

Transkriptomanalyse Schizophrenie-relevanter Hirnregionen

Neuregulin-1 defizienter Mäuse

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Biochemiker Philipp Kaiser

aus

Friedrichshafen

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Korreferent: Prof. Dr. Jörg Kämper

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2011

Mein Dank gilt

in besonderem Maße meinem Betreuer Dr. F. Weth für die Ermöglichung dieser Arbeit und die Hilfestellungen zu thematischen Fragen,

Prof. Dr. M. Bastmeyer für die Eingliederung in die Abteilung für Zell- und Neurobiologie und das Gutachten,

Prof Dr. J. Kämper für die Zweitbegutachtung,

L. Dahm, R. Niehage und den Mitarbeitern des Zoologischen Instituts am KIT.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde in keiner Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Karlsruhe, den 31. Mai 2011

Philipp Kaiser

INHALT

1	ZUSAMMENFASSUNG	7
2	EINLEITUNG.....	8
2.1	SCHIZOPHRENIE.....	8
2.1.1	SYMPTOME	8
2.1.2	NEUROPATHOLOGIE	8
2.1.3	DOPAMINHYPOTHESE.....	10
2.1.4	MANIFESTATION	11
2.1.5	EPIDEMIOLOGIE	11
2.1.6	RISIKOFAKTOREN	12
2.1.7	KOPPLUNGS- UND ASSOZIATIONSSTUDIEN	14
2.2	NEUREGULIN-1	16
2.3	NRG1 KNOCKOUT MAUS	19
2.4	STRATEGIE	19
3	MATERIAL	21
3.1	CHEMIKALIEN	21
3.2	LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN.....	21
3.3	NUKLEINSÄUREN	21
3.3.1	NUKLEOTIDE.....	21
3.3.2	OLIGONUKLEOTIDE	22
3.3.3	VEKTOR	23
3.3.4	SONDEN	23
3.4	ENZYME, POLYPEPTIDE UND ANTIKÖRPER.....	24
3.5	ORGANISMEN	24
3.5.1	WIRTSBAKTERIEN.....	24
3.5.2	VERSUCHSTIERE	24
3.6	GERÄTELISTE.....	25
4	METHODEN.....	26
4.1	GENOTYPISIERUNG.....	26
4.2	GEWEBEPRÄPARATION	26
4.2.1	PRÄPARATION VON HIRNREGIONEN EMBRYONALER MÄUSE.....	27
4.2.2	PRÄPARATION VON HIRNREGIONEN POSTNATALER MÄUSE	28
4.3	AUFREINIGUNG VON RNA	30
4.4	QUALITÄTSBESTIMMUNG VON RIBONUKLEINSÄUREN.....	30
4.5	MICROARRAY	31
4.6	ALGORITHMEN	33
4.7	QUANTITATIVE REALTIME RT-PCR.....	34
4.7.1	REVERSE TRANSKRIPTION	35
4.7.2	SYNTHESE UND AUFREINIGUNG VON CDNA.....	35
4.8	IN SITU HYBRIDISIERUNG.....	36
4.8.1	SONDENHERSTELLUNG	37
4.8.2	WHOLE MOUNT PRÄPARATE	37
4.8.3	HERSTELLUNG VON GEWEBESCHNITTEN.....	38
4.8.4	FIXIERUNG UND PERMEABILISIERUNG	38
4.8.5	HYBRIDISIERUNG.....	39
4.8.6	DETEKTION.....	40
4.8.7	ANALYSE.....	40
4.9	NISSL FÄRBUNG	43
5	ERGEBNISSE	44
5.1	BESTIMMUNG UND ABGRENZUNG RELEVANTER BEREICHE.....	44
5.1.1	RÄUMLICHE LAGE VON AT UND PT E15,5.....	44
5.1.2	EMBRYONALE ENTWICKLUNG UND RÄUMLICHE LAGE VON FC.....	45
5.2	QUALITÄTSKONTROLLE ISOLIERTER RNA	48
5.3	AFFYMETRIX MOUSE GENOME 430.2 GENECHIPS®	49

5.3.1	Globale Qualitätskontrolle der Resultate	50
5.3.2	TranskriptaAuswahl.....	54
5.4	Expressionsstudien ausgewählter Transkripte	56
5.4.1	NRG1 (Neuregulin-1).....	56
5.4.2	MTMR7 (Myotubularin Related Protein 1).....	60
5.4.3	PCM1 (Pericentriolar Material 1 Protein)	63
5.4.4	GRIA1 (Glutamate Receptor, Ionotropic, AMPA 1)	65
5.4.5	Wnt Signalweg	67
5.4.6	NEO1 (Neogenin 1)	71
5.4.7	ARHGAP18 (Rho GTPase Activating Protein 18).....	72
5.4.8	FEZF2 (Fez Family Zinc Finger 2).....	73
5.4.9	NPTX2 (Neuronal Pentraxin 2).....	75
5.4.10	TTR (Transthyretin)	76
5.4.11	SEMA5A (Semaphorin 5A).....	78
6	 Diskussion	80
6.1	RNA Qualität	80
6.1.1	RNA Integrity Number.....	80
6.1.2	Detektionssignale von Actb und Gapdh	80
6.2	Qualität der Hybridisierungen	81
6.2.1	Hybridisierungsartefakte	81
6.2.2	Korrelationskoeffizienten	82
6.2.3	Normalisierung	82
6.3	Globale Differentialität	83
6.3.1	Ratio-Intensity Plots	83
6.3.2	Principal Component Analysis	85
6.3.3	Transkriptomische Veränderungen durch NRG1 ^{+/-}	85
6.3.4	Deregulierte Transkripte	85
6.4	Validierung ausgewählter Transkripte.....	86
6.4.1	Konsequenzen der reduzierten Gendosis von NRG1	87
6.4.2	Probenzusammensetzung.....	88
6.4.3	Auswertungsalgorithmus	89
6.4.4	Auswahl untersuchter Gene.....	90
6.4.5	Quantitative Realtime RT-PCR	90
6.4.6	In situ Hybridisierung	92
6.5	Resümee	93
6.6	Weiterführende Studien	95
6.6.1	Betroffene Funktionssysteme.....	95
6.6.2	GO-Analyse	96
6.6.3	Deregulierte Signalwege	96
7	 Verzeichnisse.....	101
7.1	Websites.....	101
7.2	Abkürzungsverzeichnis	101
7.3	Abbildungsverzeichnis	102
7.4	Tabellenverzeichnis	102
7.5	Literaturverzeichnis	103
8	 Anhang	113
8.1	Ausgewählte Transkripte	113
8.1.1	Embryonal (676 IDs).....	113
8.1.2	Postnatal (427 IDs)	114
8.2	GO-Analyse	116
8.3	RNA-Pools der GeneChips®	117
8.4	RNA-Pools der QPCR	119
8.5	Genomisches Fragment	119
8.6	Schnittebenen durch At, Fc, Pt und Sc.....	120

1 ZUSAMMENFASSUNG

Schizophrenie ist eine neuroentwicklungsbiologisch verursachte Psychose. Die entsprechenden funktionellen und strukturellen Veränderungen des Zentralnervensystems manifestieren sich im frühen Erwachsenenalter durch einen vielfältigen psycho- und neuropathologischen Symptomenkomplex. Die genetisch verursachten molekularen, zellulären und neuropsychologischen Ursachen sind bislang weitgehend unbekannt. Die Erbllichkeit der Krankheit wird auf ca. 80 % geschätzt. Eines der wichtigsten Suszeptibilitätsgene ist Neuregulin-1 (*Nrg1*).

In dieser Arbeit wurden die transkriptomischen Konsequenzen eines genetischen Defizits an *Nrg1* im Tiermodell untersucht. Von Mäusen der Genotypen *Nrg1*^{+/-} und *Nrg1*^{+/+} wurden Transkriptome von je drei Pool-Replikaten von 4 krankheitsrelevanten Regionen und 2 Entwicklungsstadien durch Affymetrix Mouse Genome 430.2 GeneChips® erfasst. Die Datensätze der 48 Microarrays sind von durchgehend hoher Qualität und zeigen markante globale Differentialität zwischen den Stadien und Regionen. Die Unterschiede der Genotypen liegen jedoch nur in der Größenordnung der interindividuellen Unterschiede. Die Auswahl veränderter einzelner Gene basiert auf einem minimalen fold change von 1,5 bei gleichzeitigem Signifikanzniveau kleiner 0,05 (t-Test). Die Veränderungen sind weitgehend regions- und stadienspezifisch. Hauptsächliche Befunde sind im embryonalen frontalen System (mediofrontaler Cortex und anteriomedialer Thalamus) auszumachen. Zur Validierung der Expressionsverhältnisse wurden quantitative realtime RT-PCR und *in situ* Hybridisierungen an koronalen Kryomikrotomschnitten genutzt. Für *Nrg1* als Positivkontrolle wurde das Expressionsdefizit in heterozygoten Tieren durch alle angewandten Methoden bestätigt. Von 10 weiteren Genen (*Arhgap18*, *Fezf2*, *Fzd3*, *Gria1*, *Mtmr7*, *Neo1*, *Nptx2*, *Pcm1*, *Ttr*, *Wnt5a*) konnten dagegen die differentiellen Expressionswerte der GeneChips® trotz empfindlicher Testverfahren nicht bestätigt werden.

Insgesamt sind die beobachteten Effekte im Genotyp *Nrg1*^{+/-} subtil und die Einzelgen-Analyse liefert anscheinend zu viele falsch Positive. Global wirkt *Nrg1* in unterschiedlichen Regionen und zu unterschiedlichen Zeiten vermutlich über ungleiche Mechanismen, wobei korrespondierend mit dem psychopathologischen Phänotyp das frontale thalamokortikale System stärker betroffen zu sein scheint als das posteriore.

Die nützliche, wenn auch unter neurobiologischen Aspekten lückenhafte Datenbank KEGG liefert bei der Untersuchung des embryonalen Entwicklungszustandes vorläufige Hinweise auf veränderte Zellzykluslängen im Genotyp *Nrg1*^{+/-}. Anzeichen auf eine damit einhergehende verfrühte Differenzierung und Migration von Zellen der kortikalen proliferativen Zonen liefert das Expressionsmuster von *Sema5a*, einem Marker der Ventrikulärzone. Zum postnatalen Zeitpunkt wurden übermäßig Gene der Axonlenkung dereguliert, die postnatal eine Rolle bei der neuronalen Plastizität spielen.

2 EINLEITUNG

2.1 SCHIZOPHRENIE

Schizophrenie ist eine schwerwiegende Erkrankung des Gehirns. Die Krankheit tritt weltweit auf und entwickelt sich nicht selten chronisch. Betroffene Personen sind durch die Schwere der Symptome und den zumeist lang andauernden Verlauf in ihrer Persönlichkeit und in Interaktionen mit ihrem sozialen Umfeld außerordentlich stark beeinträchtigt. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) stuft die Schizophrenie als weltweit eine der kostspieligsten Krankheiten ein. Gründe dafür sind ihre Häufigkeit, Chronizität und die Beeinträchtigung der Fähigkeit zu selbständigem Leben der betroffenen Patienten.

2.1.1 SYMPTOME

Laut ICD-10 (GM-2011-F20), dem Krankheitsklassifikationssystem der WHO sind schizophrene Störungen im Allgemeinen durch grundlegende und charakteristische Störungen von Denken und Wahrnehmung sowie inadäquate oder verflachte Affekte, Ich-Störungen und dem Verlust des Wirklichkeitsbezugs gekennzeichnet. Als diagnostischer Leitfaden werden in der ICD-10 die psychopathologischen Phänomene in neun Gruppen unterteilt. Die meisten der Symptome können konzeptionell auch in negative und positive Symptome eingeteilt werden. Zu den Positivsymptomen einer Schizophrenie gehören z.B. Wahn, Halluzinationen und psychotische Ich-Erlebnis-Störungen. Positive Symptome sprechen im Allgemeinen gut auf gezielte Pharmakotherapie mit antipsychotisch wirksamen Neuroleptika an und sind längerfristig weniger problematisch. Zu den Negativsymptomen zählt man u.a. Beeinträchtigungen des Denkens, der Affektivität, des Antriebs und Willens, sowie der Kommunikations- und Kontaktfähigkeit. Negative Symptome sind therapieresistenter und für den Patienten in der Regel insgesamt folgenschwerer.

Entsprechend der Zusammensetzung auftretender Symptome und spezifischer Symptomatik können schizophrene Subtypen unterschieden werden, zu denen die WHO unter anderem die paranoide, hebephrene und katatone Schizophrenie, sowie Schizophrenia simplex zählt.

2.1.2 NEUROPATHOLOGIE

Die sporadisch in vielen Gehirnregionen auftretenden morphologischen Korrelate der Schizophrenie sind subtil und für diagnostische Zwecke überwiegend untauglich.

Ein genereller Befund aus *post mortem* Untersuchungen schizophrener Patienten stellt die reduzierte Gehirnmasse dar (Harrison et al. 2003). Konsistent dazu sind Ergebnisse von *in vivo* durchführbaren strukturellen Magnetresonanztomographie (MRT) Studien. Aus diesen geht hervor,

dass mit einer Verminderung des Volumens (Lawrie & Abukmeil 1998, Steen et al. 2006, Vita et al. 2006, Wright et al. 2000), insbesondere der grauen Substanz, eine Vergrößerung der Ventrikel einhergeht. Morphometrische Veränderungen der Ventrikel gehören zu den am häufigsten reproduzierten Messungen struktureller Gehirnanomalien von Schizophrenen (Honea et al. 2005, Steen et al. 2006). Weitere strukturelle Veränderungen sind vornehmlich im Bereich des Präfrontalcortex (PFC) und des medialen und superioren Temporallappen des Cortex und im Thalamus zu beobachten. Untersucht man zusätzliche Parameter wie Cortexdicke (Kuperberg et al. 2003), Gyrfikation (Kulynych et al. 1997, Vogeley et al. 2000), hippocampale Form (Casanova & Rothberg 2002, Csernansky et al. 2002) und zerebrale Asymmetrie (Ribolsi et al. 2009) können auch dort Veränderungen festgestellt werden. Ergebnisse aus diffusionsgewichteter MRT deuten auch auf Unregelmäßigkeiten innerhalb von Fasertrakten der weißen Substanz und damit auf eine gestörte Konnektivität einzelner Hirnareale hin (Kubicki et al. 2007).

Volumetrische Abweichungen sind, teilweise bereits vor dem Ausbruch einer Psychose und unabhängig von Medikationseffekten, sowie in nicht betroffenen Familienangehörigen mit erhöhtem genetischem Erkrankungsrisiko existent. Dies weist darauf hin, dass die Befunde in Patienten aus genetisch prädisponierten, grundlegenden Entwicklungsdefekten resultieren und nicht etwa Folgen einer bestehenden Schizophrenieerkrankung sind.

Funktionelle Analysen des Gehirns schizophrener Patienten zeigen meist eine Hypofunktionalität insbesondere frontal gelegener Hirnbereiche. Anhand funktioneller MRT Analysen lässt sich bei Tests entsprechend kognitiver Fähigkeiten, z.B. des Arbeitsgedächtnisses (n-back test) oder exekutiver Funktionen (wisconsin card sort test), ein vermindertes Aktivierungspotential des dorsolateralen PFC feststellen. Der PFC übernimmt eine übergeordnete Kontrollfunktion für Handlungsplanungen und kognitive Fähigkeiten und ist Sitz des Arbeitsgedächtnisses (Laws 1999, MacDonald et al. 2005).

Neben den genannten Veränderungen des Gehirns gehören auch subtile neurophysiologische Anzeichen zum Endophänotyp einer Schizophrenie. Diese äußern sich u.a. in Defekten der normalerweise durch Präpulsinhibition verminderten Startle Reaktion. Hinzu kommen Störungen der Augenfolgebewegungen (Keshavan et al. 2008) und des olfaktorischen Systems (Nguyen et al. 2010). Eine grundlegend wichtige Erkenntnis für das Verständnis der Entstehung schizophrener Erkrankungen ist die Beobachtung, dass keine Astroglieose festzustellen ist (Jarskog et al. 2007). Dieses Fehlen von Gliazellproliferation und anderer Anzeichen von Neurodegeneration sprechen für einen möglichen neuroentwicklungsbiologischen Ursprung der Erkrankung (Harrison & Roberts 2000, Lewis & Levitt 2002). Die Hypothese zur Schizophrenie als neuroentwicklungsbiologisch verursachte Störung wird außerdem durch neuropathologische Detailbeobachtungen gestützt.

Histologische Befunde deuten darauf hin, dass frühzeitig während der Entwicklung Störungen auftreten, die insbesondere die Migration, den Fortbestand und die Konnektivität von Neuronen betreffen. Man findet z.B. dislokalisierte Neurone in Schicht zwei und drei des entorhinalen Cortex (Arnold et al. 1991, Falkai et al. 2000) und in der subkortikalen weißen Substanz (Akbarian et al. 1996). Dies sind Anzeichen einer neuronalen Migrationsstörung während der embryonal stattfindenden Kortikogenese. Morphologische Merkmale in der grauen Substanz sind verkleinerte Somata neokortikaler Pyramidenzellen (Pierri et al. 2003). Innerhalb dieser Zellpopulation kann auch eine Verringerung der Verzweigungen von Dendriten und eine reduzierte Zahl an dendritischen Spines ausgemacht werden (Black et al. 2004, Garey et al. 1998, Glantz & Lewis 2000, Rosoklija et al. 2000). Typische neuropathologische Merkmale einer Schizophrenie sind die Reduktion interneuroner Verbindungen und der messbare Verlust an Neuropil supragranulärer kortikaler Schichten. Beobachtet wird eine erhöhte Zelldichte und gleichzeitig eine Größenabnahme der Zellsomata (Rajkowska et al. 1998, Selemon et al. 1998). Desweiteren korreliert die Abnahme neuronaler Verbindungen mit einer Verringerung der Ausdehnung von Basaldendriten und der Dichte dendritischer Spines von Pyramidenzellen der tieferen Schicht III (Glantz & Lewis 2000). Subpopulationen von Interneuronen, speziell Parvalbumin-immunopositive, sind in ihrer Anzahl und ihren synaptischen Projektionen reduziert (Lewis 2000, Reynolds et al. 2002), wobei die Gesamtzahl an Neuronen des Cortex (Pakkenberg 1993) und des Hippokampus unverändert bleibt (Heckers et al. 1991, Walker et al. 2002). Hingegen kann die Neuronenzahl einzelner thalamischer Kerne, insbesondere MD, AV und AM (mediodorsal-, anteroventral-, anteromedial thalamic nucleus) verringert sein (Popken et al. 2000, Young et al. 2000). Außerdem konnten funktionelle Defizite von Oligodendrocyten festgestellt werden (Tkachev et al. 2003). In morphologischen Zählungen konnte zusätzlich eine veränderte Verteilung und Verringerung der Zellzahl (Hof et al. 2003) dieser für neuronale und synaptische Integrität verantwortlichen Zellpopulation gefunden werden (Wilkins et al. 2003).

2.1.3 DOPAMINHYPOTHESE

Bezüglich auftretender neurochemischer Anomalien im Gehirn ist das Dopaminsystem erwähnenswert. Einige indirekte Hinweise deuten auf eine Überempfindlichkeit dieses Transmittersystems im Zusammenhang mit schizophrenen Psychosen hin. Zum einen können durch pharmakologische Aktivierung des Dopaminsystems mittels Dopamin Agonisten, wie zum Beispiel Amphetamin, psychotische Effekte ausgelöst werden. Zum anderen wirkt eine dopaminerge Blockade antipsychotisch (Guillin et al. 2007). Klinisch eingesetzte D2 Rezeptorantagonisten richten sich allerdings vornehmlich gegen die Positivsymptomatik. Signifikante Assoziationen mit Genen des

Dopaminsystems konnten dagegen bislang nicht gefunden werden, was gegen einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der Regulation des Dopaminsystems und Schizophrenie spricht.

2.1.4 MANIFESTATION

Die Erstmanifestation der Krankheit liegt meist im frühen Erwachsenenalter, selten vor dem zehnten und selten nach dem 40. Lebensjahr. Typischerweise erkranken Männer zwischen dem 16. und 25. Lebensjahr, durchschnittlich mit 18 Jahren, und damit geringfügig früher als Frauen, die Symptome erst einige Jahre später entwickeln und durchschnittlich mit 25 Jahren erkranken. Erkennbar höher als für Männer ist die Inzidenz dagegen für Frauen über 30 Jahren.

Klassischerweise treten kontinuierlich wiederkehrende Episoden positiver, negativer und gemischter Symptomatik auf. Dieser chronisch rezidivierende Krankheitsverlauf variiert dabei von Patient zu Patient. Oft beobachtbar sind einzelne oder wiederkehrende Episoden ohne Verschlimmerung mit dazwischenliegenden, vollständig symptomfreien Abschnitten. Bei einem nicht unbeträchtlichen Anteil der Patienten zeigt sich aber eine chronische Verfestigung vor allem der negativen Symptome, insbesondere je länger das Beschwerdebild unbehandelt bleibt. Das Ausmaß der Erkrankung auf das persönliche Befinden der Betroffenen zeigt sich u.a. darin, dass innerhalb eines zehnjährigen Intervalls nach der Diagnose einer Schizophrenie circa 10 % ihr Leben mit einem Suizid selbst beendet haben.

2.1.5 EPIDEMIOLOGIE

Das Lebenszeitrisko an Schizophrenie zu erkranken wird durchschnittlich auf 0,7 % veranschlagt. Zuverlässige Zahlen zu weltweit an Schizophrenie erkrankten Personen sind aufgrund von Diagnose- und Klassifizierungsschwierigkeiten schwer zu erfassen (Eaton et al. 2007) und führen zu unterschiedlichen Angaben. Die zugrundeliegenden Studien zur Wahrscheinlichkeit im Leben an Schizophrenie zu erkranken schwanken zwischen 0,3 und 2 % (Saha et al. 2005).

Einer umfassenden Metastudie von 2004 zufolge, die 55 Studien zwischen den Jahren 1965 und 2001 aus 33 Ländern zusammenfasst, liegt die mittlere jährliche Inzidenzrate bei 15,2 pro 100000 (McGrath et al. 2004). Ein Zusammenhang zwischen Inzidenzrate und untersuchter globaler Region, bzw. deren ökonomischen Status, konnte nicht festgestellt werden. Allerdings erkranken dieser Studie nach nicht nur signifikant mehr in Städten lebende Menschen, sondern auch 4,6mal häufiger Personen mit Migrationshintergrund (Cantor-Graae & Selten 2005, Selten et al. 2007). In wieweit dies ursächlich ist, oder als Folge der Erkrankung betrachtet werden kann ist hinsichtlich der Faktoren gesellschaftlicher Integration, sozialem Stress, einwirkender Umweltgifte und etwaigem Drogenkonsum der betroffenen Personen diskussionswürdig (Dohrenwend et al. 1992). Generell

sprechen die erhöhten Zahlen Erkrankter in Städten und unter Migranten für einen Beitrag sozialer Risikofaktoren (Cantor-Graae 2007).

Durch die globale Ähnlichkeit von Inzidenz- und Prävalenz kann resümiert werden, dass maßgeblich biologische Ursachen für die Erkrankung in Frage kommen und soziale Faktoren unter Umständen zu leichten Modifikationen führen.

2.1.6 RISIKOFAKTOREN

Derzeitig wird davon ausgegangen, dass Schizophrenie eine multifaktorielle Erkrankung diverser genetischer und nichtgenetischer Komponenten ist. Aus genetischer Sicht werden die Ursachen von Schizophrenie als heterogenetisch und polygenisch angesehen. Viele zuverlässige Studien sprechen für den Einfluss diverser genetischer Polymorphismen, die jeweils einen kleinen Effekt zur Suszeptibilität beitragen (Lichtermand et al. 2000). Allgemein gilt, dass keiner der einzelnen Risikofaktoren essentiell und alleine ausreichend für eine Erkrankung zu sein scheint, sondern vielmehr einen jeweiligen Beitrag dazu leistet.

2.1.6.1 UMWELTBEDINGTE EINFLÜSSE

Unter diesem Abschnitt sollen nichtgenetische Einflüsse diskutiert werden, welche die Suszeptibilität für Schizophrenie erhöhen. Dazu gehören biologische und psychosoziale Faktoren, die pränatal und während der Geburt, der Kindheit und Jugend, sowie des frühen Erwachsenenalters ein erhöhtes Risiko erzeugen können. Entsprechend der Annahme, dass neuroentwicklungsbiologische Störungen ursächlich für die Entstehung von Schizophrenie sind, stehen vornehmlich Risikofaktoren im Fokus, die sich *in utero* auf die Embryonalentwicklung auswirken (Patterson 2007). Dazu gehören unter anderem Infektionen (Brown & Derkits 2010), Ernährungsdefizite, Neurotoxine und Stressfaktoren der Mutter. Innerhalb der postulierten *Two-Hit*-Hypothese zur Entstehung von Schizophrenie (Bayer et al. 1999) stellen diese Faktoren den zweiten *Hit* dar, während genetische Veranlagungen für Betroffenen zum ersten *Hit* gehören.

Infektionserkrankungen der Mutter innerhalb des ersten Zeitraums einer Schwangerschaft führen statistisch zu einer erhöhten Anfälligkeit des Kindes im Laufe des Lebens zu erkranken (Meyer et al. 2007, Penner & Brown 2007). Für den Nachwuchs sind insbesondere Influenzainfektionen mit einem erhöhten Risiko behaftet. Dies geht aus nachträglich durchgeführten Analysen von aufbewahrten Seren von Müttern aus der Zeit der Schwangerschaft hervor. Dabei korrelieren Infektionen im ersten Trimenon mit einem siebenfach erhöhten Risiko für die Nachkommen. Spätere Infektionszeiträume spielen demgegenüber lediglich eine untergeordnete, beziehungsweise keine Rolle (Brown et al. 2004). Pränatale Risiken gehen auch von Infektionen mit Rötelviren, Protozoen *Toxoplasma gondii*

und *Herpes simplex type II (HSV-2)* Viren aus, die während des Geburtsvorgangs übertragen werden können (Brown & Derkits 2010). Als zugrunde liegender Mechanismus werden die vom Immunsystem als Reaktion auf eine Infektion als Mediatoren freigesetzten Cytokine diskutiert. Diese beeinflussen die normale Entwicklung des fetalen Gehirns (Ashdown et al. 2006, Deverman & Patterson 2009). In weiterführenden Studien konnten bereits die Cytokine Interleukin-8 (IL-8) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) mit Schizophrenie und anderen psychiatrischen Erkrankungen assoziiert werden (Boin et al. 2001, Brown & Derkits 2010). Durch Zytokine vermittelt, können Infektionen die Expression von Genen der Immunantwort verändern. Unter anderem finden sich Proteine des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse I im Nervensystem auch in Synapsen angereichert. Dort sind sie für die Funktion notwendig und übernehmen eine wichtige Rolle bei der Plastizität und Feinregulierung des Nervensystems (Boulanger 2009, Boulanger & Shatz 2004).

Ernährungsdefizite (St Clair et al. 2005, Susser et al. 1996) und einschneidende Lebenskrisen (Khashan et al. 2008) der Mutter während des ersten Drittels einer Schwangerschaft sollen an dieser Stelle als weitere pränatale Risikofaktoren erwähnt werden. Entsprechend der Dopaminhypothese prädisponieren diese Stressfaktoren für eine spätere Hypersensibilität des Dopaminsystems (Yui et al. 2007). Dazu kommen Komplikationen während des Geburtsvorgangs, die ursächlich für eine Sauerstoffunterversorgung des Kindes sein können und vermutlich dadurch eine Erhöhung des Risikos bewirken (Byrne et al. 2007, Geddes & Lawrie 1995, Geddes et al. 1999). Zu den Risikofaktoren während der Jugend und des Erwachsenenalters ist, neben schweren Traumatisierungen und Infektionserregern (Brown 2010) der Konsum von Cannabis erwähnenswert (Henquet et al. 2005, Moore et al. 2007).

2.1.6.2 GENETISCHE FAKTOREN

Obwohl zwei Drittel der Schizophrenieerkrankungen sporadisch auftreten, steigt das Risiko einer Erkrankung mit zunehmendem Verwandtschaftsgrad zu einer schizophrenen Person (Kendler et al. 1993). Eine familiäre Häufung als Folge genetischer Prädisposition geht aus der Analyse von Familienstambäumen klar hervor. Zwillings- und Adoptionsstudien bekräftigen dies. Beim Auftreten der Krankheit unter genetisch identischen, eineiigen Zwillingspaaren liegt die Wahrscheinlichkeit, dass beide erkranken bei 40-50 %. Bei zweieiigen Paaren liegt diese deutlich niedriger bei 10-15 % (McGue & Gottesman 1991). Aus diesen Konkordanzraten kann die Erbllichkeit abgeschätzt werden. Die Heritabilität als Anteil genetischer Faktoren an der Gesamtvarianz wird für Schizophrenie auf beträchtliche 80 % kalkuliert. Familiäre Umgebungsfaktoren können nur etwa 10 % der Varianz erklären (Sullivan et al. 2003). Gegenüber anderen psychiatrischen Erkrankungen scheint Schizophrenie demzufolge in weitaus höherem Maße vererbbar zu sein.

2.1.7 KOPPLUNGS- UND ASSOZIATIONSSTUDIEN

Zur Identifizierung krankheitsbeeinflussender Suszeptibilitätsgene dienen Kopplungs- und Assoziationsstudien.

2.1.7.1 KOPPLUNGSSTUDIEN

Genetische Analysen von Familienstammbäumen betroffener und gesunder Familienmitglieder dienen in genomweiten Kopplungsstudien (Genomwide Linkage - GWL) der Erkennung genomischer Bereiche, in denen ein oder mehrere Gene, bzw. deren Variationen positioniert sind, die für die untersuchte Krankheit prädisponieren. Die genetische Heterogenität und begrenzte Anzahl zur Studierenerhebung verfügbarer Familien, sowie die wahrscheinliche Existenz mehrerer unabhängiger Risikogene verringern die Sensitivität und Präzision dieser Methode. Zur Detektion von Genen mit relativ geringen Effekten ist dies unzureichend. Kopplungsstudien von komplex genetischen Krankheiten besitzen typischerweise eine Genauigkeit von einigen zehn cM. Auch wenn ein überzeugendes Kandidatengen im identifizierten Sequenzbereich lokalisiert ist, umfassen diese Bereiche oft Hunderte von Genen. Im Falle von Schizophrenie ist die Gesamtzahl an Genen aus den in GWL-Studien identifizierten Genomabschnitten immens und umfasst erhobenen Metastudien zufolge annähernd ein Viertel aller bekannten Gene (Badner & Gershon 2002, Lewis et al. 2003, Ng et al. 2009). Um aus den in GWLs identifizierten chromosomalen Regionen einzelne, ausschlaggebende Risikogene aufspüren zu können werden zusätzliche genomweite Assoziationsstudien (Genomwide Association Study - GWAS) durchgeführt.

2.1.7.2 ASSOZIATIONSSTUDIEN

Gegenwärtig werden pro Jahr mehr als 150 Assoziationsstudien zur Schizophrenie veröffentlicht. Trotz dieser starken Bemühungen konnte keines der darin beschriebenen Gene oder genetischen Varianten als glaubwürdiger Suszeptibilitätsloкус etabliert werden. Systematische und nach Richtlinien des Human Genomic Epidemiology Network (HuGENet™) (Ioannidis et al. 2006) erstellte Zusammenfassungen aller publizierten GWAS und dazu erhobener Meta-Analysen sind in einer laufend aktualisierten Datenbank zugänglich (Allen et al. 2008).

Mit Hilfe von GWAS werden Genotyphäufigkeiten eines Markerlokus untersucht oder aus Kopplungsstudien ermittelte Regionen weiter eingegrenzt. In diese Art von Studien können auch genetisch voneinander unabhängige Personen mit einbezogen werden. Die Methode besitzt genügend Sensitivität zum Auffinden auch geringerer Geneffekte. Als Marker dienen über das ganze Genom verteilte Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) und Mikrosatelliten. Relativ zueinander nahe gelegene Marker und Allele befinden sich in einem Kopplungsungleichgewicht. In der

chromosomalen Umgebung eines bei Patienten gegenüber einer Kontrollgruppe auffällig gehäuft Markers kann im Erbgut erkrankter Personen der krankheitsrelevante Genelokus identifiziert werden. Werden hinreichend dicht beieinander gelegene Marker untersucht, lassen sich mitunter einzelne Gene mit einer Krankheit direkt in Verbindung bringen. Die dazu nötige Untersuchung einer riesigen Anzahl an Markern ist allerdings nicht nur aufwendig und kostspielig, wenn auch mit den heutigen Möglichkeiten zur Genomsequenzierung durchführbar, sondern bereitet vor allem Probleme bei deren statistischer Auswertung in Bezug auf multiples Testen. Dementsprechend können durch handhabbar viele Marker in einer *de novo* Assoziationsstudie nur relativ große Sequenzbereiche untersucht werden.

Die in einer assoziierten Sequenz positionierten Kandidatengene werden anschließend in der Regel auf ihre Plausibilität im Zusammenhang mit der Krankheit untersucht. Im Folgenden können direkt Marker innerhalb eines in Verdacht stehenden Gens zur Charakterisierung verschiedener Allele dieses Gens herangezogen werden. Zur Verringerung der beobachteten Varianz von GWAS für psychiatrische Erkrankungen mit komplexer Genetik sind jedoch möglichst große Fallzahlen zur Studiererhebung notwendig. Erwähnt werden diesbezüglich 20000 bis 30000 notwendige Fälle mit einer ähnlichen Anzahl an Kontrollen zur stabilen Analyse (Cichon et al. 2009).

Befunde aus einzelnen Kopplungsstudien sind für Schizophrenie immens vielzählig vorhanden, über das gesamte Genom verteilt und lassen sich selten konsistent replizieren. Ursächlich dafür sind vor allem die unzureichenden Untersuchungszahlen, die möglicherweise voneinander abweichenden Diagnosekriterien und uneinheitliche statistische Auswerteverfahren.

Eine umfassende, 2009 publizierte Meta-Analyse (Ng et al. 2009) basiert auf 32 unabhängigen genomweiten Kopplungsstudien. Die 2003 erschienene Vorläuferstudie (Lewis et al. 2003) wurde um 12 weitere Einzelstudien erweitert und fasst aus 3255 untersuchten Familienstammbäumen 7413 Fälle zusammen. In dieser Analyse wurden genomweite Kopplungen von 10 nicht benachbarten 30 cM langen chromosomalen Segmenten als signifikant bewertet, insbesondere auf den Chromosomenabschnitten 2q und 5q. Eine Teilanalyse nur der an europäisch-abstammigen Personen durchgeführten Studien untermauert zudem die Kopplung eines Abschnitts des kurzen Arms von Chromosom 8 im Bereich von 16-33 Mb (siehe Absatz 2.2 und Stefansson et al. 2002) Das dort gefundene Kopplungsmuster resultiert entweder aus einem starken Kopplungssignal nahe der untersuchten Abschnittsgrenze, oder deutet auf mehrere Suszeptibilitätsloki hin. Zusätzliche Studien (Badner & Gershon 2002, DeLisi et al. 2002) untermauern weitere Kopplungsungleichgewichte in den chromosomalen Abschnitten 10p, 13q und 22q.

Unabhängig davon konnte bei der Untersuchung eines schottischen Familienstammbaumes mit schwerwiegend psychiatrisch erkrankten Familienmitgliedern als genetisches Risiko eine balancierte

Translokation (1;11)(q42.1;q14.3) auffindig gemacht werden (Millar et al. 2000, St Clair et al. 1990). Statistisch konnte belegt werden, dass eine Vererbung dieser Translokation ursächlich für eine Reihe psychiatrischer Erkrankungen wie Schizophrenie, Bipolar disorder oder Major Depression ist. Gegenüber der Allgemeinbevölkerung ist das Erkrankungsrisiko eines Erbträgers hierbei circa 50mal erhöht (Blackwood et al. 2001). Die mittlerweile genau spezifizierte Translokation unterbricht auf Chromosom 1 die Funktion eines konventionell proteincodierenden Gens DISC1 (disrupted in schizophrenia 1) und einer nichtcodierenden antisense RNA DISC2 (Millar et al. 2000).

2.2 NEUREGULIN-1

Auf dem kurzen Arm von Chromosom 8, im Abschnitt der in der Meta-Studie von Ng et al. (Ng et al. 2009) signifikant auffälligen Kopplungsmarker, zwischen 16 und 33 Mb vom Telomer, liegt das Gen Neuregulin-1 (*NRG1*). Bereits im Jahr 2002 wurde von einer Gruppe isländischer Wissenschaftler (Stefansson et al. 2002) durch eine genomweite Analyse isländischer Familien mit schizophrenen Angehörigen und durch Feinkartierung der in vorausgehenden Studien erstmals 1995 (Pulver et al. 1995) identifizierten Kopplungsregion auf Chromosom 8p21, 8p22-11 eine direkte Assoziation von *NRG1* mit Schizophrenie gefunden. Die dort entdeckte genetische Variation resultiert in einer ca. zweifachen Risikoerhöhung für Schizophrenie (Stefansson et al. 2002). Mittlerweile konnten weitere genetische Variationen in Form von SNPs innerhalb dieses Gens mit dem Auftreten psychotischer Symptome (Hall et al. 2006), einer Vergrößerung der Lateralventrikel (Mata et al. 2009), mit Dichte- und Integritätsverlusten der weißen Substanz (McIntosh et al. 2008) und mit einer veränderten Zellmigration (Sei et al. 2007) assoziiert werden.

NRG1 gehört zu einer Familie von Wachstumsfaktoren, die von den Genen *NRG1-4* kodiert werden. *NRG1* überspannt auf der chromosomalen DNA mehr als 1,125 Mb und ist somit eines der größten Gene des menschlichen Genoms. Durch alternatives Spleißen der vielzählig vorhandenen Exons können etliche Isoformen gebildet werden. Basierend auf humanen Expressed Sequence Tags (ESTs) sind gegenwärtig 31 unterschiedliche Transkripte dieses Gens bekannt. Unter alternativen Namen bekannt, gehören dazu Neu differentiation factor (*NDF*), heregulin, glial growth factor (*GGF*) und acetylcholine-receptor (*AChR*)-inducing activity (*ARIA*). Ein Merkmal, das alle Isoformen tragen, ist die epidermale Wachstumsfaktor (EGF)-ähnliche Domäne im extrazellulären Bereich. Diese ist für die Aktivierung und Signalweiterleitung verschiedener Homo- und Heterodimere von (ERBB1), ERBB2; ERBB3 und ERBB4 Rezeptortyrosinkinasen notwendig und ausreichend. Entsprechend der Zusammensetzung ihrer Strukturdomänen im aminoterminalen Bereich vor der EGF-ähnlichen Domäne lassen sich die Genprodukte von *NRG1* sechs verschiedenen Typen zuordnen (Mei & Xiong 2008). Die meisten der Isoformen werden als membranständige Vorläuferproteine gebildet und

außerhalb der Zelle auf der carboxyterminalen Seite der EGF-ähnlichen Domäne proteolytisch gespalten. Durch die Aktivität der Typ I Transmembranproteasen tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE/ADAM17), β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE/memapsin 2) und meltrin beta (ADAM19) führt dies zur Freisetzung diffusibler Wachstumsfaktoren. Eine Ausnahme stellt die TypIII NRG1 Isoform dar, deren Aminoterminus eine weitere transmembranale Domäne besitzt und demzufolge auch nach einer proteolytischen Spaltung des Vorläuferproteins membranständig bleibt. Einige NRG1 Isoformen besitzen keine Transmembrandomäne und können direkt in den extrazellulären Raum sezerniert werden (Falls 2003).

NRG1 ist an vielen Prozessen der Entwicklung des Nervensystems beteiligt. Eine wichtige Funktion ist z.B. die Förderung der Proliferation neuronaler Vorläuferzellen. Dementsprechend werden Genprodukte von NRG1 und deren Rezeptoren in Regionen embryonaler und adulter Neurogenese exprimiert. Funktionsverluste von *Nrg1* oder *ErbB4*, sowie Störungen in der Signalweiterleitung von NRG1 führen zu im Weiteren detaillierter beschriebenen Defekten der Migration pyramidalen und GABA (γ -Aminobuttersäure)-erger Neurone, des Neuritenwachstums und der axonalen Projektion, der Myelinisierung und der Plastizität von Synapsen. Während embryonaler Entwicklungsphasen sind die radiale Migration glutamaterger Neurone und die tangential Migration GABAerger Interneurone wichtige, durch NRG1 beeinflusste Prozesse der Cortexentwicklung (Mei & Xiong 2008).

NRG1 induziert die Ausbildung und fördert die Aufrechterhaltung der für die Migration neuronaler Vorläuferzellen des Cortex und granularer Zellen des Kleinhirns erforderlichen Fortsätze radialen Gliazellen (Anton et al. 1997, Rio et al. 1997). Diffusibles NRG1 wird dabei von migrierenden Zellen sekretiert. Für eine *ErbB4* exprimierende und tangential migrierende Subpopulation kortikaler Interneurone gewährleistet membranständiges TypIII NRG1 durch direkten Kontakt (short-range) deren Migration in einem permissiven Korridor. Über größere Distanzen (long-range) attraktiv auf kortikal migrierende Interneurone wirken dagegen diffusible Formen von TypI und TypII NRG1 aus den medialen ganglionischen Eminenzen (Flames et al. 2004). Im adulten Gehirn migrieren Interneuronenvorläufer auf dem rostralen migratorischen Strom (RMS) von der Subventrikulärzone bis in den olfaktorischen Bulbus. Für diesen Vorgang nutzen *ErbB4* exprimierende Neuroblasten diffusible und membranständige Formen von NRG1 als Signal (Anton et al. 2004, Ghashghaei et al. 2007).

Bedeutende Funktion besitzt NRG1 auch bei der Wegfindung thalamokortikaler Axone (TCA), die ausgehend von Neuronen des dorsalen Thalamus rostral in Richtung Telencephalon über die Basalganglien bis in den Cortex gelenkt werden. Dabei spielen wiederum verschiedene NRG1 Isoformen eine Rolle. Einerseits wirken, von Zellen des ventralen und lateralen Pallidums sekretierte diffusible Formen long-range. Andererseits formen aus der lateralen ganglionischen Eminenz in

Richtung Diencephalon migrierende Zellen, zwischen der medialen ganglionischen Eminenz und der Striatumanlage, durch die Expression von membranständigem NRG1 für TCAs attraktive short-range Markierungen (Lopez-Bendito et al. 2006, Mei & Xiong 2008).

Membranständiges TypIII NRG1 auf Axonen des peripheren Nervensystems bestimmt konzentrationsabhängig die Stärke der Myelinisierung durch Schwann'sche Zellen (Lemke 2006, Michailov et al. 2004, Nave & Salzer 2006, Taveggia et al. 2005). Im Zentralnervensystem (ZNS) scheint der Einfluss von *Nrg1* auf die Myelinisierung durch Oligodendrozyten dagegen untergeordnet und lediglich regional begrenzt zu sein (Brinkmann et al. 2008, Taveggia et al. 2008). Nichtsdestotrotz übt NRG1 eine Wirkung auf gliale Vorläuferzellen aus und reguliert deren Proliferation und Differenzierung (Canoll et al. 1996, Vartanian et al. 1994).

Im Jahr 1993 konnte ein aus Rückenmarks- und Gehirnexttrakten extrahierter nikotinischer Acetylcholinrezeptor-induzierender Faktor (Jessell et al. 1979) als NRG1 Isoform (ARIA) identifiziert werden, der die neuromuskuläre Reizübertragung im Skelettmuskel begünstigt (Falls et al. 1993). Überdies wurden weitere spezifische Wirkungen von NRG1-Isoformen auf die Expressionslevel unterschiedlicher Ionenkanäle im ZNS nachgewiesen. Dort beeinflussen membranständige TypIII NRG1 Isoformen die Expression neuronaler AChRs und diffusible TypI und TypII Isoformen die Expression ionotroper GABA_A Rezeptoren. Sowohl diffusible, als auch membranständige NRG1-Isoformen wirken im Gehirn auf die Expressionslevel und Zusammensetzungen von NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)- und AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)-Rezeptoren (Mei & Xiong 2008). Postsynaptische NRG1 Signalkaskaden führen zur aktivitätsabhängigen Reifung exzitatorischer Synapsen und zur Rekrutierung zusätzlicher AMPA Rezeptoren durch Interaktion mit dem Scaffoldprotein PSD95 (Barros et al. 2009). Dass NRG1 eine Rolle bei der Plastizität glutamaterger Synapsen spielt, konnte auch anhand der durch appliziertes NRG1 blockierten Langzeit-Potenzierung (LTP) an Synapsen der Schaffer-kollateralen in der hippocampalen CA1 Region gezeigt werden (Huang et al. 2000, Kwon et al. 2005). Neben den Effekten auf exzitatorische Synapsen, spielt NRG1 auch bei der Reizübertragung inhibitorischer GABAerger Synapsen des PFC eine Rolle (Woo et al. 2007) und ist somit an unterschiedlicher Stelle für synaptische Plastizität wichtig.

Eine essentielle Rolle außerhalb des Nervensystems kommt NRG1 auch in der embryonalen Herzentwicklung zu. So sind homozygot negative Mutationen von *Nrg1* und der Rezeptorgene *ErbB2*, *ErbB3* und *ErbB4* für Mausembryonen zwischen E10,5 und E13,5 lethal (Erickson et al. 1997, Gassmann et al. 1995, Lee et al. 1995, Meyer & Birchmeier 1995).

Auch wenn viele Funktionen von NRG1 im zentralen Nervensystem bekannt sind und für dieses Gen eine hohe mechanistische Plausibilität besteht, bleibt die genaue von diesem Gen vermittelte Merkmalsausprägung, die letztlich zu Schizophrenie beiträgt, bislang unbekannt.

2.3 NRG1 KNOCKOUT MAUS

Um der Frage nachzugehen, welche Auswirkungen eine Deregulation des Gens *Nrg1* auf transkriptioneller Ebene in schizophrenierelevanten Regionen des Gehirns hat, wurde als Untersuchungsobjekt eine pan-*Nrg1* knockout Maus gewählt und in, für die Entstehung der Krankheit wesentlichen Entwicklungsstadien untersucht. Die in dieser Arbeit untersuchten Tiere sind aufgrund der im vorherigen Absatz (vgl auch Absatz 3.5.2) beschriebenen Lethalität des homozygoten Knockouts, heterozygote Erbräger einer künstlich erzeugten Mutation im Gen *Nrg1*. Dabei wurde der für die EGF-ähnliche Domäne kodierende Bereich u.a. durch das Gen *LacZ* von *E.coli* substituiert. Funktionell betrifft die Mutation somit alle möglichen NRG1 Isoformen. Diese Genmanipulation wurde im Labor von C. Birchmeier entwickelt (Meyer & Birchmeier 1995) und Tiere dieses Mausstammes für experimentelle Zwecke dieser Arbeit freundlicherweise von dort zur Verfügung gestellt. In Mäusen haben Mutationen von *Nrg1* phänotypische Konsequenzen, deren hauptsächliche Merkmale in Tabelle 1 aufgelistet sind. Die Phänotypen von Mäusen mit Defekten im Gen *Nrg1* unterstützen die Hinweise, dass *Nrg1* ein genetischer Risikofaktor für die Ausprägung von Schizophrenie ist.

