinsäure-(RNA)-Isolation	27
2.4.2 Bestimmung der Ribonukleinsäure-(RNA)-Konzentration	27
2.4.3 Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA)	28
2.4.4 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	28
2.4.5 Auswertung der qRT-PCR-Läufe	29
2.5 Biochemische Methoden	30
2.5.1 Proteinextraktion aus Gewebe und Zellkulturen	30
2.5.2 Proteinbestimmung nach Pierce (<i>Bicinchoninic Acid</i> , BCA)	30
2.5.3 Aufreinigung von filamentärem (F) und globulärem (G) Aktin	31
2.5.4 Western-Blot-Analyse	32
2.6 Histologische und immunhistochemische Methoden	33
2.6.1 Herstellung von Vibratomschnitten	33
2.6.2 Immunfluoreszenzanalysen an Vibratomschnitten	34
2.6.3 Hämatoxylin/Eosin-Färbung an Vibratomschnitten	35
2.6.4 Nissl-Färbung an Vibratomschnitten	35
2.6.5 Immunhistochemische Analysen (Avidin-Biotin-Methode).....	36
2.6.6 Golgi-Färbung an Vibratomschnitten	36

2.7	Bioinformatische Methoden	38
2.7.1	Zielgenanalyse der miR-17~92-Cluster-Familie.....	38
2.8	Zellkulturmethoden	39
2.8.1	Kultivierung von Zellen.....	39
2.8.2	Fixierung von Zellen.....	40
2.8.3	Präparation der Kleinhirne und Herstellung von Dissoziationskulturen von Primärzellen.....	40
2.8.4	<i>Time-lapse in vitro</i> Migrationsanalyse.....	41
2.8.5	Auswertung der <i>Time-lapse in vitro</i> Migrationsanalyse	41
2.9	Mikroskopie und fotografische Dokumentation	42
2.10	Morphologische Kleinhirnanalyse	42
2.10.1	Untersuchungsparameter	42
2.10.2	Programmentwicklung zur morphologischen Kleinhirnanalyse.....	45
2.11	Statistische Auswertungen	50
3	ERGEBNISSE	51
3.1	Genotypisierung der Math1-cre- und L7-cre-transgenen Mäuse und Zelltyp-spezifische Math1-cre Expression in verschiedenen Altersstadien	51
3.2	Expression des miR-17~92-Clusters im Kleinhirn der Math1-cre-Mausmutante (KcKO)	55
3.2.1	Vergleich der miRNA-Expression in WT- und KcKO-Kleinhirnen	55
3.2.2	Einfluss des Alters und des Geschlechts auf die miRNA-Expression im Kleinhirn	56
3.2.3	Unterschiedliche miRNA-Expression in den anterioren und posterioren Lobuli des Kleinhirns	56
3.3	Allgemeine körperliche und verhaltensbezogene Entwicklung von miR-17~92-Cluster-defizienten Tieren	58
3.4	Makroskopische Kleinhirnanalyse der miR-17~92-Cluster-defizienten Mausmutanten	60
3.4.1	Kleinhirngewicht der KcKO-Mausmutante	61
3.4.2	Kleinhirngewicht der PcKO-Mausmutante	63
3.5	Effekt der miR-17~92-Cluster-Defizienz in Körner- bzw. Purkinjezellen auf die morphologische Kleinhirnentwicklung	65
3.5.1	Morphologische Veränderung des Kleinhirns durch Körnerzell-spezifische miR-17~92-Cluster-Deletion.....	65
3.5.2	Entwicklung und Anwendung der Methode zur Analyse der Lobulierung des Kleinhirns – WT- vs. KcKO-Tiere	68
3.5.3	Morphologische Veränderung des Kleinhirns durch Purkinje-Zell-spezifische miR-17~92-Cluster-Deletion.....	78
3.6	Einfluss der miR-17~92-Cluster-Deletion auf die Zellmorphologie im Kleinhirn	81
3.6.1	Einfluss der Fixierung auf die Größe der Somata	81
3.6.2	Vergleich der Zellkörper von Körnerzellen in WT- und KcKO-Mäusen	82
3.6.3	Vergleich der Dendritenlänge von Körnerzellen in WT- und KcKO-Mäusen.....	85
3.6.4	Vergleich der Dendritenbaum-Entwicklung in Purkinjezellen von WT- und PcKO-Tieren	89
3.7	Charakterisierung ektoptischer postmitotischer Körnerzellen in der EGL von KcKO-Tieren	90
3.7.1	Vergleich der Anzahl an proliferierenden Zellen in den Körnerzellschichten von WT- und KcKO-Tieren	90
3.7.2	Vergleich der Anzahl an apoptotischen Zellen in den Körnerzellschichten von WT- und KcKO-Tieren	92
3.8	Auswirkungen der miR-17~92-Cluster-Deletion auf die Migration von Körnerzellen <i>in vitro</i>	94
3.9	F-Aktin-Gehalt in KcKO-Körnerzellen	97
3.10	Target-Analyse anhand vorhandener Datensätze für die miR-17~92-Cluster-Familie	99
4	DISKUSSION	102
4.1	Allgemeine körperliche Merkmale der miR-17~92-Cluster-defizienten Mauslinien	102
4.2	Bedeutung der Deletion des miR-17~92-Clusters in Körnerzellen für die Kleinhirnentwicklung	103
4.3	Bedeutung der Deletion des miR-17~92-Clusters in Purkinjezellen für die Kleinhirnentwicklung	103
4.4	Einfluss der miR-17~92-Cluster-Defizienz in Körnerzellen auf die Faltung des <i>Cortex cerebelli</i>	105

4.5	Einfluss der miR-17~92-Cluster-Defizienz auf den Zellzyklus der Körnerzellen	108
4.6	Einfluss des miR-17~92-Clusters auf die Morphologie von Körnerzellen.....	109
4.7	Einfluss des miR-17~92-Clusters auf die Körnerzellmigration <i>in vitro</i>	110
4.8	Limitationen der Studie.....	111
4.9	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	112
5	ZUSAMMENFASSUNG	114
6	ANHANG	116
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	118
7.1	Literaturverzeichnis.....	120
	7.1.1 Internetquellen	127
	7.1.2 Publikationen	127
8	DANKSAGUNG.....	128

1 Einleitung

Das Kleinhirn gehört zu den am gründlichsten erforschten Strukturen im Gehirn. Verglichen mit den anderen Strukturen im zentralen Nervensystem entwickelt sich das Kleinhirn relativ spät. Die klar abgrenzbaren Zellschichten bzw. Zelltypen und die gut definierbaren Prozesse während der embryonalen und postnatalen Entwicklung machen das Kleinhirn zu einem idealen Forschungsmodell. Trotz der umfangreichen Forschung am Kleinhirn sind nicht alle zellulären Vorgänge und Abläufe der Entwicklung bekannt (Fayrer, 1866; Herrick, 1891). In jüngster Zeit wurde die Rolle von micro-Ribonukleinsäuren (miRNAs, miR) bei der Entstehung von Tumoren im Kleinhirn untersucht und mit der normalen Kleinhirnentwicklung verglichen (Li et al., 2012; Murphy et al., 2013; Northcott et al., 2009; Uziel et al., 2009; Zindy et al., 2015). Die Proliferation und Migration einiger Zelltypen wiesen in diesen Mauslinien anomale Muster auf, was zu Deformationen in der Kleinhirnmorphologie im anterioren Teil führte. Die vorliegende Arbeit untersucht die Funktion des miR-17~92-Clusters in der Kleinhirnentwicklung, wobei der Fokus auf den Körnerzellen liegt.

1.1 Das Kleinhirn

Viele Zelltypen und Entwicklungsprozesse des Kleinhirns weisen bei Säugetieren und Vögeln konservierte Merkmale auf. Auch Reptilien, Amphibien und Fische besitzen eine vergleichbare Kleinhirnstruktur (Altman and Bayer, 1996; Sultan and Glickstein, 2007). Daher stehen zahlreiche Tiermodelle zur Verfügung, wobei die Maus aufgrund ihrer histologischen und genetischen Ähnlichkeit mit dem Menschen und der resultierenden guten Übertragbarkeit gewonnener Daten am häufigsten genutzt wird (Essen, 2002; Strand et al., 2007; Wasserman et al., 2000). Die Funktionen des Kleinhirns beschränken sich nicht auf die Kontrolle feinmotorischer Bewegungsabläufe; das Kleinhirn ist zudem wesentlich am impliziten Lernen und anderen kognitiven Prozessen beteiligt (Leiner et al., 1993). Hirntumoren, insbesondere Medulloblastome, die während der embryonalen Kleinhirnentwicklung entstehen, können Bewegungs-, Sprach-, Entwicklungs- und kognitive Störungen (Konzentrations-, Merkfähigkeits- oder Gedächtnisstörungen) hervorrufen. Die Kleinhirnentwicklung wird im Folgenden, sofern keine andere Spezies oder Mauslinie erwähnt wird, an der Mauslinie C57BL/6 beschrieben.

1.1.1 Makroskopische Einteilung und Topografie des Kleinhirns

Das Kleinhirn liegt zusammen mit dem Hirnstamm in der hinteren Schädelgrube und wird durch das Kleinhirnzelt (*Tentorium cerebelli*) vom Großhirn getrennt. Ventral begrenzt von der *Medulla oblongata* und dem *Pons* bilden das Kleinhirn und der Hirnstamm den Umriss des 4. Ventrikels, einen von vier mit Liquor gefüllten Hohlräumen. Kaudal setzt sich der 4. Ventrikel in den Zentralkanal (*Canalis centralis*) des Rückenmarks fort und ist über drei Foramina mit dem äußeren Liquorsystem verbunden. Dieser extracerebrale Liquor schützt das Gewebe vor Verformungen durch äußere Einflüsse.

Das Kleinhirn wird grob in drei Bereiche gegliedert: die zwei Hemisphären und den dazwischen liegenden Kleinhirnwurm (*Vermis cerebelli*). Die weitere Unterteilung erfolgt nach makro- und mikroanatomischen sowie funktionellen Kriterien. Makroskopisch wird das Kleinhirn durch Furchen (*Fissurae*) in drei größere Kleinhirn-Lappen (*Lobus anterior cerebelli*, *Lobus posterior cerebelli* und *Lobus flocculonodularis*) und kleinere Lappchen (*Lobuli I–X*) unterteilt (s. Abb. 1.1).

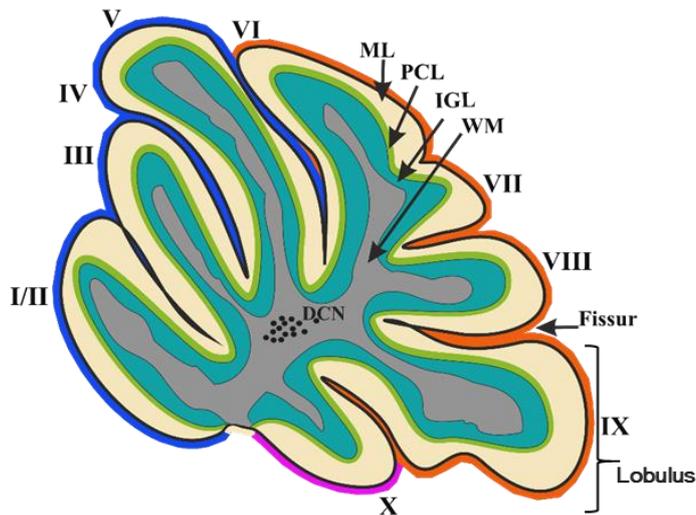


Abb. 1.1: Makroskopischer Aufbau und Lobulierung eines adulten Kleinhirns der Maus (C57BL/6)

Die Lobuli sind mit römischen Zahlen (I/II bis X) durchnummeriert. Die Zellschichten sind farblich gekennzeichnet: Molekularschicht (ML, beige), Purkinjezellschicht (PCL, hellgrün), interne Körnerzellschicht (IGL, türkis) und weiße Substanz (WM, grau). Weitere Strukturen: tiefe Kleinhirnkerne (DCN, schwarz), Lobus anterior cerebelli (LA, blau), Lobus posterior cerebelli (LP, orange), Lobus flocculonodularis (LF, lila). (Eigene Darstellung)

Die durch die Faltung entstehenden typischen blätterartigen Windungen (*Foliae cerebelli*) dienen der Oberflächenvergrößerung und tragen im mediansagittalen Schnitt zur charakteristischen baumartigen Struktur des Kleinhirns bei (*Arbor vitae*) (s. Abb. 1.1). Die nervenzellhaltige oberflächliche Schicht des Kleinhirns wird als Kleinhirnrinde (*Cortex cerebelli*) und die darunter liegende weiße Substanz als Kleinhirnmark (*Corpus medullare cerebelli*) bezeichnet. Im Zentrum des Marks liegen die paarigen Kleinhirnkerne (*Nuclei cerebelli*) umgeben von Nervenfasern, die sich bis in die drei Kleinhirnstiele (*Pedunculi cerebellares superiores, medii und inferiores*) fortsetzen und Verbindungen zum Großhirn und anderen Regionen des Zentralen Nervensystems darstellen. Über diese Verknüpfung werden alle afferenten und efferenten Informationen des Kleinhirns geleitet. Für die Verarbeitung der Informationen spielen die Kleinhirnkerne eine essenzielle Rolle, insbesondere bei den Efferenzen.

1.1.2 Mikroskopische Struktur der Kleinhirnrinde

Die Kleinhirnrinde kann mikroskopisch in drei Zellschichten unterteilt werden. Direkt unter der *Pia mater* liegt die Molekularschicht (*Stratum moleculare*), die nach innen von der Purkinjezellschicht (*Stratum ganglionare*, *Stratum purkinjense*) begrenzt wird (s. Abb. 1.2). Neben den Sternzellen und Korbzellen enthält die Molekularschicht die Axone der Körnerzellen, die Dendritenbäume der Purkinjezellen und die Fortsätze von Bergmann-Gliazellen. In der angrenzenden Purkinjezellschicht befinden sich fast ausschließlich Purkinjezellen, deren Perikaryen in einer Einzelschicht angeordnet sind. Die dritte und breiteste Zellschicht, die innere Körnerzellschicht (IGL, *Stratum granulosum*), beinhaltet neben den

namengebenden Körnerzellen Lugaro-Zellen, unipolare Bürstenzellen und verschiedene Typen von Golgi-Zellen (Simat et al., 2007). Die Entwicklung der IGL ist der maßgebliche Forschungsgegenstand dieser Arbeit.

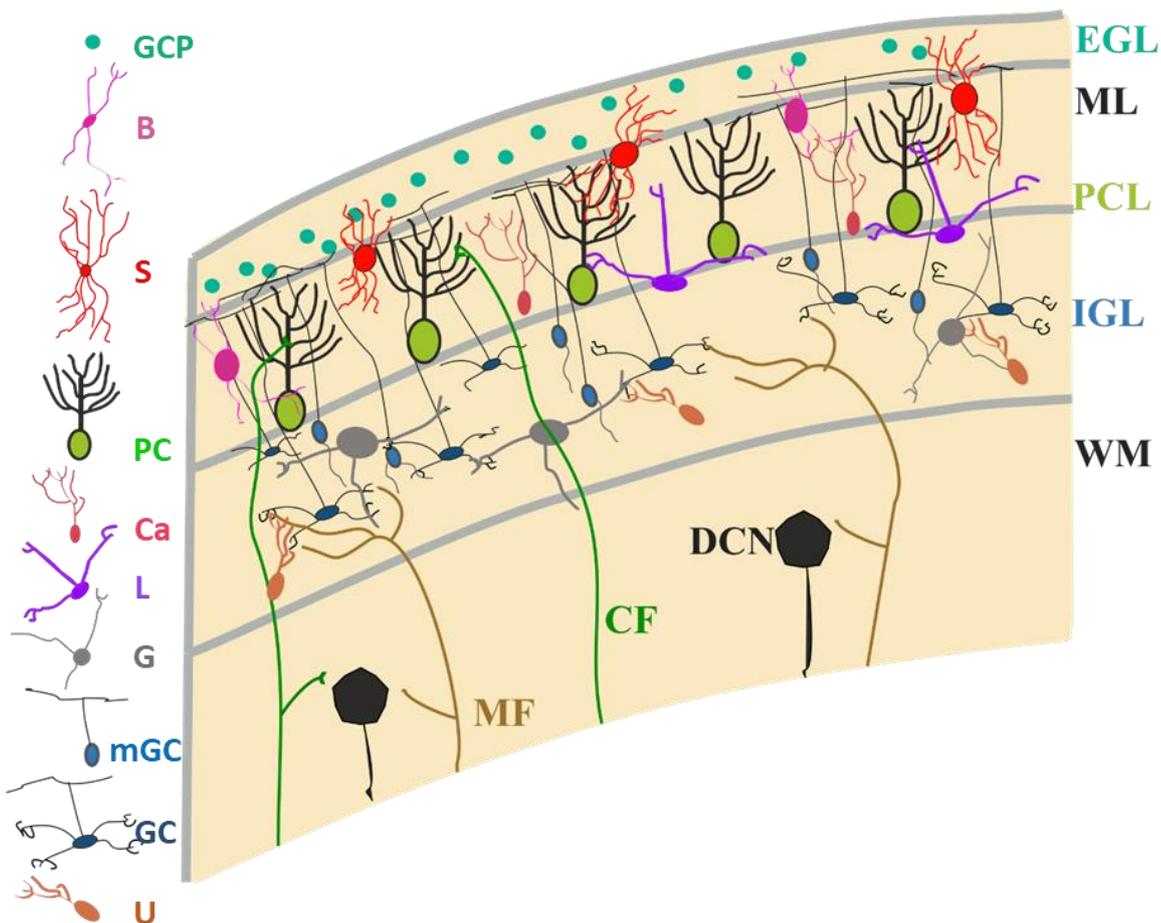


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Zellschichten im Kleinhirn am 15-ten postnatalen Tag (P15)

In dem Lobulusquerschnitt sind die Zellschichten und Zelltypen der Kleinhirnrinde bis zu den tiefen Kernen (DCN) in der weißen Substanz (WM) dargestellt. An P15 befindet sich über der Molekularschicht (ML) eine schmale externe Körnerzellschicht (EGL) mit Körnerzellvorläufer (GCP, KVZ) und migrierenden Körnerzellen (mGC). Die ML beinhaltet inhibitorisch wirkende Stern- (S) und Korbzellen (B). In der Purkinjenzellschicht (PCL) befinden sich neben Purkinjenzellen (PC) auch Candelabrumzellen (Ca). Am unteren Rand der PCL liegen Lugaro-Zellen (L). Die innere Körnerzellschicht (IGL) umfasst exzitatorisch wirkende Körnerzellen (GC), Gliazellen (G) sowie unipolare Bürstenzellen (U). Die afferenten Moosfasern (MF) wirken exzitatorisch auf GC und die Kletterfasern (CF) auf PC. Die Größenverhältnisse der Zelltypen entsprechen nicht der Realität. (Eigene Darstellung)

1.1.3 Funktionelle Verschaltung der Kleinhirnrinde

Im Folgenden werden die Prinzipien der Verschaltung der Kleinhirnrinde und ihrer Afferenzen und Efferenzen beschrieben. Eine dysregulierte Kommunikation der cerebellären Neurone im sich entwickelnden Kleinhirn kann zu dauerhaften Deformationen führen (Chizhikov and Millen, 2003; Men et al., 2015).

Aus der Tiefe des Kleinhirnmarklagers (*Substantia medullaris*) steigen zwei verzweigte Fasersysteme, die exzitatorischen Kletterfasern und die Moosfasern, in Richtung Kleinhirnrinde auf. Die Moosfasern sind stark verzweigte Axone, die aus dem Rückenmark (*Medulla spinalis*), der Brücke (*Pons*) oder dem verlängerten Mark (*Medulla oblongata*) kommend zunächst

Kollateralfasern zu den Kleinhirnkernen abgeben und dann mit glutamatergen Synapsen an den Dendriten der Körnerzellen enden. Der aus den Moosfasern stammende *Input* wird indirekt über die Körnerzellen und deren Axone (Parallelfasern) an die Dendriten der Purkinjezellen weitergeleitet. Als Neurotransmitter fungiert hier Glutamat. Dagegen wirken die aus der unteren Olive stammenden Kletterfasern direkt über Glutamat auf die Purkinjezellen. Auch verschiedene Interneurone (Stern- und Korbzellen) in der Molekularschicht werden von den Parallelfasern erreicht und wirken ihrerseits inhibitorisch über den Neurotransmitter Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) auf Purkinjezellen, um die Erregung räumlich und zeitlich einzugrenzen. Verschiedene Varianten von Golgi-Zellen in der Körnerzellschicht werden ebenfalls über Parallelfasern innerviert und wirken über einen *Feedback*-Mechanismus hemmend auf die Dendriten der Körnerzellen. Als einzige Efferenzen der Kleinhirnrinde wirken die Axone der Purkinjezellen hemmend auf die ihnen nachgeordneten Neurone im Komplex der Kleinhirnerne (O'Brien and Unwin, 2006).

1.2 Histogenese des Kleinhirns der Maus

1.2.1 Migration der Nervenzellen in der Kleinhirnentwicklung

Die Bildung der charakteristischen cerebellären Zelllagen beginnt während der Embryonalentwicklung durch Migration und Verschaltung der Neurone. Die Entwicklung wird erst postnatal abgeschlossen. Dabei legen Nervenvorläuferzellen ausgehend von ihrem Entstehungsort mitunter große Distanzen bis zum Erreichen ihres finalen Funktionsorts zurück und durchlaufen verschiedene Entwicklungsstadien bis zu ihrer finalen Differenzierung.

Die Neurogenese der späteren cerebellären Zelltypen beginnt in zwei anatomisch getrennten Keimzonen. Aus der rhombischen Lippe gehen glutamaterge Neurone, darunter Körnerzellen, Bürstenzellen und die exzitatorischen Neurone der tiefen Kerne hervor (Kim and Scott, 2014; Machold and Fishell, 2005). Die Gamma-Amino-Buttersäure-(GABA)-ergen Neurone der tiefen Kerne sowie die Purkinjezellen, Golgi-Zellen, Korbzellen und Sternzellen stammen aus der zweiten Keimzone, der Ventrikularzone, die den 4. Ventrikel dorsal begrenzt (Chédotal, 2010; Millen and Gleeson, 2008). Aus einem Zellpool der rhombischen Lippe migrieren die ersten Körnervorläuferzellen (KVZ) um den embryonalen Tag 13–15 (E13–E15) tangential über die Oberfläche der Kleinhirnanlage, um dort die zunächst einschichtige externe Körnerzellschicht (EGL) zu bilden (s. Abb. 1.3) (Hatten and Heintz, 1995).

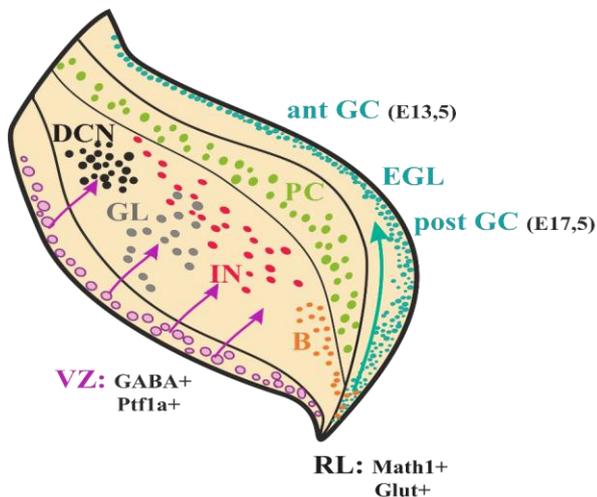


Abb. 1.3: Cerebelläre Neurogenese (parasagittale Schnittebene)

VZ: Ventrikularzone, RL: rhombische Lippe, EGL: externe Körnerzellschicht, ant GC: spätere anteriore Körnerzellen, post GC: spätere posteriore Körnerzellen, DCN: tiefe Kleinhirnkernschicht, GL: Gliazellen, IN: Interneurone, PC: Purkinjezellen, B: Bürstenzellen, Transkriptionsfaktoren: Gamma-Aminobuttersäure (GABA+), Mouse atonal homolog 1 (Math1+), Pancreas-associated Transcription Factor 1a (Ptf1a). (Eigene Darstellung)

Im weiteren Verlauf der Kleinhirnentwicklung dehnt sich die EGL aufgrund der Proliferation der KVZ aus, bis sie um den postnatalen Tag 7 (P7) ihre größte Breite erreicht (6–8 Zellschichten). Nach ihrer letzten Teilung verweilen die Zellen bis zu 48h in der EGL, bevor sie aus der unteren EGL-Schicht radial durch die Molekularschicht und Purkinjezellschicht migrieren und die IGL bilden (s. Abb. 1.4) (Komuro et al., 2001). Die postmitotische Körnerzelle kann während der radialen Migration ihre mediolaterale und rostrokaudale Position nicht mehr verändern (Komuro and Rakic, 1998). Sie orientiert sich an den Bergmann-Gliafasern, die durch die Molekularschicht und Purkinjezellschicht ziehen, wobei sich ihr Zellausläufer (engl. *leading process*) durch kontraktile Bewegungen um die Gliafasern windet und den Zellkörper hinter sich herzieht (Tsai and Gleason, 2005). Während die EGL so immer dünner wird, bis sie an P21 gänzlich verschwunden ist, ist die IGL ab P5 erkennbar und bildet sich bis P21 aus den postmitotischen Körnerzellen der EGL. Die reife Körnerzelle in der IGL zeichnet sich in der Regel durch drei bis fünf Dendriten mit endständigen krallenartigen Verzweigungen aus. Der Ausrichtungswinkel der Dendriten korreliert mit dem des Axons (Houston et al., 2017).

Die neuronale Differenzierung der Körnerzellen während der Entstehung des Kleinhirns geht mit einer Formveränderung des Somas einher (Kuhar et al., 1993). Während der tangentialen und radialen Migration weist das Soma der Körnerzellen eine längliche Form mit langen horizontal bzw. vertikal ausgerichteten Ausläufern auf. Dagegen zeichnen sich die reife Körnerzellen in der IGL und während der stationären Zellphasen in der EGL durch eine rundliche Zellkörperform aus (s. Abb. 1.4) (Komuro et al., 2001). Diese charakteristische Morphologie der Körnerzellen in der IGL wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit in juvenilen Mäusen, in denen das miR-17~92-Cluster in Körnerzellen deletiert war, untersucht (s. Kap. 3.6).

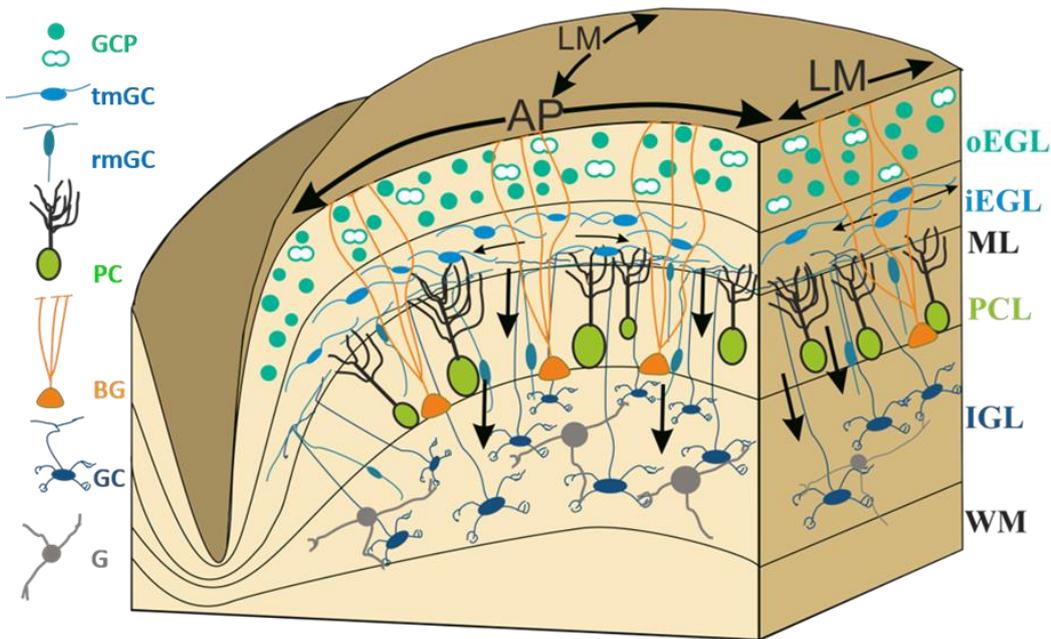


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Migration cerebellärer Körnerzellen einer juvenilen Maus

Die Körnerzellvorläufer (GCP) differenzieren und migrieren in großer Anzahl in der oberen externen Körnerzellschicht (oEGL) entlang der Anterior-Posterior-Achse (AP) und vollziehen eine tangentielle Migration (tmGC) in der inneren externen Körnerzellschicht (iEGL) entlang der Lateral-Medialen-Achse (LM). Die radiale Migration (rmGC) führt durch die Molekularschicht (ML) und Purkinjezellschicht (PCL) in die interne Körnerzellschicht (IGL). GC: reife Körnerzellen, WM: weiße Substanz, PC: Purkinjezellen, G: Gliazellen, BG: Bergmann-Gliazellen. (Eigene Darstellung)

1.2.2 Faltung des Kleinhirns und Bildung der Fissuren

Die Ausbildung der Fissuren während der Entwicklung des Kleinhirns ist für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse. Die stark gefaltete Oberfläche des Kleinhirns gehört zu den am stärksten konservierten Merkmalen in der Gehirnentwicklung bei Säugetieren. Die resultierende Oberflächenvergrößerung von bis zu 70 % ermöglicht es, eine große Anzahl an Nervenzellkörpern entlang der Oberfläche anzuordnen. Die Fissuren dienen während der Kleinhirnentwicklung als Fundament und Grundgerüst für die migrierenden Vorläuferzellen. Verzögerungen oder Schädigungen in dieser Phase können zu massiven Störungen bei der Ausbildung des Kleinhirns führen.

Bei der Maus beginnt die Bildung von drei der vier primären Fissuren (*Fissura preculminata*, *prima* und *secunda*) um E17,5. Einen Tag später (E18,5) folgt die vierte Fissur (*Fissura posterolateralis*). Durch die Einfaltung der Oberfläche sind die ersten fünf Hauptlobuli (von anterior nach posterior: *Lobulus anterobasalis*, *anterodorsalis*, *centralis*, *posterior* und *inferior*) in diesem frühen embryonalen Entwicklungsstadium schon deutlich zu erkennen (Sudarov and Joyner, 2007). Nach der Einstülpung der Kleinhirnoberfläche folgt ein Längenwachstum der Lobuli bis zu ihrer genetisch vorbestimmten Größe und Form, wobei der exakte Zeitpunkt der Bildung der Hauptfissuren essentiell ist. Die Ursprünge der Fissuren, die sogenannten Ankerzentren, formieren sich während der embryonalen Kleinhirnentwicklung (E16,5–18,5) durch eine Reorganisation von Purkinjezellen und der daraus resultierenden Zelllageneinstülpung sowie durch eine Anhäufung von KVZ in der EGL in diesen Bereichen der sich entwickelnden Kleinhirnoberfläche (Sudarov and Joyner, 2007). Während die an diesem Prozess

beteiligten Purkinjezellen keine abweichende Morphologie aufweisen, unterscheiden sich die KVZ in den Ankerzentren deutlich von den KVZ an anderen Stellen der EGL.

Der Ursprung der Signale für die unterschiedliche Ausbildung der Morphologie der Körnerzellen ist weitgehend ungeklärt. Bekannt ist jedoch, dass das auf die Körnerzellen mitogen wirkende *Sonic-Hedgehog*-(Shh)-Signal der Purkinjezellen dabei eine Rolle spielt (Lewis et al., 2004). Postnatal ist der Shh-Signaltransduktionsweg aber essentiell für die Proliferation und Migration der Körnerzellen und die daraus resultierende Morphologie des Kleinhirns (Corrales et al., 2006). Die endgültige Morphologie des Kleinhirns ist am P21 ausgebildet. Die den komplexen Entwicklungsprozessen zugrundeliegenden genetischen Grundlagen sind bis heute nicht vollständig erforscht und sollen in der vorliegenden Dissertation weiter untersucht werden. Dabei liegt der Fokus auf der potentiellen Bedeutung von miRNAs.

1.3 Biogenese und Funktionen von microRNAs

MiRNAs gehören zu der großen Gruppe nicht-kodierender RNA (ncRNAs). Mit einer Länge von 19–25 Nukleotiden zählen miRNAs zu den kürzesten regulatorischen RNAs in der Zelle (Ambros, 2004; Bartel, 2004; He and Hannon, 2004; Lee et al., 2002). Diese RNA-Moleküle werden nach ihrer regulierten Transkription nicht in ein Protein translatiert (s. Abb. 1.5). Stattdessen wirken sie als zelluläre Regulatoren und beeinflussen auf post-transkriptioneller Ebene zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Migration (Bartel, 2004; Filipowicz et al., 2008; Lagos-Quintana et al., 2003; Lewis et al., 2004; Wang and Bao, 2017). Die evolutionär hochgradig konservierten Sequenzen werden in vielzelligen Tieren (Metazoa) und Pflanzen als einzelne Gene oder polycistronisch als sogenannte Cluster exprimiert. Aktuell wird davon ausgegangen, dass bis zu 30 % aller proteinkodierenden Gene von miRNAs reguliert werden (Filipowicz et al., 2008). Dabei ist auch die Expression der miRNAs organ-, gewebe- und zelltypspezifisch reguliert und unterliegt während der Entwicklung zeitlichen Veränderungen. Zusätzlich können miRNAs indirekt durch extrazelluläre Exosomen oder direkt über Zell-Zellverbindungen (z. B. *gap junctions*) zwischen Zellen übertragen werden (Hwang et al., 2007; Lemcke and David, 2018; Valadi et al., 2007; Zhang et al., 2015).

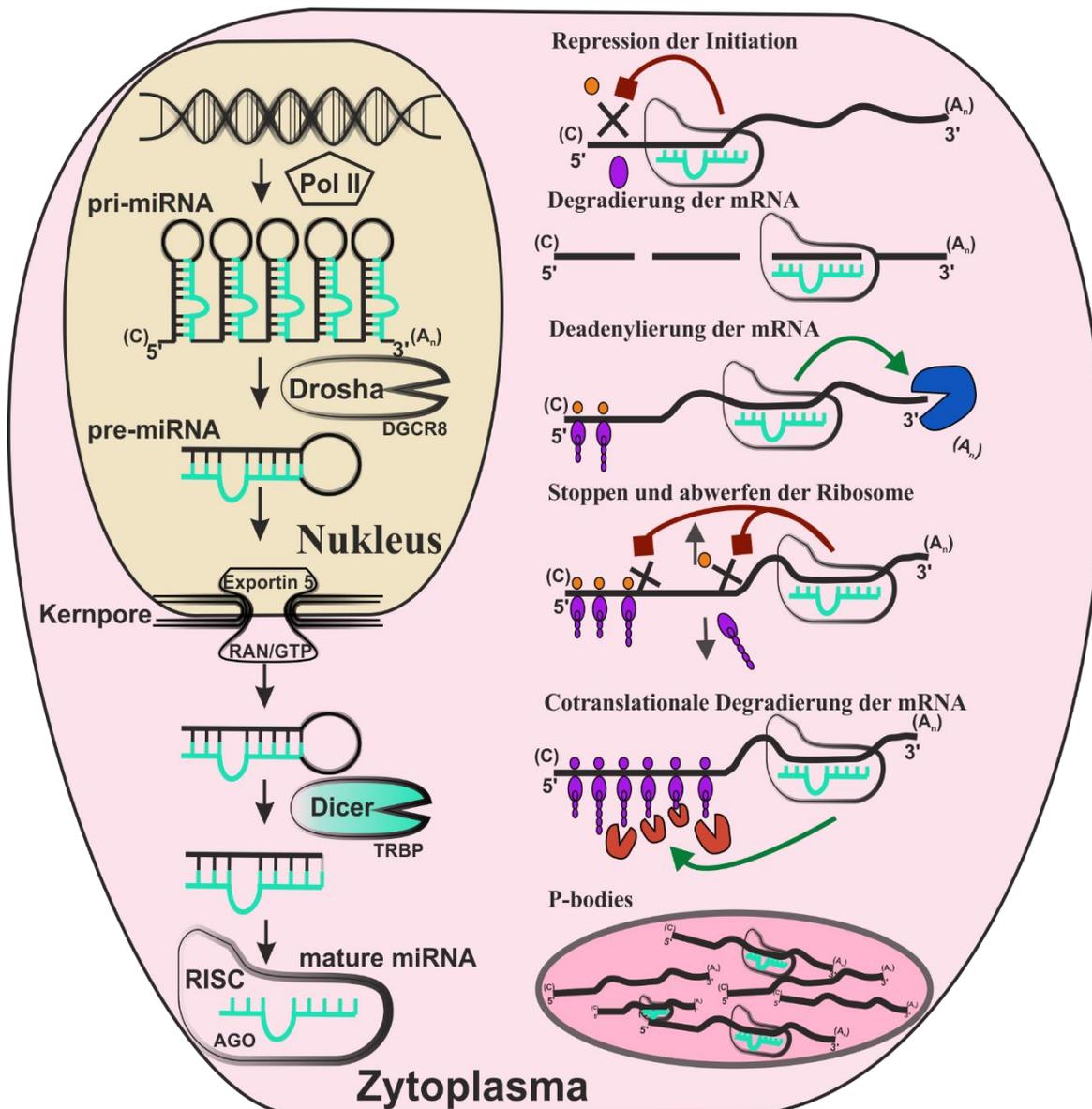


Abb. 1.5: Schematische Übersicht über die Biogenese und Funktionen von micro-Ribonukleinsäuren (miRNAs)

MiRNAs werden einzeln oder im Cluster durch die RNA-Polymerase II (Pol II) transkribiert. Die entstehende primary-miRNA (pri-miRNA) wird über einen Enzymkomplex (Ribonuklease (RNase) III (Droscha) + RNA-bindendes Protein Pasha (DGCR8)) zur precursor-miRNA (pre-miRNA) prozessiert. Der Transfer in das Zytoplasma erfolgt über den Transporter Exportin 5 und das Transportprotein Ras-related Nuclear protein (RAN/GTP, syn. GTP-binding nuclear protein Ran). Ein Enzymkomplex (Endoribonuklease Dicer + RISC loading complex RNA binding subunit (TRBP, syn. TAR-RNA-binding protein)) prozessiert die miRNA zu einer doppelsträngigen miRNA. Anschließend wird ein Strang selektiv stabilisiert und als reife miRNA (mature miRNA) in den miRNA-induced silencing complex (RISC) inkorporiert. Hier findet die Interaktion mit den Zieltranskripten statt. Der RISC-Komplex beinhaltet als Kernkomponente Proteine der Argonauten-Familie (AGO). Die Zieltranskripte werden durch verschiedene Mechanismen inhibiert oder degradiert. (A_n): Poly-A-Schwanz; (C) 7-Methylguanosin-Cap; mRNA: messenger RNA (Modifiziert nach Pillai et al., 2007; Zhang et al., 2013).

1.3.1 Wirkmechanismen von miRNAs

Das erste Gen, für das eine Regulation durch eine miRNA beschrieben wurde, war ein Regulator der Larvenentwicklung (*lin-14*) von *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Die kurzen RNA-Sequenzen des miRNA-Gens *lin-4* binden an verschiedene Stellen des 3'-untranslatierten Bereichs der kodierenden *lin-14* messenger Ribonukleinsäure (mRNA) und blockieren so die Translation (*gene-silencing*, s. Abb. 1.5). Die Bindung der miRNA an die Ziel-mRNA kann aber auch zu deren Degradation führen. Beide Mechanismen können zudem parallel auftreten. Essentiell ist hierbei die „seed“-Region, eine acht Nukleotide lange Sequenz am 5'-Ende (Position 2–8) der reifen miRNA, über die eine – in den meisten Fällen – perfekte Paarung an die Zielsequenz am 3'-Ende und seltener am 5'-Ende der mRNA erfolgt (Grimson et al., 2007; Kehl et al., 2017; Lytle et al., 2007; Vella et al., 2004). Häufig befinden sich multiple Bindungsstellen für eine oder verschiedene miRNAs im 3'-untranslatierten Bereich einer mRNA. Bei Säugetieren liegt meist eine degenerierte Basenpaarung zwischen miRNA und dem 3'-untranslatierten Bereich der mRNA vor (Friedman et al., 2009; Grimson et al., 2007; Uhlmann et al., 2012). Der Grad der Komplementarität bestimmt die Bindungsstärke. Bei partieller Komplementarität wird die Translation der mRNA nur reprimiert; bei einer vollständigen Übereinstimmung kommt es dagegen zur mRNA-Degradation (Bartel, 2004; Filipowicz et al., 2008). Ein Mechanismus der miRNA-vermittelten mRNA-Destabilisierung ist der mRNA-Abbau durch eine beschleunigte Deadenylierung des Poly-A-Schwanzes (Pillai et al., 2007; Wakiyama et al., 2007). Weiter können miRNAs mRNAs zu zellulären Regionen mit niedriger Proteinsynthese rekrutieren und die Bildung von mRNA-Prozessierungskörperchen (*P-bodies*) initiieren. In diesen Aggregaten aus Argonauten-(AGO)-Proteinen, GW182-Proteinen und miRNAs wird die mRNA aufbewahrt oder degradiert (Liu et al., 2005; Parker and Sheth, 2007; Pillai et al., 2007; Sen and Blau, 2005). Zudem können miRNAs auch direkt auf die Proteinsynthese wirken und auf diese Weise die Expression ihres Zielgens beeinflussen. Die Initiation der mRNA-Translation kann durch eine direkte Bindung von miRNAs an den Translationsfaktor eIF4E oder indirekt durch die Besetzung des *Cap-Binding-Complex* am 5'-Ende der Ziel-mRNA durch den *RNA-induced silencing complex* (RISC; Argonauten-2 Proteine) gehemmt werden (Humphreys et al., 2005; Lytle et al., 2007; Towler et al., 2015; Zhang et al., 2013). Auch während der Elongation können miRNAs regulatorisch in die Translation der mRNA eingreifen, indem sie zur Dissoziation des Ribosoms von der mRNA führen oder die Bewegung der Ribosomen entlang der mRNA blockieren. Vermehrt rekrutierte Proteasen bauen die unvollständigen Proteine oder die sich bildende Polypeptidkette ab (Petersen et al., 2006; Pillai et al., 2007; Zhang et al., 2013).

1.3.2 Natürliche Formen der miRNA-Modifikation

Die miRNA unterliegt wie die mRNA stabilisierenden bzw. destabilisierenden Einflüssen. Mit einer durchschnittlichen Halbwertszeit von 119 h (3,6–225 h) sind miRNAs bis zu zehnfach stabiler als die von ihnen regulierten mRNAs, deren Halbwertszeit im Durchschnitt bei 7,1 h (0,25–50 h) liegt (Gantier et al., 2011; Sharova et al., 2009; Towler et al., 2015). Die Stabilität und Aktivität der miRNA wird maßgeblich durch intrinsische Sequenzen außerhalb der „seed“-Region im 3'- und 5'-Ende bestimmt; dabei bewirken Mutationen in diesen Regionen meist eine Destabilisierung (Bail et al., 2010; Chen and

Shyu, 1995; Towler et al., 2015). Das Anfügen von Nukleotiden an das 5'- oder 3'-Ende der miRNA (z. B. Adenosin; (Adenylierung) durch Nukleotidyltransferasen wirkt stabilisierend, jedoch verringert sich dadurch gleichzeitig die miRNA/mRNA-Bindungsaffinität (Burroughs et al., 2010; Morin et al., 2008). Solche Längen- oder/und miRNA-Sequenzvarianten (IsomiRs) stellen eine weitere Ebene der Genexpressionsregulation dar, da aus einer Vorläufer-miRNA unterschiedliche miRNAs mit verschiedenen Zielsequenzen und Lebensdauern entstehen können (Cloonan et al., 2011; Luciano et al., 2004; Morin et al., 2008; Telonis et al., 2015). Das Vorkommen von modifizierten und in ihrer Menge variierenden miRNAs in der Zelle erhöht die Komplexität von Funktionsanalysen der miRNAs. Zusätzlich wurden weitere regulatorische Prozesse, wie die Senkung der miRNA-Konzentration durch antagonistische nicht-kodierende RNAs oder die Erhöhung der miRNA-Konzentration in der Zelle durch eine RNA 2'-O-Methyltransferase-vermittelte 2'-O Methylierung am 3'-Ende der miRNA zur Stabilisierung und Schutz vor einem Exoribonuklease-Abbau, beschrieben (Abe et al., 2014; Bail et al., 2010; Ebert et al., 2007; Hansen et al., 2013; Schneider et al., 2016; Thomas et al., 2012; Towler et al., 2015). Diese miRNA-Modifikationen scheinen für entwicklungsbedingte Veränderungen von Genaktivitäten in Zellen und in Alterungsprozessen von Organen eine große Rolle zu spielen.

1.3.3 Das miR-17~92-Cluster

Der Fokus der vorliegenden Dissertation liegt auf den Funktionen des miR-17~92-Clusters im sich entwickelnden Gehirn und bei der Reifung neuronaler Zelltypen. Die Aufklärung der Wirkmechanismen neurobiologisch relevanter miRNAs wird dadurch erschwert, dass sie über die Interaktion mit verschiedenen Proteinen in multiple zelluläre Prozesse eingreifen (Danka Mohammed et al., 2017; Lewis et al., 2004). Weiter werden die miRNAs des Clusters in verschiedenen Stadien des Entwicklungs- und Alterungsprozess des Gehirns teilweise unterschiedlich reguliert. Ein Beispiel ist die verstärkte Genexpression von miR-17 und -20a im Kleinhirn sieben Tage alter Mäuse, die 80-fach höher liegt als im adulten Tier. Dieser altersbedingte Expressionsunterschied ist deutlich stärker ausgeprägt als bei den restlichen miRNAs des miR-17~92-Clusters. Zu den nachgewiesenen Funktionen der miR-17 und -20a zählen eine Steigerung der Zellproliferation in Zellkulturexperimenten mit neonatalen Stammzellen (engl. „*unrestricted somatic stem cells*“ (USSC)), die hauptsächlich durch eine Erhöhung der Transkriptionsrate verursacht wird (Beveridge et al., 2009; Iwaniuk et al., 2011; Northcott et al., 2009; Trompeter et al., 2011). Zu den Zielgenen der miR17 und miR-20a gehören Gene, die direkt oder indirekt den Zellzyklus regulieren (Trompeter et al., 2011). Auch bei der Zelldifferenzierung übernehmen miRNAs der miR-17~92-Cluster-Familie wichtige Funktionen. Sie regulieren das Axon-Wachstum und die synaptische Signalübertragung zwischen Neuronen (Lugli et al., 2005, 2008; Olive et al., 2009; Paschou et al., 2012; Wang and Bao, 2017; Zhang et al., 2013). In ausdifferenzierten Zellen sinkt der miRNA-Gehalt stark ab. Somit scheinen die miRNAs des Clusters vor allem bei der Neurobiogenese und bei der Entwicklung des Gehirns eine Rolle zu spielen.

1.4 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten die Funktionen der microRNAs des miR-17~92-Clusters in den beiden Haupttypzellen des Kleinhirns (Körnerzellen, Purkinjezellen) und der mögliche Einfluss dieser miRNAs auf die Entwicklung des Kleinhirns untersucht werden. Dafür wurden zwei Mauslinien mit einer cerebellären Körnerzell- bzw. Purkinjezell-spezifischen miR-17~92-Cluster-Deletion etabliert und mittels molekularer und morphologischer Methoden charakterisiert. Dabei sollte auch die Frage geklärt werden, ob die Abwesenheit des miR-17~92-Clusters in den Körnerzellvorläuferzellen unterschiedliche Auswirkungen auf die Entwicklung des anterioren bzw. posterioren Kleinhirnbereichs hat. Hierzu wurde die miRNA-Expression, die Morphologie der Kleinhirnbereiche und Körnerzellen evaluiert.

Um die Morphometrie der Kleinhirnstruktur verschiedener Mauslinien vergleichen zu können, wurde eine *Software* für eine möglichst präzise und umfassende Analyse der einzelnen Kleinhirnbereiche entwickelt. Zudem erlaubte diese *Software* eine effiziente Automatisierung der Vermessung einer hohen Anzahl an Gewebeschnitten und generierte eine ausreichend große Datenmenge für statistische Analysen.

Für die Analyse der cerebellären Zelltypen in dem sich entwickelnden Kleinhirn wurde eine Zelltyp-spezifische biochemische Methode zur Silberfärbung von Kleinhirngewebeschnitten auf Basis der Golgi-Färbung modifiziert und etabliert.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Geräte

In Tab. 2.1 sind die in dieser Dissertation verwendeten Geräte gelistet.

Tab. 2.1: Liste der verwendeten Geräte

Geräte	Modell	Bezugsquelle
Digital-Kamera	DFC 350 FX	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Elektrode	InLab Expert Pro Elektrode	Mettler Toledo, Gießen
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelkammer	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Geldokumentation	Geldoc 2000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Homogenisator	Precellys 24	VWR International GmbH, Darmstadt
Inkubator	Innova 4000 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, New Jersey, USA
Inkubator Zellkultur	Hera Cell	Hereaus, ThermoFisher Scientific
Konzentrator-Zentrifuge	Heraeus, VR-maxi St.a.	Heto-Holten, Allerø, Dänemark
Mikroskop	Axioskop 2 Mot	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Mikroskop	DM IRE2	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Mikroskop	Axiovert 200M (LSM 510 META)	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
pH-Meter	350 pH/Temp/mV Meter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Perfusions Gerät	TL 230V/50HZ	Meredos GmbH, Bovenden
Photometer	Life Science UV/Vis Spectrofotometer DU530	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Photometer	Qubit 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Rotator	Rotator SB3	Stuart, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK
Thermoblock	UNO-Thermoblock	Biometra GmbH, Goettingen
Thermocycler	Thermal Cycler PX2	Thermo Scientific, USA
Thermocycler	Mastercycler Epradiant S	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler	Light Cycler 96	Roche GmbH, Mannheim
Thermocycler	C1000 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Transfer System	Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vibratom	Leica VT1000S	Leica Biosystem, Nussloch
Vibratom	Leica VT1200	Leica Biosystem, Nussloch
Waage	LabStyle 303	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Western Blot Detektor	ImageQuant LAS 4000 Mini	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, UK
Zentrifugen	Biofuge primo R, Biofuge	Hereaus, ThermoFischer

2.1.2 Chemikalien

In Tab. 2.2 sind die Bezugsquellen der in dieser Dissertation verwendeten Chemikalien und Materialien gelistet.

Tab. 2.2 Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien und sonstigen Materialien

Firma	Vertrieb
Abcam	Cambridge, UK
ABgene	Hamburg
Ambion	Ambion Biosystems, Darmstadt
Amersham Biosciences	GE Healthcare Europe GmbH, München
BioStatus Limited	Shepshed Leicestershire, UK
Biomol	Biomol GmbH, Hamburg
BioRad	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Carl Roth	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calbiochem	Merck KGaA, Darmstadt
Dako	Dako North America, Carpinteria, USA
Dynal	Invitrogen, Paisley, UK
Eurogentec	Eurogentec s.a, Seraing, Belgien
Fermentas	Fermentas GmbH, ST. Leon-Rot, Litauen
Gibco	Invitrogen, Paisley, UK
Heto-Holten	Heto-Holten, Allerø, Dänemark
Hoechst	Sanofi-Aventis, Frankfurt
IBA	IBA GmbH, Göttingen
IDT	Integrated DNATechnologies, Leuven, Belgien
Invitrogen	Invitrogen, Paisley, UK
Leica Biosystem	Leica Biosystem, Nussloch, Deutschland
Macherey-Nagel	Macherey-Nagel GmbH & Co. Kg, Düren
Merck	Merck KGaA, Darmstadt
Meredos	Meredos GmbH, Bovenden
Mettler Toledo	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Milipore	Milipore GmbH, Schwalbach
Molecular Probes	Invitrogen, Paisley, UK
Nalgene	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
New England Biolabs	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
PanReac	AppliChem GmbH, Darmstadt
Pierce	Perbio Science Deutschland, Bonn
Qiagen	QIAGEN GmbH, Deutschland, Hilden
Roche	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Serva	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Sigma	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Stratagene	Stratagene Europe, Amsterdam, NL
Upstate	Milipore GmbH, Schwalbach
Vector Laboratories	Linaris Biologische Produktion GmbH, Wertheim

In Tab. 2.3 sind die verwendeten Chemikalien gelistet.

Tab. 2.3 Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
A 40 % (w/v) Acrylamid Bis-Acrylamid:	AccuGel 29:1 (National Diagnostics)
Rinderserumalbumin (BSA) Fraction V	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Seakem LE Agarose Biozym, Hessisch Oldendorf, FMC
AMPUWA-(H ₂ O)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Chloralhydrat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck KGaA, Deutschland
DePeX	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Thermo Fisher, Scientific™ Inc., Dreieich
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Thermo Fisher, Scientific™ Inc., Dreieich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Dimethylsulfoxid, Sigma, Saint Louis, USA
DNase 1	NEB, New England Biolabs, USA
DNase 1 Reaktionspuffer	NEB, New England Biolabs, USA
<i>Dream</i> -Taq-Puffer	Thermo Scientific, USA
Entellan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Fluorescence Mounting Medium	Dako North America, Carpinteria, USA
GlutaMAX	Gibco Invitrogen, Paisley, UK
GibcoHEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)	Thermo Fisher, Scientific™ Inc., Dreieich
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdichromat	Merck, Darmstadt Deutschland
Kresylviolett	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ladepuffer 6 x	Fermentas, Fermentas GmbH, ST. Leon-Rot
Laminin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
<i>Gene Ruler plus DNA-Ladder</i> –100 Basenpaare (bp) (0,5 µg/µl)	NEB, New England Biolabs, USA
<i>Gene Ruler plus DNA-Ladder</i> –1 Kilobase (kb) (0,5 µg/µl)	NEB, New England Biolabs, USA
Natriumchlorid-(NaCl) -Lösung, 0,9 %	Diaco Biofarmaceutici, Italien
Neurobasal™-A Medium	Thermo Fisher, Scientific™ Inc., Dreieich
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher, Scientific™ Inc., Dreieich
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pierce RIPA Puffer	Thermo Scientific, USA
Poly-L-Lysin Lösung	Sigma-Aldrich, Darmstadt Deutschland
Proteinase K	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Silbernitrat (BP, PH. Eur.)	PanReac, AppliChem GmbH, Darmstadt
<i>Dream</i> -Taq-DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich, Darmstadt
	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Chemikalien	Bezugsquelle
Trizol	Thermo Fisher, Scientific™ Inc., Dreieich
Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

2.1.3 Verwendete Oligonukleotide

In Tab. 2.4 sind die verwendeten Oligonukleotide gelistet. Tab. 2.5 fasst die LNA™-enhanced-microRNA-qPCR-Primer zusammen.

Tab. 2.4 Liste der verwendeten Oligonukleotide

Primer Bezeichnung	Primer Basensequenz 5'–3'
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-(GAPDH)-forward	TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC
GAPDH-reverse	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAG
Math1-Cre-forward	TCCGGGCTGCCACGACCAAGT
Math1-Cre-reverse	GCAGATGGCGCGCAACACC
L7-Cre-forward	CTGGGACCCTCAGCCCTCACC
L7-Cre-reverse	CTGTTTTGCACGTTCCACCGGC
miR17-92-forward	TCGAGTATCTGACAATGTGG
miR17-92-reverse	TAGCCAGAAGTTCCAAATTGG
dT/dG-forward	CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT
dT/dG-reverse-1	CGAGGCGGATCACAAGCAATA
dT/dG-reverse-2	TCAATGGGCGGGGGTCGTT
Gender-forward	CTGAAGCTTTTGGCTTTGAG
Gender-reverse	CCACTGCCAAATTCCTTGG

A: Adenin, C: Cytosin, Cre: cyclization recombination, G: Guanin, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, L7: Purkinje-Zell spezifischer Promotor, Math1: Mouse atonal homolog 1 (Körnerzell-spezifischer Promotor), T: Thymin

Tab. 2.5 Liste der LNA (locked nucleic acid)™-enhanced-microRNA-qPCR-Primer (Exiqon)

Primer Bezeichnung	Zielsequenz	Produktnummer (Exiqon)
hsa-miR-17-5p primer set UniRT	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	204771
hsa-miR-19b-3p primer set UniRT	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA	204450
hsa-miR-92a-3p primer set UniRT	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUG	204258
U6 snRNA (hsa) primer set UniRT	Keine Angabe der Firma Exiqon	203907
5S rRNA (hsa) primer set UniRT	Keine Angabe der Firma Exiqon	203906

A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, hsa: human, miR: micro-Ribonukleinsäure, qPCR: quantitative Polymerase-Kettenreaktion, rRNA: ribosomale Ribonukleinsäure, snRNA: small nuclear Ribonukleinsäure, U: Uracil

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Erzeugung, Haltung und Handhabung transgener Mäuse

Die miR-17~92^{flox/flox} Mäuse wurden freundlicherweise von Dr. Oliver Tress (Anatomisches Institut der Universität Bonn) zur Verfügung gestellt und dienten in allen Versuchen als Wildtyp-(WT)-Vergleich bzw. Kontrolle (Ventura et al., 2008).

Die miR-17~92-Cluster homozygot geflochten Tiere wurden mit der Mauslinie Math1-cre gekreuzt, die von Dr. Oliver Tress zur Verfügung gestellt wurde (Matei et al., 2005). Dadurch wurde ein *conditional knockout* (cKO) des miR-17~92-Clusters (Math1-cre-cKO (KcKO)) in den cerebellären Körnerzellen (Math1-positiv) erreicht.

