

Aus dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums  
Hamburg-Eppendorf  
Institutsdirektor: Herr Prof. Dr. med. Andreas Gal

# **„Expressionsanalyse des *Fam134c*-Gens“**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Tabea Linne,  
geboren am 02.03.1984 in Göttingen

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 4.3.2011

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der / die Vorsitzende: PD Dr. I. Kurth

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter / in: Prof. Dr. Gabriele Rune

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter / in: Prof. Dr. A. Gal

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	5
1.1.	Die <i>Fam134</i> -Genfamilie.....	5
1.2.	Das <i>Fam134c</i> -Gen.....	7
1.3.	Der Golgi-Apparat.....	7
<b>2.</b>	<b>Fragestellung</b> .....	10
<b>3.</b>	<b>Material</b> .....	11
3.1.	Chemikalien und Enzyme.....	11
3.2.	Puffer und Lösungen.....	11
3.3.	Antikörper.....	13
3.4.	Zellen.....	13
3.5.	Mausmodell.....	13
3.6.	Genehmigung der Tierversuche.....	14
<b>4.</b>	<b>Methoden</b> .....	14
4.1.	Perfusion und Fixation.....	14
4.2.	Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten.....	14
4.3.	Immunfluoreszenzfärbung von N2a-Zellen.....	15
4.4.	Behandlung von N2a-Zellen mit Brefeldin A .....	15
4.5.	<i>In-situ</i> -Hybridisierung.....	16
4.6.	$\beta$ -Galaktosidase Färbung.....	17
4.7.	Elektronenmikroskopie.....	17
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	18
5.1.	$\beta$ -Galaktosidase Färbung.....	18
5.1.1.	Expression während der Embryonalentwicklung.....	19
5.1.2.	Expression von <i>Fam134c</i> im zentralen Nervensystem der adulten Maus.....	22
5.1.3.	Expression im peripheren Nervensystem.....	33

5.2.	Immunfluoreszenzfärbung.....	34
5.2.1.	Fam134c wird in hippocampalen Neuronen exprimiert.....	35
5.2.2.	Expression im Kleinhirn.....	36
5.2.3.	Expression in Motoneuronen.....	38
5.2.4.	Expression im Spinalganglion.....	39
5.2.5.	Expression in der Retina.....	41
5.2.6.	Expression in der Hypophyse.....	42
5.3.	Behandlung von N2a-Zellen mit Brefeldin A.....	43
5.4.	<i>In-situ</i> -Hybridisierung.....	45
<b>6.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>50</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>51</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagungen.....</b>	<b>55</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>56</b>
<b>11.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>57</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Die FAM134-Genfamilie

Die *FAM134*-Genfamilie (family with sequence similarity 134) umfasst drei Mitglieder, die auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind: *FAM134A* (2q36.1), *FAM134B* (5p15.1) und *FAM134C* (17q21.31).

Die Proteine der *FAM134*-Genfamilie sind laut Strukturvorhersagen integrale Membranproteine, die jeweils über vier hydrophobe Segmente verfügen. *FAM134B* weist zusätzlich eine C-terminale Coiled-Coil Domäne auf, die möglicherweise Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Die genaue subzelluläre Lokalisation und Funktion der Proteine ist nicht bekannt.

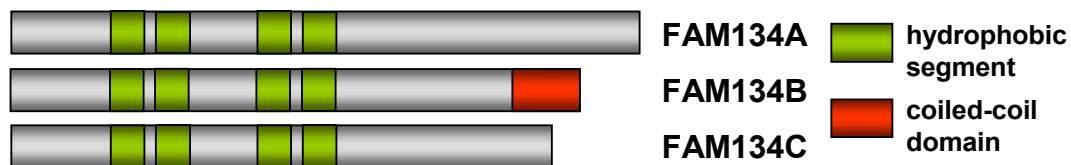


Abb.1: Schematische Darstellung der Proteine der FAM134-Familie. Die hydrophoben Segmente der integralen Membranproteine sind in grün und die Coiled-coil Domäne ist in rot dargestellt.

Kürzlich konnten Mutationen im *FAM134B*-Gen mit einer Form der hereditären sensorisch-autonomen Neuropathie (HSAN) in Zusammenhang gebracht werden (Kurth et al. 2009). Die Patienten litten unter seit der Kindheit bestehenden Sensibilitätsstörungen der distalen Extremitäten, schweren Osteolysen und Nekrosen an Händen und Füßen, sowie autonomen Störungen in Form von Harninkontinenz und intermittierender Hyperhidrosis. Die elektrophysiologischen Untersuchungen ergaben ein axonales Schädigungsmuster und auch die Nervenbiopsie bestätigte eine axonale Neuropathie.



Abb.2: Mutationen im *FAM134B*-Gen bewirken eine hereditäre sensorisch-autonome Neuropathie. Die Nervenschädigungen führen zu Osteolysen und Mutilationen der distalen Extremitäten.

Aus DNA einer konsanguinen Familie mit vier erkrankten und fünf gesunden Kindern wurde eine SNP-Chip-Analyse durchgeführt, wodurch eine 44 Gene umfassende Kandidatenregion für die Erkrankung auf Chromosom 5 lokalisiert werden konnte. Es konnte eine homozygote Punktmutation im *FAM134B*-Gen nachgewiesen werden, die zu einem vorzeitigen Stopcodon führt. Bei drei weiteren untersuchten Familien mit Symptomen der hereditären sensorisch-autonomen Neuropathie wurden in der Folge ebenfalls loss-of-function Mutationen im *FAM134B*-Gen detektiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Mutationen im *FAM134B*-Gen krankheitsursächlich für eine HSAN sein können. Erste Hybridisierungsstudien des Gens im Mausorganismus ergaben hohe Expressionslevel in den sensorischen und autonomen Ganglien. Das von *FAM134B* codierte Protein konnte in unserer Arbeitsgruppe als Golgi-Protein identifiziert werden.

Vor diesem Hintergrund sollten nun auch die zwei weiteren Mitglieder der *FAM134*-Genfamilie untersucht werden. Expressionsanalysen an murinen Geweben sollten dabei erste Hinweise über die jeweiligen Funktionen ergeben.

## 1.2. Das *FAM134C*-Gen

In der vorliegenden Arbeit wird das Expressionsmuster des *Fam134c*-Gens analysiert. Das humane *FAM134C*-Gen, welches auch als *DKFZp686B1036* und *FLJ33806* bezeichnet wird, ist auf Chromosomen 17q21.31 im Bereich 37,985,066-38,014,928 bp lokalisiert.

In der Ensembl Human Gene View Datenbank ist das *FAM134C*-Gen mit der Identifikationsnummer ENSG00000141699 gelistet. Dort sind auch die Sequenzen der cDNA und mRNA, sowie die Aminosäuresequenz des Proteins zu finden ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/geneview?gene=ENSG00000141699](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000141699)).

Das *FAM134C*-Gen umfasst neun Exons und codiert ein Protein, welches laut Vorhersage über vier Transmembrandomänen verfügt. In der vorliegenden Studie konnte das *Fam134c*-Protein mittels immunhistochemischer Analysen als Membranprotein des Golgi-Apparates identifiziert werden.

## 1.3. Der Golgi-Apparat

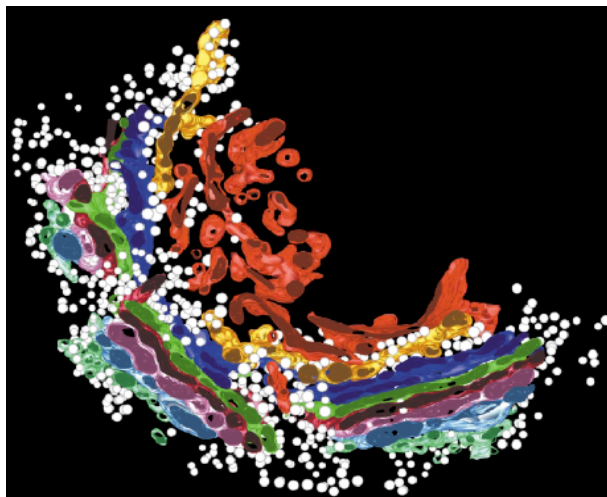


Abb.3: 3-Dimensionale Rekonstruktion von EM-Aufnahmen des Golgi-Apparates. Die Zisternen der trans-Seite sind rot und die der cis-Seite sind hellblau angefärbt. Quelle: Brad J., Howell M. and K. E., 2002. The mammalian Golgi-complex debates. Nature reviews, Molecular cell biology. 3, 789-795.

Der Golgi-Apparat ist für die Modifikation, die Sortierung und den Transport von Makromolekülen von zentraler Bedeutung. Er besteht aus Stapeln von flachen, parallel

angeordneten Zisternen, die miteinander verbunden sind und an deren seitlichen Enden zahlreiche Vesikel ausknospen (Brad et al. 2002).

Mindestens fünf Regionen lassen sich unterscheiden:

Cis-Golgi-Netzwerk, Cis-Golgi, Mediale-Golgi, Trans-Golgi und Trans-Golgi-Netzwerk (Cooper 2000). Proteine werden nach ihrer Synthese über einen Übergangsbereich, dem ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment), vom Endoplasmatischen Retikulum zur konvex gebogenen cis-Seite des Golgi-Apparates transportiert. Nach der Modifikation und Sortierung der Moleküle werden an der konkaven trans-Seite Sekretionsvesikel abgeschnürt, über die ein weiterer Transport zum Zielort erfolgt.

Die häufigste Modifikation im Golgi-Apparat stellt die Glycosylierung dar. Im Lumen der Zisternen werden Kohlenhydrate durch Glycosyltransferasen auf Proteine und Lipide übertragen. Diese Glycokonjugate sind z.B. Bestandteil der Glycokalix, der Immunglobuline, sowie der Proteoglykane (Hirsch-Kauffmann et al. 2000).

Weitere posttranslationale Modifikationen erfolgen durch Sulfatierung, Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung (Mogelsvang et al. 2006; Habuchi et al. 2004; Preisinger et al. 2005).

Des Weiteren findet im Golgi-Apparat die proteolytische Prozessierung und damit Aktivierung von Insulin, Glukagon und weiteren Peptidhormonen statt. Durch Endoproteasen des Trans-Golgi-Netzwerkes werden die Hormone in ihre aktive Form überführt (Eurekah Bioscience Collection 2003).

Neben der Modifikation sind die Sortierung von Proteinen nach ihrem Bestimmungsort und die Vesikelbildung wichtige Funktionen des Golgi-Apparates. In den Vesikeln können Hormone und Neurotransmitter gespeichert und bei Bedarf freigesetzt werden. Einige Proteine z.B. lysosomale Enzyme sind für den Intrazellularraum bestimmt, andere werden nach außen sezerniert. Die Mechanismen der spezifischen Sortierungsprozesse im Golgi-Apparat sind Gegenstand aktueller Forschung.

Bei der Modifikation der Proteine übernehmen die einzelnen Regionen des Golgi-Apparates unterschiedliche Aufgaben, so dass im Cis-, Medialen- und Trans-Golgi jeweils eine spezifische Zusammensetzung von Enzymen vorherrscht. Die Enzyme, die an frühen Schritten der Modifikation beteiligt sind, finden sich in den Zisternen der Cis-Seite, wohingegen Enzyme, die in spätere Prozessierungsschritte involviert sind, in den Zisternen der Trans-Seite lokalisiert sind. Es werden unterschiedliche Modelle diskutiert,



die den Proteintransport durch den Golgi-Apparat und dabei die Aufrechterhaltung der spezifischen Lokalisation der Enzyme erklären.

Das Vesikel-Transportmodell stellt den Golgi-Apparat als statische Struktur mit einer festen Anzahl an Zisternen mit konstantem Durchmesser dar. Mittels Transportvesikeln, so genannten COPI-Vesikeln (coatamer protein complex-1), die eine glatte Oberfläche aufweisen, werden die Moleküle von einer Zisterne zu der nächsten transportiert, indem die Vesikel mit der in Trans-Richtung benachbarten Zisterne verschmelzen. Die spezifische Enzymzusammensetzung wird durch Oligomerisation mit den Enzymen derselben Zisterne aufrechterhalten.

Im Gegensatz zum Vesikel-Transportmodell wird der Golgi-Apparat im Zisternen-Maturierungs-Modell als dynamische Struktur beschrieben, in der die Zisternen selbst durch den Golgi-Apparat wandern. Das Cis-Golgi-Netzwerk entsteht aus dem ERGIC durch Fusion der Membranen. Neue Cis-Golgi-Zisternen gehen aus dem Cis-Golgi-Netzwerk hervor und die bestehenden alten Zisternen werden zu neuen Medialen- und die schon bestehenden Medialen- zu neuen Trans-Golgi-Zisternen.

Die Aufrechterhaltung der Enzymzusammensetzung erfolgt beim Maturierungsmodell mittels COPI Vesikel, die durch retrograden Transport Enzyme zurücktransportieren (Rebouille et al. 2005; Warren et al. 1998; Glick et al. 2000; Orci et al. 1997; Martiez-Menérguez et al. 2001; Bothman et al. 1994; Allan et al. 1999).

Dass der Golgi-Apparat eine weitgehend dynamische Struktur aufweist, zeigt sich auch während der Mitose. Vor der Zellteilung werden Matrixproteine des Golgi-Apparates mittels Proteinkinasen phosphoryliert, was eine Fragmentierung des Golgi-Apparates und Verteilung im Zytosol bewirkt. In den Tochterzellen werden die Proteine dephosphoryliert und die ursprüngliche Struktur wird wieder hergestellt (Robbin and Gonatas 1964; Warren 1993). Neuere Ergebnisse zeigen, dass eine Hemmung der Fragmentierung des Golgi-Apparates den Eintritt der Zelle in die Mitose verhindert (Sutterlin et al. 2002).

Während der Apoptose geschieht ein ähnlicher Prozess der Fragmentierung, in dem der Golgi-Apparat in tubulovesikuläre Strukturen zerfällt (Chiu et al. 2002; Lane et al. 2002; Machamer 2003).

Bei mehreren neurodegenerativen Erkrankungen wie der Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), der Corticobasalen Degeneration, der Alzheimer Demenz, der Creuzfeldt-Jakob

Erkrankung und der Spinocerebellären Ataxie Typ 2 (SCA2) wurden über Fragmentierungen des Golgi-Apparates berichtet (Gonatas et al. 2006). Ob es sich hierbei um eine frühe Reaktion der Zelle auf Stresssignale handelt, oder ob der Golgi-Apparat direkt an der Apoptose beteiligt ist, ist Gegenstand aktueller Forschung.

## 2. Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression des *Fam134c*-Gens analysiert werden. Mit einem polyklonalen Antikörper gegen das Protein sollte eine immunhistochemische Analyse an verschiedenen Gewebeschnitten der adulten Maus sowie an kultivierten Zellen durchgeführt werden. Die genaue Lokalisation des Proteins sollte durch Mehrfachfärbungen mit geeigneten Antikörpern analysiert werden.

Zusätzlich sollten zur detaillierten Bestimmung des Expressionsmusters auf mRNA-Ebene *in-situ*-Hybridisierungen an Mausembryonen vorgenommen werden.

Des Weiteren lag ein transgenes Mausmodell vor, in dem das *Fam134c*-Gen an den codierenden Bereich des *lacZ*-Gens gekoppelt ist. Nach terminierten Verpaarungen der Mäuse sollten die Embryonen *in toto* zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten und die Organe der adulten Maus durch  $\beta$ -Galaktosidase Färbung auf das Expressionsmuster des *Fam134c*-Gens analysiert werden. In den Zellen, die das *Fam134c/lacZ* Fusionsprodukt exprimieren, entsteht eine Blaufärbung.

