

Aus der Abteilung für Vergleichende Medizin  
des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg  
(Leiter: Prof. Dr. J. Schmidt)  
angefertigt unter der Leitung von Dr. M. Brielmeier

Vorgelegt über den Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie  
am Institut für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Vorstand: Prof. Dr. W. Schmahl)

UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION VON THIOREDOXIN REDUKTASE 1 IN  
DER ZNS-ENTWICKLUNG IN KONDITIONALEN KNOCKOUT-MÄUSEN

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von Jonna Sørensen  
aus Roskilde, Dänemark

München 2007

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Prof. Dr. Schmahl

Korreferenten: Prof. Dr. Wolf

Prof. Dr. Sinowatz

Prof. Dr. Goldberg

Prof. Dr. Förster

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

**Far & Mor**  
**Farfar & Farmor**  
**Tascha**

# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis .....	4
2	Einleitung.....	6
2.1	Selen und Selenoproteine .....	6
2.2	Das Thioredoxin/Thioredoxin Reduktase- System.....	12
2.3	Das Kleinhirn .....	15
2.4	Das Knockout- Modell .....	22
3	Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	26
4	Material.....	27
4.1	Chemikalien.....	27
4.2	Enzyme .....	27
4.3	Verbrauchsmaterialien und Kits.....	28
4.4	Desoxy-Oligonukleotide.....	28
4.5	Material für Histologie und Immunhistochemie .....	29
4.6	Antikörper für Immunhistochemie .....	30
4.7	Material für Western Blot .....	31
4.8	Material für Northern Blot .....	31
5	Methoden .....	33
5.1	Zucht der Mauslinien und äußere Beobachtung der Tiere.....	33
5.2	Histologie.....	38
5.3	Immunhistochemie .....	40
5.4	Semiquantitative RT-PCR .....	42
5.5	Western Blot.....	44
5.6	DNA-Chip Analyse.....	47
5.7	Northern Blot .....	47
5.8	Real-Time PCR .....	50
5.9	Datenauswertung und –verarbeitung.....	50
6	Ergebnisse .....	52
6.1	Zucht der gehirnspezifischen Txnrd1-Knockout Mäuse.....	52
6.2	Äußeres Erscheinungsbild der gehirnspezifischen Txnrd1-Knockout Mäuse ....	52
6.3	Histologische Analyse der gehirnspezifischen Txnrd1-Knockout Mäuse .....	54

---

6.4	Immunhistochemische Untersuchung der gehirnspezifischen Txnrd1- Knockout Mäuse.....	66
6.5	Semiquantitative RT-PCR .....	78
6.6	Western Blot.....	79
6.7	DNA-Chip Analyse und Northern Blot.....	80
6.8	Real-Time PCR .....	82
7	Diskussion .....	84
7.1	Reduziertes Körpergewicht im Txnrd1-Knockout Mausmodell .....	84
7.2	Histologische Befunde .....	85
7.3	Fehlen von histopathologischen Veränderungen im Großhirn der Txnrd1-Knockout Mäuse.....	89
7.4	Störungen des Zellzyklus .....	90
7.5	Molekularbiologische Ergebnisse .....	92
7.6	Ausblick .....	93
8	Zusammenfassung .....	94
9	Summary .....	96
10	Abkürzungsverzeichnis.....	98
11	Literaturverzeichnis .....	101
12	Danksagung .....	124
13	Lebenslauf.....	126

## 2 Einleitung

### 2.1 Selen und Selenoproteine

#### 2.1.1 Selen

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der Bedeutung des Enzyms Thioredoxin Reduktase 1 für die Gehirnentwicklung. Da Thioredoxin Reduktase 1 zu den Selenoproteinen gehört, soll hier zunächst allgemein auf die Eigenschaften von Selen sowie seinen Einfluss auf menschliche und tierische Gesundheit eingegangen werden.

Im Jahr 1817 entdeckte der schwedische Chemiker Jöns Jacob Berzelius das Spurenelement Selen und benannte es nach der griechischen Göttin des Mondes. Seit Mitte der 1930er Jahre galt Selen als toxisches Element. Erst 1957 wurde Selen überraschenderweise in den Versuchen von Schwarz und Foltz (Schwarz 1958) als essentielles Spurenelement identifiziert. Sie stellten fest, dass Selen das Wirkprinzip der Bierhefe war, die zum Schutz gegen Lebernekrose in Vitamin E- defizienten Laborratten eingesetzt wurde. Selen kommt sowohl in pflanzlicher als auch in tierischer Nahrung vor, wobei der Selengehalt des Bodens für den Selengehalt in der Nahrungskette ausschlaggebend ist. Die Böden Mitteleuropas sind in der Mehrzahl als eher selenarm einzustufen. Selenmangel (unterhalb 0,2 mg/kg Futter-Trockensubstanz; Kamphues 1999) führt bei den Haustieren zu verschiedenen Krankheitsbildern. Typische Ausfallerscheinungen sind Muskel- und Leberdystrophie. Bei den Muskeldystrophien handelt es sich um eine hyalin-schollige (Zenkersche) Degeneration, die im Herzen (Maulbeerherz-Krankheit) und in anderen Muskelgruppen (*White muscle disease*) als aufgehellte Streifen in Erscheinung treten (Dahme, E. 1999). Bei Küken kommt es in Mangelsituationen zur exsudativen Diathese und Pankreasdegeneration, wobei der Schweregrad der Erscheinungen auch von der Versorgung mit Vitamin E abhängig ist (Van Metre 2001). Da die Wichtigkeit von Selen in der heutigen Zeit bekannt ist, kommt es bei Haustieren selten zur Selenmangel, da die kommerziell erhältlichen Futtermittel mit Selen versehen sind. Bei der ausschließlichen Weidehaltung von Tieren kann es jedoch von Bedeutung sein. Bei Menschen zeigt sich der extreme Selenmangel (weniger als 10 µg/Tag; Oster 1992) in Form der „*Keshan Disease*“, genannt nach der Provinz „Keshan“ in China mit niedrigem Selengehalt im Boden (Li 1985). Hier kommt es zur

multifokalen Myocarditis, wobei die Krankheit sich nicht in allen Fällen durch Selen-Supplementierung verhindern ließ. Als weiterer pathogenetischer Faktor wird eine Infektion mit kardiotropen Coxsackieviren diskutiert. Eine andere Auswirkung von Selenmangel beim Menschen hat sich in der „Kashin-Beck“-Erkrankung gezeigt: Myositis, Makrozytose und Osteoarthropathie sind die Symptome. Dabei ist diese Erkrankung im Gegensatz zur „Keshan Disease“ mit Selen therapierbar. Man geht aber davon aus, dass sie nicht nur durch Selenmangel zustande kommt, sondern auch durch gleichzeitigen Jodmangel (Vanderpas 1990). Selenverbindungen werden im allgemeinen gut resorbiert und sind im Überschuss toxisch. Chronische Vergiftungen treten bei den Haustieren ab etwa 3-5 mg Selen/kg Futter-Trockensubstanz als „Alkali Disease“, in Form von Symptomen des „Blind-Stagger“-Typs oder als Kachexie mit Nieren- und Leberschäden auf. Toxische Auswirkungen beim Menschen (mehr als 450 µg Selen/Tag) zeigen sich als Verlust der Nägel, Haare und als Dermatitis (Vinceti 2001). Ein möglicher Toxizitätsmechanismus von Selen besteht in der Möglichkeit, Selen in Aminosäuren unspezifisch gegen Schwefel auszutauschen. Durch den Austausch entstehen Proteine mit geänderten Eigenschaften, sowie als Metaboliten Selenomethionin und Selenocystein, die beide toxisch sind. Die Magen- und Darmschleimhäute werden gereizt, es tritt Hepatose bis zum Leberkoma auf.

Selen ist am besten für seine Eigenschaft als Antioxidanz bekannt (Rotruck 1973, Burk 2002), weil es in diversen antioxidativ wirkenden Enzymen in Form der Aminosäure Selenocystein enthalten ist (Flohe 1973, Brigelius-Flohe 2002). Es trägt somit zur Verringerung der Peroxidation von Molekülen bei. Das Spurenelement besitzt aber auch andere wichtige Aufgaben: z.B. ist es ein Teil der Thyroidhormon-Deiodinasen (s. Tabelle 2.1), die am Metabolismus der Thyreoidhormone beteiligt sind (Kohrle 2005). Damit spielt Selen auch für das Wachstum und den Metabolismus eine wichtige Rolle.

Ausserdem hat sich Selen im Bereich der Fertilität als wichtig erwiesen, da es ein Bestandteil der Selenoproteine Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPx oder GPx4), Selenoprotein P und Thioredoxin Reduktase 3 (Txnrd3) ist. Diese Enzyme sind wichtig für die Spermienreifung und –motilität (Foresta 2002, Maiorino 1999, Conrad 2005, Pfeifer 2001, Nishimura 2001, Miranda-Vizuete 2004). Diese kurze Skizzierung von Selen lässt die Breite des Selen-Aufgabenfeldes deutlich werden.

### 2.1.2 Selenoproteine

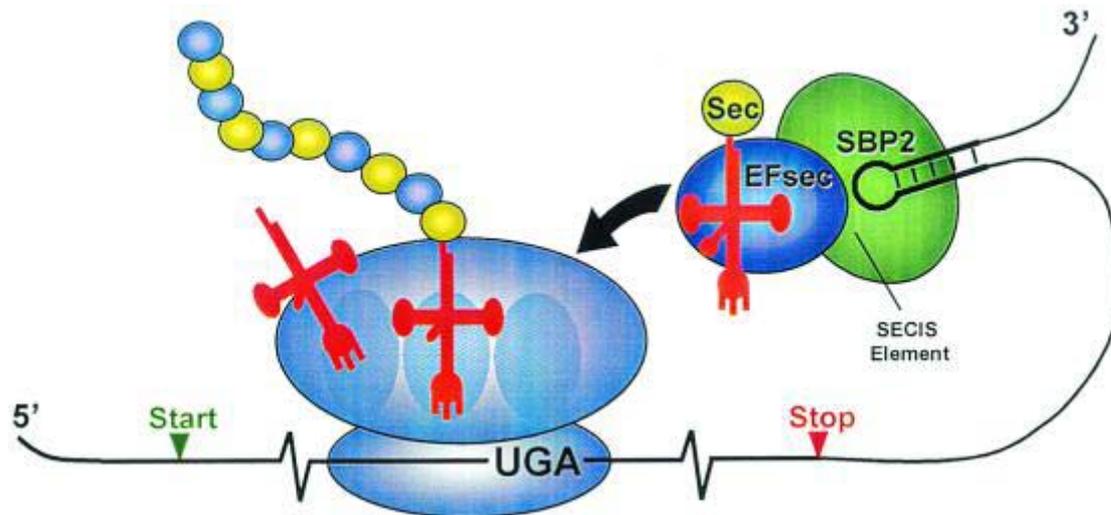
Wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben ist, erfüllt Selen wichtige Funktionen in Form von Selenoproteinen. Im Folgenden soll deshalb die Funktion der einzelnen Selenoproteine näher beleuchtet werden. Im Genom der Maus befinden sich 24 Genorte für Selenoproteine, der Mensch besitzt 25 Genorte. Als Selenoproteine werden nur solche selenhaltigen Proteine bezeichnet, die Selen in Form der 21. Aminosäure Selenocystein (Sec) enthalten, die durch das Nukleotid-Triplett UGA kodiert wird (Hatfield 2002, Stadtman 1996, Bock 1991, Low 1996). Üblicherweise funktioniert das UGA-Codon als ein Stop-Codon, in Selenoprotein-Genen wird es hingegen als Selenocystein-Codon gelesen. In den 3'-untranslatierten Regionen (3'-UTR) der Transkripte von Selenoprotein-Genen befindet sich eine Haarnadelstruktur, „*Selenocysteine insertion sequence*“ (SECIS)-Element genannt. An dieses SECIS-Element bindet ein „*SECIS-binding protein 2*“ (SP2), was dazu führt, dass das UGA-Codon nicht als Stop- sondern als Sec-Codon gelesen wird (Copeland 2003). Die Aminosäure Selenocystein wird gebildet, indem Serin (Ser), das bereits an seine tRNA Ser(Sec) gebunden ist, modifiziert wird. Diese Reaktion ist Adenosintriphosphat (ATP)- abhängig und wird von Selenophosphat Synthetase 2 (SelD2) katalysiert. Die co-translationale Inkorporation von Sec am Ribosom in das Selenoprotein benötigt ausser den o.g. Faktoren noch den Sec-spezifischen Translationsfaktor (EF-Sec). Der normale Elongationsfaktor (EFtu) wird verdrängt und die Bindung von Terminationsfaktoren am UGA-Codon dadurch verhindert. Die Wichtigkeit von Selen wird durch seine Rolle als Bestandteil von diversen Schlüssel-Redoxenzymen deutlich. Da die Selenolgruppe im Gegensatz zur Thiolgruppe bei physiologischem pH-Wert in Selenoproteinen gänzlich ionisiert vorliegt, stellt sie einen höchst effizienten Redox-Katalysator dar (Beckett 2005, Hatfield 2002).

Die Wichtigkeit der Selenoproteine wird in dem Experiment von Bosl 1997 offensichtlich, in dem das Gen für die die tRNA Sec inaktiviert wurde und so embryonale Lethalität durch das Fehlen aller Selenoproteine induziert wurde. Bis jetzt sind über 30 Selenoproteine (s.u.) mit Hilfe von <sup>75</sup>Se- Markierung *in vivo* (Hawkes 1985, Evenson 1988) entdeckt worden, von denen 15 in ihrer biologischen Funktion näher charakterisiert worden sind (Kryukov 2003).

**Tabelle 2.1: Übersicht über bekannte Selenoproteine (Modifiziert nach Brauer 2004)**

Selenoprotein	Gewebeexpression	Funktion	Literatur
Zytosolische Glutathionperoxidase (GPx1)	Ubiquitär	Antioxidanz	Flohe 1973, Rotruck 1973
Gastrointestinale Glutathionperoxidase (GPx2)	Gastrointestinaltrakt, Leber	Antioxidanz	Chu 1993
Plasma Glutathionperoxidase (GPx3)	Plasma, Niere	Antioxidanz	Takahashi 1987
Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathionperoxidase (GPx4, PHGPx)	Ubiquitär ;3 Formen: zytosolisch, mitochondrial, spermienkernspezifisch	Detoxifikation von Lipidhydroperoxiden; Funktionen in der Spermatogenese	Borchert 2003, Pfeifer 2001
Thioredoxin-Reduktase 1 (Txnrd1, TrxR1)	Ubiquitär; zytosolisch	Intrazelluläres Redoxenzym, multiple Funktionen	Tamura 1996, Sun 1999, Zhong 2000
Thioredoxin-Reduktase 2 (Txnrd2, TrxR2)	Ubiquitär; mitochondrial	Mitochondriales Redoxenzym	Gasdaska 1999, Lee 1999
Thioredoxin-Reduktase 3 (Txnrd3, TrxR3)	Vorwiegend im Hodengewebe	Thioredoxin-GSH-Reduktase Aktivität	Watabe 1999
Thyreoidhormon Deiodinase 1 (Dio1)	Hauptsächlich in Schilddrüse, Leber, Niere, Hypophyse	Deiodination (Aktivierung) von T4 zu T3	Arthur 1990, Behne 1984
Thyreoidhormon Deiodinase 2 (Dio2)	Gehirn, braunes Fettgewebe, Hypophyse, Plazenta	Lokale Deiodination von T4 zu T3	Croteau 1996, Salvatore 1996
Thyreoidhormon Deiodinase 3 (Dio3)	Plazenta, Haut	Inaktivierung von aktiven T3 zu T2	Croteau 1996
Selenophosphat-Synthetase 2 (SPS2)	Leber, Hodengewebe	Katalysiert Synthese von Selenophosphat aus Selenit und AMP	Guimaraes 1996
15 kDa Selenoprotein (Sel15)	Gehirn	Unbekannt	Gladyshev 1998
18 kDa Selenoprotein (Sel18)	Verschiedene Gewebe	Unbekannt	Behne 1990

Selenoprotein	Gewebeexpression	Funktion	Literatur
Selenoprotein M (SeIM)	Verschiedene Gewebe	Unbekannt	Korotkov 2002
Selenoprotein N (SeIN)	Skelettmuskulatur, Leber, Gehirn, Herz, Magen	Unbekannt	Lescure 2002
Selenoprotein P (SeIP)	Plasma, Leber	Selentransport, Antioxidanz	Hill 1991
Selenoprotein R (SeIR)	Verschiedene Gewebe, Teil der R-Methionin-Sulfoxid-Reduktase	Reduziert Methioninreste in Proteinen	Kryukov 2002
Selenoprotein W (SeIW)	Gehirn, Milz, Hodengewebe, Skelett- und Herzmuskulatur	Evtl. Antioxidanz. Bindet Glutathion	Watabe 1999
Selenoprotein H	Verschiedene Gewebe	Unbekannt	Kryukov 2003
Selenoprotein O	Verschiedene Gewebe	Unbekannt	Kryukov 2003
Selenoprotein I	Verschiedene Gewebe	Unbekannt	Kryukov 2003
Selenoprotein K	Verschiedene Gewebe	Unbekannt	Kryukov 2003
Selenoprotein S	Verschiedene Gewebe	Unbekannt	Kryukov 2003
Selenoprotein V	Hodengewebe	Unbekannt	Kryukov 2003



**Abbildung 2.1: Insertionsmechanismus von Sec in Eukaryoten (Modifiziert nach Hatfield 2002)**

Bei Selendefizienz wird eine Hierarchie der Expression von Selenoproteinen sowie Effizienzunterschiede in der Synthese von Selenoproteinen in den verschiedenen Geweben offensichtlich. Dabei ist die Menge des Elements unter anderem in Leber, Niere und Skelettmuskulatur substantiell reduziert. Gehirn, endokrine und reproduktive Organe hingegen sprechen kaum auf Veränderungen im Selenstatus an (Behne 1988, Hill 1992), in diesen Organen insbesondere nicht die Aktivität von Thioredoxin Reduktase und Selenoprotein W (Yeh 1997, Whanger 2001). Eine Hierarchie ist auch innerhalb der Selenoproteine vorhanden: bei Selendefizienz ist der Spiegel an GPx1, GPx3 und SelP drastisch reduziert (Brigelius-Flohe 1999), der Spiegel an Thyroidhormon Deiodinase 1 sowie GPx4 hingegen nicht (Bermano 1995). Durch intraperitoneale Verabreichung von  $^{75}\text{Se}$  konnte bei der Beobachtung der Isotopen-Lokalisation festgestellt werden, dass die Ansammlung am höchsten im Cerebellum, am zweithöchsten im Cortexbereich des Großhirns sowie in der Medulla oblongata ist (Prohaska 1976). Die Aktivität der Thioredoxin Reduktase kann mit Ausnahme des Gehirns durch den Selengehalt moduliert werden (Hill 1997). Die Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Spurenelement Selen in Form von Selenoproteinen als Radikalfänger und Komponente des Redoxsystems für die physiologischen Prozesse des ZNS von essentieller Bedeutung ist. Die lokalen Wirkorte und Funktionen des Selens im Gehirn sind jedoch noch nicht genau bekannt.

## 2.2 Das Thioredoxin/Thioredoxin Reduktase- System

Die Thioredoxin Reduktase- Familie wird durch die Anwesenheit von Selenocystein im C-terminalen Bereich charakterisiert. Das System setzt sich aus NADPH als Cofaktor, Thioredoxin (Trx) und Thioredoxin Reduktase (Txnrd) zusammen.

Experimentell kann man keine klare Trennung zwischen den Funktionsweisen von Txnrd und Trx machen, da Trx ein Teil im Substratspektrum von Txnrd ist. Daher soll hier auch auf Trx eingegangen werden.

Trx ist ein kleines (10-12 kDa) ubiquitär vorkommendes Protein aus 104 Aminosäuren mit einer Disulfidbrücke (S-S) und einem konservierten aktiven Zentrum (Trp-Cys-Gly-Pro-Cys) (Nakamura 1997). Bisher sind für Säugetiere zwei Gene für Trx kloniert worden. Trx1 ist hauptsächlich im Zytoplasma und benötigt ein nukleäres Lokalisierungssignal, um in den Kern zu translozieren. Trx2 ist aufgrund eines mitochondrialen Importsignals in den Mitochondrien lokalisiert. Damit gibt es zwei verschiedene Trx-Txnrd-Systeme, über deren Austauschbarkeit noch nichts bekannt ist. Trxne regulieren diverse intrazelluläre redox- abhängige Prozesse, die die Proliferation in normalen sowie in Tumorzellen stimulieren und die in ihrer extrazellulären sezernierten Form Zytokin- ähnliche Effekte haben (Baker 1997, Nishinaka 2002). Für die Regulation von Enzymen und Transkriptionsfaktoren sind die reduzierten Thiol-Gruppen essentiell, die als Elektronen-Donor dienen. Die Reaktionspartner von Trx werden effizient reduziert, die Thiolgruppe des Thioredoxins dabei oxidiert. Durch die Thioredoxin Reduktase wird das entstandene oxidierte Trx unter NADPH-Verbrauch regeneriert, damit es weiterhin seine Rolle als Donor erfüllen kann (siehe Abbildung 2.2). Trx wird in den meisten Zellen des menschlichen Körpers exprimiert. Trx mRNA-Expression, Trx RNA-Stabilität und Proteinmengen werden nicht durch den Selenstatus beeinflusst. Die Wichtigkeit dieses Systems für den Organismus wurde durch das Experiment von Matsui 1996 dargestellt, in dem gezeigt wurde, dass das Entfernen von Txn schon früh, nämlich kurz nach der Implantation, für die embryonale Entwicklung lethal ist. Dies wird mit einer herabgesetzten DNA-Replikation erklärt. Die normale Progression durch den Zellzyklus kann nicht gewährleistet werden, da durch das Fehlen des Txns, das als Kofaktor der Ribonukleotidreduktase agiert, die Produktion der Ribonukleotide nicht funktioniert.

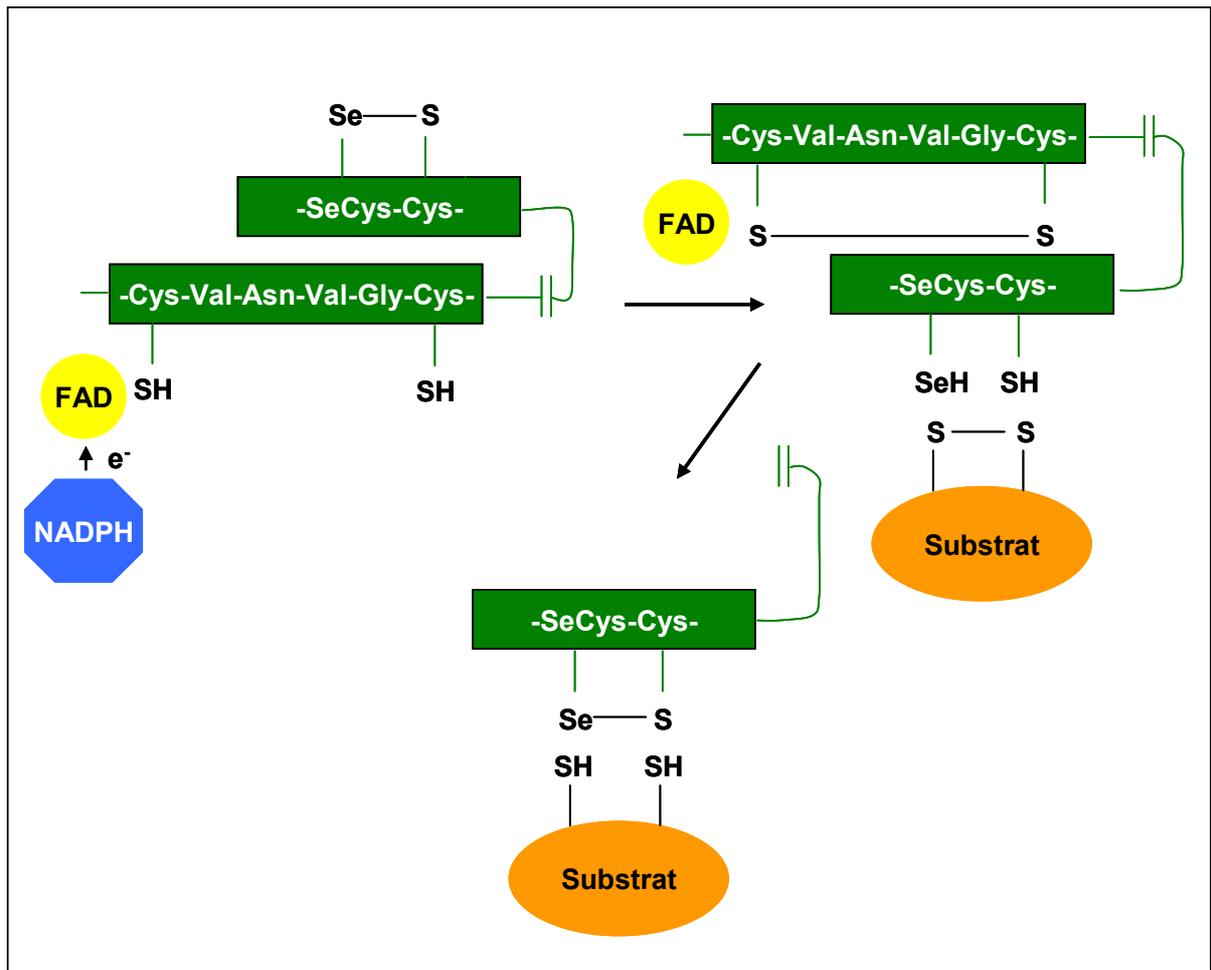


Abbildung 2.2: Reaktionsmechanismus des Thioredoxin Reduktase Systems (modifiziert nach Mustacich 2000)

Txnrd der Säugetiere gehören zur Familie der FAD-haltigen Pyridin-Nukleotid-Oxidoreduktasen, die im gesamten Tierreich vorkommen. Stadtman et al. (1996) zeigten, dass das aus menschlichen Lungenkarzinom-Zellen isolierte Txnrd1 ein Selenoprotein ist. Txnrd sind homodimerische Proteine von 54,5 – 67,5 kDa Masse, in denen jedes Monomer eine FAD-prothetische Gruppe, eine NADPH-Bindestelle und ein N-terminales redoxaktives Zentrum (-Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys-) mit einer Thiol-Gruppe beherbergt (Williams 1995). Ein weiteres redox-aktives Zentrum befindet sich am C-Terminus (-Cys-Sec-). D.h. Txnrd hat zwei redox-aktive Zentren: eins ist homolog mit dem Zentrum von anderen Disulfid-Reduktasen und das am C-Terminus (carboxy-Terminus) lokalisierte mit der Gly-Cys-Sec-Gly- Sequenz (Gladyshev 1996), ist für die katalytische Aktivität des Enzyms von essentieller Bedeutung (Nordberg 1998, Gromer 1998). Elektronen werden von NADPH via FAD

zu diesen aktiven Zentren transportiert, die das Substrat reduzieren (siehe Abbildung 2.2).

Wie aus der Tabelle 2.1 zu entnehmen ist, sind bis jetzt drei Isoenzyme in der Gruppe der Thioredoxin Reduktasen bekannt. Dabei sind die Nukleotidsequenzen von Txnrd1 und Txnrd2 zu 54% homolog und unterscheiden sich v. a. in dem Vorhandensein eines mitochondrialen Importsignals der Txnrd2. Die Nukleotidsequenzen von Txnrd1 und Txnrd3 sind zu 72% identisch. Die zytosolische Txnrd1 ist die am häufigsten vorkommende Txnrd in Zellen der Säugetiere. Das für Txnrd1 kodierende Gen liegt in der Maus auf Chromosom 10 (Kawai 2000). Bisher wurden drei verschiedene Txnrd1-Genprodukte gefunden, die durch alternatives Spleißen aus einer prä-mRNA hervorgehen (Txnrd1 I-III) und alle zytosolisch lokalisiert sind (Sun 2001).

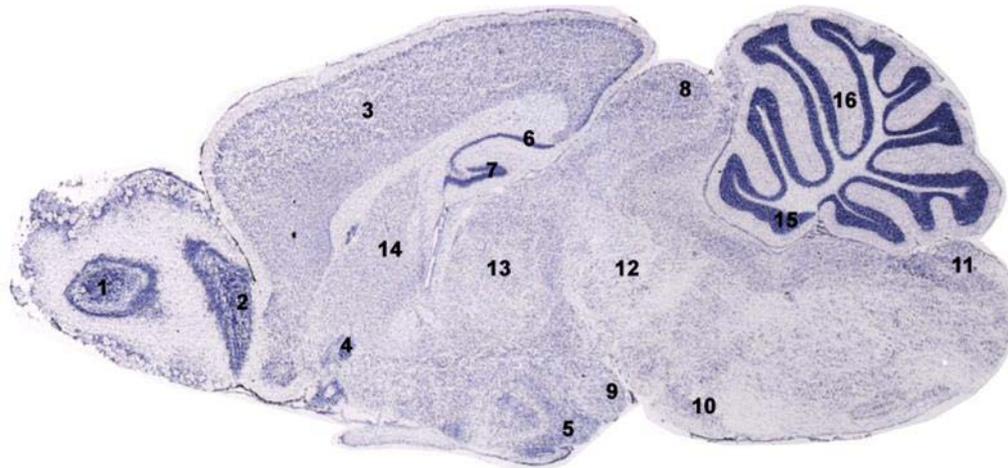
Txnrd der Säugetiere besitzen ein breites Spektrum an Substraten, die vom Enzym reduziert werden, wie z.B. Trx, Vit K, Alloxan, Lipid-Hydroperoxidasen, Dehydroascorbinsäure, Ubichinon, Selenit und Selenodiglutathion (Holmgren 1995, Arner 2000). Das Trx/Txnrd-System wird mit folgenden zellulären Funktionen assoziiert: Elektronendonation für Ribonucleotid Reduktase in der DNA-Synthese (Laurent 1964), Regeneration von Proteinen, die durch oxidativem Stress inaktiviert worden sind (Patel 1996, Moskovitz 2001), Regulation von p53 (Hirota 1997) und Zelldetoxifikation (Chae 1999). Txnrd1 reguliert Gen-Expression durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. NFκB im Kern (Matthews 1992, Hirota 1999), den Glucocorticoid-Rezeptor (Grippio 1983), sowie Modulation von AP-1 (Xanthoudakis 1992). Da das Thioredoxin-System sehr viele Interaktionsstellen mit ROS-Molekülen hat („*Reactive Oxygen Species*“), wird eine Rolle in der Bewältigung von oxidativen Stress angenommen (Spector 1988, Nordberg 2001). Sowohl *in vivo*- als auch *in vitro*-Modelle zeigen eine protektive Rolle von Trx und Txnrd gegen ROS-verursachte Zytotoxizität (Lovell 2000). Die Untersuchung der Rolle von Txnrd1 in Knockout-Mäusen zeigte, dass das Enzym für das Zellwachstum von Wichtigkeit ist (Jakupoglu 2005). Die Txnrd1- defizienten Embryonen überlebten nur bis Embryonaltag 9,5 (E9,5) und zeigten hochgradige Entwicklungsretardation. Die Wichtigkeit des Enzyms wird durch die Tatsache untermauert, dass die Aktivität von Thioredoxin Reduktase 1 im Gehirn sich im Gegensatz zu anderen Selenoproteinen bei Selenmangel nicht verändert (Hill 1997).

Darüber hinaus ist bisher nur wenig über die physiologischen Funktionen von Selenoproteinen im Gehirn sowie über ihre regionale und zelluläre Expression bekannt.

## 2.3 Das Kleinhirn

### 2.3.1 Anatomie, Histologie und Physiologie des Kleinhirns

Das Kleinhirn (Cerebellum) dient als wichtiges Integrationsorgan für die Koordination und Feinabstimmung der Motorik und für die Regulation des Muskeltonus sowie Erhaltung des Gleichgewichtes (Nickel et al. 1991). Bei Kleinhirndefekten kommt es daher oftmals zu unkoordinierten Bewegungsabläufen, Beeinträchtigungen des Gleichgewichtes oder auch zu Störungen der Augenbewegung. Das Kleinhirn ist mit dem Hirnstamm (Pons und Medulla) über Kleinhirnstiele (Pedunculi cerebellares) verbunden. Anatomisch setzt sich das Kleinhirn von Säugetieren aus zwei Hemisphären zusammen, die durch den sogenannten Kleinhirnwurm (Vermis cerebelli) miteinander verbunden sind. Im Sagittalschnitt zeigt sich die Faltung des Kleinhirns in Lappchen (Lobuli), die in blattartigen Windungen (Folia) unterteilt sind und aufgrund der baumartigen Struktur als „Lebensbaum“ (Arbor vitae cerebelli) bezeichnet werden. Larsell (1952) unterscheidet zehn Lobuli in der Vermis hingegen nur acht in den Hemisphären (Eingezeichnete Lobuli in Abbildung 6.10 im Ergebnisteil). Nach Altman und Bayer (1997) werden diese Lobuli im Sagittalschnitt folgendermaßen eingeteilt: anteriorer Lobus (rostral von Fissura prima: Lobulus I-V), zentraler Lobus (zwischen Fissura prima und Fissura secunda: Lobulus VI-VIII), posteriorer Lobus (zwischen Fissura secunda und Fissura posterolaterale, Lobulus IX und Paraflocculus) und inferiorer Lobus (Lobulus X und flocculus).

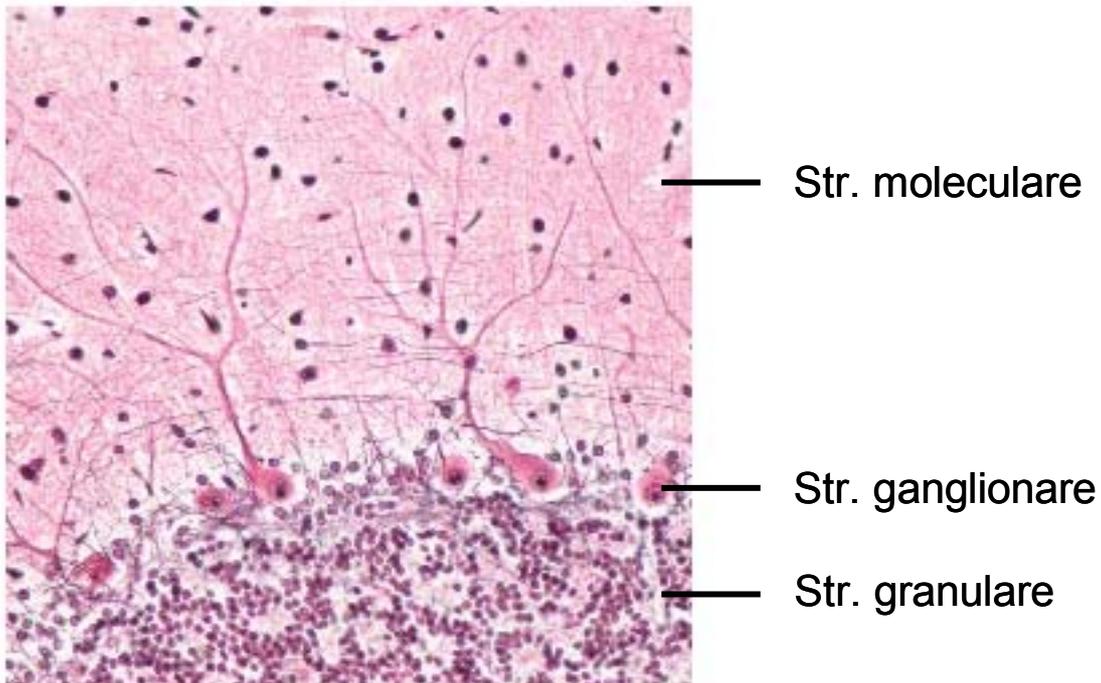


**Abbildung 2.3: Übersicht des Maus-Gehirns, Sagittalschnitt (Modifiziert nach Tennessee Mouse Genome Consortium, <http://www.tnmouse.org/>).**

1, 2: Str. Granulare des Bulbus olfactorius. 3: Cortexschicht I-VI. 4: Calleja-Inseln. 5: Nucleus praemammillarius. 6: Hippocampus. 7: Gyrus dentatus. 8: Colliculus superior. 9: Nucleus mammillarius. 10: Nucleus pontinus. 11: Nucleus cuneatus. 12: Tiefer mesencephalischer Nucleus. 13: Thalamus. 14: Nucleus caudatus. 15: IGL. 16: EGL.