Die Math1-Promotor-Aktivität der Math1-cre-cKO-Tiere wurde durch die Verpaarung mit einer Cre-Reporter Maus (membrane-localized tdTomato/membrane localized *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) (mT/mG) (gt(Rosa)^{26Sortm4(ACTB-tdTomato-EGFP)Luo/J} (JAX 007576 (Md et al., 2007)) untersucht, dankenswerterweise von Prof. Dr. Stefan Baader, (Anatomische Institut der Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

Durch die Kreuzung der miR-17~92^{flox/flox} Mäuse mit der L7-cre Mauslinie (JAX 004146 (Barski et al., 2000)), dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Stefan Baader (Anatomisches Institut der Universität Bonn) wurde das miR-17~92-Cluster in den cerebellären Purkinjezellen deletiert (L7-cre-cKO, PcKO).

Alle verwendeten Mäuse (s. Tab. 2.6) hatten einen C57BL/6 Hintergrund. Bei der Zucht der Tiere wurde möglichst vermieden, Geschwister untereinander zu verpaaren. Es wurden stets Math1-cre positive Männchen mit Math1-cre negativen Weibchen sowie L7-cre positive Männchen mit L7-cre negativen Weibchen verpaart. Die Genotypisierung der Tiere erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung transgenspezifischer Primer (s. Kap. 2.3.2).

Als frühestes adultes Entwicklungsstadium wurde der postnatale Tag 21 festgelegt. Die morphologische Kleinhirnentwicklung der Maus ist an P21 abgeschlossen (Corrales et al., 2006).

Tab. 2.6 Verwendete Mauslinien

Mauslinie	Abkürzung	Veröffentlichung
miR-17~92 ^{flox/flox}	WT	Ventura et al., 2008
Math1	Math1-cre	Matei et al., 2005
miR-17~92 ^{flox/flox} , Math1-cre	Math1-cre-cKO; KcKO	Ventura et al., 2008; Matei et al., 2005
L7	L7-cre	Barski et al., 2000
miR-17~92 ^{flox/flox} , L7-cre	L7-cre-cKO; PcKO	Ventura et al., 2008; Barski et al., 2000
Gt(ROSA) ^{26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J}	mT/mG	Md et al., 2007
miR-17~92 ^{flox/flox} , Math1-cre, mT/mG	Math1-cre-cKO, mT/mG	Ventura et al., 2008; Md et al., 2007

Cre: cyclization recombination, flox: flanked by LoxP; L7: Purkinje-Zell spezifischer Promotor, Math1: Mouse atonal homolog 1 (Körnerzell-spezifischer Promotor), mG: membrane localized enhanced green fluorescent protein (EGFP) miR: micro-Ribonukleinsäure, mT: membrane-localized tdTomato

2.2.2 Zucht- und Haltungsbedingungen von Mäusen

Für die Haltung der Tiere wurden die Vorgaben des geltenden Tierschutzgesetzes eingehalten. Die Tierversuche wurden entsprechend § 8 Abs 1 des TierSchG in Verbindung mit §33 TierSchVersV durch die Bezirksregierung Köln im Vorfeld genehmigt (Aktenzeichen 84-02.04.2017.A120). Die den Mäusen zur Verfügung stehende Käfigfläche und die Besatzdichte richteten sich nach den gesetzlich vorgegebenen Werten, um die biologischen Bedürfnisse der Tiere nach Lokomotion, Nahrungsaufnahme und Ruhe zu erfüllen. Ein konstanter Licht-Dunkel-Rhythmus von 12/12 h wurde bei allen Tieren eingehalten. Die Mäuse erhielten Wasser und Futter *ad libitum*. In einem konstanten Rhythmus von ein- bis zweimal pro Woche wurden die Tiere in saubere Käfige umgesetzt. Für die Altersbestimmung der Tiere wurde der Tag der Geburt bis zur sechsten Stunde der Lichtphase als P0 definiert.

Das körperliche und soziale Verhalten der in der vorliegenden Arbeit verwendeten drei Mauslinien wurde durch die kontinuierliche visuelle Analyse der Mäuse durchgeführt. Hierbei wurde auf ein natürliches Verhalten wie Nestbau, Körperpflege, Futtersuche, Ruhen, Erkunden und Klettern geachtet.

2.2.3 Narkose der Mäuse

In Abhängigkeit vom Alter wurden die Tiere mit einer Überdosis (s. Tab. 2.7) an intraperitoneal appliziertem Injektionsnarkotikum betäubt. Als Narkotikum wurde eine Lösung aus Ketamin (Medistat), Xylazin (Serumwerk) (Ketamin/Xylazin, 10 mg / 2,5 mg / kg Körpergewicht) in 0,9 %igem NaCl (Diaco Biofarmaceutici) verwendet.

Tab. 2.7 Menge des Narkotikums in Abhängigkeit vom Alter der Tiere

Alter der Tiere	Menge des verabreichten Narkotikums
P3	0,10 ml
P5	0,10 ml
P7	0,15 ml
P10	0,25 ml
≤ P21	0,75 ml

P: postnataler Tag

2.2.4 Ganzkörperfixierung von Mäusen durch Perfusion

Nach dem Anästhesieren des Tiers (s. Kap. 2.2.3) wurde der Brustkorb der Maus geöffnet und das noch schlagende Herz frei präpariert. Danach wurde der rechte Ventrikel im unteren Bereich mit einer Flügelkanüle punktiert. Zunächst wurde eine Perfusionslösung (Phosphat-gepufferte Salzlösung, PBS) zum Ausspülen des Blutes und dann eine Fixationslösung

(4 %iges PFA) mittels einer Peristaltikpumpe (TL 230V/50HZ, Meredos GmbH, Bovenden) in die Kanüle gepumpt (s. Tab. 2.8). Über einen Schnitt in das Atrium wurde ein Druckausgleich während der Perfusion erreicht. Anschließend wurde der Kopf des Tieres entfernt und die Schädelkalotte geöffnet, um das fixierte Gehirn frei zu präparieren. Die Nachfixierung der Gewebe erfolgte 1–2 Wochen in 2 %igen PFA bei 4 °C. Das so fixierte Gewebe kann mehrere Jahre bei 4 °C ohne erkennbare Gewebeveränderungen aufbewahrt werden. Es zeigt sich lediglich eine minimale Abnahme der Gewebegröße.

Tab. 2.8 Ringerlösung, Perfusionslösung und Fixans in Abhängigkeit vom Alter der Versuchstiere

Alter der Tiere	Perfusionslösung ml/min	Ringerlösung	Fixans
P3	7,0	3,50 ml	21,0 ml
P5	10,0	7,50 ml	21,0 ml
P7	10,0	7,50 ml	25,0 ml
P10	10,0	7,50 ml	25,0 ml
P15	15,0	10,50 ml	30,0 ml
≤ P21	17,0	12,80 ml	42,5 ml

P: postnataler Tag

2.2.5 Bestimmung des Nass- und Trockengewichts des Gehirngewebes

Das Gewicht des Gehirngewebes wurde bei Tieren unterschiedlichen Alters (P7, P15, P21, P110, > P110) untersucht. Für eine exakte Gewichtsangabe des Kleinhirns wurde das Nass- und Trockengewicht bestimmt. Zunächst wurden die Tiere narkotisiert (s. Kap. 2.2.3) und das Körpergewicht bestimmt. Nach der Dekapitation und Entnahme des Kleinhirns wurde das Nassgewicht des Kleinhirns ermittelt. Im Anschluss wurde das Kleinhirngewebe in einer Vakuum-Konzentrator-Zentrifuge Heraeus (VR-maxi St.a.) (Heto-Holten Allerø, Dänemark) bei 60 °C über Nacht in Eppendorf-Gefäßen mit entferntem Deckel getrocknet. Das Leergewicht der Eppendorf-Gefäße wurde zuvor individuell bestimmt. Nach der Trocknung des Gewebes wurde das Gefäß erneut gewogen. Das Trockengewicht des Kleinhirns wurde aus der Differenz der beiden Werte ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mit der frei zugänglichen Programmier-Software R.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-Isolation aus Schwanzbiopsien der Maus

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde die DNA aus Schwanzbiopsien verwendet. Die Entnahme des etwa 0,5 cm langen Schwanzgewebes erfolgte entweder zum Zeitpunkt des Experiments oder nach dem Anbringen der individuellen Ohrmarkierung. Das Mausgewebe wurde über Nacht (maximal 24 h) in 100 µl Lyse-Puffer aus 10 µl *Dream-Taq*-Puffer, 2,5 µl Proteinase K und 87,5 µl Reinstwasser bei 55 °C in einem Eppendorf-Thermocomfort-Mixer lysiert. Die Zellproteine

wurden dabei durch die Proteinase K abgebaut. Anschließend wurde die Aktivität der Proteinase K gestoppt, indem die Probe für 30 min auf 95 °C erhitzt wurde. Das verbliebene partikuläre Material der Probe wurde bei 14.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde als *Template* in die PCR-Reaktion eingesetzt.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Genotypisierung der Mäuse und Mauslinien wurde eine PCR mit den entnommenen Gewebeproben durchgeführt. Jeweils 2 µl der aus der Schwanzprobe gewonnenen DNA (s. Kap. 2.3.1) wurden mit den *Primer*-Paaren und dem Reaktionsgemisch vermischt und in den PCR-Cycler eingesetzt. Die Reaktionsgemische (s. Tab. 2.9, Tab. 2.11 und Tab. 2.13) und PCR-Programme (s. Tab. 2.10, Tab. 2.12 und Tab. 2.14) variierten in Abhängigkeit von den verwendeten *Primer*-Paaren.

Tab. 2.9 Polymerase-Kettenreaktion-(PCR) -Ansätze zur Identifikation der *Math1-cre* und *L7-cre* Tiere

Math1-cre		L7-cre	
Reaktionsansatz	Menge [µl]	Reaktionsansatz	Menge [µl]
DNA	2,0	DNA	2,00
10 x <i>Dream</i> -Taq-Puffer	2,0	10 x <i>Dream</i> -Taq-Puffer	2,00
25 mM MgCl ₂ [2 mM]	1,6	25 mM MgCl ₂ [2 mM]	0,32
10 mM dNTPs [0,2 mM]	0,3	10 mM dNTPs [0,2 mM]	0,90
Math1-Cre-forward (<i>Primer</i>)	0,5	L7-Cre-forward (<i>Primer</i>)	0,50
Math1-Cre-reverse (<i>Primer</i>)	0,5	L7-Cre-reverse (<i>Primer</i>)	0,50
GAPDH-forward	0,5	GAPDH-forward	0,50
GAPDH-reverse	0,5	GAPDH-reverse	0,50
DMSO	1,2	DMSO	1,20
<i>Dream</i> -Taq-Polymerase	0,3	<i>Dream</i> -Taq-Polymerase	0,20
destilliertes Wasser (dH ₂ O)	10,6	dH ₂ O	11,38
Ansatz	20,0	Ansatz	20,00

Cre: cyclization recombination, *DMSO*: Dimethylsulfoxid, *DNA*: Desoxyribonukleinsäure, *dNTPs*: Desoxynukleosidtriphosphate, *GAPDH*: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, *Math1*: Mouse atonal homolog 1 (Körnerzell-spezifischer Promotor), *MgCl₂*: Magnesiumchlorid,

Tab. 2.10 Polymerase-Kettenreaktion-(PCR) -Programmabläufe zur Amplifikation der *Math1-cre*- und *L7-cre*-Sequenzen

Math1-cre			L7-cre	
Temperatur [°C]	Zeit [min]		Temperatur [°C]	Zeit [min]
94	4	je 30–35 Zyklen	94	0,50
94	0,50		94	0,50
63	1		63	1
72	1		72	1
72	2		72	2
4	Halten		4	Halten

Cre: cyclization recombination, *L7*: Purkinje-Zell spezifischer Promotor, *Math1*: Mouse atonal homolog 1 (Körnerzell-spezifischer Promotor)

Tab. 2.11: Polymerase-Kettenreaktion-(PCR) -Ansätze für Green-fluorescent-protein-(GFP) - und miR-17~92-Cluster-Sequenzen

GFP		miRNA-17~92-Cluster	
Reaktionsansatz	Menge [μ l]	Reaktionsansatz	Menge [μ l]
DNA	2,0	DNA	2,0
10 x <i>Dream</i> -Taq-Puffer	2,0	10 x <i>Dream</i> -Taq-Puffer	2,5
25 mM MgCl ₂ [2 mM]	1,2	25 mM MgCl ₂ [2 mM]	2,0
10 mM dNTPs [0,2 mM]	0,4	10 mM dNTPs [0,2 mM]	0,5
GFP-forward (Primer)	0,5	miR17-92-forward (Primer)	1,0
GFP-reverse (Primer)	0,5	miR17-92-reverse (Primer)	1,0
DMSO	0,8		
<i>Dream</i> -Taq-Polymerase	0,2	<i>Dream</i> -Taq-Polymerase	0,3
dH ₂ O	12,4	dH ₂ O	15,7
Ansatz	18,0	Ansatz	25,0

dH₂O: destilliertes Wasser, DMSO: Dimethylsulfoxid, DNA: Desoxyribonukleinsäure, dNTPs: Desoxynukleosidtriphosphate, GFP: green fluorescent protein, MgCl₂: Magnesiumchlorid, miR: micro-Ribonukleinsäure

Tab. 2.12: Polymerase-Kettenreaktion-(PCR) -Programmabläufe zur Amplifizierung der Green-fluorescent-protein-(GFP) - und miRNA-17~92-Cluster-Sequenzen

GFP			miRNA-17~92-Cluster	
Temperatur [°C]	Zeit [min]		Temperatur [°C]	Zeit [min]
94	3		94	3
94	0,75	je 32–35 Zyklen	94	0,50
50	0,75		53	1
72	1		72	0,66
72	10		72	2
4	Halten		10	Halten

GFP: green fluorescent protein, miR: micro-Ribonukleinsäure

Tab. 2.13: Polymerase-Kettenreaktion-(PCR)-Ansatz für Gender-Sequenzen

Reaktionsansatz	Menge [μ l]
DNA	2,0
10 x Dream-Taq-Buffer	2,5
25 mM MgCl ₂ [2 mM]	1,6
10 mM dNTPs [0,2 mM]	0,5
Gender-forward (Primer)	0,5
Gender-reverse (Primer)	0,5
Dream-Taq-Polymerase	0,3
dH ₂ O	17,1
Ansatz	23,0

dH₂O: destilliertes Wasser, DNA: Desoxyribonukleinsäure, dNTPs: Desoxynukleosidtriphosphate, MgCl₂: Magnesiumchlorid

Tab. 2.14 Polymerase-Kettenreaktion-(PCR)-Programmabläufe für die Amplifizierung der Gender-Sequenzen

Temperatur [°C]	Zeit [min]	
94	5	
94	0,33	Je 35 Zyklen
54	1	
72	0,66	
72	10	
10	Halten	

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden je nach der zu erwartenden PCR-Fragmentgröße 1,5–2 %ige (w/v) Agarose-Gele mit 70–180 ml Gelvolumina gegossen (s. Tab. 2.15). Die Gelelektrophorese wurde in einer Gelkammer mit ionischer Pufferlösung (Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat-(EDTA)-Puffer, TBE) durchgeführt. Die DNA-Proben aus der PCR wurden mit 2 μ l Ladepuffer (Fermentas) versetzt. Jede Geltasche wurden mit 15–18 μ l dieser DNA-Lösung befüllt. Zusätzlich wurden eine Leerprobe mit H₂O statt DNA und ein DNA-Größenstandard aufgetragen. Die angelegte elektrische Spannung betrug je nach Gelkonzentration 65–150 V und die Laufzeit 45–120 min. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente im ultravioletten (UV) Licht wurde dem Agarose-Gel 0,25 μ g/ml Ethidiumbromid zugegeben. Nach der Agarose-Gelelektrophorese wurden die Gele mit Hilfe des Geldokumentationssystems von Biorad fotografiert.

Tab. 2.15 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat	89 mM Tris
(EDTA)-(TBE)-Puffer	89 mM Borsäure 2 mM EDTA pH-Wert 8
6 x Ladepuffer	10 mM Tris-HCl pH-Wert 7,6
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg Ethidiumbromid/ml (Sigma)
DNA-Größenstandard	<i>Gene Ruler plus DNA-Ladder</i> – 100 bp (Fermentas) (0,5 µg/µl) <i>Gene Ruler plus DNA-Ladder</i> – 1 kb (Fermentas) (0,5 µg/µl)

DNA: Desoxyribonukleinsäure, TBE: TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) -Borat-EDTA, EDTA: Ethylendinitrilotetraessigsäure

2.4 Nachweis der miRNA-Expression

2.4.1 Ribonukleinsäure-(RNA)-Isolation

Für die RNA-Isolation aus dem Cerebellum wurde die Zwei-Phasen-Extraktion angewendet. Um möglichst Ribonuklease-(RNase)-frei zu arbeiten, wurde mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes Wasser (Thermo Scientific) benutzt und die Arbeitsfläche sowie alle Geräte mit Chloroform gereinigt. Zur Isolierung der cerebellären RNA wurden die Mäuse zunächst narkotisiert (s. Kap. 2.2.3) und dekapitiert. Das Cerebellum wurde auf Eis präpariert. Das Gewebe (1 ml/100 mg) wurde in Trizol in ein Precellys-Gefäß aufgenommen und mit einem Homogenisator (Precellys 24 VWR International GmbH, Deutschland) mit dem Programm 5 (5.000 rpm, 2 x 20 sec) homogenisiert. Nach dem Ruhen (3 min, Raumtemperatur (RT)) wurden die Proben bei 12.000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entstanden drei Schichten. Die untere Phase enthielt die Proteine, die mittlere weiße Phase die DNA und die obere wässrige Phase die RNA. Die wässrige Phase mit der RNA wurde in ein Nuklease-freies Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurde die gleiche Menge an Isopropanol zugegeben. Die Ansätze wurden sanft gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren für 15 min bei 4 °C und 12.000 g wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit der gefällten RNA zunächst 2-mal mit 75 %igen Ethanol gewaschen und danach jeweils 3 min bei 4 °C für 7.500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde komplett getrocknet und anschließend in 44 µl Diethylpyrocarbonat-(DEPC)-Wasser resuspendiert.

Zur Entfernung eventueller DNA-Reste wurde nach der RNA-Präparation ein Desoxyribonuklease-(DNase)-Verdau durchgeführt. Dazu wurden 5 µl (10 x) DNase-Puffer und 1 µl der DNase zu 44 µl RNA-Probe pipettiert und für 20 min bei 37 °C verdaut. Vor der Inaktivierung des Enzyms bei 75 °C für 10–15 min wurde der Probe 0,6 µl 0,4 mM EDTA zugefügt, um die RNA vor Denaturierung zu schützen.

2.4.2 Bestimmung der Ribonukleinsäure-(RNA)-Konzentration

Im Anschluss wurde der RNA-Gehalt der Proben mit dem Fluorometer Qubit 2.0 der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) und dem *Qubit RNA HS Assay Kit* im UV-Bereich von 260 nm bestimmt. Dafür wurde 1 µl

der Probe zu 199 µl Puffer (enthalten im *Assay Kit*) und 1 µl Enzym (enthalten im *Assay Kit*) gegeben. Die Konzentration wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Extinktion } 260 \text{ nm} \times \text{Verdünnung} \times 40 = \mu\text{g RNA/ml}$$

Für die Bestimmung der Konzentration von DNA-Proben bei 260 und 280 nm wurde das Photometer der Firma Beckmann verwendet. Ein Absorptionwert bei 260 nm von 1,0 entspricht bei proteinfreier doppelsträngiger DNA-Lösung einer Konzentration von 50 µg/ml. Die Reinheit der DNA-Probe wird durch das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 und 280 nm bestimmt, wobei der optimale Wert zwischen 1,7 und 2,0 liegt. Bei abweichenden Werten muss von einer Verunreinigung der Probe durch Proteine oder RNA ausgegangen werden.

2.4.3 Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA)

Zur cDNA-Synthese wurde das *Universal cDNA Synthesis Kit II, 8.64 rxns* von Exiqon verwendet. Nach der Extraktion (s. Kap. 2.4.1) und Quantifizierung (s. Kap. 2.4.2) der Kleinhirn-RNA wurden 10 µl mit einer Gesamt-RNA-Konzentration von 100 ng in die cDNA-Synthese eingesetzt. Pro RNA-Probe wurden 4 µl (5 x) Puffer sowie 2 µl Enzym-Mix verwendet. Die Ansätze wurden auf 20 µl mit Ribonuklease-(RNase)-freiem Wasser aufgefüllt. Die Reverse Transkription wurde in einem Thermocycler (UNO-Thermoblock, Biometra) bei 42 °C für 60 min durchgeführt und durch eine Inkubation der Ansätze für 5 min bei 95 °C beendet. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -80 °C für maximal 14 Tage aufbewahrt.

2.4.4 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR dient der Quantifizierung von DNA. Die Zunahme des PCR-Produkts im Verlauf der Reaktion wurde mit dem DNA-Farbstoff SYBR *Green I* (BioRad, Hercules, USA) verfolgt. Für die qRT-PCR der miRNAs miR-17, miR-19b, miR-92a und der internen Kontrollen U6 *small nuclear RNA* (snRNA) und 5S ribosomalen RNA (rRNA) (s. Tab. 2.5) wurden die für kurze miRNA-Sequenzen entwickelten LNATM-enhanced-microRNA-qPCR-*Primer* der Firma Exiqon verwendet. Für die Reaktion wurden Reaktionsansätze mit den cDNA-Proben (s. Tab. 2.16) in den Thermocycler eingesetzt. Es wurden immer Triplikate der zu amplifizierenden cDNA-Proben verwendet. In jedem Lauf wurde eine „*non-Template*“-Kontrolle mit H₂O mitgeführt, um mögliche Kontaminationen auszuschließen. Für die qRT-PCR-Reaktionen (s. Tab. 2.17) wurde der *Thermocycler C1000 Touch Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) verwendet.

Tab. 2.16 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion-(qRT-PCR)-Reaktionsansätze zur Bestimmung der microRNA-Expression

Reaktionsansatz	Menge [μ l]
cDNA	3
Primer-Mix (forward/reverse)	1
MasterMix iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad)	5
Nuklease-freies H ₂ O	1
Ansatz	10

cDNA: komplementäre Desoxyribonukleinsäure

Tab. 2.17 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion-(qRT-PCR)-Programmabläufe zur Bestimmung der microRNA-Expression

Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min]	
95	0,5	
94	0,08	je 39 Zyklen
60	0,5	
65	0,5	
65	0,08	

2.4.5 Auswertung der qRT-PCR-Läufe

Die Auswertung der qRT-PCR-Läufe erfolgte mit Software *Bio-Rad CFX Manager 3.1* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Während des qRT-PCR-Laufs wurde der *quantification of cycle* (Cq)-Wert jeder Probe ermittelt. Dieser Wert entsprach der Anzahl der PCR-Zyklen (C), die nötig waren, um ein definiertes Basisfluoreszenzniveau zu erreichen. Zu diesem Zeitpunkt (Cq-Wert) überstieg die detektierte Fluoreszenzintensität des PCR-Produkts die Basisfluoreszenzintensität signifikant. Zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz (E) und der optimalen Reaktionsbedingungen der qRT-PCR wurde eine Standardkurve mit bekannter *Template*-Konzentration erstellt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe mit den *Template*-Konzentrationen von 1:10, 1:20, 1:200, 1:2.000 und 1:20.000 von einer Ausgangskonzentration von 5 ng/ μ l in der qRT-PCR vervielfältigt. Aus den Cq-Werten der *Template*-Konzentrationen wurde eine Standardkurve erstellt. Aus der Steigung (*slope*) dieser Standardkurve ließ sich die Effizienz (E) über die Formel: $E=10^{(-1/slope)}$ errechnen. Bei einer optimalen Effizienz verdoppelt sich die Anzahl der PCR-Produkte in jedem Zyklus. In dieser Arbeit wurde eine *Template*-Konzentration von 0,75 ng als optimale Ausgangskonzentration der einzusetzenden Proben bestimmt. Zur Quantifizierung der miRNA-Menge (miR-17, miR-19b, miR-92a) im KcKO und WT-Kleinhirngewebe wurden die Cq-Werte der Zielgene auf die interne Kontrolle 5S rRNA normalisiert. Dazu wurde für jede Probe der Cq-Wert des Kontrollgens (5S rRNA) von dem Cq-Wert des jeweiligen Zielgens (in diesem Fall die miRNAs) subtrahiert:

$$\Delta Cq_{(cKO)} = Cq_{(cKO)} - Cq_{(5S\ rRNA)} \quad \text{bzw.} \quad \Delta Cq_{(WT)} = Cq_{(WT)} - Cq_{(5S\ rRNA)}$$

Verwendet wurde der Cq-Mittelwert der Ausgangsproben-Triplikate. Im Anschluss wurde die relative miRNA-Expression mit Hilfe der $\Delta\Delta Cq$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001) berechnet. Dazu wurden die $\Delta Cq_{(cKO)}$ -Werte auf die $\Delta Cq_{(WT)}$ -Werte normalisiert:

$$\Delta\Delta Cq_{(cKO)} = \Delta Cq_{(cKO)} - \Delta Cq_{(WT)}$$

Zum Schluss wurde die Expressionsrate der $\Delta\Delta Cq_{(cKO)}$ Werte mit einer Amplifikationseffizienz von 100 % errechnet:

$$2^{-\Delta\Delta Cq_{(cKO)}}$$

Im Anschluss wurde das Expressionsniveau der Proben von cKO-Tieren und WT-Tieren verglichen. Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der Cq-Werte erfolgten mit Hilfe des Programms R.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Proteinextraktion aus Gewebe und Zellkulturen

Zur Präparation des Gesamtproteins wurden die primären Körnerzellkulturen (s. Kap. 2.8.3) nach einer eintägigen Inkubation in einer 1,9 cm² großen Kulturplatten durch Zugabe von 500 μ l Trypsin-Lösung (Invitrogen, 15400-054) und Auf- und Abpipettieren abgelöst und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße übertragen. Die Proben wurden bei 14.000 rpm für 3 min sedimentiert. Zur Bestimmung des Gesamtproteins von frisch präpariertem Kleinhirngewebe (s. Kap. 2.8.3) wurde das Kleinhirngewebe direkt nach dem Trypsinisieren sedimentiert. Für eine Proteinbestimmung nach Pierce (s. Kap. 2.5.2) wurden die Pellets in 1 ml *Radioimmunoprecipitation-Assay*-(RIPA)-Puffer (s. Tab. 2.18) resuspendiert. Für eine Separation von filamentärem (F) und globulärem (G) Aktin (s. Kap. 2.5.3) wurde die Pellets in 1 ml PBS aufgenommen.

Tab. 2.18 Lösungen für die Proteinextraktion

Radioimmunoprecipitation-Assay-(RIPA)-Puffer	50 mM Tris, pH 8,0
	150 mM NaCl
	1 % NP-40
	0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
	0,5 % Natriumdexocholat

NaCl: Natriumchlorid, NP-40: Zellysepuffer

2.5.2 Proteinbestimmung nach Pierce (*Bicinchoninic Acid*, BCA)

Der Proteingehalt in den Zellproben der Körnerzellkulturen wurden mittels BCA-Protein-Assay und dem *Pierce-BCA-Protein-Assay-Kit* der Firma *Thermo Scientific* bestimmt. Für die Messung wurden die Proben als Doppelansatz in einem Volumen von 10 μ l in die *Wells* einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Als Standardkurve wurde aus einer Albumin-Standardlösung (2 mg/dl) und dem Proteinproben-Puffer Gemisch eine Konzentrationsreihe hergestellt (125–2000 μ g/ml). 200 μ l der nach Herstellerangaben angesetzten *BCA-Working-Solution* (Reagenz A + Reagenz B im Verhältnis 50:1) wurden zu jeweils 200 μ l der Proben, Leerproben (*Radioimmunoprecipitation-Assay*-(RIPA)-Puffer) und die

Proteinstandards gegeben. Nach kurzem Invertieren wurden die Platten 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend bei RT kurz abgekühlt. In einem Mikroplattenspektralphotometer (μ Quant, BioTek Instruments, Bad Friedrichshall) wurde bei 565 nm die Absorption gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte mit Hilfe der Kalibrierungskurve der Standardproteine und der ermittelten Absorptionswerte der Proben.

2.5.3 Aufreinigung von filamentärem (F) und globulärem (G) Aktin

Die Separation von F-Aktin und G-Aktin aus Zellpellet erfolgte nach der Resuspension in 1 ml PBS (s. Kap. 2.5.1). Die resuspendierte Zellprobe wurde erneut für 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen; je nach Zellmenge wurden 50 bzw. 100 μ l PBS sowie die gleiche Menge an 2 x PHEM-Puffer mit 2 % TritonX-100 zugegeben (s. Tab. 2.19). Die Zellyse wurde mit einem manuellen *Douncer* aus Glas für maximal 1 min unterstützt. Im Anschluss blieben die Proben für 15 min auf Eis und wurden dann erneut für 10 min bei 4 °C mit 15000 rpm zentrifugiert.

Tab. 2.19 Lösungen für die F- und G-Aktin-Aufreinigung

10 x PHEM-Puffer	600 mM Piperazin-N, N'-bis(2-Ethansulfonsäure) (PIPES) (1,810 g)
	200 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure (HEPES) (0,477 g)
	100 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA) (0,380 g)
	20 mM Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) (0,041 g)
	auf 10 ml H_2O , pH 7–7,4

H₂O: Wasser

80 bzw. 160 μ l des Überstands mit dem G-Aktin wurden abgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach der Zugabe von 20 bzw. 40 μ l 6 x SDS Probenpuffer (s. Tab. 2.20) wurde die Probe für 10 min bei 95 °C erhitzt. Der restliche Überstand wurde verworfen. Das Pellet mit dem F-Aktin wurde in 125 bzw. 250 μ l 1 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und ebenfalls 10 min aufgekocht. Die Proben (Menge abhängig vom Experiment) wurden auf 10 % frisch angesetzte SDS-Polyacrylamid-Gele (s. Tab. 2.20 und Tab. 2.21) aufgetragen. Die Stromstärke im Gel betrug bis zur Aufkonzentrierung der Proben an der Grenze zum Trenngel 15–30 mA. Danach wurde die Stromstärke auf 70–100 mA erhöht. Als Größenmarker wurde die *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fermentas, Litauen) verwendet.

Tab. 2.20 Lösungen für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Lösung	Zusammensetzung
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris, pH 6,8 0,4 % SDS
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris, pH 8,8 0,4 % SDS
Acrylamid/Bis-Acrylamid 40 % (w/v)	AccuCel 29:1 (National Diagnostics)
SDS-Elektrophorese-Puffer (10 x)	250 mM Tris 192 mM Glycin 1,0 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (6 x)	120 mM Tris/HCl pH 6,8 24 % (w/v) Glycerin 2,4 % (w/v) SDS 10 % 0,0012 % (w/v) Bromphenolblau 2 % 6 % (v/v) β -Mercaptoethanol

SDS: Natriumdodecylsulfat, TRIS: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Tab. 2.21 Zusammensetzung der Natriumdodecylsulfat-(SDS)-Polyacrylamid-Gele

Trenngel (10 %)	[ml]	Sammelgel (5 %)	[ml]
Trenngel-Puffer	3,000	Sammelgel-Puffer	0,630
H ₂ O	5,760	H ₂ O	3,650
Acrylamid	3,000	Acrylamid	0,625
SDS (10 %)	0,120	SDS (10 %)	0,050
Ammoniumpersulfat (APS) (10 %)	0,120	Ammoniumpersulfat (APS) (10 %)	0,050
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	0,005	Tetramethylethyldiamin (TEMED)	0,005

H₂O: Wasser, SDS: Natriumdodecylsulfat

2.5.4 Western-Blot-Analyse

Die im SDS-Gel aufgetrennten, negativ geladenen Proteine wurden mittels Elektrotransfer (*Trans-Blot-Turbo-Transfer System* (BioRad, Deutschland)) auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF, Millipore, IPVH00010) übertragen. Vor dem Transfer wurden die Membranen für 3 min in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer (s. Tab. 2.22) für 5–10 min äquilibriert. Der Transfer erfolgte bei 25 V für 10 min, die Stromstärke betrug 1,3 A. Die Gele wurden zur Abschätzung der Proteinmengen temporär mittels *GelCodeBlue Stain Reagent* (Thermo Scientific, USA) angefärbt. Dann wurden die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran mit Blockierungspuffer für 2–4 h bei RT blockiert. Hiernach erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (s. Tab. 2.23) in Blockierungspuffer über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde die Membran mit *Tris-buffered saline* mit Tween20 (TBST) 3-mal für 5–10 min gewaschen. Danach wurde der zweite Antikörper (Verdünnung: 1:20000) in Blockierungspuffer auf die Membran gegeben und für 2–4 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach erneuten Waschschritten wurde der gebundene Antikörper mit dem *SuperSignal West Pico*

(Thermo Scientific, USA) bzw. dem *SuperSignal West Femto* (Thermo Scientific, USA) ECL Substrat nachgewiesen. Die Fotodokumentation erfolgte mit dem Western-Blot-Detektor (*ImageQuant LAS 4000 Mini*, GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, UK). Die Belichtungszeiten variierten in Abhängigkeit von den verwendeten Antikörpern und dem Substrat. Für die Überprüfung, ob die Proteine auf die Membran übertragen wurden, wurde der Farbstoff Ponceau S verwendet. Die Auswertung der fotodokumentierten Proteinbanden erfolgte mit der frei zugänglichen *Software ImageJ* und dem Toolkit *Gels* (s. Kapitel 7.1.1).

Tab. 2.22 Lösungen für das Western-Blot-Verfahren

Semi-dry Transferpuffer	48 mM Tris, pH 8,0 38 mM Glycin 10 % Methanol
Tris-buffered saline TBS (10 x)	50 mM Tris 150 mM NaCl, pH 7,5
Tris-buffered saline mit Tween20 (TBST)	1 x TBS mit Zusatz von 0,1 % Tween20
Ponceau S	0,5 % Ponceau S 1 % Eisessig
Blockierungspuffer	5 % Milchpulver 3 % Rinderserumalbumin (BSA) In 1 x TBS gelöst, filtriert

NaCl: Natriumchlorid, TRIS: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Tab. 2.23 Liste der verwendeten Primärantikörper für das Western-Blot-Verfahren

Antigen	Ursprung	Hersteller	Verdünnung
Aktin β	Maus IgG	Sigma	1:10.000
Cyclophilin B	Kaninchen IgG	Abcam	1:10.000
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	Kaninchen IgG	Abcam	1:10.000
Histon-Deacetylase (HDAC1)	1 Kaninchen	Therm Scientific	1: 1000
<i>Neuronal nuclear protein</i> (NeuN)	Maus IgG	Millipore	1: 1000

IgG: Immunglobulin G

2.6 Histologische und immunhistochemische Methoden

2.6.1 Herstellung von Vibratomschnitten

Zur Generierung unterschiedlich dicker Gewebsschnitte für die Golgi- und Nissl-Färbung sowie für immunzytochemische Färbungen wurden fixierte und auf einer Seite mit einer Rasierklinge begradigte Gehirne mit Sekundenkleber auf einen

Vibratomblock fixiert. Die aufgeklebten Gehirne wurden durch 4 %ige Agarose-Blöcke, die um das aufgeklebte Gewebe gelegt und ebenfalls aufgeklebt wurden, stabilisiert. Der vorbereitete Vibratomblock wurde so in die Vibratomwanne gesetzt, dass die horizontal eingespannte und vibrierende Rasierklinge sagittal durch das fixierte Gewebe schneiden konnte. Dabei waren sowohl die Klinge als auch das Gehirn in PBS getaucht. Für die immunhistochemische-, Immunfluoreszenz- und Nissl-Färbung betrug die Schnittdicke 25–40 µm, für die Hämatoxylin/Eosin- und Golgi-Färbung 100–200 µm.

2.6.2 Immunfluoreszenzanalysen an Vibratomschnitten

Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden die Vibratomschnitte zunächst in Eppendorf-Gefäße überführt und für 30 min bei 80 °C in *Saline-sodium-citrate*-(SSC) -Lösung erhitzt, um die Zugänglichkeit des Antigens für den Primärantikörper zu erhöhen (s. Tab. 2.24). Vor dem Waschschrift mit PBS wurden die Schnitte in 12-Well Platten überführt. Zur Permeabilisierung wurden die Schnitte mit 0,5 %iger Triton-X-100/PBS-Lösung bei RT für 30 min inkubiert und danach erneut zweimal mit PBS gewaschen. Die Absättigung von unspezifischen freien Proteinbindestellen erfolgte mit einer Gelatine (0,2 %) / Ziegen-Serum (2 %) / PBS-Lösung für 2 h bei RT. Die Schnitte wurden mit dem Primärantikörper (s. Tab. 2.25) in Blockierungslösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurde der Sekundärantikörper (s. Tab. 2.25) auf die Schnitte gegeben und für mindestens 1 ½ h inkubiert. Zur Markierung der Zellkerne wurden die Schnitte mit 1 ml Hoechst-Lösung (Hoechst 33342 (≥ 98 %, B2261) (Sigma), 20 µg/ml in PBS) bedeckt und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit PBS und viermal mit ddH₂O gewaschen. Die fertigen Schnitte wurden mit einem Fluoreszenz-stabilisierenden Medium (Fluorescence Mounting Medium; Dako North America, Carpinteria, USA) eingedeckelt und bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Tab. 2.24 Saline sodium citrate (SSC) Lösung

<i>Saline sodium citrate</i> (SSC) (20 x)	Substanzen	Pro Liter
	NaCl 3 M	175,3 g
	Natriumcitrat 0,3 M	88,2 g
	mit HCl auf pH 7,0	
	ddH ₂ O	auf 1 l

ddH₂O: zweifach destilliertes Wasser, NaCl: Natriumchlorid

Tab. 2.25 Liste der Primär- und Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz an Vibratomschnitten

Primärantikörper			
Antigen	Ursprung	Hersteller	Verdünnung
<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> (PCNA)	Kaninchen IgG	Abcam	1:500
Caspase 3	Kaninchen IgG	Cell Signaling	1:500
Phospho-Histon H3 (pH3)	Kaninchen IgG	Millipore	1:200
Calbindin	Kaninchen IgG	Sigma	1:800
<i>Neuronal nuclear protein</i> (NeuN)	Maus IgG	Millipore	1:100
Sekundärantikörper			
Konjugat	Spezifität	Hersteller	Verdünnung
AlexaFlour 546	Ziege Anti-Maus IgG	Molecular Probes	1:500
AlexaFlour 546	Ziege Anti-Kaninchen IgG	Molecular Probes	1:500
AlexaFlour 488	Ziege Anti-Maus IgG	Invitrogen	1:800
AlexaFlour 488	Ziege Anti-Kaninchen IgG	Invitrogen	1:800
Streptavidin 488	Ziege Anti-Maus IgG	Vector	1:450

IgG: Immunglobulin G

2.6.3 Hämatoxylin/Eosin-Färbung an Vibratomschnitten

Für die Hämatoxylin/Eosin-Färbung wurden die Schnitte zunächst auf einen Objektträger gezogen und komplett getrocknet, sodass sie sich während der Färbeprozedur nicht mehr ablösen. Anschließend erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin (1 g Hämatoxylin (Chroma, 2C 163), 0,2 g Natriumiodat, 50 g Aluminiumkaliumsulfat, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure auf 1 L dH₂O sterilfiltriert) bis eine Färbung zu erkennen war. Durch die Veränderung des pH-Wertes auf > 3 mittels Leitungswassers wurden die Schnitte „gebläut“. Durch die Gegenfärbung mit Eosin wurde das Zytoplasma rot angefärbt. Die Eosin-Lösung wurde frisch mit einem Tropfen Eisessig angesetzt (0,1 g Eosin/100 ml dH₂O) und für 5–10 min auf die Schnitte gegeben. Nach dem Waschgang mit Leitungswasser für 1–5 min, um überschüssige Färbelösung zu entfernen, wurden die Schnitte mit 90 %igem und 100 %igem Ethanol zweimal für jeweils 5 min dehydriert. Im Anschluss folgten zwei Waschschritte für 3 min mit Xylol. Die fertigen Schnitte wurden mit DePeX eingedeckelt.

2.6.4 Nissl-Färbung an Vibratomschnitten

Für die Nissl-Färbung wurden die Schnitte auf einem Objektträger komplett getrocknet, um ein Ablösen während der Färbung zu verhindern. Dann wurden sie mit 0,1 g Kresylviolett, / 100 ml dH₂O inkubiert, der 10 Tropfen reine Essigsäure zugegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von 10–15 min wurde die Lösung gründlich mit dH₂O abgespült und die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (90 %iges und 100 %iges Ethanol) zweimal für 5 min dehydriert. Im letzten Schritt wurde die Schnitte zweimal für 3 min mit Xylol gewaschen und mit DePeX eingedeckelt.

2.6.5 Immunhistochemische Analysen (Avidin-Biotin-Methode)

Die Avidin-Biotin-Methode (ABC-Methode) wird für stabile Immunfärbungen an Gewebeschnitten genutzt (Dodson, 2002; Guesdon et al., 1979). Die Methode wurde erstmals von Hsu et al. (1981) beschrieben. Vor der Färbung der Gewebeschnitte (Dicke 25 µm) wurde die endogene Peroxidase mit 10 % Methanol und 0,3 % H₂O₂ in PBS blockiert. Um die Penetration der Antikörper zu erleichtern, wurden die Schnitte mit 0,3–0,5 % Triton-X-100/PBS/0,02 % Natriumazid permeabilisiert. Zwischen den Arbeitsgängen wurden die Schnitte jeweils dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen des Primärantikörpers wurden die Schnitte mit 4 % BSA / 5 % *Normal Goat Serum* / PBS-Blockierlösung für 2 h bei RT inkubiert. Der Primärantikörper wurde nach Herstellerangaben in Blockierlösung angesetzt und über Nacht auf die Gewebeschnitte gegeben (s. Tab. 2.26). Danach wurden die Schnitte mit dem biotinyliertem Sekundärantikörper für mindestens 2 h inkubiert (s. Tab. 2.26). Das ABC-Komplex-Reagenz wurde nach Herstellerangaben frisch angesetzt. Dafür wurden 2 Tropfen der Lösung A in 10 ml PBS gegeben, vermengt und anschließend zwei Tropfen der Lösung B hinzugegeben. Die Gewebeschnitte wurden 30 min in dem ABC-Komplex-Reagenz inkubiert. Nach der Reaktion wurden die Schnitte mit 50 mM Tris (pH 8) Lösung bedeckt, und anschließend zur Entfernung von Salzen mit dH₂O dreimal für 10 min gewaschen. Abschließend wurden die Ansätze 15–45 min mit der chromogenen Substratlösung 3-Amino-9-Ethylcarbazol (*Vektor NocaRed Substrate Kit (for peroxidase)*) inkubiert. Ein rotes Präzipitat im Gewebeschnitt entsprach den Antigen-Antikörper-Komplexen. Die Substratlösung wurde mit dH₂O von den Schnitten abgespült. Nach der Trocknung auf einem Objektträger wurden die Schnitte mit Entellan (Merck) eingedeckelt.

Tab. 2.26 Liste der Primär- und Sekundärantikörper der Avidin-Biotin-Färbung an Schnitten

Primärantikörper			
Antigen	Ursprung	Hersteller	Verdünnung
<i>Neuronal nuclear protein (NeuN)</i>	Maus monoklonal	Millipore	1:100
Calbindin D28k	Kaninchen monoklonal	Sigma	1:2000
Sekundärantikörper			
Bezeichnung	Ursprung	Hersteller	Verdünnung
GAM biotinylated	Ziege (anti mouse) IgG	Vector	1:450
GAR biotinylated	Ziege (anti-rabbit) IgG	Vector	1:600

IgG: Immunglobulin G

2.6.6 Golgi-Färbung an Vibratomschnitten

Die Morphologie der Körnerzellen mit deletiertem miR-17~92-Cluster (KcKO) sollte mit der von WT-Körnerzellen verglichen werden. Die zu den ältesten Methoden der Hirnforschung zählende Golgi-Imprägnationsfärbung (Golgi, 1873) erlaubt die

komplette Darstellung einzelner Nervenzellen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine eigene Golgi-Färbemethode auf Basis der von Colonnier (1964) entwickelten und durch Patro et al. (2013) modifizierten Methode etabliert (Colonnier, 1964; Patro et al., 2013). Durch die systematische Variation der Perfusionsart (mit/ohne Perfusion), der Fixierungszeiten (48 h – 7 Tage), der Fixierungsmedien (4 % PFA oder Varianten des *Quick-Golgi-Fixatives* (QGF) s. Tab. 2.27), der Inkubationszeiten (48 h – 7 Tage) und der Zusammensetzung der Inkubationsmedien (QGF, QGF2 (QGF mit doppelter Menge an Formaldehyd), 3 % Zinkchromat anstelle von Kaliumdichromat in QGF, QGF mit 15 % Sucrose oder QGF mit 0,1 % Triton X-100) wurde eine Golgi-Färbungsmethode zur präferierten Markierung von Purkinjezellen, Bergman-Gliazellen und Körnerzellen in adulten Vibratom-Kleinhirnschnitten entwickelt (s. Tab. 2.28; weitere Details siehe Czechowska et al. (2019)).

Tab. 2.27 Lösungen für die Golgi-Färbung

Quick Golgi Fixative (QGF)	5,0 % Kaliumdichromat 2,2 % Chloralhydrate 2,2 % Formaldehyd 2,0 % Glutaraldehyd 0,1 % Dimethylsulfoxid
Silbernitrat-Lösung	0,75 % Silbernitrat (AppliChem) in dH ₂ O

dH₂O: destilliertes Wasser

Tab. 2.28: Protokolle zur präferierten Markierung von cerebellären Zelltypen

	Körnerzellen	Purkinjezellen	Bergmann-Gliazellen
Perfusion	PBS und QGF	-	-
Fixation	QGF (48 h)	4 % PFA (48 h) QGF2 (48 h)	QGF (7 Tage)
Inkubation	Silbernitrat (48 h)	Silbernitrat (48 h)	Silbernitrat (7 Tage)

PBS: phosphate-buffered saline, PFA: Paraformaldehyd, QGF: Quick-Golgi-Fixative

Anfärbung der cerebellären Körnerzellen

Für die Anfärbung der cerebellären Körnerzellen wurden 15 Tage alte Mäuse betäubt (s. Kap. 2.2.3) und anschließend mit 15 ml PBS und danach mit 35 ml QGF perfundiert (s. Tab. 2.27). Das entnommene Kleinhirn wurde entlang der mediosagittalen Linie in zwei gleichgroße Hälften geteilt, in Watte eingebettet und in 20 ml QGF für 48 h im Dunkeln imprägniert. Im Anschluss wurde das Kleinhirn in 0,75 %iger Silbernitrat-Lösung vorsichtig gewaschen und für weitere 48 h im Dunkeln in 20 ml 0,75 %iger Silbernitrat-Lösung unter kontinuierlichem sanftem Schütteln inkubiert. Die Herstellung der Vibratomschnitte (100–200 µm dick) erfolgte wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben, anstelle des PBS wurden die Schnitte zum Schneiden aber in 70 %iger Ethanol-Lösung getaucht. Danach wurden die Schnitte mittels einer Alkohol- und Xylol-Reihe entwässert und mit DePeX eingedeckelt.

Die fertigen Schnitte wurden als *Z-Stack* fotografiert. Dafür wurde der auszuwertende Bereich mit deutlich angefärbten Körnerzellen ausgewählt. Die einzelnen Bilder des *Z-Stack* wurden zu einem überlagerten Bild zusammengeführt. Mit der Hilfe der frei zugänglichen *Software ImageJ* wurden die Somata und die Dendriten der Körnerzellen manuell erfasst und ausgemessen (Umfang, Fläche, Länge). Im anterioren Teil des Kleinhirns wurden die Lobuli II und III, im posterioren Teil

der Lobulus IX ausgewertet, dabei wurden pro Lobulus 30–40 Körnerzellen analysiert. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der frei zugänglichen *Software R*.

Anfärbung juveniler Purkinjezellen

Die Golgi-Färbung von juvenilen Tieren im Alter von 8 Tagen unterscheidet sich von denen der adulten Tiere. Die entwickelten Protokolle zur Anfärbung von cerebellären Zelltypen im Kleinhirn adulten Tiere konnten nicht übernommen werden (Czechowska et al., 2019). Deshalb wurde das Protokoll zur Färbung von Purkinjezellen in adulten Tieren wie folgt modifiziert:

Vor der Dekapitation des Gehirns wurden die Tiere mit PBS perfundiert. Die Fixierung des Kleinhirns in 4 % PFA erfolgte statt zwei Tage vier Tage. Die Inkubation der Gehirne (in Watte eingewickelt) erfolgte in QGF nicht in QGF2 (QGF mit doppelter Menge an Formaldehyd). Im weiteren Verlauf wurde wie mit adulten Kleinhirnen, siehe oben (Anfärbung der cerebellären Körnerzellen) verfahren. Die Gehirne wurden für 48 h in 0,75 %ige Silbernitrat-Lösung inkubiert. Im letzten Schritt wurden Vibratomschnitte in 75 %igen Ethanol hergestellt und die Schnitte mit DePeX eingedeckelt.

Zur Analyse der Purkinjezellen wurden *Z-Stacks* der auszuwertenden Zellen angefertigt und mit Hilfe von *ImageJ* ausgewertet, dabei wurden pro Tier 2-4 Zellen analysiert. Für die Bestimmung der Anzahl und des Abstands der Dendriten-Kreuzungspunkte (beginnend mit einem definierten Abstand vom Somata-Mittelpunkt der Purkinjezelle) wurde das *Plugin* zur Sholl-Analyse von 2D-Bildern verwendet (Kroner et al., 2014; Stanko et al., 2015). Alle Bilder wurden mit derselben Grundeinstellung ausgewertet und anschließend mit der *Software R* statistisch untersucht.

2.7 Bioinformatische Methoden

2.7.1 Zielgenanalyse der miR-17~92-Cluster-Familie

Von der großen Anzahl der vermuteten miRNA-mRNA-Interaktionen wurde bisher nur wenige experimentell durch Mikroarray-, Reporter-Assay- und Western-Blot-Analysen nachgewiesen. Meistens wurden potentielle Zielgene durch Algorithmen bioinformatisch identifiziert. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die miRNA-mRNA-Interaktionen für das miR-17~92-Cluster und für die miRNA-17~92-Cluster-Familie (+ miRNA-106a~363 und miRNA-106b~25) bioinformatisch analysiert. Mit der *DIANA-miRPath v3.0 Software* (Vlachos et al., 2015) auf der Basis der Datenbank *TargetScan v6.2* (Friedman et al., 2009; Grimson et al., 2007; Lewis et al., 2005) wurden *Kyoto Encyclopedia of genes and genomes databases* (KEGG) Signalweg-Analysen durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurden der *Fisher's Exact Test*, *EASE score* (Hosack et al., 2003) in der *DIANA-miRPath v3.0 Software* ausgewählt und nur die Ergebnisse mit einer Signifikanz von $p \leq 0,05$ für die weitere Auswertung verwendet.

Die identifizierten Signalwege wurden auf ihre Relevanz in der cerebellären Kleinhirnentwicklung und speziell für Körnerzellen überprüft. Mittels Literaturrecherchen wurde die Expression der Zielgene in cerebellären Körnerzellen und die Funktion der Signalwege evaluiert. Die durch die miR-17~92-Cluster-Familie beeinflussten Signalwege wurden anschließend mit einem R-Skript und dem Packet „*heatmap*“ visualisiert.

2.8 Zellkulturmethoden

2.8.1 Kultivierung von Zellen

Tab. 2.29 gibt eine Übersicht, über die für Zellkulturarbeiten benutzten Medien und Lösungen.

Tab. 2.29 Übersicht über die verwendeten Zellkulturlösungen

Lösung	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ * 7 H ₂ O 1,8 mM KH ₂ PO ₄
HANK's-Lösung (pH 7,2) modifiziert und steril filtriert	137 mM NaCl 5 mM KCl 0,7 mM Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O 5 mM Glucose * 2 H ₂ O 2,5 mM CaCl ₂ * 2 H ₂ O 1,2 mM MgSO ₄ * 7 H ₂ O 4,17 mM NaHCO ₃
Penicillin und Streptomycin	1 % (10.000 U/ml) (Gibco)
Medium für Primärzellkultur	Neurobasalmedium (Gibco) 2 % B27 Supplement 0,02 mM GlutaMAX
Trypsin-Inhibitor-Lösung	9,8 ml Soybean Trypsin Inhibitor (8 mg/ml in PBS) 800 µl 10 % BSA in PBS
Trypsin-Lösung	50 ml PBS pH 7,5 20 mg Trypsin 10 mg EDTA-Natriumsalz
Laminin	1 mg/ml (Sigma, L2020)
Poly-L-Lysin (1 x)	100 x Poly-L-Lysin Hydrobromid [2 mg/ml] (Sigma); Verdünnung 1:100 in dH ₂ O

BSA: Rinderserumalbumin, CaCl₂: Kalziumchlorid, dH₂O: destilliertes Wasser, EDTA: Ethylendiamintetraacetat, H₂O: Wasser, KCl: Kaliumchlorid, KH₂PO₄: Kaliumdihydrogenphosphat, MgSO₄: Magnesiumsulfat, NaCl: Natriumchlorid, NaHCO₃: Natriumhydrogencarbonat, NaH₂PO₄: Dinatriumhydrogenphosphat, PBS: Phosphate-buffered saline

Die Zellkulturexperimente erfolgten unter sterilen Bedingungen an Präparations- und Sterilbänken in einer Umgebung der Sicherheitsstufe S1. Die verwendeten Materialien, Geräte und Lösungen wurden autoklaviert, heißluftsterilisiert oder sterilfiltriert. Die mit murinem/transfizierem Zellmaterial in Kontakt gekommenen Materialien oder Geräte wurden mit 70 %igem Alkohol desinfiziert, autoklaviert und vorschriftsmäßig entsorgt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank mit Kohlenstoffdioxid-(CO₂)-Begasung im offenen System bei 37 °C mit 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von 95 %

kultiviert. Für die unterschiedlichen Experimente wurden sterile Zellkulturschalen verschiedener Größe (s. Tab. 2.30) mit oder ohne Glasplättchen verwendet.

Tab. 2.30 Übersicht über die in der Zellkultur verwendeten Kulturschalen

Kulturschalen	Wachstumsfläche [cm ²]	Füllmenge [ml]
6-Well	9,6	2–5
12-Well	3,9	2–4
24-Well	1,9	0,5–3
96-Well	-	0,1–0,3

Zur Verbesserung der Haftung der primären Körnerzellen wurden die Kulturträger mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dazu wurden die Kulturträger 2 h bei 37 °C mit Poly-L-Lysin (1 µg/ml) inkubiert, anschließend zweimal mit dH₂O gewaschen und unter der Sterilbank vollständig getrocknet. Die beschichteten Platten wurden bis zur Benutzung im Kühlschrank für maximal einen Tag aufbewahrt. Zusätzlich zu der Poly-L-Lysin-Beschichtung wurden die 24-Well-Platten für einige Versuche mit Laminin beschichtet. Dazu wurden die mit Poly-L-Lysin beschichteten Wells für 2 h bei 37 °C mit Laminin (10 µg/ml in PBS) inkubiert. Anschließend wurde die Wells mit dH₂O gewaschen, mit Medium bedeckt und bis zur Benutzung im Brutschrank für maximal einen Tag aufbewahrt.

2.8.2 Fixierung von Zellen

Die Zellen wurden mit auf RT erwärmten PBS gewaschen und anschließend mit auf RT erwärmter 4 %iger PFA-Lösung für 10 min bei RT fixiert. Nach Entfernung der Fixierlösung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in PBS bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.8.3 Präparation der Kleinhirne und Herstellung von Dissoziationskulturen von Primärzellen

Bei sieben Tage alten, mit einer Schere dekapitierten Mäusen, wurde die Schädeldecke medial in anterior-posterior Richtung mit einer Pinzette geöffnet. Das Gehirn wurde entnommen und in eisgekühlte HANK's-Lösung (s. Tab. 2.29) überführt. Unter einer Präparationslupe wurden das Cerebellum vom restlichen Gehirn getrennt und die Meningen entfernt. Danach wurde das Cerebellum zerkleinert und in 1 ml Trypsin-Lösung (s. Tab. 2.29) bei 37 °C für 15 min inkubiert. Die Enzymaktivität wurde durch Zugabe eines doppelten Volumens einer Trypsin-Inhibitor-Lösung (s. Tab. 2.29) gestoppt. Die mechanische Dissoziation der Zellen erfolgte durch die Passage durch ein feines Zellsieb (Porendurchmesser 250 µm). Die Zellsuspension wurde für 8 min bei 1400 rpm sedimentiert. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml Medium für die Primärzellkultur (NB-Medium) resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Primärzellen wurden in einer Dichte von 5×10^4 in 2 cm² Well-Platten ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C kultiviert.

Für die Herstellung primärer Zellkulturen des anterioren bzw. posterioren Teils des Cerebellums wurden die Lobuli II–III bzw. Lobuli IV–X nach dem Entfernen der Meningen (s. o.) getrennt aufgearbeitet.

2.8.4 Time-lapse *in vitro* Migrationsanalyse

Für die Migrationsanalysen wurden Primärzellen von 7 Tage alten Mäusen benutzt, die auf Poly-L-Lysin und Laminin-beschichtete 24-Well-Platten (ohne Glasplättchen) ausgesät wurden (s. Kap. 2.8.3). Vor Beginn des Experimentes wurden die ausgesäten Zellen für 4 h im Brutschrank kultiviert, um eine Anhaftung der Zellen an die Oberfläche zu gewährleisten. Zur Analyse der Auswirkung der Zelldichte auf das Migrationsverhalten wurden verschiedene Ausgangsdichten (20.000 Zellen/Well, 50.000 Zellen/Well und 100.000 Zellen/Well) verwendet. In allen Versuchsansätzen stammten die Zellen jeweils von einem Tier. Zusätzlich wurde aus den Zellen mehrerer Tiere gleichen Genotyps ein Zellpool gebildet und analysiert. Für die Zeitrafferaufnahmen wurde das Mikroskop DMIRE2 (Leica, Bensheim) genutzt, in dessen Inkubationskammer die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ während des Experiments kultiviert wurden. Das Mikroskop (Leica DMIRE2) war mit einer *Charged-coupled-device*-(CCD)-Kamera (DFC350FX, Leica) ausgerüstet. Die Aufnahmen (1392 x 1040 Pixel, 1 Pixel entsprach 0,27 µm) erfolgten bei einer geringen Vergrößerung (N-Plan 20 x/0,04, Leica) in 10 min Abständen an vier Positionen des Wells. Die Belichtungszeit blieb konstant, die Fokussierung erfolgte automatisch.

