

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Entwicklungsgenetik

Expression, Regulation und Funktion von Tdp-43 in der Maus

Claudia Maria Groß

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. E. Grill

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Wurst

2. Priv.-Doz. Dr. J. Beckers

Die Dissertation wurde am 24.09.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 19.01.2011 angenommen.

„Die Naturwissenschaft beschreibt und erklärt die Natur nicht einfach, so wie sie ‚an sich‘ ist. Sie ist vielmehr ein Teil des Wechselspiels zwischen der Natur und uns selbst.“

Werner Heisenberg

Inhaltsverzeichnis

I.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	8
II.	ZUSAMMENFASSUNG.....	11
III.	EINLEITUNG.....	13
III.1.	PROTEINE MIT PATHOGENETISCHER ROLLE IN NEURODEGENERATIVEN ERKRANKUNGEN	13
III.1.1.	<i>Aβ-Plaques</i>	13
III.1.2.	<i>Tau, Auslöser von neurofibrillären Tangles</i>	14
III.1.3.	<i>α-Synucleinopathie</i>	15
III.1.4.	<i>Das FUS/TLS Protein</i>	16
III.1.5.	<i>Intermediär-Filament-Proteine in NIFID</i>	17
III.1.6.	<i>Prion-Ablagerungen</i>	17
III.1.7.	<i>TDP-43 Zelleinschlüsse</i>	17
III.2.	ALS	18
III.3.	FTLD	19
III.3.1.	<i>FTLD-Nomenklatur</i>	20
III.3.2.	<i>TDP-43 Proteinopathie in FTLD-TDP</i>	22
III.4.	MOLEKULARE STRUKTUR VON TDP-43.....	23
III.4.1.	<i>Entdeckung von TDP-43</i>	23
III.4.2.	<i>Genom- und Protein-Struktur von TDP-43</i>	23
III.4.3.	<i>Die NLS-Domäne</i>	25
III.4.4.	<i>NES und RRM's</i>	26
III.4.5.	<i>Die C-terminale Region</i>	26
III.5.	TDP-43 UND SEINE ÄHNLICHKEIT ZU HNRNPS	27
III.6.	TDP-43 DIMERISATION	29
III.7.	TDP-43 MODIFIKATIONEN	29
III.8.	BEKANNTE FUNKTIONEN VON TDP-43.....	33
III.9.	DIE MAUS ALS INTERPRETER DES MENSCHLICHEN GENOMS.....	37
III.9.1.	<i>Genom-Sequenzierungen</i>	37
III.9.2.	<i>Die gene trap Mutagenese</i>	38
IV.	MATERIAL	41
IV.1	GERÄTELISTE.....	41
IV.2.	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	43
IV.2.1.	<i>Chemikalien</i>	43
IV.2.2.	<i>Enzyme</i>	46
IV.2.3.	<i>Kits</i>	46
IV.2.4.	<i>Sonstige Verbrauchsmaterialien</i>	47

IV.2.5.	<i>E. coli</i> Stämme.....	47
IV.2.6.	Eukaryotische Zellen.....	48
IV.2.7.	Mausstämme.....	48
V.	METHODEN.....	49
V.1.	KLONIERUNGSTECHNIKEN BASIEREND AUF DESOXYRIBONUKLEINSÄUREN.....	49
V.1.1.	Vektor-DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	49
V.1.2.	Dephosphorylierung eines linearisierten Vektors.....	49
V.1.3.	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	49
V.1.4.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	50
V.1.5.	Aufreinigung der DNA.....	50
V.1.6.	Ligation.....	51
V.1.7.	TOPO-TA Klonierung.....	51
V.1.8.	Chemische Transformation von Bakterien.....	52
V.1.9.	Präparation von Vektor-DNA aus Bakterien.....	52
V.1.10.	Vervielfältigung von DNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	52
V.2.	EXTRAKTION VON DNA AUS MAUSSCHWANZBIOPSIEN.....	53
V.3.	EXTRAKTION VON DNA AUS DER AMNION-HÜLLE.....	54
V.4.	GENOMISCHER SOUTHERN-BLOT.....	54
V.4.1.	Restriktionsenzymatischer Verdau genomischer DNA.....	54
V.4.2.	Auftrennung der genomischen DNA und Blotting.....	54
V.4.3.	Herstellung einer DNA-Sonde durch radioaktive Markierung.....	55
V.4.4.	Hybridisierung der genomischen DNA.....	55
V.5.	ARBEITEN MIT RIBONUKLEINSÄUREN (RNA).....	56
V.5.1.	Präparation von Gesamt-RNA aus Gehirngewebe.....	56
V.5.2.	Überprüfung der Integrität der RNA mittels eines Agarose-Geles.....	56
V.5.3.	cDNA Synthese mittels reverser Transkriptase.....	57
V.5.4.	Quantitative RT-PCR.....	57
V.5.5.	5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).....	57
V.6.	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	58
V.6.1.	Proteingewinnung aus Zellen oder Gehirngewebe.....	58
V.6.2.	Bestimmung der Protein Konzentration.....	58
V.6.3.	Auftrennung von Proteinen auf denaturierendem SDS-Polyacrylamid Gel und Western Blot.....	59
V.7.	EMBRYONALE STAMMZELLKULTUR.....	60
V.7.1.	Kultivierung von ES- oder Fibroblasten-Zellen.....	60
V.7.2.	Transiente Transfektion von ES- oder HEK293T-Zellen.....	60
V.8.	TIERHALTUNG.....	61
V.9.	BLASTOZYSTEN-ISOLATION.....	61
V.9.1.	Bestimmung embryonaler Stadien.....	61

V.10.	TETRAPLOIDE AGGREGATION	62
V.11.	MORPHOLOGISCHE TECHNIKEN	62
V.11.1.	<i>Perfusion von adulten Mäusen</i>	62
V.11.2.	<i>Schneiden von Embryonen, adulten Gehirnen und Rückenmark mit dem Mikrotom</i>	63
V.12.	IMMUNHISTOCHEMIE	64
V.12.1.	<i>Immunhistochemische Färbung auf Paraffin Schnitten</i>	64
V.12.2.	<i>β-Gal Färbung</i>	65
V.12.3.	<i>H&E Färbung</i>	66
V.13.	WHOLE MOUNT RNA IN-SITU HYBRIDISIERUNG	66
V.14.	VERHALTENSANALYSEN	68
VI.	ERGEBNISSE	69
VI.1.	MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG DER MAUSLINIE D045A10.....	69
VI.1.1.	<i>Darstellung des Lokus und der βgeo-Insertion</i>	69
VI.1.2.	<i>Genotypisierung</i>	71
VI.2.	EXPRESSIONSSTUDIEN VON TARDBP	72
VI.2.1.	<i>Proteinanalyse und Immunfärbung zeigen starke TARDBP Expression im Gehirn</i>	72
VI.2.2.	<i>Die β-Galaktosidase Färbung deckt sich mit der Antikörperfärbung</i>	74
VI.2.3.	<i>Proteinanalysen und quantitative PCR zeigen keine 50 % ige Reduktion von TDP-43 in heterozygoten Tieren</i>	75
VI.2.3.1.	<i>TARDBP Proteinanalyse zeigt einen signifikanten Unterschied in heterozygoten Tieren</i>	75
VI.2.3.2.	<i>Methodik der quantitativen PCR Analyse an heterozygoten Tardbp-Mausmutanten</i>	76
VI.2.3.3.	<i>Statistische Auswertung der qPCR</i>	77
VI.2.4.	<i>miR330 als potentiell regulatorisches Element von TDP-43</i>	79
VI.2.4.1.	<i>Hintergrund: miRNAs und ihre Wirkung</i>	79
VI.2.4.2.	<i>Identifizierung von miR330</i>	80
VI.2.4.3.	<i>qPCR zur Analyse von miR330</i>	81
VI.2.4.4.	<i>Statistische Analyse der einzelnen qRT-PCR Experimente</i>	82
VI.2.4.5.	<i>Validierung von miR330 in vitro</i>	85
VI.3.	ADULTE TARDBP ^{+/-} MUTANTEN ZEIGEN REDUZIERT MOTORISCHE FÄHIGKEITEN	88
VI.3.1.	<i>Beschreibung der einzelnen Verhaltenstests</i>	89
VI.3.2.	<i>Auswertung der motorischen Tests</i>	90
VI.3.3.	<i>Skelettmuskelfasern zeigen keine regenerative Morphologie</i>	92
VI.3.4.	<i>Anzahl der Motoneuronen in TDP-43 Mutanten unverändert</i>	93
VI.4.	GENOTYPISIERUNG ZEIGT FRÜHE LETALITÄT VON HOMOZYGOTEN EMBRYONEN.....	95
VI.4.1.	<i>β-Gal Aktivität und Antikörperfärbungen zeigen unterschiedliche Expressionsmuster</i>	95
VI.4.2.	<i>Zwei-Promotoren Theorie</i>	97
VI.4.3.	<i>TDP-43 ist am extraembryonalen Phänotyp beteiligt</i>	99
VI.4.3.1.	<i>Hintergrund: Tetraploide Aggregation</i>	101
VI.4.3.2.	<i>Der extraembryonale Phänotyp kann „gerettet“ werden</i>	102

VI.4.3.3.	TDP-43 ist essentiell für die Entwicklung des Trophoblasten.....	103
VI.5.	EXPRESSIONSSTUDIEN VON ÄLTEREN EMBRYONEN POST-IMPLANTATION ZEIGEN KEINE WEITEREN DISKREPANZEN	104
VI.5.1.	<i>Untersuchung der Expressionsmuster mit Antikörperfärbung und β-Gal Färbung</i>	<i>104</i>
VI.5.2.	<i>Whole mount in-situ Hybridisierungen korrespondieren teilweise mit der Antikörperfärbung</i>	<i>107</i>
VII.	DISKUSSION.....	109
VII.1.	TDP-43 IST ESSENTIELL WÄHREND DER IMPLANTATION UND GASTRULATION	109
VII.1.1.	<i>SMN Inaktivierung führt zu einem massiven Zelltod im frühen Mausembryo</i>	<i>110</i>
VII.1.2.	<i>Wie kommt der frühe Phänotyp der homozygoten TDP-43 Mutante zustande?</i>	<i>110</i>
VII.1.2.1.	Exkurs: Zellschicksal während der frühen Embryogenese	110
VII.1.2.2.	Maus-Mutanten, die einen Implantations-Phänotyp zeigen	111
VII.1.2.3.	Wie kann TDP-43 während dieser frühen Zellschicksalsbestimmung in den molekularen Mechanismus integriert werden?	113
VII.1.3.	<i>Maus-Mutanten mit Plazenta-Defekt.....</i>	<i>114</i>
VII.1.4.	<i>Tdp-43 ist am embryonalen Phänotyp beteiligt.....</i>	<i>115</i>
VII.1.5.	<i>Zwei-Promotoren Theorie im TDP-43 Lokus.....</i>	<i>116</i>
VII.2.	TDP-43 PHÄNOTYP IM ADULTEN TIER.....	119
VII.2.1.	<i>Veränderungen in heterozygoten Tieren auf molekularer Ebene</i>	<i>120</i>
VII.2.2.	Exkurs: <i>miRNA</i> Prozessierung	121
VII.2.3.	<i>miRNAs in neurodegenerativen Erkrankungen</i>	<i>122</i>
VII.2.4.	<i>Bereits bekannte miRNA Interaktion mit TDP-43</i>	<i>122</i>
VII.2.5.	<i>Die Regulation von miRNAs erfolgt durch Mikroprozessoren</i>	<i>123</i>
VII.2.5.1.	Der Droscha Komplex.....	123
VII.2.5.2.	TDP-43 ist am Droscha Komplex beteiligt und reguliert die <i>miRNA</i> Prozessierung.....	124
VII.2.5.3.	Überexpressionsassay von <i>miR330</i> zeigte keinen Regulationseffekt	126
VII.3.	RISIKOFAKTOREN FÜR FTLD-TDP UND ALS	126
VII.3.1.	<i>Das sezernierte Protein Progranulin</i>	<i>126</i>
VII.3.2.	<i>Das noch unbekannte Transmembranprotein TMEM106B</i>	<i>127</i>
VII.3.1.3.	Bekannte stromabwärts gelegene Zielgene von TDP-43	129
VIII.	PERSPEKTIVEN	131
IX.	ANHANG	133
IX.1.	OLIGONUKLEOTIDE UND PCR-BEDINGUNGEN	133
IX.2.	ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIZIERTEN TDP-43 K.O.-MÄUSE.....	134
X.	ABKÜRZUNGEN.....	135
XI.	REFERENZEN.....	139

XII. DANKSAGUNG 159

I. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb.	1:	Algorithmus zur Klassifizierung von sporadischen Formen neurodegenerativer Erkrankungen	16
Abb.	2:	TDP-43 als Faktor während der Transkriptions-Regulation	23
Abb.	3:	Schematische Darstellung der Proteinstruktur von TDP-43	24
Abb.	4:	TDP-43 Mutationen in ALS und FTLD-TDP	27
Abb.	5:	Struktur des hnRNP A1 mit einer Größe von 320 Aminosäuren	28
Abb.	6:	TDP-43 Proteinopathie	30
Abb.	7:	Darstellung der Caspase-3 Schnittstellen und C-terminalen Phosphorylierungspositionen	31
Abb.	8:	Wildtypisches (links) und pathogenes TDP-43 (rechts) in einer Nervenzelle	32
Abb.	9:	Alternatives Spleißen von CFTR	34
Abb.	10:	Repräsentation der funktionellen Klassen der TDP-43 Interaktions-Proteine	37
Abb.	11:	Southern Blot Analyse zur Bestätigung von einmaligen Integrationen des <i>gene trap</i> Vektor	70
Abb.	12:	<i>Tardbp</i> Lokus mit <i>gene trap</i> Insertion	70
Abb.	13:	Genotypische Analyse der <i>gene trap</i> Mauslinie D045A10	71
Abb.	14:	Tdp-43 ist im adulten Maushirn in allen drei neuronalen Zelllinien exprimiert	73
Abb.	15:	Expression von Tdp-43 im Gyrus dentatus adulter Mäuse	74
Abb.	16:	Heterozygote Tiere zeigen ein reduziertes TDP-43 Level	75
Abb.	17:	Schematische Darstellung der taqman-Methode	76
Abb.	18:	Quantifizierung des Tardbp Transkript-Levels in 7 unabhängigen Experimenten	78
Abb.	19:	Darstellung der kodierenden Sequenzen mit UTRs (<i>untranslated regions</i>) von Tdp-43 in <i>H. sapiens</i> und <i>M. musculus</i>	81
Abb.	20:	Hypothetischer feedback-Mechanismus, der eine Stabilisierung der Tardbp mRNA durch miR330 suggeriert	82
Abb.	21:	<i>Fold changes</i> mit Konfidenzintervallen	84
Abb.	22:	<i>Stem loop</i> Struktur und reife miRNA330 in <i>H. sapiens</i> und <i>M. musculus</i>	86

Abb. 23:	Darstellung des pUI4-SIBR miR330 Expressionsvektors	87
Abb. 24:	Western Blot zur Analyse des TDP-43-Levels bei Überexpression von miR330	87
Abb. 25:	Verhaltensanalyse der TDP-43 Mäuse im Alter von 5 und 12 Monaten	90
Abb. 26:	Skelettmuskelquerschnitt von Mutante und Wildtyp im Vergleich	92
Abb. 27:	Aufbau des Rückenmarks auf zellulärer und funktionaler Ebene	93
Abb. 28:	Motoneuronen-Zählung im ventralen Horn von drei wildtypischen und drei heterozygoten Männchen im Alter von 12 Monate	94
Abb. 29:	LacZ- und immunohistochemische Färbungen an Embryonen des Embryonaltages 7.5	96
Abb. 30:	5'RACE-Analyse	98
Abb. 31:	Tardbp Analyse mit dem Promotor-Vorhersage Programm Genomatix	99
Abb. 32:	lacZ-Färbung und TARDBP-Immunohistologie an einem Plazentaquerschnitt zum Zeitpunkt E10.5	99
Abb. 33:	Exkurs: Erzeugung von Mäusen aus ES-Zellen mit Hilfe der tetraploiden Aggregation	101
Abb. 34:	Partieller <i>rescue</i>	103
Abb. 35:	Blastozysten-Explantate von 3.5 Tage alten Embryonen aus het x het Verpaarungen	104
Abb. 36:	lacZ Färbungen an Tardbp ^{+/-} Embryonen zwischen Embryonaltag 8.5 und 10	105
Abb. 37:	lacZ und immunohistochemische (IHC) Färbungen an Embryonen Tag E8.5 und E10.5	106
Abb. 38:	<i>Whole mount in-situs</i> an Wildtyp Embryonen bestätigen teilweise die Antikörper-Färbung	108
Abb. 39:	TDP-43 als vermeintlicher Interaktionspartner des Trophoblast initiiierenden Cdx2 Transkriptionsfaktors	113
Abb. 40:	Murine Plazenta-Entwicklung von Embryonaltag 8 bis 10	114
Abb. 41:	Zwei unterschiedliche Promotorregionen im murinen Tardbp Gen	118
Abb. 42:	Vergleich der lacZ-Färbungen von 10.5 bzw. 9.5 Tage alten Embryonen verschiedener <i>gene trap</i> Mutanten	119
Abb. 43:	Vermeintlicher Mechanismus während der Initiierung des miRNA Prozessierungs-Komplexes	125
Abb. 44:	Schematische Darstellung der Lokalisation bzw. Umverteilung von TDP-43	128

Abb. 45A:	Interaktionsmodel von TDP-43 mit Zielproteinen im Cytoplasma	130
Abb. 45B:	Multikausalität von TDP-43 im Nukleus	130
Tabelle 1:	Auflistung weiterer miRNAs, die mittels bio- informatischer Vorhersageprogramme gefunden wurden	80
Tabelle 2:	Statistische Auswertung der Genotypisierung von Embryonen	95
Tabelle 3:	Zusammenfassung der publizierten TDP-43 k.o. Mäuse	134

II. Zusammenfassung

Tardbp codiert das *transactivation response* (Tar)-DNA Bindeprotein TDP-43, das als Hauptkomponente in neuronalen Zelleinschlüssen von familiären und sporadischen Fällen der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) und in der häufigsten Form der Frontotemporalen Lobar Demenz (FTLD), kurz FTLD-TDP, gefunden wurde. Die Struktur von TDP-43 hat große Ähnlichkeit mit der von hnRNPs (*heterogenous nuclear ribonucleoproteins*), die RNAs stabilisieren und transportieren. TDP-43 bindet sowohl RNA- als auch DNA-Moleküle und ist in seiner Funktion ein Transkriptionsregulator, der alternatives Spleißen von prä-mRNA induziert, wie bereits bei *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) oder *survival of motorneurons* (SMN) gezeigt werden konnte. Weitere Funktionen von TDP-43, die den Pathomechanismus von ALS und FTLD-TDP erklären könnten, sind noch nicht bekannt.

In dieser vorliegenden Studie wurde durch insertionale Mutagenese eine murine Null Mutante von *Tardbp* erzeugt, um weitere funktionelle Aufgaben von TDP-43 zu entschlüsseln. Homozygote Mutanten zeigten einen frühen letalen Phänotyp zum Zeitpunkt der Implantation. Mit einem tetraploiden *rescue* konnte das Absterben von homozygoten Embryonen bis zum Stadium E9.0 hinausgezögert werden. Dies lässt auf eine extraembryonale Kontribution zum Phänotyp schließen. Blastozysten Auswuchs-Experimente verdeutlichten das Fehlen des Trophoblasten in homozygoten Embryonen. In heterozygoten fünf Monate alten Männchen konnte eine signifikante Reduktion der motorischen Fähigkeit festgestellt werden, das sich im Alter von einem Jahr noch verdeutlichte. Zusätzlich war das TDP-43 Level in adulten heterozygoten Tieren nicht wie erwartet um 50 % reduziert, sondern auf 70-80 % hochreguliert. Dies lässt auf einen Rückkopplungsmechanismus schließen, der TDP-43 mRNA stabilisiert bzw. vermehrt translatiert.

The transactive-response DNA-binding protein gene (*Tardbp*) encodes TDP-43, a protein, which represents the major pathological component in inclusions in sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and the most common form of frontotemporal lobar degeneration, FTLD-TDP. Structurally and functionally, TDP-43 is capable of binding DNA and RNA and was shown to be involved in the regulation of numerous transcripts, among these the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and the survival of motorneurons (SMN) messenger RNAs. Further functions of TDP-43, which may define the pathomechanism of ALS and FTLD-TDP, are unknown.

Here, we report the inactivation of the mouse *Tardbp* gene by means of insertional mutagenesis. *Tardbp* mouse embryos were not viable and died within the first week after fertilization. Tetraploid rescue resulted in survival of mutants until day 9 of embryonic development, indicating an extraembryonic contribution to the *Tardbp* mutant embryonic phenotype. In further support, explant cultures of blastocysts for 14 days revealed the absence of trophoblast outgrowth from mutant embryos.

Heterozygous *Tardbp* mutant males showed significant impairments of motor functions at five months and one year of age. Interestingly, heterozygous animals showed levels of 70-80 % instead of the expected 50 %, of TDP-43 mRNA and protein, indicating a feedback loop regulating mRNA expression or stability.

III. Einleitung

Demenz oder *dementia* (lat.), gleichbedeutend mit Schwachsinn, Wahnsinn oder Verrücktheit, ist vor allem in der schnell alternden Gesellschaft unserer westlichen Welt eine weit verbreitete neurodegenerative Erkrankung. Demenzen sind die Alterskrankheiten der Zukunft, was aus Statistiken von Epidemiologen ersichtlich wird, die eine Verschiebung der Altersstruktur in Deutschland vorhersagen (Bickel et al, 1999). Durch den steigenden Anteil sehr alter Menschen entsteht das sogenannte vierte Lebensalter, zu dem die über 80-jährigen Menschen gezählt werden. Sind die Menschen dieses letzten Lebensabschnitts überwiegend von neurodegenerativen Erkrankungen befallen, so entstehen für die Zukunft bislang ungelöste ökonomische und soziale Probleme, da neurodegenerative Erkrankungen bis dato kaum behandelbar sind.

Die bekannteste und am weitesten verbreitete Form von Demenz ist die Alzheimer'sche Krankheit (AD), benannt nach ihrem Entdecker Alois Alzheimer (1864-1915). Dieser beschrieb erstmals durch seine langjährigen Studien an der Patientin Auguste Deter klinische Symptome sowie histologische Befunde von Neurodegeneration. Charakteristisch für diese Krankheit sind hauptsächlich der Gedächtnisverlust und die sukzessive Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen. Aus neuropathologischer Sicht findet vor allem ein Verlust von Neuronen und Synapsen im Cortex und Hippocampus sowie in der Amygdala und des Meynert's nucleus basalis statt, ausgelöst durch die Ablagerung von unlöslichen Proteinaggregaten, den amyloiden Plaques und neurofibrillären Tangles (Götz et al, 2008).

III.1. Proteine mit pathogenetischer Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen

III.1.1. A β -Plaques

Auslöser der senilen extrazellulären Plaques und der intrazellulären Filamente (neurofibrillären Tangles) im Hippocampus und im cerebralen Cortex von Alzheimer Patienten sind aggregierende β -Amyloidpeptide (A β) und Tau-Akkumulationen

(Mann, 1997).

Das A β Peptid entsteht in Nervenzellen durch die enzymatische Spaltung des membranständigen Vorläufer-Proteins APP (*amyloid precursor protein*). Dabei können zwei molekulare Varianten entstehen, A β ₄₀ und die pathogene Form A β ₄₂. Auch im gesunden Menschen findet sich A β ₄₂, jedoch überwiegt das Verhältnis von A β ₄₀ zu A β ₄₂. Bei Patienten wird (fast) nur noch die pathogene und aggregierende Form A β ₄₂ gebildet, die extrazellulär Aggregate ausbildet und so die physiologischen Funktionen der Nervenzellen, wie z.B. die Calcium-Regulation oder die Elektronentransportkette der Mitochondrien, stört (Mattson, 2004).

III.1.2. Tau, Auslöser von neurofibrillären Tangles

Die Tauopathie ist eine weitere Form der Aggregatsbildung in AD. Neurofibrilläre Filamente entstehen durch den Zerfall von Mikrotubuli. Dies führt in pyramidalen Neuronen zu einer Unterbrechung der Reizweiterleitung und des Stofftransportes und leitet den Zelltod ein. Tau-Proteine, die Promotoren und Stabilisatoren der Mikrotubuli (Hirokawa et al, 1988), liegen in Alzheimer Patienten in einer hyperphosphorylierten Form vor und tendieren so zum Aggregieren und Verstopfen des Zellinneren. Enzymatische Störungen führen zu dieser verstärkten Phosphorylierung der Tau-Proteine (Lewczuk et al, 2004), welche dann intrazellulär akkumulieren. Zusätzlich verformen sich die Mikrotubuli und zerfallen schließlich.

Tau wird durch das Gen MAPT (*microtubule associated protein tau*) auf Chromosom 17 codiert. Es besteht aus 16 Exons und liegt im adulten menschlichen Gehirn in 6 verschiedenen Isoformen vor, die durch alternatives Spleißen von Exon 2, 3 und 10 entstehen. Die Exone 9–12 codieren Mikrotubuli-assoziiierende Bindemotive und durch den Ausschluß beziehungsweise Einschluß von Exon 10 entstehen Tau-Isoformen mit 3R (*repeats*)- oder 4R-Mikrotubuli-Bindedomänen, die sich durch die unterschiedliche Anzahl an Wiederholungen (R) unterscheiden (Andreadis et al, 1992; Goedert et al, 1989). Die Isoformen werden posttranslational modifiziert und aggregieren in Patienten als hyperphosphoryliertes und verkürztes Tau zu intrazellulären Akkumulationen (Kovacs et al, 2010). Eine Reihe der Tauopathien sind assoziiert mit unterschiedlichen Erkrankungen wie Frontotemporale Lobar Demenz (FTLD), Pick's Erkrankung (PiD), Progressive Supranukleäre Palsie (PSP), Cortico Basale Degeneration (CBD) und FTDP-17T (Frontotemporale Demenz mit

parkinsonähnlichen Erscheinungen in Verbindung mit Chromosom 17q21) (Cairns et al, 2007). In Krankheiten herrschen entweder 3R-Tau (PiD), 4R-Tau (FTDP-17T) oder ein Mix aus beiden Isoformen (AD) vor (Delacourte, 2008). Der eigentliche Auslöser der pathologischen Aggregation von Tau ist noch unbekannt, jedoch wurden eine Reihe von Mutationen im MAPT Gen entdeckt, die Auslöser der Neurofibrillen in nicht Alzheimer-Erkrankungen, wie beispielsweise in familiären Formen von FTDP-17T, sind (Querfurth, 2010, Ingram et al, 2002, Hutton et al, 1998). MAPT Mutationen wurden erstmals im Jahre 1998 in Verbindung mit dieser Erkrankung identifiziert (Hutton et al, 1998; Baker et al, 2006). Für die Alzheimer-Erkrankung wurden bislang noch keine Mutationen beschrieben.

III.1.3. α -Synucleinopathie

Zusätzlich zu den Tau- und A β -Aggregaten existieren noch weitere Proteinablagerungen in neurodegenerativen Erkrankungen (Abb. 1). Verändertes und fehlgefaltetes α -Synuclein ist die Hauptkomponente der Lewy *Bodies*, die vor allem in Neuronen und Neuriten des CA2 und CA3 Sektor des Ammonhorns auftreten (Krüger et al, 1998; Polymeropoulos et al, 1997). Diese Ablagerungen, die durch Mutationen im α -Synuclein-Gen entstehen, findet man in familiären und sporadischen Parkinson Patienten sowie bei Patienten der Lewy *Body* Demenz (DLB) (Spillantini et al, 1997; Wakabayashi et al, 2000). In Patienten der DLB wurden neben den α -Synuclein-Ablagerungen und Ubiquitin-Ablagerungen auch A β Plaques gefunden. Allerdings ist noch nicht klar, wie sich diese Ablagerungen in DLB bilden und inwiefern ein Zusammenhang zwischen Parkinson und DLB besteht (Kovacs et al, 2010).

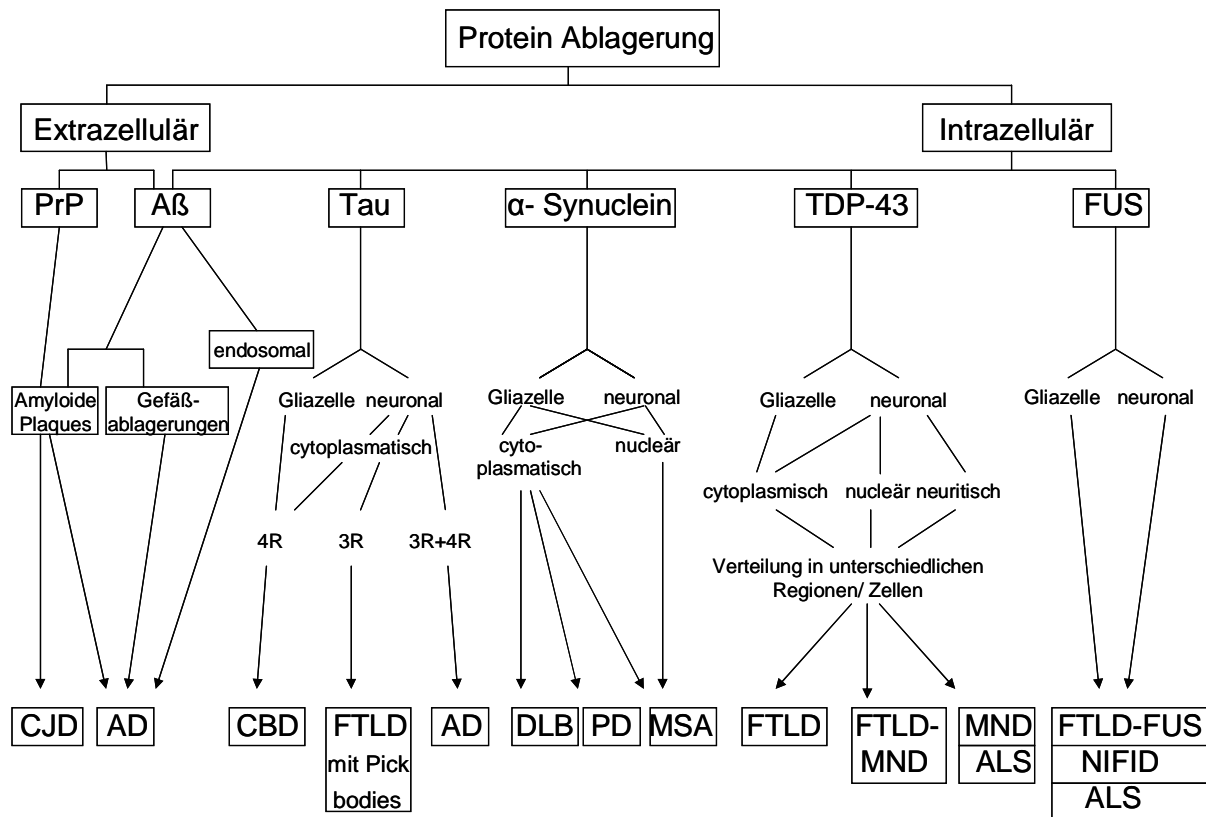


Abb. 1: Algorithmus zur Klassifizierung von sporadischen Formen neurodegenerativer Erkrankungen. CJD: Creutzfeldt-Jacob Erkrankung; AD: Alzheimer Erkrankung; CBD: Corticobasale Degeneration; FTLD: Frontotemporale Lobar Dementia; DLB: Dementia mit Lewy Bodies; PD: Parkinson Erkrankung; MSA: Multiple Atrophie; MND: Motoneuronen Erkrankung; ALS: Amyotrophe Lateralsklerose; NIFID: Neuronale Intermediär Filament Einschlusskörperchen Erkrankung (modifiziert nach Kovacs et al, 2010).

III.1.4. Das FUS/TLS Protein

Intrazelluläres aggregiertes FUS/TLS (*fused in sarkoma / translated in liposarkoma*) wurde in Parkinson Patienten, in familiärer und sporadischer ALS, in FTLD-FUS sowie in NIFID (Neuronale Intermediär-Filament Einschlusskörperchen Erkrankung) nachgewiesen. Die Akkumulationen, die durch Mutationen am C-Terminus ausgelöst werden, sind in 4 % aller fALS Patienten zu finden (Kwiatkowski et al, 2009) und sind im Cytoplasma von Neuronen lokalisiert (Vance et al, 2009). In der spinalen cerebralen Ataxie Typ 3 und in der Huntington Erkrankung wurde das wildtypische FUS/TLS Protein als Hauptkomponente der PolyQ Aggregate entdeckt (Doi et al, 2008).

III.1.5. Intermediär-Filament-Proteine in NIFID

Die Neuronale Intermediär-Filament Einschlusskörperchen Erkrankung (NIFID) ist eine klinisch heterogene Variante der FTD mit zahlreichen neurofilamenthaltigen Einschlüssen in den Nervenzellen. NIFID führt zu motorischen Defiziten und Verhaltensstörungen, die durch die Atrophie zahlreicher Gehirnregionen ausgelöst werden (Yokota et al, 2008).

III.1.6. Prion-Ablagerungen

Krankheiten, die mit dem Prion-Protein assoziieren, sind Varianten der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung, die sporadisch oder familiär auftreten. Veränderungen im zellulären Prion-Protein (PrP^{C}), die durch Punkt- oder insertionale Mutationen ausgelöst werden, verursachen die Krankheits- assoziierte Form PrP^{TSE} , die in der übertragbaren, spongiösen Encephalopathie (TSE) gefunden wurde und durch ihre Konformationsänderung Neuronen abtötet (Kovacs und Budka, 2008). Das fehlgefaltete Prion-Protein ist somit ein Charakteristikum der neuronalen, extrazellulären Ablagerungen in der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung und deren Varianten. Die PrP-Plaques können amyloiden oder nicht-amyloiden Charakter haben und wurden auch schon in AD detektiert (Kovacs et al, 2009). Der Gewebeverlust, der durch die extrazellulären Plaques ausgelöst wird, wird eventuell durch andere Signalwege initiiert, die durch die Prion-Pathogenese (negativ) beeinflusst werden (Kovacs und Budka, 2008).