Tabelle 1: Verhaltensmerkmale *Nrg1* defizienter Mäuse

Genetisches Mausmodell	Verhaltensphänotyp der heterozygoten Mutante
<i>Nrg1</i> -knockout der EGF-ähnlichen Domäne C57BL/6 Hintergrund (Meyer & Birchmeier 1995)	Lokomotorische Hyperaktivität; Auffälligkeiten bei der Gewöhnung an eine neue Umgebung. (Duffy et al. 2008)
<i>Nrg1</i> -knockout der EGF-ähnlichen Domäne C57BL/6 x 129/SvEv Hintergrund (Erickson et al. 1997)	Hyperaktivität im OF (Open-Field Test); Reduktion funktioneller NMDA Rezeptoren. (Gerlai et al. 2000)
<i>Nrg1</i> -knockout der Transmembrandomäne C57BL/6 Hintergrund (Stefansson et al. 2002)	Hyperaktivität im OF, reversibel durch Clozapin; beeinträchtigte Gewöhnung an neue Umgebungs- und soziale Reize; verminderte Ängstlichkeit; Defizite der PPI. (Karl et al. 2007, O'Tuathaigh et al. 2007)
<i>Nrg1</i> -knockout der Immunglobulin-ähnlichen Domäne C57BL/6 Hintergrund (Kramer et al. 1996)	Erhöhte Clozapin Suppression der Hyperaktivität im OF; defizitäre Latent Inhibition. (Rimer et al. 2005)

2.4 STRATEGIE

Untersuchungsobjekt der vorliegenden Arbeit ist ein pan-*Nrg1* knockout Mausstamm (Meyer & Birchmeier 1995). Zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien wurden vergleichende transkriptomische Analysen von Nachkommen des heterozygoten *Nrg1*^{+/-} und wildtypischen *Nrg1*^{+/+} Genotyps durchgeführt und der Einfluss der genetischen Manipulation von *Nrg1* als Suszeptibilitäts-gen für Schizophrenie auf das gesamte Transkriptom näher beleuchtet. Die Befunde schizophreniekranker

EINLEITUNG

Patienten deuten darauf hin, dass die auftretenden pathologischen Veränderungen und physiologischen wie neuronalen Defizite nicht das gesamte Gehirn gleichartig betreffen. Relevante Regionen des Gehirns, in der Befunde zuverlässig und mit hoher Plausibilität zum Phänotyp der Erkrankung passend beobachtet werden, sind zum einen der dlPFC und die mit diesem in direkter Verbindung stehenden anteromedialen Kerne des Thalamus. Innerhalb der Arbeit wurde die Gesamtstrategie verfolgt, die zu den betroffenen Regionen homologen Hirnareale der Maus als krankheitsrelevantes frontales System genauer zu studieren. Der somatosensorische Bereich des Cortex und der mit diesem verbundene Ventrobasalkomplex des Thalamus sind von der Krankheit nicht betroffene Hirnareale und können als Kontrollregionen genutzt werden. Die 4 Hirnregionen wurden einzeln in zwei Altersstadien präpariert, in denen Prozesse von neuroentwicklungsbiologisch großer Bedeutung stattfinden und die, wenn sie beeinträchtigt sind und fehlerhaft stattfinden, ursächlich für eine spätere Erkrankung an Schizophrenie sein können. Entsprechend der Anfälligkeit gegenüber embryonal einwirkenden Risikofaktoren wurde ein frühes Entwicklungsstadium untersucht, ebenso wie ein relevantes postnatales Stadium, das in Zusammenhang mit der Manifestation der Krankheit steht. Zu essentiellen embryonalen Entwicklungsprozessen zählen die zeitlich determinierte Genese und Migration von Vorläuferzellen höherer kortikaler Schichten. Während der voranschreitenden Kortikogenese findet im Bereich des IL/PrL des untersuchten Mausstammes am Embryonaltag E15,5 die Bildung supragranulärer Schichten statt (Absatz 5.1.2). Eine Störung dieses Vorgangs kann sich in dyslokalisierten und fehlerhaft miteinander verbundenen Neuronen äußern und die normale Konnektivität, sowie die Funktionalität von Zellen des Cortex beeinträchtigen. Fehlentwicklungen dieser Art offenbaren sich unter Umständen erst zu späteren Entwicklungszeiten. Die postnatale Reifung dieses Hirnareals durch das als Pruning bezeichnete auflösen überschüssiger, neuronaler Verbindungen kann um den 28. Lebenstag der Tiere beobachtet werden (Van Eden & Uylings 1985). Im Menschen steht dieser Vorgang im Zusammenhang mit der Manifestation von Schizophrenie während der Pubertät und frühen Erwachsenenalters (Paus et al. 2008).

Zur Erforschung des krankheitsbedeutsamen Beitrags von *Nrg1* wurden Transkriptome der ausgewählten Regionen und Altersstadien separat erfasst und anschließend analysiert. Die gesamte Studie umfasst 48 Affymetrix Mouse Genome 430.2 GeneChips® (Affymetrix, Santa Clara, CA USA) für drei Replikate von je 4 Regionen und 2 Altersstadien der beiden Genotypen *Nrg1*^{+/-} und *Nrg1*^{+/+}. Für die Analyse globaler Veränderungen in der Gesamtpopulation wurde pro GeneChip® RNA von 12 Individuen untersucht.

3 MATERIAL

3.1 CHEMIKALIEN

Für diese Arbeit wurden nach Möglichkeit analytisch reine Grob- und Feinchemikalien verwendet. Sofern nicht anders deklariert, wurden folgende Bezugsquellen genutzt: (Merck, Darmstadt, Deutschland), (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA).

3.2 LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN

Als Lösungsmittel wurde in allen Fällen deionisiertes H₂O verwendet. Die angegebenen pH-Werte beziehen sich auf Raumtemperatur. Prozentangaben sind, sofern nicht anders angegeben, als Masse/Volumen zu verstehen.

PBS	NaCl	137 mM			
	KCl	2,7 mM	50 x Denhardts	BSA	10 mg/ml
	Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	8,1 mM	Reagens	Ficoll® 400	10 mg/ml
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM		Polyvinylpyrrolidon	10 mg/ml
	pH 7,4			(MW=10 kDA)	
TE-Puffer	Tris/HCl	10 mM	Reaktionspuffer	Tris	0,1 M
	EDTA	1 mM		NaCl	0,1 M
	pH 8			MgCl ₂	5 mM
				pH 9,5	
MaBS	Maleinsäure	0,1 M	ISH-Puffer	Formamid	50 % v/v
	NaCl	0,15 M		SSC	5 x
	pH 7,5			Denhardt's Reagens	5 x
		<i>Torula</i> -Hefe RNA		0,4 mg/ml	
20 x SSC	NaCl	3 M		tRNA aus <i>S.cerevisiae</i>	0,1 mg/ml
	Trinatriumcitrat	0,3 M			
	pH 7				

3.3 NUKLEINSÄUREN

3.3.1 NUKLEOTIDE

Für die Synthese von DNA wurde aus 100 mM Stammlösungen (Roth, Karlsruhe, Deutschland) der vier Desoxynukleotid-Natriumsalze eine Mischung zusammengestellt. Diese enthält die Nukleotide dATP, dGTP, dCTP und dTTP in einer Konzentration von je 25 mM.

Für die Synthese der RNA-Sonden wurde DIG RNA Labeling Mix (Roche, Basel, Schweiz) verwendet. Diese 10 x Stammlösung enthält die Ribonukleotide ATP, GTP und CTP in einer Konzentration von je 10 mM, sowie 6,5 mM unmarkiertes UTP. Zusätzlich sind darin 3,5 mM mit Digoxigenin markiertes

DIG-11-UTP enthalten. Das Pflanzensteroid aus *Digitalis lanata* ist über einen Spacer von elf Kohlenstoffatomen an die 5'-Position des Pyrimidinringes gebunden. Laut Herstellerangaben wird durch T3- und T7-RNA Polymerasen durchschnittlich alle 20 bis 25 Nukleotide ein DIG-11-UTP in das Transkript eingebaut.

3.3.2 OLIGONUKLEOTIDE

Tabelle 2: Liste verwendeter Oligonukleotide

Plasmide mit klonierten cDNA-Fragmenten der Gene *Gbx2*, *Lhx2*, *Ngn2* und *Cux2* standen für diese Arbeit bereits zur Verfügung und konnten übernommen werden. Zur verbesserten Klonierungseffizienz amplifizierter cDNA-Fragmente besitzen Klonierungsprimer im 3'-Bereich einige zur Targetsequenz nichtkomplementäre Nukleotide. Die angegebenen Ziffern innerhalb der Namen geben die Position ab dem Startcodon der mRNA an.

¹Für *Gria1* wurde u.a. der Real-Time Assay QT01062544 von Qiagen bezogen (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Bindungsstellen der enthaltenen Oligonukleotide liegen ungefähr bei 1000-1200 nt der CDS der mRNA.

²r2344mtmr7 besitzt eine vom Standard abweichende Bezeichnung. Zusammen mit f2289mtmr7 werden 104bp amplifiziert.

Gen	Name	Verwendung	Sequenz
	random hexanukleotide	Reverse Transkription	NNNNNN
<i>Arhgap18</i>	si1169arhgap18	Klonierung	GTCGAGCTCATTGGGAAAGTGTCAAACAGCA
	ki1572arhgap18		CCTGTGCGTGTCCATAGAATTTCTGGTACCTA AT
<i>Cux2</i>	si74Cux2	Klonierung	GCAGAGCTCCGGCTTCTGAGTGTTTAT
	Ki865Cux2		TCAGGTACCGTTTCTCTATGGCCTCGGACT
<i>Fezf2</i>	f853Fezf2	qPCR	TATAACCTCACCCGCCACATGC
	r918Fezf2		GCCACAGACTTTGCACACAAACG
<i>Fzd3</i>	Ki1715fzd3	Klonierung	TAAGGTACCGAAGCAAAGCAGGGAGTGTC
	Si2596fzd3		GATGAGCTCTGCATATCTGGGGGA
<i>Fgf8</i>	Bi310Fgf8	Klonierung	GGGGATCCGGACCTACCAGCTCTAC
	Ki927Fgf8		GGGGTACCACCCAACAGCAAACAATATGC
<i>Gbx2</i>	Si231Gbx2	Klonierung	AAGAGCTCGACCCTCACCACCAGATCCC
	Ki744Gbx2		TAGGTACCCCGTTCTTGCCTGTGGACGTG
<i>Gria1</i>	f2438gria1	qPCR	TGATTGGAGGGCTGGGATT
	r2572gria1		TCGATGTCCGTATGGCTTCA
	Mm_Gria1_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)1	1	qPCR
<i>Mtmr7</i>	Si1842Mtmr7	Klonierung	AGTGAGTCCCCCGACCTCTCAGTGAATA
	Ki2722Mtmr7		AGTGGTACCGCAAATCCCTGTCTTCTGA
	f2289mtmr7	qPCR	AAAGCCCTCTGGTTTCTCCC
	r2344mtmr7		GGTAAAGGCAGAAGGAAATGTCA
<i>Neo1</i>	si(>2810)13neo1	Klonierung	CCCGAGCTCTGTCTTGGTCACTGCAC
	ki(>2810)875neo		CTGGGTACCGCTGGATTTGGGACATGAG
<i>Ngn2</i>	Si661Ngn2	Klonierung	GCCGAGCTCAACTCCAGTCCCCATACAG
	Ki1339Ngn2		GCCGGTACCTACAGGTGAAATCCCACAGC
<i>Nptx2</i>	f1958nptx2	qPCR	GCTTCTACAACAATCCCCACAA
	r2062nptx2		GGTCAGATGCTCACAGGAACC
<i>Nrg1</i>	F_Exon7_Nrg1	Genotypisierung	GGGACCAGCCATCTCATAAA
	R_Intron7-8_Nrg1		AGGAACACCAGGAGGAAAGC
	R_LacZ_Nrg1		GAGGGGACGACGACAGTATC
	fwd668nrg1	qPCR	CCACATCTACATCCACGACTGG
	rev776nrg1		TTTGACAGTCTTCCACCATGA
	affy351fwdNRG1	qPCR	TCCTTTTGTCTGCATTTCTTCAT
	affy538revNRG1		GCGTCTATCCAGGGTAACTTTCT
	fwdKi606nrg1	Klonierung*	CTAGGTACCCAAGTCAGGAACTCAGC
	rev944nrg1		ACCAACAGGGCGATACAGAT
	affy538revNRG1	Klonierung	TCCTTTTGTCTGCATTTCTTCAT

Gen	name	Verwendung	Sequenz
	affy351fwdNRG1		TCCTTTTGTCTGCATTCTTCAT
<i>Pcm1</i>	si.28_at-110pcm1	Klonierung	TTGGAGCTCTGGCTTTCTCAAATTGCTAGG
	ki.28_at793pcm1		GAAGGTACCGAGGAGCTTAGCCTGATTCTCA
	pcm1_qF2	qPCR	GTCGGGTAAGAGTTGAGAAAAGGT
	pcm1_qR2		AATGAAAAACACGCCCTTAGAA
<i>Sema5a</i>	Sii903Sema5a	Klonierung	GGACCGCGGTACTTTCTTCTGCGG
	Ki1506Sema5a		CGTGGTACCGCGTGTGGATGGAAGTGG
<i>Ttr</i>	SiTtr82	Klonierung	CCGAGCTCAAATGTCCTCTGATGGTC
	KiTtr771		GGAGGTACCATCAAGCAAGTTGCCAGGAG
<i>Wnt5a</i>	f1493wnt5a	qPCR	AGGAGCCATTTTCTTCTCAAACA
	r1613wnt5a		TACCAGAGCACCTGCAATTCAT
	Si1530wnt5a	Klonierung	AGCGAGCTCATGGGTGGTATCCAGGTGAA
	Ki2452wnt5a		AGCGGTACCTGCACACCTCTGTGGACTC

3.3.3 VEKTOR

Alle als Matrize für RNA-Sonden dienende DNA-Fragmente wurden in den vom Plasmid pUC19 abgeleiteten Vektor pBluescript I KS (Agilent, Santa Clara, CA USA) kloniert. Neben einem ColE1 Replikationsursprung für die unabhängige Replikation mit hoher Kopienzahl in E.coli ist in der 2961 Basenpaare umfassenden Sequenz ein für die Selektion transformierter Bakterien wichtiges Ampicillin-Resistenzgen kodiert. Zwischen den beiden für eine *in vitro*-Transkription wichtigen Promotoren für die T3- und T7-RNA-Polymerase, befindet sich eine 126 Nukleotide lange Multiple Cloning Site (MCS) mit 21 einmal vorkommenden Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.

3.3.4 SONDEN

Tabelle 3: Eigenschaften verwendeter ISH-Sonden

Positionsangaben beziehen sich auf den Start der proteincodierenden Sequenz (CDS) der mRNA, oder auf die angegebenen Referenzsequenzen. Plasmide mit klonierten cDNA Fragmenten der Gene *Cad6* und *Cad8* wurden zur Herstellung der Sonden freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. C. Redies zur Verfügung gestellt.

Gen	Position	Länge in nt	GC-Gehalt in %
<i>Arhgap18</i>	1169-1555	387	48
<i>Cad6</i>	200-1229	1030	51
<i>Cad8</i>	-229-1347	1576	45
<i>Cux2</i>	74-865	792	60
<i>Fgf8</i>	310-927 (NM_010205.2)	618	62
<i>Fzd3</i>	1715-2596	882	44
<i>Gbx2</i>	231-744	514	62
<i>Lhx2</i>	997-1516	520	49
<i>Mtmr7</i>	1842-2722	881	41
<i>Neo1</i>	3826-4753 (NM_008684.2)	947	56
<i>Ngn2</i>	661-1339	679	52
<i>Nrg1</i>	608-894 (NM_178591.2)	287	47
<i>Pcm1</i>	49508-50410 (NT_039460)	903	35
<i>Sema5a</i>	876-1479	604	53
<i>Ttr</i>	82-771	700	48
<i>Wnt5a</i>	1530-2453	924	42

3.4 ENZYME, POLYPEPTIDE UND ANTIKÖRPER

Tabelle 4: Verwendete Enzyme, RNase-Inhibitoren und Antikörper

Für molekularbiologische Standardverfahren wurden folgende Enzyme und Inhibitoren verwendet. Zur Detektion von DIG wurden die aufgeführten F_{ab}-Antikörperfragmente mit daran gekoppelter Alkalischer Phosphatase verwendet.

Klassifikation	Produktname	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1)	Shrimp Alkaline Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DNA-abhängige DNA-Polymerase (EC 2.7.7.7)	HotStart Taq mit Antikörper	Genaxxon, Ulm, Deutschland
	KAPA SYBR FAST qPCR Universal	Peplab, Erlangen, Deutschland
	T4 DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon, Deutschland
DNA-abhängige RNA-Polymerase (EC 2.7.7.6)	T3 RNA Polymerase from <i>E. coli</i> HB101	Roche, Basel, Schweiz
	T7 RNA Polymerase from <i>E. coli</i> BL 21/pAR 1219	
DNaseI (EC 3.1.21.1)	RNase-free DNase	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ligase (EC 6.5.1.1)	T4 DNA Ligase	Invitrogen, San Diego, CA USA
RNA-abhängige DNA-Polymerase (EC 2.7.7.49)	Superscript® III Reverse Transkriptase	Invitrogen, San Diego, CA USA
Restriktionsendonuklease (EC 3.1.21.4)	Konventionelle Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Ribonukleaseinhibitor	RiboLock™	Fermentas, St. Leon, Deutschland
F _{ab} -Antikörperfragment	Anti-Digoxigenin-AP, F _{ab} fragments from sheep	Roche, Basel, Schweiz

3.5 ORGANISMEN

3.5.1 WIRTSBAKTERIEN

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen wurde der *E. coli* Stamm XL1 Blue MRF' (Agilent, Santa Clara, CA USA) mit folgendem Genotyp verwendet: Δ (mcrA)183, Δ (mcrCB hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44 thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, [F', proAB, lacIqΔM15, Tn10(Tetr)].

3.5.2 VERSUCHSTIERE

Für die Transkriptionsanalyse wurden bezüglich des Gens *Nrg1* heterozygot defiziente Mäuse und ihre wildtypischen Geschwister verwendet. Der für diese Arbeit zur Verfügung gestellte Tierstamm (Meyer & Birchmeier 1995) konnte vom Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin in Berlin-Bruch besorgt werden und wurde unter standardisierten Bedingungen (12 h-Wechsel zwischen Licht und Dunkelheit bei freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser) spezifiziert pathogenfrei (SPF) außer für *Pasteurellaceae* und *Helicobacter* im Tierstall des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena gehalten. Dieser Tierstamm wurde später am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) des KIT gehalten und gezüchtet. Für weitere Experimente dieser Arbeit wurden Tiere von dort bezogen.

In embryonalen Stammzellen des Mausstamms Sv 129 wurde durch homologe Rekombination ein Teil des N-Terminus der EGF-ähnlichen Domäne und ein Teil des darauffolgenden Introns durch eine für das *LacZ*-Gen und das Neomycinresistenz-Gen kodierende Sequenz von *E. coli* ausgetauscht.

Diese befindet sich im selben Leseraster wie *Nrg1*. Daraus hervorgehende homozygote *Nrg1*^{-/-} Tiere dieser über mehrere Generationen auf C57BL6 gekreuzten Genotyps sind aufgrund einer Entwicklungsstörung des Herzens lethal und sterben während der Embryogenese zwischen E10,5 und E11.5. Für die Züchtung von Nachkommen wurden durchweg heterozygote *Nrg1*^{+/-} mit homozygoten *Nrg1*^{+/+} Tieren verpaart.

3.6 GERÄTELISTE

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Affymetrix Station	GeneChip® Hybridization Oven 640	Affymetrix, Santa Clara, CA USA
	GeneChip® Fluidics Station 450	
	GeneChip® Scanner 3000	
CCD-Kamera	Spot 1.3.0	Visitron Systems, München, Deutschland
Hybridisierungsöfen	7601	GFL, Burgwedel, Deutschland
Kryomikrotom	CM 3050-1-1-1	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrofluidik-Plattform	Bioanalyzer 2100	Agilent, Sanat Clara, CA USA
Mikroskop	Axioplan	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mischbett-Wasservollentsalzer	Reinstwassersystem Micro 08.1005	TKA, Niederelbert, Deutschland
Realtime qPCR Cycler	Corbett-Rotorgene 6000	Qiagen, Hilden, Deutschland
Spektralphotometer	Nanodrop® ND1000	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Vibratom	Vibratome Series 1000	Technical Products international Inc., St.Louis MO USA

4 METHODEN

4.1 GENOTYPISIERUNG

Für die Spezifizierung der Versuchstiere bezüglich ihrer Allele von *Nrg1* erfolgte für jedes Tier eine Genotypisierung. Dazu wurde genomische DNA aus Biopaten der Embryonen, bzw. vom Schwanzende neugeborener Tiere isoliert. Entsprechend des beiliegenden Protokolls wurde dazu das DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) verwendet. Falls vorhanden wurden 200 ng genomische DNA als Template für 32 Zyklen PCR mit folgender Zusammensetzung eingesetzt: 20 pmol der Oligonukleotide F_Exon7_Nrg1, R_Intron7-8_Nrg1 und R_LacZ_Nrg1 (verwendete Annealingtemperatur 56 °C), 1x PCR-Puffer M3455, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs und 2,5 u Hotstart Taq Polymerase (Genaxxon, Ulm, Deutschland) bei einem Gesamtvolumen von 25 µl. Durch die Oligonukleotide F_Exon7_Nrg1 und R_Intron7-8_Nrg1 wurde dabei ein Genfragment von *Nrg1* von 459 bp amplifiziert. Durch den zusätzlichen Oligonukleotidprimer R_LacZ_Nrg1 mit Komplementarität zu dem in das Genom inserierten *LacZ*-Gen entstand im Falle von DNA aus heterozygoten *Nrg1*^{+/-} Tieren zusammen mit dem Oligonukleotidprimer F_Exon7_Nrg1 ein weiteres Amplifikat von 314 bp (siehe Anhang 8.5). Die synthetisierten DNA-Fragmente konnten elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und nachgewiesen werden.

4.2 GEWEBEPRÄPARATION

Zur Entnahme von Gewebe, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Tiere durchweg mit CO₂ narkotisiert und anschließend dekapitiert. Mit den verwendeten Altersstadien P28 und trächtigen Muttertieren zur Entnahme von Embryonen zum Zeitpunkt E15,5 wurde gleich verfahren. Trächtigen Muttertieren wurde während der Narkose der Uterus aus dem geöffneten Bauchraum entfernt, die sich darin befindenden Embryonen einzeln entnommen und in eiskaltem PBS gelagert. Das Muttertier wurde danach dekapitiert. Anschließend erfolgte für die Embryonen eine genaue Alterbestimmung nach den Kriterien von Theiler (Theiler 1989). Um aus Gewebeteilen RNA hoher Qualität zu isolieren, wurden die Präparate wie für E15,5 in Absatz 4.2.1 und für P28 in Absatz 4.2.2 beschrieben, schnellstmöglich weiterverwendet. Für die Anfertigung von Kryomikrotomschnitten wurde die abgetrennten Köpfe von Embryonen in flüssigem N₂ tiefgefroren und bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert. Zum Einfrieren von Mäusegehirnen P28 wurde Isopentan mit Trockeneis auf -45 °C gekühlt und die Präparate darin bis zur vollständigen Abkühlung in kurzen Intervallabständen eingetaucht. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

Zur Vereinfachung der Nomenklatur der präparierten Hirnteile wurden in dieser Arbeit der Tabelle 6 zu entnehmende Abkürzungen eingeführt.

Tabelle 6 Abkürzungsnomenklatur präparierter Gewebeteile

Abkürzung	Gehirnbereiche
AT	Anteromediale Thalamuskern
FC	Infralimbischer (IL) und prälimbischer (PrL) Cortex
PT	Ventrobasalkomplex aus VBL und VPM
SC	Somatosensorischer Cortex

4.2.1 PRÄPARATION VON HIRNREGIONEN EMBRYONALER MÄUSE

Aus dem vom embryonalen Körper abgetrennten Kopf wurde vollständig das sich entwickelnde Gehirn präpariert, midsagittal durchteilt, die Hirnhaut entfernt und die Cortexhälften der linken und rechten Hemisphäre vom übrigen Hirn getrennt. Die Bereiche FC und SC wurden aus dem Cortex isoliert, die Bereiche AT und PT aus dem Diencephalon. Die durchgeführten Präparationen sind in den folgenden Absätzen 4.2.1.1, 4.2.1.2, 4.2.1.3 und 4.2.1.4 beschrieben. Die in eiskaltem PBS präparierten Gewebestücke von Mäusegehirnen E15,5 wurden sofort mit Hilfe eines 2 ml Gewebe-Homogenisators in 0,8 ml TRIzol® (Invitrogen, San Diego, CA USA) homogenisiert.

4.2.1.1 PRÄPARATION ANTEROMEDIALER THALAMUSKERNE E15,5

Die Präparation der anteromedialen Thalamuskern basiert auf den in Absatz 5.1.2 gewonnenen Erkenntnissen. Die Morphologie des embryonalen thalamischen Gewebes bietet in ungefärbtem Zustand Orientierungspunkte, die der Separierung von AT und PT (Absatz 4.2.1.3) dienen. Die in Abbildung 2 B exemplarisch an einem gefärbten *whole mount* Präparat eingezeichneten Punkte 1-4 begrenzen den dorsalen Thalamus. Parallel zur posterioren Abgrenzungslinie zwischen den Punkten 3 und 4 wird vom Orientierungspunkt 2 zu Punkt 5 mit einem Skalpell geschnitten, um in einer zweiten Schnitfführung zu Punkt 1 die anteromedialen Kerne zwischen Punkt 1, 2 und 5 zu isolieren.

4.2.1.2 PRÄPARATION VON IL/PRL E15,5

Die abgetrennten Cortexhälften wurden vor der medialen ganglionischen Eminenz entlang der sichtbaren Einkerbung transversal geschnitten. Der rostrale Part wurde in eine laterale und eine mediale Hälfte geteilt. Von letzterer wurde das Septum, sowie caudal ein Streifen parallel zum ersten Schnitt entfernt. Die Breite dieses Streifens beträgt circa 1/4 der rostro-caudalen Ausdehnung dieses Präparates bis zum Bulbus olfactorius. Das verbleibende Gewebestück entspricht FC.

4.2.1.3 PRÄPARATION DES VENTROBASALKOMPLEXES E15,5

Die Isolierung von PT erfolgte in gemeinsam durchgeführten Schritten bei der Präparation von AT (siehe Absatz 4.2.1.1.). Um VB zu isolieren, wurde nach der Abtrennung von AT parallel zu den in Abbildung 2 B eingezeichneten Orientierungspunkten 3 und 5 geschnitten, sodass das Präparat

zwischen den Punkten 2 und 5 halbiert wurde. Parallel zur letztgenannten Strecke wurde das Präparat ein zweites Mal in antero-posteriorer Richtung halbiert, um mit dem ventralen Gewebestück VB zu separieren.

4.2.1.4 PRÄPARATION DES SOMATOSENSORISCHEN CORTEX E15,5

SC wurde aus dem mittleren Teil des transversal gedrittelten Kortex isoliert. Der mediale Anteil dieses Präparats wurde aufgeklappt und das Pallium horizontal in drei gleiche Teile geschnitten. Das mittlere Gewebestück entspricht SC.

4.2.2 PRÄPARATION VON HIRNREGIONEN POSTNATALER MÄUSE

Für die Präparation der vier Hirnteile AT, FC, PT und SC aus einer 28 Tage alten Maus wurde das Gehirn vollständig und unversehrt aus dem Schädel entfernt (siehe 4.2). Das präparierte Gehirn wurde an einer durchs Kleinhirn gestochenen Kanüle aufgehängt und in einem abgeschnittenen 50 ml PE-Zentrifugenröhrchen mit 38 °C warmer *low melting* Agarose (Roth, Karlsruhe, Deutschland) überschichtet. Das so eingebettete Präparat wurde bis zum Erstarren der Agarose auf Eis lagern. Anschließend wurde das eingebettete Gewebe en bloc mit einem Skalpell ausgeschnitten und der caudale Teil ab dem Kleinhirn mit einem transversalen Schnitt entfernt. Das zur erhöhten Festigkeit mit Agarose umgebene Präparat wurde mit Sekundenkleber auf die Objekthalterung eines Vibratoms aufgeklebt. Dabei wurde genauestens auf eine senkrechte Ausrichtung der anterior-posterioren Achse des eingebetteten Gehirns geachtet. Das Reservoir der vorgekühlten Schneidewanne wurde mit eiskaltem PBS befüllt. Mit einer eingespannten Vibratomklinge wurden 350 µm dicke Schnitte angefertigt und daran wie in den folgenden Absätzen 4.2.2.1, 4.2.2.2, 4.2.2.3 und 4.2.2.4 beschrieben, die oben genannten Hirnteile isoliert. Als grundlegende Informationsquelle zur Lokalisierung der gewünschten Hirnregionen innerhalb der Vibratomschnitte diente ein Gehirnatlas der Maus (Paxinos & Franklin 2001). Fertig präparierte und in TRIzol® homogenisierte Gewebeteile wurden nach einer halbstündigen Inkubation bei RT in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C zwischengelagert.

4.2.2.1 PRÄPARATION ANTEROMEDIALER THALAMUSKERNE P28

Die zur Präparation von AT gewünschten Kerne des Thalamus befinden sich im anterioren Bereich entlang der Mittellinie. Zur Isolierung wurden 350 µm dicke Mikrotomschnitte verwendet. Diese Region befindet sich im Stadium P28 i.d.R. auf zwei separaten Schnitten. AT liegt in Vibratomschnitten posterior vom Septum, auf denen die Lateralventrikel der rechten und linken Hemisphäre voneinander getrennt sind [Figure 33]. In Richtung posterior reichen die ausgesuchten

Schnitte bis zum Beginn der deutlich spitz nach dorsal stehenden Habenulae [Figure 40]. Die ausgewählten Schnitte werden mit einem Skalpell lateral an der Grenze zur Stria medullaris, ventral am Foramen of Monro und ventral auf Höhe des als Bogen sichtbaren centromedialen thalamischen Kerns geschnitten. Das zentral ausgeschnittene Gewebestück enthält die für AT spezifischen thalamischen Kerne. Die in eckigen Klammern angegebenen Verweise beziehen sich auf (Paxinos & Franklin 2001).

4.2.2.2 PRÄPARATION VON IL/PRL P28

Diese Regionen befinden sich auf den angefertigten coronalen Vibratomschnitten rostral ab der Position, an der olfaktorischer Ventrikel [OV] und der posteriore Ast der anterioren Kommissur [ac] erstmalig getrennt verlaufen [Figure 13] und caudal bis zum Beginn des Corpus callosum [genu of the corpus callosum]. Die weiße Substanz [forceps minor of the corpus callosum] beschränkt FC jeweils nach ventral. Vom so vorliegenden medialen Teil des Vibratomschnittes wurde orthogonal zur Mittellinie dorsal knapp ein Viertel, ventral knapp die Hälfte entfernt. In einem in 350 µm dünne koronale Schnitte zerteilten Gehirn einer vierwöchigen Maus befindet sich AT im Normalfall auf einem Schnitt.

4.2.2.3 PRÄPARATION DES VENTROBASALKOMPLEXES P28

Der Ventrobasalkomplex VB (VPM/VPL) zieht sich von rostral nach caudal in unterschiedlichem Ausmaße durch mehrere 350 µm dicke Vibratomschnitte. Ein Großteil davon wurde von zwei rostral der externen Markstränge des Thalamus (external medullary lamina) gelegenen Schnitten präpariert. Mit einem Sample Corer von 0,8 mm Durchmesser (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) wurde von zwei Vibratomschnitten aus dem an interne Kapsel und Retikularkern angrenzenden thalamischen Bereich der linken und der rechten Hemisphäre je ein Zylinder ausgestochen.

4.2.2.4 PRÄPARATION DES SOMATOSENSORISCHEN CORTEX P28

Zur Präparation von SC im postnatalen Stadium P28, wurde Gewebe isoliert, welches das Barrel field (S1BF) einschließt. Dieses durchzieht in rostro-caudaler Ausdehnung mehrere der angefertigten Vibratomschnitte. Als erkennbare rostral Abgrenzung durchzieht die anteriore Kommissur beide Hemisphären eines Schnittes. Sind die Lateralventrikel ventrolateral auf Höhe der internen Kapsel dient dies als deutliche, posteriore Präparationsgrenze. Jede Hemisphäre wird ausgehend von ihren ventromedialsten Stellen im basalen Telencephalon radial zur

Cortexoberfläche in zwei gleich große Teile geteilt. Entlang der Winkelhalbierenden der medialen Hälfte wird nochmals geschnitten und der S1BF enthaltende Cortex liegt frei.

4.3 AUFREINIGUNG VON RNA

Embryonale Präparate wurden, nach der Genotypisierung anhand eines separat entnommenen Bioptates jedes einzelnen Embryos, mit bis zu 3 weiteren Proben von Tieren des gleichen *Nrg1*-Genotyps innerhalb der folgenden RNA Aufreinigungsprozedur vereinigt. Von postnatalen Proben wurden 4 vereinigt.

Zur Aufreinigung von RNA aus TRIzol® wird den Proben pro ml TRIzol® 0,2 ml Chloroform zugegeben und ausgeschüttelt. Unter Zuhilfenahme von MaXtract high density Gel (Qiagen, Hilden, Deutschland) zur optimalen Phasentrennung wurde 15 min bei 12000 g und 12 °C zentrifugiert. Die RNA-Aufreinigung erfolgte aus der wässrigen Phase. Dieser wurde Ethanol (30 % des Volumens an TRIzol®) zugegeben und die RNA mit Hilfe von Bestandteilen aus RNeasy Micro (AT,FC,PT und SC E15,5, PT P28) und RNeasy Mini Kit (AT,FC,SC P28) (Qiagen, Hilden, Deutschland) in hoher Reinheit isoliert. Das Isolierungsprotokoll vom Hersteller wurde wie folgt optimiert: Die wässrige Ribonukleinsäurelösung wurde in einem ersten Zentrifugationsschritt an eine RNeasy MinElute, bzw. RNeasy Mini Spin Column gebunden. Alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte erfolgten, falls nicht anders aufgeführt, bei 8000 g, 15 s und 4 °C. Die RNA wurde auf der Säule mit 500 µl des mitgelieferten Puffers RW1 gewaschen. Anschließend schloss sich eine 15-minütige Inkubation mit DNase I im Puffer RDD, gefolgt von Waschschritten mit 350 µl RW1, 500 µl RPE und 500 µl Ethanol an. Vor der abschließenden Elution mit RNase-freiem Wasser (15000 g, 1 min bei RT) wurde die verwendete Säule 5 min bei 15000 g und 4 °C trocken zentrifugiert. Die Konzentration der RNA im Eluat wurde spektralphotometrisch bestimmt. Mit allen embryonalen, sowie den postnatalen Präparaten von PT wurden RNeasy MinElute Spin Columns aus dem RNeasy Micro Kit (Qiagen) verwendet und abschließend 12 µl H₂O zur Elution genutzt. Aufgrund ihrer höheren Ladekapazität fanden für postnatale Präparate von AT, FC und SC RNeasy Mini Columns aus dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) Verwendung und abschließend 30µl Elutionsvolumen H₂O.

4.4 QUALITÄTSBESTIMMUNG VON RIBONUKLEINSÄUREN

Das angewandte Verfahren beruht auf einer automatisierten elektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren durch einen Mikrofluidik-Chip. Verwendet wurde das Bioanalyser RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent, Santa Clara, CA USA). Von jeder zu untersuchenden totalen RNA wurde eine Probe von 2,5 ng gepuffert und denaturiert in einem gelbefüllten Kapillarsystem eines PicoChips nach den enthaltenen Molekülgrößen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte am Ende der Laufstrecke mittels laserinduzierter Fluoreszenz eines ribonukleinsäuresensiblen

Farbstoffs. Als Grundlage für eine qualitative Beurteilung der RNA dient das erhaltene Elektropherogramm. Als augenscheinliche Indikatoren für die Qualität der gesamten RNA dienen deutlich abgegrenzte Peaks der unterschiedlichen ribosomalen RNAs (rRNAs) und derer eventuell auftretenden Abbaufragmente. Zur Klassifizierung kann durch einen Auswertungsalgorithmus für jedes Elektropherogramm eine sogenannte RNA integrity number (RIN) (Schroeder et al. 2006) von 1-10 errechnet werden. Eine hohe RIN ist hierbei gleichbedeutend mit intakt isolierter RNA.

4.5 MICROARRAY

In dieser Arbeit wurden die als GeneChip® Mouse Genome 430.2 Array bezeichneten Oligonukleotid-Arrays (Affymetrix Santa Clara, CA USA) verwendet. Kernstück dieser biotechnischen Sensoren zur Genexpressionsanalyse ist ein von einer Plastikkapsel geschützter circa 12,8 mm x 12,8 mm großer Silizium-Wafer auf den durch den Einsatz photolithographischer Masken und kombinatorischer Chemie (Fodor et al. 1991) lokal definiert knapp eine Million verschiedene Oligonukleotide (*probes*) an die Festphase synthetisiert sind (Pease et al. 1994). Die Größe jedes einzelnen quadratischen *features* dieser high density oligonucleotid microarrays beträgt dabei nur 11 µm. Auf dem Array befindet sich immer ein *probe*-Paar in direkter Nachbarschaft. Jedes Paar besteht aus einem als Perfekt Match (PM) bezeichneten 25-mer, welches absolut komplementär zu einer bestimmten RNA des untersuchten Organismus ist und einem zweiten Oligonukleotid, welches dem PM mit Ausnahme einer Transition an der zentralen 13. Position in der Mitte der Oligonukleotidsequenz identisch ist. Dieses als Mismatch (MM) bezeichnete Oligonukleotid mit einem Basenaustausch kann als interne Kontrolle dienen. Es ermöglicht Kreuzhybridisierungen und lokalen Hintergrund abzuschätzen und durch Subtraktion vom PM zu eliminieren. GeneChips® von Affymetrix zeichnet insbesondere ihre Sondenredundanz aus. Eine RNA wird dabei durch mehrere an unterschiedliche Sequenzabschnitte der gleichen RNA hybridisierende und an verschiedenen Stellen des Arrays aufgebraute Oligonukleotide detektiert. Effekte einzelner Hybridisierungsfehler der relativ kurzen *probes* sollen dadurch vermindert und die Sensitivität für gering exprimierte Gene erhöht werden. Jeweils 11 räumlich verteilte und zu einem *Probeset* zusammengefasste *probe*-Paare dienen der Expressionsanalyse eines einzigen Transkripts. *Probesets* weisen generell Komplementarität zu Sequenzen innerhalb von 500 Basen am 3'-Ende von Transkripten auf. Der Einfluss von Ungleichgewichten zwischen 5'-und 3'-Bereichen innerhalb transkribierter cDNA wird dadurch gering gehalten. Der verwendete Mouse Genome 430.2 Array ermöglicht die genomweite Expressionsanalyse auf einem einzigen GeneChip® und ermittelt die Detektionssignale von 45101 *Probesets*. Alle *Probesets* wurden von annotierten Sequenzen der Datenbanken GeneBank®, dbEST und RefSeq ausgewählt. Die in Sequenzcluster zusammengefasste Detektionsbereiche einzelner

METHODEN

Transkripte wurden vom Hersteller, basierend auf der UniGene Datenbank (Build 107, 2002) erstellt.

Jeder GeneChip® enthält zusätzliche *features* mit Sonden zur Hybridisierungskontrolle. Biotinylierte B2-Kontrolloligonukleotide hybridisieren an *probes* entlang der Arrayränder, an einige innenliegende, sowie an mehrere Stellen in jeder der Ecken. Anhand dieser kann beim Auslesen das Koordinatennetz jedes Arrays individuell justiert werden. Desweiteren werden für die gesamte Prozedur in unterschiedlichen Konzentrationen RNAs der Gene *bioB*, *bioC*, *bioD* aus dem Biotin Syntheseweg von *E.coli* und der Rekombinase *Cre* des Bakteriophagen *P1* als Hybridisierungskontrollen entsprechende Kontrollprobesets gebunden. Klonierte und mit PolyA-sites versehene RNA-Fragmente der Gene *dab*, *lys*, *phe*, *thr* und *trp* aus *Bacillus subtilis* als Zugabe vor der reversen Transkription dienen als spike-in Kontrollen für die Synthese von cDNA und werden letztlich ebenfalls auf dem Array als polyA Kontrollen detektiert. Gegen letztere und darüber hinaus gegen *Gapdh* und *Actb* besitzt der Array neben den konventionellen zusätzliche *Probesets*, die Komplementarität zu 5'-Bereichen bzw. mittleren Abschnitten der Transkripte aufweisen. Die daraus resultierenden Hybridisierungssignale indizieren die anfängliche Intaktheit der RNA und die Effizienz der Erststrangsynthese der cDNA.

Die Hybridisierung der Microarrays wurde als Serviceleistung unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. med. A. Habenicht am Institut für vaskuläre Medizin (IVM) des interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung (IZKF) in Jena durchgeführt. 900 ng aufgereinigte und qualitätsgeprüfte totale RNA der verschiedenen Konditionen wurden zur Untersuchung an die Microarrayplattform des IVM geliefert. Ausgangssubstanz für die Hybridisierung von GeneChips® ist amplifizierte RNA (aRNA). Die notwendigen Schritte von der totalen RNA zur hybridisierungsfähigen aRNA erfolgten nach einem modifizierten Protokoll unter Verwendung des GeneChip® 3'-IVT Express Kit der Firma Affymetrix. Der wesentliche Versuchsablauf soll im Folgenden aufgelistet sein.

In einem ersten Schritt wurde der mit einer entsprechenden Menge poly-A Control Mix ergänzte Pool totaler RNA unter Einsatz synthetischer T7-oligo-d(T)₂₄ Oligonukleotide, welche 5' eines OligodT Bereichs einen T7 RNA Polymerase Promotor tragen, revers transkribiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Zweitstrangsynthese durch enzymatische Aktivität von RNaseH und DNA-Polymerase I aus *E.coli*. An diesen schließt sich eine mehrstündige *in vitro* Transkription (IVT) an, in der ausgehend von doppelsträngigen cDNA Matrizen unter Einbau biotinylierter Ribonukleotidanaloga durch T7-RNA-Polymerase, vielfache Kopienzahlen aRNA amplifiziert wurden. Die markierte aRNA wurde durch temporäre Immobilisierung an beschichtete, magnetische Beads aus der Lösung aufgereinigt. Nach einer anschließenden Konzentrationsbestimmung der aRNA

folgte in $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$ -Lösung eine für die Hybridisierung an GeneChips® notwendige kontrollierte Fragmentierung der aRNA in 25-200 nt langen Fragmente. Der Hauptanteil der Fragmente lag anschließend zwischen 100-120 nt Länge. Nach einer Vorhybridisierung der verwendeten Arrays wurden fragmentierte biotinmarkierte aRNA, B2-Kontrolloligonukleotide und Hybridisierungskontrollen bei 45 °C für die Dauer von 16 h im GeneChip® Hybridization Oven 640 mit den auf dem Array befindlichen *probes* zur Hybridisierung gebracht. Die nachfolgenden Entwicklungsschritte der Arrays erfolgten automatisiert durch die GeneChip® Fluidics Station 450. Dabei wurde ungebundener Lösungsüberschuss durch wiederholte Waschungen entfernt und die verbliebene, biotinylierte aRNA durch Zugabe von Phycoerythrin-gekoppeltem Streptavidin modifiziert. Durch ihrerseits ebenfalls biotinylierte Streptavidin-Antikörper wurde zudem eine Verstärkungskaskade ausgelöst, die zu einer sensitiven Detektion der aRNA führte.

Das Auslesen der Arrays erfolgte mit einem GeneChip® Scanner 3000. Die durch einen 532 nm Laser angeregte Fluoreszenz des Phycoerythrins wurde bei 570 nm Wellenlänge durch einen konfokalen Scanner detektiert. Mit einer Auflösung von 64 Pixeln pro *feature* und 16bit/Pixel wurden die Bildrohdaten in einem DAT-file gespeichert. Die Information über jede einzelne der *probes* wurde durch die Affymetrix image analysis software aus der Bilddatei extrahiert. Dabei wurde das vierte Quartil der inneren 36 Pixel jedes *features* als einzelner Intensitätswert der *probe* festgehalten und in einem CEL-file gespeichert.

4.6 ALGORITHMEN

Ausgehend von den in CEL-files gespeicherten Rohdaten bedarf es weiterer Verarbeitungsschritte, um an Expressionsdaten von Transkripten der Maus zu gelangen. Notwendige, sowie ergänzende Schritte betreffen probenspezifisch die Hintergrundkorrektur und Anpassung der PM-Werte, die Verrechnung von Proben zu Probesets, sowie globale Normalisierung der hybridisierten Arrays des gesamten Experiments. Grundsätzlich steht eine Auswahl verschiedener Algorithmen für die Datenanalyse von Microarrays zur Verfügung. Eine gängige Software von Affymetrix stellt MicroarraySuite 5 (MAS5) dar. Jeder einzelne Array wird dabei separat verrechnet. Auf der Grundlage von PM und MM *probes* wird von dem zugrunde liegenden Algorithmus für jedes *Probeset* ein zusätzlicher Signifikanzwert (Wilcoxon's signed-ranked-test) für die Detektionswahrscheinlichkeit kalkuliert und damit eine Abschätzung der Qualität des *Probesets* und der Expression des detektierten Transkripts ermöglicht. In dieser Arbeit wurden Signifikanzwerte kleiner 0,05 als *present*, größer oder gleich 0,05 und kleiner 0,065 als *marginal* und größer oder gleich 0,065 als *absent* bewertet. Werden in einem Experiment mehrere Microarrays hybridisiert und zusammen ausgewertet, bieten sich alternative Algorithmen zu MAS5 an, welche die Rohdaten

aller Arrays für eine gemeinsame Auswertung mit einbeziehen. Vorzüge können sich insbesondere bei der Bewertung von lokalem Hintergrund ergeben. Gebräuchliche und innerhalb der Arbeit benutzten Auswertesoftware Genespring GX 10 (Agilent) implementierte Algorithmen sind neben MAS5, „Robust Multiarray Average (RMA)“ (Irizarry et al. 2003) und GeneChip RMA (GCRMA) (Wu & Irizarry 2004), Probe Logarithmic Intensity Error Estimation (PLIER16) von Affymetrix und Model-Based Expression Indexes (Li & Wong 2001). Zwischen diesen unterscheiden sich die von einem Rohdatensatz durch unterschiedliche Realisierung der einzelnen Verarbeitungsschritte kalkulierten Genexpressions-werte signifikant. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde GCRMA als Standard *probe* Summarization Algorithmus genutzt. In Vergleichsstudien zu verschiedenen Auswerteverfahren von GeneChips® stellt sich dieser Algorithmus zur Detektion von Expressionsunterschieden von GeneChips® als verlässlich heraus (Irizarry et al. 2006, Schuster et al. 2007). Die in Genespring GX 10 durchgeführte Datenverarbeitung von GeneChip® CEL-files umfasste die Prozesse der *probe* Summarization mit Hintergrundkorrektur und Normalisierung durch GCRMA, log Transformation (Logarithmus zur Basis 2) und Baseline Transformation.

4.7 QUANTITATIVE REALTIME RT-PCR

Für eine quantitative Expressionsanalyse einzelner Transkripte durch realtime qPCR wurde RNA verschiedenen zusammengesetzter Pools (siehe Anhang 8.4) entsprechend Absatz 4.7.2, revers transkribiert und aufgereinigt. Parallel untersucht wurden je 5 RNA Pools aus Präparaten von je 4 Tieren vom heterozygoten Genotyp *Nrg1*^{+/-} und vom wildtypischen Genotyp *Nrg1*^{+/+}. Die quantitative Expressionsanalyse durch realtime qPCR erfasst demgemäß Transkripte in anders zusammengesetzten Proben, als für die Hybridisierung von Genchips® verwendet und analysiert wurden. Als Matrizen für die Vervielfältigung durch Polymerasen wurden in einzelnen Reaktionen 2,5 ng cDNA eingesetzt. Von jeder cDNA wurde ein Mastermix erstellt, der auf fünf replizierte Gesamtansätze von je 10 µl aufgeteilt wurde, die neben 2,5 ng cDNA je Reaktion genspezifische Oligonukleotidprimer (siehe Tabelle 2) in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 20 und 100 nmol, 5µl KAPA SYBR® Fast qPCR 2x Mastermix (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) und H₂O beinhalteten. Ein Gemisch aus allen in einem Experiment verwendeten Pools von cDNA wurde dazu verwendet, in verschiedenen Verdünnungen eine Standardreihe zur internen Eichung und Bestimmung der Reaktionseffizienz zu nutzen. Zur Aufnahme der Eichgeraden wurden an 5 verschiedenen Verdünnungsstufen drei Replikate durchgeführt. Die realtime Analyse zur relativen Quantifizierung der Reaktionen wurde am Gerät Corbett Rotor-Gene™ 6000 realtime cycler (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt und aufgezeichnet. Zur Detektion wurde die Fluoreszenz des im Ansatz vorhandenen und in doppelsträngige DNA interkalierenden Cyanin-

Farbstoffes SYBR-Green genutzt. Der Cycle threshold (Ct) zur Festlegung der Detektionswerte wurde vom Gerät anhand der Standardreihe automatisiert festgelegt. Die für *Nrg1* und *Mtmr7* durchgeführte absolute Quantifizierung erfolgte anhand einer im gleichen Versuch ermittelten Standardverdünnungsreihe von in einen Vektor klonierten genspezifischen cDNA-Fragmenten. Die als Matrize verwendete Vektor-DNA wurde außerhalb des inserierten cDNA-Fragments mehrfach durch Restriktionsenzyme geschnitten und dadurch linearisiert. Ein Molekül an doppelsträngigem cDNA-Fragment wurde für die sich anschließende absolute Quantifizierung doppelt gerechnet

4.7.1 REVERSE TRANSKRIPTION

Für die Synthese von cDNA wurde isolierte, totale RNA revers transkribiert. Die dafür eingesetzten Hexanukleotidprimer binden ihrer ungleichen, zufällig synthetisierten Sequenzen entsprechend an unterschiedliche Abschnitte innerhalb der vorliegenden RNA-Moleküle. Unabhängig des Hydrolysezustandes der Ribonukleinsäuren erhält man ausgehend von diesen Oligonukleotiden gleich repräsentierte cDNA-Fragmente der 5'- sowie 3'-Bereiche. Für die reverse Transkription von bis zu 5 µg RNA wurde diese zur Reduktion von Sekundär- und Tertiärstrukturen zunächst mit 200 ng Hexanukleotidprimer in einem Volumen von 11 µl für 5 min bei 65 °C denaturiert und auf Eis abgeschreckt. Anschließend wurden dem Ansatz 4 µl 5x SSIIRT-Transkriptionspuffer und zu einer Endkonzentration von 0,5 mM Desoxynukleotide, sowie 20 u Ribonuklease Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) zugegeben. Das Ansatzvolumen wurde mit H₂O auf 19 µl ergänzt. Nach der Zugabe von 200 u Superscript® III Reverse Transkriptase (Invitrogen, San Diego, CA USA) erfolgt eine erste Inkubation für 10 min bei 25 °C. Bei dieser Temperatur besitzt das Enzym hinreichende Aktivität, um die kurzen, hexameren Oligonukleotide um etliche Nukleotide zu verlängern. Dadurch wird ein erneutes Ablösen der Oligonukleotidprimer bei der für eine maximale Enzymaktivität erforderlichen, erhöhten Temperatur von 50 °C verhindert. Nach einer Reaktionsdauer von 60 Min bei dieser Temperatur erfolgte die thermische Inaktivierung des Enzyms durch zehnmütiges Erhitzen auf 75 °C. Der synthetisierte Erststrang des cDNA/RNA-Hybrids wurde für die meisten nachfolgende Schritte ohne zusätzliche Aufreinigung und Degradation der RNA verwendet. Für quantitative Analysen wurde das Protokoll zur reversen Transkription von RNA modifiziert und die erhaltene cDNA weiter aufgereinigt (siehe 4.5 und 4.7.2).