2.8.5 Auswertung der Time-lapse *in vitro* Migrationsanalyse

Die Bearbeitung des Bildmaterials erfolgte mit Hilfe des *Open-Source*-Programms ImageJ. Mit dem *Plugin MTrackJ* (<http://www.imagescience.org/meijering/software/mtrackj/>) wurden die Zellen manuell verfolgt und ihre Migrationsstrecken für die statistischen Auswertungen ermittelt. Jeder markierte Punkt des Migrationsweges wurde als X- und Y-Koordinaten gespeichert. Je nach Fragestellung wurden 10–20 Zellen pro Well-Position verfolgt, sodass pro Well 20–80 Zellen analysiert wurden.

Die Körnerzellen im Kleinhirn der Maus migrieren bis zu ihrer endgültigen Position in der IGL an P15. Der Höhepunkt ihrer Proliferation liegt zwischen P4 und P8. Das Migrationsverhalten wird durch Signalstoffe und Wechselwirkungen mit anderen Neuronen gesteuert (Marín et al., 2010). In dem vorliegenden *in vitro* Versuchsaufbau (s. Kapitel 2.8.4) fehlten diese Signale. Daher war nur eine Analyse der Migrationsgeschwindigkeit, der Art der Migration (gerichtet vs. ungerichtet), die allgemeine Motilität, sowie die Morphologie der Zellen *in vitro* möglich. Die Zellbewegung wurde mittels mittlerer quadratischer Teilchenverschiebung (engl. *mean square displacement*, MSD) berechnet. Die MSD erlaubt eine Aussage über die Strecke und die Direktionalität der Wanderung einer Zelle pro Zeiteinheit. Dabei kann anhand der MSD-Kurvenverläufe eine Aussage über die Art und Weise der Zellbewegung getroffen werden. Ein linear steigender MSD-Kurvenverlauf weist auf eine ungerichtete Zellbewegung mit einer Abfolge rein zufälliger und voneinander unabhängiger Schritte hin, wohingegen ein superlinearer oder sublinearer Kurvenverlauf auf eine gerichtete, beziehungsweise beeinträchtigte Bewegung der Zellen hindeutet. Neben der Art der Zellwanderung lässt sich anhand der Steilheit der MSD-

Kurvensteigung auch die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit der Zellen ableiten (Dickinson and Tranquillo, 1993; Sistig et al., 2017). Die weitere statistische Auswertung wurde in R (<http://www.r-project.org/>) durchgeführt.

2.9 Mikroskopie und fotografische Dokumentation

Alle mikroskopischen Übersichtsaufnahmen der mit Nissl-gefärbten Kleinhirnschnitte wurden mit dem aufrechten Mikroskop von Nikon (ECLIPSE Ni, Nikon, Tokyo) mit einem Objektiv (2 x Objektiv NA= 0,4) und der dazugehörigen Kamera (DS-Fi2) sowie der *Software* NIS-Elements von Nikon aufgenommen.

Die Auswertung der fluoreszierenden Zell- und Gewebepreparate, mit Ausnahme der Schnittbilder der Math1-cre-cKO-mT/mG- und WT-mT/mG-Tiere, erfolgte mit dem Epifluoreszenz-Mikroskop *Axioskop 2 Mot* (Zeiss, Jena), der Kamera (*Photometrics Cool SNAP Ez*, Visitron Systems, Puchheim) und der *Axio Vision 2 Software* (Zeiss). Als Lichtquelle wurden Halogenmetall-Dampflampen mit den für das Fluorochrom erforderlichen Wellenlängenfiltern (Alexa 555: 514 nm, 543 nm; Alexa 488: 477 nm, 488 nm) verwendet. Alle Belichtungszeiten und -stärken waren in einer Versuchsreihe identisch.

Zum Nachweis des Tomato- und EGFP-Fluoreszenzsignals der Math1-cre-cKO-mT/mG- und WT-mT/mG-Mäuse wurden das Konfokale-Laser-Scanning Mikroskop (*Leica TCS SP2*, Leica, Microsystems, Wetzlar) und ein Argon-Ionen-Laser mit der Anregungswellenlänge von 488 nm sowie ein Helium/Neon-Laser mit 543 nm verwendet. Die Fluoreszenzsignale der Schnittproben wurden über zwei Detektionskanäle zeitversetzt und überlappungsfrei aufgenommen. Es wurde ein 40 x Objektiv mit Öl, eine numerische Apertur von 1,25, sowie ein *Pinhole* von 1 Airy-Einheiten verwendet. Für die Vergleichbarkeit von Schnitten von WT- und cKO-Tieren wurde darauf geachtet, identische Intensitätsparameter bezüglich der *Gain*- und *Offset*-Werte zu verwenden.

Für die Auswertung der immunhistochemischen und Übersichtsfärbung mittels Hämatoxylin/Eosin der Vibratomschnitte wurde das Elektronenmikroskop *Axioskop 2 Mot* (Zeiss GmbH, Jena) verwendet. Die digitale Bildverarbeitung erfolgte mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramm *AnalySIS start 5.0* sowie der frei zugänglichen *Software ImageJ*. Bei vergleichenden Bildanalysen wurden für alle Proben die gleichen Beleuchtungsstärken und -zeiten verwendet.

Bei der Anfertigung und Auswertung von mikroskopischen Bildaufnahmen können verschiedene Fehlerquellen durch zum Beispiel unterschiedliche Auflösungsvermögen der verwendeten Objektive, verschiedene Umgebungstemperaturen oder individuelle Einstellungen auftreten. Um die Fehlerabweichungen möglichst gering zu halten, wurde darauf geachtet, dass bei zu vergleichenden Proben, identische Objektive und Einstellungen verwendet wurden, um die Fehlerabweichungen möglichst gering zu halten.

2.10 Morphologische Kleinhirnanalyse

2.10.1 Untersuchungsparameter

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie sich der cKO des miR-17~92-Clusters in Körnerzellen (KcKO) auf die Gesamtgröße und Faltung des Kleinhirns sowie die Größe der Lobuli und Tiefe der Fissuren auswirkt. Dazu wurden

sagittale Schnitte aus dem Vermis untersucht. Das Schema eines solchen Schnittes und die Untersuchungsparameter sind in Abb. 2.1 skizziert.

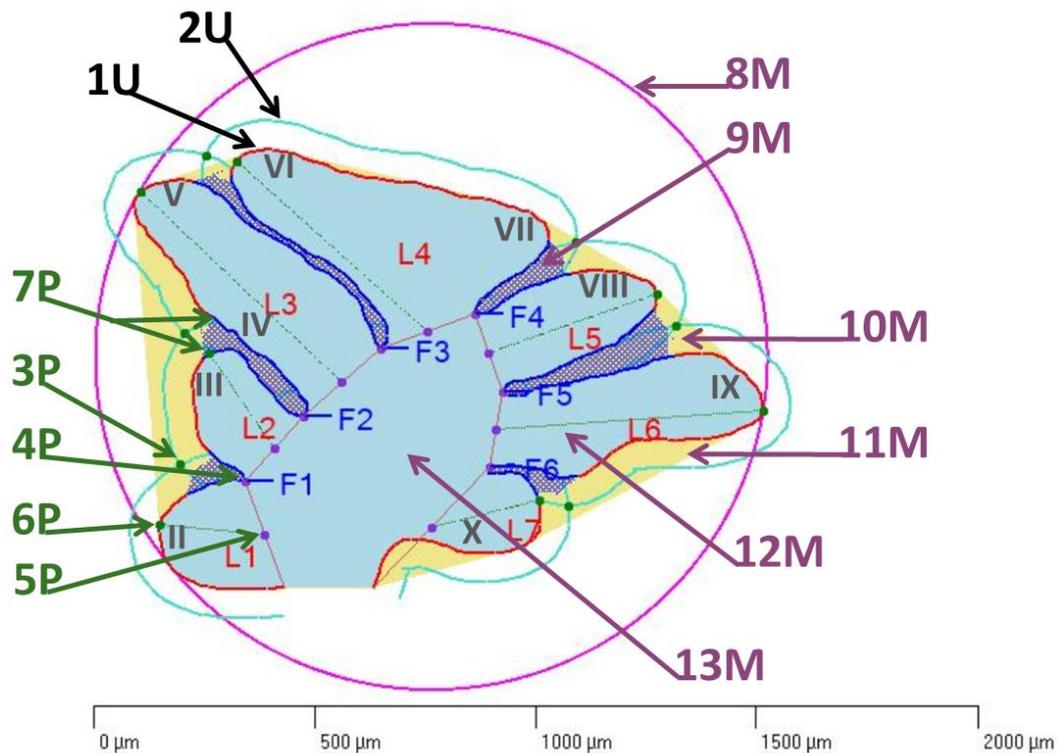


Abb. 2.1: Parameter der Kleinhirnanalyse an einer 7 Tage alten Maus

(1U/2U, schwarz) Markierung des gezeichneten Perimeters (1U, rot) und der simulierten Hilfs-Außenlinie (2U, türkis). (3–7P, grün) zur Berechnung der Fissuren wurden definierte Kreuzungspunkte der Hilfs-Außenlinie (2U) mit sich selbst (3P, grün) und den korrespondierenden Punkten (7P) auf dem Perimeter (1U) verwendet. Der vom Kreuzungspunkt (3P) entfernteste Punkt (4P, grün) auf dem Perimeter (1U), der zwischen den beiden mit Pfeilen angedeuteten Punkten (7P) liegt, definierte den Fissurentiefpunkt. Der Mittelpunkt (5P, lila) einer simulierten Linie (helllila) zwischen zwei benachbarten Fissurentiefpunkten und der davon am weitesten entfernten Punkt (6P, grün), der „Lobulus-Startpunkt“ auf dem Perimeter (1U), der zwischen den zwei benachbarten Fissurentiefpunkten liegt, dienen der Längenbestimmung der Lobuli. 8M (violett) bezeichnet den minimalen Kreis (minCi) um den Kleinhirnschnitt. Die Flächen der Fissuren (9M, blau schraffiert), der Lobuli (12M, hellblau hinterlegt) und des gesamten Kleinhirns (13M, hell blau hinterlegt) sowie die Fläche der konvexen Hülle (10M, hell gelb) des Kleinhirns dienten als Parameter. Die konvexe Hülle des Kleinhirns beinhaltet sowohl die Fläche des Kleinhirns (13M, hell blau) als auch die durch den Perimeter der konvexen Hülle (11M, gelb) begrenzte Fläche (hell gelb).

Die Kennzeichnung der Lobuli erfolgte von Lobulus II–X (grau)

Berechnet wurden unter anderem die Größe bzw. Länge der Lobuli (L1–L9 (rot)) und Fissuren (F1–F8 (blau)). Als Kleinhirnerimeter wurde die per Hand gezeichnete Umfangslinie (1U) verwendet. Der durch die Umfangslinie begrenzte Bereich wurde als gesamte Kleinhirnfläche (13M, hellblau schraffiert) definiert. In Kleinhirnschnitten, in denen sich Start- und Endpunkt von 1U nicht berührten, wurde zwischen den Punkten eine Gerade zur Berechnung der gesamten Kleinhirnfläche konstruiert. Die Berechnung der zweidimensionalen Fläche (A) erfolgte, indem die Summe der Fläche jedes Pixels (a_p) des Bildes berechnet wurde (Airey et al., 2001; Olson, 2011). Im Anschluss wurde das Flächenmaß der Pixel in μm^2 konvertiert:

$$A = \sum a_p$$

Für eine exakte und vergleichbare morphometrische Charakterisierung der Kleinhirne von cKO- und WT-Tieren wurden die im Folgenden beschriebenen etablierten Messgrößen und daraus resultierenden weiterführenden Kenngrößen auf die Kleinhirnmorphologie angewandt.

Für die Berechnung der Parameter Konvexität und *Solidity* ist eine Methode zur Bestimmung der Hüllgeometrie und der dadurch definierten Fläche des Kleinhirnschnitts erforderlich. Dafür bietet sich die Methode zur Bildung einer konvexen Hülle (*convex hull*) um die Punktmenge der Kleinhirnumfangslinie an (Olson, 2011). Berechnet wurde das Polygon mit dem kleinsten Perimeter, der alle Punkte auf der Kleinhirnumfangslinie (1U) beinhaltet und so die kleinste konvexe Menge der Kleinhirnfläche wiedergab. Es wurden sowohl der Perimeter (P_c , 11M) als auch die Fläche (A_c , 10M) innerhalb der konvexen Hülle mit einem Algorithmus (QuickHull) errechnet und für die Berechnungen der Parameter Konvexität (C_x) und *Solidity* (S) verwendet (Bradford et al., 1996; Olson, 2011).

Zunächst wurde die Rundheit (C) mit Hilfe des Perimeters des minimalen Kreises und des Perimeters des Kleinhirnschnittes berechnet. Damit wurde der Grad bestimmt, wie sehr sich der Umfang des Kleinhirns einem Kreis (8M) näherte, und als dimensionslose Kenngröße in einer Skala zwischen 0 und 1 angegeben. Je mehr der Kleinhirnschnitt der Form eines Kreises entsprach, desto näher lag der Wert bei 1 (perfekter Kreis). Je weniger rund der Kleinhirnschnitt war, desto näher lag der Wert bei 0 (Olson, 2011):

$$C = \frac{P_{minCi}}{P}$$

Der Grad der Konvexität des Kleinhirnschnittes beschrieb, wie kantig und uneben seine Form war. Definiert wird die Konvexität (C_x) durch den Perimeter (P_c) der konvexen Hülle dividiert durch den Perimeter (P) des Objekts. Die Konvexität war empfindlich gegenüber Unebenheiten des Kleinhirnumfangs. Je kantiger der Kleinhirnschnitt war, desto näher lag der Wert bei 0, dabei war die allgemeine Abweichung zur Kreisform größtenteils vernachlässigbar. Je ebener und somit auch runder die Kleinhirnform, desto näher lag der Wert für C_x bei 1 (Olson, 2011).

$$C_x = \frac{P_c}{P}$$

Als letzte Kenngröße wurde in der vorliegenden Arbeit die *Solidity* des Kleinhirnschnitts bestimmt. Die *Solidity* (S) beschreibt die Dichte und Konkavität eines Objekts und wird als das Verhältnis der Gesamtfläche des Objekts (A) dividiert durch die Fläche der konvexen Hülle des Objekts (A_c) definiert. Je dichter und kompakter die Kleinhirnschnittform war, desto enger lagen die Gesamtfläche und die Fläche der konvexen Hülle des Kleinhirnschnittes beieinander und nahmen den Wert 1 an. Je weniger der Kleinhirnschnitt einem perfekten Kreis ähnelte, desto größer wurde die Fläche der konvexen Hülle des Kleinhirns, und die *Solidity* näherte sich dem Wert 0 (Olson, 2011).

$$S = \frac{A}{A_c}$$

Die Berechnung der Lobuluslänge und Fissurentiefe erfolgte über eine Hilfs-Außenlinie (2U), die mit konstantem Abstand zur Kleinhirnumfangslinie (1U) einmal komplett um den Kleinhirnperimeter konstruiert wurde. Als Startpunkt (3P) der Längenmessung einer Fissur (F) diente der Kreuzungspunkt der Hilfs-Außenlinie (2U) und als Tiefpunkt (4P) der vom Startpunkt (3P) am weitesten entfernte Punkt auf dem Perimeter (1U) innerhalb der Start- und End-Punkte (7P) des Fissurenperimeters. Diese Strecke entsprach der Länge (L_f) der Fissur. Für die Berechnung des Perimeters (blau) und der

Fläche (9M, blau schraffiert) der Fissur wurden die zum Kreuzungspunkt der Hilfs-Außenlinie (3P) korrespondierenden Punkte (7P) auf dem Perimeter (1U) als Start- und Endpunkt genutzt.

Die Lobuluslänge entsprach der maximalen Strecke zwischen dem Endpunkt (5P: Mittelpunkt einer Geraden (hellila) zwischen den beiden benachbarten Fissurentiefpunkten) und dem Punkt (6P) auf dem Perimeter (1U), der am weitesten von den Fissurenendpunkten entfernt und zwischen den beiden benachbarten Fissurentiefpunkten lag. Dabei ergab sich die Fläche des Lobulus (12M) aus dem eingegrenzten Bereich zwischen der Umfangslinie (1U) und der direkten Linie zwischen den Fissurentiefpunkten (4P). Zur Bestimmung des Lobulusperimeters wurde die Strecke zwischen zwei benachbarten Fissurentiefpunkten (4P) auf der Umfangslinie (1U) gemessen. Auf die Problematik der Lobuluslängenmessung beim ersten bzw. letzten Lobulus ohne zwei angrenzende Fissuren wird in Kapitel 2.10.2 eingegangen.

Mit Hilfe des Programms wurden noch weitere Kenngrößen berechnet, die sich aber als im Rahmen der vorliegenden Arbeit statistisch nicht relevant herausstellten und daher nicht aufgeführt wurden.

2.10.2 Programmentwicklung zur morphologischen Kleinhirnanalyse

Zur effizienten und reproduzierbaren Durchführung der Messungen wurde ein Programm zur Automatisierung der wichtigsten Arbeitsschritte entwickelt. Für die Implementierung des in .Net C# geschriebenen Programms danke ich Herrn Marc Costea. Im Vorfeld waren einige der Funktionen des Programms auch in R implementiert worden. Diese dienten der Verifizierung der korrekten Funktion des endgültigen Programms.

Das Programm erlaubte es, Fotos in Form von *Joint Photographic Experts Group-Norm* (JPEG), *Portable Network Graphics* (PNG), *Tagged Image File Format* (TIFF) und *Windows Bitmap* (BMP)-Dateien einzulesen und automatisiert auszuwerten (s. Abb. 2.3). Beim Einlesen der Datei wurden automatisch die Informationen zum Alter (B), zum Genotyp (C), die Tiernummer (D), die Schnittkennzeichnung (E), die Färbemethode (F), das Mess- und Färbedatum (G, H) und die Vergrößerung der Aufnahme (I) aus dem Dateinamen extrahiert, sofern diese nach dem in Abb. 2.2 gezeigten Muster strukturiert waren. Anderenfalls konnten diese Informationen nicht automatisch gespeichert werden und mussten manuell angepasst werden. Bei der Analyse wurde jedem Schnitt auch eine durchlaufende Schnittnummer (A) zugeordnet.

Slice		
# 2182	← A	
Age	B	→ 7
Genotype	C	→ KO
Animal	D	→ 1
Cut Identifier	E	→ k
Method	F	→ nissl
Date Measurement	G	→ 2019-12-29
Date Staining	H	→ 2019-12-04
Zoom Factor	I	→ 2

Abb. 2.2: Struktur des Dateinamens für eine automatische Informationsextraktion

Das Namensschema wird anhand des Vibratomschnitts *P7_1_KO_nissl_04122019_2xk* skizziert. (A–I) Aus den Dateinamen der Vibratomschnitte ließen sich Informationen über das Alter (B), den Genotyp (C), die Tiernummer (D), die Schnittkennzeichnung (E), die Färbemethode (F), das Datum der Messung (G) und der Färbung (H) sowie den Vergrößerungsfaktor (I) entnehmen. Zusätzlich wurde eine Schnittnummer (A) vergeben.

Nach Einlesen der Daten wurde der Perimeter des Kleinhirns durch manuelles Nachzeichnen der Kleinhirnoberfläche (s. Abb. 2.3) mit einer durchgehenden Linie (Kleinhirnumfangsline (1U), s. Abb. 2.1) bestimmt. Da dabei der Abstand, der die Linie bildenden Punkte nicht notwendigerweise gleichmäßig war, konnte im Programm ein Mindestabstand definiert werden (s. Abb. 2.5, N). Die Punkte zur Definition der Umfangsline wurden dann automatisch ausgedünnt, um eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen. Die X/Y-Koordinaten dieser Punkte wurden gespeichert. Wichtig beim Nachzeichnen des Kleinhirnschnittes war es, beim ersten Lobulus (rostral) zu beginnen und mit dem Uhrzeigersinn (aufsteigende Reihenfolge der Lobuli bis zum letzten Lobulus (Lobulus X)) weiter zu zeichnen. Um dies zu gewährleisten, erlaubte eine Funktion die Spiegelung des Kleinhirnschnittes (s. Abb. 2.5, K und Abb. 2.3, B). Im Anschluss wurde der Schnitt automatisch rotiert, sodass die Gerade zwischen Start und Endpunkt der Umfangsline parallel zur X-Achse lag (s. Abb. 2.4).

A)



B)

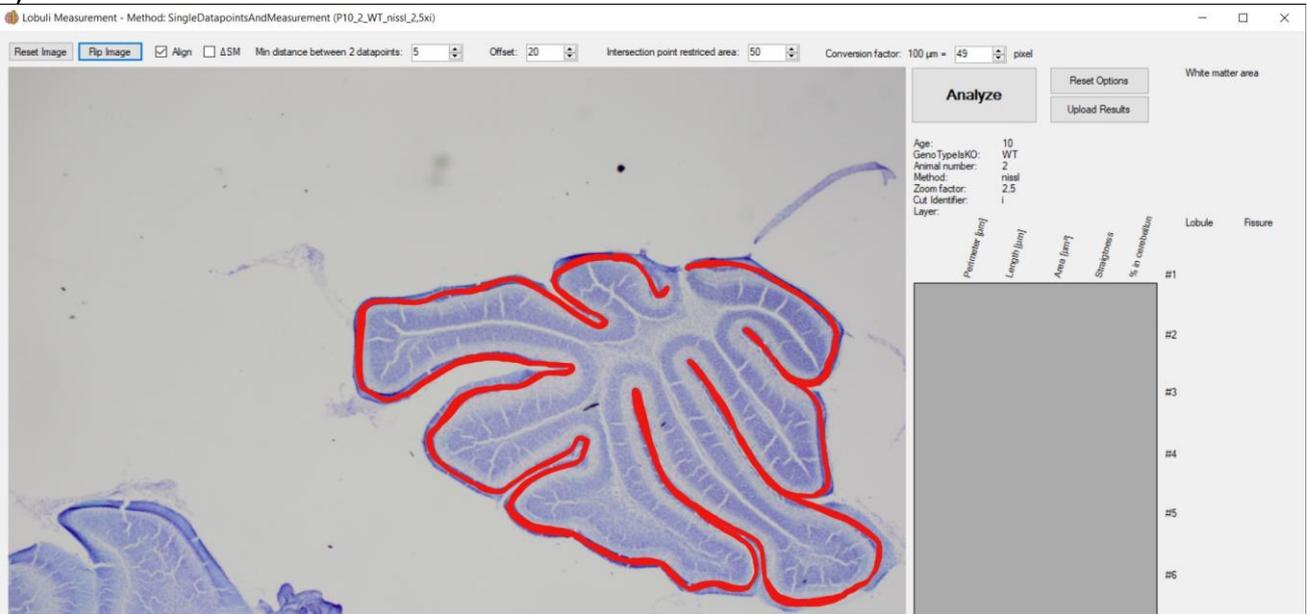


Abb. 2.3 Benutzeroberfläche des Programms Lobuli Measurement

(A/B) Exemplarische Darstellung eines medialen Kleinhirnschnitts einer WT-Maus an P10, direkt nach dem Einlesen der Datei (A) und nach dem Spiegeln des Schnittes (B). Im Anschluss wurde der Kleinhirnerperimeter manuell im Uhrzeigersinn, beginnend bei Lobulus II nachgezeichnet (rote Linie).

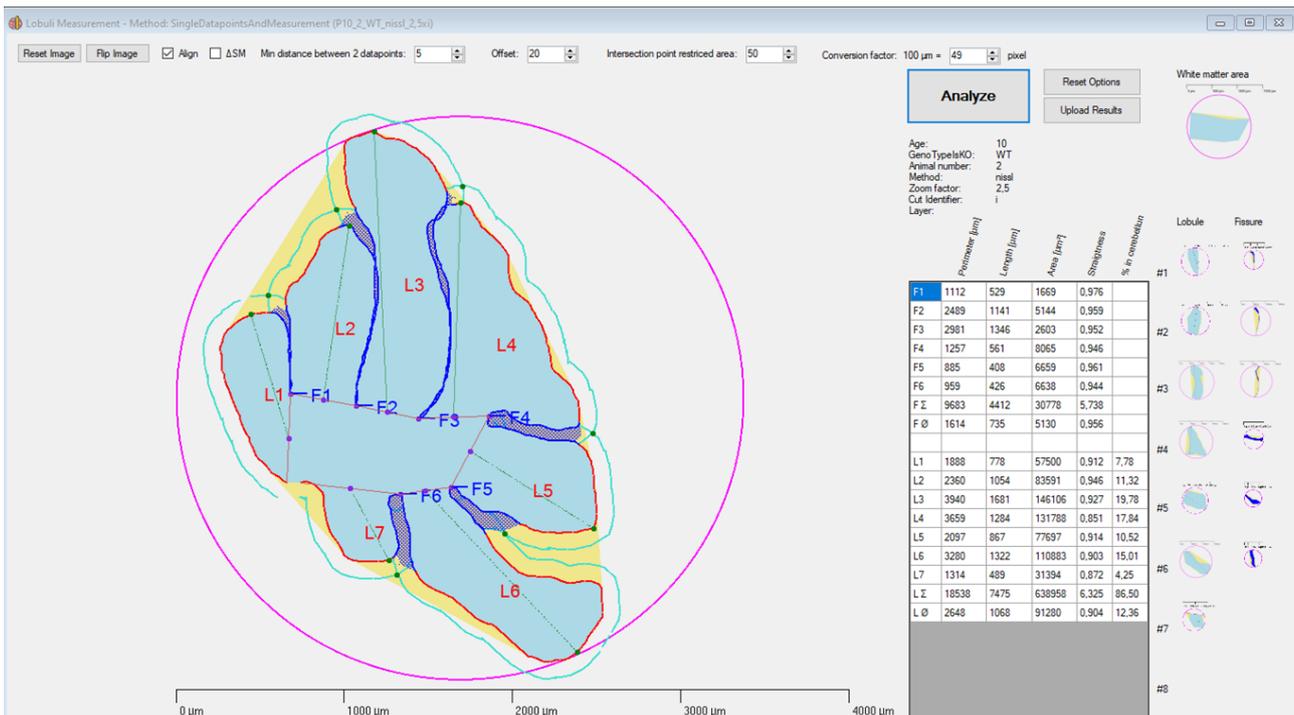


Abb. 2.4 Übersichtsaufnahme eines analysierten Kleinhirnschnittes

Exemplarische Darstellung eines mittels des Programms ausgewerteten Kleinhirnschnittes (WT, P10). Der linke Bildbereich stellt graphisch die durchgeführten Messungen dar, der rechte Bildbereich gibt eine Übersicht der wichtigsten Messergebnisse wieder.

Wurden die Lobuli und Fissuren nicht automatisch korrekt definiert, konnte dies manuell korrigiert werden. Dabei wurden die bereits bestimmten X/Y-Koordinatenpunkte verwendet, so dass ein erneutes Zeichnen des Kleinhirnumfangs entbehrlich war. Eine manuelle Korrektur war auch beim Fehlen mehrerer Lobuli im anterioren oder posterioren Kleinhirnbereich möglich.

Für die Anpassung der Parameter des Programms an die variable Morphometrie der Gewebeschnitte verschiedenen Alters standen vier Parameter zur Verfügung, die manuell verstellt werden konnten (s. Abb. 2.5, N–Q). Der Mindestabstand zwischen zwei Datenpunkten (s. Abb. 2.5, N) betrug in dieser Arbeit fünf Pixel. Damit wurden ca. 500 Datenpunkte pro Kleinhirnschnitt für die weiteren Berechnungen verwendet. Der Abstand (*Offset*) zwischen der Außenlinie und dem Kleinhirmpereimeter konnte manuell festgelegt werden (s. Abb. 2.5, O). Ein geringer Abstand erhöhte die Unempfindlichkeit gegenüber dem Fehler, Unebenheiten in der Kleinhirnumfangslinie fälschlich als Lobulus zu erkennen. Fissuren wurden aber nur dann richtig gemessen, wenn die Lobuli sehr eng aneinander lagen. Bei einem großen Abstand wurden dagegen jede Unebenheit in der Kleinhirnumfangslinie und sowohl tiefe als auch sehr flache Fissuren erkannt. Jedoch stieg dabei die Wahrscheinlichkeit, fälschlicherweise mehr Lobuli zu erkennen, als im Schnitt vorhanden waren.

In der vorliegenden Arbeit war ein *Offset*-Wert von 20 für alle Kleinhirnschnitte von Tieren im Alter von sieben und zehn Tagen optimal. Die Lobuli und Fissuren in Kleinhirnschnitten von drei Tage alten Tieren waren erst oberflächlich entwickelt, daher wurde der *Offset*-Wert auf 28 erhöht. Bei den Kleinhirnschnitten von 21 Tage alten Tieren wurde ebenfalls der erhöhte *Offset*-Wert von 28 angewendet, um trotz der präparationsbedingt stark variierenden Spaltbreiten zwischen den einzelnen Lobuli eine korrekte Messung zu gewährleisten.

Mit dem Parameter „P“ (s. Abb. 2.5, P) konnten vermeintliche Überschneidungen der Umfangslinie, die durch unsauberes Zeichnen oder Zittern entstanden waren, im Nachhinein herausgerechnet werden. Dieser Parameter bestimmt den Radius

von Pixeln, indem nach zwei Schnittpunkten der Außenlinie kein weiterer Schnittpunkt mehr anerkannt wird. In der Auswertung aller Kleinhirnschnitte wurde in dieser Arbeit ein Radius von 50 Pixeln verwendet.

Mit dem Parameter "Q" wurde manuell das Pixel/ μm -Verhältnis der Bilder für 100 μm angegeben (s. Abb. 2.5, Q).

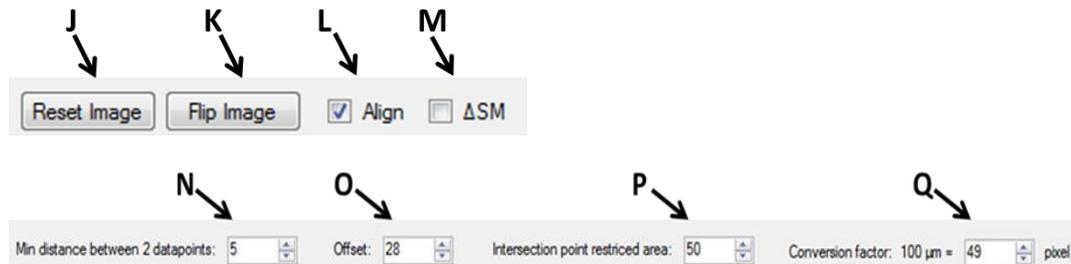


Abb. 2.5: Einstellungsmöglichkeiten zur Auswertung des Kleinhirnschnitts

Obere Reihe – Funktionen zur Darstellungsveränderung und Auswertung des Kleinhirnschnitts: Mit dem Button (J) können alle Einstellungen zurückgesetzt werden. Mit Button (K) wird der Gewebeschnitt vertikal gespiegelt, und mit Button (L) wird das Bild anhand des Start- und Endpunktes entlang der X-Achse ausgerichtet. Die Differenz zwischen dem Schwerpunkt und Mittelpunkt des Polygons, das durch den Perimeter (1U) bestimmt wird, kann hier ausgerechnet werden (M).

Untere Reihe – Grundeinstellung zur Kleinhirnanalyse: Der minimale Abstand in Pixeln zwischen zwei Datenpunkten (N), der Abstand (O) zwischen dem Perimeter (1U) und der Außenlinie (2U), der Mindestabstand (P) zwischen zwei Kreuzungspunkten (7P) der Außenlinie (2U) sowie die Angabe des Konvertierungsfaktors $\mu\text{m}/\text{Pixel}$ (Q) können hier manuell angegeben werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die oben beschriebenen Parameter so eingestellt, dass in einem normalentwickelten Kleinhirn im medialen Schnitt sieben Lobuli automatisch erkannt wurden. Aufgrund der geringen Ausprägung von Lobulus IV wurde dieser zum Lobulus V (L3) und Lobulus VII zum Lobulus VI (L4) gezählt. Die verwendeten Mauslinien wiesen keinen sichtbaren Lobulus I auf, daher betrug die maximale Lobuli-Anzahl neun anstelle von zehn. Bei einem fehlenden Lobulus im anterioren Bereich (Lobulus II–V) wurde immer der Lobulus III als fehlend vermerkt. Dies erfolgte durch einen manuellen Vermerk, da nicht ersichtlich war, welcher der anterioren Lobuli fehlte. Im Falle des ersten und letzten Lobulus wurde der erste bzw. letzte gesetzte X/Y-Koordinatenpunkt als Start- bzw. Endpunkt verwendet.

Ausgewertet wurden 100-200 μm dicke Kleinhirnschnitte von lateral bis medial je nach Alter der Tiere (P3: 50 μm ; P7: 100 μm ; P10: 100 μm ; P21: 150 μm). Die Vibratomschnitte wurden mit der H / E- oder Nissl- Färbung angefärbt (s. Kap. 2.6.3 und 2.6.4). Es wurden nur Vibratomschnitte, die mit derselben Färbungsmethode behandelt wurden, untereinander verglichen.

Bei der Verwendung des Programms zur Auswertung der eingelesenen Bildaufnahmen können verschiedene Fehlerquellen eine Rolle spielen, wie die natürliche Grenze der bildverarbeitenden Auswertung (ein Pixel als keinstes Bild-Teil) oder die Verarbeitung von Fließkommazahlen, die sowohl durch die verwendete Programmiersprache als auch das verwendete Betriebssystem und die verwendete Hardware (CPU) entstehen. Diese waren aber für alle analysierten Bilddateien jeweils gleich und können daher bei dem Vergleich der einzelnen Daten vernachlässigt werden.

2.11 Statistische Auswertungen

Um zwei Stichproben aus einer normalverteilten Grundgesamtheit mit unbekanntem Parametern statistisch miteinander vergleichen zu können, wurden die Daten im ersten Schritt auf die Gleichheit der Varianz (Homogenität der Varianzen) mittels F-Test oder Levene-Test untersucht. Bei nicht signifikant unterschiedlichen Testergebnissen wurde im Anschluss der Hypothesentest der t-Verteilung (t-Test) angewendet. Dabei werden die Mittelwerte zweier normalverteilter Gruppen je nach ihrer Varianz durch eine Form des t-Tests auf signifikante Unterschiede hin geprüft. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf 5 % festgelegt. Zum Vergleich von zwei oder mehrerer Variablen wurde die lineare Regressionsanalyse angewendet oder mittels einer ANOVA ein multipler Vergleichstest mehrerer Gruppen durchgeführt.

Um zu berechnen und grafisch darzustellen, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Zufallsvariable eine bestimmte Merkmalsausprägung annimmt, wurde das Verfahren der Kerndichteschätzung (englisch: *kernel density estimation*) verwendet, dabei wird die Wahrscheinlichkeitsverteilung einer Zufallsvariable geschätzt.

Alle statistischen Auswertungen und grafischen Darstellungen wurden mit der frei zugänglichen *Software R* (<http://www.r-project.org/>) berechnet und gestaltet. Die Legende des Signifikanzniveaus entspricht folgenden Werten: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, $p > 0,5$ (nicht signifikant, ns).

Mögliche Mess- und Analysefehler, die durch die mikroskopische Bildaufnahme, sowie die Verwendung des jeweiligen Programms für die statistische Auswertung auftraten, konnten durch die Verwendung gleicher Methoden zur Auswertung und Statistik herausgerechnet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypisierung der Math1-cre- und L7-cre-transgenen Mäuse und Zelltyp-spezifische Math1-cre Expression in verschiedenen Altersstadien

Die Funktion des miR-17~92-Clusters in der Entwicklung des Kleinhirns wurde mit der Hilfe des zell-spezifischen Verlustes dieses Clusters in den Körner- bzw. Purkinjezellen untersucht. Die Cluster-Deletion wurde durch ein Cre/loxP-System vermittelt. Zur Generierung homozygoter cKO-Mäuse mit einem deletierten miR-17~92-Cluster in den Körner- bzw. Purkinjezellen wurden drei verschiedene Mauslinien benötigt. Zur genetischen Charakterisierung der verwendeten Mäuse war es notwendig, alle Mäuse im Vorfeld zu genotypisieren (s. Kap. 2.3).

Dabei wurde zunächst mittels PCR überprüft, ob die Tiere für die gefloxe Variante des miR-17~92-Cluster-Sequenzabschnitts homozygot waren (miR-17~92^{flox/flox}). In der Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte wurde für das gefloxe miR-17~92-Cluster homozygoter Mäuse (miR-17~92^{flox/flox}) eine Bande bei 289 bp (s. Abb. 3.1 A) erwartet. WT-Mäuse ohne gefloxe miR-17~92-Cluster Region (miR-17~92^{+/+}) sollten eine Bande bei 255 bp aufweisen (Daten nicht gezeigt) und für das gefloxe miR-17~92-Cluster heterozygoter Mäuse (miR-17~92^{+flox}) sollten zwei Banden bei 255 bp und 289 bp detektiert werden.

Zur Generierung zellspezifischer miR-17~92-Cluster-cKO-Mauslinien wurden Mäuse, die für das gefloxe miR-17~92-Cluster-Gen homozygot waren (miR-17~92^{flox/flox}) mit Mauslinien mit einer zellspezifischen Cre-Expression gekreuzt (s. Abb. 3.1 A). Für die selektive Deletion des miR-17~92-Clusters in Körnerzellen wurde eine transgene Mauslinie mit einem Cre-Transgen unter der Kontrolle des Math1-Promotors verwendet. In der Agarose-Gelelektrophorese der Produkte der Kontroll-PCR zeigten Math1-cre exprimierende Tiere (Math1-cre) eine Bande bei 400 bp (s. Abb. 3.1 B). Weiter wurde eine transgene Mauslinie verwendet, die das Cre-Transgen unter dem L7-Promotor selektiv in Purkinjezellen exprimiert. L7-cre exprimierende Tiere (L7-cre) wiesen in der Agarose-Gelelektrophorese der Produkte der Kontroll-PCR eine Bande bei 550 bp auf (s. Abb. 3.1 C). Im weiteren Verlauf wurden heterozygot gefloxe Nachkommen (miR-17~92^{+flox}), die Math1- bzw. L7-cre positiv waren, jeweils untereinander verpaart. Damit wurden zwei zellspezifische homozygote miR-17~92-Cluster-cKO-Mauslinien (Math1-cre-cKO (KcKO) und L7-cre-cKO (PcKO)) generiert. Als WT-Kontrolle dienten in den weiteren Experimenten Mäuse, die für die gefloxe miR-17~92-Cluster Region homozygot (miR-17~92^{flox/flox}) und Math1-cre bzw. L7-cre negativ waren.

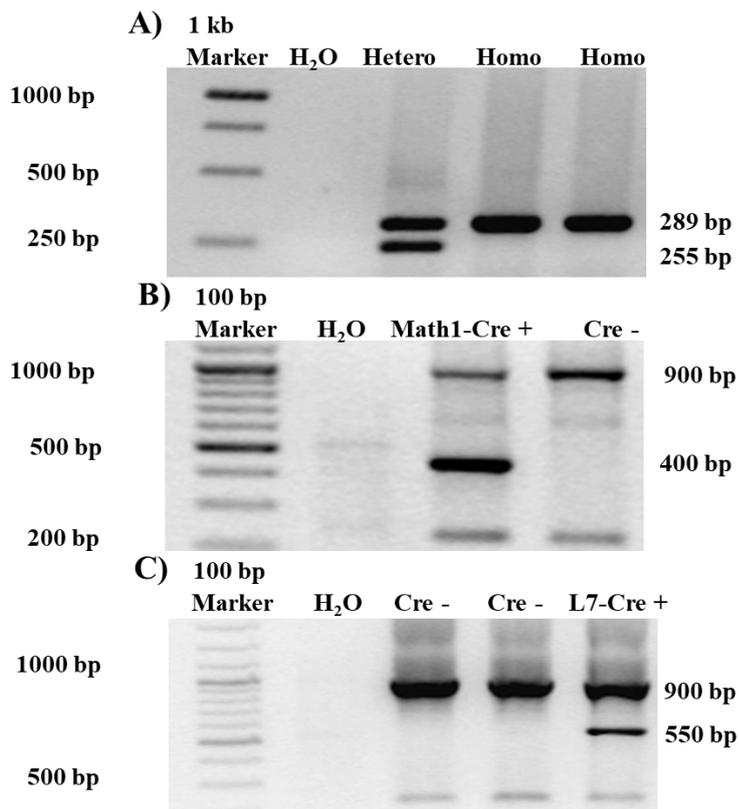


Abb. 3.1: Nachweis des geflochten miR-17~92-Clusters und der Cre-Aktivität in Math1- bzw. L7-cre-Tieren mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) – Auftrennung der PCR-Produkte über Agarose-Gelelektrophorese
 (A) Nachweis des geflochten miR-17~92-Clusters: Für das geflochte miR-17~92-Cluster homozygoter Mäuse wurde eine Bande bei 289 bp (Homo) erwartet, heterozygote Mäuse wiesen zwei Banden bei 255 bp und 289 bp (Hetero) auf. (B) Nachweis des Math1-cre-Produktes: Math1-cre-positive Tiere zeigten eine Bande bei 400 bp (Math1-Cre+). (C) Nachweis des L7-cre-Produktes: L7-cre-positive Tiere zeigten eine Bande bei 550 bp (L7-Cre+). (B/C) Als interne Kontrolle wurde ein PCR-Produkt der Glycerinaldehyd-3-phosphatDehydrogenase (GAPDH) mit einer Bande bei 900 bp nachgewiesen (Cre-/+). Als Negativkontrolle wurde destilliertes Wasser verwendet (H₂O).

Der Transkriptionsfaktor Math1 wird auch außerhalb des Kleinhirns in anderen Geweben exprimiert. Daher wurde die spezifische Aktivität, der unter dem Math1-Promotor exprimierten Cre-Rekombinase in den Körnerzellen immunhistochemisch analysiert. Dazu wurde die Math1-cre-Mauslinie mit der Cre-Reporter-Maus Gt(Rosa)^{26Sortm4}(ACTB-tdTomato-EGFP)^{Luo/J} (mT/mG) verpaart. Die Expression des von *loxP*-Abschnitten flankierten mT-Proteins war Cre-unabhängig und resultierte in einem beinahe ubiquitären Fluoreszenzsignal in den Zellen des Kleinhirns (s. Abb. 3.2 A/C) und im gesamten Körper der Maus. Die mG-Expression wurde erst nach der Cre-abhängigen Exzision der tdTomato-Sequenz möglich, dies erfolgte folglich nur in Math1-cre-exprimierenden Zellen.

Die histologische Untersuchung der EGFP-Expression in den Körnerzellen von Math1-cre-ckO-mT/mG-Mäusen an P7 ergab ein klares EGFP-Signal in der EGL (s. Abb. 3.2 B/C). Bei WT-mT/mG-Mäusen fehlte dieses Signal (s. Abb. 3.2 E/F). In diesen Tieren wurde nur das Fluoreszenzprotein Tomato exprimiert (s. Abb. 3.2 D/F).

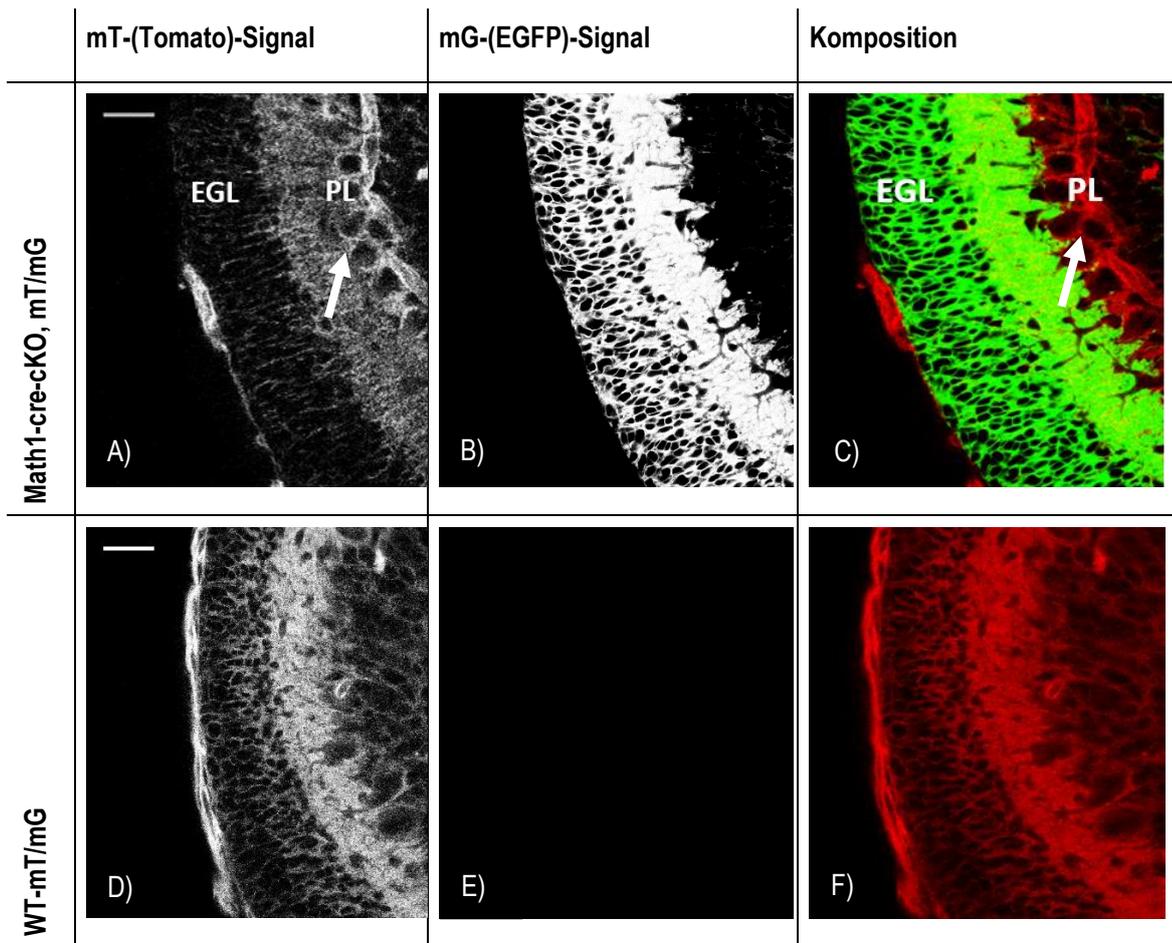


Abb. 3.2: Nachweis der Math1-cre Expression in cerebellären Körnerzellen 7 Tage alter Tiere (P7)

(A–C) *Math1-cre-cKO-mT/mG*-Mäuse: Übersichtsaufnahmen eines Lobulus mit dem ubiquitären Tomato-Fluoreszenzsignal in der Purkinjzellschicht (PL) (A und C, weißer Pfeil) und dem enhanced green fluorescent protein (EGFP)-Signal (B und C) in der externen Körnerzellschicht (EGL). (D–F) *WT-mT/mG*-Kontrollmäuse: Die Tiere wiesen ein deutliches Tomato-Signal auf (D) jedoch aufgrund der Abwesenheit der Cre-Rekombinase keinerlei EGFP-Fluoreszenz (E). In (C) und (F) wurden das Tomato- (rot) und EGFP- (grün) Fluoreszenzsignal kombiniert.

Für technische Daten s. Kap. 2.9; Schnittdicke 30 μm ; Maßstab 20 μm

Bei älteren *Math1-cre-cKO-mT/mG*-Mäusen war an P15 ein schwächeres EGFP-Signal von den Parallelfasern, ausgehend in der Molekularschicht (ML) und in der entstehenden IGL, ausgehend von den Körnerzellen, erkennbar (s. Abb. 3.3 B/C). In den Zellen des Kleinhirns, in denen das *Math1-cre*-Transgen nicht exprimiert wurde (z.B. Purkinjzellen), wurde nur das Fluoreszenzprotein Tomato exprimiert (s. Abb. 3.3 A/C). Das Gleiche galt für *WT*-Tiere, die kein *Math1-cre*-Allel besaßen (s. Abb. 3.3 D–F).

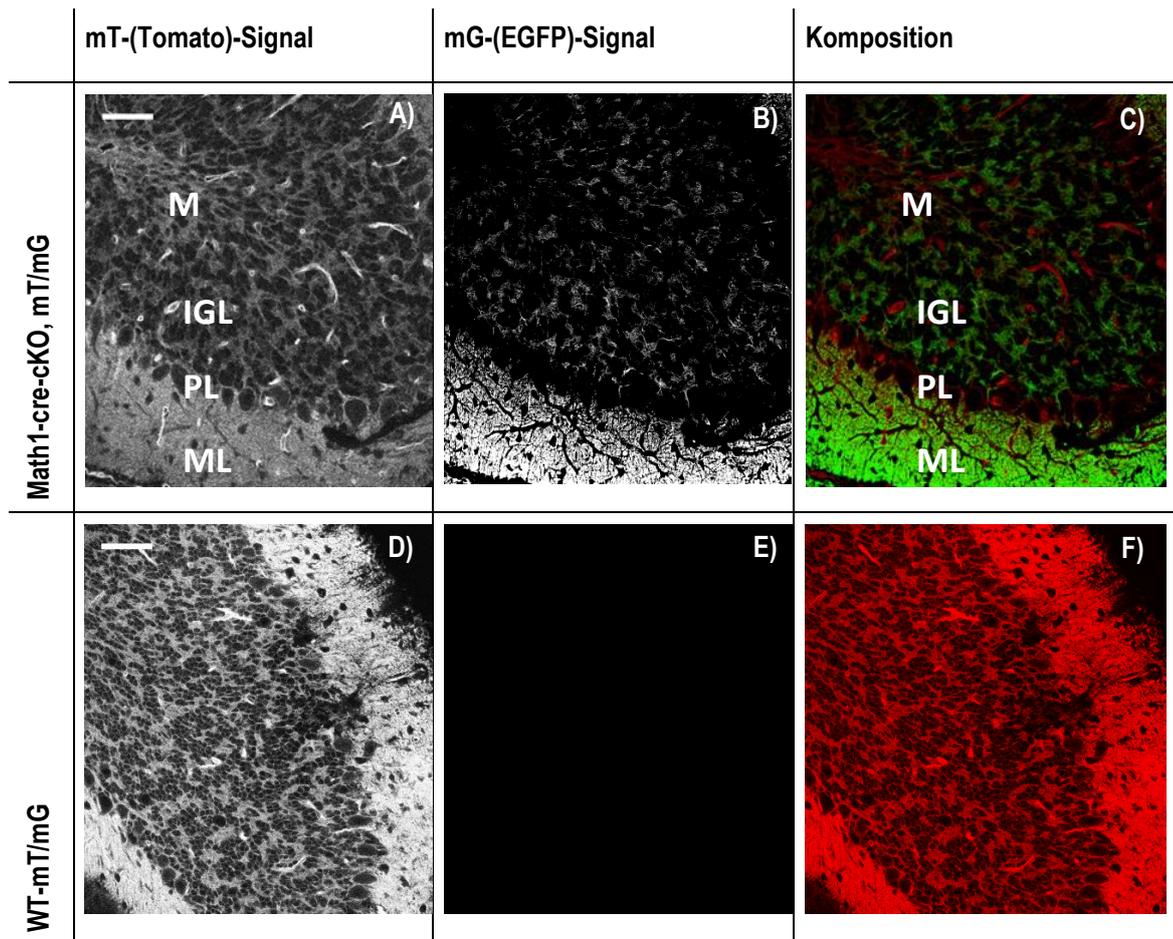


Abb. 3.3: Nachweis der Math1-cre Expression in cerebellären Körnerzellen 15 Tage alter Tiere (P15)

(A–C) *Math1-cre-cKO-mT/mG*-Mäuse: (A) Das ubiquitäre Tomato-Fluoreszenzsignal war überwiegend in der Purkinjezellschicht (PL) und im Mark (M) präsent. (B) Das enhanced green fluorescent protein-(EGFP)-Signal war deutlich in der Molekularschicht (ML) und in der internen Körnerzellschicht (IGL) des Lobulus erkennbar. In der PL war kein EGFP-Signal nachweisbar. (D–F) *WT-mT/mG*-Kontrollmäuse: Das Tomato-Signal war deutlich ubiquitär sichtbar (D/F), die EGFP-Fluoreszenz war in Abwesenheit des *Math1-cre* Transgens nicht detektierbar (E/F). In (C) und (F) wurden das Tomato- (rot) und EGFP- (grün) Fluoreszenzsignal kombiniert. Für technische Daten s. Kap. 2.9; Schnittdicke 30 μm ; Maßstab 20 μm

Eine Überprüfung der L7-Promotor-Funktion in Purkinjezellen mittels der Cre-Reporter Maus $\text{Gt(Rosa)}^{26\text{Sortm4(ACTB-tdTomato-EGFP)}_{\text{Luo/J}}$ (*mT/mG*) war aufgrund der schwachen Signalstärke in den juvenilen Altersstadien nicht eindeutig auswertbar (Daten nicht gezeigt).

3.2 Expression des miR-17~92-Clusters im Kleinhirn der Math1-cre-Mausmutante (KcKO)

3.2.1 Vergleich der miRNA-Expression in WT- und KcKO-Kleinhirnen

Um die Auswirkung der miR-17~92-Cluster-Deletion in den Körnerzellen von KcKO-Mäusen auf Expressionsebene zu analysieren und zu validieren, erfolgte eine Analyse der Genexpression ausgewählter miRNAs des Clusters (miR-17, -19b und 92a) auf RNA-Ebene (qRT-PCR). Die Expression wurde im gesamten Kleinhirn und in bestimmten Kleinhirnbereichen bei jungen (P7) und 21 Tage alten (P21) KcKO- und WT-Mäusen verglichen. Die für die miR-17~92-Cluster-Expression verwendeten Kleinhirnproben enthielten verschiedene Zelltypen, die einen unterschiedlichen Beitrag zu der nachgewiesenen Expression leisten (Budde et al., 2010). Die Menge der drei analysierten miRNAs des miR-17~92-Clusters war in den KcKO-Kleinhirnen im Vergleich zu den WT-Kleinhirnen zum Zeitpunkt P7 signifikant geringer (s. Tab. 3.1). Die 21 Tage alten KcKO-Tiere zeigten nur noch für die miR-19b-Expression signifikant geringere Werte. Bei den beiden anderen miRNAs war nur eine tendenzielle Reduktion nachweisbar (s. Tab. 3.1). Eine Rest-miRNA-Menge konnte für alle miRNAs aber auch in den KcKO-Kleinhirnen nachgewiesen werden.

Tab. 3.1: Expression von miRNAs des miR-17~92-Clusters im Kleinhirn – KcKO- vs. WT-Tiere

	miRNA	Genotyp	Cq	fc	p-Wert
7 Tage alte Tiere (P7)	miR-17	WT	8,9 ± 0,4	1,5	0,0314
		KcKO	13,2 ± 0,9		
	miR-19b	WT	4,3 ± 0,5	1,8	0,0360
		KcKO	7,9 ± 1,3		
	miR-92a	WT	6,1 ± 0,6	1,9	0,0076
		KcKO	11,4 ± 0,3		
21 Tage alte Tiere (P21)	miR-17	WT	14,4 ± 0,2	1,2	0,0691
		KcKO	16,8 ± 0,1		
	miR-19b	WT	7,4 ± 0,1	1,4	0,0097
		KcKO	10,0 ± 0,4		
	miR-92a	WT	12,3 ± 0,2	1,1	0,0766
		KcKO	13,4 ± 0,1		

Die aus den technischen Triplets errechneten Cq (medialen quantification of cycle) -Werte der miRNAs pro Tier wurden auf die medialen Cq-Werte der internen Kontrolle 5S normalisiert (s. Kap. 2.4.5). Zwischen 7 Tage alten KcKO- und WT-Tieren wurden signifikante Expressionsunterschiede (fold-change (fc) = relative Expressionslevel der miRNAs in den WT-Proben als Vielfaches der KcKO-Proben) für die drei analysierten miRNAs detektiert. Zwischen 21 Tage alten KcKO- und WT-Tieren war nur noch die Expression der miR19b signifikant unterschiedlich.

Anzahl der zusammengefassten qRT-PCR-Läufe P7: N=3; KcKO: n=8, WT: n=7; P21: N=2; n=5 pro Genotyp; Teststatistik: t-Test

3.2.2 Einfluss des Alters und des Geschlechts auf die miRNA-Expression im Kleinhirn

Die Expression der untersuchten miRNAs des Clusters unterschied sich nicht nur zwischen WT- und KcKO-Kleinhirnen (s. Tab. 3.1), sondern zum Teil auch zwischen den Tieren desselben Genotyps. Die Verhältnisse zwischen den Expressionsspiegeln der einzelnen miRNAs in Kleinhirnen aus KcKO- bzw. WT-Tieren blieben aber annähernd konstant. Zudem konnte ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die miRNA-Expression nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In den folgenden Versuchen wurden daher beide Geschlechter gemeinsam analysiert.