### **3. Material**

#### **3.1. Chemikalien und Enzyme**

Agarose	- Invitrogen, Carlsbad, USA
Brefeldin A	- Sigma, München
DAPI	- Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DPX	- Fluka Chemie GmbH, Buchs
Essigsäureanhydrid	- Sigma, München
Ethanol	- Merck, Darmstadt
Fluoromount	- Southern Biotech, Birmingham (UK)
Foetales Kälberserum (FCS)	- PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
37% Formaldehyd	- Fluka Chemie GmbH, Buchs
25% Glutaraldehyd	- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
OPTI-MEM	- Invitrogen/ Gibco Auckland
Paraformaldehyd	- Sigma Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	- Gibco/ BRL, Eggenstein
RNAase A	- Roche, Mannheim
Tissue-Tek	- Sakura (Zoeterwoude, Niederlande)
Triton X-100	- Sigma, München
Tris Base	- Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
X-Gal	- Carl Roth GmbH, Karlsruhe

#### **3.2. Puffer und Lösungen**

Blocklösung für Immunhistochemie:	1 x PBS, 0,3% Triton-X-100, 3% NGS
Kulturmedium für N2a-Zellen:	OPTI-MEM mit Glutamax; 1% Pen/Strep, 10% foetales Kälberserum

LacZ Fixativ:	0,27 ml 37% Formaldehyde, 0,08 ml 25% Glutaraldehyde, 0,5 ml 20 x PBS ad 10 ml Aqua <sub>bidest</sub> .
10 x PBS:	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , mit KCl pH 7,4 einstellen
4% PFA	4 g PFA in 95 ml Aqua <sub>bidest</sub> , auf 65 °C erhitzen, 5 M NaOH und 10 ml 10 x PBS zugeben
RNAse A-Puffer:	25 ml 5 M NaCl 500 µl 0,5 M EDTA, pH 8, 2,5 ml 1 M Tris, pH 8, ad 250 ml Aqua <sub>bidest</sub>
20 x SSC:	175,3 g NaCl 88,2 g Tri-NaCitrat 2H <sub>2</sub> O Endkonzentration 0,3 M
1 M Triethanolamin:	185,65 g Triethalonamin-HCL ad 1000 ml H <sub>2</sub> O auf pH 8 einstellen mit 10 M NaOH
X-Gal stain	0,25 ml 40 mg/ml X-Gal, 0,1 ml 500 mM K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> Kaliumhexacyanoferrat (II) in Aqua <sub>bidest</sub> , 0,1 ml 500 mM K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> Kaliumhexacyanoferrat (III) in Aqua <sub>bidest</sub> , 0,1 ml 200mM MgCl <sub>2</sub> , 1 ml 10 x PBS, 0,2 ml 10% Triton X-100 ad 10 ml Aqua <sub>bidest</sub>

### **3.3. Antikörper**

#### **Primärantikörper:**

Anti-Fam134c      Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen. Verdünnung: 1:500

Anti-Giantin                      Monoklonaler Antikörper aus der Maus (Alexis, Schweiz). Verdünnung: 1:2000

Anti- $\gamma$ -Adaptin      Monoklonaler Antikörper aus der Maus (BD Biosciences Pharmingen, USA). Verdünnung: 1:1000

#### **Sekundärantikörper:**

Ziege-Anti-Kaninchen IgG:      Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Leiden, NL),  
Verdünnung: 1:2000

Ziege-Anti-Maus IgG:      Alexa Fluor 555 (Invitrogen, Leiden, NL),  
Verdünnung: 1:2000

### **3.4. Zellen**

Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um N2a-Zellen (Neuroblastoma-Zellen der Maus).

### **3.5. Mausmodell**

Es konnte ein transgenes Mausmodell generiert werden, in dem das *lacZ*-Gen innerhalb des letzten Exons des *Fam134c*-Gens vorliegt. Der verwendete ES Zell-Klon CSG013 wurden von der Firma Bay Genomics bezogen.

### **3.6. Genehmigung der Tierversuche**

Eine entsprechende Tierversuchsgenehmigung des Instituts für Humangenetik liegt unter der Nummer 84/07 vor.

## **4. Methoden**

### **4.1. Perfusion und Fixation**

Die Perfusion der Organe über den Blutkreislauf des Tieres ist für das vollständige Auswaschen der Blutzellen sowie für die Vernetzung und Konservierung der Zellstrukturen unablässig. Die Maus wurde zunächst durch eine intraperitoneale Injektion mit Ketamine (Sigma) betäubt. Der Brustkorb wurde geöffnet und das Herz freigelegt. Mit einer Kanüle wurde die linke Herzkammer punktiert und 1 x PBS in den Blutkreislauf der Maus gepumpt. Durch einen Schnitt in den rechten Vorhof konnte das Blut nach Passage des großen Körperkreislaufs vollständig abfließen.

Anschließend erfolgte entweder die Perfusion mit 50 ml LacZ Fixativ, wenn eine  $\beta$ -Galaktosidase Färbung durchgeführt werden sollte oder mit 50 ml 4%iger Paraformaldehydelösung als Fixativ für die Immunhistochemie. Die Organe wurden präpariert und für eine halbe Stunde bei 4°C mit dem jeweiligen Fixativ nachfixiert.

### **4.2. Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten**

Die in Paraformaldehyde fixierten Organe wurden drei Mal für fünf Minuten mit 1 x PBS gewaschen und über Nacht mittels 30%iger Saccharoselösung, gelöst in 1 x PBS, dehydriert. Mit dem Mikrotom wurden 7-9  $\mu$ m dicke Schnitte von den einzelnen Organen angefertigt, die auf Histobond-Objektträger der Firma Marienfeld aufgetragen wurden. Auf die Schlitten (Shandon Coverplate) der Feuchtkammer (Immunstaining chamber) wurde jeweils 1 ml 1 x PBS gegeben und die Objektträger mit der Seite des Gewebeschnittes aufgelegt und in die Feuchtkammer geschoben. Die Schnitte wurden für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur mit 1 ml Blocklösung inkubiert, um

unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Die Inkubation mit dem in Blocklösung verdünnte Primärantikörper, der spezifisch an das zu analysierende Protein bindet, erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Schnitte drei Mal für fünf Minuten mit 1 x PBS gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Der Sekundärantikörper, welcher an einen Immunfluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist und an den Primärantikörper bindet, wurde zugegeben und für zwei Stunden erfolgte bei Raumtemperatur in einem abgedunkelten Raum die Inkubation. Abschließend wurden Deckgläschen mit Fluoromount aufgelegt und die Präparate am konfokalen Mikroskop ausgewertet. Der Immunfluoreszenzfarbstoff, welcher an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, wird durch das Licht eines Lasers angeregt. Da der Sekundärantikörper an den Primärantikörper gebunden ist und dieser wiederum an das spezifische Protein, entsteht dort, wo sich das Protein befindet ein Farbsignal.

#### ***4.3. Immunfluoreszenzfärbung von N2a-Zellen***

Die auf Deckgläschen ausgesäten und ein bis zwei Tage gewachsenen N2a-Zellen wurden zwei Mal für fünf Minuten vorsichtig mit 1 x PBS gewaschen und für 15 Minuten mit 4% PFA fixiert. Anschließend wurde erneut drei Mal mit 1 x PBS gewaschen und wie bei der Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten mit dem Schritt der halbstündlichen Inkubation mit Blocklösung fortgeföhren.

#### ***4.4. Behandlung von N2a-Zellen mit Brefeldin A***

Die auf Deckgläschen ausgesäten N2a-Zellen wurden für 5 min, 15 min und 30 min mit 5 µg/ml Brefeldin A bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend erfolgte die Fixierung mit Paraformaldehyd und die Immunfluoreszenzfärbung.

## **4.5. *In-situ*-Hybridisierung**

Mit der *in-situ*-Hybridisierung kann durch eine radioaktiv markierte RNA-Antisense-Sonde die zu analysierende RNA im Gewebe nachgewiesen werden.

Es lag bereits eine getestete Sonde für die *Fam134c*-RNA vor, mit der 16 µm dicke Schnitte von Embryonen hybridisiert wurden. Die Schnitte wurden zunächst 10 min mit 4% PFA fixiert und zwei Mal für 10 min mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte für drei Minuten eine Inkubation in 0,1 M Triethanolamin, danach 10 min in 0,1 M Triethanolamin mit 350 µl Essigsäureanhydrid. Die Schnitte wurden einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (30%, 50%, 70%, 95% und 100% für je drei Minuten) unterzogen. Nach dem Trocknen der Schnitte bei Raumtemperatur wurde die Sonde aufgetragen, wobei 100 µl des Sonden-Hybmix-Gemisches pro Objektträger verwendet wurde. Die Ränder des Deckgläschens wurden mit DPX versiegelt. Nach einer Stunde Trocknungszeit wurden die Präparate 24 Stunden bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der DPX-Rand abgelöst. Nach 15 Minuten Inkubation in 4 x SSC auf dem Schüttler wurden die Deckgläschen abgenommen. Es wurde drei Mal für 10 Minuten mit 4 x SSC gewaschen und danach wurden die Objektträger für eine halbe Stunde in RNase-A-Puffer mit 500 µl RNase A bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine absteigende SSC-Reihe durchgeführt: 2 x SSC, 1 x SSC, 0,5 x SSC für je 10 Minuten bei Raumtemperatur und schließlich mit 0,1 x SSC bei 55°C für eine halbe Stunde. Zum Abkühlen wurden die Objektträger drei Minuten in 0,1 x SSC bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger wurden schließlich in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 70%, 95%) für je drei Minuten gereinigt und bei Raumtemperatur getrocknet. Dann wurden die Objektträger in eine Filmkassette mit einem Röntgenfilm (Kodak BioMax MR) eingelegt und mehrere Tage belichtet. Mit der Optimax Typ TR Entwicklermaschine der Firma MS Laborgeräte wurden die Filme entwickelt.



#### **4.6. $\beta$ -Galaktosidase Färbung**

Es wurde ein transgenes Mausmodell generiert, bei dem im letzten Exon des *Fam134c*-Gens der codierende Bereich des *lacZ*-Gens eingebracht wurde. Das *lacZ*-Gen codiert die  $\beta$ -Galaktosidase, ein Enzym des Bakteriums *E. coli*, welches die Spaltung von Lactose in Galaktose und Glucose katalysiert. Die  $\beta$ -Galaktosidase kann außerdem das synthetische Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid (X-Gal) zu einem blauen Indigofarbstoff spalten. In den Geweben, in denen das *Fam134c/lacZ*-Fusionsprodukt vorkommt, entsteht nach Zugabe von X-Gal eine Blaufärbung, da die *Fam134c*-Proteine an die  $\beta$ -Galaktosidase gekoppelt sind.

Die Durchführung der  $\beta$ -Galaktosidase Färbung erfolgte nach folgendem Protokoll: Die mit Lac-Z Fixativ fixierten Organe wurden drei Mal für fünf Minuten mit 1 x PBS gewaschen, in 3%iges Agarosegel eingebettet, und mit dem Vibratom wurden 300  $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt. Anschließend erfolgte die Färbung mit X-Gal Lösung für eine Stunde im Dunklen bei Raumtemperatur. Die Embryonen wurden für 12 Stunden gefärbt, wenn möglich mit dem Vibratom geschnitten und in 1 x PBS mit 1 mM EDTA überführt, um die Farbreaktion zu stoppen. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte am Lichtmikroskop und mit der Digitalkamera.

#### **4.7. Elektronenmikroskopie**

Die Präparation und die Färbung der Gewebeschnitte für die Elektronenmikroskopie sowie die Aufnahmen am Elektronenmikroskop wurden von Frau Dr. Michaela Schweizer im ZMNH (Hamburg) durchgeführt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. $\beta$ -Galaktosidase Färbung

Für das *Fam134c*-Gen konnte ein transgenes Mausmodell generiert werden, in dem der codierende Bereich des *lacZ*-Gens im letzten Exon des *Fam134c*-Gens im geeigneten Leserahmen integriert ist. Das *lacZ*-Gen codiert für die  $\beta$ -Galaktosidase, welche das synthetische Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid (X-Gal) zu einem blauen Indigofarbstoff spalten kann. Das *Fam134c*-Protein ist bei den verwendeten transgenen Mäusen mit der  $\beta$ -Galaktosidase fusioniert, so dass nach Zugabe von X-Gal in den Geweben, in denen das *Fam134c*-Protein exprimiert wird, eine Blaufärbung entsteht.

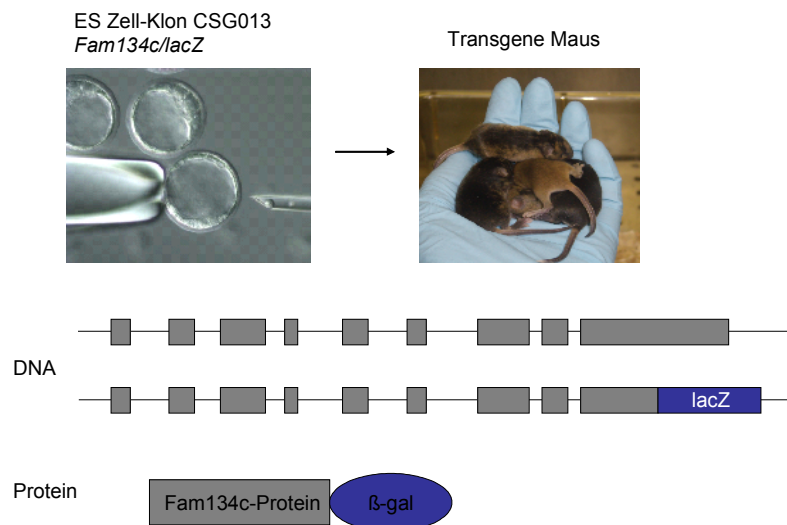


Abb.4: Generierung eines transgenen Mausmodells. Oben: Abbildung der embryonalen Stammzellen (ES) und der daraus resultierenden transgenen Mäuse. Mitte: Schematische Darstellung des Gens *Fam134c*. Die neun Exons sind als graue Kästen dargestellt. Unter dem Wildtypallel ist das Fusionsgen mit der *lacZ*-Kassette im letzten Exon abgebildet. Unten: Darstellung des Fusionsproduktes von *Fam134c* mit der  $\beta$ -Galaktosidase.

### 5.1.1. Expression während der Embryonalentwicklung

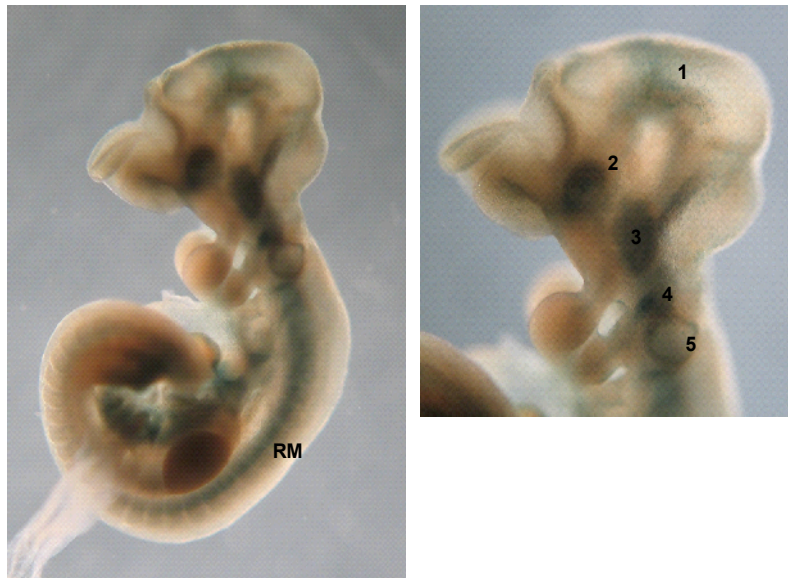


Abb.5: Mausembryo im Entwicklungsstadium E9: Rückenmark (RM), Telencephalon (1), Retina (2), Ganglion trigeminale (3), Ganglion geniculi (4), Ohranlage (5)

Die Abbildung 5 zeigt einen Mausembryo im Entwicklungsstadium E9. Im Rückenmark, im Gehirn, in der Retina, im Ganglion trigeminale und im Ganglion geniculi ist eine Blaufärbung zu verzeichnen, die für die Expression von *Fam134c* in diesen Strukturen spricht. Die Blaufärbung im Gehirn ist in diesem Entwicklungsstadium noch deutlich schwächer als in den Ganglien und im Rückenmark.