4.7.2 SYNTHESE UND AUFREINIGUNG VON cDNA

Die reverse Transkription für die Synthese von cDNA als Template für quantitative PCR erfolgte prinzipiell ähnlich zu dem in Absatz 4.7.1 beschriebenen Protokoll. Um Schwankungen der Ausbeute an cDNA bei diesem Syntheseschritt auf ein Minimum zu reduzieren, wurden die später gemeinsam analysierten Proben von 500 ng RNA (FC E15,5) bzw. 750 ng (AT P28, SC P28) identisch und

zeitgleich behandelt. Dazu erfolgte in einem ersten Schritt die Zugabe von 2 µl einer zuvor zusammengesetzten Lösung aus Oligonukleotidprimern und dNTP's (125 ng/µl random hexamer, 0,5 mM dNTP's), in einem zweiten die Denaturierung bei 65 °C für 5 min. Die auf Eis abgeschreckte Lösung wurde mit 3,25 µl eines Gemisches aus 4 Teilen 0,1 M DTT und einem Teil 5x SSIIRT-Transkriptionspuffer ergänzt. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 7 µl einer vorbereiteten Lösung aus 3,25 µl H₂O, 1,4 µl 5x SSIIRT-Transkriptionspuffer, 0,35 µl DTT, 1µl RNase Inhibitor (40 u) und 1µl SSIIRT (200 u). Im Thermocycler wurden die Proben stufenweise gemäß vorherigem Protokoll (Absatz 4.7.1) 5 min bei 25 °C, 60 min bei 50 °C und 15 min bei 75 °C temperiert. Die hydrolytische Degradation von RNA aus entstandenen RNA-DNA Hybriden erfolgte unter dem Einfluss von 5 u zugeführter RNase H (Affymetrix, Santa Clara, CA USA) bei 37 °C innerhalb von 5 min. Nachfolgend wurde einzelsträngige RNA zudem durch 1 µl RNase A (10 mg/ml; für DNase-freien Zustand gekocht) (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO USA) 10 min bei 68 °C hydrolysiert. Die Aufreinigung der einzelsträngigen cDNA erfolgte über eine Silikagelsäule (DNA Clean & Concentrator™-5 Kit (Zymo Research, Irvine, CA USA)). Den Proben wurde dazu 225 µl DNA Bindepuffer beigemischt und 60 s bei 10000 g durch die Säule zentrifugiert. Einem Waschen mit 200 µl Waschpuffer folgte eine weitere Zentrifugation für 3 min bei 10000 g zur vollständigen Trocknung der Säule. Eluiert wurde nach einminütiger Inkubation mit 12 µl Elutionspuffer EB (Qiagen, Hilden, Deutschland) bei 10000 g für 60 s. Abschließend wurden die sscDNA-Konzentrationen der Eluate dreifach spektralphotometrisch bestimmt und es wurde auf eine einheitliche Konzentration von 2,5 ng/µl verdünnt.

4.8 IN SITU HYBRIDISIERUNG

Die Gewebepreparation zur Anfertigung von Kryomikrotomschnitten der Mäusegehirne, wurde in Absatz 4.2 beschrieben.

Es wurden ausschließlich Materialien und Lösungen eingesetzt, die frei von Kontaminationen durch RNase waren. Sofern nicht in diesem Zustand, wurden hitzebeständige Materialien 3 h bei 180 °C gebacken und Plastikgeräte 10 min mit 3 % w/v H₂O₂ gespült. Lösungen wurden nach Möglichkeit mit 1/1000 Volumenanteil Diethylpyrocarbonat (DEPC) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) behandelt und autoklaviert, oder aus RNase-freien Chemikalien und DEPC-behandeltem H₂O angesetzt. Die Arbeitsflächen wurden mit RNase Away® (Roth, Karlsruhe, Deutschland) abgewischt. Hefe RNA wurde proteolytisch von RNase-Kontaminationen befreit. Dazu wurden 25 mg/ml *Torula*-Hefe RNA in 10 mM Tris, 5 mM EDTA, 0,5 % SDS (pH 7,8) gelöst und nach Zugabe von Proteinase K zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml über Nacht bei 55 °C inkubiert. Nach zweimaliger Phenol-

Chloroform-Extraktion folgte eine Ethanolfällung. Die gereinigte *Torula*-Hefe RNA wurde in TE-Puffer (pH 7,5) aufgenommen.

4.8.1 SONDENHERSTELLUNG

Für die Amplifikation von DIG-markierten RNA-Sonden durch DNA-abhängige RNA Polymerasen wurden Sequenzbereiche der Gene in den Vektor pBluescript I KS kloniert. Dazu notwendige molekularbiologischen Methoden sind in Standardwerken zusammengefasst (Sambrook & Russell 2000). Eingesetzte Enzyme, Oligonukleotide, RNA und der Klonierungsvektor sind vorhergehenden Absätzen zu entnehmen (vgl. Tabelle 2, Tabelle 4 und Absatz 4.7.1).

Unter Verwendung genspezifischer Klonierungsprimer wurden durch PCR genspezifische cDNA Fragmente amplifiziert. Diese wurden mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen endonukleolytisch gespalten, ebenso der Vektor, der zusätzlich dephosphoryliert wurde. Vektor und cDNA-Fragmente wurden ligiert und damit kompetente *E.coli* (Absatz 3.5.1) transformiert. Nach Vervielfältigung selektierter Klone wurden die rekombinanten Plasmide aus den Wirtsbakterien isoliert, linearisiert und gegebenenfalls 3'-überhängende Nukleotide entfernt. Von Promotoren in der Vektorsequenz wurde durch RNA-Polymerasen DIG-markierte antisense RNA amplifiziert und als Sonde zur Detektion von mRNA im Gewebe verwendet. Die Eigenschaften verwendeter ISH-Sonden sind in Tabelle 3 aufgelistet.

4.8.2 WHOLE MOUNT PRÄPARATE

Das präparierte Gewebe wurde über Nacht in 4 % PFA bei 4 °C fixiert und danach mehrmals in eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend folgte eine Entwässerung mit Methanol (25 %, 50 %, 75 % in PBS und 100 % je 5 min) und die vorläufige Lagerung bei -20 °C. Die Rehydrierung des Gewebes erfolgte in umgekehrter Methanolreihe. Danach wurde mehrfach mit eiskaltem PBS/0,1 % Tween (PBT) gewaschen und das Gewebe 1 h in eiskalter verdünnter Lösung H₂O₂ gebleicht. Im Anschluss wurde erneut mehrfach mit PBT auf Eis gewaschen, bevor eine Inkubation mit Proteinase K (10 µg/µl in PBT) für 15 min bei RT erfolgte. Diese enzymatische Reaktion wurde mit einer frisch hergestellten Glycinlösung (2 mg/ml in PBT) gestoppt. Danach wurde mehrfach mit PBT gewaschen und mit 4 % PFA-0,2 % Glutaraldehyd in PBT 15 min refixiert. Nach dem Auswaschen der Fixierlösung mit PBT folgte die Prähybridisierung, zuerst in 50 % Hybridisierungslösung (50 % Formamid, 5x SSC, 1 mg/ml *Torula* RNA, 0,1 % Tween, 0,2 SDS und 5 mM EDTA)/PBT, danach in 100 % Hybridisierungslösung für je 5 min. Anschließend in 900 µl Hybridisierungslösung für 3h bei 65 °C. In 100 µl der Hybridisierungslösung wurden 300 ng der mit DIG-markierte Sonde für 5 min bei 95 °C denaturiert und zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte für alle Sonden über Nacht bei 70 °C. Darauf folgend wurde je 10 min mit folgenden Lösungen ebenfalls bei Hybridisierungstemperatur

METHODEN

gewaschen: 5x in Posthybridisierungslösung (50 % Formamid, 5 x SSC, 1 % SDS)/2xSSC,1 % SDS, anteilig 100/0, 75/25, 50/50, 25/75 und 0/100 und wiederholt in SSC, 1 % SDS. Danach 1x mit 2 x SSC/1 % SDS für 30 min, anschließend nochmals für 15 min bei Raumtemperatur. Es folgten drei Waschschrte mit MaBS/0,1 % Tween für je 10 min. Die Gewebeproben wurden vor der Antikörperzugabe 1 h mit der Blockierungslösung (1 % BSA, 2 % Blockingreagenz (Roche, Basel, Schweiz) und 1 % Tween) geschwenkt. In einer Verdünnung von 1:5000 wurden Anti-DIG F_{ab} Antikörperfragmente zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei Raumtemperatur folgten je zehnminütige Waschschrte in Blockierungslösung, 50 % Blockierungslösung in MaBS/0,1 % Tween, MaBS/0,1 % Tween. Anschließend wurde 3x in MaBS/0,1 % Tween für je 30 min gewaschen, 1x inMaBS/0,1 % Tween für 60 min, 3x in Reaktionspuffer/0,1 % Tween und abschließend zur Inaktivierung endogener Phosphatasen für 30 min in Reaktionspuffer/0,1 % Tween/Levamisol. Die Detektion erfolgte wie unter Absatz 4.8.6 beschrieben durch den Einsatz von NBT/BCIP.

4.8.3 HERSTELLUNG VON GEWEBESCHNITTEN

Für *in situ* Hybridisierungen wurden koronale Schnittserien angefertigt. Dazu wurden die tiefgefrorenen Präparate ohne vorheriges Auftauen mit TissueTek (Sakura Finetek, Alphen am Rhein, Niederlande) auf den Objektisch des Kryomikrotoms aufgefroren. Bei individuell angepassten Temperaturen von ca. -17 °C in der Kammer des Geräts und ca. -15 °C Objekttemperatur wurden 20 µm dicke Schnitte auf Superfrost plus (Menzel, Braunschweig, Deutschland) Objektträger gesammelt und 2 h auf einer Heizplatte bei 55 °C getrocknet. Die bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C aufbewahrten, konsekutiven Schnittserien wurden vor Gebrauch wieder eine Stunde bei 55 °C gebacken. Von Gehirnen im Entwicklungsstadium E15,5 wurden drei parallele Serien von Kryomikrotomschnitten angefertigt. Dementsprechend befindet sich jeder vierte 20 µm dicke Schnitt auf demselben Objektträger. Von Gehirnen im Entwicklungsstadium P28 wurden 5 parallele Schnittserien von 20 µm Dicke angefertigt, sodass sich jeder sechste Schnitt eines Gehirns auf demselben Objektträger befindet.

4.8.4 FIXIERUNG UND PERMEABILISIERUNG

Die an den Kryomikrotomschnitten durchgeführte *in situ*-Hybridisierung soll die Expression eines Gens in verschiedenen Hirnarealen widerspiegeln. Dazu muss die RNA möglichst vollständig in ihrer Umgebung erhalten bleiben. Die Fixierung von RNA beruht auf ihrer engen Assoziation mit Proteinen, die im Gegensatz zu RNA gut fixiert werden können und die RNA vor Elution bewahren. Um ein osmotisches Schwellen oder Schrumpfen der Zellen zu vermeiden wird ein zum intrazellulären Milieu isotonisches Medium verwendet. Da chemische Fixative wirksamer sind als physikalische, wird in dieser Arbeit eines der gängigsten chemischen Fixierungsmittel verwendet.

Vier prozentiger Paraformaldehyd (PFA) in PBS enthält labile oligomere Bestandteile mit Methylenglykolstruktur, die bei Reaktion mit Nukleophilen, vor allem Aminogruppen, eine erste Vernetzung bewirken. Es wird angenommen, dass eine stabilere Bindung entsteht, wenn je drei Aminogruppen mit drei monomeren Formaldehydmolekülen zu einem Sechsring kondensieren. Bei einem höheren pH-Wert ist die Zahl freier Aminogruppen erhöht, wodurch eine stärkere Fixierung erreicht wird. Wegen der hohen Molekularität ist die Fixierung durch PFA jedoch langsam und sehr zeitabhängig.

Die vorbereiteten Schnitte wurden 10 min bei RT mit 4 % PFA in PBS fixiert. Für die Permeabilisierung wurde 10 min mit 0,2 M HCl bei RT, sowie 10 min in 0,1 M Tris-HCl (pH 8) inkubiert. Die Acetylierung der Aminogruppen zur Verhinderung der Entstehung von RNH_3^+ -Gruppen erfolgte für 10 min bei RT mit 5 mM Acetanhydrid in 0,1 M Triethanolamin/HCl (pH 8). Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils mit PBS gespült.

4.8.5 HYBRIDISIERUNG

Für *in situ*-Hybridisierungen von RNA in Gewebe unter Verwendung DIG-markierter RNA-Sonden kann die Schmelztemperatur der Hybride mit folgender Formel berechnet werden:

$$T_m^{\text{Dig}} \text{ (in } ^\circ\text{C)} = 79,8 + 18,5 \log c_{\text{mc}} + 58,54 \cdot \text{GC} + 11,8 \cdot \text{GC}^2 - 820 / L - 0,35 \cdot c_{\% \text{ FA}} - 20$$

c_{mc}	Zahlenwert der molaren Konzentration einwertiger Kationen
GC	GC-Gehalt des Hybrids als Molenbruch
L	Zahlenwert seiner Länge in bp
$c_{\% \text{ FA}}$	Zahlenwert des Formamidgehalts in %
- 20	thermischer Korrekturfaktor für Digoxigeninmarkierung.

Für Hybridisierungen wurde DIG-markierte *antisense*-RNA-Sonde dem *in situ*-Hybridisierungspuffer in einer Konzentration von 3 ng/ μl zugesetzt. Vor Zugabe des Denhardt's Reagenzes wurde die Lösung für drei Minuten bei 99 °C denaturiert und auf Eis abgeschreckt. Anschließend wurde sie auf 70 °C gebracht. Denhardt's Reagens, RNA aus *Torula*-Hefe und tRNA aus *S.cerevisiae* wurden für die Blockierung unspezifischen Hintergrunds eingesetzt. Je Objektträger wurden 145 μl Hybridisierungslösung aufgetragen und zur gleichmäßigen Verteilung mit einem zuvor silanisierten (PlusOne™ Repel-Silan (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK)) Deckglas abgedeckt. Die Objektträger wurden horizontal gelagert in einer feuchten Kammer inkubiert, die ein mit 5 x SSC und 50 % Formamid getränktes Filterpapier enthält. Um die feuchte Kammer vor Verdunstung zu schützen, wurde sie mit Frischhaltefolie versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei einer geeigneten Temperatur ($T_0 = T_m - 5 \text{ } ^\circ\text{C}$) im Hybridisierungsöfen. Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläser mit 5 x SSC bei RT abgespült und anschließend 30 min bei T_m in 50 % Formamid, 2 x SSC,

METHODEN

60 min bei T_0 in 0,2 x SSC und schließlich 15 min bei RT im gleichen Puffer gewaschen, wobei entstandene Fehlhybridisierungen abgespült werden.

4.8.6 DETEKTION

Nach dem Waschen wurde für 5 min in MaBS umgepuffert und zur Vermeidung unspezifischer Bindungen des Antikörpers 1 h bei RT mit 2 %-igem Blockierungsreagens (BR) (Roche, Basel, Schweiz) in MaBS blockiert. Die Inkubation mit dem Antikörper (1/750, 2 % BR in MaBS) erfolgte bei RT für 60 min in einer feuchten Kammer über Reaktionspuffer. Dazu werden 145 μ l der Antikörperlösung auf den Objektträger gegeben und zur gleichmäßigen Verteilung mit Parafilm™ blasenfrei abgedeckt. Zur Entfernung überschüssigen Antikörpers wurde 3x 10 min mit MaBS gewaschen. Abschließend wurde 5 min in Reaktionspuffer, der zur Inhibition der endogenen alkalischen Phosphataseaktivität eine Spatelspitze Levamisol Hydrochlorid enthält, umgepuffert.

Die kolorimetrische Detektion der DIG-markierten RNA erfolgte mit einem an alkalische Phosphatase konjugierten Antikörper gegen Digoxigenin. Als Substrat für die alkalische Phosphatase dient 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat 4-Toluidinsalz (BCIP), das zu einem Indoxyl dephosphoryliert und anschließend zu einem wasserunlöslichen Indigofarbstoff oxidiert wird. Als Oxidationsmittel dient Nitroblautetrazoliniumchlorid (NBT), das bei dieser Reaktion zu einem unlöslichen blauen Formazan reduziert wird und somit farbverstärkend wirkt.

Für die Nachweisreaktion wird auf jeden Objektträger 1 ml BCIP/NBT-Substratlösung aufgetragen (0,4 mM BCIP, 0,4 mM NBT in Reaktionspuffer). Die Inkubation erfolgt je nach Farbentwicklung unter Umständen bis zu mehreren Tagen in einer feuchten Kammer über Reaktionspuffer bei RT im Dunkeln und wurde anschließend durch Verdünnung der Substratlösung in PBS gestoppt. Die Präparate wurden mit Mowiol (0,1 g/ml in 25 % w/v Glycerin, 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; HOECHST) eingedeckelt.

4.8.7 ANALYSE

Für eine sich anschließende relative Quantifizierung der Färbung wurden Schnittserien von zwei dem exakt gleichen Altersstadium zugeordneten Gehirnen der Genotypen *Nrg1^{+/-}* und *Nrg1^{+/+}* verwendet. Um Unwägbarkeiten und Ungleichheiten während der Inkubationszeiten der Hybridisierungsprozedur bis zum Farbumsatz auf ein geringstmögliches Maß zu beschränken, wurden auf einen Objektträger gleichermaßen serielle Schnitte beider Genotypen aufgelegt. Bei der kolorimetrischen Detektion hybridisierter DIG-markierter Sonde wurde generell darauf geachtet, dass die farbumsetzende Reaktion von NBT/BCIP nicht in die Sättigung gelangte und eventuell vorhandene Expressionsunterschiede im letzten Schritt des Experiments nicht nivelliert wurden. Durch einen Waschschrift in PBS wurde die Farbumsetzung gestoppt und die Objekte abschließend

unter Mowiol eingedeckelt. Eine der parallel angefertigten Schnittserien wurde stets für Nissl-Färbungen verwendet. Alle angefärbten und auszuwertenden Kryomikrotomschnitte wurden am Mikroskop unter denselben Bedingungen und Geräteeinstellungen mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Mit Hilfe der zur Orientierung und Lokalisierung einzelner Hirnstrukturen dienenden Nissl-Färbungen wurden die ISH der Schnittserien beider Genotypen aufeinander aligniert. Die genaue Quantifizierung der Stärke des Farbumsatzes erfolgte anschließend mit Hilfe des Programms ImageJ. Auf allen jeweiligen Schnitten mit Schnittebenen durch relevante Regionen wurden die Mediane der Grauwertevertellungen ausgewählter Bereiche von AT, FC, PT und SC gemessen. Die Messdaten der Auswahlregionen eines Vergleichspaares wurden miteinander in Relation gesetzt, wobei der wildtypische Genotyp *Nrg1^{+/+}* gegenüber dem heterozygoten Genotyp *Nrg1^{+/-}* zu 100 Prozent gesetzt wurde. Die auf diese Weise normalisierten Messdaten aller angefertigten Experimente wurden in eine gemeinsame Auswertung mit einbezogen. Die statistische Analyse basiert auf einem zweiseitigen, homoskedastischen t-Test. Eine Ausnahme davon stellt die quantitative Auswertung des Färbemusters von Sema5a (siehe 5.4.11) dar. Hier wurde wie unter 4.8.7.3 beschrieben verfahren.

4.8.7.1 QUANTIFIZIERUNG E15,5

Die Schnittebenen durch FC befinden sich bei einer Belegung von zwei Gehirnen unterschiedlichen Genotyps auf auf demselben Objektträger. Auf einem zweiten sind die zu vergleichenden Schnitte von AT,PT und SC beider Genotypen angeordnet. Die Schnittauswahl zur quantitativen Analyse der Bereiche AT,FC, PT und SC erfolgte nach Durchsicht der Nissl-gefärbten Schnittserie und darauf identifizierter Regionsmarkern einzelner Schnitte. Der rostral gelegene Schnitt durch FC ist daran auszumachen, dass medial die kortikale Platte bis auf Höhe der Lateralventrikel reicht. Auf dem posterior gelegenen, auszuwertenden Schnitt mit einem Teil von FC beginnt das differenzierende Feld des Striatums (Abbildung 23 A). Die mit ImageJ Version 1.43 vermessenen Bereiche dieser Schnitte schließen medial die gesamte kortikale Platte ein. Die Senkrechte zwischen den beiden Hemisphären wurde vom ventralsten Punkt der kortikalen Platte bis zum Schädelknochen in drei gleiche Abschnitte unterteilt. Ausgehend vom dorsalen Ende des mittleren Abschnitts wurde eine Begrenzungslinie auf kürzester Strecke in Richtung Lateralventrikel gezogen, die sich mit einer zweiten vom ventralen Ende der kortikalen Platte ausgehenden Linie schneiden und dadurch den zu vermessenden Bereich von FC einschließt. Aus der linken und rechten Hemisphäre ergaben sich zwei Messwerte aus einem Schnitt. Die Auswahl an Schnitten auf denen die thalamischen Kerne von AT liegen, umfasst den gesamten anterioren Teil des Thalamus bis posterior das laterale Genikulatum deutlich erkennbar ist (Abbildung 23 B). Diese Schnittebene wurde von der Analyse

ausgeschlossen. Zum dorsal das ganze thalamische Gewebe einbeziehende Auswahlbereich jedes einzelnen Schnittes wurde die Stria medullaris mit vermessen. Von dieser wurde in beiden Hemisphären nach ventral eine begrenzende Linie gezogen. Orthogonal dazu grenzt eine horizontale Linie auf Höhe des dritten Ventrikels den Auswahlbereich ab. Auf dem sich dem posterioren Ende von AT direkt anschließenden Kryomikrotomschnitt mit Schnittebene durch das laterale Genikulatum liegt der anteriore Beginn des Auswahlbereichs von SC (Abbildung 23 C). Dieser dehnt sich nach posterior über viele Schnitte aus. In der letzten posterior gelegenen Schnittebene liegt dorsal der Habenulae die Epiphyse zwischen den Hemisphären. Die dorsale Anteile der Schnitte wurden transversal verlaufende Linie durch die Palial-Subpalial Boundary getrennt. Zu dieser orthogonal wurden zwei Hilfslinien durch die medialsten Stellen der Lateralventrikel beider Hemisphären eingezeichnet. Von den Schnittstellen aus in einem Winkel von 60° nach lateral werden weitere Begrenzungslinien eingezeichnet. Die eingegrenzten lateralen Teile beider Cortexhälften wurden von der Ventrikulärzone bis zur kortikalen Platte als SC vermessen. VB wurde ab einer posterior der internen Kapsel gelegenen Schnittebene bis zu dem Schnitt, den die Lateralventrikel vollständig durchgehend nach ventral durchziehen, ermittelt. Die Größe des vermessenen kreisrunden Bereichs wurde so ermittelt, dass der Durchmesser ein Viertel eines Kreises beträgt, der zum vollständigen Ausfüllen einer Thalamushälfte notwendig wäre. VB liegt in einem Bereich des Thalamus, der ventrolateral direkt dem medialen Lemniskus angrenzt.

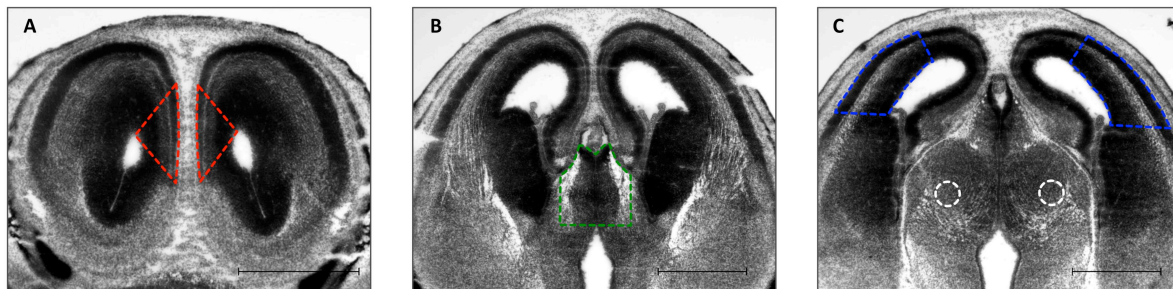


Abbildung 1: Ausgewählte Sektoren koronaler Kryomikrotomschnitte E15,5

(A) AT (grün), (B) FC (rot), (C) PT (weiß) und SC (blau); Skalierung 1 mm.
Abbildungen der vollständigen Bereiche, siehe Anhang Abbildung 23.

4.8.7.2 QUANTIFIZIERUNG P28

Für eine qualitative und quantitative Auswertung koronaler Kryomikrotomchnitte, wurden die Gehirnareale entsprechend ihrer Lage in veröffentlichten Kartierungen festgestellt (2009, Paxinos & Franklin 2001). Die anatomischen Positionen wurden anhand der an einer parallelen Schnittserie angefertigten Nissl-Färbung übertragen und zudem den Präparaten zur Isolierung von RNA (siehe Absatz 4.2.2) angeglichen.

4.8.7.3 QUANTIFIZIERUNG SEMA5A

Um den radial verlaufenden Färbungsgradienten von Sema5a in der VZ und SVZ genau zu erfassen, wurde das ImageJ Plug-in *Radial Profile Angle* verwendet, das mittlere Pixelintensitäten entlang von Kreisbögen vorgewählter Sektoren bestimmt. Die Sektoren wurden jeweils von der linken und rechten Hemisphären einer Auswahl an gefärbten koronalen Kryomikrotomschnitten vermessen. Als anteriore Grenze der Schnittauswahl wurde die Schnittebene gewählt, an der dorsoventrale Ausdehnung der medialen kortikalen Platte bis zum Lumen des Lateralventrikels reicht. An der posterior begrenzenden Schnittebene ist ventral der dritte Ventrikel sichtbar. Die Mittelpunkte der Kreissektoren wurden in eine zentrale Position des Ventrikels gelegt, von der aus Sektoren begrenzt von einer Parallelen zur Mittellinie und der Horizontalen durch den Mittelpunkt vermessen wurden. Die in tangentialer Richtung erhobenen Daten mittlerer Intensitäten wurden auf eine normierte Cortexdicke bezogen dargestellt.

4.9 NISSL FÄRBUNG

Bei dieser histologischen Färbetechnik bindet der verwendete Farbstoff vornehmlich an basophile Nukleinsäuren in den Kernen und Ribosomen der Zellen. In Nervengewebe dient dies der Darstellung von Zellkörpern der Neuronen, da diese viel raues endoplasmatisches Retikulum aufweisen.

Am Kryomikrotom angefertigte und auf Objektträgern angetrocknete Gewebeschnitte wurden 30 min in einer 95 % Ethanol/ 5 % Eisessig-Lösung fixiert. Nach kurzem Spülen in H₂O wurden die Objekte unter Beobachtung der Farbaufnahme 5-15 min in 0,5 % w/v Kresylviolett in 200 mM Natriumacetatpuffer pH 4,1 inkubiert. Anschließend wurde den angefärbten und erneut in H₂O gespülten Objekten, in einer Reihe von je zweiminütigen Waschschrritten in ansteigenden Konzentrationen an Ethanol (50 %, 70 %, 95 %, EtOH abs., EtOH abs.), Wasser und ungebundener Farbstoff entzogen. Die Intensität der Färbung konnte über die Dauer der Waschschrritte, insbesondere in 70 % EtOH kontrolliert werden. Abschließend wurden die Objekte nach drei Minuten im organischen Lösungsmittel Xylol unter Verwendung von Entellan® (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

5 ERGEBNISSE

Während der Entwicklung des Gehirns wird in germinalen Zonen bereits in sehr kleinen Zeitintervallen eine immens hohe Anzahl an Zellen neu gebildet. Die zugrundeliegenden Vorgänge gehen zeitlich uneinheitlich vonstatten und es existieren zeitliche wie räumliche Entwicklungsgradienten. Die Zellen von unterschiedlichen Hirnarealen differenzieren sich anschließend in charakteristischer Art und Weise. Aus diesen Gründen ist es für die Transkriptomstudie von großer Bedeutung die Präparationen der Gewebeteile räumlich und zeitlich exakt festzulegen.

5.1 BESTIMMUNG UND ABGRENZUNG RELEVANTER BEREICHE

5.1.1 RÄUMLICHE LAGE VON AT UND PT E15,5

Die Identifizierung einzelner thalamischer Kerne des embryonalen Hirns der Maus ist aufgrund ihrer morphologischen Undifferenziertheit zum Zeitpunkt E15,5 schwierig und Bedarf komplexer Strategien. Die Zuordnung von embryonalem thalamischen Gewebe zu erst postnatal vollständig differenzierten thalamischen Kernen basiert in der vorliegenden Arbeit auf kombinatorischen Expressionsmustern unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren. Ausgehend von Expressionsmustern der Gene *Lhx2*, *Gbx2* und *Ngn2*, konnte von vorausgehenden Arbeiten (Niehage 2008) ein Modell übernommen werden, das thalamischen Kernvorläufern eine grobe embryonale Position zuordnet. Die dadurch erleichterte neu durchgeführte Analyse von Expressionsmustern der Cadherine *Cad6* und *Cad8* von ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten (Abbildung 2) verbessert die Lokalisation und ermöglicht es die Position embryonaler Anlagen von Thalamuskernen auf die ebenfalls angefertigten dreidimensionalen *whole mount* Präparate zu übertragen. Die Färbemuster von ISH gegen *Cad6*, *Cad8*, und weitere gegen *Gbx2*, *Ngn2* und *Lhx2* (nicht gezeigt) konnten mit Hilfe des Modells thalamischen Regionen und einzelnen Kernen zugeordnet werden. Trotz der teils regionsunspezifischen Färbemuster für AT und PT von einzelnen dieser Gene, konnte die Lage dieser Regionen indirekt durch die Kombination aller detektierten Genexpressionen erfolgreich ausgemacht und die anterior gelegenen Thalamuskern von VB unterschieden werden. Die daraus interpretierten Erkenntnisse zur dreidimensionalen Lage von Thalamusbereichen ermöglichen deren gezielte und sehr genaue Präparation (4.2.1.1 und 4.2.1.3).

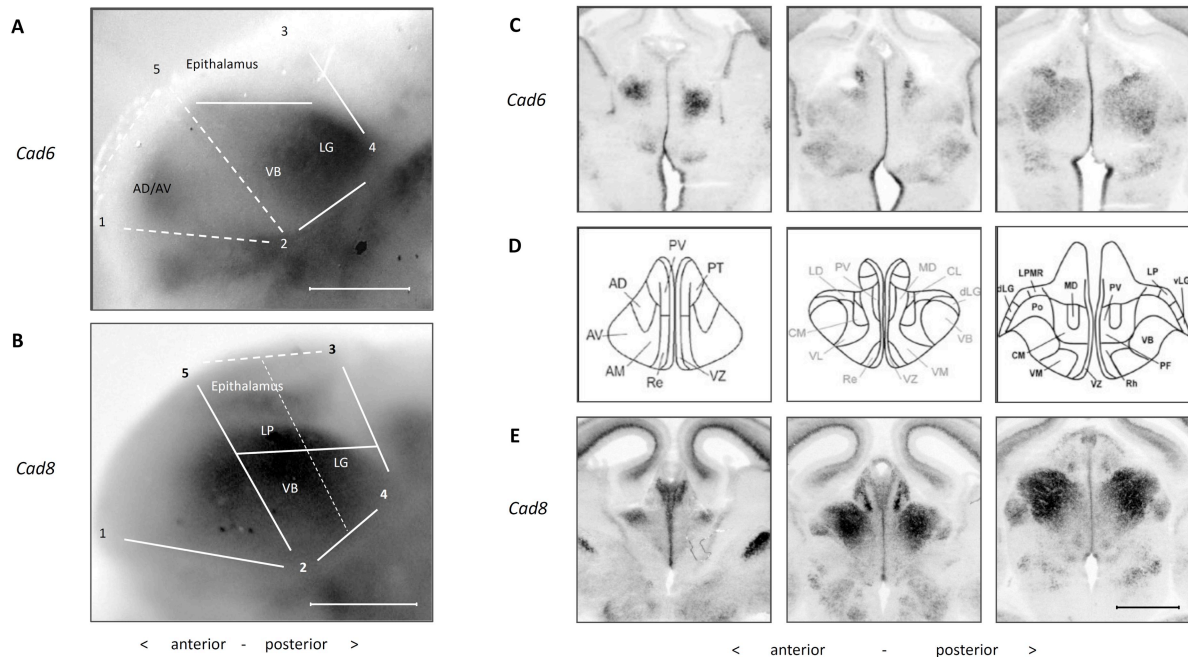


Abbildung 2: Kartierung des anterioren Thalamus E15,5

ISH des dorsalen Thalamus gegen *Cad6* und *Cad8*; **(A-B)** *Whole mount* Präparate in medialer Ansicht mit eingezeichneten Präparationsgrenzen **(C)** u. **(E)** ISH gegen *Cad6* und *Cad8* an koronalen Kryomikrotomschnitten. Durch *Cad6* wird u.a. die Position der Anlage von AD, LG und VB gefärbt. *Cad8* färbt demgegenüber anteromedial, weiter posterior gelegene Teile und den Epithalamus. In Kombination der Färbemuster ist der gesamte AT der von *Cad8* gefärbte, weitgehend *Cad6* negative Bereich zwischen 1,2 und 5. **(D)** Modellzeichnung thalamischer Kerne (Niehage 2008). Skalierung 500 µm.

5.1.2 EMBRYONALE ENTWICKLUNG UND RÄUMLICHE LAGE VON FC

Die Entwicklung des ZNS erfolgt durch zeitlich gestaffelte Genese und Migration von Zellen germinaler Zonen. Zum Aufbau des laminar strukturierten Cortex migrieren neu gebildete Zellen aus der Ventrikulärzone (VZ) und Subventrikulärzone (SVZ) radial durch bereits bestehende Schichten zur pialen Seite. Die Ausbildung tieferer Schichten erfolgt somit früher als die höherer Schichten. Zudem unterscheiden sich die genauen Zeitpunkte der Entstehung einzelner kortikaler Schichten in transversaler und in longitudinaler Ausrichtung, d.h. ventrolaterale Neurone entstehen früher als dorsomediale und anterior gelegene früher als posterior gelegene (Bayer & Altman 1991). Im motorischen Cortex der Maus beginnt die Bildung der höheren Schichten z.B. zwischen E14 und E16 (Zimmer et al.. 2004). Der infralimbische (IL) und prälimbische (PrL) Cortex der Maus werden zusammen als Homolog zum dIPFC der Primaten betrachtet (Uylings et al.. 2003). In der adulten Maus liegen diese Bereiche anteromedial bis zum Beginn des Corpus Callosum. Um in diesen Bereichen des untersuchten Mausstammes den genauen zeitlichen Ablauf des Prozesses der neuronalen Migration von Vorläuferzellen supragranulärer Schichten feststellen zu können, wurden

Sonden für ISH gegen den Transkriptionsfaktor *Cux2* hergestellt. Während der Kortikogenese wird dieser hauptsächlich in basalen Progenitoren und ihren radial migrierenden Abkömmlingen exprimiert und dient daher als Marker der oberen kortikalen Schichten (Zimmer et al., 2004). Durchgeführte ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten verschiedener Altersstadien zwischen E15 und E16 zeigen im Bereich des IL/PrL neben der Expression von *Cux2* in der Marginalzone (MZ) eine deutliche Expressionszunahme dieses Transkripts zwischen E15 und E16 in der SVZ. Bei E15,5 betrifft die durch die Sonde gegen *Cux2* herbeigeführte Färbung nicht mehr nur die MZ und Teile der SVZ, sondern weitet sich auf die gesamte SVZ aus. Dies ist auf die Migration *Cux2*-positiver Zellen aus den proliferativen Zonen zurückzuführen. Diffusere Färbungen sind ebenfalls in der Intermediärzone (IZ) zu erkennen (Abbildung 3A). Zum Zeitpunkt E16 ist neben der bereits in vorherigen Entwicklungsstadien vorhandenen Färbung der MZ eine markante Zunahme der Färbung in der kortikalen Platte (CP) zu erkennen. Diese verdeutlicht die zunehmende Zahl dorthin migrierender Zellen. Aus den Färbemustern wurde gefolgert, dass die Migration von Vorläuferzellen und die Bildung supragranulärer Schichten von IL/PrL bei E15,5 beginnt.

Die neuropathologischen Befunden der Krankheit (Absatz 2.1.2) und die während früher Entwicklungsphasen auf den Embryo einwirkenden Risikofaktoren (Absatz 2.1.6) verdeutlichen, dass die Histogenese höherer kortikaler Schichten ein sensibler und gegenüber der Krankheit anfälliger Prozess ist. *Nrg1* wiederum ist bekanntlich ein wichtiger Faktor für die radiale Migration von Vorläuferzellen (Absatz 2.2). Aus diesen Gründen wurde für die Untersuchung transkriptomischer Effekte von *Nrg1* auf Prozesse dieses embryonalen Entwicklungsstadiums FC zum Zeitpunkt E15,5 präpariert.

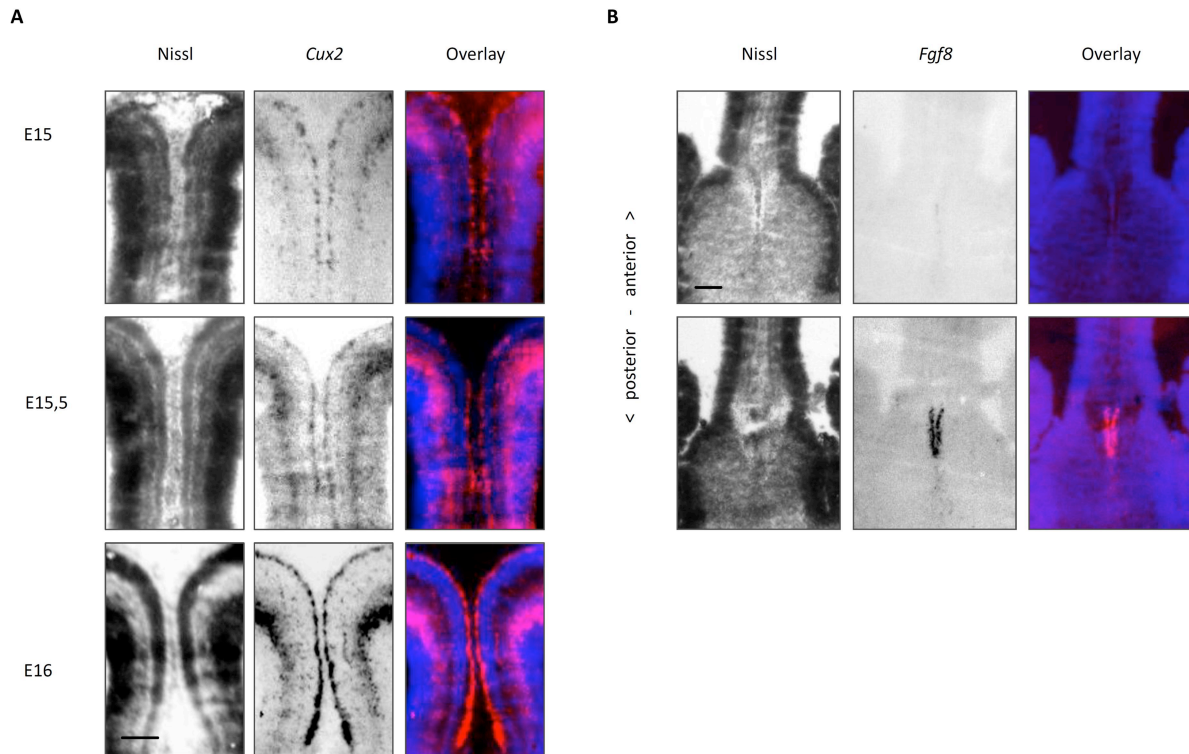


Abbildung 3: Entwicklung und posteriore Grenze von FC.

(A) ISH gegen *Cux2* ab E15 und zugehörige Nissl-Färbungen. Supragranuläre Schichten des IL/PrL sind durch *Cux2*-positive Zellen in der CP an E16 zu erkennen. Die Bildung und Migration dieser Neuronen beginnt bei E15,5 **(B)** Markierung der glial wedge und des Indusium griseum durch ISH gegen *Fgf8*. Präparationsgrenze von FC. Skalierung 500 µm.

Für die Präparation von IL/PrL aus dem embryonalen Gehirn bedarf es zusätzlich einer genauen Bestimmung der exakten räumlicher Lage im untersuchten Stadium E15,5. Wegen des Fehlens direkter Markierungsmöglichkeiten dieser Hirnregionen wurden für eine indirekte Lokalisierung ISH zur Detektion des Fibroblasten Wachstumsfaktor *Fgf8* durchgeführt. Embryonal können Transkripte dieses Gens u.a. in der glial wedge und dem Indusium griseum detektiert werden (Smith et al., 2006), die Begrenzungen für hindurchwachsende Fasern des entstehenden Corpus callosum darstellen. Deren genaue Lagebestimmung gibt Aufschluss über die caudale Grenze des, entsprechend vorhandener Atlantenkartierungen der adulten Maus (Paxinos & Franklin 2001), posterior bis zum Corpus callosum reichenden IL/PrL. Das Färbemuster durchgeführter ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten von E15 kann in der Tat mit Hilfe von Nissl-Färbungen an parallel angefertigten Schnittserien Zellen zugeordnet werden, die entlang der Mittellinie caudal des Fornix und damit in direkter Umgebung des Bildungsortes des Corpus callosum lokalisiert sind (Abbildung 3B). Zu diesen Ergebnissen wurden ebenfalls ISH an *whole mount* Präparaten angefertigt (nicht gezeigt) und eine Präparationsanleitung für FC erarbeitet (Absatz 4.2.1.2).

5.2 QUALITÄTSKONTROLLE ISOLierter RNA

Aus den sorgfältig präparierten Hirnregionen konnte im weiteren experimentellen Ablauf RNA isoliert und deren Konzentrationen spektralphotometrisch gemessen werden. Die Qualität wurde mit Hilfe eines Bioanalyzers unter Verwendung von RNA 6000 Pico LabChips überprüft. In einem Kapillarsystem des Chips wurde die untersuchte Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt, durch einen Fluoreszenzfarbstoff detektiert und in einem Elektropherogramm aufgezeichnet. Diese zeigen Folgendes: Nach der Erkennung des zugesetzten Markers wurde nach ca. 26 s Laufzeit 5 S rRNA und tRNA detektiert. Die nachfolgenden großen Peaks wurden durch die Detektion der größeren 18 S und 28 S rRNA verursacht. Zeitlich später folgende Fluoreszenzsignale stammen von intakt isolierten, unprozessierten Vorläufern von mRNA aus den Zellkernen und sind lediglich bei der Analyse von RNA sehr hoher Qualität zu erwarten. Nimmt die Qualität ab und die RNA unterliegt Degradationsprozessen, betrifft dies statistisch häufiger längere als kürzere Ribonukleinsäuren. Sichtbar wird dies durch die relative Abnahme des Peaks der 28 S rRNA und den gleichzeitig zunehmenden Fluoreszenzsignalen zeitlich vor den Peaks der 18 S und 28 S rRNA durch deren Fragmentierung in kleinere Bruchstücke. Eine Auswertesoftware kalkulierte für jedes erhaltene Elektropherogramm eine qualitätsabhängige RNA integrity number (RIN). Die für die Analysen dieser Arbeit verwendeten RNA-Proben wurden mit einer durchschnittlichen RIN von 8,6 bewertet. Die jeweiligen, in Abbildung 4 gezeigten Elektropherogramme von RNA mit der niedrigsten, sowie höchsten in dieser Arbeit verwendeten RIN von 7,5 bzw. 9,9 verdeutlichen die insgesamt hohe Qualität.

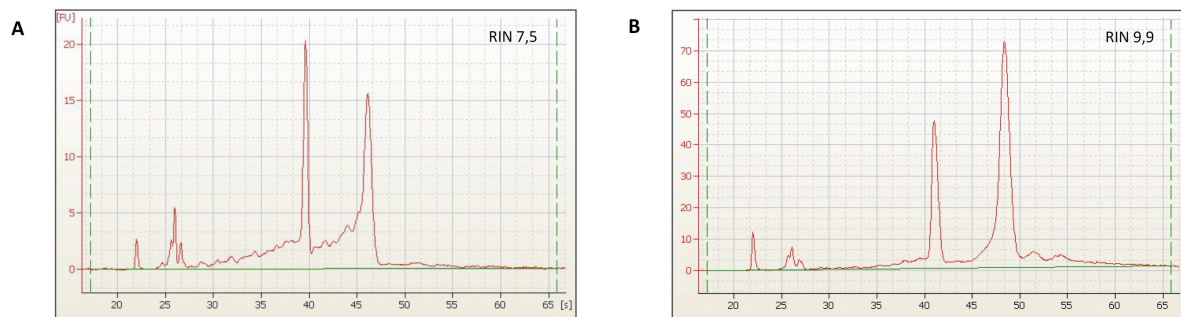


Abbildung 4: RNA Qualitätskontrolle

Elektropherogramme, Bioanalyser RNA 6000 Pico LabChip. **(A)** Isolierte RNA der niedrigsten hier verwendeten Qualitätsstufe, RIN 7,5. **(B)** Isolierte RNA der höchsten Qualitätsstufe, RIN 9,9.

Die Ergebnisse der Qualitätsanalyse verwendeter RNAs sind in Tabelle 7 zusammengefasst dargestellt. Die Tabelle beinhaltet darüber hinaus Informationen über die mittleren Konzentrationen aller isolierten RNA-Proben aus den präparierten Gewebestücken.

Tabelle 7: Mittlere Konzentrationen und Qualitäten verwendeter RNA-Proben

Mittelwerte \pm SD von je 18 RNA-Proben, bestehend aus zusammengeführten RNA-Pools von 4 Tieren. AT, FC, PT E15,5 und VB P28 - 12 μ l Elutionsvolumen, SC E15,5 und AT, FC, SC P28 - 30 μ l Elutionsvolumen.

Altersstadium	AT	FC	PT	SC	Merkmale
embryonal	266 \pm 106	148 \pm 51	340 \pm 112	235 \pm 83	c (ng/ μ l)
	8,8 \pm 0,4	9,2 \pm 0,4	8,7 \pm 0,4	9,2 \pm 0,4	RIN
postnatal	223 \pm 50	201 \pm 46	123 \pm 34	575 \pm 235	c (ng/ μ l)
	8,1 \pm 0,4	8,2 \pm 0,3	8,0 \pm 0,3	8,3 \pm 0,3	RIN

Zur genauen Bewertung der RNA und der Qualitätssicherung der experimentellen Abläufe wurde ein GeneChip[®] Test3 Array hybridisiert und analysiert. Für diesen Zweck wurde isolierte RNA verwendet, die mit einer RIN von 7,5 das in dieser Arbeit verwendete Qualitätsminimum darstellt. Auf dem Array können für die Gene *Actb* und *Gapdh* durch das Vorhandensein mehrerer *Probesets* Fragmente aus 5`-, mittleren und 3`-Transkriptbereichen detektiert werden, deren Signalintensitäten entsprechend GCRMA Probe Summarization Verhältnisse von 1:1,24:1,23 und 1:0,75:0,69 aufweisen. Die zur Hybridisierung der Mouse Genome 430.2 Arrays notwendige Qualitätsanforderung an RNA, ein Verhältnis der Detektionssignale von 3' zu 5'-Detektionsbereichen unter 3 zu liefern, ist damit selbst für die verfügbaren RNA-Pools mit einer RIN von 7,5 weit übererfüllt.