Um den Einfluss des Alters zu analysieren, wurden sieben Tage alte (P7) juvenile Tiere und 21 Tage alte (P21) Tiere verwendet und untereinander verglichen. Am postnatalen Tag 21 ist die reguläre Kleinhirnentwicklung (Zellzahl und Zellschichten) bei Mäusen abgeschlossen, daher wurde dieses Alter als frühestes adultes Altersstadium zur Analyse der miRNA-Expression verwendet. In 21 Tage alten Tieren zeigten die miRNAs-17, -19b und -92a im Vergleich zu juvenilen Tieren (P7) eine reduzierte Expression. Das galt sowohl für KcKO-Tiere als auch für WT-Tiere, bis auf die miR-19b (s. Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Expression von miRNAs des miR-17~92-Clusters im Kleinhirn – P7 vs. P21

		P21 (Lobuli II–X)	P7 (Lobuli II–X)	P7/P21	
miRNA	Genotyp	Cq	Cq	fc	p-Wert
miR-17	WT	14,4 ± 0,2	8,9 ± 0,4	1,6	0,0447
	KcKO	16,8 ± 0,1	13,2 ± 0,9	1,3	0,0168
miR-19b	WT	7,4 ± 0,1	4,3 ± 1,5	1,7	0,0583
	KcKO	10 ± 0,4	7,9 ± 1,3	1,3	0,0209
miR-92a	WT	12,3 ± 0,2	6,1 ± 0,6	2,0	0,0090
	KcKO	13,4 ± 0,1	11,4 ± 0,3	1,2	0,0167

Für die miR-17 und miR-92a konnte eine reduzierte Expression in 21 Tage alten Tieren im Vergleich zu 7 Tage alten Tieren beider Genotypen detektiert werden. Die Expression der miR-19b war nur in 21 Tage alten KcKO-Tieren signifikant reduziert.

Anzahl der zusammengefassten qRT-PCR-Läufe P7: N=3; KcKO: n=8, WT: n=7; P21: N=2; n=5 pro Genotyp; Teststatistik: t-Test.

3.2.3 Unterschiedliche miRNA-Expression in den anterioren und posterioren Lobuli des Kleinhirns

Die Entstehung der Lobuli (I–X) im Kleinhirn erfolgt zum Teil in unterschiedlichen embryonalen bis postnatalen Entwicklungsphasen (s. Kap. 1.2.2). Zur Detektion von Expressionsunterschieden in WT- und KcKO-Tieren zum Zeitpunkt P7 und P21 wurde die Expression der miRNAs des miR-17~92-Clusters in anterioren (Lobuli I–III) und posterioren Kleinhirnbereichen (Lobuli IV–X) getrennt analysiert. Damit sollten potentielle Unterschiede in den beiden Kleinhirnbereichen in WT-Tieren detektiert und Expressionsmuster in WT- und KcKO-Tieren verglichen werden.

Bei dem Vergleich der Kleinhirnbereiche (Lobuli II–III vs. Lobuli IV–X s. Tab. 3.3, grüne Markierung), war die Expression der miRNAs (Ausnahme miR-17, WT-Tiere) in beiden Genotypen an P7 in den posterioren Lobuli IV–X signifikant höher (niedrigerer Cq-Wert) als in den anterioren Lobuli II–III. Am deutlichsten war der Unterschied für die miR-19b. Zu P21 trat

bei KcKO-Tieren eine signifikant erhöhte miR-17-Expression in den posterioren im Vergleich zu den anterioren Lobuli auf. Für die anderen beiden miRNAs war bei KcKO-Tieren nur eine geringfügig unterschiedliche Expression in posterioren und anterioren Lobuli nachweisbar. Dagegen zeigten WT-Tiere in den posterioren Lobuli der adulten WT-Kleinhirne eine tendenziell erniedrigte Expression der drei miRNAs im Vergleich zu der miRNA-Expression in den anterioren Lobuli. Auffällig war zudem, dass die miRNA-Expression zwischen den adulten Tieren eines Genotyps in den anterioren Lobuli stärker variierte als in den posterioren Lobuli. Somit unterschieden sich die beiden Genotypen hinsichtlich ihrer miR-17, -19b- und -92a-Expressionslevel in Abhängigkeit vom Kleinhirnbereich an P21. An P7 zeigten beide Genotypen eine erhöhte miRNA-Expression in den posterioren Lobuli im Vergleich zu den anterioren Lobuli.

Tab. 3.3: Relative Expressionslevel von miR-17, -19b und -92a im anterioren (Lobuli I-III) und posterioren Kleinhirnbereich (Lobuli IV-X) in KcKO- und WT-Tieren zum Zeitpunkt P7 und P21

P7		Lobuli I-III			Lobuli IV-X			Lobuli IV-X/I-III	
miRNA	Genotyp	Cq	fc	p-Wert	Cq	fc	p-Wert	fc	p-Wert
miR-17	WT	11,5 ± 1,3	1,3	0,0183	9,6 ± 0,8	1,3	0,0113	0,8	0,1032
	KcKO	14,6 ± 0,2			12,5 ± 0,5			0,8	0,0131
miR-19b	WT	4,0 ± 1,2	2,2	0,0080	2,5 ± 0,6	2	0,0067	0,6	0,0257
	KcKO	8,9 ± 0,3			5,0 ± 0,5			0,6	< 0,001
miR-92a	WT	8 ± 1,4	1,4	0,0264	5,9 ± 0,5	1,5	0,0031	0,7	0,0512
	KcKO	11 ± 0,3			8,8 ± 0,5			0,8	0,0042
P21		Lobuli I-III			Lobuli IV-X			Lobuli IV-X/I-III	
miRNA	Genotyp	Cq	fc	p-Wert	Cq	fc	p-Wert	fc	p-Wert
miR-17	WT	14,6 ± 1,5	1,2	0,0115	14,6 ± 0,6	1	0,4624	1	0,4859
	KcKO	17,4 ± 2,2			14,1 ± 0,8			0,8	0,0195
miR-19b	WT	3,7 ± 2,0	2,5	0,0125	6,7 ± 0,7	1,2	0,0491	1,8	0,1875
	KcKO	9,4 ± 2,6			8,0 ± 0,6			0,9	0,3792
miR-92a	WT	8,5 ± 1,6	1,4	0,0497	11,4 ± 0,7	1	0,3644	1,4	0,1146
	KcKO	12,3 ± 2,7			11,0 ± 0,8			0,9	0,0834
		P21 Lobuli I-III/P7 Lobuli I-III		P21 Lobuli IV-X/P7 Lobuli IV-X					
miRNA	Genotyp	fc	p-Wert	fc	p-Wert				
miR-17	WT	1,3	0,0261	0,1	0,0010				
	KcKO					1,2	0,0204	1,1	0,0190
miR-19b	WT	0,9	0,7592	2,7	0,0017				
	KcKO					1	0,6456	1,6	0,0042
miR-92a	WT	1	0,3337	1,9	0,0003				
	KcKO					1,1	0,4498	1,3	0,0194

Grüne Markierung: Vergleich der Kleinhirnbereiche Lobuli I-III vs. Lobuli IV-X; rote Markierung: Vergleich der Zeitpunkte P7 vs. P21; Lila Markierung: Vergleich der Genotypen WT- vs. KcKO-Tiere. Anzahl der zusammengefassten qRT-PCR-Läufe, P21: N=2; P7: N=4; P21: n=5 pro Genotyp, P7: n=8 pro Genotyp; Teststatistik: t-Test

Ein Vergleich der miRNA-Expression in den beiden Kleinhirnbereichen zwischen P7 und P21 Tage alten Tieren beider Genotypen (P7 vs. P21 s. Tab. 3.3, rote Markierung) ergab eine Reduktion der miRNA-Expression im posterioren Kleinhirnbereich bei adulten Tieren (P21). Im anterioren Kleinhirnbereich verringerte sich nur die Expression von miR-17 in adulten Tieren beider Genotypen signifikant.

Im juvenilen Alter (P7) zeigten in beiden Kleinhirnbereichen KcKO-Tiere eine reduzierte miRNA-Expression im Vergleich zu WT-Tieren (WT- vs. KcKO-Tiere s. Tab. 3.3, lila Markierung). Auch im adulten Alter (P21) wiesen KcKO-Tiere in den anterioren Lobuli eine signifikant geringere miRNA-Menge im Vergleich zu WT-Tieren auf. Für den posterioren Kleinhirnbereich war dies nur für miR-19b der Fall.

3.3 Allgemeine körperliche und verhaltensbezogene Entwicklung von miR-17~92-Clusterdefizienten Tieren

Eine Reduktion der miR-17~92-Cluster-Expression in den Körner- bzw. Purkinjezellen kann sowohl Auswirkungen auf die Entwicklung des Kleinhirns als auch sekundär auf die allgemeine körperliche und verhaltensbezogene Entwicklung der zwei Mauslinien haben. Um einen möglichen Einfluss der Cluster-Deletion unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Startpunkte der Expression des verwendeten Promotors (L7- bzw. Math1-cre) zu analysieren, wurden beide Mauslinien zunächst auf körperliche Defizite hin untersucht. Die Expression des Transkriptionsfaktors Math1 beginnt in der Rautenlippe des Kleinhirns um etwa E10. Math1 ist damit der früheste bekannte Marker für unreife cerebelläre KVZ während ihrer Entstehung in der Rautenlippe um etwa E12,5. Dagegen wurde eine vollständige L7-cre vermittelte Rekombination in Purkinjezellen erst an P6 nachgewiesen (Barski et al., 2000; Ben-Arie et al., 1997).

Sowohl die Tiere mit gefloxtem miR-17~92-Cluster (miR-17~92^{flox/flox} (WT)) als auch die Tiere, in denen das miR-17~92-Cluster spezifisch in den cerebellären Körnerzellen (miR-17~92^{flox/flox}, Math1-cre (KcKO)) bzw. Purkinjezellen (miR-17~92^{flox/flox}, L7-cre (PcKO)) deletiert wurde, wiesen keine äußeren morphologischen Unterschiede, Verhaltensauffälligkeiten oder motorischen Beeinträchtigungen in den betrachteten Altersstadien auf. Als Kontrolle dienten ungefloxt reiner C57BL/6J-Tiere (miR17~92^{+/+}). Das Wurfverhältnis der cKO- (40–50 %) zu WT-Tieren (50–60 %) entsprach für beide Mausmutanten den Mendelschen Regeln. Auch die durchschnittliche Lebensdauer beider Mausmutanten stimmte mit bekannten Daten von C57BL/6J-Tieren überein (Yuan et al., 2009). Da sich gefloxt Geschwistertiere (miR-17~92^{flox/flox} (WT)) ohne Math1-cre bzw. L7-cre-Aktivität morphologisch und in ihrem Verhalten nicht von ungefloxt C57BL/6J-Tieren (miR17~92^{+/+}) unterschieden, wurden sie aufgrund ihres gleichen genetischen Hintergrunds als Kontrollen (WT-Tiere) für die KcKO- bzw. PcKO-Tiere verwendet.

Zur Erfassung eventueller Auswirkungen der Cluster-Deletionen auf die körperliche Entwicklung wurde das Körpergewicht der PcKO- bzw. KcKO-Tiere sowie der WT-Tiere in drei juvenilen Altersstufen (P7, P10 und P15) verglichen. Beim Körpergewicht bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Genotypen (s. Abb. 3.4). Für die Analyse der adulten Altersstadien wurden 21–569 Tage alte Mäuse verwendet (das früheste adulte Alter P21 kennzeichnet die

abgeschlossene Kleinhirnentwicklung). Beide Mausmutanten und die WT-Tiere zeigten auch im adulten Alter eine vergleichbare Körpergewichtsentwicklung mit einer stetigen Zunahme bis etwa P300 (s. Abb. 3.4). Sowohl bei den WT-Tieren als auch den KcKO-Tieren wurde ein deutlicher Geschlechtsdimorphismus mit schwereren Männchen und leichteren Weibchen ab P110 beobachtet. (Bergmann et al., 1995; *Mouse strain Informatics, The Jackson Laboratory*, (<https://www.jax.org/strain/000664>))

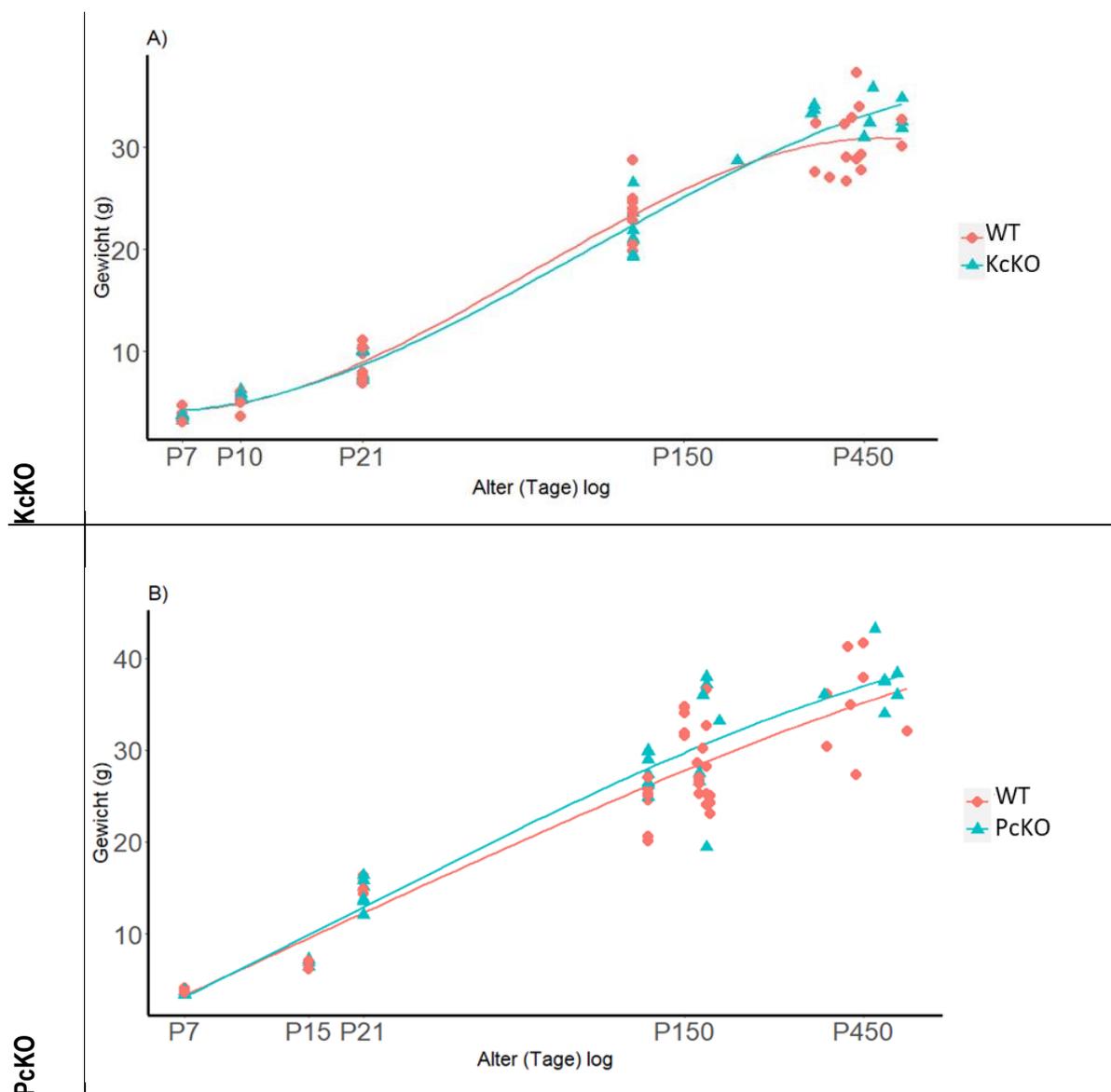


Abb. 3.4: Normale Entwicklung des Körpergewichts in miR-17~92-Cluster-defizienten Tieren (KcKO, PcKO) und WT-Kontrollen (A/B) Das Körpergewicht der juvenilen (P7, P10 und P15) und adulten Tiere (P21-P569) zeigte eine vergleichbare Entwicklung. (A) KcKO- vs. WT-Tiere (B) PcKO- vs. WT-Tiere. Es bestand zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen den Genotypen.

Untersuchte Altersstadien: P7, P10, P15, P21–P569, ((A): $p=0,8677$, $n=88$, (B): $p=0,7867$, $n=81$); Teststatistik: t-Test

Im Anschluss wurde der Einfluss der Parameter, Geschlecht, Alter und Genotyp auf die Körpergewichtsentwicklung der beiden Mausmutanten mit Hilfe eines linearen Modells untersucht, wobei das Geschlecht und der Genotyp als qualitative Faktoren sowie das Alter als quantitativer Faktor eingingen. Die Ergebnisse in Tab. 3.4 zeigen, dass das Alter in beiden

Mutanten einen signifikanten Einfluss auf das Körpergewicht der Tiere hatte, wohingegen ein signifikanter Effekt des Genotyps auf die Gewichtsentwicklung fehlte. KcKO-Tiere zeigten in der Interaktion zwischen den Faktoren Geschlecht und Alter einen natürlichen gewichtsbezogenen Sexualdimorphismus. Somit rief die zelltypspezifische Deletion des miR-17~92-Clusters im Cerebellum keine sichtbaren körperlichen Veränderungen der Tiere hervor, und die Körpergewichtsentwicklung der miR-17~92-defizienten Mauslinien entsprach der von WT-Tieren.

Tab. 3.4: Einfluss von Genotyp, Alter und Geschlecht auf die Körpergewichtsentwicklung – KcKO-Tiere (A) und PcKO-Tiere (B)

A)		KcKO			
Parameter (Prädiktoren)	DF	Mittel der Quadrate	F-Wert	p (F)	Signifikanzniveau
Konstanter Term	78	4,42			
Genotyp	1	0,80	0,18	0,671	ns
Alter	1	10356,92	2334,85	< 0,001	***
Geschlecht	1	56,34	12,70	< 0,001	***
Alter:Geschlecht	1	33,33	7,51	0,007	**
B)		PcKO			
Parameter (Prädiktoren)	DF	Mittel der Quadrate	F-Wert	p (F)	Signifikanzniveau
Konstanter Term	56	16,90			
Genotyp	1	16,52	0,97	0,327	ns
Alter	1	5399,11	319,54	< 0,001	***
Geschlecht	1	72,61	4,29	0,428	ns
Alter:Geschlecht	1	11,22	0,66	0,418	ns

(A/B) Kennwerte zweier ANOVAs zur Bestimmung des möglichen Einflusses der drei Faktoren Genotyp (0=cKO, 1=WT), Alter (P7–P569) und Geschlecht (0=Weibchen, 1=Männchen) auf die Körpergewichtsentwicklung der beiden Mausmutanten KcKO und PcKO. Nur das Alter und das Geschlecht (bei KcKO-Tieren), nicht aber der Genotyp zeigten signifikante Effekte. Eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren Alter und Geschlecht war nur bei der Mausmutante KcKO (A) nachweisbar.

Teststatistik: F-Test: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, $p > 0,5$ (nicht signifikant, ns).

3.4 Makroskopische Kleinhirnanalyse der miR-17~92-Cluster-defizienten Mausmutanten

Erste freisichtige Begutachtungen der frisch präparierten Kleinhirne von KcKO- und PcKO-Tieren wiesen keine sichtbaren morphologischen Veränderungen, wie einen Hydrozephalus, eine Mikrozephalie oder andere sichtbare Größenveränderungen des Kleinhirns auf (Forni et al., 2006; Sgaier et al., 2007). Zur Detektion nicht sichtbarer Entwicklungsunterschiede zwischen den Kleinhirnen der Mausmutanten und WT-Tieren wurden die Gewichte von zwei Gehirnbestandteilen (Kleinhirn und restliches Gehirn (Groß- und Stammhirn)) in unterschiedlichen postnatalen Altersstadien verglichen. Zur Minimierung potentieller Unterschiede beim Wasser-, Blut- oder Liquorgehalt wurden stets die Trockengewichte der präparierten Gewebe bestimmt.

3.4.1 Kleinhirngewicht der KcKO-Mausmutante

In allen analysierten adulten Kohorten waren die Kleinhirne der KcKO-Mäuse signifikant leichter als bei WT-Tieren (s. Abb. 3.5). Die jüngeren Altersstadien (P7 und P10) zeigten die gleiche Tendenz, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Die Kleinhirngewichte stiegen mit zunehmendem Alter der Tiere in beiden Genotypen bis etwa P200 an. Dieser Befund bestätigte die bereits beschriebene Stagnation des Kleinhirngewichts von adulten C57BL/6J-Mäusen (Airey et al., 2001).

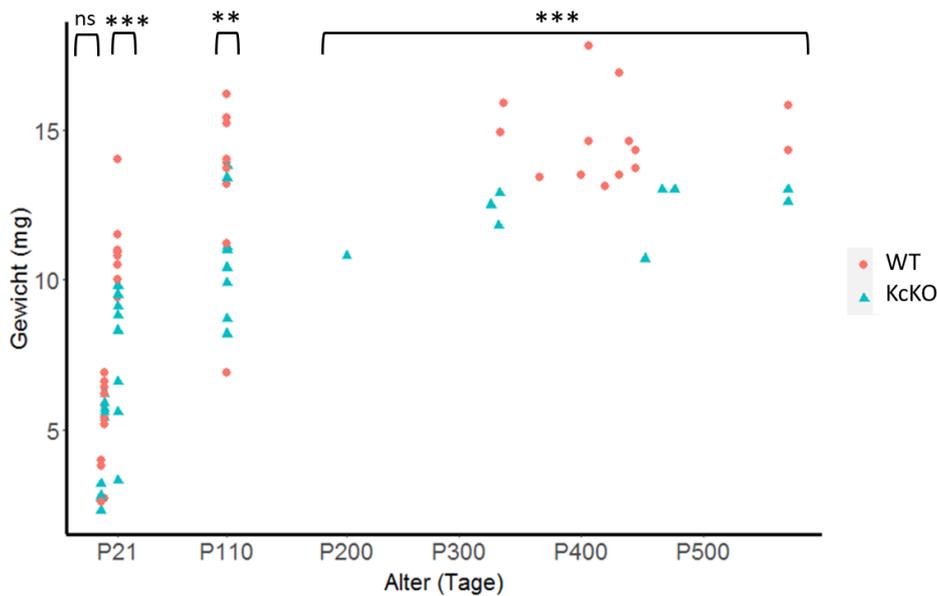


Abb. 3.5: Verringertes Kleinhirntrockengewicht adulter KcKO-Tiere im Vergleich zu WT-Tieren

Die Kleinhirntrockengewichte für die jungen Altersstadien (P7/P10) zeigten keinen signifikanten Unterschied (ns) zwischen WT- (rot) und KcKO-(türkis)-Mäusen (P7: $n=10$, $p=0,1561$; P10: $n=16$, $p=0,1121$). Die adulten KcKO-Tiere (P21–P569) wiesen signifikant geringere Kleinhirntrockengewichte als die gleichaltrigen WT-Tiere auf.

Altersstadien P7-P569: $n=86$, dargestellt als Punkte (WT) und Dreiecke (KcKO). Teststatistik: t -Test: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, $p > 0,5$ (nicht signifikant, ns).

Eine Regressionsanalyse bestätigte den Genotyp der Tiere als hoch-signifikanten Haupteffekt auf das Kleinhirngewicht (s. Tab. 3.5). Erwartungsgemäß beeinflusste auch das Alter das Gewicht des sich entwickelnden postnatalen Kleinhirns signifikant.

Tab. 3.5: Effekt von Genotyp, Alter und Geschlecht auf das sich entwickelnde Kleinhirngewicht – Regressionsanalyse

Parameter (Prädiktoren)	Regressionskoeffizient	Std. Error	Empirischer T-Wert	p (T)	Signifikanzniveau
Konstanter Term	0,1415	0,8635	0,16	0,870	ns
Genotyp	2,0344	0,5014	4,05	<0,001	***
Alter	2,2248	0,1984	11,21	<0,001	***
Geschlecht	0,6604	1,2743	0,51	0,605	ns

Das Kleinhirntrockengewicht (mg) wurde als abhängige Variable (Kriterium) angenommen, als unabhängige Variablen (Prädiktoren) wurden der Genotyp (0=KcKO, 1=WT), das Alter (P7–P569) und Geschlecht (0=Weibchen, 1=Männchen) der Tiere verwendet. Der Genotyp zeigte einen signifikanten Einfluss auf das Kleinhirngewicht. Es bestanden keine signifikanten Interaktionen zwischen den drei Prädiktoren (Daten nicht gezeigt).

n=60. Teststatistik: t-Test: ***p≤0,001, **p≤0,01, *p≤0,05, p>0,5 (nicht signifikant, ns).

Laut Airey et al. (2001) besteht bei WT-Mäusen eine Korrelation zwischen dem Kleinhirn- und Gesamthirngewicht (Airey et al., 2001). Daher wurde das restliche Gehirngewicht (Groß- und Stammhirn) der adulten Mäuse (P21 und P110) bestimmt (s. Abb. 3.6). Die Gehirngewichte der KcKO-Tiere wiesen an P21 und P110 keinen signifikanten Unterschied zu den WT-Tieren auf (s. Abb. 3.6 A/C). Dagegen wurde ein in Relation zum Gehirngewicht signifikant reduziertes Kleinhirngewicht der KcKO-Tiere im Vergleich zu WT-Tieren nachgewiesen. Demnach führte die Deletion des miR-17~92-Clusters in cerebellären Körnerzellen zu einer Reduktion der Kleinhirngröße, nicht aber zu einer Abnahme der restlichen Gehirngröße.

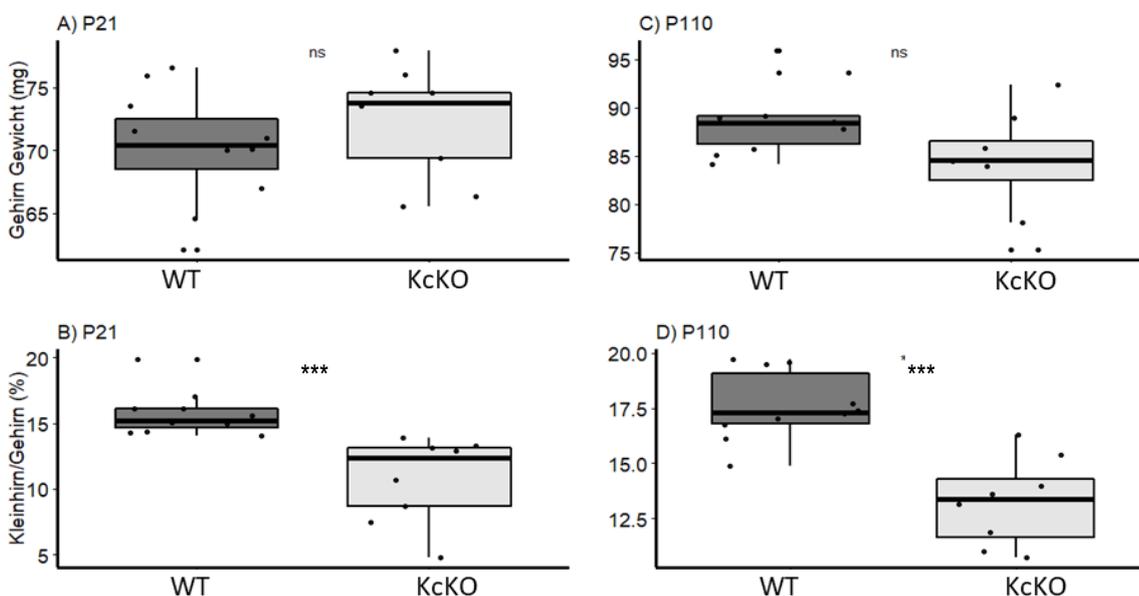


Abb. 3.6: Resthirngewichte (ohne Kleinhirn, A/C) und Verhältnis von Kleinhirngewicht zu Gehirngewichten (B/D) in adulten (P21 und P110) WT- und KcKO-Mäusen

Die Trockengewichte (mg) von Gehirnen (ohne Kleinhirn) von WT- und KcKO-Mäusen an P21 (A) und P110 (C) unterschieden sich nicht signifikant. Das Verhältnis (%) von Kleinhirn- zu Gehirntrockengewicht an P21 und P110 war in KcKO-Tieren (hellgrau) signifikant geringer als in WT-Tieren (dunkelgrau).

Die Daten sind als Box-Plot-Graphik mit dem Median (dicke schwarze Linie) dargestellt. Die Punkte visualisieren die einzelnen Tiere. (A/B) P21: n=21 (KcKO: n=10; WT: n=11) p≤0,0001; (C/D) P110: n=18 (KcKO: n=8; WT, n=10) p≤0,0003). Wilcoxon-Test: ***p≤0,001, **p≤0,01, *p≤0,05, p>0,5 (nicht signifikant, ns).

3.4.2 Kleinhirngewicht der PcKO-Mausmutante

In PcKO-Tieren wick das Kleinhirntrockengewicht in juvenilen (P15) und adulten Altersstadien (P21–P587) nicht signifikant von dem der WT-Tiere ab. Im adulten Alter an P200 stagnierte das bis dahin stetig steigende durchschnittliche Kleinhirngewicht beider Genotypen (s. Abb. 3.7). Auch mittels Varianzanalyse konnte kein signifikanter Effekt des Genotyps und des Geschlechts der Tiere auf das Kleinhirntrockengewicht gefunden werden. Allein das Alter der Tiere erwies sich als signifikanter Einfluss auf das Kleinhirngewicht der PcKO-Mausmutante (s. Tab. 3.6).

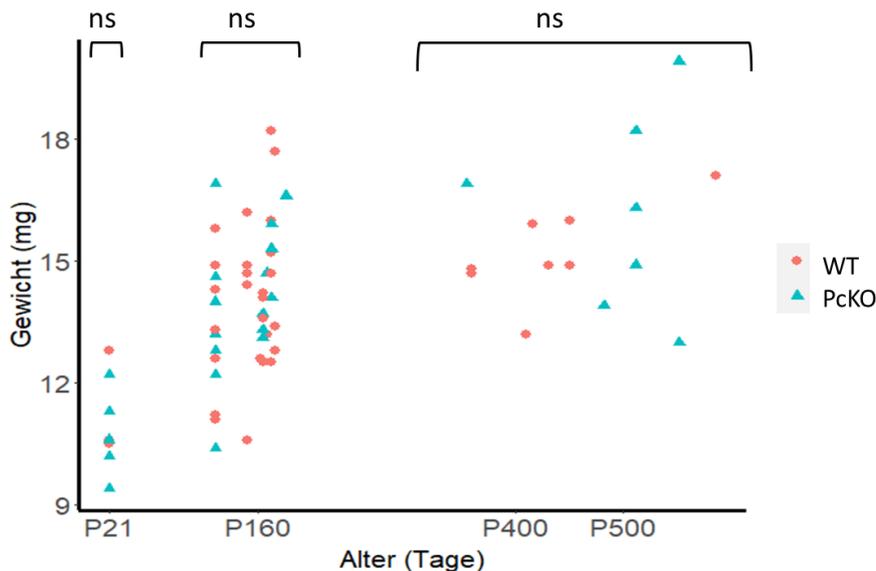


Abb. 3.7: Normales Kleinhirntrockengewicht adulter PcKO- im Vergleich mit WT-Tieren

Die Kleinhirntrockengewichte aller getesteter Altersstadien zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen WT- (rot) und PcKO- (türkis)-Mäusen. Beide Genotypen wiesen ein mit dem Alter steigendes Kleinhirngewicht bis etwa P200 auf.

Untersuchte Altersstadien: P21, P120, P>150–P587, n=66. Teststatistik t-Test: ***p≤0,001, **p≤0,01, *p≤0,05, p>0,5 (nicht signifikant, ns).

Tab. 3.6: Effekt von Genotyp, Alter und Geschlecht auf das sich entwickelnde Kleinhirngewicht

Parameter (Prädiktoren)	Regressions- koeffizient	Std. Error	Empirischer T-Wert	p (T)	Signifikanz- niveau
Konstanter Term	2,6332	1,48	1,77	0,081	ns
Genotyp	0,4210	0,52	0,80	0,423	ns
Alter	2,2936	0,31	7,27	< 0,001	***
Geschlecht	1,71	2,09	0,81	0,418	ns

Das Kleinhirntrockengewicht (mg) wurde als Kriterium, der Genotyp (0=PcKO, 1=WT), das Alter (P15–P587) und Geschlecht der Tiere als Prädiktoren in der Regressionsanalyse verwendet. Das Alter der Tiere wies als einzige Variable einen signifikanten linearen Einfluss auf das Kleinhirngewicht auf. Zwischen den drei Prädiktoren bestanden keine signifikanten Interaktionen (Daten nicht gezeigt).

n=62. Teststatistik: t-Test: ***p≤0,001, **p≤0,01, *p≤0,05, p>0,5 (nicht signifikant, ns).

Auch für die PckO-Tiere wurde das restliche Gehirngewebe separat von den Kleinhirnen gewogen und als Referenz für das Kleinhirngewicht verwendet. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den adulten (P21 und P120) Kleinhirngewichten der PckO-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren (s. Abb. 3.8).

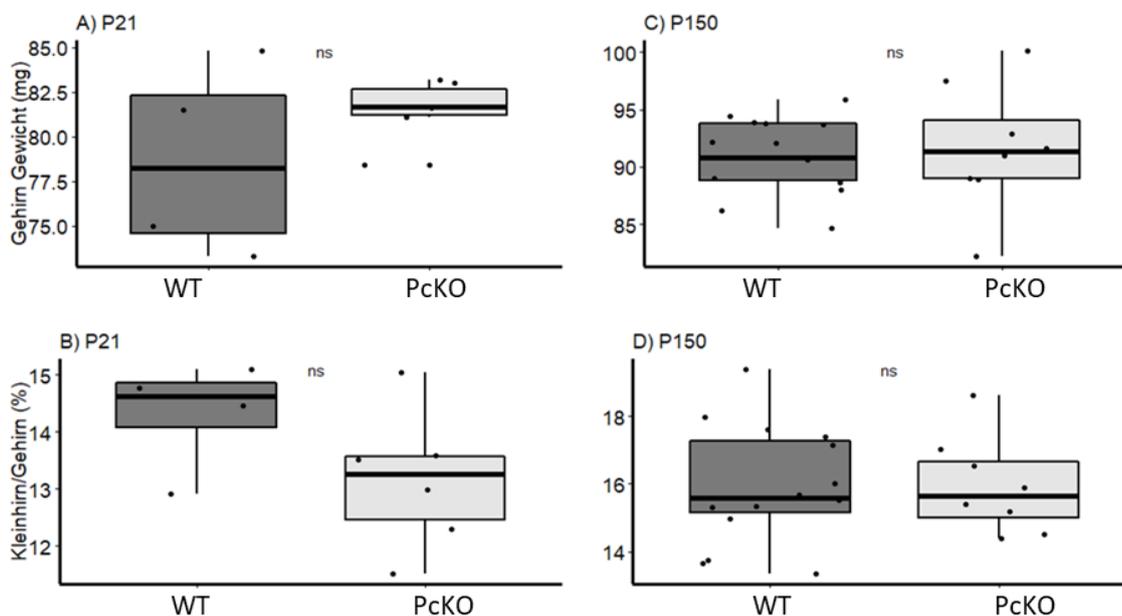


Abb. 3.8: Resthirngewichte (ohne Kleinhirn, A/C) und Verhältnis von Kleinhirngewicht zu Gehirngewichten (B/D) in adulten (P21/P150) WT und PckO-Mäusen

Die Trockengewichte (mg) von Gehirnen (ohne Kleinhirn) von WT- und PckO-Mäusen an P21 (A, $p=0,476$) und P150 (C, $p=0,8252$) waren nicht signifikant (ns) unterschiedlich. Das Verhältnis (%) von Kleinhirn- zu Gehirntrockengewicht an P21 (B, $p=0,2571$) und P150 (D, $p=0,9748$) von PckO- (hellgrau) und WT-Tieren (dunkelgrau) zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

Die Daten sind graphisch als Box-Plot mit dem Median (dicke schwarze Linie) dargestellt. Die Punkte visualisieren die einzelnen Tiere. P21: $n=10$ (PckO: $n=6$ WT: $n=4$); P150, $n=23$ (PckO: $n=8$; WT: $n=15$); Wilcoxon-Test*** $p\leq 0,001$, ** $p\leq 0,01$, * $p\leq 0,05$, $p>0,5$ (ns).

Zusammenfassend wurde das Kleinhirntrockengewicht und das restliche Gehirntrockengewicht der PckO-Mausmutante analog zu den WT-Tieren nur durch das Alter der Tiere beeinflusst. Die Abwesenheit des miR-17~92-Clusters in cerebellären Purkinjellen führte zu keiner Größenveränderung des Kleinhirns oder des restlichen Gehirngewebes.

3.5 Effekt der miR-17~92-Cluster-Defizienz in Körner- bzw. Purkinjezellen auf die morphologische Kleinhirnentwicklung

Die in Kapitel 3.4.1 beschriebenen geringeren Kleinhirntrockengewichte der KcKO-Tiere im Vergleich zu WT-Tieren könnten auf cerebelläre Anomalien der KcKO-Tiere hindeuten. Zum Nachweis möglicher Entwicklungsunterschiede in der Lobulierung und der Ausbildung der Fissuren postnataler KcKO-Kleinhirne wurden immunhistochemische Analysen in KcKO- und WT-Kleinhirnen durchgeführt. Zur Detektion auch geringer Unterschiede in der Größe und dem Ausbildungsgrad einzelner Lobuli und Fissuren der KcKO-Kleinhirne wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine (halbautomatische) Methode entwickelt. Diese Methode erlaubt eine quantitative Analyse der Morphologie von Kleinhirnschnitten durch vorher definierte deskriptive Parameter (Kap. 2.10; Abb. 2.1).

In PckO-Tieren (miR-17~92-Cluster-Deletion in Purkinjezellen) bestanden im Vergleich zu WT-Tieren keine Gewichtsunterschiede bezüglich der Kleinhirne. Auch bei dieser Mausmutante wurden mögliche Entwicklungsanomalien mittels immunhistochemischer Färbungen analysiert.

3.5.1 Morphologische Veränderung des Kleinhirns durch Körnerzell-spezifische miR-17~92-Cluster-Deletion

Für die Analyse juveniler KcKO- und WT-Kleinhirnschnitte an P3 und P5 wurde ein Körnerzell-spezifischer Antikörper verwendet. Der NeuN-Antikörper bindet an post-mitotische Körnerzellen, die im inneren Anteil der EGL und in den ausdifferenzierten Körnerzellen in der IGL vorkommen (Weyer and Schilling, 2003). Im Altersstadium P3 wurde eine unterentwickelte *Fissura anterior* zwischen den Lobuli II und III in einigen KcKO-Kleinhirnen beobachtet. Die sich entwickelnden Körnerzellschichten wiesen keinen Unterschied zwischen WT- und KcKO-Kleinhirnen auf (s. Abb. 3.9 A/B). Eine Fehlbildung der ersten Fissur im anterioren Bereich wurde auch in KcKO-Kleinhirnen zwei Tage älterer Tiere (P5) nachgewiesen, dabei konnte wieder keine Veränderung der sich entwickelnden EGL und IGL der KcKO-Kleinhirne im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Kleinhirnen beobachtet werden (s. Abb. 3.9 C/D).

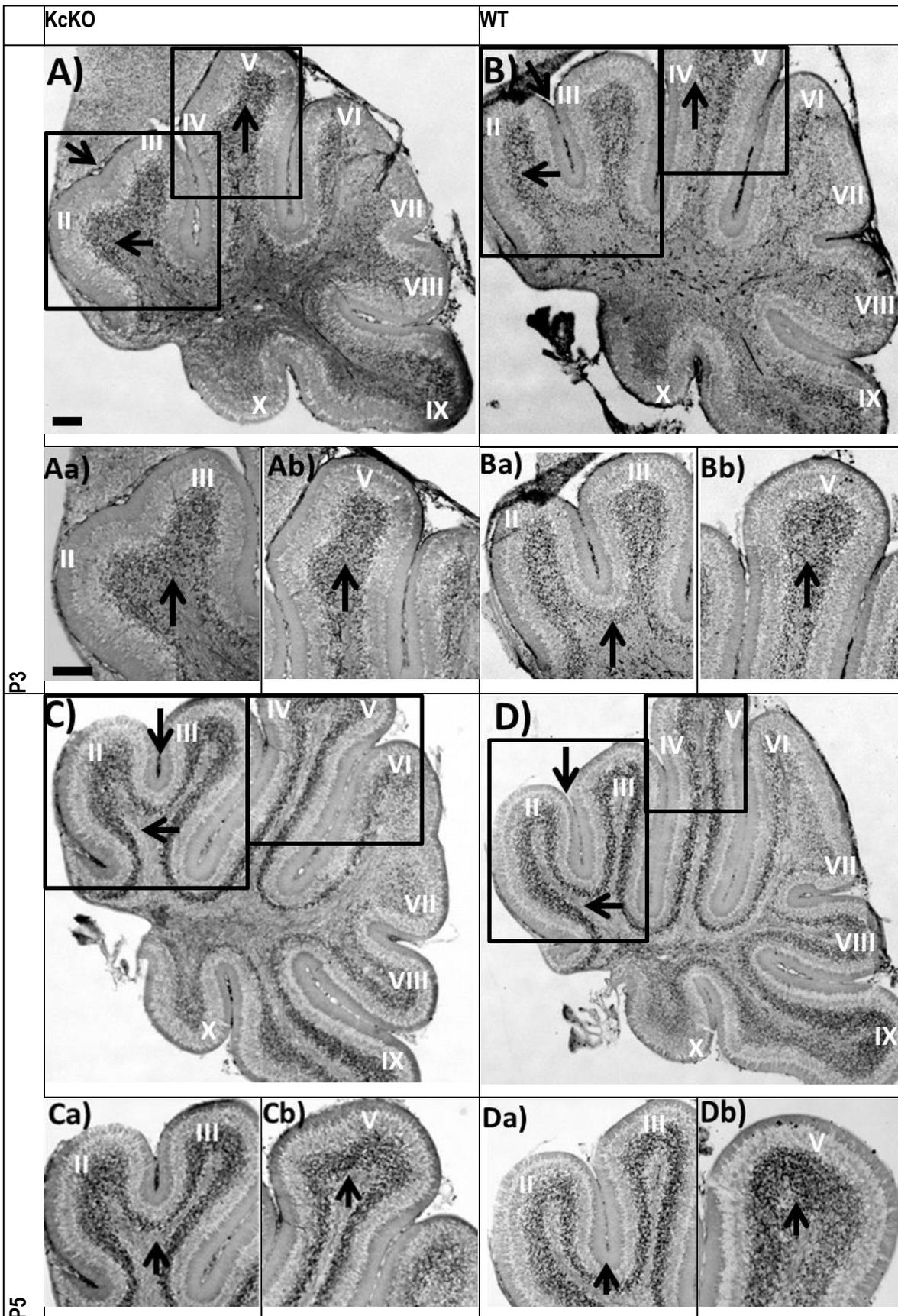


Abb. 3.9: Verzögerte Entwicklung der Kleinhirne in juvenilen KcKO-Tieren im Vergleich mit WT-Tieren an P3 und P5 – immunhistochemische Analyse des Körnerzellmarkers Neuronal nuclear protein (NeuN)

(A/C) Die Kleinhirne von drei (P3) und fünf (P5) Tage alten KcKO-Mäusen wiesen im Vergleich zu denen von WT-Tieren (B/D) eine verminderte Entwicklung der ersten anterioren Fissur zwischen Lobulus II und III auf (schwarzer Pfeil). (Aa/Ab/Ca/Cb) Die externe (EGL) und interne Körnerzellschicht (IGL, schwarze Pfeile) in den anterioren Lobuli II–V wiesen keine Unterschiede zwischen KcKO- und WT-Tieren (Ba/Bb/Da/Db) auf.

Vibratonschnitte 25 μm , Maßstab 100 μm

Im Alter von sieben Tagen zeigten sich bei den KcKO-Tieren deutliche Entwicklungsunterschiede mit unterschiedlicher Ausprägung in der Foliation des anterioren Teils des Kleinhirns (s. Abb. 3.10 A/D). Bei weitgehend normal erscheinender IGL wurden ektopische postmitotische Körnerzellen in der äußeren Schicht der EGL in den anterioren Lobuli II–III und zum Teil im Lobulus V detektiert, wogegen in den restlichen Lobuli eine intakte Laminierung zu erkennen war (s. Abb. 3.10 Aa–Ab/Da–Db). Die Ausprägung des KcKO-Phänotyps variierte stark von kaum sichtbaren morphologischen Veränderungen in den Körnerzellschichten und der Lobulierung bis hin zur Abwesenheit ganzer Lobuli im anterioren Bereich. Der posteriore Kleinhirnbereich wies dagegen in allen Fällen eine ungestörte Lobulierung und normale Ausprägung der EGL und IGL auf. Auch an 10 Tage alten KcKO-Tieren wurden vereinzelt ektopische, NeuN-positive Körnerzellen in der Molekularschicht nachgewiesen (s. Abb. 3.10 B/E). Diese traten im frühen adulten Altersstadium an P21, bei dem die reguläre Kleinhirnentwicklung (Zellzahl und Zellschichten) abgeschlossen ist, nicht mehr auf. In adulten KcKO-Tieren (P21) blieb aber die Störung der Lobulierung bzw. bei der Bildung der Fissuren weiterhin bestehen. Die Laminierung in Purkinje- und Körnerzellschicht schien intakt (s. Abb. 3.10 C/F).

Eine Überprüfung der Purkinjezellschicht an P7, P10 und P21 in KcKO-Kleinhirnen mit Hilfe des Purkinjezell-spezifischen Antikörpers Calbindin (Pinol et al., 1990) zeigte keine Unregelmäßigkeiten im Vergleich mit WT-Kleinhirnen bei der Zellschichtung (Daten nicht gezeigt).

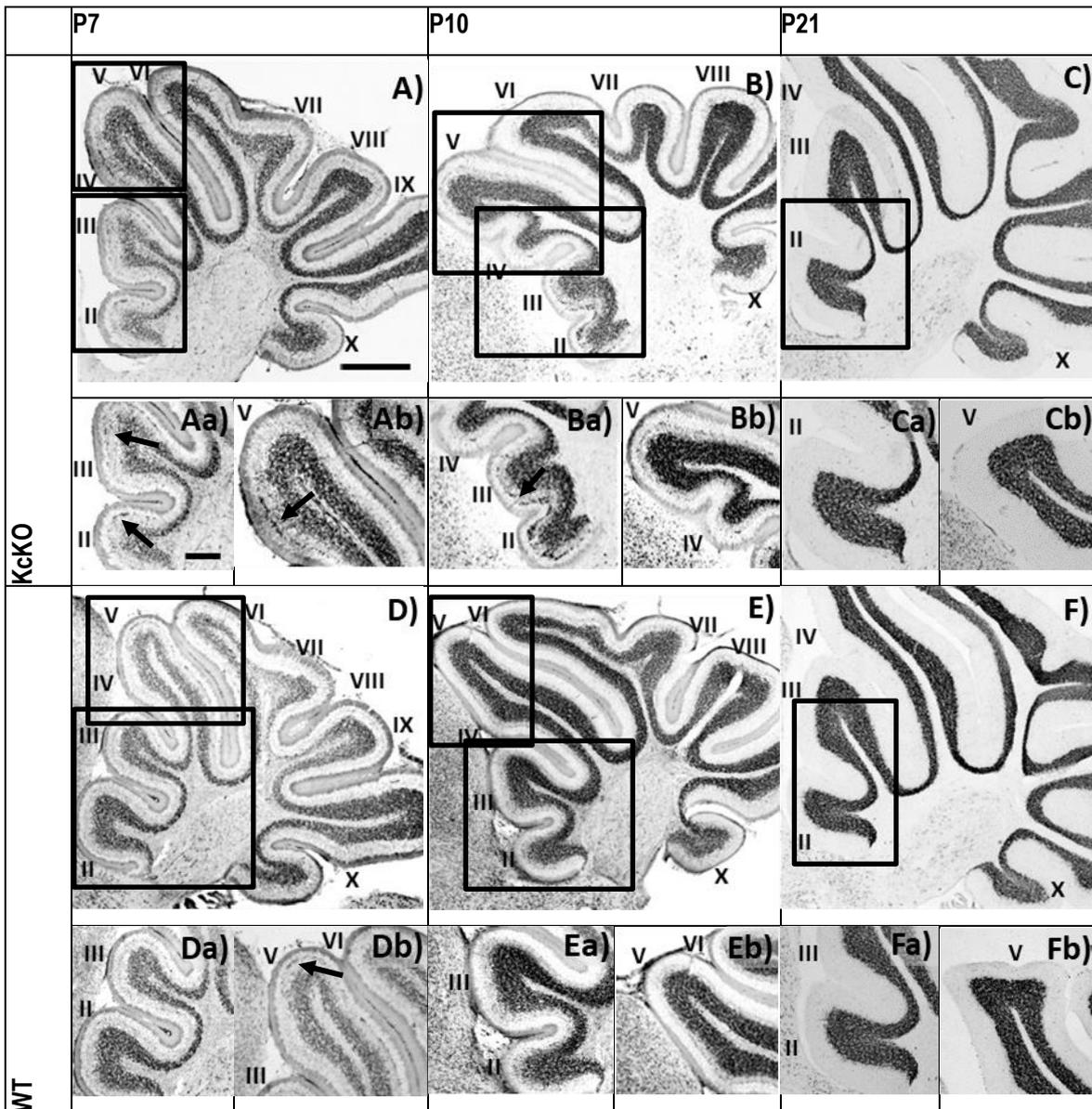


Abb. 3.10: Abweichende Entwicklung der anterioren Lobuli der KcKO- Kleinhirne an P7, P15 und P21 im Vergleich mit WT- Kleinhirnen – immunhistochemische Analyse des Körnerzellmarkers Neuronal nuclear protein (NeuN)

(A–C) Die Kleinhirne der KcKO-Tiere wiesen im Vergleich zu denen der WT-Tiere (D–F) eine mehr oder weniger starke Fehlentwicklung in der Foliation im anterioren Bereich im juvenilen (P7) bis adulten (P21) Alter auf. (Aa–Bb, Pfeile) Ektopische postmitotische Körnerzellen wurden in Lobulus II–V in 7 und 10 Tage alten KcKO-Mäusen als Zellband detektiert, in WT-Mäusen waren nur vereinzelt Zellen sichtbar (Db, Pfeil). Im posterioren Kleinhirnbereich bestanden keine Entwicklungsunterschiede zwischen KcKO- und WT-Tieren (A–F).

Vibratonschnitte 25 µm, Maßstab 50 µm

3.5.2 Entwicklung und Anwendung der Methode zur Analyse der Lobulierung des Kleinhirns – WT- vs. KcKO-Tiere

Für die quantitative Analyse der Kleinhirnmorphologie wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode entwickelt und in .Net C# implementiert. Damit konnten sagittale Kleinhirnschnitte verschiedener Altersstadien mittels deskriptiver Größen- und

Formparameter (s. Kap. 2.10, Abb. 2.1) beschrieben und geringe Unterschiede erfasst werden (Bartels et al., 2012; Bonhomme et al., 2014; Cardini and O'Higgins, 2004). Für eine ausreichende Beschreibung der Morphologie des Kleinhirns ist sowohl die Messung des Perimeters als auch der vom Perimeter umschlossenen Fläche erforderlich. Ein Kleinhirn mit kleinem Perimeter, aber großer Fläche deutet auf kurze Lobuli bzw. Fissuren oder das Fehlen einzelner Lobuli hin. Umgekehrt spiegelt ein großer Perimeter mit kleiner Fläche einen Phänotyp mit langen Lobuli bzw. tiefen Fissuren oder zusätzlichen Lobuli wider. Die Morphologie der einzelnen Lobuli und Fissuren eines Kleinhirnschnitts wurden ebenfalls vermessen.

Für statistische Vergleiche zwischen den Kleinhirnformen verschiedener Genotypen wurden zusätzlich drei analytische Parameter der Morphometrie – *Solidity*, Konvexität und Rundheit – genutzt. Für den statistischen Vergleich der Kleinhirne aus KcKO- und WT-Tieren wurden midsagittale Schnitte verwendet.

Zunächst wurde die kleinste Anzahl an Datenpunkten ermittelt, die für eine korrekte Darstellung der per Hand nachgezeichneten Kleinhirnumfangslinien (1U) erforderlich war (s. Kap 2.10, Abb. 2.1). Damit wurde die zu verarbeitende Datenmenge auf ein Minimum reduziert und gleichzeitig die Kleinhirnumfangslinie (1U) geglättet. Eine Menge von ca. 500 Datenpunkten und ein Mindestabstand von fünf Pixeln (s. Abb. 2.5) zwischen den Datenpunkten erwies sich in den vorliegenden Auswertungen als ausreichend.

Danach wurde der optimale Abstand zwischen der gezeichneten Kleinhirnumfangslinie und der hinzugefügten Hilfs-Außenlinie (2U) für eine korrekte Messung der Lobuluslängen und Fissurentiefen bestimmt. An P3 sind die Fissuren erst rudimentär ausgebildet, wodurch der Abstand zwischen den einzelnen Lobuli deutlich breiter als an P10 ist. Adulte Kleinhirnschnitte ab dem frühesten adulten Altersstadium P21 besitzen deutlich längere bzw. tiefer ausgebildete Lobuli und Fissuren, die durch die Färbungsprozedur auch weiter aufgefächert auf dem Objektträger liegend fixiert werden können. An P7 und P10 besteht entwicklungsbedingt die größte Varianz bei der Entwicklung der Lobulierung. Daher wurden die Kleinhirnschnitte exemplarisch mit verschiedenen Parametereinstellungen für jedes Alter getrennt analysiert und die optimalen Abstände der Hilfs-Außenlinie (2U) zur Kleinhirnumfangslinie (1U) mit der höchsten Rate an korrekt erkannten und vermessenen Lobuli ermittelt. An P3/P21 wurde ein Abstand („*Offset*“ (s. Abb. 2.5)) von 28 Pixel und an P7/P10 Schnitte ein Abstand von 20 Pixel als optimal identifiziert. Bei diesem Vorversuch wurde auch der Abstand bzw. der Winkel zwischen den Lobuli der einzelnen Fissuren betrachtet, um mögliche Messungenauigkeiten zu detektieren, die eine Anpassung der „*Offset*“-Einstellung erfordert hätten. Wie in Abb. 3.11 exemplarisch für P7 dargestellt, bestand keine auffällig große Varianz der Winkel bei den untersuchten Genotypen. Daher ist davon auszugehen, dass der präparationsbedingte Unterschied der Abstände zwischen den Lobuli bei der Fissurenlänge und dem Fissurenperimeter, deren Berechnung unter anderem durch die Hilfs-Außenlinie (2U) bestimmt wird, vernachlässigbar ist.

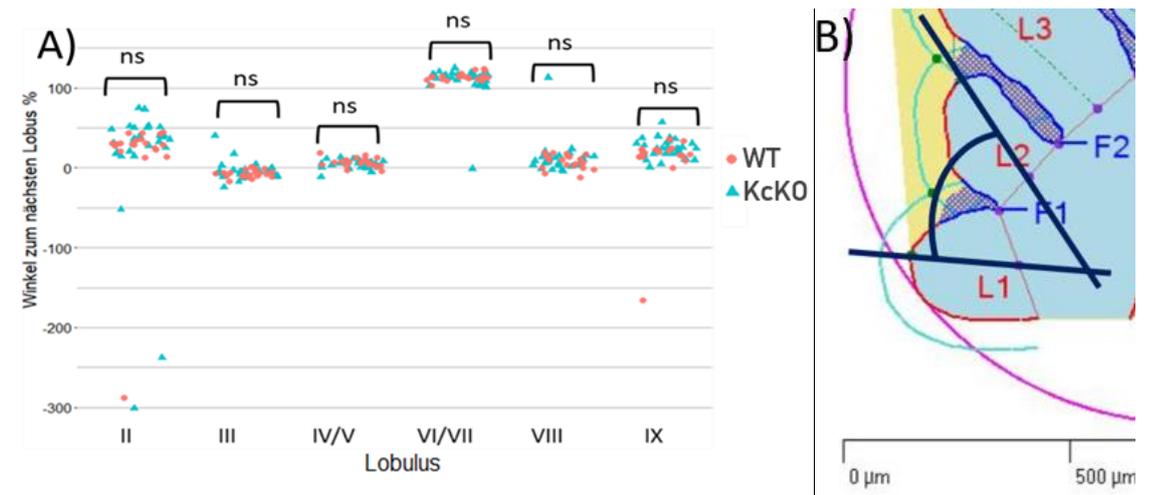


Abb. 3.11: Vergleichbare Winkel zwischen benachbarten Lobuli in Kleinhirnschnitten von KcKO- und WT-Tieren

(A/B) Die Winkel, dargestellt als Punkte (WT) und Dreiecke (KcKO) einzelner Kleinhirnschnitte, zwischen den Längengeraden zweier benachbarter Lobuli der Kleinhirne von KcKO- und WT-Tieren waren vergleichbar. (B) Exemplarische Darstellung einer Winkelberechnung (schwarze Linien) zwischen Lobulus II (L1) und III (L2), angelehnt an die in Kapitel 2.10 definierten und berechneten Kleinhirnparameter (s. Abb. 2.1).

Parametereinstellung: „Offset“ =20; F1/F2: Fissur 1 und 2; n=6 pro Genotyp, Teststatistik: t-Test (nicht signifikant, ns)

Während die Kleinhirne beider Genotypen an P3 noch nahezu den gleichen Perimeter aufwiesen (s. Abb. 3.12 A), zeigte sich schon an P7 ein deutlicher Längenunterschied zwischen den KcKO- und WT-Tieren (s. Abb. 3.12 B). Die Kleinhirnperimeter der KcKO-Tiere (P7–P21) waren signifikant kürzer als die der WT-Kleinhirne (s. Abb. 3.12 C/D). Diese Daten korrespondieren mit den in Kapitel 3.4.1 beschriebenen leichteren adulten (P21) Kleinhirntrockengewichten von KcKO-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren und zeigen darüber hinaus, dass sich die Kleinhirnentwicklung in juvenilen KcKO-Tieren (P7 und P10) und WT-Tieren unterschied. Mit zunehmendem Alter der Tiere (P7–P21) vergrößerte sich die Variationsbreite der gemessenen Perimeter in beiden Genotypen und es kam zu immer deutlicheren Überlappungen bei den Perimeterlängen beider Genotypen.