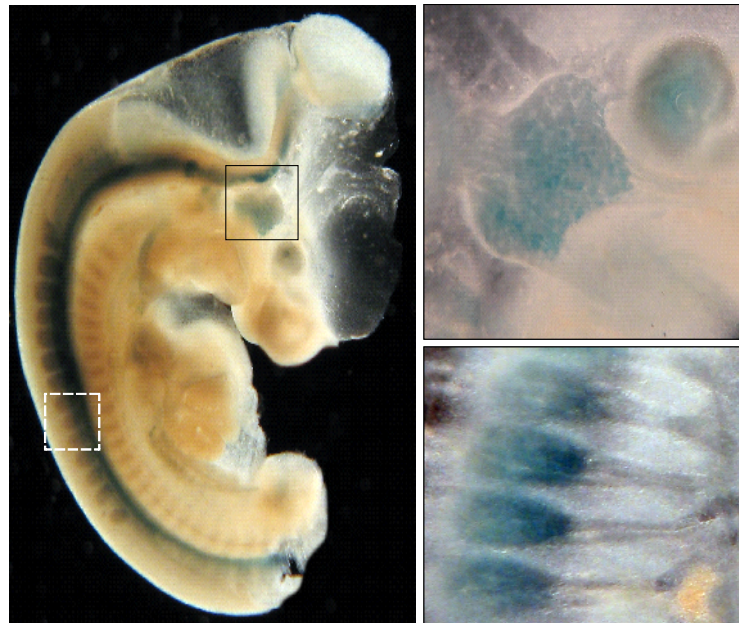


Abb.6: 300µm dicker Sagittalschnitt eines Mausembryos im Entwicklungsstadium E11. Im Ganglion trigeminale (rechts oben) und in den Spinalganglien (rechts unten) wird *Fam134c* exprimiert.

In der Abbildung 6 ist ein Mausembryo im Entwicklungsstadium E11 zu sehen. Das Ganglion trigeminale (rechtes oberes Bild), sowie die Spinalganglien (rechtes unteres Bild), in denen *Fam134c* exprimiert wird, sind vergrößert dargestellt. Das Ganglion trigeminale ist ein sensorisches Ganglion, welches die Zellkörper der ersten afferenten Neurone des Nervus trigeminus enthält und für die sensorische Versorgung der Gesichtshaut, der Cornea und Bindehaut, der Schleimhäute der Nasen- und Mundhöhle, der Zähne und dem größten Teil der Hirnhäute verantwortlich ist. Die drei Hauptäste (N. ophthalmicus, N. maxillaris und N. mandibularis) des Ganglion trigeminale weisen keine Blaufärbung auf. Auch in den Spinalganglien (rechtes unteres Bild) ist die Blaufärbung auf die Ganglien beschränkt.

Diese Abbildungen zeigen, dass *Fam134c* nur in den Ganglien, die die Zellkörper der pseudounipolaren Nervenzellen enthalten, jedoch nicht in den abgehenden Nervenfasern exprimiert wird.



Abb.7: 300 µm dicker Vibratomschnitt durch den Kopf eines Mausembryos (E11): Telenzephalon (1), Hippocampus (2), Cerebellum (3), Retina (4), Ganglion trigeminale (5), Nucleus principalis nervi trigemini (6), Ganglion cervicale superius (7)

In der Vergrößerung eines Embryokopfes (E11) ist die Blaufärbung im Telenzephalon, im Hippocampus, im Cerebellum, in der Retina, im Ganglion trigeminale, im Nucleus principalis n. trigemini und im sympathischen Ganglion cervicale superius zu erkennen.

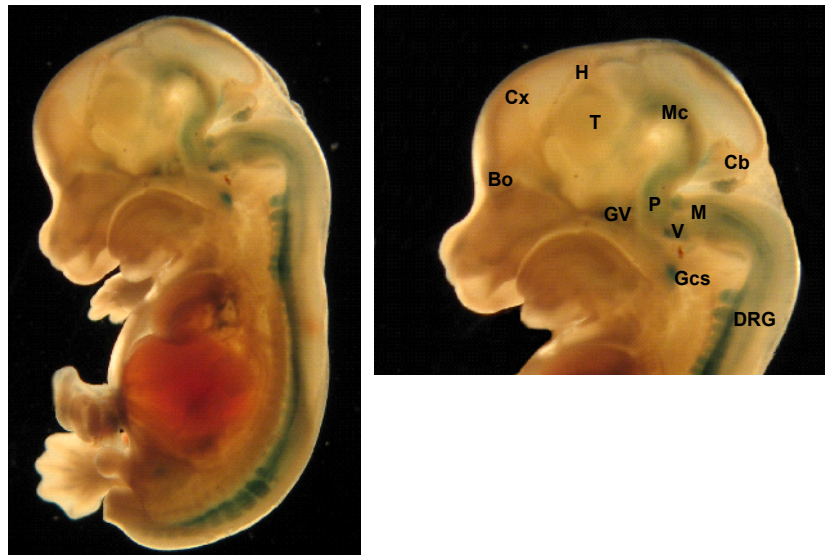


Abb.8: Entwicklungsstadium E14: Bulbus olfactorius (Bo), Cerebellum (Cb), Cortex (Cx), Spinalganglien (DRG), Ganglion cervicale superior (Gcs), Ganglion trigeminale (GV), Hippocampus (H), Medulla (M), Mesencephalon (Mc), Pons (P), Thalamus (T), Ncl. principalis n. trigemini (V)

Die Abbildung 8 zeigt ein Embryo im Entwicklungsstadium E14. Hier wird besonders die starke Expression des *Fam134c*-Gens im zentralen Nervensystem sowie in den Spinalganglien deutlich. In der Vergrößerung des Kopfes ist zu erkennen, dass vornehmlich der Hirnstamm blau gefärbt ist, jedoch keine Blaufärbung im Thalamus zu beobachten ist. Des Weiteren sind neben den Spinalganglien auch das Ganglion trigeminale sowie das sympathische Ganglion cervicale superior blau gefärbt.

### 5.1.2. Expression von *Fam134c* im zentralen Nervensystem der adulten Maus

Die folgenden Abbildungen zeigen die Expression des *Fam134c*-Gens im zentralen Nervensystem. Die mit dem Vibratom angefertigten 300µm dicken Frontalschnitte des Gehirns wurden zur Bestimmung der gefärbten Strukturen den korrespondierenden Abbildungen des Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org/>) gegenübergestellt.

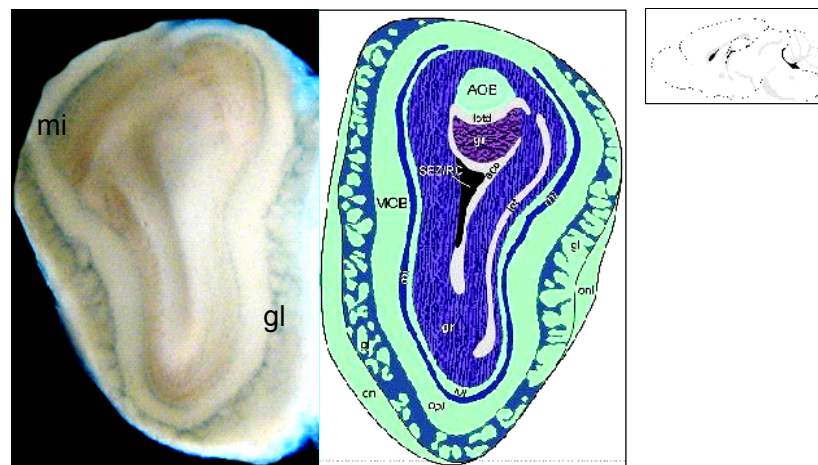


Abb.9: Frontalschnitt durch den Bulbus olfactorius. Bei den blau gefärbten Schichten handelt es sich um das Stratum glomerulosum (gl) und das Stratum mitrale (mi). Rechte Bildhälfte: <http://mouse.brain-map.org/viewImage.do?imageId=130995>

Der Schnitt durch den Bulbus olfactorius zeigt, dass das *Fam134c*-Gen im Stratum glomerulosum und Stratum mitrale des Bulbus olfactorius exprimiert wird. Im Bulbus olfactorius enden die Axone der olfaktorischen Neurone des Riechepithels, und von hier



aus werden die Geruchsinformationen zu kortikalen olfaktorischen Hirnregionen weitergeleitet. Der Bulbus olfactorius setzt sich von außen nach innen aus folgenden Schichten zusammen: 1. Str. fibrosum, 2. Str. glomerulosum, 3. Str. plexiforme externum, 4. Str. mitrale, 5. Str. plexiforme internum, 6. Str. granulosum.

In dem in der Abbildung 9 blau gefärbten Stratum glomerulosum erfolgt die Umschaltung von den olfaktorischen Neuronen zu den Mitral- und Büschelzellen. Außerdem liegen in dieser Schicht die periglomerulären Neurone, die als Interneurone die Weiterleitung des Geruchsignals im Sinne einer Kontrastverstärkung beeinflussen. Auch im Str. mitrale, in dem die Zellkörper der Mitralzellen zu finden sind, wird *Fam134c* exprimiert. Die Axone der Mitralzellen bilden zusammen mit den Axonen der Büschelzellen und den Bulbusafferenzen den Tractus olfactorius, der im Pedunculus olfactorius zum olfaktorischen Cortex zieht.

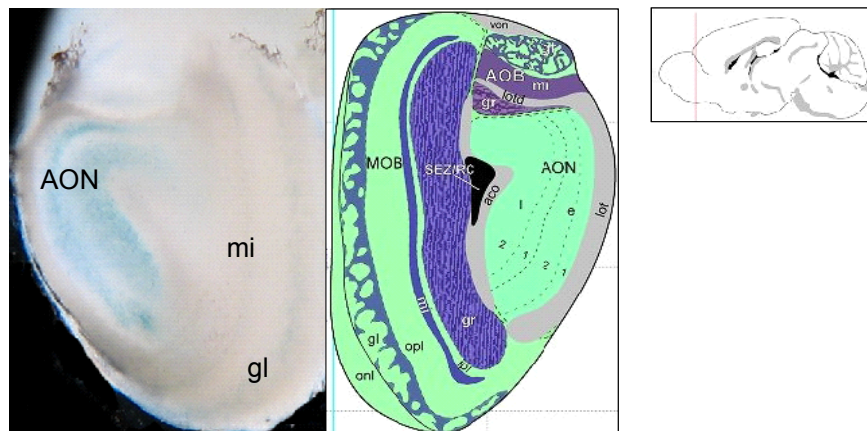


Abb.10: Frontalschnitt auf Höhe des Nucleus olfactorius anterior: Nucleus olfactorius anterior (AON), Bulbus olfactorius, Str. glomerulosum (gl), Bulbus olfactorius, Str. mitrale (mi). Rechte Bildhälfte: <http://mouse.brain-map.org/viewImage.do?imageId=130989>

Im Pedunculus olfactorius liegt zusätzlich der aus multipolaren Neuronen bestehende Nucleus olfactorius anterior (Regio retrobulbaris). Auch hier wird *Fam134c* exprimiert, so dass Mutationen im *Fam134c*-Gen möglicherweise eine Veränderung des Riechvermögens (Hyp- bzw. Anosmie) hervorrufen könnten.

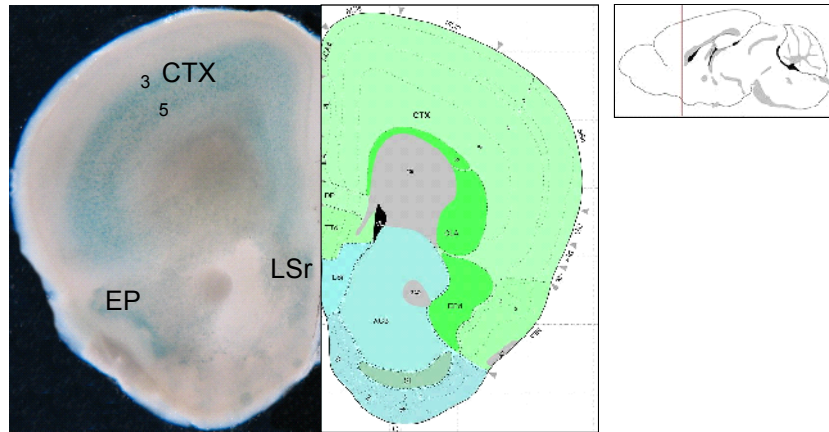


Abb.11: Schnitt in Höhe des motorischen Cortexes: Nucleus endopiriformis (EP), Nucleus septalis lateralis (LS), Cortex cerebri (CTX). Rechte Bildhälfte: <http://mouse.brain-map.org/viewImage.do?imageId=130972>

In der Abbildung 11, die einen Schnitt in Höhe des motorischen Cortexes darstellt, ist die Blaufärbung besonders deutlich in den Pyramidenzellschichten (Schicht 3 und 5) zu erkennen. Dies beruht zum einen auf der hohen Dichte der Pyramidenzellen in diesem Bereich, zum anderen spiegelt es hohe Expressionslevel des *Fam134c*-Gens wieder. Die Molekularschicht (Schicht 1), in der hauptsächlich Nervenfasern liegen, zeigt keine Blaufärbung, und in den Körnerzellschichten (Schicht 2 und 4) ist nur eine sehr schwache Färbung zu erkennen. Die unterste Schicht 6 (lamina multiformis), in der Nervenzellen vorkommen, deren Axone zum Thalamus ziehen, zeigt keine Blaufärbung. Dem gegenüber wird *Fam134c* im Nucleus endopiriforme exprimiert. Er ist ein Teil des piriformen Cortexes, in dem Geruchsinformationen verarbeitet werden.

Des Weiteren ist der Nucleus septalis lateralis (Laterales Septum) angefärbt. Die Septumregion ist eine wichtige Schaltstation zwischen limbischen Arealen einerseits und hypothalamischen und Hirnstammzentren andererseits. Der Nucleus septalis lateralis ist insbesondere für die Vermittlung von absteigenden Einflüssen der limbischen Hirnareale auf endokrine und autonome Prozesse zuständig.



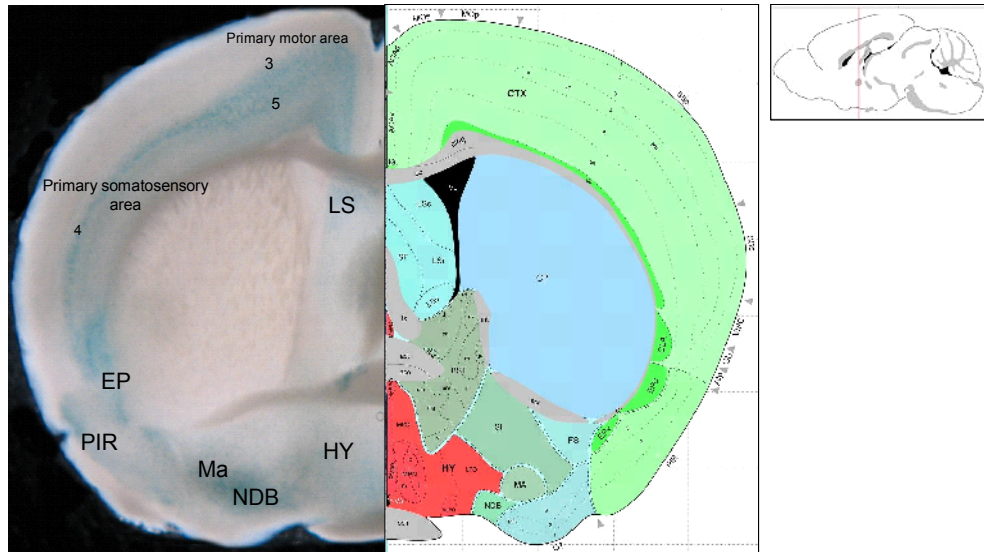


Abb.12: Frontalschnitt auf Höhe der Seitenventrikel: Nucleus septalis lateralis (LS), Hypothalamus (HY), Nucleus diagonalis (NDB), Nucleus magnocellulare (Ma), Nucleus endopiriforme (EP), Area piriforme (PIR). Rechte Bildhälfte: <http://mouse.brain-map.org/viewImage.do?imageId=130957>

Der Nucleus striae diagonales (Diagonales Band), welcher in der Abbildung 12 blau gefärbt ist, ist wie der Nucleus septalis lateralis Bestandteil der Septumregion. Zusammen mit dem Medialen Septum bildet der Ncl. striae diagonales den Mediales-Septum/Diagonales Band-Komplex (MSDB). Er erhält Afferenzen aus hypothalamischen Gebieten, aus dem Hirnstamm und aus dem Rückenmark. Die Efferenzen des MSDB verlaufen zum Hippocampus und in die limbischen Cortexareale. Diese Areale spielen eine wichtige Rolle bei Lern- und Erinnerungsprozessen. Bei Läsionen in der Septumregion wurde über Störungen der Gedächtnisleistung und Persönlichkeitsveränderungen berichtet.