5.3 AFFYMETRIX MOUSE GENOME 430.2 GENECHIPS[®]

Für eine vergleichende Transkriptomstudie heterozygoter *Nrg1*^{+/-} Mäuse und ihrer wildtypischen *Nrg1*^{+/+} Geschwister, wurden mit Hilfe von Mouse Genome 430.2 Arrays von Affymetrix, 16 unterschiedliche Konditionen untersucht. Diese umfassen vier verschiedene Hirnregionen AT, FC, PT und SC (siehe Abschnitte 4.2.1 und 4.2.2) der beiden Genotypen in den Altersstadien E15,5 und P28. Auf jedem einzelnen Array wurden voneinander unabhängige Pools isolierter RNA von 12 Individuen untersucht. Von jeder Kondition wurden darüber hinaus drei voneinander vollständig unabhängige Replikate angefertigt. Die genaue Zusammenstellung der Pools kann Abbildung 21 und Abbildung 22 entnommen werden. Als vereinfachte Nomenklatur der GeneChips[®] wurden folgende am Beispiel AT16N1 gezeigte Abkürzungen verwendet: AT - Region (alternativ: FC, PT und SC), 16 - Stadium E15,5 (alternativ: 28 für P28), N - Genotyp *Nrg1*^{+/-} (alternativ: W für *Nrg1*^{+/+}) und 1 - Chip-Nr. (alternativ: Replikate 2 und 3). Abbildung 5 zeigt die embryonal wie postnatal einheitliche graphische Darstellung der untersuchten Gehirnregionen und analysierten GeneChips[®].

ERGEBNISSE

	AT	FC	PT	SC
Nrg1 ^{+/-}	■ AT16N1-3 ■ AT28N1-3	■ FC16N1-3 ■ FC28N1-3	■ PT16N1-3 ■ PT28N1-3	■ SC16N1-3 ■ SC28N1-3
Nrg1 ^{+/+}	■ AT16W1-3 ■ AT28W1-3	■ FC16W1-3 ■ FC28W1-3	■ PT16W1-3 ■ PT28W1-3	■ SC16W1-3 ■ SC28W1-3

Abbildung 5: Farbkodierung untersuchter Gehirnregionen

5.3.1 GLOBALE QUALITÄTSKONTROLLE DER RESULTATE

Bei der ersten Inspektion wurden die Arraybilddaten auf eventuell vorhandene Hybridisierungstefakte wie z.B. Blasen, Kratzer oder inhomogene Hybridisierungen kontrolliert. Nur in drei der 48 hybridisierten GeneChips® konnten Unregelmäßigkeiten der Hybridisierung festgestellt werden, die maximal 1,8 % (AT28N3), 0,4 % (FC16N2) und 0,1 % (FC28N2) der Fläche des Arrays bedeckten. Für eine gemeinsame Auswertung angefertigter Replikate wurden diese relativ geringen Anteile an Fehlhybridisierungen von *features* der jeweiligen Arrays als noch akzeptabel eingestuft. Von den internen Kontrollgenen *Actb* und *Gapdh* wurden die Signalintensitätsverhältnisse der *Probesets* von 3'- und 5'-Bereichen untersucht. GeneChips® von embryonalen Proben wiesen im Mittel Werte für *Actb* von 1,49 und für *Gapdh* von 0,98 auf, GeneChips® von postnatalen Proben etwas höhere Werte von 2,49 für *Actb* und 1,15 für *Gapdh*. Nur von den GeneChips® SC28N3 und SC28W1 wurde mit Werten von 3,16 respektive 3,13 ein angestrebtes Verhältnis von unter 3 knapp überschritten. RNAs aus embryonalem Gewebe erreichen hier einen etwas höheren Qualitätsstandard. Durchschnittlich wurden die Qualitätsmerkmale aller GeneChips® als gut und ausreichend eingestuft (vgl. Absatz 6.2).

Für die Abschätzung von biologischer und technischer Übereinstimmung der Datensätze einer Kondition wurden paarweise Pearson Korrelationskoeffizienten bestimmt. Diese sind anhand von Rohdatenwerten einzelner *features* ohne vorausgehende Normalisierung berechnet. Paaren derselben Kondition sind Werte von maximal 0,999 bis minimal 0,965 zugeordnet. Die Mittelwerte der Korrelationskoeffizienten innerhalb der Replikate einer Kondition liegen bei mindestens 0,978. Keiner der GeneChips® von Replikaten einer Kondition konnte diesen Korrelationswerten zufolge als Ausreißer identifiziert werden.

Zur globalen Qualitätsbeurteilung wurden die Gesamtverteilungen aller *Probeset*-spezifischen Signalwerte der GeneChips® nach durchgeführter Hintergrundkorrektur, Normalisierung und *probe* Summarization (GCRMA), sowie Baseline Transformation miteinander verglichen. Abbildung 6 zeigt die ermittelten Verteilungsdaten zum untersuchten embryonalen Stadium in der oberen, die zum postnatalen Stadium in der unteren Diagrammhälfte. Dargestellt sind die Interquartilsabstände und jeweiligen Mediane. Die eingezeichneten Whiskers zeigen die Quantile Q_{2,5} und Q_{97,5} der gesamten Verteilung, innerhalb deren Grenzen 95 % aller Signalwerte liegen. Unterschiedliche Hirnregionen

sind farblich gekennzeichnet, wobei den Daten des heterozygoten Genotyps generell eine hellere Farbvariante als den zugehörigen wildtypischen Kontrollen zugeordnet ist (Dieses Farbschema gilt für alle in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen). Die Breite der Verteilungen fällt innerhalb äquivalenter Konditionen der beiden Genotypen gering aus. Abweichungen sind dagegen zwischen den Quantilen $Q_{2,5}$ und $Q_{97,5}$ unterschiedlicher Regionen auszumachen. Die kortikalen Regionen im Entwicklungsstadium E15,5 zeigen dabei die größte Bandbreite an Signalwerten. Für GeneChips® postnataler Transkriptome zeigt sich eine asymmetrische Verteilung der *Probeset* Signalwerte, was auf die gemeinsame Verrechnung dieser GeneChips® mit Genchips® der embryonalen Konditionen zurückzuführen ist. Verrechnet man die 24 GeneChips® der postnatalen Konditionen getrennt von denen der embryonalen Konditionen, zeigt sich zu beiden Seiten der Mittelwerte eine gleichmäßige Verteilung.

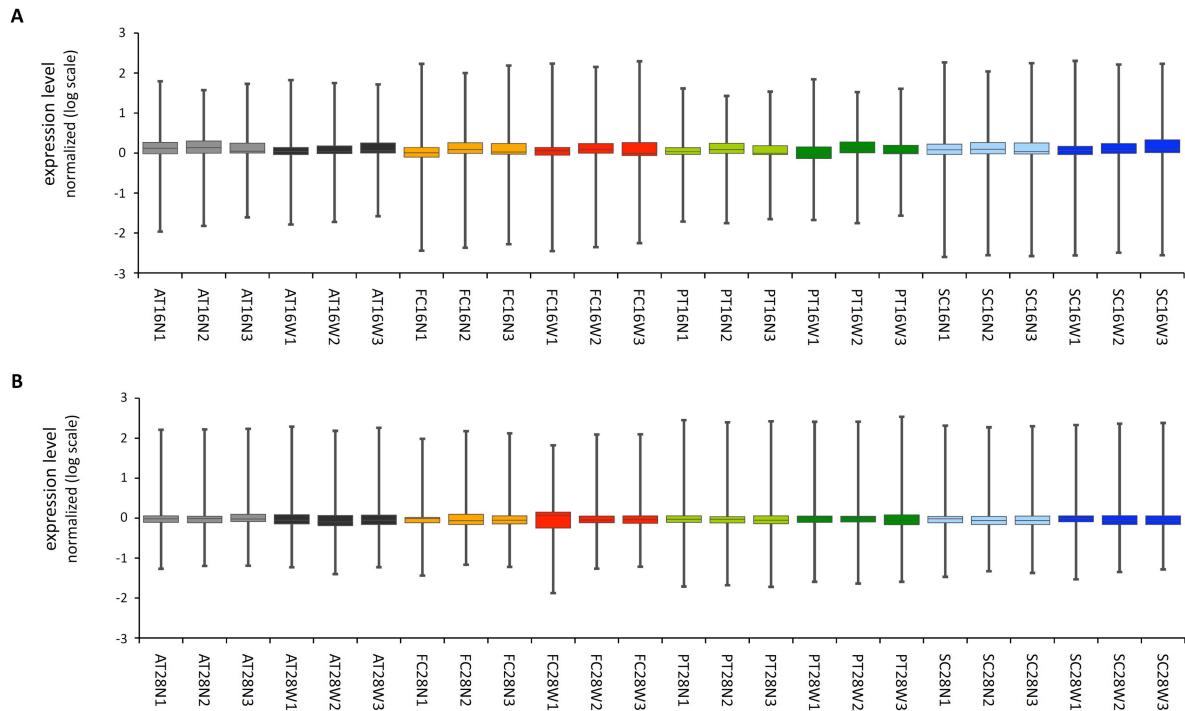


Abbildung 6: Gesamtverteilungen der GeneChip® Signalwerte

(A) Entwicklungsstadium E15,5. **(B)** Entwicklungsstadium P28. Verwendeter *probe* Summarization Algorithmus: GCRMA und Baseline Transformation. Signalwerte der Probesets von 48 GeneChips® wurden gleichzeitig kalkuliert. Boxen: Quantile Q_{25} und Q_{75} plus Mittelwerte der Verteilung. Whiskers: Quantile $Q_{2,5}$ und $Q_{97,5}$.

Eine weitere Gesamtanalyse der Transkripte erfolgte durch die Zuordnung von Detektionswahrscheinlichkeiten zu den Signalwerten der *Probesets*. Zur *probe* Summarization und Ermittlung der Signifikanzwerte (Wilcoxon’s signed-ranked-test) wurde hierfür MAS5 benutzt. Es zeigt sich, dass entsprechend dieser Analyse unabhängig von Region und Stadium zwischen 52,3 und 57,3 Prozent

ERGEBNISSE

der *Probesets* mit einem als *present* ($p < 0,05$) oder *marginal* ($0,05 \leq p < 0,065$) bewerteten Signifikanzwert detektiert werden können. Die Diagramme A und B der Abbildung 7 zeigen die über die Replikate einer Kondition gemittelten Werte. Die Unterschiede zwischen den Werten der GeneChips® fallen insgesamt gering aus. Konsistent innerhalb der drei Replikate einer Kondition als *present* oder *marginal* nachweisbar, sind 46,5 bis 51,3 Prozent aller *Probesets*. Bezieht man alle Microarrays einer Hirnregion zu einem Altersstadium, unabhängig des untersuchten Genotyps in diese Berechnung mit ein, verringern sich die Anteile auf 45,6 bis 49,8 Prozent. Diese Prozentsätze entsprechen den durch MAS5 als exprimiert bewerteten Anteilen der Transkriptome, für die basierend auf diesem *probe* Summarization Algorithmus Expressionsunterschiede einzelner Transkripte von heterozygoten und wildtypischen *Nrg1* Mäusen berechnet werden können.

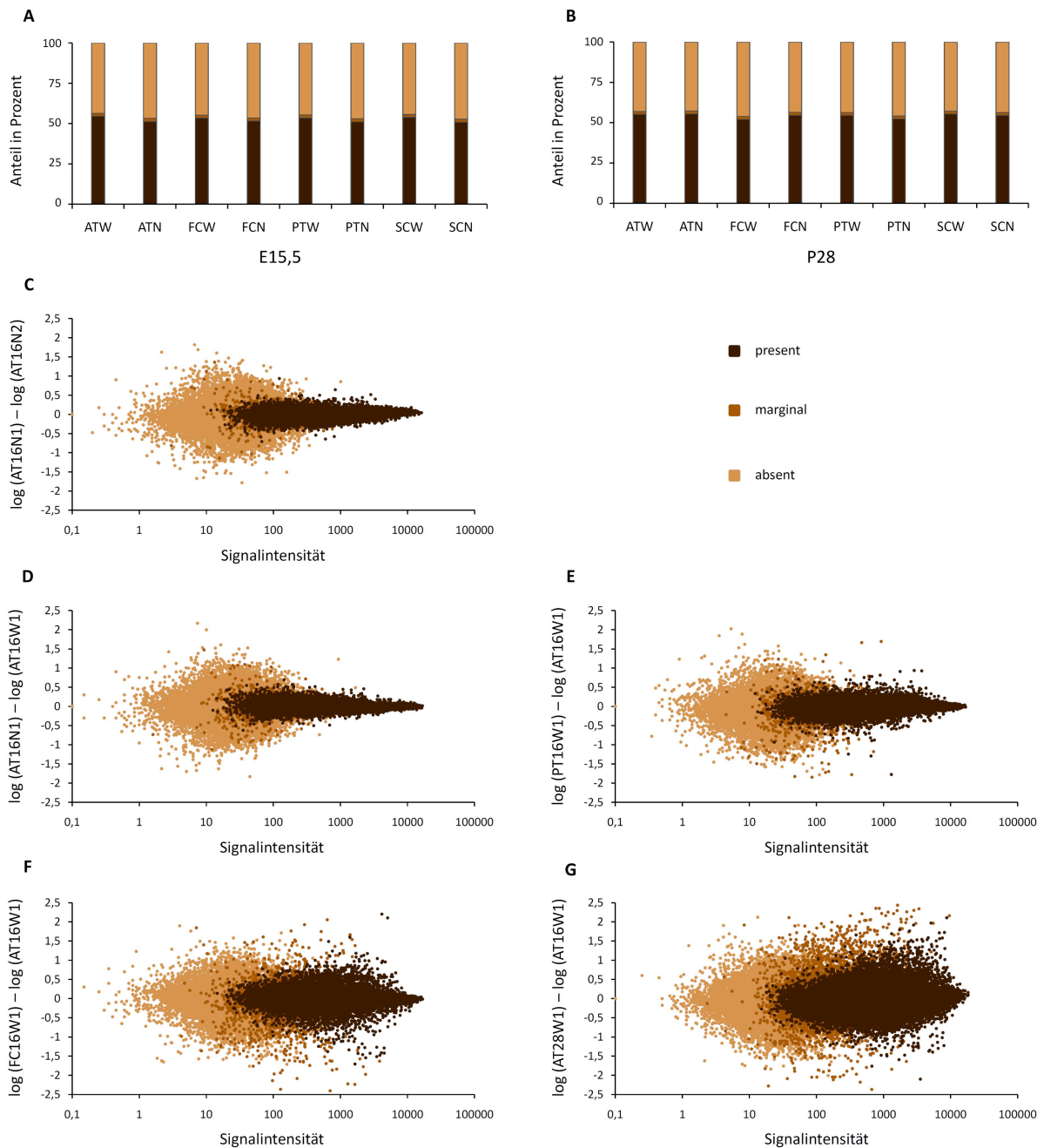


Abbildung 7: Korrelationen zwischen Replikaten, Genotypen, Regionen und Altersstadien

(A) u. (B) Anteile von Probesets mit Detektionswahrscheinlichkeiten von $p < 0,05$ (present - p), $0,05 \leq p < 0,065$ (marginal - m) und $0,065 \leq p$ (absent - a), gemittelt über die Replikate einer Kondition E15,5 bzw. P28. (C) AT16N1 vs. AT16N2, (D) AT16N1 vs. AT16W1, (E) PT16W1 vs. AT16W1, (F) FC16W1 vs. AT16W1, (G) AT28W1 vs. AT16W1. Dunkelbraune Wertepaare - p/p und p/m; braune Wertepaare - p/a und m/m; hellbraune Wertepaare - m/a und a/a; (p - present, m - marginal, a - absent).

Abbildung 7C-G zeigt ratio-intensity Plots unterschiedlicher GeneChip® Datensätze. Dabei sind die Signalwerte der Probesets im Koordinatensystem entlang der Abszisse dargestellt. Der Logarithmus des Expressionsquotienten ist der Ordinatenachse zu entnehmen. Entsprechend analogem Signifikanzlevel sind die Datenpunkte farblich kodiert (dunkelbraun – present/present oder

present/marginal, braun – *marginal/marginal* oder *present/absent* (*absent*: $0,065 < p$) und hellbraun – *absent/marginal* oder *absent/absent*). Aus dieser Art der Signalwertedarstellung aller Probesets im Vergleich zweier GeneChips® geht erkennbar hervor, dass die Gesamttranskriptome in zunehmendem Maße divergieren, je weiter die untersuchten Proben räumlich und zeitlich voneinander abweichen. Die Unterschiede zwischen Replikaten ein und derselben Kondition liegen dabei in der gleichen Größenordnung wie die Unterschiede zwischen den Genotypen. Einem Auswahlkriterium von mindestens 1,5facher Regulation und Signifanzwerten von $p < 0,065$ genügen in den Vergleichen AT16N1 vs. AT16W1 1405 *Probesets*, PT16W1 vs. AT16W1 2815 *Probesets*, FC16W1 vs. AT16W1 4989 *Probesets* und AT28W1 vs. AT16W1 11882 *Probesets* (siehe Abbildung 7D-G). Auch anhand dieser Zahlen ist festzustellen, dass die Differenzen zwischen den untersuchten Genotypen geringer zwischen unterschiedlichen Regionen sind und die Streubreite der Punktwolke unterschiedlicher Altersstadien am deutlichsten ist.

Innerhalb replizierter GeneChips® einer Region eines Altersstadiums durchgehend mit *present* oder *marginal* bewertete Signale existieren bis hinunter zu einem nominellen Wert von circa 25. Im Signalbereich zwischen 75 und 100 unterschreiten zwischen 14 und 24 Prozent der *Probesets* ein Signifikanzlevel von $p < 0,065$. Je höher die detektierten Signalwerte steigen, desto mehr wird vorhandener Hintergrund der Arrays übertroffen und desto höher liegt dadurch die Detektionswahrscheinlichkeit einzelner Transkripte.

5.3.2 TRANSKRIPTAUSWAHL

Für eine fundiertere Analyse einzelner, veränderter Transkripte wurde als zuverlässiger Algorithmus zur *probe* Summarization GCRMA und Genespring GX 10 genutzt. Für die Auswahl konsistent differentiell exprimierter Transkripte, wurden folgende Kriterien als notwendig festgelegt. Erstens eine mindestens 1,5fache Deregulation, gemittelt über die drei angefertigten Replikate einer Kondition in Mäusen des Genotyps *Nrg1^{+/-}* gegenüber *Nrg1^{+/+}* und zweitens ein im Vergleich der Genotypen statistisches Signifikanzlevel des zweiseitigen, homoskedastischen t-Tests von $p < 0,05$. Je nach Region und Altersstadium genügen zwischen 5,7 ‰ und 1,6 ‰ der *Probesets* diesen Anforderungen. Genaue Zahlen der in Listen zusammengefassten, differentiell exprimierten Transkripte einzelner Regionen sind Tabelle 8 zu entnehmen. Embryonal befinden sich insgesamt 676 *Probesets*, postnatal 427 *Probesets* in einer oder mehreren Auswahllisten. In der Zusammenfassung des frontalen Systems (AT \cup FC \setminus PT \cup SC) findet man embryonal 450 *Probesets* und postnatal 177 *Probesets* als dereguliert aufgelistet. Schaut man sich die in Venn-Diagrammen (Abbildung 8) dargestellten Schnittmengen der Listen an, stellt man fest, dass diese sehr klein sind.

Die mit den ausgewiesenen *Probesets* detektierten Transkripte werden demnach mehrheitlich regionspezifisch dereguliert.

Tabelle 8: Auflistung der kriterienerfüllenden *Probesets*

Anzahl ausgewählter Transkripte (Signifikanzlevel $p < 0,05$ (t-Test), fold change $> 1,5$); Anzahl regions- und altersspezifisch ausgewählter *Probesets* in Klammern.

	E15,5				P28			
Transkripte (altersspezifisch)	676 (657)				427 (408)			
Region	AT	FC	PT	SC	AT	FC	PT	SC
Transkripte (regionspezifisch)	259 (226)	238 (206)	71 (56)	166 (143)	112 (103)	82 (73)	156 (144)	102 (92)

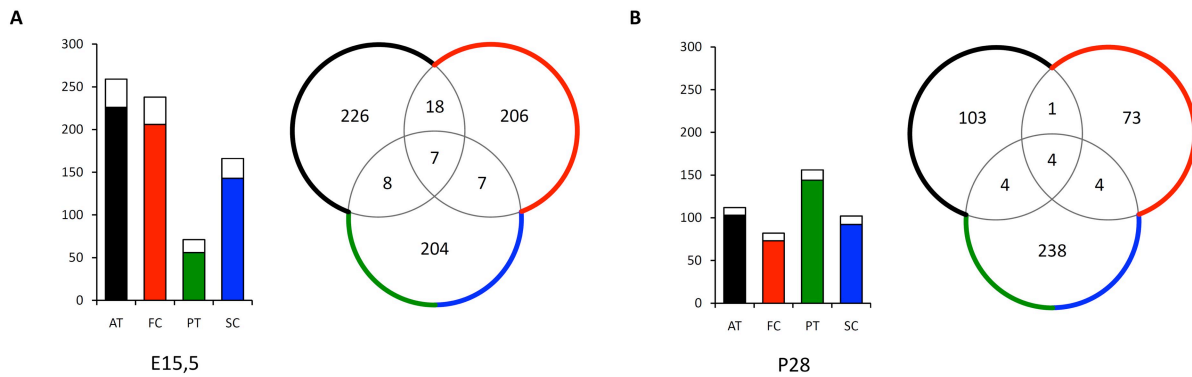


Abbildung 8: Auswahl deregulierter *Probesets*

(A) E15,5 (B) P28. Auswahlkriterien: Signifikanzlevel von $p < 0,05$ (t-Test) und gleichzeitigem fold change größer 1,5. Regionspezifisch ausgewählte *Probesets* sind als farbige Anteile der Balkendiagramme abgebildet. Venn Diagramme: Schnittmengen der Transkripte untersuchter Regionen. AT (schwarz), FC (rot) PT/SC (grün/blau).

Schnittmengen des frontalen Systems abzüglich der Kontrollen ($AT \cap FC \setminus PT \cup SC$): 18 Transkripte bei der Untersuchung von E15,5 (17 davon annotiert) - *Cfh, Cpm, Dpf1, Gbas, Gria1, Klf12, Nrp2, Rbbp4, Rybp, Smg5, Srrm2, Vabp, Vps37a, Zbtb12, 4921513D23Rik, 4933439C20Rik, AU022434*; 1 Transkript bei der Untersuchung von P28 - *Irf*.

5.4 EXPRESSIONSSTUDIEN AUSGEWÄHLTER TRANSKRIPTE

Basierend auf der GeneChip®-Analyse der Hirnarealtranskriptome von Mäusen des Genotyps *Nrg1*^{+/-} und *Nrg1*^{+/+} sind im Folgenden weiterführende und der Validierung der GeneChip® Resultate dienende Studien einzelner Gene aufgeführt.

5.4.1 NRG1 (NEUREGULIN-1)

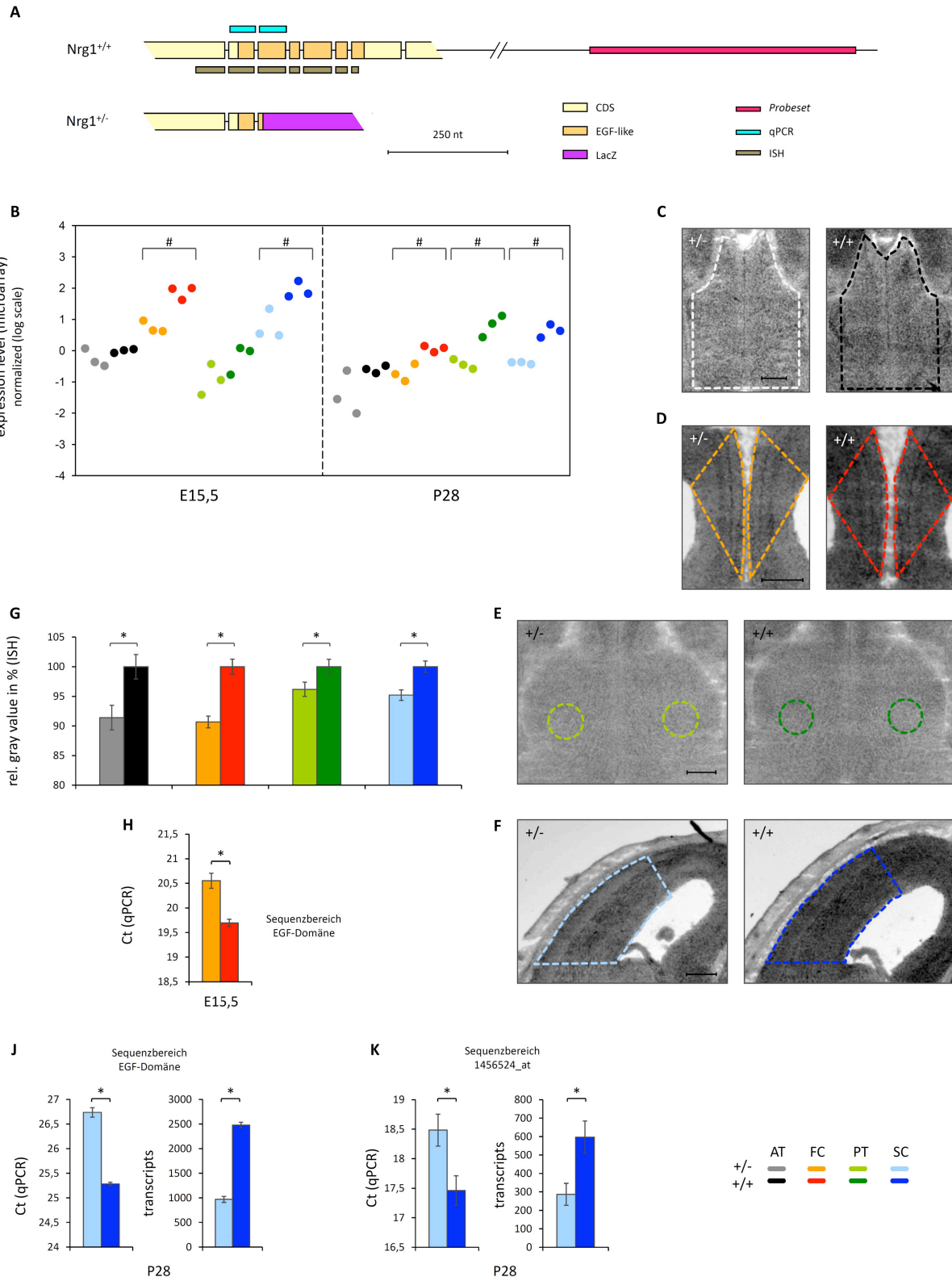
Die Funktionen dieses Gens während der Entwicklung des zentralen Nervensystems sind bereits ausführlich in Absatz 2.2 aufgeführt. An dieser Stelle dient die Untersuchung der Expression von Transkripten dieses Gens der Etablierung und Kontrolle der verwendeten Nachweismethoden. Die von den Genchips® detektierten Expressionslevel (Tabelle 9 und Abbildung 9B) von *Nrg1* zeigen in allen untersuchten Gehirnarealen des heterozygoten Genotyps *Nrg1*^{+/-} gegenüber den wildtypischen Kontrollen des Genotyps *Nrg1*^{+/+} geringere Werte. Die zur Auswahl von, durch die Veränderung der Gendosis an *Nrg1* betroffenen Gene angelegten Kriterien, werden für Transkripte von *Nrg1* in den embryonalen kortikalen Regionen FC und SC übertroffen. In den thalamischen Regionen kann dies nicht beobachtet werden. Zum postnatalen Zeitpunkt P28 finden sich im Vergleich der Transkriptome beider Genotypen signifikante Unterschiede in FC, PT und SC. Detektiert wurden die Transkripte von *Nrg1* durch das Probeset 1456524_at. Die Expressionsmuster von *Nrg1* wurden durch ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten untersucht (Abbildung 9C-F). Verwendet wurde eine Sonde, die Komplementarität zum Sequenzabschnitt aufweist, der für die EGF-Domäne kodiert (Abbildung 9A). Dadurch konnte die Expression von allen möglichen *Nrg1*-Isoformen erfasst werden. Im Cortex kann *Nrg1* in der SVZ, der Intermediärzone (IMZ) und der oberen Schicht der CP nachgewiesen werden. Ganz ähnliche Färbemuster wurden in dieser Region für viele der untersuchten Gene erhalten (vgl. Expression von *Mtmt7*, *Pcm1*, *Wnt5a*, *Neo1*). Konsistent zu den Ergebnissen der GeneChips® ist die Expression im thalamischen Gewebe schwach und nur diffus auszumachen. Im embryonalen Thalamus werden die einzelnen Kernanlagen auf koronalen Schnitten als Streifen entlang der dorsoventralen Ausrichtung sichtbar (siehe Modellzeichnung Abbildung 2D). In Gehirnen des Genotyps *Nrg1*^{+/+} können Transkripte von *Nrg1* durch eine intensivere Färbung deutlicher detektiert werden. Im Thalamus zeichnet sich eine etwas stärkere Färbung im Bereich der Habenulae ab. Von einem gewissen Grundlevel der Expression wurde auch in PT ausgegangen. In einer Quantifizierung von ISH aus mehreren, unabhängig voneinander untersuchten Hirnpaaren, konnten für die embryonalen Hirnregionen AT, FC, PT und SC signifikant unterschiedliche Färbeintensitäten ausgemacht werden (Abbildung 9G).

Tabelle 9: Nrg1: GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1456524_at

(#) Erfüllte Auswahlkriterien ($p < 0,05$ (t-Test) und fold change $> 1,5$).

region	E15,5				P28			
	AT	FC	PT	SC	AT	FC	PT	SC
fold change	1,2 down	2,2 down	1,6 down	2,2 down	1,7 down	1,7 down	2,4 down	2,0 down
p-value	2,1E-01	2,4E-03	1,5E-01	2,2E-02	1,2E-01	1,0E-02	4,7E-03	1,1E-03
mean norm. Nrg1 ^{+/+}	0,00	1,87	-0,23	1,93	-0,60	0,06	0,80	0,63
mean raw Nrg1 ^{+/+}	41	150	36	158	27	43	73	64
		(#)		(#)		(#)	(#)	(#)

ERGEBNISSE



Überprüft wurden die Expressionsverhältnisse zwischen den Genotypen desweiteren durch quantitative realtime RT-PCR. Detektiert wurden dabei Sequenzbereiche der EGF-Domäne (FC E15,5 und SC P28) (Abbildung 9A,H,J) und darüber hinaus ein entsprechender Sequenzabschnitt, der auch vom GeneChip® *Probesets* von *Nrg1* detektiert wurde (SC P28) (Abbildung 9K). In allen untersuchten Fällen wurde die Reduktion der Expressionsniveaus von *Nrg1* in Mäusen des Genotyps *Nrg1*^{+/-} gegenüber *Nrg1*^{+/+} experimentell bestätigt. Niedrigere C_t-Werte sind hier gleichbedeutend mit einer größeren Ausgangsmenge des detektierten Transkripts. In SC P28 wurden die Transkriptmengen anhand parallel amplifizierter Proben bekannter Konzentrationen von *Nrg1* absolut gemessen (Abbildung 9J,K). Dadurch wird deutlich, dass mit 2500 Transkripten gegenüber 600 Transkripten durch die Amplifikation der EGF-Domänensequenz eine höhere Anzahl erfasst wird, als dies für den *Probeset*-Detektionsbereich der Fall ist. Dies deutet darauf hin, dass durch das *Probeset* des GeneChips® nicht alle *Nrg1*-Isoformen detektiert werden. Ein Hinweis darauf, dass die universelle Halbierung der Gendosis in verschiedenen Regionen Änderungen unterschiedlicher Transkripte hervorruft ist das unterschiedliche Ausmaß der Downregulation von *Nrg1* im Genotyp *Nrg1*^{+/-}. In der Detektion aller Isoformen im Bereich der EGF-Domänen (Abbildung 9 J) kann ein von fold change von 2,6 errechnet werden, im Falle des *Probeset*-Detektionsbereiches (Abbildung 9 K) fällt dieser mit 2,1 etwas geringer aus. Für die embryonale Region FC (Abbildung 9H) kann ein fold change von 1,75 festgestellt werden.

Sowohl durch die quantitative Auswertung von ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten, als auch durch quantitative RT-PCR konnte der in der vorangehenden Analyse der GeneChips® festgestellte Expressionunterschied zwischen Mäusen des Genotyps *Nrg1*^{+/-} und *Nrg1*^{+/+} also quantitativ bestätigt werden. Die durchgeführten Methoden sind daher für die Validierung von Microarray-Experimenten geeignet.

Abbildung 9: Expressionsanalyse *Nrg1*

(A) Ausschnitt der Genstruktur von *Nrg1* im Bereich der EGF-ähnlichen Domäne. Detektionsbereiche des *Probesets* (2876 nt vom 3`Ende der Referenzsequenz NM_178591.2), der Sonden für ISH und des Amplifikationsfragments der qPCR sind farblich gekennzeichnet **(B)** GeneChip® Detektionswerte, *Probeset* 1456524_at. Hellerer Farbton: Genotyp *Nrg1*^{+/-}; dunklerer Farbton: *Nrg1*^{+/+}; # Signifikanzlevel p<0,05 (t-Test) bei gleichzeitigem Expressionslevelunterschied größer 1,5. **(C-F)** ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten der Gehirnaareale AT (schwarz); FC (rot); PT (grün); SC (blau) E15,5. **(G)** Quantifizierung der ISH. Ausgewertete Schnitte von drei unabhängigen Hirnpaaren (AT n_{Schnitte}=16^{+/-}/16^{+/+}; FC n_{Schnitte}=35^{+/-}/30^{+/+}; PT n_{Schnitte}=41^{+/-}/38^{+/+}; SC n_{Schnitte}=48^{+/-}/45^{+/+}), Mittelwert ± SEM. * Signifikanzlevel p<0,05 (t-Test). **(H)** Quantitative RT-PCR, FC E15,5; Sequenzbereich der EGF-Domäne. **(J)** Quantitative RT-PCR wie unter H, aber SC P28; relative und absolute Quantifizierung. **(K)** Quantitative RT-PCR, SC P28; Sequenzbereich des *Probesets* 1456524_at. Relative und absolute Quantifizierung; Mittelwert ± SEM. * Signifikanzlevel p<0,05 (t-Test). Skalierung 250 µm

5.4.2 MTMR7 (MYOTUBULARIN RELATED PROTEIN 1)

MTMR7 gehört zur Proteinfamilie der Myotubularine, von denen einige Mitglieder katalytische Phosphataseaktivität besitzen und die Moleküle Phosphatidylinositol 3-Phosphat (PI3P) und Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphat (PI(3,5)P2) dephosphorylieren. Diese Phosphoinositide sind insbesondere an der Sortierung, dem Transport und der Fusion endosomaler Vesikel beteiligte *second messenger* Signalmoleküle (Laporte et al.. 2003). In Experimenten an *Caenorhabditis elegans* konnte experimentell nachgewiesen werden, dass orthologe Phosphatasen an der Endozytose beteiligt sind (Xue et al.. 2003). In Tabelle 10 sind die Daten der GeneChip® Analyse für das *Probeset 1447831_s_at* von *Mtmr7* zusammengefasst.

Tabelle 10: *Mtmr7*: GeneChip® Detektionswerte, *Probeset 1447831_s_at*

(#) Erfüllte Auswahlkriterien (p<0,05 (t-Test) und fold change > 1,5).

	E15,5				P28			
region	AT	FC	PT	SC	AT	FC	PT	SC
fold change	1,9 down	1,9 down	1,8 down	1,7 down	1,7 down	1,8 down	1,7 down	1,7 down
p-value	5,9E-03	4,0E-03	9,1E-03	2,1E-02	2,8E-04	2,9E-03	2,4E-04	6,5E-04
mean norm. Nrg1 ^{+/+}	-0,15	-0,28	0,55	-0,19	0,49	0,84	1,47	1,09
mean raw Nrg1 ^{+/+}	1393	1274	2270	1357	2177	2778	4302	3297
	(#)	(#)	(#)	(#)	(#)	(#)	(#)	(#)

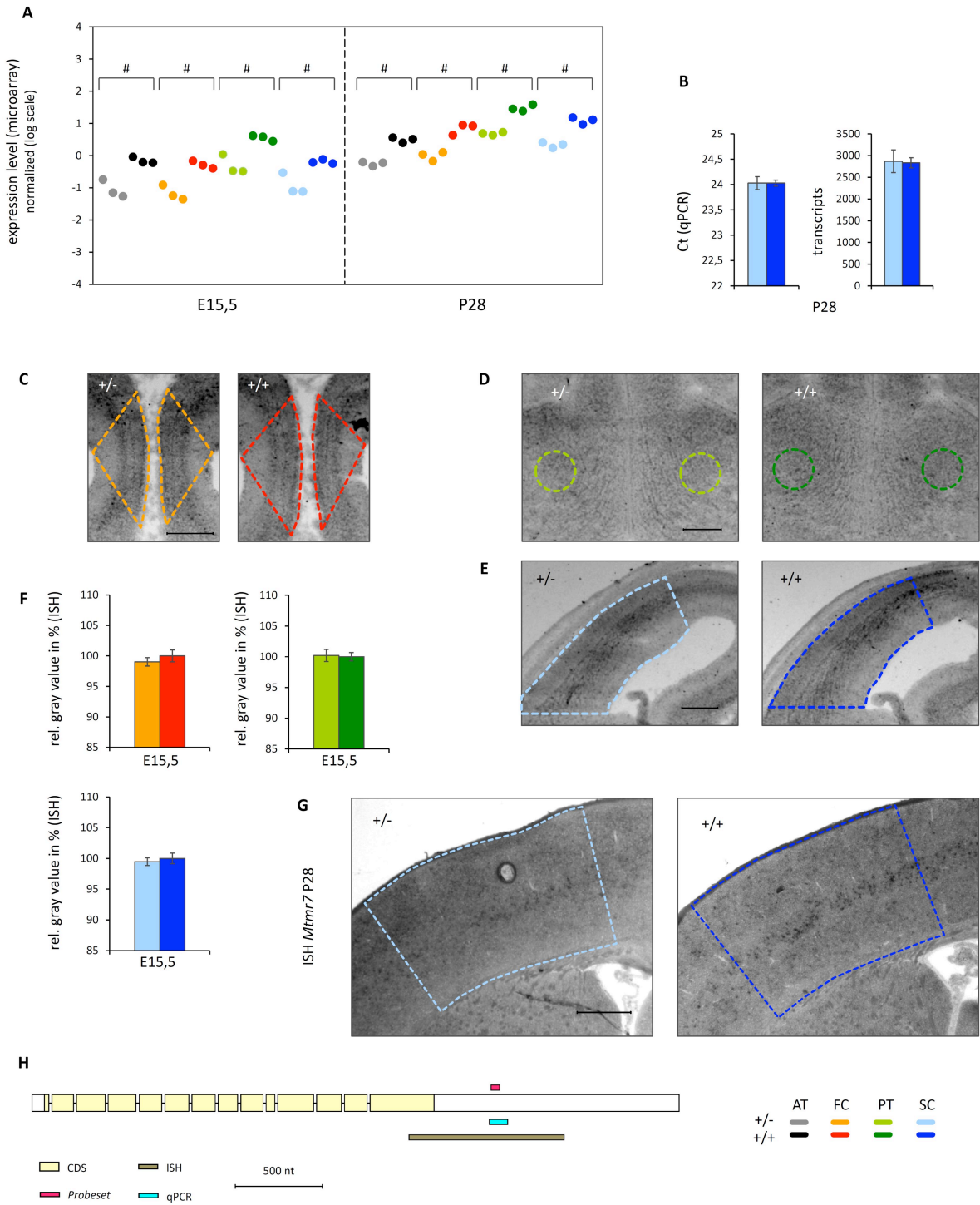


Abbildung 10: Expressionsanalyse *Mtmr7*

(A) GeneChip® Detektionswerte, *Probeset 1447831_s_at*. Hellerer Farbton: Genotyp *Nrg1*^{+/-}; dunklerer Farbton: *Nrg1*^{+/+}; # Signifikanzlevel p<0,05 (t-Test) bei gleichzeitigem Expressionslevelunterschied größer 1,5. (B) Quantitative RT-PCR, FC P28. (C-E) ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten der Gehirnaareale FC (rot); PT (grün); SC (blau) E15,5. (F) Quantifizierung der ISH. Ausgewertete Schnitte eines Hirnpaares (FC n_{Schnitte}=35^{+/-}/30^{+/+}; PT n_{Schnitte}=7^{+/-}/8^{+/+}; SC n_{Schnitte}=9^{+/-}/8^{+/+}) Mittelwert ± SEM. (G) ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten, P28; SC blau markiert. Skalierung 250 µm (C-E), 500 µm (G). (H) Ausschnitt der Genstruktur von *Mtmr7* mit farblicher Kennzeichnung der Detektionsbereiche des *Probesets*, der Sonden für ISH und des Amplifikationsfragments der qPCR.

Die Signalwerte des Probesets *1447831_s_at* sind in den Transkriptomen aus allen 4 untersuchten Hirnarealen zu beiden Entwicklungsstadien E15,5 und P28 in heterozygoten *Nrg1^{+/-}* Mäusen konsistent gegenüber den wildtypischen *Nrg1^{+/+}* Kontrollen um einen Faktor zwischen 1,7 und 1,9 verringert und erfüllen die angelegten Auswahlkriterien. Demzufolge gehört *Mtmr7* zu den in Abbildung 8 dargestellten 7 Transkripten, die sich zum Embryonalstadium E15,5 in allen Auswahllisten befinden und zugleich zu den 4 Transkripten, für die dies auch zum postnatalen Stadium P28 zutrifft. Die mittleren Detektionswerte der GeneChip® Triplikate von beiden Vergleichskonditionen (*Nrg1^{+/-}* vs. *Nrg1^{+/+}*) liegen mit 1274 bis 4302 in allen Regionen im zuverlässigen Detektionswertebereich. Die normalisierten Expressionsdaten des untersuchten Probesets von 48 GeneChips® sind in Abbildung 10A graphisch dargestellt. Erkennbar sind die innerhalb einer Region durchweg höheren Expressionswerte im wildtypischen Genotyp. Ein innerhalb der vorgenommenen Transkriptomstudie herausragendes Charakteristikum von *Mtmr7* ist die Tatsache, dass das zugehörige Probeset *1447831_s_at* von allen angewandten Auswertelgorithmen (MAS5, RMA, GCRMA, PLIER16 und LiWong) in gleicher Weise den Auswahlkriterien standhält und deshalb auf bioinformatischer Grundlage als tatsächlich dereguliertes Gen zu bewerten ist.

Abbildung 10B zeigt das Ergebnis der quantitativen Expressionsanalyse durch qPCR der für dieses Experiment exemplarisch ausgewählten Region FC zum Entwicklungsstadium E15,5. Der von den GeneChips® gemessene Expressionsunterschied von *Mtmr7* konnte hierbei nicht bestätigt werden. Die wiederholt durchgeführten quantitativen Messungen von Transkripten dieses Gens deuten, unabhängig vom Genotyp *Nrg1^{+/-}* oder *Nrg1^{+/+}*, auf unveränderte Expressionslevel in Transkriptomen des embryonalen frontalen Cortex, FC E15,5. An koronalen Kryomikrotomschnitten konnte durch ISH die Expression im Gewebe lokalisiert. Embryonal kann im Bereich des frontalen Cortex Abbildung 10C eine Expression in der SVZ, der IMZ und der CP ausgemacht werden. Abbildung 10D und E zeigen die Expressionen von *Mtmr7* in anderen Hirnbereichen. Die Quantifizierungen der Färbeintensitäten Abbildung 10F ergeben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen und können das Ergebnis der GeneChips® nicht bestätigen. Zum postnatalen Untersuchungszeitpunkt P28 wurde insgesamt nur ein schwaches Färbemuster erhalten, das sich vor allem auf den Cortex beschränkt und dort Zellen der Schichten IV und V hervorhebt (Abbildung 10G). Hinweise für Expressionsunterschiede bei P28 wurden nicht gefunden und daher nicht weiter quantifiziert. Abbildung 10H zeigt die verschiedenen Detektionsbereiche der verwendeten Nachweismethoden.

5.4.3 PCM1 (PERICENTRIOLAR MATERIAL 1 PROTEIN)

Als Bestandteil des pericentriolären Materials übernimmt *Pcm1* eine essentielle Rolle bei der Organisation centrosomaler Proteine und der Bindung von Mikrotubuli an das Centrosom (Dammermann & Merdes 2002). Im Nervensystem ist *Pcm1* an der embryonalen Neurogenese beteiligt und für eine korrekte Morphologie von Axonen erforderlich (de Anda et al.. 2010, Ge et al.. 2010). Mehrere Assoziationsstudien deuten darauf hin, dass ein Zusammenhang dieses im Zytoband 8p22-p21.3 gelegenen Gens mit Schizophrenie und im Speziellen auch mit einem Volumenverlust an grauer Substanz im Orbitofrontallappen schizophrener Patienten besteht (Datta et al.. 2010, Gurling et al.. 2006, Moens et al.. 2010).

Nach der Auswertung der vergleichenden GeneChip® Analysen ist *Pcm1* ein weiteres, zwischen den Genotypen *Nrg1*^{+/-} und *Nrg1*^{+/+} differentiell exprimiertes Gen. Dies gilt sowohl für das embryonale Stadium E15,5, als auch für das postnatale Stadium P28. Über das *Probeset 1438528_at* der Arrays erhaltene Detektionssignale erfüllen die angelegten Auswahlkriterien (Absatz 5.3.2) in allen untersuchten Regionen. Der Detektionsbereich des *Probesets* wird dabei *Pcm1* zugeordnet, liegt aber nicht innerhalb der Referenzsequenz der mRNA. Die Expression ist in heterozygoten *Nrg1*^{+/-} Tieren gegenüber wildtypischen *Nrg1*^{+/+} Tieren in Vergleichskonditionen um einen Faktor zwischen 3,9 und 6,8 signifikant erhöht. Nach diesen Werten ist *Pcm1* unter den signifikant deregulierten Genen eines der am stärksten von der genetischen Manipulation von *Nrg1* betroffenen Gene. Die aufgelisteten Daten dazu sind der anschließenden

Tabelle 11 zu entnehmen. Daraus geht auch hervor, dass *Pcm1* zum Zeitpunkt E15,5 deutlich höhere Expressionswerte erreicht als zum Zeitpunkt P28.