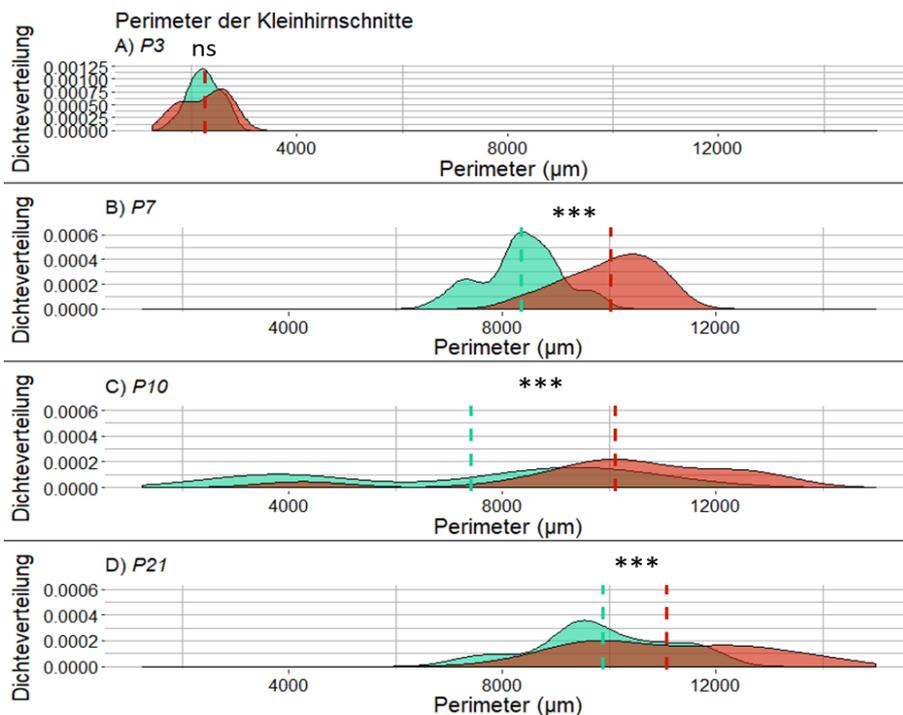


Abb. 3.12: Reduzierte Kleinhirnperimeter der KcKO-Kleinhirne ab P7 (P7 - P21) im Vergleich mit WT-Kleinhirnen

(A–D) Perimeter der Kleinhirn-Sagittalschnitte aus der Vermis von KcKO- (türkis) und WT-Tieren (rot). (A) An P3 zeigte sich kein Unterschied zwischen den Genotypen (KcKO: 2,248 μm , WT: 2,252 μm , $p=0,96$). (B–D) In älteren Tieren war der Kleinhirnumfang der KcKO-Tiere signifikant reduziert (P7/KcKO: 8,35 μm , WT: 10,02 μm , $p < 0,001$; P10/KcKO: 7,490 μm , WT: 10,109 μm , $p < 0,001$; P21/KcKO: 14,865 μm , WT: 17,160 μm , $p < 0,001$).

Pro Altersstadium und Genotyp wurden $n=3-5$ Tiere und je Tier mindestens drei mediale Vibratomschnitte ausgewertet. Die gestrichelten Linien repräsentieren den errechneten Mittelwert. Teststatistik: t-Test: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, $p > 0,5$ (nicht signifikant, ns).

Bei dem Vergleich der Flächen der Kleinhirnschnitte von KcKO- und WT-Tieren wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied ab P7 nachgewiesen (s. Abb. 3.13). Die Kleinhirne der KcKO-Tiere wiesen an P7 und P10 eine signifikant kleinere Fläche auf (s. Abb. 3.13 B/C). Mit zunehmendem Alter der Tiere wurde der Größenunterschied zwischen den Kleinhirnflächen – wie schon für die Perimeter beobachtet – geringer, sodass an P21 kein signifikanter Unterschied mehr bestand (s. Abb. 3.13 D). Damit waren an P21 die KcKO-Kleinhirnflächen bei signifikant reduziertem Perimeter vergleichbar so groß wie die Kleinhirnflächen der WT-Kleinhirne mit größeren Perimetern. Dieses Ergebnis spiegelt die Morphologie von zwei der drei ausgewerteten KcKO-Tiere wider. In einem der Tiere fehlte ein anteriorer Lobulus. In einem weiteren KcKO-Kleinhirn war die Form des Lobulus II deutlich breiter als gewöhnlich. Dies bewirkte bei einem kürzeren Perimeter eine gleichbleibende Flächengröße.

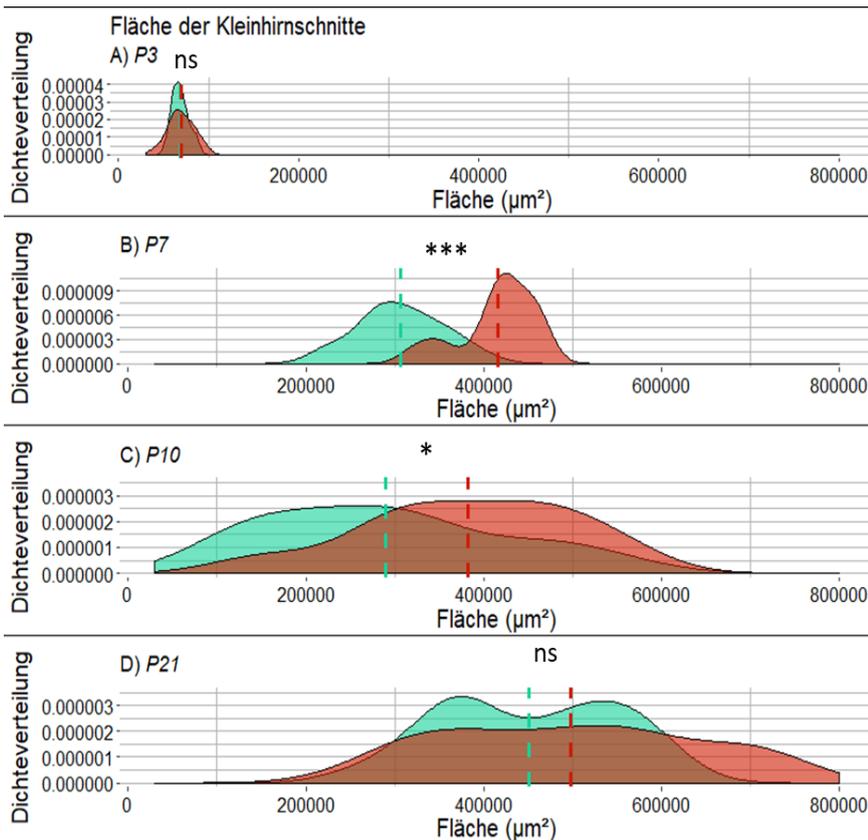


Abb. 3.13: Vergleich der Kleinhirnflächen von KcKO- und WT-Tieren an P3, P7, P10 und P21

(A) An P3 bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Kleinhirnflächen der KcKO- (türkis) und WT-Tiere (rot) (KcKO: $68,61 \mu\text{m}^2$, WT: $69,59 \mu\text{m}^2$, $p=0,772$). (B/C) An P7 und P10 waren die Kleinhirnflächen der KcKO-Tiere signifikant kleiner als die der WT-Tiere (P7/KcKO: $306,9 \mu\text{m}^2$, WT: $415,32 \mu\text{m}^2$, $p<0,001$; P10/KcKO: $289,57 \mu\text{m}^2$, WT: $382,77 \mu\text{m}^2$, $p=0,012$). (D) In adulten Tieren war der Unterschied der Kleinhirnflächen zwischen beiden Genotypen nicht signifikant (ns) (P21/KcKO: $450,77 \mu\text{m}^2$, WT: $497,57 \mu\text{m}^2$, $p=0,092$). Pro Altersstadium und Genotyp wurden $n=3-5$ Tiere und je Tier mindestens drei mediale Vibratormschnitte ausgewertet. Die gestrichelten Linien repräsentieren den errechneten Mittelwert. Teststatistik: t-Test: *** $p\leq 0,001$, ** $p\leq 0,01$, * $p\leq 0,05$, $p>0,5$ (nicht signifikant, ns).

Zusätzlich wurden zur Beschreibung der Form der Kleinhirne drei morphometrische Parameter (Solidity, Rundheit, Konvexität) verglichen (s. Tab. 3.7). Auch diese Parameter zeigten ab P10 in KcKO- und WT-Kleinhirnen eine unterschiedliche Ausprägung. Der auf den ersten Blick minimal erscheinende Unterschied zwischen den Parameterwerten wies dennoch auf prägnant verschiedene Umfangsformen bzw. Lobulierungen des Kleinhirns hin. Die drei Parameterwerte der KcKO-Tiere entsprachen eher den Werten eines perfekten Kreises, während die Parameterwerte der WT-Tiere auf eine komplexere Morphologie hindeuteten.

Tab. 3.7: Morphometrische Parameter der Kleinhirnschnitte – Vergleich der WT- und KcKO-Tiere nach Alter

	Solidity			Rundheit			Konvexität		
	Genotyp			Genotyp			Genotyp		
Alter	WT	KcKO	Signifikanz-niveau	WT	KcKO	Signifikanz-niveau	WT	KcKO	Signifikanz-niveau
P3	0,84	0,83	ns	0,74	0,73	ns	0,62	0,61	ns
P7	0,84	0,83	ns	0,60	0,60	ns	0,48	0,49	ns
P10	0,82	0,84	**	0,59	0,60	ns	0,46	0,48	*
P21	0,81	0,84	**	0,62	0,65	***	0,47	0,50	***

An P21 unterschieden sich die KcKO-Kleinhirnschnitte in allen drei analysierten Parametern signifikant von den WT-Kleinhirnschnitten. In die Berechnung gingen die Mittelwerte aller medialen Schnitte einer Alters- und Genotyp-Gruppe ein. Teststatistik: t-Test: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, $p > 0,5$ (nicht signifikant, ns).

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede der Morphologie der sagittalen Kleinhirnschnitte in KcKO-Mäusen und WT-Mäusen nur auf globale oder auch auf regionale Veränderungen zurückgingen, wurde im nächsten Schritt die Größe (Perimeter und Fläche) einzelner Lobuli und die Tiefe der sie trennenden Fissuren verglichen. Mit der morphologischen Analyse einzelner Lobuli sollten auch die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung quantitativ erfasst werden (s. Kap. 3.5.1, Abb. 3.9 und Abb. 3.10). Diese hatte ergeben, dass die Entwicklung der Lobuli im anterioren Kleinhirnbereich von KcKO-Kleinhirnen (P7–P21) durch die Deletion des miR-17~92-Clusters in den Körnerzellen beeinträchtigt war, während die posteriore Lobulierung weitgehend normal verlief.

Die anterioren Lobuli III und IV/V und die Fissur zwischen den beiden Lobuli waren von P7–P21 in KcKO-Tieren im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Tieren signifikant in ihrer Größe reduziert. Der Lobulus II war nur an P7 und P10 in KcKO-Tieren signifikant reduziert; dabei war die Fissur zwischen den Lobuli II und III auch schon an P3 signifikant kürzer, nicht aber in adulten Tieren (s. Kap. 6, Tab. 6.1 A und Tab. 6.2 A). Auch die posterioren Lobuli VIII und IX waren nur in den juvenilen, nicht aber in adulten (P21) KcKO-Mäusen signifikant kleiner als die entsprechenden Lobuli in WT-Mäusen. Lobulus X sowie die beiden Fissuren zwischen den Lobuli VIII und X waren überwiegend mit den entsprechenden Strukturen in den WT-Mäusen in allen vier analysierten Altersstadien vergleichbar (s. Kap. 6, Tab. 6.1 B und Tab. 6.2 B).

Die Ergebnisse für die Lobuli und Fissuren spiegelten die bereits beschriebene allgemein reduzierte Kleinhirngröße, besonders in den anterioren Bereichen der KcKO-Tiere und den mit steigendem Alter schwindenden Größenunterschied zu den WT-Tieren wider (s. Abb. 3.10 und Abb. 3.13).

Um zu klären, ob die Reduktion der Lobuli und Fissuren auf eine allgemein reduzierte Kleinhirnform zurückzuführen war, oder ob eine Lobulus-bezogene individuelle Entwicklungsstörung vorlag, wurden die Perimeterlängen der Lobuli als prozentuale Anteile des gesamten Kleinhirnperimeters berechnet.

In den juvenilen Altersstadien P3 und P7 wurde keine Reduktion des Anteils der anterioren Lobulusperimeter (Lobulus II und III) am gesamten Kleinhirnperimeter bei KcKO-Tieren im Vergleich mit WT-Tieren beobachtet (s. Abb. 3.14). Dennoch war der Anteil des Fissurenperimeters am gesamten Kleinhirnperimeter zwischen den beiden anterioren Lobuli II und III in den juvenilen KcKO-Tieren signifikant reduziert (s. Abb. 3.15). Die Anteile der Perimeter der posterioren Lobuli IX und X am gesamten Kleinhirnperimeter waren in juvenilen und adulten KcKO-Tieren größer als in gleichaltrigen WT-Tieren (s. Abb.

3.14 und Abb. 3.16). Korrespondierend waren auch die Anteile der Fissurenperimeter am gesamten Kleinhirnperimeter zwischen den Lobuli VIII und IX (Fissur 1) und zwischen den Lobuli IX und X (Fissur 6) an P3 bei KcKO-Tieren im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Tieren signifikant vergrößert (s. Abb. 3.17).

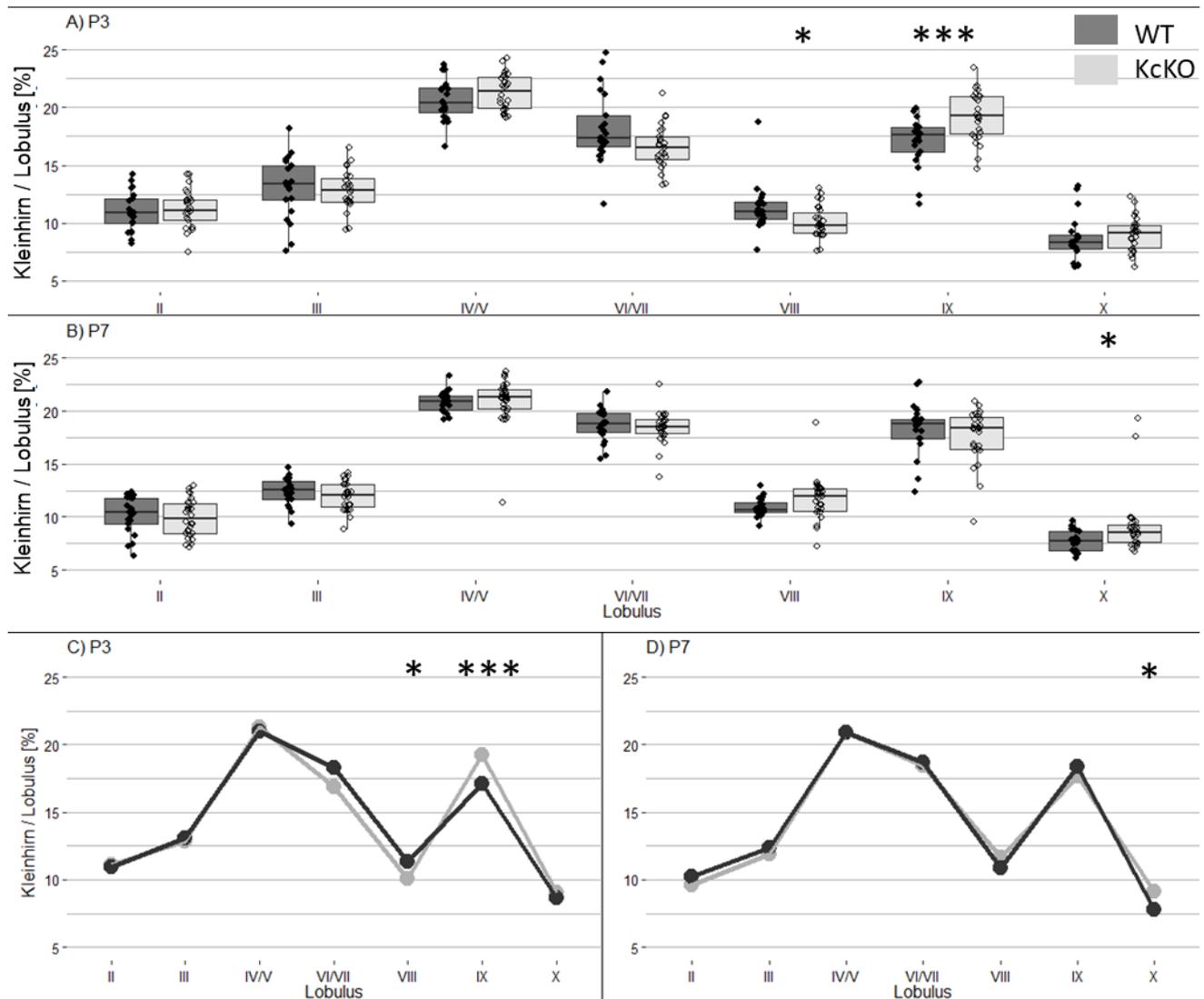


Abb. 3.14: Anteil der Perimeter der Lobuli (II–X) am gesamten Kleinhirnperimeter (%) in juvenilen (P3, P7) KcKO- und WT-Tieren (A) An P3 waren der Anteil des Perimeters des posterioren Lobulus VIII am gesamten Kleinhirnperimeter in KcKO-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren signifikant reduziert und der Anteil des Perimeters des posterioren Lobulus IX signifikant erhöht. (B) An P7 war der Anteil des Perimeters des Lobulus X am gesamten Kleinhirnperimeter in KcKO-Kleinhirnen im Vergleich zu WT-Kleinhirnen signifikant erhöht. Für die anderen Lobuli bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen KcKO- und WT-Tieren an P3 und P7. (A/B) Die Daten sind als Box-Plot-Graphik mit dem Median (dicke schwarze Linie) dargestellt. Die Kreise visualisieren die einzelnen Kleinhirnschnitte der Tiere. (C/D) Mittelwerte der in (A/B) gezeigten KcKO- (hellgrau) und WT-Daten (schwarz). Es wurden mindestens drei mediale Vibratomschnitte pro Kleinhirn ausgewertet. $n=3$ pro Genotyp. t-Test: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, $p > 0,5$ (nicht signifikant, ns).

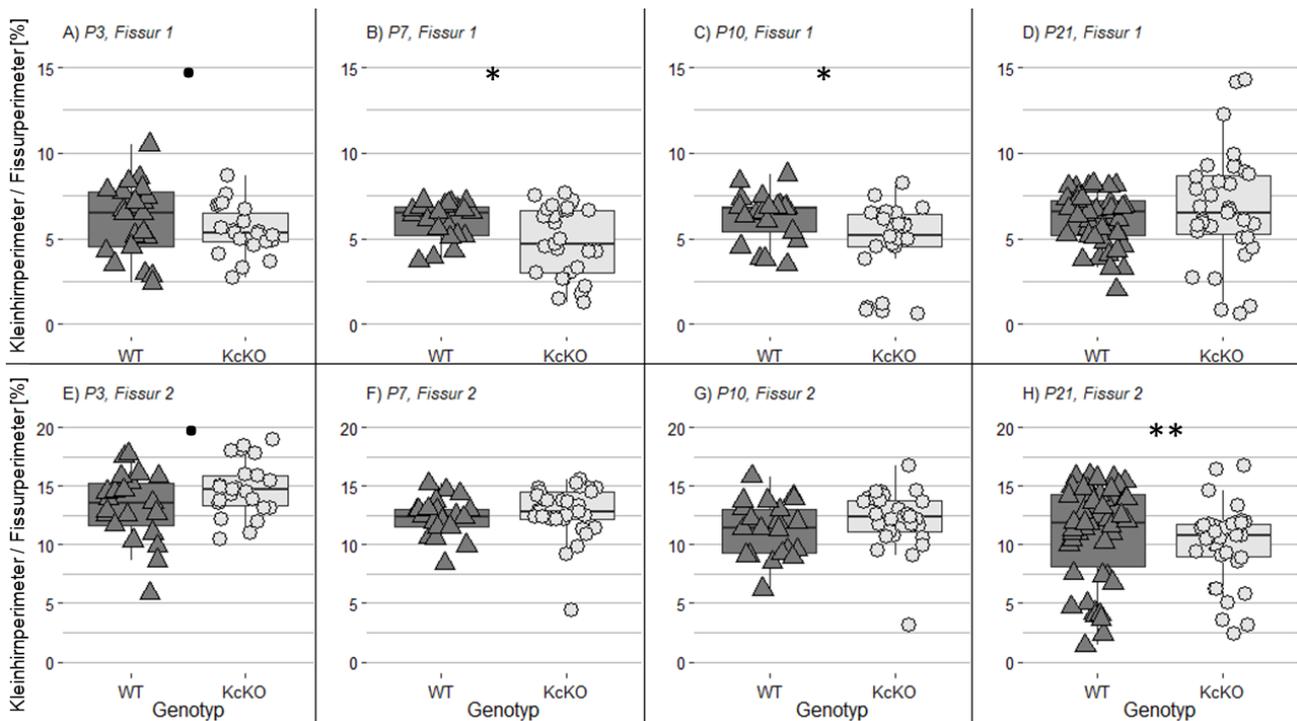


Abb. 3.15: Anteil der Perimeter der Fissuren 1 und 2 (Fissur 1 zwischen Lobulus II und III; Fissur 2 zwischen Lobulus III und IV/V) am gesamten Kleinhirnpereimeter (%) KcKO- und WT-Tieren an P3, P7, P10 und P21

(A–C) Der relative Anteil des anterioren Fissurenperimeters 1 am Kleinhirnpereimeter von juvenilen KcKO-Tieren und der relative Anteil des anterioren Fissurenperimeters 2 von P21 KcKO-Tieren waren signifikant kleiner als der von gleichaltrigen WT-Tieren. (E) An P3 war der Anteil des Perimeters der Fissur 2 am Kleinhirnpereimeter von KcKO-Tieren leicht erhöht.

Die Daten sind graphisch als Box-Plot mit dem Median (dicke schwarze Linie) dargestellt. Die Kreise visualisieren die einzelnen Kleinhirnschnitte der KcKO-Tiere, die Dreiecke die Kleinhirnschnitte der WT-Tiere. Es wurden mindestens drei mediale Vibratomschnitte pro Kleinhirn ausgewertet. $n=3-5$ pro Genotyp; KcKO-Tiere: hellgrau. WT-Tiere: schwarz. t-Test: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, $p > 0,5$ (nicht signifikant, ns).

In 10 und 21 Tage alten KcKO-Tieren war der Anteil des Lobulusperimeters III am gesamten Kleinhirnpereimeter signifikant kleiner als in den gleichaltrigen WT-Tieren (s. Abb. 3.16). Dagegen zeigten sich die relativen Anteile der Perimeter des anterioren Lobulus II und der posterioren Lobuli IX und X am gesamten Kleinhirnpereimeter von adulten (P21) KcKO-Tieren vergrößert. Entsprechend waren auch die Anteile der Fissurenperimeter am Kleinhirnpereimeter bei adulten KcKO-Tieren zwischen Lobulus III und IV/V signifikant kleiner und zwischen Lobulus IX und X signifikant größer als bei adulten WT-Tieren (s. Abb. 3.15 und Abb. 3.17).

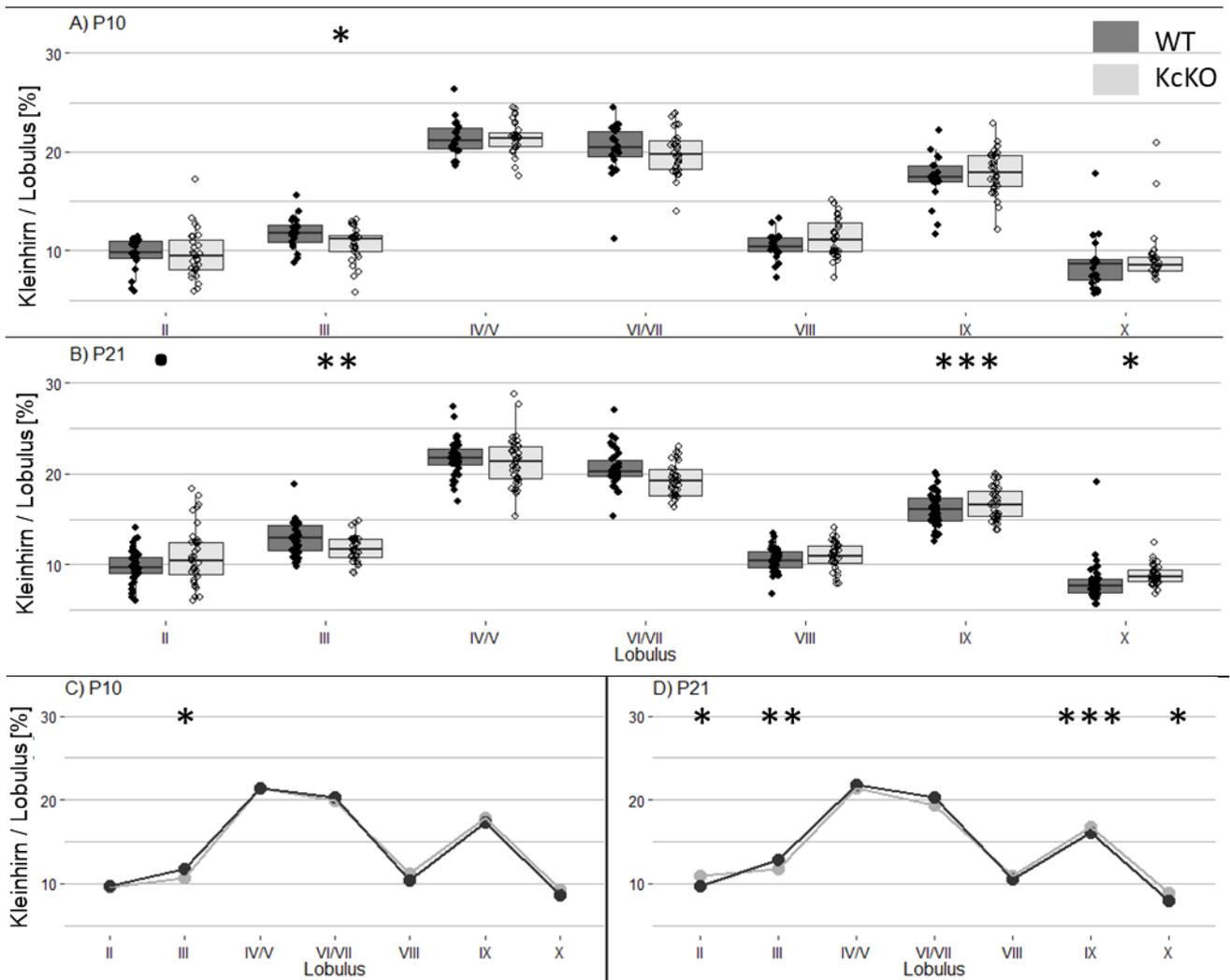


Abb. 3.16: Anteil der Perimeter der Lobuli (II–X) am gesamten Kleinhirnperimeter (%) in juvenilen und adulten (P10, P21) KcKO- und WT-Tieren

(A/B) An P10 und P21 war der Anteil des Perimeters des Lobulus III am gesamten Kleinhirn bei KcKO-Tieren signifikant geringer als bei gleichaltrigen WT-Tieren, dagegen war der Anteil des Perimeters des Lobulus II, Lobulus IX und X am gesamten Kleinhirn an P21 bei KcKO-Tieren signifikant erhöht.

(A/B) Die Daten sind graphisch als Box-Plot mit dem Median (dicke schwarze Linie) dargestellt. Die Kreise visualisieren die einzelnen Kleinhirnschnitte der Tiere. (C/D) Mittelwerte der in (A/B) gezeigten KcKO- (hellgrau) und WT-Daten (schwarz). Es wurden mindestens drei mediale Vibratonschnitte pro Kleinhirn ausgewertet. $n=3-5$ pro Genotyp. t -Test: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, $p > 0,5$ (nicht signifikant, ns).

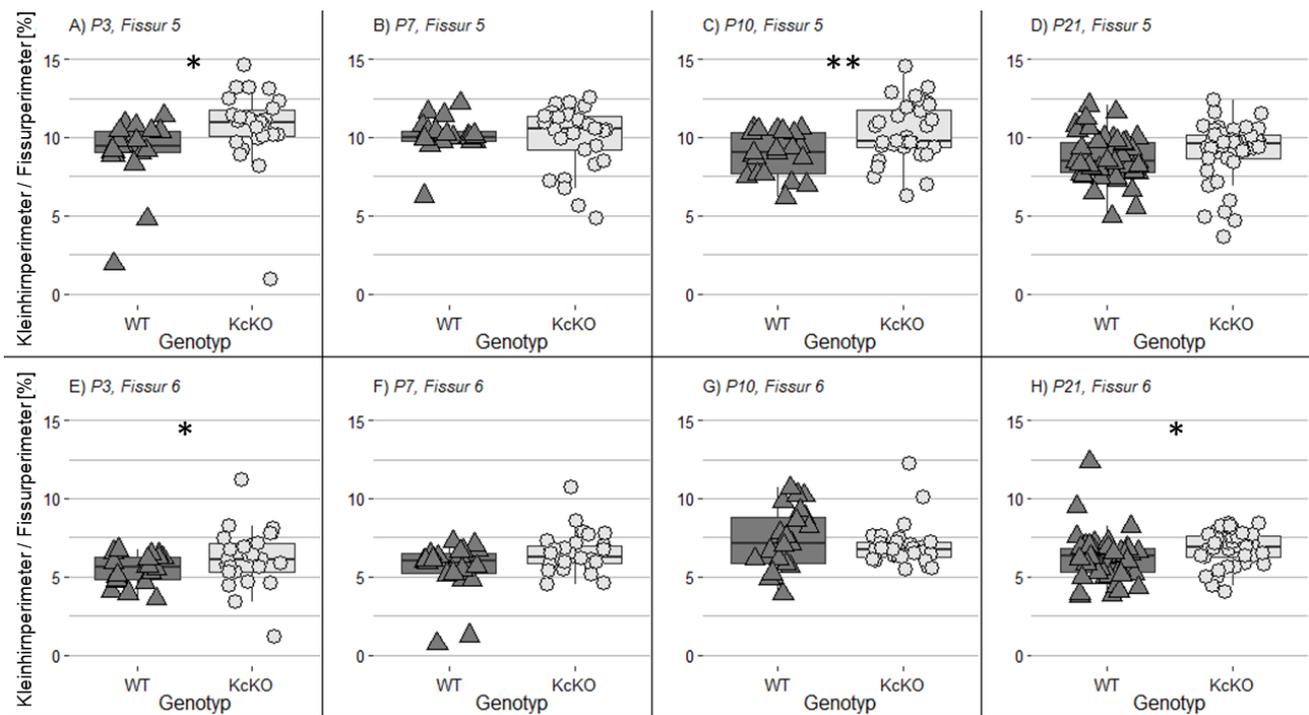


Abb. 3.17: Anteil der Perimeter der posterioren Fissuren 5 und 6 (Fissur 5 zwischen Lobulus VIII und IX; Fissur 6 zwischen Lobulus IX und X) am gesamten Kleinhirnerimeter (%) KcKO- und WT-Tieren an P3, P7, P10 und P21

(A/C) Der relative Anteil des posterioren Fissurenperimeters 5 am Kleinhirnerimeter von KcKO-Tieren an P3 und P10 war signifikant größer als der der gleichaltrigen WT-Tiere. (E/H) An P3 und P21 war der Anteil des Fissurenperimeters am Kleinhirnerimeter in alten KcKO-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren signifikant erhöht.

Die Daten sind graphisch als Box-Plot mit dem Median (dicke schwarze Linie) dargestellt. Die Kreise visualisieren die einzelnen Kleinhirnschnitte der KcKO-Tiere, die Dreiecke die Kleinhirnschnitte der WT-Tiere. Es wurden mindestens drei mediale Vibratomschnitte pro Kleinhirn ausgewertet. $n=3-5$ pro Genotyp; KcKO-Tiere: hellgrau. WT-Tiere: schwarz. t-Test: $***p \leq 0,001$, $**p \leq 0,01$, $*p \leq 0,05$, $p > 0,5$ (nicht signifikant, ns).

Unabhängig von der analysierten Schnittebene im Kleinhirn (lateral bis medial) erwies sich der Genotyp der Tiere in der Varianzanalyse als signifikanter Einflussfaktor auf die Perimeter der Lobuli. Erwartungsgemäß wurde die Größe der Lobuli auch vom Alter der Tiere und von der Lobulusposition (II-X) beeinflusst (s. Tab. 3.8). Somit hatte die Abwesenheit der miRNAs des miR-17~92-Clusters in cerebellären Körnerzellen nicht nur einen signifikanten Effekt auf die Kleinhirngröße, sondern auch auf die Größe einzelner Lobuli.

Tab. 3.8: Effekt des Alters, des Lobulus und des Genotyps auf die Perimeterlänge der Lobuli

A) Mediale Schnittebene					
Parameter (Prädiktoren)	DF	Mittel der Quadrate	F-Wert	p (F)	Signifikanzniveau
Konstanter Term	166	196268			
Genotyp	1	5128979	26,13	<0,001	***
Alter	1	24176042	123,17	<0,001	***
Lobulus	6	4285959	21,83	<0,001	***
B) Medial/laterale Schnittebene					
Parameter (Prädiktoren)	DF	Mittel der Quadrate	F-Wert	p (F)	Signifikanzniveau
Konstanter Term	159	30158165			
Genotyp	1	1070530	5,64	0,018	*
Alter	1	15419182	81,29	<0,001	***
Lobulus	6	4133552	21,79	<0,001	***
C) Laterale Schnittebene					
Parameter (Prädiktoren)	DF	Mittel der Quadrate	F-Wert	p (F)	Signifikanzniveau
Konstanter Term	110	171561			
Genotyp	1	935648	5,45	0,021	**
Alter	1	15547915	90,62	<0,001	***
Lobulus	7	2304819	13,43	<0,001	***

*Kennwerte einer Varianzanalyse zur Bestimmung des möglichen Einflusses des Genotyps (0=KcKO, 1=WT), des Alters (P3 - P21) und des Lobulus auf die Perimeterlänge der Lobuli im Kleinhirn. (A–C) In die Berechnung wurde jeweils ein medialer (A), lateraler (C) oder medial/lateraler (B) Vibratonschnitt aus der Sagittalebene pro Kleinhirn einbezogen. Alle drei Faktoren beeinflussten die Perimeterlänge der Lobuli unabhängig von der Schnittebene. Interaktionen zwischen den Faktoren konnten ausgeschlossen werden. n=2–5 pro Genotyp und Alter. Teststatistik; F-Test: ***p≤0,001, **p≤0,01, *p≤0,05, p>0,5 (nicht signifikant, ns).*

3.5.3 Morphologische Veränderung des Kleinhirns durch Purkinje-Zell-spezifische miR-17~92-Cluster-Deletion

Die Analyse der Mauslinie, in der das miR-17~92-Cluster in Purkinjenzellen deletiert wurde, erfolgte mit einem Antikörper gegen den Zelltyp-spezifischen *earlyonset*-Marker Calbindin („*Calcium binding protein*“), um mögliche morphologische Kleinhirnentwicklungsdefizite zu analysieren (Pinol et al., 1990). An P8 war das Kleinhirn der PckO-Mausmutante normal entwickelt und zeigte eine dem Alter entsprechende, fast vollständig einschichtige Purkinjenzellschicht (s. Abb. 3.18). Auch an P15 und bei adulten PckO-Tieren an P21 wiesen die Kleinhirne eine normale Entwicklung und Purkinjenzellschicht auf (s. Abb. 3.19). Die reifen ausdifferenzierten Purkinjenzellen zeigten einen vollständig entwickelten Dendritenbaum.

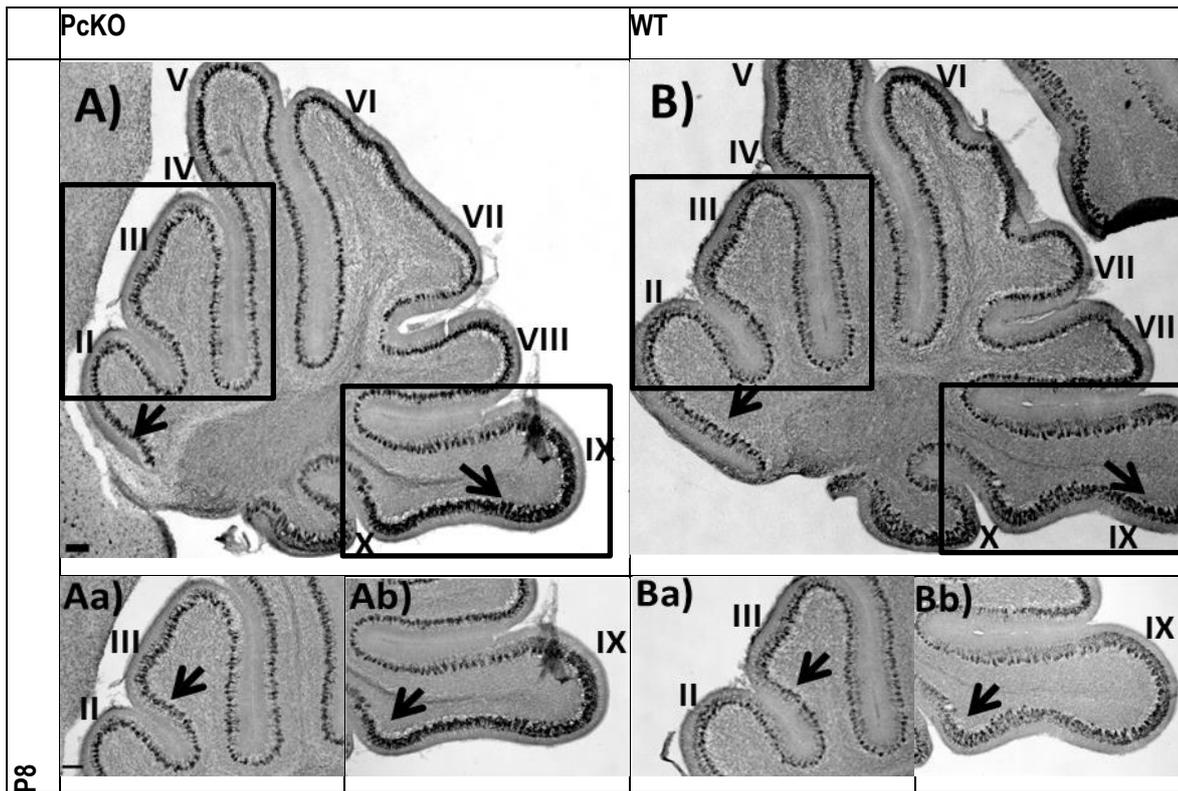


Abb. 3.18: Vergleichbare Entwicklung der Kleinhirne in PcKO- und WT-Mäusen an P8 – immunohistochemische Analyse des Purkinje-Zell-Markers Calbindin

(A/B) Die Kleinhirne beider Genotypen wiesen eine normaler Folierung auf (II–IX). (Aa–Bb) Die Purkinjellschicht in den anterioren Lobuli II–III und dem posterioren Lobulus IX bestand dem Alter entsprechend in PcKO-Kleinhirnen aus einem Monolayer (schwarze Pfeile). Einzelne Lücken oder mehrreihige Zellen traten in beiden Genotypen auf (schwarze Pfeile).

Vibratomschnitte 25 μm , Maßstab 50 μm

Zusammenfassend zeigte die Entwicklung der Purkinjezellen, ebenso wie die allgemeine Kleinhirnmorphologie, in der PcKO-Mauslinie keine Auffälligkeiten. Auf weitere quantitative morphologische Auswertungen – analog zur KcKO-Mauslinie – wurde daraufhin verzichtet.

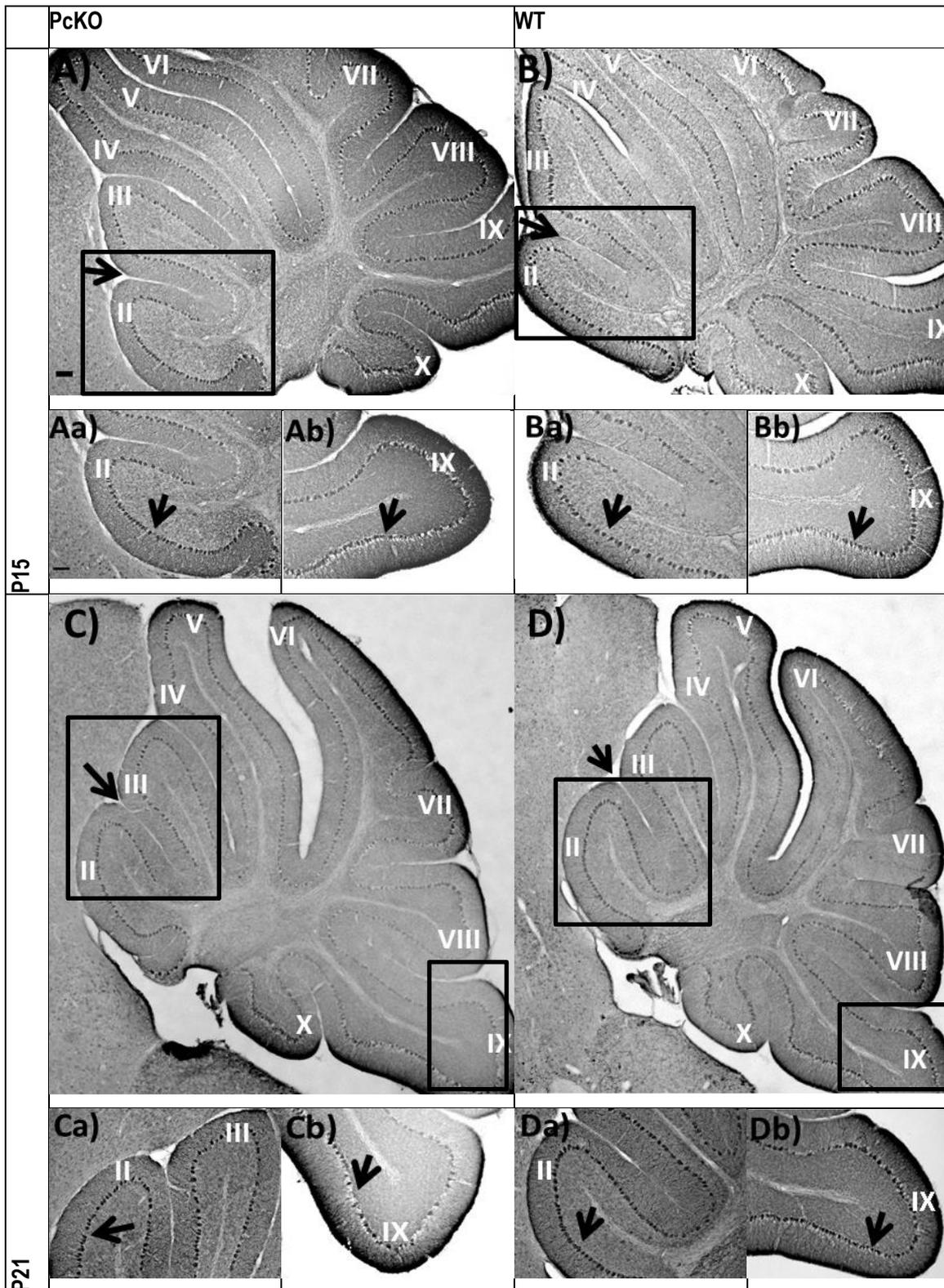


Abb. 3.19: Vergleichbare Entwicklung der Kleinhirne in PcKO- und WT-Mäusen an P15 und P21 – immunhistochemische Analyse des Purkinje-Zell-Markers Calbindin

(A–D) Kleinhirne von PcKO-Tieren (A/C) wiesen an P15 und P21 im Vergleich mit gleichaltrigen WT-Kleinhirnen (B/D) keine erkennbaren Unterschiede in der Lobuli- und Fissuren- (schwarze Pfeile) Entwicklung auf. (Aa–Db) Beide Genotypen zeigten eine vergleichbare Entwicklung der einschichtigen Calbindin-positiven Purkinjezellschicht (schwarze Pfeile) in den (Aa/Ba/Ca/Da) anterioren Lobuli und dem (Ab/Bb/Cb/Db) posterioren Lobulus IX.

Vibratonschnitte 25 µm, Maßstab 50 µm

3.6 Einfluss der miR-17~92-Cluster-Deletion auf die Zellmorphologie im Kleinhirn

In den vorigen Kapiteln konnte nur für die miR-17~92-Cluster-Deletion in den Körnerzellen ein Einfluss auf die Kleinhirnmorphologie gezeigt werden, nicht aber für die Cluster-Deletion in den Purkinjezellen. Angesichts dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass die Cluster-Deletion Veränderungen in der Entwicklung der Körnerzellen verursacht, wogegen die Purkinjezellentwicklung unbeeinträchtigt zu sein scheint. Im Folgenden soll die Morphologie der zwei Zelltypen in den jeweiligen Mausmutanten (KcKO und PckO) untersucht werden. Für die histologische Analyse der Zellen wurde eine Golgi-Färbemethode an Vibratomschnitten entwickelt (s. Kap. 2.6.6), mit der die Somata und Dendriten der Zellen gefärbt werden (Czechowska et al., 2019).

3.6.1 Einfluss der Fixierung auf die Größe der Somata

Durch die Fixierungsschritte während der Golgi-Färbungsmethode zur präferierten Anfärbung von Körnerzellen kann das verwendete Gewebe schrumpfen. Um sicherzustellen, dass solche Färbungsartefakte den Vergleich der KcKO- und WT-Kleinhirnschnitte nicht verfälschen, wurde der Zellkörper eines weiteren cerebellären Zelltyps (Purkinjezellen) ausgemessen. Die Somaflächen der angefärbten Purkinjezellen und deren Zellkörperumfänge waren in beiden Genotypen vergleichbar (s. Abb. 3.20). Die Fixierungsschritte der Golgi-Färbung der Kleinhirnschnitte hatten demnach keinen variierenden Effekt auf die Somatagröße cerebellärer Zellen.

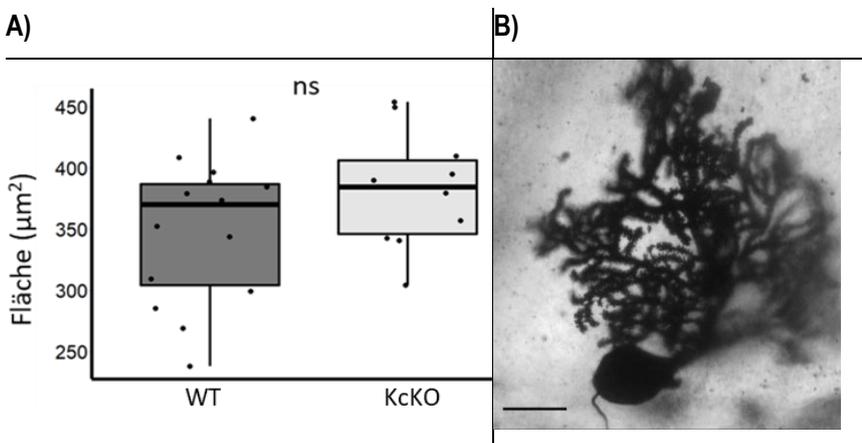


Abb. 3.20: Bestimmung der Fläche der Purkinjezell-Somata in KcKO- und WT-Mäusen

(A) Die Somaflächen der angefärbten Purkinjezellen in den Kleinhirn-Vibratomschnitten beider Genotypen waren nicht signifikant (ns) verschieden ($p > 0,05$; KcKO-Purkinjezellen: $n=10$, WT-Purkinjezellen: $n=13$). (B) Exemplarisch dargestellt eine Golgi-gefärbte Purkinjezelle.

(A) Die Daten sind graphisch als Box-Plot mit dem zugehörigen Median (dicke schwarze Linie) dargestellt. Die Punkte visualisieren die vermessenen Purkinjezellen. Maßstab 25 µm. Teststatistik: t-Test: ns= nicht signifikant.

3.6.2 Vergleich der Zellkörper von Körnerzellen in WT- und KcKO-Mäusen

Zur vergleichenden Analyse der Zellgröße und Dendritenlänge der Körnerzellen in anterioren und posterioren Kleinhirnbereichen von KcKO- und WT-Mäusen wurden Kleinhirne von 15 Tage alten Mäusen verwendet. Die durchschnittlichen Somaflächen sowie Dendritenlängen der Zellen wurden getrennt für die anterioren Lobuli II und- III sowie für den posterioren Lobulus IX in der IGL ausgewertet (s. Abb. 3.21).

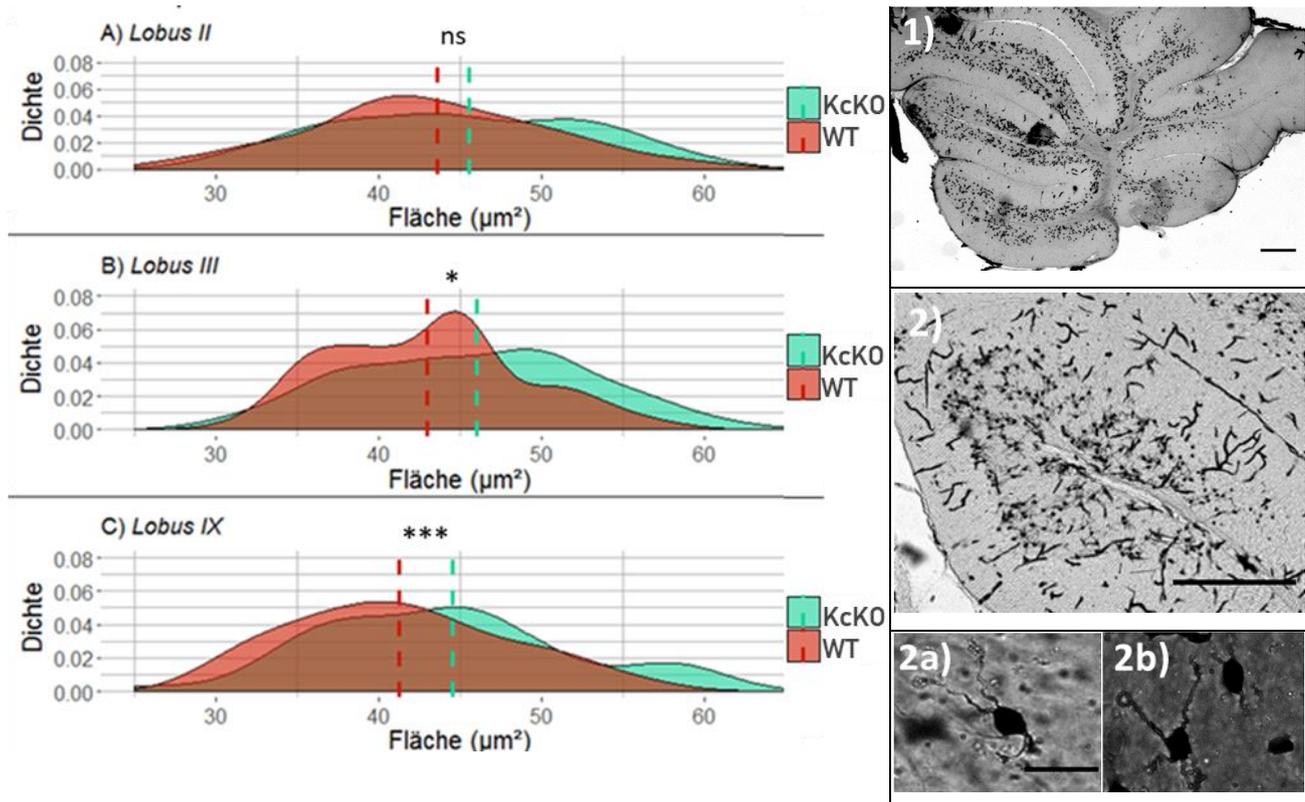


Abb. 3.21: Somaflächen der Körnerzellen in Kleinhirnen von KcKO- und WT-Tieren an P15

(1/2) Exemplarische Übersichtsaufnahmen eines Golgi-gefärbten Kleinhirnschnittes und des Lobulus III einer WT-Maus. (2a/2b) Darstellung zweier Golgi-gefärbter Körnerzellen des Lobulus III. (A/C) Die Somaflächen-Werte von KcKO-Körnerzellen (türkis) wiesen für alle untersuchten Lobuli eine größere Spanne auf (KcKO: 26,69–80,11 μm^2 , WT: 27,37–75,25 μm^2). (A) Die Somafläche des Lobulus II wies keinen signifikanten Unterschied zwischen WT- (rot) und KcKO-Tieren auf (WT: 43,64 μm^2 , KcKO: 45,56 μm^2 , $p=0,158$). (B/C) Im Mittel (gestrichelte Linie) waren die Somata bei KcKO-Tieren signifikant größer als bei WT-Tieren (Lobulus III: WT: 42,96 μm^2 , KcKO: 46,06 μm^2 , $p=0,014$; Lobulus IX: WT: 41,26 μm^2 , KcKO: 44,54 μm^2 , $p=0,006$). KcKO: $n=4$, WT: $n=3$, pro Lobulus $n= 40\text{-}60$ Körnerzellen, Maßstab 100 μm , 50 μm , 5 μm . Teststatistik: t-Test: *** $p\leq 0,001$, ** $p\leq 0,01$, * $p\leq 0,05$, $p>0,5$ (nicht signifikant, ns).

Im anterioren Kleinhirnbereich war in KcKO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen die durchschnittliche Somafläche einer Körnerzelle aus dem Lobulus II tendenziell und aus dem Lobulus III signifikant größer. Überraschenderweise wies auch der posteriore Lobulus IX von KcKO-Mäusen eine im Vergleich zu WT-Mäusen größere Somafläche der Körnerzellen auf. Die Körnerzellgrößen der drei Lobuli in den KcKO-Tieren zeigten eine breite, unimodale Verteilung (s. Abb. 3.21). Dagegen war die Spanne der Somaflächen der Körnerzellen im Lobulus III in den WT-Tieren deutlich geringer mit einem deutlichen

Maximum im Bereich des errechneten Mittelwerts (s. Abb. 3.21 B). Im direkten Vergleich überlagerten sich die Verteilungskurven der Somaflächen in KcKO- und WT-Tieren in allen drei Lobuli über weite Bereiche. In WT-Tieren kamen aber häufiger sehr kleine und in KcKO-Mäusen sehr große Somaflächen vor.

Aufgrund der großen Streuung der Somaflächen in KcKO- und WT-Körnerzellen in allen drei Lobuli wurde die Somaflächen-Verteilung in einzelnen Tieren analysiert, um zu überprüfen, inwieweit der errechnete Durchschnittswert die Situation in Individuen widerspiegelt (s. Abb. 3.22 und Abb. 3.23).

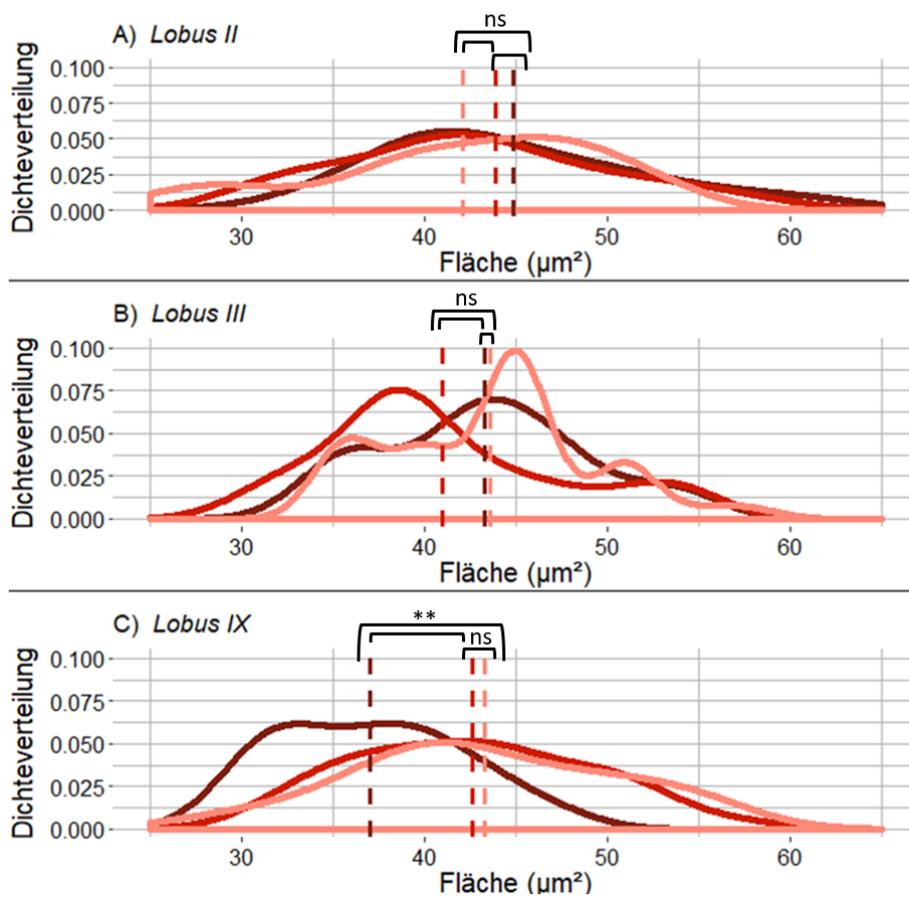


Abb. 3.22: Somaflächen der Körnerzellen in den Lobuli II, III und IX in individuellen Wildtyp-Tieren

(A/B) Die mittleren Somaflächen der Körnerzellen aus Lobulus II und III in drei Individuen (dunkelrote bis hellrote Kurven) unterschieden sich nicht signifikant (ns). (C) Die mittlere Somafläche der Körnerzellen im Lobulus IX eines WT-Tieres (dunkelrot) wick signifikant von der mittleren Somafläche der beiden anderen WT-Tiere (rot und hellrot) ab. Innerhalb eines Individuums unterschied sich die mittlere Somafläche aus dem posterioren Lobulus IX von denen der anterioren Lobuli in ihrer Größe signifikant. Die durchschnittliche Größe der Somafläche bei den beiden anderen Tieren war für alle Lobuli vergleichbar. Die gestrichelten Linien repräsentieren den Mittelwert der Somaflächen des jeweiligen Tieres.