Der in der Abbildung 12 gefärbte Magnozellularäre Kern bildet mit der Substantia innominata den magnozellularären basalen Vorderhirnkomplex. Dieser liefert die gesamte cholinerge Innervation des Telencephalons. Bei Schädigungen des basalen Vorderhirns kommt es zu Verlusten der kognitiven Fähigkeiten wie selektive Aufmerksamkeit, Lernen und Erinnerung. Bei der Alzheimer Erkrankung und anderen Demenzerkrankungen liegt eine Degeneration der cholinergen Neurone des basalen Vorderhirns vor, deren Ausmaß mit dem Grad der Demenz korreliert.

Außerdem zeigt sich eine Blaufärbung im Hypothalamus. Er verbindet das endokrine System mit dem Nervensystem. Neurone des Hypothalamus, welche weit reichende

Verbindungen im ZNS besitzen, geben Hormone an das Blut ab und steuern somit komplexe Regulationsprozesse.

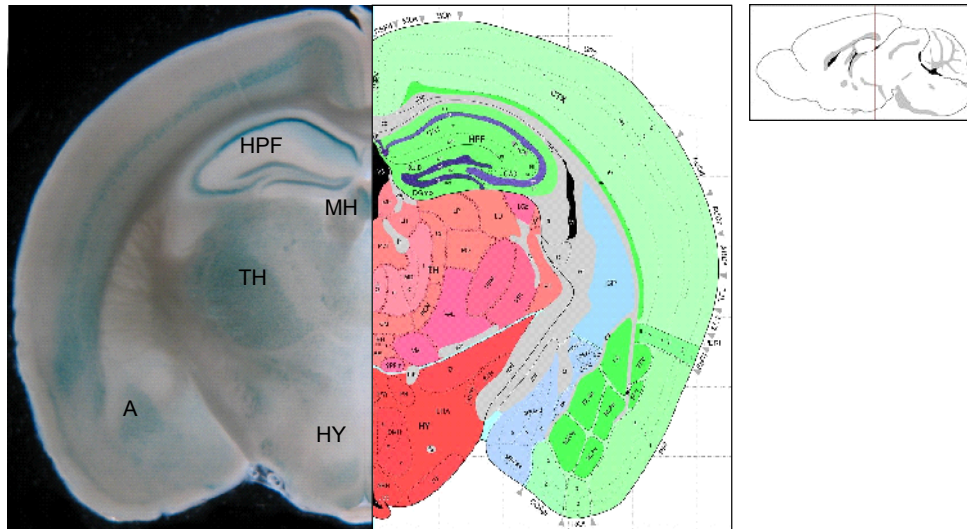


Abb.13: Frontalschnitt auf Höhe des Zwischenhirns: Hippocampus (HPF), Habenula mediale (MH), Thalamus, Ventrikerne (TH), Amygdala (A), Hypothalamus (HY). Rechte Bildhälfte: <http://mouse.brain-map.org/viewImage.do?imageId=130938>

Ein Schnitt auf Höhe des Zwischenhirns zeigt, dass *Fam134c* in den Ventrikerne des Thalamus exprimiert wird. In dieser Kerngruppe erfolgt die Umschaltung vom somatosensorischen und motorischen System.

Auch im Hippocampus, in der Amygdala und im Ncl. habenularis medialis, die zum limbischen System gehören, wird *Fam134c* exprimiert. Das limbische System übernimmt komplexe assoziative Aufgaben wie emotionale Bewertung, Handlungsplanung, Lern- und Gedächtnisfunktionen, Aufmerksamkeit, Aktivität, Antriebs- und Aktivierungsfunktionen. Dysfunktionen führen zu schweren Aufmerksamkeits- und Gedächtnisstörungen.

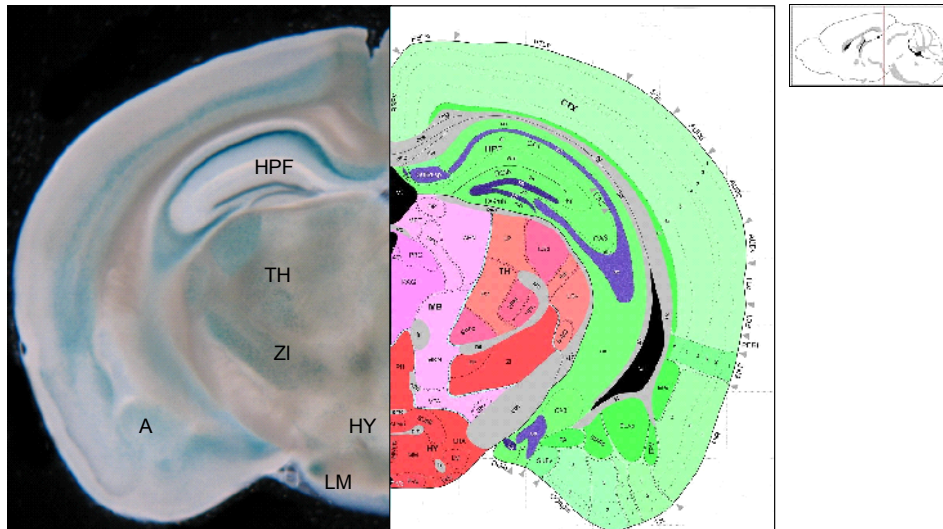


Abb.14: Frontalschnitt auf Höhe des Zwischenhirns: Hippocampus (HPF), Thalamus (TH), Zona incerta (ZI), Hypothalamus (HY), Nucleus mammillaris lateralis (LM), Amygdala (A). Rechte Bildhälfte: <http://mouse.brain-map.org/viewImage.do?imageId=130932>

Eine starke Blaufärbung ist in dieser Abbildung im Ncl. mammillaris lateralis (LM) zu erkennen. Die Verbindungen der Ncl. mammillaris sind Teil der limbischen Verbindungen. Degenerationen der Corpora mammillaria sind bei vielen Demenzerkrankungen beschrieben worden. Bei der Wernicke-Encephalopathie kommt es beispielsweise durch einen schweren Vitamin B1-Mangel z.B. bei chronischen Alkoholabusus zu einer Degeneration der Corpora mammillaria und folglich zur Demenz. Des Weiteren ist die Zona incerta blau gefärbt. Sie enthält dopaminerge Neurone und besitzt Verbindungen zum Hypothalamus und zur Amygdala.

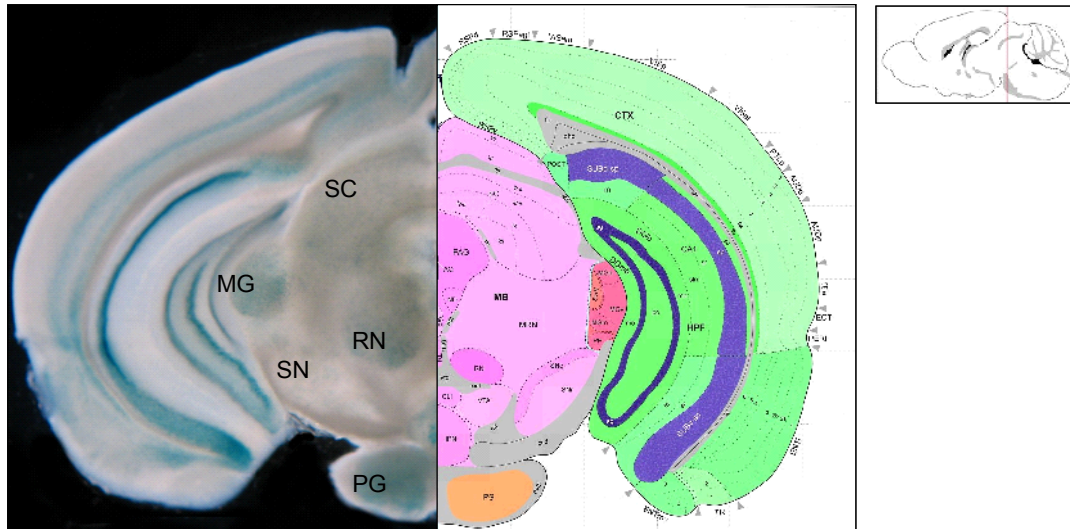


Abb.15: Frontalschnitt auf Höhe des Mittelhirns: Colliculus superior (SC), Corpus geniculatum mediale (MG), Nucleus ruber (RN), Substantia nigra (SN), Pons (PG). Rechte Bildhälfte: <http://mouse.brain-map.org/viewImage.do?imageId=130922>

Dieser Schnitt durch das Mittelhirn zeigt eine Blaufärbung in den Colliculi superiores (obere Zueihügel). Sie sind für die Reflexbewegungen der Augenmuskeln und der Pupille zuständig. Außerdem sind der Nucleus ruber und die Substantia nigra angefärbt. Diese Kerne sind für die Verschaltung des extrapyramidalen Systems von großer Bedeutung. Ausfälle des Nucleus ruber führen zu Ruhetremor, verändertem Muskeltonus und choreatisch-athetotischen Bewegungen. Die Substantia nigra ist für die unwillkürliche Mitbewegung und für den Bewegungsbeginn (Starterfunktion) zuständig. Beim Ausfall kommt es zu Muskelstarre, Ruhetremor, Wegfall der Mitbewegungen und zu mimischer Starre.

Lateral des Mittelhirns ist in dieser Abbildung ein Teil des Zwischenhirns angeschnitten, wo sich eine Blaufärbung des Corpus geniculatum mediale erkennen lässt. In diesem Kern wird die Hörbahn umgeschaltet. Die afferenten Fasern kommen von den Cochleariskernen, vom Colliculus inferior und vom Corpus trapezoideum des oberen Olivenkomplexes. Die efferenten Fasern des Corpus geniculatum mediale ziehen zur Hörrinde (Heschl-Querwindung, Gyri temporalis).

Im unteren Bildabschnitt ist ein Teil der Pons angeschnitten. Auch hier ist eine Blaufärbung der grauen Substanz zu erkennen.

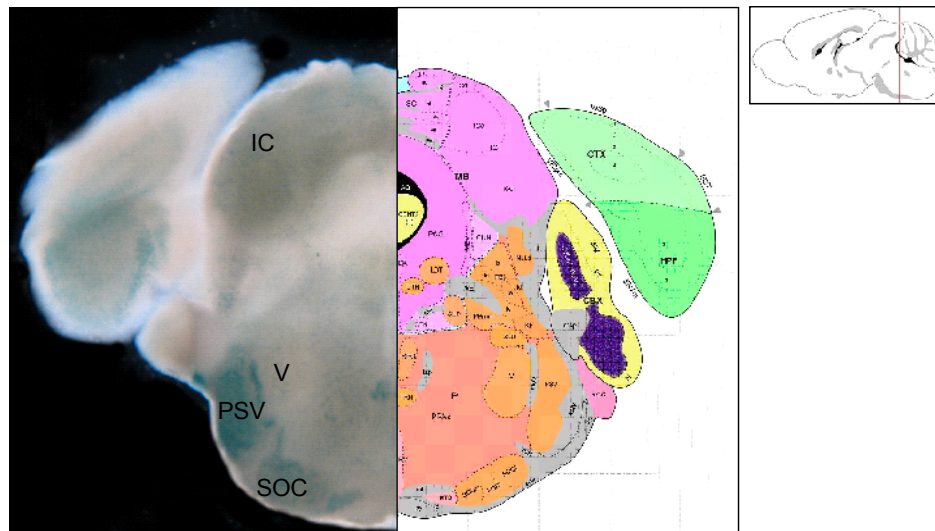


Abb.16: Frontalschnitt auf Höhe der Pons: Colliculus inferior (IC), Nucleus principalis n. trigemini (PSV), Oliva superior (SOC), N. motorius n. trigemini (V). Rechte Bildhälfte: <http://mouse.brain-map.org/viewImage.do?imageId=130907>

Im oberen Bildabschnitt sind die unteren Zueihügel des Mittelhirns (Colliculus inferior) zu sehen, die an der Umschaltung der zentralen Hörbahn beteiligt sind.

In der Pons zeigen zwei Kerngebiete eine starke Blaufärbung: Der Nucleus principalis n. trigemini und der zur Hörbahn gehörende obere Olivenkomplex. Der Nucleus principalis des fünften Hirnnervens wird auch als Nucleus pontinus n. trigemini bezeichnet. Die sensiblen Fasern stammen vom Ganglion trigeminale (Ganglion semilunare, Ganglion Gasseri) und enden in den zwei sensiblen Trigeminkernen: Dem Nucleus principalis und Nucleus spinalis n. trigemini. Im Nucleus principalis n. trigemini enden vorwiegend die Fasern der epikritischen Sensibilität und im Nucleus spinalis n. trigemini die der protopathischen Sensibilität der Haut und Schleimhaut des Gesichtes. Der Nucleus motorius n. trigemini beinhaltet multipolare Neurone, die für die Innervation der Kaumusculatur zuständig sind. Interessanterweise ist der motorische Kern des N. trigeminus in der Abbildung nicht angefärbt, so dass davon auszugehen ist, dass *Fam134c* nur in den sensiblen Kerngebieten des N. trigeminus exprimiert wird.





Abb.17: Frontalschnitt auf Höhe der Pons und des Kleinhirns: Nucleus cochlearis, Pars dorsalis (DCO), Nucleus cochlearis, Pars ventralis (VCO), Nucleus principalis n. trigemini (PSV), Ganglion trigeminale (GV)

Das Ganglion trigeminale (links unten) und der Verlauf des N. trigeminus zum Nucleus principalis n. trigemini sind abgebildet. In der Pons weisen zahlreiche Kerngebiete eine Blaufärbung auf. Besonders intensiv ist diese im Nucleus principalis n. trigemini und in den Cochleariskernen.

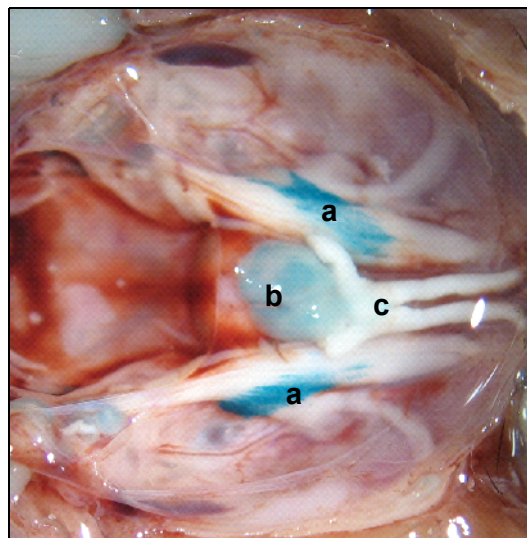


Abb.18: Aufsicht auf die Schädelbasis der adulten Maus. Ganglion trigeminale (a), Hypophyse (b), Nervus opticus (c)

Die Abbildung 18 zeigt eine Aufsicht auf die Schädelbasis nach Entfernung des Gehirns. Die Ganglien des Nervus trigeminus (a), die Hypophyse (b), das Chiasma opticum

sowie die beiden Nn. optici (c) sind abgebildet. Die Ganglien des N. trigeminus und die Hypophyse weisen eine Blaufärbung auf, die sich scharf von den Nervenfasern abgrenzen lässt.