Die furchenreiche Oberfläche des Kleinhirns überzieht mit einer dünnen, grauen Rindenschicht (Cortex cerebelli) den Markkörper (Corpus medullare) sowie drei paarige tiefe Kerne: den Nucleus fastigii, den Nucleus interpositus und den Nucleus dentatus. Der cerebelläre Output erfolgt im Wesentlichen über diese drei Kerne. Sie sind wichtig für Kopf- und Nackenkontrolle, Aufrechterhaltung der Körperstatik und des Skelettmuskeltonus sowie für die Ausführung und Korrektur motorischer Aktionen. Die einzige Ausnahme stellt der Lobus flocculonodularis dar, der direkt auf die vestibulären Kerne der Medulla oblongata projiziert und für das Gleichgewicht während des Stehens und Gehens sowie die Koordination von Kopf- und Augenbewegungen sorgt. Der Kleinhirncortex der Säugetiere verfügt über eine geringe Anzahl von Neuronentypen, die eine regelmäßige Anordnung aufweisen. Mikroskopisch lassen sich von außen nach innen drei Schichten unterscheiden:

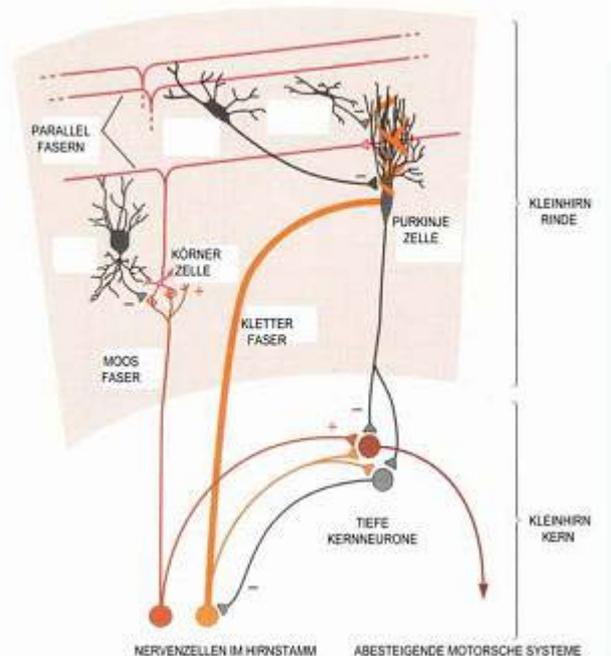
- Molekularschicht (Stratum moleculare)
- Purkinje-Zellschicht (Stratum ganglionare)
- Körnerzellschicht (Stratum granulare)



**Abbildung 2.4: Schichten des Kleinhirns (Cerebellum Ratte, Bodian-Färbung; Modifiziert nach <http://www.anatomie.net/histoweatlas>)**

In der zellarmen Molekularschicht befinden sich vorwiegend die marklosen Parallelfasern der Körnerzellen, die entlang der Längsachse der Folia verlaufen sowie die weit verzweigten Dendritenbäume der birnenförmigen Purkinje-Zellen, deren Zellkörper im reifen Kleinhirn die einreihige Purkinje-Zellschicht bilden (Voogd, Glickstein 1998). Die Parallelfasern bilden erregende (exzitatorische) Synapsen mit den dendritischen Ausläufern (Spines) der Purkinje-Zellen. Zwei andere Zelltypen sind zusätzlich in der Molekularschicht aufzufinden: die Stern- und Korbzellen. Sie sind Interneurone mit inhibitorischer Wirkung auf die Purkinje-Zellen, die im Schaltkreis des Kleinhirns eine wichtige Rolle spielen. Nur Purkinje-Zellen senden mit ihren Axonen Ausgangssignale (Efferenzen) aus der Kleinhirnrinde, in dem sie in Verbindung mit cerebellären Nuclei und mit einigen Nuclei des Hirnstammes stehen. Eingangssignale (Afferenzen) aus anderen Hirnarealen erreichen die Kleinhirnrinde im Wesentlichen über zwei exzitatorische Fasertrakte, die Kletter- und die Moosfasern. Die Kletterfasern erregen die Purkinje-Zellen am Zellkörper und an den Stammdendriten. Sie entspringen in der unteren Olive in der Medulla oblongata, welche ihrerseits Eingänge aus dem Rückenmark und der Großhirnrinde erhält. Die aus dem Hirnstamm und Rückenmark entspringenden Moosfasern hingegen bilden exzitatorische Synapsen mit den Körnerzellendendriten. Die Körnerzellen sind kleine

und zahlreiche zytoplasmaarme Zellen, deren Axone in Richtung der Molekularschicht ziehen, in der sie sich T-förmig teilen, um dabei mit Purkinje-Zell Dendriten und Interneuronen Kontakt aufzunehmen. Auf der Grenze zur Molekularschicht liegen die Golgi-Zellen, die als inhibitorische Schaltneurone funktionieren, indem sie die Körnerzellen hemmen. Die Kletter- und Moosfasern geben auf ihrem Weg in die Kleinhirnrinde zahlreiche Axonkollaterale an die Neurone der tiefen Kleinhirnkern ab, die so einerseits direkt erregt werden und andererseits durch die Axon-Terminale der Purkinje-Zellen gehemmt werden. Die exzitatorische Wirkung der afferenten Fasern der Kleinhirnrinde wird so in eine Hemmung umgewandelt, und eine inhibitorische Wirkung auf die Purkinje-Zell-Aktivität führt zu erhöhter Aktivität in den tiefen Kleinhirnkernen. Neben den ubiquitären Glia-Zelltypen besitzt die Kleinhirnrinde einen Sondertyp der Astroglia, die Bergmann Gliazellen. Ihre Zellkörper liegen direkt an den Zellkörpern der Purkinje-Zellen. Mit mehreren langen Ausläufern durchspannen sie die Molekularschicht und bilden mit ihren Endfüßen die Gliagrenzmembran. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Kleinhirns (siehe unten).



**Abbildung 2.5: Verschaltung der Neurone im Kleinhirn (modifiziert nach Kandel 2000)**

Trotz des lateinischen Namens „Cerebellum“ – „kleines Gehirn“ beherbergt das reife Kleinhirn mehr als die Hälfte aller Neurone des Nervensystems. Daher ist es keine Überraschung, dass das Kleinhirn eine zentrale Rolle für das Säugetier in der Auseinandersetzung mit der Umwelt spielt. Obwohl das Kleinhirn eine der ersten ZNS-Strukturen ist, die sich differenziert, erreicht es in der Maus erst ca. einen Monat nach der Geburt seine reife Konfiguration. Diese lange Entwicklungsperiode macht diese Struktur daher so empfänglich für Abweichungen in der Entwicklung. Gleichzeitig stellt der durchgehende regelmäßige histologische Aufbau, sowie die geringe Anzahl verschiedener Neuronentypen ein geeignetes System für die Erforschung bestimmter Gene und ihren Einfluss auf die zellulären und molekularen Mechanismen der neuronalen Migration (Komuro 1995) dar. So ist das Kleinhirn zu einem der am besten untersuchten Gebiete des Zentralnervensystems geworden (Millen 1994).

### 2.3.2 Entstehung der Zytoarchitektur

Die Ausführungen zur Histogenese sollen nur soweit umrissen werden, als sie dem Vergleich der normalen Histogenese mit den Veränderungen des *Txnrd1*-Knockouts dienen.

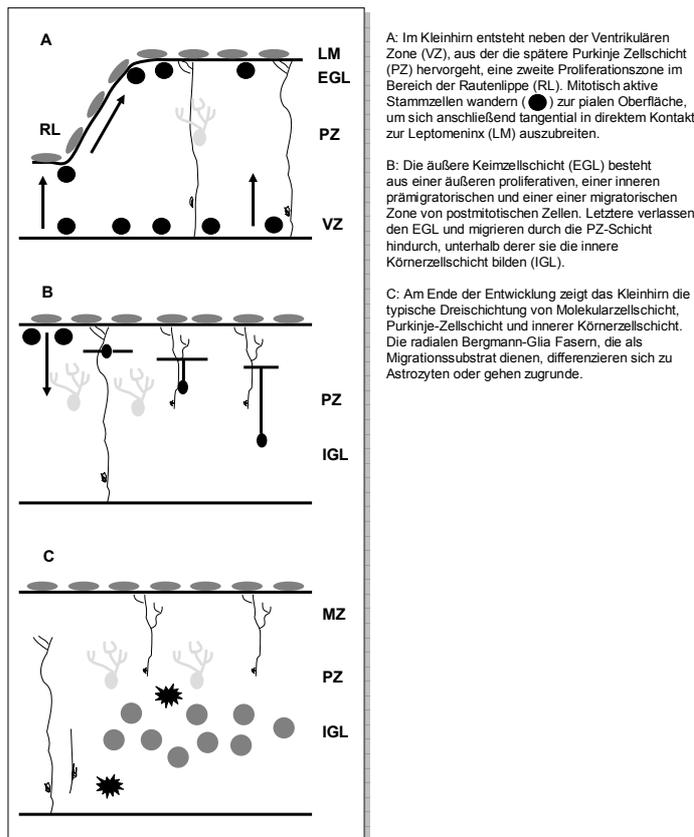
Obwohl das Kleinhirn als eine der ersten Strukturen aus dem sich entwickelnden Gehirn entsteht, erreicht es in der Maus seine reife Form erst nach der dritten postnatalen Woche. Die Migration der Neuronen ist das Resultat aus multiplen molekularen Ereignissen, die sich im Ablauf verschiedener molekularer Ereignisketten unterscheiden, wie z.B. Bildung von adhäsiven Interaktionen, Aktivierung von spezifischen Ionenkanälen und deren Rezeptoren sowie Zusammenbau und Fragmentierung des Zytoskeletts (Hatten 1995, Komuro 1998, Rakic 1994, Rakic 1995).

Das Kleinhirn entsteht aus dem Rhombencephalon des dreiblasigen Stadiums der Gehirnentwicklung (Schnorr 1996). Das Rhombencephalon teilt sich am Embryonaltag 9 (E9) (Hatten 1995) in das Met- und das Myelencephalon auf, wobei letzteres sich im dorsalen Bereich zum Kleinhirn weiter differenziert. Dieser dorsale Bereich bildet lateral die Rautenlippen „rhombic lips“ (= Neuroepithel), die sich in der Mitte zur Kleinhirnplatte vereinen, aus der seitlich die Hemisphären und zentral der Wurm (Vermis) hervorgehen. Die laterale Lage der Rautenlippen resultiert aus dem

unvollständigen Schluss des Neuralrohres im Zusammenhang mit dessen Abbiegen um den Kleinhirnbrückenwinkel (Alder, 1996). Somit entsteht eine Öffnung und die Zellen, die ursprünglich in der dorsalen Mittellinie lokalisiert waren, verlagern sich nach lateral. Die cerebelläre Anlage ist im anterioren Bereich vom Isthmus und im posterioren Bereich vom Plexus chorioideus flankiert (Goldowitz, 1998). Die Kleinhirnmatrix besteht anfänglich aus einer ventrikulären neuroepithelialen Zone und aus einem mehr caudal gelegenen Trigonum germinativum (Keimbereich), das anterior vor dem Plexus chorioideus liegt. Das Kleinhirn ist insofern eine außergewöhnliche Struktur, als die neuronalen Populationen zwei verschiedenen germinativen Zonen entstammen. Die Vorläuferzellen der tiefen Nuclei werden in dem Trigonum germinativum zuerst generiert (Altman 1997). Danach folgen die Vorläuferzellen der „EGL“ (*External Germinal Layer*) um den Zeitpunkt E10-12, aus dem nur eine Sorte von Neuronen entsteht: die Körnerzellen (Hallonet 1990). Erst später (E11-13) verlassen die Purkinje-Zellen diesen Bereich und siedeln sich entlang des Bergmann Glia-Systems in einem breitem Band unter den postmitotischen Vorläuferzellen der EGL an (Misson 1988), wo sie vorerst bis nach der Geburt bleiben. Die Bergmann Glia entsteht zum einen aus Vorläuferzellen der ventrikulären Zone (Rakic 1971), zum anderen aus Derivaten der EGL (Sievers 1994).

Die Vorläuferzellen der EGL wandern über die cerebelläre Oberfläche und bilden den oben genannten zweiten Keimbereich (Miale 1961). Nach der Geburt expandiert diese Zone, ausgehend von einer einlagigen Schicht, zu einer Schicht aus 8 Zelllagen (Fujita 1966). Während dieser Zeit entstehen die Golgi-Zellen im sich verkleinernden ventrikulären Neuroepithel. Durch eine massive Mitoseaktivität in der äußeren EGL, die bis P21 stattfindet, kommt es zur Expansion der Oberfläche des Kleinhirns, welche sich dadurch faltet. Die Körnerzellen sind die am häufigsten vorkommenden Neuronen im Kleinhirn und es wird vermutet, dass die Kinetik ihrer Entstehung eine entscheidende Rolle bei der Größenentwicklung und bei der Furchung spielt (Yang 1996, Millen 1995, Millen 1994, Huard 1999). Weiterhin nimmt man an, dass die Purkinje-Zellen sich durch diese Ausdehnung der Kleinhirnoberfläche nicht mehr in einem Multi- sondern in einem Monolayer anordnen. Die postmitotischen (innerer Teil der EGL) Körnerzellen der EGL wandern mit Hilfe der Bergmann Glia radial nach innen an den Purkinje-Zellen vorbei in den darunter liegenden Kleinhirncortex ein, so dass sich eine innere Körnerzellschicht

(IGL/ *Inner Granular Layer*) formiert. Gleichzeitig entstehen auch die Korb- und Sternzellen und lagern sich in der ventrikulären Zone ab (Zhang 1996). Später besiedeln sie das Str. molekulare. Nach der dritten postnatalen Woche ist die Proliferation aller Vorläufer der Körnerzellen abgeschlossen und durch die nach innen gerichtete Migration verschwindet die EGL, wird durch das Str. molekulare ersetzt und es entsteht aus der IGL das Str. granulare.



**Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Entwicklung der Kleinhirnanlage**

### 2.3.3 Genetische Regulation

Mit der Analyse von natürlich vorkommenden sowie induzierten Mutationen ist das Verständnis für die Gene und ihre Funktion in der Kleinhirnentwicklung gewachsen. In der Abbildung 2.7 werden einige wichtige Gene in Zusammenhang mit der Entwicklung des Kleinhirns gezeigt. In der Diskussion wird näher auf einige der Gene sowie die dazu gehörigen Knockout-Modelle eingegangen.

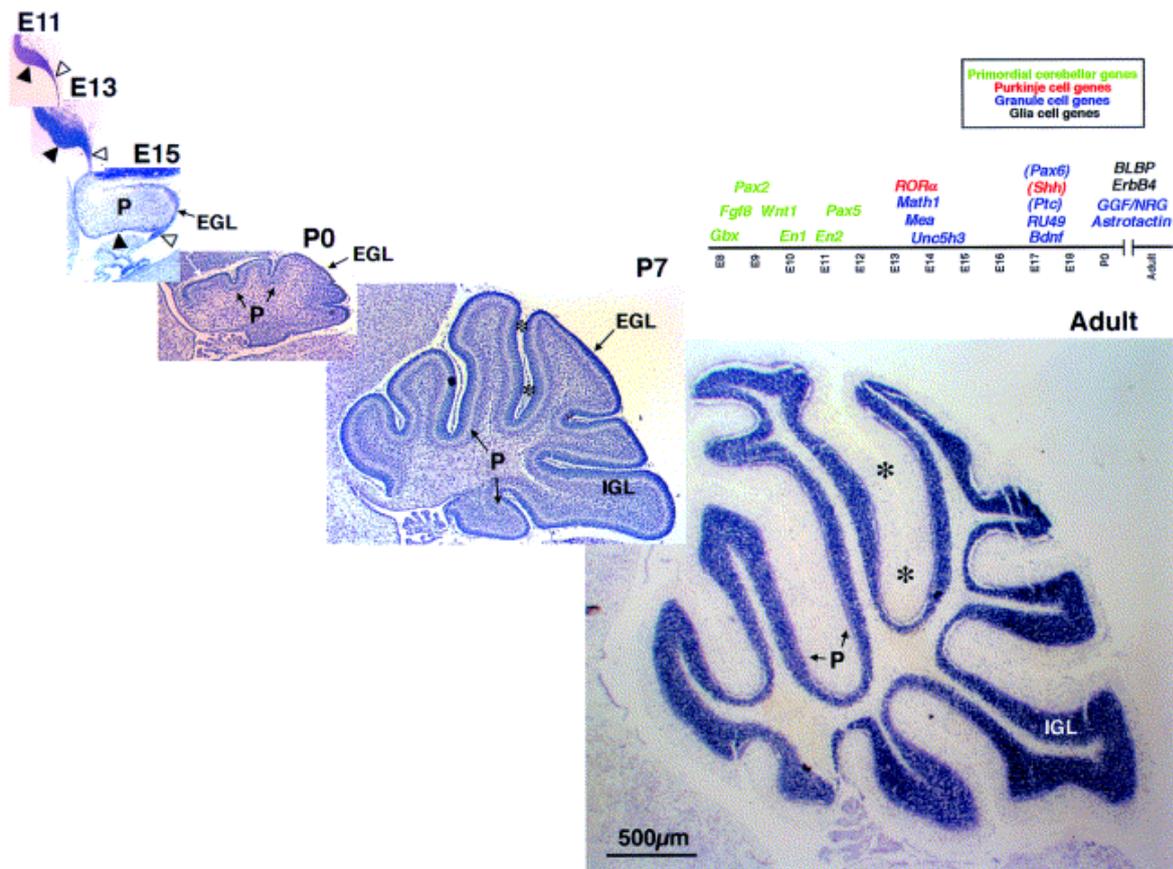


Abbildung 2.7: Übersicht über Entwicklung des Kleinhirns und dafür verantwortliche Gene (Modifiziert nach Goldowitz 1998)

## 2.4 Das Knockout- Modell

### 2.4.1 Cre/lox-Technologie

Das Ausschalten eines Gens in sämtlichen Geweben, um seine Bedeutung untersuchen zu können, geht oft mit frühem embryonalem Tod einher. Damit lässt sich seine Funktion im adulten Tier nicht untersuchen und für biochemische Analysen im Embryo steht wenig Gewebematerial zur Verfügung. Um dies zu umgehen, wird die Methode des Ausschaltens eines Gens in einem bestimmten Gewebe zu einem bestimmten Zeitpunkt genutzt. Diese Methode nennt man konditionalen Knockout. Die inzwischen gut etablierte Cre/loxP-Technologie ist eine Möglichkeit konditionale Mutationen zu erzeugen, indem das Enzym Cre-Rekombinase durch einen Promotor der Wahl zell- oder gewebespezifisch exprimiert wird, um so die Erforschung der gewebespezifischen Aufgabe eines Genprodukts zu ermöglichen (Sternberg 1981, Abremski 1981, Sauer 1988). Die Problematik der frühen Lethalität und die daraus

entstehenden Untersuchungsschwierigkeiten entstand auch bei den Txnrd1-defizienten Embryonen, die mit einer deleter-Cre transgenen Maus generiert wurden, da deleter-Cre für die Ausschaltung des von Txnrd1 in allen Geweben sorgte (Jakupoglu 2005). Durch das Fehlen von Txnrd1 in sämtlichen Geweben blieb die Embryonalentwicklung bis E8,5 normal, ab E9,5 kam es jedoch zu embryonaler Lethalität. Die Tiere zeigten eine hochgradige Entwicklungsretardation, da der Neuralrohrschluss am kranialen Pol nicht vollzogen wurde und man keine eindeutige Einteilung der embryonalen Körperachse in Kopf, Rumpf und Schwanz erkennen konnte. Die Organogenese war gestört wie z.B. durch das Fehlen von Somiten und eine Missbildung am kaudalen Körperende. Die bereits beschriebene Tatsache, dass der Selengehalt im Gehirn bei Selenmangel kaum absinkt und die Thioredoxin Reduktase 1- Aktivität nicht sinkt, legt die Vermutung nahe, dass Thioredoxin Reduktase 1 eine essentielle Rolle in der Gehirnentwicklung haben könnte. Daher fiel für eine postnatale Untersuchung des Knockout-Tieres die Wahl auf die Etablierung eines gehirnspezifischen Txnrd1-Knockout Tieres.

Durch *Gene-Targeting* wurde ein essentieller Teil des Txnrd1-Gens mit zwei Cre-Erkennungssequenzen (loxP-site) flankiert. Man nennt ein solches Allel auch „gefloxtes“ Allel vom englischen „*flanked by loxP sites*“. Wenn diese Tiere zusätzlich für eine zellspezifisch exprimierte Cre-Rekombinase transgen sind, wird das Gen in der spezifischen Zelllinie einen Knockout darstellen (Tsien 1996), außerhalb der spezifischen Zelllinie hingegen funktionsfähig sein.

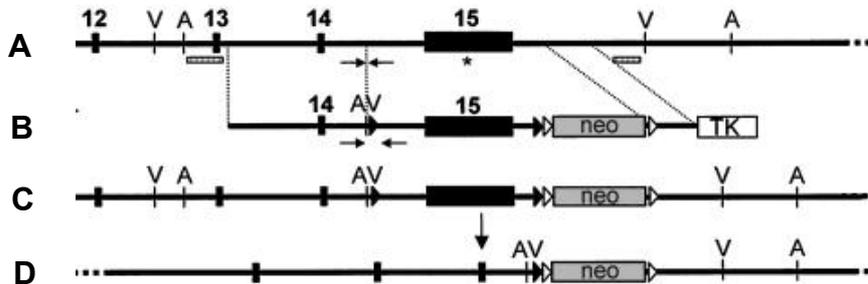
Das Enzym Cre-Rekombinase („*causes recombination*“; 38 kDa), das aus dem Bakteriophagen P1 (Austin 1981) stammt, katalysiert dabei effizient die intramolekulare Rekombination der „loxP-sites“ („*locus of crossing over [x] of P1 recombinase*“; 34 bp lang). Wenn beide loxP-Sites die gleiche 5'-3'- Orientierung in einer cis-Lokalisation haben, wird durch Aktivität der Cre-Rekombinase das dazwischen liegende Stück DNA deletiert.

#### 2.4.2 *Gene Targeting*-Strategie für das Txnrd1 Gen

Bei der Generierung des konditionalen *Gene-Targeting*-Konstruktes für Thioredoxin Reduktase1 wurde zunächst der zu inaktivierende DNA-Abschnitt der Txnrd1 mit Hilfe eines *Gene targeting* Vektors in ES-Zellen von loxP-Erkennungssequenzen flankiert („gefloxte“). Als Zwischenprodukt erhält man einen „gefloxten“ Genlokus.

In einem zweiten Schritt wird die „gefloxte“ Mauslinie mit Cre-Rekombinase transgenen Tieren verpaart (Gu 1994). Die Nachkommen dieser Kreuzung inaktivieren das zu untersuchende Gen in Abhängigkeit von der gewebespezifischen Expression der Cre-Rekombinase. Die in dieser Arbeit zu analysierenden, konditionale Txnrd1-Knockout- Maus wurde von Cemile Jakupoglu 2003 (Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät LMU München 2003) etabliert.

Das Gen für Thioredoxin Reduktase 1 besteht aus 15 Exons (MGI ID:1354175; <http://www.informatics.jax.org/>). Exon 15 besteht aus einem Protein-kodierenden Teil sowie aus einem nicht-kodierenden Teil. Im kodierenden Bereich ist das UGA-Triplett zu finden, das für Selenocystein kodiert und für die Funktion des Gens essentiell ist. Der nicht-kodierenden Teil enthält das SECIS-Element und das poly-A-Signal für Terminierung der Transkription. Zusätzlich befinden sich dort auch RNA-Elemente mit regulatorischer Funktion, die für die Stabilität der Txnrd1-mRNA von Bedeutung sind (Gasdaska 1999). Da Exon 15 ein funktionell für Thioredoxin Reduktase 1 wichtiger Genbereich ist, wurde es durch die bereits oben beschriebene Strategie ausgeschaltet.



**Abbildung 2.8: Txnrd1 Targeting Strategie (modifiziert nach Jakupoglu 2005)**

Schematische Darstellung des murinen Txnrd1 Gens (nur Exon 12 bis 15). (A) WT Allel. (B) Targeting Konstrukt. (C) gefloxtes Allel. (D) Knockout Allel. Exon 15 beherbergt das Condon UGA für Secys (Stern), das SECIS Element, AU-reiche Elemente und das Terminierungssignal für die Transkription. LoxP-Stellen (ausgefüllte Dreiecke) umgeben Exon 15, Frt-Stellen umgeben die Neomycin-Kassette (weiße Dreiecke). TK, Thymidinkinase.

### 2.4.3 Nestin als Promotor

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse einer konditionalen Mutante, bei der das Cre-Gen unter die Kontrolle des Promotors des Nestin-Gens gestellt wurde. Zusätzlich wurde der im zweiten Intron befindliche, für das Nervensystem spezifische Enhancer benutzt (Tronche 1999). Nestin ist ein Intermediärfilament-

Protein, welches bei der Maus in der Embryonalentwicklung ab dem 9. Tag in neuronalen, glialen und muskulären Vorläuferzellen exprimiert wird. Der Enhancer im zweiten Intron des Nestin-Gens ist nur in Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) aktiv (Zimmerman 1994). Die Nestin Expression wird dabei beim Übergang von proliferierenden Stammzellen zu postmitotischen Neuronen herunter reguliert. In pathologischen Situationen wie z.B. in einer Glia-Narbe nach einer ZNS-Läsion wird Nestin reinduziert werden. Seine genaue Rolle ist noch nicht bekannt, eine Funktion in der Regulation des Zusammen- und Abbaus von Intermediärfilamenten wird jedoch angenommen (Michalczyk 2005). Graus-Porta et al. haben im Jahr 2001 die Nestin-Cre Maus mit Hilfe von LacZ *in vivo* und *in vitro* charakterisiert: in den frühen embryonalen Stadien (E10,5) zeigte das gesamte Neuralrohr Nestin-abhängige Färbung. Im Stadium E12,5 war in sagittalen Gehirnschnitten Expression in der kortikalen Wand des Cerebrums und in den ventrikulären Neuroepithelien zu sehen, wobei Blutgefäße und Meningen negativ waren. Das gleiche Muster, das heißt Nestin-Positivität sowohl in Glia als auch in Neuronen, wurde auch im Zeitraum zwischen E15,5 und P7 im Cerebellum gesehen. Dabei war in den in-Situ Hybridisierungsexperimenten von Dahlstrand 1995 das Signal im Cerebellum viel stärker als im Cerebrum. Ähnliche Ergebnisse hat Yang 1997 in seinen Expressionsuntersuchungen erzielt: die höchste Expression von Nestin fand er in der Maus am Tag E14 im Cerebrum und P5 in Cerebellum. Zimmerman (1994) hat diese Expression in Cerebellum genauer beschrieben, und zwar sah er die Nestin-Expression im EGL des sich noch postnatal entwickelnden Kleinhirns. Da eine mitotische Aktivität im Cerebrum von radialer – und von Bergmann Glia im Cerebellum besteht (Misson 1988, Sotelo 1994, Gaiano 2002), werden die Glia-Zellen als Teil der ZNS-Vorläufer Population vorgeschlagen (McKay 1989, Noctor 2001, Doetsch 1999). Die sehr effiziente Wirkung sowie die Beschränkung der Cre-Rekombinase Aktivität des Nestin-Cre-transgenen Mausstammes auf das Nervensystem gilt als erwiesen (Knoepfler 2002). Dadurch ist es möglich, die Funktion von Txnrd1 in der Gehirnentwicklung zu studieren. Da Nestin in proliferierenden Stammzellen exprimiert wird, das heißt zu einem frühen Zeitpunkt der Gehirnentwicklung und weil Stammzellen Vorgänger aller Neuronen sind, wird es von großem Interesse sein, mit Hilfe der Cre/Lox-Technologie durch die die Nestin-Aktivität an Thioredoxin Reduktase1 gekoppelt wird, zu untersuchen, ob Thioredoxin Reduktase 1 in allen Zelltypen im gesamten ZNS die gleiche Rolle spielt.

### **3 Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Grundlage dieser Arbeit bildet das von Cemile Jakupoglu (Jakupoglu 2003) etablierte Knockout Mausmodell für das Selenoprotein Thioredoxin Reduktase1 (Txnrd1). Die Tatsache, dass die Aktivität des Enzyms bei Selenmangel nicht absinkt, hatte vermuten lassen, dass dieses Enzym eine zentrale Rolle im Gehirn spielt. Dies wurde durch eine phänotypische Anomalie der Kleinhirn-Entwicklung in den Knockout-Tieren bestätigt. Die Inaktivierung von Txnrd1 mit Hilfe von Nestin-Cre in neuronalen Vorläuferzellen und deren Folgen auf die Gehirnentwicklung sowie die Mechanismen der Fehlentwicklung des Kleinhirns sollten in dieser Arbeit durch Analysen zu embryologischen und postnatalen Zeitpunkten erarbeitet werden. Ob der Phänotyp der Knockout-Tiere durch ein allgemeines dysmorpho-genetisches Prinzip entsteht oder durch Funktionsverlust nur bestimmter Zellsorten wird ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit sein.

## 4 Material

### 4.1 Chemikalien

Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ampuwa	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Borsäure	Carl Roth + Co KG, Karlsruhe
Chloroform p.a.	NeoLab GmbH, Heidelberg
dNTP-Mix	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Diethylether	Merck KGaA, Darmstadt
DNA-Größenstandard, 100 bp	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DNA-6x-Ladepuffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol p. a.	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
EDTA	Carl Roth + Co KG, Karlsruhe
Isopropanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl	Carl Roth + Co KG, Karlsruhe
SDS	NeoLab GmbH, Heidelberg
Phenol-Guanidiniumthiocyanat-Lösung	peqlab GmbH, Erlangen
PBS	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
RotiPhenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth + Co KG, Karlsruhe
Tris	Merck KGaA, Darmstadt
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt

### 4.2 Enzyme

Proteinase K	peqLab GmbH, Erlangen
Taq Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### 4.3 Verbrauchsmaterialien und Kits

ApopTag Peroxidase Kit	Chemicon/Millipore, Schwalbach
DNase Kit, M6101	Promega GmbH, Mannheim
PCR Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Reverse Transcription System A3500	Promega GmbH, Mannheim

### 4.4 Desoxy-Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Verwendung
OligoTR1flox1	TCC ACC TCA CAG GAG TGA TCC C	Genotypisierung
OligoTR1floxr1	TGC CTA AAG ATG AAC TCG CAG C	Genotypisierung
OligoCreD	CAC GAC CAA GTG ACA GCA ATG CTG	Genotypisierung
OligoCreE	CAG GTA GTT ATT CGG ATC ATC AGC	Genotypisierung
GAPDH 1	CTC ACT CAA GAT TGT CAG CAA TG	RT-PCR, Northern Blot
GAPDH 2	GAG GGA GAT GCT CAG TGT TGG	RT-PCR, Northern Blot
Txnrd1 59f	CGA AGA CAC AGT GAA GCA TGA CTG GG	RT-PCR
Txnrd1 60r	TCC CCT CCA GGA TGT CAC CGA TGG CG	RT-PCR
Txnrd1 E13f	TTG GCC ATT GGA ATG GAC AGT CC	RT-PCR
Txnrd1 E15r	AGC ACC TTG AAT TGG CGC CTA GG	RT-PCR
Oligo Adcy f1	AGT GGA TGT CAG ACT ACG GCT G	Northern Blot
Oligo Adcy r1	TGC GAG CAC CGA TCA CTC CAG C	Northern Blot
Oligo Agt f1	CTG CCT GGA GTC CAT GAA TTC TG	Northern Blot
Oligo Agt r1	CAC ATC CAG TGC CTC CGG TGA G	Northern Blot
Oligo SelW f1	GTT CGA GTC GTG TAT TGT GGA G	Northern Blot
Oligo SelW r1	CAC AGC CAG AAT CCA TCT CTG G	Northern Blot
Oligo Zic1 f1	CCG CGA TCC GAG CAC TAT GCT G	Northern Blot
Oligo Zic1 r1	CGT GTA GGA CTT ATC GCA CAT C	Northern Blot

#### 4.5 Material für Histologie und Immunhistochemie

ABC-Kit	Vector Labs, Ohio USA
Bovines Serum Albumin	MP Biomedicals, Eschwege
BrdU	MP Biomedicals, Eschwege
Citronensäure	NeoLab GmbH, Heidelberg
DAB-Kit	Vector Labs, Ohio USA
Deckgläser	Carl Roth + Co KG, Karlsruhe
Einbettkassetten	Carl Roth + Co KG, Karlsruhe
Eosin	Carl Roth + Co KG, Karlsruhe
Formaldehyd, 37%	Merck KGaA, Darmstadt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Hämatoxylin	Carl Roth + Co KG, Karlsruhe
Methanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
M.O.M.-Kit	Vector Labs, Ohio USA
Paraffin (ohne DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
PFA	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
RotiHistokit II	Carl Roth + Co KG, Karlsruhe
Superfrost Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Tri-Natriumzitat-Dihydrat	NeoLab GmbH, Heidelberg

## 4.6 Antikörper für Immunohistochemie

**Tabelle 4.1: Primäre Antikörper**

Antikörper	Hersteller	Quelle
<i>Proliferationsmarker</i>		
anti-BrdU (monokl.)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Maus
anti-PCNA (monokl.)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg	Maus
anti-PH3 (polykl.)	Cell signaling, Neb GmbH, Frankfurt a. M.	Kaninchen
<i>Zellzyklusmarker</i>		
anti-Cyclin D2 (polykl.)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg	Kaninchen
anti-p21 (polykl.)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg	Kaninchen
<i>Zellspezifische Marker</i>		
anti-Calbindin (polykl.)	Chemicon/ Millipore GmbH, Schwalbach	Kaninchen
anti-GAD67 (monokl.)	Chemicon/ Millipore GmbH, Schwalbach	Maus
anti-GFAP (monokl.)	Chemicon/ Millipore GmbH, Schwalbach	Maus
anti-vGlut1 (polykl.)	Chemicon/ Millipore GmbH, Schwalbach	Meerschwein
anti-Nestin (monokl.)	Chemicon/ Millipore GmbH, Schwalbach	Maus
anti-NeuN (monokl.)	Chemicon/ Millipore GmbH, Schwalbach	Maus
<i>Apoptosemarker</i>		
anti-digoxigenin	Chemicon/ Millipore GmbH, Schwalbach	

**Tabelle 4.2: Sekundäre Antikörper**

Antikörper	Hersteller	Quelle
anti-Kaninchen biot.	Vector Labs, Ohio USA	Ziege
anti-Maus biot.	Vector Labs, Ohio USA	Pferd
anti-Meerschwein biot.	Vector Labs, Ohio USA	Ziege

#### 4.7 Material für Western Blot

Acrylamid-Mix	SERVA GmbH, Heidelberg
Ammoniumpersulfat 10%	MP Biomedicals, Eschwege
Anti-Maus, W402B	Promega GmbH, Mannheim
Blotting Membran, Hybond ECL	Amersham/ GE Healthcare, München
Blotting Papier, #1703966	Bio-Rad Labs GmbH, München
Bromphenolblau, 1%	Fluka/Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
DC Protein Assay	Bio-Rad Labs GmbH, München
ECL-Kit, RPN 2106	Amersham/ GE Healthcare, München
Essigsäure p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin p.a.	NeoLab GmbH, Heidelberg
Glyzerin	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Hyperfilm-ECL, RPN 3103K	Amersham/ GE Healthcare, München
2-Mercaptoethanol p.a.	NeoLab GmbH, Heidelberg
Milchpulver	Carl Roth + Co KG, Karlsruhe
Ponceau S	Carl Roth + Co KG, Karlsruhe
Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Proteinstandard, #10748-010	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Sukrose	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
TEMED	Fluka/Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Tween 20	NeoLab GmbH, Heidelberg
Txnrd1-Antikörper, LF-PA0023	Labfrontier, Seoul Korea
Ziege anti-Kaninchen, #170-6515	Bio-Rad Labs GmbH, München

#### 4.8 Material für Northern Blot

Formaldehyd 37%	Merck KGaA, Darmstadt
Hybond N <sup>+</sup> Membran	Amersham/ GE Healthcare, München
Hyper Film	Amersham/ GE Healthcare, München
Microspin-Columns G50	Amersham/ GE Healthcare, München
MOPS	NeoLab GmbH, Heidelberg
Natrium-Azetat	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
αP <sup>32</sup> -dCTP	Amersham/ GE Healthcare, München

---

PCR Purification Kit, # 28104

Qiagen GmbH, Hilden

Random prime labelling Kit

Amersham/ GE Healthcare, München

## 5 Methoden

### 5.1 Zucht der Mauslinien und äußere Beobachtung der Tiere

#### 5.1.1 Tierhaltung und Hygienestatus

Die Zucht der Tiere findet in den Tierräumen des Biologikums (GSF, Neuherberg) statt. Pro Käfig (Typ II Polycarbonat) werden maximal 5 Tiere auf Labortiereinstreu (Lignocel 3-4, Rettenmaier, Rosenberg) gehalten, die einmal wöchentlich gewechselt wird. Die Tiere werden mit einer Standarddiät (Altromin 1314) *ad libitum* gefüttert und erhalten durch 0,2 µm filtriertes teilentmineralisiertes Wasser *ad libitum*. Die Haltung der Tiere erfolgt unter standardisierten klimatischen Bedingungen.