Pro Lobulus: $n = 40-60$ Körnerzellen; Teststatistik: t -Test: $***p \leq 0,001$, $**p \leq 0,01$, $*p \leq 0,05$, $p > 0,5$ (nicht signifikant, ns).

Die Somaflächen von WT-Körnerzellen aus dem Lobulus II wiesen eine breit auseinandergezogene Verteilung auf; die Unterschiede zwischen den Tieren waren gering (s. Abb. 3.22 A). Das galt auch für die Körnerzellen zweier WT-Tiere in Lobulus IX; die Körnerzellen des dritten Tieres zeigten eine Verschiebung zu kleineren Somagrößen und andeutungsweise eine bimodale Verteilung (s. Abb. 3.22 C). Auch die polymodale Größenverteilung der Körnerzellen in Lobulus III eines

Tieres wich deutlich von der Verteilung der anderen Tiere ab (s. Abb. 3.22 B). Die Mittelwerte der Somaflächen zwischen den WT-Tieren unterschieden sich mit einer Ausnahme im posterioren Lobulus IX nicht signifikant.

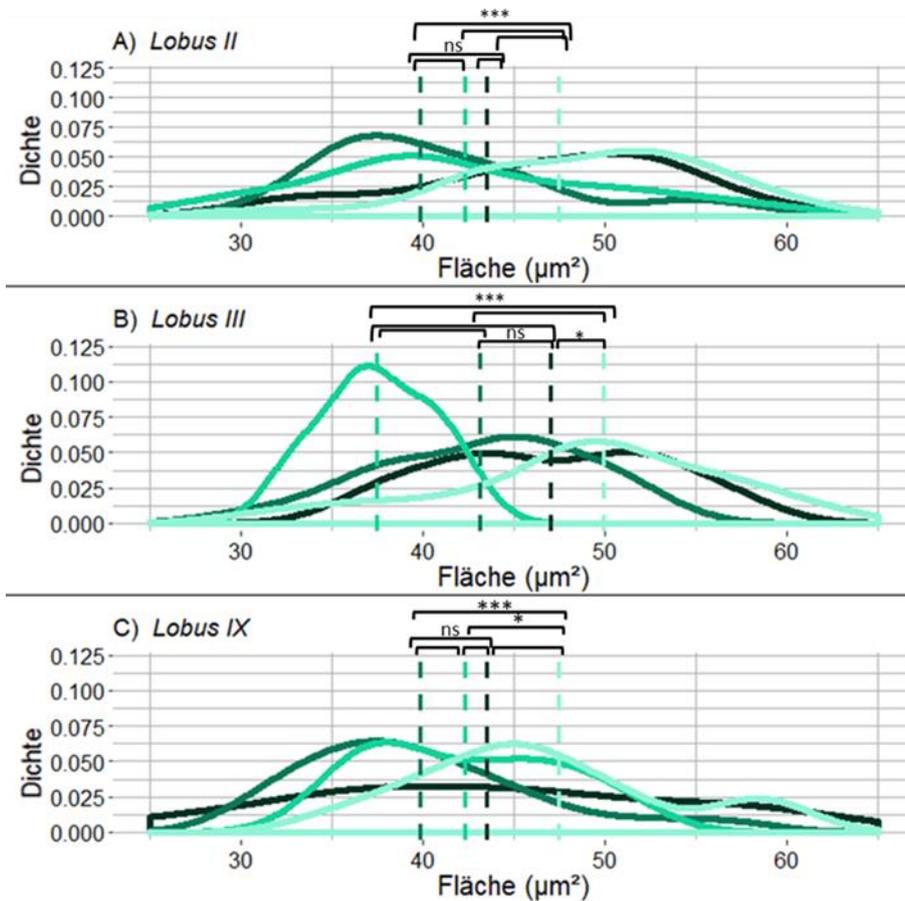


Abb. 3.23: Somaflächen der Körnerzellen in den Lobuli II, III und IX in individuellen KcKO-Tieren

(A–C) Die Größenverteilung der Somaflächen von Körnerzellen aus den Lobuli II, III und IX innerhalb eines Individuums unterschied sich mit einer Ausnahme (zwischen Lobulus III und IX (dunkelgrün)) nicht signifikant (ns). Zwischen den Individuen wichen die durchschnittlichen Somaflächen der Körnerzellen aus Lobulus II (A) bei zwei Tieren und aus Lobulus III (B) bei drei Tieren signifikant ab. (C) Der Mittelwert der Somaflächen im Lobulus IX unterschied sich überwiegend nicht zwischen den Individuen. Die gestrichelten Linien repräsentieren den Mittelwert der Somaflächen des jeweiligen Tieres.

Pro Lobulus $n = 40\text{--}60$ Körnerzellen; Teststatistik: t -Test: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, $p > 0,5$ (nicht signifikant, ns).

Die Verteilung der Somaflächen der KcKO-Körnerzellen aus allen analysierten Lobuli wies eine deutlich größere Varianz auf als bei WT-Körnerzellen. Im Gegensatz zu der einheitlichen unimodalen Verteilung der Somaflächen der WT-Körnerzellen aus Lobulus II zeigten die KcKO-Körnerzellflächen zum Teil signifikante Unterschiede. Jeweils zwei Tiere zeigten eine rechtsschiefe (größere Somaflächen) und linksschiefe (kleinere Somaflächen) Verteilung (s. Abb. 3.23 A). Auch die KcKO-Körnerzellen aus dem Lobulus IX wiesen nur in zwei Fällen eine vergleichbare Tendenz zu kleineren Somaflächen auf, dagegen zeigten die Körnerzellen aus dem dritten Tier eine bimodale, rechtsschiefe Verteilung. Die Größenverteilung der Somaflächen aus dem vierten Tier unterschied sich durch die flache unimodale Verteilungskurve deutlich von derjenigen der anderen Tiere (s. Abb. 3.23 C). Die Somaflächen von Körnerzellen aus dem Lobulus III zeigten bei zwei der vier KcKO-

Tiere eine breite, unimodale und in einem Fall eine bimodale Verteilung (s. Abb. 3.23 B). Das vierte Tier war durch eine unimodale Verteilung, kleinere Somaflächen und eine insgesamt geringere Streuung der Werte gekennzeichnet.

Zusammenfassend war die Varianz der Körnerzell-Somaflächen zwischen Individuen bei KcKO-Mäusen größer als bei WT-Mäusen. Die KcKO-Körnerzellen aus dem anterioren Lobulus III und aus posterioren Lobulus IX wiesen ein signifikant größeres Soma im Vergleich zu den WT-Körnerzellen auf; bei den Körnerzellen aus Lobulus II bestand nur ein tendenzieller Unterschied.

3.6.3 Vergleich der Dendritenlänge von Körnerzellen in WT- und KcKO-Mäusen

Neben dem Zellkörper haben auch die Dendriten einen Einfluss auf die Migration und Signalweiterleitung der Zelle, dabei verändern sie fortwährend ihre Gestalt. Die reife Körnerzelle zeichnet sich durch vier bis fünf verzweigte oder unverzweigte Dendriten mit einem charakteristischen klauenförmigen Ende aus. Eine veränderte Dendritenentwicklung kann Auswirkungen auf die allgemeine Motilität und Entwicklung der gesamten Zelle haben. Im Folgenden wurde die Länge der Dendriten postmitotischer Körnerzellen aus der IGL von 15 Tage alten KcKO- mit WT-Tieren verglichen, um einen möglichen Einfluss der miR-17~92-Cluster-Deletion auf die Morphologie der Körnerzellen-Dendriten zu analysieren. Die Dendritenlängen der Körnerzellen aus Lobulus II und IX waren in KcKO-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren signifikant kürzer. Dendriten der Körnerzellen aus dem Lobulus III waren dagegen bei beiden Genotypen vergleichbar lang (s. Abb. 3.24). Mit Hilfe des Verfahrens der Kerndichteschätzung wurde die Verteilung der Dendritenlängen statistisch ausgewertet und zwischen den Genotypen verglichen. Für die Körnerzellen aus den drei analysierten Lobuli beider Genotypen konnte eine übereinstimmende Verteilung der Dendritenlängen mit deutlichen Spitzen (*Peaks*) nachgewiesen werden. Dennoch wurde eine signifikant größere Anzahl an kürzeren Dendriten bei KcKO-Tieren in den Körnerzellen aus Lobulus II und IX gemessen; die Verteilungskurven der Genotypen überlagerten sich in diesem Bereich nicht mehr vollständig (s. Abb. 3.24 A/C). Die durchschnittliche Dendritenlänge von Körnerzellen aus dem Lobulus III war in beiden Genotypen nicht signifikant unterschiedlich; wobei auch hier vermehrt kurze Dendriten in Körnerzellen der KcKO-Tiere nachgewiesen wurden. Im Gegensatz zu den Körnerzellen aus Lobulus II und IX hatten die Körnerzellen aus Lobulus III in WT-Tieren eine vergleichsweise geringe Anzahl an langen Dendriten, wodurch die Verteilungskurve steil abfiel. Daher unterschieden sich die durchschnittlichen Dendritenlängen in KcKO- und WT-Tieren nicht (s. Abb. 3.24 B).

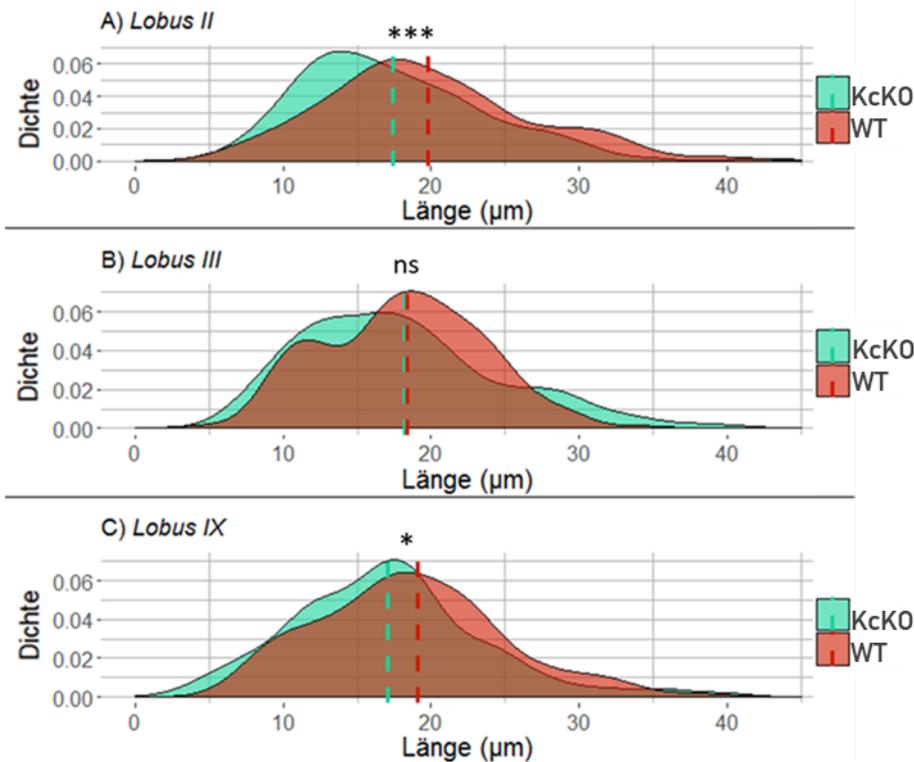


Abb. 3.24: Dendritenlänge der Körnerzellen in Kleinhirnen von KcKO- und WT-Tieren an P15

(A/C) In den Lobuli II und IX waren die Dendritenlängen der KcKO-Körnerzellen (türkis) im Vergleich zu WT-Körnerzellen signifikant kürzer (rot). (B) In Lobulus III war die mittlere Dendritenlänge der Körnerzellen in KcKO- und WT-Tieren vergleichbar.

Die gestrichelten Linien repräsentieren den Mittelwert. (A-C) Lobulus II: WT: 19,76 µm, KcKO: 17,44 µm, $p=0,001$; Lobulus III: WT: 18,37 µm, KcKO: 17,48 µm, $p=0,725$; Lobulus IX: WT: 19,05 µm, KcKO: 16,12 µm, $p=0,020$; WT: $n=3$, KcKO: $n=4$, pro Lobulus: $n=40-60$ Körnerzellen, Teststatistik: t-Test: *** $p\leq 0,001$, ** $p\leq 0,01$, * $p\leq 0,05$, $p>0,5$ (nicht signifikant, ns).

Aufgrund der extrem variablen Dendritenlängen in den Körnerzellen der Genotypen wurden im Anschluss die Werte für individuelle Tiere separat analysiert.

Die Längenverteilung der Dendriten von Körnerzellen aus Lobulus II und IX von allen drei WT-Tieren war tendenziell bimodal (s. Abb. 3.25 A/C). Bei einer insgesamt breiten Verteilung der Dendritenlängen fiel bei Lobulus II in zwei der drei Tiere (s. Abb. 3.25 A) und für Lobulus IX in einem Tier (hellrot) (s. Abb. 3.25 C) das Vorkommen längerer Dendriten auf. Auch die Körnerzellen aus dem Lobulus III zeigten in zwei der drei Tiere eine bimodale Längenverteilung der Dendriten (s. Abb. 3.25 B). Die Dendritenlängen in Abhängigkeit vom Lobulus wichen in nur einem Individuum (dunkelrot) nicht signifikant voneinander ab.

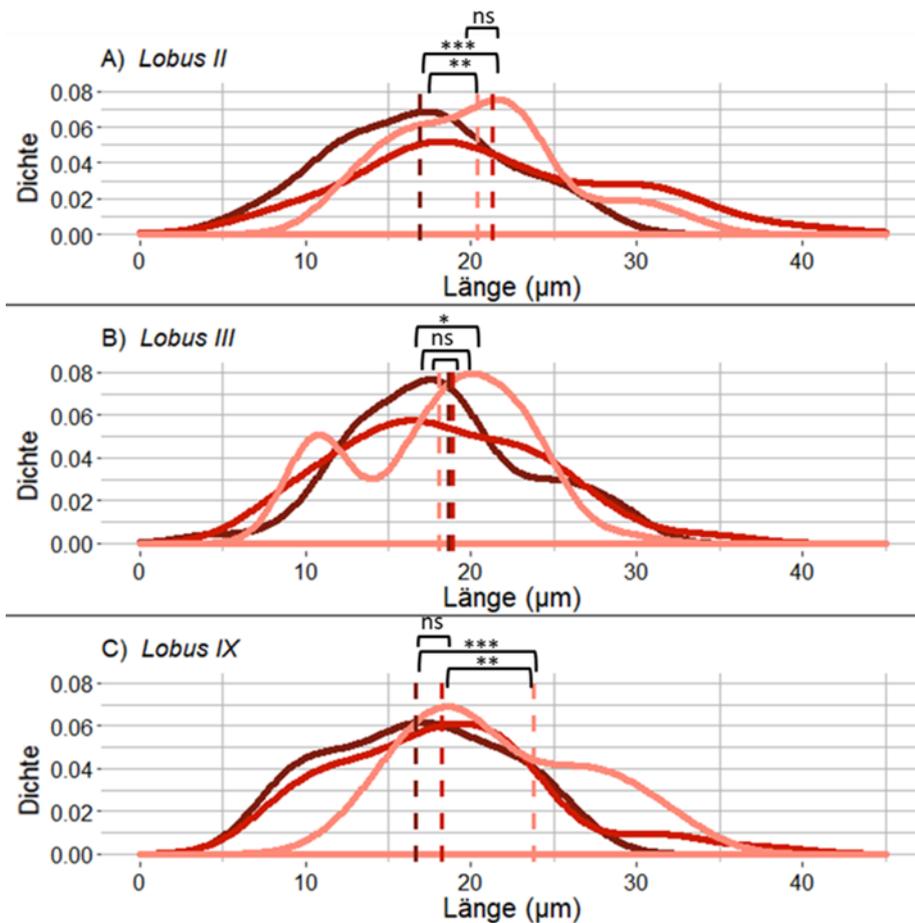


Abb. 3.25: Dendritenlängen der Körnerzellen in den Lobuli II, III und IX in individuellen WT-Tieren an P15

(A–C) Nur ein Tier wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Dendritenlängen in den drei analysierten Lobuli auf ($p > 0,05$); in den beiden anderen Tieren variierten die Dendritenlängen signifikant zwischen den analysierten Lobuli. (B) In Lobulus III zeigte die Länge der Dendriten innerhalb eines Tieres die größte Varianz; zwischen den drei Tieren bestand in diesem Lobulus die geringste Varianz der Dendritenlängen.

Die gestrichelten Linien repräsentieren den Mittelwert der Dendritenlängen des jeweiligen Tieres. $n=3$, pro Lobulus: $n= 40-60$ Körnerzellen. Teststatistik: t-Test: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, $p > 0,5$ (nicht signifikant, ns).

Die Verteilung der Dendritenlängen der Körnerzellen aus den Lobuli II und III wies für jeweils zwei der vier KcKO-Tiere eine linksschiefe unimodale bzw. bimodale Verteilung auf (s. Abb. 3.26 A/B). In einem KcKO-Tier waren die Dendritenlängen der Körnerzellen aus dem Lobulus II deutlich unimodal und linksschief verteilt (s. Abb. 3.26 A). Körnerzellen aus dem posterioren Lobulus IX zeigten dagegen bei zwei der vier KcKO-Tiere (dunkelgrün, hellgrün) eine tendenziell polymodale Verteilung der Dendritenlängen (s. Abb. 3.26 C). Die beiden anderen Tiere wiesen variable Verteilungsmuster auf. Eine Verschiebung der Dendritenlängen hin zu kleineren Größen mit einer unimodalen Dendritenlängen-Verteilung wurde nur in einem der vier Tiere beobachtet (mintfarben). Das andere Tier wies andeutungsweise eine bimodale Verteilung der Dendritenlängen im mittleren Längenbereich auf (mittelgrün).

Die Dendritenlängen aus allen drei Lobuli wiesen – ähnlich wie die Somaflächen – bei den KcKO-Tieren eine deutlich größere Spannbreite auf als bei den WT-Tieren, so dass die Verteilungskurven der einzelnen Tiere insgesamt flacher verliefen. Die durchschnittlichen Dendritenlängen der Körnerzellen in KcKO- und WT-Tieren war nur in Lobulus III

vergleichbar. Bei der individuellen Analyse wiesen nur zwei der vier KcKO-Tiere eine mit den WT-Tieren vergleichbare Dendritenlänge auf, in den beiden anderen KcKO-Tieren waren die Dendriten signifikant kürzer (s. Abb. 3.25 und Abb. 3.26).

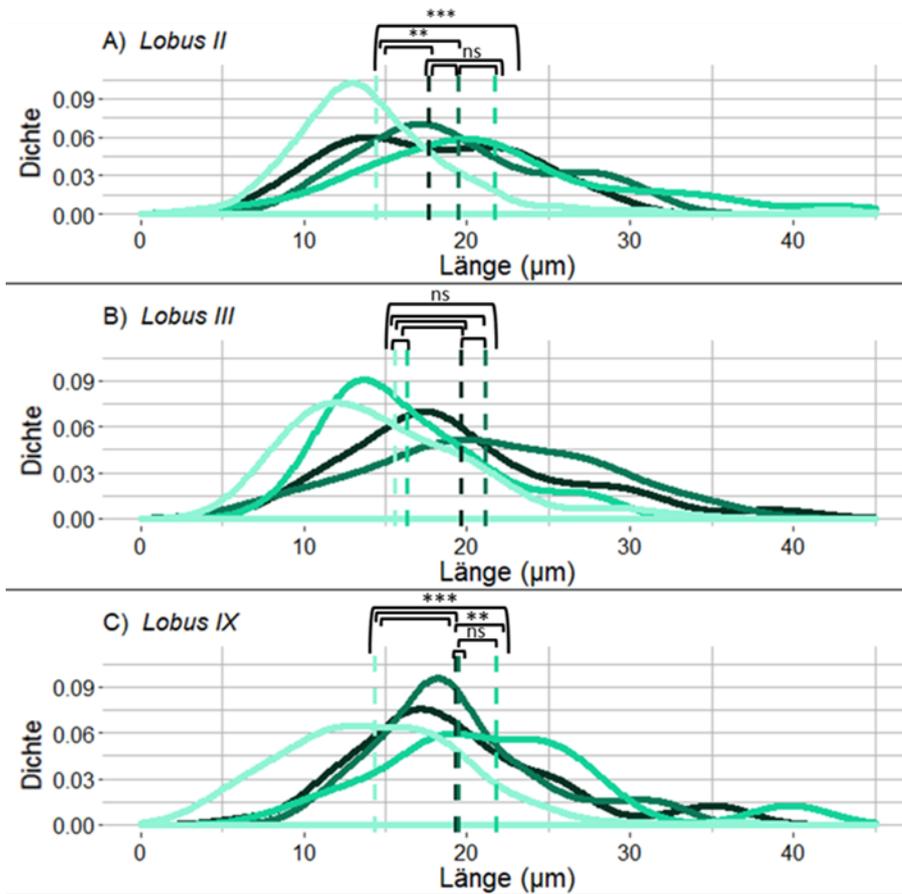


Abb. 3.26: Dendritenlängen der Körnerzellen in den Lobuli II, III und IX in individuellen KcKO-Tieren an P15

(A–C) Die mittleren Dendritenlängen der Körnerzellen aus Lobulus II und IX wichen bei drei von vier Tieren signifikant voneinander ab. In einem Tier stimmte die durchschnittliche Dendritenlänge der Körnerzellen in allen drei Lobuli überein. (A) Für Lobulus II zeigte eines der vier Tiere eine signifikant unterschiedliche mittlere Dendritenlänge. (B) In Lobulus III stimmten die durchschnittlichen Dendritenlängen der Körnerzellen in allen vier Tieren überein. (C) Die Dendritenlängen der Zellen aus Lobulus IX wichen bis auf eine Ausnahme alle signifikant voneinander ab; hier wurde die größte Varianz beobachtet.

Die gestrichelten Linien repräsentieren den Mittelwert aus den Dendritenlängen des jeweiligen Tieres. $n=4$, pro Lobulus: $n= 40-60$ Körnerzellen. Teststatistik: t-Test: $***p\leq 0,001$, $**p\leq 0,01$, $*p\leq 0,05$, $p>0,5$ (nicht signifikant, ns).

Zusammenfassend ergaben die Analysen, dass in beiden Genotypen die gemessenen Dendritenlängen zwischen und innerhalb der Tiere stärker variierten als die Somaflächen. Zwischen den KcKO-Tieren variierten die Verteilungskurven der Somaflächen deutlich stärker als zwischen den WT-Tieren. Die KcKO-Körnerzellen besaßen im Vergleich zu den WT-Körnerzellen tendenziell größere Somaflächen mit kürzeren Dendriten.

3.6.4 Vergleich der Dendritenbaum-Entwicklung in Purkinjezellen von WT- und PckO-Tieren

Die Purkinjezellen spielen bei der embryonalen Kleinhirnentwicklung, insbesondere während der Bildung der Fissuren durch die sogenannten Anker-Zentren, eine essentielle Rolle (Sudarov and Joyner, 2007). Der potentielle Effekt der Deletion des miR-17~92-Clusters in den Purkinjezellen auf die morphologische Entwicklung der Zellen und sekundär auf die gesamte Kleinhirnentwicklung wurde mit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Golgi-Färbung an Kleinhirnschnitten von juvenilen PckO-Tieren (P8) untersucht. Zum Vergleich des Verzweigungsmusters der Purkinjezellendendriten in WT- und PckO-Tieren wurde die Sholl-Analyse Methode genutzt (Toledo et al., 2019).

In den PckO-Tieren wiesen die Purkinjezellen weniger Verzweigungen auf, und die Dendritenbäume der WT-Purkinjezellen schienen in ihrer Entwicklung weiter fortgeschritten zu sein (s. Abb. 3.27). Eine deutliche Verzögerung oder Anomalie in der Entwicklung der Purkinjezellen konnte nicht in allen PckO-Tieren gleichermaßen festgestellt werden. Die Anzahl der Kreuzungspunkte in den Zellen variierte sehr stark zwischen den einzelnen Tieren beider Genotypen (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund führte zu der Frage, welche Faktoren die Komplexität der Dendritenbaum-Differenzierung beeinflussen. Die in Tab. 3.9 aufgeführten Ergebnisse einer statistischen Analyse (*Mixed Model*) ergaben, dass lediglich die Distanz vom Zellkörnernachweislich einen signifikanten Effekt auf die Zahl der dendritischen Verzweigungen von Purkinjezellen hatte. Für den Genotyp konnte kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden (s. Tab. 3.9). Ein Einfluss der Cluster-Deletion auf die Purkinjezell-Entwicklung von acht Tage alten PckO-Tieren konnte mit Hilfe der hier verwendeten Analyse-Methode und der Anzahl an ausgewerteten Zellen nicht eindeutig nachgewiesen werden.

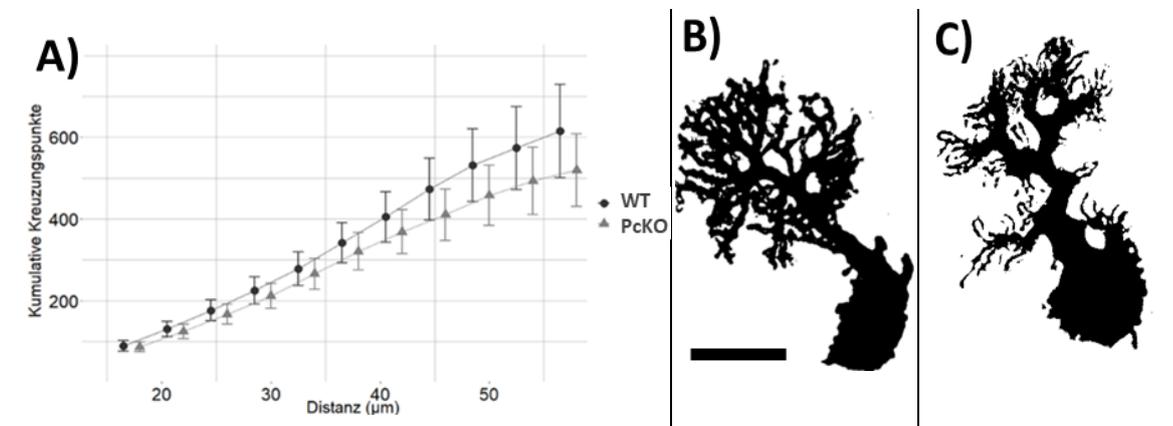


Abb. 3.27: Dendritenwachstum der Purkinjezellen in WT- und PckO-Tieren an P8

(A) Dargestellt sind die durchschnittlichen Anzahlen der kumulativen Kreuzungspunkte der Purkinjezellendendriten in WT- (dunkelgrau) und PckO-Tieren (hellgrau), die mit Hilfe einer Sholl-Analyse-Methode bestimmt wurden. Die Verteilung der Kreuzungspunkte unterschied sich zwischen den PckO- und WT-Purkinjezellen. Bei den PckO-Tieren zeigte sich eine geringere Anzahl an Kreuzungspunkten ($p \leq 0,001$). (B/C) Segmentierte Darstellung von Golgi-angefärbten Purkinjezellen von WT- (B) und PckO- (C) Tieren.

$n = 9$ (WT: $n = 4$; PckO: $n = 5$; pro Tier $n = 2-4$ Purkinjezellen) Teststatistik: Kolmogrov-Smirnov-Test; Fehlerbalken= Standardfehler, Maßstab $25 \mu\text{m}$

Tab. 3.9 Effekt des Genotyps (WT- vs. PcKO-Tiere) und der Entfernung vom Zellkörper (Distanz) auf die Zahl der dendritischen Verzweigungen von Purkinjezellen

Parameter (Prädiktoren)	DF	Mittel der Quadrate	F-Wert	Größtmöglicher Freiheitsgrad	p (F)	Kleinstmöglicher Freiheitsgrad	p (F)
Genotyp	1	20,06	1,48	3533	0,224	3524	0,224
Distanz	1	5897,45	434,2	3533	< 0,001	3524	< 0,001

Dargestellt sind die Kennwerte eines gemischten Modells (Mixed Model) zur Analyse der Einflüsse der zwei kontrollierbaren Effekte (fixed effects), Genotyp (0=PcKO, 1=WT) und Distanz vom Soma auf die Anzahl der Kreuzungspunkte in den Dendritenbäumen von Purkinjezellen. Angegeben sind die p(F)-Werte für den jeweils größt- und kleinstmöglichen Freiheitsgrad der zwei untersuchten Parameter. Es wurde nur für den Parameter Distanz ein signifikanter Einfluss auf die Anzahl der Kreuzungspunkte nachgewiesen. Eine Interaktion zwischen den beiden Prädiktoren konnte nicht beobachtet werden.

F-Test.

3.7 Charakterisierung ektopischer postmitotischer Körnerzellen in der EGL von KcKO-Tieren

3.7.1 Vergleich der Anzahl an proliferierenden Zellen in den Körnerzellschichten von WT- und KcKO-Tieren

An P15 konnte bei KcKO-Körnerzellen im Vergleich mit WT-Körnerzellen eine veränderte Zellmorphologie mit vergrößerter Zellkörperfläche und kürzeren Dendriten beobachtet werden (s. Kap. 3.6.2 und 3.6.3). Zudem wurden in den Kleinhirnschnitten von KcKO-Tieren in zwei juvenilen Altersstadien (P7 und P10) NeuN-positive ektopische postmitotische Körnerzellen in der EGL bzw. Molekularschicht nachgewiesen (s. Kap. 3.5.1). Die genannten Ergebnisse könnten auf eine gestörte Proliferation, ausgelöst durch eine veränderte Körnerzellentwicklung, hindeuten. Zur Analyse eines möglichen Proliferationsdefekts der Körnerzellen in KcKO-Tieren wurden Immunfluoreszenzanalysen mit den beiden Proliferationsmarkern Phospho-Histon H3 (pH3) und *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) an Vibratomschnitten zu P7 durchgeführt. Beide Proliferationsmarker detektieren mitotische Zellen in unterschiedlichen Zellteilungsphasen und können für die Analyse der Proliferationsrate bei gleicher Gesamtzellzahl und Zellzyklusphasen verwendet werden.

Die erhöhte Anzahl an pH3-positiven Zellen in der EGL im anterioren Kleinhirnbereich (Lobuli II–V) deutet auf eine erhöhte Proliferation der Körnerzellen in KcKO-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren hin. In der EGL der posterioren Lobuli VIII und IX unterschied sich die Zahl der pH3-positiven Zellen nicht signifikant zwischen den Genotypen zum Zeitpunkt P7 (s. Abb. 3.28). Die Varianzanalyse zeigte, dass die veränderte Anzahl an proliferierenden Körnerzellen in den KcKO-Tieren nicht vom Lobulus abhing (s. Tab. 3.10).

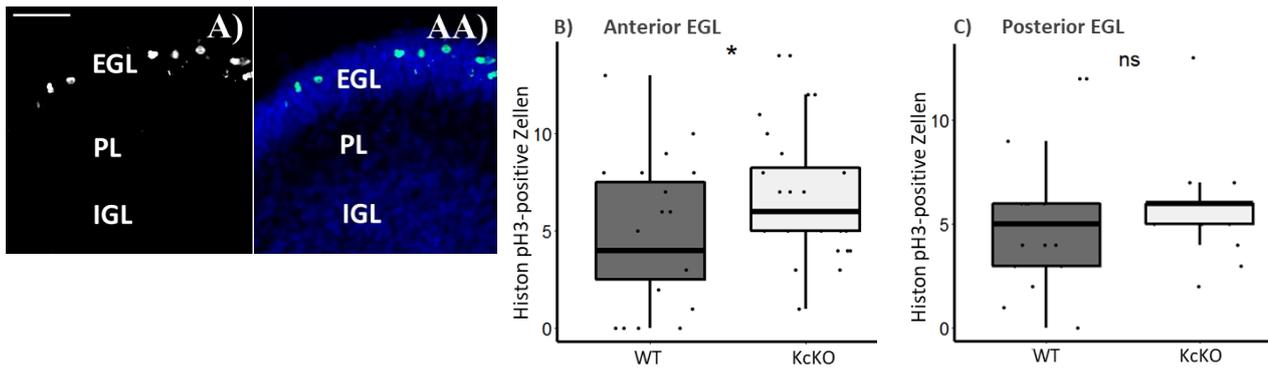


Abb. 3.28: Erhöhte Anzahl an Phospho-Histon H3 (pH3)-positiven Körnerzellen im anterioren Kleinhirnbereich von KcKO-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren – immunhistochemische Analyse der pH3-Expression an P7

(A/AA) Übersichtsdarstellung von pH3-positiven Zellen (grün) in der EGL eines WT-Lobulus. Zellkernfärbung mittels Hoechst (blau) (B) In der EGL von anterioren Kleinhirn-Lobuli in KcKO-Tieren befanden sich mehr pH3-positive Zellen. (C) Die Anzahl an proliferierenden Zellen im posterioren Kleinhirnbereich war für beide Genotypen gleich.

Anterior: Lobuli II–V; posterior: Lobuli VIII und IX; Vibratomschnitte 25 μm , (B/C) Box-Plot-Graphiken mit dem Median der Werte. Die Punkte repräsentieren die Anzahl pH3-positiver Zellen (pro Genotyp, $n=3$ je 2 Kleinhirnschnitte); Teststatistik: t-Test: *** $p\leq 0,001$, ** $p\leq 0,01$, * $p\leq 0,05$, $p>0,5$ (nicht signifikant, ns).

Tab. 3.10: Effekt des Genotyps (WT- vs. KcKO-Tiere) und des Lobulus (Lobuli II-V) auf die Anzahl der Phospho-Histon H3 (pH3)-positiven Körnerzellen im anterioren Kleinhirnbereich

Parameter	DF	Chiq	p (Chiq)	Signifikanzniveau
Genotyp	1	8,19	0,0041	**
Lobulus	3	0,95	0,8113	ns
Genotyp:Lobulus	3	0,75	0,8593	ns

ANOVA (Typ II) und Wald Chi-Quadrat-Test zur Berechnung der Haupteffekte und Interaktionen der zwei Parameter Genotyp und Lobulus auf die Anzahl der pH3-positiven Zellen in der externen Körnerzellschicht im anterioren Kleinhirnbereich (Lobuli II-V) von KcKO- und WT-Tieren im Alter von 7 Tagen (P7).

Teststatistik: Chiq-Test: *** $p\leq 0,001$, ** $p\leq 0,01$, * $p\leq 0,05$, $p>0,5$ (nicht signifikant, ns).

Der Proliferationsmarker PCNA fungiert als Cofaktor während der Replikationsphase und ist in unterschiedlichen Zellzyklusphasen sowohl im Zellkern (G₁- und S-Phase) als auch im Zytoplasma (M-Phase) lokalisiert. Die Detektion einzelner PCNA-positiver Zellen in der EGL war aufgrund der großen Zelldichte nicht möglich. Daher wurde die PCNA-Expression anhand der Breite der PCNA-positiven EGL ermittelt.

Im anterioren Kleinhirnbereich wurde im Lobulus III eine signifikant breitere PCNA-positive EGL in KcKO-Tieren detektiert. Auch in den beiden untersuchten posterioren Lobuli VIII und IX war die PCNA-positive EGL in den KcKO-Tieren signifikant breiter (s. Abb. 3.29).

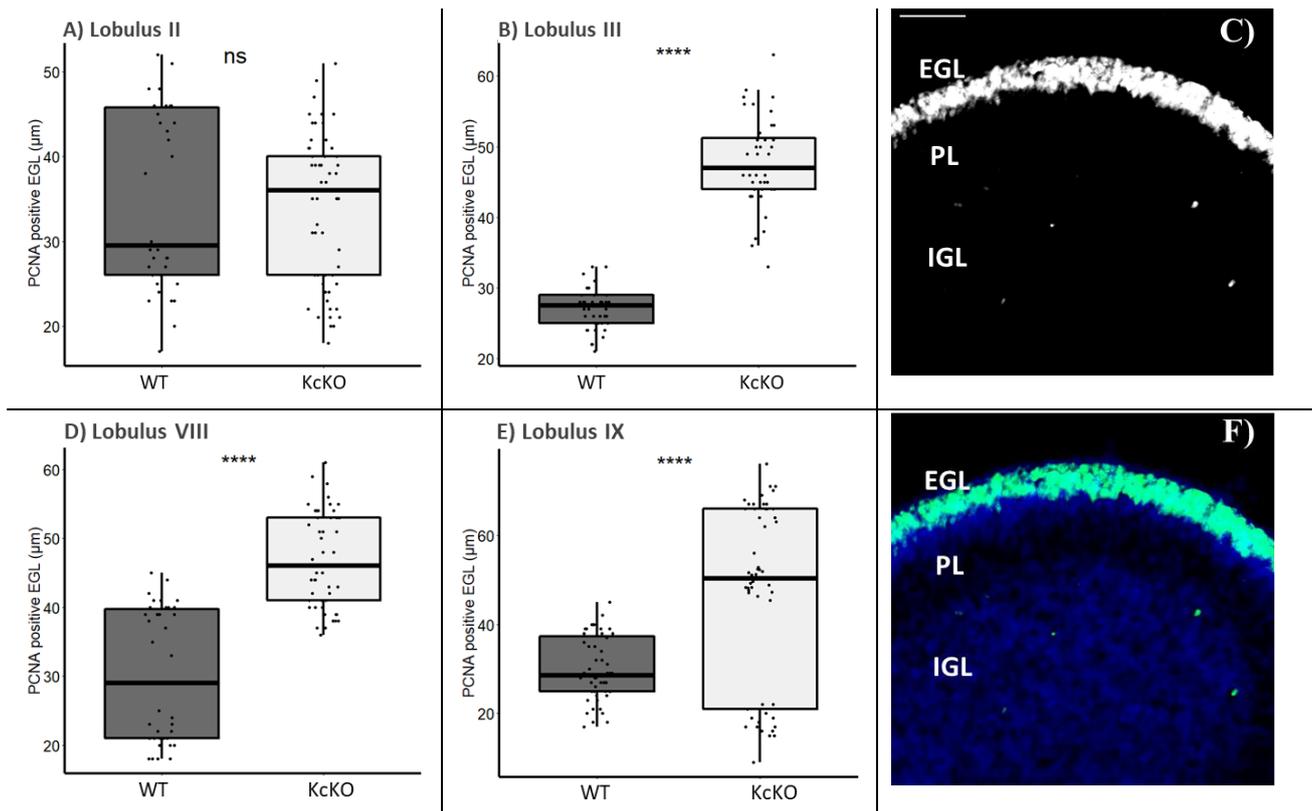


Abb. 3.29: Breitere PCNA-positive EGL in Lobuli von KcKO-Tieren– immunhistochemische Analyse der Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Expression

(A/B) Die PCNA-positive Zellschicht war im anterioren Lobulus III des Kleinhirns in KcKO-Tieren signifikant breiter als in WT-Tieren, Lobulus II wies keinen Unterschied auf. (C/F) Darstellung der mit PCNA behandelten EGL eines Lobulus. (D/E) In beiden posterioren Lobuli wurde eine signifikant breitere PCNA-positive EGL in KcKO-Tieren detektiert.

(A/B, D/E) Box-Plot-Graphiken mit dem Median der Daten (schwarze dicke Linie). Die Punkte repräsentieren die gemessene Breite der PCNA-positiven Zellschicht; pro Genotyp: n=3 je 2 Kleinhirnschnitte; Zellkernfärbung mittels Hoechst (blau); Vibratomschnitte 25µm; Teststatistik: t-Test: ****p≤0,001, **p≤0,01, *p≤0,05, p>0,5 (nicht signifikant, ns).

Im anterioren Kleinhirnbereich wurde in KcKO-Tieren eine signifikant erhöhte Anzahl an pH3-positiven Körnerzellen und eine breitere PCNA-positive EGL nachgewiesen. Im posterioren Kleinhirnbereich der KcKO-Tiere war die PCNA-positive EGL breiter. Dagegen kamen pH3-positive Zellen in der EGL im posterioren Kleinhirnbereich in KcKO- und WT-Tieren vergleichbar häufig vor. Die Deletion des miR-17~92-Clusters bewirkte eine erhöhte Anzahl an pH3-positiven Körnerzellen der anterioren Lobuli.

3.7.2 Vergleich der Anzahl an apoptotischen Zellen in den Körnerzellschichten von WT- und KcKO-Tieren

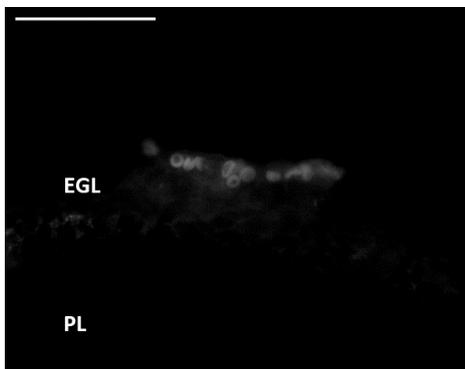
Die an P7 und P10 in KcKO-Tieren detektierten ektopischen postmitotischen Körnerzellen in der äußeren Zellschicht unterhalb der Pia waren in adulten Kleinhirnen an P21 nicht mehr nachweisbar (s. Kap.3.5.1.) Um zu klären, ob das Verschwinden dieser Zellen auf eine erhöhte Apoptoserate zurückzuführen ist, erfolgte eine immunhistochemische Analyse

der Vibratonschnitte der KcKO- und WT-Tiere (P7) mit einem Antikörper gegen die aktivierte Caspase 3. Caspase 3 ist ein Indikator für apoptotische Zellen. Die EGL bzw. IGL der einzelnen Lobuli wurden getrennt voneinander ausgewertet.

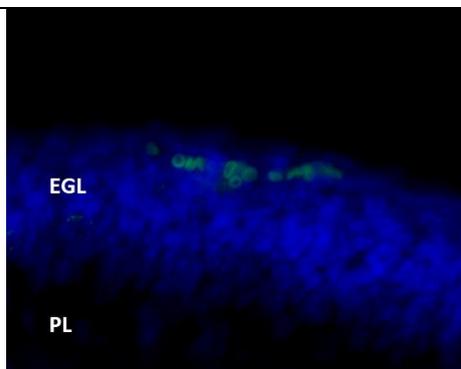
Mit einer Ausnahme (Lobulus IV) war die Anzahl der Caspase 3-positiven Zellen in der EGL der anterioren Lobuli bei KcKO-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren signifikant erhöht; in der IGL war dies nur in den ersten beiden Lobuli II und III der Fall. Auch in den beiden posterioren Lobuli VI und X wurde eine erhöhte Anzahl an Caspase 3-positiven Zellen in der EGL bei KcKO-Tieren detektiert; in der IGL war davon nur der Lobulus X betroffen (s. Abb. 3.30).

Die größere Anzahl an Caspase 3-positiven Zellen der Lobuli der KcKO-Tiere deutet auf eine erhöhte Apoptoserate in der EGL und IGL hin. Damit ist eine gesteigerte Apoptose eine mögliche Erklärung für das Verschwinden der ektopischen postmitotischen Körnerzellen bis zum adulten Altersstadium an P21.

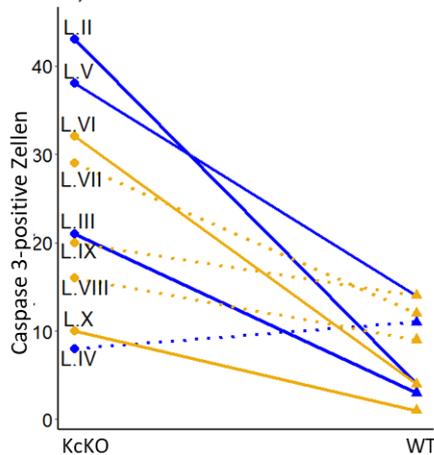
A) Caspase 3



B) Caspase 3 und Hoechst



D) EGL



C) IGL

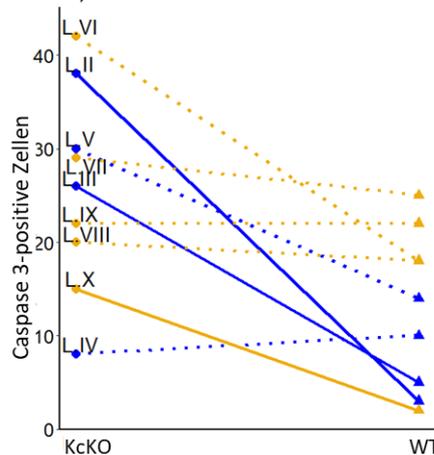


Abb. 3.30: Vergleich der Anzahl an Caspase 3-positiven Zellen in der externen (EGL) und internen Körnerzellschicht (IGL) in WT- und KcKO-Tieren – immunhistochemische Analyse der Expression der aktivierten Caspase 3

(A/B) Ausschnitt eines WT-Lobulus mit Caspase 3-positiven Zellen (grün) in der EGL. (C/D) Bis auf den Lobulus IV wurde in der EGL in allen anterioren Lobuli (blau) und in den beiden posterioren Lobuli (gelb) VI und X eine signifikant höhere Anzahl an Caspase 3-positiven Zellen in KcKO-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren detektiert. In der IGL war dies nur für die beiden anterioren Lobuli II und III und für den posterioren Lobulus X der Fall.

Zellkernfärbung mittels Hoechst (blau); Vibratonschnitte 25 μ m, Punkte: Anzahl Caspase 3-positiver Zellen in KcKO-Tieren, Dreieck: Anzahl Caspase 3-positiver Zellen in WT-Tieren, t-Test: durchgängige Linie: $p < 0,05$, gestrichelte Linie: $p > 0,05$

Zur Analyse des Einflusses der beiden nominalen Variablen Lobulus und Genotyp auf die Anzahl der Caspase 3-positiven cerebellären Körnerzellen wurde eine Varianzanalyse durchgeführt (s. Tab. 3.11). Beide Parameter zeigten einen hochsignifikanten Effekt auf die Caspase 3-positiven Zellen. Zusätzlich bestand eine Interaktion zwischen den beiden Faktoren.

Tab. 3.11: Effekt des Genotyps (WT vs. KcKO-Tiere) und des Lobulus auf die Anzahl der Caspase 3-positiven Zellen in der internen (IGL) und externen Körnerzellschicht (EGL)

Externe Körnerzellschicht (EGL)				
Parameter	DF	Chiq	p (Chiq)	Signifikanzniveau
Genotyp	1	6,2899	0,0121	*
Lobulus	8	30,5115	0,0001	***
Genotyp: Lobulus	8	29,7526	0,0002	***
Interne Körnerzellschicht (IGL)				
Parameter	DF	Chiq	p (Chiq)	Signifikanzniveau
Genotyp	1	2,8743	0,09	ns
Lobulus	8	35,6722	<0,0001	***
Genotyp: Lobulus	8	31,8516	<0,0001	***

Mit einer ANOVA (Typ II) wurden die Effekte der Parameter Genotyp, Lobulus und deren Interaktion auf die Anzahl der Caspase 3-positiven Zellen in der EGL und IGL von KcKO- und WT-Kleinhirnschnitten im Alter von 7 Tagen (P7) berechnet. Der Parameter Genotyp zeigt einen signifikanten Einfluss auf die Caspase 3-positiven Zellen in der EGL. Der Parameter Lobulus allein betrachtet und die Interaktion zwischen beiden Effekten weisen eine deutliche Signifikanz auf.

Es wurden pro Genotyp 3 Tiere ausgewertet. Pro Tier wurden zwei Schnitte analysiert und die Summe der Caspase-3-positiven Zellen in die Analyse einbezogen. Vibratomschnitte: n=12. Teststatistik: Chiq-Test: ***p≤0,001, **p≤0,01, *p≤0,05, p>0,5 (nicht signifikant, ns).

3.8 Auswirkungen der miR-17~92-Cluster-Deletion auf die Migration von Körnerzellen *in vitro*

In 7 und 10 Tage alten KcKO-Tieren konnten ektopische postmitotische Körnerzellen in der äußeren Zellschicht unterhalb der Pia im anterioren Kleinhirnbereich detektiert werden (s. Kapitel 3.5.13.6). Im Verlauf der Kleinhirnentwicklung migrieren die postmitotischen Körnerzellen aus der unteren EGL-Schicht radial durch die Molekularschicht zu der entstehenden IGL. Ein Verweilen von teilweise differenzierten (NeuN-positiven) Körnerzellen in der EGL, deutet auf ein verändertes Migrationsverhalten der neuronalen Körnerzellvorläuferzellen (KVZ) in KcKO-Kleinhirn hin. Dabei ist eine reguläre Migration der KVZ für eine normale Entwicklung des Kleinhirns unverzichtbar. Die bereits beschriebenen Änderungen der Kleinhirnstruktur bei KcKO-Mäusen könnten auf eine Störung der Migration der KVZ zurückzuführen sein. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Migrationsbewegung von KVZ aus sieben Tage alten KcKO- und WT-Tieren *in vitro* über einen definierten Zeitraum mittels *Time-lapse*-Mikroskopie verglichen. Dabei wurden 3 Parameter anhand der gewonnenen Daten über die mittlere quadratische Teilchenverschiebung (*Mean square displacement (MSD)*) der Zellen analysiert: die allgemeine Motilität, die Direktionalität (ungerichtete oder gerichtete Zellbewegung) und die Geschwindigkeit der Zellbewegung (s. Kap. 2.8.5). Bei beiden Genotypen konnte ein annähernd linearer MSD-Kurvenverlauf beobachtet werden, welcher auf eine ungerichtete Zellbewegung und uneingeschränkte Motilität der KVZ aus KcKO- bzw. WT-Tieren hindeutet

(s. Abb. 3.31). Anhand der Steilheit der MSD-Kurve kann die Geschwindigkeit, mit der sich die KVZ *in vitro* fortbewegten, berechnet werden: je langsamer die Zellbewegung, desto flacher ist der Kurvenanstieg bzw. je schneller die Zellbewegung, desto steiler der Kurvenanstieg (Stokes et al., 1991). Hierbei konnte ein Unterschied zwischen den KVZ aus den KcKO- und WT-Tieren beobachtet werden. Im Mittel bewegten sich die KVZ aus KcKO-Tieren schneller.

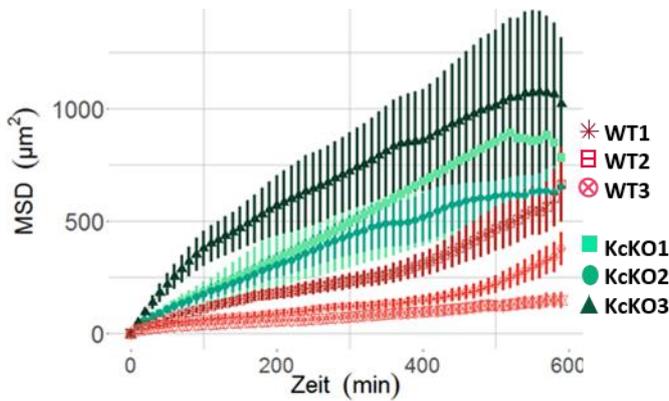


Abb. 3.31: Vergleich der *in vitro* Migration von Körnervorläuferzellen (KVZ) aus KcKO- und WT-Mäusen
Die Mean square displacement (MSD)-Kurven der KVZ beider Genotypen entsprachen am ehesten einer Geraden, was auf eine ungerichtete Zellmigration hinweist. Die höhere Steigung der MSD-Kurven der KVZ der KcKO-Tiere bildete eine höhere Geschwindigkeit der Migration ab.

Abgebildet sind die errechneten Mittelwerte und die Standardfehler der MSD-Werte der KVZ aus drei KcKO- und WT-Kleinhirnen über den Zeitraum von 600 min. Zellzahlkonzentration pro Well: 100.000 ZW; pro Genotyp $n=3$.

Wie in Kapitel 3.5 dargestellt, waren in den Kleinhirnen der KcKO-Tiere die Veränderungen vor allem im anterioren Teil zu beobachten. Daher wurde anschließend die Migrationsbewegung der KVZ aus dem anterioren (Lobulus II–III) und posterioren Bereich (Lobulus IV–X) von WT und KcKO-Tieren separat verglichen. Die MSD-Kurven bildeten für die KVZ aus den KcKO- und WT-Tieren in beiden Kleinhirnbereichen eine normale ungerichtete Bewegung ab (s. Abb. 3.32). Die WT-Zellen aus den anterioren Lobuli bewegten sich langsamer vorwärts als die Zellen aus den posterioren Lobuli (flacherer Verlauf der MSD-Kurven). Die KcKO-Zellen verhielten sich genau umgekehrt; die Zellen aus den anterioren Lobuli bewegten sich schneller als die Zellen aus den posterioren Lobuli (steilerer Verlauf der MSD-Kurven). Einen Unterschied in der Art der Zellbewegung (gerichtet oder ungerichtet) war bei den KVZ der beiden Herkunftsorte (anteriore oder zentrale-posteriore Lobuli) und Genotypen nicht zu beobachten (s. Abb. 3.32). Das bedeutet, dass die KVZ aus KcKO- und WT-Tieren aus beiden Kleinhirnbereichen *in vitro* eine ungerichtete Migration mit nahezu linear verlaufender MSD-Kurve aufwiesen.

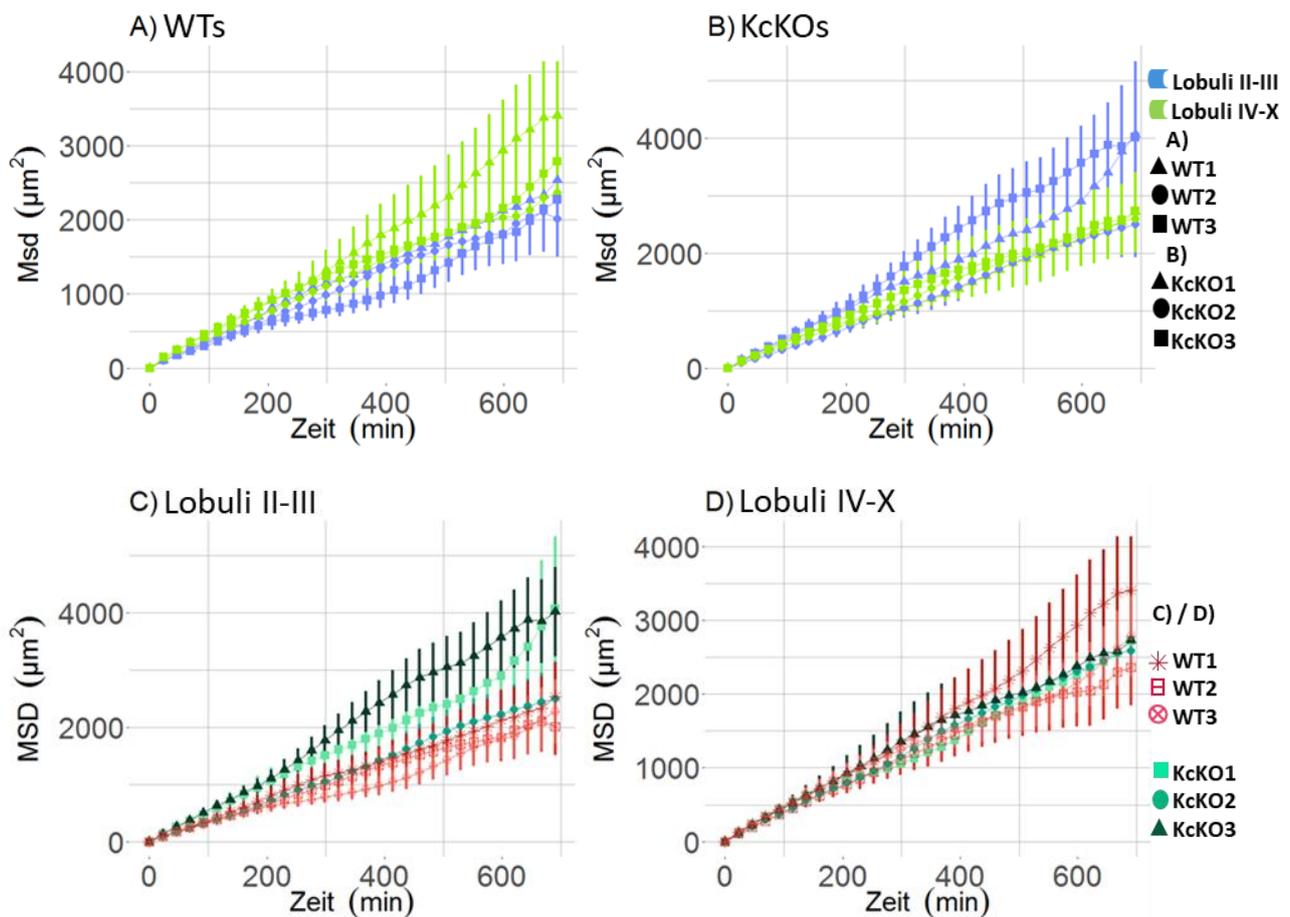


Abb. 3.32: In vitro Migrationsverhalten der Körnervorläuferzellen (KVZ) in Abhängigkeit vom Genotyp (WT- vs. KcKO-Tiere) und vom Herkunftsort (Lobulus II-III vs. IV-X) in vitro – Mean square displacement (MSD)-Analyse

(A) WT-Tiere: KVZ aus den Lobuli II-III wiesen eine langsamere Zellbewegen auf als KVZ aus den Lobuli IV-X (gleiches Individuum). (B) KcKO-Tiere: KVZ aus den Lobuli II-III migrierten schneller als KVZ aus Lobuli IV-X. (C) Lobuli II-III: Die KVZ aus KcKO-Tieren migrierten schneller im Vergleich zu den KVZ aus WT-Tieren. (D) Lobuli IV-X: Die KVZ beider Genotypen verhielten sich vergleichbar. (A-D) Die MSD-Kurven bilden für alle untersuchten Zellen eine eher ungerichtete Diffusionsbewegung ab.