Tabelle 11: *Pcm1*: GeneChip® Detektionswerte, *Probeset 1438528_at*

(#) Erfüllte Auswahlkriterien (p<0,05 (t-Test) und fold change > 1,5).

region	E15,5				P28			
	AT	FC	PT	SC	AT	FC	PT	SC
fold change	6,8 up	4,3 up	4,3 up	5,3 up	5,7 up	6,0 up	4,4 up	3,9 up
p-value	7,1E-03	4,0E-03	2,3E-02	3,2E-04	4,3E-04	9,2E-03	3,6E-05	1,7E-03
mean norm. <i>Nrg1</i> ^{+/-}	-0,20	0,72	0,10	0,46	-2,87	-2,78	-2,71	-2,56
mean raw <i>Nrg1</i> ^{+/-}	80	150	108	120	12	13	13	15
	(#)	(#)	(#)	(#)	(#)	(#)	(#)	(#)

ERGEBNISSE

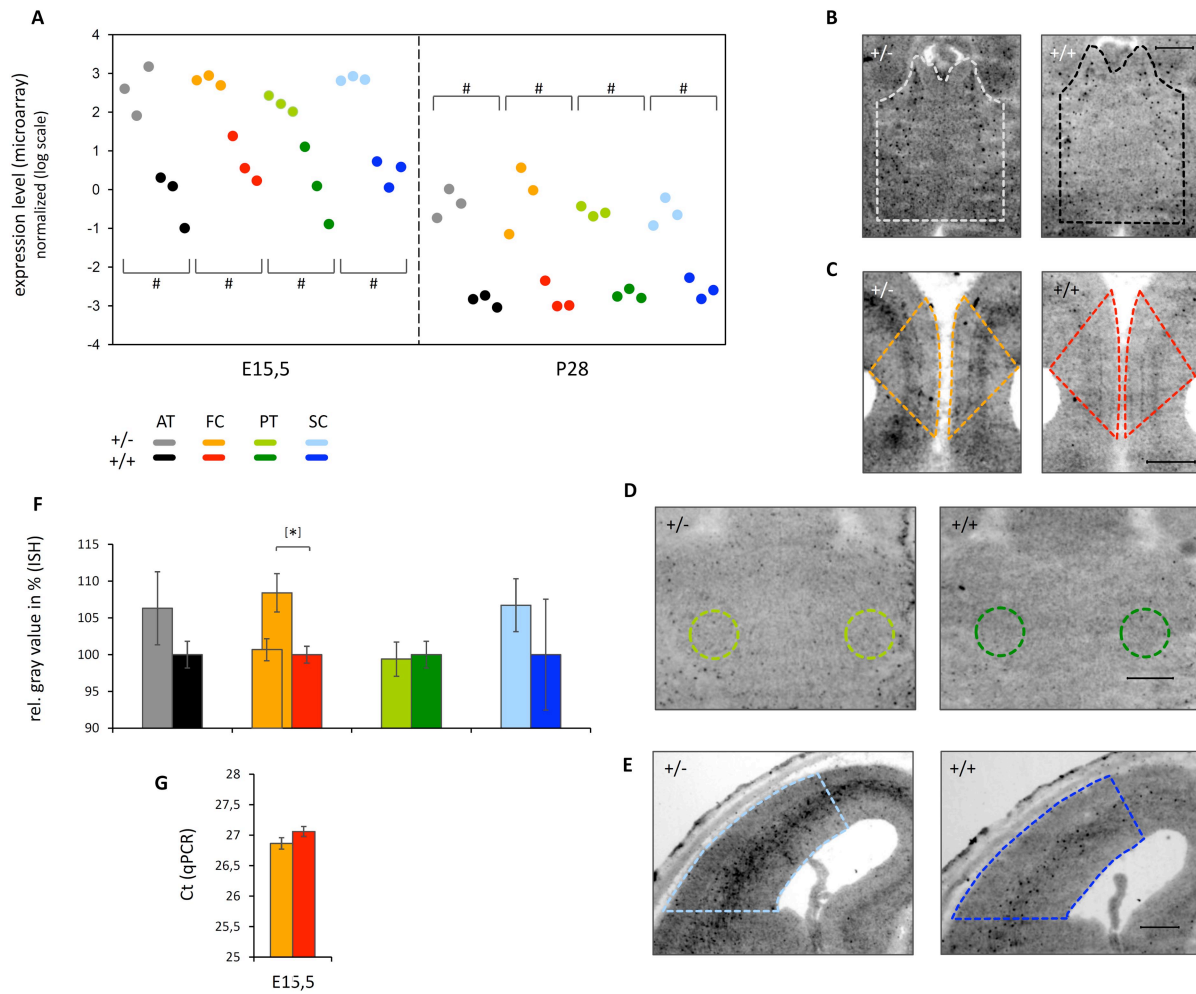


Abbildung 11: Expressionsanalyse *Pcm1*

(A) GeneChip® Detektionswerte, *Probeset 1438528_at*. Hellerer Farbton: Genotyp *Nrg1*^{+/-}; dunklerer Farbton: *Nrg1*^{+/+}; # Signifikanzlevel p<0,05 (t-Test) bei gleichzeitigem Expressionslevelunterschied größer 1,5. **(B-E)** ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten der Gehirnaeare AT (schwarz); FC (rot); PT (grün); SC (blau) E15,5. **(F)** Quantifizierung der ISH. Ausgewertete Schnitte von 8 (FC[*]), bzw. 7 (FC) und 4 (AT,PT,SC) unabhängigen Hirnpaaren (AT n_{Schnitte}=20^{+/-}/19^{+/+}; FC n_{Schnitte}=[71^{+/-}/85^{+/+}] 57^{+/-}/73^{+/+}; PT n_{Schnitte}=49^{+/-}/35^{+/+}; SC n_{Schnitte}=41^{+/-}/34^{+/+}) Mittelwert ± SEM. * Signifikanzlevel p<0,05 (t-Test). **(G)** Quantitative RT-PCR, FC E15,5; Mittelwert ± SEM. Skalierung 250 µm.

Pcm1 zählt ebenso wie *Mtmt7* (5.4.2) zu den in Abbildung 8 dargestellten 7 Transkripten, die sich im Embryonalstadium E15,5 in allen Auswahllisten befinden und zugleich zu den 4 Transkripten, für die dies auch im postnatalen Stadium P28 zutrifft. Die normalisierten Daten des untersuchten *Probesets* von 48 GeneChips® sind in Abbildung 11A graphisch dargestellt. In diesem Fall sind die Expressionswerte einzelner Konditionen des heterozygoten Genotyps *Nrg1*^{+/-} gegenüber denen der Vergleichsregionen des wildtypischen Genotyps *Nrg1*^{+/+} durchweg erhöht. In Abbildung 11B-E sind Ausschnitte von ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten der Gehirnen beider Genotypen E15,5 gezeigt, die das Expressionsmuster von *Pcm1* in den untersuchten Regionen AT, FC, PT und SC

zeigen. Deutliche Färbeintensitäten werden durch die verwendete Sonde in kortikalen Bereichen erhalten und beenden sich dort im Bereich der SVZ. Die kortikale Platte wird von der Färbung ausgespart und *Pcm1* scheint dort nicht exprimiert zu werden. Im Thalamus sind lediglich im anterioren Bereich diffuse Färbungen zu beobachten. Die quantitative Analyse umfasst Schnittebenen durch die Regionen AT, PT und SC aus paarweisen Vergleichen von jeweils 4 untersuchten Gehirnen beider Genotypen. Trotz der individuellen Unterschiede der gezeigten ISH an Schnitten durch SC konnten innerhalb dieser Regionen keine signifikanten Unterschiede in den gemessenen Expressionswerten festgestellt werden (Abbildung 11F). Ebenso wenig wurde dies für die thalamischen Regionen festgestellt. Die quantitative Analyse von FC umfasst für diesen Auswahlbereich die paarweisen Vergleiche von jeweils 8 Gehirnen der Genotypen *Nrg1*^{+/-} und *Nrg1*^{+/+}. Die aufgenommenen Datenwerte erreichen in der Gesamtanalyse einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen. Die Mediane der Grauwerte aller Pixel innerhalb der Auswahlregionen von ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten sind bei heterozygoten Tieren durchschnittlich um 8,4 % gegenüber den gemessenen Werten der Kontrollschnitte erhöht. Die Vergleiche einzelner Paare weichen allerdings in unterschiedlichem Maße von diesem Gesamtergebnis ab und sind mitunter gegensätzlich, sodass im Genotyp *Nrg1*^{+/-} u.U. schwächere Expressionen gemessen werden, als im Genotyp *Nrg1*^{+/+}. Die Daten der einzelnen Vergleichspaare von Gehirnen des Genotyps *Nrg1*^{+/-} und *Nrg1*^{+/+} stellen sich wie folgt dar: 3 x signifikant erhöhte Werte, 1 x signifikant niedrigere Werte in *Nrg1*^{+/-}. In 4 weiteren Vergleichen konnte kein signifikanter Unterschied der Genotypen ausgemacht werden. Nimmt man die dem Vergleichspaar zugehörigen Schnitte mit der größten gemessenen Differenz in den Grauwerten (durchschnittlich 40 % höhere Werte bei *Nrg1*^{+/-} gegenüber *Nrg1*^{+/+}) aus der zusammenfassenden Auswertung heraus, nivellieren sich die Expressionsniveaus der Genotypen *Nrg1*^{+/-} und *Nrg1*^{+/+}. Ähnliche Effekte können auch in den Regionen AT, PT und SC ohne signifikante Unterschiede beobachtet werden. Die Varianz dieses Gens in einzelnen Tieren ist dementsprechend gegenüber der Gesamtpopulation relativ hoch. Zur Ergebnisbestätigung wurde darüber hinaus an Proben des FC E15,5, quantitative realtime RT-PCR durchgeführt. Das Ergebnis dieses Experiments lässt keinen statistisch signifikanten Unterschied von *Pcm1* zwischen den untersuchten Genotypen erkennen (Abbildung 11G).

5.4.4 GRIA1 (GLUTAMATE RECEPTOR, IONOTROPIC, AMPA 1)

Dieses Gen kodiert für einen ionotropen Glutamat-Rezeptoren, der pharmakologisch durch den Agonisten AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propionat) aktiviert werden kann. Über diesen Kationenkanal werden in Folge einer Bindung des exzitatorischen Neurotransmitters

ERGEBNISSE

Glutamat schnelle synaptische Erregungen übertragen, indem die chemischen Signale der Präsynapse in postsynaptische Potentiale umgewandelt werden. Zusammen mit NMDA Rezeptoren übernehmen AMPA Rezeptoren eine zentrale Rolle bei der synaptischen Plastizität im ZNS. *ErbB4* vermittelte Effekte von *Nrg1* auf die Bildung und Funktion glutamaterger Synapsen konnten bereits gezeigt werden (Li et al. 2007). Genetische Defizite in der NRG1 Signalübertragung führen demnach zu einer Hypofunktionalität des glutamatergen Systems. Dazu passend weisen Mäuse mit einem knockout von *Gria1* Verhaltensabnormitäten auf, die eine potentielle Rolle dieses Gens an der Pathophysiologie von Schizophrenie untermauern (Wiedholz et al. 2008) und in genomweiten Expressionsanalysen des humanen PFC konnten Veränderungen dieses Gens in schizophrenen Patienten beobachtet werden (Choi et al. 2009).

Tabelle 12: *Gria1*: GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1448972_at

(#) Erfüllte Auswahlkriterien ($p < 0,05$ (t-Test) und fold change $> 1,5$).

	E15,5				P28			
region	AT	FC	PT	SC	AT	FC	PT	SC
fold change	1,6 down	1,9 down	1,3 down	1,6 down	1,1 down	1,0 down	1,3 down	1,0 up
p-value	2,3E-02	1,3E-02	4,6E-02	1,2E-01	6,6E-01	9,1E-01	2,6E-01	9,6E-01
mean norm. <i>Nrg1</i> ^{+/+}	-0,06	0,08	-0,23	-0,72	2,49	3,04	0,28	2,11
mean raw <i>Nrg1</i> ^{+/+}	318	352	283	205	1871	2739	412	1463
	(#)	(#)						

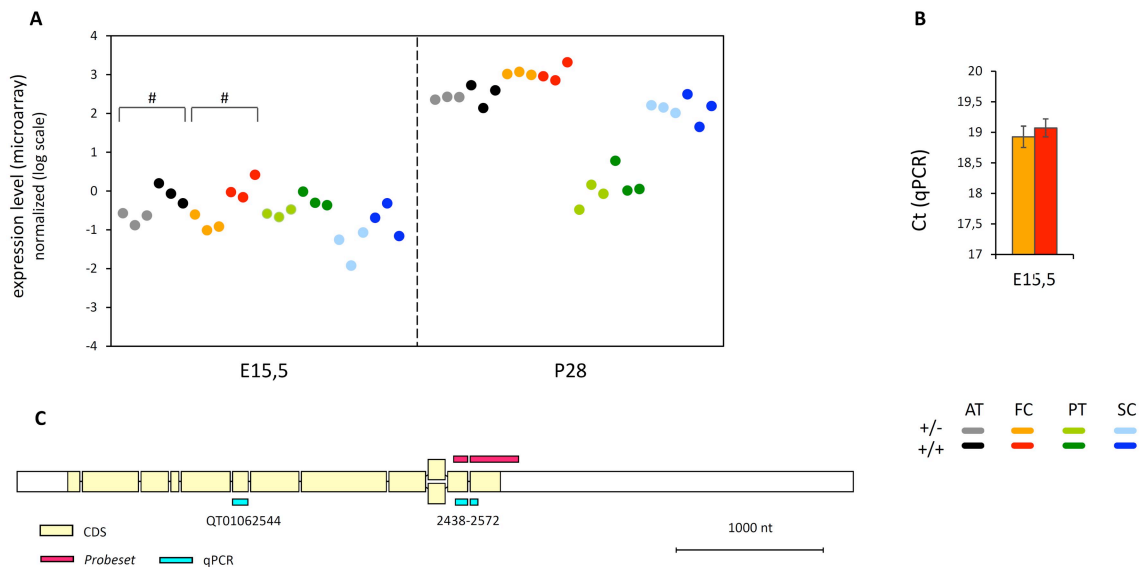


Abbildung 12: Expressionsanalyse *Gria1*

(A) GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1448972_at. Hellerer Farbton: Genotyp *Nrg1*^{+/-}; dunklerer Farbton: *Nrg1*^{+/+}; # Signifikanzlevel $p < 0,05$ (t-Test) bei gleichzeitigem Expressionslevelunterschied größer 1,5. **(B)** Quantitative RT-PCR, FC E15,5; Mittelwert \pm SEM. **(C)** Ausschnitt der Genstruktur von *Gria1* mit farblicher Kennzeichnung der Detektionsbereiche des Probesets und des Amplifikationsfragments der qPCR.

Nach Analyse der GeneChips® ist die Expression von *Gria1* in den Regionen des frontalen Systems heterozygoter *Nrg1*^{+/-}-Mäuse im embryonalen Stadium E15,5 signifikant dereguliert. Die genetische Manipulation von *Nrg1* vermindert die detektierten Transkriptmengen des *Probesets 1448972_at* von *Gria1* in den Regionen AT und FC um einen Faktor von 1,6 bzw. 1,9. Tabelle 12 enthält die in Abbildung 12A auch graphisch dargestellten Zahlenwerte. Überprüft wurde das Ergebnis für FC E15,5 anhand mehrfach durchgeführter quantitativer realtime RT-PCR (Abbildung 12B) an gleich zusammengesetzten Vergleichsproben cDNA. Den durch die GeneChips® detektierten signifikanten, regionalen Expressionsunterschied in FC der Genotypen *Nrg1*^{+/-} und *Nrg1*^{+/+}, konnte dieses Experiment jedoch nicht validieren. Abbildung 12C zeigt den Detektionsbereich des *Probesets* und den Amplifikationsbereich der qPCR.

5.4.5 WNT SIGNALWEG

Gleich mehrere durch die GeneChip® als differentiell exprimiert detektierte Gene können dem kanonischen Wnt-Signalweg zugeordnet werden (vgl. Absatz 6.6.3.2). Während der Gehirnentwicklung wirkt dieser Signalweg auf essentielle Prozesse der Proliferation und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen (Hirabayashi et al. 2004, Hur & Zhou 2010, Zhou et al. 2006). Zur Validierung des Befundes *Nrg1* defizienter Mäuse, wurden zwei der deregulierten Gene des Wnt-Signalweges näher untersucht. Wnt5a (wingless-type MMTV integration site family, member 5A), ein extrazellulär diffusibler Ligand und der Rezeptor Fzd3 (frizzled homolog 3 (Drosophila)).

5.4.5.1 WNT5A (WINGLESS-TYPE MMTV INTEGRATION SITE FAMILY, MEMBER 5A)

Von diesem Mitglied der Wnt-Glykoproteine ist bekannt, dass es zu frühen Zeiten der Entwicklung die Differenzierung und Funktion glutamaterger Synapsen fördert. In hippokampalen Neuronen regt WNT5A die *de novo* Ausildung sowie die Verstärkung bereits existenter synaptischer Verbindungen an und erhöht dadurch die Dichte an dendritischen Spines (Varela-Nallar et al. 2010). Für *Wnt5a* mehrfach belegt ist auch die Einflussnahme auf die Entwicklung dopaminergener Neurone (Andersson et al. 2008, Castelo-Branco et al. 2003, Yoon et al. 2011).

In der transkriptomischen Analyse fallen die Signalwerte des *Probesets 1448818_at* zur Detektion von *Wnt5a* auf GeneChips® der heterozygoten *Nrg1*^{+/-} Mäuse in der Region FC zum Zeitpunkt E15,5 1,7fach geringer aus, als die Werte der zu vergleichenden Kontrollenkondition. Tabellarisch und graphisch ist dies in Tabelle 13, bzw. Abbildung 13A dargestellt. Im Embryonalstadium E15,5 liegen die gemessenen Signalwerte in Regionen des frontalen Systems (AT/FC) deutlich über denen anderer embryonaler und postnataler Konditionen.

Tabelle 13: *Wnt5a*: GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1448818_at

(#) Erfüllte Auswahlkriterien ($p < 0,05$ (t-Test) und fold change $> 1,5$).

region	E15,5				P28			
	AT	FC	PT	SC	AT	FC	PT	SC
fold change	1,1 down	1,7 down	1,5 down	1,1 up	1,4 up	1,2 down	1,0	1,1 down
p-value	8,6E-01	3,9E-02	1,7E-01	8,3E-01	2,0E-01	3,1E-01	9,8E-01	2,5E-01
mean norm. <i>Nrg1</i> ^{+/-}	2,25	4,22	0,52	-0,62	-0,53	0,89	-0,43	-0,53
mean raw <i>Nrg1</i> ^{+/-}	158	609	48	21	23	61	25	23

(#)

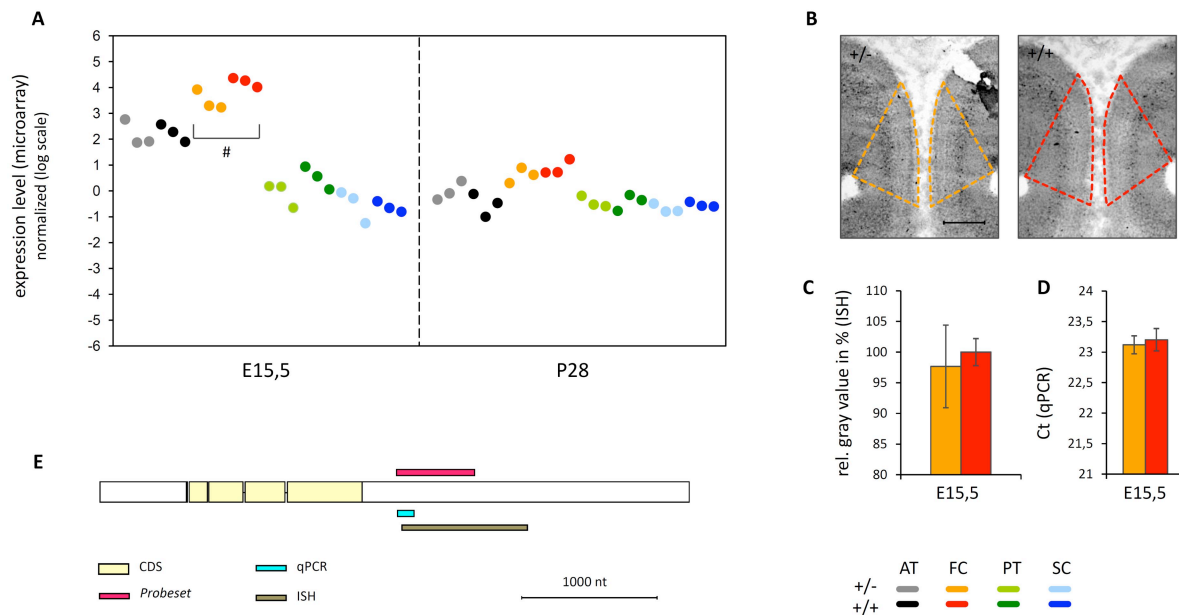


Abbildung 13: Expressionsanalyse *Wnt5a*

(A) GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1448818_at. Hellerer Farbton: Genotyp *Nrg1*^{+/-}; dunklerer Farbton: *Nrg1*^{+/+}; # Signifikanzlevel $p < 0,05$ (t-Test) bei gleichzeitigem Expressionslevelunterschied größer 1,5. (B) ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten, FC E15,5. Skalierung 250 μm . (C) Quantifizierung der ISH. Ausgewertete Schnitte eines Hirnpaares (FC $n_{\text{Schnitte}} = 10^{+/-} / 10^{+/+}$) Mittelwert \pm SEM. (D) Quantitative RT-PCR, FC E15,5; Mittelwert \pm SEM. Skalierung 250 μm . (E) Ausschnitt der Genstruktur von *Wnt5a* mit farblicher Kennzeichnung der Detektionsbereiche des Probesets, der Sonden für ISH und des Amplifikationsfragments der qPCR.

Abbildung 13B zeigt ISH von *Wnt5a* an koronalen Kryomikrotomschnitten im Bereich von FC, E15,5. Transkripte von *Wnt5a* konnte im Bereich der SVZ detektiert werden. Wie diese Bilderauswahl andeutet, kann auch bei der quantitativen Analyse der Grauwerte von ISH in Bereichen des FC (Abbildung 13C) kein signifikanter Expressionsunterschied ausgemacht werden. Ein ausgeglichenes Expressionsniveau zwischen den untersuchten Genotypen konnte, widersprüchlich zur Analyse der GeneChips®, auch durch quantitative realtime RT-PCR gezeigt werden (Abbildung 13D). Die Detektionsbereiche von Probeset, ISH und qPCR sind in Abbildung 13E graphisch dargestellt.

5.4.5.2 FZD3 (FRIZZLED HOMOLOG 3 (DROSOPHILA))

FZD3 ist ein 7-Transmembrandomänen Protein und gehört zu den Rezeptoren für Proteine der Wnt Genfamilie. Neuroentwicklungsbiologisch spielt es eine Rolle bei der Ausbildung reziproker Verbindungen zwischen dem Cortex und subkortikalen Strukturen. *Fzd3*^{-/-} knockout Mäuse zeigen Defekte bei der Ausbildung axonaler Fasertrakte rostral gelegener Bereiche des Gehirns. Vollständig durch den Gendefekt betroffen sind insbesondere kortikospinale, thalamokortikale, kortikothalamische und nigrostriatale Verbindungen, sowie die anteriore Kommissur. Am Corpus callosum ist ein teilweiser Verlust der Verbindungen festzustellen. Weiter caudal gelegene Bereiche des ZNS sind ebenso wenig betroffen wie das periphere Nervensystem. Zellproliferative und migratorische Effekte werden nicht beobachtet und der Einfluss von FZD3 kann demnach auf axonale Effekte beschränkt werden (Wang et al. 2002, Wang et al. 2006).

In der transkriptomischen Untersuchung der heterozygoten *Nrg1*^{+/-} Mäuse im Vergleich zum Genotyp *Nrg1*^{+/+}, deuten die GeneChips® von AT E15,5 auf eine 1,5fache Reduktion der Transkriptmengen dieses Gens hin. Detektiert wurde dieser Unterschied mit dem *Probeset 1421157_at*, dessen Signalwerte Tabelle 14 und Abbildung 14A zu entnehmen sind.

Tabelle 14: Fzd3: GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1421157_at

(#) Erfüllte Auswahlkriterien (p<0,05 (t-Test) und fold change > 1,5).

region	E15,5				P28			
	AT	FC	PT	SC	AT	FC	PT	SC
fold change	1,5 down	1,2 down	1,1 up	1,2 down	1,0	1,0	1,0	1,0
p-value	5,7E-03	4,9E-01	3,8E-01	5,0E-01	4,5E-01	2,0E-01	2,1E-01	8,4E-01
mean norm. <i>Nrg1</i> ^{+/+}	0,87	1,00	0,03	0,62	-0,10	-0,03	-0,06	-0,08
mean raw <i>Nrg1</i> ^{+/+}	8	9	4	7	4	4	4	4

(#)

ERGEBNISSE

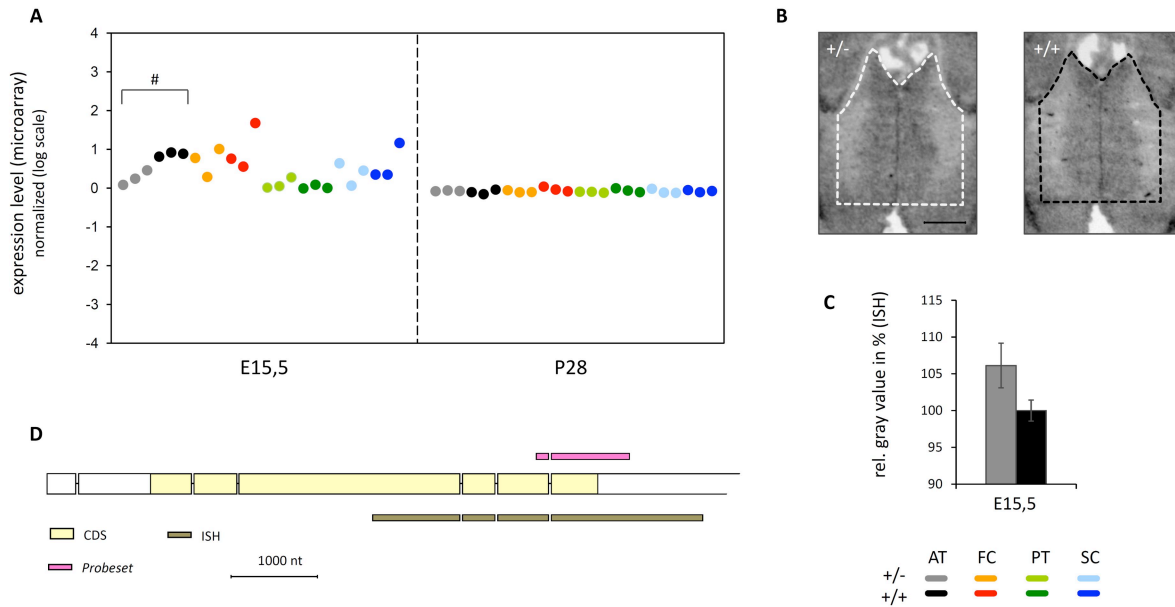


Abbildung 14: Expressionsanalyse *Fzd3*

(A) GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1421157_at. Hellerer Farbton: Genotyp $Nrg1^{+/-}$; dunklerer Farbton: $Nrg1^{+/+}$; # Signifikanzlevel $p < 0,05$ (t-Test) bei gleichzeitigem Expressionslevelunterschied größer 1,5. **(B)** ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten, AT E15,5; Skalierung 250 μ m. **(C)** Quantifizierung der ISH. Ausgewertete Schnitte von drei unabhängigen Hirnpaaren (AT $n_{\text{Schnitte}}=14^{+/-}/16^{+/+}$); Mittelwert \pm SEM. **(D)** Ausschnitt der Genstruktur von *Fzd3* mit farblicher Kennzeichnung der Detektionsbereiche des Probesets und der Sonden für ISH.

Mit einem durchschnittlichen Expressionsniveau der GeneChips® von 5, liegen die ermittelten Expressionsdaten dieses Gens bei einem insgesamt sehr geringen Niveau. Die in Abbildung 14B gezeigten ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten im Bereich von AT können allerdings eine schwache Expression dieses Gens in anterioren Kernen des Thalamus entlang der Mittellinie zum Zeitpunkt E15,5 nachweisen. Die Quantifizierung (Abbildung 14C) der durch Sonden gegen *Fzd3* gefärbten Schnitte aus drei unabhängigen Hirnpaaren kann wiederum den mit den GeneChips® gemessenen signifikanten Expressionsunterschied zwischen $Nrg1^{+/-}$ und $Nrg1^{+/+}$ auch für dieses Gen nicht bestätigen (Abbildung 14C). der Detektionsbereich der ISH-Sonde schliesst den Detektionsbereich des Probesets mit ein (Abbildung 14D).

Eine weiterführende bioinformatische Pathway-Analyse (Absatz 6.6.3.2) detektiert den Wnt-Signalweg als dereguliertes zelluläres Funktionssystem. Das deutet auf eine funktionelle Beeinträchtigung dieses Signalweges durch die Reduktion der Gendosis von *Nrg1* hin. Die daran beteiligten Gene *Wnt5a* und *Fzd3* konnten im Gewebe nachgewiesen werden, deren unterschiedliche Expressionslevel in den Genotypen $Nrg1^{+/-}$ und $Nrg1^{+/+}$ jedoch nicht bestätigt werden.

5.4.6 NEO1 (NEOGENIN 1)

Neo1 kodiert für ein Rezeptormolekül, das Signale von Axonlenkungsmolekülen wie *Netrin1* und der Klasse von RGMs (repulsive guidance molecules) in die Zelle überträgt (De Vries & Cooper 2008). Je nach Ligand können dadurch attraktive oder repulsive Wirkungen auf Zellfortsätze ausgelöst werden. Eine wichtige Funktion kommt *Neo1* bei der Ausbildung des Neuralrohres zu (Mawdsley et al. 2004). Während der Entwicklung des Nervensystems kann über NEO1 auch der Zellfortbestand durch die Regulation der Apoptose gelenkt werden (Matsunaga & Chédotal 2004).

Tabelle 15: *Neo1*: GeneChip® Detektionswerte, *Probeset 1444295_at*

(#) Erfüllte Auswahlkriterien ($p < 0,05$ (t-Test) und fold change $> 1,5$).

region	E15,5				P28			
	AT	FC	PT	SC	AT	FC	PT	SC
fold change	2,7	5,5	1,8	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0
p-value	1,8E-01	1,7E-02	3,6E-01	6,1E-01	7,3E-01	2,8E-01	3,0E-01	5,1E-01
mean norm. <i>Nrg1</i> ^{+/+}	2,61	3,11	1,01	3,20	-0,16	-0,01	-0,05	-0,11
mean raw <i>Nrg1</i> ^{+/+}	32	38	12	40	4	4	4	4

(#)

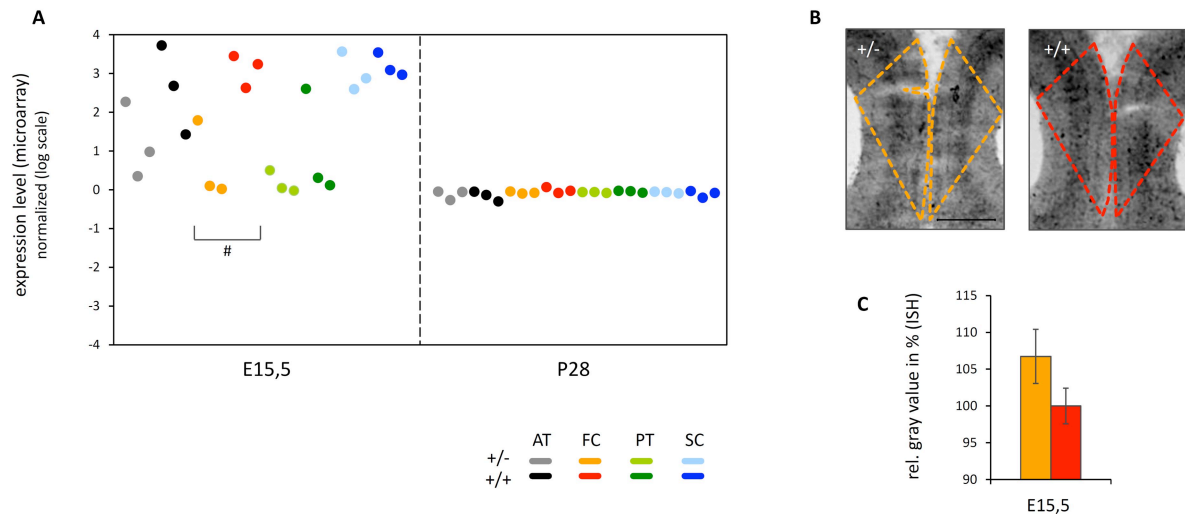


Abbildung 15: Expressionsanalyse *Neo1*

(A) GeneChip® Detektionswerte, *Probeset 1444295_at*. Hellerer Farbton: Genotyp *Nrg1*^{+/-}; dunklerer Farbton: *Nrg1*^{+/+}; # Signifikanzlevel $p < 0,05$ (t-Test) bei gleichzeitigem Expressionslevelunterschied größer 1,5. (B) ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten im Bereich von FC, E15,5; Skalierung 250 μ m (C) Quantifizierung der ISH. Ausgewertete Schnitte eines Hirnpaares (FC $n_{\text{Schnitte}} = 8^{+/-} / 6^{+/+}$).

Die Expressionsdaten des GeneChips® von *Neo1* sind Abbildung 15 und Tabelle 15 zu entnehmen. Die Detektionssequenz des *Probesets 1444295_at* liegt außerhalb der Referenzsequenz der mRNA, detektiert aber laut BLAST-Analyse gleichermaßen die Isoformen 1 und 2 von *Neo1*. Die verwendete ISH-Sonde detektiert einen gleichen Sequenzbereich von *Neo1* wie das *Probeset*. Im Bereich des FC

wird durch ISH die Expression von *Neo1* im Bereich der SVZ, IMZ und der CP deutlich (Abbildung 15B). Die Quantifizierung der Färbeintensitäten der kolorimetrischen dargestellten ISH (Abbildung 15C) ergibt jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen. Der Unterschied im Expressionsniveau, wie er für dieses Gen durch die GeneChips® angezeigt wird, konnte durch ISH nicht bestätigt werden.

5.4.7 ARHGAP18 (RHO GTPase ACTIVATING PROTEIN 18)

Arhgap18 kodiert für ein GTPase-Aktivatorprotein der Rho-GTPasen, deren Aktivitätszustand von gebundenem GTP bzw. GDP abhängt. Rho-GTPasen spielen eine wichtige Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts und demnach auch bei Wachstums- und Richtungslenkungsprozessen von Axonen (Hall & Lalli 2010). Ein wichtiges Kriterium zur genaueren Expressionsanalyse dieses Gens durch ISH ist die Tatsache, dass für den genomischen Abschnitt von *Arhgap18* durch die Analyse von SNPs eine Assoziation mit Schizophrenie festgestellt werden konnte (Potkin et al. 2009).

Tabelle 16: *Arhgap18*: GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1431133_at

(#) Erfüllte Auswahlkriterien ($p < 0,05$ (t-Test) und fold change $> 1,5$).

region	E15,5				P28			
	AT	FC	PT	SC	AT	FC	PT	SC
fold change	4,2	1,0	1,7	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0
p-value	4,5E-04	3,8E-01	3,0E-01	5,2E-01	3,9E-02	2,4E-01	4,9E-01	6,2E-01
mean norm. <i>Nrg1</i> ^{+/+}	3,51	0,01	1,52	0,15	-0,06	0,00	-0,02	-0,06
mean raw <i>Nrg1</i> ^{+/+}	84	7	25	8	7	7	7	7

(#)

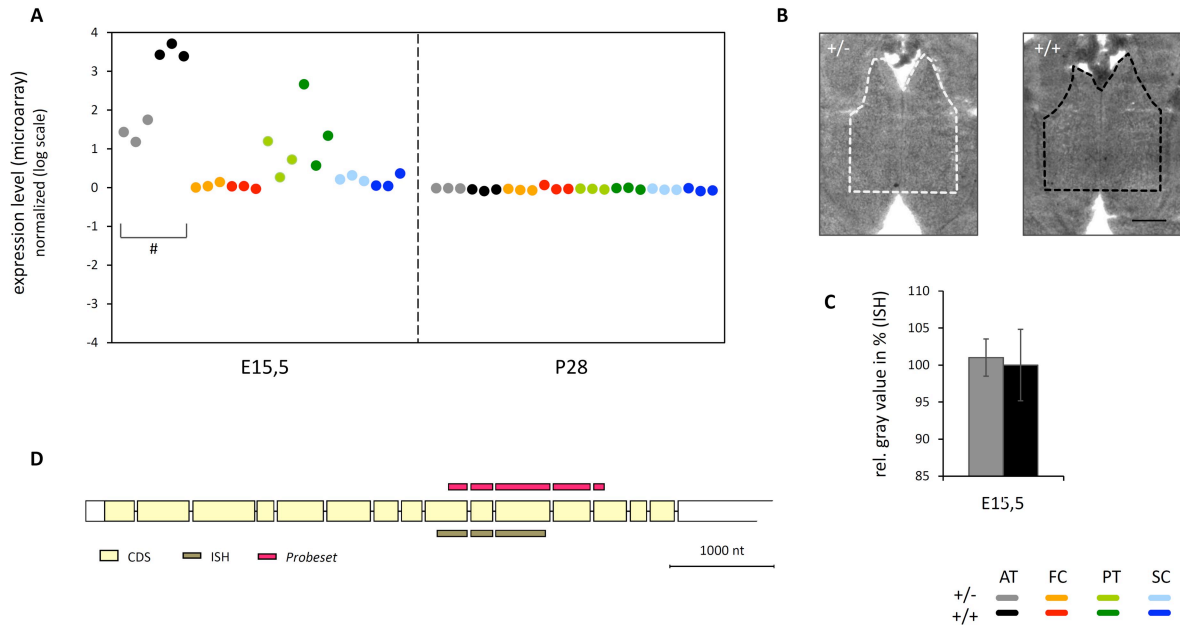


Abbildung 16: Expressionsanalyse *Arhgap18*

(A) GeneChip® Detektionswerte, *Probeset 1431133_at*. Hellerer Farbton: Genotyp $Nrg1^{+/-}$; dunklerer Farbton: $Nrg1^{+/+}$; # Signifikanzlevel $p < 0,05$ (t-Test) bei gleichzeitigem Expressionslevelunterschied größer 1,5. **(B)** ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten im Bereich von AT, E15,5; Skalierung 250 μm **(C)** Quantifizierung der ISH. Ausgewertete Schnitte eines Hirnpaares (AT $n_{\text{Schnitte}}=5^{+/-}/5^{+/+}$). **(D)** Ausschnitt der Genstruktur von *Arhgap18* mit farblicher Kennzeichnung der Detektionsbereiche des *Probesets* und der Sonden für ISH.

Tabelle 16 können die durch GeneChips® ermittelten Expressionswerte des *Probesets 1431133_at* entnommen werden (vgl. Abbildung 16A). Eine signifikante Deregulation zwischen den untersuchten Genotypen $Nrg1^{+/-}$ und $Nrg1^{+/+}$ wurde dabei in AT festgestellt. Die Bestätigung dieser Expressionswerte durch ISH verlief allerdings negativ. Mit der verwendeten Sonde (vgl. Abbildung 16D) konnte durch ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten im Bereich von AT nur sehr schwache Signale vor einem hohen Hintergrundsignal detektiert werden (Abbildung 16B). In der Quantifizierung dieser Färbungen (Abbildung 16C) zeigt sich kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen.

5.4.8 FEZF2 (FEZ FAMILY ZINC FINGER 2)

Der Transkriptionsfaktor *Fezf2* mit Zinkfingerproteinstruktur organisiert während der Cortexentwicklung die schicht- und subtypspezifische Morphologie von Axonen und Dendriten (Chen et al. 2005a, Chen et al. 2008, Chen et al. 2005b, Lodato et al. 2011, McKenna et al. 2011). Die selektive Expression von *Fezf2* in Schicht V und VI des Cortex lenkt Axone von Projektionsneuronen in subkortikale Bereiche und entscheidet dabei über kortikokortikale oder

callosale Projektionen der Pyramidenzellen (Chen et al. 2008). Genetische Manipulationen der Expression dieses Gens zeigen dies ebenso wie eine veränderte Morphologie der Dendriten.

Tabelle 17: Fezf2: GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1418790_at

(#) Erfüllte Auswahlkriterien (p<0,05 (t-Test) und fold change > 1,5).

region	E15,5				P28			
	AT	FC	PT	SC	AT	FC	PT	SC
fold change	1,3 up	1,0	1,0	1,0	2,6 up	1,1 up	1,8 up	1,1 down
p-value	4,1E-01	9,9E-01	6,8E-01	8,2E-01	1,4E-04	4,2E-01	1,5E-01	5,1E-01
mean norm. Nrg1 ^{+/-}	-3,32	5,23	-3,62	5,57	-3,80	4,23	-3,06	2,00
mean raw Nrg1 ^{+/-}	11	4034	9	4979	8	1979	14	421

(#)

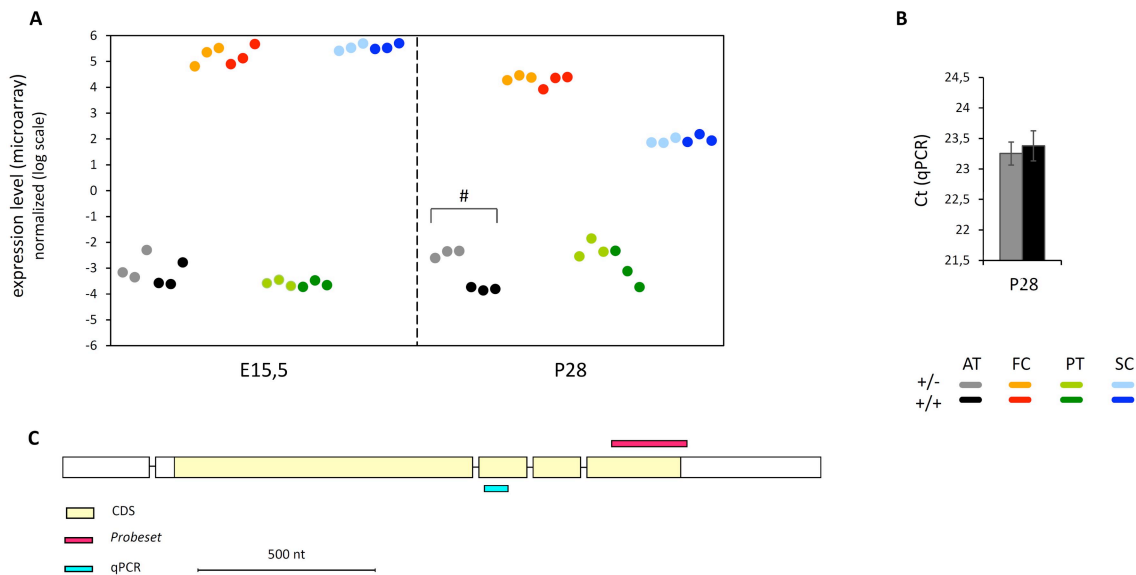


Abbildung 17: Expressionsanalyse Fezf2

(A) GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1418790_at. Hellerer Farbton: Genotyp Nrg1^{+/-}; dunklerer Farbton: Nrg1^{+/+}; # Signifikanzlevel p<0,05 (t-Test) bei gleichzeitigem Expressionslevelunterschied größer 1,5. **(B)** Quantitative RT-PCR, AT P28; Mittelwert ± SEM. **(C)** Ausschnitt der Genstruktur von Fezf2 mit farblicher Kennzeichnung der Detektionsbereiche des Probesets und des Amplifikationsfragments der qPCR.

In den kortikalen Regionen FC und SC wird dieser Transkriptionsfaktor insbesondere zum Zeitpunkt E15,5 stärker exprimiert als in anderen Regionen. Dies ist anhand der in Tabelle 17 und Abbildung 17A zusammengefassten Expressionswerten des zugehörigen Probesets festzustellen. Die Auswahlkriterien von statistisch signifikanter und 1,5facher Deregulation in heterozygoten Nrg1^{+/-} Mäusen trifft allerdings postnatal P28 für AT zu. Das Ergebnis eines in diesem Genotyp in dieser Region knapp 2,6fach erhöhten Expressionslevels des Gens wurde unabhängig durch quantitative realtime RT-PCR überprüft. Den mit Hilfe von GeneChips® gemessenen signifikanten Unterschied zwischen Proben der beiden zu vergleichenden Genotypen konnten die an der gleichen

Probenzusammenstellung (qPCR) von cDNA dreifach durchgeführten Experimente nicht bestätigen. Exemplarisch ist in Abbildung 17B eines dieser Resultate der quantitativen realtime RT-PCR gezeigt. Die Detektionsbereiche von qPCR und *Probeset* weichen in diesem Falle voneinander ab, liegen aber beide im Proteincodierenden Bereich der mRNA Abbildung 17C.

5.4.9 NPTX2 (NEURONAL PENTRAXIN 2)

Nptx2 kodiert für ein synaptisch sekretiertes Protein mit Bindungsaffinität zu extrazellulären Bereichen von AMPA Rezeptoruntereinheiten. Durch diese Eigenschaft übernimmt NPTX2 eine bedeutende Rolle beim Clustern dieser Rezeptoren an exzitatorischen Synapsen. Dort spielt es eine Schlüsselrolle bei der Synaptogenese und vermittelt neuronale Plastizität (Chang et al. 2010, O'Brien et al. 1999).

Tabelle 18: *Nptx2*: GeneChip® Detektionswerte, *Probeset 1420720_at*
 (#) Erfüllte Auswahlkriterien (p<0,05 (t-Test) und fold change > 1,5).

region	E15,5				P28			
	AT	FC	PT	SC	AT	FC	PT	SC
fold change	1,1 up	1,9 up	1,8 up	1,3 up	1,5 up	1,4 up	1,2 up	1,2 up
p-value	2,0E-01	1,5E-01	9,6E-02	2,8E-01	4,6E-02	1,4E-01	1,1E-01	1,5E-01
mean norm. <i>Nrg1</i> ^{+/+}	-0,69	-2,60	-1,85	-2,06	2,59	0,96	1,14	1,42
mean raw <i>Nrg1</i> ^{+/+}	55	15	26	22	543	178	196	237

(#)

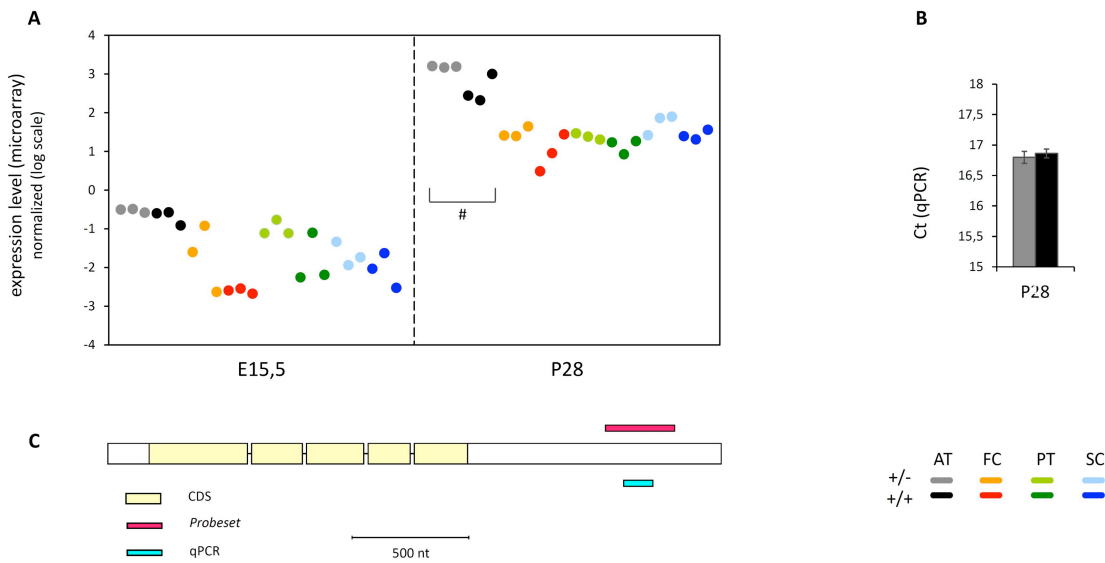


Abbildung 18: Expressionsanalyse *Nptx2*

(A) GeneChip® Detektionswerte, *Probeset 1420720_at*. Hellerer Farbton: Genotyp *Nrg1^{+/-}*; dunklerer Farbton: *Nrg1^{+/+}*; # Signifikanzlevel $p < 0,05$ (t-Test) bei gleichzeitigem Expressionslevelunterschied größer 1,5. **(B)** Quantitative RT-PCR, AT P28; Mittelwert \pm SEM. **(C)** Ausschnitt der Genstruktur von *Nptx2* mit farblicher Kennzeichnung der Detektionsbereiche des *Probesets* und des Amplifikationsfragments der qPCR.

Nptx2 wird zum postnatalen Zeitpunkt P28 entsprechend der GeneChip® Resultate (Tabelle 18 und Abbildung 18A) deutlich stärker exprimiert als zum untersuchten embryonalen Zeitpunkt E15,5. Eine signifikante, über 1,5fache Deregulation der Expression existiert in der Region AT, P28. Es wurde versucht, die ermittelten erhöhten Expressionswerte im Genotyp *Nrg1^{+/-}* gegenüber *Nrg1^{+/+}* durch quantitative realtime RT-PCR zu bestätigen. Die Detektionsbereiche von qPCR und *Probeset* sind in Abbildung 18C dargestellt. Die durchgeführte Überprüfung legt auch für *Nptx2* den Schluss nahe, dass die genetische Manipulation von *Nrg1* einen anderen Einfluss auf die Expression dieses Gens hat, als das Ergebnis der Untersuchung von Transkriptomen mittels GeneChips® vermuten lässt. Ein signifikanter Veränderung des Expressionsniveaus von *Nptx2* konnte in diesem Experiment nicht gezeigt werden (Abbildung 18B). Dieses Resultat wurde wiederholt an cDNA aus dem gleichen Set von Proben verwendeter cDNA beobachtet. Die Ergebnisse der GeneChips® konnte allerdings nicht untermauert werden.