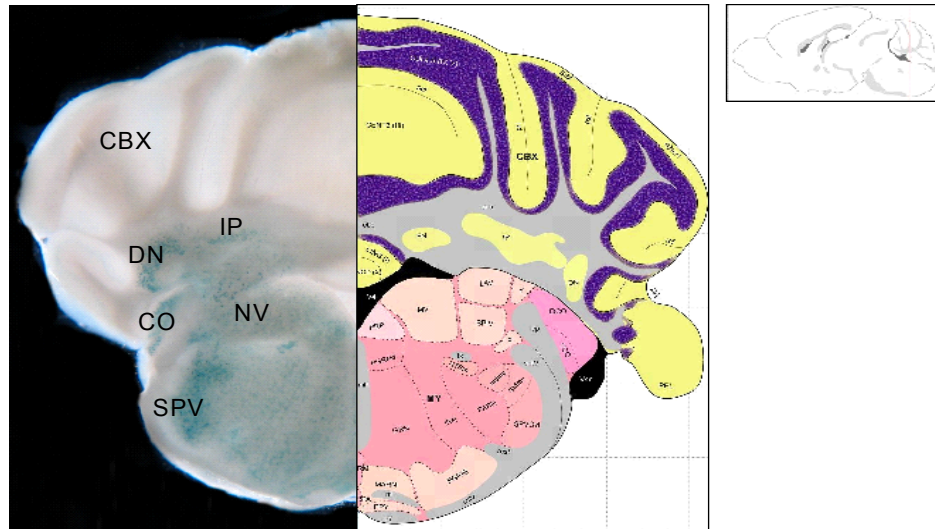


Abb.19: Frontalschnitt auf Höhe des Kleinhirns: Cerebellum (CBX), Nucleus dentatus (DN), Nucleus interpositus (IP), Nucleus cochlearis (CO), Nucleus vestibularis (NV), Nucleus spinalis n. trigemini (SPV). Rechte Bildhälfte: <http://mouse.brain-map.org/viewImage.do?imageId=130895>

In diesem Schnitt auf Höhe des Kleinhirns ist eine schwache Anfärbung der Purkinje-Zellschicht zu erkennen. Außerdem wird offensichtlich in den Kleinhirnkernen *Fam134c* exprimiert. Das Kleinhirn ist für die unbewusste Koordination und Feinabstimmung von Bewegungen, für das Gleichgewicht und für die Regulation des Muskeltonus zuständig. Die inhibitorischen Purkinjezellen sind die efferenten Neurone und innervieren die Kleinhirnkern, die wiederum zum Cortex projizieren. Außerdem werden von den Purkinjezellen einige Vestibulariskerne (vor allem Ncl. vestibularis lateralis) innerviert.

Es werden vier verschiedene Kleinhirnkern unterschieden: Ncl. fastigii, Ncl. globosus, Ncl. emboliformis und Ncl. dentatus. Die Kleinhirnkern entlassen Kleinhirnprojektionen, die direkt oder indirekt zu motorischen Systemen im Hirnstamm (Formatio reticularis, Ncl. ruber, Colliculus superior, Ncll. vestibulares, Complexus olivaris inferior) und zum cerebralen Cortex verlaufen.

Läsionen des Kleinhirns führen im Allgemeinen zu einer Symptomkombination bestehend aus Nystagmus, Intentionstremor, Ataxie und skandierender Sprache.

Des Weiteren sind die Vestibularis- und Cochleariskerne, in denen die Fasern des Nervus vestibulocochlearis enden, blau gefärbt.

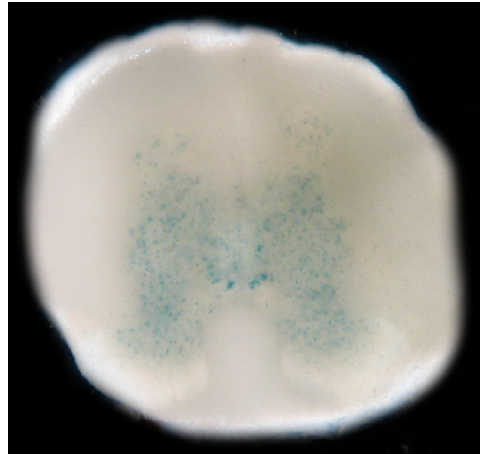


Abb.20: 300µm dicker Querschnitt durch das Rückenmark. Die Neurone der grauen Substanz zeigen eine deutliche Blaufärbung.

Die Abbildung 20 zeigt einen Querschnitt durch das Rückenmark. In der grauen Substanz ist eine Blaufärbung der Neurone zu erkennen. Die graue Substanz besteht aus dem Vorderhorn, dessen motorische Vorderhornzellen zur Muskulatur ziehen und aus dem Hinterhorn, das sich aus sensiblen Neuronen zusammensetzt. Im Thorakalmark ist zusätzlich ein Seitenhorn vorhanden, in dem vegetative Nervenzellen des Sympathikus liegen.

Zusammenfassend weist *Fam134c* ein sehr breites Expressionsmuster im zentralen Nervensystem auf, wobei das Protein nur in den Kerngebieten, jedoch nicht in den Nervenfasern vorzukommen scheint.



### 5.1.3. Expression im peripheren Nervensystem

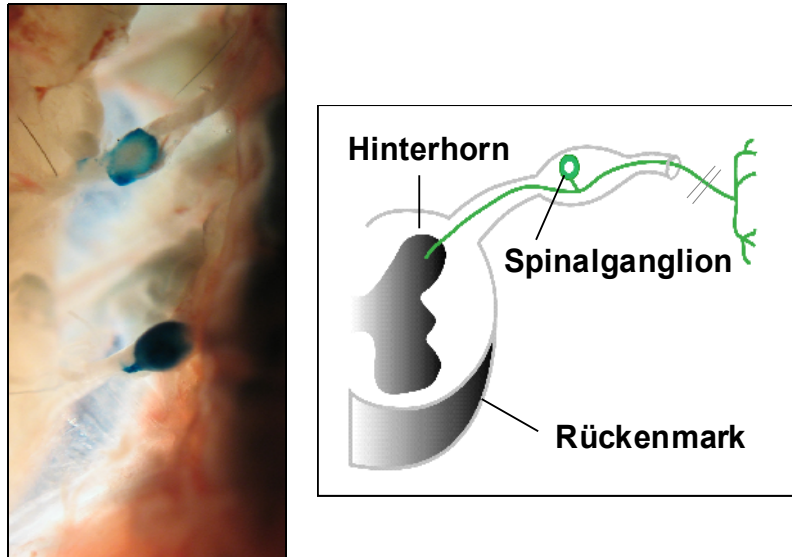


Abb.21: Spinalganglien der adulten Maus in den Foramina intervertebralia. Linkes Bild: zwei Spinalganglien sind durch die  $\beta$ -Galaktosidase Färbung blau gefärbt. Im rechten Bildrand ist die Wirbelsäule zu erkennen. Rechtes Bild: Schematische Darstellung eines Spinalganglions und des Rückenmarks.

Auch im peripheren Nervensystem wird Fam134c exprimiert. Die Abbildung 21 zeigt zwei Spinalganglien, welche blau gefärbt sind. Im rechten Bildabschnitt ist die Wirbelsäule zu erkennen. Die Spinalganglien beinhalten die Perikarya der sensorischen pseudounipolaren Neurone, die das erste Neuron der afferenten Strecke zum ZNS darstellen. Ihre peripheren Fortsätze enden entweder als freie Nervenendigungen oder als Rezeptoren in Gelenken, Haut, Muskeln und inneren Organen und nehmen sensorische Reize auf, die über die Hinterwurzel zum Hinterhorn und von dort aus nach zentral weitergeleitet werden.

Auch hier ist wieder zu beobachten, dass die Blaufärbung auf die Kerngebiete beschränkt ist. In den Nervenfasern liegt Fam134c nicht vor.

## 5.2. Immunfluoreszenzfärbung

Die Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase Färbung zeigen, dass *Fam134c* in zahlreichen Kerngebieten des Nervensystems exprimiert wird. In den Nervenfasern konnte *Fam134c* hingegen nicht nachgewiesen werden. Um nun die genaue Lokalisation in der Zelle bestimmen zu können, wurden Immunfluoreszenzstudien durchgeführt. Hierfür wurden polyklonale Antiseren im Kaninchen generiert, indem mit an KLH-gekoppelten Peptiden des C-Terminus des *Fam134c*-Proteins immunisiert wurde. Die Antiseren wurden anschließend über eine Säule, an die das zur Immunisierung verwendete Peptid gekoppelt war, aufgereinigt. Sowohl an kultivierten Zellen, als auch an murinen Gewebeschnitten wurde die Immunfluoreszenzfärbung mit dem Anti-*Fam134c* durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop. Die folgenden Abbildungen zeigen, dass der *Fam134c*-Antikörper längliche Strukturen in der Nähe des Zellkerns bindet, wie sie für den Golgi-Apparat charakteristisch sind. Durch Co-Färbung mit einem Antikörper gegen Giantin, dem größten Membranprotein des Cis- und Medialen-Golgi Komplexes, konnte die Golgi-Lokalisation bestätigt werden: Die Überlagerung der Farbkanäle zeigte hohe Korrelation der beiden Antikörper epitope.

In den folgenden Analysen wurde als Sekundärantikörper für Anti-*Fam134c* stets ein grün fluoreszierender und für Giantin, sowie  $\gamma$ -Adaptin (ein Marker für das trans-Golgi Netzwerk sowie Clathrin coated vesicles) ein rot fluoreszierender Antikörper verwendet. Als Negativkontrollen, bei denen keine vergleichbare Färbung erfolgte, diente die Inkubation ohne Primärantikörper und mit einem Antikörper, dessen Epitop in den Geweben nicht vorkommt.

### 5.2.1. *Fam134c* wird in hippocampalen Neuronen exprimiert

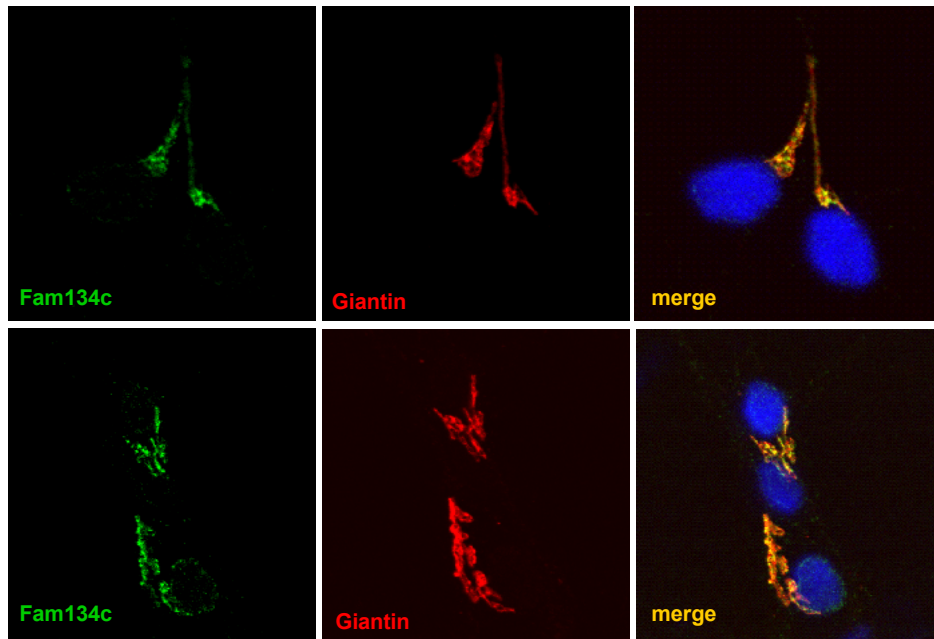


Abb.22: Primäre kultivierte hippocampale Neurone.

Die Abbildung 22 zeigt primäre kultivierte hippocampale Neurone. Durch den Fam134c-Antikörper sind längliche, perinukleäre Strukturen grün angefärbt, deren Form charakteristisch für den Golgi-Apparat ist. Der hier rot dargestellte Cis-Golgi-Marker Giantin weist eine ähnliche Lokalisation auf. In der Überlagerung der beiden Farbkanäle (merge) werden die starken Überlappungen der beiden Antikörper epitope deutlich. Die Zellkerne sind mit DAPI blau angefärbt.

## 5.2.2. Expression im Kleinhirn

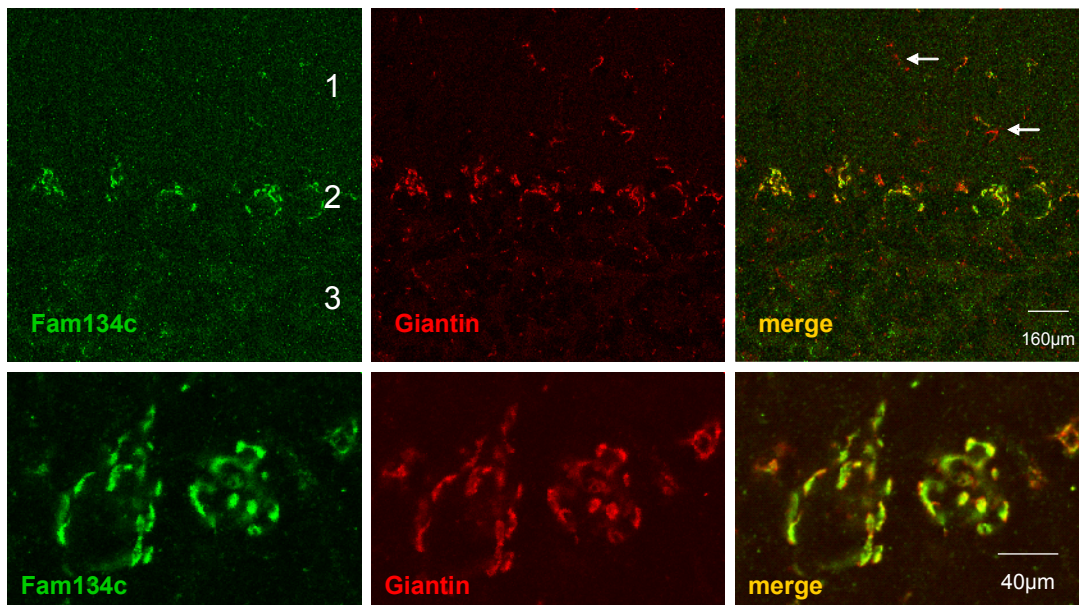


Abb.23: 7µm dicker Kryoschnitt eines adulten murinen Kleinhirns. Obere Bildreihe: Ausschnitt aus der Kleinhirnrinde: Stratum moleculare (1), Stratum purkinjense (2), Stratum granulosum (3). Die Pfeile kennzeichnen Golgi-Zisternen, die nur durch Giantin ein Signal aufweisen. Untere Bildreihe: Vergrößerung der Purkinjezellschicht

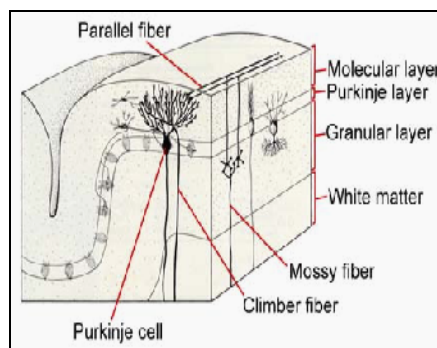


Abb.24: Aufbau der Kleinhirnrinde

Quelle: [http://www.astralgia.com/webportfolio/omnimoment/live\\_science/purkwrlld/gifs/layers.jpg](http://www.astralgia.com/webportfolio/omnimoment/live_science/purkwrlld/gifs/layers.jpg)

Die Abbildung 23 zeigt einen Ausschnitt aus der Kleinhirnrinde sowie eine Vergrößerung von zwei Purkinjezellen (unten). Die Kleinhirnrinde gliedert sich in drei Schichten: Stratum moleculare (1), Stratum purkinjense (2) und Stratum granulosum (3). Das Stratum moleculare ist die äußerste Schicht, die sich durch eine geringe Neuronendichte auszeichnet. In ihr sind die Dendritenbäume der Purkinjezellen, afferente Kletter- und Parallelfasern, Dendriten von Golgi-Zellen, sowie Stern- und

Korbzellen enthalten. In der Abbildung ist der Golgi-Apparat der Stern- und Korbzellen durch Giantin rot angefärbt. Dagegen zeigt Fam134c in dieser Schicht kein eindeutiges Signal. In der Überlagerung der Farbkanäle (merge) sind Zisternen des Golgi-Apparates, die nur durch Giantin, jedoch nicht durch Fam134c gefärbt sind, mit Pfeilen gekennzeichnet.

Dem Stratum moleculare schließt sich das Stratum purkinjense mit den großen Perikarya der Purkinjezellen an. Der Golgi-Apparat der Purkinjezellen zeigt durch Fam134c eine starke Grünfärbung. In der Vergrößerung wird die nahezu identische Lokalisation von Fam134c und Giantin im Golgi-Apparat der Purkinjezellen deutlich.

Der Purkinjezellschicht folgt das Stratum granulosum, welches die Körnerzellen und vereinzelte Golgi-Zellen beinhaltet. In dieser Schicht findet sich kein spezifisches Signal der beiden Antikörper.