**Tabelle 5.1: Haltungsbedingungen der Versuchstiere**

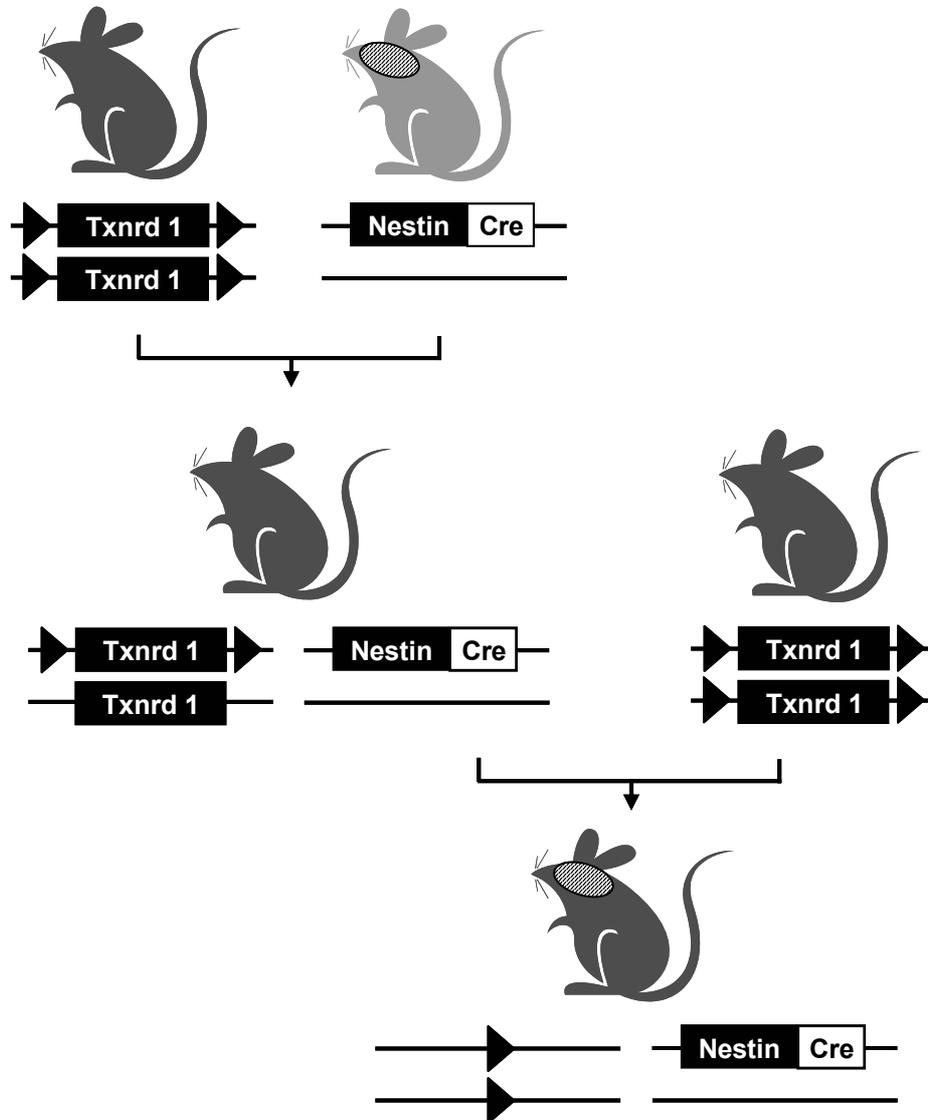
Raumtemperatur	21 (+/- 1) °C
Relative Luftfeuchtigkeit	55 (+/- 5) %
Luftwechselrate	15-20/ Stunde, gefilterte Zuluft
Lichtzyklus	12 Stunden

Die Werte werden konstant überwacht und aufgezeichnet. Die Versuchstiere werden in einer SPF (Spezifiziert pathogen frei) -Barrierehaltung gehalten und ihr Hygienestatus nach den aktuellen Richtlinien der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* („FELASA“) regelmäßig im dreimonatigen Abstand untersucht (Nicklas 2002). Die hygienische Einheit, in der die Mäuse gehalten wurden, war während der hier beschriebenen Untersuchungen frei von allen in der FELASA-Richtlinie gelisteten Mauspathogenen bis auf Maus Hepatitisvirus („MHV“; erster Test für MHV-spezifische Antikörper in August 2005), *Helicobacter spp.* sowie gastrointestinale Helminthen (*Syphacia spp.*) ebenso in August 2005. Die Mäuse wurden mit Fenbendazol behandelt. Bei darauf folgenden Untersuchungen wurden keine Helminthen festgestellt.

#### 5.1.2 Zur Zucht verwendete Mausstämme

Die in dieser Arbeit zu analysierenden, konditionalen Thioredoxin Reduktase 1-Knockout Mäuse wurden von Cemile Jakupoglu (Jakupoglu, 2005) etabliert. Das

Knockout-Modell sowie Cre/lox-Technologie und *Gene Targeting*-Strategie sind bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben worden. Hier soll lediglich das Zuchtschema dargestellt werden.



**Abbildung 5.1: Zuchtschema.** Tiere, die homozygot eine LoxP-Flankierung ( ► ) des Exon 15 der Thioerodoxin Reduktase 1 tragen werden mit Cre-Transgenen Mäusen verpaart, in denen die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Nestin- Promoters steht. Aus der F1-Generation werden die Tiere weiter zur Zucht verwendet, die sowohl das Nestin-Cre-Transgen als auch heterozygot eine LoxP-Flankierung tragen. Diese Tiere werden nochmals mit einem homozygot LoxP-flankierten Thioerodoxin Reduktase1 Maus verpaart. In der F2-Generation geht die Knockout-Maus mit 25% Wahrscheinlichkeit hervor, die homozygot LoxP-flankiert ist und das Nestin-Cre-Transgen trägt.

### 5.1.3 Zuchttest der Knockout-Mäuse

Es wurden zwei Zuchtpaare angesetzt, um das Verpaarungsvermögen der Knockout-Tiere zu untersuchen. Bei einem Zuchtpaar war das weibliche Tier ein Knockout, bei dem anderen Zuchtpaar war das männliche Tier ein Knockout. Der jeweilige Zuchtpartner war eine Maus der C57Bl/6J-Inzuchtlinie (Fa. Charles River).

### 5.1.4 Genotypisierung der Mausstämme

Die Genotypisierung der Tiere sowie der Embryonen erfolgte mittels PCR (*Polymerase Chain Reaction*), bei der die zu untersuchende Gensequenzen vervielfältigt und anschließend zur Auswertung gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden.

### 5.1.5 DNA-Isolierung aus Schwanzspitzen

#### Reagenzien

Lyse-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,6

10 mM EDTA pH 8,0

10 mM NaCl

0,5 % SDS

200 µg/ml Proteinase K

Phenol-Chloroform

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5

1 mM EDTA

Für die Genotypisierung der Mäuse wurden etwa 0,3 cm lange Schwanzspitzen-Proben entnommen, in 350 µl Lyse-Puffer über Nacht bei 55°C unter Schütteln inkubiert. Nach vollständiger Lyse des Gewebes wurden 350 µl Phenol-Chloroform zugefügt, stark gemischt und 6 min bei 15700 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden 200 µl aus der oberen, wässrigen Phase zur Fällung der DNA mit 500 µl eines bereits vorbereiteten Ethanol/NaCl-Gemisches (15 µl NaCl 5M pro 1 ml 100% Ethanol) vermischt. Nach 10 min Zentrifugation bei 16060 g und 4°C wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet zweifach mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in 75 µl TE-Puffer gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

### 5.1.6 Standard PCR-Bedingungen

Bei der routinemäßigen Genotypisierung der Mäuse mittels PCR wurde jeweils 1 µl isolierte DNA pro 25 µl Standard-Reaktionsansatz verwendet. Die Konzentrationen der für die PCR notwendigen Komponenten wurden für den Reaktionsansatz gemäß den Angaben der Hersteller eingestellt:

Aqua dest.	14 µl
dNTP-Mix (1 mM)	5 µl
Forward-5' Primer (5 µM)	1,5 µl
Reverse-3' Primer (5 µM)	1,5 µl
10x PCR Puffer (ohne MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Whatman Biometra, T1) nach folgendem Standard-Schema durchgeführt und wurde bezüglich der Annealing-Temperatur entsprechend den Schmelzeigenschaften der Primer und bezüglich der Elongationszeit entsprechend der zu erwartenden PCR-Produktgröße eingestellt:

**Tabelle 5.2: Standard PCR-Schema**

1 Zyklus	35 Zyklen			1 Zyklus	
Hot start	Denaturierung	Annealing	Elongation	Finale Elongation	Kühlen
5 min 95°C	20 sec 95°C	20 sec 59-68°C	10 sec/100bp Produkt 72°C	7 min 72 °C	4°C

### 5.1.7 Gel-Elektrophorese

#### Reagenzien

50x TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer:	242 g Tris
	57,1 ml Eisessig
	18,6 g EDTA
	Ad 1000 ml Aqua dest.
10x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer:	107,8 g Tris
	55,03 g Borsäure
	43,84 g EDTA
	Ad 1000 ml Aqua dest.

Für die Auswertung wurden 10 µl des PCR-Amplifikats zunächst mit 3 µl 6x DNA-Ladepuffer vermischt und auf ein frisch hergestelltes 1%-iges Agarose-Gel (w/v, in 1x TAE; 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetragen. Für Banden kleiner als 300 bp wurde ein 2%-iges Gel (w/v, 1x TBE) verwendet. Zum Größenvergleich der Banden wurden 3 µl eines 100 bp DNA-Größenstandards geladen. Die Auftrennung erfolgte in 1x TAE- bzw. in 1x TBE-Puffer bei einer Spannung von 110 V. Die Gele wurden nach der Elektrophorese mit Hilfe eines Geldokumentationssystems Typ V028277 (Vilber Lourmat, Eberhardzell) aufgenommen, ausgedruckt und ausgewertet.

### 5.1.8 Postnatale Körpergewichtsentwicklung

Mindestens 2 Knockout-Tiere und mindestens 2 Kontroll-Tiere wurden an postnatalen Tag (P) 7, P14, P21 und P28 gewogen. Das Gewicht wurde in g gemessen.

### 5.1.9 *Pole*-Test der Koordination

Für diesen Versuch wurden 14 Wildtyp-Tiere und 14 Knockout-Tiere, die alle adult waren (älter als 6 Wochen) getestet. Eine 50 cm Edelstahl-Gewindestab mit 1 cm Durchmesser war auf einer Edelstahlplatte befestigt. Auf der Platte war Labortiereinstreu verteilt. Die Tiere wurden einen Tag vor Versuchsbeginn an das Gerät gewöhnt. Zur Prüfung der Koordination wurde jedes Tier mit dem Kopf nach unten an der Spitze des Stabes positioniert. In je 5 Versuchen wurde die Zeit in s gemessen bis das Tier

die Stange heruntergeklettert war und den Boden mit allen Pfoten erreicht hatte. Bei Herunterfallen oder -gleiten des Tieres wurden 120 s eingetragen.

## 5.2 Histologie

### 5.2.1 Verwendetes Probenmaterial

Für die pränatalen Untersuchungen wurden Embryonen zu den Zeitpunkten embryonaler Tag 11,5 (E11,5); 15,5 (E15,5) und 18,5 (E18,5) verwendet. Zur Feststellung des Gestationsstadiums wurden täglich morgens Vaginal-Pfropf-Kontrollen an den Muttertieren durchgeführt, die ein Indikator für eine vorangegangene Kopulation sind. Für die postnatalen Untersuchungen wurden die Gehirne von Tieren an P (postnataler Tag) 0, P7, P14 und P21 verwendet. Für Untersuchungen auf Altersdegeneration wurden Gehirne von Tieren im Alter von zwei Jahren verwendet.

### 5.2.2 Präparation und Fixation der Gewebe und der Embryonen

#### Reagenzien

Bouin'sche Lösung:	20 ml Pikrinsäure, gesättigt
	5 ml Formaldehyd, 37%
	1 ml Eisessig

An dem zu untersuchende Gestationstag wurde das Muttertier durch zervikale Dislokation euthanasiert. Muttertiere, deren Embryonen zusätzlich für die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper anti-5'-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) vorgesehen waren, wurden 1,5 h vor Euthanasie intraperitoneal mit 100 mg/kg Körpergewicht BrdU injiziert. Der Uterus wurde entnommen und in sterilem PBS gewaschen. Der Uterus wurde vorsichtig zwischen den Plazentomen durchgeschnitten und durch Öffnen der Embryonalhüllen wurden die Embryonen vollständig aus Deciduum und Dottersack isoliert. Anschließend wurde den Embryonen ein 0,3 cm langes Schwanzstück abgetrennt, das für die DNA-Isolierung und Genotypisierung benutzt wurde. Für die Präparation der Gehirne zum

postnatalen Zeitpunkt wurden die Tiere zunächst mit Diethylether narkotisiert, um dann durch Decapitation getötet zu werden. Die Schädeldecke wurde entfernt und das Gehirn vorsichtig heraus präpariert. Die Fixation von Embryonen sowie postnatalen Gehirnen erfolgte über Nacht bei 4°C in 4% PFA/PBS oder in Bouin'scher Lösung. Für die In Situ-Aufnahmen wurde ein Stereomikroskop Typ SV11 (Zeiss, Oberkochen) verwendet. Anschließend wurden die fixierten Gewebe in 70% Ethanol gewaschen und bis zur Einbettung in Paraffin darin aufbewahrt.

### 5.2.3 Anfertigen von Paraffinschnitten

Die Einbettung der fixierten Gewebe begann nach der Überführung in Einbettkassetten mit der Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe nach dem folgenden Schema:

**Tabelle 5.3: Entwässerungsprogramm**

70% Ethanol	80% Ethanol	96% Ethanol	100% Ethanol	Xylol	Paraffin
2h	1h	3h	5h	3h	Über Nacht

Am nächsten Tag wurde das Gewebe mit Hilfe einer Paraffinausgießstation Typ pec 3003-D (Tespa GmbH, Gießen) in Blöcke gegossen und ausgehärtet. Mit einem Rotationsmikrotom Typ HM 355S (Microm, Walldorf) wurden bei den Embryonen 7 µm und bei den postnatalen Stadien 8 µm dünne Serienschritte hergestellt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und über Nacht im Wärmeschrank bei 50°C getrocknet. Für die Immunhistochemie wurden Superfrost Plus-Objektträger verwendet, die durch elektrostatische Kräfte eine bessere Haftung der Schnitte gewährleisten.

Die angefertigten Schnitte wurden weiter für Hämatoxylin/Eosin- und immunhistochemischen Färbungen verwendet.

#### 5.2.4 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

##### Reagenzien:

Eosin:           2 g Eosinpulver  
                  200 µl Aqua dest.  
                  600 µl Eisessig

In dieser Übersichtsfärbung heben sich die Zellkerne blau/lila vom restlichen rosaroten Gewebe ab.

Die Paraffinschnitte wurden in Xylol (10 min) entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe (100% Ethanol 10 min, 95% Ethanol 5 min, 70% Ethanol 5 min, Aqua dest. 5 min) rehydriert. Nach 5 min Inkubationszeit in Hämatoxylin wurde die Färbung durch fließendes Leitungswasser (15 min) gebläut. Der 2-minütigen Inkubation in 1% Eosin folgte eine Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol nur kurz, 95 % Ethanol 3 min, 100% Ethanol 5 min, Xylol 10 min). Die Schnitte wurden mit RotiHistokit II unter Deckgläsern eingedeckelt.

### 5.3 Immunhistochemie

##### Reagenzien:

Natriumzitatpuffer: 9 ml aus Lösung A  
                          41 ml aus Lösung B  
                          450 ml Aqua dest.

Lösung A (0,1 M): 21 g Citronensäure  
                          1000 ml Aqua dest.

Lösung B (0,1 M): 29,4 g Tri-Natriumzitat-Dihydrat  
                          1000 ml Aqua dest.

Soweit nicht anders abgegeben wurden die einzelnen Schritte bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Die Paraffinschnitte wurden durch eine absteigende Alkoholreihe (Xylol 15 min, 100% Ethanol 10 min, 95% Ethanol 5 min, 70% Ethanol 5 min, Aqua dest 10 min) entparaffiniert und rehydriert. Je nach Herstellerangaben des verwendeten Antikörpers erfolgte zur Demaskierung des Antigens ein Erhitzen der Schnitte mithilfe einer Mikrowelle in 0,01 M Natriumzitatpuffer (pH 6) für mehrere

Minuten mit anschließendem langsamen Abkühlen der Schnitte auf RT. Die endogene Aktivität von Peroxidasen wurde durch eine Behandlung mit Wasserstoffperoxid (0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol, 15 min) inaktiviert. Um unspezifische Epitope abzudecken wurden die Schnitte für 30 min mit einer Blocking-Lösung präinkubiert (5% Bovines Serum Albumin in PBS für polyklonale Antikörper; M.O.M-Kit Blocking Solution für monoklonale Maus-anti-Maus Antikörper). Je nach Antikörper erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 h bei 37°C oder bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer. Die Verdünnung des Antikörpers erfolgte gemäß Herstellerangaben in der Blocking-Lösung. Es folgte zweimal ein 5 minütiges Waschen in PBS sowie 5 min Präinkubation mit der Blocking-Lösung. Entsprechend dem Primärantikörper folgte die Inkubation mit den Biotin-gekoppelten, sekundären Antikörper in der feuchten Kammer für 1 h. Der Sekundärantikörper wurde wie der Primärantikörper in Blocking-Lösung verdünnt; Verdünnungsgrad, Inkubationszeit und –temperatur wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte dreimal 5 min in PBS gewaschen. Zur Detektion des sekundären Antikörpers wurde die ABC-Lösung aus dem ABC-Kit verwendet (30 min). Die ABC (*Avidin-Biotin-Complex*)-Lösung besteht aus Avidin und Meerrettich-Peroxidase, die zusammen einen Komplex bilden, der an das an den Sekundärantikörper gekoppelte Biotin bindet. Nach weiteren Waschschritten (PBS 2 x 5 min, Aqua dest. 5 min) erfolgte die Färbereaktion, bei der lösliches Diaminobenzidin durch die Peroxidase enzymatisch in einen braunen unlöslichen Farbstoff umgesetzt wird. Nach ausreichender Färbung (1-3 min) wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. gewaschen, zur Gegenfärbung 3 Sekunden in Hämatoxylin getaucht, diese Farbe unter Leitungswasser gebläut, dehydriert und eingedeckelt.

### 5.3.1 Apoptose-Detektion

PFA-fixierte Schnitte von Tieren im Alter von P1 und P7 wurden mit dem ApopTag Peroxidase Kit auf Apoptose untersucht. Dabei diente eine Gewebeprobe aus dem Hodengewebe eines C57Bl/6-Tiers als Positivkontrolle. Die Paraffinschnitte wurden durch eine absteigende Alkoholreihe (Xylol 3 x 5 min, 100% Ethanol 2 x 5 min, 95% Ethanol 5 min, 70% Ethanol 3 min, PBS 5 min) entparaffiniert und rehydriert. Zur Demaskierung des Antigens erfolgte ein Erhitzen der Schnitte mit Hilfe einer Mikrowelle in 0,01 M Natriumzitatpuffer (pH 6) für mehrere Minuten und im

Anschluss ein 20 minütiges Abkühlen. Die endogene Aktivität von Peroxidasen wurde durch eine Behandlung mit Wasserstoffperoxid (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS, 5 min) inaktiviert mit zweimaligem Abwaschen je 5 min in PBS. Die Schnitte wurden nach der Präinkubation mit „*Equilibration Buffer*“ (10 Sekunden, RT) für eine Stunde mit dem gemäß Herstellerangaben angemischten „*Working Strength TdT Enzyme*“ bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurde ein „*Working Strength Stop/Wash Buffer*“ für 10 min bei RT verwendet, gefolgt von Waschen in PBS. Danach wurden die Schnitte mit dem „*Anti-Digoxigenin Conjugate*“ bedeckt und für 30 min in einer feuchten Kammer belassen. Die Entwicklung der Farbreaktion geschah nach dem Waschen in PBS durch ein Peroxidase Substrat (3-6 min) und mit einer Gegenfärbung in Hämatoxylin. Die Dehydrierung und Eindeckelung der Schnitte erfolgte wie unter dem Kapitel Immunhistochemie bereits beschrieben.

## 5.4 Semiquantitative RT-PCR

### 5.4.1 Präparation gesamtzellulärer RNA

Das Nieren- und Gehirngewebe von Mäusen wurde sofort nach der Präparation in 1 ml saurer Phenol-Guanidiniumthiocyanat-Lösung (peqGoldTriFast) mit Hilfe eines elektrischen Homogenisators vom Typ Ultra Turrax T18 Basic (IKA, Staufen) zerkleinert, anschließend zur Phasentrennung in 200 µl Chloroform überführt, gründlich durchgemischt und nach 5 min Inkubation bei RT für 7 min mit 15700 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig abpipettiert, in 500 µl Isopropanol gegeben und für 10 min in -80 °C gestellt, um dann für 10 min bei 4°C, 16060 g zentrifugiert zu werden. Das entstandene Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet und in 200 µl RNase-freiem Wasser (Ampuwa) gelöst. Für den DNase-Verdau wurde ein Promega-Kit verwendet: je 90 µl RNA-Lösung wurde mit 10 µl Puffer und 3 µl RNase-freier DNase und für 45 min bei 37°C inkubiert. Zur Aufreinigung der RNA wurde nochmals eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt (siehe oben), dabei wurde aber die Isolierte RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Anschließend wurde für jede Probe die RNA-Konzentration bestimmt.

### 5.4.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese aus RNA wurde das „*Reverse Transcription System*“ verwendet. Dieses System enthält neben dem Enzym „Reverse Transkriptase“ auch alle anderen erforderlichen Komponenten. Der Reaktionsansatz wurde gemäß Herstellerangaben wie folgt hergestellt:

MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µl
Reverse Transkriptions-Puffer 10x	2 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
Reverse Transkriptase (24 U/µl)	0,6 µl
Random Primer	1 µl
RNA-Template	1 µg
RNase-freies Wasser	ad 20 µl

Der Ansatz wurde zunächst für 10 min bei RT und anschließend für 60 min bei 42 °C inkubiert. Durch 5 minütiges Erhitzen auf 95°C mit anschließender Eis-Kühlung wurde die Reaktion inaktiviert. Das cDNA-Transkript wurde mit Wasser auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und danach bei -20 °C gelagert.

### 5.4.3 PCR-Ansatz für semiquantitative RT-PCR

Für die PCR wurden pro Probe je 1 µl cDNA eingesetzt.

Aqua dest.	25 µl
dNTP (1 mM)	10 µl
PCR-Puffer 10X (ohne MgCl <sub>2</sub> )	5 µl
Forward-Primer (5 µM)	3 µl
Reverse-Primer (5 µM)	3 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl



### 5.5.2 Gel-Auftrennung der Proteine

#### Reagenzien:

Lämmli-Puffer (2X):	12,5 ml Tris/HCl, 1 M, pH 6,8 4 g SDS 20 ml Glycerin 2 ml Bromphenolblau, 1% Ad 100 ml Aqua dest.
Trenngel 10%:	7,9 ml Aqua dest. 6,7 ml Acrylamid-Mix 30% 5 ml Tris 1,5 M pH 8,8 0,2 ml SDS 10% 0,2 ml Ammoniumpersulfat 10% 0,008 ml TEMED
Sammelgel 5%:	6,8 ml Aqua dest. 1,7 ml Acrylamid-Mix 30 % 1,25 ml Tris 1 M pH 6,8 0,1 ml SDS 10% 0,1 ml Ammoniumpersulfat 10% 0,01 ml TEMED
<i>Running Buffer</i> 10X:	10 g SDS 30 g Tris 144 g Glycin Ad 1000 ml Aqua dest.

Über das Trenngel wurde das Sammelgel in die mit *Running Buffer* gefüllte Elektrophoresekammer Typ 45-1010-i (peqlab GmbH, Erlangen) gegossen und die Aushärtung abgewartet. 30 µg Protein aus den Proben wurden mit 21 µl Lämmli-Puffer zusammen pipettiert, mit STE bis zu einem 30 µl Endvolumen aufgefüllt und für 5 min bei 95°C aufgekocht. Die Proben wurden danach in die Geltaschen pipettiert und 10 µl eines Proteinstandards wurde zum Größenvergleich der Banden



Auf der Membran befindliche unspezifische Epitope wurden mit 5% Milchpulver in TBST (*Blocking* Lösung) für 1 h bei RT geblockt. Der Thioerodoxin Reduktase 1-Antikörper wurde 1:2000 mit der *Blocking* Lösung verdünnt und die Membran 1 h bei RT damit inkubiert. Anschließend erfolgte zweimal ein 5-minütiges Waschen der Membran mit Aqua dest. und 3 mal 5 min mit TBST. Der Sekundärantikörper wurde ebenso 1:2000 in der *Blocking* Lösung verdünnt und die Membran für 1,5 h bei RT damit inkubiert. Die Membran wurde zweimal mit Aqua dest., drei Mal mit TBST je für 5 min und nochmals mit Aqua dest. gewaschen. Die Entwicklung des Antikörpersignals erfolgte, laut Herstellerangaben des ECL-Kits für Western Blotting mit einer Hyperfilm für ECL, in einer Film-Entwicklermaschine (Kodak, Stuttgart). Um die Membran auf eine erneute Inkubation mit einem Antikörper vorzubereiten und zur Darstellung der Ladung gleicher Proteilmengen, erfolgte ein Waschen in *Stripping Buffer* für 30 min bei 50°C. Danach wurde die Membran 2 mal 10 min bei RT in TBST gewaschen und unspezifische Epitope mit der *Blocking* Lösung abgedeckt. Der Antikörper  $\alpha$ -Tubulin wurde für 1 h bei RT mit der Membran inkubiert. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Anti-Maus), die Waschritte sowie die Entwicklung des Signals erfolgte wie bereits beschrieben.

## 5.6 DNA-Chip Analyse

Gesamt-RNA wurde aus dem Gehirn (Groß- und Kleinhirn) von Knockout- und Wildtyp-Tieren zum Zeitpunkt P14 wie bereits beschrieben isoliert. Die DNA-Chip Analyse wurde von Kooperationspartner Tomek Mijalski (Institut für Experimentelle Genetik, GSF, Neuherberg) durchgeführt.

## 5.7 Northern Blot

Aufgrund der Ergebnisse der Expressionsanalyse (DNA-Chip Analyse) wurden die Kandidatengene Selenoprotein W, Adenylatzyklase1, Zinc finger Protein1 und Angiotensinogen für eine Northern Blot-Analyse ausgesucht. Eine Gehirnhälfte und eine Niere wurden von zwei Knockout- und zwei Kontroll-Tieren jeweils zum Zeitpunkt P7 und P28 präpariert. Die Isolation von gesamtzellulärer RNA, DNase Behandlung und Konzentrationsmessung erfolgte wie bereits beschrieben. 5  $\mu$ g RNA pro Probe wurde verwendet.

### 5.7.1 Sondenherstellung

Anhand der mRNA-Sequenzen unter <http://www.informatics.jax.org> wurde das Design der Primer für die Sonden festgelegt.

PCR Ansatz für die Sondenherstellung:

RNAse freies Wasser (Ampuwa)	25 µl
dNTP (2 M)	10 µl
PCR-Puffer 10X	5 µl
Forward-Primer (5 mM)	3 µl
Reverse-Primer (5 mM)	3 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
cDNA von C57Bl/6-Tieren	2 µl

Auf einem initialen Denaturierungsschritt von 5 min bei 95 °C folgten 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung für 20 Sekunden bei 95 °C, Primer-annealing für 20 Sekunden einer Temperatur entsprechend der Primerschmelztemperaturen, 10 Sekunden Elongation pro 100 bp Länge des Amplifikationsproduktes bei 72 °C. Nach einem finalen Elongationsschritt von 7 min bei 72 °C wurde der Ansatz auf 4 °C gekühlt. 5 µl des PCR-Produkt wurde, wie bereits oben beschrieben, zur Auswertung auf ein 1 %-iges TAE Agarose Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und dokumentiert. Der restliche Teil des PCR-Produktes wurde entsprechend den Herstellerangaben vom PCR *Purification Kit* aufgereinigt. Für das Labelling wurde 3 µl aus den DNA-Sonden entnommen, mit 45 µl Aqua dest. gemischt und auf 95°C für 5 min aufgewärmt, um danach in Eis gekühlt zu werden. Dieser Ansatz wurde in einem Eppendorf-Tube aus dem Kit *Random Prime labelling System* überführt, mit 5 µl αP<sup>32</sup>-dCTP vermischt und für 1 h in einem 37°C Wasserbad aufgewärmt. Zur Nukleotid-Entfernung wurden Microspin-Columns entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet und die Radioaktivität der Sonde mit einem Messgerät Typ QC 4000 (Bioscan, Washington USA) detektiert.

### 5.7.2 Hybridisierung

#### Reagenzien:

MOPS-Puffer (10X pH 7,0):	0,4 M MOPS 100 mM Natrium-Azetat 10 mM EDTA/NaOH pH 8,0
Formaldehyd-Gel:	5 g Agarose 50 ml MOPS-Puffer 10X 435 ml autoklaviertes Aqua dest. 25,5 ml Formaldehyd 37%
<i>Running Buffer:</i>	1X MOPS-Puffer
Church-Puffer:	500 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,5 M) 500 ml SDS (10 %) 2 ml EDTA (0,5 ; pH 8,0)
SSC (20X):	175,3 g NaCl 88,2 g Tri-Natrium-Zitrat/NaOH pH 7,0 Ad 1000 ml Aqua dest.
Wasch-Lösung:	2X SSC 1% SDS

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proben im Formaldehyd-Gel für 5-6 h bei einer Spannung von 100 V in einem *Running Buffer*, wurde das Gel mit einer Polaroid-Kamera zur Kontrolle der aufgetragenen RNA-Mengen abgelichtet und dann auf eine Membran (Hybond N<sup>+</sup>) durch Kapillarkräfte übertragen. Die Immobilisierung der RNA auf der Membran erfolgte durch einen Cross-Linker Typ UV-Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla USA). Mit einer UV-Lampe wurde der Transfer der RNA kontrolliert. Die Membran wurde in Church-Puffer für 3 h bei 65 °C prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte Sonde auf 95 °C erhitzt, mit 15 ml 65°C warmen Church-Puffer vermischt und mit der Membran für 2,5 Tage bei 65°C inkubiert. Danach wurde die Membran drei Mal für 15 min in der Wasch-Lösung

bei 65°C gewaschen und für zwei Wochen bei -80°C auf einem Hyperfilm zur Exposition gelagert, der dann in einer Entwicklermaschine entwickelt wurde. Durch die Hybridisierung mit der GAPDH-Kontrollsonde konnten die aufgetragenen RNA-Mengen quantitativ miteinander verglichen werden.

## 5.8 Real-Time PCR

Die RNA-Extraktion aus Kleinhirngewebe aus Kontroll- und Knockouttieren zum Zeitpunkt P0 und P7, die DNase-Behandlung und cDNA-Synthese erfolgte wie bereits beschrieben. Für die Untersuchung auf Expressionsveränderungen im gehirnspezifischen Txnrd1-Knockout wurden folgende Gene ausgewählt: Txnrd1, Nestin, GFAP, Pax6, En1, Tubb3, vGlut1, CNP und Gad67. Die Real-Time PCR wurde von Kooperationspartnerin Cemile Jakupoglu (Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn) durchgeführt.

## 5.9 Datenauswertung und –verarbeitung

Die Auswertung und fotografische Dokumentation der Schnitte erfolgte mit einem Mikroskop Typ Axioplan 2 (Zeiss, Oberkochen), an das eine Axiocam MRc-Kamera (Zeiss, Oberkochen) gekoppelt war, und mit Hilfe der Software Axiovision 3.1 (Zeiss, Oberkochen). Bei der mikroskopischen Auswertung wurden die subventrikuläre Zone, der Bulbus olfactorius, Cortex cerebri und Cerebellum begutachtet.

Die Messung der Kleinhirnhöhe und des –areals wurde mit der Software Axiovision LE 4.1 von Zeiss durchgeführt, dabei wurde die Höhe zwischen Lobulus V und IX bzw. das Areal des Kleinhirns in midsagittaler Schnittebene gemessen. Die Höhe wurde zum Zeitpunkt P1, P7, P14, P21, 2 Monate und bei adulten Tieren gemessen, das Areal zum Zeitpunkt E15,5; E18,5; P1; P7; P14 und P21. Zu jedem Zeitpunkt wurde sowohl bei Knockout- als auch bei den Kontrolltieren mindestens zwei Messungen durchgeführt.

Die Anzahl der PH3-positiven Zellen im Kleinhirn auf einem Paraffinschnitt wurde zum Zeitpunkt E11,5; E15,5; E18,5; P1; P7; P14 und P21 gezählt.

Die Quantifizierung der relativen Anzahl von Körnerzellen im Str. granulare (Leung 2004) in anterioren und in posterioren Bereich wurde mit Hilfe der Software *Particle Analysis* von ImageJ (<http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/imagej/>) errechnet. In drei Wildtyp- und in drei Knockout-Tieren wurden in anterioren und posterioren

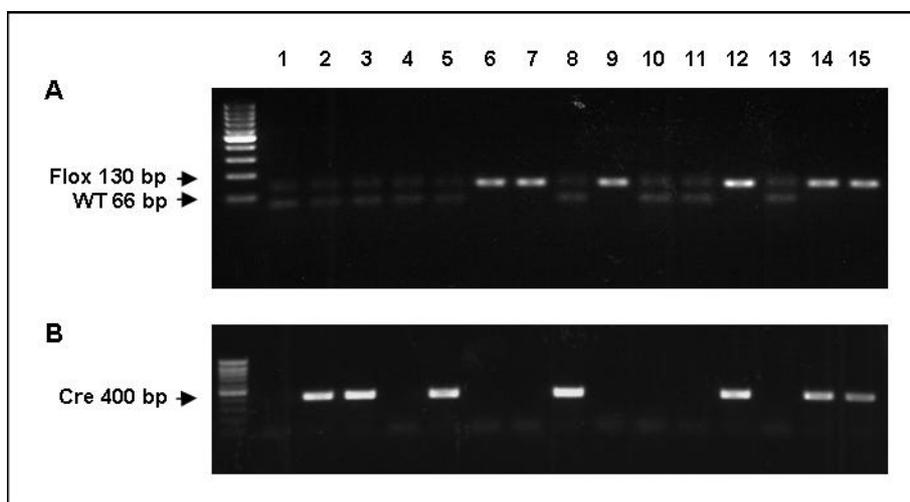
---

Kleinhirn jeweils drei Gesichtsfelder bei 100-facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurde adulte Tiere verwendet. Zur Feststellung der Signifikanz wurde der Students-t-Test verwendet.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Zucht der gehirnspezifischen Txnrd1-Knockout Mäuse

Um die Funktion von Txnrd1 in der Gehirnentwicklung zu studieren, wurden Txnrd1-Knockout Mäuse gemäß dem bereits beschriebenen Knockout-Modell generiert (Einleitung S. 23; Zuchtschema: Methoden S. 34, Abbildung 5.1). Der Genotyp der Tiere der F2-Generation wurde mittels PCR-Analyse von DNA aus Schwanzspitzenbiopsien ermittelt (Abbildung 6.1).