5.4.10 TTR (TRANSTHYRETIN)

Transthyretin ist ein homotetrameres Carrierprotein, das im Gehirn von Zellen des Plexus Choroideus sekretiert wird. Im Plasma und der zerebrospinalen Flüssigkeit fungiert TTR als Transporter für das für Metabolismus und Entwicklung essentielle Thyroidhormon Thyroxin. Im Plasma wird

außerdem Vitamin A1 von TTR transportiert, das so für die Homöostase der bindenden Moleküle im Gewebe sorgt. Untersuchungen homozygot negativer *Ttr* Mäuse zeigen allerdings, dass TTR für die Aufrechterhaltung notwendiger Konzentrationen von Schilddrüsenhormonen im Gewebe entscheidend ist (Palha 2002). Eine verminderte Proteinkonzentration an TTR konnte im Liquor von first-onset paranoid schizophrenen Patienten gemessen werden und das Protein wird deshalb als Biomarker für schizophrene Erkrankungen diskutiert (Huang et al. 2007).

Tabelle 19: *tr: GeneChip® Detektionswerte*

Zusammenfassung der *Ttr* detektierenden *Probesets* 1451580_at, 1454608_x_at, 1455913_x_at und 1459737_s_at. (#) Erfüllte Auswahlkriterien ($p < 0,05$ (t-Test) und fold change > 1,5).

region	E15,5				P28			
	AT	FC	PT	SC	AT	FC	PT	SC
fold change	1,8 up	1,3 up	76,2 down	5,6 up	1,1 up	1,7 down	1,6 down	1,6 up
p-value	4,1E-02	6,6E-01	2,3E-04	9,3E-02	3,0E-01	1,2E-01	8,8E-02	2,9E-01
mean norm. <i>Nrg1</i> ^{+/-}	-0,22	-2,40	1,07	-2,00	4,08	-4,63	11200,56	0,32
mean raw <i>Nrg1</i> ^{+/+}	601	182	8110	501	8829	34	11201	1311
	(#)		(#)					

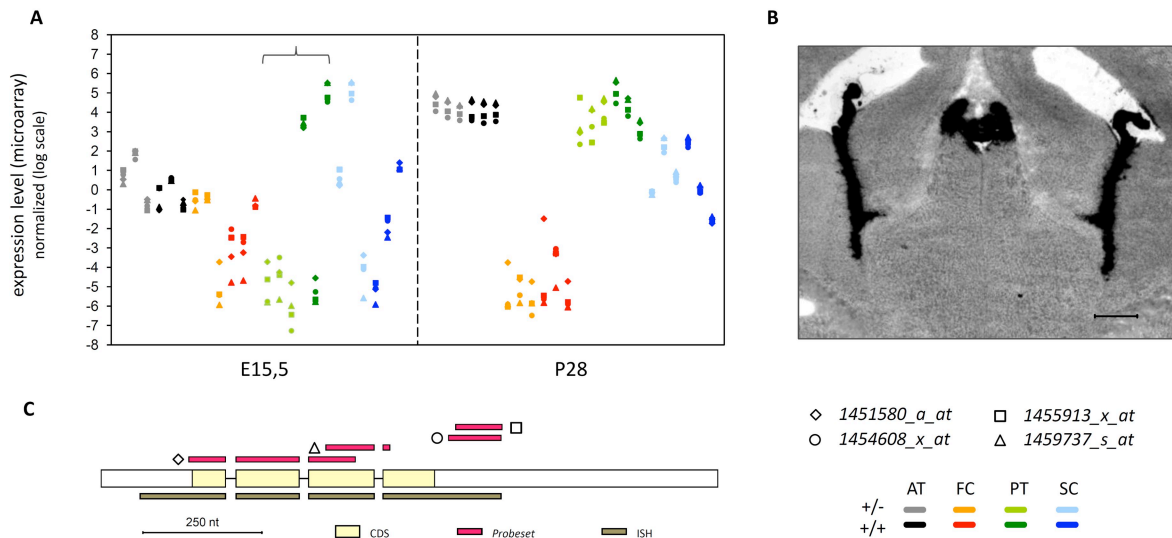


Abbildung 19: Expressionsanalyse *Ttr*

(A) GeneChip® Detektionswerte der Probesets 1451580_a_at, 1455913_x_at, 1454608_x_at und 1459737_s_at. Hellerer Farbton: Genotyp *Nrg1*^{+/-}; dunklerer Farbton: *Nrg1*^{+/+}; {Signifikanzlevel $p < 0,05$ (t-Test) bei gleichzeitigem Expressionslevelunterschied größer 1,5} **(B)** ISH an koronalem Kryomikrotomschnitt E15,5; Skalierung 250 μ m. **(C)** Ausschnitt der Genstruktur von *Ttr* mit farblicher Kennzeichnung der Detektionsbereiche der Probesets und des Detektionsbereiches der ISH-Sonde.

Transthyretin stellt in dieser Auflistung ausgewählter Transkripte einen Sonderfall dar. Dieses Gen zeigte in einer ersten und einfachen Analyse der ratio-intensity Plots auffällig hohe Unterschiede im

Expressionsniveau in thalamischen Regionen zum Zeitpunkt E15,5. Der mit einem Wert über 76 immens hohe, gemittelte fold change im embryonalen PT, wird von 4 unabhängigen *Probesets* bestätigt. Jedoch erhöht lediglich eine Kondition (PT16N2) enorm die Streubreite der gemessenen Werte. Die Daten aller *Probesets* dieser Region zusammen, erreichen trotzdem ein Signifikanzlevel unter $p < 0,05$ (Tabelle 19 und Abbildung 19A). Die Position der einzelnen *Probesets* geht aus Abbildung 19C hervor. Bei der Überprüfung dieses Ergebnisses durch ISH zeigt sich, dass *Ttr* in exorbitantem Maße von Zellen des Plexus choroideus exprimiert wird. Bereits nach kürzester Farbreaktion der ISH, ist die Reaktion im Bereich des Plexus choroideus vollständig abgeschlossen und die Färbeintensität dort gewaltig höher als im umliegenden Gewebe. In den zu untersuchenden Regionen AT, FC, PT und SC konnten quantitative keine signifikanten Expressionsunterschiede ausgemacht werden. Zusammengefasst sind dies deutliche Anzeichen auf einen Präparationsartefakt, dessen globaler Einfluss auf die Transkriptomstudie aber durch die extrem hohe Expression dieses Gens gering ausfällt (Absatz 6.3.1.1).

5.4.11 SEMA5A (SEMAPHORIN 5A)

Semaphorine sind eine großen Klasse von sekretierten und membranständigen Lenkungsmolekülen. Zusammen mit den Rezeptorklassen der Plexine und Neuropiline sind Semaphorine an der axonalen Wegfindung beteiligt (Kruger et al. 2005, Raper 2000) und können die Zellmigration steuern (Tamagnone & Comoglio 2004). Über intrazelluläre Signalkaskaden üben sie entsprechend der ausgelösten Signalkaskade repulsive oder attraktive Wirkungen auf Zellfortsätze aus. Für *Sema5a* konnte zwischen den untersuchten Genotypen durch GeneChips® keine quantitative Deregulation festgestellt werden. Die Expression dieses Gens wurde aus anderen Beweggründen untersucht. Dazu gehört die Untersuchung der Proliferation und Migration von Zellen germinaler Zonen. Einen direkten Hinweis auf veränderte Proliferations- und Migrationsprozesse in *Nrg1* defizienten Mäusen lieferte die Detektion von *Pcm1* (Absatz 5.4.3). Vermutlich wirken sich veränderte Zellzykluslängen (siehe Absatz 6.6.3.2) genau auf diese Prozesse aus. Nach einer vorangegangenen Studie (Bürger 2007) wird *Sema5a* embryonal fast ausschließlich in der VZ exprimiert und dient daher als Marker für die Untersuchung dieser proliferativen Zone.

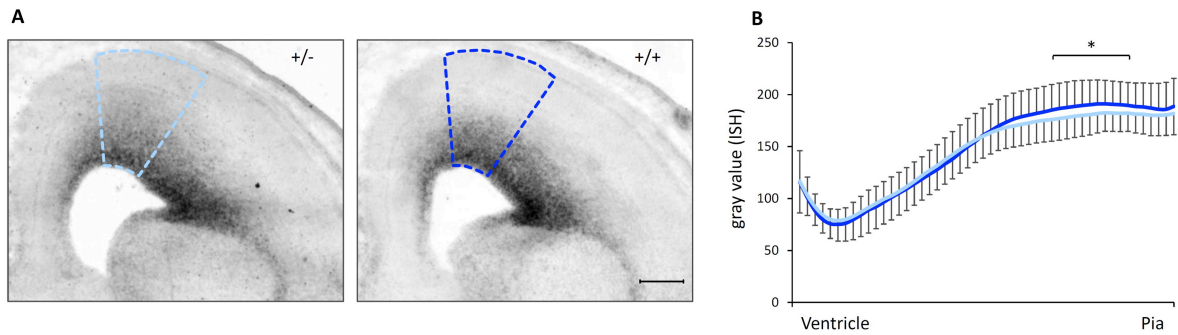


Abbildung 20 Expressionsanalyse *Sema5a*

(A) Expressionsmuster von *Sema5a* der Genotypen *Nrg1*^{+/-} und *Nrg1*^{+/+}, E15,5. *Sema5a*-positive Zellen sind zu diesem Zeitpunkt vornehmlich in der Ventrikulär- und Subventrikulärzone auszumachen, wobei die Migration dieser Zellen im heterozygoten Genotyp weiter vorangeschritten ist. **(B)** Quantifizierung radialer Sektoren der ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten von 3 unabhängigen Hirnpaaren; ausgewertete Schnitte (nSchnitte=59+/-/50+/-). Signifikante Abweichungen ($p < 0,05$ (t-Test)) im Bereich der IMZ und CP.

Von koronalen Kryomikrotomschnittserien an E15,5 Gehirnen der Genotypen *Nrg1*^{+/-} und *Nrg1*^{+/+} wurden mittlere Pixelintensitäten von Kreisbögen ausgewählter Sektoren des FC bestimmt, um den radialen Färbungsverlauf von ISH gegen *Sema5a* im Cortex zu bestimmen (siehe 4.8.7.3). Die Messreihen umfassen 30 (*Nrg1*^{+/-}) und 25 (*Nrg1*^{+/+}) vermessene Sektoren aus drei unabhängigen Hirnpaaren E15,5 der Genotypen *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-}. Für die dem Ventrikel zugewandten Zonen VZ und SVZ konnten zum Entwicklungszeitpunkt E15,5 keine Unterschiede belegt werden. Die über die ganze Schichtdicke des Kortex erhobenen Daten der Expressionsintensitäten dieser ISH unterschreiten jedoch in einem höheren, radial in Richtung pialer Seite gelegenen Abschnitt ein t-Test Signifikanzniveau von $p < 0,05$. An parallelen Schnittserien durchgeführte Nissl Färbungen zeigen, dass dieser Teil des Cortex der Intermediärzone (IMZ) und der kortikalen Platte (CP) zugeordnet werden kann. In Mäusen des Genotyps *Nrg1*^{+/-} befinden sich also mehr *Sema5a*-positive Zellen in der IMZ als in Mäusen des Genotyps *Nrg1*^{+/+}. Dies könnte auf eine zeitliche Deregulation von Proliferation und Migration hinweisen.

6 DISKUSSION

6.1 RNA QUALITÄT

Die durchweg hervorragende Qualität der aus sehr kleinen Gewebestücken isolierten RNA, spricht für eine reproduzierbare Durchführung der Präparation und das verwendete Aufreinigungsprotokoll. Aufgrund der strengen Einhaltung schnellstmöglicher Präparation unter eiskalten Temperaturbedingungen konnten stärkere enzymatische wie physikalische Degradationsprozesse durch Hydrolyse der Ribonukleinsäure erfolgreich verhindert werden. Die Integrität der RNA ist unbedingte Voraussetzung für die Anfertigung von GeneChips® zur Transkriptanalyse. Die Bewertung der RNA-Proben mit einer RIN und ein GeneChip® Test3 Array stellte die RNA-Qualität für den Versuchsablauf der Hybridisierung von Mouse Genome 430.2 GeneChips® sicher.

6.1.1 RNA INTEGRITY NUMBER

Zur effektiven Qualitätsbestimmung von RNA stellten sich die den aufgezeichneten Elektropherogrammen zugeordneten RIN als hilfreich heraus (Imbeaud et al. 2005, Schroeder et al. 2006). Wie theoretisch zu erwarten ist, lässt sich aus dem sehr gut zu homogenisierenden embryonalen Gewebe im Vergleich zu postnatalem Gewebe leichter RNA von hoher Qualität isolieren. Pro Volumen an präpariertem Gewebe ist aufgrund der hohen Zelldichte embryonal auch eine gute Ausbeute an isolierter RNA zu erreichen. Die in Tabelle 7 zusammengestellten Zahlen verdeutlichen die etwas höhere Qualität der embryonalen Proben.

Ebenso verdeutlichen die Verhältnisse von 3'/5'-Detektionssignalen der Gene *Actb* und *Gapdh* (Absatz 6.1.2.1) nach der Hybridisierung von 48, zur Gesamtanalyse von Transkriptomen genutzten GeneChips®, dass die Qualitätsanforderungen von embryonalen Proben in höherem Maße erfüllt werden, als dies für postnatale Proben zutrifft.

6.1.2 DETEKTIONSSIGNALE VON ACTB UND GAPDH

Für die Hybridisierung von GeneChips® werden die Transkripte ausgehend vom 3' poly(A) Ende der mRNA revers transkribiert. Dies hat zur Folge, dass 5'-Bereiche von Transkripten in der cDNA unterrepräsentiert sind, je höher der Degradationszustand der isolierten RNA ist. Um die Detektion aller exprimierten Gene durch GeneChips® zu gewährleisten, sind die Oligonukleotide der *Probesets* so entworfen, dass sie Komplementarität zu Sequenzen von 3'-Bereichen der jeweiligen Transkripte besitzen. Trotz dieser technischen Raffinesse der GeneChips® muss ein Mindestmaß an Qualität der untersuchten RNA gewährleistet sein. Ein indirekter Indikator für die Qualität von GeneChip®

Hybridisierungen stellen die Detektionssignale verschiedener *Probesets* von *Actb* und *Gapdh* dar. Nach Angaben von Affymetrix ist eine ausreichende Qualität bei einem Verhältnis von Detektionssignalen der *Probesets* dieser Gene aus 3'- und 5'-Bereichen von unter 3 gegeben.

6.1.2.1 GENECHIP® TEST3 ARRAY UND MOUSE GENOME 430.2

Vor der Hybridisierung von Mouse Genome 430.2 GeneChips® wurde ein GeneChip® Test3 Array hybridisiert. Ausgehend von RNA mit einer RIN von 7,5 lieferte dieser Detektionsverhältnisse von 1,23 und 0,69 der 3'- und 5'-*Probesets* von *Actb* und *Gapdh*. Dieser Testlauf einer GeneChip® Hybridisierung wurde als sehr erfolgreich gewertet und bestätigte nochmals die hervorragende Qualität der verfügbaren RNA.

Bei der Hybridisierung von Mouse Genome 430.2 GeneChips® wurden für diese Detektionssignale insgesamt etwas geringere Werte erhalten. Der Grenzwert von 3 wurde aber lediglich von zwei der 48 GeneChips® überschritten. Letztlich wurden jedoch auch die GeneChips® SC28N3 und SC28W1, welche 3'/5'-Signalverhältnisse für *Actb* von 3,16 und 3,13 aufweisen, für alle folgenden Auswertungen mit einbezogen. Diese Wahl beruht auf den im Folgenden näher erläuterten Gegebenheiten und Überlegungen (siehe auch Absatz 6.2). Die von gleichen Konditionen dieser beiden GeneChips® angefertigten Replikate erfüllen die notwendigen Kriterien. Für die statistische Analyse der GeneChips® jeder Kondition konnten folglich Triplikate verwendet werden. Die Verhältnisse von Signalwerten der *Probesets* von mittleren zu 3'-gelegenen Sequenzbereichen von *Actb*, fallen für die beiden auffälligen GeneChips® mit 2,86 und 2,40 erwartungsgemäß geringer aus. Diese Detektionsbereiche liegen bis 1297 bzw. 971 Nukleotide vor dem Transkriptende der Referenzsequenz NM_007393.3. Untersucht man die Signalwerte des 3'-*Probesets* von *Actb* von allen GeneChips® der embryonalen wie postnatalen Konditionen, stellt man für FC28N3 und FC28W1 keine auffällig niedrigeren Werte fest. Da die *Probesets* der GeneChips® i.d.R. komplementär zu Abschnitten innerhalb von 500 Nukleotiden aus 3'-Bereichen der Transkripte sind, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass alle Targetsequenzen in der hybridisierten aRNA von SC28N3 und SC28W1 repräsentiert sein sollten.

6.2 QUALITÄT DER HYBRIDISIERUNGEN

6.2.1 HYBRIDISIERUNGARTERFAKTE

Für eine ordentliche Vergleichbarkeit der Datensätze von GeneChips® sind neben dem Einsatz bestmöglicher Qualität der hybridisierten RNA die im Folgenden aufgeführten Eigenschaften zu beurteilen. Zunächst sind Hybridisierungsartefakte zu berücksichtigen.

Die in drei der Arrays von GeneChips® erkennbaren Hybridisierungsartefakte, ausgelöst durch eine inhomogene Verteilung der Hybridisierungslösung, wurden für die Auswertung als nicht übermäßig störend eingestuft. Gründe dafür sind deren kleine Flächenbedeckung von max. 1,8 %, 0,4 % und 0,1 % und die auf dem Array weitverteilte Anordnung der *probes* eines *Probesets*. Durch die Verteilung und Integrierung mehrerer *probes* zu einem *Probesets*, betrifft der Fehler nicht nur selektiv die Detektion einzelner Transkripte, sondern verteilt sich auf mehrere *probe*-Paare von unterschiedlichen *Probesets*.

6.2.2 KORRELATIONSKOEFFIZIENTEN

Zur Qualitätsbeurteilung der Hybridisierungen von GeneChips® wurden desweiteren Pearson Korrelationskoeffizienten der Arrays herangezogen, die sich aus den Daten der *features* jedes Arrays berechnen. Diese Daten werden dabei ohne Normalisierung und *probe* Summarization verwendet und geben zur Vergleichbarkeit die tatsächlichen Hybridisierungszustände der Arrays wieder. Die innerhalb gleicher Konditionen erreichten Korrelationswerte liegen minimal bei 0,965 und damit insgesamt bei sehr hohen Werten. In diesem Punkt von der Norm abweichende GeneChips® sind nicht auszumachen.

6.2.3 NORMALISIERUNG

Um die Vergleichbarkeit von GeneChips® untereinander weiter beurteilen zu können, wurden die Gesamtverteilungen der Signalwerte aller *Probesets* miteinander verglichen. Die in Abbildung 6 dargestellten Verteilungen nach durchgeführter Normalisierung, *probe* Summarization durch GCRMA und Baseline Transformation verdeutlichen die hohe Übereinstimmung der Datensätze von angefertigten Replikaten verschiedener Vergleichskonditionen. Auffällig erscheinen die Unterschiede der maximal und minimal dargestellten Werte der Quantile $Q_{2,5}$ und $Q_{97,5}$. Für GeneChips® von Proben aus Präparaten des embryonalen Thalamus zeigen die Daten eine insgesamt weniger breite Verteilung als die Daten der GeneChips® von FC und SC zum Zeitpunkt E15,5. Eine nicht weiter bewiesene Ursache hierfür könnte der leicht unterschiedliche embryonale Entwicklungszustand sein. Auffallende Unterschiede zwischen den Datensätzen kortikaler und thalamischer Regionen können nicht ausgemacht werden. Die gewünschten Vergleiche zwischen der für Schizophrenie relevanten Region AT und der als Kontrolle dienenden unbetroffenen Region PT können deshalb gezogen werden, ebenso wie dies für FC als für die Krankheit relevante Region und der zugehörigen Kontrollregion SC gilt.

Für die Datenverarbeitung von GeneChip® Rohdaten wurde der *probe* Summarization Algorithmus GCRMA verwendet, der in die zugrunde liegenden Berechnungen die Daten aller GeneChips® einbezieht und diese aufeinander abgleicht. Das hat zur Folge, dass die Datensätze der postnatalen

Konditionen asymmetrisch verteilt sind. Verarbeitet man die Rohdaten von embryonalen und postnatalen Konditionen separat, ist dies nicht der Fall. Durch die Unabhängigkeit der beiden Analysegruppen von GeneChips® verliert man allerdings gleichzeitig deren exakte Vergleichbarkeit. Für den Fall der Verarbeitung aller GeneChips® in einem Schritt, haben die 24 Datensätze von postnatalen Konditionen einheitlichen und somit vergleichbaren Charakter. Eine etwas breitere Verteilung gegenüber anderen Datensätzen weist FC28W1 auf. Die Korrelationskoeffizienten dieses Arrays zu anderen bewegen sich allerdings im normalen Bereich. Auch die Datensätze von SC28N3 und SC28W1 mit relativ hohen Verhältnissen der 3'/5' Detektionssignale von *Actb* (Absatz 6.1.2.1) zeigen bezüglich ihrer Gesamtverteilung keine Auffälligkeiten und reihen sich in das Gesamtbild aller GeneChips® ein.

Aus der Untersuchung globaler Qualitätskriterien der Rohdaten von 48 GeneChips® wurde geschlußfolgert, dass der gesamte, 16 Konditionen à 3 Replikate umfassende Datensatz für die Transkriptomstudie genutzt werden kann. Die Durchführung der Hybridisierung mit abschließender Extraktion von Rohdaten der GeneChips® verlief somit erfolgreich.

6.3 GLOBALE DIFFERENTIALITÄT

6.3.1 RATIO-INTENSITY PLOTS

Der zur Auswertung nützliche *probe* Summarization Algorithmus MAS5 bewertet die Verlässlichkeit der Messung von *Probesets* und errechnet für diese aus den Verhältnissen der Detektionssignale von PM *probes* und MM *probes* Detektionswahrscheinlichkeiten. Unter der Annahme, dass durch eine MM *probe* hybridisierte RNA detektiert wird, die als Hintergrundsignal und damit fehlerhaft in gleicher Stärke mit Oligonukleotiden des PM hybridisiert, kann der MM Signalwert von der PM *probe* direkt subtrahiert werden. Unspezifische Kreuzhybridisierungen werden dementsprechend egalisiert und aus den Signalwerten eines *probe*-Paares lediglich die zu 100 % komplementäre RNA quantifiziert. Die Berechnung eines p-values (Wilcoxon's signed-rank-test) zur Detektionswahrscheinlichkeit von Transkripten basiert auf den Signalwerten der *probe*-Paare. Je geringer die Signale von MM gegenüber denen zugehöriger PM *probes* und je einheitlicher die Signalverhältnisse innerhalb der Paare eines *Probesets*, desto kleiner der p-value und höher die Detektionswahrscheinlichkeit.

Natürlicherweise sind in einem Genom nicht alle Gene zur selben Zeit aktiv. Der Anteil an exprimierten Genen kann anhand der p-values der *Probesets*, die als Indikatoren für die Genexpression dienen, abgeschätzt werden. Aus den in Abbildung 7 dargestellten Ergebnissen kann Mehreres interpretiert werden. Sowohl im embryonalen als auch im postnatalen Stadium können ungefähr gleiche Anteile des Genoms mit als *present* oder *marginal* gekennzeichneten p-values

detektiert werden. Anhand der für die von MAS5 berechneten Detektionssignale der *Probesets*, gelten je GeneChip® Anteile von 52,3 % bis 57,3 % der auf den Arrays repräsentierten Transkripte als exprimiert. Die ratio-intensity Plots zeigen, dass schwache Detektionswahrscheinlichkeiten v.a. den *Probesets* im niedrigen Detektionswertebereich zugeordnet werden. Insofern korreliert der p-value wie erwähnt mit der Expressionsstärke in gewissem Maße. Allerdings können aufgrund der begrenzten technischen und physikalischen Möglichkeiten zur simultanen Detektion und Quantifizierung von tausenden unterschiedlichen mRNA Spezies durch GeneChips® (vgl. Absatz 6.4.3) Transkripte mit niedriger Expressionsstärke fehlerbehaftet quantifiziert werden. In diesem Fall besteht möglicherweise ein Ungleichgewicht zwischen der tatsächlichen Expression und ihrer statistischen Auswertung.

Dass die Transkriptome verschiedener Hirnareale voneinander abweichen, verdeutlichen die gezeigten ratio-intensity Plots. Je größer die Streubreite der Verteilung im Vergleich zweier GeneChips®, desto größer sind die Unterschiede in den Expressionsstärken gleicher Transkripte der beiden Datensätze. Je weiter die untersuchten Gehirnareale voneinander räumlich entfernt liegen (kortikale vs. thalamische Regionen) und je unterschiedlicher der Entwicklungszustand (embryonal vs. postnatal), desto größer sind die transkriptomischen Veränderungen der exprimierten Gene. Erwartungsgemäß sind zumindest globale Transkriptomunterschiede erkennbar. Dies ist ein Qualitätsmerkmal für exakte und sauber durchgeführte Präparationen der untersuchten Hirnareale. Die Unterschiede zwischen den Genotypen sind jedoch sehr gering und liegen in der gleichen Dimension wie die detektierten Unterschiede von angefertigten Replikaten (vgl. Abbildung 7C u. D). Der Einfluss der reduzierten Gendosis von *Nrg1* drückt sich demnach in sehr kleinen Gesamtveränderungen aus.

6.3.1.1 TRANSTHYRETIN

Bereits bei der ersten Analyse der ratio-intensity Plots wurde *Ttr* auffällig. Das Gen zeichnet sich durch eine besonders hohe Veränderung aus. Aufgrund der außergewöhnlich hohen Expression im Plexus choroideus wurde es allerdings eindeutig als Artefakt der Präparation identifiziert. Bei der Analyse der GeneChips® konnten keine weiteren Gene identifiziert werden, die ähnliche Veränderungen in der Expression zeigen wie *Ttr* und charakteristisch im Plexus choroideus exprimiert werden. Von einer starken Verunreinigung durch an Teile des Thalamus angeheftete Gewebestücke des Plexus choroideus wurde nicht ausgegangen. Aus der Varianz zwischen den Replikaten lässt sich erkennen, dass den Artefakten dieser Art keine Systematik zugrunde liegt. Es handelt sich demnach um einzelne Präparationsfehler und der Befund von *Ttr* ist auf die immens hohe Expressionsstärke dieses Gens zurückzuführen.

6.3.2 PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS

In Kollaboration mit einer Arbeitsgruppe des CAS-MPG Partner Institute for Computational Biology in Shanghai wurden Principal Component Analysen (PCAs) der gesamten Datensätze ausgearbeitet. Diese zeigen, durch Altersstadien und Regionen hervorgerufene, deutliche transkriptomische Effekte in der Maus. Vergleichsweise dazu ist der Einfluss des Genotyps nur gering. Diesbezüglich zeichnen sich aber ebenfalls deutliche Auswirkungen insbesondere im untersuchten Embryonalstadium E15,5 ab. Postnatal sind auch die Effekte zwischen den Regionen abgeschwächt. Während der embryonalen Entwicklungs- und Differenzierungsphase der Regionen sind demnach insgesamt stärkere Unterschiede festzustellen.

6.3.3 TRANSKRIPTOMISCHE VERÄNDERUNGEN DURCH *NRG1*^{+/-}

Durch die hohe Anzahl individueller Präparate je GeneChip® und die Anfertigung von drei unabhängigen Replikaten für jede Kondition wurde angenommen, dass in Vergleichskonditionen verändert exprimierte Transkripte bis zu einem fold change von 1,5 zuverlässig als differentiell detektiert werden (vgl. Absatz 6.4.2). Dies gilt, wenn gleichzeitig ein statistisches Signifikanzlevel von $p < 0,05$ (t-Test) erreicht wird. Durch die Kombination der Auswahlkriterien sollte bei dieser einfachen statistischen Analyse der Anteil von Fehlern 1., sowie 2. Art gering gehalten werden (vgl. dazu Absatz 6.4.4). Der exakte Nachweis über die genauen Fehleranteile kann allerdings nur über zusätzliche Experimente zur Validierung einzelner Transkripte geführt werden. Als zusätzliches Kriterium wurden einzelne Transkripte aufgrund ihrer biologischen Plausibilität ausgesucht.

6.3.4 DEREGULIERTE TRANSKRIPTE

Für die nachfolgenden Aussagen zu den erstellten Venn-Diagrammen wurde angenommen, dass die darin auftauchenden Transkripte überwiegend als richtig positiv detektiert wurden (vgl. Absatz 6.4.4). Die unter den Replikaten einer Kondition konsistent als dereguliert identifizierten Transkripte, zeigen insgesamt nur geringe Expressionsunterschiede zwischen den untersuchten Genotypen auf. Die meisten veränderten Gene weisen dabei einen fold change unter 2,5 auf. Der Einfluss der Halbierung der Gendosis von *Nrg1* auf das Transkriptom unterschiedlicher Hirnregionen wirkt sich daher nur subtil auf die Expression einzelner Gene aus. In der Gesamtheit der Analysen aller GeneChips® embryonaler und postnataler Konditionen werden 1084 unterschiedliche *Probesets* mit signifikanter Deregulation im Genotyp *Nrg1*^{+/-} erfasst, von denen lediglich 19 die Auswahlkriterien in einer oder mehreren Regionen zu beiden Entwicklungszeitpunkten erfüllen. Zu letzteren gehören u.a. *Mtmr7* und *Nrg1*. Bei einer Detektionsmöglichkeit von 45102 unterschiedlichen Transkriptsequenzen je GeneChip®, sind zwischen Vergleichskonditionen nur

geringe Anteile unterschiedlich. Fasst man die Veränderungen entsprechend der untersuchten Entwicklungszeitpunkte zusammen, identifiziert man in Mäusen des Genotyps *Nrg1*^{+/-} embryonal 676 und postnatal 427 deregulierte Transkripte. Nur wenige dieser Transkripte erfüllen wiederum die angelegten Auswahlkriterien in mehr als einer der untersuchten Regionen AT, FC, PT, oder SC zwischen den Genotypen sodass die Schnittmengen deregulierter Gene verschiedener Gehirnbereiche gering ausfallen. Die geringe Übereinstimmung der Stadien und Regionen deutet darauf hin, dass *Nrg1* zu unterschiedlichen Zeiten und in unterschiedlichen Regionen über verschiedene Mechanismen wirkt.

Zum embryonalen Zeitpunkt sind an differentiell exprimierten Transkripten zahlenmäßig größere Befunde sowohl in einzelnen als auch in allen Regionen zusammen festzustellen. Im Großen und Ganzen werden vergleichbar zum Untersuchungszeitpunkt P28 etwa ein Drittel weniger Transkripte als differentiell analysiert. Passend dazu deuten die PCAs (Absatz 6.3.2) postnatal auf einen geringeren Einfluss des Genotyps hin, als dieser für den embryonalen Zeitpunkt festgestellt werden kann. Durch die verschiedenen bekannten und hauptsächlich entwicklungsbiologisch in frühen Stadien bedeutungsvollen Funktionen von *Nrg1* (vgl. Absatz 2.2, (Mei & Xiong 2008)) kann dies auch erwartet werden, obwohl die Expression dieses Gens nicht nur auf frühe Entwicklungsstadien begrenzt ist, sondern auch postnatal zum Zeitpunkt P28 weiterhin nachgewiesen werden kann (Tabelle 9). Auffallend ist, dass embryonal in den Regionen AT und FC, mit 472 gegenüber den Kontrollregionen PT und SC mit 226 mehr als die doppelte Anzahl an Transkripten im Vergleich der Genotypen einen signifikant erhöhten fold change über 1,5 aufweisen. Postnatal ist dies in dieser Art und Weise nicht der Fall und ein weiterer Hinweis auf die relevanten Funktionen, die *Nrg1* als Suszeptibilitätsgen der entwicklungsbiologisch verursachten Krankheit Schizophrenie genau in diesen ausgewählten Regionen übernimmt. Die einhergehenden Störungen von molekularen Funktionssystemen betreffen der Transkriptomstudie nach während einer frühen Entwicklungszeit des Nervensystems vor allem Regionen, die von Bedeutung für die psychische Erkrankung sind.

6.4 VALIDIERUNG AUSGEWÄHLTER TRANSKRIPTE

Um die Richtigkeit von GeneChip® Analysen zu überprüfen, bedarf es weiterer quantitativer Nachweismethoden. In dieser Arbeit wurde für den Nachweis einzelner Deregulationen auf Transkriptebene quantitative realtime RT-PCR genutzt. Für den gleichen Zweck wurden ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten angefertigt, um daran Unterschiede in der Färbung einzelner Areale zwischen den Genotypen auszumachen.

Auf Basis der angestellten bioinformatischen Verarbeitungsschritte der GeneChip® Daten konnten außer für *Nrg1* für keines der ausgesuchten Gene eine differentielle Expression bestätigt werden.

Aufgrund der schwachen Effekte durch den veränderten Genotyp und die Art des statistischen Signifikanzlevel einzelner Transkripte wurde bereits angenommen, einen gewissen Anteil falsch positive Detektionen in Kauf genommen zu haben. Die Expressionsanalyse der Gene *Mtmr7*, *Pcm1*, *Gria1*, *Wnt5a*, *Fzd3*, *Neo1*, *Arhgap18*, *Fezf2*, *Nptx2* und *Ttr* offenbart aber die Höhe dieses Anteils. Worin sind die Gründe der fehlenden Differentialität der untersuchten Gene zu suchen?

6.4.1 KONSEQUENZEN DER REDUZierten GENDOSIS VON NRG1

Existieren auf der Ebene von einzelnen Genen tatsächlich reale Unterschiede?

Am Beispiel der Expressionsstudie von *Nrg1* (Absatz 5.4.1) konnten Unterschiede zwischen den Genotypen *Nrg1*^{+/-} und *Nrg1*^{+/+} zumindest für dieses Gen belegt werden. Sowohl durch quantitative realtime RT-PCR, als auch durch die quantitative Auswertung kolorimetrisch dargestellter ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten wurden die Ergebnisse der GeneChips® bestätigt. Da die durch qPCR und ISH erhaltenen Messdaten für *Nrg1* ein statistisch sicheres Signifikanzniveau erreichen, machen sie die quantitative Bewertung von Expressionen einzelner Gene möglich und können zur Validierung von GeneChip® Resultaten hilfreich sein.

Für *Nrg1* konnte die genaue Transkriptanzahl durch die Eichung anhand klonierter Transkriptfragmente bekannter Konzentrationen bestimmt werden. Analysiert wurde die Expression verschiedener Transkriptsequenzen. Mit der Amplifikation eines Abschnittes der EGF-Domäne wurden alle möglichen Isoformen erfasst. Durch übereinstimmende Sequenzabschnitte mit dem zugehörigen Probeset der GeneChips®, das Transkripte von *Nrg1* außerhalb der EGF-Domäne detektiert, kann dagegen nur eine Subpopulation der Transkripte von *Nrg1* erfasst werden. Die unterschiedlich detektierten Mengen belegen dies (Absatz 5.4.1 H u. I). Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Transkriptzusammensetzung der *Nrg1* Expression variiert, ist das variable Ausmaß der Downregulation verschiedener Sequenzbereiche von *Nrg1* im Genotyp *Nrg1*^{+/-}. Da die jeweiligen Sonden verschiedene Sequenzbereiche erkennen, könnte dies auch die unterschiedlich detektierten Expressionsverhältnisse verschiedener Regionen erklären.

Auf Proteinebene wurden die Folgen der verminderten Expression von *Nrg1* nicht untersucht. Der verfügbare Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen von NRG1 stellte sich für diese Arbeit als nicht brauchbar heraus. Über die Deregulation des ErbB-Signalweges konnte aber indirekt nachgewiesen werden, dass die verminderte Expression dieses Gens auch eine reduzierte Menge an translatiertem Protein nach sich zieht (Absatz 6.6.3.2). Allerdings zeigt sich hierbei auch, dass die fehlende Menge an Ligand über die intrazellulär ausgelöste Signalkaskade von NRG1 zumindest teilweise kompensiert werden kann. Der globale Effekt der reduzierten Gendosis auf das Transkriptom der Maus wird dadurch abgeschwächt. Erschwerend beim Auffinden der Effekte

kommt hinzu, dass die isolierten Präparate neuronaler Gewebeteile eine große Zelldiversität aufweisen. Sie umfassen eine Vielzahl unterschiedlicher Typen von Neuronen bzw. neuronaler Vorläuferzellen, sowie in weitaus größerer Anzahl gliale Zellen. In der Analyse isolierter RNA eines Homogenisats vieler verschiedener Zellen werden deshalb Effekte die sich nur auf einzelne Zellpopulationen auswirken abgeschwächt. Diese Tatsache erschwert den Nachweis vieler transkriptomischer Veränderungen, die nur wenige der Zellen betreffen.

Einen eindeutigen Hinweis, dass sich die reduzierte Gendosis von *Nrg1* auch auf Proteinebene widerspiegelt liefert der veränderte Verhaltensphänotyp der defizitären Mäuse (Absatz 2.3). Trotz der kleinen und schlecht auffindbaren Veränderungen einzelner Gene existieren reale Expressionsunterschiede, die sich letztlich im Verhaltensphänotyp auswirken.

6.4.2 PROBENZUSAMMENSETZUNG

Für die Untersuchung regions- und stadienspezifischer Transkriptome aus heterozygoten und wildtypischen pan-*Nrg1* Mäusen wurde die Strategie gewählt Proben einer größeren Anzahl von verschiedenen Tieren gemeinsam auf einem GeneChip® zu analysieren. Allgemeine transkriptomische Effekte können auf diese Art mit wenigen Replikaten von GeneChips® abgebildet werden. Die Individualität einzelner Tiere geht dagegen verloren und die Varianz der Expression einzelner Transkripte ist nachträglich schlechter aufzulösen, als dies mit einem GeneChip® pro Individuum möglich wäre. Für den Fall, dass durch die reduzierte Gendosis nur wenige Tiere transkriptomische Veränderungen zeigen, reduzieren sich durch die gemeinsame Analyse vieler Tiere die Detektionssignale der veränderten Transkripte. Dadurch dass die Signalwerte möglicherweise im Signalhintergrund untergehen, wird das Auffinden von kleinen Veränderungen erschwert. Die Anfälligkeit gegenüber Unterschieden in der Präparation der Hirnareale wird allerdings durch das Poolen von RNA mehrerer Tiere stark reduziert. Aufgrund individueller morphologischer Unterschiede ist die Dissektion identischer Hirnareale trotz größtmöglicher Präzision nicht zu 100 % zu gewährleisten. Für jede Kondition wurden Proben aus 12 Individuen gemeinsam durch einen GeneChip® analysiert und die für eine statistische Analyse mindestens erforderliche Zahl von drei unabhängigen Replikaten angefertigt. Die verwendeten RNA-Pools für die Hybridisierung von GeneChips® beinhalteten in keinem Fall Proben von mehr als zwei Nachkommen desselben Muttertieres. Dadurch sollte eine große Varianz abgedeckt und umweltbeeinflusste, individuelle Unterschiede ausgeglichen werden. Dies gilt sowohl für GeneChips® der embryonalen, als auch für GeneChips® der postnatalen Konditionen. Für die Zusammensetzung von letzteren wurden, für eine maximale Ausgeglichenheit, gleiche Anteile RNA von männlichen und weiblichen Individuen gemischt. Da von den Embryonen nur der Genotyp und

nicht das Geschlecht getestet wurde, ist die genaue Zusammensetzung dieser Pools an Anteilen männlicher und weiblicher Nachkommen unbekannt und zufällig verteilt. Die Validität dieser Strategie, RNA-Pools für die Hybridisierung von GeneChips® zu verwenden um damit die Aussagekraft der Studie zu erhöhen, wird von einer Untersuchung zur statistischen Aussagekraft verschiedentlich zusammengesetzter GeneChip®-Analysen gestützt (Peng et al. 2003). Anhand von Affymetrix GeneChip® Daten konnte gezeigt werden, dass 25 individuelle Proben zufällig auf 5 GeneChips® verteilt, gleiche Ergebnisse produzieren, wie 20 GeneChips® von 20 verschiedenen Proben. Veränderungen, die zwischen Vergleichsgruppen größer als 1,5-fach sind, können unter diesen Bedingungen zu 100 % als solche detektiert werden. In vorliegender Arbeit wurde bei gleichzeitiger Erhöhung der Zahl individueller Proben auf 36 die Anzahl an GeneChips® auf drei unabhängige Replikate einer Kondition reduziert. Bei der anschließenden Analyse der GeneChips® sollte dadurch eine hinreichend große statistische Power erreicht sein, die zur Auswahl auch kleiner Veränderungen ausreicht.

6.4.3 AUSWERTUNGSLGORITHMUS

Für die Analyse von Genechips® gibt es viele verschiedene Auswertungsalgorithmen (Absatz 4.6). Das MAS5 zugrunde liegende Berechnungsmodell zur Detektion von Signalwerten der *Probesets* misachtet die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der Oligonukleotidsonden des Arrays. Für die transkriptomischen Untersuchungen in dieser Arbeit wurde daher ein anderer Algorithmus als MAS5 verwendet. Beim Vergleich verschiedener Transkriptome reagiert die Auswahl an differentiell transkribierten Genen, insbesondere mit niedrigen Expressionswerten und damit im niedrigen Detektionsbereich, sensibel auf die Art und Weise der bioinformatischen Verarbeitung der Rohdaten. Die produzierten Ergebnisse können damit signifikant unterschiedlich sein. Die große Divergenz der Resultate ist problematisch. In der vorliegenden Arbeit konnte lediglich *Mtmr7* von allen angewandten Algorithmen (MAS5, PLIER16, Li&Wong, RMA und GCRMA) als dereguliertes Gen auffindig gemacht werden. Aus theoretischen Überlegungen heraus wurde GCRMA als Standard *probe* Summarization Algorithmus ausgewählt. Diese Entscheidung basiert auf überzeugenden physikalischen Modellen und empirisch erhobenen Daten (Hekstra et al. 2003, Naef & Magnasco 2003). GCRMA berechnet die Expressionsdaten einzelner GeneChips® auf Grundlage des gesamten Datensatzes eines Experiments. Für die Berücksichtigung sequenzspezifischer Faktoren bei der Oberflächenadsorption und Hybridisierung kurzer Oligonukleotide mit *probes* eines Microarrays spricht die hohe Detektionsvariabilität der *probes* eines *Probesets*, insbesondere der MM-Proben. Bei ungefähr einem Drittel aller *probe*-Paare lässt sich für die MM-*probe* ein höherer Signalwert detektieren. Bei 95% dieser *probe*-Paare befindet sich an mittlerer Basenposition der

Oligonukleotide ein Purin. Darüber hinaus kann auch für jede weitere Base einer *probe* eine positionsspezifische Affinitätsvariable abgeschätzt werden. Ein Basenaustausch an der zentralen Nukleotidposition von Adenosin zu Cytosin kann beispielsweise die Signalintensität einer *probe* um mehr als das Doppelte erhöhen. Weiteren Einfluss auf die Signalwerte einer *probe* übt die Biotinmarkierung der Sonden an Cytosin und Uracil aus. Zur Datenverarbeitung durch GCRMA werden nur die sequenzspezifisch gewichteten Signalwerte der PM *probes* verrechnet. In Vergleichsstudien der unterschiedlichen Auswerteverfahren konnte gezeigt werden, dass die modellbasierte, probenspezifische Hintergrundkorrektur von GCRMA zu vergleichsweise hoher Richtigkeit führt, insbesondere von niedrig konzentrierten Transkripten. Dies lässt sich anhand von spike-in Microarray Experimenten mit bekannten Konzentrationsänderungen einzelner Transkripte und durch Analyse von falsch positiv und falsch negativ beurteilten Transkripten anhand von receiver operator characteristic (ROC) Kurven ableiten. Wegen der bekannten Veränderungen der spike-in Transkripte lässt sich auch die Richtigkeit der Messwerte abschätzen. Diese ist bei der Benutzung von GCRMA optimiert (Irizarry et al. 2006, Schuster et al. 2007).

6.4.4 AUSWAHL UNTERSUCHTER GENE

Die Expressionsanalysen einzelner, in der Gesamtanalyse auffälliger Transkripte (Absatz 5.4) basiert auf verschiedenen Kriterien, die zu deren Auswahl an die Ergebnisse der GeneChip® Studie angelegt wurden. Ein Problem der statistischen Analyse von 45102 *Probesets* ist, dass bei einem Signifikanzlevel von $p < 0,05$ (t-Test) ohne weitere Korrekturen die Wahrscheinlichkeit bei 100 % liegt, dass ein oder mehrere *Probesets* rein zufällig dieses Signifikanzniveau erreichen. Um die Anzahl der falsch positiven Transkripte zu reduzieren sind Korrekturfaktoren für multiples Testen notwendig (Bonferroni-Korrektur; False discovery rate (FDR) (Benjamini et al. 2001) etc.). Bei der Analyse der Transkriptome von *Nrg1^{+/-}* und *Nrg1^{+/+}* Mäusen genügen allerdings keine *Probesets* diesen erweiterten Anforderungen bei gleichzeitigem fold change größer 1,5. Wissenlich, dass ein Anteil der ausgewählten *Probesets* falsch positiv und möglicherweise ebenso *Probesets* falsch negativ sind, wurden die Expressionen ausgesuchter Gene weiter untersucht. Hierfür wurden hauptsächlich Gene mit hoher biologischer Plausibilität ausgesucht. Durch dieses weitere Kriterium wurde versucht, die Anzahl der falsch positiven Detektionen nochmals zu reduzieren.

6.4.5 QUANTITATIVE REALTIME RT-PCR

Für viele der untersuchten Gene wurde an regionsspezifisch isolierter RNA quantitative realtime RT-PCR durchgeführt. Ein Experiment zur quantitativen Analyse eines Transkripts umfasste 5 Proben des heterozygoten und 5 Proben des wildtypischen Genotyps. Jede Probe ist dabei ein RNA-Pool aus individuellen Präparaten von 4 verschiedenen Tieren. Es wurden zudem andere Kombinationen der

Proben als mit den GeneChips® analysiert. Eventuell vorhandene genomische DNA wurde durch DNase I während der Aufreinigungsprozedur eliminiert. Zum Ausgleich qualitativer Unterschiede wurden alle Proben so ausgewählt, dass RNA von vergleichbarer Qualität (RIN) verwendet wurde. Außerdem wurde zur Vermeidung von Ungleichgewichten zwischen 5'- und 3'-Sequenzbereichen, mit random Hexanukleotiden revers transkribiert (Absatz 4.7.2). In vorangehenden Versuchen wurde deutlich, dass nach der reversen Transkription von RNA die Ausbeute erhaltener cDNA starken Schwankungen unterliegt. Dies wurde vor allem auf den leicht variablen Einsatz reverser Transkriptase zurückgeführt. Jede für quantitative Analysen genutzte RNA wurde deshalb parallel und mit ein und denselben Enzym- und ergänzenden Reaktionslösungen behandelt. Nach Abschluss der reversen Transkription kann die cDNA nur sehr ungenau spektralphotometrisch in Lösung mengenmäßig bestimmt werden. Verunreinigungen der cDNA beeinflussen zudem die Effizienz der nachfolgenden qPCR. Zur Entfernung störender Bestandteile wurde durch RNase H und RNase A verbliebene RNA aus RNA/DNA-Hybriden, sowie restliche einzelsträngige RNA enzymatisch abgebaut. Alle niedermolekularen Lösungsbestandteile wurden durch eine Aufreinigung der cDNA entfernt (vgl. Absatz 4.7.2). Die Konzentrationen der verschiedenen Proben einzelsträngiger cDNA wurden, unter Beachtung des entsprechenden Absorptionskoeffizienten, dreifach spektralphotometrisch bestimmt. Alle Proben wurden abschließend auf eine gleiche Konzentration von 2,5 ng/µl verdünnt. Für die auf diese Art und Weise verarbeiteten Proben konnte in separaten qPCR Experimenten gezeigt werden, dass die nachfolgenden Reaktionen gleiche Effizienzen aufweisen. Ebenso können durch gleiche eingesetzte Ausgangsmengen der cDNA, bestmöglich vergleichbare Resultate einzelner Transkripte erhalten werden. Die Normalisierung verschiedener Proben cDNA basiert demnach auf einer spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung und anschließendem Ausgleich abweichender Proben. Anhand interner Kontrollgene wie *Actb* und *Gapdh* konnte darüber hinaus exemplarisch an einigen der Proben gezeigt werden, dass quantitativ keine signifikanten Unterschiede zwischen verschiedenen Proben existieren.