Zelldichte: 100.000 Z/W; pro Genotyp n=3

Wie bereits erwähnt, ist die Steigung der MSD-Kurve ein Maß für die Wanderungsgeschwindigkeit (Stokes et al., 1991). Der statistische Vergleich der Steigungen dieser Kurven für Körnerzellen aus den anterioren und posterioren Kleinhirnbereichen und zwischen Körnerzellen von WT- und KcKO-Tieren ergab folgendes Bild. Die KVZ aus den anterioren Lobuli II-III von KcKO-Tieren bewegten sich im Durchschnitt signifikant schneller als die KVZ aus den Lobuli IV-X; bei WT-Tieren war die KVZ-Migrationsbewegung der KVZ aus den Lobuli IV-X schneller (s. Tab. 3.12 A/B). Bei dem Vergleich zwischen den Genotypen zeigte sich, dass die KVZ aus den anterioren Lobuli II-III der KcKO-Tiere im Mittel signifikant schneller migrierten als die WT-KVZ (s Tab. 3.12 A und Abb. 3.32 C). Die KVZ aus den Lobuli IV-X beider Genotypen wiesen dagegen vergleichbare Migrationsgeschwindigkeiten auf (s. Tab. 3.12 B und Abb. 3.32 D). Einige KVZ aus KcKO- und WT-Tieren zeigten unabhängig vom Herkunftsort (anteriorer oder posteriorer Kleinhirnbereich) eine vergleichbare Migrationsgeschwindigkeit (Abb. 3.32 C/D).

Tab. 3.12: Vergleich der Steigung der MSD-Kurven der KVZ aus beiden Genotypen (KcKO vs. WT) und Kleinhirnbereichen (Lobuli II–III vs. Lobuli IV–IX)

Errechnete Steigung der MSD-Kurven ($\mu\text{m}^2/\text{min}$)					
Genotyp	A) KcKO vs. WT		B) KcKO vs. WT		C) Lobuli I–III vs. Lobuli IV–IX
	Lobuli II–III	p-Wert	Lobuli IV–X	p-Wert	p-Wert
WT	32,65 ± 1,1	< 0,001	41,50 ± 0,9	0,4124	< 0,001
KcKO	47,86 ± 2,4		40,43 ± 0,9		0,006

(A-C) Die Steilheit der MSD-Kurve ist ein Maß für die Geschwindigkeit der analysierten Zellbewegungen (Stokes et al., 1991). (A/C) Die KVZ aus den Lobuli II–III der KcKO-Tiere migrierten schneller als die KVZ aus den posterioren Lobuli der KcKO-Tiere und als alle KVZ der WT-Tiere (steilerer MSD-Kurvenanstieg). (B) Die KVZ aus den posterioren Lobuli der KcKO-Tiere und WT-Tiere wiesen eine vergleichbare MSD-Kurvensteigung auf; die KVZ migrierten nahezu gleich schnell. (C) Die KVZ aus den posterioren Lobuli der WT-Tiere zeigten eine signifikant steilere MSD-Steigung im Vergleich zu der MSD-Kurve der KVZ aus dem anterioren Kleinhirnbereich. Zellzahldichte: 100.000 pro Well; pro Genotyp n=3; Teststatistik: t-Test

Die Deletion des miR-17~92-Clusters beeinträchtigte demnach nicht die allgemeine Zellmotilität der KVZ *in vitro*. Für die KVZ aus den anterioren Lobuli den KcKO-Tieren konnte im Gegenteil eine signifikant schnellere Migration nachgewiesen werden. Die Differenzen der Zellbewegung der KVZ aus den anterioren und posterioren Kleinhirnbereichen waren bei KcKO- und WT-Tieren unterschiedlich. In WT-Tieren zeigten KVZ aus den anterioren Kleinhirnbereichen im Vergleich zu KVZ aus den posterioren Kleinhirnbereichen eine geringere Migrationsgeschwindigkeit, bei den KVZ aus KcKO-Tieren war es umgekehrt.

3.9 F-Aktin-Gehalt in KcKO-Körnerzellen

Die *in vitro* Migrationsanalysen aus KcKO-Tieren belegen, dass der Verlust des miR-17~92-Clusters das Migrationsverhalten der KVZ beeinflusst (s. Kap. 3.8). Im Rahmen der Zellbewegung übernehmen Mikrotubuli und das Aktin-Zytoskelett essentielle Funktionen in dem fluktuierenden System von Wachstums- und Abbauprozessen (Polymerisation und Depolymerisation) des kortikalen Aktin-Netzwerks (Mitra et al., 2005; Rj and Me, 1995). Zur Analyse eines möglichen Zusammenhangs zwischen den veränderten Migrationsbewegungen der KVZ in KcKO-Tieren und einer potentiell veränderten Aktin-Funktion wurde zunächst das F-Aktin über fluoreszierendes Phalloidin in Primärzellkulturen spezifisch angefärbt. Die Fluoreszenzsignalstärken zwischen einzelnen Zellen und den Versuchsreihen variierten für eine valide Auswertung jedoch zu stark (Daten nicht gezeigt). Für die Quantifizierung des zellulären Anteils an F-Aktin in den Körnerzellen der WT- und KcKO-Tiere wurde daher das Verhältnis von F/G-Aktin mittels Western-Blot-Analyse von Primärzellkulturen aus dem Kleinhirn bestimmt. Eine separate Analyse der zwei Kleinhirnbereiche war aufgrund der geringen Probenmenge aus den anterioren Lobuli nicht möglich.

Da die Sensitivität der Western-Blot-Methode maßgeblich von einer optimalen, im besten Fall linearen Beziehung zwischen der Menge des in der Probe vorhandenen Antigens und der Stärke des zu detektierenden Messsignals abhängig ist, wurde der nachfolgend beschriebene Vorversuch durchgeführt (Ghosh et al., 2014; Hathaway and Haeberle, 1985; Schilling and Aletsee-Ufrecht, 1989). In diesem Vorversuch wurden unterschiedliche Antikörper-Konzentrationen und G-Aktin-

Probenmengen aus WT-Kleinhirnen eingesetzt, um die optimale Antikörper-Konzentration, bei der das detektierbare Messsignal die in der Probe vorhandene Antigenmenge gleichwertig wiedergibt, zu ermitteln. Bei einer Antikörper-Verdünnung von 1:10.000 wurde annähernd ein linearer Zusammenhang zwischen der in den verwendeten Probenmengen (5µl, 10µl und 15µl) steigenden Aktin-Konzentration (im Verhältnis 1:2:3) und dem detektierten Messsignal beobachtet. Mit der niedrigeren bzw. höheren Antikörper-Verdünnung konnte die steigenden Antigenkonzentrationen in den Proben nicht zuverlässig detektiert werden. Die Aktinmenge die in den 15 µl Proben vorhanden war, wurde in allen drei analysierten Antikörper-Verdünnungen nahezu mit derselben Signalstärke detektiert (s. Abb. 3.33). Weitere Versuche mit G-Aktin Proben aus aufbereiteten 1 Tage alten WT-Primärzellkulturen, ergaben bei einer Antikörper-Verdünnung von 1:10.000 und einer Probenmenge zwischen 12 und 18 µl ein vergleichbares Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Um trotz natürlicher, präparationsbedingter oder phänotypischer Schwankungen der in 15 µl Probe enthaltenen Aktinmenge vergleichbare Aktinkonzentrationen nachweisen zu können, wurde in den nachfolgenden Versuchen eine Antikörper-Verdünnung von 1:10.000 und eine Probenmenge von 15 µl verwendet.

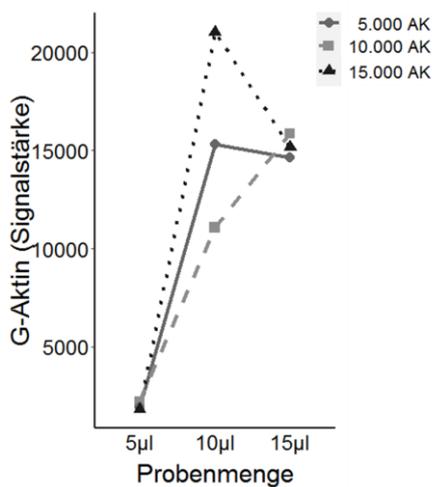


Abb. 3.33: Vorversuch zur Optimierung der Western-Blot-Analyse – Variation der Aktin-Antikörper-Konzentration und Probenmenge

Zur Optimierung der Versuchsbedingungen wurden drei Antikörper-Konzentrationen (1:5.000, 1:10.000 und 1:15.000) mit drei G-Aktin-Probenmengen aus WT-Kleinhirnen (5 µl, 10 µl und 15 µl) analysiert. Die gemessene G-Aktin-Signalstärke nahm bei einer Antikörperverdünnung von 1:10.000 annähernd kontinuierlich mit der in der Probe steigenden Aktinmenge zu. Die drei Antikörper-Verdünnungen wiesen bei einer Probenmenge von 15 µl vergleichbare G-Aktin-Signale bzw. Aktinmengen nach.

Die Punkte, Dreiecke und Quadrate repräsentieren die jeweiligen Mittelwerte der Daten; Anzahl der Versuche: N=3 mit n=2

Die Bestimmung des F/G-Aktin-Verhältnisses ergab einen messbaren Unterschied in den Kleinhirnen aus KcKO- und WT-Tieren. Die F/G-Aktin-Relation verlagerte sich sowohl in den ein Tag alten KcKO-Primärzellen als auch im frisch präparierten gesamten Kleinhirn der sieben Tage alten KcKO-Tiere zugunsten des F-Aktins im Vergleich zu den Befunden aus WT-Tieren (s. Abb. 3.34 A/B). Der absolute Gehalt an F-Aktin in den Proben des Kleinhirns unterlag Schwankungen zwischen den Individuen und Versuchsreihen (N=4) in beiden Genotypen. In den Kleinhirnen der KcKO-Tiere zeigte sich eine größere Varianz an gemessenen F/G-Aktin Mengen (s. Abb. 3.34 B). Die gesamte Menge an Aktin im Kleinhirn war in den beiden Genotypen vergleichbar (s. Abb. 3.34 C). Die Reinheit der Aktin-Fractionen wurde mit spezifischen Markern für den zytosolischen (G-Aktin) und nukleären (F-Aktin) Anteil nachgewiesen (s. Abb. 3.34 D).

Zusammenfassend ergab die Proteinanalyse eine signifikante Verschiebung des F/G-Verhältnisses zugunsten des F-Aktin-Anteils bei KcKO-Kleinhirnen im Vergleich zu WT-Kleinhirnen.

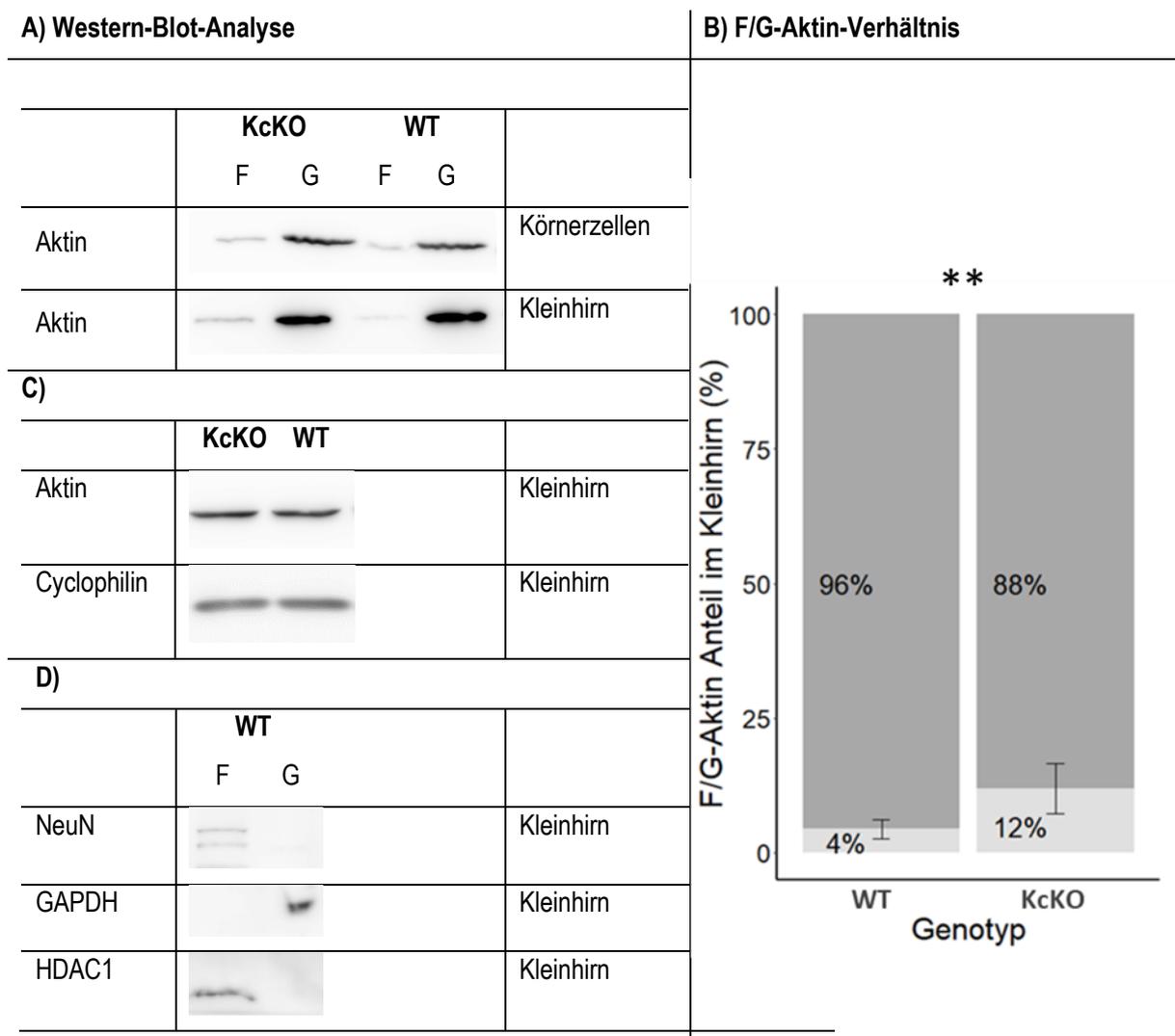


Abb. 3.34: F/G-Aktin-Verhältnis in Körnerzellen und Kleinhirnen der KcKO- bzw. WT-Tiere an P7 – Western-Blot-Analyse

(A) In frisch präpariertem Kleinhirn bzw. in ein Tag alten primären Körnerzellkulturen befand sich das filamentöse Aktin (F) in der nukleären Fraktion (Pellet) und das globuläre Aktin (G) in der zytosolischen Fraktion (Überstand) der Probe (s. Kap. 2.5.3). (B) Der prozentuale Anteil von F- bzw. G-Aktin am Gesamt-Aktin-Gehalt zeigte einen signifikant erhöhten F-Aktin-Anteil in KcKO-Kleinhirnen. $N=4$, pro Genotyp: $n=6$. t-Test (C) Der Gesamt-Aktin-Gehalt in $30 \mu\text{g}$ Gesamt-Protein aus dem Kleinhirn beider Genotypen war vergleichbar. Als Lademengenkontrolle diente der Nachweis von Cyclophilin B. (D) Der Marker Histon-Deacetylase 1 (HDAC1) wurde nur in der nukleären Fraktion (F-Aktin) und der Zytoplasma-Marker Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) nur in der zytosolischen Fraktion (G-Aktin) nachgewiesen. Das Neuronal nuclear protein (NeuN) diente als Nachweis für Körnerzellen in der Kleinhirn-Probe.

(B) Fehlerbalken= Standardfehler. Teststatistik: t-Test: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, $p > 0,5$.

3.10 Target-Analyse anhand vorhandener Datensätze für die miR-17~92-Cluster-Familie

Die Deletion des miR-17~92-Clusters in den Körnerzellen hatte nachweislich einen Einfluss auf die Körnerzell- und Kleinhirnentwicklung der KcKO-Tiere. Dabei konnte auch eine veränderte Morphologie und Migrationsbewegung der miR-17~92-Cluster deletierten Körnerzellen nachgewiesen werden. Zur Identifikation möglicher Zielgene des miR-17~92-Clusters und deren potentiell veränderten Signalwegen, die den beschriebenen Phänotyp der KcKO-Tiere

herbeiführen, wurde eine Datenbankanalyse mit Hilfe der *DIANA-mirPath v.3 Software* durchgeführt (s. Kap.2.7.1). Dabei wurden mit Ausnahme der miR-20a bei allen miRNAs des miR-17~92-Clusters jeweils nur für einen der beiden miRNA-Stränge des miRNA-Duplex mögliche regulatorische Funktionen im Rahmen von Signalwegen gefunden.

Auf der Basis der aus der Datenbankanalyse resultierenden gewichteten Auflistung der Signalwege und der in der Literatur beschriebenen experimentell validierten Genaktivität einiger Zielgene im Kleinhirn wurden elf potentiell durch das miR-17~92-Cluster beeinflusste Signalwege im Kleinhirn und cerebellären Körnerzellen identifiziert (s. Abb. 3.35 A). Einige dieser elf Signalwege (der durch mTOR (*mechanistic target of Rapamycin*), der durch TGF- β (*Transforming growth factor beta*) und der durch FoxO (*Forkhead box protein O*) definierte Signalweg) und allgemein Signalwege, die Adhärenzverbindungen beinhalten, bestehen aus Molekülen, bei denen sich Bindungsstellen für alle sechs miRNAs des miR-17~92-Clusters befinden. Die zwei Signalwege, die durch die Hippo- bzw. MAPK-(*Mitogen activated protein kinase*) Kinase definiert werden, können mit vier der sechs miRNAs des miR-17~92-Clusters in Zusammenhang gebracht werden. Für die restlichen fünf Signalwegen (z. B. Zellzyklus) wurden potentielle Bindungsstellen für zwei bis drei der vom miR-17~92-Cluster kodierten miRNAs vorhergesagt. Einen potentiellen Einfluss auf alle elf Signalkaskaden konnte nur für die miR-17-5p ermittelt werden. Betrachtet man beide miRNA-Stränge der miR-20a, konnte auch für diese miRNA des miR-17~92-Clusters in allen aufgeführten elf Signalwegen Bindungsstellen für Zielgene gefunden werden.

Neben den sechs miRNAs des miR-17~92-Clusters wurden auch die restlichen neun miRNAs der gesamten Cluster-Familie (s. Abb. 4.1) in die Datenbank-Analyse zur Identifikation potentieller Zielgene mit einbezogen. Dabei konnte für die miRNAs des miR-17~92-Clusters die größte Anzahl an Signalwegen mit potentiellen Zielgenen, die für das Kleinhirn eine Rolle spielen, vorhergesagt werden. Für das miR-106b~25-Cluster konnten die wenigsten Signalewege mit potentiellen Bindungsstellen für Zielgenen, die eine Funktion in der Kleinhirn- bzw. Körnerzellentwicklung aufweisen, prognostiziert werden (s. Abb. 3.35 B). Bis auf den Phosphatidylinositol-Signalweg konnten alle in der miR-17~92-Cluster-Analyse identifizierten Signalwege auch in Zusammenhang mit den miRNAs des miR-106a~363-Clusters gebracht werden. Die meisten Assoziationen mit potentiellen Zielsequenzen in neun der elf Signalwegen wiesen die miRNAs -106a und -20b auf. Für die miR-18b, -363 und -92-2 (in der *Heatmap* nicht abgebildet) konnten dagegen keine oder bis zu zwei potentielle Zielgene identifiziert werden. Die meisten Zielgene der miR-17~92-Cluster-Familie waren mit der Differenzierung, Proliferation und Apoptose in cerebellären Körnerzellen assoziiert. Auch in Signalwegen die mit der Zellmotilität, dem Zellzyklus und Aktin-Prozessen in Verbindungen stehen, konnten potentielle Zielgene für die miR-Cluster-Familie identifiziert werden.

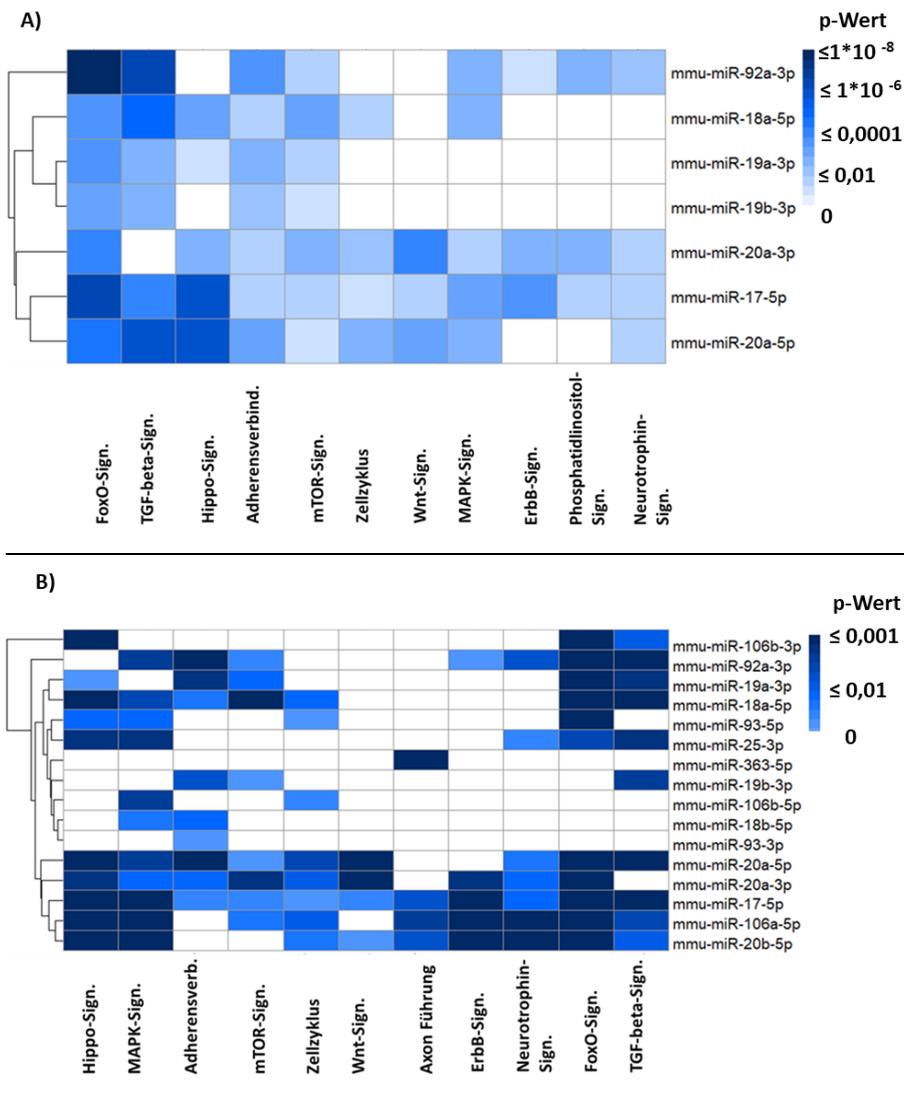


Abb. 3.35: Heatmap der durch das miR-17~92-Cluster (A) und der miR-17~92-Cluster-Familie (B) potentiell beeinflussten Signalwege, die für die Körnerzell-Entwicklung von Interesse sein könnten

(A) Durch eine *in silico* Analyse mit Hilfe der DIANA-mirPath v.3 Software (von Kyoto Encyclopedia of genes and genomes databes (KEGG)) konnten Signalwege, deren Konstituenten potentielle Bindungsstellen für miRNAs des miR-17~92-Clusters enthielten ermittelt werden. In Verbindung mit einer Literaturrecherche konnten elf dieser ermittelten Signalwege mit Bezug zum Kleinhirn und zu cerebellären Körnerzellen identifiziert werden. In allen elf Signalwegen konnten potentielle Bindungsstellen für die miR-17 und die miR-20a (beide miRNA Stränge zusammen) des miR-17~92-Clusters nachgewiesen werden, für die miR-19b in vier und für die anderen drei miRNAs in fünf bis zu acht Signalwegen. (B) Für die miR-17~92-Cluster-Familie konnte, bis auf eine Ausnahme, ein Bezug zu den gleichen Signalwegen, wie für das miR-17~92-Cluster (in (A) dargestellt) hergestellt werden.

Die Farbkodierung kennzeichnet logarithmierte p-Werte der durch die miRNAs potentiell beeinflussten Signalwege (Fisher-Yates-Test). Die Abstufung der Farbe spiegelt in A) logarithmierte ($\log_{0,1}$) und in B) logarithmierte ($\log_{0,00001}$) p-Werte von niedrig- ($p \leq 0,049$) bis hochsignifikant ($p < 0,00001$) wider. Die Farbe Weiß steht für ein fehlendes Zielgen in dem jeweiligen Signalweg.

4 Diskussion

Die vorliegenden Befunde belegen, dass die miRNAs des miR-17~92-Clusters die Entwicklung des Kleinhirns nachhaltig beeinflussen. KcKO-Tiere wiesen in der vorliegenden Studie ein verringertes Kleinhirngewicht mit unterschiedlichen morphologischen Veränderungen der anterioren Lobuli auf. Zudem wiesen die anterioren Lobuli von juvenilen KcKO-Tieren eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen, sowie postmitotische ektopische Körnerzellen in der EGL auf. Auch die Anzahl an proliferierenden Körnerzellen war in der EGL von KcKO-Kleinhirnen signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu wiesen die posterioren Kleinhirnbereiche von KcKO- und WT-Tieren kaum Unterschiede auf. Interessant war auch der Unterschied zwischen der miRNA-Expression in juvenilen und adulten Kleinhirnen. In juvenilen KcKO-Tieren wurde für beide Kleinhirnbereiche eine signifikant reduzierte Expression der drei analysierten miRNAs des miR-17~92-Clusters detektiert. Dieser Expressionsunterschied zwischen KcKO- und WT-Mäusen war in adulten Tieren, mit Ausnahme der miR-19b, nur noch für die anterioren Lobuli, nicht aber für die posterioren Lobuli nachweisbar. Auch für die Geschwindigkeit der KVZ-Migration *in vitro* konnten verschiedene Ergebnisse für KVZ aus den zwei Kleinhirnbereichen anterior und posterior beobachtet werden, wobei sich die Körnerzellen aus beiden Genotypen hierbei auch maßgeblich unterschieden. Diese *in vitro* Migrations-Analysen von miR-17~92-defizienten KVZ legen nahe, dass die morphologischen Veränderungen der Kleinhirne der KcKO-Tiere mehrheitlich auf eine veränderte Migration dieser Zellen zurückgingen. Die Befunde der vorliegenden Studie sollen im Folgenden im Kontext bereits publizierter Daten diskutiert werden.

4.1 Allgemeine körperliche Merkmale der miR-17~92-Cluster-defizienten Mauslinien

Die normale körperliche Entwicklung der beiden cKO-Mauslinien, in denen das miR-17~92-Cluster in Körnerzellen (KcKO) bzw. Purkinjezellen (PcKO) deletiert war, wurde anhand einer detaillierten Analyse der Körpergewichtsentwicklung über eine große Altersspanne bestätigt (s. Kap. 3.3). Keine der beiden cKO-Mauslinien zeigte äußere morphologische Unterschiede oder motorische Beeinträchtigungen im Vergleich mit WT-Mäusen. Daher ist davon auszugehen, dass die PcKO- und KcKO-Mauslinie eine für C57BL/6J Mäuse normale körperliche Entwicklung durchliefen. Diese Hypothese spiegelte sich auch in einer normalen Lebenserwartung und Vermehrungsrate wider. Dennoch sollte erwähnt werden, dass der Math1-Reporter auch in den sekretorischen Dünndarmzellen exprimiert wird (Mulaney and Dabdoub, 2012). Eine Deletion des miR-17~92-Clusters unter dem Math1-Reporter bei KcKO-Tieren könnte somit auch die Darmaktivität und -entwicklung beeinflussen. Gegen solche Effekte spricht aber der fehlende Unterschied beim Körpergewicht zwischen KcKO- und WT-Tieren. Das Körpergewicht der KcKO-Tiere wurde – wie auch in vorangegangene Studien – nur durch das Alter bestimmt (Miller et al., 2002). Somit ist ein Einfluss potentieller Veränderungen im Darm der KcKO-Tiere auf die körperliche Entwicklung weitestgehend auszuschließen.

4.2 Bedeutung der Deletion des miR-17~92-Clusters in Körnerzellen für die Kleinhirnentwicklung

Wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, zeigten morphologische Analysen der Kleinhirne der KcKO-Tiere deutliche Entwicklungsunterschiede mit unterschiedlicher Ausprägung überwiegend im anterioren Kleinhirnbereich im Vergleich zu WT-Tieren. Die Entwicklung des Kleinhirns wurde unter anderem mit Hilfe einer Gewichtsanalyse in verschiedenen Altersstadien untersucht. In juvenilen Entwicklungsstadien (P7–P10) bestand kein signifikanter Gewichtsunterschied des Kleinhirns zwischen KcKO- und WT-Tieren. Bei der Interpretation der Befunde sollte aber berücksichtigt werden, dass das geringe Gewicht der juvenilen Kleinhirne in der Nähe der Nachweisgrenze der verwendeten Waagen lag und dass Mess- und Präparationsunterschiede daher hier deutlicher ins Gewicht fielen als bei den schwereren adulten Kleinhirnen. Ab P21 zeigten KcKO-Tiere eine Gewichtsreduktion des Kleinhirns (s. Kap. 3.4.1) und parallel dazu eine Reduktion des Gesamtumfanges des Kleinhirns (s. Kap. 3.5.2). Eine solche Gewichtsreduktion wurde bereits in der Literatur beschrieben (Zindy et al., 2014). Anders als bei Zindy et al. (2014) zeigten KcKO-Tiere in der vorliegenden Arbeit aber kein reduziertes Gewicht des restlichen Großhirns. Dieser Befund bestätigt die Spezifität des hier verwendeten Math1-cre-Konstrukts und die gezielte miR-17~92-Cluster-Deletion in Math1-cre-exprimierenden Körnerzellen im Kleinhirn (s. Kap. 3.2). Zindy et al. (2014) verwendeten für ihre Analysen eine cKO-Mauslinie mit einer Nestin-Promotor abhängigen Deletion des miR-17~92-Clusters, wodurch die Expression im gesamten Gehirn vermindert wurde. In einer weiteren cKO-Mauslinie in der sowohl das miR-17~92-Cluster, als auch ein weiteres Cluster der miR-17~92-Cluster-Familie, das miR-106b~25-Cluster unter dem Nestin-Promotor deletiert war, konnte Zindy et al. (2014) einen stärker ausgeprägten cKO-Phänotyp beobachten. Die Ergebnisse der Datenbankanalysen zu möglichen Zielgenen der miR-17~92-Cluster-Familie inklusive des miR-106b-25-Clusters (Kap. 3.10) belegen, dass die Cluster gemeinsame Zielgene besitzen und möglicherweise auch gemeinsame Signalwege regulieren. Ob eine Erweiterung der Cluster-Deletion auf das miR-106b~25-Cluster, wie es in der Arbeit von Zindy et al. (2014) durchgeführt wurde, auch mit dem in dieser Arbeit verwendeten Math1-cre-Konstrukts zu einem deutlicheren Entwicklungsunterschied des Kleinhirns und somit auch für messbare Unterschiede in jüngeren Tieren sorgen würde, ist auf der Grundlage bisheriger Studienergebnisse durchaus möglich und sollte in weiteren Studien erforscht werden.

4.3 Bedeutung der Deletion des miR-17~92-Clusters in Purkinjenzellen für die Kleinhirnentwicklung

Im Kleinhirn regulieren unter anderem die Purkinjenzellen die Proliferation und Entwicklung von KVZ (Smeyne et al., 1995; Sudarov and Joyner, 2007; Wechsler-Reya and Scott, 1999). Deshalb sollte in der vorliegenden Studie evaluiert werden, welchen Effekt die Elimination des miR-17~92-Clusters in cerebellären Purkinjenzellen auf ihre eigene Entwicklung und auf die Entwicklung der Körnerzellen bzw. auf das gesamte Kleinhirn hat.

Die körperliche Entwicklung der PckO-Tiere war mit der Entwicklung von WT-Tieren vergleichbar (s. Kap. 3.3). Auch die Untersuchung des Kleinhirngewichts der PckO-Tiere bis zur 83. postnatalen Woche zeigte keine Gewichtsunterschiede, die auf eine veränderte Kleinhirnentwicklung der PckO-Tiere hingewiesen hätten (s. Kap. 3.4.2). Beide Ergebnisse sprechen für einen fehlenden oder geringen Einfluss der miRNAs des miR-17~92-Clusters in Purkinjenzellen auf die allgemeine körperliche Entwicklung und auf die Kleinhirnentwicklung. Zur Analyse des Einflusses der miR-17~92-Cluster-Deletion in Purkinjenzellen auf ihre eigene Entwicklung wurde das Entwicklungsstadium der Purkinjenzellen an P8 in PckO- und WT-Tieren mittels Golgi-Färbung verglichen (s. Kap. 3.6.4). Für die Deletion des miR-17~92-Clusters konnte auf den ersten Blick ein Einfluss auf das Verzweigungsmuster der Dendritenbäume der juvenilen Purkinjenzellen beobachtet werden; die Dendritenverzweigung der Purkinjenzellen in PckO-Tieren war gegenüber WT-Tieren reduziert. Da die Anzahl der Kreuzungspunkte zwischen den einzelnen Tieren beider Genotypen stark variierte, stellte sich jedoch die Frage, inwieweit die veränderte Dendritenentwicklung der Purkinjenzellen an P8 auf die Cluster-Deletion und nicht auf normale individuelle Entwicklungsunterschiede zwischen einzelnen Tieren zurückzuführen war. Weiterführende statistische Analysen bestärkten die Vermutung, dass die Variabilität der Werte zwischen den Tieren zu hoch war, um den Einfluss des Genotyps auf das Kreuzungsmuster eindeutig bestätigen oder ausschließen zu können. Eine starke Erhöhung der Stichprobengröße (Anzahl der zu untersuchenden Tiere und Purkinjenzellen) könnte ein eindeutigeres Ergebnis liefern. Um aber eine möglicherweise unnötig hohe Anzahl an Versuchstieren zu vermeiden, wurde stattdessen der Effekt der miR-17~92-Cluster-Deletion in Purkinjenzellen in späteren Entwicklungsstadien analysiert. Hierfür wurden immunhistochemische Analysen an PckO-Vibratomschnitten durchgeführt (s. Kap. 3.5.3). Morphologische Untersuchungen mit dem Purkinje-Zellmarker Calbindin D-28K an P15 und P21 in WT- und PckO-Tieren ergaben keine abweichenden Befunde bei der Entwicklung der Purkinjenzellschicht. Laut den vergleichbaren Studien von Schaefer et al. (2007) an adulten Mäusen verursacht ein Verlust von allen miRNAs in den Purkinjenzellen im adulten Kleinhirn erst ab der 13.– 17. postnatalen Woche eine langsame Degeneration der Purkinjenzellen und eine zunehmende Dysfunktion des Kleinhirns (Schaefer et al., 2007). Die im Gegensatz zu den Befunden von Schaefer et al. (2007) in der vorliegenden Analyse fehlende Reduktion des Kleinhirngewichts bis zur 84. postnatalen Woche sowie die fehlenden Verhaltensauffälligkeiten wie Ataxien bei adulten PckO-Tieren weisen ebenfalls auf eine vernachlässigbare regulatorische Funktion des miR-17~92-Clusters in der Purkinjenzellentwicklung hin. Dieser Hypothese widersprechen jedoch die Befunde von Pieczora et al. (2017), die eine erhöhte Expression einzelner miRNAs des Clusters (miR-19b, -20a und 92a) in Purkinjenzellen juveniler Ratten an P9 im Vergleich zu adulten Ratten an P30 nachwiesen (Pieczora et al., 2017). Eine erhöhte Expression in juvenilen im Vergleich zu adulten Altersstadien deutet auf eine essentielle Funktion der miRNAs in den sich entwickelnden Zellen hin.

Eine mögliche Erklärung für den fehlenden sichtbaren Effekt der Deletion des miR-17~92-Clusters in den Purkinjenzellen der PckO-Tiere könnte eine Kompensation des Verlustes dieser miRNAs durch eine gesteigerte miRNA-Expression der intakten Cluster der miR-17~92-Cluster Familie sein. Pieczora et al. (2017) beschrieben eine erhöhte miR-93-Expression des miR-106b~25-Clusters, eines der drei Clusters der miR-17~92 Cluster-Familie, in Purkinjenzellen juveniler Tiere. Zusammen mit der miR-20a und vier weiteren miRNAs wird die miR-93 aufgrund ihrer homologen „seed“-Sequenz zur miR-17-Familie zusammengefasst (s. Abb. 4.1 A). Auch für die miR-19b und -92a existieren miRNAs mit homologen „seed“-Sequenzen in Clustern der miR-17~92-Cluster-Familie, die von der Deletion in den PckO-Tieren ausgeschlossen

waren (s. Abb. 4.1 B/D) (Fang et al., 2017). Eine erhöhte Expression der intakten miRNAs in der Cluster-Familie könnte den durch die Deletion entstandenen miRNA-Verlust im Laufe der Kleinhirnentwicklung ganz oder teilweise kompensieren. Der Effekt einer individuellen miRNA auf die Expression eines Zielgens lässt sich teilweise bis vollständig durch andere miRNAs ausgleichen (Baek et al., 2008; Ebert and Sharp, 2012). Auf diese Weise könnte sich der Verlust des miR-17~92-Clusters in Purkinjezellen möglicherweise kompensieren. Eine Bestätigung dieser Hypothese wäre durch eine quantitative Expressionsanalyse der miR-93, miR-92 und weiterer miRNAs mit homologen „seed“-Sequenzen mittels qRT-PCR oder Western-Blot möglich. Aufgrund der geringen Anzahl an Purkinjezellen und der erschwerten Separation der Zellen war dies im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar. Eine weitere Möglichkeit zur Klärung dieses Fragenkomplexes wäre eine Deletion aller Cluster der miR-17~92-Cluster-Familie in Purkinjezellen.

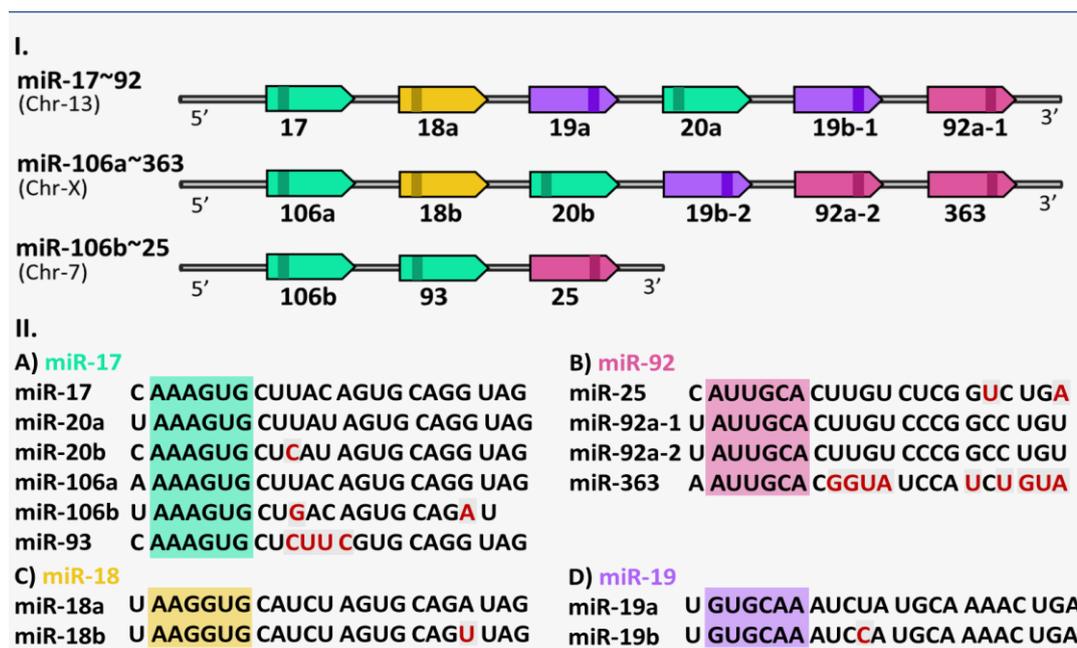


Abb. 4.1: MiR-17~92-Cluster-Familie

(I.) Schematische Darstellung der drei Cluster der miR-17~92-Cluster-Familie. Die farbigen Boxen symbolisieren die pre-miRNAs, die dunklen Balken in den Boxen die korrespondierende reife miRNA. Die Farbkodierungen der Boxen kennzeichnen übereinstimmende „seed“-Sequenzen der miRNAs. (II.) Die miRNAs lassen sich anhand der „seed“-Sequenzen in vier Gruppen einteilen (A–D, farbliche Kodierung entsprechend I.).

Abweichende Nukleotide in den miR-Sequenzen sind rot hervorgehoben. (Modifiziert nach Cp et al., 2012; Ventura et al., 2008)

A: Adenin, C: Cytosin, Chr: Chromosom, G: Guanin, miR: micro-Ribonukleinsäure, T: Thymin

4.4 Einfluss der miR-17~92-Cluster-Defizienz in Körnerzellen auf die Faltung des *Cortex cerebelli*

Die Absenz des miR-17~92-Clusters in Körnerzellen bewirkte eine reduzierte Kleinhirngröße, ektopische Körnerzellen in der EGL und eine veränderte Entwicklung der anterioren Lobuli (s. Kap. 3.5). Besonders auffällig war die große Varianz des KcKO-Phänotyps zwischen einzelnen Individuen während der postnatalen Kleinhirnentwicklung. Diese Variationsbreite an Ausprägungen erwies sich für die quantitative Analyse als besondere Herausforderung. Daher wurde in der vorliegenden

Studie ein morphometrisches Verfahren zur standardisierten Erfassung der Form und Größe des Kleinhirns sowie der Anzahl und Größe der Fissuren und Lobuli nach definierten geometrischen Kriterien entwickelt (s. Kap. 2.10). Dieses Vorgehen wurde in ein Programm implementiert, mit dem die Kleinhirnmorphologie von KcKO- und WT-Tieren ausgewertet werden konnte.

Die Ergebnisse der Umfangsparameter (*Solidity*, Rundheit, Konvexität) unterstützten die Befunde einer verzögerten Entwicklung einiger Lobuli und Fissuren in den Kleinhirnen von KcKO- im Vergleich zu WT-Tieren (s. Kap. 3.5.2). Die Kleinhirnerimeter von adulten KcKO-Tieren näherten sich durch die weniger stark ausgeprägten Lobuli und Einfaltungen stärker der Form eines perfekten Kreises an als die Perimeter der WT-Kleinhirne (s. Kap. 3.5.2). In einem weiteren Mausmodell mit einer spezifischen Deletion aller durch das Ribonuklease (RNase) III-Enzym Dicer (Dicer-cKO) prozessierten miRNAs unter der Kontrolle des Math1-Promotors in Körnerzellen, konnten Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Schilling (Anatomisches Institut der Universität Bonn) die essentielle Rolle der miRNAs während der Kleinhirnentwicklung belegen (Tress und Eiberger; persönliche Mitteilung). Der nahezu komplette Verlust der miRNAs in Körnerzellen resultierte bei adulten Dicer-cKO-Mäusen in einer reduzierten Kleinhirngröße, einer gestörten rostralen Folienentwicklung, einer ektopischen Ansammlung von postmitotischen Körnerzellen, motorischen Beeinträchtigungen und einer verkürzten Lebenserwartung von 80 Tagen. Vergleicht man den Phänotyp der KcKO- und Dicer-cKO-Mäuse, scheint das Fehlen des miR-17~92-Clusters in Körnerzellen einen zum Teil abgeschwächten Phänotyp der in den Dicer-cKO-Mäusen beschriebenen abnormalen Entwicklung der anterioren und posterioren Kleinhirnbereiche zu bewirken. Auch Zindy et al. (2015), die alle durch Dicer prozessierten miRNAs in nahezu allen Zelltypen des Kleinhirns (Nestin-Promotor) deletierten, fanden in ihren Experimenten einen essentiellen Effekt der miRNAs auf die Kleinhirnentwicklung in embryonalen Entwicklungsstadien (Zindy et al., 2015).

Bei der Auswertung der einzelnen Lobuli- und Fissurenperimeter in den KcKO-Tieren verschiedener Altersstadien fiel besonders die reduzierte Größe der anterioren Lobuli III und IV/V sowie der Fissur (2) zwischen den beiden Lobuli auf (s. Tab. 6.1 und Tab. 6.2). Nur diese beiden anterioren Lobuli zeigten in Kleinhirnen sowohl juveniler als auch adulter KcKO-Tiere eine reduzierte Größe. Für die anderen Lobuli, insbesondere für die posterioren Lobuli bestand im adulten Stadium (P21) kein Unterschied zwischen KcKO- und WT-Tieren. Diese Unterschiede in der Entwicklung wurden bei einer Normierung der Perimeterlängen der einzelnen Lobuli und Fissuren auf den gesamten Kleinhirnerimeter besonders deutlich (s. Kap. 3.5.2). Die Anteile der Perimeter des anterioren Lobulus III und der Fissur zwischen Lobuli III und IV/V am gesamten Kleinhirnerimeter war in adulten KcKO-Tieren an P21 signifikant kleiner, wohingegen die Anteile der posterioren Lobuli IX und X sowie der trennenden Fissur (6) signifikant größer waren. Diese Befunde bestätigten den in den vorangegangenen morphologischen Analysen beobachteten Unterschied in der Entwicklung zwischen dem anterioren und posterioren Kleinhirnbereich sowie die geringere Größe der Kleinhirne in KcKO- im Vergleich zu WT-Tieren (s. Kapitel 3.5.1 und 3.5.2). Zindy et al. (2014) wiesen neben einem verringerten Klein- und Großhirngewicht auch eine Entwicklungsstörung der anterioren Lobuli I–V bei einem miR-17~92-Cluster-KO unter dem Nestin-Promotor nach (Zindy et al., 2014). Wie in den Kleinhirnen der KcKO-Tiere waren die anterioren Lobuli I–V in ihrer Größe reduziert und die Fissuren zwischen den anterioren Lobuli schienen weniger stark ausgeprägt. Bei einem doppelten KO des miR-17~92- und miR-106b-25-Clusters unter dem Nestin-Promotor war der beschriebene Phänotyp noch deutlicher ausgeprägt (Zindy et al., 2014). Die Tatsache, dass die beiden KO-Mauslinien aus den Studien von Zindy et al. (2014) eine normale Entwicklung der posterioren Lobuli

VIII–X aufwiesen, bestätigt die in dieser Studie vorliegende Annahme eines unterschiedlichen Effektes der miR-17~92-Cluster-Deletion auf die Körnerzellen der beiden Kleinhirnbereiche. Die stärker ausgeprägten Entwicklungsdefekte des doppelten KO beruhen sehr wahrscheinlich nicht auf einer essentiellen Funktion des miR-106b~25-Clusters, da ein alleiniger KO dieses Clusters keine Auswirkungen auf die Kleinhirnentwicklung zeigte (Zindy et al., 2014). Vielmehr weisen die unterschiedlichen Ausprägungsstärken des Phänotyps in den beiden miR-17~92-KO-Mauslinien von Zindy et al. (2014) und in der KcKO-Mauslinie der vorliegenden Arbeit auf eine (teilweise) Kompensation der fehlenden miRNAs durch intakte Cluster der miR-17~92-Cluster-Familie hin. Eine solche Kompensation wurde bereits in Kapitel 4.3 als möglicher Grund für die fehlende Auswirkung der spezifischen miR-17~92-Cluster-Deletion in Purkinjezellen diskutiert.

Dem miR-17~92-Cluster wird als Effektor des Shh-Signalwegs eine entscheidende Rolle im Kleinhirn und bei der Zellproliferation der Körnerzellen zugeschrieben (Bai et al., 2019; Northcott et al., 2009; Uziel et al., 2009; Zindy et al., 2014). Die miRNAs-17 und -20a beeinflussen den Shh-Signalweg u. a. über die Expression des Transkriptionsfaktors MYC/MYCN, wobei die genauen Mechanismen bis heute nicht vollständig aufgeklärt sind (Gruszka et al., 2018; Northcott et al., 2009). Laut einiger Studien führt ein gestörtes oder fehlendes Shh-Signal zu einer fehlerhaften Differenzierung von Körnerzellen und zu einer massiven Beeinträchtigung der Komplexität sowie der Größe der cerebellären Folien. Dagegen wird die Bildung der Folien im Embryonalstadium sowie die Position der Fissuren im Kleinhirn nicht beeinflusst (Corrales et al., 2006; De Luca et al., 2016; Lewis et al., 2004; Zindy et al., 2014). Die Purkinjezellen, die Bergmann-Gliazellen und die allgemeine Kleinhirnarchitektur schienen in allen von Zindy et al. (2014) verwendeten KO-Mauslinien und der in dieser Arbeit verwendeten KcKO-Mauslinie normal entwickelt zu sein. Dennoch könnte der unspezifische miR-17~92-Cluster-KO im Kleinhirn bei Zindy et al. (2014) die Defektausbildung in der Lobulierung über einen veränderten Shh-Signalweg anders beeinflusst haben als der in dieser Arbeit verwendete spezifische miR-17~92-Cluster-KO in Körnerzellen. In den Nestin-Promotor-assoziierten KO-Mauslinien könnte der Shh-Signalweg auch in den anderen Zelltypen des Kleinhirns durch die Abwesenheit des miR-17~92- bzw. des miR-106b-25-Clusters gestört sein und zu einer allgemeinen Dysregulation bzw. Verringerung der Proliferation führen. Beispielsweise wird die Proliferationsrate der KVZ durch das Shh-Signal ausgehend von den Purkinjezellen reguliert (Northcott et al., 2009; Uziel et al., 2009; Xu et al., 2013). Auch für die korrekte Differenzierung der Bergmann-Gliazellen ist das Shh-Signal essentiell. Gleichzeitig inhibieren Gliazellen das Shh-Signal, so dass die KVZ ausdifferenzieren können und als postmitotische Zellen zur IGL wandern (Dahmane and Ruiz-i-Altaba, 1999). Die Kleinhirne der KcKO-Tiere wiesen eine normale Bildung der pränatal entwickelten, fünf primären Lobuli und der postnatalen kortikalen Kleinhirnarchitektur auf, die postnatale Entwicklung der anterioren und zentralen Lobuli war in ihrer Entwicklung dagegen gestört. Die vorwiegend postnatal auftretenden Defekte könnten unter anderem durch eine Störung der Proliferation der KVZ bedingt oder verstärkt worden sein. Zur Validierung dieser Hypothese wurde in den weiteren Versuchen die Anzahl an proliferierenden bzw. apoptotischen Körnerzellen von KcKO- und WT-verglichen.

4.5 Einfluss der miR-17~92-Cluster-Defizienz auf den Zellzyklus der Körnerzellen

An P7 und P10 wurde in einigen KcKO-Kleinhirnen ein individuell unterschiedlich stark ausgeprägtes Zellband aus postmitotischen Körnerzellen in der Molekularschicht der anterioren Lobuli detektiert (s. Kap. 3.5.1). An P21 konnten diese ektopischen Zellen nicht mehr nachgewiesen werden. Diese ektopischen Zellen in den anterioren Lobuli unterschieden sich deutlich von den gelegentlich in adulten C57BL/6-WT-Tieren zu beobachtenden Ektopien, die immer in den posterioren Lobuli VI–IX lokalisiert sind (Tanaka and Marunouchi, 2005). Die an P7 in KcKO-Tieren beobachtete erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen in den anterioren Lobuli ist eine mögliche Erklärung für das Verschwinden des ektopischen Zellbands im adulten KcKO-Tier. In mehreren Untersuchungen wurde der pro-apoptotische Regulator *Bcl-2-like protein 11* (BIM) als Zielgen der miR-19a, -19b, -20a und -92 identifiziert (Fang et al., 2017). Weiter reguliert die miR-20a die *Fas-receptor* (FasR) Expression, die Apoptose auslösen kann (Yang et al., 2018; Zhang et al., 2017). Die durch eine miR-17~92-Cluster-Deletion in KcKO-Körnerzellen ausgelöste fehlerhafte Regulation dieser Faktoren zusammen mit einer fehlgeleiteten Proliferation und Differenzierung der Zellen könnte zu einer vermehrten Apoptose in den ektopischen Zellen in der EGL von 7 Tage alten KcKO-Tieren und zu einer reduzierten Gesamtzahl von Körnerzellen trotz einer erhöhten Proliferationsrate führen. Für die Validierung dieser (positiven) Effekte der Cluster-Deletion auf die Apoptose der KcKO-Körnerzellen sind weitere Experimente mit einer Bestimmung der Konzentrationen der beteiligten Proteine (z.B. BIM, FasR) in den Körnerzellen der KcKO- und WT-Tiere notwendig.

Die erhöhte Anzahl von pH3-positiven Zellen in der EGL von anterioren Lobuli und die breitere PCNA-positive EGL in den Lobuli III, VIII und IX in KcKO-Tieren weist auf eine erhöhte Proliferationsrate der Körnerzellen an P7 hin (s. Kap. 3.7.1). Dieser Befund steht im Widerspruch zu veröffentlichten Studien, in denen eine fehlende oder reduzierte miR-17~92-Cluster-Expression eine reduzierte Zellproliferation zur Folge hatte (Bai et al., 2019; Fang et al., 2017; Zindy et al., 2014). Zindy et al. (2014) wiesen jedoch nur in Tieren mit dem doppelten KO des miR-17~92- und miR-106b-25-Clusters, nicht aber in Tieren mit dem einfachen KO des miR-17~92-Clusters eine reduzierte Proliferation nach. Die unterschiedlichen Befunde unterstützen die Vermutung (s. Kap. 4.4), dass der für die Deletion verwendete Promotor (vorliegende Arbeit: Math1-Promotor; Zindy et al. (2014): Nestin-Promotor) den Phänotyp der miR-17~92-Cluster KO-Mauslinien beeinflusst. Dabei spielen auch unterschiedliche Startpunkte der Expression unter der Regulation des Math1- und Nestin-Promotors eine Rolle. Die Nestin-Expression in verschiedenen Vorläuferzellen des Kleinhirns beginnt an E9,5–10,5 (Graus-Porta et al., 2001); die Expression des Transkriptionsfaktors Math1 startet in unreifen cerebellärer KVZ dagegen erst an E12,5. Zunächst wird Math1 in den KVZ, die später den anterioren Teil des Kleinhirns bilden, exprimiert, später auch in Zellen für den späteren posterioren Kleinhirnbereich. An E17 sind dann alle KVZ Math1-positiv (Fang et al., 2017; Mogilyansky and Rigoutsos, 2013). Der unterschiedliche Zeitpunkt der Math1- bzw. Nestin-Promotor-vermittelten miRNA-Deletion in den KVZ der KO-Mauslinien kann ein unterschiedliches Expressionsmuster der miRNAs zur Folge haben. Dieser Unterschied ist eine weitere Erklärung für die möglicherweise verschiedenen Proliferationsraten der Körnerzellen der KcKO-Mäuse und der Mauslinie von Zindy et al. (2014). Die quantitative miRNA-Analyse ergab in den Kleinhirnen von KcKO-Tieren einen Expressionsunterschied für alle miRNAs zwischen anterioren und posterioren Lobuli an P7. Dieser Unterschied war an P21 nur noch für eine miRNA nachweisbar (s. Tab. 3.3). Auch dieser Befund könnte mit dem Math1-Expressionsmuster

zusammenhängen und bestärkt die Vermutung, dass das Verhalten der Körnerzellen eng an den Startzeitpunkt der Cluster-Deletion gebunden ist.