**Abbildung 6.1: PCR Analyse von Tieren aus der F2-Generation.** (A) Txnrd1<sup>flox</sup> forward/reverse-PCR. DNA von Tieren mit dem Txnrd1-Allel ergibt bei der PCR-Analyse neben dem kürzeren Wildtyp-Produkt (66 bp) auch ein längeres Produkt (130 bp). In 1,2,3,4,5,8,10,11,13 handelt es sich um Txnrd1<sup>WT/flox</sup>-Tiere, hingegen bei 6,7,9,12,14,15 um Txnrd1<sup>flox/flox</sup>-Tiere. (B) Cre-PCR von Tieren aus (A). Das Cre-Produkt ist 400 bp groß. 2,3,5,8,12,14,15 sind Cre positiv; unter gleichzeitiger Beachtung von (A) stellen 12,14,15 Knockout-Tiere (Txnrd1<sup>flox/flox</sup>; Cre) dar.

### 6.2 Äußeres Erscheinungsbild der gehirnspezifischen Txnrd1-Knockout Mäuse

In der klinischen Beobachtung können die Txnrd1-Knockout Mäuse bereits ab etwa P10 vor allem durch Störungen im Bewegungsmuster von ihren Wildtyp-Geschwistern unterschieden werden. Die Tiere zeigen Ataxie (zur Seite fallen und nur verzögerte Positionskorrektur) und intermittierendes Zittern. Die Tiere haben Schwierigkeiten mit der Futteraufnahme aus der Futterraufe und würden sterben, wenn man ihnen nicht Futter in die Einstreu legen würde. Eine Gewichtskontrolle

(Abbildung 6.2) der Knockout-Tiere stellt das verminderte Körpergewicht dieser Tiere im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern dar. Sie erreichen auch im adulten Alter nicht das Wildtyp-Gewicht.

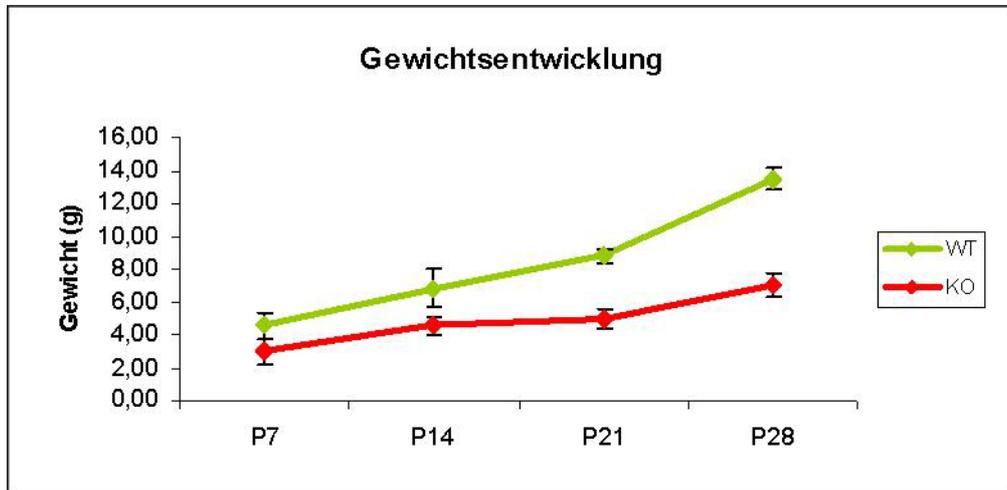
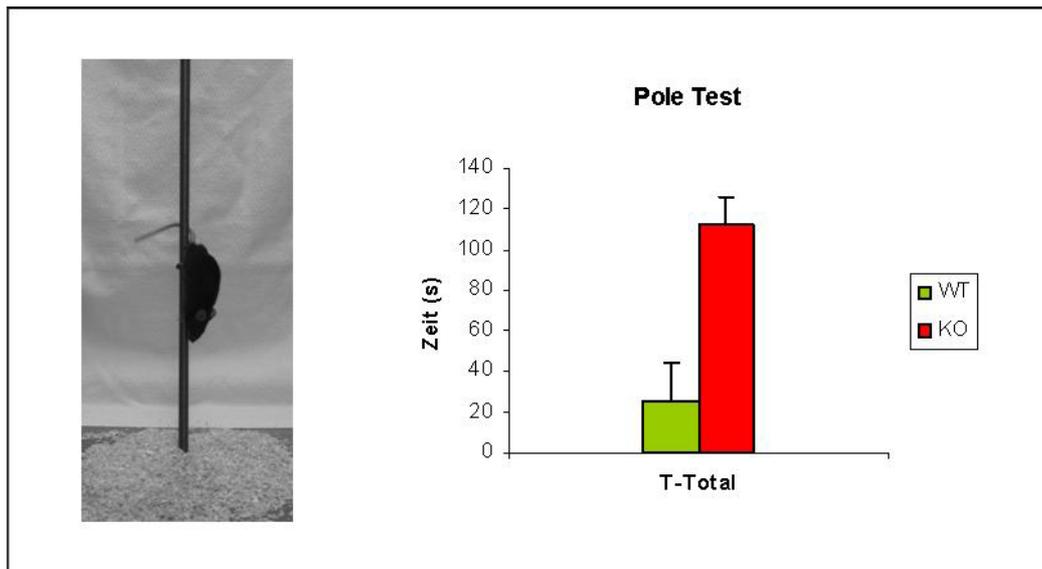


Abbildung 6.2: Gewichtsentwicklung. WT = Wildtyp, KO = Knockout.

Um den Einfluss der beobachteten Ataxie auf das Verpaarungsvermögen zu klären, wurden Zuchttests mit geschlechtsreifen Knockout-Mäusen jeweils mit einem C57Bl/6J-Partner durchgeführt. Die verpaarten Tiere zeigen aber keinerlei Einschränkungen weder in der Kopulationsfähigkeit, in der Reproduktionsrate, noch in der Aufzucht ihrer Nachkommen.

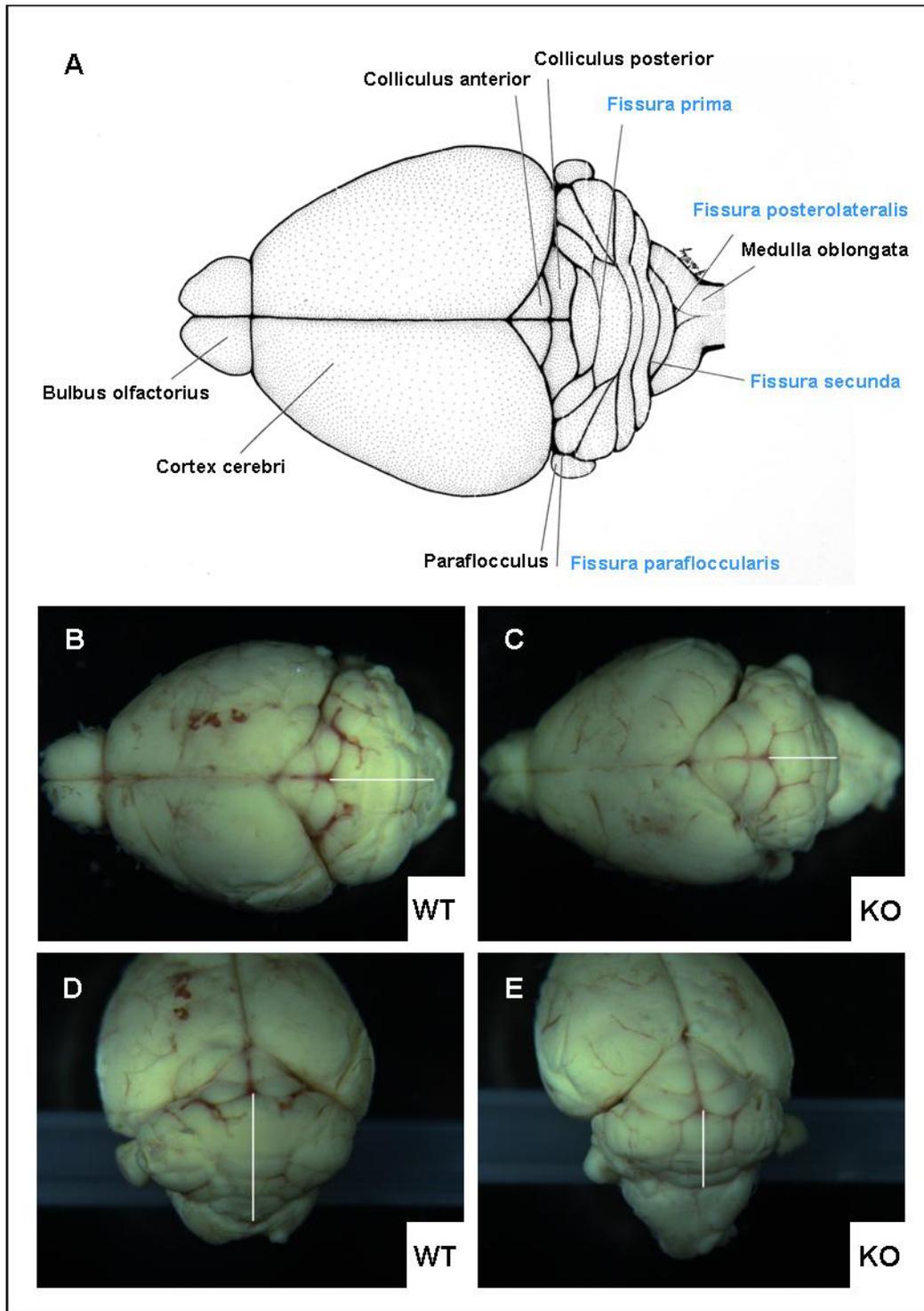
Zur Quantifizierung der beobachteten Ataxie erfolgte ein *Pole-Test* (modifiziert nach Fernagut 2003), bei dem die benötigte Zeit für das Herunterklettern der Tiere von einer Gewindestange (T-Total) gemessen wurde. Bei Tieren, die herunterfielen oder -glitten, wurde 120 s als Messwert eingetragen. Aus der Abbildung 6.3 geht hervor, dass die Knockout-Tiere aufgrund ihrer Cerebellum-Hypoplasie mit daraus folgender Koordinationsstörung wesentlich länger als die Wildtyp-Tiere benötigen.



**Abbildung 6.3: Pole-Test der Koordination.** Von 14 getesteten Knockout-Tieren waren 11 bei jedem Testdurchlauf nicht in der Lage, sich festzuhalten. WT = Wildtyp, KO = Knockout.

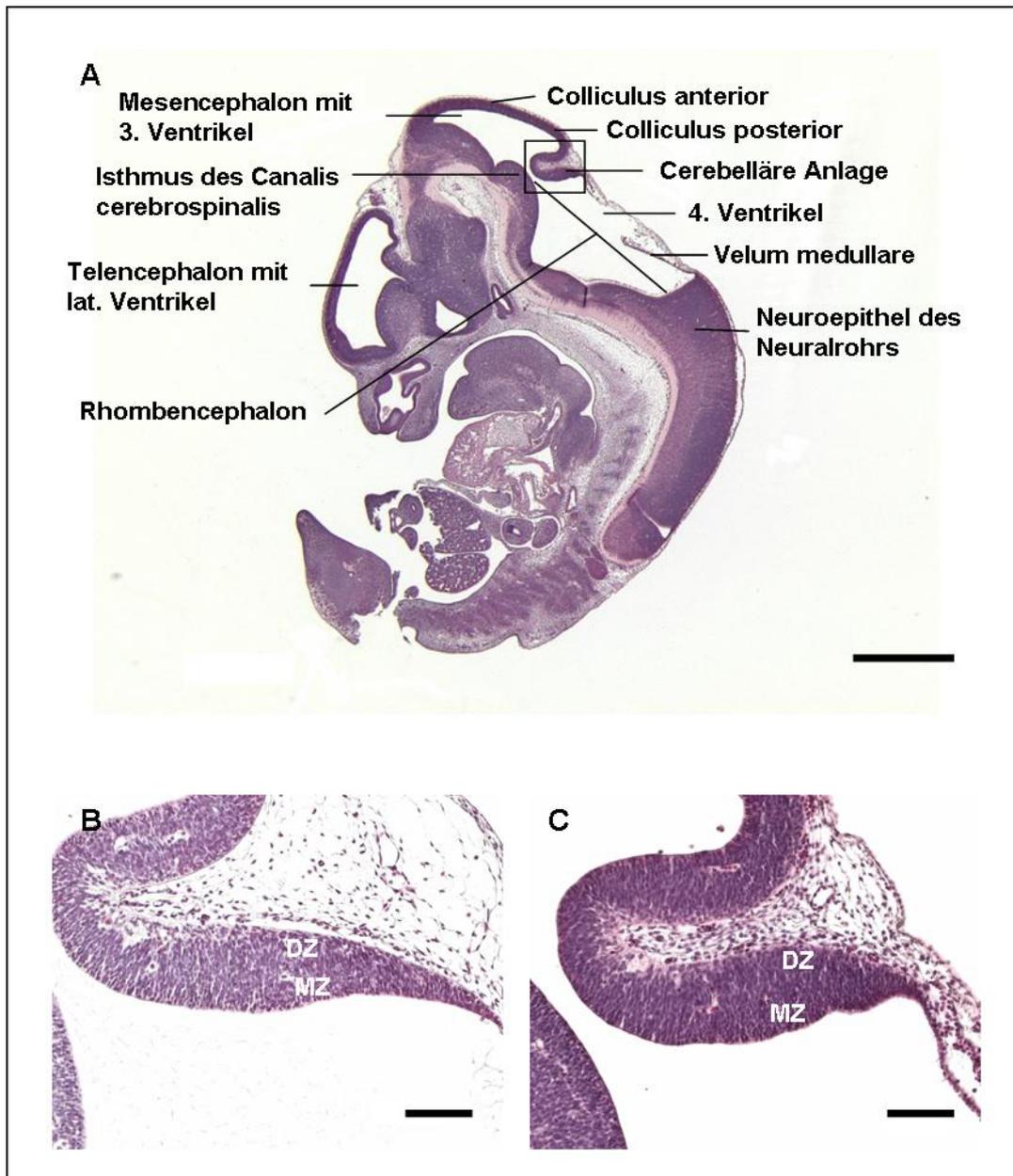
### 6.3 Histologische Analyse der gehirnspezifischen Txnrd1-Knockout Mäuse

Vor der eigentlichen histologischen Untersuchung wurde das frisch präparierte Gehirn klinisch auffälliger Tiere zunächst unter dem Stereomikroskop bei 6-facher Vergrößerung betrachtet (Abbildung 6.4), um Hinweise auf die Auswirkungen des gehirnspezifischen Txnrd1-Knockout Tieres zu erhalten. Als pathologisch-anatomischer Befund lässt sich eine hochgradige cerebelläre Hypoplasie der Knockout-Tiere feststellen, während der cerebrale Cortex unauffällig erscheint. Die Colliculi anteriores und Colliculi posteriores der Vierhügelplatte erscheinen dagegen vergrößert.



**Abbildung 6.4: Stereomikroskopische Aufnahmen.** (A) Skizze eines Mäusegehirns, dorsale Ansicht (modifiziert nach Sidman 1971). (B) – (E) Stereomikroskopische Aufnahmen: Primäre Vergrößerung 6X, WT = Wildtyp, KO = Knockout. Die maximale Ausdehnung des Cerebellums in anteriorer-posteriorer Richtung ist jeweils durch eine eingezeichnete Linie markiert.

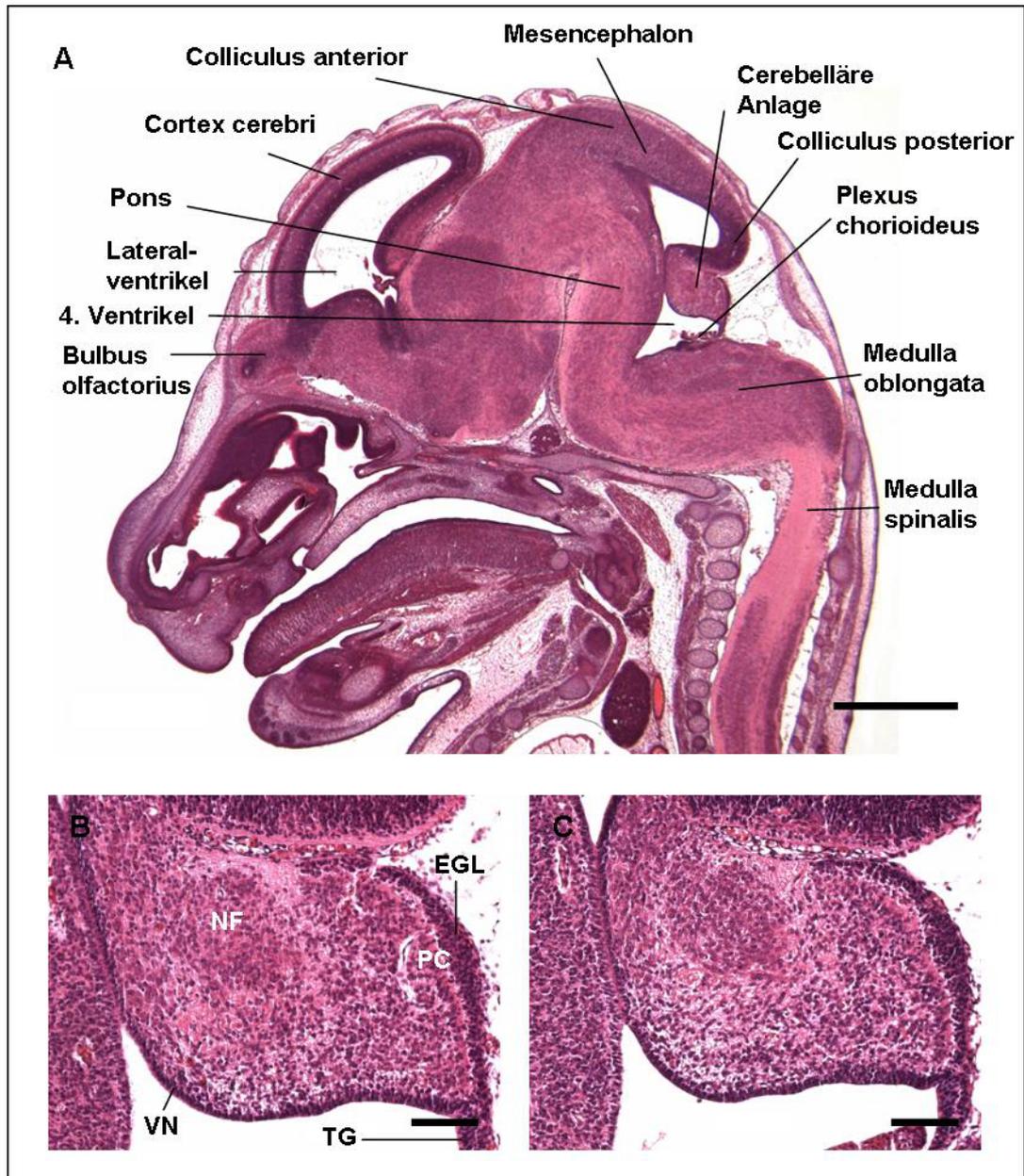
Die Entwicklung des Kleinhirns fängt bei der Maus (wie bereits beschrieben) am embryonalen Tag 9 (E9) an und kommt erst nach der dritten postnatalen Woche zum Abschluss. Daher wurde die histologische Untersuchung sowohl zu prä- als auch zu postnatalen Zeitpunkten durchgeführt. Als pränatale Untersuchungszeitpunkte wurden E11,5; E15,5 und E18,5 gewählt (Abbildung 6.5 - Abbildung 6.7). Da die Struktur der Kleinhirn-Anlage vor dem E11,5 extrem klein ist und somit die Untersuchung des Bereiches nicht möglich ist, wurden diese Entwicklungsstadien nicht analysiert. Die gezielte Inaktivierung von *Txnrd1* im Gehirn ist an die Aktivität des Nestin-Promotors gekoppelt, der in ZNS-Vorläuferzellen sowohl im Cerebrum als auch in Cerebellum aktiv ist. Aus diesem Grund wurden die histologische Schnitte zusätzlich zum Cerebellum auch im Bereich von Bulbus olfactorius, Zona subventricularis und Cortex cerebri auf Veränderungen überprüft. Zur histologischen Analyse wurde die Standardfärbung Hämatoxylin/Eosin herangezogen. Zum Zeitpunkt E11,5 der Embryonenentwicklung (Abbildung 6.5) wird die cerebelläre Anlage als ventrikuläres Neuroepithel erkennbar, welches aus mehreren Zelllagen besteht, in dem sich sowohl eine mitotische Zone als auch eine differenzierende Zone abgrenzen lassen. Die Vorläuferzellen der tiefen Nuclei verlassen als erste das Neuroepithel, später folgen die Purkinje-Zellen (E11-13). Die cerebelläre Anlage grenzt kranial an den Isthmus und kaudal an das Velum medullaris, aus dem sich später der Plexus chorioideus entwickelt. Das ventrikuläre Neuroepithel des Wildtyps und des Knockout-Tieres weisen keinen Unterschied bei der lichtmikroskopischen Untersuchung auf. Dies gilt ebenso für die Anlagen des Cerebrums (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 6.5: Entwicklungsstadium E11,5 (sagittale Schnittebene).** (A) Stereomikroskopische Übersichtsaufnahme des Embryos, primäre Vergrößerung 1,2X; Größenbalken 1 mm. (B), (C) Ventrikuläres Neuroepithel, primäre Vergrößerung 20X, Größenbalken 100 µm. (B) Wildtyp, (C) Knockout. MZ: Mitotische Zone, DZ: Differenzierende Zone.

Am Tag 15,5 der Embryonenentwicklung (Abbildung 6.6) ist der Plexus chorioideus ausgebildet, und der Keimbereich des Trigonum germinativum hat sich aus dem ventrikulären Neuroepithel formiert. Aus dem Trigonum germinativum entsteht die zweite germinative Zone, die EGL (*External Germinal Layer*), die die Quelle für die Körnerzellen des später entstehenden Str. granulare ist. Die EGL breitet sich über die cerebelläre Oberfläche aus, um den anteriorsten Punkt des Cerebellums zu

erreichen. Diese Migration ist jedoch zum Zeitpunkt E15,5 noch nicht abgeschlossen. Ein Unterschied in der cerebellären Anlage zwischen Wildtyp und Knockout ist weder in der Dicke der noch in der Ausbreitung der EGL zu verzeichnen. Die bereits etablierten Purkinje-Zellen siedeln sich entlang des Bergmann Glia-Systems in einem breiten Multilayer unter den postmitotischen Vorläuferzellen der EGL an. Phänotypische Aberrationen zwischen Wildtyp und Knockout in der Entwicklung des Cerebrums sind nicht zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

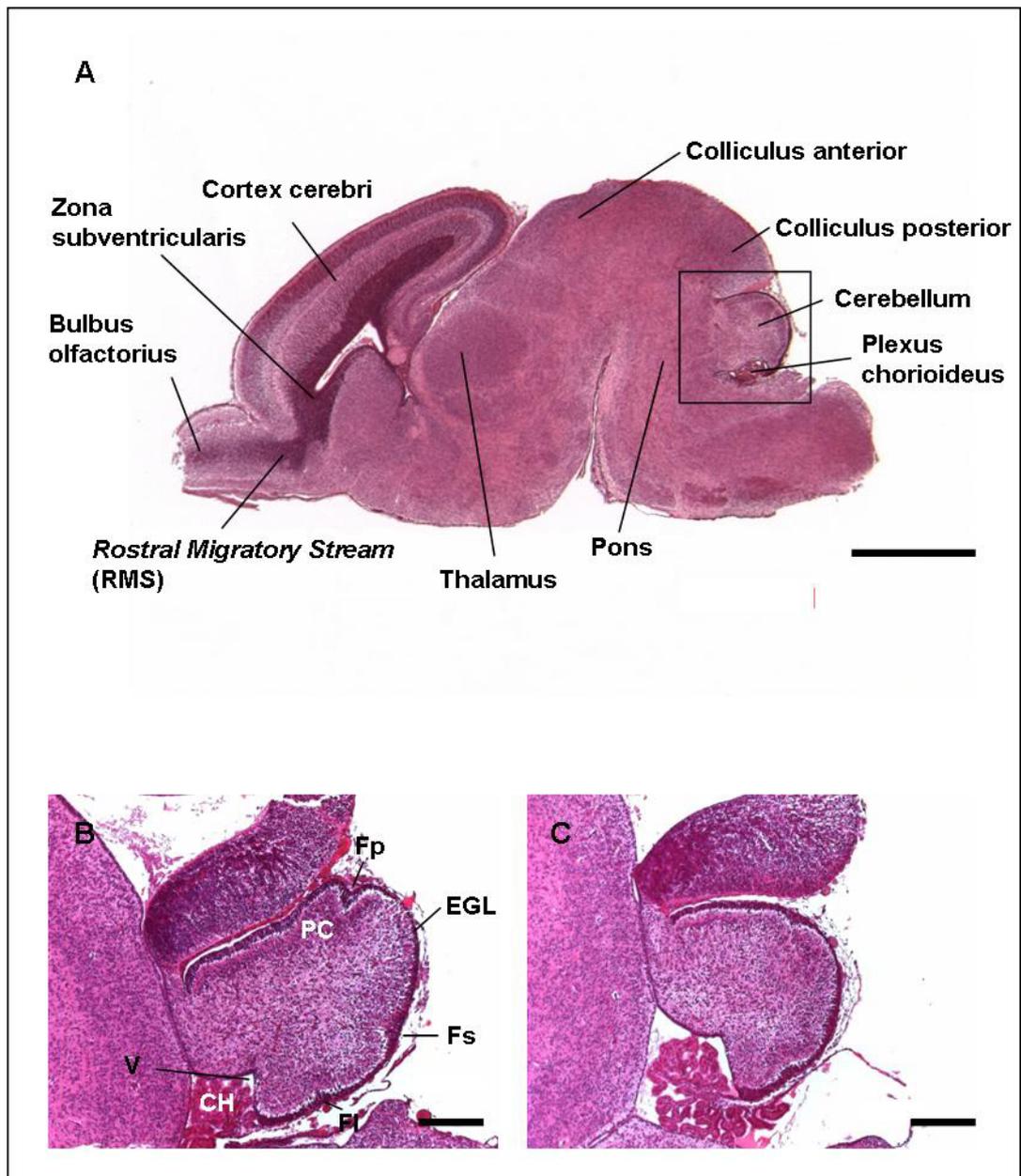


**Abbildung 6.6: Entwicklungsstadium E15,5 (sagittale Schnittebene).** (A) Stereomikroskopische Übersichtsaufnahme des Kopfbereiches, primäre Vergrößerung 1,2X; Größenbalken 1 mm. (B), (C) Cerebelläre Anlage, primäre Vergrößerung 20X, Größenbalken 100 µm. (B) Wildtyp, (C) Knockout. EGL: External Germinal Layer, PC: Purkinje-Zellschicht, VN: Ventrikuläres Neuroepithel, TG : Trigonum germinativum, NF: Nucleus fastigi

---

Zum Zeitpunkt Tag 18,5 der Embryonalentwicklung (Abbildung 6.7) ist die Migration der EGL über die Oberfläche des Cerebellums beendet. Dabei wird der anteriorste Punkt im Wildtyp wie auch im Knockout erreicht. Die EGL ist zu diesem Zeitpunkt in beiden Phänotypen mehrere Zelllagen dick. Die Foliation beginnt mit der Bildung von Fissura prima, secunda und posterolateralis. Ab diesem Entwicklungsstadium sieht man einen ersten Unterschied in der Kleinhirnentwicklung im Vergleich zwischen Wildtyp und Knockout: das Kleinhirn der Knockout-Embryonen ist kleiner, und es besteht nur eine geringgradige Andeutungen der Fissurae prima, secunda und posterolateralis. Die Großhirne weisen jedoch keine Unterschiede auf (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich über die pränatale Entwicklung des Gehirns aussagen, dass die gehirnspezifische Ausschaltung von *Txnrd1* in einer Störung der Kleinhirnentwicklung ab E18,5 resultiert. Die vorhergehende Stadien der Anlage dieses Gebietes weichen jedoch nicht von der normalen Entwicklung ab.

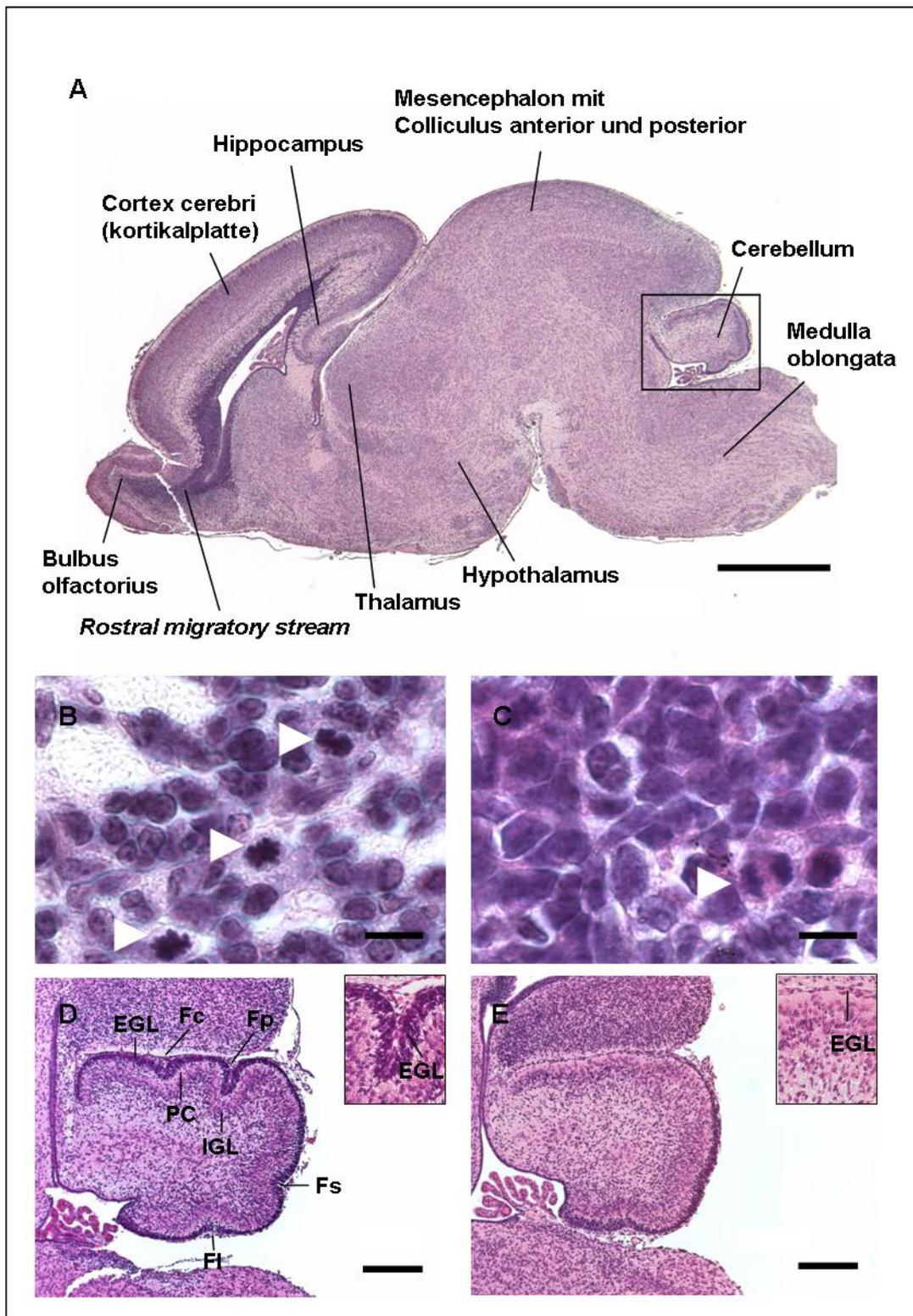


**Abbildung 6.7: Entwicklungsstadium E18,5 (sagittale Schnittebene).** (A) Stereomikroskopische Übersichtsaufnahme des Gehirns, primäre Vergrößerung 1,2X; Größenbalken 1 mm. (B), (C) Cerebellum, primäre Vergrößerung 10X, Größenbalken 200 µm. (B) Wildtyp, (C) Knockout. CH: Plexus chorioideus, EGL : External Germinal Layer, PC: Purkinje-Zellschicht, V: 4. Ventrikel, Fp: Fiss. prima, Fs: Fiss. secunda, Fl: Fiss. posterolateralis.

Als postnatale Untersuchungszeitpunkte wurden P (postnataler Tag) 1, P7, P14 und P21 gewählt, da die Entwicklung des Kleinhirns in der Maus erst nach der dritten postnatalen Woche abgeschlossen ist. Zum Zeitpunkt P1 (Abbildung 6.8) kommt es durch massive Mitosen im EGL (Abbildung 6.9) zur Expansion des Kleinhirns, welche eine immer deutlich werdende Foliation zur Folge hat und zur Verdickung der EGL führt. Diese im äußeren Teil der EGL stattfindenden Mitosen dauern bis über den

Tag P21 an. Im inneren Teil der EGL sind migratorische postmitotische Zellen lokalisiert. Die postmitotischen Körnerzellen wandern mit Hilfe der Bergmann Glia, die sowohl aus dem ventrikulären Neuroepithel als auch aus Derivaten der EGL stammen, durch die Purkinje-Zellschicht und bilden die IGL (*Inner Granular Layer*). Aus dieser Schicht entsteht am Ende der Kleinhirnentwicklung nach Abwanderung aller Körnerzellen aus dem EGL in Richtung IGL das Str. granulare. Die EGL wird dann durch das Str. moleculare mit Korb- und Sternzellen aus dem ventrikulären Neuroepithel ersetzt. Während der Expansion des Kleinhirns entsteht durch Streckung aus dem Multilayer der Purkinje-Zellen ein Monolayer, und das Kleinhirn nimmt seine endgültige Form an (Abbildung 6.10 (E), (F), Nomenklatur der Foliation nach Larsell 1952).

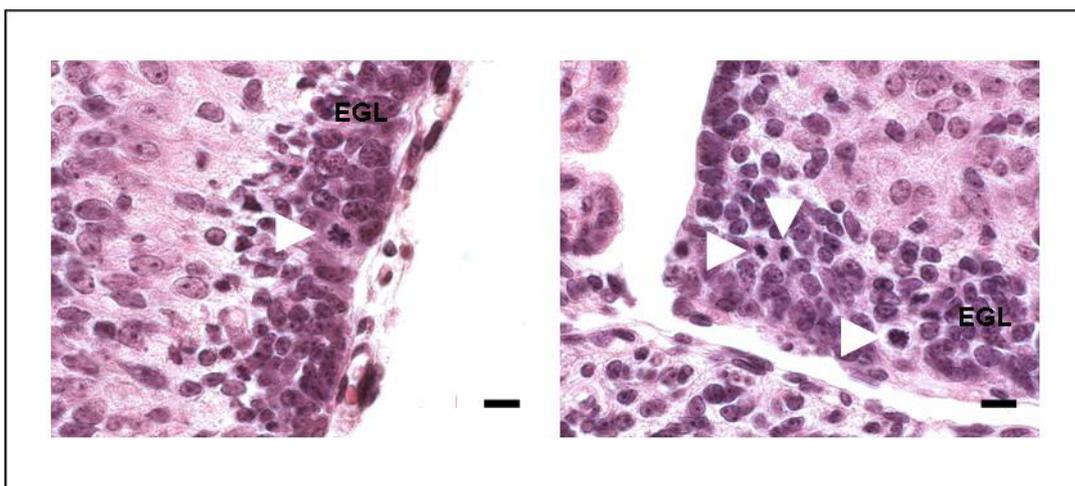
Zum Zeitpunkt P1 (Abbildung 6.8) ist die anteriore EGL im Knockout im Gegensatz zum Wildtyp an manchen Stellen nur eine Zellschicht dick oder sogar nur nestartig präsent. Im posterioren Bereich hat die EGL jedoch die gleiche Dicke wie im Wildtyp. Die Foliation im Knockout ist zurückgeblieben und gleicht dem Foliationsmuster des Wildtyps zum Zeitpunkt E18,5. Im Gegensatz dazu sind im Wildtyp die Fissuren tiefer und die Fissura preculminata tritt auf. Das Großhirn wurde auch analysiert, es waren jedoch keine Unterschiede zu erkennen, insbesondere sind sowohl im Knockout als auch im Wildtyp viele mitotische neuronale Zellen im *Rostral Migratory Stream* zu beobachten (Abbildung 6.8 (B): untere Pfeile: Metaphase, oberer Pfeil: Telophase, (C) Anaphase).