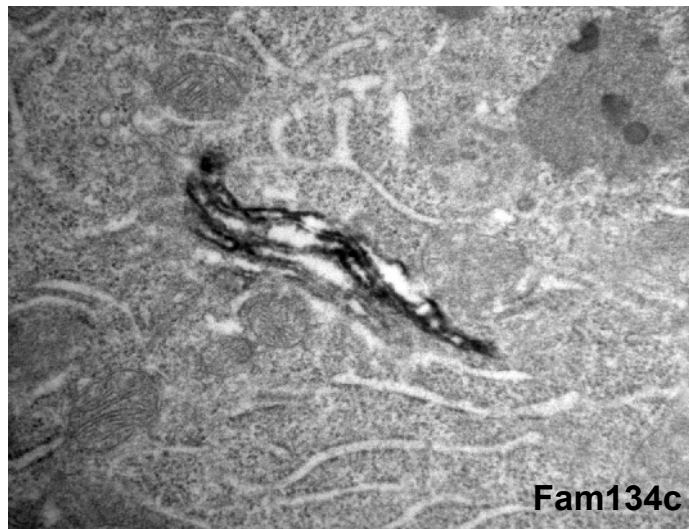


Abb.25: EM-Bild des Golgi-Apparates einer Purkinjezelle

Um die Lokalisation von Fam134c mit einer weiteren Methode zu bestätigen, wurden zusätzlich elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kleinhirnschnitten nach Inkubation mit dem aufgereinigten Fam134c Antiserum und anschließender DAB-Färbung erstellt. In dem oben abgebildeten EM-Bild, welches von Frau Dr. Michaela Schweizer im ZMNH (Hamburg) aufgenommen wurde, sind die Golgi-Zisternen einer Purkinjezelle zu sehen. Der Fam134c-Antikörper bindet an ein Membranprotein des Golgi-Apparates, so dass dort ein Signal entsteht.

### 5.2.3. Expression in Motoneuronen

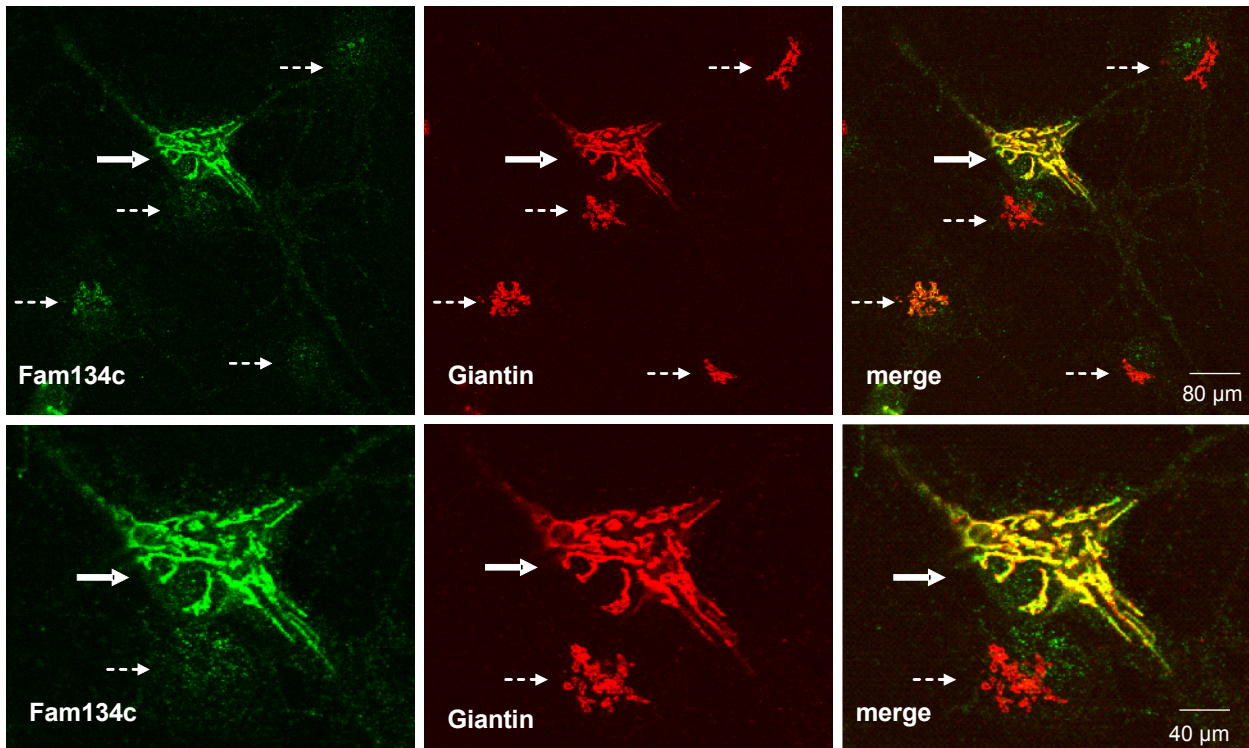


Abb.26: Primär kultivierte Neurone des Vorderhorns des murinen Rückenmarks. Die durchgängigen Pfeile zeigen auf ein  $\alpha$ -Motoneurone. Mit den gestrichelten Pfeilen sind die  $\gamma$ -Motoneurone und Interneurone gekennzeichnet. Die untere Bildreihe zeigt eine Vergrößerung des  $\alpha$ -Motoneurons.

Die obere Abbildung zeigt murine Motoneurone in Kultur mit weiteren Zellen des Vorderhorns. In der unteren Abbildung ist eine Vergrößerung des  $\alpha$ -Motoneurons zu sehen. Bemerkenswerterweise wird *Fam134c* nicht in allen Zellen der Kultur gleich stark exprimiert: Bei der in der Mitte der Abbildung gelegenen größten Zelle handelt es sich um ein  $\alpha$ -Motoneuron (durchgängiger Pfeil), dessen Cis-Golgi-Apparat durch *Fam134c* und *Giantin* deutlich gefärbt ist. Die  $\alpha$ -Motoneurone innervieren die extrafusalen Skelettmuskelfasern und steuern so die Muskelkontraktion. Beim Funktionsausfall der  $\alpha$ -Motoneurone resultiert eine schlaffe Lähmung und Atrophie des Muskels. Mit den gestrichelten Pfeilen ist der Cis-Golgi-Apparat der kleineren  $\gamma$ -Motoneurone und Interneurone gekennzeichnet. Die  $\gamma$ -Motoneurone innervieren die intrafusalen Skelettmuskelfasern in den Muskelspindeln, die als Dehnungsrezeptoren dienen. Die Interneurone sind zwischen den zuführenden Fasersystemen und den Motoneuronen



eingeschaltet und regulieren die Aktivität der Motoneurone. Im Gegensatz zum Golgi-Apparat der  $\alpha$ -Motoneurone zeigen die Golgi-Zisternen der  $\gamma$ -Motoneurone und Interneurone keine intensive Grünfärbung durch den Fam134c-Antikörper, so dass von einer geringeren oder fehlenden Expression in diesen Zelltypen auszugehen ist.

#### 5.2.4. Expression im Spinalganglion

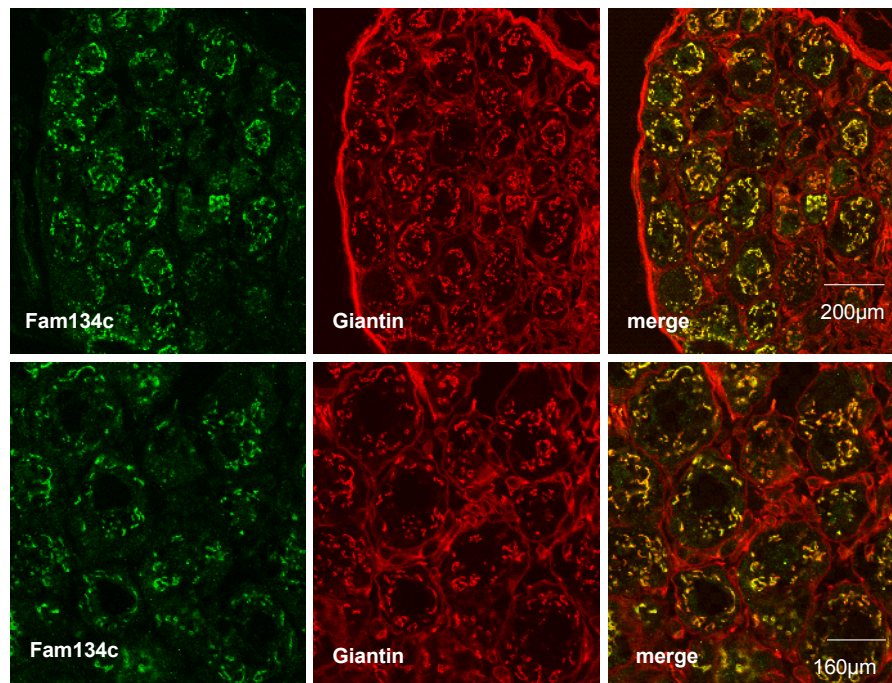


Abb.27: 7  $\mu$ m dicker Kryoschnitt durch ein Spinalganglion der adulten Maus.

Die Abbildung 27 zeigt einen 7  $\mu$ m dicken Kryoschnitt durch ein murines Spinalganglion, in dem zahlreiche pseudounipolare Neurone enthalten sind. In den unteren Abbildungen ist eine Ausschnittsvergrößerung zu sehen. Der Antikörper gegen Fam134c bindet auch in diesen sensorischen Neuronen an den Cis-Golgi-Apparat. Neben der spezifischen Färbung des Cis-Golgi-Apparates durch Giantin ist die Anfärbung des Peri- und Endoneuriums als unspezifisches Signal zu bewerten, da der verwendete rote Sekundärantikörper gegen murine Antikörper gerichtet ist und zusätzlich zum Giantin-Antikörper auch die endogenen, am Endo- und Perineurium gebundenen Antikörper der Maus erkennt.

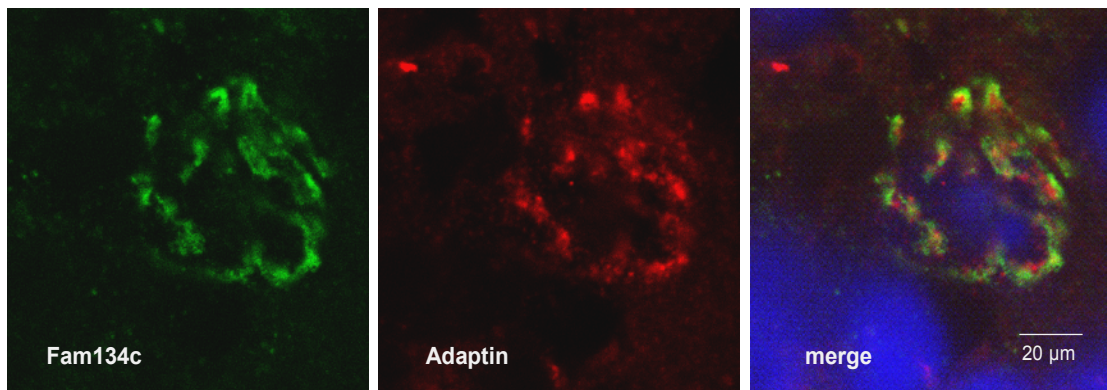


Abb.28: 7  $\mu\text{m}$  dicker Kryoschnitt durch ein murines Spinalganglion. Ausschnittsvergrößerung einer pseudounipolaren Nervenzelle. Es wurde eine Co-Färbung von Fam134c mit  $\gamma$ -Adaptin durchgeführt. Die Zellkerne sind mit DAPI in blau dargestellt.

In dieser Abbildung ist die Co-Färbung von Fam134c mit einem Antikörper gegen  $\gamma$ -Adaptin dargestellt. Dieses Protein ist Bestandteil des Trans-Golgi-Netzwerkes und der mit Clathrin umgebenen Transportvesikel. In der Überlagerung der Farbkanäle sind nur wenige Übereinstimmungen mit der Lokalisation von Fam134c zu erkennen, so dass davon auszugehen ist, dass Fam134c vorwiegend in der Cis-Seite des Golgi-Apparates lokalisiert ist.



### 5.2.5. Expression in der Retina

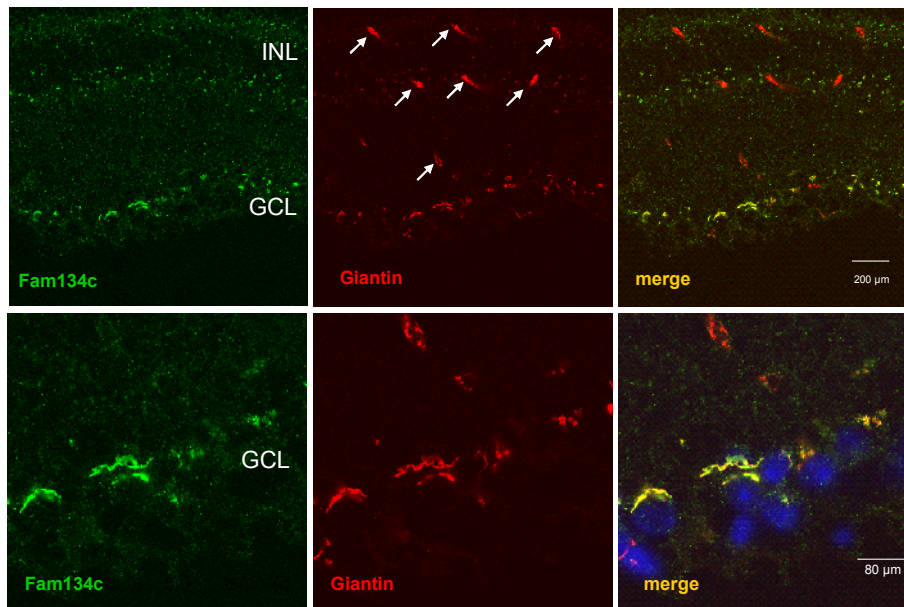


Abb.29: 9 µm dicker Kryoschnitt durch die Retina der adulten Maus. Obere Bildreihe: Ausschnitt der Inneren Körnerschicht (INL) und der Ganglienzellschicht (GCL). Die Pfeile kennzeichnen die Zellen, die nur ein Giantin-, jedoch kein Fam134c-Signal aufweisen. Untere Bildreihe: Vergrößerung der Ganglienzellschicht.

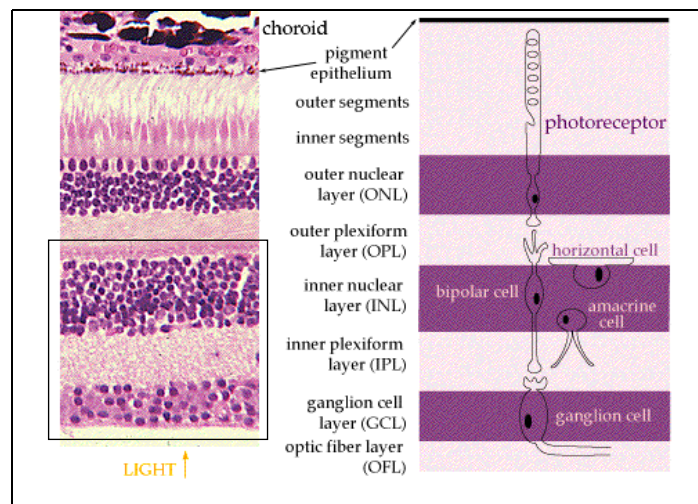


Abb.30: Aufbau der Retina (Quelle: <http://thalamus.wustl.edu/course/eye3.gif>). Der Kasten kennzeichnet die Lokalisation des in der Abb.29 dargestellten Ausschnittes.

In der Immunfluoreszenzfärbung der murinen Retina zeigt sich, dass *Fam134c* im Golgi-Apparat der Ganglienzellen und in Zellen der inneren Körnerschicht exprimiert wird. Durch Fam134c sind in der inneren Körnerschicht (IKS) nur wenige Golgi-Zisternen,

vermutlich von Bipolarzellen (zweite Neurone der Sehbahn) angefärbt. In der Giantin-Färbung zeigen noch weitere Zellen (mit Pfeilen gekennzeichnet) ein Golgi-Signal, in denen *Fam134c* jedoch nicht exprimiert wird. Aufgrund der Lokalisation könnte es sich bei diesen Zellen um Horizontal- und Amakrinzellen handeln. Die Horizontalzellen sind für die Quervernetzungen zwischen Fotorezeptoren und Bipolarzellen zuständig und die Amakrinzellen bilden die lateralen Verbindungen zwischen Bipolarzellen und Ganglienzellen. Durch die Modulation des Signalfusses wird unter anderem die Lichtadaptation möglich.