III.1.7. TDP-43 Zelleinschlüsse

Das *transactivation response*-(Tar) DNA Bindeprotein mit einem Molekulargewicht von 43 kDa, kurz TDP-43, ist ein weiteres charakteristisches Protein in neurodegenerativen Erkrankungen. TDP-43 zeigt starke pathologische Befunde in Neuronen und Gliazellen von Patienten der Frontotemporalen Lobar Demenz (FTLD) sowie in Motoneuronen von ALS-Patienten. Diese Zelleinschlüsse sind typischerweise intrazellulär und co-lokalisieren mit Ubiquitin (Neumann et al, 2006). In der familiären Form von ALS und auch in FTLD werden die Zelleinschlüsse

vergleichbar mit FUS/TLS durch Mutationen am C-Terminus ausgelöst.

Im Hinblick auf den Effekt von TDP-43 als pathologisches Protein in den Neurodegenerationen FTLD und ALS gilt es nun, diese beiden Erkrankungen näher zu beschreiben.

III.2. ALS

Amyotrophe Lateralsklerose oder auch Lou Gehrig's Syndrom zeigt degenerative Veränderungen in den oberen und unteren Motoneuronen des Hirnstamms, der Großhirnrinde und des Rückenmarks (Cleveland et al, 2001). Charakteristisch für den Phänotyp dieser Krankheit ist der Verlust von Motoneuronen, die Denervation ihrer Zielmuskeln und der daraus resultierenden Muskelatrophie und Paralyse (Williams et al, 2009). Dies führt gegen Ende des Krankheitsverlaufs zu einem progressiven Defekt des respiratorischen Systems bis hin zur Atemlähmung. Der vollständigen Paralyse geht die Lähmung der unteren Gesichtshälfte einschließlich des Verlustes von Lippen- und Zungenbewegung voraus. Dies wird durch den Defekt der oberen Motoneurone ausgelöst. Der Defekt der unteren Motoneurone führt anfangs zu progressiver Schwäche, gefolgt von Muskelschwund und Spastiken. Die Degeneration der motorischen Nervenfasern, die vom Gehirn ins Rückenmark ziehen, zeigt eine deutliche Veränderung der motorischen Vorderwurzeln des Rückenmarkes, während die hinteren, für die Sensibilität zuständigen Wurzeln, intakt bleiben (Turner et al, 2003).

ALS, die dritthäufigste Form der neurodegenerativen Erkrankungen, ist führend bezüglich Motoneuronen-Defekte, und zählt zu den *early-onset* Erkrankungen, die zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr mit einem Krankheitsverlauf von ungefähr 3-5 Jahren auftreten. Spontane Formen von ALS (sALS), in denen TDP-43 Zelleinschlüsse gefunden wurden, treten bei ungefähr 95 % aller ALS- Fälle auf (Dickson et al, 2007; McCluskey et al, 2009). Nur 5 % aller Patienten sind an der familiären Form von ALS erkrankt, die autosomal dominant vererbt wird. Auch in vererbaren ALS Formen wurden TDP-43 Einschlüsse gefunden, allerdings nicht in der häufigsten familiären Form mit SOD-1 Mutationen (Mackenzie et al, 2007). Die Kupfer-Zink-Superoxiddismutase-1 (SOD1) wurde als erstes ALS Gen nachgewiesen. Etwa 10 % der fALS-Patienten sind mit Mutationen im SOD1-Gen assoziiert. Durch die Mutationen wird das SOD1-Protein in ein schadhaftes Eiweiß umgewandelt, das

zu einer Schädigung motorischer Nervenzellen führt. Im Jahr 2001 konnte das ALS2 (Alsin)-Gen identifiziert werden, das als Ursache der ALS Fälle in Familien von Nordafrika und Kuwait verantwortlich ist. Das ALS2-Gen (Guaninnukleotid-Austauschfaktor für RAB5A) ist wahrscheinlich in bestimmten Transportfunktionen innerhalb der Nervenzellen beteiligt (axonaler Transport). Der Mechanismus der Neuronenschädigung ist jedoch noch unbekannt. Außerdem wurden die Gene von SETX (Senataxin), VAPB (Vesikel-assoziiertes Membranprotein B), DCTN1 (Dynactin1), FUS/TLS und CHMB2B (*charged multivesicular bodyprotein 2B*) als bekannte erbliche Varianten der ALS beschrieben (Mitchell et al, 2007). Ein weiterer genetischer Faktor für fALS ist das Tardbp-Gen, das TDP-43 kodiert und über einen *screen* von zahlreichen Probanden mit 12 verschiedenen SNPs als ALS-Gen identifiziert wurde. Später wurden weitere Aminosäure-Substitutionen in TARDBP bei einem *screen* von 200 ALS Patienten entdeckt (Kabashi et al, 2008).

Da die familiären, nicht-SOD1 ALS-Fälle auch Formen von Demenz zeigen können, schließt man eine Überlappung der beiden neurodegenerativen Erkrankungen FTLD und ALS nicht aus. Zusätzlich fand man bei ca. 15 % von FTLD-Patienten eingeschränkte motorische Fähigkeiten, die typisch für Parkinson-, MND (*motor neuron disease*)- bzw. ALS-Patienten sind (Hodges et al, 2004). Im Gegensatz dazu fanden sich in 50 % der Patienten mit MND kognitive Beeinträchtigungen (Lomen-Hoerth et al, 2003), die typisch für FTLD sind. Diese klinischen Gemeinsamkeiten sind auf molekulare Äquivalenzen zurückzuführen. In manchen Familien co-segregieren die beiden Formen ALS und FTLD und zeigen überlappende Krankheitsbilder (Talbot und Ansorge, 2006).

III.3. FTLD

Vor mehr als 100 Jahren publizierte der Neurologe Arnold Pick zum ersten Mal eine progressive Demenzform, die sich klinisch und pathologisch von AD unterscheidet (A. Pick, 1892). Patienten dieser Krankheit zeigten Sprach- und Verhaltensdefizite sowie eine Atrophie im frontalen und temporalen Lobar (A. Alzheimer, 1911). Diese Erkrankung, die A. Pick zuerst beschrieben hatte, wurde später unter dem Namen Frontotemporale Lobar Degeneration (FTLD) bekannt.

FTLD stellt nach AD eine weit verbreitete Form von Alters- bzw. Adoleszenz-Demenz dar. Diese zweithäufigste Form der Debilität repräsentieren 12 % aller senilen

Demenzpatienten, wobei eine weite Spanne des Erkrankungsalter vorliegt: Neben dem *late-onset*, das Menschen eines Alters von über 65 Jahren betrifft, gibt es auch Patienten mit einer sogenannten präsenilen bzw. *early-onset* FTLD, die bereits im Alter von 20 Jahren beginnen kann. In diesem Fall leidet bereits jeder zweite Demenzerkrankte an FTLD. Der Krankheitsverlauf dauert in der Regel 8-10 Jahre, beginnend mit einer milden Form von gestörten kognitiven Fähigkeiten bis hin zu schwersten Verhaltensstörungen, Veränderung der Persönlichkeit, des Sozialverhaltens sowie Sprachverlust (Aphasie). Diese phänotypischen Merkmale gehen einher mit der Atrophie des frontalen und temporalen Gehirnlappens, wo die Zentren für Verhalten, Emotion, Persönlichkeit und Sprache liegen (Neary et al, 1998). Hier scheint vor allem das Broca-Zentrum betroffen zu sein, das die Sprache steuert. In FTLD-Patienten führt eine Atrophie dieser Gehirnregion zu einem progressiven Sprachdefekt, der sich beginnend mit Wortfindungsstörungen und Sprachverständnisstörungen bis hin zum vollständigen Verstummen äußert. Diese Sprachstörung ähnelt einer Broca-Aphasie, welche eine starke Beeinträchtigung des sozialen Verhaltens mit sich bringt.

III.3.1. FTLD-Nomenklatur

Man unterscheidet grundsätzlich zwei Typen der FTLD:

- FTLD mit TAU Akkumulationen (FTLD-TAU), die sporadisch aber auch familiär auftreten kann sowie
- FTLD mit ubiquitinierten Einschlüssen (FTLD-U), die Tau und α -Synuclein negativ sind (Neumann et al, 2007). Im Gehirn dieser Patienten wurden pathologische Zelleinschlüsse gefunden, die sich mit dem unspezifischen Marker Ubiquitin anfärben ließen. In diesen ubiquitinierten Einschlusskörperchen, die letztendlich zum Absterben der Nervenzellen führen, wurde TDP-43 als Hauptproteinkomponente identifiziert (Neumann et al, 2006). TDP-43 ist seitdem das Schlüsselprotein einer Erkrankungsgruppe, die unter der Bezeichnung TDP-43-Proteinopathie zusammengefasst wird. Darunter zählt auch die neu klassifizierte Unterform von FTLD-U, namens FTLD-TDP (Mackenzie et al, 2009).

Die Neurodegeneration FTLD entsteht zu ungefähr 50-70 % sporadisch (Sampathu

et al, 2006) und tritt in selteneren Fällen auch familiär gehäuft auf. Es wurden eine Reihe von Genen identifiziert, die bei familiären FTLD-Formen eine Rolle spielen, wie MAPT (*microtubule associated protein tau*) (Spillantini et al, 2000), PGRN (Progranulin) (Baker et al, 2006), VCP (*valosine-containing protein*) (Watts et al, 2004), FUS/TLS (*fused in sarkoma/translated in liposarkoma*) (Lagier-Tourenne et al, 2010), CHMB9P (*charged multivesicular body protein 2B*) (Skibinski et al, 2005), ein unbekanntes Gen auf Chromosom 9 (Chr. 9p) (Valdmanis et al, 2007) und TDP-43 (Neumann et al, 2006). Mutationen in diesen Genen werden autosomal dominant vererbt.

Vor kurzem konnte mittels eines GWAS (*genome wide association screen*) ein weiterer Locus identifiziert werden, der in der Entwicklung der sporadischen Form von FTLD eine Rolle spielt. Dieser Locus auf Chromosom 7p21 kodiert für ein Transmembranprotein, kurz TMEM106B, dessen genetische Variationen ein Risikofaktor für FTLD-TDP darstellen (Van Deerlin et al, 2010). Polymorphismen an Chromosom 7p21 erhöhen die TMEM106B Expression, was wiederum zu einem erhöhtem Krankheitsrisiko führt. PGRN-Mutationen, die bei ungefähr 20 % der FTLD-TDP Fälle auftreten, sind mit TMEM106B Variationen assoziiert. Bei erhöhter TMEM106B Expression wird die PGRN Expression inhibiert. Dies deutet darauf hin, dass PGRN *downstream* von TMEM106B in der pathogenen Signalkaskade wirkt. Somit kann TMEM106B auch als „Modifizierer“ von PGRN bezeichnet werden (Van Deerlin et al, 2010).

Durch die unterschiedlichen betroffenen Gene wird FTLD in 6 Klassen eingeteilt, die sich aufgrund der verschiedenen neuronalen und glialen Aggregatsformen histologisch unterscheiden lassen (Kwong et al, 2008).

- Klasse 1 zeigt Zellaggregate mit hyperphosphoryliertem TAU, ausgelöst durch Mutationen in MAPT. Die Tauopathie ist für diese Klasse charakteristisch.
- Die zweite Klasse, jetzt FTLD-TDP genannt (Mackenzie et al, 2009), schließt alle Patienten mit ein, die Ubiquitin- und TDP-43-positive Einschlüsse zeigen, jedoch TAU- und α -Synuclein-negativ sind. Sowohl sporadische als auch familiäre Formen von FTLD mit Mutationen in PGRN, VCP, Chr. 9p oder TDP-43 gehören dieser Klasse an.
- Das intermediär-Filament Protein ist charakteristisch für die dritte Klasse und Auslöser für die Aggregate in NIFID. Auch diese Klasse ist TAU-negativ.

- Die vierte Klasse repräsentiert die Patienten der FTLD, die keine Zelleinschlüsse haben. Bezüglich dieser Klasse ist noch nicht sehr viel bekannt.
- Die fünfte Klasse, auch FTLD-FUS genannt, repräsentiert die FTLD Erkrankten, die Mutationen im FUS/ALS Gen tragen.
- Die sechste und letzte Klasse wird durch Zellaggregate charakterisiert, die TDP-43 negativ sind aber Mutationen im Gen CHMP2B tragen und Ubiquitin-positiv sind.

III.3.2. TDP-43 Proteinopathie in FTLD-TDP

Krankhaftes TDP-43 und somit auch die Erkrankungsform FTLD-TDP wird mittels der TDP-43 Proteinopathie-Nomenklatur in verschiedene Untergruppen klassifiziert.

Basierend auf der morphologischen und flächenhaften Verteilung von Ubiquitin positiven, neuronalen, cytoplasmischen Einschlüssen (*ubiquitin positive neuronal cytoplasmic inclusions*: NCIs), neuronalen intranukleären Einschlüssen (*neuronal intranuclear inclusions*: NIIs) und dystrophischen Neuriten (*dystrophic neurites*: DNs) in betroffenen kortikalen Hirnregionen, kann man zwischen vier pathologischen Subtypen von FTLD-TDP unterscheiden (Neuman et al, 2006; Mackenzie et al, 2006):

- Subtyp 1 wird charakterisiert durch lange Neuriten und NCIs in den oberflächlichen kortikalen Schichten, nämlich des Cortex und des Hippocampus; Subtyp 1 wurde in der sporadischen und familiären Form von FTLD-TDP entdeckt.
- Subtyp 2 zeigt weit verbreitete NCIs in den oberflächlichen und tieferen kortikalen Schichten und in der Amygdala, v.a. in den sporadischen und familiären Formen von FTLD-TDP mit Mutationen auf Chromosom 9.
- Im Subtyp 3 findet man ringförmige NCIs und dystrophe Neuriten (DNs) mit intranukleären Einschlüssen (NIIs) v.a. in den oberflächlichen kortikalen Schichten. Beobachtet wurde diese Pathologie in den familiären Formen mit PGRN-Mutationen.
- Subtyp 4 ist nur in familiären Formen von FTLD-TDP mit einer Mutation in VCP zu finden. Hier findet man TDP-43-positive sowie Ubiquitin-positive Einschlüsse in den unteren kortikalen Schichten mit DNs und NIIs, aber nur

wenigen NCIs (Cairns et al, 2007).

III.4. Molekulare Struktur von TDP-43

III.4.1. Entdeckung von TDP-43

Das Protein TDP-43 wurde erstmals im Jahr 1995 im humanen Immunschwäche-Virus 1 (HIV-1) entdeckt, wo es als Tar (*transactivation response*)-DNA Bindeprotein agiert und die Transkription von viralen Genen reprimiert (Abb. 2) (Ou et al, 1995). TDP-43 inhibiert durch die Bindung an die Tar-DNA der HIV-1 LTR-Promotorregion (Position -18 bis +28) die Transkriptioninitiation von viralen Genen und hemmt zusätzlich die Bindung von wesentlichen Transkriptionsfaktoren (TBP) (Ou et al, 1995).

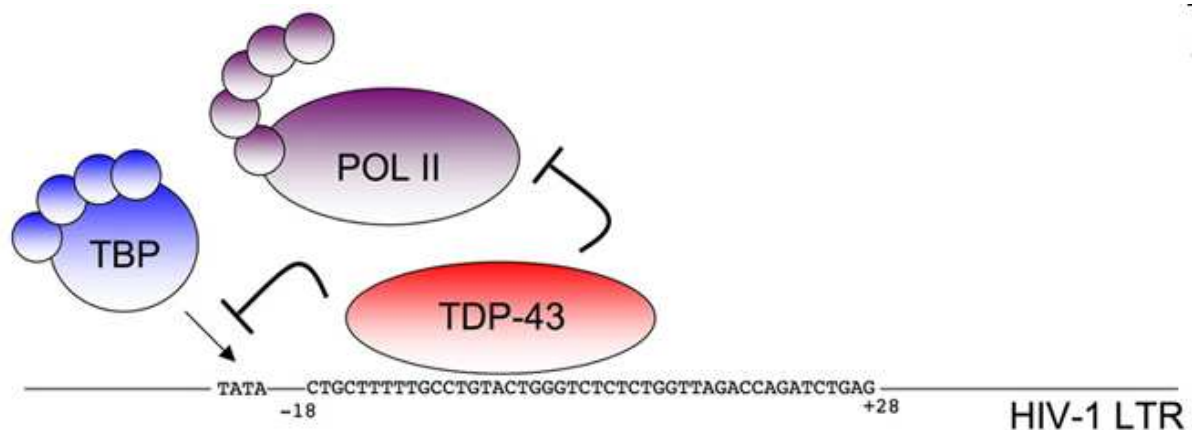


Abb. 2: TDP-43 als Faktor während der Transkriptions-Regulation. TDP-43 inhibiert den HIV-1 LTR Promotor durch die Bindung an das TATA-Element der TAR-DNA Region. Die Bindung von TDP-43 an dieses Element inhibiert die Anheftung von elementaren Transkriptionsfaktoren (TBP) und der DNA Polymerase II (Buratti und Baralle, 2008).

III.4.2. Genom- und Protein-Struktur von TDP-43

TDP-43 wird durch das Gen Tardbp kodiert, das sich im menschlichen Genom auf Chromosom 1p36.22 in telomerischer Richtung befindet, und besteht in seiner längsten Isoform aus 414 Aminosäuren. Durch alternatives Spleißen können beim

Menschen bis zu elf verschiedene Protein-Isoformen generiert werden (Wang et al, 2004). Bislang wurden jedoch nur Proteine mit ganzer Länge (43kDa) oder mit 28kDa in gesunden Menschen detektiert.

Das Gen *Tardbp* ist aus sechs Exons aufgebaut, wobei das erste Exon nicht translatiert wird (Abb. 3). Auffällig ist eine besonders lange 3'UTR-Region, auf die in späteren Kapiteln näher eingegangen wird. *Tardbp* ist zwischen Vertebraten und Invertebraten, insbesondere zwischen *H. sapiens*, *M. musculus*, *D. melanogaster* und *C. elegans* ein hoch konserviertes Kernprotein (Wang et al, 2004).

TDP43 ist in allen Geweben, einschließlich Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Muskel Haut und Gehirn ubiquitär exprimiert (Buratti et al, 2001) und besitzt vier charakteristische Domänen (Wang et al, 2004), nämlich die Nukleus Lokalisationssequenz (NLS), die Nukleus Export Sequenz (NES), zwei RNA Erkennungssequenzen (RRM1 und RRM2) und eine C-terminale Glycin-reiche Sequenz. TDP-43 gehört aufgrund seiner Homologie zur Familie der hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*).

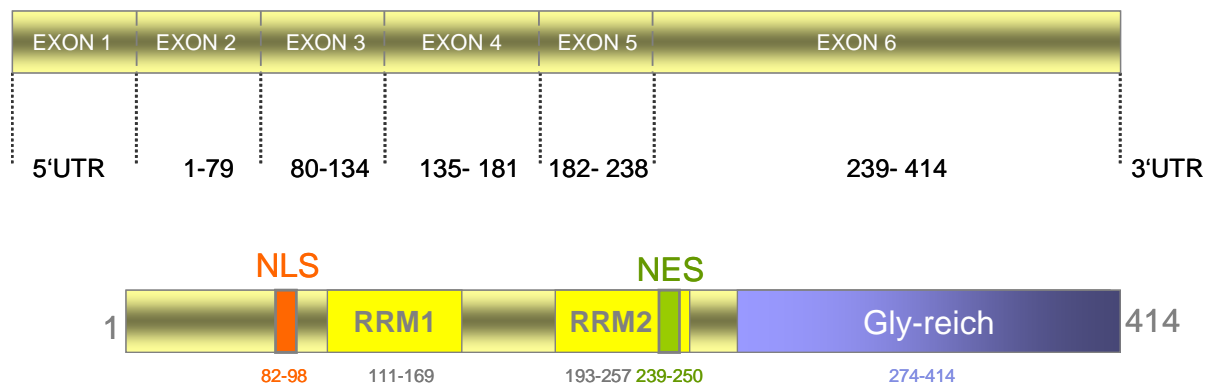


Abb. 3: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von TDP-43. Das Protein ist aus 414 Aminosäuren aufgebaut, die in vier charakteristische Regionen eingeteilt werden können; Die N-terminale Sequenz, die eine NLS (*nucleus localisation signal*) besitzt, bildet die erste Region. Die zwei folgenden Regionen werden von zwei RRM (*RNA recognition motifs*; RRM1 und RRM2), gebildet, wobei sich in der RRM2 eine charakteristische NES-Domäne (*nucleus export signal*) befindet. Die letzte Region wird durch ein Glycin-reiches, C-terminales Ende, das die Bindedomäne für Protei-Protein Interaktionen darstellt, gebildet. An Position 209 spaltet die Caspase-3 das Protein in verkürzte Fragmente. Im oberen Teil der schematischen Darstellung ist angegeben, welches Exon für die entsprechende Proteinsequenz kodiert. Auffällig ist Exon1, das komplett untranslatiert bleibt.

III.4.3. Die NLS-Domäne

Wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt beinhaltet TDP-43 ein nukleäres Lokalisations-Signal (NLS), das für den Transport von TDP-43 in den Nukleus verantwortlich ist. Endogenes TDP-43 ist überwiegend im Zellkern lokalisiert und fungiert als RNA-Transporter. Eine deletierte oder mutierte NLS-Domäne verhindert den nukleären Transport von TDP-43 (Winton et al, 2008). Daraufhin wird TDP-43 phosphoryliert und aggregiert präferiert im Cytoplasma. Dies kennzeichnet die Pathologie der neurodegenerativen Erkrankungen FTLD und ALS (Nonaka et al, 2009). Die NLS erstreckt sich von Aminosäure 82 bis 98 und hat einen zweiteiligen Aufbau (KRKXXXXXXXXXXXXKR) inklusive zwei basischer Motive (K82RK84=NLS1, K95VKR98=NLS2) (Winton et al, 2008). Diese für hnRNPs charakteristische Sequenz stellt eine universelle Abfolge von Aminosäuren dar, die von Importin α/β erkannt wird (Otis et al, 2006) und TDP-43 mit Importin β als Konjugat in den Kern wandert. Dass der nukleäre Transport von TDP-43 Importin β abhängig ist, wurde bereits gezeigt (Sato et al, 2009). Zusätzlich spielt der Import/Export-Faktor Ran-GDP/GTP, der an Importin bindet, eine entscheidende Rolle im Transportsystem von TDP-43, da dessen Mislokalisierung einen beträchtlichen Einfluss auf die Umverteilung und Aggregation von TDP-43 im Cytoplasma hat (Winton et al, 2008). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde erneut gezeigt, dass der Verlust des Zellkerntransports von TDP-43 zu cytoplasmatischer Akkumulation von TDP-43 führt. Nishimura et al (2010) berichtete, dass TDP-43 im Cytoplasma mit Karyopherin- α (KPNA) und Karyopherin- β 1 (KPNB1) assoziiert und als Komplex durch die kernmembranständige NUP62 (Nucleoporin62)-Pore in den Zellkern wandern, wo der TDP-43-Karyopherin-Komplex wieder dissoziiert. KPNA wird von dem Molekül CAS (*cellular apoptosis susceptibility*) in das Cytoplasma zurücktransportiert. Eine Fehlfunktion des Importmechanismus, der durch den Verlust des Importproteins Karyopherin β 1 oder CAS hervorgerufen werden kann, führt zu einer toxischen TDP-43 Anhäufung im Cytoplasma (*toxic-gain-of-function*) und zu einem Verlust von funktionellem TDP-43 im Kern (*nuclear-loss-of-function*). Da der Reimport in den Kern mit zunehmendem Alter schwächer wird und in sporadischen FTLD-TDP Patienten eine Reduktion von CAS in Neuronen gefunden wurde, könnte ein fehlerhafter Kerntransport eine mechanistische Rolle in der Pathogenese der TDP-43 Proteinopathie spielen (Nishimura et al, 2010).

III.4.4. NES und RRMs

Da sich TDP-43 zwischen Zellkern und Cytoplasma hin und her bewegt, konnte ein nukleäres Export-Signal (NES) identifiziert werden. Dieses erstreckt sich von Aminosäure 239 bis 250 und besitzt zwei hydrophobe Motive, die essentiell für den Export aus dem Zellkern sind. TDP-43 Δ NES führt zu nukleären Zelleinschlüssen, die sich aus mutiertem und endogenen TDP-43 zusammensetzen (Winton et al, 2008).

Da TDP-43 nicht nur DNA sondern auch RNA bindet, besitzt es zwei charakteristische RNA Erkennungsmotive (RRM1 und RRM2), ähnlich wie hnRNPs (Ding et al, 1999). Diese Bindemotive werden für den Transport und zur Stabilisierung von mRNA benötigt. RRM1 bindet sehr spezifisch an mRNA-Moleküle mit der Erkennungssequenz (UG)_n (Ayala et al, 2005); diese Interaktion fördert die Beweglichkeit und Mobilität von TDP-43 auf dem Weg aus den Zellkern (Ayala et al, 2008). Die genaue Funktion von RRM2 ist hingegen noch nicht bekannt. Allerdings wird eine Rolle in der Organisation der Chromatinstruktur vermutet (Ayala et al, 2008).

III.4.5. Die C-terminale Region

Das charakteristische C-terminale Motiv von TDP-43, die Glycin-reiche Sequenz, ist eine stark konservierte Region, die sich von Position 274 bis 414 erstreckt, und den spezifischen Bereich für Protein-Protein-Interaktionen, insbesondere mit hnRNPs (A1, A2/B1, C1/C2, A3) repräsentiert (Buratti et al, 2005; Kabashi et al, 2008). Zudem wurden in diesem Motiv fast ausschließlich ‚*missense*‘ Mutationen von Patienten der sporadischen und familiären ALS gefunden. Nur eine der bis dato bekannten 32 Mutationen liegt außerhalb dieses Abschnitts in der RRM1 Domäne. In Abbildung 4 sind die Aminosäure-Substitutionen der ALS und FTLD-TDP Mutationen einzeln aufgeführt.

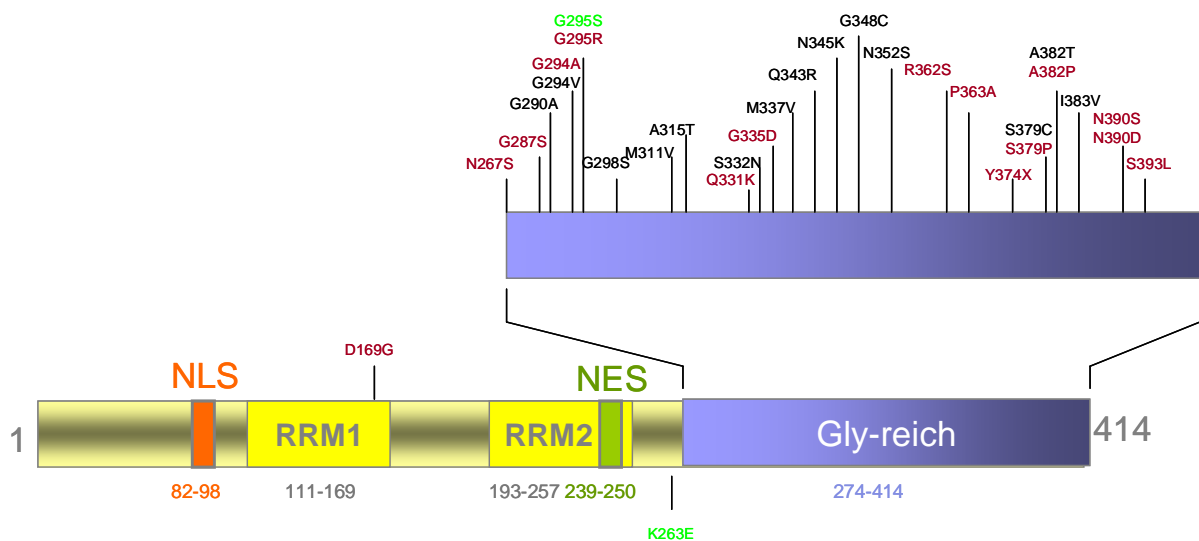


Abb. 4: TDP-43 Mutationen in ALS und FTLD-TDP. 29 der 30 identifizierten TDP Mutationen in ALS liegen in der Glycin-reichen Sequenz. Nur eine Mutation liegt außerhalb in der RRM1 Region. In rot sind diejenigen Mutationen gekennzeichnet, die in sporadischen ALS Fällen aufgetreten sind, in schwarz sind die familiären Fälle dargestellt. Die beiden erst kürzlich identifizierten FTLD-TDP Mutationen sind in grün dargestellt (Lys263Glu und Gly295Ser). Alle Mutationen sind *missense* Mutationen, bis auf die verkürzte Mutation Y374X (modifiziert nach Lagier-Tourenne and Cleveland, 2009, Chen-Plotkin, 2010).

Der auffällig häufige Austausch zwischen basischen und hydrophilen Aminosäuren führt wahrscheinlich zu einer Strukturveränderung und Fehlfaltung des Proteins. Dies hat zur Folge, dass neue Protein-Protein-Interaktionen entstehen können und eine Akkumulation von TDP-43 im Cytoplasma gefördert wird (Rutherford et al, 2008). Daraus resultiert ein *toxic-gain-of-function* von TDP-43 im Cytoplasma und ein *loss-of-function* von TDP-43 im Nukleus.

III.5. TDP-43 und seine Ähnlichkeit zu hnRNPs

HnRNPs sind prä-mRNA-bindende Proteine, die kleine Komponenten anderer Ribonukleoproteine (wie z.B. snRNP Komplexe) darstellen (Dreyfuss et al, 1993). Vor allem zu dem Molekül hnRNP A1 zeigt TDP-43 strukturelle und auch funktionelle Gemeinsamkeiten (Abb. 5). Wie TDP-43 so begleitet hnRNP A1 mRNAs von der aktiven Seite der Transkription zur aktiven Seite der Translation (Lervolino et al, 2001). Wie TDP-43 besitzt hnRNP A1 zwei RNA Erkennungssequenzen (RBDs), die eine hohe Affinität zu der consensus Sequenz UAGGGA/U haben, die wiederum der

5'- und 3'-Spleißseiten der Vertebraten ähneln (Burd und Dreyfuss, 1994). HnRNP A1 beeinflusst somit das Spleißen von prä-mRNA (Portman und Dreyfuss, 1994) und ist im mRNA Metabolismus involviert. Des weiteren ist hnRNP A1 am *shuttling* von mRNA aus dem Zellkern beteiligt. Der Transport von hnRNP A1 zurück in den Kern erfolgt wie bei TDP-43 durch Transportin-Proteine, die den Reimport initiieren. Das nukleo-cytoplasmatische *shuttling* von hnRNP A1 erfolgt über eine zweiteilige M9 Domäne, die den Export und Import in den Zellkern kontrolliert. Beim Protein TDP-43 hingegen sind zwei getrennte Domänen, die NLS Sequenz und die NES Sequenz, für den Export beziehungsweise Import verantwortlich. Die Beteiligung an der miRNA Prozessierung ist eine weitere Gemeinsamkeit von hnRNP A1 und TDP-43. Beide Proteine assoziieren an Drosha und sind an der nukleären Prozessierung von pre-miRNA beteiligt. HnRNP A1 ist ein *in trans* wirkender Hilfsfaktor von Drosha, der während der pri-miRNA-18a Prozessierung die Entspannung des pri-miRNA Stammes induziert und so die Spaltung zur prä-miRNA durch Drosha ermöglicht (Michlewski et al, 2008). Der genaue miRNA Prozessierungsverlauf, der durch TDP-43 ausgelöst wird ist noch unbekannt. Jedoch bindet TDP-43 an Drosha selbst (Strong, 2009) und löst dort eventuell eine Konformationsänderung aus, die Drosha positiv während der miRNA Prozessierung beeinflusst.



Abb. 5: Struktur des hnRNP A1 mit einer Größe von 320 Aminosäuren. RBD: RNA-Bindedomänen, RGG-Box: RNA-Bindemotiv in der Glycin-reichen Sequenz mit RGG Wiederholungen, M9: Nukleus Export und Import Sequenz (modifiziert nach Fukuda et al, 2002).

III.6. TDP-43 Dimerisation

TDP-43 tendiert aufgrund seiner Kristallstruktur zur Ausbildung von Homodimeren (Kuo et al, 2009). Die Schnittstelle eines TDP-Dimers ist die RRM2-Domäne, die im C-Terminus lokalisiert ist und sich zu thermostabilen Strukturen assemblieren kann. Zusätzlich zu dem C-terminalen Bereich ist ebenfalls der N-Terminus an der intermolekularen Interaktion beteiligt (Zhang et al, 2009). In humanen Stammzellen sowie in Gehirngeweben konnten TDP-43 Dimere mit einer molekularen Größe von 86 kDa nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass sich auch unter normalen physiologischen Bedingungen konstitutiv TDP-43 Dimere in sehr geringen Mengen in der Zelle bilden. Diese Dimere sind mutmaßlich der Auslöser für TDP-43 Aggregate unter pathologischen Bedingungen (Shiina et al, 2009).

III.7. TDP-43 Modifikationen

Die TDP-43 Proteinopathie ist unlängst nicht nur in FTLD-TDP und ALS beobachtet worden sondern auch in anderen, nicht unpopulären neurodegenerativen Erkrankungen. In Abbildung 6 sind weitere, verschiedene Krankheiten und ihre Präferenz zu TDP-43 Einschlüssen dargestellt. Der genaue Mechanismus, der die TDP-43 Aggregation und die Neurodegeneration auslöst, ist noch unklar.