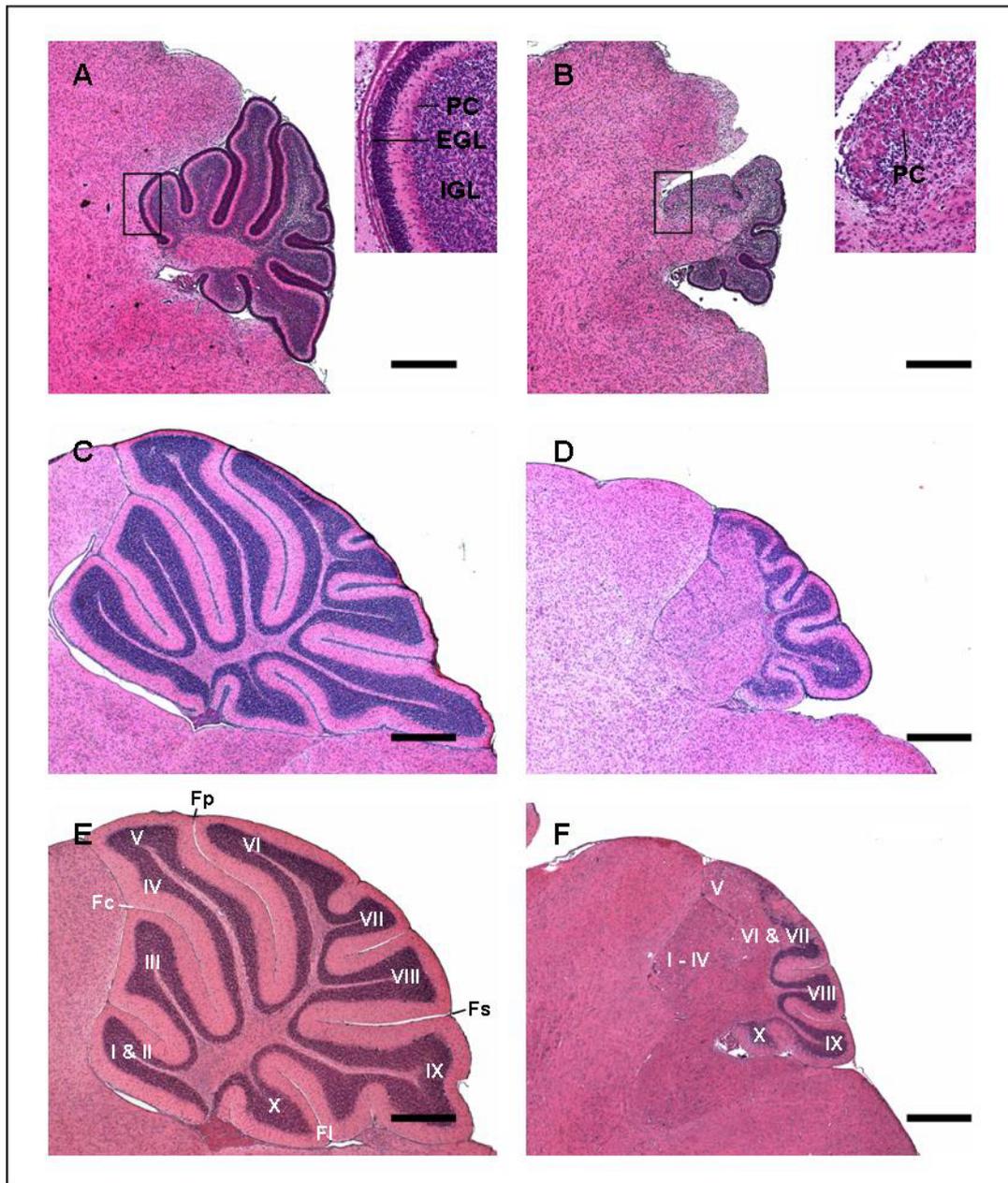
**Abbildung 6.8: Entwicklungsstadium P1 (sagittale Schnittebene).** (A) Stereomikroskopische Übersichtsaufnahme des Gehirns, primäre Vergrößerung 1,2X; Größenbalken 1 mm. (B), (C) *Rostral Migratory Stream* (RMS), primäre Vergrößerung 100X, Größenbalken 10  $\mu$ m, Pfeil: Mitotische Zellen. (D), (E) Cerebellum, primäre Vergrößerung 10X, primäre Vergrößerung Insert 40X, Größenbalken 200  $\mu$ m. EGL: External Granular Layer, IGL: Inner Granular Layer, PC: Purkinje-Zellschicht, Fc: Fiss. preculminata, Fp: Fiss. prima, Fs: Fiss. secunda, Fl: Fiss. posterolateralis.

Im Entwicklungsstadium P7 (Abbildung 6.10) setzen sich die Befunde aus P1 deutlich fort: die Entwicklung des posterioren Teils des Kleinhirns im Knockout ist verhältnismäßig ungestört, wenn auch die EGL nicht den gleichen Durchmesser und die Lobuli nicht den Umfang des Wildtyps annehmen. In diesem Teil ist eine intakte Laminierung erkennbar, zusammengesetzt aus EGL, Purkinje-Zellschicht und IGL. Dagegen fehlt im anterioren Knockout-Kleinhirn auf Grund einer nur spärlich vorhandenen EGL die IGL-Ausprägung. Das Kleinhirn expandiert nicht und damit ist einerseits die Foliation, andererseits die Laminierung der Zellschichten gestört. Da die Expansion vom normalen Entwicklungsschema abweicht, verteilen sich die Purkinje-Zellen nicht in einem Monolayer, sondern nehmen eine ektopische, mitunter auch herdförmige Position ein.

Diese Störungen der Kleinhirnentwicklung im Knockout setzen sich über die Zeitpunkte P14 und P21 (Abbildung 6.10) fort, so dass am Ende der postnatalen Kleinhirnentwicklung zusammenfassend folgende histologische Befunde bestehen: die Foliation ist vor allem im anterioren Bereich (Abbildung 6.10 (E),(F)) gestört. Betroffen sind die Lobuli I-V, dagegen sind die Lobuli VI-X zu identifizieren, nehmen aber nicht das Ausmaß der entsprechenden Wildtyp-Lobuli an. Die Laminierung der Schichten Str. moleculare, Str. ganglionare und Str. granulare ist im anterioren Bereich nicht durchgängig und Purkinje-Zellen sind ektopisch. Str. moleculare und Str. granulare differenzieren sich nicht. Das Großhirn der Knockout-Mäuse entwickelt sich dagegen ohne Auffälligkeiten.



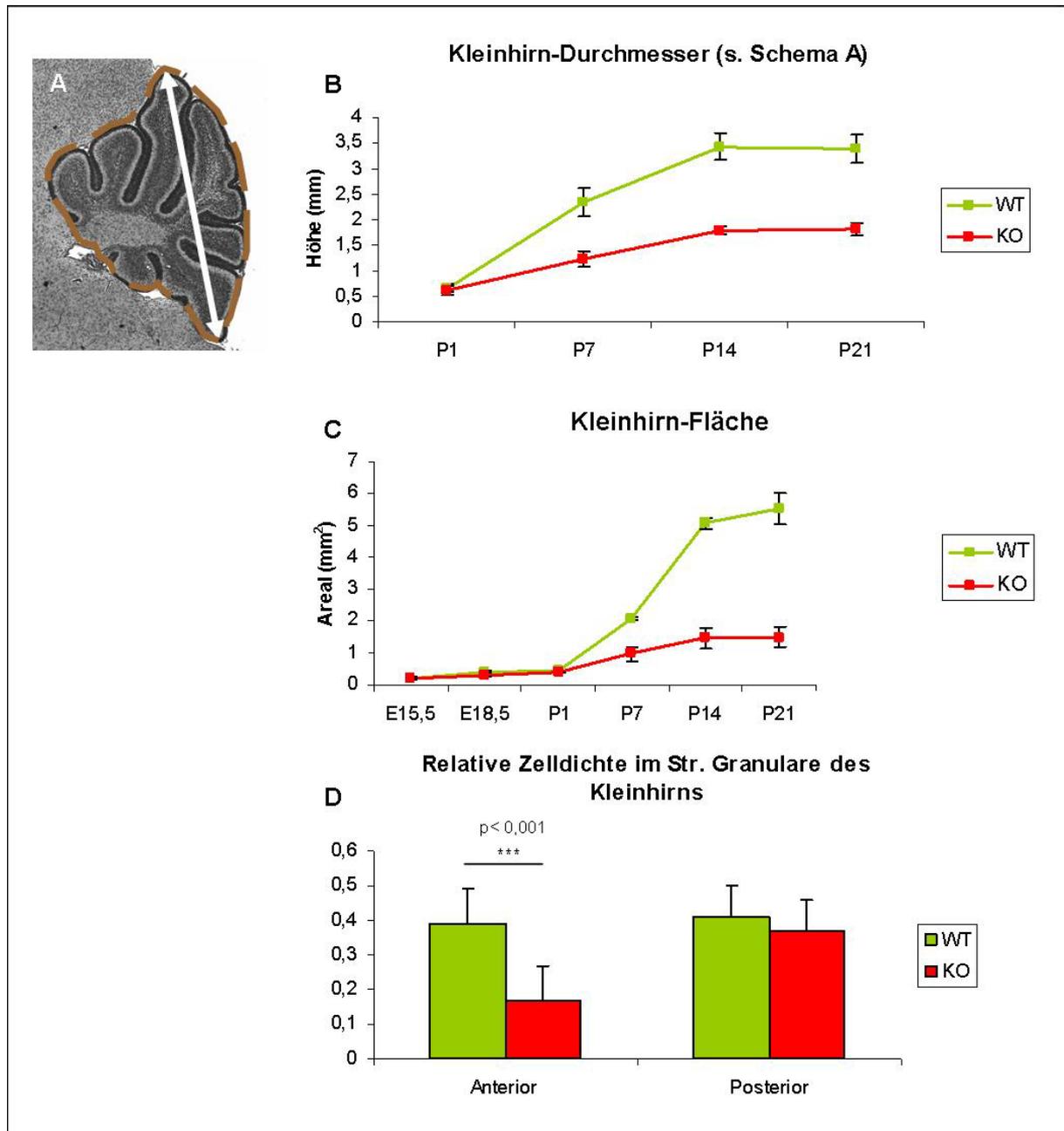
**Abbildung 6.9: Mitosen im EGL:** Vergrößerung 100X, Größenbalken 10 µm. EGL: External Germinal Layer. Pfeil: Mitotische Zelle.



**Abbildung 6.10: Entwicklungsstadien P7 bis P21.** (A) P7 Wildtyp (B) P7 Knockout. (C) P14 Wildtyp, (D) P14 Knockout. (E) P21 Wildtyp, (F) P21 Knockout. Primäre Vergrößerung 4X, Insert 20X, Größenbalken 0,5 mm. PC: Purkinje-Zellen, EGL: External Germinal Layer, IGL: Inner Granular Layer. Fc: Fiss. preculminata, Fp: Fiss. prima, Fs: Fiss. secunda, FI: Fiss. posterolaterale. Römische Zahlen: Nomenklatur der Foliation nach Larsell 1952.

Um den Größenunterschied zwischen dem offensichtlich kleineren Knockout-Kleinhirn und dem des Wildtyps zu quantifizieren, wurden morphometrische Analysen durchgeführt: die Spannweite zwischen Lobulus V und IX wurde zum Zeitpunkt P1, P7, P14 und P21 gemessen und die Flächenmaße eines sagittalen Kleinhirnschnittes zu den Zeitpunkten E15,5; E18,5; P1; P7; P14 und P21 ermittelt. In Abbildung 6.11 wird dargestellt, dass der gewählte Durchmesser („Spannweite“) des Wildtyp-

Kleinhirns beinahe doppelt so groß wie die des Knockouts ist. Die Flächenmessung ergab ein vierfach größeres Kleinhirnareal im Wildtyp. Diese Größenunterschiede waren in beiden Messungen ab P7 festzustellen. Damit bestätigt der histologische Befund den makroskopischen Befund der massiven cerebellären Hypoplasie.



**Abbildung 6.11: Morphometrische Analysen:** (A) Messmethoden für die Berechnung Kleinhirndurchmesser (Pfeil) und -Fläche (gestrichelte Linie). (B) Kleinhirndurchmesser, (C) Kleinhirnfläche, (D) Die relative Zelldichte im Str. granulare bezeichnet den Anteil der Zellstrukturen an der Gesamtfläche ermittelt mit der Auswertungssoftware ImageJ, WT: Wildtyp, KO: Knockout.

Eine Möglichkeit zur Darstellung der ungeordneten Organisation des anterioren Kleinhirnbereiches im Knockout-Tier ist die Quantifizierung der Körnerzellen im Str. granulare mit Hilfe der Software ImageJ (Auswertungsmethode von Leung 2004) (Abbildung 6.11(D)). Die relative Anzahl der Körnerzellen in den Knockout-Mäusen ist sowohl in posterioren als auch in anterioren Kleinhirn-Bereich niedriger als in den Wildtyp-Tieren, im anterioren Bereich laut Students-t-Test sogar hoch signifikant.

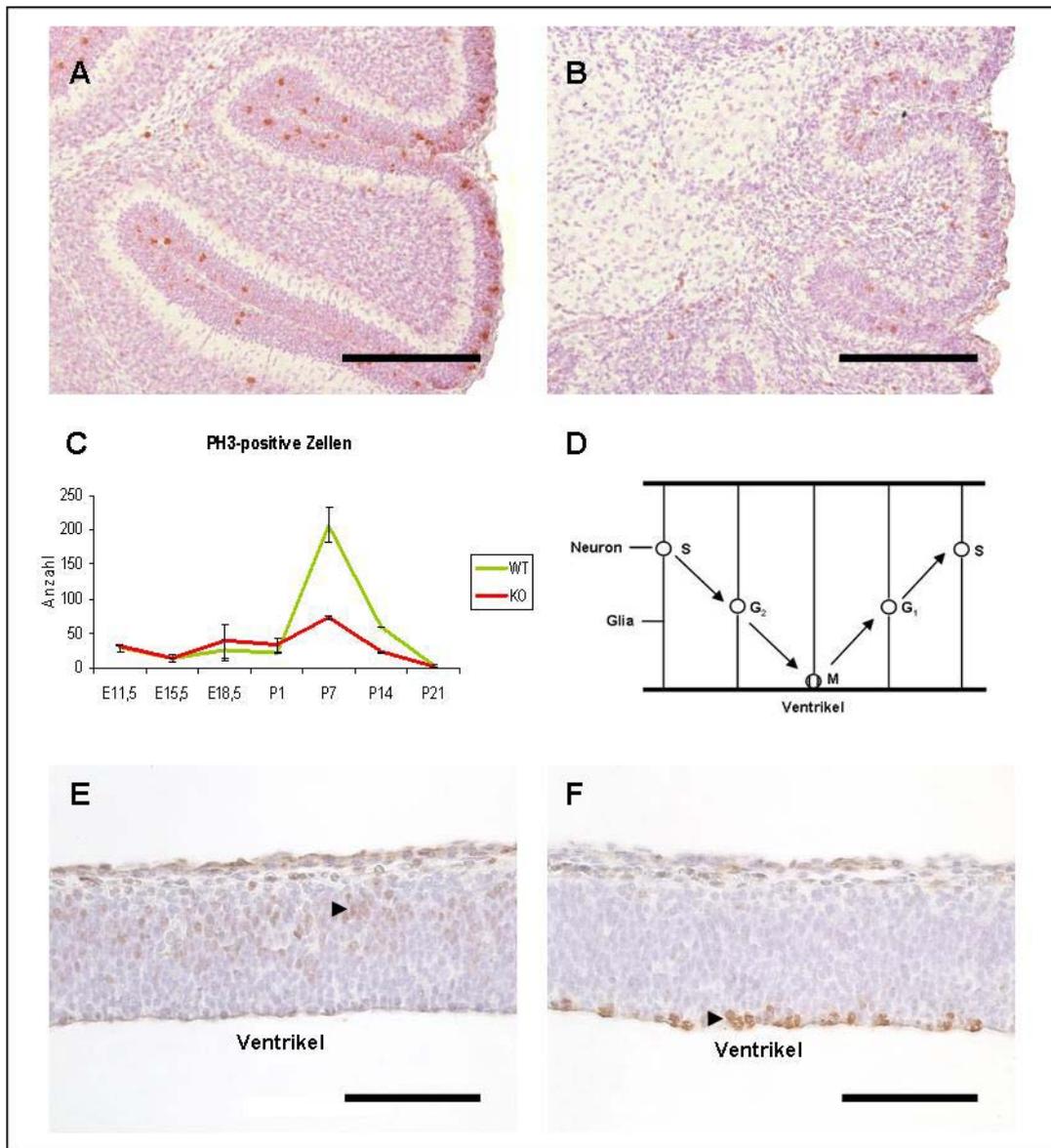
### 6.3.1 Untersuchung auf Altersdegeneration

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, ist Thioredoxin Reduktase1 ein Teil des oxidativen Schutzsystems des Organismus, und da neuronales Gewebe besonders sensitiv auf oxidativen Stress reagiert (Contestabile 2001), sollte mit der histologischen Untersuchung 2 Jahre alter Txnrd1 Knockout-Mäuse geklärt werden, ob die Ausschaltung von Txnrd1 die Degeneration des Gehirngewebes forciert. Dies konnte bei der Altersdegenerations-Analyse jedoch nicht beobachtet werden.

## 6.4 Immunhistochemische Untersuchung der gehirnspezifischen Txnrd1-Knockout Mäuse

Um festzustellen, ob ein gestörtes Proliferationsverhalten für den in der HE-Färbung beobachteten Phänotyp verantwortlich ist, wurden immunhistochemische Analysen für die Proliferationsmarker Phospho-Histon H3 (PH3), 5'-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) und *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) durchgeführt. Jeder dieser Proliferationsmarker markiert eine unterschiedliche Phase der Zellteilung. Anti-PH3 detektiert Phosphorylierung von Histon H3, während der Chromosomen-Kondensation der Mitose und Meiose (Hendzel 1997). Bei der Analyse mit Anti-PH3 (Abbildung 6.12 (A)-(C)) wurde ein Unterschied in der Anzahl mitotischer Zellen vor allem im EGL zum Entwicklungszeitpunkt P7 und P14 ermittelt. Am P7 ist die Anzahl PH3-positiven Zellen in der EGL der Wildtyp-Tiere mehr als 2,5-fach höher als in den Knockout-Tieren. BrdU ist ein Thymidin-Homolog und wird in die DNA während der DNA-Synthese in der S-Phase der Mitose eingebaut (Schutte 1987). Die einzige Diagnose, die mit anti-BrdU festgestellt werden konnte, war, dass die sogenannte interkinetische Kernwanderung im Cortex cerebri des Knockout-Tieres ungestört ist

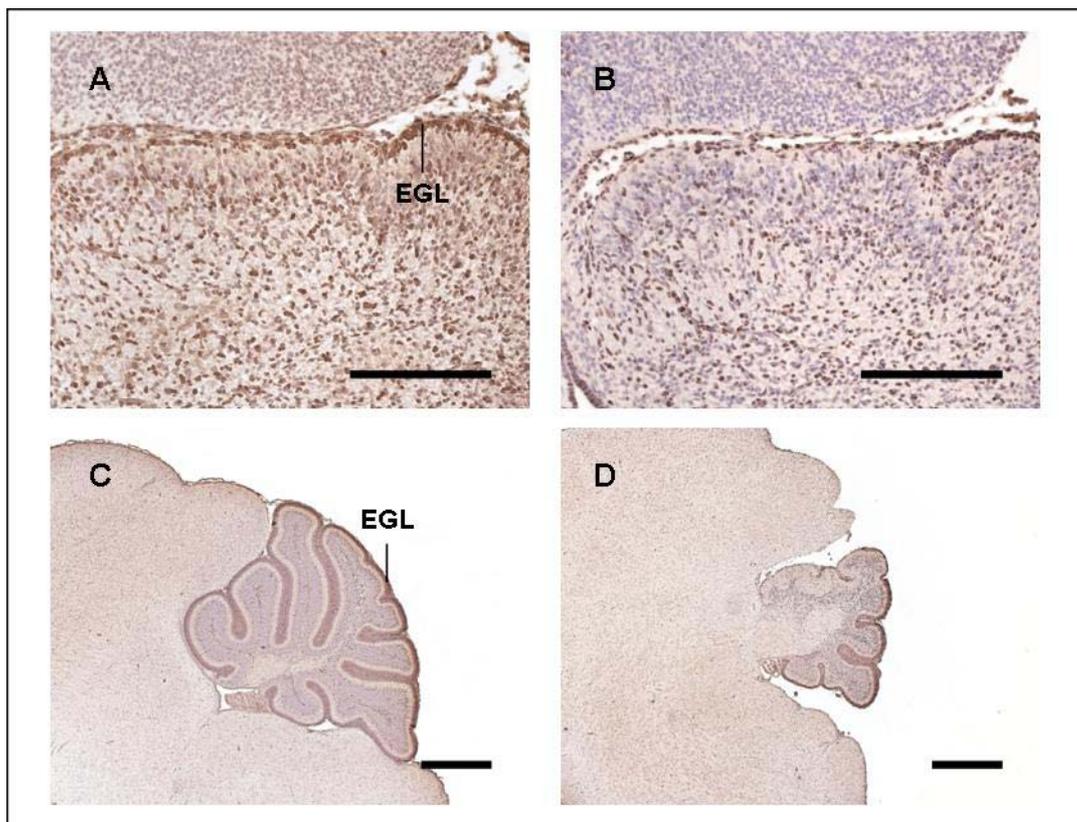
(Abbildung 6.12 (D)), was die normale Entwicklung des Großhirns im *Txnrd1*-Knockout erklärt. Die interkinetische Kernwanderung ist ein Phänomen, bei dem die Neuronen-Kerne am Anfang der  $G_1$ -Phase sich im Zytoplasma via Glia-Zellen in Richtung Kortikalplatte bewegen, dort in der S-Phase verweilen und sich während der  $G_2$ -Phase wieder zurück zur ventrikulären Seite des Cortex bewegen, um dort die M-Phase zu vollziehen (Sauer 1959, Ueno 2006).



**Abbildung 6.12: Immunhistochemische Untersuchung mit Anti-Phospho-Histon H3 (PH3) und Anti-5'-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU).** (A) Cerebellum P7 Anti-PH3, Wildtyp, (B) Cerebellum P7 Anti-PH3, Knockout. Primäre Vergrößerung 20X, Größenbalken 200  $\mu\text{m}$ . (C) Quantifizierung der Anti-PH3-positiven Zellen im Kleinhirn zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten. (D) Ablauf der interkinetischen Kernwanderung (Modifiziert nach Ueno 2006). (E) Cortex cerebri E11,5 Anti-BrdU, Knockout. (F) Cortex cerebri E11,5 Anti-PH3 Knockout. Primäre Vergrößerung 40X, Größenbalken 100  $\mu\text{m}$ , Pfeil: Immunhistochemisch positive Zellen.

PCNA ist eine Komponente des DNA-Replikationsgeschehens und fungiert als Hilfsprotein der DNA-Polymerase  $\delta$  (Kelman 1997). In der  $G_1$ -Phase und S-Phase ist PCNA im Zellkern, in der  $G_2$ -Phase sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma und in der M-Phase im Zytoplasma lokalisiert (Foley 1993). Da Körnerzellen nur sehr wenig Zytoplasma besitzen, sind die Veränderungen der Expressionsorte von PCNA dort schwer nachvollziehbar. Aus der Abbildung 6.13 wird die nesterartige Ausprägung der EGL zum Zeitpunkt P1, die bereits in der HE-Analyse beschrieben wurde, bestätigt. Es wird deutlich, dass wenige proliferierende Zellen in der EGL vorhanden sind (Abbildung 6.13 (A), (B)). Abbildung 6.13 (C) und (D) stellen den Zustand zum Zeitpunkt P7 dar, der die Beobachtung aus der Analyse der HE-gefärbten Schnitte bestätigt.

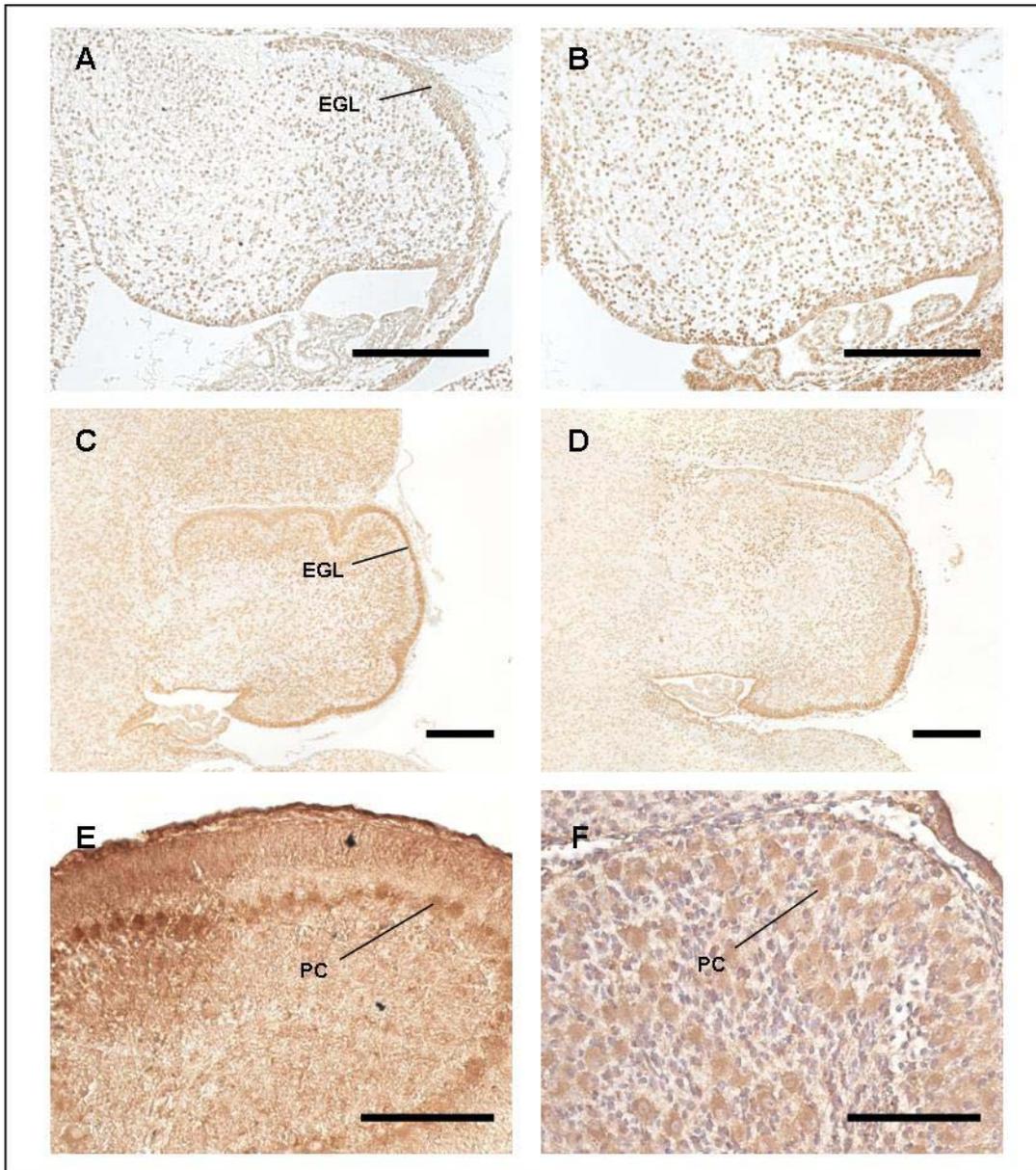
Interessanterweise ist das Proliferationsverhalten im Kleinhirn des Knockout-Tieres erst zu einem späteren Zeitpunkt herabgesetzt als zu dem Untersuchungszeitpunkt, an dem morphologische Unterschiede zwischen Knockout und Wildtyp auftreten.



**Abbildung 6.13: Immunhistochemische Untersuchung mit Anti-*Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA).** (A) Anteriores Kleinhirn, P1, Wildtyp. (B) Anteriores Kleinhirn, P1, Knockout-Tier. Primäre Vergrößerung 20X, Größenbalken 200  $\mu$ m. (C) P7, Wildtyp. (D) P7, Knockout-Tier. Primäre Vergrößerung 4X, Größenbalken 0,5 mm. EGL: External Germinal Layer.

---

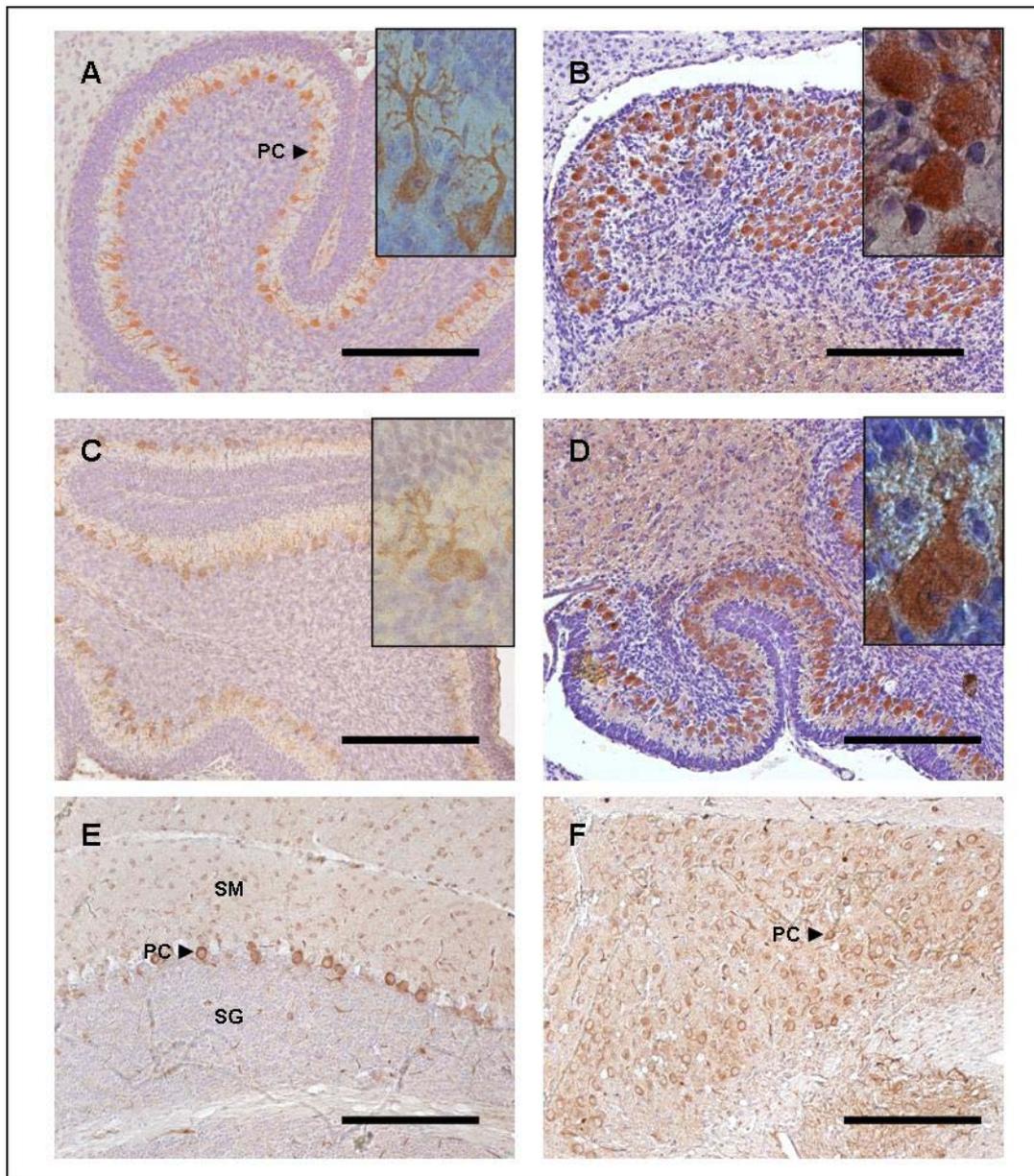
Da die Proliferationsmarker offen legen, dass der Zellzyklus im Txnrd1-Knockout gestört ist, wurden entsprechende Marker verwendet, um eine genauere Aussage über die Störpunkte in der Mitose treffen zu können (Abbildung 6.14). CyclinD2 ist ein Protein im Zellkern, das den Übergang von  $G_0$  zu  $G_1$  einleitet, in dem es für den Zellzyklus wichtige Cyclin-abhängige Kinasen aktiviert (*Cyclin dependent kinases/Cdk*) (Sherr 1999). Aus der immunhistochemischen Färbung mit Anti-CyclinD2 geht hervor, dass es zum Zeitpunkt E15,5 keinen Unterschied im Ablauf des Zellteilungsprozesses zwischen Wildtyp und Knockout gibt (Abbildung 6.14 (A), (B)). Zum Zeitpunkt P1 ((C), (D)) ist dort, wo EGL-Zellen vorhanden sind, in beiden Genotypen die gleiche Zellteilungsaktivität. Da die EGL im Knockout dünner und an manchen Stellen im anterioren Kleinhirn kaum vorhanden ist, kommt es an diesen Stellen entsprechend zu einer geringeren Anzahl von Anti-CyclinD2-positiven Zellen.



**Abbildung 6.14: Immunhistochemische Färbung mit Anti-CyclinD2 und Anti-p21.** (A) Anti-CyclinD2, E15,5 Wildtyp, (B) Anti-CyclinD2, E15,5 Knockout. Primäre Vergrößerung 20X, Größenbalken 200  $\mu$ m. (C) Anti-CyclinD2, P1 Wildtyp, (D) Anti-CyclinD2, P1 Knockout. Primäre Vergrößerung 10X, Größenbalken 200  $\mu$ m. (E) Anti-p21, P7 Wildtyp, (F) Anti-p21, P7 Knockout. Primäre Vergrößerung 40X, Größenbalken 100  $\mu$ m. EGL: External Germinal Layer, PC: Purkinje-Zellen.