Aus der Datenbank-gestützten Zielgenanalyse geht hervor, dass die miRNAs des miR-17~92-Clusters zusätzlich zu dem bereits erwähnten Shh-Signalweg weitere Stoffwechselwege der cerebellären Zellen regulieren, die die Proliferation, Apoptose und Differenzierung betreffen (s. Abb. 3.35). Im Folgenden werden daher zwei weitere mögliche dysregulierte Signalwege in den Körnerzellen der KcKO-Tiere diskutiert. Der Phosphoinositid-3-Kinase (PI₃K)/Protein Kinase B (PKB/AKT)/mTOR-Signalweg fördert durch eine Steigerung der Proteintranslation und des Zellstoffwechsels das Zellwachstum und die Proliferation. Laut einiger Studien regulieren die miR-19a und -19b durch die Inhibierung des *Phosphatase and Tensin homolog* (PTEN) den mTOR-Signalweg indirekt (Fang et al., 2017; Mogilyansky and Rigoutsos, 2013). PTEN ist ein negativer Regulator des mTOR-Signalwegs. In den Körnerzellen der KcKO-Tiere könnte die fehlende Unterdrückung der PTEN-Expression zu einer verstärkten Inhibierung des mTOR-Signalwegs führen und somit zur einer reduzierten Proliferationsrate. Letzteres wurde für die Körnerzellen der doppelten KO-Mauslinie bereits beschrieben (Zindy et al., 2014). Das miR-17~92-Cluster inhibiert jedoch auch den negativen Regulator TGF- β von PTEN (Chow et al., 2008). Die miRNAs miR-17 und -20a beeinflussen den TGF- β II Rezeptor direkt. Die miR-18a wirkt dagegen über die Proteine *Mothers against decapentaplegic homolog* (Smad) 2 und Smad4 indirekt auf den TGF- β -Signalweg (Mogilyansky and Rigoutsos, 2013). Ein Wegfall der Inhibierung von TGF- β in den miR-17~92 depletierten Körnerzellen könnte die Hemmung von PTEN durch TGF- β verstärken, was wiederum zu einer erhöhten mTOR-Aktivität und einer erhöhten Proliferation führen könnte, wie sie in den Körnerzellen der KcKO-Tiere beobachtet wurde. Laut Backman et al. (2001), hat das Fehlen von PTEN in den Körnerzellen des Kleinhirns jedoch keine veränderte Proliferation der Zellen zur Folge (Backman et al., 2001). Bei der in der Studie verwendeten KO-Mauslinie wurde für die PTEN-Deletion u. a. in den Körnerzellen des Kleinhirns und im Gyrus dentatus der Promotor des *Glial fibrillary acidic protein* (Gfap) verwendet (Backman et al., 2001; Kwon et al., 2001). Der Phänotyp dieser PTEN-KO-Mauslinie weist Ähnlichkeiten mit dem Kleinhirnphänotyp der KcKO-Tiere auf. Dazu zählen deutlich vergrößerte Körnerzellen im Kleinhirn der PTEN-KO-Mauslinie und in Kleinhirnen der KcKO-Mäuse an P15 (s. Kap.3.6). Die am Anfang des Kapitels erwähnte breitere PCNA-positive EGL in anterioren und posterioren Lobuli der KcKO-Tiere im Vergleich zu WT-Tieren könnte auf die vergrößerten Zellkörper der KcKO-Körnerzellen zurückzuführen sein. Demnach scheinen weitere veränderte Regulatoren oder dysregulierte Zellzyklusphasen an der erhöhten Anzahl an proliferierenden KcKO-Körnerzellen in 7 Tage alten Tieren beteiligt zu sein. Die veränderte Zellmorphologie der juvenilen KcKO-Körnerzellen wird im folgenden Kapitel diskutiert.

4.6 Einfluss des miR-17~92-Clusters auf die Morphologie von Körnerzellen

Laut früherer Arbeiten geht die Proliferation, Differenzierung und Migration der Körnerzellen mit einer systematischen Änderung der Morphologie dieser Zellen einher (Kawaji et al., 2004; Komuro et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wiesen KcKO-Körnerzellen in den anterioren Lobuli II–III und dem posterioren Lobulus IX überwiegend größere Zellkörper und kürzere Dendriten in 15 Tage alten Tieren auf (s. Kap. 3.6). Im Zusammenhang mit einem möglicherweise veränderten Zellzyklus von KcKO-Körnerzellen wurde der Einfluss der mTOR-, MAPK- und Shh-Signalwege bereits erörtert (s. Kap.

4.5). Die durch eine reduzierte miR-19-Expression in KcKO-Körnerzellen potentiell hervorgerufene Herabregulierung des mTOR-Signalwegs kann das Wachstum von Zellfortsätzen einschränken und wäre eine Erklärung für die verkürzten Dendriten der Zellen an P15 (Haws et al., 2014; Jaworski et al., 2005; Zhang et al., 2013). Neuere Untersuchungen an HeLa- und retinalen Epithel-Zellen belegen den Einfluss des mTOR- und MAPK-Signalwegs auf die Zellgröße (Fingar and Blenis, 2004; Liu et al., 2018). Der MAPK-Signalweg reguliert u. a. die Zeitspanne, in der die Zelle in der G1-Phase verweilt. Bei der Proliferation cerebellärer KVZ spielt der MAPK-Signalweg eine bedeutende Rolle (Guldal et al., 2012). Das Fehlen der regulierenden Wirkung des miR-17~92-Clusters auf den MAPK-, mTOR- und Shh-Signalweg könnte zu veränderten Zellzyklusphasen mit Auswirkungen auf die Proliferation, Differenzierung und Zellmorphologie in der Körnerzellentwicklung geführt haben. Wie auch die Ausprägungsstärke der Lobulierungsdefekte im anterioren Kleinhirnbereich der KcKO-Tiere, variierte die Dendritenlänge und Somatagröße der Körnerzellen in den Lobuli der KcKO-Kleinhirnen an P15 stark (Kap. 3.6). Die Parameter zeigten nur in zwei der vier KcKO-Tiere einen signifikanten Unterschied zu WT-Tieren. Die Morphologie der Körnerzellen und des Kleinhirns in den beiden anderen KcKO-Mäusen glich eher der Morphologie der WT-Tiere. Auf der Basis der vorliegenden Befunde kann ein Zusammenhang zwischen der Körnerzell- und der gesamten Kleinhirnmorphologie weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Der Einfluss eines großen Zellkörpers und drastisch verkürzter Dendriten auf die Migrationskapazität der Körnerzellen wird im folgenden Kapitel diskutiert.

4.7 Einfluss des miR-17~92-Clusters auf die Körnerzellmigration *in vitro*

Die *in vitro* Migrationsanalyse von Körnerzellen aus KcKO- und WT-Tieren ergab je nach Herkunftsort der Zellen (anteriore vs. posteriore Kleinhirnbereiche) eine unterschiedliche Migrationsgeschwindigkeit (s. Kap. 3.8). Weiter war die Geschwindigkeit der Zellbewegung bei KcKO- und WT-Körnerzellen aus den anterioren Lobuli verschieden. Diese Befunde sprechen dafür, dass die abweichende Entwicklung der anterioren Lobuli – bei normal entwickelten posterioren Lobuli – in den KcKO-Kleinhirnen auf das veränderte Migrationsverhalten der Körnerzellen zurückzuführen ist. In den *in vitro* Versuchen migrierten die KcKO-Körnerzellen aus dem anterioren Kleinhirnbereich deutlich schneller als die WT-Körnerzellen. Als Hinweis auf eine mögliche Ursache der unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten der KcKO- und WT-Körnerzellen kann der erhöhte Anteil von F-Aktin in den Körnerzellen von sieben Tage alten KcKO-Tieren, der mit Hilfe von Western-Blot-Analysen detektiert wurde, herangezogen werden (s. Kap. 3.9). Zur weiteren Bestätigung der durch die Proteinanalyse detektierten Unterschiede in der Aktin-Polymerisation der KcKO-Kleinhirne, sollten ergänzende Experimente, wie zum Beispiel die spezifische Fluoreszenzfärbungen von F-Aktin in Primärzellen beitragen. Das Aktin-Zytoskelett ist gemeinsam mit dem Motorprotein Myosin an den zellulären Prozessen der Migration beteiligt, die durch den mTOR-Komplex 1 und 2 gesteuert werden (Liu and Parent, 2011; Martin and Hall, 2005). Schlüsselregulatoren (z. B. Rho-GTPasen, *Ras homolog family member A* (RhoA), *Ras-related C3 botulinum toxin substrate* (Rac), *Cell division control protein 42 homolog* (Cdc42)) des mTOR-Signalwegs kontrollieren die Ausbildung von Zellfortsätzen über den Auf- und Abbau von polymerem F-Aktin zu Aktinfilamenten, die durch die Polymerisation von monomerem G-Aktin entstehen. Die aus der Ablation des miR-17~92-Clusters in KcKO-Körnerzellen resultierende veränderte mTOR-Aktivität (s. Kap. 4.5)

könnte das F/G-Aktin-Verhältnis gestört und so die Bewegung der Zellen verändert haben (Jacinto and Lorberg, 2008; Machacek et al., 2009).

An der potentiellen Verlagerung der F/G-Aktin-Relation zugunsten des F-Aktins sind zwei weitere durch das miR-17~92-Cluster regulierte Gene beteiligt. Die miR-17 ist ein bekannter Regulator der Expression des extrazellulären Matrixproteins Fibronektin und des *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), während miR-92a die Expression des Adhäsionsmoleküls Integrin $\alpha 5$ moduliert. Ein abweichendes Verhältnis von Integrinen und Adhäsionsfaktoren kann das Migrationsverhalten der Zellen erheblich verändern (Huttenlocher and Horwitz, 2011). Der Wegfall der miRNA-Regulatoren in den KcKO-Körnerzellen könnte über eine reduzierte Menge an Integrin-Cluster und eine daraus folgende verringerte Adhäsion an der extrazellulären Matrix und den Nachbarzellen die Geschwindigkeit der Zellbewegung erhöhen. Für diese These spricht die möglicherweise veränderte Aktin-Polymerisation in den Körnerzellen der KcKO-Tiere. Somit scheint es möglich, dass das veränderte Migrationsverhalten der Körnerzellen aus KcKO-Tieren auf das Fehlen des miR-17~92-Clusters zurückzuführen ist und sich auch zwischen Körnerzellen aus anterioren und posterioren Lobuli unterscheidet. Dieses unterschiedliche Migrationsverhalten könnte die morphologischen Veränderungen der anterioren Lobuli bei weitgehend normaler posteriorer Lobulierung erklären.

4.8 Limitationen der Studie

Die Verwendung einer einzigen Mauslinie, in der nur das miR-17~92-Cluster, aber nicht die zwei weiteren Cluster der gleichen Cluster-Familie entfernt wurden, stellt eine Einschränkung dar. Es ist bekannt, dass die einzelnen miRNAs der miR-17~92-Cluster-Familie teilweise gemeinsame Zielgene regulieren, weshalb nicht auszuschließen ist, dass die Auswirkungen der Deletion des miR-17~92-Clusters in den zwei cerebellären Hauptzelltypen durch miRNAs der zwei noch intakten Cluster (s. Abb. 4.1) zum Teil kompensiert wurden (Cp et al., 2012; Gruszka et al., 2018; Trompeter et al., 2011; Ventura et al., 2008; Zindy et al., 2014).

Da eine signifikante Reduktion der miRNAs durch die qRT-PCR in KcKO-Tieren nachgewiesen werden konnte (s. Kap. 3.2.1), kann davon ausgegangen werden, dass eine ausreichend große Menge an miRNAs des Clusters in der KcKO-Mauslinie entfernt wurde. Als technische Einschränkung ist zu erwähnen, dass die verwendeten Primersequenzen nicht spezifisch genug gegenüber der gewünschten Ziel-miRNA waren, sodass auch hier miRNAs der anderen zwei Cluster detektiert werden konnten.

Die zur Verfügung stehenden technischen Möglichkeiten ließen keine eindeutige Verifizierung der miR-17~92-Cluster-Deletion in den cerebellären Purkinjezellen zu, so dass stattdessen auf den Nachweis der L7-Cre Sequenz durch die PCR-Methode und bereits veröffentlichte Studien, in denen die gleiche Mauslinie verwendet wurde, zurückgegriffen wurde (Barski et al., 2000; Toledo et al., 2019).

Für die Anfärbung der cerebellären Körnerzellen von Mäusen ab dem Alter P15 wurde eine Golgi-Färbungsmethode entwickelt (s. Kap. 2.6.6). Diese Methode kann jedoch nicht für jüngere Tieren verwendet werden. Daher wurde für die

Analyse der Entwicklung der KVZ in juvenilen Mäusen der spezifische Körnerzellmarker NeuN verwendet. Zusätzlich wurde die Anzahl an proliferierenden bzw. apoptotischen Körnerzellen von Mäusen an P7 ausgewertet.

In Kapitel 3.5.2 ergab sich die Problematik, dass – bedingt durch die Abwesenheit einzelner Lobuli im anterioren Kleinhirnbereich mancher KcKO-Tiere – einzelne Messwerte der fehlenden Lobuli statistisch nicht erfasst werden konnten. Die negativen Auswirkungen hiervon auf die restliche morphologische Analyse in Kapitel 3.5.2 ließen sich jedoch begrenzen, indem auf weitere Parameter wie Rundheit, Konvexität, *Solidity* und den Kleinhirnperimeter zurückgegriffen wurde.

4.9 Schlussfolgerungen und Ausblick

Schlussfolgernd belegt die vorliegende Arbeit anhand von morphologischen Veränderungen und abweichendem Migrationsverhalten der KcKO-Körnerzellen den Einfluss des miR-17~92-Clusters auf die Entwicklung dieser Zellen im Kleinhirn. Das miR-17~92-Cluster scheint bei der Körnerzellenentwicklung nicht nur an der Zellgröße, sondern auch an dem Wachstum der Dendriten maßgeblich beteiligt zu sein. Dabei ist auch eine Veränderung der Polymerisation des Aktin-Netzwerks nachweisbar. Die veränderte Körnerzellentwicklung beeinflusst zudem die Entwicklung des gesamten Kleinhirns. Betroffen von der veränderten Lobulierung ist hauptsächlich der anteriore Kleinhirnbereich.

Für die Entwicklung der PckO-Purkinjellen konnte in dieser Studie der Einfluss des miR-17~92 Clusters nicht eindeutig nachgewiesen werden, ebenso stellte sich die Kleinhirnentwicklung unauffällig dar.

Aufgrund der nicht ausreichenden Spezifität der Primerbindungen (qRT-PCR) und teilweise überlappenden Zielgene der miR-17~92-Cluster-Familie bleibt zu empfehlen, zwei Mauslinien mit einer Deletion der gesamten miR-17~92-Cluster-Familie analog zu der Studie der vorliegenden Arbeit zu untersuchen.

Hierbei sollte eine quantitative Expressionsanalyse der in dieser Arbeit beschriebenen Zielgene durchgeführt werden, um die Funktion der miRNAs in der Kleinhirnentwicklung im Detail besser nachvollziehen zu können.

Um die Funktionen der miRNAs in der Purkinjellenentwicklung zu erforschen, ermöglicht die Verwendung einer alternativen Mauslinie, in der das miR-17~92-Cluster schon in den frühen embryonalen Entwicklungsstadien entfernt wird, einen weiteren Einblick in die Rolle der miRNAs. Für eine Verifizierung der spezifischen miRNA-Deletion in den Purkinjellen der Mausmutante sollte eine Methode gewählt werden, die zunächst das Separieren der Purkinjellen bzw. -zellschicht in dem Maße ermöglicht, dass anschließend eine quantitative Expressionsanalyse (qRT-PCR) möglich ist. Hierzu würde sich ein Laser-Mikrodissektions-System eignen (Pieczo et al., 2017).

Um die morphologischen Entwicklungsphasen der Körnerzellen in juvenilen Tieren im Detail untersuchen zu können, bietet sich die Methode der Rasterelektronenmikroskopie an. Hierbei sollten ebenfalls die unterschiedlichen Zellausläufer analysiert werden, da in der vorliegenden Arbeit eine Verschiebung des F/G-Aktin-Verhältnisses beobachtet werden konnte.

Durch die Verwendung von Lebendschnittkulturen ergibt sich ein weiterer Aufschluss auf das Verhalten der Körnerzellen *in vivo*. Dies würde auch die Analyse des Aktin-Zytoskeletts durch spezifische Antikörperfärbungen in verschiedenen Phasen der Körnerzellmigration ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Seit der Entdeckung der ersten micro-Ribonukleinsäure (miRNA/miR) wurde intensiv an der Funktion von miRNAs bei der Entwicklung des Kleinhirns geforscht. Dennoch sind die Mechanismen, über die miRNAs die beteiligten Signalwege beeinflussen, noch weitgehend unverstanden. Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation der Bedeutung des miR-17~92-Clusters für die Entwicklung des Kleinhirns und für die Körnerzellmorphologie. Dazu wurden zwei Zell-spezifische Knockout-(cKO) -Mauslinien mit einer Deletion des miR-17~92-Clusters in Körnerzellen (KcKO) oder Purkinjezellen (PcKO) des Kleinhirns analysiert.

Die miR-17~92-Cluster-Expression im Kleinhirn war in den juvenilen KcKO-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-(WT)-Tieren signifikant reduziert; dieser Unterschied war bei adulten Tieren weniger deutlich ausgeprägt. Auch zeigten nur die posterioren Kleinhirnbereiche von juvenilen, nicht aber adulten Tieren beider Genotypen eine höhere miR-17~92-Cluster-Expression als die anterioren Kleinhirnbereiche. Eine vollständige miR-17~92-Cluster-Deletion in KcKO-Kleinhirnen war nicht zu erwarten, da auch andere Zelltypen das Cluster exprimieren.

KcKO- und PcKO-Mäuse zeigten eine mit Wildtyp-(WT)-Mäusen vergleichbare Gewichtsentwicklung und identisches Verhalten. Bei KcKO-Mäusen, nicht aber bei PcKO-Mäusen führte die Deletion des miR-17~92-Clusters zu Abweichungen bei der Kleinhirnentwicklung. Zu den Unterschieden gehörten ein verringertes Kleinhirngewicht und ein reduzierter Kleinhirnerimeter. Um diese Veränderungen standardisiert erfassen zu können, wurde ein Verfahren entwickelt, mit dessen Hilfe die Morphometrie einzelner Lobuli und Fissuren quantitativ analysiert werden konnte. Hier zeigte sich, dass die Entwicklungsdefizite überwiegend die anterioren Lobuli des Kleinhirns bei weitgehend normaler posteriorer Lobulierung betrafen. Der Unterschied zwischen den KcKO- und WT-Kleinhirnen verstärkte sich mit zunehmendem Alter der Tiere.

Zur Analyse des Einflusses der miR-17~92-Cluster-Defizienz auf die Purkinjezellmorphologie in PcKO-Mäusen bzw. auf die Körnerzellmorphologie in KcKO-Mäusen wurde eine modifizierte Golgi-Färbungsmethode entwickelt, die eine detaillierte Auswertung einzelner Zellen im Kleinhirnschnitt erlaubte. Die Dendritenbäume von juvenilen PcKO-Purkinjezellen wiesen eine geringere Anzahl an Verzweigungen auf und schienen im Vergleich zu den WT-Purkinjezellen in ihrer Entwicklung rückständig zu sein. Dieser Unterschied zwischen juvenilen PcKO- und WT-Purkinjezellen kann, aufgrund entwicklungsbedingt variierender Differenzierungsgraden der Dendritenbäumen nicht eindeutig auf die fehlenden Funktionen des miR-17~92-Clusters in den PcKO-Purkinjezellen zurückgeführt werden. Darüber hinaus konnte in adulten PcKO-Tieren keine abweichende Purkinjezellschichtentwicklung beobachtet werden.

KcKO-Körnerzellen dagegen wiesen – bei einer großen individuellen Schwankungsbreite – vergrößerte Somafächen und verkürzte Dendriten auf. Unreife KcKO-Körnerzellen der externen Körnerzellschicht (EGL) zeigten zudem eine erhöhte Anzahl an proliferierenden und apoptotischer Zellen. Die Anzahl an apoptotischer Zellen war sowohl in der EGL als auch in der IGL erhöht. Ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Apoptose von Körnerzellen und der ubiquitären veränderten KcKO-Körnerzellmorphologie ist anzunehmen.

Migrationsanalysen zeigten für die KcKO- im Vergleich zu WT-Körnervorläuferzellen aus den anterioren Lobuli eine erhöhte Wandergeschwindigkeit. Möglicherweise sind die reduzierten Kleinhirnerimeter mit anterioren Lobulierungsdefekten daher auf ein veränderte Migrationsmuster anteriorer KcKO-Körnerzellen zurückzuführen. Migrationsanalysen von

KcKO-Körnerzellen aus allen Lobuli zusammen ergaben jedoch auch eine erhöhte Migrationsgeschwindigkeit der KcKO-Körnerzellvorläuferzellen. Ein Grund dafür könnte eine veränderte Aktin-Polymerisation in den KcKO-Körnerzellen sein. Eine Datenbank-gestützte Zielgenanalyse für das miR-17~92-Cluster im Kleinhirn wies zudem auf einen Einfluss des miR-Clusters auf verschiedene grundlegende Signalwege in der Kommunikation zwischen den Zellen über den *Transforming growth factor beta* (TGF- β) und den *Sonic-hedgehog* (Shh) Signalweg und innerhalb der Zelle über den *mechanistic target of Rapamycin* (mTOR) Signalweg hin.

Zusammenfassend bietet die vorliegende Arbeit neue Einblicke in die Funktion der miRNAs des miR-17~92-Clusters im Rahmen der Entwicklung von Körnerzellen und belegt einen bisher unbekanntem Mechanismus der differentiellen Regulierung der Entwicklung in den anterioren und posterioren Bereichen des Kleinhirns.

6 Anhang

Tab. 6.1: Vergleich der Lobuli der Kleinhirne in KcKO- und WT-Tieren nach Alter (P3, P7, P10, p12), Perimeterlängen (μm) und Anteil der Perimeterlänge an dem gesamten Kleinhirnperimeter (%)

A)	Lobulus II			Lobulus III			Lobulus IV/V		
	Genotyp			Genotyp			Genotyp		
Alter	WT	KcKO	Sign.	WT	KcKO	Sign.	WT	KcKO	Sign.
P3	249	250	ns	301	263	ns	473	480	ns
%	11	10	ns	12	12	ns	22	22	ns
P7	1030	800	***	1246	993	***	2094	1746	***
%	9	9	ns	12	11	ns	22	22	ns
P10	987	728	*	1199	729	***	2159	1585	***
%	9	9	ns	11	10	*	23	22	ns
P21	1080	1068	ns	1419	1073	***	2418	2114	***
%	9	11	.	12	11	**	23	22	ns

B)	Lobulus VIII			Lobulus IX			Lobulus X		
	Genotyp			Genotyp			Genotyp		
Alter	WT	KcKO	Sign.	WT	KcKO	Sign.	WT	KcKO	Sign.
P3	250	225	*	386	431	.	139	201	ns
%	11	10	*	17	19	***	9	9	ns
P7	1089	977	*	1850	1480	***	779	756	ns
%	11	12	ns	18	17	ns	8	9	*
P10	1052	827	*	1724	1323	**	892	673	*
%	10	11	ns	17	17	ns	9	9	ns
P21	1158	1085	ns	1786	1653	ns	877	868	ns
%	10	11	ns	15	16	***	8	9	*

Die Perimeterlängen (μm) von jeweils drei Lobuli aus dem (A) anterioren bzw. (B) posterioren Kleinhirnbereich von KcKO- und WT-Tieren wurden auf signifikante Unterschiede getestet. Ebenso wurde mit den Anteilen der Perimeterlängen der Lobuli am gesamten Kleinhirnperimeter (%) verfahren. (A) Nur die Perimeterlänge des Lobulus III und deren Anteil am gesamten Kleinhirnperimeter war an P10 und P21 in KcKO-Kleinhirnen signifikant kürzer bzw. kleiner als in WT-Kleinhirnen. Der Lobulus IV/V in KcKO-Tieren (P10, P21) wies im Vergleich zu WT-Tieren signifikant kürzere Perimeterlängen auf, jedoch keinen Unterschied in dem berechneten Anteil zum gesamten Kleinhirnperimeter. (B) Die posterioren Lobuli IX und X wiesen in adulten KcKO-Tieren (P21) einen signifikant größeren Anteil am gesamten Kleinhirnperimeter bei vergleichbaren Perimeterlängen im Vergleich mit WT-Tieren auf.

$n=24$: pro Genotyp $n=3$, pro Altersstadium $n=6$; Teststatistik: t-Test: *** $p\leq 0,001$, ** $p\leq 0,01$, * $p\leq 0,05$, $p>0,5$ (nicht signifikant, ns).

Tab. 6.2: Vergleich der Fissuren der Kleinhirne in KcKO- und WT-Tieren nach Alter (P3, P7, P10, P21), Perimeterlängen (μm) und Anteil der Perimeterlänge an dem gesamten Kleinhirnperimeter (%)

A)	Fissur II–III			Fissur III–IV/V		
	Genotyp			Genotyp		
Alter	WT	KcKO	Sign.	WT	KcKO	Sign.
P3	145	107	*	305	303	ns
%	10	9	.	24	27	*
P7	609	405	***	1240	1070	*
%	11	8	**	22	22	ns
P10	634	285	***	1156	831	**
%	11	8	*	20	21	ns
P21	645	596	ns	1357	902	***
%	12	12	ns	23	19	***

B)	Fissur VIII–IX			Fissur IX–X		
	Genotyp			Genotyp		
Alter	WT	KcKO	Sign.	WT	KcKO	Sign.
P3	204	237	ns	125	134	ns
%	9	11	*	9	10	*
P7	1009	836	***	556	544	ns
%	10	10	ns	10	11	ns
P10	904	757	ns	743	508	***
%	9	10	**	13	12	ns
P21	925	898	ns	687	672	ns
%	9	9	ns	12	13	*

Die Perimeterlängen (μm) der Fissuren zwischen den zwei anterioren Lobuli II und III und zwischen den Lobuli III und IV/V (A), sowie den posterioren Lobuli VIII und IX und den Lobuli IX und X (B) wurden auf signifikante Unterschiede getestet. Ebenso wurden die Perimeterlängen der Fissuren anteilig zum gesamten Kleinhirnperimeter berechnet (%) und zwischen den zwei Genotypen (KcKO und WT) verglichen. (A) Nur die Perimeterlänge der Fissur zwischen Lobulus III und IV/V war in allen Altersstadien bis auf P3 in KcKO-Tieren signifikant reduziert. In den juvenilen Alterstadien (P3-P10) konnten signifikant reduzierte Perimeterlängen der Fissur zwischen den anterioren Lobuli II und III der KcKO-Tiere im Vergleich mit WT-Tieren nachgewiesen werden.

$n=24$: pro Genotyp $n=3$, pro Altersstadium $n=6$. Teststatistik: t-Test: *** $p\leq 0,001$, ** $p\leq 0,01$, * $p\leq 0,05$, $p>0,5$ (nicht signifikant, ns).

7 Abkürzungsverzeichnis

Maßeinheiten	
bp	Basenpaar(e)
kb	Kilobasen
rpm	Umdrehungen pro Minute
Cq	<i>quantification of cycle; Threshold-Zykluszahl</i>

Nukleinsäuren, Komponenten und Enzyme	
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre DNA
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
RNA	Ribonukleinsäure
miRNA/miR-	micro Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA

Signalwege und Komponenten	
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>

Sonstige	
C57BL/6	Mauslinie
cKO	conditional knockout
Cre	cyclization recombination
E	embryonaler Tag
EGFP	enhanced green fluorescent protein
F-Aktin	filamentäres Aktin
G-Aktin	globuläres Aktin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>engl. green-fluorescent-protein</i>)
HDAC1	Histon-Deacetylase 1
KO	Knockout
PcKO	miR-17~92 ^{flox/flox} , L7-cre: Mäuse mit cKO des miR-17~92-Clusters in Purkinjenzellen
KcKO	miR-17~92 ^{flox/flox} , Math1-cre: Mäuse mit cKO des miR-17~92-Clusters in cerebellären Körnerzellen

L7	Purkinje cell protein 2 (Pcp2) = Purkinje-Zell-spezifischer Promotor
Math1	Mouse atonal homolog 1 = Körnerzell-spezifischer Promotor
mT/mG-Mauslinie	(Gt(Rosa) ^{26Sortm4} (ACTB-tdTomato-EGFP) _{Luo} /J
mG	membrane-localized <i>enhanced green fluorescent protein</i> (EGFP)
mT	membrane-localized tdTomato
MSD	mittlere quadratische Teilchenverschiebung (engl. " <i>mean square displacement</i> ")
n	Anzahl der Merkmalsausprägungen (Anzahl der Tiere bzw. Zellen)
N	Größe der Grundgesamtheit (Anzahl der Versuche)
NeuN	<i>Neuronal nuclear protein</i>
P	postnataler Tag
PCNA	<i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
pH3	Phospho-Histon H3
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
RT	Raumtemperatur
WT	Wildtyp

Substanzen

BCA	Bicinchoninsäure (engl. <i>Bicinchoninic Acid</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>Bovine-serum-albumin</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
PBS	Phosphat-gepufferte Lösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PFA	Paraformaldehyd
QGF	<i>Quick Golgi Fixative</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat

Zelltypen und Zellschichten

EGL	externe Körnerzellschicht
IGL	interne Körnerzellschicht
KVZ	Körnervorläuferzellen

7.1 Literaturverzeichnis

- Abe, M., Naqvi, A., Hendriks, G.-J., Feltzin, V., Zhu, Y., Grigoriev, A., and Bonini, N.M. (2014). Impact of age-associated increase in 2'-O-methylation of miRNAs on aging and neurodegeneration in *Drosophila*. *Genes Dev.* 28, 44–57.
- Airey, D.C., Lu, L., and Williams, R.W. (2001). Genetic Control of the Mouse Cerebellum: Identification of Quantitative Trait Loci Modulating Size and Architecture. *J. Neurosci.* 21, 5099–5109.
- Altman, J., and Bayer, S.A. (1996). Development of the Cerebellar System: In Relation to Its Evolution, Structure, and Functions (Boca Raton: CRC-Press).
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350–355.
- Backman, S.A., Stambolic, V., Suzuki, A., Haight, J., Elia, A., Pretorius, J., Tsao, M.S., Shannon, P., Bolon, B., Ivy, G.O., et al. (2001). Deletion of *Pten* in mouse brain causes seizures, ataxia and defects in soma size resembling Lhermitte-Duclos disease. *Nat. Genet.* 29, 396–403.
- Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., and Bartel, D.P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455, 64–71.
- Bai, X., Hua, S., Zhang, J., and Xu, S. (2019). The MicroRNA Family Both in Normal Development and in Different Diseases: The miR-17-92 Cluster. *BioMed Res. Int.* 2019, 9450240.
- Bail, S., Swerdel, M., Liu, H., Jiao, X., Goff, L.A., Hart, R.P., and Kiledjian, M. (2010). Differential regulation of microRNA stability. *RNA* 16, 1032–1039.
- Barski, J.J., Dethleffsen, K., and Meyer, M. (2000). Cre recombinase expression in cerebellar Purkinje cells. *Genesis* 28, 93–98.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116, 281–297.
- Bartels, P., Hirsch, P.E., Svanbäck, R., and Eklöv, P. (2012). Water Transparency Drives Intra-Population Divergence in Eurasian Perch (*Perca fluviatilis*). *PLOS ONE* 7, e43641.
- Ben-Arie, N., Bellen, H.J., Armstrong, D.L., McCall, A.E., Gordadze, P.R., Guo, Q., Matzuk, M.M., and Zoghbi, H.Y. (1997). *Math1* is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature* 390, 169–172.
- Bergmann, P., Schmidt, P., and Militzer, K. (1995). Sex differences in age development of a mouse inbred strain: body composition, adipocyte size and organ weights of liver, heart and muscles. *Lab. Anim.* 29, 102–109.
- Beveridge, N.J., Tooney, P.A., Carroll, A.P., Tran, N., and Cairns, M.J. (2009). Down-regulation of miR-17 family expression in response to retinoic acid induced neuronal differentiation. *Cell. Signal.* 21, 1837–1845.
- Bonhomme, V., Picq, S., Gaucherel, C., and Claude, J. (2014). Momocs: Outline Analysis Using R. *J. Stat. Softw.* 56, 1–24.
- Bradford, B., P, D., and HuhdanpaaHannu (1996). The quickhull algorithm for convex hulls. *ACM Trans. Math. Softw. TOMS.*
- 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.
- Burroughs, A.M., Ando, Y., de Hoon, M.J.L., Tomaru, Y., Nishibu, T., Ukekawa, R., Funakoshi, T., Kurokawa, T., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., et al. (2010). A comprehensive survey of 3' animal miRNA modification events and a possible role for 3' adenylation in modulating miRNA targeting effectiveness. *Genome Res.* 20, 1398–1410.
- Cardini, A., and O'higgins, P. (2004). Patterns of morphological evolution in *Marmota* (Rodentia, Sciuridae): geometric morphometrics of the cranium in the context of marmot phylogeny, ecology and conservation. *Biol. J. Linn. Soc.* 82, 385–407.
- Chédotal, A. (2010). Should I stay or should I go? Becoming a granule cell. *Trends Neurosci.* 33, 163–172.
- Chen, C.-Y.A., and Shyu, A.-B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci.* 20, 465–470.
- Chizhikov, V., and Millen, K.J. (2003). Development and malformations of the cerebellum in mice. *Mol. Genet. Metab.* 80, 54–65.
- Chow, J.Y.C., Dong, H., Quach, K.T., Van Nguyen, P.N., Chen, K., and Carethers, J.M. (2008). TGF-beta mediates PTEN suppression and cell motility through calcium-dependent PKC-alpha activation in pancreatic cancer cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G899-905.
- Cloonan, N., Wani, S., Xu, Q., Gu, J., Lea, K., Heater, S., Barbacioru, C., Steptoe, A.L., Martin, H.C., Nourbakhsh, E., et al. (2011). MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways. *Genome Biol.* 12, R126.
- Colonnier, M. (1964). The tangential organization of the visual cortex. *J. Anat.* 98, 327–344.3.
- Corrales, J.D., Blaess, S., Mahoney, E.M., and Joyner, A.L. (2006). The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation. *Development* 133, 1811–1821.

- Cp, C., C, B., and A, V. (2012). The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease. *Cancer J. Sudbury Mass* 18, 262–267.
- Czechowska, N., van Rienen, A., Lang, F., Eiberger, B., and Baader, S.L. (2019). An update on the Golgi staining technique improving cerebellar cell type specificity. *Histochem. Cell Biol.* 151, 327–341.
- Dahmane, N., and Ruiz-i-Altaba, A. (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126, 3089–3100.
- Danka Mohammed, C.P., Park, J.S., Nam, H.G., and Kim, K. (2017). MicroRNAs in brain aging. *Mech. Ageing Dev.* 168, 3–9.
- De Luca, A., Cerrato, V., Fucà, E., Parmigiani, E., Buffo, A., and Leto, K. (2016). Sonic hedgehog patterning during cerebellar development. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 291–303.
- Dickinson, R.B., and Tranquillo, R.T. (1993). Optimal estimation of cell movement indices from the statistical analysis of cell tracking data. *AIChE J.* 39, 1995–2010.
- Dodson, A. (2002). Modern methods for diagnostic immunocytochemistry. *Curr. Diagn. Pathol.* 8, 113–122.
- Ebert, M.S., and Sharp, P.A. (2012). Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell* 149, 515–524.
- Ebert, M.S., Neilson, J.R., and Sharp, P.A. (2007). MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat. Methods* 4.
- Essen, D.C.V. (2002). Surface-Based Atlases of Cerebellar Cortex in the Human, Macaque, and Mouse. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 978, 468–479.
- Fang, L.-L., Wang, X.-H., Sun, B.-F., Zhang, X.-D., Zhu, X.-H., Yu, Z.-J., and Luo, H. (2017). Expression, regulation and mechanism of action of the miR-17-92 cluster in tumor cells (Review). *Int. J. Mol. Med.* 40, 1624–1630.
- Fayrer, J. (1866). Aphasia and Death Resulting from Softening in Left Anterior Cerebral Lobe and Cerebellum, Due to Atheromatous Degeneration and Embolism of the Cerebral Arteries. *Edinb. Med. J.* 12, 422–431.
- Ferreira, T., and Rasb, W. (2012). ImageJ User Guide.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102–114.
- Fingar, D.C., and Blenis, J. (2004). Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23, 3151–3171.
- Forni, P.E., Scuoppo, C., Imayoshi, I., Taulli, R., Dastrù, W., Sala, V., Betz, U.A.K., Muzzi, P., Martinuzzi, D., Vercelli, A.E., et al. (2006). High Levels of Cre Expression in Neuronal Progenitors Cause Defects in Brain Development Leading to Microencephaly and Hydrocephaly. *J. Neurosci.* 26, 9593–9602.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105.
- Gantier, M.P., McCoy, C.E., Rusinova, I., Saulep, D., Wang, D., Xu, D., Irving, A.T., Behlke, M.A., Hertzog, P.J., Mackay, F., et al. (2011). Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res.* 39, 5692–5703.
- Ghosh, R., Gilda, J.E., and Gomes, A.V. (2014). The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev. Proteomics* 11, 549–560.
- Golgi, C. (1873). Sulla struttura della sostanza grigia del cervello.
- Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., Orban, P., Klein, R., Schittny, J.C., and Müller, U. (2001). β 1-Class Integrins Regulate the Development of Laminae and Folia in the Cerebral and Cerebellar Cortex. *Neuron* 31, 367–379.
- 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.
- Gruszka, R., Zakrzewska, M., Gruszka, R., and Zakrzewska, M. (2018). The Oncogenic Relevance of miR-17-92 Cluster and Its Paralogous miR-106b-25 and miR-106a-363 Clusters in Brain Tumors. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 879.
- Guesdon, J.L., Ternynck, T., and Avrameas, S. (1979). The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 27, 1131–1139.
- Guldal, C.G., Ahmad, A., Korshunov, A., Squatrito, M., Awan, A., Mainwaring, L.A., Bhatia, B., Parathath, S.R., Nahle, Z., Pfister, S., et al. (2012). An essential role for p38 MAPK in cerebellar granule neuron precursor proliferation. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 123, 573–586.
- Hansen, T.B., Jensen, T.I., Clausen, B.H., Bramsen, J.B., Finsen, B., Damgaard, C.K., and Kjems, J. (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* 495, 384–388.
- Hathaway, D.R., and Haerberle, J.R. (1985). A radioimmunoblotting method for measuring myosin light chain phosphorylation levels in smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 249, C345–351.

- Hatten, M.E., and Heintz, N. (1995). Mechanisms of Neural Patterning and Specification in the Development Cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 385–408.
- Haws, M.E., Jaramillo, T.C., Espinosa-Becerra, F., Widman, A., Stuber, G.D., Sparta, D.R., Tye, K.M., Russo, S.J., Parada, L.F., Kaplitt, M., et al. (2014). PTEN knockdown alters dendritic spine/protrusion morphology, not density. *J. Comp. Neurol.* 522, 1171–1190.
- He, L., and Hannon, G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5, 522–531.
- Herrick, C.L. (1891). THE EVOLUTION OF THE CEREBELLUM. *Science ns-18*, 188–189.
- Hosack, D.A., Dennis, G., Sherman, B.T., Lane, H.C., and Lempicki, R.A. (2003). Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol.* 4, R70.
- Houston, C.M., Diamanti, E., Diamantaki, M., Kutsarova, E., Cook, A., Sultan, F., and Brickley, S.G. (2017). Exploring the significance of morphological diversity for cerebellar granule cell excitability. *Sci. Rep.* 7, 46147.
- Hsu, S.M., Raine, L., and Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 29, 577–580.
- Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I.K., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16961–16966.
- Huttenlocher, A., and Horwitz, A.R. (2011). Integrins in Cell Migration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Hwang, H.-W., Wentzel, E.A., and Mendell, J.T. (2007). A Hexanucleotide Element Directs MicroRNA Nuclear Import. *Science* 315, 97–100.
- Iwaniuk, K.M., Schira, J., Weinhold, S., Jung, M., Adjaye, J., Müller, H.W., Wernet, P., and Trompeter, H.-I. (2011). Network-like impact of MicroRNAs on neuronal lineage differentiation of unrestricted somatic stem cells from human cord blood. *Stem Cells Dev.* 20, 1383–1394.
- Jacinto, E., and Lorberg, A. (2008). TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem. J.* 410, 19–37.
- 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.
- Kawaji, K., Umeshima, H., Eiraku, M., Hirano, T., and Kengaku, M. (2004). Dual phases of migration of cerebellar granule cells guided by axonal and dendritic leading processes. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 228–240.
- Kehl, T., Backes, C., Kern, F., Fehlmann, T., Ludwig, N., Meese, E., Lenhof, H.-P., and Keller, A. (2017). About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways. *Oncotarget* 8, 107167–107175.
- Kim, B.J., and Scott, D.A. (2014). Mouse Model Reveals the Role of RERE in Cerebellar Foliation and the Migration and Maturation of Purkinje Cells. *PLOS ONE* 9, e87518.
- Komuro, H., and Rakic, P. (1998). Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 1478–1490.
- 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.
- Kroner, A., Greenhalgh, A.D., Zarruk, J.G., Passos Dos Santos, R., Gaestel, M., and David, S. (2014). TNF and increased intracellular iron alter macrophage polarization to a detrimental M1 phenotype in the injured spinal cord. *Neuron* 83, 1098–1116.
- Kuhar, S.G., Feng, L., Vidan, S., Ross, M.E., Hatten, M.E., and Heintz, N. (1993). Changing patterns of gene expression define four stages of cerebellar granule neuron differentiation. *Dev. Camb. Engl.* 117, 97–104.
- Kwon, C.H., Zhu, X., Zhang, J., Knoop, L.L., Tharp, R., Smeyne, R.J., Eberhart, C.G., Burger, P.C., and Baker, S.J. (2001). Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. *Nat. Genet.* 29, 404–411.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., and Tuschl, T. (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA* 9, 175–179.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 21, 4663–4670.
- Leiner, H.C., Leiner, A.L., and Dow, R.S. (1993). Cognitive and language functions of the human cerebellum. *Trends Neurosci.* 16, 444–447.
- Lemcke, H., and David, R. (2018). Potential mechanisms of microRNA mobility. *Traffic Cph. Den.* 19, 910–917.
- 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.
- Lewis, P.M., Gritli-Linde, A., Smeyne, R., Kottmann, A., and McMahon, A.P. (2004). Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Dev. Biol.* 270, 393–410.

- Li, Y., Vecchiarelli-Federico, L.M., Li, Y.-J., Egan, S.E., Spaner, D., Hough, M.R., and Ben-David, Y. (2012). The miR-17-92 cluster expands multipotent hematopoietic progenitors whereas imbalanced expression of its individual oncogenic miRNAs promotes leukemia in mice. *Blood* 119, 4486–4498.
- Liu, L., and Parent, C.A. (2011). TOR kinase complexes and cell migration. *J. Cell Biol.* 194, 815–824.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* 7, 719–723.
- Liu, S., Ginzberg, M.B., Patel, N., Hild, M., Leung, B., Li, Z., Chen, Y.-C., Chang, N., Wang, Y., Tan, C., et al. (2018). Size uniformity of animal cells is actively maintained by a p38 MAPK-dependent regulation of G1-length. *eLife* 7.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408.
- LUCIANO, D.J., MIRSKY, H., VENDETTI, N.J., and MAAS, S. (2004). RNA editing of a miRNA precursor. *RNA* 10, 1174–1177.
- 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.
- 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.
- Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G.L., Hahn, K.M., and Danuser, G. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 461, 99–103.
- Machold, R., and Fishell, G. (2005). Math1 Is Expressed in Temporally Discrete Pools of Cerebellar Rhombic-Lip Neural Progenitors. *Neuron* 48, 17–24.
- Marín, O., Valiente, M., Ge, X., and Tsai, L.-H. (2010). Guiding Neuronal Cell Migrations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001834.
- Martin, D.E., and Hall, M.N. (2005). The expanding TOR signaling network. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 158–166.
- Matei, V., Pauley, S., Kaing, S., Rowitch, D., Beisel, K.W., Morris, K., Jones, K., Lee, J., and Fritsch, B. (2005). Smaller inner ear sensory epithelia in Neurog1 null mice are related to earlier hair cell terminal mitosis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 234, 633–650.
- Md, M., B, T., K, M., L, L., and L, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse.
- Men, Y., Zhang, A., Li, H., Jin, Y., Sun, X., Li, H., and Gao, J. (2015). LKB1 Regulates Cerebellar Development by Controlling Sonic Hedgehog-mediated Granule Cell Precursor Proliferation and Granule Cell Migration. *Sci. Rep.* 5.
- Millen, K.J., and Gleeson, J.G. (2008). Cerebellar Development and Disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 12–19.
- Miller, R.A., Harper, J.M., Galecki, A., and Burke, D.T. (2002). Big mice die young: early life body weight predicts longevity in genetically heterogeneous mice. *Aging Cell* 1, 22–29.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 56–68.
- Mogilyansky, E., and Rigoutsos, I. (2013). The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death Differ.* 20, 1603–1614.
- Morin, R.D., O'Connor, M.D., Griffith, M., Kuchenbauer, F., Delaney, A., Prabhu, A.-L., Zhao, Y., McDonald, H., Zeng, T., Hirst, M., et al. (2008). Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res.* 18, 610–621.
- Mulvaney, J., and Dabdoub, A. (2012). Atoh1, an essential transcription factor in neurogenesis and intestinal and inner ear development: function, regulation, and context dependency. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 13, 281–293.
- 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.
- Northcott, P.A., Fernandez-L, A., Hagan, J.P., Ellison, D.W., Grajkowska, W., Gillespie, Y., Grundy, R., Meter, T.V., Rutka, J.T., Croce, C.M., et al. (2009). The miR-17/92 Polycistron Is Up-regulated in Sonic Hedgehog-Driven Medulloblastomas and Induced by N-myc in Sonic Hedgehog-Treated Cerebellar Neural Precursors. *Cancer Res.* 69, 3249–3255.
- O'Brien, J., and Unwin, N. (2006). Organization of spines on the dendrites of Purkinje cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1575–1580.
- Olive, V., Bennett, M.J., Walker, J.C., Ma, C., Jiang, I., Cordon-Cardo, C., Li, Q.-J., Lowe, S.W., Hannon, G.J., and He, L. (2009). miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev.* 23, 2839–2849.

- Olson, E. (2011). Particle Shape Factors and Their Use in Image Analysis – Part 1 : Theory. *J. GXP Compliance* 15, 85–96.
- Parker, R., and Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol. Cell* 25, 635–646.
- Paschou, M., Paraskevopoulou, M.D., Vlachos, I.S., Koukouraki, P., Hatzigeorgiou, A.G., and Doxakis, E. (2012). miRNA Regulons Associated with Synaptic Function. *PLOS ONE* 7, e46189.
- Patro, N., Kumar, K., and Patro, I. (2013). Quick Golgi method: modified for high clarity and better neuronal anatomy. *Indian J. Exp. Biol.* 51, 685–693.
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells. *Mol. Cell* 21, 533–542.
- Pieczora, L., Stracke, L., Vorgerd, M., Hahn, S., Theiss, C., and Theis, V. (2017). Unveiling of miRNA Expression Patterns in Purkinje Cells During Development. *The Cerebellum* 16, 376–387.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., and Filipowicz, W. (2007). Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol.* 17, 118–126.
- Pinol, M.R., Kägi, U., Heizmann, C.W., Vogel, B., Séquier, J.-M., Haas, W., and Hunziker, W. (1990). Poly- and Monoclonal Antibodies Against Recombinant Rat Brain Calbindin D-28K Were Produced to Map Its Selective Distribution in the Central Nervous System. *J. Neurochem.* 54, 1827–1833.
- Rj, R., and Me, H. (1995). Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15.
- 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.
- Schilling, K. (2000). Lineage, development and morphogenesis of cerebellar interneurons. In *Progress in Brain Research*, (Elsevier), pp. 51–68.
- Schilling, K., and Aletsee-Ufrecht, M.C. (1989). An immunoblot assay for the simultaneous quantification of several antigens. *Anal. Biochem.* 177, 203–206.
- Schneider, T., Hung, L.-H., Schreiner, S., Starke, S., Eckhof, H., Roszbach, O., Reich, S., Medenbach, J., and Bindereif, A. (2016). CircRNA-protein complexes: IMP3 protein component defines subfamily of circRNPs. *Sci. Rep.* 6.
- Sen, G.L., and Blau, H.M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol.* 7, 633–636.
- Sgaier, S.K., Lao, Z., Villanueva, M.P., Berenshteyn, F., Stephen, D., Turnbull, R.K., and Joyner, A.L. (2007). Genetic subdivision of the tectum and cerebellum into functionally related regions based on differential sensitivity to engrailed proteins. *Dev. Camb. Engl.* 134, 2325–2335.
- Sharova, L.V., Sharov, A.A., Nedorezov, T., Piao, Y., Shaik, N., and Ko, M.S.H. (2009). Database for mRNA Half-Life of 19 977 Genes Obtained by DNA Microarray Analysis of Pluripotent and Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells. *DNA Res.* 16, 45–58.
- Simat, M., Parpan, F., and Fritschy, J.-M. (2007). Heterogeneity of glycinergic and gabaergic interneurons in the granule cell layer of mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 500, 71–83.
- Sistig, T., Lang, F., Wrobel, S., Baader, S.L., Schilling, K., and Eiberger, B. (2017). Mtss1 promotes maturation and maintenance of cerebellar neurons via splice variant-specific effects. *Brain Struct. Funct.* 222, 2787–2805.
- Smeyne, R.J., Chu, T., Lewin, A., Bian, F., S.-Crisman, S., Kunsch, C., Lira, S.A., and Oberdick, J. (1995). Local Control of Granule Cell Generation by Cerebellar Purkinje Cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 6, 230–251.
- Stanko, J.P., Easterling, M.R., and Fenton, S.E. (2015). Application of Sholl analysis to quantify changes in growth and development in rat mammary gland whole mounts. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 54, 129–135.
- Stokes, C.L., Lauffenburger, D.A., and Williams, S.K. (1991). Migration of individual microvessel endothelial cells: stochastic model and parameter measurement. *J. Cell Sci.* 99 (Pt 2), 419–430.
- Strand, A.D., Aragaki, A.K., Baquet, Z.C., Hodges, A., Cunningham, P., Holmans, P., Jones, K.R., Jones, L., Kooperberg, C., and Olson, J.M. (2007). Conservation of Regional Gene Expression in Mouse and Human Brain. *PLOS Genet.* 3, e59.
- Sudarov, A., and Joyner, A.L. (2007). Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers. *Neural Develop.* 2, 26.
- Sultan, F., and Glickstein, M. (2007). The cerebellum: Comparative and animal studies. *The Cerebellum* 6, 168.
- Tanaka, M., and Marunouchi, T. (2005). Abnormality in the cerebellar folial pattern of C57BL/6J mice. *Neurosci. Lett.* 390, 182–186.
- Telonis, A.G., Loher, P., Jing, Y., Londin, E., and Rigoutsos, I. (2015). Beyond the one-locus-one-miRNA paradigm: microRNA isoforms enable deeper insights into breast cancer heterogeneity. *Nucleic Acids Res.* 43, 9158–9175.

- Thomas, M.F., Abdul-Wajid, S., Panduro, M., Babiarz, J.E., Rajaram, M., Woodruff, P., Lanier, L.L., Heissmeyer, V., and Ansel, K.M. (2012). Eri1 regulates microRNA homeostasis and mouse lymphocyte development and antiviral function. *Blood* 120, 130–142.
- Toledo, A., Lang, F., Doengi, M., Morrison, H., Stein, V., and Baader, S.L. (2019). Merlin modulates process outgrowth and synaptogenesis in the cerebellum. *Brain Struct. Funct.* 224, 2121–2142.
- Towler, B.P., Jones, C.I., and Newbury, S.F. (2015). Mechanisms of regulation of mature miRNAs. *Biochem. Soc. Trans.* 43, 1208–1214.
- Trompeter, H.-I., Abbad, H., Iwaniuk, K.M., Hafner, M., Renwick, N., Tuschl, T., Schira, J., Müller, H.W., and Wernet, P. (2011). MicroRNAs MiR-17, MiR-20a, and MiR-106b Act in Concert to Modulate E2F Activity on Cell Cycle Arrest during Neuronal Lineage Differentiation of USSC. *PLoS ONE* 6.
- Tsai, L.-H., and Gleeson, J.G. (2005). Nucleokinesis in Neuronal Migration. *Neuron* 46, 383–388.
- Uhlmann, S., Mannsperger, H., Zhang, J.D., Horvat, E.-Á., Schmidt, C., Küblbeck, M., Henjes, F., Ward, A., Tschulena, U., Zweig, K., et al. (2012). Global microRNA level regulation of EGFR-driven cell-cycle protein network in breast cancer. *Mol. Syst. Biol.* 8, 570.
- 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.* 106, 2812–2817.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659.
- Vella, M.C., Choi, E.-Y., Lin, S.-Y., Reinert, K., and Slack, F.J. (2004). The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes Dev.* 18, 132–137.
- Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., et al. (2008). Targeted Deletion Reveals Essential and Overlapping Functions of the miR-17~92 Family of miRNA Clusters. *Cell* 132, 875–886.
- Vlachos, I.S., Zagganas, K., Paraskevopoulou, M.D., Georgakilas, G., Karagkouni, D., Vergoulis, T., Dalamagas, T., and Hatzigeorgiou, A.G. (2015). DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* 43, W460–W466.
- Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O., and Yokoyama, S. (2007). Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev.* 21, 1857–1862.
- Wang, B., and Bao, L. (2017). Axonal microRNAs: localization, function and regulatory mechanism during axon development. *J. Mol. Cell Biol.* 9, 82–90.
- Wasserman, W.W., Palumbo, M., Thompson, W., Fickett, J.W., and Lawrence, C.E. (2000). Human-mouse genome comparisons to locate regulatory sites. *Nat. Genet.* 26, 225–228.
- Wechsler-Reya, R.J., and Scott, M.P. (1999). Control of Neuronal Precursor Proliferation in the Cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22, 103–114.
- Weyer, A., and Schilling, K. (2003). Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J. Neurosci. Res.* 73, 400–409.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862.
- Xu, H., Yang, Y., Tang, X., Zhao, M., Liang, F., Xu, P., Hou, B., Xing, Y., Bao, X., and Fan, X. (2013). Bergmann glia function in granule cell migration during cerebellum development. *Mol. Neurobiol.* 47, 833–844.
- Yang, Y., Huang, G., Zhou, Z., Fewell, J.G., and Kleinerman, E.S. (2018). miR-20a regulates Fas expression in osteosarcoma cells by modulating Fas promoter activity and can be therapeutically targeted to inhibit lung metastases. *Mol. Cancer Ther.* 17, 130–139.
- Yuan, R., Tsaih, S.-W., Petkova, S.B., de Evsikova, C.M., Xing, S., Marion, M.A., Bogue, M.A., Mills, K.D., Peters, L.L., Bult, C.J., et al. (2009). Aging in inbred strains of mice: study design and interim report on median lifespans and circulating IGF1 levels. *Aging Cell* 8, 277–287.
- Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., and Mi, S. (2015). Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13, 17–24.
- Zhang, Y., Ueno, Y., Liu, X.S., Buller, B., Wang, X., Chopp, M., and Zhang, Z.G. (2013). The MicroRNA-17-92 cluster enhances axonal outgrowth in embryonic cortical neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 6885–6894.
- Zhang, Y., Alexander, P.B., and Wang, X.-F. (2017). TGF- β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9.
- Zindy, F., Kawachi, D., Lee, Y., Ayrault, O., Ben Merzoug, L., McKinnon, P.J., Ventura, A., and Roussel, M.F. (2014). Role of the miR-17~92 cluster family in cerebellar and medulloblastoma development. *Biol. Open* 3, 597–605.

Zindy, F., Lee, Y., Kawauchi, D., Ayrault, O., Merzoug, L.B., Li, Y., McKinnon, P.J., and Roussel, M.F. (2015). Dicer Is Required for Normal Cerebellar Development and to Restrain Medulloblastoma Formation. *PLoS ONE* 10.

7.1.1 Internetquellen

Freies Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramm: ImageJ mit dem Plugin MTrackJ und dem Toolkit Gels

URL: <https://imagej.nih.gov/ij/index.html> und <http://www.imagescience.org/meijering/software/mtrackj/> (Stand: 17.07.2021)

URL: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/analyze.html> (Stand 17.07.2021)

URL: <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide> (Stand 17.07.2021)

Freie Statistik-Software: R

URL: <http://www.r-project.org/> (Stand: 17.07.2021)

Mauslinien Informationen: The Jackson Laboratory

URL: <https://www.jax.org/strain/000664> (Stand 17.07.2021)

7.1.2 Publikationen

Czechowska N, van Rienen A, Lang F, Eiberger B, Baader S L. An update on the Golgi staining technique improving cerebellar cell type specificity. *Histochemistry and Cell Biology*. 2019 Jan; 151:327-341

URL: <https://doi.org/10.1007/s00418-018-01766-0>

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Karl Schilling, für die Möglichkeit, an diesem herausfordernden Thema im Institut für Anatomie und Zellbiologie des Universitätsklinikums Bonn forschen zu können. Vor allem seine exzellente fachliche Betreuung, seine Begeisterungsfähigkeit und fortwährende Unterstützung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Witke danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens zu dieser Arbeit, gleichermaßen den Professoren von der Emde und Kubitscheck für die Bereitschaft, an meiner Prüfungskommission mitzuwirken.

Meiner gesamten Arbeitsgruppe unter der Leitung von Frau Dr. Britta Eiberger möchte ich meinen herzlichen Dank für die vielfältig inspirierende Arbeitsatmosphäre und den regen wissenschaftlichen Austausch aussprechen. Durch die fortwährend tatkräftige Unterstützung, die vielen guten Ratschläge und Ideen konnte ich die zahlreichen Herausforderungen im Labor meistern. Meinen Mitdoktoranden Carina Bönisch und Thorsten Sistig danke ich darüber hinaus für die zahlreichen lustigen und aufmunternden Momente, die mich durch diverse kleine und mittlere Katastrophen getragen haben.

Herrn Prof. Dr. Stefan Baader und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die rege Unterstützung und die fruchtbare Kooperation. Ganz besonders möchte ich mich hier bei Frau Dr. Franziska Lang für ihre verlässliche Unterstützung und gute Freundschaft bedanken.

Bei meinem Kollegen Dr. Maik Hintze, Institut für Neuroanatomie, möchte ich mich ganz herzlich für seine wissenschaftliche Unterstützung und unendliche Hilfsbereitschaft bedanken, die mich auch in den schwierigsten Momenten nicht verzweifeln ließ. Darüber hinaus gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Anatomischen Instituts, die stets bereit waren, mir mit Rat und Tat zu helfen.

Bei Herrn Marc Costea möchte ich mich ganz herzlich für seine Unterstützung bei der Entwicklung der morphometrischen Analysemethoden bedanken; ohne ihn wäre die Verwirklichung dieses Programms nicht möglich gewesen.

Einen weiteren Dank möchte ich meiner lieben Freundin Dr. Ina Engels aussprechen, die für mich zu jeder Tages- und Nachtzeit ein offenes Ohr hatte und in schlechten wie in guten Zeiten immer an meiner Seite stand.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders herzlich für die aufmerksame, liebevolle und vielseitige Unterstützung während des Verfassens dieser Arbeit und meiner gesamten Doktorandenzeit. Ohne Eure Hilfe wäre dies nicht zu schaffen gewesen.