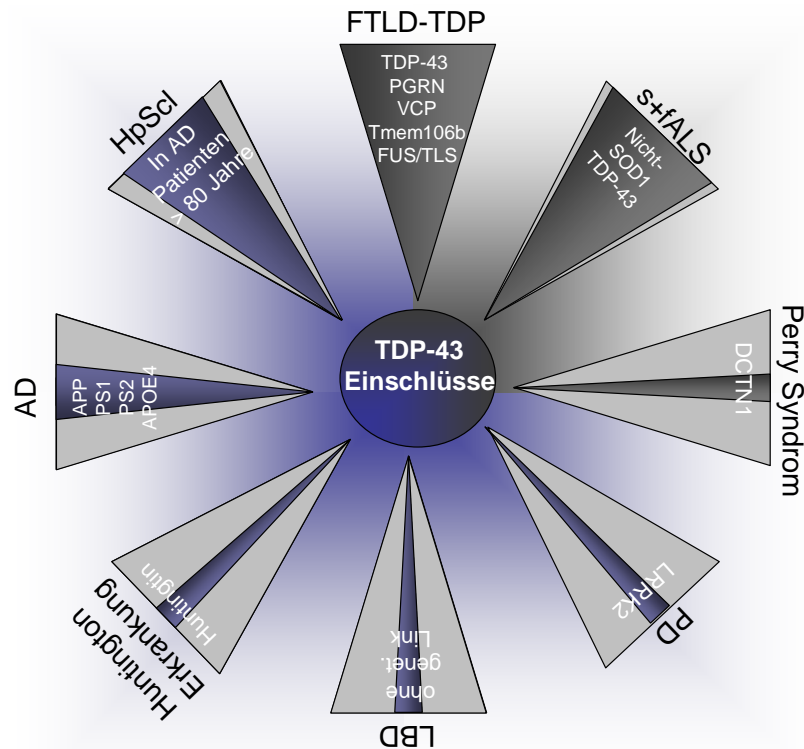


Abb. 6: TDP-43-Proteinopathie. Schematische Darstellung von Erkrankungen mit Genmutationen und TDP-43 Zelleinschlüssen. FTLD-TDP und ALS repräsentieren die Krankheiten mit dem größten Anteil an aggregiertem TDP43 (komplette und beinahe komplette Füllung der Pfeile). In allen FTLD-TDP Patienten sowie in 90 % der sporadischen und familiären ALS Patienten ohne SOD-1 Mutation konnten TDP-43 Einschlüsse gefunden werden. In ~20 % aller Alzheimer Patienten wurden ebenfalls TDP-43 Einschlüsse gefunden, sowie in 5 % der Parkinson Patienten mit LRRK2 Mutation und in Patienten des Perry Syndroms, einer seltenen Form der autosomal dominanten PD mit einer Mutation im Dynactin 1 Gen. Das Perry Syndrom, FTLD-TDP und ALS zeigen primär TDP-43 Pathologie (dunkelgrau markiert). In der Lewy-Body Erkrankung und in der Huntington Erkrankung wurde die TDP-43 Pathologie, ebenso wie in AD und PD, nur als sekundäres histopathologisches Merkmal entdeckt (blau markiert). In weiteren seltenen Erkrankungen (wie beispielsweise Hippocampale Sklerose, Guam-ALS oder Myopathie), die nur einen geringen Prozentsatz ausmachen, wurden ebenso TDP-43 Aggregate gefunden. In 70 % der Hippocampalen Sklerose-Fälle konnte TDP-43 in Zellaggregaten gefunden werden.

In Nishimoto et al. (2010) wird gezeigt, dass unter Apoptose TDP-43 durch Caspase-3 proteolytisch gespalten wird und verkürzte C-terminale Fragmente (CTFs) entstehen (Abb. 7). Bis dato wurden lediglich die zwei verkürzten CTFs mit 25kDa und 35kDa detektiert. Diese C-terminalen Fragmente, denen die NLS fehlt, tendieren in Patienten im Cytoplasma am C-Terminus zu hyperphosphorylieren und zu ubiquitinieren und bilden in ihrer modifizierten Form vermehrt cytoplasmatische Einschlüsse und Verklumpungen. 25kDa Fragmente bilden toxische cytoplasmatische Einschlüsse und 35kDa Fragmente wurden in Stress-Granula und in Aggresomen histologisch nachgewiesen (Igaz et al, 2009). Ein Abbau der

fehlerhaften Proteine durch Proteasomen konnte nicht beobachtet werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Aminosäuren S409/410 in 25kDa Fragmente mehr zum Phosphorylieren neigen als in ungespaltenen TDP-43-Molekülen (Zhang et al, 2009). Jedoch hat diese Phosphorylierung keinen Effekt auf die Aggregatsbildung und Toxizität von CTFs in der Zelle. Es wird eher vermutet, dass das 25kDa Fragment den Zelltod durch toxisches *gain-of-function*, also durch die Interferenz mit der normalen Zell-Aktivität, induziert (Zhang et al, 2009).

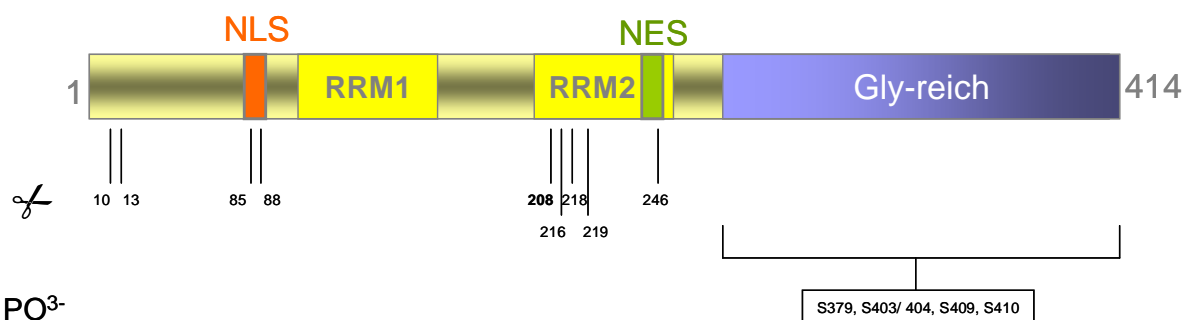


Abb. 7: Darstellung der Caspase-3 Schnittstellen (Igaz et al, 2009, Van Damme et al, 2005) **und C-terminaler Phosphorylierungspositionen** (Hasegawa et al, 2008) an Serin in TDP-43.

Zusätzlich wurden in FTLD-TDP Patienten verkürzte Isoformen von TDP-43 mit einer Größe von 25 und 35 kDa (p25iso und p35iso) unter normalen, nicht apoptotischen Bedingungen gefunden. Die Generierung dieser Isoformen erfolgt durch alternative Translationsstarts, die *downstream* des ursprünglichen Startcodons liegen: der Translationsstart von p35iso befindet sich an Met⁸⁵, der Translationsstart von p25iso erstreckt sich nicht ganz eindeutig von Position 160-169 (Igaz et al, 2009). Beide Formen des p35, sowohl die Isoform als auch das durch proteolytische Spaltung generierte CTF, wurden in Stress-Granula und Aggresomen nachgewiesen. Da in Stress-Granula RNA gelagert oder abgebaut wird (Anderson und Kedersha, 2009) und TDP-43 mRNA-Moleküle nachweislich bindet, deutet einiges darauf hin, dass TDP-43 eine entscheidende Rolle in der Translation, der Stabilität und im mRNA-Metabolismus spielt (Nishimoto et al, 2010). Wodurch und wieso diese Fragmente in Stress-Körnchen oder Aggresomen wandern, ist allerdings noch unklar (Igaz et al, 2009).

Es wurden auch hyperphosphorylierte und ubiquitinierte Formen des vollständigen TDP-43 entdeckt, die ebenfalls zum Aggregieren tendieren und nicht proteolytisch abgebaut werden. Diese Aggregate kommen in ALS Patienten durch die Mutationen

in der Glycin-reichen Sequenz zustande, da mutiertes TDP-43 wahrscheinlich vermehrt zur Aggregation tendiert als die Wildtyp-Form. Die Substitutionen am C-Terminus veranlassen durch neue Aminosäurereste eine verstärkte (Hyper-) Phosphorylierung von TDP-43 (Neumann et al, 2009).

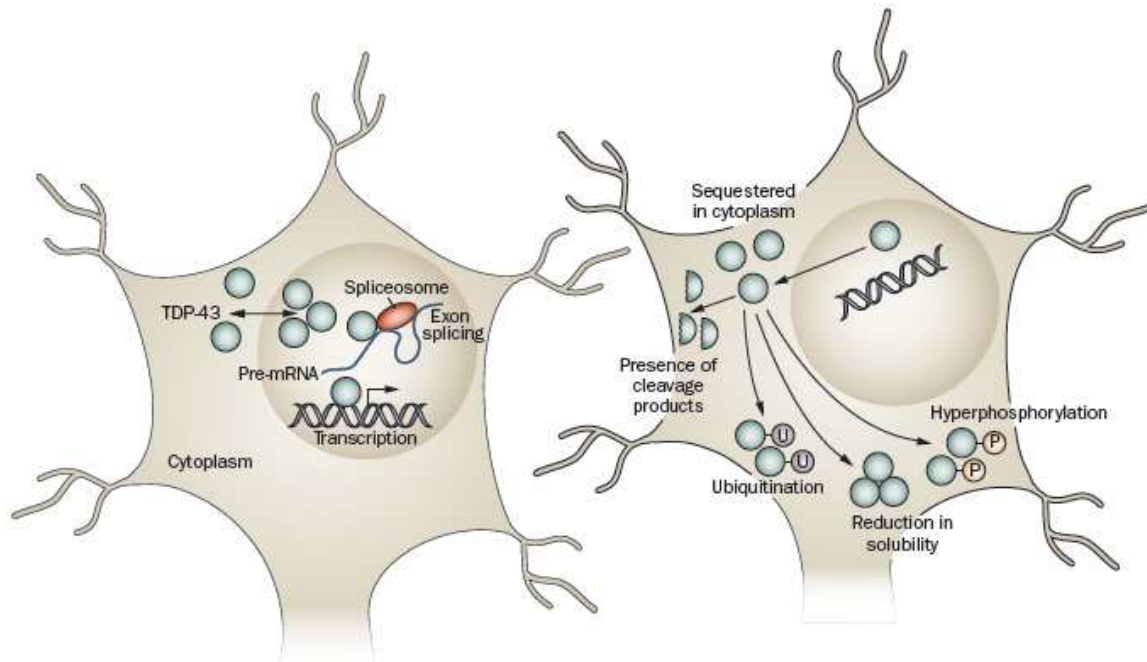


Abb. 8: Wildtypisches (links) und pathogenes TDP-43 (rechts) in einer Nervenzelle. Unter normalen, physiologischen Bedingungen hält sich TDP-43 trotz ständigem *shuttling* zwischen Kern und Cytoplasma zum größten Teil im Nukleus auf. Dort reguliert es auf transkriptionellem Level die Genexpression, ist an Spleißvorgängen beteiligt, besitzt mRNA stabilisierende Funktionen und spielt in der miRNA Biosynthese eine Rolle (links). Unter pathophysiologischen Bedingungen ist TDP-43 fast gänzlich aus dem Nukleus verschwunden und aggregiert im Cytoplasma. Pathogenes TDP-43 liegt (hyper-) phosphoryliert (P) und ubiquitiniert (U) sowie als C-terminales Fragment (CTF), das ebenfalls phosphoryliert (P) und ubiquitiniert (U) wird, im Cytoplasma vor. Pathogenes TDP-43 ist weniger löslich und tendiert entweder aufgrund eines *loss-of-function* Effekt im Zellkern oder eines toxischen *gain-of-function* Effekt im Nukleus die Zellphysiologie zu stören und Zelleinschlüsse zu bilden, die zum Zelltod (rechts) führen (nach Chen-Plotkin, 2010).

Zusätzlich wurden nicht nur Aggregate im Cytoplasma gefunden, sondern auch im Nukleus. Mutiertes TDP-43 neigt durch die fehlerhaften Aminosäuren zu einer Protein-Fehlfaltung und Konformationsänderung und verklumpt nicht nur im Cytoplasma, sondern auch im Zellkern, wo der überwiegende Aufenthaltsort von TDP-43 ist. Dies führt, ebenso wie die toxischen Einschlüsse im Cytoplasma, zum Zelltod. In Abbildung 8 sind alle Ereignisse, die während der TDP-43 Pathogenese in einer Zelle stattfinden können, visuell zusammengefasst.

III.8. Bekannte Funktionen von TDP-43

Das DNA- und RNA-Bindeprotein TDP-43 ist bezüglich seiner Funktion und seines Mechanismus noch weitgehend unerforscht. Die RRM1s und die Ähnlichkeit zu hnRNPs weisen jedoch darauf hin, dass TDP-43 ein Transportmolekül ist, das Boten-RNA aus dem Kern in das Cytoplasma transportiert. Zusätzlich ist die Bindung von TDP-43 an DNA-Sequenzen bekannt. Wie schon 1995 von Ou et al. gezeigt wurde, nimmt TDP-43 durch DNA-Bindung Einfluss auf die Regulation der HIV-1 Gene. Diese Transkriptionsregulation von TDP-43 wurde später noch in weiteren Genen entdeckt.

Die bekannten Funktionen oder Hinweise auf Funktionen von TDP-43 lassen sich mittlerweile in vier Kategorien einteilen:

- i) TDP-43 induziert alternatives Spleißen (Spleiß-Regulation)
- ii) TDP-43 reprimiert die Transkription
- iii) TDP-43 stabilisiert hnNFL mRNA
- iv) TDP-43 in Assoziation mit der RNA/DNA Maschinerie

i) TDP-43 induziert alternatives Spleißen von CFTR, apoA-II und SMN2

Das *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) Gen, das in seiner mutierten Form Verursacher der Zystischen Fibrose (CF) ist, besitzt am Ende von Intron 8 nahe der 3' Spleißerkennungssequenz eine polymorphe $[TG]_mT_n$ Sequenz (Buratti et al, 2001). In der prä-mRNA des CFTR Gens wird die einsträngige Dinucleotid-Abfolge $[UG]_mU_n$ von TDP-43 als Zielsequenz erkannt und über die konservierten aromatischen Reste der RRM1 Domäne gebunden (Buratti und Baralle, 2001). Die RRM2 Domäne sorgt für eine korrekte Komplexbildung. Durch die Interaktion zwischen $[UG]_mU_n$ und TDP-43 wird ein Spleißen zwischen Exon 8 und 9 verhindert; Dies hat das *skipping* von Exon 9 zur Folge und die Bildung eines nicht-funktionellen CFTR-Proteins, das Zystische Fibrose auslöst. Die Anzahl der $[TG]_mT_n$ Wiederholungen hat einen Einfluss auf die Bindeaffinität von TDP-43 und auf den Schweregrad der Krankheit. In der schwerwiegenden Form von CF wurden bis zu 13 $[TG]$ Wiederholungen gefunden, wohingegen in der milden Form von CF die polymorphe Sequenz nur aus 6-9 $[TG]$ besteht (Cooper et al, 2009) (Abb. 9). *In vitro*

Experimente mit Zellen von Patienten haben gezeigt, dass eine Herunterregulation von TDP-43 die reprimierende Funktion aufhebt und es zu einem normalen Spleißen zwischen Exon 8 und Exon 9 kommt (Ayala et al, 2006). Dies beweist die Spleiß-Repressor-Aktivität von endogenem TDP-43.

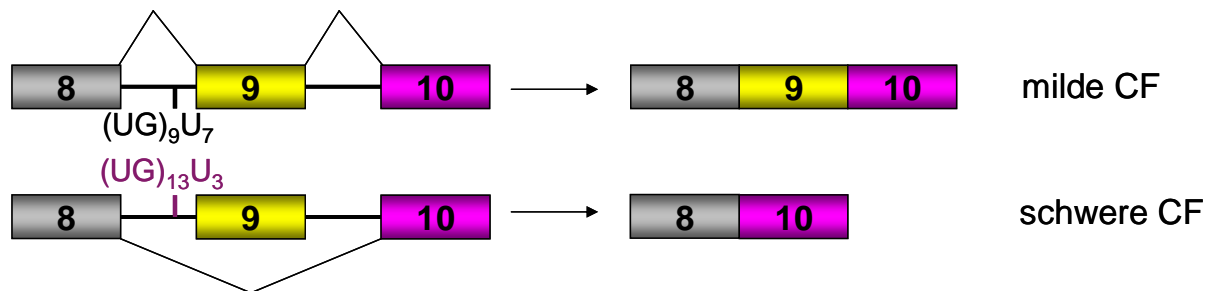


Abb. 9: Alternatives Spleißen von CFTR. TDP-43 bindet an die bekannte Zielsequenz $(UG)_{13}U_3$ und verhindert so in der schweren Form von Zystischer Fibrose (CF) das korrekte Spleißen zwischen Exon 8 und Exon 9. Somit geht der mRNA die Sequenz von Exon 9 verloren und das CFTR Protein kann funktionell nicht mehr wirken. In der milden Form von CF kann trotz der vorhandenen Zielsequenz $(UG)_mU_n$ Exon 9 richtig gespleißt werden, da die Wiederholungen der $(UG)_mU_n$ nicht häufig genug für eine TDP-43 Interaktion auftreten (modifiziert nach Cooper et al, 2009).

Eine ähnliche Funktion wie in CFTR wurde für TDP-43 während des Spleißvorgangs des humanen Apolipoprotein A-II (APOA-II) entdeckt, das am Lipidstoffwechsel beteiligt ist. Auch hier hat die Interaktion mit TDP-43 eine inhibierende Wirkung bezüglich der Spleiß-Regulation. Am 3' Ende von Intron 2 des ApoA-II Gens befindet sich eine auffällige $[GU]_{16}$ Sequenz, an die TDP-43 bindet und so das korrekte Spleißen von Intron 2 verhindert (Mercado et al, 2005). Jedoch kann der negative Effekt von TDP-43 durch *in cis* interagierende Faktoren aufgehoben werden: Die SR Proteine ASF/SF2 und SC35 binden spezifisch an einen Spleiß-Verstärker im Exon 3 (ESE) und induzieren somit das Spleißen zu Exon 3.

Neben der Aufgabe des Exon-Entfernens wurde auch die Exon-Aufnahme als weitere Funktion von TDP-43 entdeckt. Bose et al. (2008) zeigt, dass TDP-43 während des Spleißvorgangs der SMN2 prä-mRNA den Exon 7 Einbau fördert (Bose et al, 2008). Hierfür werden wiederum beide RRM-Motive benötigt; RRM1 bindet primär an die zu spleißende prä-mRNA während RRM2 für eine korrekte Komplexformation sorgt.

ii) TDP-43 reprimiert die Transkription: TDP-43 als transkriptioneller Regulator von SP-10 und CDK6

TDP-43 übernimmt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation von zelltypspezifischer Gentranskription. Das Spermium-Gen SP-10, das ein akrosomales Protein kodiert, wird von TDP-43 gewebs- und zeitspezifisch reguliert. In somatischen Zellen der Maus bewirkt TDP-43 durch die Bindung an den proximalen Promotor des SP-10 Gens einen *enhancer-blocking* Effekt und ist so in der SP-10 Insulator-Funktion impliziert. TDP-43 interagiert mit zwei [GT]₃ Motiven des SP-10 Promotor-Gegenstranges und reprimiert so *in cis* die Spermium-spezifische Genexpression (Acharya et al, 2007). Im Gegensatz dazu aktiviert TDP-43 jedoch auch die Expression von SP-10 in den Spermatozyten während der Spermatogenese (Abhyankar et al, 2007), indem es mit dem SP-10 Promotor assoziiert. Dadurch gewinnt TDP-43 neben der Insulator-Funktion zusätzlich eine aktivierende Funktion. Da TDP-43 die Transkription von SP-10 in somatischen Zellen reprimiert und in reifen Spermatozyten aktiviert, vermutet man, dass Spleißvarianten und posttranslationale Modifikationen von TDP-43 in den männlichen Keimbahnzellen die SP-10 Expression induzieren (Abhyankar et al, 2007).

Als ein weiteres Zielgen von TDP-43 wurde das *cyclin-dependent kinase 6* (Cdk6) Gen identifiziert. Die prä-mRNA von Cdk6 enthält wie das CFTR Gen multiple [GU]_n Wiederholungen, die Zielsequenzen von TDP-43 zur Gen-Regulation darstellen. *In vitro* Untersuchungen mit humanen Zellen haben gezeigt, dass der Verlust von TDP-43 zu einem Anstieg der Cdk6 Expression führt (Ayala et al, 2008). Somit inhibiert endogenes TDP-43 die Expression von Cdk6 durch die Rekrutierung von GU-reichen Transkripten. Außerdem wurde gezeigt, dass die Verminderung von TDP-43 in der Zelle durch hyperphosphoryliertes Retinoblastoma Protein (pRb) zu einem verändertem Zellzyklus und zu Apoptose führt (Ayala et al, 2008). Der Verlust der Membranstabilität des Zellkerns ist ebenfalls ein Effekt, der durch die Reduktion von funktionellem TDP-43 und der Misregulation von pRb verursacht wird (Ayala et al, 2008).

iii) TDP-43 stabilisiert hNFL mRNA

TDP-43 fungiert auch als Stabilisator von mRNA im Zusammenhang mit der leichten Isoform des humanen Neurofilament-Proteins hNFL. hNFL aggregiert in ALS Patienten primär zu Homopolymeren, die Vorläufer der Neurofilament-Aggregate darstellen. Es wurde gezeigt, dass TDP-43 die hNFL-mRNA im Nukleus durch eine direkte Interaktion mit dem 3'UTR stabilisiert und die Translokation ins Cytosol sowie die Translation im Cytoplasma reguliert (Strong et al, 2007). So fungiert TDP-43 in diesem Zusammenhang als ein *in cis* regulierendes Element mit stabilisierender Wirkung. Im Gegensatz dazu wurde in familiären ALS Fällen auch eine destabilisierende Wirkung auf hNFL gefunden, die durch die Assoziation mit mutiertem SOD1-Protein (mtSOD1) (Ge et al, 2005) oder dem 14-3-3 Protein (Ge et al, 2007) zustande kommt. Beide Proteine sind wie TDP-43 in ALS-Motoneuronen fehllokalisiert. Die cytoplasmatische Lokalisation von TDP-43 verhindert in der Pathogenese von ALS-Patienten die Stabilisierung von hNFL mRNA.

iv) TDP-43 in Assoziation mit der RNA/DNA Maschinerie

Als letzte bekannte Funktion von TDP-43 ist die Beeinflussung des RNA Metabolismus zu nennen. TDP-43 gehört zur Familie der hnRNPs und interagiert, wie in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt, über die RRM1-Domäne an RNA-Moleküle. Außerdem finden Interaktionen mit anderen hnRNPs (A1, A2/B1, C1/C2, A3) statt (Buratti et al, 2005). Dies deutet auf weitere Assoziationen mit RNAs hin.

Mittels eines *Global Proteomic Approach* wurden neue Interaktions-Kandidaten von TDP-43 ermittelt, die den mRNA Metabolismus regulieren. Die aufgedeckten Interaktions-Partner können prinzipiell in zwei Gruppen eingeteilt werden:

- Nukleäre Proteine, die den RNA Metabolismus im Kern steuern und
- Proteine, die die mRNA-Translation im Cytoplasma steuern (Abb. 10)

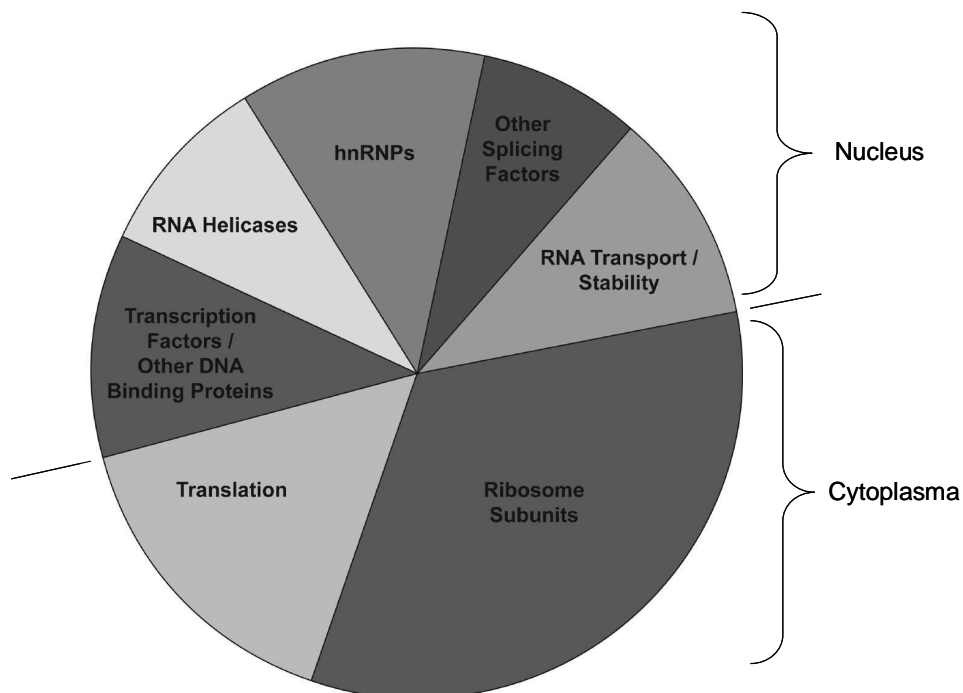


Abb. 10: Repräsentation der funktionellen Klassen der TDP-43 Interaktions-Proteine. Proteine, die an der Translationsmaschinerie und als Untereinheit an den Ribosomen wirken, interagieren im Cytoplasma mit TDP-43. Im Nukleus wurden Interaktionspartner gefunden, die am RNA-Transport und -Stabilität, am Spleißen und an der Gen-Expression (Transkriptionsfaktoren/DNA-Bindeproteine) beteiligt sind. Des weiterem interagiert TDP-43 mit RNA-Helikasen sowie mit hnRNPs (modifiziert nach Freibaum et al, 2010).

Kern-lokalisierte Proteine sind hnRNPs, RNA-Helikasen, Spleiß-Faktoren und Transkriptionsfaktoren. Somit wäre auch der DNA Metabolismus über TDP-43 gesteuert. Im Cytoplasma sind überwiegend ribosomale Untereinheiten und Translations-involvierte Proteine gefunden worden (Freibaum et al, 2010). Dies zeigt, dass TDP-43 ein nukleocytoplasmatisches *shuttling* Protein ist und funktionelle Aufgaben im Kern sowie im Cytoplasma erledigt, die alle mit RNA bzw. DNA Metabolismus in Verbindung gebracht werden können.

III.9. Die Maus als Interpret des menschlichen Genoms

III.9.1. Genom-Sequenzierungen

Es gibt verschiedene Strategien und Wege um das Genom des Menschen, die darin kodierten Gene und deren Funktion zu erforschen. Ein Meilenstein war die

Sequenzierung des gesamten menschlichen Genoms mit einer Größe von $3,27 \times 10^9$ bp im Jahr 2001 (Lander et al, 2001; Venter et al, 2001). Mittlerweile wurde von vielen weiteren Organismen, wie beispielsweise der Langschwanzmaus *Mus musculus* (Waterston et al, 2002), des Karpfenfisches *Danio rerio*, des Nematoden *Coenorhabditis elegans*, der Taufliege *Drosophila melanogaster* oder auch der Brassicaceae *Arabidopsis thaliana*, welche unter Genetikern gerne als Modellorganismen genutzt werden, das komplette Genom sequenziert. Nun gilt es, die einzelnen Gene, die im Menschen nur 3 % der gesamten Genomsequenz beanspruchen, zu charakterisieren und funktionell zu bestimmen. Im Jahr 2001 konnten bislang nur 15 % der insgesamt 25000 kartierten humanen Gene bezüglich ihrer Expression und Funktion charakterisiert werden (Stanford, Cohn und Cordes, 2001). Großes Interesse liegt vor allem in der Erforschung von sogenannten Krankheitsgenen. Hierfür hat man sich mit einem zusätzlichen Sequenzierprojekt zur Aufgabe gemacht, das Genom von 1000 verschiedenen Menschen komplett zu sequenzieren um einen möglichst detaillierten Katalog genetischer Variationen im menschlichen Genom zu erstellen. Damit wird es möglich sein, die winzigen Veränderungen im Erbgut aufzuspüren, die auch *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) genannt werden. Diese kleinen Unterschiede zwischen einzelnen Individuen liefern unter anderem Hinweise auf die Ursache vieler Krankheiten.

III.9.2. Die *gene trap* Mutagenese

Zur Analyse von Krankheits-assoziierten Proteinen werden bevorzugt Tiermodelle verwendet, um mit Hilfe von Expressionsstudien und phänotypischen Analysen an Mutanten pathogenen Proteinen gezielter auf die Spur zu kommen und letztendlich deren Signalwege zu entschlüsseln. Nur mit diesem Verständnis ist es möglich, Krankheiten gezielt zu behandeln oder sogar zu heilen.

Aufgrund der großen genetischen Ähnlichkeit und Physiologie zwischen Mensch und Maus liegt es Nahe, von Genfunktionen der Maus Rückschlüsse auf die humane Genfunktion zu ziehen. Es wurden *knock-out* Mausprojekte ins Leben gerufen, um mit der Erzeugung von Null-Allelen die Funktion des betroffenen Gens durch den entstandenen Phänotyp zu analysieren (Austin et al, 2004; Auwerx et al, 2004).

Die Methoden zur Genanalyse wurden erst im Laufe der letzten Jahre verbessert und optimiert. Mit neuen Technologien wurde im letzten Jahrzehnt die Genforschung

soweit vorangetrieben, dass bis heute ungefähr 60 % der Gene charakteristisch und funktionell bestimmt werden können. Eine Methode, die einen großen Teil zur funktionalen Genomanalyse beigetragen hat, ist die *gene trap* Technologie (Genfallen-Technologie), der die Methode der *reverse-Genetik* zugrunde liegt. Als Modellorganismus dient *Mus musculus*, der drei entscheidende Vorteile mit sich bringt:

- a) die Nähe zum menschlichen Genom; Mensch und Maus zeigen in ihrer Genomsequenz eine Homologie von ~ 93 %
- b) die einfache Handhabung in Haltung und Pflege sowie die geringe Generationszeit von 9 Wochen
- c) Die Verfügbarkeit von etablierten embryonalen Maus-Stammzellen, die eine individuelle und gezielte Manipulation des Genoms zulassen

Dem *gene trapping* liegt das Prinzip der zufälligen insertionalen Mutagenese zugrunde mit dem Vorteil gegenüber der *targeting trapping*, dass ein einziger *gene-trapping* Vektor verwendet werden kann, um 1000 von zufälligen Genen in murinen ES-Zellen zu mutieren und zu identifizieren (Zambrowicz et al, 1998; Wiles 2000). Bei diesem Vektor handelt es sich in der Regel um ein promotorloses Gen (daher auch Promotor *trap* genannt; diese Methode erlaubt die Selektion lediglich von aktiv-exprimierten Genen), das über einen Spleißakzeptor (SA) und ein Polyadenylierungssignal (pA) verfügt und mit einer Selektions- (Neomycin) und Reporter- (β -Galactosidase) Kasette ausgestattet ist. Die Insertion des *gene trap* Vektors in den intronischen Bereich eines endogenen Gens führt zu einem Transkriptionsabbruch wodurch eine Fusion-mRNA aus den 5' Exons des *getrappten* Gens einschließlich der β geo Insertion entsteht. Anders als bei zufälligen Mutagenese Strategien wie Chemikalien (Brown und Peters, 1996) oder Strahlung (You et al, 1997) kann die Insertionsstelle des Vektors mittels einer 5' bzw. 3' RACE (Scotto-Lavino et al, 2006) oder einer *splinkerette* PCR (Horn et al, 2007) genau lokalisiert werden. Aus der mRNA wird ein Fusionsprotein translatiert, das den internen Reporter β -Galactosidase enthält. Dieses Reporter gen gestattet die *in vivo* Expressionsanalyse des getrappten Gens in der entstehenden Mausmutante (Friedrich und Sariano, 1991). Ob diese Mausmutante eine phänotypische Ausprägung besitzt, ist bis zu diesem Zeitpunkt allerdings noch nicht ersichtlich.

Das *targeted trapping* hingegen ist eine hocheffektive Methode, um Gene, die in

embryonalen Stammzellen angeschaltet sind, zu inaktivieren (Friedel et al, 2005). Dieses Verfahren beruht auf homologer Rekombination (Bradley et al, 1992; Joyner, 1991). Mittels dieser Methodik kann beispielsweise eine promotorlose *gene trap* Kasette in einen vorbestimmten Locus eingefügt werden. Die Kasette muss dazu von genomischen Sequenzen des Ziellokus flankiert sein, die nicht den Promotor des zu mutierenden Gens enthalten. Das Reporter/Selektorprinzip findet nach wie vor Anwendung, was eine Selektion richtig getrappter Ereignisse ermöglicht.

Ein weiteres Potential des *gene trap* liegt in der Verwendung von konditionalen Mutationen. Diese ermöglichen das zeitliche und gewebsspezifische An- und Abschalten der Mutation durch die Verpaarung verschiedener Cre-Mauslinien. Hierfür werden sogenannten FLEx *gene trap* Vektoren verwendet (Schnütgen und Ghyselinck, 2005; Floss und Schnütgen, 2008), die Erkennungssequenzen für die jeweilige Cre- Rekombinase tragen.

Auch für diese vorliegende Arbeit wurde eine *gene trap* Maus aus der GGTC (*German Gene Trap Consortium*) ES-Zell-Datenbank generiert, die einen mutagenen Vektor im Intron 1 des gewünschten Gens, nämlich *Tardbp*, trägt. Diese Maus wurde geno- und phänotypisch charakterisiert, um ein *loss-of-function* des Proteins TDP-43 *in vivo* zu studieren, denn das vermeintlich multifunktionelle Protein TDP-43 kann bis dato in kein regulatorisches Netzwerk der Zellphysiologie eingegliedert werden und ist auch in seiner Funktion weitgehend unerforscht. Da TDP-43 in einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen und Myopathien involviert ist, hat man es sich zur Aufgabe gemacht, die physiologische(n) Rolle(n) dieses relativ unerforschten Proteins aufzudecken.