Für die Analyse des Expressionsunterschieds einzelner Transkripte zwischen den Genotypen *Nrg1*^{+/-} und *Nrg1*^{+/+} wurden an allen 10 Proben je 5 Replikatmessungen angestellt und die Reaktionseffizienzen durch die Eichung anhand einer Standardverdünnungsreihe bestimmt. Die Standardabweichungen der C_t-Werte repliziert gemessener Proben sind im Mittel mit circa 0,1 sehr gering. Dies ergibt für die technischen Replikate einen sehr geringen Fehler, der lediglich eine Ungenauigkeit der tatsächlichen Expressionsverhältnisse von $\pm 2^{0,1}$ zur Folge hat. Fasst man nun die mittleren Expressionswerte der 5 biologischen Replikate eines Genotyps zusammen, können theoretisch auch sehr geringe Unterschiede zwischen den Genotypen ausgemacht werden. In den meisten Fällen ist eine größere Varianz innerhalb der Ergebnisse von analysierten Proben

biologischer Replikate zu beobachten, als aufgrund der vorangehenden Experimente mit *Actb* und *Gapdh* zunächst erwartet wurde. Das hat zur Folge, dass die Varianz innerhalb der biologischen Replikate weitaus größer ist, als die technische. Zurückzuführen ist dies auf die individuellen Unterschiede einzelner Tiere und die Variabilität der Expression einzelner Gene. Da sich die Proben in diesem Fall aus einem RNA-Pool von 4 individuellen Tieren zusammensetzten, ist der Einfluss von individueller Varianz hier etwas größer als bei den GeneChips®. Mit je 5 vermessenen Proben der beiden Genotypen wurden die mittleren Expressionswerte von 20 heterozygoten und 20 wildtypischen Tieren erfasst. Für *Nrg1* konnte mit dieser Methode die reduzierte Expression bestätigt werden. Für unterschiedliche Transkriptsequenzen konnte zusätzlich auch deren Kopienzahl exakt bestimmt werden.

6.4.6 IN SITU HYBRIDISIERUNG

In kolorimetrischer Darstellung dient die ISH an Gewebeschnitten normalerweise zur qualitativen Untersuchung von lokalen Expressionsmustern. Die klassische Methode für quantitative ISH funktioniert über die radioaktive Markierung der verwendeten Sonden. Für eine exakte Expressionslokalisation sind bis zur möglichen Quantifizierung von Silberkörnchen lange Inkubationszeiten einzuhalten. Für einen hohen Durchsatz an ISH, wie er in dieser Arbeit erfolgte, ist diese Methode ungeeignet. Für quantitative Auswertungen von kolorimetrisch dargestellten ISH sind einige Besonderheiten einzuhalten. Innerhalb der Prozedur der ISH sind viele Schritte zu absolvieren, die physikalisch oder enzymatisch das Ergebnis potentiell beeinflussen können. Zur Reduktion von Behandlungsungleichheiten wurden zu vergleichende Kryomikrotomschnitte beider Genotypen auf demselben Objektträger angeordnet und somit identisch behandelt. Besonderes Augenmerk wurde auch hier auf die Verwendung von Embryonen des gleichen Altersstadiums gelegt, die nach Möglichkeit demselben Muttertier entstammten. Ausschlaggebend für eine durchführbare Quantifizierung ist die Anpassung der individuellen Farbumsätze der Substrate NBT und BCIP zu einem unlöslichen Niederschlag. Enzymatisch wird die Reaktion durch die an anti-DIG F_{ab}-Fragment gekoppelte alkalische Phosphatase ausgelöst. Zum Farbumsatz ist die Bildung von Kristallisationskeimen notwendig. Aus diesem Grund verläuft die Reaktion nicht linear, was die Quantifizierung erschwert. In gewissem Maße korreliert aber die Quantität des Farbumsatzes in direkter Umgebung von ISH-Sonden mit der Menge an hybridisierten Transkripten. Dies gilt solange die Farbreaktion nicht gesättigt ist. Alle zu quantifizierenden ISH Experimente wurden aus diesem Grunde in einem Zustand relativ schwacher spezifischer Färbungen abgeschlossen. Auf den unter denselben Bedingungen aufgenommenen Bildern wurden die auszuwertenden Areale anhand parallel angefertigter Nissl Färbungen einer weiteren Schnittserie identifiziert. Die im Ganzen sehr

aufwendige Prozedur von der Anfertigung von morphologisch intakten Kryomikrotomschnitten bis hin zur Auswertung spezifisch gefärbter Gehirnareale ist nicht selten mit Artefakten verschiedenster Art belastet, die zu einem relativ großen Ausschuss an auszuwertenden Schnitten führt. An sorgfältig selektierten ISH von Schnittebenen durch relevante Regionen wurden die Mediane der Grauwertevertellungen ausgewählter Areale gemessen. Diese sind relativ unabhängig gegenüber Ausreißern und spiegeln die Gesamtexpression regionspezifisch in einem Zahlenwert wider. Zur statistischen Analyse wurden Daten von ausgewerteten Schnitten mehrerer unabhängiger Tiere miteinander verrechnet, um Variabilitäten einzelner Vergleiche eines heterozygoten *Nrg1*^{+/-} und wildtypischen *Nrg1*^{+/+} Gehirns abschätzen zu können.

Bei der Expressionsanalyse von *Nrg1* konnten die erhaltenen Färbungen mit statistischer Sicherheit als signifikant unterschiedlich bewertet werden (Absatz 5.4.1). Die zwischen den Genotypen quantifizierten Unterschiede in den Färbungsintensitäten machen je nach Region für *Nrg1* zwischen 4 % und 9 % aus. Bestehen im Wesentlichen zwischen den Genotypen tatsächliche Expressionsunterschiede, können diese folglich auch mit dieser Methode nachgewiesen werden. Nominell fallen die Werte geringer aus als mit anderen Methoden gemessene Unterschiede (GeneChip®, qPCR). Die geringe Differenz der Messwerte kolorimetrisch dargestellter ISH wie sie für *Nrg1* festgestellt wurden ist für die Expressionsanalyse von schwach deregulierten Genen problematisch. Ein hauptsächlicher Grund für die kleineren Gesamtunterschiede ist der relativ hohe Grauwert des Hintergrundes und die nicht linear verlaufende Farbreaktion.

In einer nützlichen Variante der Methode könnte man fluoreszierende ISH-Sonden einsetzen. Die Detektion beruht dabei nicht auf einer Präzipitatbildung und korreliert daher besser mit der Menge an mRNA im Gewebe. Die enzymatische Tyramid Signalamplifikation (Speel et al. 1999) ist für ISH an koronalen Kryomikrotomschnitten aber noch nicht ausreichend etabliert und bedarf in Zukunft weiterer Experimente.

6.5 RESÜMEE

Transkriptomische Unterschiede verschiedener Konditionen anhand einzelner Transkripte zu bewerten ist v.a. für Gene sinnvoll und naheliegend, deren genaue molekulare Funktion bekannt ist. Durch den Einzelnachweis dieser Gene können im Weiteren daraus resultierende funktionelle Effekte einer Deregulation abgeschätzt werden. Dieser von einem Gen als der kleinsten Funktionseinheit des Zellsystems ausgehende Ansatz ist für eine Validierung der bioinformatisch ausgewerteten Datensätze von GeneChips® notwendig. Zur Bestätigung, dass das genetische Defizit an *Nrg1* transkriptomische Konsequenzen nach sich zieht, wurde zuerst die Expression dieses zentralen Gens der vorliegenden Arbeit genauer untersucht. Durch die sich gegenseitig

bestätigenden Befunde aus GeneChip®, ISH und qPCR-Analysen dient *Nrg1* auch als Positivkontrolle für die angestellten Nachweisverfahren.

Die Gesamtanalyse der Genchips® zeigt, dass transkriptomische Veränderungen vorwiegend embryonal in den Regionen AT und FC auftreten (vgl. Absatz 5.3.2 und 6.3.4). Aus diesem Grund wurden hauptsächlich Deregulationen von Genen dieses frontalen Systems untersucht. Für die Auswahl einzelner Transkripte wurden als besondere Merkmale die statistische Sicherheit der Transkriptdetektion und die Höhe des Expressionsunterschieds zwischen den Genotypen betrachtet. Alle dabei als differentiell exprimiert eingestuftene Gene wurden mit Hilfe verfügbarer Literatur separat studiert und einzelne Gene mit ausgewiesenen neuroentwicklungsbiologischen Funktionen (*Gria1*, *Nptx2*, *Wnt5a*, *Fzd3*, *Neo1* und *Fezf2*) für weiterführende Analysen ausgewählt. Besonderes Augenmerk wurde auf Gene gelegt, die in verschiedenen Konditionen simultan die Auswahlkriterien erfüllten (*Mtmr7*, *Pcm1*). Ebenfalls wurden Gene untersucht, die aufgrund einer Pathway-Analyse funktionell zu einem der deregulierten Funktionssysteme gehören (Absatz 6.6.3.2). Im speziellen Fall wurden als funktionelle Bestandteile des Wnt-Signalweges *Wnt5a* und *Fzd3* untersucht (Absatz 5.4.5). Für *Arhgap18* gibt es überzeugende Studien zur Assoziation mit Schizophrenie (Potkin et al. 2009). Assoziationen zu Schizophrenie sind aufgrund der immens hohen Anzahl und statistischen Unsicherheiten der Studien allerdings stets genauer zu prüfen. So sind für sehr viele weitere Gene Assoziationen publiziert, die sich in vielen Fällen als nicht haltbar herausstellen. Für *Pcm1* ist die direkte Interaktion mit dem Suszeptibilitätsgen *Disc1* bekannt (Bradshaw & Porteous 2010, Hashimoto et al. 2011).

Trotz dieser Auswahlkriterien befinden sich tatsächlich unter den als dereguliert detektierten Genen sehr viele falsch positive. Andererseits sind sicherlich nicht alle deregulierten Gene als solche detektiert worden und fälschlicherweise bei der Analyse negativ. Was bleibt ist ein Missverhältnis zwischen tatsächlich positiv und tatsächlich falsch detektierten Genen. Die Auswahlmethode stellt sich somit für die Detektion kleiner Unterschiede einzelner Gene als zu unspezifisch heraus. Grundvoraussetzung für eine Transkriptomstudie mit zu erwartenden sehr kleinen Unterschieden ist eine solide bioinformatische Verarbeitung der Genechip® Daten. Sind die Effekte sehr klein und können nur schwer vom Signalhintergrund getrennt werden, wird dies umso wichtiger. Es zeigt sich im Tiermodell, entsprechend der Befunde am Menschen, dass der Einfluss genetischer Variation im Gen *Nrg1* gering ausfällt.

6.6 WEITERFÜHRENDE STUDIEN

Aufgrund der geringen Übereinstimmungen der Ergebnisse bislang angewandter Methoden zur Analyse und Validierung der transkriptomischen Vergleichsstudie zwischen heterozygoten $Nrg1^{+/-}$ und wildtypischen $Nrg1^{+/+}$ Mäusen sind die Schwerpunkte weiterführender Experimente möglicherweise anders zu setzen. Neben der Überprüfung der statistischen Auswerteverfahren ist ein hilfreicher und vielversprechender Ansatz der GeneChip® Analyse, die Deregulation von Gruppen funktionell zusammenhängender Gene zu untersuchen. Dies betrifft insbesondere auch die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko in Zusammenhang stehenden Effektoren und deren Wirkmechanismen. Auf diese Weise können möglicherweise die zellulären Grundlagen der neuropathologischen Veränderungen besser aufgeklärt werden, als dies durch die Expressionsanalyse einzelner Gene möglich ist.

6.6.1 BETROFFENE FUNKTIONSSYSTEME

Zum Aufspüren globaler transkriptomischer Veränderungen, insbesondere wenn es sich um subtile Veränderungen handelt, wird die Aussage stichhaltiger und widerstandsfähiger gegenüber statistischen Fehlern der durchgeführten Berechnungen, wenn sie von zusammenhängenden zellulären Funktionssystemen ausgehend, veränderte zelluläre Prozesse identifiziert. Um allgemein deregulierte Prozesse und Funktionssysteme ausfindig zu machen, können dabei fehlerhafte Detektionen von wenigen einzelnen Transkripten in Kauf genommen werden. Auf diese Weise werden auch Transkripte identifiziert, deren Einfluss alleine auf den ersten Blick marginal sein kann, sich aber in der Gesamtheit durch die gleichzeitige Veränderung weiterer, kovarianter Transkripte des gleichen Systems funktionell addieren oder multiplizieren kann. Eine solche Analysemethode wird von Datenbanken unterstützt, die genaue Informationen über zelluläre Funktionssysteme und daran beteiligte Komponenten abrufbar machen. Für die Auswertungen dieser Arbeit haben sich die Web-basierte bioinformatischen Analysemodule der Datenbank DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v.6.7) (Dennis et al. 2003) als nützlich erwiesen. Mit Hilfe von Genannotationen aus Datenbanken wie KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Kanehisa & Goto 2000), GO (the Gene Ontology) (Ashburner et al. 2000) u.a.m. können komplexe Zusammenhänge innerhalb einer zusammengestellten Transkriptausswahl abgebildet werden. Je größer die funktionellen Beziehungen der Transkripte sind, desto zuverlässiger und mit steigender statistischer Aussagekraft gelingt diese globale qualitative Analyse auch an kurzen Listen. Die Quantität der Veränderungen einzelner Transkripte spielt dabei keine Rolle. Getestet wird nur, ob gegenüber der transkriptomischen Gesamtheit überzufällige Anhäufungen von Transkripten, für die ein annotierter Zusammenhang besteht, existieren. Aussgekräftige Ergebnisse erhält man, wenn

eine größere Selektion ausgewählter Transkripte von allen Regionen gemeinsam analysiert wird, so dass darin mehrere Transkripte denselben Signalwegen zugeordnet werden können.

6.6.2 GO-ANALYSE

Mit Hilfe der GO Datenbank bestehen multiple Klassifizierungsmöglichkeiten für die globale Analyse veränderter Prozesse und zellulärer Funktionssysteme. Problematisch ist die große Diversität und Redundanz der Kategorisierung einzelner Gene, die sich insbesondere unter entwicklungsbiologischen Aspekten als unzureichend darstellt.

Untersucht man die stadien- und regionspezifisch deregulierten Transkripte entsprechend ihrer Annotationen in der GO Datenbank, zeichnet sich anhand der vielzählig untergliederten Terms zu biologischen Prozessen, molekularen Funktionen und zellulären Komponenten, ein neuroentwicklungsbiologisch undifferenziertes und weniger konkretes Bild der gesamten transkriptomischen Veränderungen ab, als dies mit Hilfe der KEGG Datenbank der Fall ist. Die ersten 20 signifikant überrepräsentierten GO-terms der Kategorien Biological Process, Molecular Function und Cellular Component sind im Anhang in Tabelle 25 zusammengefasst.

6.6.3 DEREGULIERTE SIGNALWEGE

6.6.3.1 UNTERSUCHUNG ZUM POSTNATALEN ZEITPUNKT

Eine mit den Möglichkeiten von DAVID durchgeführte Untersuchung von allen 427 postnatal veränderten Transkripten ergibt in der Datenbank KEGG lediglich einen, signifikant überrepräsentierten Signalweg. Dieser wird unter der Bezeichnung Axon guidance mmu04360 geführt. *Nrg1* ist in dieser Auswahlliste das einzige Transkript, das dem ErbB-Signalweg zugeordnet werden kann (vgl. 6.6.3.2). Ohne die Identifikationsnummer von *Nrg1* gibt DAVID für Axon guidance als EASE Score einen modifizierten Fisher Exact Test p-value von $6,2E-2$ an. Dies entspricht einem signifikanten Treffer. Die Veränderungen einzelner Transkripte betreffen für diesen Signalweg hauptsächlich thalamische Regionen und sind überwiegend in den Kontrollregionen PT und SC auszumachen. Die Lenkung von Axonen findet zudem embryonal statt, sodass der Befund zunächst wenig einleuchtend ist. Viele der Signalmoleküle, die embryonal an der Wegfindung von Axonen beteiligt sind, wirken postnatal aber auf Prozesse der neuronalen Plastizität (Lai & Ip 2009, Pasterkamp & Giger 2009). Diese Tatsache macht die Detektion des Pathways wiederum zum postnatalen Stadium plausibel.

Tabelle 20: Transkripte des KEGG-pathways: Axon guidance mmu04360

Probeset ID	Gensymbol	Expressionsquotient	Regulation	Region
1446383_at	<i>Efna5</i>	1,9	up	PT
1437920_at	<i>Epha5</i>	1,6	down	PT
1420995_at	<i>Plxna3</i>	2,2	down	PT
1450906_at	<i>Plxnc1</i>	2,3	down	AT
1441162_at	<i>Rock1</i>	1,5	up	AT
1433920_at	<i>Sema4c</i>	2,9	up	SC
1458140_at	<i>Slit2</i>	1,6	down	SC

6.6.3.2 UNTERSUCHUNG ZUM EMBRYONALEN ZEITPUNKT

Basiert die mit DAVID angestellte Untersuchung auf den 676 embryonal differentiell exprimierten Gentranskripten, können davon 7 dem ErbB-Signalweg (KEGG - mmu04012) zugeordnet werden (siehe Tabelle 21). Dazu gehören neben *Nrg1* die Gene *Camk2a*, *Camk2d*, *Egrf*, *Eif4ebp1*, *Mapk1* und *Pik3r3*. Für diesen NRG1-abhängigen Signalweg kann eine signifikante Erhöhung der Zahl an Transkripten innerhalb der verwendeten Auswahlliste auch statistisch belegt werden. DAVID gibt hierfür einen EASE Score von 6,2E-2 an. Tatsächlich kann dadurch festgestellt werden, dass die nachweislich verminderte Expression von *Nrg1* (vgl. Absatz 5.4.1) weitreichende Folgen für die Expression weiterer Gene nach sich zieht. Würde *Nrg1* im Genotyp *Nrg1^{+/-}* dasselbe Expressionsniveau erreichen wie bei Vorhandensein von natürlicherweise zwei Allelen im Genotyp *Nrg1^{+/+}*, wären keine weiteren zellulären Regulationsmechanismen auszumachen.

Tabelle 21 Transkripte des KEGG pathways: ErbB signaling mmu04012

Probeset ID	Gensymbol	Expressionsquotient	Regulation	Region
1457311_at	<i>Camk2a</i>	1,7	up	FC
1459457_at	<i>Camk2d</i>	2,2	up	AT
1435888_at	<i>Egfr</i>	1,9	up	FC
1434976_x_at	<i>Eif4ebp1</i>	1,9	down	FC
1419568_at	<i>Mapk1</i>	1,8	down	FC
1456524_at	<i>Nrg1</i>	2,2	down	FC
1456482_at	<i>Pik3r3</i>	1,5	down	AT

Eine Möglichkeit des Organismus, die genetische Manipulation des untersuchten *Nrg1* Gens auf zellulärer Ebene auszugleichen besteht darin, den durch Genprodukte von *Nrg1* ausgelösten Signalweg zu verstärken und so ein Defizit an NRG1 zu kompensieren. Die in Tabelle 21 aufgelisteten Regulationen einzelner Gentranskripte zum Ausgleich der partiellen Reduktion von *Nrg1* bewirken vermutlich insgesamt eine höhere Empfindlichkeit des Signalwegs.

Niedrigere Expressionslevel des Liganden *Nrg1* werden durch eine Erhöhung der Rezeptorkonzentration von EGFR (ERBB1) und durch intrazelluläre Verstärkungen der Signale mindestens teilweise kompensiert. Die verminderte Expression der regulatorischen Untereinheit der intrazellulär in den Signalweg involvierten Phosphoinositid-3-Kinase verstärkt deren enzymatische Aktivität. Die erhöhte Expression der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen *Camk2a* und *Camk2d* sollten ebenfalls eine erhöhte Sensitivität der intrazellulären Signalkaskade

DISKUSSION

von NRG1 bewirken. Auch eine verminderte Expression an eukaryontischem Translationsinitiationsfaktor 4E Bindeprotein kann laut KEGG Annotation reduzierte Signale von NRG1 intrazellulär ausgleichen. Die normalerweise von NRG1 bewirkte Inhibition von EI4EBP1 wird bei vermindertem NRG1 Signal konstant gehalten, wenn weniger EI4EBP1 gebildet wird.

Da Genregulationen innerhalb der Signalkaskade von NRG1 festgestellt werden können, ist auch auf dem Level von Proteinen, als den molekularen Funktionseinheiten der Gene, von einer Reduktion auszugehen. Diese Tatsache stellt die Grundlage für einen veränderten Phänotyp in heterozygoten *Nrg1*^{+/-} Mäusen dar. Indem die verminderte Expression von *Nrg1* durch eine Gegenregulation des ErbB-Signalweges zumindest teilweise kompensiert wird, ist eine Reduktion des Effektes auf andere Transkripte zu erwarten. Die subtilen Unterschiede der beiden untersuchten Genotypen bestätigen dies.

Viele der intrazellulären Enzymkaskaden konvergieren an bestimmten Stellen, sodass zentrale Proteine in unterschiedliche Signalwege involviert sein können. Dies gilt auch für Schlüsselproteine des ErbB Signalweges. Damit sich ein klareres und differenzierteres Bild der komplexen transkriptomischen Auswirkungen des *Nrg1* Defizits herauskristallisiert, wurde die Pathway-Analyse ohne die in den direkten NRG1 Signalweg inbegriffenen Gene durchgeführt. Dezimiert man die Auswahlliste diesbezüglich von 676 auf 669 Transkripte, werden die in Tabelle 22 zusammengefassten Funktionssysteme als signifikant dereguliert eingestuft.

Tabelle 22 Funktionelle KEGG Annotationen 669 embryonal ausgewählter Transkripte

KEGG-pathway	Transcripts	EASE-Score	Fold Enrichment
Cell cycle	12	1,3E-3	3,1
Cell adhesion molecules	11	7,2E-3	2,7
SNARE interactions	5	2,4E-2	4,5
Basal cell carcinoma	6	2,6E-2	3,5
Pathways in cancer	17	3,7E-2	1,7
Oocyte meiosis	8	4,8 E-2	2,4
Viral myocarditis	6	7,0 E-2	2,7
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	6	7,4 E-2	2,6
Wnt signaling pathway	9	8,3 E-2	2,0
Hedgehog signaling pathway	5	8,4 E-2	3,0
Amyotrophic lateral sclerosis	5	8,9 E-2	2,9
ECM-receptor interaction	6	9,6 E-2	2,4
Acute myeloid leukemia	5	9,8 E-2	2,8

Ein detektierter Signalweg dieser Auflistung aus dem bereits Expressionslevel der Gene *Fzd3* und *Wnt5a* in separaten Experimenten (Absatz 5.4.5) genauer analysiert wurden ist der Wnt signaling pathway mmu04310. Dieser ist in der zusammengestellten embryonalen Auswahlliste mit 9 Genen signifikant überrepräsentiert (Tabelle 23) und neuroentwicklungsbiologisch von bekannter Relevanz. Dieses Resultat wird mit einem EASE Score von 8,3E-2 bewertet. Trotz der negativen Validierung der einzelnen Gene (*Fzd3* und *Wnt5a*) liefert diese Art der Analyse weitere Hinweise darauf, dass der Signalweg im Ganzen dereguliert ist.

Tabelle 23: Transkripte des KEGG-pathways: Wnt signaling mmu04310

Probeset ID	Gensymbol	Expressionsquotient	Regulation	Region
1422129_at	<i>Apc2</i>	2,8	down	AT
1459516_at	<i>Cul1</i>	1,7	up	SC
1447294_at	<i>Fbxw11</i>	1,8	down	SC
1421157_at	<i>Fzd3</i>	1,5	down	AT
1436398_at	<i>Lef1</i>	2,1	down	FC
1429177_x_at	<i>Sox17</i>	1,8	down	SC
1425229_a_at	<i>Tcf7L2</i>	1,6	up	FC
1425425_a_at	<i>Wif1</i>	1,6	up	AT
1448818_at	<i>Wnt5a</i>	1,7	down	FC

Mit einem EASE Score von $1,3E-3$ wird der höchste Signifikanzwert in der Zusammenstellung von Tabelle 22 für den in der Datenbank KEGG annotierten Pathways Cell cycle mmu04110 erreicht. Insgesamt können 12 Transkripte der verwendeten Auswahl diesem Signalweg zugewiesen werden. Die veränderten Expressionen von Regulationsgenen der Zellzykluskontrolle deregulieren diesem Ergebnis zufolge in heterozygoten *Nrg1*^{+/-} Mäusen den zellulären Ablauf der Zellteilung. Die durch die GeneChips® experimentell belegten Genregulationen (Tabelle 24) und die Art und Weise der Interaktionen der 12 Transkripte legen den Schluss nahe, dass der Zellzyklus dadurch vermutlich verlangsamt wird.

Tabelle 24: Transkripte des KEGG-pathways: Cell cycle mmu04110

Probeset ID	Gensymbol	Expressionsquotient	Regulation	Region
1447363_s_at	<i>Bub1b</i>	2,4	down	AT
1416076_at	<i>Ccnb1</i>	1,7	down	AT
1437070_at	<i>Cdc14b</i>	1,5	up	AT
1439394_x_at	<i>Cdc20</i>	2,6	down	FC
1417131_at	<i>Cdc25a</i>	2,9	down	AT
1422252_a_at	<i>Cdc25c</i>	2,2	down	FC
1422747_at	<i>Chek2</i>	1,6	up	AT
1459516_at	<i>Cul1</i>	1,7	up	SC
1449773_s_at	<i>Gadd45b</i>	2,3	down	FC
1445341_at	<i>Gm10608</i>	1,5	down	FC
1439704_at	<i>Hdac2</i>	1,9	down	FC
1440841_at	<i>Ywhae</i>	1,6	down	AT

Die Gene *Gm10608* und *Ywhae* regulieren in einer Signalkaskade über *Cdc25b* letztlich *Ccnb1* (Cyclin B1), das mit der cyclinabhängigen Kinase D (*Cdk1*) interagiert. Alle 4 Gene zeigen im embryonalen frontalen System (AT und FC E15,5) heterozygoter *Nrg1*^{+/-} Mäuse gegenüber den Kontrolltranskriptomen wildtypischer *Nrg1*^{+/+} Mäuse verminderte Expressionswerte. Hinzu kommt eine verstärkte Expression von *Chek2*. Die auf *Cdc25b* inhibierend wirkenden Genprodukte von *Chek2* führen ebenfalls zu einer langsameren Anreicherung von *Ccnb1* während der G2/M Phase des Zellzyklus. Parallel in gleicher Weise wirkt sich die Expressionsabnahme von *Cdc25a* auf *Cdk1* aus. Gegensätzlich zu diesen funktionell eng assoziierten Genen wirkt allerdings das niedrigere Expressionslevel von *Gadd45b*, das inhibierend wirkend mit *Ccnb1* interagiert. Begutachtet man die Expressionslevel dieser Gene gemeinsam, kann aber insgesamt von einer Verlängerung der G2/M

Phase des Zellzyklus ausgegangen werden. Wie bereits in vorhergehenden Abschnitten dieser Arbeit erwähnt, sind für eine normale Histogenese des ZNS zeitlich genau ablaufende Zellteilungen notwendig. Entsprechend einer publizierten Hypothese zur Länge des Zellzyklus und dessen Einfluss auf die Proliferation und Neurogenese (Götz & Huttner 2005) korreliert die Verlängerung des Zellzyklus mit der Differenzierung von Vorläuferzellen. Die durch die Expressionsstudie von *Sema5a* in *Nrg1^{+/-}* Mäusen beobachtete vorzeitige Migration von *Sema5a*-positiven Zellen könnte dazu passend die Folge einer verfrühten Reifung neuronaler Vorläuferzellen sein.

Während der Embryonalentwicklung nimmt die Länge des Zellzyklus mit fortschreitender Dauer natürlicherweise kontinuierlich zu. Durch die große Zahl und die genaue Altersbestimmung von 12 individuellen Embryonen pro GeneChip® ist es allerdings unwahrscheinlich, dass zwischen den Genotypen ein genereller Altersunterschied bestand und dies die Transkriptomstudie beeinflusste. Im untersuchten Tiermodell lässt die Anzahl und Wirkungsweise der veränderten Gene der Zellzykluskontrolle (Tabelle 24) darauf schließen, dass die Genese neuer Zellen störanfällig gegenüber Veränderungen von *Nrg1* ist. Die Bestimmung der genauen Zellzykluszeiten in gleichen Entwicklungsstadien von *Nrg1^{+/-}* und *Nrg1^{+/+}* könnte daher ein Ziel zukünftiger Experimente sein.

7 VERZEICHNISSE

7.1 WEBSITES

Allen Brain Atlas	http://www.brain-map.org/
DAVID Bioinformatics Resources	http://david.abcc.ncifcrf.gov/
The Gene Ontology	http://www.geneontology.org/
KEGG Pathway Database	http://www.genome.jp/kegg/
SZGene (SchizophreniaGene)	http://www.szgene.org/
ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij/

7.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AD	Anterodorsal thalamic nucleus	MAS5	Microarray Suite 5
AT	Anteromediale Thalamuskern	MD	Mediodorsal thalamic nucleus
AV	Anteroventral thalamic nucleus	MM	Mismatch <i>probe</i>
AM	Anteromedial thalamic nucleus	MZ	Marginalzone
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat	NBT	4-Nitro blue tetrazolium chloride
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	P28	Altersstadium, postnataler Tag 28
CDS	Protein-kodierende Sequenz	PrL	Prälimbischer Cortex
CP	Kortikale Platte	<i>Probe</i>	Einzelnes <i>feature</i> eines Affymetrix Microarrays
DIG	Digoxigenin	<i>Probesets</i>	Zusammensetzung einzelner <i>probes</i>
E15,5	Altersstadium, Embryonaltag 15,5	PT	Posteriore Thalamuskern
FA	Formamid	PM	Perfect match <i>probe</i>
FC	Frontaler Cortex	qPCR	Quantitative RT-PCR
GCRMA	GeneChip Robust Multiarray Average	RIN	RNA integrity number
GWAS	Genomewide Association Study	RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
GWL	Genomewide Linkage	SC	Somatosensorischer Cortex
IL	Infralimbischer Cortex	SD	Standarabweichung
ISH	<i>In situ</i> Hybridisierung	SEM	Standar error oft the mean
IMZ	Intermediärzone	SNP	Single Nucleotide Polymorphism
IVT	<i>In vitro</i> Transkription	SVZ	Subventrikulärzone
KIT	Karlsruher Institut für Technologie	VB	Ventrobasalkomplex aus VPM
LD	Laterodorsal thalamic nucleus	VPL	Ventral posterolateral nucleus
LG	Lateral geniculate nucleus	VPM	Ventral posteromedial nucleus
LP	Lateral posterior thalamic nucleus	VZ	Ventrikulärzone

7.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Ausgewählte Sektoren koronaler Kryomikrotomschnitte E15,5	42
Abbildung 2:	Kartierung des anterioren Thalamus E15,5	45
Abbildung 3:	Entwicklung und posteriore Grenze von FC.....	47
Abbildung 4:	RNA Qualitätskontrolle	48
Abbildung 5:	Farbkodierung untersuchter Gehirnregionen	50
Abbildung 6:	Gesamtverteilungen der GeneChip® Signalwerte	51
Abbildung 7:	Korrelationen zwischen Replikaten, Genotypen, Regionen und Altersstadien	53
Abbildung 8:	Auswahl deregulierter Probesets	55
Abbildung 9:	Expressionsanalyse Nrg1	59
Abbildung 10:	Expressionsanalyse Mtmr7	61
Abbildung 11:	Expressionsanalyse Pcm1	64
Abbildung 12:	Expressionsanalyse Gria1	66
Abbildung 13:	Expressionsanalyse Wnt5a	68
Abbildung 14:	Expressionsanalyse Fzd3.....	70
Abbildung 15:	Expressionsanalyse Neo1	71
Abbildung 16:	Expressionsanalyse Arhgap18	73
Abbildung 17:	Expressionsanalyse Fezf2	74
Abbildung 18:	Expressionsanalyse Nptx2	76
Abbildung 19:	Expressionsanalyse Ttr	77
Abbildung 20:	Expressionsanalyse Sema5a	79
Abbildung 21:	RNA-Pools embryonaler Tiere E15,5	117
Abbildung 22:	RNA-Pools postnataler Tiere P28.....	118
Abbildung 23:	Quantifizierte Auswahlbereiche von AT, FC, PT und SC	120

7.4 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Verhaltensmerkmale Nrg1 defizienter Mäuse.....	19
Tabelle 2:	Liste verwendeter Oligonukleotide	22
Tabelle 3:	Eigenschaften verwendeter ISH-Sonden	23
Tabelle 4:	Verwendete Enzyme, RNase-Inhibitoren und Antikörper	24
Tabelle 5:	Verwendete Geräte	25
Tabelle 6:	Abkürzungsnomenklatur präparierter Gewebeteile.....	27
Tabelle 7:	Mittlere Konzentrationen und Qualitäten verwendeter RNA-Proben.....	49
Tabelle 8:	Auflistung der kriterienerfüllenden Probesets	55
Tabelle 9:	Nrg1: GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1456524_at	57
Tabelle 10:	Mtmr7: GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1447831_s_at	60
Tabelle 11:	Pcm1: GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1438528_at.....	63
Tabelle 12:	Gria1: GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1448972_at	66
Tabelle 13:	Wnt5a: GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1448818_at.....	68
Tabelle 14:	Fzd3: GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1421157_at	69
Tabelle 15:	Neo1: GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1444295_at	71
Tabelle 16:	Arhgap18: GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1431133_at	72
Tabelle 17:	Fezf2: GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1418790_at	74
Tabelle 18:	Nptx2: GeneChip® Detektionswerte, Probeset 1420720_at	75
Tabelle 19:	tr: GeneChip® Detektionswerte	77
Tabelle 20:	Transkripte des KEGG-pathways: Axon guidance mmu04360	97
Tabelle 21:	Transkripte des KEGG pathways: ErbB signaling mmu04012.....	97
Tabelle 22:	Funktionelle KEGG Annotationen 669 embryonal ausgewählter Transkripte	98
Tabelle 23:	Transkripte des KEGG-pathways: Wnt signaling mmu04310	99
Tabelle 24:	Transkripte des KEGG-pathways: Cell cycle mmu04110	99
Tabelle 25:	GO-terms von 676 embryonal ausgewählten Transkripten	116
Tabelle 26:	GO-terms von 427 postnatal ausgewählten Transkripten	116

7.5 LITERATURVERZEICHNIS

- Akbarian S, Kim JJ, Potkin SG, Hetrick WP, Bunney WE, Jones EG. 1996. Maldistribution of interstitial neurons in prefrontal white matter of the brains of schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 53: 425-36
- Allen NC, Bagade S, McQueen MB, Ioannidis JP, Kavvoura FK, et al.. 2008. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet* 40: 827-34
- Andersson ER, Prakash N, Cajanek L, Minina E, Bryja V, et al.. 2008. Wnt5a regulates ventral midbrain morphogenesis and the development of A9-A10 dopaminergic cells in vivo. *PLoS One* 3: e3517
- Anton ES, Ghashghaei HT, Weber JL, McCann C, Fischer TM, et al.. 2004. Receptor tyrosine kinase ErbB4 modulates neuroblast migration and placement in the adult forebrain. *Nat Neurosci* 7: 1319-28
- Anton ES, Marchionni MA, Lee KF, Rakic P. 1997. Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development* 124: 3501-10
- Arnold SE, Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR. 1991. Some cytoarchitectural abnormalities of the entorhinal cortex in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 48: 625-32
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, et al.. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25: 25-9
- Ashdown H, Dumont Y, Ng M, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. 2006. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 11: 47-55
- Badner JA, Gershon ES. 2002. Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7: 405-11
- Barros CS, Calabrese B, Chamero P, Roberts AJ, Korzus E, et al.. 2009. Impaired maturation of dendritic spines without disorganization of cortical cell layers in mice lacking NRG1/ErbB signaling in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 4507-12
- Bayer SA, Altman J. 1991. *Neocortical Development*. New York: Raven Press.
- Bayer TA, Falkai P, Maier W. 1999. Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the "two hit hypothesis". *J Psychiatr Res* 33: 543-8
- Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. 2001. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* 125: 279-84
- Black JE, Kodish IM, Grossman AW, Klintsova AY, Orlovskaya D, et al.. 2004. Pathology of layer V pyramidal neurons in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 161: 742-4
- Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT, St Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ. 2001. Schizophrenia and affective disorders--cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am J Hum Genet* 69: 428-33
- Boin F, Zanardini R, Pioli R, Altamura CA, Maes M, Gennarelli M. 2001. Association between -G308A tumor necrosis factor alpha gene polymorphism and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 6: 79-82
- Boulanger LM. 2009. Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron* 64: 93-109
- Boulanger LM, Shatz CJ. 2004. Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 5: 521-31

- Bradshaw NJ, Porteous DJ. 2010. DISC1-binding proteins in neural development, signalling and schizophrenia. *Neuropharmacology*
- Brinkmann BG, Agarwal A, Sereda MW, Garratt AN, Muller T, et al.. 2008. Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron* 59: 581-95
- Brown AS. 2010. The environment and susceptibility to schizophrenia. *Prog Neurobiol*
- Brown AS, Begg MD, Gravenstein S, Schaefer CA, Wyatt RJ, et al.. 2004. Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 61: 774-80
- Brown AS, Derkits EJ. 2010. Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *Am J Psychiatry* 167: 261-80
- Byrne M, Agerbo E, Bennedsen B, Eaton WW, Mortensen PB. 2007. Obstetric conditions and risk of first admission with schizophrenia: a Danish national register based study. *Schizophr Res* 97: 51-9
- Bürger S. 2007. *Analyse der Expression der Verdrahtungsmoleküle der Semaphorin/ Neuropilin/ Plexin Familie während der thalamokortikalen Entwicklung der Maus*. Friedrich-Schiller-Universität, Jena
- Canoll PD, Musacchio JM, Hardy R, Reynolds R, Marchionni MA, Salzer JL. 1996. GGF/neuregulin is a neuronal signal that promotes the proliferation and survival and inhibits the differentiation of oligodendrocyte progenitors. *Neuron* 17: 229-43
- Cantor-Graae E. 2007. The contribution of social factors to the development of schizophrenia: a review of recent findings. *Can J Psychiatry* 52: 277-86
- Cantor-Graae E, Selten J. 2005. Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review. *Am J Psychiatry* 162: 12-24
- Casanova MF, Rothberg B. 2002. Shape distortion of the hippocampus: a possible explanation of the pyramidal cell disarray reported in schizophrenia. *Schizophr Res* 55: 19-24
- Castelo-Branco G, Wagner J, Rodriguez FJ, Kele J, Sousa K, et al.. 2003. Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12747-52
- Chang MC, Park JM, Pelkey KA, Grabenstatter HL, Xu D, et al.. 2010. Narp regulates homeostatic scaling of excitatory synapses on parvalbumin-expressing interneurons. *Nat Neurosci* 13: 1090-7
- Chen B, Schaevitz LR, McConnell SK. 2005a. Fez1 regulates the differentiation and axon targeting of layer 5 subcortical projection neurons in cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 17184-9
- Chen B, Wang SS, Hattox AM, Rayburn H, Nelson SB, McConnell SK. 2008. The Fezf2-Ctip2 genetic pathway regulates the fate choice of subcortical projection neurons in the developing cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11382-7
- Chen JG, Rasin MR, Kwan KY, Sestan N. 2005b. Zfp312 is required for subcortical axonal projections and dendritic morphology of deep-layer pyramidal neurons of the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 17792-7
- Choi KH, Zepp ME, Higgs BW, Weickert CS, Webster MJ. 2009. Expression profiles of schizophrenia susceptibility genes during human prefrontal cortical development. *J Psychiatry Neurosci* 34: 450-8
- Cichon S, Craddock N, Daly M, Faraone SV, Gejman PV, et al.. 2009. Genomewide association studies: history, rationale, and prospects for psychiatric disorders. *Am J Psychiatry* 166: 540-56
- Csernansky JG, Wang L, Jones D, Rastogi-Cruz D, Posener JA, et al.. 2002. Hippocampal deformities in schizophrenia characterized by high dimensional brain mapping. *Am J Psychiatry* 159: 2000-6

- Dammermann A, Merdes A. 2002. Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *J Cell Biol* 159: 255-66
- Datta SR, McQuillin A, Rizig M, Blaveri E, Thirumalai S, et al.. 2010. A threonine to isoleucine missense mutation in the pericentriolar material 1 gene is strongly associated with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 15: 615-28
- de Anda F, Meletis K, Ge X, Rei D, Tsai L. 2010. Centrosome motility is essential for initial axon formation in the neocortex. *J Neurosci* 30: 10391-406
- De Vries M, Cooper HM. 2008. Emerging roles for neogenin and its ligands in CNS development. *J Neurochem* 106: 1483-92
- DeLisi LE, Shaw SH, Crow TJ, Shields G, Smith AB, et al.. 2002. A genome-wide scan for linkage to chromosomal regions in 382 sibling pairs with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry* 159: 803-12
- Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, et al.. 2003. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 4: P3
- Deverman BE, Patterson PH. 2009. Cytokines and CNS development. *Neuron* 64: 61-78
- Dohrenwend B, Levav I, Shrout P, Schwartz S, Naveh G, et al.. 1992. Socioeconomic status and psychiatric disorders: the causation-selection issue. *Science* 255: 946-52
- Duffy L, Cappas E, Scimone A, Schofield PR, Karl T. 2008. Behavioral profile of a heterozygous mutant mouse model for EGF-like domain neuregulin 1. *Behav Neurosci* 122: 748-59
- Eaton W, Hall A, Macdonald R, McKibben J. 2007. Case identification in psychiatric epidemiology: a review. *Int Rev Psychiatry* 19: 497-507
- Erickson SL, O'Shea KS, Ghaboosi N, Loverro L, Frantz G, et al.. 1997. ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. *Development* 124: 4999-5011
- Falkai P, Schneider-Axmann T, Honer WG. 2000. Entorhinal cortex pre-alpha cell clusters in schizophrenia: quantitative evidence of a developmental abnormality. *Biol Psychiatry* 47: 937-43
- Falls D, Rosen K, Corfas G, Lane W, Fischbach G. 1993. ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* 72: 801-15
- Falls DL. 2003. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284: 14-30
- Flames N, Long JE, Garratt AN, Fischer TM, Gassmann M, et al.. 2004. Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44: 251-61
- Fodor S, Read J, Pirrung M, Stryer L, Lu A, Solas D. 1991. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251: 767-73
- Garey LJ, Ong WY, Patel TS, Kanani M, Davis A, et al.. 1998. Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65: 446-53
- Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, Simon H, Lai C, et al.. 1995. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378: 390-4
- Ge X, Frank CL, Calderon de Anda F, Tsai LH. 2010. Hook3 interacts with PCM1 to regulate pericentriolar material assembly and the timing of neurogenesis. *Neuron* 65: 191-203
- Geddes JR, Lawrie SM. 1995. Obstetric complications and schizophrenia: a meta-analysis. *Br J Psychiatry* 167: 786-93
- Geddes JR, Verdoux H, Takei N, Lawrie SM, Bovet P, et al.. 1999. Schizophrenia and complications of pregnancy and labor: an individual patient data meta-analysis. *Schizophr Bull* 25: 413-23

- Gerlai R, Pisacane P, Erickson S. 2000. Heregulin, but not ErbB2 or ErbB3, heterozygous mutant mice exhibit hyperactivity in multiple behavioral tasks. *Behav Brain Res* 109: 219-27
- Ghashghaei HT, Lai C, Anton ES. 2007. Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nat Rev Neurosci* 8: 141-51
- Glantz LA, Lewis DA. 2000. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 57: 65-73
- Götz M, Huttner WB. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 777-88
- Guillin O, Abi-Dargham A, Laruelle M. 2007. Neurobiology of dopamine in schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 78: 1-39
- Gurling HM, Critchley H, Datta SR, McQuillin A, Blaveri E, et al.. 2006. Genetic association and brain morphology studies and the chromosome 8p22 pericentriolar material 1 (PCM1) gene in susceptibility to schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 63: 844-54
- Hall A, Lalli G. 2010. Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a001818
- Hall J, Whalley HC, Job DE, Baig BJ, McIntosh AM, et al.. 2006. A neuregulin 1 variant associated with abnormal cortical function and psychotic symptoms. *Nat Neurosci* 9: 1477-8
- Harrison PJ, Freemantle N, Geddes JR. 2003. Meta-analysis of brain weight in schizophrenia. *Schizophr Res* 64: 25-34
- Harrison PJ, Roberts GW. 2000. *The Neuropathology of Schizophrenia: Progress and Interpretation*. Oxford University Press.
- Hashimoto R, Ohi K, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, et al.. 2011. No association between the PCM1 gene and schizophrenia: A multi-center case-control study and a meta-analysis. *Schizophr Res*
- Heckers S, Heinsen H, Geiger B, Beckmann H. 1991. Hippocampal neuron number in schizophrenia. A stereological study. *Arch Gen Psychiatry* 48: 1002-8
- Hekstra D, Taussig AR, Magnasco M, Naef F. 2003. Absolute mRNA concentrations from sequence-specific calibration of oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res* 31: 1962-8
- Henquet C, Murray R, Linszen D, van Os J. 2005. The environment and schizophrenia: the role of cannabis use. *Schizophr Bull* 31: 608-12
- Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H, Nakajima K, Akiyama T, et al.. 2004. The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* 131: 2791-801
- Hof PR, Haroutunian V, Friedrich VL, Byne W, Buitron C, et al.. 2003. Loss and altered spatial distribution of oligodendrocytes in the superior frontal gyrus in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 53: 1075-85
- Honea R, Crow TJ, Passingham D, Mackay CE. 2005. Regional deficits in brain volume in schizophrenia: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies. *Am J Psychiatry* 162: 2233-45
- Huang JT, Leweke FM, Tsang TM, Koethe D, Kranaster L, et al.. 2007. CSF metabolic and proteomic profiles in patients prodromal for psychosis. *PLoS One* 2: e756
- Huang YZ, Won S, Ali DW, Wang Q, Tanowitz M, et al.. 2000. Regulation of neuregulin signaling by PSD-95 interacting with ErbB4 at CNS synapses. *Neuron* 26: 443-55
- Hur EM, Zhou FQ. 2010. GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci* 11: 539-51
- Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, et al.. 2005. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* 33: e56

- Ioannidis JP, Gwinn M, Little J, Higgins JP, Bernstein JL, et al.. 2006. A road map for efficient and reliable human genome epidemiology. *Nat Genet* 38: 3-5
- Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. 2003. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31: e15
- Irizarry RA, Wu Z, Jaffee HA. 2006. Comparison of Affymetrix GeneChip expression measures. *Bioinformatics* 22: 789-94
- Jarskog LF, Miyamoto S, Lieberman JA. 2007. Schizophrenia: new pathological insights and therapies. *Annu Rev Med* 58: 49-61
- Jessell TM, Siegel RE, Fischbach GD. 1979. Induction of acetylcholine receptors on cultured skeletal muscle by a factor extracted from brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 5397-401
- Kanehisa M, Goto S. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28: 27-30
- Karl T, Duffy L, Scimone A, Harvey RP, Schofield PR. 2007. Altered motor activity, exploration and anxiety in heterozygous neuregulin 1 mutant mice: implications for understanding schizophrenia. *Genes Brain Behav* 6: 677-87
- Kendler K, McGuire M, Gruenberg A, O'Hare A, Spellman M, Walsh D. 1993. The Roscommon Family Study. I. Methods, diagnosis of probands, and risk of schizophrenia in relatives. *Arch Gen Psychiatry* 50: 527-40
- Keshavan MS, Tandon R, Boutros NN, Nasrallah HA. 2008. Schizophrenia, "just the facts": what we know in 2008 Part 3: neurobiology. *Schizophr Res* 106: 89-107
- Khashan AS, Abel KM, McNamee R, Pedersen MG, Webb RT, et al.. 2008. Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Arch Gen Psychiatry* 65: 146-52
- Kramer R, Bucay N, Kane DJ, Martin LE, Tarpley JE, Theill LE. 1996. Neuregulins with an Ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4833-8
- Kruger RP, Aurandt J, Guan KL. 2005. Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 789-800
- Kubicki M, McCarley R, Westin CF, Park HJ, Maier S, et al.. 2007. A review of diffusion tensor imaging studies in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 41: 15-30
- Kulynych JJ, Luevano LF, Jones DW, Weinberger DR. 1997. Cortical abnormality in schizophrenia: an in vivo application of the gyrification index. *Biol Psychiatry* 41: 995-9
- Kuperberg GR, Broome MR, McGuire PK, David AS, Eddy M, et al.. 2003. Regionally localized thinning of the cerebral cortex in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 60: 878-88
- Kwon OB, Longart M, Vullhorst D, Hoffman DA, Buonanno A. 2005. Neuregulin-1 reverses long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *J Neurosci* 25: 9378-83
- Lai KO, Ip NY. 2009. Synapse development and plasticity: roles of ephrin/Eph receptor signaling. *Curr Opin Neurobiol* 19: 275-83
- Laporte J, Bedez F, Bolino A, Mandel JL. 2003. Myotubularins, a large disease-associated family of cooperating catalytically active and inactive phosphoinositides phosphatases. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2: R285-92
- Lawrie SM, Abukmeil SS. 1998. Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry* 172: 110-20
- Laws KR. 1999. A meta-analytic review of Wisconsin Card Sort studies in schizophrenia: general intellectual deficit in disguise? *Cogn Neuropsychiatry* 4: 1-30; discussion 31-5