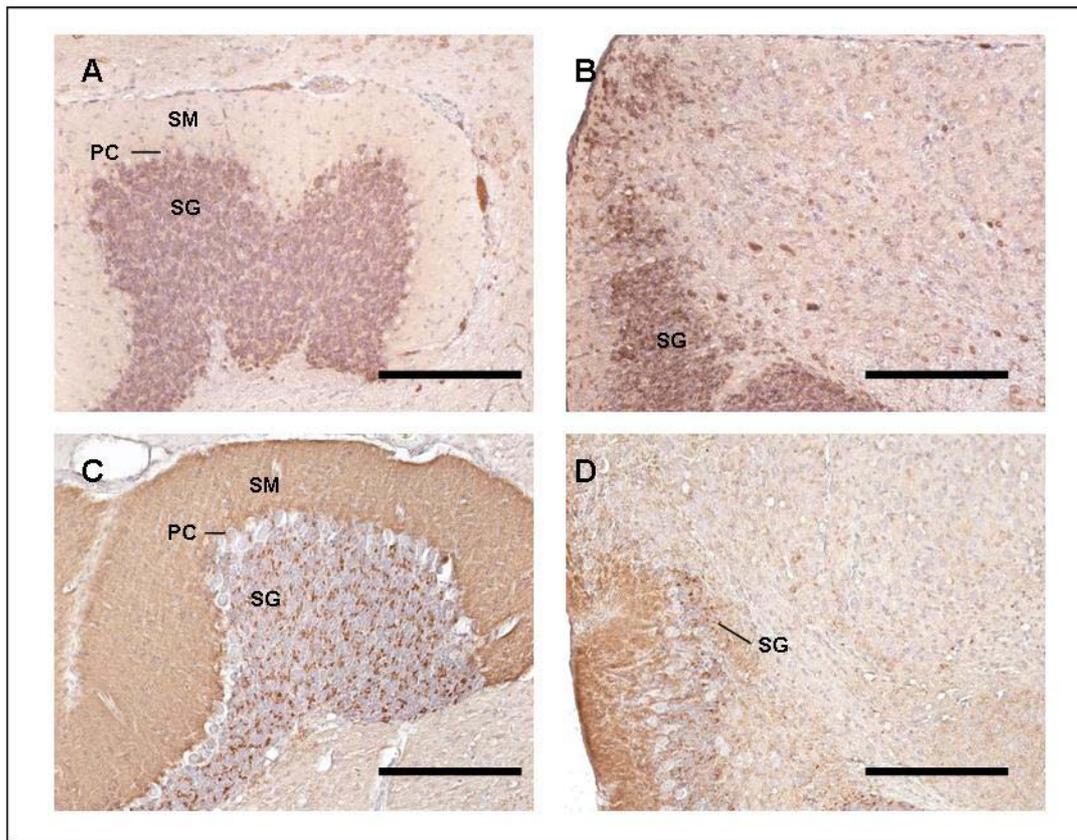
Da die Störung der Proliferationsrate an einer Überexpression eines Cdk-Inhibitors wie p21 (vor allem exprimiert in Purkinje-Zellen) liegen könnte, wurde eine immunhistochemische Färbung mit Anti-p21 durchgeführt. p21 inhibiert den Übergang von  $G_0$ - zur  $G_1$ -,  $G_1$ - zur S- sowie  $G_2$ - zur M-Phase (Pestell 1999). Aus Abbildung 6.14 (E), (F) geht hervor, dass die Expression in den Purkinje-Zellen

beider Genotypen gleich ist, die Lokalisation der Purkinje-Zellen (wie bereits in den HE-Untersuchungen beschrieben) jedoch in den Knockout-Tieren ektopisch ist. Für die Darstellung und genauere Untersuchung der einzelnen Zelltypen wurden zelltypische Marker für die Immunhistochemie verwendet. Purkinje-Zellen werden mit Hilfe des Antikörpers Anti-Calbindin (*Calcium binding protein*) detektiert (Abbildung 6.15 (A)-(D)) (de Talamoni 1993). Die in der HE-Färbung bereits beobachtete Ektopie der Purkinje-Zellen im anterioren Bereich des Cerebellum im Knockout wird deutlicher dargestellt. Im posterioren Bereich ähnelt die Lokalisierung der Purkinje-Zellen dem Wildtyp, sie positionieren sich jedoch nicht gänzlich in einem Monolayer. Ein anderer Befund ist die Feststellung der gestörten Arborisation der Purkinje-Zell-Dendriten im anterioren Bereich (Abbildung 6.15 (B), Insert)). Ein weiterer Antikörper für die Darstellung der Purkinje-Zellen ist Anti-GAD67 (Abbildung 6.15 (E), (F)), welcher speziell GABA-positive (Gamma Amino-Buttersäure) Zellen zu markieren vermag. Zu dieser Gruppe gehören Purkinje-, Golgi-, Stern- und Korbzellen (Batini 1990). Auch hier wird die Purkinje-Zell-Ektopie im anterioren Cerebellum des Knockout-Tieres bestätigt.



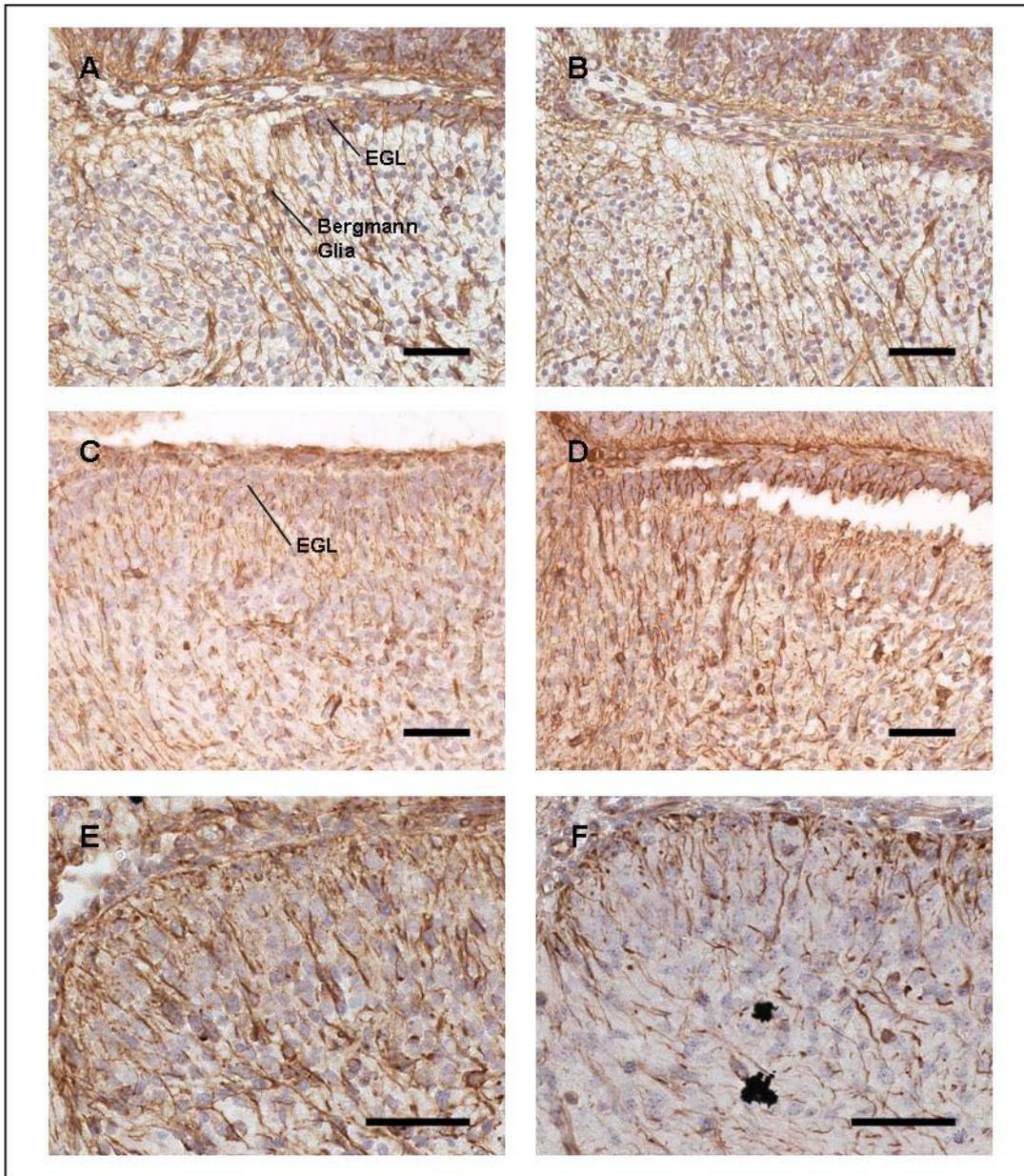
**Abbildung 6.15: Immunhistochemische Untersuchung mit Anti-Calbindin und Anti-GAD67.** (A), (C) Anti-Calbindin, Cerebellum, P7 Wildtyp. (B), (D) Anti-Calbindin, Cerebellum, P7 Knockout. (A), (B) Anterior. (C), (D) Posterior. (E), (F) P21, Anti-GAD67, Anteriores Cerebellum. (E) Wildtyp, (F) Knockout. Primäre Vergrößerung 20X, Insert 100X, Größenbalken 200 µm. PC: Purkinje-Zellschicht, SM: Str. moleculare, SG: Str. granulare.

Mit Anti-NeuN wurden postmitotische Neurone der Str. granulare dargestellt (Abbildung 6.16 (A), (B)) (Lind 2005). Zum Zeitpunkt P21 ist die Proliferation der EGL abgeschlossen und die daraus entstandene Körnerzellen sind nach innen gewandert und haben das Str. granulare gebildet. Als Folge der dünnen EGL im anterioren Teil des Kleinhirns im Knockout-Tier entsteht in diesem Bereich keine geordnete Neuronenschicht.



**Abbildung 6.16: Immunhistochemische Untersuchung mit Anti-NeuN und Anti-vGlut.** (A) Anti-NeuN, P21, Anteriores Cerebellum, Wildtyp. (B) Anti-NeuN, P21, Anteriores Cerebellum, Knockout. (C) Anti-vGlut, P21, Anteriores Cerebellum, Wildtyp. (D) Anti-vGlut, P21, Anteriores Cerebellum, Knockout. Primäre Vergrößerung 20X, Größenbalken 200 µm. SM: Str. moleculare, PC: Purkinje-Zellschicht, SG: Str. granulare.

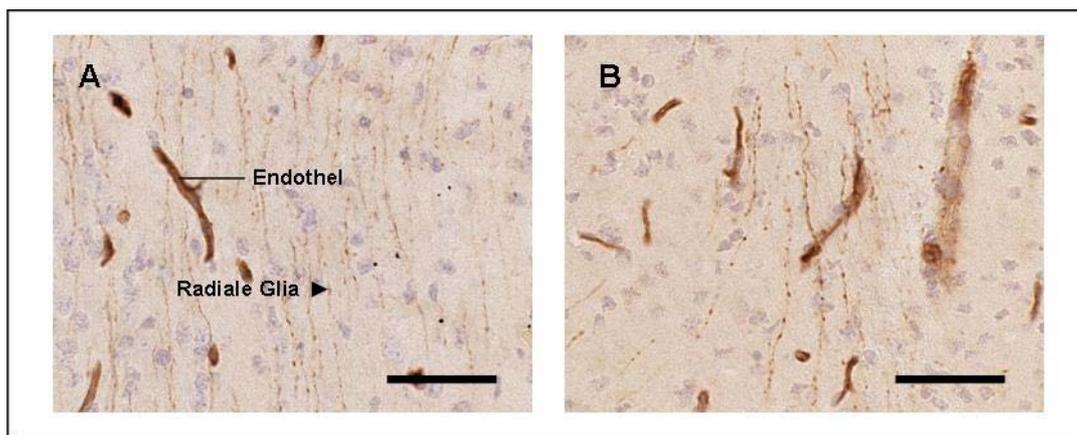
Der Antikörper Anti-vGlut (vesikulärer Glutamat-Transporter) stellt zusätzlich zu den Körnerzellen die im Str. moleculare lokalisierten Parallelfasern des postnatalen Kleinhirns dar (Miyazaki 2003). Aus der Abbildung 6.16 (C), (D) geht hervor, dass kein Aufbau von Str. moleculare und Str. granulare im anterioren Kleinhirn des Knockout-Tieres im Laufe der postnatalen Entwicklung stattfindet.



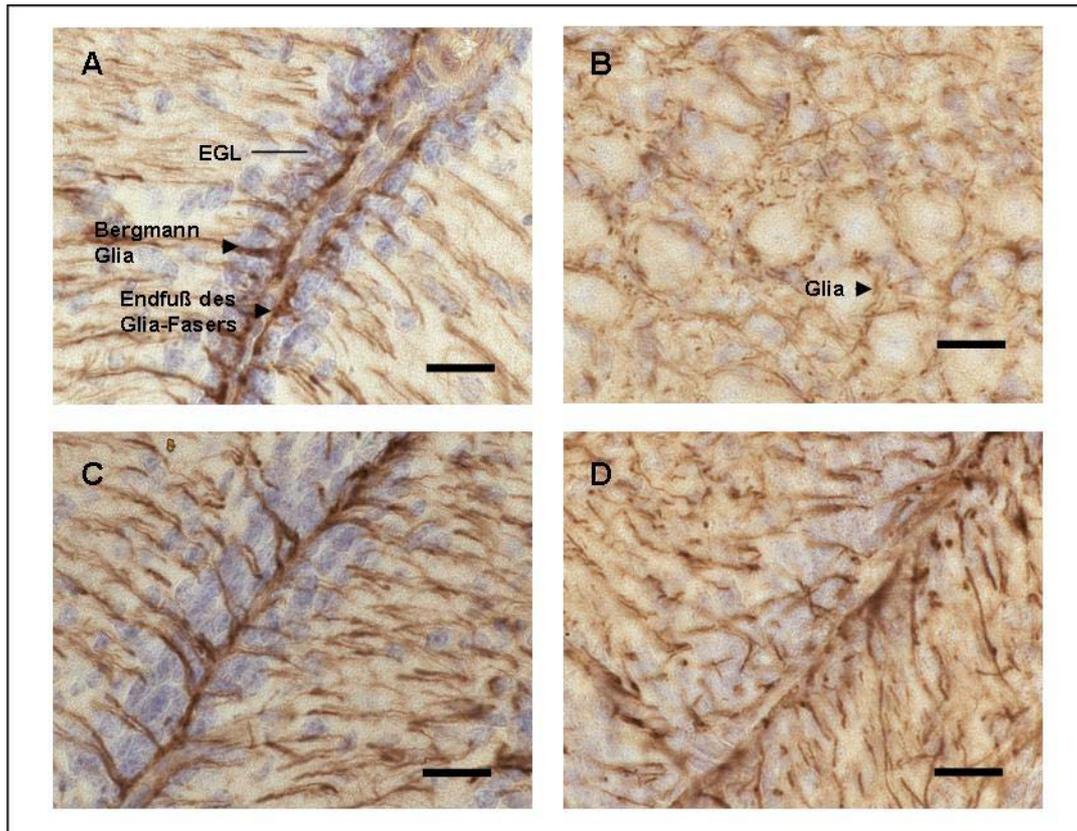
**Abbildung 6.17: Immunhistochemische Untersuchung mit Anti-Nestin.** (A), (C), (E) Wildtyp, anteriores Cerebellum zum Zeitpunkt E15,5 (40X); E18,5 (40X); P1(63X). Größenbalken 50 µm. (B), (D), (F) Knockout, anteriores Cerebellum zum Zeitpunkt E15,5 (40X); E18,5 (40X); P1(63X). Größenbalken 50 µm.

Mit dem Antikörper Anti-Nestin (Abbildung 6.17) werden intermediärfilament-Proteine neuronaler und vor allem glialer Vorläuferzellen dargestellt (Tohyama 1992). Die Expression in den neuronalen Vorläuferzellen wird herunterreguliert, wenn aus proliferierenden Stammzellen postmitotische Neuronen entstehen (Zimmermann 1994). Zu den glialen Vorläuferzellen zählt auch die Bergmann-Glia aufgrund der bereits in der Einleitung beschriebenen mitotischen Aktivität. Zum frühen Embryonalzeitpunkt E11,5 sind sowohl die Bergmann-Glia-Faser als auch die Zellen

des ventrikulären Neuroepithels Nestin-positiv. Zu diesem Zeitpunkt sind keine Expressionsunterschiede bezüglich Nestin zwischen Wildtyp und Knockout sichtbar. Zum Zeitpunkt E15,5 ((A), (B)) sowie E18,5 ((C), (D)) wird die radiale Ausrichtung der für die Neuronen-Migration essentiellen Bergmann Glia erkennbar. Ein Unterschied ist jedoch nicht zu verzeichnen. Zum Zeitpunkt P1 ((E), (F)) ist die Anzahl der Bergmann Glia im anterioren Kleinhirn des Knockout-Tieres verringert. Diese Gliazellen zeigen verkürzte Ausläufer und an manchen Stellen knäuelartige Aufwindungen. Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten bestätigten die Aussage Tohyamas (1992), dass die Expression von Nestin nur in vaskulären Zellen erhalten bleibt. Ein weiterer Befund ist die Darstellung der radialen Glia-Fasern im Cerebrum (Abbildung 6.18), die ein perlenkettenartiges Aussehen haben. Die radiale Glia im Cerebrum entspricht der Bergmann Glia im Cerebellum, interessanterweise wurde jedoch kein Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout bezüglich radialer Glia im Cerebrum gesehen.



**Abbildung 6.18: Immunhistochemische Untersuchung mit Anti-Nestin. Darstellung radialer Glia im Cerebrum.** P14, primäre Vergrößerung 63X, Größenbalken 50  $\mu\text{m}$ . (A) Wildtyp, (B) Knockout.



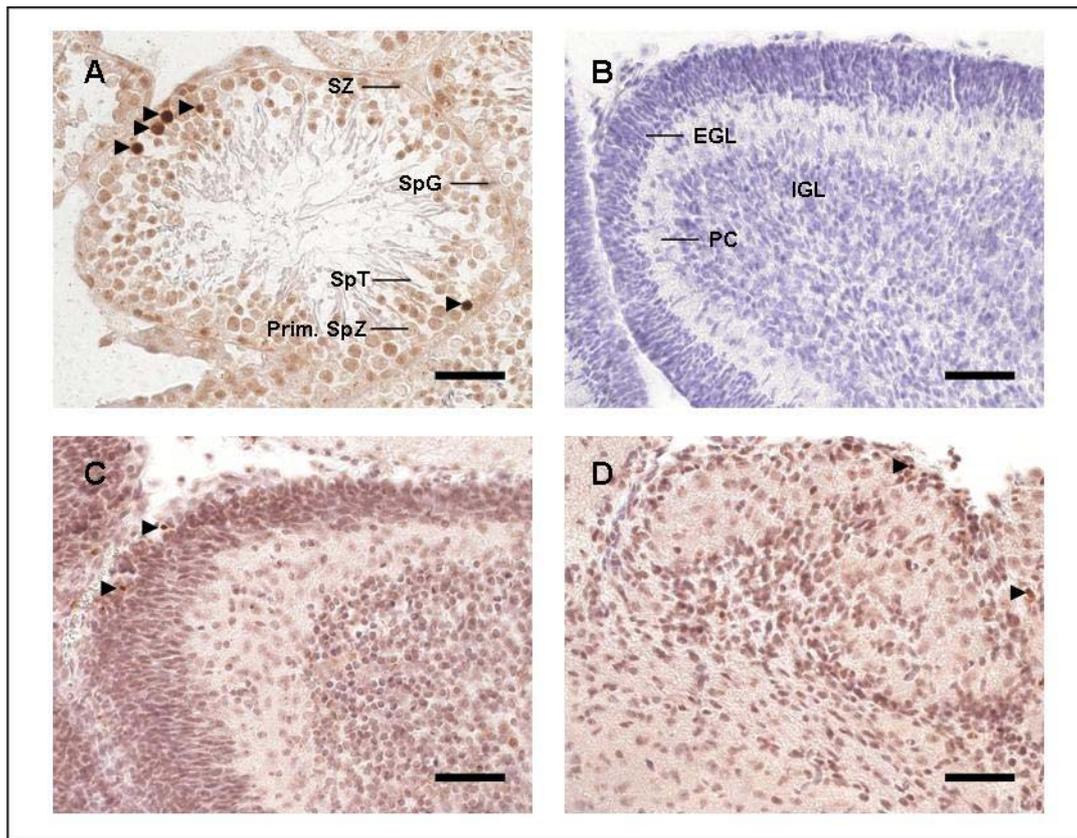
**Abbildung 6.19: Immunhistochemische Untersuchung mit Anti-GFAP.** (A) Wildtyp, anteriores Cerebellum. (B) Knockout, anteriores Cerebellum. (C) Wildtyp, posteriores Cerebellum. (D) Knockout, posteriores Cerebellum. P14, primäre Vergrößerung 100X, Größenbalken 10 µm.

Für die Darstellung der Bergmann Glia und von Astrozyten zu postnatalen Zeitpunkten ist der Antikörper Anti-GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) geeignet (Hatten 1982). Alle postnatalen Untersuchungszeitpunkte zeigten das gleiche Bild: die Bergmann Glia-Faser im posterioren Knockout-Cerebellum sehen denen des Wildtyps in ihrer radialen Ausrichtung ähnlich (Abbildung 6.19 (B), (D)), wenn auch in geringerer Dichte. Im anterioren Bereich des Kleinhirns gibt es erhebliche Entwicklungsdifferenzen zwischen Wildtyp und Knockout, wo die Glia-Fasern des Knockout-Tieres ungeordnet mit einer dünneren Faserstärke vorliegen. Damit wird die Aussage des Anti-Nestin Antikörpers unterstützt.

Zusammenfassend zeigen die immunhistochemischen Untersuchungen des gehirnspezifischen Txnrd1-Knockout Tieres, dass vor allem die Proliferation der Zellen des EGLs gestört ist, und dass die Purkinje-Zellen mit einer gestörten Arborisation ihrer Dendriten ektopisch im anterioren Cerebellum lokalisiert sind, weiterhin dass Str. moleculare und Str. granulare sich nicht bilden und dass sich die Bergmann Glia-Fasern ab P1 vor allem im anterioren Bereich eine gestörte Entwicklung durchlaufen.

#### 6.4.1 Apoptose-Detektion

Zur Klärung, ob der Ursprung des ausgedünnten EGLs im Knockout in einem erhöhten Zelltod dessen Zellen zu suchen ist, wurden apoptotische Zellen detektiert. Bei dem programmierten Zelltod (Apoptose) entstehen DNA-Strangbrüche, die durch die enzymatische Markierung von freien 3'-OH-Enden mit modifizierten Nukleotiden im Gewebeschnitt farblich dargestellt werden können (Gavrieli 1992). Bis hin zur Entwicklung des reifen Gehirns gehen bis zu etwa 50 % der Neuronen durch Apoptose zu Grunde. Im Kleinhirn der Maus, zum Beispiel erfolgt physiologisch eine hohe Apoptoserate der mitotisch aktiven Körnerzellen in der äußeren EGL zwischen P5 und P9 (Wood 1993). Folgende Entwicklungsstufen wurden untersucht: E11,5; E15,5; E18,5; P1 und P7. Als Positivkontrolle wurde Hodengewebe genutzt, da Apoptose in den Keimzellen ein allgemein gut darstellbarer zellulärer Vorgang ist (Clermont 1972). Wie in Abbildung 6.20 für P7 dargestellt, zeigten die Zellen des EGL im Knockout-Tier zu keinem dieser Zeitpunkte eine erhöhte Apoptose-Rate im Vergleich zum Wildtyp.

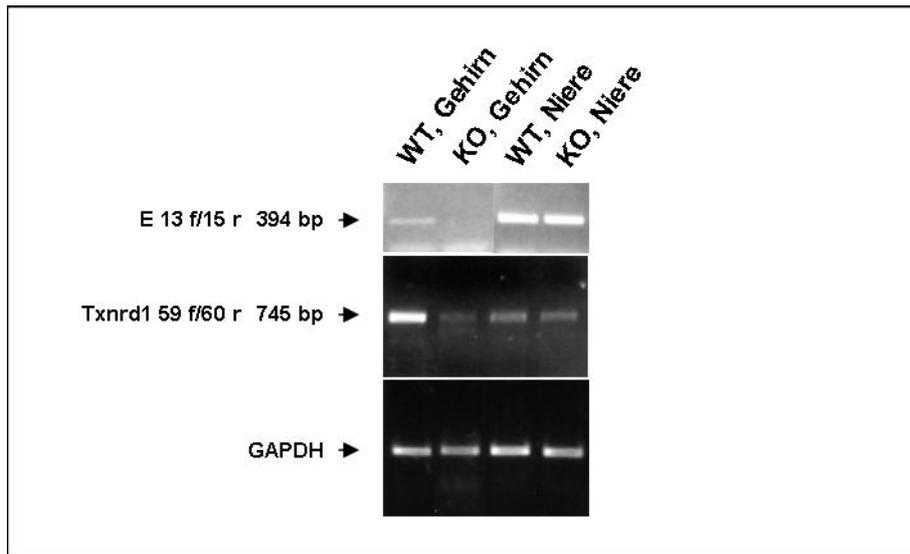


**Abbildung 6.20: Apoptose-Detektion zum Untersuchungszeitpunkt P7 der Entwicklung.** Primäre Vergrößerung 40X, Größenbalken 50  $\mu$ m. (A) Positivkontrolle im Hoden. Pfeile: Apoptose-positive Zellen, SpG: Spermatogonien, SZ: Sertoli-Zelle, Prim. SpZ: Primärer Spermatozyt, SpT: Spermatisden. (B) Negativ-Kontrolle, anteriores Cerebellum: hier wurde der primäre Antikörper nicht verwendet, EGL: External Germinal Layer, PC: Purkinje-Zellschicht, IGL: Inner Granular Layer. (C) Wildtyp, anteriores Cerebellum. Pfeile: Apoptose-positive Zellen. (D) Knockout, anteriores Cerebellum. Pfeile: Apoptose-positive Zellen.

## 6.5 Semiquantitative RT-PCR

Zur Überprüfung der Herabsetzung des Txnrd1-Expressionsniveaus auf mRNA-Ebene im Gehirngewebe wurde eine semiquantitative RT-PCR mit Gehirn-, und als Kontrolle, Nierengewebe aus adulten Mäusen durchgeführt. Für diese Analyse wurde zum einen ein Primerpaar verwendet, welches das im Knockout entfernte Exon 15 detektiert (Txnrd1 E13f/ Txnrd1 E15r) und zum anderen ein Primerpaar, das ein Produkt von Exon 5 bis Exon 11 amplifiziert (Txnrd1 59f/ Txnrd1 60r), welches im Knockout die trunkeierte Txnrd1-mRNA und im Wildtyp sowohl die Wildtyp-Sequenz der Txnrd1-mRNA als auch die trunkeierte Form darstellt. Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR (Abbildung 6.21) zeigten, dass die Expression von Exon

15 im Gehirn von Txnrd1-Knockout unterbunden ist, es im Nierengewebe dagegen weiterhin exprimiert wird. Weiterhin geht hervor, dass die Expression im Gehirn des Knockout-Tieres der trunkierten Form der Txnrd1-mRNA geringer als in der Niere ist und dass im Wildtyp-Gehirn dagegen mehr Wildtyp-Sequenz und trunkierte Txnrd1-mRNA als in der Niere vorliegt. Damit wurde auch molekularbiologisch nachgewiesen, dass der gehirnspezifische Knockout von Txnrd1 auf mRNA-Ebene funktioniert.

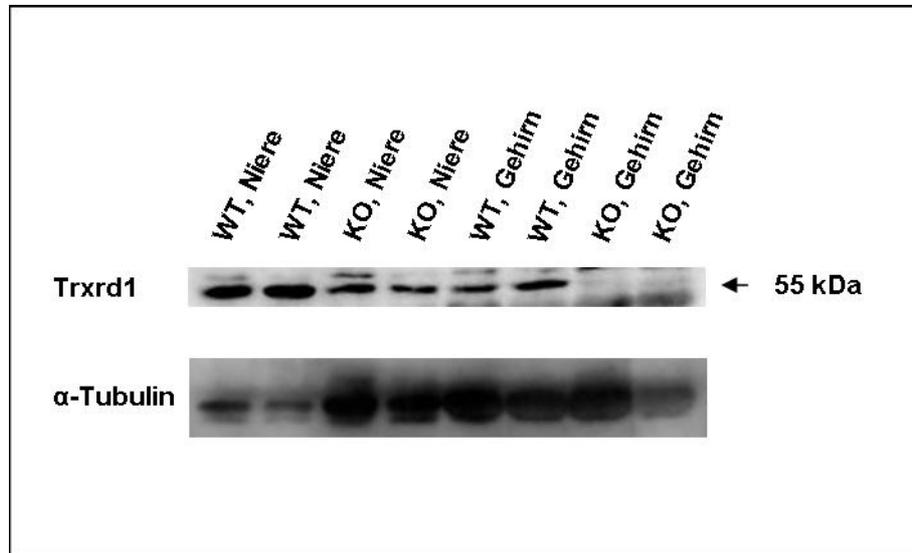


**Abbildung 6.21: Semiquantitative RT-PCR.** E13f/15r amplifiziert ein Produkt von Exon 13 bis Exon 15. Txnrd1 59f/60r amplifiziert ein Produkt von Exon 5 bis Exon 11 und stellt die trunkierte Form von Txnrd1 dar. Als Lade-Kontrolle wurde ein Primerpaar für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. WT = Wildtyp, KO = Knockout.

## 6.6 Western Blot

Um den gehirnspezifischen Txnrd1-Knockout zusätzlich auf der Protein-Ebene zu bestätigen, wurde ein Western Blot durchgeführt (Abbildung 6.22). Die zytoplasmatische Protein-Fraktion aus Gehirn- und Nierengewebe adulter Mäuse wurde extrahiert, auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und für die Inkubation mit einem Antikörper gegen Txnrd1 auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Als Kontrolle für die Protein-Beladung des Gels wurde ein Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin verwendet. Aus der Abbildung geht hervor, dass im Gehirn der Knockout-Mäuse keine Thioredoxin Reduktase1 nachgewiesen werden kann und dass es dagegen in

der Niere weiterhin produziert wird, wobei im Knockout-Gehirngewebe die Menge an Protein trotz stärkerer Beladung im Verhältnis zum Wildtyp leicht reduziert ist.



**Abbildung 6.22: Western Blot mit Anti-Txrd1.** Als Lade-Kontrolle wurde Anti- $\alpha$ -Tubulin verwendet. WT = Wildtyp, KO = Knockout, jeweils 2 Tiere.

## 6.7 DNA-Chip Analyse und Northern Blot

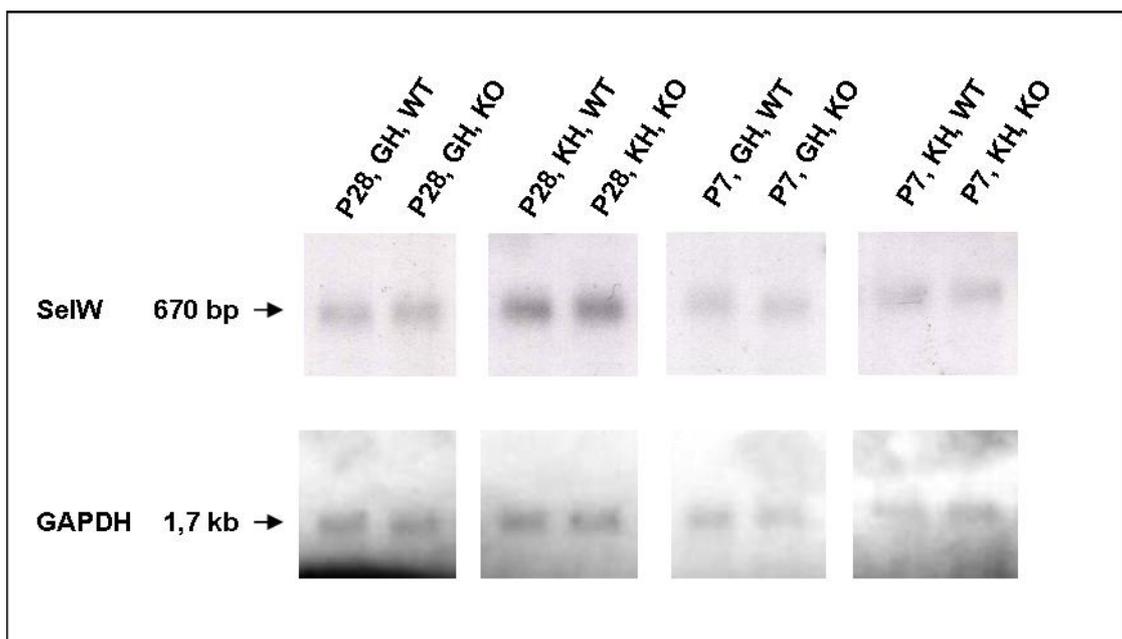
Für die Untersuchung, ob die Expression bestimmter Gene, die für die Entwicklung und physiologische Funktion des Kleinhirns von Bedeutung sind, im Knockout-Tier verändert ist, wurde freundlicherweise eine DNA-Chip Analyse vom Kooperationspartner Tomek Mijalski durchgeführt (Institut für Experimentelle Genetik, GSF, Neuherberg). Gehirngewebe (Cerebrum und Cerebellum) 14 Tage alter Knockout- und Kontrolltiere wurde verwendet. Folgende Gene waren im Knockout in ihrer Expression signifikant verändert und für die Gehirnentwicklung und –physiologie von Interesse:

**Tabelle 6.1: Differenziell exprimierte Gene im gehirnspezifischen Txnrd1-Knockout (P14)**

Genbezeichnung	Gen ID/ Funktion im Gehirn	Faktor
Thioredoxin Reduktase 1	Txnrd1/ siehe Einleitung	- 1,87
Angiotensinogen	Agt/ Aufrechterhaltung der Blut-Gehirn-Barriere; Neuronen-Apoptose-Schutz	+ 1,77
Zinc finger protein 1	Zic1/ Regulation der Neuronendifferenzierung im Kleinhirn	- 1,74
Selenoprotein W	SelW/ Antioxidanz	- 1,33
Adenylatzyklase 1	Adcy1/ cAMP-Signalkaskade; Neuroplastizität	- 1,42

Der Faktor gibt die Änderung des Expressionslevels des jeweiligen Genes in dem gehirnspezifischen Txnrd1-Knockout im Vergleich zum Wildtyp wieder. Ein positiver Faktor zeigt an, dass die Expression eines Gens erhöht war, während ein negativer Faktor für ein erniedrigtes Expressionslevel steht.

Diese Ergebnisse wurden daraufhin durch Northern Blots verifiziert. Das Gewebe wurde jedoch anders als das Gewebe für den DNA-Chip sowohl aus Tieren zum Zeitpunkt P7 und P28 entnommen und nach Groß- und Kleinhirn getrennt. RNA wurde extrahiert, in Gegenwart von denaturierendem Formamid in einem Agarosegel aufgetrennt, an einer Nitrocellulosemembran gebunden und mit einer radioaktiv markierten Einzelstrang-DNA-Sonde inkubiert.



**Abbildung 6.23: Northern Blot mit SelW-Sonde (Selenoprotein W).** Als Lade-Kontrolle wurde eine Sonde für spezifisch für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. GH = Großhirn, KH = Kleinhirn, WT= Wildtyp, KO = Knockout.

---

Es wurden Sonden für alle in Tabelle 6.1 genannten mRNA-Sequenzen bis auf *Txnrd1* hergestellt. Das einzig auswertbare Ergebnis wurde jedoch mit der Sonde für *SelW*-mRNA erzielt (Abbildung 6.23). Daraus geht hervor, dass mit dem Northern Blot kein Unterschied zwischen Knockout und Wildtyp detektiert werden konnte. Die Expression von *SelW* ist aber sowohl an P7 als auch an P28 im Kleinhirn höher als im Großhirn.

## **6.8 Real-Time PCR**

Eine andere Methode, um Gen Expressions-Veränderungen im Knockout quantitativ festzustellen, ist Real-Time PCR. Dafür wurde RNA aus Kleinhirnen von Knockout- und Kontrolltieren an P0 und P7 präpariert. Die eigentliche Durchführung der Real-Time PCR wurde freundlicherweise von der Kooperationspartnerin Cemile Jakupoglu (Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn) übernommen. Folgende Gene wurden für die Untersuchung ausgewählt:

**Tabelle 6.2: Differentiell exprimierte Gene im gehirnspezifischen Txnrd1-Knockout (P0, P7)**

Genbezeichnung	Funktion im Gehirn	Faktor
Txnrd1 (Thioredoxin Reduktase)	siehe Einleitung	P0: - (4,3 - 9,2) P7: - (1,8 - 158)
Nestin	siehe Einleitung	P7: + (1,6 - 2,4)
GFAP (Glial fibrillary acidic protein)	siehe 6.4. Exprimiert in Glia, Astrozyten	P0: - (1,7 - 2,9)
Pax6 (Paired box gene)	Postnatale Anregung (glialer) Zellen zur Neubildung von Neuronen	P0: - (1,2 - 1,5)
En1 (Engrailed)	Anlage des Kleinhirns	Kein signifikanter Unterschied
Tubb3 (Neuron spezifische Klasse III Tubulin)	Gen der Neuronen-Mikrotubuli	Kein signifikanter Unterschied
vGlut1 (vesikuläre Glutamat-Transporter)	Exprimiert in Körnerzellen, Parallelfaser im Str. moleculare	Kein signifikanter Unterschied
Gad67 (GABAerge Neurone)	Exprimiert in Purkinje-Zellen	Kein signifikanter Unterschied
CNP (Zyklische Nukleotid Phosphodiesterase)	Exprimiert in Oligodendrozyten	Kein signifikanter Unterschied

Der Faktor gibt die Änderung des Expressionslevels des jeweiligen Genes in dem gehirnspezifischen Txnrd1-Knockout im Vergleich zum Wildtyp wieder. Ein positiver Faktor zeigt an, dass die Expression eines Gens erhöht war, während ein negativer Faktor für ein erniedrigtes Expressionslevel steht.