IV. Material

IV.1 Geräteliste

Analysewaage:	Sartorius, Basic 210-S
Autoklav:	ASS und Aigner, Typ 667-1ST
Eismaschine:	Scotsman, AF30
Elektrophorese-Netzgeräte:	E-C Apparatus Inc., EC 250-90, EC3000-90, Consort, E443
Entwicklermaschine für Röntgenfilme:	AGFA, Curix 60
Feinwaage:	Sartorius LC220S, LC6201S, BA210S
Gefrierschrank (-80°C):	Heraeus
Gefrierschrank (-20°C):	Liebherr
Geigerzählrohr:	Berthold, LB122
Geldokumentationsanlage:	Herolab
Gelelektrophoresekammern:	MWG Blotec; Peqlab
Glas-Homogenisator (2 ml):	Kimble/ Kontes
Glaspipetten:	Hirschmann
Heizblöcke:	Eppendorf, Thermomixer. 5463Comfort
Heizer/Magnetprüher:	IKA Labortechnik, RCT basic
Hybridisierungsöfen:	ThermoHybaid, Hybridizer HB100
Hybridisierungsröhren:	ThermoHybaid
Inkubatoren (Bakterien):	New Brunswick Scientific, Innova 4230
Inkubatoren (eukaryot. Zellen):	Heraeus
Isotopenzähler:	Scott - lab, Easicount 400
Kaltlichtquellen:	Leica, KL 1500; Zeiss, KL 2500 LCD
Kameras:	Zeiss, AxioCam MRC, HRC; Fuji, HC2000
Kryostat:	Microm, HM 560
Kühlschränke:	Liebherr

Laborglas:	Schott
Magnetrührer:	IKA Labortechnik, RCT basic
Mikroskope:	Zeiss Axioplan 2, Zeiss Stemi SV 6
Mikrotome:	Microm, HM 355S; Leica, RM2155
Mikrowelle:	Sharp
Neubauer Zählkammer:	Brand
Paraffin-Einbettvorrichtung:	Sakura, Tissue-TEK TEC
PCR-Geräte:	Eppendorf, Mastercycler Gradient
Photometer:	Eppendorf, Biophotometer
pH-Messgerät:	WTW, pH 538
Pipettierhilfe:	Brand, Accujet
Pipetten (10 µl-1 ml):	Gilson
Reinstwasser-Aufbereitungsanlage:	Millipore, MilliQ
Rotor Stator Dispergiergerät:	IKA Labortechnik, Ultraturrax
Schüttler:	Heidolph, Polymax 1040; Brand, Nutator
Sonifizierer:	Branson sonifier, cell disrupter B15
Sterilbank:	Nunc, Microflow 2
Stereolupen:	Leica, Wild M10, M8, MZ8, MZ Apo
Thermomixer:	Eppendorf S436, comfort
UV-DNA / RNA-Crosslinker:	Stratagene, UV Stratalinker 1800
Vibratom:	Microm HM650
Vortexer:	Scientific Industries, Vortex Genie
Wasserbäder:	Julabo U3; Lauda A100/E100
XCell SureLock™ Mini-Cell:	Invitrogen
Zentrifugen:	Sorvall, RC5C Plus (Rotoren: GSA, SA600); Heraeus, Biofuge pico/fresco, Varifuge 3.0R Hettich, Universal 30F, Eba 12

IV.2. Verbrauchsmaterialien

IV.2.1. Chemikalien

Agarose:	Biozym
Ammoniumacetat:	Merck
Ampicillin:	Sigma
Ampuwa:	Fresenius
APS (Ammoniumperoxodisulfat):	Sigma
Avidin-Biotin Peroxidase Komplex-System:	Pierce
β -Mercaptoethanol:	Sigma
Bacto-Agar:	Difco
Bacto-Pepton:	Difco
bbFGF:	Roche
Blockier-Lösung:	Roche
BMPurple AP Substrat:	Roche
Bromphenolblau:	Sigma
Calciumchlorid (CaCl ₂):	Sigma
Complete Mini (Proteaseinhibitoren):	Roche
DAB (3,3 Diaminobenzidine):	Sigma
Deoxycholat:	Sigma
Dithiotreitol (DTT):	Stratagene
DMSO (Dimethylsulfoxid):	Sigma
dNTP (100 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP):	MBI
Dulbecco's MEM:	Gibco
EDTA:	Sigma
EGTA:	Sigma
Eosin Y:	Sigma
Essigsäureanhydrid:	Merck
Ethanol abs.:	Merck
Ethidiumbromid:	ICN
Ethylenglykol:	Sigma
Ficoll 400:	Sigma
Fötale Kälberserum (FCS):	PAN Hybond

Gelatine:	Sigma
Glucose:	Sigma
Glycerin:	Sigma
Hämatoxylin (C ₁₆ H ₁₄ O ₆ •3H ₂ O):	Fluka
Hefeextrakt:	Difco
HEPES:	Gibco
Humanes Choriongonadotropin (βhCG):	Intervet
Hybridisierungs- Mix:	Ambion
Isopropanol:	Merck
Kaliumchlorid (KCl):	Merck
Kaliumferricyanid (K ₃ Fe(CN) ₆):	Sigma
Kaliumferrocyanid (K ₄ Fe(CN) ₆ •3H ₂ O):	Sigma
Kaliumhydroxid (KOH):	Sigma
Kaliumphosphat (KH ₂ PO ₄ •H ₂ O, K ₂ HPO ₄):	Roth
Kanamycin:	Sigma
Kresylviolet-Acetat:	Sigma
Levamisol:	Fluka
Lipofectamin 2000:	Invitrogen
MAB/2 %:	Roche
M2 Medium:	Sigma
Magermilchpulver:	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ •4H ₂ O):	Merck
Maleinsäure:	Sigma
MEMs nicht-essentielle Aminosäuren:	Gibco
Methanol:	Merck
Mineralöl:	Sigma
MOPS:	Sigma
Natriumacetat (NaOAc):	Sigma
Natriumchlorid (NaCl):	Sigma
Natriumcitrat:	Sigma
Natriumdesoxycholat:	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS):	Sigma
Natriumhydroxid (NaOH) :	Roth
Natriumphosphat (NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O, Na ₂ HPO ₄):	Sigma

Nonidet P40 (NP-40):	Fluka
Orange G:	Sigma
Paraformaldehyd:	Sigma
PBS (Zellkultur):	Gibco
α - ³² P-dCTP:	Amersham
Pen-Strep (100x):	Invitrogen
Pertex Mounting Medium:	HD Scientific
PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin):	Intervet
Poly-Mount:	Polysciences
Rapid-Hyb-Buffer:	Amersham
Rinderserumalbumin (BSA, 20 mg/ml):	MBI
Roti-Histol:	Roth
RNaseZap:	Sigma
RPMI 1640 Medium:	Gibco
Salzsäure (HCl):	Merck
Schafserum:	Gibco
Spermidin:	Sigma
Sucrose:	Sigma
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin):	Sigma
Triethanolamin:	Merck
Tris (Trizma-Base):	Sigma
Triton-X 100:	Biorad
Trizol:	Invitrogen
tRNA:	Roche
Trypsin (0.05x EDTA):	Gibco
Trypton BD:	Bioscience
Tween 20:	Sigma
Tyrode:	Sigma
VectaMount-Medium:	Vector Laboratories
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂):	Invitrogen
X-Gal:	Fermentas
Xylol:	Merck

IV.2.2. Enzyme

Calf intestinal alkaline phosphatase (CIP):	NEB
DNase I (RNase frei):	Roche
Klenow Fragment der DNA Polymerase I:	NEB
PCR Mastermix (2.5x):	5PRIME
Proteinase K:	Roche
Restriktionsenzyme:	Roche, MBI, NEB
RNA Polymerasen (T7, Sp6; 20 U/μl):	Roche
RNase A:	Serva
RNase H:	NEB
RNase Inhibitor:	Roche
SuperScript II:	Invitrogen
T4 DNA-Ligase:	Roche
Taq DNA Polymerase:	Qiagen, Invitrogen
Taqman Universal PCR Mastermix:	Applied Biosystem

IV.2.3. Kits

5'RACE System:	Invitrogen
BCA Protein Assay Kit:	Pierce
DNA Maxi Prep Kit:	Qiagen
DNA Mini Prep Kit:	Qiagen
ECL Detection Kit:	Amersham
Northern Max TM -Gly Kit:	Ambion
PCR Purification Kit:	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit:	Qiagen
Rediprime II DNA Labelling Kit:	Amersham
RNeasy Mini Kit:	Qiagen
Roti-Histo Kit II:	Roth
SuperScript II First- Strand Synthesis System:	Invitrogen
TOPO TA Cloning Kit:	Invitrogen
Wizard Genomic DNA Purification Kit:	Promega

IV.2.4. Sonstige Verbrauchsmaterialien

Autoradiographie-Filme:	Biomax, X-OMAT, Sigma
Autoradiographie-Emulsion:	Kodak, New Haven, USA
Bakterienkulturschalen, Einmalpipetten:	Greiner Labortechnik
Einmal- Handschuhe:	Kimberley- Clark
Einmalpipetten-Spitzen (10-1000 µl):	Starlab
Einbettgefäße:	Polysciences, Peel-A-Way
Entwickler (D-19), Fixierer:	Sigma
Elektroporationsküvetten (0.4 cm):	Biorad
Falcon-Gefäße, Kanülen, Spritzen:	Becton, Dickinson (Europe), Schubert & Weiss (München)
Filterpapier:	Whatman 3MM
Längenstandard, DNA-Gele (Smartladder):	Eurogentec
Längenstandard SeeBlue Plus2 <i>prestained</i> :	Invitrogen
Microspin S-300:	Amersham
NuPAGE Novex Bis-Tris Gel (4-12 %):	Invitrogen
Nylon Transfer Membran:	Amersham
Parafilm:	American National Can, USA
Pasteurpipetten:	Brand
PVDF Membran:	Pall Biosciences
Röntgen- Kassetten:	Amersham
Safe-Lock-Reaktionsgefäße (0.5/1.5/2.0 ml):	Eppendorf
Verbrauchsmaterial aller Art für die Zellkultur:	Nunc

IV.2.5. E. coli Stämme

DB3.1	Invitrogen
DH5α	Gibco Life Technologies
TOP10	Invitrogen

IV.2.6. Eukaryotische Zellen

E14	Embryonale murine Stammzellen
IDG3.2	Embryonale murine Stammzellen
TBV2	Embryonale murine Stammzellen
HEK293T	<i>human epithelial kidney</i> Fibroblastenzellen 293T
3T3	Immortalisierte Fibroblasten Zellen

IV.2.7. Mausstämme

C57Bl/6J	Inzucht Stamm (Jackson Laboratories)
C75Bl/6N	Inzucht Stamm (Jackson Laboratories, modifiziert)
CD1	Rückgekreuzter Stamm (Charles River)

V. Methoden

V.1. Klonierungstechniken basierend auf Desoxyribonukleinsäuren

V.1.1. Vektor-DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Vektor-DNA wird mit kommerziell erhältlichen Restriktionsenzymen verdaut. Pro μg zu spaltende DNA werden 1-10 U Enzym eingesetzt (eine Enzym-Einheit (U = unit) ist die Menge an Enzym, die für die Spaltung von 1 μg DNA innerhalb einer Stunde erforderlich ist). Die Reaktionsbedingungen werden entsprechend den Herstellerangaben eingestellt und der DNA-Restriktionsansatz wird für mindestens 1h bei der entsprechenden Aktivitätstemperatur des verwendeten Enzyms inkubiert.

V.1.2. Dephosphorylierung eines linearisierten Vektors

Um eine Religation des Vektors nach dem Verdau zu verhindern, werden die 5'-Enden vor der Aufreinigung dephosphoryliert. Hierfür wird der Vektor für ca. 30 min bei 37°C mit der *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIP), 1U/ μl behandelt. Der auf diese Weise für die Ligation vorbereitete Vektor wird über ein Agarosegel aufgereinigt.

V.1.3. Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Lineare, doppelsträngige DNA bewegt sich durch die Agarose-Matrix mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist. Auch die Konformation der DNA spielt eine Rolle, denn ringförmige superhelikale DNA wandert schneller als linearisierte („relaxierte“) DNA. Je nach Länge der zu erwartenden DNA Fragmente werden Agarose/1 x TAE-Gele mit einem Anteil von 0.5 % (gute Auftrennung großer Fragmente von 1-10 kb) bis zu 1.5% (gute Auftrennung kleiner Fragmente von 0.1-2 kb) Agarose verwendet. Zur sauberen

Auftrennung von sehr kleinen Fragmenten (100-200 bp) werden Gele mit einer Konzentration von bis zu 4 % Agarose verwendet. Die DNA-Fragmente werden durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids (0.5 µg/ml) bei UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm oder 312 nm sichtbar gemacht.

Die DNA-Proben werden mit einem entsprechenden Volumen an Ladepuffer versetzt und bei einer Spannung von 80-120 V bei maximaler Stromstärke aufgetrennt.

50 x TAE: 2 M Tris
 50 mM Essigsäure
 50 mM EDTA

6 x Ladepuffer: 0.2 % Bromphenolblau
 60 % Glycerol
 2 % SDS
 100 mM EDTA

V.1.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA wird an einem Photometer über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm ermittelt. Der Quotient von OD_{260}/OD_{280} ermittelt die Reinheit der Probe. Werte zwischen 1.8 – 2.0 zeugen von einer hohen Reinheit der gelösten DNA.

V.1.5. Aufreinigung der DNA

- Aufreinigung eines Vektors oder eines Fragmentes aus dem Agarosegel

Die Isolation der im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgt mit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Die gewünschte DNA-Bande wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten und dem Protokoll entsprechend aufgereinigt.

- Aufreinigung eines PCR-Produktes

PCR Produkte mit einer einzigen eindeutigen Größe werden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) gemäß Herstellerprotokoll aufgereinigt.

V.1.6. Ligation

Um zwei DNA-Enden kovalent zu verbinden, müssen mit Hilfe der Ligase Phosphodiesterbindungen verknüpft werden. Hierfür ist es nötig, dass mindestens ein DNA-Ende eine 5'-Phosphatgruppe trägt. Freie Enden entstehen durch den Verdau der DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen. Üblicherweise setzt man 50 ng Vektor und eine 3-fache Menge Insert ein. Die Ligation erfolgt über üN bei 16°C.

Ligationsansatz :

1.0 µl 10 x Ligasepuffer

x µl Vektor

x µl Fragment

0.4 µl T4 DNA-Ligase (5U/µl)

ad. 10 µl Aqua dest.

V.1.7. TOPO-TA Klonierung

Diese Methode wird hauptsächlich dazu benutzt, um PCR-Fragmente in einen TOPO Vektor zu klonieren und diesen dann zu sequenzieren. Laut Herstellerprotokoll werden 4 µl des PCR Ansatzes bzw. des gereinigten PCR Fragmentes zu dem TOPO-TA Vektor hinzugegeben und in etwa 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei findet die Ligation von Fragment und Vektor statt. Zur Vervielfältigung des Ligationsproduktes wird die Hälfte des Ligationsansatzes zu dem Bakterienstamm E.coli top10 One shot™ Zellen (DH5α) hinzugegeben. Die Transformation erfolgt nach Protokoll (Kapitel V.1.8).

V.1.8. Chemische Transformation von Bakterien

Bei dieser Art der Transformation wird die Zellwand von DH5 α Bakterien kurzzeitig durchlässig gemacht, so dass Vektoren in die Bakterien eindringen können. Diese werden dann im Zuge der Vermehrung der Bakterien vervielfältigt. Die Vektoren enthalten Resistenzgene für bestimmte Antibiotika, wodurch die transformierten Bakterien auf die Aufnahme des Plasmides hin selektiert werden können.

Zur chemischen Transformation wird ein Hitzeschock durchgeführt, um die Bakterienmembran permeabel zu machen. Dazu werden 200 μ l chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend werden ca. 50 ng DNA oder $\frac{1}{2}$ Ligationsansatz (5 μ l) zugegeben und vorsichtig unter die Bakterien gemischt. Nach einer Inkubation auf Eis für 20 min wird der Hitzeschock bei 42°C für 45 sek im Wasserbad durchgeführt. Danach werden 800 μ l S.O.C.-Medium zugegeben und die Bakterien für 1 Std bei 37°C geschüttelt. 50-200 μ l transformierte Bakterienlösung werden auf Selektionsplatten LB-Agar-Ampicillin (Amp) Platten (100 μ g/ml) oder LB-Agar-Kanamycin (Kan) (50 μ g/ml) ausplattiert.

LB-Agar: LB-Medium + 1.5 % Agar

V.1.9. Präparation von Vektor-DNA aus Bakterien

Die Extraktion von Vektor-DNA aus E.coli basiert auf der modifizierten "alkalischen Lyse" (Birnboim und Doly, 1979). Es werden je nach Menge der Bakterien suspension sog. „Mini-“ (5 ml Bakterienkultur) oder „Maxipreps“ (200 ml Bakterienkultur) ausgeführt. Dazu werden das QIAprep Miniprep Kit bzw. das Plasmid Maxiprep Kit verwendet.

V.1.10. Vervielfältigung von DNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

PCR-Reaktionsansatz:

10 µl 2.5 x Taq-Puffer (enthält Taq Polymerase)
10 ng Vektor-DNA-Template (~100-200 ng genomische DNA)
0.4 µM Primer 1 (Stammlösung 10 µM, bei -20°C)
0.4 µM Primer 2 (Stammlösung 10 µM, bei -20°C)
ad. 25 µl Aqua dest.

Um die Fragmentgröße der amplifizierten DNA zu bestimmen, wird die PCR-Reaktion auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA nach Bedarf weiterverwendet. Verwendete Primer und spezifische PCR-Bedingungen verschiedener Experimente sind im *Anhang* angegeben.

V.2. Extraktion von DNA aus Mausschwanzbiopsien

Die etwa 0.4 cm langen Schwanzspitzen werden in einem Eppendorf-Gefäß mit 600 µl Schwanz-Puffer und Proteinase K (1.5 mg/ml) versetzt. Der Ansatz wird bei 55°C üN geschüttelt. Am nächsten Tag werden 600 µl Phenol/Chloroform-Lösung (Roth) zugefügt und der Deckel des Eppendorf-Gefäßes mit Phase Lock Gel (Eppendorf) ausgefüllt. Nachdem die Mischung eine halbe Stunde lichtgeschützt bei RT geschüttelt wurde, wird für 10 min bei 16000 g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und die genomische DNA mit 600 µl Isopropanol ausgefällt. Es wird für 10 min bei 16000 g zentrifugiert um die DNA zu pelletieren. Anschließend wird das DNA-Pellet mit 600 µl 70 %igem EtOH gewaschen und erneut für 10 min bei 16000 g zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend ca. 20 min getrocknet. Die genomische DNA wird bei 65°C in 100 µl TE-Puffer oder Wasser gelöst. Für die Typisierung mit PCR werden 0.5 µl (etwa 100-200 ng) dieser Lösung eingesetzt, für die Typisierung per genomischen Southern-Blot 20 µl (8-10 µg).

Schwanz-Puffer: 50mM Tris-HCl, pH 8.0
 50 mM EDTA pH 8.0
 100 mM NaCl
 0.5 % SDS

Zusätzlich wurde zur genomischen DNA Gewinnung der Wizard Genomic DNA Purification Kit unter Herstelleranweisungen verwendet

V.3. Extraktion von DNA aus der Amnion-Hülle

Nach Präparation wird das extraembryonale Gewebe für 3-4 Std bzw. ün in 100 µl Schwanz-Puffer und Proteinase K (1.5 mg/ml) bei 55°C verdaut. Nachfolgend wird die genomische DNA durch Zugabe von 10 µl (1/10 Vol) 3 M Kaliumacetat und 300 µl 100 % EtOH gefällt. Nun wird für 10 min bei 16000 g zentrifugiert, 2x in 100 µl 70 % EtOH gewaschen und die DNA leicht getrocknet. Das Pellet wird in 30 µl TE-Puffer aufgenommen. Für eine PCR-Reaktion wird 1 µl DNA-Lösung eingesetzt.

V.4. Genomischer Southern-Blot

V.4.1. Restriktionsenzymatischer Verdau genomischer DNA

Die genomische DNA wird ün wie folgt verdaut:

10 µg genomische DNA
3 µl 10 x RE Puffer
0.3 µl RNaseA (Stammlösung 10 mg/ml, bei -20°C)
3 µl konzentriertes RE (40 U/µl)
2 µl Spermidin (Stammlösung 0.1 M, bei -20°C)
ad. 30 µl Aqua dest.

V.4.2. Auftrennung der genomischen DNA und Blotting

Die Auftrennung der DNA erfolgt ün im 0.8 % igen Agarose-TBE-Gel. Das Gel wird anschließend für 1h in Denaturierungslösung geschwenkt, wodurch die DNA denaturiert wird. Danach wird 1h neutralisiert.

Denaturierungslösung:	0.5 M NaOH 1.5 M NaCl
Neutralisierungslösung:	1.5 M NaCl 0.5 M Tris-HCl pH 7.5
20 x SSC:	3 M NaCl 0.3 M Natriumcitrat pH 7.0

Das Gel wird ün mit 20 x SSC geblottet. Hierfür wird eine Brücke mit Whatmanpapier in 20 x SSC getaucht um einen ständigen Flüssigkeitstransfer zu garantieren, worauf zunächst das Gel, darauf eine feuchte (2 x SSC) Hybridisation Hybond N+ Membran, zwei Lagen mit 2 x SSC angefeuchtetes 3MM Whatman und zuletzt mehrere Lagen Zellstoff gestapelt wird. Der Blot wird beschwert und am folgenden Tag abgebaut.

V.4.3. Herstellung einer DNA-Sonde durch radioaktive Markierung

Für die radioaktive Markierung (α -³²P-dCTP) eines DNA-Fragmentes wird das MegaprimeTM DNA-Labeling-System verwendet. Es wird 50-100 ng DNA eingesetzt. Nach der Markierung wird die Sonde über die S300 MicrospinTM Column aufgereinigt. Im Szintillator wird die Radioaktivität der Probe überprüft. Vor der eigentlichen Hybridisierung wird die Sonde für 5 min bei 95°C de naturiert.

V.4.4. Hybridisierung der genomischen DNA

Die Membran, auf der sich nach dem Blotten die genomische DNA befindet, wird in 2 x SSC gewaschen. Daraufhin wird die DNA mittels UV-Licht an die Membran gebunden (*cross-linking*). Anschließend wird die Membran in 10 ml *Rapid Hyb Buffer* mit der markierten DNA Sonde bei 65°C ün hybridisiert. Nach der Hybridisierung wird die Membran in 2 x SSC/0.1 % SDS bei RT oder mit 1 x SSC/0.1 % SDS bei 42°C mit zunehmender Stringenz nach Bedarf gewaschen. Ein Autoradiographie-Film wird für mindestens 24h auf dem Blot bei – 80°C exponiert.

V.5. Arbeiten mit Ribonukleinsäuren (RNA)

V.5.1. Präparation von Gesamt-RNA aus Gehirngewebe

Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgt nach Anleitung mit dem RNeasy Mini oder Midi Kit. Dazu wird das Gewebe zunächst gewogen um die Menge an Lysispuffer (RLT) anpassen zu können. Für 200 mg Gewebe werden 4 ml Puffer verwendet. Das Gewebe wird in diesem Puffer unter Verwendung eines Dispergiergerätes zerkleinert. Das Lysat wird entsprechend der Anleitung weiterbehandelt.

V.5.2. Überprüfung der Integrität der RNA mittels eines Agarose-Geles

Ein 1.5 % iges Gel wird mit 1 x Laufpuffer und 7.4 % Formaldehyd hergestellt. Die RNA-Proben werden mit 1 x Ladepuffer bei 65°C für 15 min erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von EtBr werden die Proben auf das mit 1 x Laufpuffer überschichtete Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt ün.

5 x Laufpuffer: 0.1 M MOPS pH 7.0
 40 mM Na-Acetat
 5 mM EDTA
 DEPC-Aqua dest.

10 x Ladepuffer: 50 % Glycerol
 1 mM EDTA pH 8.0
 0.25 % Bromphenolblau
 0.25 % Xylencyanol FF
 DEPC-Aqua dest.

V.5.3. cDNA Synthese mittels reverser Transkriptase

Die cDNA Synthese aus gewonnener RNA erfolgt mittels des *SuperScript II First-Strand Synthesis* System laut Herstellerbedingungen. Für eine cDNA-Umschreibung wird 2 µg RNA eingesetzt. Die erhaltene cDNA kann bei -20°C gelagert werden.

V.5.4. Quantitative RT-PCR

Für die quantitative real-time (RT) PCR wird die cDNA 1:100 verdünnt und mit 2x TaqMan Universal Mastermix, 900 nM Primer-*forward*, 900 nM Primer-*reverse* und mit 200 nM FAM gelabelte Probe versetzt um WT Tardbp Transkripte oder miR330 Transkripte zu detektieren (Gesamtvolumen der Reaktion 20µl). Zum Normalisieren dienen entweder β-Actin- (Maus ACTB endogene Kontrolle von Applied Biosystem) oder Nestin- spezifische Primer. Das Expressionslevel von Tardbp oder miR330 wird pro Experiment in triple-Ansätzen gemessen. Mit dem ABI 7900 Q-PCR Gerät werden 40 Zyklen mit jeweils 94°C Denaturierungstemperatur und 62°C Annealing- bzw. Synthesetemperatur gefahren.

V.5.5. 5`RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Für die 5`RACE wird das 5`RACE System von Invitrogen verwendet und nach Herstellerempfehlung durchgeführt. Die erhaltenen PCR Produkte werden mit einem PCR Aufreinigungs-Kit gereinigt und in den pCRII TOPO Vector kloniert. Mit den kommerziellen Primern M13-*forward* und M13-*reverse* werden die Fragmente sequenziert und anschließend analysiert.

V.6. Proteinbiochemische Methoden

V.6.1. Proteingewinnung aus Zellen oder Gehirngewebe

Aufgearbeitete Zellen oder präpariertes Hirngewebe werden in 200 bzw. 600 µl RIPA Puffer zerkleinert und gelöst und für 15 min auf Eis inkubiert. Um die Zelltrümmer zu pelletieren, wird für 10-30 min bei 16000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthält das gelöste Protein, das zur Aufbewahrung aliquotiert und bei -80°C gelagert wird.

RIPA Puffer: 150 mM NaCl
 1 % NP-40
 0.5 % DOC (Deoxycholat)
 0.1 % SDS
 50 mM Tris pH 8.0
 Complete Mini Tabs (Protease Inhibitor- erst kurz vor Gebrauch zugeben)

V.6.2. Bestimmung der Protein Konzentration

Mit Hilfe des Bicinchonic Acid (BCA) Protein Assay Reagent Kit wird die Gesamt-Proteinkonzentration nach Angaben des Herstellers bestimmt. Abhängig von der Konzentration können Proteine alkalisches Cu(II) zu Cu(I) reduzieren. BCA ist ein chromogenes Reagenz für Cu(I), da es mit dessen Verbindung einen violetten Komplex ausbilden kann, der bei einer Wellenlänge von 562nm sein Absorptionsmaximum besitzt. Diese Absorption ist direkt proportional zur Proteinkonzentration, so dass durch eine quantitative photometrische Messung der Proteinlösung, die mit einem Proteinstandard verglichen wird, die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden kann.

V.6.3. Auftrennung von Proteinen auf denaturierendem SDS-Polyacrylamid Gel und Western Blot

Mit dieser von Laemmli (1970) beschriebenen Methode werden Proteine ihrer Molmasse entsprechend aufgetrennt. Es werden denaturierende Gele verwendet, die aus einem sog. Sammel- und Trenngel bestehen. Die Proben werden zunächst in dem oberen, 4 %igen Sammelgel ankonzentriert und werden dann im hier verwendeten 12 %igen Trenngel entsprechend ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Das Gel wird in dem Kammer-System XCell SureLock™ Mini-Cell auf Spannung gelegt (ca. 1 Std bei 200 V) und anschließend im Nassverfahren (XCell II™ Blot Module) 1 Std bei 30 V und einer Stromstärke von 170 mA auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach dem Blotten wird die Membran aus dem Kammer-System genommen und kurz in TBS geschwenkt. Anschließend wird die Membran für 1 Std bei RT in 5 % Magermilch in TBS-T geblockt. Es folgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper (üN bei 4°C) in 5 % Magermilchpulver/TBS-T. Danach werden unspezifische Antikörperbindungen in 3 Waschschritten á 15 min in TBS-T entfernt. Daraufhin wird die Membran für 1 Std mit dem zweiten Antikörper (IgG-Peroxidase gekoppelt) bei RT in 5 % Magermilchpulver/TBS-T inkubiert. Es wird erneut 3 x 15 min in TBS-T gewaschen. Zur Detektion der Banden wird eine 1:1 Mischung der beiden Substrate des ECL Substrates hergestellt und die Membran damit benetzt. Die entstandene Lumineszenz wird mit einem lichtempfindlichen Autoradiographie-Film exponiert.

6x Laemmli-Puffer: 300 mM Tris-HCl pH 6.8
 60 % Glycerol
 12 % SDS
 600 mM β -Mercaptoethanol
 0.6 % Bromphenolblau

TBS: 137 mM NaCl
 30 mM Tris-Cl pH 7.6

TBS-T: TBS mit 0.1 % Tween 20

Im Western Blot verwendete Antikörper:

- Primäre Antikörper:
- *monoclonal rat anti-TDP-43 (clone2H4)* (entwickelt von M. Neumann und E. Kremmer)
 - *mouse anti-GAPDH* (Chemicon)
 - *polyclonal rabbit anti-GFP* (Abcam)
- Sekundäre Antikörper:
- *alkaline phosphatase conjugated anti-mouse or anti-rat IgG* (Dako)
 - *alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit IgG* (Abcam)
- Protein-Marker: *SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard* (Invitrogen)

V.7. Embryonale Stammzellkultur

V.7.1. Kultivierung von ES- oder Fibroblasten-Zellen

Embryonale Stamm (ES)-Zellen (TBV2 oder IDG3.2) oder Fibroblasten (HEK293T, 3T3) werden bei 37°C in einer 5 % igen CO₂ Atmosphäre kultiviert. Als Medium wird DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) verwendet. Haben die Zellen etwa 70-80 % ige Konfluenz erreicht, werden sie auf drei (ES-Zellen) bzw. sechs (Fibroblasten-Zellen) höhere Zellkultur-Platten passagiert. Die Zellen werden hierfür mit Trypsin für 4 min bei 37°C inkubiert. Dies ermöglicht ein leichtes Ablösen der Zellen. Sollen die Zellen in einer bestimmten Zelldichte ausplattiert werden, wird deren Anzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

V.7.2. Transiente Transfektion von ES- oder HEK293T-Zellen

Bei der transienten Transfektion von Zellen wird die DNA nicht stabil in das Genom der Zelle eingebaut sondern bleibt episomal bestehen. Für die Transfektion wird

Lipofectamin 2000 verwendet. Für eine 3cm \varnothing Zellkulturschale wird 1 μ g DNA eingesetzt. Die Prozedur erfolgt nach Herstellerprotokoll.

V.8. Tierhaltung

Alle Mäuse wurden in einem geschlossenen System gemäß den Bestimmungen der Tierschutzverordnung gehalten und gezüchtet. Futter und Wasser standen den Mäusen zur freien Verfügung. Die Temperatur betrug 22 \pm 2°C und die relative Luftfeuchtigkeit 55 \pm 5 %. Eine automatische Zeitschaltuhr regelte die Tag- und Nachtphasen, die jeweils 12 Stunden betragen. Mäuse aus der Mutantenzucht wurden drei Wochen nach der Geburt von den Eltern abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt. Die Markierung der Mäuse erfolgte durch Ohrlochung.

V.9. Blastozysten-Isolation

Zum Herauswachsen des Trophoblasten aller drei Genotypen der Linie D045A10 *in vitro* war die Präparation von Blastozysten notwendig. Dazu werden heterozygote Weibchen mit heterozygoten Männchen der F1 oder F2 Generation untereinander verpaart und der Uterus 3.5 Tage nach der Befruchtung isoliert. Auf beiden Seiten des Uterus wird ein Kreuzschnitt gesetzt. Durch die so entstandenen Öffnungen wird der Uterus mit Hilfe einer Kanüle und M2 Medium gespült (Hogan et al, 1994). Die einzelnen Blastozysten werden unter dem Mikroskop identifiziert und in einer 48-well Schale kultiviert.

V.9.1. Bestimmung embryonaler Stadien

Als Grundlage der Beurteilung der Entwicklungsstadien dient sowohl das Alter der Embryonen in gezählten Tagen (E) als auch die von Theiler eingeführten Einstufungskriterien (TS) (Theiler, 1989). Die Einstufung der Embryonen während der Gastrulation erfolgt nach Downs und Davies (1993).

V.10. Tetraploide Aggregation

Das tetraploide Aggregations-Experiment wird, wie in Nagy und Rossant (1993) beschrieben, durchgeführt. Die Empfänger-Maus wird am Embryonaltag 8.5 bzw. 9.5 geopfert und präparierte Embryonen werden für die genotypische Analyse lysiert. Homozygote Embryonen werden mit einer triple-PCR und mit dem gesonderten WT-Primer-Paar identifiziert.

V.11. Morphologische Techniken

V.11.1. Perfusion von adulten Mäusen

Mäuse werden intrakardial mit einer 4 % igen PFA Lösung perfundiert. Dazu werden die Tiere zunächst mit CO₂ getötet. Dann wird der Brustkorb mit einer Schere eröffnet und eine Injektionskanüle in die linke Herzkammer eingeführt. Die rechte Herzkammer wird mit einem Schnitt geöffnet, so dass durch eine Kanüle mittels einer Umwälzpumpe 4 % iges PFA ausgehend vom linken Ventrikel durch den ganzen Körper gespült werden kann, bevor es aus dem rechten Ventrikel wieder austritt. Zunächst wird das Blut mit 1x PBS für 1-2 min aus dem Körper gespült und dann wird für 5 min mit PFA perfundiert. Das Gehirn bzw. die benötigten Organe sowie das Rückenmark werden herauspräpariert. Das Gewebe wird üN bei 4°C in 4 % PFA nachfixiert.

1 x PBS-Puffer (pH 7.4): 137 mM NaCl
2.7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
2 mM KH₂PO₄

20 % PFA: Das Paraformaldehyd (PFA) wird bei 70°C in 1 x PBS gelöst. Da PFA in PBS schwer löslich ist, wird 1/10 Vol 5 M NaOH (oder NaOH Plätzchen) zur Erhöhung des pH-Wertes hinzugegeben. Nach der vollständigen Lösung des

PFA muss der pH-Wert wieder mit HCl auf pH 7.4 eingestellt werden. 20 % iges PFA wird bei -20°C gelagert.

V.11.2. Schneiden von Embryonen, adulten Gehirnen und Rückenmark mit dem Mikrotom

Die Embryonen des gewünschten Alters werden mit Hilfe von Feinpinzetten (FST) unter Verwendung eines Binokulars aus dem Uterus präpariert. Die Dottersäcke werden für die Genotypisierung aufbewahrt. Gehirn und Rückenmark wird nach der Freilegung von Schädelknochen und Wirbelsäule heraus präpariert. Die präparierten Embryonen werden in 4 % PFA/PBS je nach Entwicklungsstadium für 30 min bis 24 Std bei 4°C nachfixiert. Anschließend werden die Präparate durch die aufsteigende EtOH-Reihe dehydriert (70 %, 96 %, 100 %) und in Rotihistol jeweils für 3 min (E7.5 und E8.5), 10 min (E9.5-10.5) oder 30 min (E11.5) geklärt. Das Paraffin (Polysciences Inc., Schmelztemperatur 65°C) wird währenddessen im Ofen bei 65°C geschmolzen. Die Präparate werden daraufhin für 24-48 Std in Paraffin gegeben und in Ausgussformen (Merck) eingebettet. Adulte Gehirne und Rückenmark werden nach der Perfusion üN in 4 % PFA nachfixiert und am nächsten Tag dehydriert (jeweils 1-2 Std. in 70 %, 96 %, 100 % EtOH und Rotihistol). Gehirn- und Rückenmarkpräparate werden analog zu den Embryonen eingebettet. Nach der Aushärtung werden die Embryonen bzw. die adulten Gehirne bzw. das Rückenmark auf den Trägern, die im Mikrotom eingespannt werden, plaziert und am Mikrotom in einer Stärke von 8 µm geschnitten. Die Schnitte werden auf Objektträger (Superfrost Plus, Menzel GmbH) im Wasserbad aufgezogen und üN bei 37°C getrocknet. Anschließend werden die Schnitte bei 4°C bis zur immunhistochemischen Analyse gelagert.