Die stärkste Expression von *Fam134c* ist in den Ganglienzellen (drittes Neuron der Sehbahn) zu verzeichnen. Die Ganglienzellen sind multipolare Neurone, deren Axone zum Discus opticus verlaufen und von dort aus den N. opticus bilden. Die Retina geht entwicklungsgeschichtlich aus dem Diencephalon-Bläschen des Gehirns hervor, so dass die Expression des *Fam134c*-Gens in der Retina mit dem breiten Expressionsmuster im Gehirn korreliert.

### 5.2.6. Expression in der Hypophyse

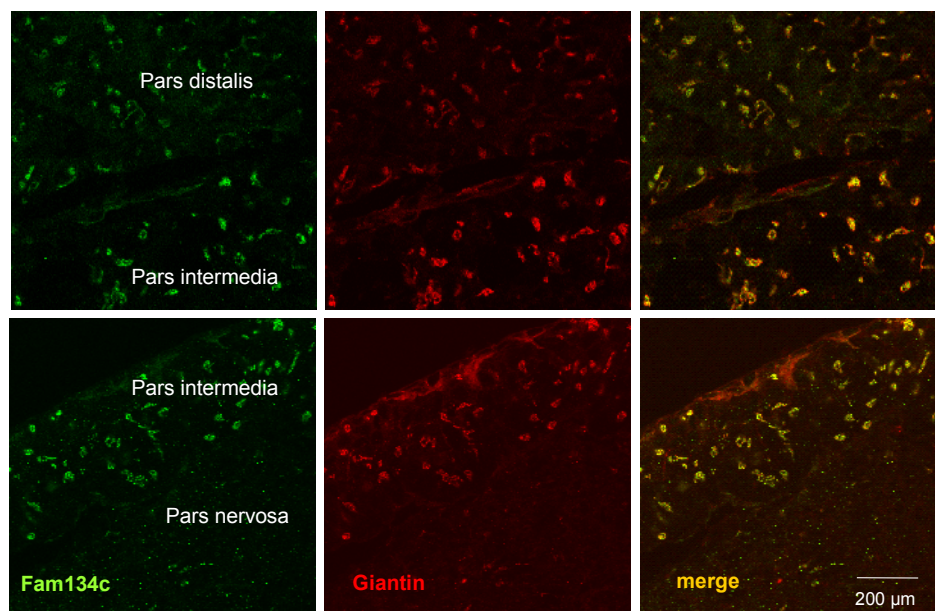


Abb.31: 7 µm dicker Kryoschnitt durch die Hypophyse der adulten Maus.

Die Abbildung 31 zeigt die zur Adenohypophyse gehörende Pars distalis, die Pars intermedia des Hypophysenmittellappens, sowie die Pars nervosa der Neurohypophyse. In allen drei Regionen wird *Fam134c* exprimiert, wobei das stärkste Signal in der Pars

intermedia vorzufinden ist. Die Pars intermedia ist beim Menschen nur rudimentär ausgebildet. In ihr sind corticotrope Zellen enthalten, die zahlreiche Hormongranula mit  $\beta$ -LPH bzw.  $\beta$ -Endorphin aufweisen.

### **5.3. Behandlung von N2a-Zellen mit Brefeldin A**

Die starken Überlappungen der Lokalisation von Fam134c mit dem Cis-Golgi-Strukturprotein Giantin zeigen, dass Fam134c in der Cis-Seite des Golgi-Apparates lokalisiert ist. Nun sollte zusätzlich geklärt werden, ob Fam134c ebenfalls ein Strukturprotein ist. Die Strukturproteine des Golgi-Apparates bilden das formgebende Gerüst des Organells, die sog. Golgi-Matrix, die Voraussetzung für die Funktion des Golgi-Apparates und damit für das Überleben der Zelle ist. Durch das Zellgift Brefeldin A wird der komplexe Aufbau des Golgi-Apparates mit seinen dynamischen Zisternen zerstört, indem der Proteintransport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat inhibiert wird. Im Gegensatz zu den Strukturproteinen, die nach Brefeldin A Behandlung in Clustern, sog. Golgi-Remnants im Zytosol verteilt vorliegen, werden die Enzyme des Golgi-Apparates in ein fusioniertes ER-Golgi-Kompartiment transportiert (Lippincott-Schwartz et al. 1990, Mardones et al. 2006).

Für den Versuch mit Brefeldin A wurden N2a-Zellen verwendet, die einer neuronalen Tumorzelllinie der Maus angehören und endogen *Fam134c* exprimieren. Die Zellen wurden für 5, 15 und 30 min mit 5  $\mu$ g/ml Brefeldin A inkubiert und anschließend der Immunfluoreszenzfärbung unterzogen. Nach 15 min Inkubation mit Brefeldin A konnte Fam134c in runden, zytoplasmatisch verteilten Strukturen lokalisiert werden. Auch in diesem Versuch zeigten Fam134c und Giantin ein sehr ähnliches Signal, so dass Fam134c wahrscheinlich ein Strukturprotein des Cis-Golgi-Apparates darstellt.

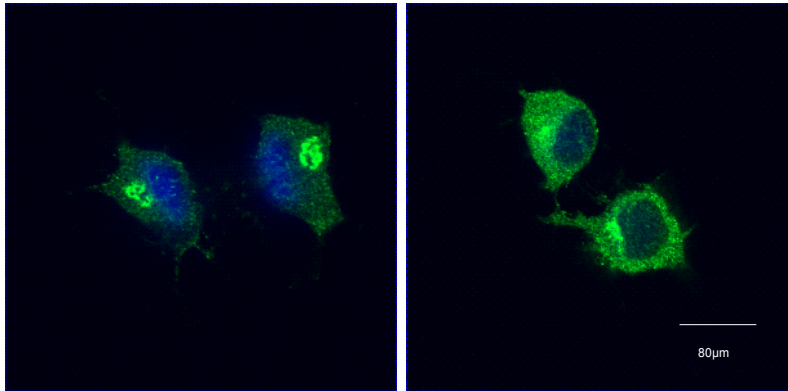


Abb.32: N2a-Zellen wurden 15 min mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Brefeldin A (BFA) behandelt und mit Fam134c angefärbt. Links: Negativkontrolle ohne Brefeldin A-Behandlung. Rechts: Fragmentierung des Golgi-Apparates durch Brefeldin A. Fam134c färbt die zahlreichen kleinen Golgi-Remnants im Zytosol an.

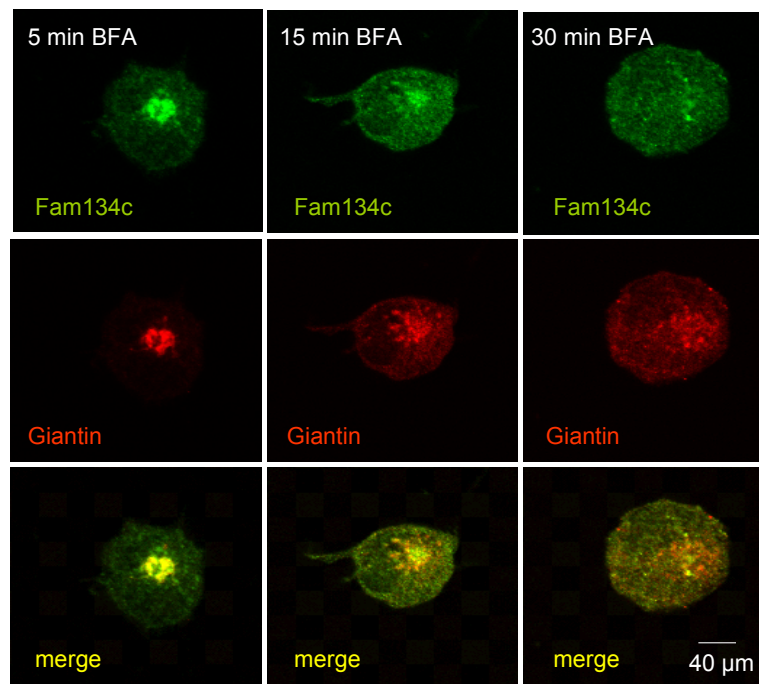


Abb.33: N2a-Zellen wurden 5, 15 und 30 min mit Brefeldin A (BFA) inkubiert.

In der Abbildung 33 ist von links nach rechts die Veränderung des Golgi-Apparates während der Brefeldin A Behandlung dargestellt.

Nach 5 min Inkubationszeit der N2a-Zellen mit Brefeldin A kann nur eine leichte Veränderung des Golgi-Apparates im Vergleich zu den unbehandelten Zellen festgestellt werden. Eine Fragmentierung des Golgi-Apparates ist erstmals nach 15 min deutlich zu erkennen, wobei die großen Fragmente noch an der ursprünglichen Stelle des Golgi-Apparates vorzufinden sind. Im Zytosol sind viele punktuelle Strukturen zu

erkennen, die auch als Golgi-Remnants bezeichnet werden. Nach 30 min ist die ursprüngliche Struktur des Golgi-Apparates vollständig aufgehoben. Im Zytosol sind durch Fam134c und Giantin die zahlreichen Golgi-Remnants angefärbt. Eine Umverteilung in das ER, wie es bei Enzymen des Golgi-Apparates der Fall wäre, konnte bei Fam134c und Giantin nicht beobachtet werden. In der Überlagerung der Farbkanäle ist das ähnliche Verteilungsmuster von Fam134c und Giantin zu erkennen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Fam134c ein Strukturprotein des Cis-Golgi-Komplexes ist.

#### 5.4. *In-situ-Hybridisierung*

Um das Expressionsmuster von *Fam134c* auch auf mRNA-Ebene zu bestimmen, wurden *in-situ*-Hybridisierungen an Kryoschnitten von Mausembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien durchgeführt.

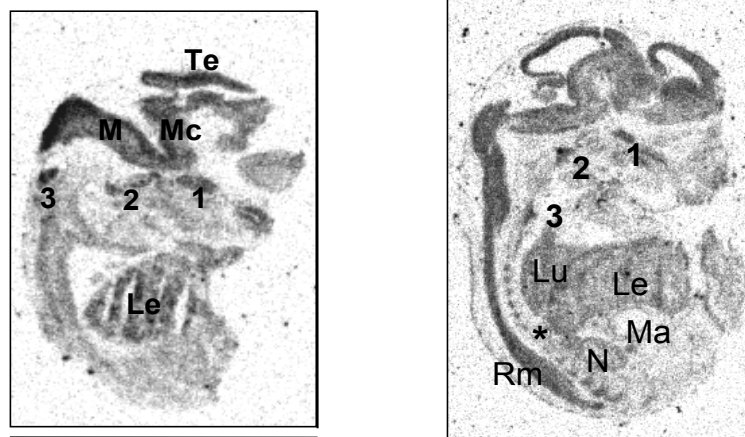


Abb.34: *In-situ*-Hybridisierung von Mausembryonen (links E12, rechts E14): Im Gehirn, im Rückenmark (Rm), im Ganglion trigeminale (1), im Ganglion cervicale superior (2), im Ganglion stellatum (3) und in den Spinalganglien (\*) wird die *Fam134c*-mRNA exprimiert. Telenzephalon (Te), Mesenzephalon (Mc), Medulla oblongata (M), Lunge (Lu), Leber (Le), Magen (Ma), Niere (N).

Die Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung zeigen, dass die *Fam134c*-mRNA im Gehirn, im Rückenmark, im Ganglion trigeminale, im Ganglion cervicale superior, im Ganglion stellatum und in den Spinalganglien exprimiert wird, so dass diese Ergebnisse mit denen der  $\beta$ -Galaktosidase Färbung und Immunfluoreszenzstudien korrelieren.

## 6. Diskussion

In dieser Studie wurde eine Expressionsanalyse des murinen *Fam134c*-Gens durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Fam134c* im Gehirn, im Rückenmark, in den Spinalganglien, in den sensiblen Ganglien der Hirnnerven und in den autonomen Ganglien des Sympathikus schon in frühen Embryonalstadien zu verzeichnen ist. Um die Expression in den einzelnen Gehirnarealen genauer zu untersuchen, wurden 300 µm dicke Frontalschnitte des Gehirns von adulten transgenen Mäusen angefertigt. Es ließ sich zum einen eine Expression im Bulbus olfactorius und Nucleus olfactorius anterior feststellen, so dass Mutationen im *Fam134c*-Gen möglicherweise zu einem beeinträchtigten Riechvermögen führen könnten. Des Weiteren war eine starke Expression in den Pyramidenzellschichten des Cortex nachweisbar. Besonders auffällig war die Expression in Hirnarealen, welche zum limbischen System gehören, bzw. welche wichtige Schaltstationen zwischen dem limbischen System und anderen Hirnregionen darstellen. Zu nennen sind der Hippocampus, die Amygdala, die Corpora mammillaria, der Nucleus habenularis medialis und die Septumregion. Da das limbische System zahlreiche assoziative Aufgaben, wie emotionale Bewertung, Handlungsplanung, Lern- und Gedächtnisfunktionen, Aufmerksamkeit, Aktivität, Antriebs- und Aktivierungsfunktionen übernimmt, wäre es möglich, dass Mutationen im *Fam134c*-Gen u.a. Aufmerksamkeits- und Aktivitäts- bzw. Gedächtnisstörungen hervorrufen können.

Auch im Kleinhirn, insbesondere in den Kleinhirnkernen, konnte die Expression von *Fam 134c* nachgewiesen werden. Das Kleinhirn erhält propriozeptive, vestibuläre und visuelle Afferenzen und entlässt Efferenzen über den Hirnstamm und Thalamus zum motorischen und prämotorischen Cortex. Die Hauptfunktion des Kleinhirns ist die Koordination von Bewegungen. Ataxie, Intentionstremor, Dysarthrie und Nystagmus könnten also Folge von Mutationen im *Fam134c*-Gen sein.

Auch in den sensiblen Kerngebieten des Nervus trigeminus, die für die sensible Versorgung der Gesichtshaut und Schleimhäute zuständig sind, konnte eine Expression von *Fam134c* nachgewiesen werden. Im motorischen Kern des Nervus trigeminus, welcher die Kaumuskulatur innerviert, wird *Fam134c* hingegen nicht exprimiert. Eine

starke Expression von *Fam134c* fand sich außerdem im Ganglion trigeminale. Dieses sensorische Ganglion enthält die Zellkörper der ersten afferenten Neurone des Nervus trigeminus. Mutationen im *Fam134c*-Gen könnten somit zu Sensibilitätsstörungen der Gesichtshaut und der Schleimhäute führen.

Im Rückenmark konnte sowohl in den sensiblen Neuronen des Hinterhorns, als auch in den Motoneuronen des Vorderhorns eine Expression von *Fam134c* detektiert werden, so dass sowohl Sensibilitätsausfällen, als auch schlaffe Lähmungen die Folge von Mutationen des *Fam134c* sein könnten. Des Weiteren war eine starke Expression in den Spinalganglien nachweisbar. Die Spinalganglien enthalten pseudounipolare Neurone, die über periphere Fortsätze sensorische Reize von Haut, Muskeln, Gelenken und inneren Organen aufnehmen und nach zentral weiterleiten. Kommt es zu Dysfunktionen in diesen Neuronen, kann eine sensorische Neuropathie resultieren.

Zusammenfassend konnte durchgehend ein neuronales Expressionsmuster identifiziert werden, wobei der Phänotyp möglicherweise nicht in allen Neuronen auftritt. Eine Kompensation von Mutationen im *Fam134c*-Gen könnte teilweise durch *Fam134a* und *b* gewährleistet sein, die in ersten *in-situ* Hybridisierungsstudien mit *Fam134c* eine überlappende Expression zeigten.

Mittels eines generierten Antikörpers gegen *Fam134c* ließ sich auch die intrazelluläre Lage des Proteins bestimmen. Mittels Immunfluoreszenzfärbungen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich, dass *Fam134c* ein Protein des Golgi-Apparates ist. In Co-Färbungen überlappte die intrazelluläre Lokalisation von *Fam134c* genau mit der des Cis-Golgi-Markers Giantin. Marker des Trans-Golgi-Netzwerkes, wie  $\gamma$ -Adaptin, wiesen ein anderes Signal auf, so dass die Lokalisation weiter auf die Cis-Seite des Golgi-Apparates eingegrenzt werden konnte.