Wie in Tabelle 6.2 und in der semiquantitativen RT-PCR dargestellt, ist die Expression von Txnrd1 im Gehirn der Knockout-Tiere deutlich herabgesetzt. Weiterhin geht hervor, dass im Knockout-Tier die Expression von Nestin an P7 erhöht ist, einem Zeitpunkt, zu der im Wildtyp die Expression abfällt. Als letzte Ergebnisse der Real-Time PCR ist die Runterregulierung von GFAP und im geringeren Grad von Pax6 am Tag der Geburt in Knockout-Tieren zu verzeichnen.

## 7 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Analyse eines Mausmodells, in welchem das Selenoprotein Thioredoxin Reduktase 1 (Txnrd1) selektiv in neuronalen Vorläuferzellen ausgeschaltet ist.

Die gezüchteten neuronspezifischen Txnrd1-Knockout Tiere zeigten eine Kleinhirn-Hypoplasie einhergehend mit Ataxie und Gewichtsreduktion. Das veränderte Bewegungsmuster wird verständlich durch eine gestörte Zytoarchitektur, welche vor allem im anterioren Kleinhirn durch ektopisch lokalisierte Purkinje-Zellen imponiert. Zusätzlich wird eine fehlerhafte Laminierung durch das Fehlen von Str. moleculare und Str. granulare, degenerierte Bergmann Glia-Fasern und fusionierte Lobuli festgestellt. Gleichzeitig kommt es zu einer veränderten Expression weiterer, für das Kleinhirn wichtiger Gene (Nestin, GFAP, Pax6) in den Txnrd1- Knockout Tieren und dies führt zu dem Schluss, dass Txnrd1 eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Kleinhirns spielt.

### 7.1 Reduziertes Körpergewicht im Txnrd1-Knockout Mausmodell

Ein gegenüber den Kontroll-Tieren reduziertes Körpergewicht kennzeichnet viele Mausmodelle mit Kleinhirn-Phänotyp, wie z.B. *Staggerer (Rora)*, *Tottering*-Mutante, *Pura*-Knockout (Heuze 1997, Jarvis 2002, Isaacs 1995, Fletcher 1996, Khalili 2003). Einige der Autoren dieser Arbeiten schlagen als Erklärung eine ataktisch bedingte Problematik, insbesondere einen Nachteil bei der Konkurrenz mit den Wurfgeschwistern bei der Futteraufnahme vor. Diese Erklärung ist bei der Zucht der Txnrd1-Knockout Tiere jedoch unwahrscheinlich, da sie in der postnatalen Phase Futterbrei angeboten bekamen und jeder Zeit Futter zur Verfügung stand. Die Tatsache, dass die Knockout Tiere keine Probleme in der Reproduktion und Aufzucht ihrer Nachkommen zeigen, spricht nicht für eine generell verzögerte oder zurückgebliebene Entwicklung des Körpers. Die genaue Ursache für das reduzierte Körpergewicht bleibt weiterhin unbekannt.

## 7.2 Histologische Befunde

Die Befunde der histologischen Analyse der Knockout-Tiere lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: die Inaktivierung von *Txnrd1* in neuronalen Vorläuferzellen verursacht eine Hypoplasie des Kleinhirns und es kommt besonders in dessen anteriorem Bereich zu fehlerhafter Foliation, Störung der Glia-Organisation und zur nesterartiger Ausbildung der EGL. Daraus resultiert ein Fehlen der IGL und des Str. moleculare, sowie das Auftreten sowohl einer ektopischen Lokalisation als auch einer Degeneration der Purkinje-Zellen.

### 7.2.1 Cerebelläre Hypoplasie

Die Bedeutung einer intakten EGL für eine korrekte Expansion und daraus folgender Foliation des Kleinhirns während der Entwicklung wird in dem *Math-1*-Knockout (*mouse atonal homologue1*) verdeutlicht (Ben-Arie 1997, Mares 1970). *Math-1* ist ein Säugetierhomolog des *Drosophila melanogaster atonal*-Gens und kodiert für einen *basic Helix-Loop-Helix (bHLH)*-Transkriptionsfaktor, der in den Zellen der EGL exprimiert wird. Die gezielte Ausschaltung von *Math-1* im Genom führt zum vollständigen Verlust der EGL, und es finden weder Expansion noch Foliation des Kleinhirns statt. Analog zu diesem Modell kann die Kleinhirn-Hypoplasie der *Txnrd1*-Knockout Tiere durch die nur nesterartig ausgebildete EGL erklärt werden, insbesondere wenn in Betracht gezogen wird, dass die Zellen der EGL die einzigen mitotisch aktiven Zellen im postnatalen Kleinhirn sind. Mares et al. (1970) haben deshalb als Erste diskutiert, dass die Proliferation dieser Schicht die treibende Kraft hinter der Kleinhirn-Expansion und -Foliation ist.

Die Kleinhirn-Größe allein scheint jedoch kein kritischer Faktor in der Ausbildung des Foliationsmusters zu sein. Unterernährung von Ratten während ihrer Entwicklung führte zu kleineren, aber korrekt ausgebildeten Lobuli des Kleinhirns (Vitiello 1989). Das postnatale Wachstum des Kleinhirns stellt einen wesentlichen Faktor für die Streckung des Str. ganglionare vom Multilayer zum Monolayer dar. Der Grund für den zum Teil vielschichtigen Aufbau des Str. ganglionare innerhalb des ansonsten korrekt laminierten posterioren Kleinhirns ist daher wahrscheinlich die Hypoplasie im *Txnrd1*-Knockout, die sich jedoch auf das gesamte Kleinhirn bezieht.

Die Colliculi inferiores und superiores erscheinen bei der stereomikroskopischen Untersuchung nur deshalb vergrößert, weil das Kleinhirn der *Txnrd1*-Knockout Tiere

hypoplastisch ist und somit die Colliculi exponierter sind, wie dies auch im Falle des Cyclin-D2-Knockout Tieres, einer Mutante mit verringerter Zellzyklus-Aktivität mit gleichzeitiger Ausbildung eines Phänotyps im Kleinhirn, beschrieben worden ist (Huard 1999).

### 7.2.2 Zusammenhang der Entwicklung der verschiedenen neuronalen und glialen Zelltypen im Kleinhirn

Da Purkinje-, Glia- und Körnerzellen während der Entwicklung des Kleinhirns miteinander interagieren, führt die primäre Störung eines dieser Zelltypen oft zu einer sekundären Störung der anderen Zelltypen. Beispielsweise breiten sich die Dendriten von Purkinje-Zellen dann aus, wenn Zellen aus der EGL via Bergmann Glia in Richtung IGL wandern und währenddessen ihre Axone (Parallelfaser) ausbreiten (Altman 1997, Caddy 1990). NeuroD (auch BETA2 genannt) ist ein *bHLH*-Transkriptionsfaktor, der für die Mitose- und Differenzierungsabläufe in der EGL wichtig ist (Chae 2004). Wie bei den *BETA2/NeuroD1*-Knockout Tieren gezeigt wurde, hat die Entfernung eines für die EGL wichtigen Faktors zur Folge, dass aufgrund fehlender mitotischer Vorgänge in der EGL eine Kleinhirnhypoplasie entsteht, die zum Fehlen der mechanischen Streckung des Purkinje-Zell-Multilayers zum Monolayer, zum Ausbleiben des IGL-Aufbaus und zu der fehlenden Ausbreitung der Purkinje-Zelldendriten führt (Cho 2006). Auf der anderen Seite gibt es die *Reeler*-Mutante, bei der die primäre Einwirkung des Wachstumsfaktors *Reelin* auf die Purkinje-Zellen nicht erfolgen kann, was dazu führt, dass die Anzahl der Purkinje-Zellen vermindert ist, und diese eine ektopische Lokalisation einnehmen. Da die Purkinje-Zellen den mitogenen Faktor *sonic hedgehog* produzieren, der für die Proliferation der Zellen in der EGL und für die Induktion der Bergmann Glia notwendig ist, entsteht auch in der *Reeler*-Mutante ein hypoplastisches Kleinhirn mit gestörter Laminierung und Foliation (Goldowitz 1997, Smeyne 1995, Dahmane 1999). Das enge Verhältnis zwischen Bergmann Glia und Purkinje-Zellen wird zum einen deutlich durch ihre Ko-Lokalisation mit etwa 8 Bergmann Glia-Zellen pro Purkinje-Zelle, zum anderen durch die Befunde, dass nach einer Transplantation embryonaler Purkinje-Zellen in adultes Kleinhirn-Gewebe Nestin in den adulten Bergmann Glia-Zellen aufs Neue exprimiert wird (Reichenbach 1995, Sotelo 1994). Daher wird von Altman und Bayer vorgeschlagen, die Bergmann Glia als Purkinje-

Zell-assoziierte Astrozyten zu definieren, die ihren zellulären Phänotyp unter Einfluss der anliegenden Purkinje-Zellen anpassen (Altman 1997). Was sind also die Konsequenzen einer gezielten Störung der Bergmann Glia? Das Versuchsmodell von Delaney ermöglicht solch eine Störung zu jedem beliebigen Zeitpunkt: je früher dies geschieht, z.B. zum Entwicklungszeitpunkt P1, desto gravierender sind die beobachteten Folgen: Kleinhirn-Hypoplasie, Störung der Laminierung, Desorganisation der Bergmann Glia, Ektopie der Purkinje-Zellen sowie Degeneration ihrer Dendriten und auch eine Körnerzell-Depletion (Delaney 1996). Diese Arbeiten zeigten, dass die Bergmann Glia einen essentiellen Organisator der cerebellären Cortex darstellt, besonders für die normal-anatomische Anordnung der Purkinje-Zellen und ihrer Dendriten sowie für die Gewährleistung der Purkinje-Zell-Vitalität. Folgende Punkte untermauern weiterhin die Wichtigkeit der Bergmann Glia in der Kleinhirn-Entwicklung: Glia-Zellen sezernieren nur zu bestimmten Zeitpunkten Adhäsionsmoleküle für die Migration der Körnerzellen (Komuro 1995). Falls es zur Desynchronisation, sei es örtlich oder zeitlich, zwischen Adhäsionsmolekül-Synthese und der intrinsisch kontrollierten Dauer der Körnerzellmigration kommt, wird deren Migration nicht stattfinden (Trenkner 1984).

### 7.2.3 Was ist die pathogenetische Ursache der aberranten Kleinhirn-Entwicklung im Txnrd1-Knockout-Modell?

Bei der Suche nach einer Antwort auf die Frage nach der primären Ursache der phänotypischen Abweichungen im Txnrd1-Knockout muss bedacht werden, dass Txnrd1 im untersuchten Modell bereits in neuronalen Vorläuferzellen ausgeschaltet wird und somit sowohl in den später entstehenden Glia-Zellen als auch in den Neuronen fehlt (Beschreibung des Modells: siehe Einleitung). Zusammen mit dem Kooperationspartner Ulrich Schweizer (Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin) wurde an einer Eingrenzung der möglichen Ursachen gearbeitet: Mäuse mit geflochten Txnrd1-Allelen wurden mit Tubulin III-Cre transgenen Mäusen statt mit Nestin-Cre transgenen Mäusen gekreuzt. Somit wurde Txnrd1 postnatal und nur in Neuronen ausschaltet. Interessanterweise entwickelte sich dabei im Unterschied zur Kreuzung von geflochten Txnrd1-Tieren mit Nestin-Cre transgenen Mäusen kein Kleinhirnphänotyp. Die Interpretation liegt nahe, dass im Nestin-Cre Txnrd1-Knockout entweder die Bergmann Glia die primär betroffene

Zellsorte ist, die Kleinhirn-Anlage ab *initio* schon gestört ist, oder beide pathogenetische Wege auftreten. Da aber die Kleinhirn-Anlage in der hier vorgenommenen histologischen Untersuchung keine Abweichungen von der normalen Entwicklung aufweist, gibt der Versuch mit dem oben genannten Neuronen-spezifischen *Txnrd1*-Knockout (Schweizer) einen klaren Hinweis auf die Bergmann Glia als primäre Targetzelle des Kleinhirn-Phänotyps im Nestin-Cre *Txnrd1*-Knockout. Außerdem spricht für diese Argumentation die Tatsache, dass in der immunhistochemischen Untersuchung mit Anti-PCNA und Anti-PH3 Proliferationsunterschiede erst zu einem Zeitpunkt nachweisbar sind, zu dem man schon morphologische Unterschiede feststellen kann, die Proliferationsstörung also nur sekundär sein kann. Die Frage, ob die Bergmann Glia bereits in der Anlage verändert ist, oder ob eine Problematik in der Interaktion mit den Neuronen vorliegt, bleibt hingegen weiterhin offen.

#### 7.2.4 Vergleich mit anderen Mutanten mit einem Kleinhirn-Phänotyp

Bei der Durchsicht der Literatur nach Kleinhirnphänotypen fällt die spontane Mutante *Mea* (*Meander tail*) auf, die ihren Namen aufgrund einer Abnormalität der Schwanzwirbel erhalten hat (Ross 1990, Jensen 2004). Diese Mutante hat zusätzlich einen mit dem *Txnrd1*-Knockout vergleichbaren Kleinhirn-Phänotyp, der sich durch Purkinje-Zell Ektopie, Laminierungsstörungen, Desorganisation der Bergmann Glia sowie Foliationsdefekten im anterioren Kleinhirn auszeichnet (Grishkat 1996). Interessanterweise zeigt diese Mutante eine ähnlich scharfe Grenze bei Lobulus VI zwischen dem unorganisierten anterioren und dem verhältnismäßig gut organisierten posterioren Kleinhirn wie in den *Txnrd1*-Knockout Mäusen. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die *Mea*- Entwicklungsstörung primär intrinsisch Vorläufer der Körnerzellen betrifft und dass die scharfe Grenze nur augenscheinlich ist, das heißt bei dieser Maus liegt in Wirklichkeit ein Einwirkungsgradient über das gesamte Kleinhirn vor, jedoch mit der größten Ausprägung im anterioren Bereich (Hamre 1997). Als Erklärung für die sehr deutlichen Effekte der Mutation selektiv auf das anteriore Kleinhirn wird eine Kompartiments-Theorie für das sich entwickelnden Kleinhirn vorgeschlagen: es gibt Hinweise aus „*Lineage*“-Analysen in Küken (Martinez 1989), aus Mutanten-Phänotypen (Ross ME 1990) und aus transgenen Mausmodellen (Logan 1993), dass eine Einteilung in eine anteriore und posteriore

Domäne mit einer Kompartimentsgrenze in Lobulus VI stattfindet (Hallonet 1990). Diese Grenze markiert auch den Defekt im posterioren Bereich der bereits beschriebenen *BETA2/NeuroD1*-Knockout Tiere, der wie ein horizontal gespiegeltes Erscheinungsbild der Veränderung bei den *Mea*-Mutanten oder auch bei den *Txnrd1*-Knockout Tieren aussieht (Cho 2006). Diese Grenze wird ebenso in den Mausmodellen *Tottering*, *Swaying* und *leaner* postuliert (Thomas 1991, Ross 1990, Fletcher 1996). Die Idee der Kompartimente ist nicht neu, sondern entstammt der *Drosophila melanogaster*-Entwicklungsgenetik. Einige Autoren schlagen vor, dass die in *Drosophila melanogaster* beobachtete Aufteilung in Entwicklungsdomänen auch in Säugetieren konserviert ist (Lumsden 1989, Ingham 1988).

Das cerebelläre Erscheinungsbild der *Txnrd1*-Knockout Tiere unterstützt die Annahme einer anterior-posterioren Kompartimentierung im Kleinhirn und deutet darauf hin, dass die Entwicklung der Bergmann Glia unter dem Einfluss von solchen regionalen Unterschieden im Kleinhirn steht. Da die Glia-Fasern sich im posterioren Bereich des Knockout-Kleinhirns mit Hilfe der GFAP-Färbung zwar geordnet aber weniger dicht im Vergleich zum denselben Bereichen des Wildtyps darstellen, besteht die Möglichkeit, dass die Wirkung von *Txnrd1* auch einem anterior-posterioren Gradienten unterliegt. Es kann dabei auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Bergmann Glia des anterioren Kleinhirns eine Zellpopulation darstellt, die sich funktionell von der restlichen Bergmann Glia unterscheidet. Weiter kann vorgeschlagen werden, dass *Txnrd1* für die Bildung der Fissuren im anterioren Kleinhirn notwendig ist. Es gibt allerdings bisher nur wenige bekannte Genprodukte, die die Foliation direkt beeinflussen: *Cerebellar folial pattern-1-5 (Cfp-1-5)* und *declival sulcus of cerebellum (dsc)* sind Gene, die jeweils eine spezifische Fissur im Kleinhirn beeinflussen (Neumann 1990, Le Roy-Duflos 2001, Wahlsten 1991). Die im *Txnrd1*-Knockout ermittelten Befunde wie z.B. Desorganisation der Bergmann Glia oder Degeneration der Purkinje-Zell-Dendriten wäre mit dem hier vorgestellten Modell jedoch nicht hinreichend erklärbar.

### **7.3 Fehlen von histopathologischen Veränderungen im Großhirn der *Txnrd1*-Knockout Mäuse**

Die Entwicklung eines ausschließlich im Kleinhirn lokalisierten Phänotyps bei der Ausschaltung von *Txnrd1* in neuronalen Vorläuferzellen stellt ein unerwartetes Ergebnis dar, da *Txnrd1* im gesamten Gehirn exprimiert wird (Jakupoglu 2005). Die

immunhistochemische Färbung gegen Nestin zeigt, dass die radialen Glia-Fasern sich im Großhirn der Txnrd1-Knockout Tiere im Gegensatz zum Kleinhirn normal entwickeln. Ausserdem zeigt die Färbung gegen BrdU, dass die interkinetische Kernwanderung in der Kortikalplatte des Großhirns wie im Wildtyp verläuft. Dies sind Voraussetzungen für eine normale Großhirnentwicklung. Txnrd1 weist möglicherweise trotz genereller Gehirn-Expression einen regionalen Unterschied in der biologischen Funktion auf. Das könnte zurückführbar sein auf die Tatsache, dass entsprechende Interaktionspartner nur lokal exprimiert sind. Auf jeden Fall steht fest, dass Txnrd1 eine besondere Bedeutung für die korrekte Ausbildung der Bergmann Glia im Kleinhirn hat, vor allem im anterioren Bereich.

#### **7.4 Störungen des Zellzyklus**

Die fehlende Ausbildung der anterioren Lobuli und deren geordneter Laminierung sowie die nesterförmige Verteilung der EGL in diesem Bereich könnte auch durch eine herabgesetzte Proliferation oder durch eine erhöhte Apoptose-Rate in diesem Bereich erklärt werden. Es gab jedoch keine immunhistologischen Anzeichen eines erhöhten Auftretens von Zell-Apoptose. Die herabgesetzte Proliferation wurde mit Hilfe der Proliferationsmarker anti-PH3 und anti-PCNA gezeigt. Diese Proliferationsstörung sollte im Detail durch eine Analyse des Expressionsniveaus der Zellzyklusmarker Cyclin D2 und p21 untersucht werden. Cyclin D2 wurde unter den zahlreichen Zellzyklusmarkern ausgewählt, weil Cyclin D2-Knockout Mäuse einen Phänotyp mit Kleinhirn-Hypoplasie aufgrund reduzierter Anzahl der Körnerzellen zeigen. Ausserdem wird Cyclin D2 im cerebellären Neuroepithel und später in postmitotischen Körnerzellen der EGL exprimiert (Ross 1996, Huard 1999). Der Antikörper gegen den Zellzyklus-Inhibitor p21 wurde ausgewählt, da p21 nachweislich in Purkinje-Zellen exprimiert wird (Legrier 2001, Miyazawa 2000). Bei den immunhistochemischen Untersuchungen ergab sich kein Unterschied in der Expression von p21 zwischen den Kontroll- und Txnrd1-Knockout Tieren. Aus der Färbung gegen CyclinD2 geht hervor, dass weniger Zellen in der EGL des Kleinhirns der Txnrd1-Knockout Tiere positiv sind. Dabei muss zur Limitation der Aussage allerdings in Betracht gezogen werden, dass in einer ausgedünnten EGL ohnehin weniger Zellen immunhistochemisch anfärbbar sind. Ein weiterer wichtiger Punkt, warum die Verknüpfung zwischen Txnrd1 und Zellzyklus untersucht wurde, ist die

Tatsache, dass Txnrd ein Zielgen von c-Myc ist (Schuhmacher 2001). C-Myc gehört zu den retroviralen Proto-Oncogenen und ist ein multifaktorieller Transkriptionsfaktor, der an Zellproliferation, -Wachstum, -Differenzierung und an weiteren intrazellulären Vorgängen beteiligt ist (Grandori 2000). N-Myc gehört sowie c-Myc und v-Myc zur selben Transkriptionsfaktorfamilie und hat in Neuronen wahrscheinlich c-Myc-ähnliche Funktionen. N-Myc wurde, analog zu Txnrd1, mit Nestin-Cre in neuronalen Vorläuferzellen ausgeschaltet und der entsprechende Knockout zeigt einen Kleinhirn-Phänotyp, der zwar *in puncto* Ataxie und Kleinhirn-Hypoplasie mit dem des Txnrd1-Knockout Tieres zu vergleichen ist, jedoch zum Txnrd1-Knockout in folgenden Punkten divergiert: es treten zusätzliche Veränderungen im Großhirn auf, Anomalien sind bereits in der Kleinhirn-Anlage erkennbar, die Ektopie der Purkinje-Zellen ist nur geringgradig ausgeprägt, und es besteht keine Desorganisation des anterioren Bereiches. Daher eignet sich der n-Myc Nestin-Cre-Knockout nicht zum Vergleich mit dem gehirnspezifischen Txnrd1-Knockout und bietet keinen Ansatz für mechanistische Erklärungen (Knoepfler PS 2002).

Es gibt neue Daten, die den Schluss zulassen, dass sich die Aufgabe der Glia-Zellen nicht nur auf ihre stützende Funktion bei der Migration und Ernährung der Neuronen beschränkt, sondern tief mit der Entwicklung des Nervensystems verbunden ist. Die radiale Glia durchläuft nämlich in allen Bereichen des ZNS (und somit auch die Bergmann Glia des Kleinhirns) eine neurogene Phase. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Gehirnregionen in den Zeitpunkten, wann diese neurogene Phase stattfindet (Noctor 2002, Anthony 2004). Es wird sogar auf Grund von Klonierungsanalysen und Cre/LoxP *fate mapping* von Anthony et al. (2004) vorgeschlagen, dass in der neurogenen Phase die Vorläufer der Körnerzellen aus Bergmann Glia entstehen. Obwohl die hier vorgelegten Untersuchungen keine genaue Mechanistik der Dismorphologie in den Txnrd1-Knockout Tieren beschreibt, ist vorstellbar, dass durch die Störung der Bergmann Glia in der neurogenen Phase sowohl deren Anomalie als auch die Störungen in den entstehenden Körnerzellen bedingt.

## 7.5 Molekularbiologische Ergebnisse

### 7.5.1 RT-PCR

Die Expression von Txnrd1 mRNA zeigte sich im Wildtyp in den Nieren stärker als im Gehirn, was die Angaben aus der Literatur bestätigt (Jurado 2003, Rundlof 2000). Im Gehirn des Knockout-Tieres wird nur wenig Txnrd1 mRNA in trunkierter Form exprimiert, d.h. ohne das für die katalytische Aktivität notwendige Exon 15. Interessanterweise ist deutlich mehr trunkierte Txnrd1 im Wildtyp-Gehirn exprimiert als in der Niere des Wildtyps. Trunkierte mRNAs unterliegen einem beschleunigten Abbau und aufgrund der speziellen Translation der Selenoproteine ist meist kein direkter Zusammenhang zwischen mRNA-Menge und exprimiertem Protein gegeben. Trunkiertes Txnrd1 Protein entsteht *in vitro* in Zellen bei Selenmangel. Anestål et al. (2003) haben beobachtet, dass eine trunkierte Form von Txnrd1 die Apoptose-Rate erhöht. Deshalb wurde trunkierter Txnrd1 eine Rolle in der Pathophysiologie der Krankheiten, die bei Selendefizienz entstehen, in Erwägung gezogen (Yarimizu 2000). Eine erhöhte Apoptose-Rate konnte jedoch weder im Wildtyp noch im Txnrd1-Knockout beobachtet werden, was einen durch trunkiertes Txnrd1 bewirkten Effekt ausschliesst.

### 7.5.2 Western Blot

Auf Protein-Ebene wird gezeigt, dass die Entfernung von Txnrd1 im Gehirngewebe in dem vorliegenden Maus-Modell erfolgreich verläuft, dass aber auch die Txnrd1-Proteinmenge in der Niere des Knockout-Tieres geringgradig verringert ist. Ob in diesem Gewebe ein regulatorischer Prozess zwischen mRNA- und Proteinebene geschaltet ist bleibt unklar und wurde nicht weiter untersucht, da dies den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt hätte.

### 7.5.3 DNA-Chip, Northern Blot & Real-Time PCR

Die Schwierigkeit, mit der weniger sensitiven Northern Blot-Technik die mit dem hochsensitiven DNA-Chip erzielten Ergebnissen zu verifizieren, kann mit den sehr geringen Mengen an exprimierter mRNA zusammenhängen. Deshalb wurde mit einer anderen Methode versucht, einen Hinweis auf die Mechanistik der phänotypischen Kleinhirn-Störung im vorliegenden Txnrd1-Mausmodell zu erhalten:

der Real-Time PCR. Die bis etwa dreifache Runterregulation des Glia-Proteins GFAP im Knockout zum Zeitpunkt der Geburt spricht, zusammen mit den oben diskutierten Ergebnissen aus der immunhistologischen Untersuchung sowie mit den Erkenntnissen aus der neuronenspezifischen *Txnrd1*-Zucht durch Ulrich Schweizer (Inst. für Experimentelle Endokrinologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin), für eine Störung der Bergmann Glia als primäre Ursache für die Entstehung des Kleinhirn-Phänotyps. Die ermittelte Hochregulierung von Nestin im Knockout zum Zeitpunkt P7, an dem im Wildtyp die Expression herunterreguliert wird, muss im Verhältnis zum Wildtyp gesehen werden: die Runterregulierung erfolgt langsamer und kann als Ausdruck der verzögerten Bergmann Glia-Entwicklung im *Txnrd1*-Knockout interpretiert werden. Ebenfalls zum Zeitpunkt der Geburt ist Pax6 in Knockout-Tieren herunterreguliert. Pax6 ist unter anderem wichtig für die postnatale Anregung glialer Zellen zur Neubildung von Neuronen sowie für die Migration von Neuronen (Engelkamp 1999, Heins 2002). Da beide Vorgänge im Knockout gestört sind, könnte Pax6 im Zusammenhang mit *Txnrd1* eine Rolle zugeschrieben werden. Allerdings muss eingeschränkt werden, dass der geringe Faktor, um den Pax6 herunterreguliert wird, nicht für eine wichtige Rolle des Gens beim *Txnrd1*-Knockout Phänotyp spricht.

## 7.6 Ausblick

Obwohl die Expression von Genen, die für die Kleinhirnentwicklung wichtig sind, im *Txnrd1*-Knockout verändert ist, bleiben die Zusammenhänge dieser Veränderungen im Unklaren. Ein genauer Ablauf der Veränderungen im Knockout-Kleinhirn konnte zwar histologisch beschrieben werden, die zugrunde liegenden mechanistischen Vorgänge auf der Ebene des Zellzyklus, von Zell-Zell-Interaktionen oder Signaling-Kaskaden konnten nur bruchstückhaft belichtet werden. Der endgültige Beweis für die hier aufgestellte Hypothese, dass die Bergmann Glia der entscheidende Zelltyp ist, welcher die Kleinhirn-Entwicklungsstörung verursacht, könnte über einen Bergmann Glia-spezifischen *Txnrd1*-Knockout erbracht werden. Dieser müsste dann zum gleichen oder sehr ähnlichen Phänotyp führen. Um die Mechanistik der Vorgänge im gehirnspezifischen *Txnrd1*-Knockout zu verstehen, müssten weiterführende Untersuchungen in Glia- und neuronenspezifischen Zellkulturen durchgeführt werden, da solche Studien aufgrund der hoch komplexen Zell-Interaktionen im entwickelnden Gehirn nicht mit *in vivo* Studien an einem Mausmodell gelöst werden können.

## 8 Zusammenfassung

Thioredoxin Reduktase 1 (Txnrd1) ist ein ubiquitär exprimiertes, Selen-haltiges Redoxenzym, welches ein Teil des Thiol-Redox-Systems ist und in dieser Funktion verschiedene intrazelluläre Substrate im reduzierten Zustand bewahrt. Man nennt dieses erzielte Gleichgewicht Redoxhomöostase. Dies ist sowohl für die Regulation verschiedener Gene als auch für das Zellwachstum und für den Schutz von Zellen vor oxidativem Stress von Bedeutung. Die Funktion der vorwiegend zytoplasmatisch lokalisierten Thioredoxin Reduktase 1 in den neuronalen Vorläuferzellen eines Mausmodells sollte durch eine gezielte Inaktivierung studiert werden.

Als Hauptbefund stellte sich heraus, dass das Fehlen von Txnrd1 in neuronalen Vorläuferzellen zu einem ausschließlich im Kleinhirn lokalisierten Phänotyp führt. Dieser Phänotyp wird kurz vor der Geburt (Embryonaltag 18,5) in Form einer Retardation der Fissuren-Bildung sichtbar und setzt sich in der postnatalen Kleinhirn-Entwicklung fort. Die Knockout-Tiere bleiben in der Gewichtsentwicklung hinter den Kontroll-Tieren zurück und weisen eine massive Kleinhirn-Hypoplasie mit klinischen Begleiterscheinungen wie Ataxie und intermittierendem Tremor auf. Das Kleinhirn der Txnrd1-Knockout Tiere zeigt eine im Lobulus VI begrenzte klare Trennung zwischen einem gut organisierten posterioren und einem dysmorphen anterioren Bereich. In diesem anterioren Bereich sind die Lobuli fusioniert. Die Purkinje-Zellen besitzen degenerierte Dendriten und sind ektopisch lokalisiert. Die geordnete Laminierung der Schichten Str. moleculare, Str. ganglionare und Str. granulare des posterioren Teils setzt sich aufgrund fehlender Differenzierung von Str. moleculare und Str. granulare nicht nach anterior fort. Weiterhin fehlt im anterioren Bereich ab dem postnatalen Tag 1 die radiale Ausrichtung der für die Neuronen-Migration essentiellen Bergmann Glia. Die Dicke deren Ausläufer bleibt hinter der der Kontroll-Tiere zurück. Mitotisch stark aktive EGL (*External Germinal Layer*), aus der später die Körnerzellen hervorgehen, zeigt in diesem Bereich keine Schichtenbildung, sondern eine nesterartige Anordnung. Die EGL der Txnrd1-Knockout Tiere zeigt ab P1 weit weniger proliferationsstypische Expressionsmuster in der Immunhistochemie als die der Kontroll-Tiere. Weiterhin wird durch molekularbiologische Untersuchungen deutlich, dass die gezielte Ausschaltung von Txnrd1 in neuronalen

Vorläuferzellen zu einer Veränderung in der Expression der für Nestin, GFAP und Pax6 kodierenden Gene im Gewebe des Kleinhirns führt.

Somit konnte eine wichtige Rolle der Txnrd1 in der Kleinhirnentwicklung und dort vor allem im Aufbau der Zytoarchitektur des anterioren Bereichs nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit legen in Verbindung mit den Erkenntnissen aus einem postnatalen Neuronen-spezifischen Txnrd1-Knockout den Schluss nahe, dass eine Störung in der Morphogenese der Bergmann Glia als primäre Ursache für die Entstehung des entstandenen Phänotyps im Txnrd1-Knockout angesehen werden kann.

## 9 Summary

### THE ROLE OF THIOREDOXIN REDUCTASE 1 IN THE CNS-DEVELOPMENT OF CONDITIONAL KNOCKOUT MICE

Thioredoxin Reductase 1 (Txnrd1) is a ubiquitously expressed redox enzyme containing Selenium. As a component of the thiol-redox-system, Txnrd1 reduces different intracellular substrates, which are important for regulation of different genes, cell-protection from oxidative stress as well as for cell growth. The protein function of the mainly cytoplasmatic localized Txnrd1 in neuronal precursor cells was to be investigated through specific inactivation in a conditional Txnrd1-Knockout strain. It was found that deficiency of Txnrd1 in neuronal precursor cells leads to a phenotype exclusive in the cerebellum. The phenotype is evident just before birth (embryonic day 18,5) showing retardation in the development of fissures which proceeds through postnatal cerebellar development. Besides, Txnrd1-Knockout mice show reduction of body weight compared to control mice as well as cerebellar hypoplasia, ataxia and tremors. The cerebellum of Txnrd1-Knockout mice is distinctively divided into a relatively organised posterior and a disrupted anterior part. The lobuli in the anterior cerebellum are merged and Purkinje-cells are ectopic localized showing degeneration of the dendrites. The regular laminar organization of molecular-, Purkinje-cell- and granular layer seen in the posterior part of the cerebellum is not persistent towards the anterior part due to lack of differentiation of the molecular and granular layer. Being essential for neuronal migration, in the anterior cerebellum of Txnrd1-Knockout mice, Bergmann glia show reduction of fiber strength and lack of radial alignment from the first postnatal day. Furthermore the mitotic active EGL which is source of granular neurons, is found to be thinner in this area and general lower proliferation rates are seen during postnatal cerebellar development. It is molecular biological proven that the specific inactivation of Txnrd1 in neuronal precursor cells leads to altered gene expression of Nestin, GFAP and Pax6 in cerebellar tissues.

All together these results demonstrate the important role of Txnrd1 in development of the cerebellum particularly in assembly of the cytoarchitecture of the anterior area.

The results of this thesis in connection with insights from a postnatal neuron-specific

Txnrd1-Knockout mouse model indicate that the disruption of Bergmann glia is the primary reason for the cerebellar appearance in Txnrd1-Knockout mice.

## 10 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
A	Adenosin
ABC	<i>Avidin-Biotin- Complex</i>
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	<i>Basic Helix-Loop-Helix</i> Transkriptionsfaktor
BrdU	5'-Bromo-2'-Deoxyuridin
bp	<i>basepairs/</i> Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CNS	central nervous system
CTP	Cytidintriphosphat
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Elongationsfaktor
EGL	<i>External Germinal Layer</i>
ES	Embryonale Stammzellen
f	<i>forward</i>
F1	Erste Filialgeneration
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
Fiss.	Fissura
G	Guanosin
G-Phase	<i>Gap-Phase</i>
GPx	Glutathionperoxidase

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
GSH	Reduziertes Glutathion
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin/Eosin
IGL	<i>Inner Germinal Layer</i>
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
M.O.M.	<i>Mouse on Mouse</i>
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
myc	<i>myelocytomatosis viral oncogene</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
P <sup>32</sup>	Radioaktiver Phosphor 32
P	Postnataler Tag
p.a.	Pro analysi
PBS	Phosphat-gepuffertes Natriumchlorid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PHGPx	Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathionperoxidase
r	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-dodezylsulfat
<sup>75</sup> Se	Radioaktives Selen 75
Sec	Selenocystein
SECIS	<i>Selenocysteine insertion sequence</i>
SelP	Selenoprotein P
Ser	Abkürzung Aminosäure Serin

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
SP	<i>SECIS-binding protein</i>
SPF	Spezifiziert pathogen frei
S-Phase	Synthesephase
spp.	Spezies
SSC	<i>Saline Sodium Citrate Buffer</i>
Str.	Stratum
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer RNA
Trx	Thioredoxin
Txnrd	Thioredoxin Reduktase
U	Abkürzung Aminosäure Selenocystein
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
w/v	Gewichtsprozent
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

## 11 Literaturverzeichnis

**Abremski, K. & Gottesman, S.** (1981) Site-specific recombination Xis-independent excisive recombination of bacteriophage lambda. *J Mol Biol* 153, 67-78.