V.12. Immunhistochemie

V.12.1. Immunhistochemische Färbung auf Paraffin Schnitten

Zunächst wird das Gewebe von Paraffin befreit, indem es 2 x 20 min in Rotihistol inkubiert wird. Anschließend wird das Gewebe rehydriert (2 x 5 min 100 % EtOH, 2 x 5 min 96 % EtOH, 2 x 5 min 70 % EtOH). Danach werden die Objektträger für 10 min in Aqua dest. und 3 min in 0.01 M Natriumcitrat gewaschen. Es folgt eine Hitzebehandlung der Schnitte um die Proteine zu denaturieren und damit die Antigene für den Antikörper besser zugänglich zu machen. Die Schnitte werden dazu für 5 min in der Mikrowelle gekocht und anschließend wird die Küvette für 20 min bei RT zum abkühlen stehen gelassen. Es wird 2 x 5 min in 1 x PBS gewaschen und zur Zerstörung endogener Peroxidasen wird für 5 min in 0.1 % H₂O₂ in 1x PBS inkubiert. Es wird erneut 2 x 5 min in 1 x PBS gewaschen. Anschließend wird 1 Std in Blockier-Lösung (10 % FCS, 0.05 % Triton-X in PBS) geblockt und die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgt in 10 % FCS/1x PBS bei 4°C. Am nächsten Tag wird 3 x 5 min in 1x PBS gewaschen und für 1 Std mit dem zweiten Antikörper in 10 % FCS/1x PBS (1:300 verdünnt) bei RT inkubiert. Es wird erneut 3 x 5 min in 1x PBS gewaschen. Es folgt die Inkubation mit ABC-Lösung (1:300 in 10 % FCS in PBS) für 30 min. Anschließend wird 2 x 5 min in 1x PBS gewaschen, gefolgt von 5 min in 0.1 M Tris-HCl. Die eigentliche Reaktion erfolgt mit dem DAB-Substrat für 10-30 min, bis eine spezifische Färbung der gewünschten Bereiche eingetreten ist. Danach wird 2 x 5 min in 1x PBS gewaschen. Die Schnitte werden dehydriert (2 x 5 min jeweils in 70 %, 96 % und 100 % EtOH), mit Rotihistol behandelt und mit RotiHistokit eingedeckelt. Bei Fluoreszenz-Färbungen entfallen die Schritte der ABC-Anwendung und der DAB-Reaktion. Die fluoreszierenden Schnitte werden mit Poly-Mount eingedeckelt.

DAB-Stocklösung: 1 g/100 ml Tris-HCl (0.05 M) pH 7.6

Antikörper:

Primär-Antikörper: -*polyclonal rabbit anti-Tardbp* (ProteintechGroup)
-Clone G-A-5 *mouse anti-GFAP* (Sigma Chemie GmbH)

- mouse anti-GST-π* (BD Deisenhofen)
- mouse anti-DCX* (Santa Cruz Biotechnology)
- mouse anti-Calbindin* (Swant, Bellinzona)
- mouse anti-NeuN* (Millipore)
- polyclonal rabbit anti-choline Acetyltransferase* (Abcam)

- Sekundär-Antikörper:
- Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG* (H+L) (Dianova)
 - Alexa594 conjugated rabbit anti mouse* (Jackson L.)
 - Alexa488 conjugated donkey anti mouse* (Jackson L.)
 - Alexa350 conjugated donkey anti mouse* (Jackson L.)

V.12.2. β-Gal Färbung

Es wurden verschiedene Embryonalstadien als auch Gehirne mit X-Gal angefärbt. Embryonen werden in 1 x PBS sezirt. Danach werden sie für 10-20 min in der Fixierlösung fixiert. Zum Waschen werden die anzufärbenden Gewebe zweimal 15 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend in X-Gal Färbelösung angefärbt. Zum Abschluß der Färbereaktion wird dreimal für 5-10 min in Waschpuffer gewaschen. Die Embryonen werden üN in 4 % PFA/1x PBS nachfixiert und können auch darin gelagert werden.

- Fixierlösung:
- 4 % PFA/1x M PBS pH 7.4
 - 5 mM EGTA (0.1 M Stamm-Lösung)
 - 10 mM MgCl₂ (1 M Stamm-Lösung)
 - verdünnt in 1x PBS pH 7.4

- Wasch-Puffer:
- 2 mM MgCl₂
 - 0.01 % Deoxycholol (5 % Stamm-Lösung)
 - 0.02 % NP40 (10 % Stamm-Lösung)
 - verdünnt in 1x PBS pH 7.4

- X-Gal Färbelösung:
- 5 mM Kaliumferrocyanid (0.5 M Stamm-Lösung)
 - 5 mM Kaliumferricyanid (0.5 M Stamm-Lösung)

X-Gal (1 mg/ml)
verdünnt in Wasch-Puffer

V.12.3. H&E Färbung

Durch Hämatoxylin werden die Zellkerne und basischen Bestandteile des Cytoplasma blau, durch Eosin das übrige Zytoplasma, sowie das Binde- und Muskelgewebe rot gefärbt. Die Methode der H&E Färbung wird in Glasbehältern durchgeführt. In die einzelnen Behältnisse werden die entsprechenden Agenzien gefüllt und die Objektträger in einem Schlitten der Reihe nach wie folgt weitergeführt: Nach einer zweimaligen Einwirkzeit von 5 min in Rotihistol folgt eine absteigende Ethanolreihe zur Rehydrierung der Proben mit anschließendem kurzen Schwenken in Hämatoxylin. Das Baden in Leitungswasser der Proben bringt die blaue Farbe der Kerne zum Vorschein. Nach einer 1-minütigen Einwirkzeit im Eosin wird erneut unter fließendem Wasser gewässert und anschließend zur Dehydrierung der Schnitte eine aufsteigende Ethanolreihe durchgeführt. Anschließend werden die Schnitte im Rotihistol gehärtet und mit RotihistoKit eingedeckelt.

V.13. whole mount RNA in-situ Hybridisierung

In-situ mRNA Hybridisierungen wurden auf ganzen C57Bl/6J Embryonen der Entwicklungsstufen E7.5, E8.5, E9.0 und E11.5 durchgeführt.

Embryonen werden präpariert, in Fixierlösung fixiert, schrittweise in der aufsteigenden Methanolreihe dehydriert und bei -20°C in 100 % Methanol gelagert.

Vor der eigentlichen Prozessierung werden die Embryonen mit einer absteigenden Methanolreihe für je 5 min und schließlich dreimal in PBT für je 10 min rehydriert.

Anschließend werden die Embryonen für 20 min mit Bleichlösung behandelt. Der Bleichvorgang wird durch dreimaliges Waschen in PBT abgestoppt. Anschließend werden die Embryonen in Postfixierlösung für 20 min nachfixiert und dreimal für je 10 min in PBT gewaschen. Die Prähybridisierung dauert 2-3h, die Hybridisierung wird über Nacht bei 70°C in Hybridisierungslösung durchgeführt.

Um unspezifisch gebundene oder nicht gebundene Probe auszuwaschen, werden

die Präparate am nächsten Tag dreimal mit Waschlösung I für je 30 min bei 70°C behandelt. Anschließend werden die Embryonen eine Stunde in 100µg/ml RNase A in TNT inkubiert und dreimal für je 5 min bei RT in TNT gewaschen. Daraufhin werden erneut drei Waschschritte in Waschlösung II für 30 min bei je 65°C durchgeführt. Die Embryonen werden danach dreimal mit MAB für je 5 min bei RT gewaschen. Schließlich erfolgt noch ein Blockierungsschritt für mindestens zwei Stunden in 10 % Schafserum, MAB/2 % Blockierreagenz. Die Antikörperinkubation erfolgte ün bei 4°C in Antikörperlösung.

Am Morgen des nächsten Tages werden die Embryonen dreimal für je 10 min in MAB gewaschen und in neue Eppendorf-Tubes überführt. Dann werden über den ganzen Tag verteilt möglichst viele Waschschritte mit MAB durchgeführt. Schließlich wird MAB ün bei 4°C auf den Embryonen belassen.

Vor der Färbung der Embryonen in BMPurple AP Substrat bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht werden drei zusätzliche Waschschritte in NTMT für je 5 min ausgeführt. Farben werden so lange wie nötig entwickelt (20 min–2 h). Die Reaktion wird durch dreimaliges Waschen in PBT gestoppt. Die Embryonen können nun fotografiert werden. Die Lagerung erfolgt in Aufbewahrungslösung bei 4°C.

PBT:	PBS mit 0.1 % Tween-20
Methanolreihe:	25 %, 50 % und 75 % MetOH in PBT
Fixierlösung:	4 % Paraformaldehyd in PBT
Bleichlösung:	3 % H ₂ O ₂ in PBT
Postfixierlösung:	4 % Paraformaldehyd, 0.2 % Glutaraldehyd in PBT
Prähybridisierungslösung:	50 % Formamid, 5 x SSC pH 4.5, 1 % SDS, 50 mg/ml tRNA der Hefe, 50 mg/ml Heparin
Hybridisierungslösung:	50 % Formamid, 5 x SSC pH 4.5, 1 % SDS, 50 mg/ml tRNA der Hefe, 50 mg/ml Heparin, 1mg/ml Digoxigenin markierter Riboprobe (Roche)
Waschlösung I:	50 % Formamid, 5 x SSC pH 4.5, 1 % SDS
Waschlösung II:	50 % Formamid, 2 x SSC pH 4.5, 0,5 M NaCl, 0,1 % Tween-20
TNT:	10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.1 % Tween-20
MAB:	100 mM Maleinsäure pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM Levamisol, 0.1 % Tween-20

Antikörperlösung:	0,5 ml MAB/2 % Block mit 1 mg Embryopulver versetzen (Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen), vortexen, für 30 min bei 70°C inkubieren und auf Eis abkühlen. 5 µl Schafserum und 0,4 µl Anti-Digoxigenin AP Fab Fragment (1:5000) zugeben und bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubieren. Bei 5000 rpm für 10 min abzentrifugieren und auf 2 ml mit MAB/2 % Block/1 % Schafserum bringen.
Embryopulver:	Herstellung siehe Hogan et al, 1994
NTMT:	100 mM Tris-HCl pH 9.5, 50 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl und 0.1 % Tween-20
Aufbewahrungslösung:	4 % PFA, 200 mM HEPES in PBT

V.14. Verhaltensanalysen

Für die Verhaltensanalysen wurden zehn heterozygote Männchen und 8 wildtypische, männliche Wurfgeschwister im Alter von 5 Monaten und einem Jahr getestet. Es wurde eine Testbatterie von fünf verschiedenen Experimentanordnungen zur Ermittlung von motorischen Defiziten durchgeführt, die aus dem Offenen Feld (Actimot System, TSE, Bad Homburg) mit einer Testdauer von 20 min., dem verticalen Stab-Test (Fleming et al, 2004), dem Rotarod (Bioseb, Frankreich) mit einer Beschleunigung von 4 bis 40rpm innerhalb von 5 min, dem automatisiertem Gangart Analyse System „CatWalk“ (Noldus, Wageningen) und der horizontalen Leiter (Eigenbau, Helmholtz-Zentrum München) bestand. Vor der Durchführung aller Tests wurden zwei Trainingseinheiten mit den Mäusen durchgeführt.

VI. Ergebnisse

VI.1. Molekulare Charakterisierung der Mauslinie D045A10

Zielgene von TDP-43 sind, bis auf ein paar wenige Ausnahmen die das Spleißen und die Transkriptions-Regulation betreffen, nur wenige bekannt und es gibt bis heute noch keine aufgedeckten Signalkaskaden, die die Aufgaben des Proteins TDP-43 funktionell beschreiben könnten. In Erwachsenen findet man TDP-43 mutiert oder nicht-mutiert als pathogenen Faktor im Gehirn und Rückenmark, was Krankheiten wie FTLD und ALS manifestiert (Neumann et al, 2006; Neumann et al, 2007). Aber wie wichtig ist das ubiquitär exprimierte Protein in anderen Geweben und wie essentiell ist es während der Embryonalentwicklung? Um dieser Fragen etwas gezielter auf die Spur zu kommen bedient man sich *loss-of-function* Maus-Mutanten, um mit Hilfe der phänotypischen Ausprägung Rückschlüsse auf die noch unbekannt Gen- bzw. Protein-Funktion zu ziehen.

VI.1.1. Darstellung des Lokus und der β geo-Insertion

Die Generierung einer *Tardbp knock-out* Maus war essentiell, um TDP-43 im Embryo und im adulten Tier zu analysieren. Hierfür wurde der *gene trap* Klon D045A10 (generiert aus der Ausgangs-ES Zelllinie Sv129S2) mit einer rFlprosa β geo-Insertion (Schnütgen et al, 2005) in Intron 1 von *Tardbp* verwendet (<http://genetrapp.de>). Die Insertion wurde durch eine 3' splinkerette PCR (Horn et al, 2007) detektiert und weitere Insertionen in anderen Loci wurden durch eine Southern Blot Analyse mit einer Neomycin-spezifischen Probe ausgeschlossen (Abb. 11). Von fünf männlichen Chimären transmittierten drei die *Tardbp*-Mutation in die Keimbahn.

Das Gen *Tardbp* der Maus besteht aus 6 Exons, wobei Exon 1 nicht translatiert wird (Abb. 12A). Die β geo-Insertion befindet sich in Intron 1 nahe dem Exon 1, noch vor dem ersten Translations-Startmotiv ATG (Kozak) (Abb. 12B). Der rFlprosa β geoA-Vektor besitzt flankierende Erkennungssequenzen für die Flp-(FRT, F3) und Cre-(loxP, lox5171) Rekombinase, wobei in der Mauslinie D045A10 ein FRT-Motiv am 5'-Ende des Vektors fehlt. Der Splice Akzeptor (SA) des Vektors führt zum Spleißen an die Selector/Reporter-Kassette β geo; die polyA Signalsequenz (pA) führt zu einem

Abbruch der Transkription. Durch das untranslatierte Exon 1 wird in der Mausmutante lediglich ein Protein bestehend aus der Selektions- und Reporter-kassette generiert (Abb. 12B).

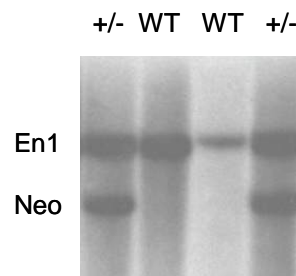


Abb. 11: Southern Blot Analyse zur Bestätigung von einmaligen Integrationen des *gene trap* Vektors. Der Southern Blot zeigt eine 8020bp große Neomycin (Neo)-spezifische Bande bei Individuen mit β geo Insertion sowie eine Engrailed-1 (En1) Bande (9850bp), die als Ladekontrolle dient. Wildtypische DNA hybridisiert lediglich mit der En1 Probe. Die genomische Schwanz DNA wurde mit HindIII verdaut.

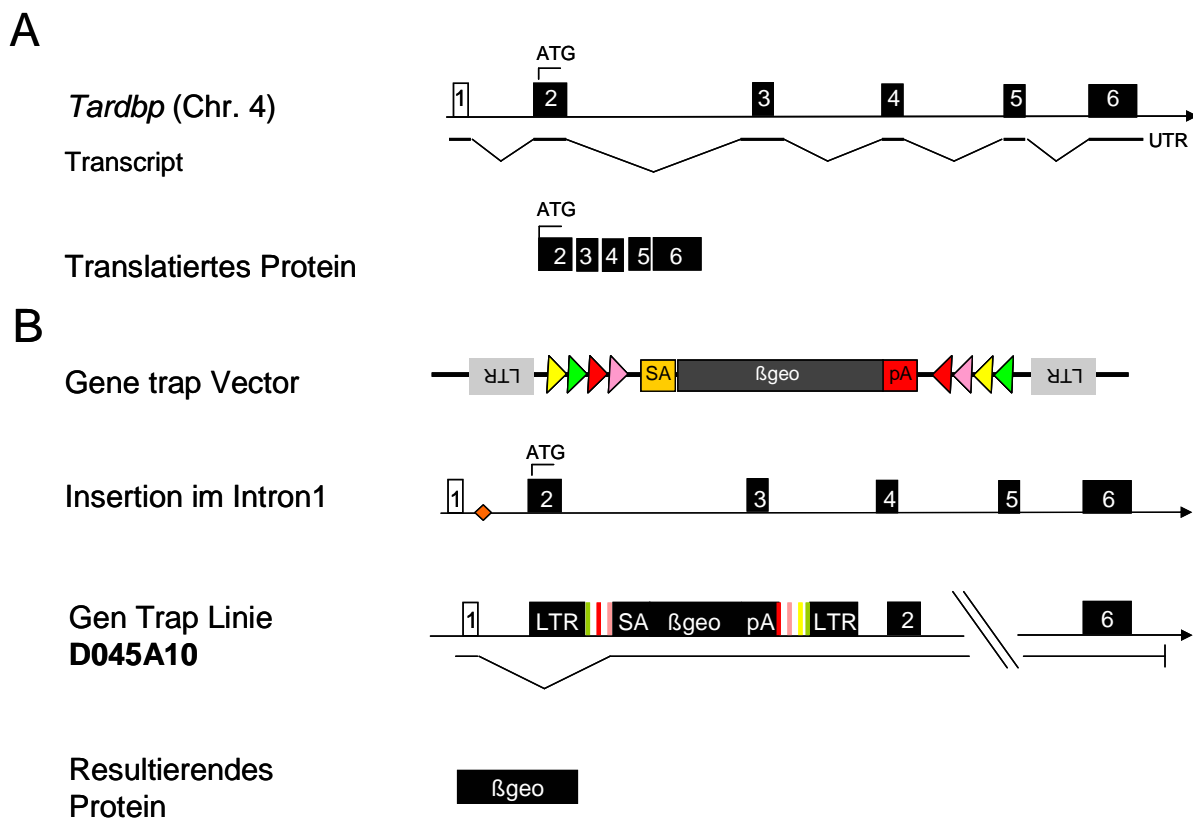


Abb. 12: *Tardbp* Locus mit *gene trap* Insertion. A) Schematische Darstellung des Wildtyp Locus (Chr.4 in der Maus), des Transkripts und des translatierten Proteins (Exon 1 untranslatiert). B) *Gene trap* Vektor mit den Rekombinase-Erkennungsmotiven FRT (gelb), F3 (grün), loxP (rot) und lox5171 (pink), die einen starken Spleiß-Akzeptor gefolgt von der Selektions- und Reporter-kassette (β geo) sowie das pA Stopp-Motiv, flankieren. Der Vektor ist in der Mauslinie D045A10 im Intron 1 von *Tardbp* integriert. Das *trapping* von *Tardbp* führt präferiert zum Spleißen von SA β geo, wodurch in diesem Fall lediglich das Protein β geo generiert wird.

VI.1.2. Genotypisierung

Zur genotypischen Analyse der Mauslinie D045A10 wurde entweder eine Triplex-PCR oder ein Southern Blot durchgeführt.

Für die Triplex-PCR wurden *Tardbp*-spezifische Primer (Tardbp1 und Tardbp2) verwendet, die die Vektorinsertion flankieren sowie ein mutanter Primer (splirev1), der zu der 3'LTR Region des mutagenen Vektors homolog ist (Abb. 13A). Da 132 bp das mutante Fragment und 235 bp das Wildtyp Fragment repräsentieren, kann anhand dieser unterschiedlichen Bandengröße zwischen Wildtyp- und *knock out*-Allel unterschieden werden (Abb. 13B).

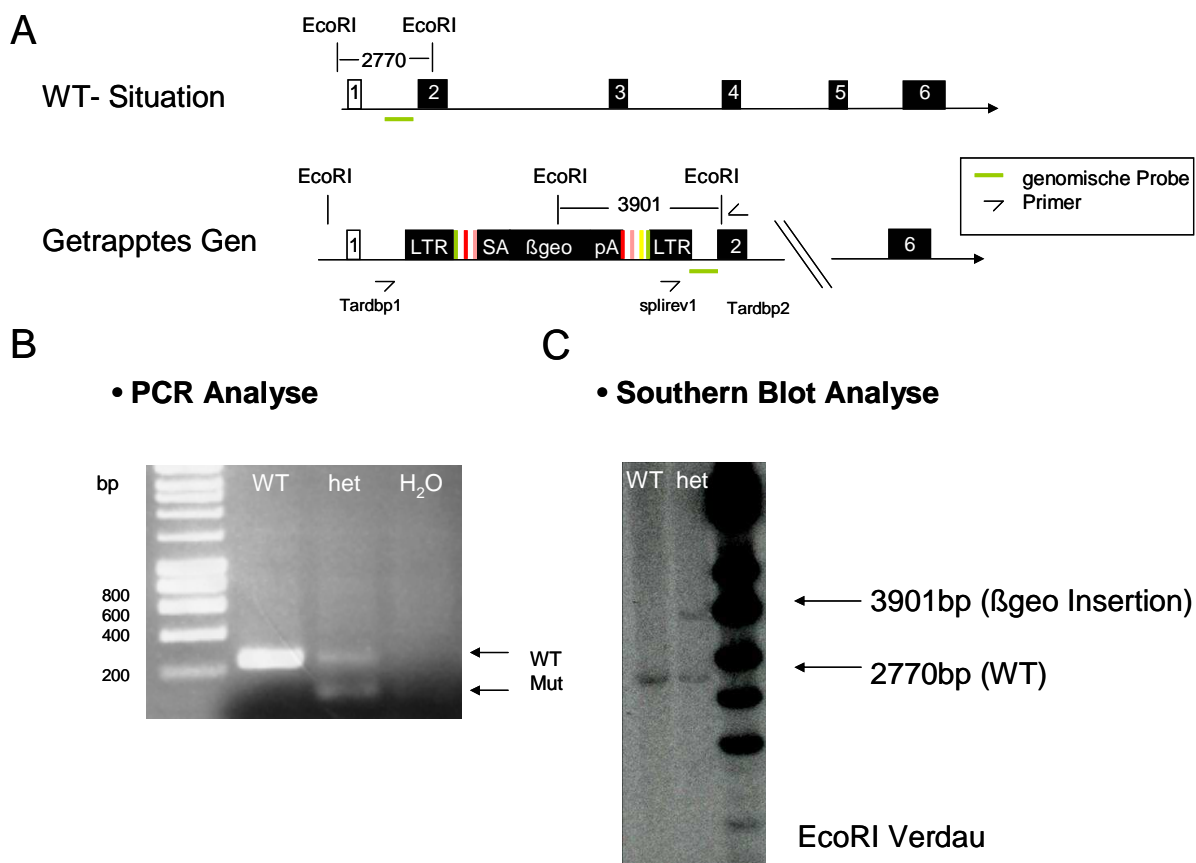


Abb. 13: Genotypische Analyse der *gene trap* Mauslinie D045A10. A) Das *trapping* von *Tardbp* mit dem β geo-Vektor integriert eine zusätzliche EcoRI Restriktionschnittstelle, wodurch das WT-Fragment (2770 bp) zum Mutanten-Fragment auf 3901bp vergrößert wird. B) Für eine Triplex PCR flankieren zwei Primer den integrierten Vektor und ein dritter bindet im 3'LTR des Vektors. Die Ergebnisse der Triplex PCR zeigen eine starke Bande von 235bp im WT und eine zusätzliche Bande von 132bp in heterozygoten Tieren. C) Das Southern Blot Autoradiogramm zeigt in heterozygoten Tieren die größere Mutanten-spezifische Bande von 3901bp nach einem EcoRI Verdau.

Im Southern Blot generiert eine Lokus-spezifische Probe, die das Wildtyp-Fragment der Genotypisierungs-PCR repräsentiert, ein 2,77 kb großes EcoRI Fragment des Wildtyp-Gens und ein 3,9 kb EcoRI-Fragment des mutierten Gens (Abb. 13C). Grundlage des Southern Blots war eine neue EcoRI Schnittstelle, die durch die Insertion des Vektors in den Lokus eingebracht worden war.

VI.2. Expressionsstudien von TARDBP

VI.2.1. Proteinanalyse und Immunfärbung zeigen starke TARDBP Expression im Gehirn

Das Protein TDP-43 ist beim Menschen ubiquitär exprimiert (Buratti et al, 2001). Da die TDP-43 Zelleinschlüsse von FTLD-Patienten in Neuronen und Gliazellen v.a. des Cortex und des Hippocampus gefunden wurden (Neumann et al, 2006) und da das Absterben dieser Zellpopulationen Auslöser des Krankheits-Phänotyps sind, wurden auch in der *gene trap* Maus diese Krankheits-spezifischen Regionen näher betrachtet. Ob die Expression von TDP-43 in der Maus das menschliche Expressionsmuster widerspiegelt, sollte mit immunhistologischen Methoden überprüft werden.

Die TDP-43 Expression im Gehirn der Maus konnte zunächst in einem Western Blot nachgewiesen werden. Das Proteinlysate aus Hirngewebe von Wildtyp-Tieren zeigte eine spezifische 43kDa Bande, die TDP-43 repräsentiert (Kapitel V.2.3, Abb. 16A). Um die neuronalen Zelltypen zu bestimmen, in denen TDP-43 exprimiert wird, wurden Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt. Paraffinschnitte von Wildtyp-Tieren wurden mit einem polyklonalem, C-terminalem TDP-43 spezifischen Antikörper und zusätzlich mit unterschiedlichen neuronalen Markern behandelt. Hierfür wurde der Marker GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), der spezifisch Astroglia-Zellen anfärbt, der Marker GST (Glutathion-S-Transferase), der spezifisch für reife Oligodendrozyten in Säugergehirnen ist und NeuN (Neuronal Nuclei), der als Marker für alle reifen Neuronen dient, verwendet. Diese Triple-Immunfluoreszenz-Markierung in Kombination mit der TDP-43 Antikörper-Färbung zeigte, dass TDP-43 in allen drei neuronalen Zellpopulationen coexprimiert ist (Abb. 14). Bei näherer Betrachtung des Gyrus Dentatus im Hippocampus, wo zusätzlich mit Doublecortin

(DCX) und Calbindin gegengefärbt wurde, konnte gezeigt werden, dass TDP-43 (rot markiert) sowohl in unreifen Neuronen (markiert mit DCX, grün) als auch in reifen Neuronen (markiert mit Calbindin, blau) der subgranulären (SGZ) und granulären Zone (GL) des Gyrus Dentatus exprimiert ist (Abb. 15A).

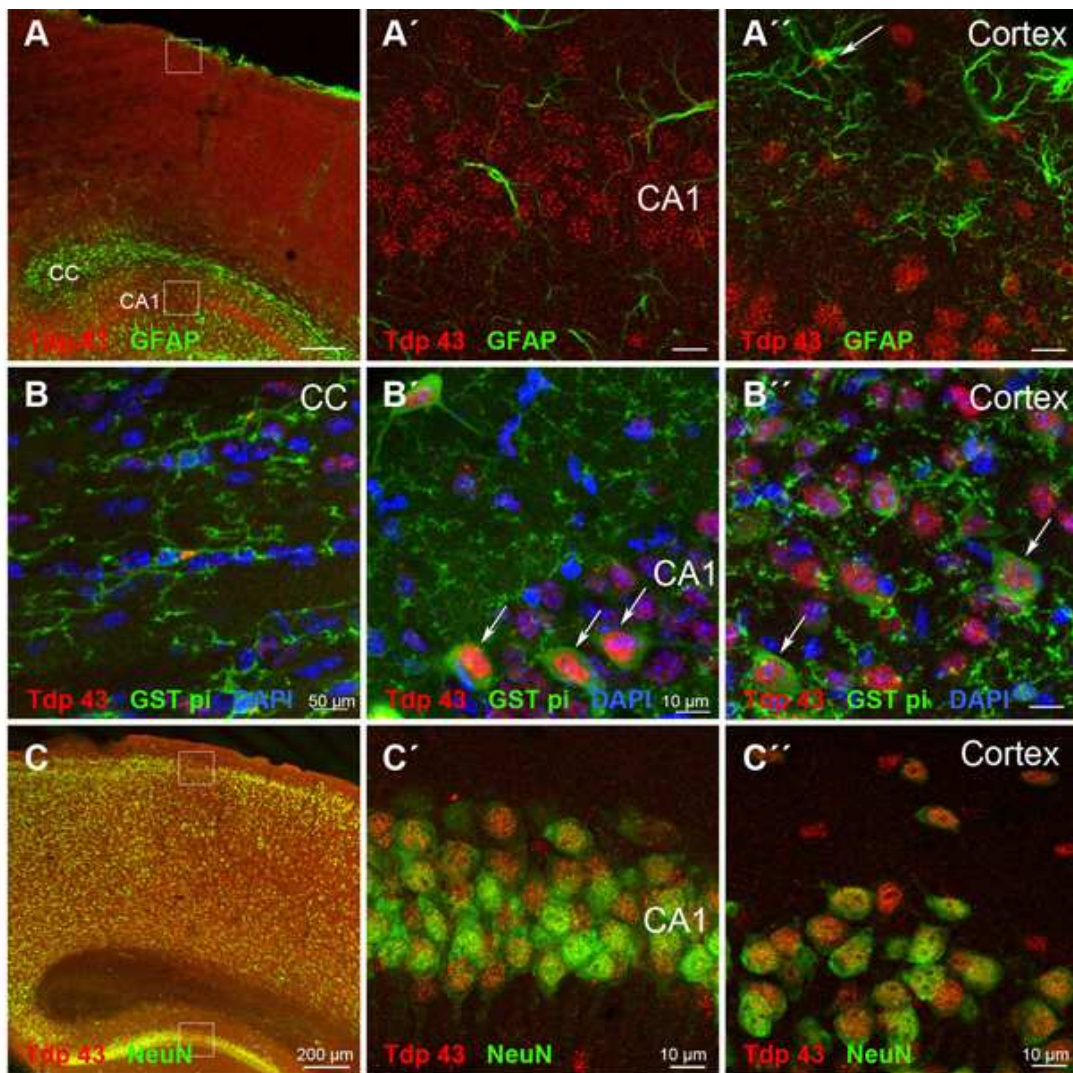


Abb. 14: Tdp-43 ist im adulten Maushirn in allen drei neuronalen Zelllinien exprimiert.

Immunfluoreszenz Färbung zeigt die Expression von Tdp-43 im Corpus Callosum (CC) (B) dem CA1 Feld des Hippocampus (A I, B I, C I) und dem Cortex (A II, B II, C II). A I und A II repräsentieren höhere Vergrößerungen der umrandeten Bereiche, die in A dargestellt sind. Im CA1 Feld des Hippocampus ist Tdp-43 nicht in GFAP-positiven Astrozyten co-exprimiert (A I), A II hingegen zeigt einige co-Expressionen im Cortex (Pfeil). (B) Tdp-43 ist nicht mit GST- π -positiven Oligodendrocyten im Corpus Callosum co-exprimiert, allerdings findet man co-Expression (B I) im CA1 Feld des Hippocampus (Pfeile) und (B II) im Cortex (Pfeile). C I und C II repräsentieren höhere Vergrößerungen der umrandeten Bereiche, die in C dargestellt sind. Tdp-43 ist in NeuN-positiven reifen Neuronen coexprimiert, wie in (C I) dem CA1 Feld des Hippocampus und (C II) dem Cortex gezeigt wird. Maßstab: (A, C) 200 μ m, (B) 50 μ m, (A I, A II, B I, B II, C I, C II) 10 μ m (durchgeführt von Anja Haslinger).

Diese zweiseitige Expression von TDP-43 in unreifen sowie in reifen neuronalen Geweben des Gyrus Dentatus lässt annehmen, dass TDP-43 auch während der adulten Neurogenese funktional von Bedeutung ist. Generell wurde TDP-43 zwar in allen drei neuronalen Zelllinien gefunden, es ist aber nicht in jeder Zelle zu jedem Zeitpunkt nachweisbar (vgl. Abb. 14 B, B', B'').

VI.2.2. Die β -Galaktosidase Färbung deckt sich mit der Antikörperfärbung

Um zu testen, ob das integrierte LacZ Gen die immunhistologischen Daten komplementiert, wurde in heterozygoten *Tardbp*-Tieren die β -Gal Aktivität im Gehirn mit histochemischen Methoden nachgewiesen.

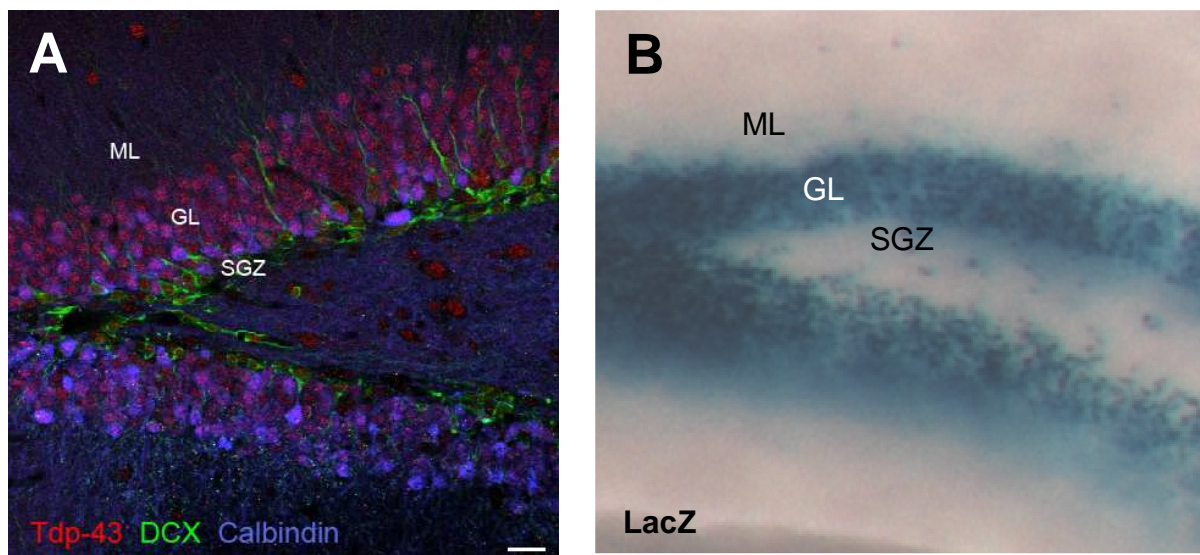


Abb. 15: Expression von Tdp-43 im Gyrus dentatus adulter Mäuse reflektiert das endogene Tdp-43 Expressionsmuster. (A) zeigt Immunfluoreszenzfärbung und (B) lacZ-Färbung von Tdp-43. (A) Tdp-43 (rot) ist in den unreifen DCX-positiven Neuronen (grün) und den reifen Calbindin-positiven Neuronen (blau) der granulären Zone exprimiert. (B) Die LacZ Expression im Gyrus Dentatus ist vor allem in der granulären Zone vertreten. ML: *molecular layer* (molekulare Schicht), GL: *granular layer* (granuläre Schicht), SGZ: *subgranular zone* (subgranuläre Zone). Maßstab: 20 μ m.