VERZEICHNISSE

- Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C. 1995. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378: 394-8
- Lemke G. 2006. Neuregulin-1 and myelination. *Sci STKE* 2006: pe11
- Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, et al.. 2003. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet* 73: 34-48
- Lewis DA. 2000. GABAergic local circuit neurons and prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 31: 270-6
- Lewis DA, Levitt P. 2002. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci* 25: 409-32
- Li B, Woo RS, Mei L, Malinow R. 2007. The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity. *Neuron* 54: 583-97
- Li C, Wong WH. 2001. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 31-6
- Lichtermann D, Karbe E, Maier W. 2000. The genetic epidemiology of schizophrenia and of schizophrenia spectrum disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 250: 304-10
- Lodato S, Rouaux C, Quast KB, Jantrachotechatchawan C, Studer M, et al.. 2011. Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron* 69: 763-79
- Lopez-Bendito G, Cautinat A, Sanchez JA, Bielle F, Flames N, et al.. 2006. Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation. *Cell* 125: 127-42
- MacDonald AW, Carter CS, Kerns JG, Ursu S, Barch DM, et al.. 2005. Specificity of prefrontal dysfunction and context processing deficits to schizophrenia in never-medicated patients with first-episode psychosis. *Am J Psychiatry* 162: 475-84
- Mata I, Perez-Iglesias R, Roiz-Santiañez R, Tordesillas-Gutierrez D, Gonzalez-Mandly A, et al.. 2009. A neuregulin 1 variant is associated with increased lateral ventricle volume in patients with first-episode schizophrenia. *Biol Psychiatry* 65: 535-40
- Matsunaga E, Chédotal A. 2004. Repulsive guidance molecule/neogenin: a novel ligand-receptor system playing multiple roles in neural development. *Dev Growth Differ* 46: 481-6
- Mawdsley DJ, Cooper HM, Hogan BM, Cody SH, Lieschke GJ, Heath JK. 2004. The Netrin receptor Neogenin is required for neural tube formation and somitogenesis in zebrafish. *Dev Biol* 269: 302-15
- McGrath J, Saha S, Welham J, El Saadi O, MacCauley C, Chant D. 2004. A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC Med* 2: 13
- McGue M, Gottesman I. 1991. The genetic epidemiology of schizophrenia and the design of linkage studies. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 240: 174-81
- McIntosh AM, Moorhead TW, Job D, Lymer GK, Muñoz Maniega S, et al.. 2008. The effects of a neuregulin 1 variant on white matter density and integrity. *Mol Psychiatry* 13: 1054-9
- McKenna WL, Betancourt J, Larkin KA, Abrams B, Guo C, et al.. 2011. Tbr1 and Fezf2 regulate alternate corticofugal neuronal identities during neocortical development. *J Neurosci* 31: 549-64
- Mei L, Xiong WC. 2008. Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 9: 437-52

- Meyer D, Birchmeier C. 1995. Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378: 386-90
- Meyer U, Yee BK, Feldon J. 2007. The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? *Neuroscientist* 13: 241-56
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, et al.. 2004. Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304: 700-3
- Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, et al.. 2000. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 9: 1415-23
- Moens LN, Ceulemans S, Alaerts M, Van Den Bossche MJ, Lenaerts AS, et al.. 2010. PCM1 and schizophrenia: a replication study in the Northern Swedish population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B: 1240-3
- Moore TH, Zammit S, Lingford-Hughes A, Barnes TR, Jones PB, et al.. 2007. Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *Lancet* 370: 319-28
- Naef F, Magnasco MO. 2003. Solving the riddle of the bright mismatches: labeling and effective binding in oligonucleotide arrays. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 68: 011906
- Nave KA, Salzer JL. 2006. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 16: 492-500
- Ng MY, Levinson DF, Faraone SV, Suarez BK, DeLisi LE, et al.. 2009. Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 14: 774-85
- Nguyen AD, Shenton ME, Levitt JJ. 2010. Olfactory dysfunction in schizophrenia: a review of neuroanatomy and psychophysiological measurements. *Harv Rev Psychiatry* 18: 279-92
- Niehage R. 2008. *Expressionsanalyse des ephrin-/ Eph-Systems im frontalen Gehirn der Maus während der embryonalen und postnatalen Entwicklung*. Friedrich-Schiller-Universität, Jena
- O'Brien RJ, Xu D, Petralia RS, Steward O, Hagan RL, Worley P. 1999. Synaptic clustering of AMPA receptors by the extracellular immediate-early gene product Narp. *Neuron* 23: 309-23
- O'Tuathaigh CM, Babovic D, O'Sullivan GJ, Clifford JJ, Tighe O, et al.. 2007. Phenotypic characterization of spatial cognition and social behavior in mice with 'knockout' of the schizophrenia risk gene neuregulin 1. *Neuroscience* 147: 18-27
- Pakkenberg B. 1993. Total nerve cell number in neocortex in chronic schizophrenics and controls estimated using optical disectors. *Biol Psychiatry* 34: 768-72
- Palha JA. 2002. Transthyretin as a thyroid hormone carrier: function revisited. *Clin Chem Lab Med* 40: 1292-300
- Pasterkamp RJ, Giger RJ. 2009. Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Curr Opin Neurobiol* 19: 263-74
- Patterson PH. 2007. Neuroscience. Maternal effects on schizophrenia risk. *Science* 318: 576-7
- Paus T, Keshavan M, Giedd JN. 2008. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat Rev Neurosci* 9: 947-57
- Paxinos G, Franklin K. 2001. *The Mouse Brain in Stereotactic Coordinates*. Academic Press
- Pease A, Solas D, Sullivan E, Cronin M, Holmes C, Fodor S. 1994. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5022-6
- Peng X, Wood CL, Blalock EM, Chen KC, Landfield PW, Stromberg AJ. 2003. Statistical implications of pooling RNA samples for microarray experiments. *BMC Bioinformatics* 4: 26

- Penner JD, Brown AS. 2007. Prenatal infectious and nutritional factors and risk of adult schizophrenia. *Expert Rev Neurother* 7: 797-805
- Pierri JN, Volk CL, Auh S, Sampson A, Lewis DA. 2003. Somal size of prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia: differential effects across neuronal subpopulations. *Biol Psychiatry* 54: 111-20
- Popken GJ, Bunney WE, Potkin SG, Jones EG. 2000. Subnucleus-specific loss of neurons in medial thalamus of schizophrenics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9276-80
- Potkin SG, Turner JA, Fallon JA, Lakatos A, Keator DB, et al.. 2009. Gene discovery through imaging genetics: identification of two novel genes associated with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 14: 416-28
- Pulver AE, Lasseter VK, Kasch L, Wolyniec P, Nestadt G, et al.. 1995. Schizophrenia: a genome scan targets chromosomes 3p and 8p as potential sites of susceptibility genes. *Am J Med Genet* 60: 252-60
- Rajkowska G, Selemon LD, Goldman-Rakic PS. 1998. Neuronal and glial somal size in the prefrontal cortex: a postmortem morphometric study of schizophrenia and Huntington disease. *Arch Gen Psychiatry* 55: 215-24
- Raper JA. 2000. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 10: 88-94
- Reynolds GP, Beasley CL, Zhang ZJ. 2002. Understanding the neurotransmitter pathology of schizophrenia: selective deficits of subtypes of cortical GABAergic neurons. *J Neural Transm* 109: 881-9
- Ribolsi M, Koch G, Magni V, Di Lorenzo G, Rubino IA, et al.. 2009. Abnormal brain lateralization and connectivity in schizophrenia. *Rev Neurosci* 20: 61-70
- Rimer M, Barrett DW, Maldonado MA, Vock VM, Gonzalez-Lima F. 2005. Neuregulin-1 immunoglobulin-like domain mutant mice: clozapine sensitivity and impaired latent inhibition. *Neuroreport* 16: 271-5
- Rio C, Rieff HI, Qi P, Khurana TS, Corfas G. 1997. Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron* 19: 39-50
- Rosoklija G, Toomayan G, Ellis SP, Keilp J, Mann JJ, et al.. 2000. Structural abnormalities of subicular dendrites in subjects with schizophrenia and mood disorders: preliminary findings. *Arch Gen Psychiatry* 57: 349-56
- Saha S, Chant D, Welham J, McGrath J. 2005. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med* 2: e141
- Sambrook J, Russell DW. 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, et al.. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7: 3
- Schuster EF, Blanc E, Partridge L, Thornton JM. 2007. Correcting for sequence biases in present/absent calls. *Genome Biol* 8: R125
- Sei Y, Ren-Patterson R, Li Z, Tunbridge EM, Egan MF, et al.. 2007. Neuregulin1-induced cell migration is impaired in schizophrenia: association with neuregulin1 and catechol-o-methyltransferase gene polymorphisms. *Mol Psychiatry* 12: 946-57
- Selemon LD, Rajkowska G, Goldman-Rakic PS. 1998. Elevated neuronal density in prefrontal area 46 in brains from schizophrenic patients: application of a three-dimensional, stereologic counting method. *J Comp Neurol* 392: 402-12
- Selten J, Cantor-Graae E, Kahn R. 2007. Migration and schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry* 20: 111-5

- Smith K, Ohkubo Y, Maragnoli M, Rasin M, Schwartz M, et al.. 2006. Midline radial glia translocation and corpus callosum formation require FGF signaling. *Nat Neurosci* 9: 787-97
- Speel EJ, Hopman AH, Komminoth P. 1999. Amplification methods to increase the sensitivity of in situ hybridization: play card(s). *J Histochem Cytochem* 47: 281-8
- St Clair D, Blackwood D, Muir W, Carothers A, Walker M, et al.. 1990. Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *Lancet* 336: 13-6
- St Clair D, Xu M, Wang P, Yu Y, Fang Y, et al.. 2005. Rates of adult schizophrenia following prenatal exposure to the Chinese famine of 1959-1961. *JAMA* 294: 557-62
- Steen RG, Mull C, McClure R, Hamer RM, Lieberman JA. 2006. Brain volume in first-episode schizophrenia: systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry* 188: 510-8
- Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, et al.. 2002. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71: 877-92
- Sullivan P, Kendler K, Neale M. 2003. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* 60: 1187-92
- Susser E, Neugebauer R, Hoek HW, Brown AS, Lin S, et al.. 1996. Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence. *Arch Gen Psychiatry* 53: 25-31
- Tamagnone L, Comoglio PM. 2004. To move or not to move? Semaphorin signalling in cell migration. *EMBO Rep* 5: 356-61
- Taveggia C, Thaker P, Petrylak A, Caporaso GL, Toews A, et al.. 2008. Type III neuregulin-1 promotes oligodendrocyte myelination. *Glia* 56: 284-93
- Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, et al.. 2005. Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47: 681-94
- Theiler K. 1989. *The House Mouse: Atlas of Embryonic Development*. second printing: Springer Verlag.
- Tkachev D, Mimmack ML, Ryan MM, Wayland M, Freeman T, et al.. 2003. Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet* 362: 798-805
- Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B. 2003. Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res* 146: 3-17
- Van Eden CG, Uylings HB. 1985. Postnatal volumetric development of the prefrontal cortex in the rat. *J Comp Neurol* 241: 268-74
- Varela-Nallar L, Alfaro IE, Serrano FG, Parodi J, Inestrosa NC. 2010. Wingless-type family member 5A (Wnt-5a) stimulates synaptic differentiation and function of glutamatergic synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 21164-9
- Vartanian T, Corfas G, Li Y, Fischbach GD, Stefansson K. 1994. A role for the acetylcholine receptor-inducing protein ARIA in oligodendrocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11626-30
- Vita A, De Peri L, Silenzi C, Dieci M. 2006. Brain morphology in first-episode schizophrenia: a meta-analysis of quantitative magnetic resonance imaging studies. *Schizophr Res* 82: 75-88
- Vogeley K, Schneider-Axmann T, Pfeiffer U, Tepest R, Bayer TA, et al.. 2000. Disturbed gyrification of the prefrontal region in male schizophrenic patients: A morphometric postmortem study. *Am J Psychiatry* 157: 34-9
- Walker MA, Highley JR, Esiri MM, McDonald B, Roberts HC, et al.. 2002. Estimated neuronal populations and volumes of the hippocampus and its subfields in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 159: 821-8
- Wang Y, Thekdi N, Smallwood PM, Macke JP, Nathans J. 2002. Frizzled-3 is required for the development of major fiber tracts in the rostral CNS. *J Neurosci* 22: 8563-73

- Wang Y, Zhang J, Mori S, Nathans J. 2006. Axonal growth and guidance defects in Frizzled3 knock-out mice: a comparison of diffusion tensor magnetic resonance imaging, neurofilament staining, and genetically directed cell labeling. *J Neurosci* 26: 355-64
- Wiedholz LM, Owens WA, Horton RE, Feyder M, Karlsson RM, et al.. 2008. Mice lacking the AMPA GluR1 receptor exhibit striatal hyperdopaminergia and 'schizophrenia-related' behaviors. *Mol Psychiatry* 13: 631-40
- Wilkins A, Majed H, Layfield R, Compston A, Chandran S. 2003. Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 23: 4967-74
- Woo RS, Li XM, Tao Y, Carpenter-Hyland E, Huang YZ, et al.. 2007. Neuregulin-1 enhances depolarization-induced GABA release. *Neuron* 54: 599-610
- Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PW, David AS, Murray RM, Bullmore ET. 2000. Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157: 16-25
- Wu Z, Irizarry RA. 2004. Preprocessing of oligonucleotide array data. *Nat Biotechnol* 22: 656-8; author reply 58
- Xue Y, Fares H, Grant B, Li Z, Rose AM, et al.. 2003. Genetic analysis of the myotubularin family of phosphatases in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 278: 34380-6
- Yoon S, Choi MH, Chang MS, Baik JH. 2011. Wnt5a-dopamine D2 receptor interactions regulate dopamine neuron development via ERK activation. *J Biol Chem*
- Young KA, Manaye KF, Liang C, Hicks PB, German DC. 2000. Reduced number of mediodorsal and anterior thalamic neurons in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 47: 944-53
- Yui K, Suzuki M, Kurachi M. 2007. Stress sensitization in schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 1113: 276-90
- Zhou CJ, Borello U, Rubenstein JL, Pleasure SJ. 2006. Neuronal production and precursor proliferation defects in the neocortex of mice with loss of function in the canonical Wnt signaling pathway. *Neuroscience* 142: 1119-31
- Zimmer C, Tiveron MC, Bodmer R, Cremer H. 2004. Dynamics of Cux2 expression suggests that an early pool of SVZ precursors is fated to become upper cortical layer neurons. *Cereb Cortex* 14: 1408-20

8 ANHANG

8.1 AUSGEWÄHLTE TRANSKRIPTE

8.1.1 EMBRYONAL (676 IDs)

1416003_at 1416076_at 1417131_at 1417399_at 1417526_at 1418053_at 1418555_x_at 1418889_a_at 1418966_a_at 1419157_at 1419372_at 1419390_at 1419439_at 1419538_at 1419640_at 1419727_at 1420269_at 1420530_at 1420812_at 1421090_at 1421124_at 1421157_at 1421922_at 1421929_at 1422129_at 1422512_a_at 1422628_at 1422631_at 1422747_at 1423065_at 1423152_at 1423153_x_at 1423288_s_at 1423333_at 1424263_at 1424361_at 1424474_a_at 1424613_at 1424686_at 1424696_at 1424745_at 1424988_at 1425425_a_at 1425582_a_at 1425617_at 1425679_a_at 1425870_a_at 1426165_a_at 1426191_a_at 1426326_at 1426431_at 1426587_a_at 1426805_at 1426951_at 1427037_at 1427286_at 1427307_a_at 1427501_at 1427754_a_at 1428016_a_at 1430117_a_at 1430776_s_at 1433462_a_at 1433660_at 1434032_at 1435493_at 1435840_x_at 1435872_at 1436186_at 1436382_at 1436404_at 1436768_x_at 1437055_x_at 1437491_at 1439476_at 1442484_at 1448231_at 1448878_at 1448972_at 1449036_at 1449325_at 1449356_at 1449533_at 1449860_at 1449932_at 1450292_a_at 1450382_at 1450876_at 1451319_at 1451431_a_at 1451452_a_at 1451797_at 1451835_at 1451888_a_at 1452009_at 1452107_s_at 1452429_s_at 1452542_x_at 1452787_a_at 1452801_at 1453631_at 1453721_a_at 1453748_a_at 1454791_a_at 1455017_a_at 1455930_at 1456048_at 1457841_at 1460191_at 1460219_at 1460328_at 1460642_at 1460654_at 1429363_at 1429401_at 1429413_at 1429452_x_at 1429545_at 1429552_at 1429680_at 1429729_at 1429734_at 1429778_at 1429978_at 1430648_at 1430685_at 1431053_at 1431133_at 1431463_at 1431831_at 1431966_at 1433435_at 1433742_at 1434505_a_at 1434634_at 1435115_at 1435529_at 1435679_at 1436131_at 1436169_at 1436173_at 1436221_at 1436275_at 1436618_at 1436731_at 1437070_at 1437118_at 1437640_at 1437979_at 1438113_at 1438528_at 1438688_at 1438784_at 1439170_at 1439318_at 1439770_at 1439806_at 1439846_at 1439858_at 1439920_at 1439927_at 1439929_at 1439966_x_at 1440002_at 1440076_at 1440162_x_at 1440224_at 1440305_at 1440375_at 1440411_at 1440417_at 1440480_at 1440615_at 1440641_at 1440726_at 1440738_at 1440841_at 1440849_at 1441354_at 1441403_at 1441545_at 1441785_at 1441834_x_at 1441949_x_at 1441977_at 1442098_at 1442222_at 1442306_at 1442407_at 1443033_at 1443083_at 1443644_at 1443707_at 1443857_at 1444503_at 1444753_at 1445621_at 1445862_at 1446052_at 1446140_at 1446259_at 1446312_at 1446500_at 1446687_at 1446693_at 1447019_at 1447059_at 1447257_at 1447270_at 1447343_at 1447363_s_at 1447463_at 1447671_x_at 1447698_x_at 1447831_s_at 1447907_x_at 1453008_at 1453189_at 1453290_at 1453837_at 1454164_at 1454388_at 1454969_at 1455000_at 1455354_at 1455500_at 1455795_at 1455861_at 1456274_at 1456421_at 1456482_at 1456765_at 1456953_at 1457109_x_at 1457298_at 1457311_at 1457565_at 1457626_at 1457627_x_at 1457679_at 1457794_at 1457824_at 1458046_at 1458134_at 1458383_at 1458496_at 1458500_at 1458861_at 1458878_at 1458934_at 1459232_at 1459442_at 1459465_at 1459664_at 1459695_at 1459809_x_at 1459950_at 1459978_x_at 1460035_at 1415903_at 1416450_at 1416986_a_at 1417066_at 1417225_at 1417946_at 1418132_a_at 1418142_at 1418189_s_at 1418492_at 1418710_at 1419568_at 1420020_at 1420304_x_at 1420615_at 1420869_at 1420912_at 1421198_at 1421468_at 1421727_at 1422252_a_at 1423224_at 1424152_at 1424187_at 1424487_x_at 1424788_at 1424922_a_at 1425097_a_at 1425157_x_at 1425229_a_at 1425390_at 1425527_at 1425845_a_at 1425913_a_at 1425954_a_at 1426127_x_at 1426328_a_at 1426339_at 1426438_at 1426439_at 1426598_at 1426702_at 1426894_s_at 1427150_at 1427202_at 1427213_at 1427267_at 1427410_at 1427580_a_at 1427618_at 1427797_s_at 1427798_x_at 1427894_at 1428195_at 1429207_at 1429632_at 1429748_at 1431239_at 1432097_a_at 1432415_at 1434282_at 1434479_at 1434976_x_at 1435143_at 1436589_x_at 1436910_at 1437746_at 1438603_x_at 1438696_at 1438782_at 1439394_x_at 1439423_x_at 1448008_at 1448371_at 1448475_at 1448700_at 1448815_at 1448818_at 1449773_s_at 1450392_at 1450437_a_at 1450459_at 1450692_at 1450955_s_at 1450986_at 1451298_at 1451314_a_at 1451445_at 1451456_at 1451886_at 1451901_at 1452077_at 1452108_at 1452654_at 1454078_a_at 1455581_x_at 1455853_x_at 1456283_at 1456492_at 1457954_at 1459817_at 1459917_at 1460344_at 1428518_at 1428634_at 1428721_at 1429125_at 1429257_at 1429463_at 1429659_at 1429974_at 1430360_at 1430974_a_at 1431102_at 1431189_a_at 1431318_at 1433651_at 1434346_at 1434780_at 1435340_at 1435699_at 1435773_at 1435849_at 1435888_at 1436252_at 1436457_at 1436481_at 1436612_at 1436646_at 1436792_at 1436793_at 1436985_at 1437018_at 1437020_at 1437230_at

ANHANG

1437699_at 1437959_at 1438268_at 1438440_at 1439704_at 1439750_at 1440022_at 1440086_at 1440227_at 1440268_at 1440355_at 1440488_at 1440858_at 1440924_at 1440937_at 1441055_at 1441058_at 1441224_at 1441608_at 1441692_at 1441771_at 1441815_at 1441995_at 1442142_at 1442309_at 1442442_at 1442931_at 1442939_at 1442950_at 1443527_at 1443904_at 1443905_at 1443958_at 1444151_at 1444237_at 1444295_at 1444330_at 1444645_at 1444886_at 1446278_at 1446421_at 1447010_at 1447101_at 1447513_at 1447886_at 1452983_at 1453144_at 1453261_at 1453448_at 1453481_at 1453595_at 1453803_at 1454924_at 1455250_at 1455267_at 1455307_at 1455345_at 1455711_at 1455983_at 1456348_x_at 1456524_at 1457240_at 1457357_at 1457553_at 1457582_at 1457692_at 1457756_at 1457908_at 1458017_at 1458052_at 1458594_at 1458877_at 1459054_at 1459057_at 1459303_at 1459420_at 1459746_at 1459878_a_at 1416137_at 1417167_at 1417446_at 1418678_at 1418977_at 1419264_at 1420719_at 1420910_at 1421301_at 1421414_a_at 1422235_at 1422526_at 1424322_at 1424382_at 1425467_a_at 1426324_at 1427417_at 1427985_at 1428329_a_at 1429238_a_at 1433598_at 1449178_at 1449245_at 1452454_at 1429564_at 1433600_at 1434350_at 1434428_at 1437065_at 1438363_at 1438431_at 1439152_at 1439872_at 1439930_at 1440813_s_at 1441411_at 1441859_x_at 1442008_at 1442518_at 1442569_at 1443321_at 1443540_at 1443569_at 1443628_at 1443963_at 1444139_at 1444372_at 1444677_at 1446085_at 1446712_at 1447878_s_at 1452834_at 1453252_at 1453402_at 1455544_at 1456721_at 1457457_at 1457511_at 1457952_at 1458634_at 1459457_at 1416128_at 1416619_at 1416966_at 1416987_at 1417288_at 1417682_a_at 1418054_at 1418153_at 1418651_at 1418895_at 1419073_at 1419403_at 1419873_s_at 1419965_at 1420411_a_at 1420533_at 1421075_s_at 1421217_a_at 1421243_at 1422130_at 1422638_s_at 1422831_at 1422877_at 1423284_at 1423859_a_at 1424039_at 1424806_s_at 1424948_x_at 1425256_a_at 1425275_at 1425351_at 1425396_a_at 1425530_a_at 1425536_at 1425927_a_at 1426430_at 1426901_s_at 1426973_at 1427465_at 1427620_at 1428372_at 1428855_at 1428856_at 1429177_x_at 1430275_a_at 1434719_at 1435309_at 1435495_at 1435962_at 1436301_at 1438483_at 1446086_s_at 1448545_at 1448638_at 1449002_at 1449062_at 1449518_at 1450143_at 1450961_a_at 1451235_at 1451358_a_at 1451914_a_at 1452195_s_at 1452309_at 1452325_at 1455819_at 1455994_x_at 1457849_at 1460343_at 1428636_at 1428927_at 1429196_at 1429893_at 1430083_at 1430253_at 1430574_at 1431432_at 1432088_at 1432182_at 1433731_at 1434640_at 1434789_at 1434797_at 1435200_at 1435407_at 1436373_at 1436398_at 1436472_at 1436622_at 1436654_at 1436904_at 1436972_at 1437796_at 1437833_at 1438085_at 1438521_at 1439312_at 1439582_at 1440564_at 1440585_at 1440759_at 1441612_at 1442095_at 1442192_at 1442791_x_at 1442945_at 1443848_at 1443898_at 1443954_at 1444253_at 1444443_at 1444595_at 1444872_at 1445105_at 1445204_at 1445341_at 1445552_at 1445741_at 1445847_at 1446396_at 1447294_at 1447484_x_at 1447495_at 1447606_x_at 1447657_s_at 1453297_at 1454982_at 1455278_at 1456163_at 1456336_at 1456563_at 1457022_at 1457393_at 1457809_at 1457955_at 1458026_at 1458172_at 1458534_at 1459431_at 1459516_at 1459601_at 1459747_at 1460546_at

8.1.2 POSTNATAL (427 IDs)

1416804_at 1417273_at 1417458_s_at 1417741_at 1418108_at 1418379_s_at 1418464_at 1418704_at 1418790_at 1418979_at 1419039_at 1419435_at 1419517_at 1420042_at 1420043_s_at 1420430_a_at 1420720_at 1421036_at 1421391_at 1422341_s_at 1422754_at 1423836_at 1423950_at 1424149_at 1424699_at 1424792_at 1425074_at 1425094_a_at 1425814_a_at 1426501_a_at 1427242_at 1427284_a_at 1427457_a_at 1427571_at 1427883_a_at 1430167_a_at 1434557_at 1435309_at 1436528_at 1437644_at 1439415_x_at 1444508_s_at 1448441_at 1448860_at 1450116_at 1450193_at 1450799_at 1450906_at 1451329_at 1451583_a_at 1452468_s_at 1455198_a_at 1460648_at 1460731_at 1428604_at 1429123_at 1429401_at 1429816_at 1429898_at 1430588_at 1430762_at 1433032_at 1433743_at 1435245_at 1435482_at 1435858_at 1436127_at 1436173_at 1436183_at 1436710_at 1436805_at 1437285_at 1437306_at 1437414_at 1438363_at 1438399_at 1438516_at 1438528_at 1439170_at 1439639_at 1439929_at 1439963_x_at 1440096_at 1440148_at 1440207_at 1440722_at 1441162_at 1441535_at 1441716_at 1441785_at 1441884_x_at 1441894_s_at 1443263_at 1443872_at 1444114_at 1444565_at 1444835_at 1444908_at 1447527_at 1447753_at 1447831_s_at 1453591_at 1455735_at 1455755_at 1455837_at 1456811_at 1456832_at 1457432_at 1457656_s_at 1458112_at 1458296_at 1459038_at 1417300_at 1417302_at 1417304_at 1418340_at 1418373_at 1419088_at 1419357_at 1419680_a_at 1419826_at 1420377_at 1420851_at 1421010_at 1421518_at 1421850_at 1422860_at 1422871_at 1423809_at 1423948_at 1424553_at 1424902_at 1425724_at 1425860_x_at 1425985_s_at 1427353_at 1427940_s_at 1432558_a_at 1433543_at 1435418_at 1439465_x_at 1448016_at 1448498_at 1449296_a_at 1449961_at 1450228_a_at 1450833_at 1451105_at 1451829_a_at 1451834_at 1451961_a_at 1452026_a_at 1453995_a_at 1457899_at 1460247_a_at 1428398_at 1428771_at 1429206_at 1430613_at 1430786_at 1434029_at 1435166_at

1436894_at 1436897_at 1437776_at 1438636_s_at 1439281_at 1439300_at 1439776_at 1439787_at 1440032_at 1440843_at
1441281_s_at 1441724_at 1441763_at 1441956_s_at 1442163_at 1442570_at 1443799_at 1444289_at 1456184_at 1456329_at
1456524_at 1457333_at 1457350_at 1457896_at 1459150_at 1459151_x_at 1459602_at 1416785_at 1417229_at 1417270_at
1417528_at 1417635_at 1418060_a_at 1418139_at 1418890_a_at 1419312_at 1419518_at 1420719_at 1420731_a_at 1420995_at
1421138_a_at 1421141_a_at 1421287_a_at 1421816_at 1422124_a_at 1422476_at 1422866_at 1422910_s_at 1423640_at 1424581_at
1425081_at 1425162_at 1426053_a_at 1427127_x_at 1427196_at 1428014_at 1434719_at 1435494_s_at 1437157_at 1437920_at
1438009_at 1438083_at 1439144_at 1448669_at 1449310_at 1450977_s_at 1452351_at 1454954_at 1460373_a_at 1460406_at
1460682_s_at 1428834_at 1428863_at 1429026_at 1429680_at 1430064_at 1431248_at 1431316_at 1431323_at 1433300_at
1433607_at 1433885_at 1434421_at 1434429_at 1435399_at 1435571_at 1435603_at 1435877_at 1436690_at 1436867_at 1436919_at
1436920_at 1437094_x_at 1437156_at 1437577_at 1437789_at 1437793_at 1438037_at 1438336_at 1438643_at 1438890_at
1439053_at 1439288_at 1439554_at 1439557_s_at 1439575_at 1439707_at 1439925_at 1440112_at 1440461_at 1440699_at
1440789_at 1440845_at 1440976_at 1440996_at 1441531_at 1441573_at 1441895_x_at 1442058_s_at 1442153_at 1442194_at
1442427_at 1442732_at 1442813_at 1443070_at 1443422_at 1443438_at 1443619_at 1443669_at 1443902_at 1444007_at 1444040_at
1444156_at 1444175_at 1444222_x_at 1444671_at 1444746_at 1444778_at 1444878_at 1445361_at 1445565_at 1446127_at
1446206_at 1446208_at 1446219_at 1446234_at 1446383_at 1446444_at 1446880_at 1447408_at 1447541_s_at 1447873_x_at
1453083_at 1453344_at 1453402_at 1453512_at 1453577_at 1454388_at 1454733_at 1454830_at 1454924_at 1455185_s_at
1455216_at 1455885_at 1456873_at 1457250_x_at 1457988_at 1458099_at 1458541_at 1458918_at 1460025_at 1460043_at
1460101_at AFFX-DapX-M_at AFFX-DapX-3_at AFFX-LysX-5_at AFFX-LysX-M_at AFFX-LysX-3_at AFFX-PheX-5_at AFFX-PheX-3_at AFFX-
ThrX-M_at AFFX-ThrX-3_at AFFX-r2-Bs-dap-M_at AFFX-r2-Bs-dap-3_at AFFX-r2-Bs-lys-5_at AFFX-r2-Bs-lys-3_at AFFX-r2-Bs-phe-5_at AFFX-
r2-Bs-phe-M_at AFFX-r2-Bs-thr-3_s_at AFFX-r2-Bs-thr-M_s_at 1416677_at 1416714_at 1417253_at 1418334_at 1418404_at 1418827_at
1419008_at 1419380_at 1419538_at 1419940_at 1420624_a_at 1421311_at 1421433_at 1422153_a_at 1424021_at 1424563_at
1424667_a_at 1424967_x_at 1425045_at 1425274_at 1437667_a_at 1448713_at 1449443_at 1451518_at 1452474_a_at 1454120_a_at
1420015_s_at 1429403_x_at 1429440_at 1429489_at 1429696_at 1430309_at 1431195_at 1432602_at 1433920_at 1434165_at
1434431_x_at 1436196_at 1438848_at 1439622_at 1439717_at 1440030_at 1440076_at 1440171_x_at 1440260_at 1440450_at
1440761_at 1440814_x_at 1441038_at 1441508_at 1442027_at 1443167_at 1444144_at 1444147_at 1444622_at 1444706_at
1445498_at 1445721_at 1445880_at 1446618_at 1446892_at 1447491_at 1447938_at 1453126_at 1453136_at 1453144_at 1455049_at
1455122_at 1456755_at 1456923_at 1456956_at 1457203_at 1457528_at 1458140_at 1458954_at

8.2 GO-ANALYSE

Tabelle 25: GO-terms von 676 embryonal ausgewählten Transkripten

Auflistung der jeweils ersten 20 überrepräsentierten Terms

Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
chromatin modification	tubulin binding	sarcolemma
chromosome organization	cytoskeletal protein binding	methyltransferase complex
chromatin organization	protein kinase activity	histone methyltransferase complex
protein amino acid autophosphorylation	purine nucleoside binding	T-tubule
phosphate metabolic process	nucleoside binding	chromatin remodeling complex
phosphorus metabolic process	metal ion binding	heterochromatin
tissue morphogenesis	adenyl nucleotide binding	chromosomal part
covalent chromatin modification	protein domain specific binding	microtubule
protein amino acid phosphorylation	cation binding	presynaptic active zone
cell cycle	microtubule binding	chromatin
cellular response to stress	adenyl ribonucleotide binding	nuclear lumen
response to DNA damage stimulus	ATP binding	cytoskeleton
palate development	nucleotide binding	non-membrane-bounded organelle
morphogenesis of an epithelium	protein tyrosine kinase activity	intracellular non-membrane-bounded organelle
endosome organization	RNA binding	axon
phosphorylation	enzyme binding	chromosome
metal ion transport	ion binding	insoluble fraction
mitotic cell cycle	protein serine/threonine kinase activity	Golgi apparatus
lymphocyte differentiation	phosphoprotein phosphatase activity	perinuclear region of cytoplasm
enzyme linked receptor protein signaling pathway	helicase activity	nucleoplasm part

Tabelle 26 GO-terms von 427 postnatal ausgewählten Transkripten

Auflistung der jeweils ersten 20 überrepräsentierten Terms

Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
muscle cell differentiation	ligase activity, forming carbon-nitrogen bonds	cytoplasmic membrane-bounded vesicle
striated muscle cell differentiation	acid-amino acid ligase activity	membrane-bounded vesicle
anatomical structure homeostasis	gated channel activity	cytoplasmic vesicle
telomere maintenance	metal ion transmembrane transporter activity	vesicle
neuron development	potassium ion binding	dendrite
regulation of muscle cell differentiation	phospholipase activity	secretory granule
cell projection organization	protein kinase regulator activity	synapse
neuron differentiation	cyclin-dependent protein kinase regulator activity	sarcoplasmic reticulum
protein modification by small protein conjugation	ion channel activity	clathrin coated vesicle membrane
wound healing	ion binding	sarcoplasm
positive regulation of interleukin-6 production	substrate specific channel activity	coated vesicle
negative regulation of microtubule depolymerization	transferase activity, transferring pentosyl groups	contractile fiber
regulation of microtubule depolymerization	passive transmembrane transporter activity	intrinsic to membrane
cell morphogenesis involved in differentiation	channel activity	microtubule associated complex
regulation of neurotransmitter levels	cation channel activity	clathrin-coated vesicle
neurotransmitter secretion	calcium ion binding	neuron projection
cell morphogenesis involved in neuron differentiation	ubiquitin-protein ligase activity	cell surface
negative regulation of microtubule polymerization or depolymerization	NAD+ ADP-ribosyltransferase activity	microtubule cytoskeleton
cellular component morphogenesis	metal ion binding	integral to membrane
	structural constituent of myelin sheath	cell soma

8.3 RNA-POOLS DER GENECHIPS®



Abbildung 21 RNA-Pools embryonaler Tiere E15,5

Tabellarische Darstellung der RNA-Pools von Hybridisierungsexperimenten 1-3 an der Affymetrix-Station. Zur Aufreinigung von RNA wurden bereits 4 individuelle Proben gemischt (farblich gekennzeichnet). Von diesen wurden 3 gemeinsam auf einem GeneChip analysiert.

ANHANG

sex		Tissue Pool	RNA Pool		Genechip				Hybridization Run 4
w		Geschwister No.T3	other Geschwister in Trizol-Sample T2	→	FC28W1	AT28W1	PT28W1	SC28W1	
m		Geschwister No.T4	other Geschwister in Trizol-Samples T5 and T8		RNA Pool No.5 +	RNA Pool No.6 +	RNA Pool No.7 +	RNA Pool No.8 +	
m		Geschwister No.T20	other Geschwister in Trizol-Sample T19		RNA Pool No.37 +	RNA Pool No.38 +	RNA Pool No.39 +	RNA Pool No.40 +	
w		No.T23	Geschwister in Trizol-Samples T21, T22 and T24	→	RNA Pool No.53	RNA Pool No.54	RNA Pool No.55	RNA Pool No.56	
m		No.T9	Geschwister in Trizol-Samples T7, T8 and T10		RNA Pool No.37 +	RNA Pool No.38 +	RNA Pool No.39 +	RNA Pool No.40 +	
m		No.T13	Geschwister in Trizol-Samples T11,T12 and T14		RNA Pool No.53	RNA Pool No.54	RNA Pool No.55	RNA Pool No.56	
w		No.T41a	Geschwister in Trizol-Samples T39 and T40	→					
m		No.T41b	Geschwister in Trizol-Sample T42						
w		No.T44	Geschwister in Trizol-Sample T43						
					Genechip				
w		No.T1	-	→	FC28N1	AT28N1	PT28N1	SC28N1	
m		No.T2	Geschwister in Trizol-Sample T3		RNA Pool No.1 +	RNA Pool No.2 +	RNA Pool No.3 +	RNA Pool No.4 +	
w		No.T14	Geschwister in Trizol-Samples T1,T12 and T13		RNA Pool No.13 +	RNA Pool No.14 +	RNA Pool No.15 +	RNA Pool No.16 +	
w		No.T6	Geschwister in Trizol-Samples T4 and T5	→	RNA Pool No.65	RNA Pool No.66	RNA Pool No.67	RNA Pool No.68	
m		No.T43	Geschwister in Trizol-Sample T44		RNA Pool No.13	RNA Pool No.14	RNA Pool No.15	RNA Pool No.16	
m		No.T47	Geschwister in Trizol-Samples T46		RNA Pool No.65	RNA Pool No.66	RNA Pool No.67	RNA Pool No.68	
					Genechip				
w		No.T5	Geschwister in Trizol-Samples T4 and T6	→	FC28W2	AT28W2	PT28W2	SC28W2	
m		No.T7	Geschwister in Trizol-Samples T8,T9 and T10		RNA Pool No.9 +	RNA Pool No.10 +	RNA Pool No.11 +	RNA Pool No.12 +	
w		No.T21	Geschwister in Trizol-Samples T22,T23 and T24		RNA Pool No.9	RNA Pool No.10	RNA Pool No.11	RNA Pool No.12	
w		No.T26	Geschwister in Trizol-Samples T25,T27 and T28	→	RNA Pool No.41 +	RNA Pool No.42 +	RNA Pool No.43 +	RNA Pool No.44 +	
m		No.T33	Geschwister in Trizol-Samples T34 and T35		RNA Pool No.41	RNA Pool No.42	RNA Pool No.43	RNA Pool No.44	
m		No.T42	sibling in Trizol-Sample T41b		RNA Pool No.45	RNA Pool No.46	RNA Pool No.47	RNA Pool No.48	
					Genechip				
w		No.T11	Geschwister in Trizol-Samples T12,T13 and T14	→	FC28W3	AT28W3	PT28W3	SC28W3	
m		No.T17	Geschwister in Trizol-Samples T15 and T16		RNA Pool No.17 +	RNA Pool No.18 +	RNA Pool No.19 +	RNA Pool No.20 +	
w		No.T8	Geschwister in Trizol-Samples T7,T9 and T10		RNA Pool No.17	RNA Pool No.18	RNA Pool No.19	RNA Pool No.20	
w		No.T34	Geschwister in Trizol-Samples T33 and T35	→	RNA Pool No.69	RNA Pool No.70	RNA Pool No.71	RNA Pool No.72	
m		No.T37	Geschwister in Trizol-Samples T36 and T38		RNA Pool No.49 +	RNA Pool No.50 +	RNA Pool No.51 +	RNA Pool No.52 +	
w		No.T49	-		RNA Pool No.69	RNA Pool No.70	RNA Pool No.71	RNA Pool No.72	
w		No.T50	-						
					Genechip				
w		No.T10	Geschwister in Trizol-Samples T7,T8 and T9	→	FC28N2	AT28N2	PT28N2	SC28N2	
m		No.T15	Geschwister in Trizol-Samples T16 and T17		RNA Pool No.21 +	RNA Pool No.22 +	RNA Pool No.23 +	RNA Pool No.24 +	
w		No.T18	Geschwister in Trizol-Samples T19 and T20		RNA Pool No.21	RNA Pool No.22	RNA Pool No.23	RNA Pool No.24	
w		No.T22	Geschwister in Trizol-Samples T21,T23 and T24	→	RNA Pool No.33 +	RNA Pool No.34 +	RNA Pool No.35 +	RNA Pool No.36 +	
m		No.T29	Geschwister in Trizol-Samples T30,T31 and T32		RNA Pool No.33	RNA Pool No.34	RNA Pool No.35	RNA Pool No.36	
w		No.T38	Geschwister in Trizol-Samples T36 and T37		RNA Pool No.61	RNA Pool No.62	RNA Pool No.63	RNA Pool No.64	
m		No.T46	Geschwister in Trizol-Sample T47						
					Genechip				
w		No.T13	Geschwister in Trizol-Samples T11,T12 and T14	→	FC28N3	AT28N3	PT28N3	SC28N3	
m		No.T16	Geschwister in Trizol-Samples T15 and T17		RNA Pool No.25 +	RNA Pool No.26 +	RNA Pool No.27 +	RNA Pool No.28 +	
w		No.T19	Geschwister in Trizol-Samples T18 and T20		RNA Pool No.25	RNA Pool No.26	RNA Pool No.27	RNA Pool No.28	
w		No.T24	Geschwister in Trizol-Samples T21,T22 and T23	→	RNA Pool No.29 +	RNA Pool No.30 +	RNA Pool No.31 +	RNA Pool No.32 +	
m		No.T31	Geschwister in Trizol-Samples T29,T30 and T32		RNA Pool No.29	RNA Pool No.30	RNA Pool No.31	RNA Pool No.32	
w		No.T25	Geschwister in Trizol-Samples T26,T27 and T28		RNA Pool No.57	RNA Pool No.58	RNA Pool No.59	RNA Pool No.60	
w		No.T36	Geschwister in Trizol-Samples T37 and T38						
w		No.T39	Geschwister in Trizol-Samples T40,T41a and T42						

Abbildung 22 RNA-Pools postnataler Tiere P28

Tabellarische Darstellung der RNA-Pools von Hybridisierungsexperimenten 4 und 5 an der Affymetrix-Station.

8.4 RNA-POOLS DER qPCR

RNA-Pools aus 4 Präparaten von individuellen Tieren. Falls diese durch GeneChips® analysiert wurden, ist dies gekennzeichnet.

FC - E15,5

<i>Nrg1</i> ^{+/-}	<i>Nrg1</i> ^{+/+}
Nummer 30 (FC16N1 grün)	Nummer 38 (FC16W1 grün)
Nummer 46	Nummer 50 (FC16W1 gelb)
Nummer 70 (FC16N1 gelb)	Nummer 62
Nummer 95 (FC16N3 blau)	Nummer 66 (FC16W1 blau)
Nummer 115	Nummer 107

AT - P28

Nummer 26 (AT28N3)	Nummer 6 (AT28W1)
Nummer 58 (AT28N3)	Nummer 38 (AT28W1)
Nummer 62 (AT28N2)	Nummer 46 (AT28W2)
Nummer 66 (AT28N1)	Nummer 50 (AT28W3)
Nummer 70 (AT28N3)	Nummer 54 (AT28W1)

SC – P28

Nummer 24 (SC28W2)	Nummer 40 (SC28W1)
Nummer 28 (SC28W3)	Nummer 48 (SC28W2)
Nummer 36 (SC28W2)	Nummer 52 (SC28W3)
Nummer 60 (SC28W3)	Nummer 56 (SC28W1)
Nummer 68 (SC28W1)	Nummer 80

8.5 GENOMISCHES FRAGMENT

Schnittstelle des genomischen Sequenzfragments der EGF-ähnlichen Domäne (hellbrauner Abschnitt) und der inserierten Sequenz des *LacZ*-Gens von *E.coli* (blauvioletter Abschnitt).

```
(N),GGGACCAGCCATCTCATAAAGTGTGCGGAGAAGGAGAAAAAATTCTGCAGCCCGGGGATCTGGCGGGATCCCGTCGTTTTACAACGTCGTGA
CTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCGAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCC
CAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTCCTGGTTCCGGCACAGAAAGCGGTGCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCTGAGGC
CGATACTGTCGTCGCCCTC(N),
```

8.6 SCHNITTEBENEN DURCH AT,FC,PT UND SC

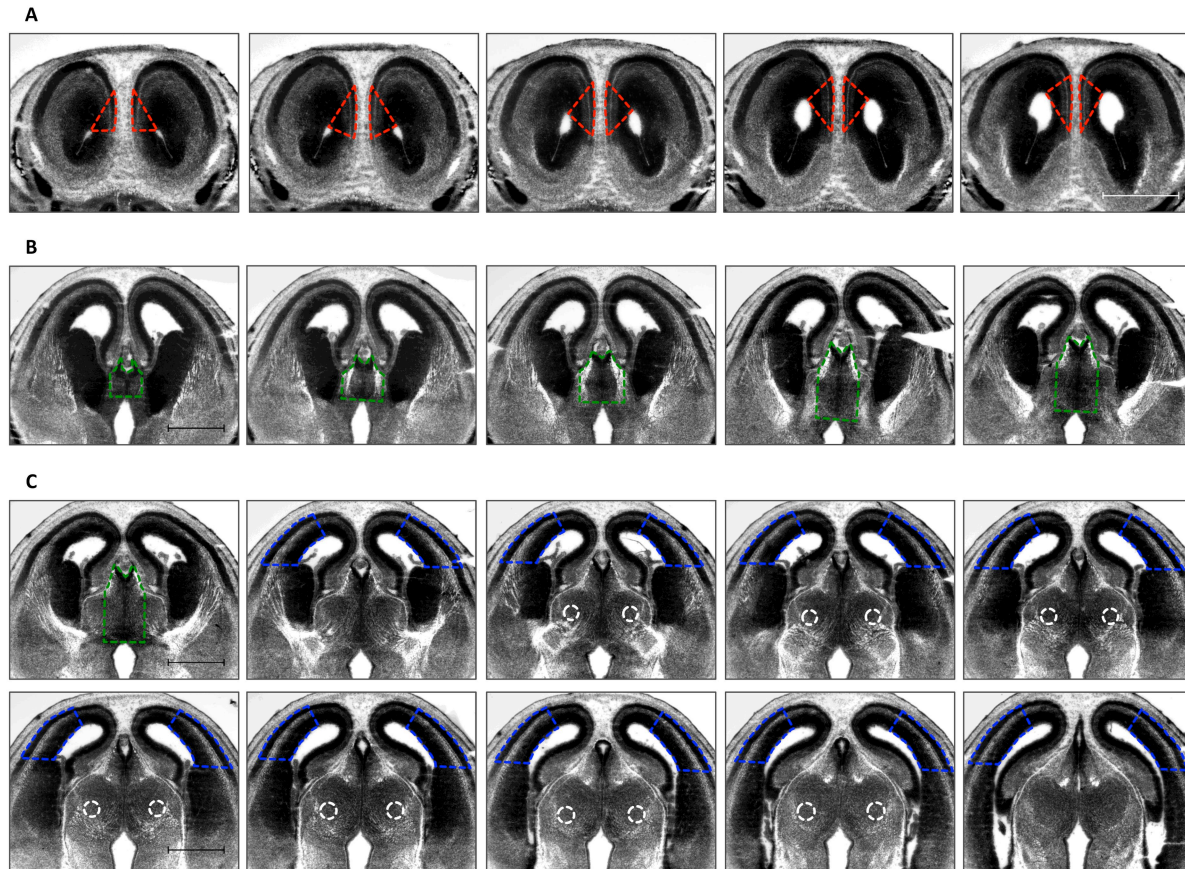


Abbildung 23: Quantifizierte Auswahlbereiche von AT, FC, PT und SC

Komplette Auswahl an koronalen Schnittebenen durch die ausgewählten Bereiche AT (grün), FC (rot), PT (weiß) und SC (blau). Von aufeinanderfolgenden 20 µm dicken Schnitten ist jeder dritte gezeigt. Skalierung 1 mm.

LEBENS LAUF

Name	Philipp Kaiser
Geburtsdatum	24.12.1979
Geburtsort	Friedrichshafen
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Gegenwärtige Adresse	Rittnertstr. 9 76227 Karlsruhe

Ausbildung	1986-1999	Schule Allgemeine Hochschulreife
	1999-2000	Zivildienst
	2000-2006	Universität Jena Diplom in Biochemie
	2006-2007	Uniklinik Jena Wissenschaftlicher Mitarbeiter Nachwuchsgruppe Neurogenetik
	2007-2011	Dissertation Karlsruher Institut für Technologie Zoologisches Institut Abteilung Zell- und Neurobiologie

Stipendium der Karlsruhe School of Optics and Photonics