Der Golgi-Apparat weist eine dynamische Struktur aus vielen Membranstapeln auf, in denen Lipide und Proteine modifiziert und sortiert werden, so dass sie schließlich zu ihren Zielort transportiert werden können. Die Strukturproteine des Golgi-Apparates bilden das formgebende Gerüst des Organells, die so genannte Golgi-Matrix. Diese spezielle Struktur des Golgi-Apparates ist Voraussetzung für die Zellfunktion und das Überleben der Zelle. Durch das Zellgift Brefeldin A wird die Struktur des Golgi-Apparates zerstört, in dem der Proteintransport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat inhibiert wird. Im Gegensatz zu den Enzymen des Golgi-Apparates, die



nach Brefeldin A-Behandlung in einem fusionierten ER-Golgi-Kompartiment vorzufinden sind, liegen die Strukturproteine in sog. Golgi-Remnants im Zytosol verteilt vor.

In dieser Studie konnte Fam134c sowie Giantin nach Brefeldin A-Behandlung in vielen punktuellen Strukturen, den Golgi-Remnants nachgewiesen werden, so dass Fam134c wahrscheinlich ein Strukturprotein des Cis-Golgi-Apparates darstellt.

In Knock-down Experimenten an N2a-Zellen und kultivierten pseudounipolaren murinen Nervenzellen der Spinalganglien, die eine hohe endogene Expression der *Fam134*-Gene aufweisen, wurde die Fam134b mRNA durch siRNAs inhibiert und die Morphologie des Golgi-Apparates analysiert. Hierbei zeigte sich eine signifikante Abnahme der Größe des Cis-Golgi-Apparates um ca. 40% in den N2a-Zellen sowie ein verkürzte Überlebenszeit der kultivierten primären sensorischen Neurone (Kurth et al. 2009). *Fam134b* scheint folglich die Degeneration sensibler Neurone des peripheren Nervensystems zu verhindern. In Analogie zur Funktion des Golgi-Proteins FAM134B, könnte auch FAM134C für das Überleben von Neuronen von Bedeutung sein, insbesondere da das Verhalten dieser strukturell homologen Proteine nach Brefeldin A-Behandlung sehr ähnlich war. Eine Dysfunktion von FAM134C könnte somit ebenfalls zu einer Veränderung der komplexen Morphologie des Golgi-Apprates führen, wodurch Beeinträchtigungen in zahlreichen Modifizierungs- und Transportprozessen resultieren könnten. Zu nennen sind hier vor allem posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung, Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung, die u.a. für die Fertigstellung und Aktivierung von Neurotransmittern, Hormonen und deren Rezeptoren von zentraler Bedeutung sind. Auf diese Weise könnte auch die Übermittlung von neuronalen Wachstumssignalen gestört sein, so dass daraus eine Neuropathie resultieren könnte. Dass Dysfunktionen in der neuronalen Wachstumssignalkaskade zu Neuropathien führen können, zeigt sich schon bei der HSN IV. Diese hereditäre sensorisch-autonome Neuropathie, mit den Symptomen der Schmerzunempfindlichkeit und Anhidrosis sowie milder geistiger Retardierung, beruht auf einer Mutation im *NTRK1*-Gen. Dieses Gen kodiert für den Tyrosin-Kinase-Rezeptor A (TrkA), welcher von NGF aktiviert wird und die Entwicklung, das Wachstum und die Differenzierung des Nervensystems reguliert (Verhoeven et al. 2006; Indo et al. 1996). Des Weiteren sind



Mutationen des TrkA-Liganden NGF-B für die HSAN V verantwortlich (Einarsdottir et al. 2004).

Ähnliche Mechanismen der Aufrechterhaltung der neuronalen Funktion durch Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren sind auch für das zentrale Nervensystem beschrieben. Aufgrund des in dieser Arbeit aufgezeigten prädominierenden Expressionsmusters des *Fam134c*-Gens im zentralen Nervensystem könnte eine Dysfunktion des Proteins FAM134C möglicherweise an einer zentralen Neurodegeneration beteiligt sein.

Damit die Funktion des *FAM134C*-Gens geklärt werden kann, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Es könnten Knock-down Experimente an geeigneten Zelllinien mit hoher endogener Expression durchgeführt werden (nach unseren Daten z.B. N2a-Zellen), in denen die *Fam134c*-RNA durch siRNAs inhibiert wird. Das Wachstumsverhalten der Zellen und die Reaktion auf Stresssignale bei einem Funktionsverlust von *Fam134c* könnten näher analysiert werden. Insbesondere sollten in diesem Zusammenhang auf mögliche strukturelle Veränderungen des Golgi-Apparates geachtet werden.

Des Weiteren könnte ein Knock-out Mausmodell generiert werden, das durch einen Funktionsverlust des *Fam134c*-Gens gekennzeichnet ist. Die entstehenden Symptome können Rückschlüsse auf die Funktion des ausgeschalteten Proteins ergeben.

Aufgrund der breiten Expression des *Fam134c*-Gens im zentralen Nervensystem wäre es möglich, dass ein vollständiger Funktionsverlust embryonal letal wirkt, so dass nur das konditionelle Knock-out Verfahren eine sinnvolle Analyse erlaubt. In einem weiteren Mausmodell könnte das Gen dann in spezifischen Zelltypen ausgeschaltet werden. Für das konditionelle Verfahren wird das Rekombinationssystem des Bakteriophagen P1 mit der Cre-Rekombinase und der Zielsequenz loxP verwendet. Dabei wird die auszuschaltende Sequenz mit zwei loxP-Sites flankiert und ein transgenes Mausmodell hergestellt. In einer weiteren transgenen Mauslinie wird die Cre-Rekombinase mit dem gewünschten zelltypspezifischen Promotor exprimiert. Werden diese beiden Mauslinien gekreuzt, entsteht der zelltypspezifische Knock-out, da die Cre-Rekombinase die loxP-Sites schneidet, so dass die flankierte Sequenz herausfällt. Mit diesem Modell könnten dann die organspezifischen Funktionen des Fam134c-Proteins analysiert werden.

Des Weiteren müsste nach Interaktionspartnern gesucht werden. Hierfür könnten Co-Immunpräzipitationen durchgeführt werden. Zudem könnten Interaktionspartner mittels Yeast-2-Hybrid identifiziert werden. Verwendet man hierbei ein Volllänge-Konstrukt mit den vorausgesagten Transmembrandomänen, so empfiehlt sich für einen solchen Ansatz das Split-Ubiquitin System (Thaminy et al. 2004).

## 7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Expressionsanalyse des *Fam134c*-Gens durchgeführt. Das Gen gehört zu der *FAM134*-Genfamilie, deren drei Mitglieder *FAM134A* (2q36.1), *FAM134B* (5p15.1) und *FAM134C* (17q21.31) integrale Membranproteine codieren. Die genaue subzelluläre Lokalisation und Funktion der Proteine *FAM134A* und *FAM134C* ist bis dato nicht bekannt.

Kürzlich konnte die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Ingo Kurth nachweisen, dass Mutationen im *FAM134B*-Gen zu einer Form der hereditären sensorisch-autonomen Neuropathie führen. Die betroffenen Patienten leiden unter Sensibilitätsstörungen sowie schweren Osteolysen und Mutilationen der Hände und Füße.

Vor diesem Hintergrund soll die Funktion des *FAM134C*-Gens analysiert werden. Expressionsanalysen an murinen Geweben sollen dabei erste Hinweise auf eine entsprechende Funktion geben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels  $\beta$ -Galaktosidase Färbung an transgenen Mäusen, Immunfluoreszenzfärbung an Zellen und murinen Gewebeschnitten sowie *in-situ*-Hybridisierungen die Expression des *Fam134c*-Gens untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass *Fam134c* eine breite Expression im zentralen Nervensystem, insb. im limbischen System, in der Hirnrinde, im Kleinhirn und im Rückenmark aufweist. Des Weiteren konnte *Fam134c* in den Spinalganglien, im Ganglion trigeminale, in den sympathischen Ganglien und in der Retina nachgewiesen werden. Das *Fam134c*-Protein konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung und elektronenmikroskopischen Aufnahmen als Membranprotein des Golgi-Apparates identifiziert werden, wo es in der cis-Seite lokalisiert ist und sich wie ein Strukturprotein verhält.

Die im Rahmen der Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen bilden die Grundlage für folgende funktionelle Studien des Fam134c Genprodukts.

## 8. Literaturverzeichnis

Allan BB, Balch WE (1999) Protein sorting by directed maturation of Golgi compartments. *Science* 258:63-66.

Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org/>, abgerufen am 5.9.2008).

Benninghoff A, Drenckhahn D (2004) Anatomie, 16.Aufl., Bd II: Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. Elsevier GmbH, München.

Bothman JE (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372:55-63.

Brad J, Howell M, Howell KE (2002) The mammalian Golgi-complex debates. *Nature reviews, Mol. Cell Biol.* 3:789-795.

Chiu R, Novikov L, Mukherjee S, Shields D (2002) A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis. *J. Cell Biol.* 159:637-648.

Cooper GM (2000) *The Cell A Molecular Approach*, 2. Aufl. Online-Version (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=golgi&rid=cooper.section.1498#1499>, abgerufen am 2.9.2008).

Cooper GM (2000) *The Cell A Molecular Approach*, 2. Aufl. Online-Version (<http://ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=gene,family&rid=cooper.section.601#607>, abgerufen am 18.11.2008).

De Matteis MA, Morrow JS (2000) Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J. Cell. Sci.* 113:2332-2343.

Einarsdottir E, Carlsson A, Minde J (2004) A mutation in the nerve growth factor beta gene (NGFB) causes loss of pain perception. *Hum. Mol. Genet.* 13:799-805.

Ensembl Human Gene View Datenbank

([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/geneview?gene=ENSG00000141699](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000141699), aufgerufen am 17.11.2008).

Eurekah Bioscience Collection (2003) Online-Version

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.facgi?highlight=golgi.eurekah&rid=eurekah.section.7306#7368>, abgerufen am 2.9.2008).

Glick BS (2000) Organisation of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:450-456.

Gonatas NK, Stieber A, Gonatas JO (2006) Fragmentation of the Golgi apparatus in neurodegenerative diseases and cell death. *J. Neurol. Sci.* 246:21-30.

Habuchi H, Habuchi O, Kimata K (2004) Sulfation pattern in glycosaminoglycan: Does it have a code? *Glycoconj. J.* 21:47-52.

Hicks SW, Machamer CE (2005) Golgi structure in stress sensing and apoptosis. *BBA* 1744:406-414.

Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M (2000) *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 4. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 35.

Indo Y, Tsuruta M, Hayashida Y (1996) Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Nat. Genet.* 13:485-488.

Kahle W, Frotscher M (2002) Taschenatlas der Anatomie, 8.Aufl., Bd III: Nervensystem und Sinnesorgane. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Knippers R (2006) Molekulare Genetik, Thieme Verlag, S. 517ff.

Kurth I, Pamminger T, Hennings JC, Soehendra D, Huebner AK, Rotthier A, Baets J, Senderek J, Topaloglu H, Farrell SA, Nürnberg G, Nürnberg P, Jonghe PD, Gal A, Kaether C, Timmerman V & Hübner CA (2009) Mutation in *FAM134B*, encoding a newly identified Golgi protein, cause severe sensory and autonomic neuropathy. *Nat. Genet.* 41:1179-1181.

Lane JD, Lucocq J, Pryde J, Barr FA, Woodman PG, Allan VJ, Lowe M (2002) Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. *J. Cell Biol.* 156:495-509.

Lippincott-Schwartz J, Donaldson JG, Schweizer A, Berger EG, Hauri HP, Yuan LC, Klausner RD (1990) Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* 60:821-836.

Machamer CE (2003) Golgi disassembly in apoptosis: cause or effect? *Trends in Cell Biol.* 13:279-281.

Mardones GA, Snyder CM, Howell KE (2006) Cis-Golgi matrix proteins move directly to endoplasmic reticulum exit sites by association with tubules. *Mol. Biol. Cell* 17:525-538.

Martinez-Menárguez JA et al. (2001) Peri-Golgi vesicles contain retrograde but not anterograde proteins consistent with the cisternal progression model of intra-Golgi transport. *J. Cell Biol.* 155:1213-1214.

Mogelsvang S, Howell KE (2006) Global approaches to study Golgi function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:438-443.

Nakogomi S, Barsoum MJ, Bossy-Wetzel E, Sütterlin C, Malhotra V, Lipton SA (2008) A Golgi fragmentation pathway in neurodegeneration. *Neurobiol. of Disease* 29:221-231.

Orci L et al. (1997) Bidirectional transport by distinct population of COP1-coated vesicles. *Cell* 90:335-349.

Preisinger C, Barr F (2005) Kinases regulating Golgi apparatus structure and function. *Lipids, Rafts and Traffic* 72:15-30.

Rabouille C, Klumperman J (2005) The maturing role of COP1 vesicles in intra-Golgi transport. *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 6:812-818.

Riedel SJ, Shi Y (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 5:897-907.

Robbins E, Gonatas NK (1964) The ultrastructure of a mammalian cell during mitotic cycle. *J. Cell Biol.* 21:429-463.

Sutterlin C, Hsu P, Mallabiabarrena A, Malhotra V (2002) Fragmentation and dispersal of the pericentriolar Golgi complex is required for entry into mitosis in mammalian cells. *Cell* 109:359-369.

Thaminy S, Miller J, Stagljar I (2004) The split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid system. *Methods Mol. Biol.* 261:297-312. Review. PMID: 15064465 [[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15064465?ordinalpos=7&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed\\_ResultsPanel.Pubmed\\_DefaultReportPanel.Pubmed\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15064465?ordinalpos=7&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum)].

Verhoeven K, Timmerman V, Mauko B, Pieber TR, Jonghe PD, Auer-Grumbach M (2006) Recent advances in hereditary sensory and autonomic neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.* 19:474-480.

Warren G (1993) Membrane partitioning during cell division. Annu. Rev. Biochem. 62:323-348.

Warren G, Malhotra V (1998) The organisation of the Golgi apparatus. Curr. Opin. Cell Biol. 10:493-498.

## **9. Danksagung**

Ich möchte mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Gal für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit in seinem Institut durchführen zu können.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Ingo Kurth für die Überlassung des Themas und die sehr gute Betreuung.

Ich danke allen Mitarbeitern der Humangenetik besonders der AG Kurth für eine nette Zusammenarbeit und die Hilfe bei Fragen und Problemen. Die Zeit im Labor hat mir sehr viel Spaß gemacht.

Außerdem möchte ich Frau Dr. Michaela Schweizer für die Anfertigung der EM-Bilder und Frau Dr. Irm Hermans-Borgmeyer für ihre Hilfsbereitschaft bei der morphologischen Analyse danken.

Meiner Familie danke ich ganz herzlich für ihre Unterstützung.

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Tabea Friederike Linne
Anschrift	Moorburger Ring 4F, 21147 Hamburg
Geboren	02.03.1984 in Göttingen

### Schulausbildung

1990-1994	Hainbunds Schule, Göttingen
1994-1996	Orientierungsstufe Süd, Buxtehude
1996-2000	Gymnasium Süd, Buxtehude
2000-2003	Halephagen-Gymnasium, Buxtehude Abitur 2003
2001	Naturwissenschaftliches Stipendium MNU <i>Deutsches Museum München</i>

### Hochschulstudium

seit 10/2003	Studium der Humanmedizin <i>Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf</i>
WS 2005/2006	Vorpräparandin im Institut für Anatomie <i>Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf</i>
03/2006	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2006-2008	Famulaturen in Innere Medizin, Radiologie und Pädiatrie
seit 04/2008	Doktorandin im Institut für Humangenetik <i>Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf</i>
2009.2010	Praktisches Jahr: Chirurgie ( <i>Krankenhaus Mariahilf</i> ) Anästhesiologie ( <i>Berufsgenossenschaftliches Unfallkrankenhaus Hamburg</i> ) Innere Medizin ( <i>AK Harburg</i> )

### Sprachkenntnisse

Englisch und Französisch	Fortgeschrittene Kenntnisse in Wort und Schrift
--------------------------	---



## **11. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um eine Zulassung zur Promotion beworben habe.

Tabea Linne