Die β -Gal Aktivität im adulten Gehirn zeigt ebenfalls wie die Fluoreszenz-Antikörper Färbung eine starke TDP-43 Expression im Hippocampus und dort besonders in der granulären Zone des Gyrus Dentatus (Abb. 15B). Der blaue Niederschlag in den

Körnerzellen und in den neuronalen Stammzellen der subgranulären Zone (SGZ) korrespondiert mit der Fluoreszenz Färbung. Dies lieferte einen weiteren Nachweis für die spezifische TDP-43 Expression in der SGZ und granulären Schicht des Gyrus Dentatus, der Stelle, an der noch undifferenzierte Neuronen proliferieren.

VI.2.3. Proteinanalysen und quantitative PCR zeigen keine 50 % ige Reduktion von TDP-43 in heterozygoten Tieren

VI.2.3.1. TARDBP Proteinanalyse zeigt einen signifikanten Unterschied in heterozygoten Tieren

Da durch die *gene trap* Insertion nur noch ein funktionsfähiges Allel von *Tardbp* vorhanden ist, wird ein 50 % iger Rückgang des Transkripts und der Proteinmenge erwartet. Um diese Annahme zu überprüfen wurden quantitative Analysen von TDP-43 auf Protein- und mRNA-Ebene durchgeführt.

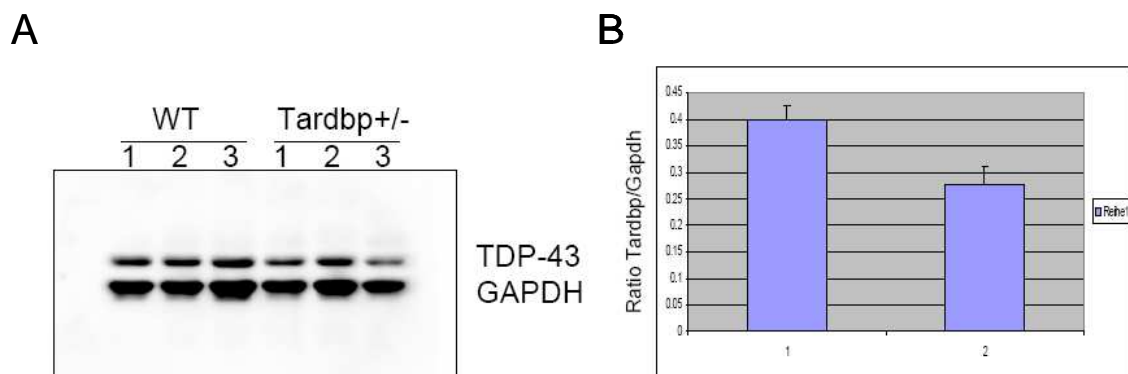


Abb. 16: Heterozygote Tiere zeigen ein reduziertes TDP-43 Level. A) Darstellung eines Western Blots aus Protein-Lysat von Gehirnen 6-9 Monate alten Tieren; Hierfür wurde ein polyklonaler C-terminaler TARDBP Antikörper verwendet. Es wurden 3 WT und 3 heterozygote Mäuse verglichen. Jedes Individuum zeigt die typische 43kDa Bande, welche TDP-43 repräsentiert. Als Ladekontrolle diente GAPDH. B) Quantifizierung des Immunoblots mit Hilfe des EC-Lumineszenz Kits. Das Diagramm zeigt eine signifikante Reduktion ($p=0,0088$) von TDP-43 um 25% in heterozygoten Tieren (Säule 2) im Vergleich zu WT Tieren (Säule 1).

Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot Analyse unter Verwendung eines polyklonalen, C-terminal-bindenden TARDBP Antikörpers an jeweils drei unterschiedlichen Mutanten und Kontrolltieren der ersten Filialgeneration

durchgeführt. Von den jeweiligen Tieren wurde Proteinlysate aus Gehirn extrahiert. Äquivalente Proteinmengen wurden durch ein vergleichbares Expressionsniveau von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) in WT und mutanten Tieren repräsentiert (Abb.16A). Mittels EC-Lumineszenz Messung konnte TARDBP quantitativ bestimmt werden und die Reduktion um 25 % zeigt einen signifikanten Rückgang von TDP-43 in heterozygoten Tieren ($p=0.0088$) (Abb. 16B). Die unerwartet hohen Expressionslevel von 75 %, die den Verlust eines Allels kompensieren, veranlasste die quantitative Messung von *Tardbp*-mRNA. Mittels einer quantitativen PCR (qPCR) sollte festgestellt werden, ob die Erhöhung des TDP-43-Levels auf Transkriptions- oder Translationsebene stattfindet.

VI.2.3.2. Methodik der quantitativen PCR Analyse an heterozygoten *Tardbp*-Mausmutanten

Die taqman-Methode beruht auf der Verwendung einer Sequenz-spezifischen Probe, welche zwischen zwei gewählten Primern bindet.

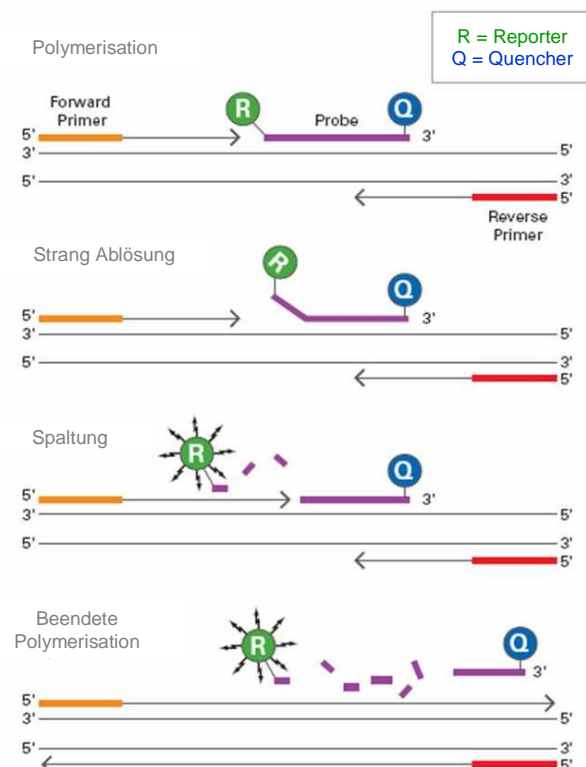


Abb.17: Schematische Darstellung der taqman-Methode.

An der taqman Probe befinden sich zwei unterschiedliche Fluoreszenz-tags: Der Reporter-Farbstoff FAM (6-Carboxyfluorescein) am 5' Ende der Probe, dessen Emissions-Spektrum durch die räumliche Nähe zu dem zweiten Fluoreszenz-Farbstoff TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin), der sich am 3' Ende befindet, blockiert ist. Der Reporter wird durch die 5' Exonuclease-Aktivität der DNA Polymerase während der Amplikon-Synthese freigesetzt und durch die räumliche Trennung zum Quencher nicht mehr in seiner Fluoreszenz-Emission gehindert. Diese Fluoreszenz-Aktivität spiegelt proportional die Menge an synthetisierten PCR-Fragmenten wieder (Abb. 17). Der ct-Wert (Schwellenwert oder *cycle threshold*) ist eine theoretische Größe, die die Anzahl an Zyklen angibt, bei denen die Fluoreszenz-Emission erstmals eine konstante Fluoreszenz-Schwelle bzw. das sogenannte Hintergrundrauschen, übersteigt. Dieser Wert beschreibt den Anfang einer exponentiellen Wachstumskurve und steht im proportionalen Verhältnis zur Amplikonanzahl und zum Expressionslevel.

Für die quantitative PCR (qPCR) wurden maßgefertigte Primer sowie eine spezifische Probe zielgerichtet in Exon 1 und 2 sowie ein kommerziell hergestellter taqman Expressions-Assay, der spezifisch für Exon 3 und 4 entworfen wurde, verwendet. Die Verwendung von Primern spezifisch für Exon 3 und 4 sollte vermeintliche Isoformen von *Tardbp* abfangen, deren Transkriptionsstarts stromabwärts der ersten Kozak Sequenz liegen. Insgesamt wurden 7 unabhängige Experimente durchgeführt, die in die statistische Auswertung mit einfließen.

VI.2.3.3. Statistische Auswertung der qPCR

Abbildung 18 zeigt die *fold changes* (Wert des Zielgens/Wert des Referenzgens) der einzelnen qPCR Experimente (blaue Balken) mit 95 % Konfidenzintervallen sowie eine Zusammenfassung aller Experimente (ANOVA, roter Balken). Die durchgezogene Linie repräsentiert den Wildtyp (*fold change* = 1).

In Experiment 1, 2, und 3 wurden Probe und Primer spezifisch für Exon 1 und 2 verwendet, wohingegen in den Experimenten 4, 5, 6 und 7 spezifische Primer und Probe für Exon 3 und 4 eingesetzt wurden. In jedem Experiment wurde β -Actin als Referenzgen verwendet bis auf Experiment 1, wo als einzige Ausnahme Nestin-spezifische Primer und Probe zur Normalisierung eingesetzt wurden. Während in den ersten 3 Experimenten mRNA aus Mausgehirn eingesetzt wurde, wurde in den

Experimenten 4, 5, 6 und 7 mRNA aus ES-Zellen verwendet. In den Experimenten 4 und 5 wurden zusätzlich zu der generell verwendeten cDNA Verdünnung (1:5) auch noch Verdünnungen von 1:50 und 1:500 verwendet. Dies wurde in den statistischen Auswertungen berücksichtigt. Mit einer Zwei-Wege ANOVA-Analyse wurden alle Experimente in einer Säule zusammengefasst.

Es gab keinen signifikanten Interaktionseffekt ($p=0.83$). Der Genotypeneffekt (*log fold change*) betrug -0.72 und hatte einen signifikanten Unterschied zu Null ($p=0.0187$). Der korrespondierende *fold change* betrug 0.61 (Wildtyp=1; durchgezogene Linie). Die Experimente zeigten eine hohe Signifikanz untereinander ($p < 0.0001$).

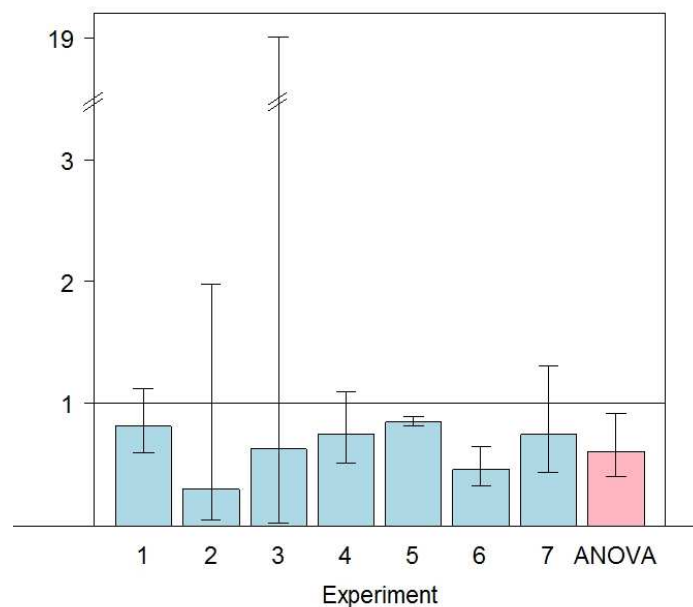


Abb.18: Quantifizierung des *Tardbp* Transkript-Levels in 7 unabhängigen Experimenten. Jedes Experiment vergleicht 3 heterozygote mit 3 wildtypischen Individuen bzw. ES Zellen. Die Darstellung präsentiert die *fold changes* jedes einzelnen Experiment (blau) und eine zwei-Wege ANOVA fasst alle Werte in einer Säule zusammen (pink). Die durchgezogene Linie repräsentiert das *Tardbp* Transkript in wildtypischen Individuen. Die zwei-Wege ANOVA berechnete eine 39 % ige Reduktion des *Tardbp* Transkripts in heterozygoten Mäusen bzw. in ES-Zellen im Vergleich zum Wildtyp.

Obwohl die einzelnen Experimente starken Schwankungen unterlagen, wurde doch insgesamt eine signifikante Reduktion von *Tardbp* mRNA in heterozygoten Tieren bzw. ES-Zellen festgestellt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in heterozygoten Individuen bzw. ES-Zellen, die auf β -Actin bzw. Nestin normalisiert wurden, eine um ca. 39 % reduzierte *Tardbp* mRNA Menge im Vergleich zu wildtypischem Gewebe bzw. TBV2-Zellen vorhanden war. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Transkription des intakten *Tardbp* Allels über einen

Rückkopplungsmechanismus stimuliert wird, da ungefähr 11 % mehr Transkript in den heterozygoten Tieren bzw. ES-Zellen vorlag als erwartet. Die erhöhte Proteinmenge spricht ebenfalls für eine *feedback* Regulation. Eine Reduktion der TDP-43 Expression um 50 % scheint die Zelle bzw. der Organismus nicht zu tolerieren.

VI.2.4. miR330 als potentielles regulatorisches Element von TDP-43

Was für ein Mechanismus liegt der Aktivierung des *Tardbp* WT-Allels in heterozygoten Tieren zugrunde und welche weiteren Faktoren könnten dabei eine Rolle spielen? Zur Untersuchung dieser Auffälligkeit im Proteinlevel wurden mehrere Informationsquellen herangezogen. Erste Hinweise lieferten bioinformatische Vorhersageprogramme. Hier wurden miRNAs als vermeintliche Interaktionspartner der *Tardbp*-mRNA identifiziert.

VI.2.4.1. Hintergrund: miRNAs und ihre Wirkung

MikroRNAs (miRs) sind wesentliche Elemente während der post-transkriptionellen Regulation der Genexpression. Vor allem während der Entwicklung steuern miRs die Genexpression durch post-transkriptionelle Modulierung der mRNA. Fast alle Gene, die während der Entwicklung eine Rolle spielen, werden durch miRNAs reguliert. miRNAs sind 20-25 Nucleotid lange, nicht-kodierende RNAs, die mit ihrer *seed* Sequenz (zwischen Nucleotid 2-7 am 5' Ende der reifen miRNA) an komplementäre Regionen der 3'UTRs von Zielgenen bindet und somit die Translation, die Stabilität oder die Lokalisation von Ziel-mRNAs inhibieren (Carthew und Sontheimer, 2009; Brodersen und Voinnet, 2009). Des weiteren inhibieren miRNAs den Prozess der Translation durch Spaltung bzw. Degradation der *target*-mRNA (Bartel, 2004). Die Translation von Zielgenen kann allerdings auch positiv von miRNAs beeinflusst werden. Wie in Vasudevan et al. (2007) gezeigt wurde, bindet miR 369-3 direkt an Proteine mit AU-reichen Elementen (ARE), wie an den Tumor Necrose-Faktor TNF α -ARE, und aktiviert somit die Translation während der Arretierung des Zellzyklus.

VI.2.4.2. Identifizierung von miR330

Die Identifizierung von miRNAs, die mit Tdp-43 interagieren, geschah zufällig während einer Analyse zur Identifizierung von miRNAs des Zielgens ADAM10. Hierzu wurden die Vorhersageprogramme miRanda, RNAhybrid und RNA22 als Plattform verwendet. Diesen Programmen liegt ein Algorithmus zu Grunde, mit dessen Hilfe potentielle Zielgene von miRNAs identifiziert werden können. Ein kritischer Punkt dabei ist die Bindungsenergie, die die gefundenen Interaktionspartner klassifiziert. Hohe Bindungsenergien mit 3'UTRs liefern hohe Wahrscheinlichkeiten für ein korrekt vorhergesagtes Zielgen. Mit den vorgestellten Vorhersageprogrammen konnte miR330 als Interaktionspartner sowohl von ADAM10 als auch von Tdp-43 ermittelt werden.

Nach der Entdeckung der miR330 als potentiell Interaktionsmolekül von Tdp-43 wurden noch weitere miRNAs aufgedeckt, die ebenfalls an das 3'UTR von Tdp-43 binden. Die relevantesten Kandidaten für Mensch und Maus sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

# bindingsites < -20	Ø energy	mmu-miRs	hsa-miRs	Ø energy	# bindingsites < -20
6	-26,26	mmu-miR-296-3p	hsa-miR-330-3p	-28,86	2
3	-25,32	mmu-miR-210	hsa-miR-24	-26,2	2
2	-28,79	mmu-miR-214	hsa-miR-331-5p	-26,78	1
2	-27,07	mmu-miR-330	hsa-miR-214	-25,97	1
2	-25,76	mmu-miR-331-5p	hsa-miR-296-3p	-24,32	1
2	-25,64	mmu-miR-24	hsa-miR-210	-23,1	1

Tab. 1: Auflistung weiterer miRNAs, die mittels bioinformatischer Vorhersageprogramme gefunden wurden. Alle aufgelisteten miRNAs binden mit einer effizienten Bindungsenergie an humanes bzw. murines Tdp-43 Transkript. miR330-3p repräsentiert das Molekül mit der höchsten Bindungsenergie im Menschen (hsa-miR330-3p orange hinterlegt). Auch in der Maus zeigt diese miRNA hohe Bindungsenergien (orange hinterlegt links); (modifiziert nach Regina Augustin, Helmholtz-Zentrum München).

Die Zielsequenz der miRNAs bedindet sich im 3'UTR des Zielgens. Da *Tardbp* im Mensch und in der Maus eine auffällig lange 3'UTR besitzt (Abb. 19), ist eine Regulation über diese Region nicht auszuschließen. Diese Regulation müsste sich

positiv auf die Expression von TDP-43 auswirken um das unerwartet hohe TDP-43 Level in heterozygoten Tieren mit einer Rückkopplungsschleife zu erklären (Abb. 20).

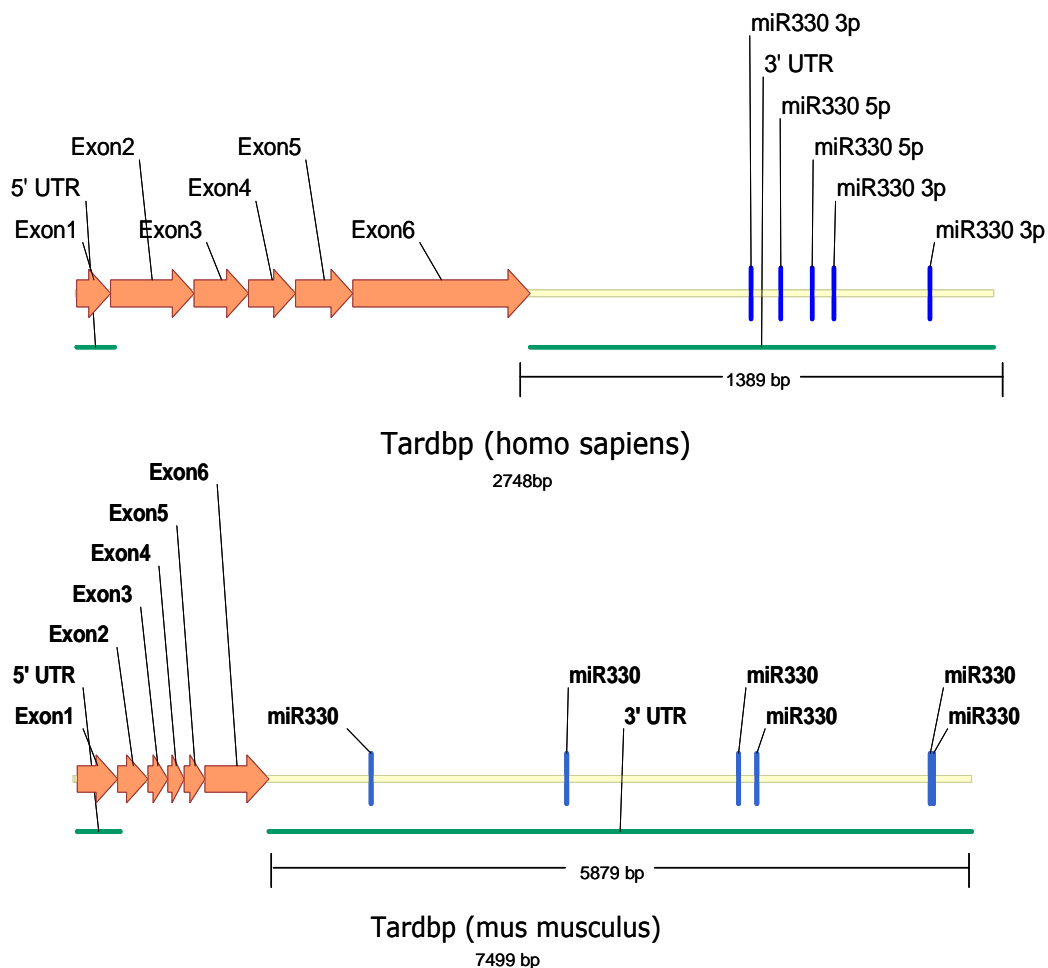


Abb. 19: Darstellung der kodierenden Sequenzen mit UTRs (*untranslated regions*) von Tdp-43 in *H. sapiens* und *M. musculus*. In den auffallend langen 3'UTR sind die Bindungssequenzen der miR330-5p (Mensch und Maus) bzw. der miR330-3p (Mensch) in blau markiert.

VI.2.4.3. qPCR zur Analyse von miR330

Um die Rückkopplungshypothese zu bestätigen, wurde in einem nächsten Schritt mit einer quantitativen *real-time* (qRT)-PCR versucht, die mRNA Expressionslevel von

Tardbp und *miR330* zwischen wildtypischen und heterozygoten Tieren bzw. ES-Zellen zu vergleichen und einen Effekt in heterozygoten Individuen zu überprüfen. Denn wenn *miR330* die Expression von TDP-43 beeinflusst, dann nur über eine positive Rückwirkung, die zu einer Erhöhung des intakten Transkriptes in heterozygoten Tiere bzw. ES-Zellen führt (Abb. 20).

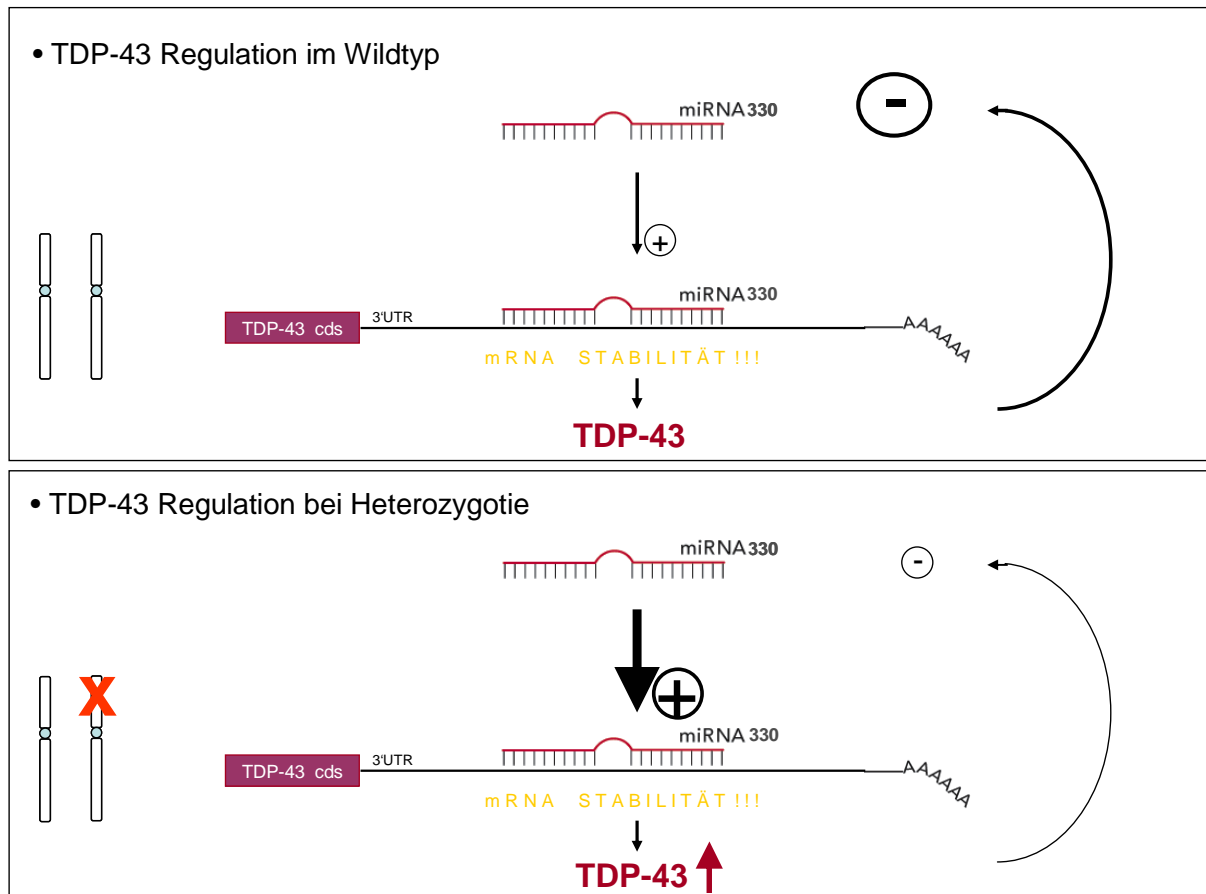


Abb. 20: Hypothetischer *feedback*-Mechanismus, der eine Stabilisierung der *Tardbp* mRNA durch *miR330* suggeriert. In der Wildtyp Situation stabilisiert *miR330* das *Tdp-43* Transkript, das wiederum einen negativen Einfluß auf die *miR330* Synthese nimmt. Bei heterozygoten Individuen ist das negative *feedback* auf die *miR330* Synthese durch nur ein aktives Allel reduziert, was zu einem erhöhten positiven *feedback* auf das *Tdp-43* Transkript bzw. die TDP-43 Synthese führt.

VI.2.4.4. Statistische Analyse der einzelnen qRT-PCR Experimente

In drei voneinander unabhängigen qRT-PCR Experimenten wurde das *miR330* Level in wildtypischen und heterozygoten ES-Zellen überprüft. Hierfür wurde wildtypische-

und mutante cDNA in einer 1:5 Verdünnung, miR330 spezifische Primer (miR330for und miR330rev), Tardbp-spezifische Primer für Exon 3 und 4 (vgl. VI.2.3.2.) sowie Transkript-spezifische taqman Proben (FAM-miR330-TAMRA und FAM-Tardbp-TAMRA) verwendet. Für jede Amplifikation wurden Triplikate angefertigt um einen Mittelwert zu berechnen. Bei der relativen Quantifizierung wurden die Expressionen der Zielgene mit dem *housekeeping-gene* (Haushaltsgen) β -Actin normalisiert. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes von Wildtyp und Mutante geschah über das sog. $\Delta\Delta\text{ct}$ -Berechnungsmodell. Dabei wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der ct-Wert des Referenzgens vom ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert, wodurch Δct ermittelt wird. Nach dieser Normierung wird vom Δct -Wert der experimentell zu untersuchenden Probe (in diesem Fall der Mutante) der Δct -Wert des Wildtyps abgezogen, um auf den sogenannten „delta-delta ct“-Wert ($\Delta\Delta\text{ct}$ -Wert) zu kommen. Der relative Expressionsunterschied von *Tardbp* und *miR330* zwischen der Mutante und dem Wildtyp, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ (Livak und Schmittgen, 2001).

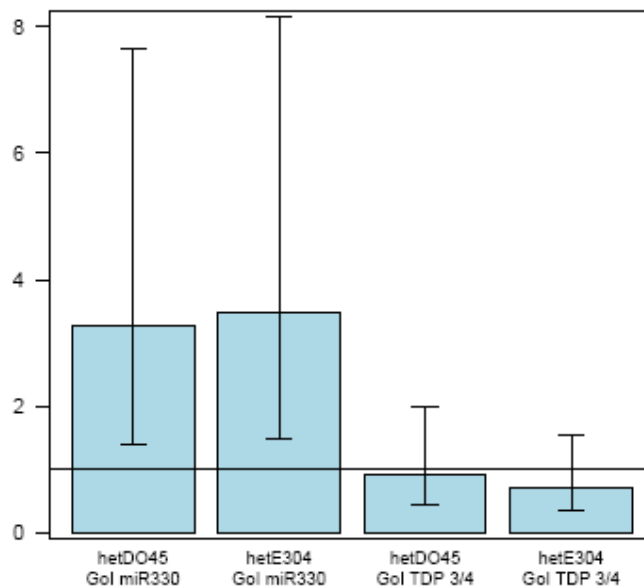
Zu allen Differenzen gegenüber dem Wildtyp, dargestellt durch die logarithmierte *fold changes*, wurden t-Test-basierte 95 % Konfidenzintervalle berechnet. Die *fold changes* selbst und deren Konfidenzintervalle wurden dann durch Delogarithmieren gewonnen (Abb. 21). Für alle Analysen wurde die R Software (*R Development Core Team* 2009) benutzt; zur Analyse der gemischten Modelle das *R-Package nlme* (Pinheiro et al, 2009).

In der statistischen Auswertung wurden die zwei getesteten *targets* *Tardbp* und miR330, die beiden Genotypen Wildtyp und heterozygot (der *gene trap* ES-Zelllinien D045A10 und E304D05 mit β geo Insertion im *Tardbp*-Gen) sowie drei unterschiedliche Verdünnungen der cDNA (1:5, 1:50, 1:500) des jeweiligen Genotyps berücksichtigt.

Die Δct -Werte wurden in einer Zweiweg-Varianzanalyse simultan auf Unterschiede zwischen den zwei Genotypen (inkl. Wildtyp) und auf Effekte des *gene of interest* (GOI) getestet. Die Verdünnung wurde als gruppierende Variable in die Varianzanalyse integriert (gemischtes Modell: *mixed-effects model*). Diese Analyse ist eine Verallgemeinerung des gepaarten t-Tests. Zunächst wurde die Varianzanalyse mit Interaktionseffekt zwischen Genotyp und GOI gerechnet. Da der Interaktionseffekt nicht signifikant war, wurde eine Varianzanalyse ohne Interaktion

gerechnet.

Alternativ wurden separate Einweg-Varianzanalysen für die GOI gerechnet, ebenfalls mit der Verdünnung als gruppierende Variable. Die Kontraste der einzelnen Genotypen gegen den Wildtyp schätzen die logarithmierte *fold change*. Die p-Werte der einzelnen Kontraste wurden mit der Methode von Holm (1979) adjustiert.



GOI	Genotyp	fold changes	p-values	p-values adjustiert
miR330	het D045A10	3,27	0,0178	0,03
miR330	het E304D05	3,49	0,015	0,03
TDP 3/4	het D045A10	0,93	0,8065	0,8065
TDP 3/4	het E304D05	0,72	0,3015	0,6031

Abb. 21: *Fold changes* mit Konfidenzintervallen. Wildtypische und heterozygote Tdp-43 ES-Zellen der Linien D045A10 und E304D05 wurden in unabhängigen Experimenten bezüglich des Tardbp-Transkript und des miR330-Transkripts quantifiziert. Die durchgezogene Linie (*fold change* = 1) repräsentiert den Wildtyp. Die *fold changes* der miR330 Experimente zeigen einen drei- bis dreieinhalb-fachen Anstieg des miR330 Transkripts (*fold changes* 3.72 und 3.49) in heterozygoten Individuen (het D045 und het E304). Das *Tardbp*-Level liegt in heterozygoten Individuen wie erwartet über 50 % (*fold changes* 0.72 und 0.93 entsprechen 72 % bzw. 93 % Transkriptlevel in +/- Individuen). GOI = *gene of interest*.

Wie in Abbildung 21 sichtbar wird, lag in heterozygoten Zellen im Vergleich zu wildtypischen Zellen ein drei- bis dreieinhalb-fach erhöhtes miR330-mRNA Level vor (*fold changes* 3,27 und 3,49). Diese auffällig hohe miR330 Expression wurde in drei unabhängigen Experimenten detektiert. Die *Tardbp*-mRNA Expression war in

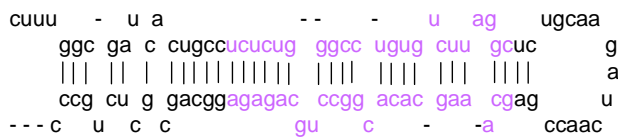
heterozygoten Zellen wie erwartet nicht um 50 % reduziert, sondern auf 72 % bzw. 93 % hochreguliert (Werte nicht signifikant da $p=0,8065$ und $0,6031$). Somit wurde auch in diesem Experiment nochmals die Hochregulation von nur einem intakten *Tardbp* Allel in heterozygoten ES-Zellen bestätigt und das erhöhte miR330 Level während der vermeintlichen Rückkopplung gemessen.

Diese Experimente lieferten einen ersten Hinweis, dass *Tardbp* in heterozygoter Ausführung anscheinend einen verminderten negativen Effekt auf die miR330 Expression ausübt, dessen Level dadurch stark hochreguliert wird. MiR330 hingegen übt als vermeintlich stabilisierendes Element der *Tardbp*-mRNA einen positiven Effekt auf das TDP-43 Level aus, wodurch *Tardbp* hochreguliert wird. Der positive Effekt auf *Tardbp* durch miR330 und die verminderte Expression von miR330 durch TDP-43 kann den Rückkopplungsmechanismus in diesem Model erklären (Abb. 20). Um diese Regulierung zu überprüfen, wurde ein *in vitro* Experiment entworfen, das diese Arbeitshypothese untermauern sollte.

VI.2.4.5. Validierung von miR330 *in vitro*

Die Bindestellen der miR330 befinden sich im 3'UTR von *Tardbp* und sind stromabwärts der Translations-Termination (TAG) lokalisiert. Die Bindung zwischen der mRNA und der miR330 erfolgt durch die komplementäre *seed*-Region an Position 2-7 der miR330 (Abb. 22).