**Alder, J., Cho, N.K. & Hatten, M.E.** (1996) Embryonic precursor cells from the rhombic lip are specified to a cerebellar granule neuron identity. *Neuron* 17, 389-399.

**Altman, J. & Bayer, S. A.** (1997) Development of the cerebellar system: in relation to its evolution, structure and functions. ISBN 0-8493-9490-2. CRC Press, Inc.

**Anestal, K. & Arner, E.S.** (2003) Rapid induction of cell death by selenium-compromised thioredoxin reductase 1 but not by the fully active enzyme containing selenocysteine. *J Biol Chem* 278, 15966-15972.

**Anthony, T.E., Klein, C., Fishell, G. & Heintz, N.** (2004) Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 41, 881-890.

**Arner, E.S. & Holmgren, A.** (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 267, 6102-6109.

**Arthur, J.R., Nicol, F. & Beckett, G.J.** (1990) Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. The role of selenium. *Biochem J* 272, 537-540.

**Austin, S., Ziese, M. & Sternberg, N.** (1981) A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* 25, 729-736.

**Baker, A., Payne, C.M., Briehl, M.M. & Powis, G.** (1997) Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis in vitro and in vivo. *Cancer Res* 57, 5162-5167.

- Batini, C.** (1990) Cerebellar localization and colocalization of GABA and calcium binding protein-D28K. *Arch Ital Biol* 128, 127-149.
- Beckett, G.J. & Arthur, J.R.** (2005) Selenium and endocrine systems. *J Endocrinol* 184, 455-465.
- Behne, D., Hilmert, H., Scheid, S., Gessner, H. & Elger, W.** (1988) Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochim Biophys Acta* 966, 12-21.
- Behne, D. & Hofer-Bosse, T.** (1984) Effects of a low selenium status on the distribution and retention of selenium in the rat. *J Nutr* 114, 1289-1296.
- Behne, D., Kyriakopoulos, A., Meinhold, H. & Kohrle, J.** (1990) Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 173, 1143-1149.
- Ben-Arie, N., Bellen, H.J., Armstrong, D.L., McCall, A.E., Gordadze, P.R., Guo, Q., Matzuk, M.M. & Zoghbi, H.Y.** (1997) Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature* 390, 169-172.
- Bermano, G., Nicol, F., Dyer, J.A., Sunde, R.A., Beckett, G.J., Arthur, J.R. & Hesketh, J.E.** (1995) Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem J* 311 (Pt 2), 425-430.
- Bock, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., Veprek, B. & Zinoni, F.** (1991) Selenocysteine: the 21st amino acid. *Mol Microbiol* 5, 515-520.
- Borchert, A., Savaskan, N.E. & Kuhn, H.** (2003) Regulation of expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene. Tissue-specific expression pattern and identification of functional cis- and trans-regulatory elements. *J Biol Chem* 278, 2571-2580.

**Bosl, M.R., Takaku, K., Oshima, M., Nishimura, S. & Taketo, M.M.** (1997) Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp). *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5531-5534.

**Brauer, A.U. & Savaskan, N.E.** (2004) Molecular actions of selenium in the brain: neuroprotective mechanisms of an essential trace element. *Rev Neurosci* 15, 19-32.

**Brigelius-Flohe, R.** (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27, 951-965.

**Brigelius-Flohe, R., Winkler, K. & Muller, C.** (2002) Estimation of individual types of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 347, 101-112.

**Burk, R.F.** (2002) Selenium, an antioxidant nutrient. *Nutr Clin Care* 5, 75-79.

**Caddy, K.W. & Herrup, K.** (1990) Studies of the dendritic tree of wild-type cerebellar Purkinje cells in lurcher chimeric mice. *J Comp Neurol* 297, 121-131.

**Chae, H.Z., Kim, H.J., Kang, S.W. & Rhee, S.G.** (1999) Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract* 45, 101-112.

**Chae, J.H., Stein, G.H. & Lee, J.E.** (2004) NeuroD: the predicted and the surprising. *Mol Cells* 18, 271-288.

**Cho, J.H. & Tsai, M.J.** (2006) Preferential posterior cerebellum defect in BETA2/NeuroD1 knockout mice is the result of differential expression of BETA2/NeuroD1 along anterior-posterior axis. *Dev Biol* 290, 125-138.

**Chu, F.F., Doroshov, J.H. & Esworthy, R.S.** (1993) Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 268, 2571-2576.

**Clermont, Y.** (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52, 198-236.

**Conrad, M., Moreno, S.G., Sinowatz, F., Ursini, F., Kolle, S., Roveri, A., Brielmeier, M., Wurst, W., Maiorino, M. & Bornkamm, G.W.** (2005) The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol* 25, 7637-7644.

**Contestabile, A.** (2001) Oxidative stress in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic perspectives. *Curr Top Med Chem* 1, 553-568.

**Copeland, P.R.** (2003) Regulation of gene expression by stop codon recoding: selenocysteine. *Gene* 312, 17-25.

**Croteau, W., Davey, J.C., Galton, V.A. & St Germain, D.L.** (1996) Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *J Clin Invest* 98, 405-417.

**Dahlstrand, J., Lardelli, M. & Lendahl, U.** (1995) Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 84, 109-129.

**Dahmane, N. & Ruiz i Altaba, A.** (1999) Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126, 3089-3100.

**Dahme E., W.E.** (1999) Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Ferdinand Enke Verlag.

**de Talamoni, N., Smith, C.A., Wasserman, R.H., Beltramino, C., Fullmer, C.S. & Penniston, J.T.** (1993) Immunocytochemical localization of the plasma membrane calcium pump, calbindin-D28k, and parvalbumin in Purkinje cells of avian and mammalian cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11949-11953.

**Delaney, C.L., Brenner, M. & Messing, A.** (1996) Conditional ablation of cerebellar astrocytes in postnatal transgenic mice. *J Neurosci* 16, 6908-6918.

**Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A.** (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.

**Engelkamp, D., Rashbass, P., Seawright, A. & van Heyningen, V.** (1999) Role of Pax6 in development of the cerebellar system. *Development* 126, 3585-3596.

**Evenson, J.K. & Sunde, R.A.** (1988) Selenium incorporation into selenoproteins in the Se-adequate and Se-deficient rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 187, 169-180.

**Fernagut, P.O., Chalon, S., Diguët, E., Guilloteau, D., Tison, F. & Jaber, M.** (2003) Motor behaviour deficits and their histopathological and functional correlates in the nigrostriatal system of dopamine transporter knockout mice. *Neuroscience* 116, 1123-1130.

**Fletcher, C.F., Lutz, C.M., O'Sullivan, T.N., Shaughnessy, J.D., Jr., Hawkes, R., Frankel, W.N., Copeland, N.G. & Jenkins, N.A.** (1996) Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. *Cell* 87, 607-617.

**Flohe, L., Gunzler, W.A. & Schock, H.H.** (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett* 32, 132-134.

**Foley, J., Ton, T., Maronpot, R., Butterworth, B. & Goldsworthy, T.L.** (1993) Comparison of proliferating cell nuclear antigen to tritiated thymidine as a marker of proliferating hepatocytes in rats. *Environ Health Perspect* 101 Suppl 5, 199-205.

**Foresta, C., Flohe, L., Garolla, A., Roveri, A., Ursini, F. & Maiorino, M.** (2002) Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biol Reprod* 67, 967-971.

- Fujita, S., Shimada, M., Nakamura, T.** (1966) H3-thymidine autoradiographic studies on the cell proliferation and differentiation in the external and the internal granular layers of the mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 128, 191-208.
- Gaiano, N. & Fishell, G.** (2002) The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu Rev Neurosci* 25, 471-490.
- Gasdaska, J.R., Harney, J.W., Gasdaska, P.Y., Powis, G. & Berry, M.J.** (1999) Regulation of human thioredoxin reductase expression and activity by 3'-untranslated region selenocysteine insertion sequence and mRNA instability elements. *J Biol Chem* 274, 25379-25385.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A.** (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119, 493-501.
- Gladyshev, V.N., Jeang, K.T. & Stadtman, T.C.** (1996) Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6146-6151.
- Gladyshev, V.N., Jeang, K.T., Wootton, J.C. & Hatfield, D.L.** (1998) A new human selenium-containing protein. Purification, characterization, and cDNA sequence. *J Biol Chem* 273, 8910-8915.
- Goldowitz, D., Cushing, R.C., Laywell, E., D'Arcangelo, G., Sheldon, M., Sweet, H.O., Davisson, M., Steindler, D. & Curran, T.** (1997) Cerebellar disorganization characteristic of reeler in scrambler mutant mice despite presence of reelin. *J Neurosci* 17, 8767-8777.
- Goldowitz, D. & Hamre, K.** (1998) The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci* 21, 375-382.

- Grandori, C., Cowley, S.M., James, L.P. & Eisenman, R.N.** (2000) The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 653-699.
- Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., Orban, P., Klein, R., Schittny, J.C. & Muller, U.** (2001) Beta1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron* 31, 367-379.
- Grippo, J.F., Tienrungroj, W., Dahmer, M.K., Housley, P.R. & Pratt, W.B.** (1983) Evidence that the endogenous heat-stable glucocorticoid receptor-activating factor is thioredoxin. *J Biol Chem* 258, 13658-13664.
- Grishkat, H.L., Schwartz, E., Jain, G. & Eisenman, L.M.** (1996) Developmental analysis of GFAP immunoreactivity in the cerebellum of the meander tail mutant mouse. *Anat Embryol (Berl)* 194, 135-146.
- Gromer, S., Wissing, J., Behne, D., Ashman, K., Schirmer, R.H., Flohe, L. & Becker, K.** (1998) A hypothesis on the catalytic mechanism of the selenoenzyme thioredoxin reductase. *Biochem J* 332 ( Pt 2), 591-592.
- Gu, H., Marth, J.D., Orban, P.C., Mossmann, H. & Rajewsky, K.** (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103-106.
- Guimaraes, M.J., Peterson, D., Vicari, A., Cocks, B.G., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Ferrick, D.A., Kastelein, R.A., Bazan, J.F. & Zlotnik, A.** (1996) Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15086-15091.
- Hallonet, M.E., Teillet, M.A. & Le Douarin, N.M.** (1990) A new approach to the development of the cerebellum provided by the quail-chick marker system. *Development* 108, 19-31.

**Hamre, K.M. & Goldowitz, D.** (1997) meander tail acts intrinsic to granule cell precursors to disrupt cerebellar development: analysis of meander tail chimeric mice. *Development* 124, 4201-4212.

**Hatfield, D.L. & Gladyshev, V.N.** (2002) How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol* 22, 3565-3576.

**Hatten, M.E. & Liem, R.K.** (1981) Astroglial cells provide a template for the positioning of developing cerebellar neurons in vitro. *J Cell Biol* 90, 622-630.

**Hatten, M.E., Rifkin, D.B., Furie, M.B., Mason, C.A., Liem, R.K.** (1982) Biochemistry of granule cell migration in developing mouse cerebellum. *Prog Clin Biol Res* 85 Pt B, 509-519.

**Hatten, M.E. & Heintz, N.** (1995) Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu Rev Neurosci* 18, 385-408.

**Hawkes, W.C., Wilhelmsen, E.C. & Tappel, A.L.** (1985) Abundance and tissue distribution of selenocysteine-containing proteins in the rat. *J Inorg Biochem* 23, 77-92.

**Heins, N., Malatesta, P., Cecconi, F., Nakafuku, M., Tucker, K.L., Hack, M.A., Chapouton, P., Barde, Y.A. & Gotz, M.** (2002) Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci* 5, 308-315.

**Henzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P. & Allis, C.D.** (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348-360.

**Heuze, P., Feron, C. & Baudoin, C.** (1997) Early behavioral development of mice is affected by staggerer mutation as soon as postnatal day three. *Brain Res Dev Brain Res* 101, 81-84.

**Hill, K.E., Lloyd, R.S., Yang, J.G., Read, R. & Burk, R.F.** (1991) The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame. *J Biol Chem* 266, 10050-10053.

**Hill, K.E., Lyons, P.R. & Burk, R.F.** (1992) Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 185, 260-263.

**Hill, K.E., McCollum, G.W., Boeglin, M.E. & Burk, R.F.** (1997) Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 234, 293-295.

**Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K. & Yodoi, J.** (1997) AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3633-3638.

**Hirota, K., Murata, M., Sachi, Y., Nakamura, H., Takeuchi, J., Mori, K. & Yodoi, J.** (1999) Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem* 274, 27891-27897.

**Holmgren, A.** (1995) Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* 3, 239-243.

**Holmgren, A. & Bjornstedt, M.** (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 252, 199-208.

**Huard, J.M., Forster, C.C., Carter, M.L., Sicinski, P. & Ross, M.E.** (1999) Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2. *Development* 126, 1927-1935.

**Ingham, P.W.** (1988) The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. *Nature* 335, 25-34.

**Isaacs, K.R. & Abbott, L.C.** (1995) Cerebellar volume decreases in the tottering mouse are specific to the molecular layer. *Brain Res Bull* 36, 309-314.

**Jakupoglu, C.** (2003) Charakterisierung der Selenoproteine Thioredoxinreduktase 1 und 2 anhand von Knockout-Mausmodellen, Dissertation LMU München.

**Jakupoglu, C., Przemeck, G.K., Schneider, M., Moreno, S.G., Mayr, N., Hatzopoulos, A.K., de Angelis, M.H., Wurst, W., Bornkamm, G.W., Brielmeier, M. & Conrad, M.** (2005) Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Mol Cell Biol* 25, 1980-1988.

**Jarvis, C.I., Staels, B., Brugg, B., Lemaigre-Dubreuil, Y., Tedgui, A. & Mariani, J.** (2002) Age-related phenotypes in the staggerer mouse expand the RORalpha nuclear receptor's role beyond the cerebellum. *Mol Cell Endocrinol* 186, 1-5.

**Jensen, P., Smeyne, R. & Goldowitz, D.** (2004) Analysis of cerebellar development in math1 null embryos and chimeras. *J Neurosci* 24, 2202-2211.

**Jurado, J., Prieto-Alamo, M.J., Madrid-Risquez, J. & Pueyo, C.** (2003) Absolute gene expression patterns of thioredoxin and glutaredoxin redox systems in mouse. *J Biol Chem* 278, 45546-45554.

**Kamphues, J.S., D; Leibetseder, J.** (1999) Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung. ISBN 3-7944-0189-1. Verlag M. & H. Schaper.

**Kandel, E.R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M.** (2000) *Principals of Neural Science*. ISBN 0071120009.

**Kawai, H., Ota, T., Suzuki, F. & Tatsuka, M.** (2000) Molecular cloning of mouse thioredoxin reductases. *Gene* 242, 321-330.

**Kelman, Z.** (1997) PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 14, 629-640.

**Khalili, K., Del Valle, L., Muralidharan, V., Gault, W.J., Darbinian, N., Otte, J., Meier, E., Johnson, E.M., Daniel, D.C., Kinoshita, Y., Amini, S. & Gordon, J.** (2003) Puralpha is essential for postnatal brain development and developmentally coupled cellular proliferation as revealed by genetic inactivation in the mouse. *Mol Cell Biol* 23, 6857-6875.

**Knoepfler, P.S., Cheng, P.F. & Eisenman, R.N.** (2002) N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev* 16, 2699-2712.

**Kohrle, J.** (2005) Selenium and the control of thyroid hormone metabolism. *Thyroid* 15, 841-853.

**Komuro, H. & Rakic, P.** (1995) Dynamics of granule cell migration: a confocal microscopic study in acute cerebellar slice preparations. *J Neurosci* 15, 1110-1120.

**Komuro, H. & Rakic, P.** (1998) Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *J Neurosci.* 18, 1478-1490

**Korotkov, K.V., Novoselov, S.V., Hatfield, D.L. & Gladyshev, V.N.** (2002) Mammalian selenoprotein in which selenocysteine (Sec) incorporation is supported by a new form of Sec insertion sequence element. *Mol Cell Biol* 22, 1402-1411.

**Kryukov, G.V., Castellano, S., Novoselov, S.V., Lobanov, A.V., Zehtab, O., Guigo, R. & Gladyshev, V.N.** (2003) Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300, 1439-1443.

**Kryukov, G.V., Kumar, R.A., Koc, A., Sun, Z. & Gladyshev, V.N.** (2002) Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4245-4250.

**Larsell, O.** (1952) The morphogenesis and adult pattern of the lobules and fissures of the cerebellum of the white rat. *J Comp Neurol* 97, 281-356.

- Laurent, T.C., Moore, E.C. & Reichard, P.** (1964) Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from Escherichia Coli B. *J Biol Chem* 239, 3436-3444.
- Le Roy-Duflos, I.** (2001) Possible causal relationships between cerebellar patterns of foliation and hindlimb coordination in laboratory mice: a quantitative trait locus analysis. *Behav Genet* 31, 29-37.
- Lee, S.R., Kim, J.R., Kwon, K.S., Yoon, H.W., Levine, R.L., Ginsburg, A. & Rhee, S.G.** (1999) Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver. *J Biol Chem* 274, 4722-4734.
- Legrier, M.E., Ducray, A., Propper, A. & Kastner, A.** (2001) Region-specific expression of cell cycle inhibitors in the adult brain. *Neuroreport* 12, 3127-3131.
- Lescure, A., Fagegaltier, D., Carbon, P. & Krol, A.** (2002) Protein factors mediating selenoprotein synthesis. *Curr Protein Pept Sci* 3, 143-151.
- Leung, C., Lingbeek, M., Shakhova, O., Liu, J., Tanger, E., Saremaslani, P., Van Lohuizen, M. & Marino, S.** (2004) Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature* 428, 337-341.
- Li, G.S., Wang, F., Kang, D. & Li, C.** (1985) Keshan disease: an endemic cardiomyopathy in China. *Hum Pathol* 16, 602-609.
- Lind, D., Franken, S., Kappler, J., Jankowski, J. & Schilling, K.** (2005) Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res* 79, 295-302.
- Logan, C., Khoo, W.K., Cado, D. & Joyner, A.L.** (1993) Two enhancer regions in the mouse En-2 locus direct expression to the mid/hindbrain region and mandibular myoblasts. *Development* 117, 905-916.

**Lovell, M.A., Xie, C., Gabbita, S.P. & Markesbery, W.R.** (2000) Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in Alzheimer's disease brain. *Free Radic Biol Med* 28, 418-427.

**Low, S.C. & Berry, M.J.** (1996) Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 21, 203-208.

**Lumsden, A. & Keynes, R.** (1989) Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* 337, 424-428.

**Maiorino, M., Flohe, L., Roveri, A., Steinert, P., Wissing, J.B. & Ursini, F.** (1999) Selenium and reproduction. *Biofactors* 10, 251-256.

**Mares, V. & Lodin, Z.** (1970) The cellular kinetics of the developing mouse cerebellum. II. The function of the external granular layer in the process of gyrification. *Brain Res* 23, 343-352.

**Martinez, S. & Alvarado-Mallart, R.M.** (1989) Transplanted mesencephalic quail cells colonize selectively all primary visual nuclei of chick diencephalon: a study using heterotopic transplants. *Brain Res Dev Brain Res* 47, 263-274.

**Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J. & Taketo, M.M.** (1996) Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol* 178, 179-185.

**Matthews, J.R., Wakasugi, N., Virelizier, J.L., Yodoi, J. & Hay, R.T.** (1992) Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res* 20, 3821-3830.

**McKay, R.D.** (1989) The origins of cellular diversity in the mammalian central nervous system. *Cell* 58, 815-821.

**Miale, I. L., Sidman, R. L.** (1961) An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol* 4, 277-296.

**Michalczyk, K. & Ziman, M.** (2005) Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol* 20, 665-671.

**Millen, K.J., Wurst, W., Herrup, K. & Joyner, A.L.** (1994) Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse *Engrailed-2* mutants. *Development* 120, 695-706.

**Millen, K.J., Hui, C.C., Joyner, A.L.** (1995) A role for *En-2* and other murine homologues of *Drosophila* segment polarity genes in regulating positional information in the developing cerebellum. *Development* 121, 3935-3945.

**Miranda-Vizuete, A., Sadek, C.M., Jimenez, A., Krause, W.J., Sutovsky, P. & Oko, R.** (2004) The mammalian testis-specific thioredoxin system. *Antioxid Redox Signal* 6, 25-40.

**Misson, J.P., Edwards, M.A., Yamamoto, M. & Caviness, V.S., Jr.** (1988) Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Brain Res Dev Brain Res* 44, 95-108.

**Misson, J.P., Edwards, M.A., Yamamoto, M. & Caviness, V.S., Jr.** (1988) Mitotic cycling of radial glial cells of the fetal murine cerebral wall: a combined autoradiographic and immunohistochemical study. *Brain Res* 466, 183-190.

**Miyazaki, T., Fukaya, M., Shimizu, H. & Watanabe, M.** (2003) Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur J Neurosci* 17, 2563-2572.

**Miyazawa, K., Himi, T., Garcia, V., Yamagishi, H., Sato, S. & Ishizaki, Y.** (2000) A role for p27/Kip1 in the control of cerebellar granule cell precursor proliferation. *J Neurosci* 20, 5756-5763.

- Moskovitz, J., Bar-Noy, S., Williams, W.M., Requena, J., Berlett, B.S. & Stadtman, E.R.** (2001) Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12920-12925.
- Mustacich, D. & Powis, G.** (2000) Thioredoxin reductase. *Biochem J* 346 (Pt 1) 1-8.
- Nakamura, H., Nakamura, K. & Yodoi, J.** (1997) Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 15, 351-369.
- Neumann, P.E., Mueller, G.G. & Sidman, R.L.** (1990) Identification and mapping of a mouse gene influencing cerebellar folial pattern. *Brain Res* 524, 85-89.
- Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E.** (1991) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, Band IV, 3. Auflage. ISBN 3-8263-3053-6. Verlag Paul Parey.
- Nicklas, W., Baneux, P., Boot, R., Decelle, T., Deeny, A.A., Fumanelli, M. & Illgen-Wilcke, B.** (2002) Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 36, 20-42.
- Nishimura, K., Matsumiya, K., Tsujimura, A., Koga, M., Kitamura, M. & Okuyama, A.** (2001) Association of selenoprotein P with testosterone production in cultured Leydig cells. *Arch Androl* 47, 67-76.
- Nishinaka, Y., Nakamura, H. & Yodoi, J.** (2002) Thioredoxin cytokine action. *Methods Enzymol* 347, 332-338.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S. & Kriegstein, A.R.** (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409, 714-720.

**Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Wong, W.S., Clinton, B.K. & Kriegstein, A.R.** (2002) Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* 22, 3161-3173.

**Nordberg, J. & Arner, E.S.** (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31, 1287-1312.

**Nordberg, J., Zhong, L., Holmgren, A. & Arner, E.S.** (1998) Mammalian thioredoxin reductase is irreversibly inhibited by dinitrohalobenzenes by alkylation of both the redox active selenocysteine and its neighboring cysteine residue. *J Biol Chem* 273, 10835-10842.

**Oster, O.** (1992) Zum Selenstatus in der Bundesrepublik Deutschland. ISBN 3-86007-046-0 Universitätsverlag Jena.

**Patel, J.M., Zhang, J. & Block, E.R.** (1996) Nitric oxide-induced inhibition of lung endothelial cell nitric oxide synthase via interaction with allosteric thiols: role of thioredoxin in regulation of catalytic activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15, 410-419.

**Pestell, R.G., Albanese, C., Reutens, A.T., Segall, J.E., Lee, R.J. & Arnold, A.** (1999) The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocr Rev* 20, 501-534.

**Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G.W. & Behne, D.** (2001) Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *Faseb J* 15, 1236-1238.

**Prohaska, J.R. & Ganther, H.E.** (1976) Selenium and glutathione peroxidase in developing rat brain. *J Neurochem* 27, 1379-1387.

**Rakic, P.** (1971) Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J Comp Neurol* 141, 283-312.

**Rakic, P., Cameron, R. S., Komuro, H.** (1994) Recognition, adhesion, transmembrane signaling and cell motility in guided neuronal migration. *Curr Opin Neurobiol* 4, 63-69.

**Rakic, P.** (1995) Radial versus tangential migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11323-11327.

**Reichenbach, A., Siegel, A., Rickmann, M., Wolff, J.R., Noone, D. & Robinson, S.R.** (1995) Distribution of Bergmann glial somata and processes: implications for function. *J Hirnforsch* 36, 509-517.

**Ross, M.E., Carter, M.L. & Lee, J.H.** (1996) MN20, a D2 cyclin, is transiently expressed in selected neural populations during embryogenesis. *J Neurosci* 16, 210-219.

**Ross, M.E., Fletcher, C., Mason, C.A., Hatten, M.E. & Heintz, N.** (1990) Meander tail reveals a discrete developmental unit in the mouse cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4189-4192.

**Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. & Hoekstra, W.G.** (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 588-590.

**Rundlof, A.K., Carlsten, M., Giacobini, M.M. & Arner, E.S.** (2000) Prominent expression of the selenoprotein thioredoxin reductase in the medullary rays of the rat kidney and thioredoxin reductase mRNA variants differing at the 5' untranslated region. *Biochem J* 347 (Pt 3) 661-668.

**Salvatore, D., Bartha, T., Harney, J.W. & Larsen, P.R.** (1996) Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology* 137, 3308-3315.

**Sauer, B. & Henderson, N.** (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5166-5170.

**Sauer, M.E. & Walker, B.E.** (1959) Radioautographic study of interkinetic nuclear migration in the neural tube. *Proc Soc Exp Biol Med* 101, 557-560.

**Schnorr, B.** (1996) *Embryologie der Haustiere*. 3., überarbeitete Auflage. ISBN 3-432-95203-1. Ferdinand Enke Verlag.

**Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G.W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U.H. & Eick, D.** (2001) The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res* 29, 397-406.

**Schutte, B., Reynders, M.M., Bosman, F.T. & Blijham, G.H.** (1987) Studies with anti-bromodeoxyuridine antibodies: II. Simultaneous immunocytochemical detection of antigen expression and DNA synthesis by in vivo labeling of mouse intestinal mucosa. *J Histochem Cytochem* 35, 371-374.

**Schwartz, P.M., Borghesani, P.R., Levy, R.L., Pomeroy, S.L. & Segal, R.A.** (1997) Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF<sup>-/-</sup> mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. *Neuron* 19, 269-281.

**Schwarz, K. & Foltz, C.M.** (1958) Factor 3 activity of selenium compounds. *J Biol Chem* 233, 245-251.

**Selenium, I.o.m.A.P.** (2000) *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids*. National Academy Press.

**Sherr, C.J. & Roberts, J.M.** (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.

**Sidman, R.L.A., J.B.; Pierce, E.T.** (1971) Atlas of the mouse brain and spinal cord. ISBN 674-05225-0.

**Sievers, J., Pehlemann, F.W., Gude, S., Hartmann, D. & Berry, M.** (1994) The development of the radial glial scaffold of the cerebellar cortex from GFAP-positive cells in the external granular layer. *J Neurocytol* 23, 97-115.

**Smeyne, R.J., Chu, T., Lewin, A., Bian, F., S, S.C., Kunsch, C., Lira, S.A. & Oberdick, J.** (1995) Local control of granule cell generation by cerebellar Purkinje cells. *Mol Cell Neurosci* 6, 230-251.

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

**Spector, A., Huang, R.R., Yan, G.Z. & Wang, R.R.** (1988) Thioredoxin fragment 31-36 is reduced by dihydrolipoamide and reduces oxidized protein. *Biochem Biophys Res Commun* 150, 156-162.

**Spector, A., Yan, G.Z., Huang, R.R., McDermott, M.J., Gascoyne, P.R. & Pigiet, V.** (1988) The effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> upon thioredoxin-enriched lens epithelial cells. *J Biol Chem* 263, 4984-4990.

**Stadtman, T.C.** (1996) Selenocysteine. *Annu Rev Biochem* 65, 83-100.

**Sternberg, N., Hamilton, D., Austin, S., Yarmolinsky, M. & Hoess, R.** (1981) Site-specific recombination and its role in the life cycle of bacteriophage P1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 45 Pt 1, 297-309.

**Sun, Q.A., Wu, Y., Zappacosta, F., Jeang, K.T., Lee, B.J., Hatfield, D.L. & Gladyshev, V.N.** (1999) Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J Biol Chem* 274, 24522-24530.

**Sun, Q.A., Zappacosta, F., Factor, V.M., Wirth, P.J., Hatfield, D.L. & Gladyshev, V.N.** (2001) Heterogeneity within animal thioredoxin reductases. Evidence for alternative first exon splicing. *J Biol Chem* 276, 3106-3114.

**Takahashi, K., Avissar, N., Whitin, J. & Cohen, H.** (1987) Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys* 256, 677-686.

**Tamura, T. & Stadtman, T.C.** (1996) A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1006-1011.

**Thomas, K.R., Musci, T.S., Neumann, P.E. & Capecchi, M.R.** (1991) Swaying is a mutant allele of the proto-oncogene Wnt-1. *Cell* 67, 969-976.

**Tohyama, T., Lee, V.M., Rorke, L.B., Marvin, M., McKay, R.D. & Trojanowski, J.Q.** (1992) Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells. *Lab Invest* 66, 303-313.

**Trenkner, E., Smith, D. & Segil, N.** (1984) Is cerebellar granule cell migration regulated by an internal clock? *J Neurosci* 4, 2850-2855.

**Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R. & Schutz, G.** (1999) Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23, 99-103.

**Tsien, J.Z., Chen, D.F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E.H., Anderson, D.J., Mayford, M., Kandel, E.R. & Tonegawa, S.** (1996) Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 87, 1317-1326.

- Ueno, M., Katayama, K., Yamauchi, H., Nakayama, H. & Doi, K.** (2006) Cell cycle progression is required for nuclear migration of neural progenitor cells. *Brain Res* 1088, 57-67.
- Van Metre, D.C. & Callan, R.J.** (2001) Selenium and vitamin E. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 17, 373-402, vii-viii.
- Vanderpas, J.B., Contempre, B., Duale, N.L., Goossens, W., Bebe, N., Thorpe, R., Ntambue, K., Dumont, J., Thilly, C.H. & Diplock, A.T.** (1990) Iodine and selenium deficiency associated with cretinism in northern Zaire. *Am J Clin Nutr* 52, 1087-1093.
- Vinceti, M., Wei, E.T., Malagoli, C., Bergomi, M. & Vivoli, G.** (2001) Adverse health effects of selenium in humans. *Rev Environ Health* 16, 233-251.
- Vitiello, F., Clos, J., Di Benedetta, C. & Gombos, G.** (1989) Developing rat cerebellum--III. Effects of abnormal thyroid states and undernutrition on gangliosides. *Int J Dev Neurosci* 7, 335-341.
- Voogd, J. & Glickstein, M.** (1998) The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci* 21, 370-375.
- Wahlsten, D. & Andison, M.** (1991) Patterns of cerebellar foliation in recombinant inbred mice. *Brain Res* 557, 184-189.
- Watabe, S., Makino, Y., Ogawa, K., Hiroi, T., Yamamoto, Y. & Takahashi, S.Y.** (1999) Mitochondrial thioredoxin reductase in bovine adrenal cortex its purification, properties, nucleotide/amino acid sequences, and identification of selenocysteine. *Eur J Biochem* 264, 74-84.
- Whanger, P.D.** (2001) Selenium and the brain: a review. *Nutr Neurosci* 4, 81-97.
- Williams, C.H., Jr.** (1995) Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *Faseb J* 9, 1267-1276.

**Wood, K.A., Dipasquale, B. & Youle, R.J.** (1993) In situ labeling of granule cells for apoptosis-associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron* 11, 621-632.

**Xanthoudakis, S. & Curran, T.** (1992) Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *Embo J* 11, 653-665.

**Yang, J., Bian, W. & Jing, N.H.** (1997) [Nestin mRNA expression during the development of mouse central nervous system]. *Sheng Li Xue Bao* 49, 657-665.

**Yang, X.W., Zhong, R. & Heintz, N.** (1996) Granule cell specification in the developing mouse brain as defined by expression of the zinc finger transcription factor RU49. *Development* 122, 555-566.

**Yarimizu, J., Nakamura, H., Yodoi, J. & Takahashi, K.** (2000) Efficiency of selenocysteine incorporation in human thioredoxin reductase. *Antioxid Redox Signal* 2, 643-651.

**Yeh, J.Y., Gu, Q.P., Beilstein, M.A., Forsberg, N.E. & Whanger, P.D.** (1997) Selenium influences tissue levels of selenoprotein W in sheep. *J Nutr* 127, 394-402.

**Zhang, L., Goldman, J.E.** (1996) Developmental fates and migratory pathways of dividing progenitors in the postnatal rat cerebellum. *J Comp Neurol* 370, 536-550.

**Zheng, C., Heintz, N. & Hatten, M.E.** (1996) CNS gene encoding astrotactin, which supports neuronal migration along glial fibers. *Science* 272, 417-419.

**Zhong, L., Arner, E.S. & Holmgren, A.** (2000) Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5854-5859.

**Zimmerman, L., Parr, B., Lendahl, U., Cunningham, M., McKay, R., Gavin, B., Mann, J., Vassileva, G. & McMahon, A.** (1994) Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12, 11-24.

## 12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlichst bedanken, die auf verschiedene Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Jörg Schmidt für die Überlassung des Dissertationsthemas und des Arbeitsplatzes in der Abteilung für Vergleichende Medizin – auch sein Engagement bzgl. einer möglichen „Industrial PhD“-Stelle soll hier erwähnt werden.

Dr. Markus Brielmeier für seine Betreuung, Diskussion und Korrektur meiner Arbeit. Seine Gabe, in den unterschiedlichsten Fachbereichen zielorientiert zu arbeiten und gleichzeitig der Leim zu sein, der unsere Arbeitsgruppe zusammenhält, ist bewundernswert.

Prof. Dr. Wolfgang Schmahl für die Betreuung dieser Arbeit, Einführung in die Neuropathologie und für die Stunden am Diskussions-Mikroskop. Die nicht nur fachlichen Gespräche haben mich immer motiviert und seine Bereitwilligkeit, sowohl negative als auch positive Kritik direkt zu äußern war sehr erfrischend.

Dr. Marcus Conrad für Betreuung, Diskussion und Unterstützung im Erlernen der molekularbiologischen Methoden.

Dr. Cemile Jakupoglu am Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn, und Dr. Ulrich Schweizer am Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, für die sehr fruchtbare Kooperation, interessante Diskussionen und Hilfsbereitschaft bei Fragen aller Art .

Dr. Claudia Kiermayer für die vorzügliche Arbeitsgemeinschaft. Durch ihr methodisches Denken war sie eine große Hilfe bei der täglichen Arbeit.

Die technischen Mitarbeiterinnen Nadja Mayer und Claudia Ludwig für die Assistenz, sowie meine Kolleginnen Dr. Corinna Mörth und Michaela Aichler für ein gutes Arbeitsklima.

Nora, Steffi & Robert, Judith & Oli: Egal ob München, Köln, Leipzig, Bristol, Madagaskar oder evtl. Südafrika - es funktioniert immer!

Barbara für eine ganz besondere Freundschaft, die mich für immer mit Freude an unsere gemeinsame Münchener Zeit zurückblicken lassen wird. Wie viel eine Tasse Milchkaffee bei der besten Freundin ausmacht!

Meine Familie, die trotz den großen Abständen zwischen uns allen, immer für mich greifbar ist – Ein immer offenes und v.a. interessiertes Ohr, aufmunternde Worte, technical support in Form von Stunden am PC (ein Hoch auf Remoteunterstützung!), Päckchen und ihre Bereitwilligkeit, sämtliche Strecken zu überwinden und wenn es bis nach Budapest ist, sind nur Auszüge aus dem Umfang ihrer liebevollen Unterstützung!

## 13 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Jonna Sørensen
Geburtsort	Roskilde, Dänemark
Staatsangehörigkeit	Dänisch

### Schulbildung

08/1983 – 06/1989	Ravnscholtskolen, Allerød, DK
08/1989 – 12/1990	Marie Kruses Skole, Farum, DK
01/1991 – 05/1998	Gymnasium Haus Overbach, Jülich Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulstudium

09/1998 – 11/1999	Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Szent István Universität, Budapest, Ungarn
11/1999 – 03/2004	Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
04/2004	Approbation

### Promotion

Seit 04/2004	GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg Abteilung für Vergleichende Medizin
--------------	--