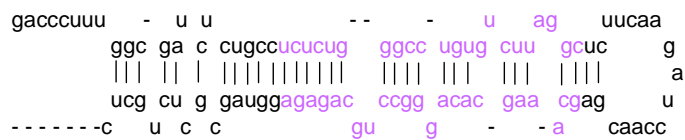
Um zu zeigen, dass TDP-43-mRNA durch miR330 stabilisiert und reguliert wird, wurden in einem *in vitro*-Assay Hek293T Zellen sowie murine ES Zellen (IDG3.2 und TBV2) mit einem miR330 Überexpressionsvektor transient transfiziert. Die reife miRNA330-5p, die am 5'Ende der prä-miR330 entsteht, ist in Mensch und Maus zu 100 % identisch. Der positive Einfluß der miR330 sollte sich nach der vorgestellten Arbeitshypothese in einem erhöhten TDP-43 Level widerspiegeln. Dies sollte mittels einer Western Blot Analyse ermittelt werden.

h. sapiens miR330 stem loop

hsa-miR-330-5p:

18 - **ucucuggggccugugucuaggc** - 39

hsa-miR-330-3p:

57 - **gcaaagcacaaggccugcagaga** - 79*m. musculus* miR330 stem loop

mmu-miR-330-5p:

22 - **ucucuggggccugugucuaggc** - 43

mmu-miR-330-3p:

61 - **gcaaagcacaaggccugcagaga** - 83

Abb.22: Stem loop Struktur und reife miRNA330 in *H. sapiens* und *M. musculus*. Die reife miRNA in 5p Orientierung ist in Mensch und Maus zu 100 % homolog. In 3p Orientierung ist ein Basenunterschied zu finden (markiert in pink c->g), der zu einer reduzierten, 95 %igen Homologie führt.

Sowohl Hek293T- als auch murine ES-Zellen (IDG3.2 und TBV2) wurden mit dem pUI4-SIBR-miR330-5p Expressionsvektor (modifiziert nach Chung et al, 2004) transient transfiziert, um miR330 zu überexprimieren. Reife miRNA330-5p wurde hierfür in die SIBR-(*synthetic inhibitory BIC-derived RNA*-) Kasette kloniert (Abb. 23) und verschiedene Mengen an miR330-Expressionsvektor (30-100 µg) wurden mittels Lipofektamin 2000 in die Zellen transfiziert (Abb. 23). Als Kontrollkonstrukt diente der Vektor pUI4-SIBR-miR335. Die Transfektionseffizienz wurde durch die CFP- (*cyan fluorescence protein*) Expression im Western Blot nachgewiesen.

Der Western Blot in Abbildung 24 zeigt, dass weder in HEK293T- noch in murinen ES-Zellen ein Anstieg von TDP-43 bei einer miR330 Überexpression nachgewiesen werden konnte. Das Kontroll-CFP Signal widerspiegelt die Transfektionseffizienz und zeigt in allen Transfektionsansätzen ein repräsentierbares Signal.

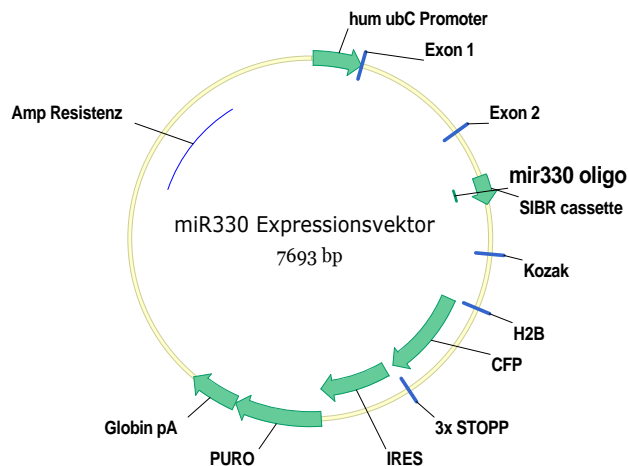


Abb. 23: Darstellung des pUI4-SIBR miR330 Expressionsvektors. Die SIBR Kasette ist Teil des nicht kodierenden Gens BIC, das im dritten Exon miR155 kodiert (Lagos-Quintana et al, 2002). Anstelle des miR155 loops wurde die miR330-5p Sequenz mittels BglIII-Restriktionsschnittstellen in die SIBR-Kasette kloniert. Der hum ubC (*human ubiquitin C*) Promotor initiiert die Expression der miR-Kasette (= SIBR Kasette) und von ORF-CFP. Der ORF (*open reading frame*) der H2B-CFP- (*cyan fluorescence protein* mit Histon-2B-*nuclear localisation signal*) Kasette dient als Indikator der miR Expression. Das Resistenzgen Puro in Kombination mit IRES hatte in diesem Assay keine Relevanz.

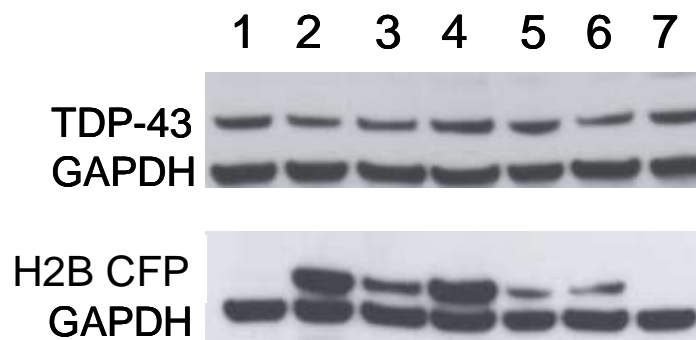


Abb. 24: Western Blot zur Analyse des TDP-43-Levels bei Überexpression von miR330.

Nr. 1-4: Mit Lipofektamin 2000 behandelte TBV2 ES-Zellen: 1 = Kontrolle, nicht transfizierte Zellen, 2 = 75 µg miR330 Expressionsvektor; 3 = 50 µg miR330 Expressionsvektor; 4 = 100 µg miR330 Expressionsvektor; Nr. 5-7: transfizierte HEK293T Zellen: 5 = 30 µg miR330 Expressionsvektor; 6 = 30 µg Kontrollvektor pUI4-SIBR miR335; 7 = Kontrolle, nicht behandelte Zellen. In allen Transfektionsansätzen (bis auf die beiden Kontrollen 1 und 7) wurde das Indikatorsignal CFP detektiert (27kDa + 15kDa H2B → 41kDa). Als Ladekontrolle diente GAPDH (36kDa). TDP-43 (43kDa) zeigte keine Veränderung in der Bandenintensität bzw. in seiner Expression.

In keinen der verwendeten Transfektionsmethoden, weder mit Lipofektamin 2000 bzw. Calcium-Phosphat noch mit Elektroporation (Daten nicht gezeigt) konnte eine Regulation von TDP-43 durch miR330 festgestellt werden. Auch bei einer

eingesetzten Menge von 100 µg Expressionsvektor (*sample 4* in Abb. 24) konnte kein Effekt der überexprimierten miR330 auf TDP-43 im Western Blot detektiert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass miR330 zwar in heterozygoten ES-Zellen hochreguliert wird, jedoch keinen direkten Einfluß auf TDP-43 selbst hat. Zusätzlich kann diese Beobachtung auch darauf hindeuten, dass sich erst ein additiver Effekt von mehreren verschiedenen miRNAs positiv auf das mRNA-Level von *Tardbp* auswirkt. Dabei könnten die zusätzlich identifizierten miRs eine Rolle spielen, die ebenfalls mit den bioinformatischen Vorhersageprogrammen gefunden wurden (Tab. 1). Im Zeitrahmen dieser Arbeit konnte allerdings dieses vermeintliche miRNA-Kollektiv nicht weiter untersucht werden.

VI.3. Adulte Tardbp^{+/-} Mutanten zeigen reduzierte motorische Fähigkeiten

Aufgrund der reduzierten TDP-43 Expression und der Kenntnis, dass *Tardbp* Mutationen v.a. in ALS-Patienten neurologische Defizite auslösen, wurden wildtypische und heterozygote Männchen, die Geschwister untereinander waren, im Alter von 5 Monaten und einem Jahr motorischen Tests unterzogen. In Patienten von FTLD und ALS wurden Zelleinschlüsse in Neuronen, Gliazellen und auch Motoneuronen diagnostiziert, die TDP-43 als Hauptkomponente enthielten. Bislang ist noch nicht klar, ob die humanen ALS-Mutationen *loss-of-function* oder dominante Mutationen sind. Die TDP-43 Pathologie verursacht im Menschen Verhaltensstörungen, Sprachstörungen und motorische Defizite. Um zu untersuchen, ob diese Debilitäten auch in adulten Mausmutanten auftreten, wurden explorative und motorische Verhaltenstests durchgeführt.

Eine erste makroskopische Analyse der heterozygoten Mutanten ergab, dass keinerlei Auffälligkeiten bezüglich Lebensfähigkeit, Fertilität, Körpergröße und Gewicht zu beobachten war. Das Verhalten bezüglich Motorik und Exploration erschien im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern zunächst unauffällig.

Daraufhin wurde eine detaillierte Verhaltensanalyse durchgeführt. Die Test-Batterie bestand aus dem offenen Feld, dem vertikal aufgerichteten Stab, dem RotaRod, der Gangart-Analyse sowie der horizontalen Leiter und sollte die Frage nach

motorischen Defiziten klären.

VI.3.1. Beschreibung der einzelnen Verhaltenstests

Die Untersuchung der motorischen Fähigkeiten erfolgte bei 8 männlichen Mutanten und 10 männlichen Kontroll-Wurfgeschwister in verschiedenen Tests.

Das offene Feld (*open field*) (Actimot System, TSE, Bad Homburg) erfasst das angeborene explorative Verhalten und die spontane Aktivität von Mäusen. Die zu testende Maus wurde in die Ecke einer offenen Box mit der Fläche von 45.5 x 45.5 x 39.5 cm platziert. Die Dauer des Experiments betrug 20 Minuten pro Maus. Gemessene Parameter waren die zurückgelegte Strecke, die Häufigkeit des Aufrichtens auf beide Hinterpfoten mit explorativer Intention (*rearing*), sowie als Maß für Ängstlichkeit die Aufenthaltsdauer und zurückgelegte Strecke im Zentrum der Box.

Beim vertikalen Stab Test (*pole test*) wird die Maus mit dem Kopf nach oben auf das obere Ende eines mit Klebeband umwickelten runden Stabes (Durchmesser 1 cm, Länge 50 cm) gesetzt und die Zeit des Wendens sowie des Herunterlaufens gemessen. Kritischer Punkt dieses Experiments ist die Koordination beim Wenden.

Das Rotarod (Bioseb, France) ist ein flexibles Tool, das die motorische Koordination und die Ermüdung der Mäuse studiert. Das Gerät besteht aus einer rotierenden Trommel, dessen Oberfläche aus einem griffigen Material besteht. Die Trommel ist in mehrere Fächer aufgeteilt, in die die Mäuse platziert werden. Die Geschwindigkeit der rotierenden Trommel erhöht sich innerhalb von fünf Minuten von vier auf 40 Umdrehungen pro Minute. Der interessante Parameter ist die Zeitspanne, während der sich die Maus auf der rotierenden Trommel halten kann.

Die Ganganalyse (*gait analysis*) im computergesteuerten CatWalk System (Noldus, Wageningen) studiert den zeitlichen Ablauf der Vorwärtsbewegungen der Maus, das Auftreten der Vorder- und Hinterpfoten sowie die Stellung der Pfoten zueinander.

Die horizontale Leiter (*ladder*) (Eigenbau, Helmholtz-Zentrum München) bewertet das geschickte Gehen auf einer Sprossenleiter und misst das Platzieren und Auftreten sowohl der Vorder- als auch der Hinterpfoten. Die Anzahl der Fehltritte bzw. das Abrutschen (*slips*) von den Sprossen gilt als Parameter für Koordinationschwäche.

VI.3.2. Auswertung der motorischen Tests

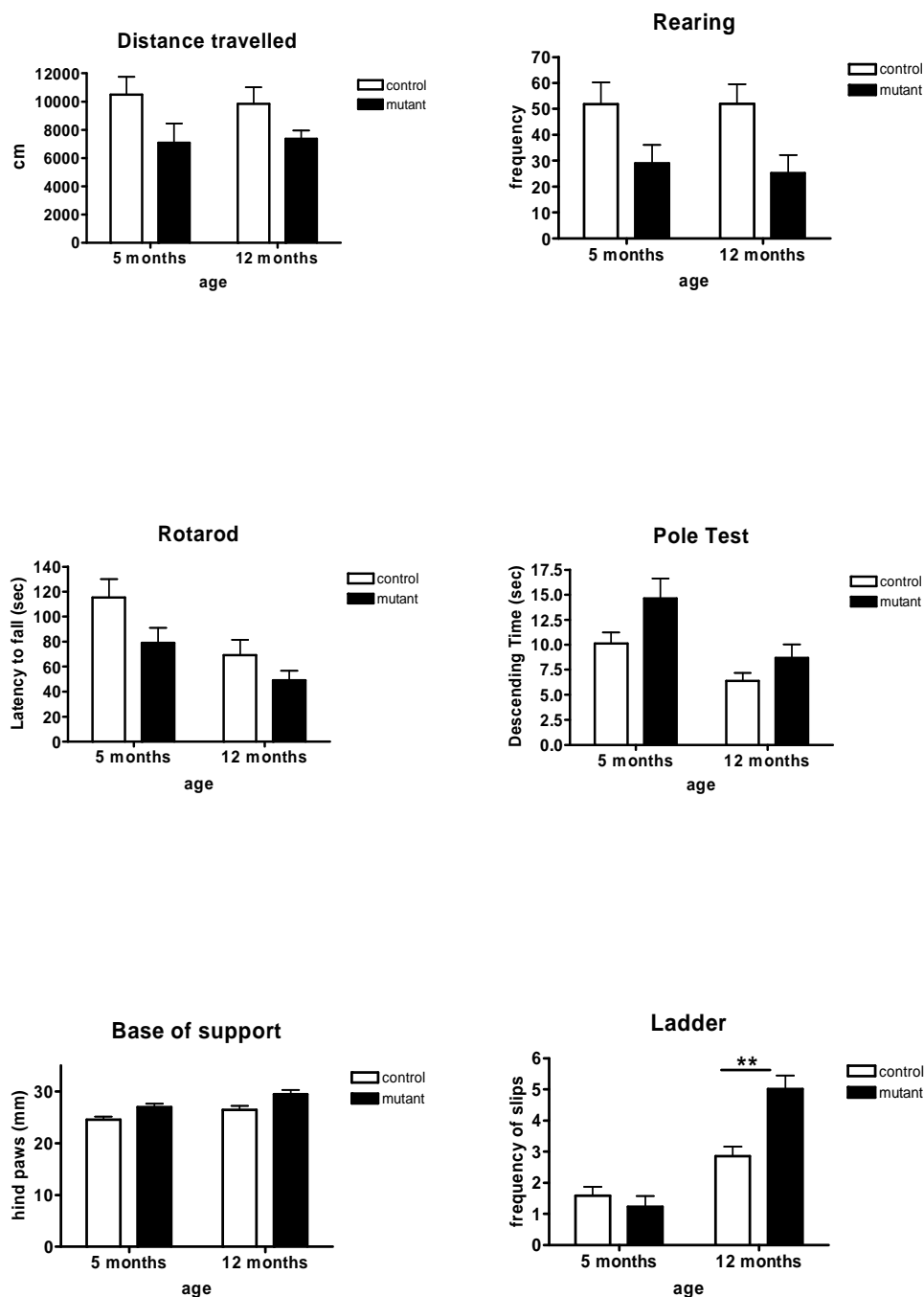


Abb. 25: Verhaltensanalyse der TDP-43 Mäuse im Alter von 5 und 12 Monaten.(oben) Spontan-Verhalten im offenen Feld. Tardbp +/- bewegten sich weniger (*distance travelled*), und zeigten reduzierte *rearing* Aktivität während der ersten 5 min im offenen Feld. Beurteilung der motorischen Fähigkeiten (Mitte). Heterozygote TDP43 Mutanten fielen schneller vom Beschleunigungs-Rotarod und benötigten mehr Zeit beim Herabsteigen des Stabs im *vertical pole test*. Außerdem zeigten Tardbp +/- Tiere eine breitere *Base of Support* der Hinterpfoten in der automatisierten *gait analysis* (unten links). Der *ladder*-Test (unten rechts) wies auf einen progressiven Verlust der Koordination in den älteren Mutanten hin. Dieser Test zeigte als einziger eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Alter. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte + SEM, n = 8-10; *P < 0.05 und **P < 0.01 vs. Kontroll-Wurfgeschwister.

Das spontan-Verhalten im offenen Feld, das eine neue und unbekannte Umgebung für die Mäuse darstellt, weist auf ein reduziertes, exploratives Verhalten bezüglich der vertikalen Bewegung (*rearing*) und auf verringerte Motivation in den 5 und 12 Monate alten Mutanten hin. Zusätzlich fand man in den Mutanten eine Reduktion in der Vorwärtsbewegung und reduziertes Erkunden des Zentrums (*distance travelled*) während der ersten 5 Beobachtungsminuten (Abb.25, oben). Die insgesamt zurückgelegte Wegstrecke und die verbrachte Zeit im Zentrum des Feldes waren zwar nicht in den Mutanten signifikant reduziert, jedoch zeigten die beiden letzten Beobachtungen ein erhöhtes Angstverhalten der Mutanten während des ersten Kontakts mit der neuen Umgebung.

Der Test am vertikalen Stab zeigte eine Störung im Bewegungsablauf der Mutanten, was durch ein verlangsamtes Herabklettern sichtbar wurde (Abb.25, Mitte rechts). Die Tests am Beschleunigungs-Rad (RotaRod) zeigten ein früheres Herabfallen bzw. ein reduziertes Koordinationsvermögen der Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Individuen (Abb.25, Mitte links). Beide Ergebnisse weisen auf eine beeinträchtigte motorische Koordination und Balance hin, was im Einklang mit dem verringerten Aufrichten der Mäuse im offenen Feld steht, das ebenfalls Balance fordert. Die Gangart-Analyse verifiziert ein großflächigeres Abstützen der Hinterpfoten der Mutanten im Vergleich zu den Kontroll-Tieren (Abb.25, unten links). Dies steht im Einklang mit den Gleichgewichtsproblemen, die bereits am vertikalen Stab und am RotaRod gefunden wurden. Der Ladder Test zeigte erst im Alter von 12 Monaten einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante (Abb. 25, unten rechts). Die Anzahl der *slips* war in den *Tardbp^{+/-}* Tieren deutlich erhöht und ist ein Parameter für reduzierte Koordination. Im Alter von 5 Monaten konnten hingegen noch keinerlei Defizite festgestellt werden.

Bei allen gewählten Parametern gab es einen signifikanten Genotyp-Effekt. Rotarod, Pole Test, Ladder und Base of Support zeigten zusätzlich einen signifikanten Alters-Effekt, der unabhängig vom Genotyp war. Nur mit dem Ladder-Test wurde eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Alter gefunden, d.h. dieser Parameter zeigte als einziger eine Progression, da die Mutanten im Alter von 5 Monaten noch keinerlei Defizit im Vergleich zu den Kontrollen zeigten (im Gegensatz zu allen anderen Parametern), sondern erst im Alter von 12 Monaten.

VI.3.3. Skelettmuskelfasern zeigen keine regenerative Morphologie

In Stewart et al. (2006) wurde beschrieben, dass mit motorischen Defiziten bzw. mit Muskelverlust oft eine Skelettmuskelregeneration (Myopathie) einhergeht, die an Muskelquerschnitten durch eine erhöhte Anzahl an kleineren *myotubes* (Muskel Fasern) sichtbar wird. Das Absterben von Motoneuronen führt ebenfalls zu motorischen Defiziten und sekundär zum Verlust von Muskelfasern.

Um die Frage zu klären, ob in den *Tardbp* Mutanten ebenfalls Skelettmuskelregeneration stattfindet, wurden von drei heterozygoten und zwei wildtypischen Männchen im Alter von 18 Monaten Skelettmuskelquerschnitte aus den vorderen und hinteren Extremitäten angefertigt und Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt.

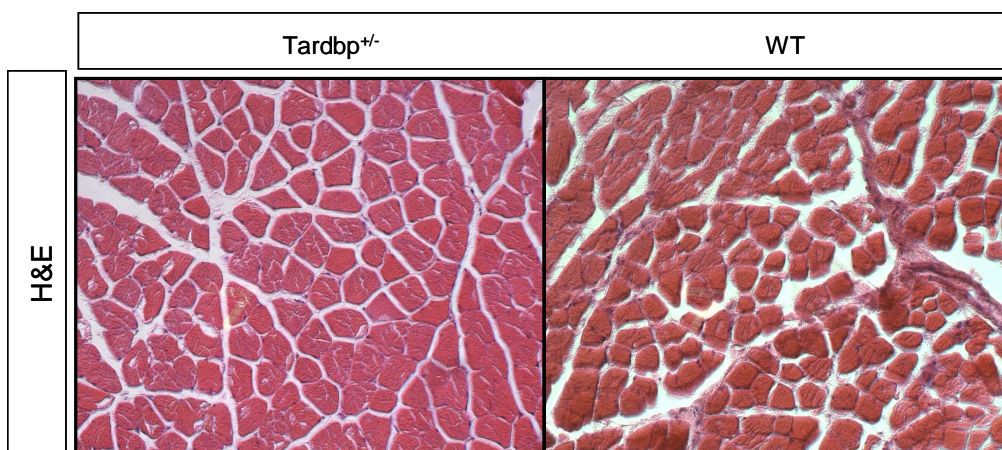


Abb. 26: Skelettmuskelquerschnitt von Mutante und Wildtyp im Vergleich. Die H&E Färbung zeigt einen regelmäßigen Aufbau der einzelnen Muskelfasern. Es sind keine Unregelmäßigkeiten oder regenerative Morphologien in den heterozygoten Mutanten zu erkennen. Vergrößerung: 200x

Mikroskopische Analysen der seriellen Schnitte zeigen keine Veränderungen der Muskelstruktur in den Mutanten (Abb. 26). Das Muskelfasermuster gibt keinen Hinweis auf einen Unterschied zwischen WT und *Tardbp*^{+/-} Tieren. Eine Muskelregeneration, die kleinere Muskelfasern und eine erhöhte Anzahl an *myotubes* im Querschnitt zeigen würde, konnte in den Skelettmuskeln der Mutanten nicht nachgewiesen werden.

VI.3.4. Anzahl der Motoneuronen in TDP-43 Mutanten unverändert

Eine reduzierte Anzahl an Motoneuronen wird oft in Menschen und Tiersystemen mit reduzierten motorischen Fähigkeiten gefunden und ist beispielsweise ein pathologisches Merkmal in der spinalen Muskelatrophie (SMA) (Fischer, 2007). Aufgrund dessen wurden zusätzlich zu den histologisch-morphologischen Skelettmuskel-Analysen auch Untersuchungen bezüglich der Motoneuronen-Anzahl im ventralen Horn des Rückenmarks durchgeführt (Abb. 27). Hierzu wurde das Rückenmark von drei männlichen Mutanten und drei männlichen Wildtypwurfgeschwistern im Alter von einem Jahr simultan präpariert, in Paraffin eingebettet und mittels immunhistologischen Methoden gefärbt. Zur Anfärbung von Motoneuronen wurde ein Acetylcholintransferase (AChT)-spezifischer Antikörper verwendet. Von 75 Rückenmark-Querschnitten wurden Motoneuronen des ventralen Horns der cervicalen, thorakalen und lumbaren Region gezählt (Abb. 28).

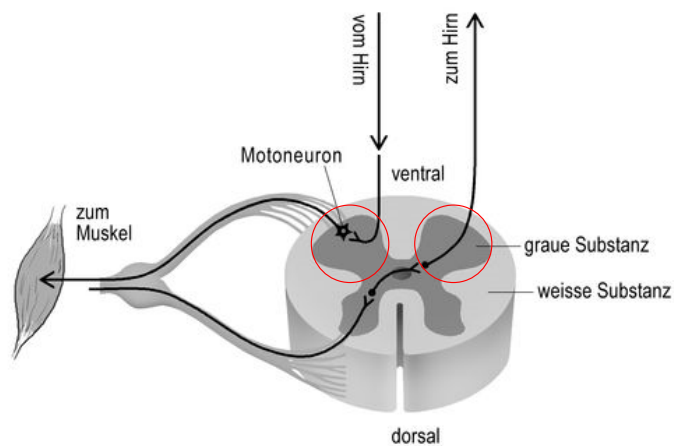


Abb. 27: Aufbau des Rückenmarks auf zellulärer und funktionaler Ebene. Die Zellkörper der Nerven der absteigenden motorischen Bahnen liegen im Gehirn. Ihr Axon verbindet sich mit einem spezifischen Motoneuron im ventralen Horn (rot umkreist). Das Signal gelangt somit vom Gehirn über das Motoneuron in die Extremitäten und löst im Muskel eine Kontraktion aus. Die aufsteigenden sensorischen Bahnen verlaufen über den dorsalen Bereich des Rückenmarks ins Gehirn (modifiziert aus www.ifp-zh.ch, 2008).

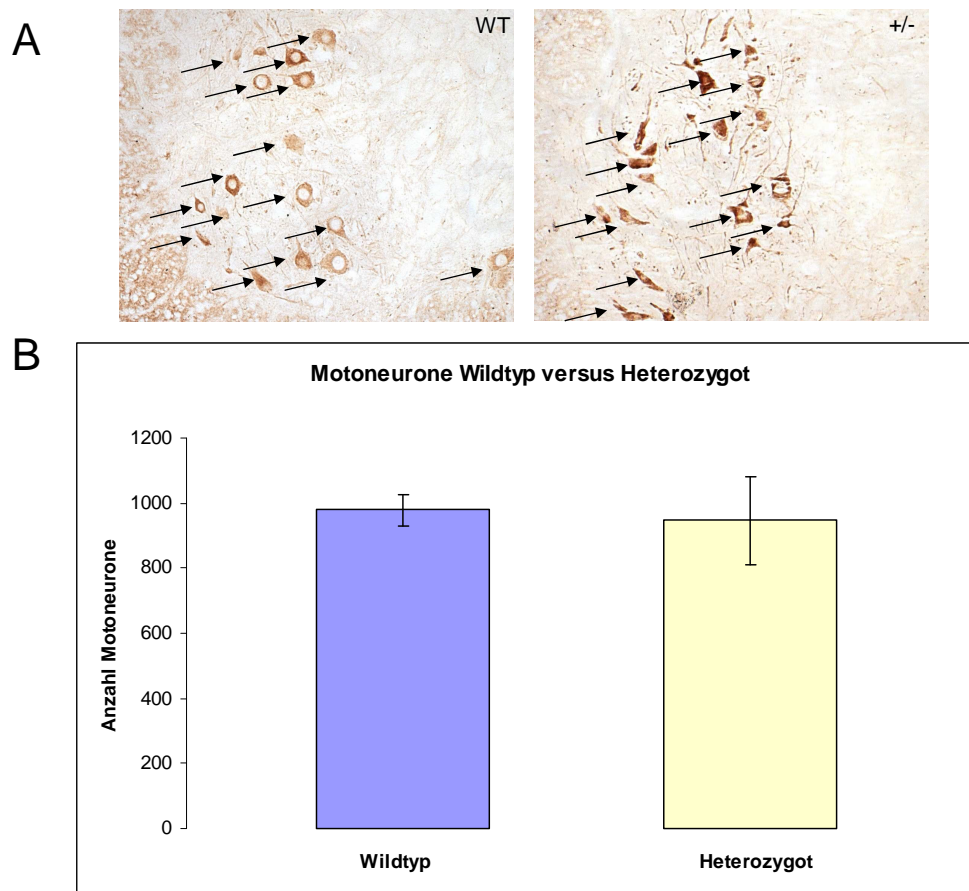


Abb. 28: Motoneuronen-Zählung im ventralen Horn von drei wildtypischen und drei heterozygoten Männchen im Alter von 12 Monate. A) Rückenmark Querschnitt: Ventrales Horn von Wildtyp und Mutante; die Pfeile markieren die gezählten Motoneurone. B) Die Auswertung von drei Tieren pro Genotyp zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Motoneurone ($p=0,7671$).

Wie Abbildung 28 zeigt, konnte keine reduzierte Anzahl an Motoneuronen in heterozygoten Tieren festgestellt werden. Die Berechnung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen 979 gezählten Motoneuronen im Wildtyp und 946 Motoneuronen in der Mutante. Der zelluläre Defekt, der sich in ALS-Patienten in der Degeneration von Motoneuronen widerspiegelt, findet in heterozygoten TDP-43 Mäusen im Alter von 12 Monaten nicht statt. Das Defizit der motorischen Fähigkeiten in männlichen Mausmutanten hat seinen Ursprung eventuell in der fehlerhaften Verschaltung von Neuronen im Subcortex und des Cerebellums, den Bereichen, wo Gleichgewicht und Koordination gesteuert werden, oder durch Schäden der subcortikalen motorischen Projektion (Van der Putten et al, 2000).

VI.4. Genotypisierung zeigt frühe Letalität von homozygoten Embryonen

Die Genotypisierung von 408 Nachkommen der ersten und zweiten Filialgeneration aus heterozygoten Verpaarungen zeigte, dass zum Zeitpunkt des Absetzens keine homozygoten Individuen gefunden wurden (Tab. 2)

Tag der Entwicklung	E3.5	E7.5	E8.5	E9.5	E10.5	E12.5	E16.5	Nach Entwöhnung
Anzahl	25	74	6	14	18	10	19	408
WT	8	25	2	2	7	3	5	168 (42%)
heterozygot	12	48	4	12	11	7	14	240 (58%)
homozygot	5	1	0	0	0	0	0	0

Tab. 2: Statistische Auswertung der Genotypisierung von Embryonen unterschiedlichen Alters und Nachkommen aus der F1 bzw. F2 Generation aus het/het Verpaarungen; Embryonen bzw. Mausschwänze wurden lysiert und DNA wie beschrieben extrahiert. Die Individuen wurden wie in Abb. 11 dargestellt mit einer Triplex-PCR analysiert.

Die genotypische Analyse von Embryonen unterschiedlichster Entwicklungsstadien wies auf einen Entwicklungsstopp von homozygoten Embryonen nach dem Blastozysten-Stadium hin. In diesem Stadium wurden fünf homozygote Embryonen von insgesamt 25 analysierten Embryonen identifiziert. Die frühe Letalität konnte somit um den Zeitpunkt der Implantation (E4.5) eingeordnet werden. Zu erwähnen ist, dass an Embryonaltag 7.5 ein homozygoter Ausreißer gefunden wurde, der bei der hohen Anzahl an genotypisierten Embryonen (74) im Stadium E7.5 statistisch nicht ins Gewicht fällt und auf eine geringe Variabilität des Phänotyps hindeutet.

VI.4.1. β -Gal Aktivität und Antikörperfärbungen zeigen unterschiedliche Expressionsmuster

Mit immunhistologischen- sowie β -Gal-Färbungen sollte die räumliche und zeitliche Expression von TDP-43 während der Embryonalentwicklung untersucht werden um eine mögliche Ursache der frühen Embryonen-Sterblichkeit zu finden.

Es wurden heterozygote Embryonen aus unterschiedlichsten Entwicklungsstufen, die das Reporter gen lacZ unter der Kontrolle des endogenen *Tardbp* Promotors inseriert haben, mit X-Gal Färbelösung gefärbt. Ergänzend wurden Wildtyp-Embryonen immunhistologisch mit dem polyklonalen TARDBP-spezifischen Antikörper gefärbt.

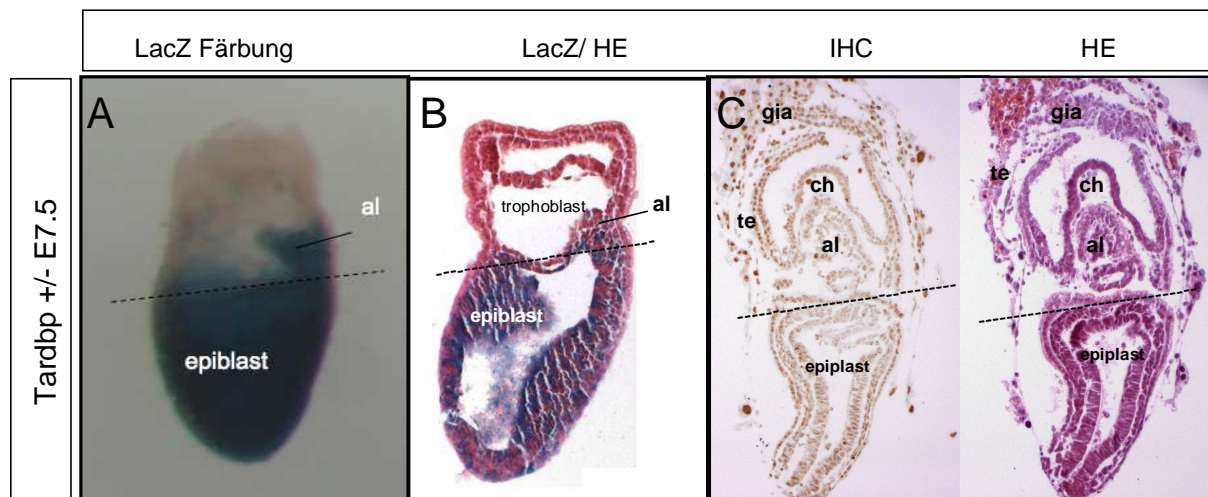


Abb. 29: LacZ- und immunhistochemische Färbungen an Embryonen des Embryonalaltages 7.5. A) Die lacZ Färbung zeigt eine deutliche Abgrenzung zwischen Epiblast und Trophoblast. Nur der embryonale Teil der *Tardbp*^{+/-} Mutante wird mit dem β -Galactosidase Assay stark angefärbt, der Trophoblast bleibt, wie im Paraffinschnitt deutlich wird, komplett ungefärbt (B). C) Die Antikörper Färbung gegen das C-terminale TARDBP zeigt eine ubiquitäre TARDBP Expression im Embryo. Sowohl im Epiblast als auch im Trophoblast wurde TARDBP detektiert. Diese beiden Färbungen sind sich bezüglich ihrer Aussage widersprüchlich. Die lacZ Färbung widerspiegelt nicht die komplette Expression von TARDBP.

Zunächst wurde die zellspezifische Expression von *Tardbp* in Embryonen des Embryonalaltages 7.5 untersucht. Die β -Gal Reporter gen-Aktivität an Ganzkörperembryonen und Paraffinschnitten zeigte eine starke und eindeutige Anfärbung des gesamten Epiblasten und der aus embryonalem Mesoderm entstandenen Allantois (Abb. 29A). Die Zellschichten des Trophoblasten waren völlig frei von β -Gal Aktivität. Der Paraffinschnitt (Abb. 29B) verdeutlicht die fehlende Färbung des trophectodermalen Gewebes. Die β -Gal Färbung detektierte somit eine spezifische *Tardbp* Expression im embryonalen Gewebe und in der Allantois.

Im Gegensatz dazu zeigte die Antikörper-DAB-Färbung an Paraffinschnitten von C57Bl/6J Embryonen eine komplette Färbung sowohl des embryonalen als auch des extraembryonalen Gewebes (Abb. 29C). Der Antikörper, der in einer um 50 %

reduzierten Verdünnung im Vergleich zur empfohlenen Dosis verwendet wurde, zeigte neben der starken Anfärbung der Nuklei im Epiblast die stärkste Anfärbung der Zellkerne im Trophoblasten und den Riesenzellen.

Diese unterschiedlichen und widersprüchlichen Expressionsmuster der lacZ- und Antikörper-Färbung in Embryonen des Embryonaltages 7.5 ließen vermuten, dass

- a) entweder die β geo-Insertion alternativ gespleißt wurde und verkürzte *Tardbp* Isoformen, die im Trophoblasten aktiv sind, nicht von der β -Gal Aktivität abgefangen wurden oder, dass
- b) die β geo-Insertion einen Trophoblast-spezifischen *enhancer* negativ beeinträchtigt oder, dass
- c) ein zweiter, ausschließlich im Trophoblast aktiver Promotor stromabwärts der β geo-Insertion vorhanden ist und diese zusätzliche Promotor-Aktivität nicht von der stromaufwärts gelegenen Reporter-kassette abgefangen werden kann.

Während Hypothese a) und b) lediglich mit Hilfe weiterer Mausmutanten mit stromabwärts gelegener Insertionen beantwortet werden könnten, sollte Hypothese c) im Folgenden untersucht werden.

VI.4.2. Zwei-Promotoren Theorie

Um die Frage zu klären, ob es noch zusätzliche Transkripte gibt, die am 3' Ende der β geo Insertion beginnen, wurde eine 5'RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) durchgeführt. Die hypothetischen Transkriptionsstarts sollten anhand der Sequenz der 5'RACE Produkte bestimmt werden. Um die unbekanntenen 5' Enden zu identifizieren, wurden Gen-spezifische Primer entworfen, die entweder von Exon 3 oder von Exon 4 initiieren (Abb. 30). Die Sequenzierungsergebnisse der klonierten Fragmente lieferten für beide Primerkombinationen Transkripte, die im Exon 2 beginnen (Abb. 30). Das kürzere Transkript mit dem Amplifikationsstart in Exon 3 lieferte ein um 21 Nukleotide verkürztes Fragment zum ersten ATG. Dem zweiten verkürzten Fragment, das mit den Primern aus Exon 4 identifiziert wurde, fehlten 51 Nukleotide zum ersten ATG. Somit waren beide Transkripte im Leserahmen zum nächsten ATG.

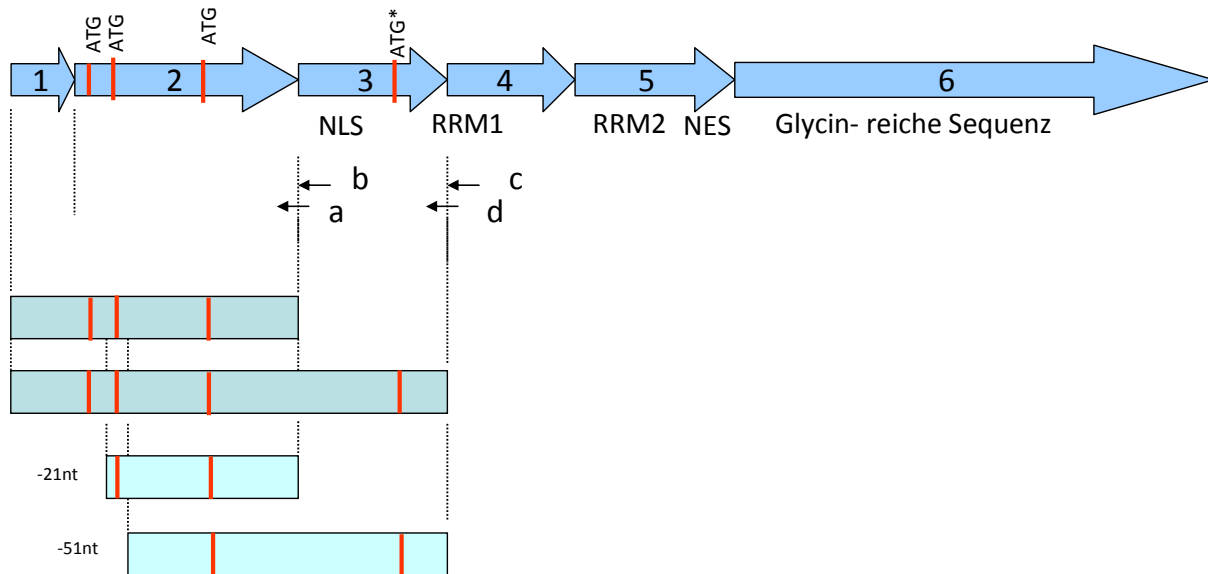


Abb. 30: Für die 5'RACE-Analyse wurden die abgebildeten Primerpaare a/b (Beginn Exon 3) oder c/d (Beginn Exon 4) verwendet, um alternative Transkripte von *Tardbp* zu bestimmen. Ein alternativer Transkriptionsstart (ATG*), der ein TDP-43 Protein ohne NLS bildet, wurde bereits beschrieben (Nishimoto et al, 2010). Zusätzlich zu dem beschriebenen Transkriptionsstart in Exon 1 wurden mit beiden Primerkombinationen Transkripte, die in Exon 2 21 oder 51 Nucleotide stromabwärts des ursprünglich beschriebenen ATGs initiieren, gefunden. Dies gibt eine zusätzliche Promotor-Region in Intron 1 an. NLS: *nuclear localization sequence*; RRM: *RNA-recognition motif*; NES: *nuclear export signal*.

Diese Ergebnisse zeigten zusätzliche Transkriptionsstarts nach dem ersten ATG im Exon 2. Wie in Nishimoto et al (2010) bereits beschrieben wurde, werden von *Tardbp* weitere Isoformen translatiert, deren Translationsstarts stromabwärts des ersten ATGs liegen. Ergänzend ist hinzuzufügen, dass mittels des Promotor-Vorhersage Programmes Genomatrix die Existenz eines zweiten Promotors in Intron 1 von *Tardbp* prognostiziert wurde (Abb. 31). Dieser vermeintlich zweite Promotor gibt die Möglichkeit des Mitwirkens von zusätzlichen *enhancern* und Transkriptionsfaktoren an, die zellspezifisch und gewebespezifisch in unterschiedlichen Zeitfenstern verschiedene Expressionsmuster von *Tardbp* generieren. Der β -Gal Reporter versäumt somit durch die frühe Vektor-Integration am 5' Ende in Intron 1 das Abfangen von zusätzlichen Transkripten, deren Transkriptionsstart in 3' Richtung verschoben ist.

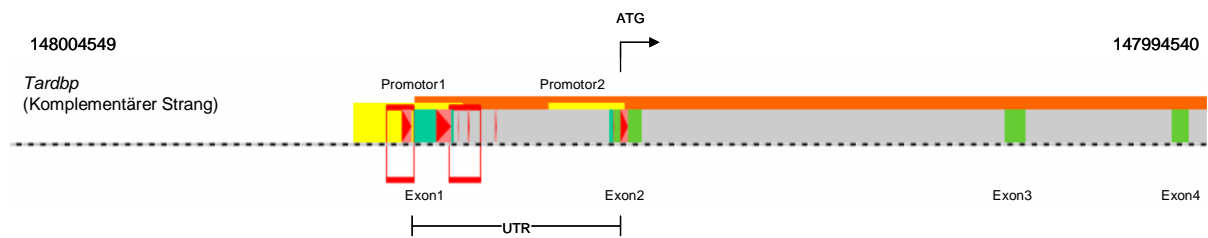


Abb. 31: *Tardbp* Analyse mit dem Promotor-Vorhersage Programm Genomatix. Zusätzlich zu der ersten Promotorregion (gelb), die sich am 5'UTR befindet, wird noch eine weitere Promotorregion vorhergesagt, die beginnend in Intron 1 bis in die kodierende Sequenz (cds) von Exon 2 (hellgrün) reicht.

VI.4.3. TDP-43 ist am extraembryonalen Phänotyp beteiligt

Um zu untersuchen, ob TDP-43 auch zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt im extraembryonalen Gewebe exprimiert wird, wurden *lacZ* Färbungen und immunhistologische Analysen an Plazentaquerschnitten zum Zeitpunkt E10.5 durchgeführt.

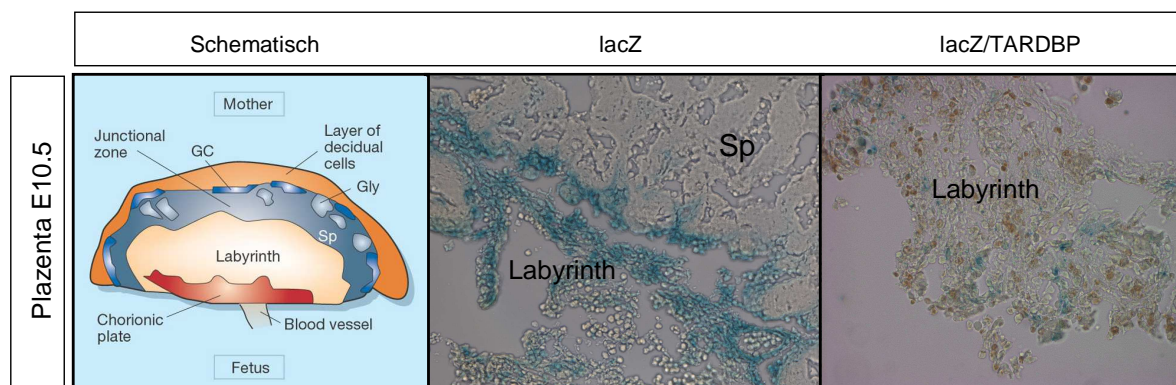


Abb 32: *lacZ*-Färbung und TARDBP-Immunohistologie an einem Plazentaquerschnitt zum Zeitpunkt E10.5. Die auffällige Blaufärbung im Labyrinth (Mitte) und der zusätzliche Nachweis von TARDBP mittels einer Antikörper-Färbung (rechts) zeigt, dass TARDBP im extraembryonalen Gewebe exprimiert wird. Der schematische Aufbau einer Mausplazenta (links) verdeutlicht die Position des Labyrinths (entnommen aus Rossant und Cross, 2001). Sp = Spongiotrophoblast., GC = *giant cells* (Riesenzellen).

Die *lacZ*-Färbung und die immunhistologischen Expressionsanalysen von TDP-43 an der Plazenta zeigten, dass TDP-43 zusätzlich zum embryonalen- auch stark im

extraembryonalen Gewebe, nämlich im Labyrinth der Plazenta, exprimiert wird (Abb. 32). Hier liegt dasselbe Expressionsmuster mit β -Gal-Aktivität oder Antikörper-Färbung vor. Das Labyrinth, das nach der chorioallantoischen Fusion aus Allantois und Chorion gebildet wird, hat seinen Ursprung sowohl im embryonalen als auch im extraembryonalen Gewebe. TDP-43 übernimmt somit während der Einnistung, die vom Trophoblasten übernommen wird zusätzlich während der Plazentation eine funktionelle Aufgabe, wie durch das Expressionsmuster der Plazenta verdeutlicht wird.

Eine Implantation des Embryos kann ohne den Trophoblasten nicht stattfinden. Das Überleben des Embryos ist in späteren Entwicklungsstadien aber nur in Verbindung mit dem mütterlichen Kreislauf möglich. Da TDP-43 gerade in diesen überlebensnotwendigen Implantations-Geweben exprimiert ist, liegt die Annahme nahe, dass die frühe Letalität durch die fehlende Expression in diesen Geweben zustande kommt.

Um die Frage eines extraembryonalen Defekts durch die TDP-43 Mutation zu klären, wurde ein tetraploider *rescue* durchgeführt.

VI.4.3.1. Hintergrund: Tetraploide Aggregation

Die tetraploide Aggregation bzw. der tetraploide *rescue* kann die Frage eines Plazenta-Defekts und somit auch die frühe Letalität von TDP-43 *k.o.*-Mutanten klären.

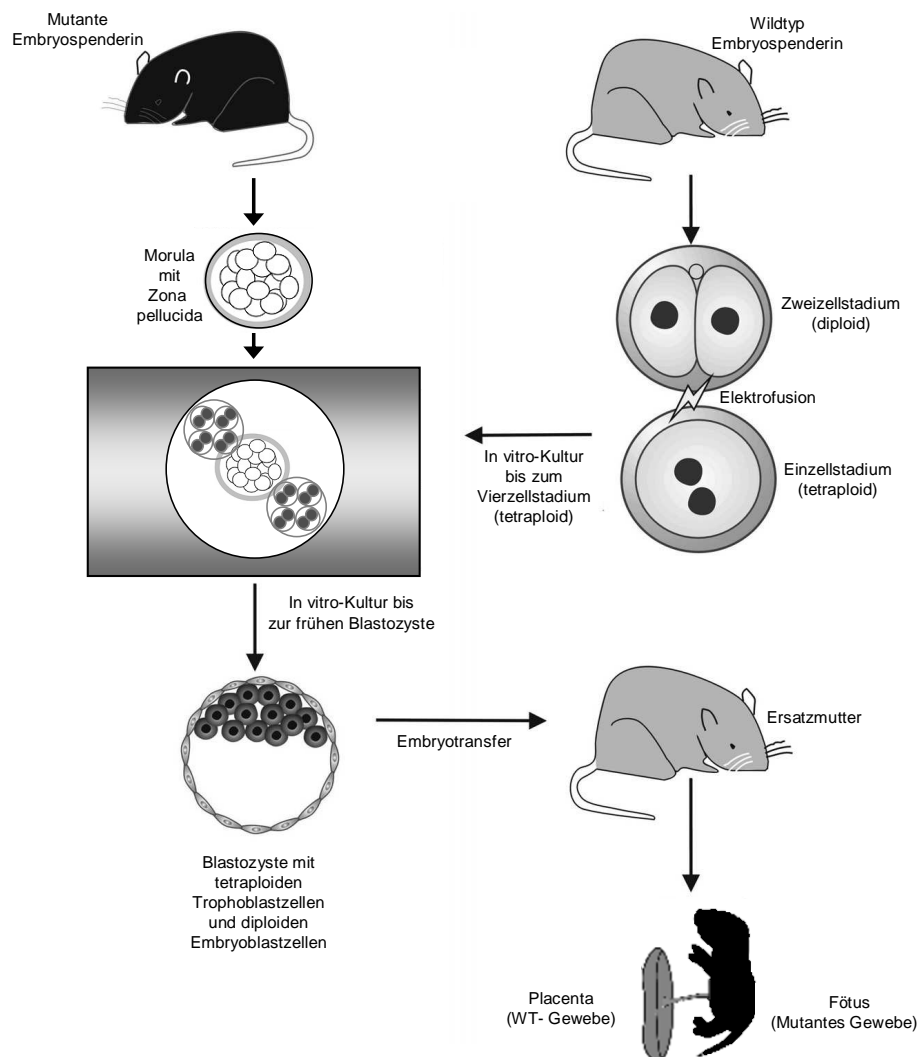


Abb 33: Exkurs: Erzeugung von Mäusen aus ES-Zellen mit Hilfe der tetraploiden Aggregation (nach Nagy et al, 1993).

Bei diesem Verfahren werden diploide Zellen mit entsprechender Nullmutation mit tetraploiden wildtypischen Zellen aggregiert. Während das embryonale Gewebe der Chimären ausschließlich aus diploiden Zellen entsteht, tragen die tetraploiden Wt-Zellen zum extraembryonalen Gewebe bei. Die diploiden Zellen mit einer *loss-of-*

function Mutation werden aus Morulae (E2.5) einer heterozygoten Muttermaus gewonnen, die mit einem heterozygoten Männchen verpaart wurde. Die Morulae, die zu 25 % Homozygotie bezüglich der Mutation zeigen, fusionieren nun einzeln mit tetraploiden Wildtyp-Zellen, die mit Hilfe eines Elektroschocks aus diploiden Embryonen des Stadiums E2.5 gewonnen wurden (Abb. 33) (Nagy et al, 1993). Da nicht auszuschließen ist, dass extraembryonales Gewebe auch von mutanem Gewebe gebildet wird, spricht man von einem partiellen *rescue*.

Zeigen die chimären Embryonen der Leihmutter ab dem Zeitpunkt der Plazentabildung (E8.0) keinen Defekt mehr, so kann man davon ausgehen, dass das ausgeschaltete Gen der Nullmutante am extraembryonalen Phänotyp beteiligt ist.

VI.4.3.2. Der extraembryonale Phänotyp kann „gerettet“ werden

Das Experiment des tetraploiden *rescue* wurde insgesamt viermal wiederholt und erbrachte eine Gesamtausbeute von 31 Embryonen, die zwischen E8.5 und E10.5 präpariert wurden. Zwei dieser Embryonen zeigten einen homozygoten Genotyp, wobei erwähnt werden muss, dass diese Embryonen zum Zeitpunkt der Präparation bereits nekrotisch waren (Abb. 34). Wurde die Leihmutter erst am Tag E9.5 bzw. E10.5 geöffnet, so fand man im gesamten Uterus ausschließlich nekrotisches, extraembryonales Gewebe innerhalb der Decidua. In diesen Stadien wurden 12 Chimären analysiert, unter denen sich kein homozygoter Embryo befand.

Diese Beobachtung zeigte, dass homozygote Embryonen in Verbindung mit Wildtypzellen, die den Trophoblasten generieren, länger überleben als Embryonen mit fehlendem bzw. reduziertem *Tardbp* Level in der Plazenta. Somit kann der extraembryonale Phänotyp in TDP-43^{-/-} Mutanten durch das *rescue*-Experiment teilweise kompensiert werden. Dieses Ergebnis bestärkt die Hypothese, dass TDP-43 an der Generierung von extraembryonalem Gewebe beteiligt ist und die Entwicklung des Trophoblasten beeinflusst. Die Expression von TDP-43 im Trophoblasten und im Labyrinth bekräftigen zusätzlich diese Annahme.

Zugleich verstärkt das Resultat der tetraploiden Aggregation die kritische Funktion von TDP-43 im Epiblasten, da keine lebensfähigen Embryonen zu einem späteren Zeitpunkt als E9.0 gefunden wurden.

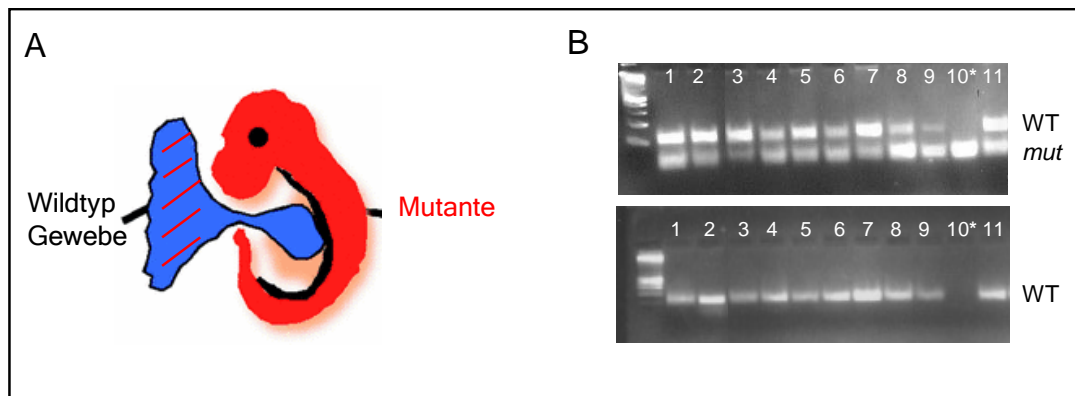


Abb. 34: Partieller *rescue* A) Schematische Präsentation des Embryos und der Plazenta nach einer tetraploiden Aggregation: die Wildtyp-Zellen generieren die Plazenta (blau), die Zellen aus der Mutante bilden den Embryo (rot) und partiell extraembryonales Gewebe (rot gestrichelt). Zwei der 31 isolierten Embryonen zwischen Tag E8.5 und E9.5 waren homozygot und bereits nekrotisch. B) Darstellung der Genotypisierungs-Ergebnisse einer Triple-PCR von elf Embryonen (E9.5) aus der tetraploiden Aggregation. Embryo Nr.10 (*) zeigt keine WT-Bande, aber eine starke Mutanten-Bande (132bp). Zur Kontrolle wurde eine PCR ausschließlich mit WT-Primern durchgeführt; hier konnte keine Bande im Embryo Nr.10 detektiert werden, was die Homozygotie bestätigt.

VI.4.3.3. TDP-43 ist essentiell für die Entwicklung des Trophoblasten

Um aufzuklären, ob TDP-43 an der Entwicklung des Trophoblasten beteiligt ist, wurden Blastozysten-Explantate aus einer heterozygoten Muttermaus, die mit einem heterozygoten Männchen verpaart wurde, entnommen und auf murinen Fibroblastenzellen für 10 Tage unter ES-Zellkulturbedingungen kultiviert. Nach dieser Wachstumsphase konnten mittels einer TDP-43 Immunfärbung Trophoblastenzellen und Riesenzellen an heterozygoten und wildtypischen Embryonen identifiziert werden (Abb. 35A), jedoch nicht oder stark reduziert in homozygoten Blastozysten (Abb. 35B). Das Wachstum des Epiblast war in allen drei Genotypen normal verlaufen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass TDP-43 eine essentielle Funktion während des Wachstums und der Differenzierung von extraembryonalem Gewebe hat und die *k.o.*-Mutante keinen Trophoblasten ohne TDP-43 Expression entwickeln kann. Dies erklärt auch die frühe Letalität zum Zeitpunkt der Implantation, denn ohne Trophoblastengewebe ist eine Einnistung in den Uterus und eine Verbindung mit dem mütterlichen Kreislauf nicht möglich (Rossant und Cross, 2001).

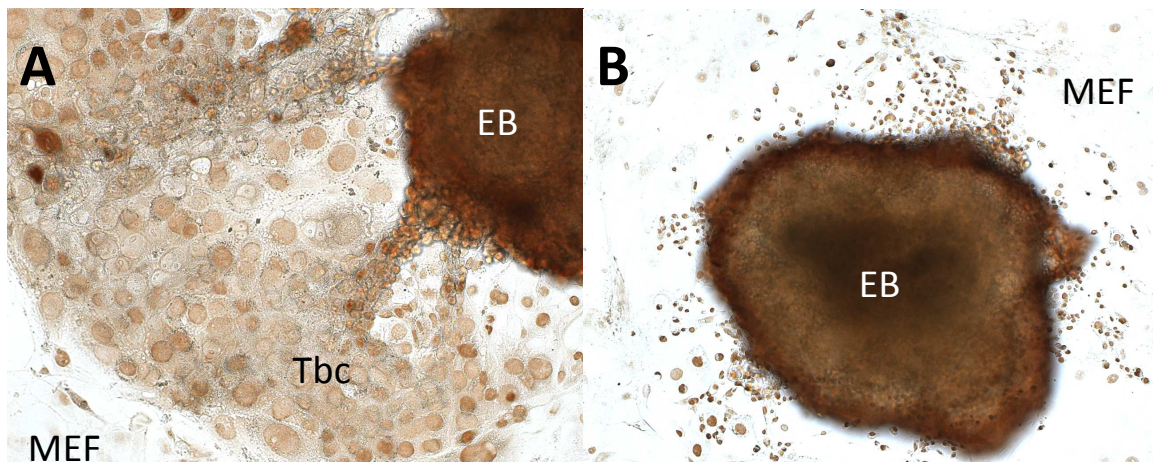


Abb. 35: Blastozysten-Explantate von 3.5 Tage alten Embryonen aus het x het Verpaarungen. Die Blastozysten wurden für 10 Tage auf murinen Fibroblastenzellen in Kultur genommen und daraufhin mit dem polyklonalen TARDBP Antikörper gegengefärbt. Der Embryonalkörper und die herausgewachsenen Trophoblastenzellen (A) zeigen TDP-43 Expression. In (B) fehlen die Trophoblastenzellen gänzlich. (A) Wildtyp, (B) homozygote Mutante. EB: Embryonalkörper; Tbc: Trophoblastenzellen; MEF: murine embryonale Fibroblastenzellen. Vergrößerung: 200x

VI.5. Expressionsstudien von älteren Embryonen post-Implantation zeigen keine weiteren Diskrepanzen

VI.5.1. Untersuchung der Expressionsmuster mit Antikörperfärbung und β -Gal Färbung

Da zu Beginn dieser Arbeit keinerlei Studien über die embryonale Expression von *Tardbp* in der Maus bekannt waren, wurden zusätzlich zu den vorangegangenen E7.5 Analysen weitere Expressionsuntersuchungen an älteren Embryonen durchgeführt.

Es wurden konventionelle, histochemische Methoden wie die Immunfärbung und die β -Gal Färbung verwendet. Alle drei Methoden sollten weitere Informationen zur embryonalen *Tardbp* Expression liefern und Hinweise auf dessen Funktion vermitteln.

Betrachtet man Färbungen von Embryonen im Alter von 8.5 Tagen (Abb.36 und 37), so findet man keine Diskrepanz zwischen der lacZ- und Antikörper-Färbung, da der

Embryo frei von trophectodermalen Gewebe ist und das ‚kritische‘ extraembryonale Gewebe den Embryo zur Bildung der Plazenta bereits verlassen hat.

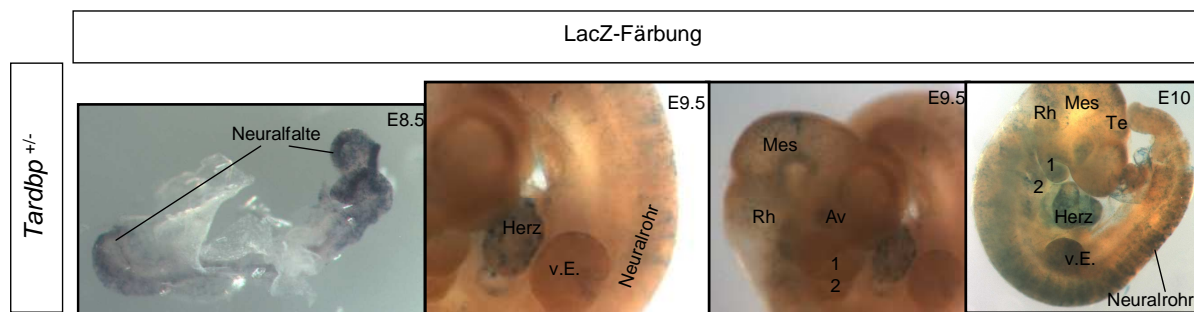


Abb. 36: lacZ Färbungen an *Tardbp*^{+/-} Embryonen zwischen Embryonaltag 8.5 und 10.

An Tag 8.5 ist eine ubiquitäre lacZ Färbung im gesamten Embryo zu beobachten, v.a. aber in der Neuralfalte. An Tag 9.5 ist eine Expression von *Tardbp* im Neuralrohr, im Herzen im Augenvesikel sowie im Mittel- und Hinterhirn zu sehen. An Tag 10 tritt die Anfärbung der vorderen Extremitätenknospe (v.E.) und der Branchialbögen 1 und 2 deutlich hervor. Das Herz, das Neuralrohr und die Somiten zeigen ebenfalls eine starke Blaufärbung. Wie an Tag 9.5 so sind auch an Tag 10 das Telencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon angefärbt. Auffällig ist die gemusterte lacZ Anfärbung während aller Embryonalstadien. Rh = Rhombencephalon, Mes = Mesencephalon, Te = Telencephalon, Av = Augenvesikel, 1, 2 = 1 und 2. Branchialbogen, Herz = Endocardium (Bulbus arteriosus) (E9.5, E10), v. E. = vordere Extremitätenknospe.

Die Embryonen an Embryonaltag 8.5 zeigen eine starke Anfärbung der Neuralfalte sowohl in der β -Gal Färbung als auch in der Immunfärbung. Embryonen an Tag 9.5 und Tag 10 zeigen einen intensiven blauen Niederschlag im Neuralrohr, im Rhombencephalon und Telencephalon sowie in den vorderen Extremitätenknospen und im Herzen.

Durch histologische Schnitte der gefärbten Embryonen lassen sich lacZ Markergenexpressionen und immunologische Färbungen gezielter zuordnen. Im Neuralrohr von 10.5 Tage alten Embryonen wurden Farb-Niederschläge im Bereich der Neuralscheitel-Zellen, die zwischen der Epidermis bzw. des Ectoderms und der prospektiven Neuralplatten liegen, und den interneuronalen Vorläuferzellen detektiert. Diese Färbung war im Neuralrohr asymmetrisch (Abb. 37, lacZ).

Mit einer Immunfärbung desselben Stadiums konnte ebenfalls die Expression von *Tardbp* in den dorsalen und migrierenden Neuralleistenzellen nachgewiesen werden. Neuralleistenzellen migrieren ab Embryonaltag 10 aus dem Neuralrohr und entwickeln Teile des peripheren bzw. vegetativen Nervensystems, beispielsweise im Herzen. Aber auch viele weitere Gewebearten können aus diesen pluripotenten Zellen entstehen, wie Haut, Kiefer, Knorpel. Die lacZ Färbung eines Embryos zum

Zeitpunkt E10 zeigt die Ansiedlung von migrierenden Neuralleistenzellen in den Ventrikeln und im Ausflußtrakt des Herzens. Die Immunfärbung mit dem *Tardbp*-spezifischen Antikörper bestätigt die TDP-43 Expression in den Neuralleistenzellen zum Zeitpunkt E10.5 und spiegelt auch den Migrationsverlauf der Neuralleistenzellen wider, der in ventraler Richtung entlang der Somiten verläuft (Abb. 37, IHC).

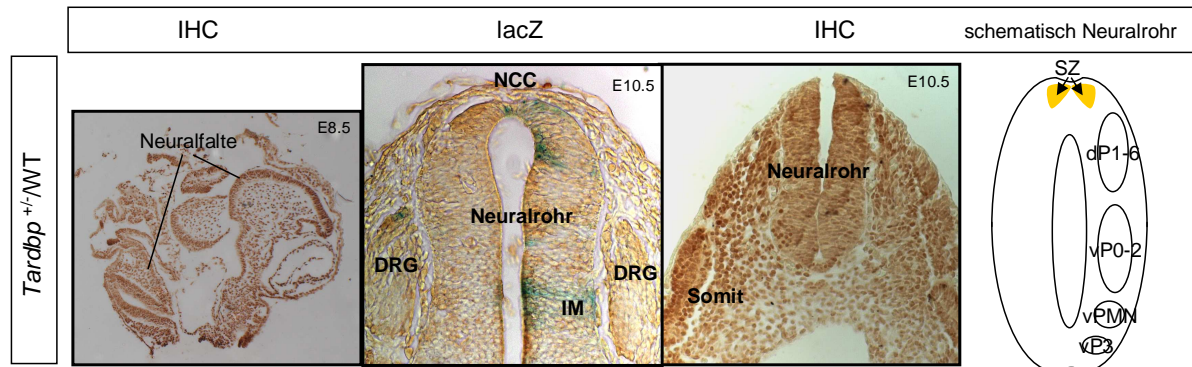


Abb. 37: lacZ und immunohistochemische (IHC) Färbungen an Embryonen Tag E8.5 und E10.5. An Tag 8.5 (links) ist TARDBP im Embryo mit IHC ubiquitär exprimiert. Auffällig ist die starke Anfärbung der Neuralfalte. Die ubiquitäre Expression verliert sich 2 Tage später (E10.5) (Mitte) in einer definierten Expression von *Tardbp* im Neuralrohr, insbesondere in den Neuralleistenzellen (NCC=*neural crest cells*), in den Vorläufer der intermediären Motoneurone (IM) und punktuell im *dorsal root ganglion* (DRG) (verdeutlicht durch die lacZ Färbung) sowie in den Somiten (sichtbar in IHC). Schematische Darstellung des Neuralrohr (rechts): dP1-6: dorsale Vorläuferzellen, vP0-2: ventrale Vorläuferzellen der Interneurone, vPMN: ventrale Vorläuferzellen der Motorneurone, vP3: ventrale Vorläuferzellen, SZ: Scheitelzellen.

Der Bereich der interneuronalen-Vorläuferzellen (vP0-2) ist in der lacZ Färbung zum Zeitpunkt E10.5 punktuell angefärbt (Abb. 37, lacZ). Die Vorläufer der Interneurone bilden sich in späteren Stadien als Bindeglied zwischen den oberen und unteren Motorneuronen in der grauen Substanz aus. Die Anfärbung dieser Region deutet an, dass *Tardbp* funktional an der Verschaltung von Motorneuronen im Rückenmark beteiligt ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zellspezifischen Expressionsmuster von *Tardbp*, die mit immunhistologischen Methoden oder mit der Reportergen-Aktivität zwischen den Embryonaltagen 8.5 und 10.5 nachgewiesen wurden, nicht mit der Funktion von TDP-43 gleichzusetzen sind. Die Funktion von TDP-43 ist bereits im sehr frühen Embryonalstadium zum Zeitpunkt der Implantation von großer Bedeutung, wie der früh letale Phänotyp verdeutlicht. Jedoch kann TDP-43 auch im

weiteren embryonalen Entwicklungsverlauf als multifunktionelles Protein wichtige Rollen in spezifischen Organen und Geweben, wie dem Herzen, dem Rückenmark oder dem Mittelhirn, übernehmen.

VI.5.2. Whole mount *in-situ* Hybridisierungen korrespondieren teilweise mit der Antikörperfärbung

Um die durchgeführten Expressionsstudien des Proteins TDP-43 zu verifizieren, wurde auch die mRNA Expression an ganzen Embryonen verschiedenster Entwicklungsstufen mittels nicht-radioaktiver mRNA *in-situ* Hybridisierung (ISH) unter Verwendung Digoxigenin-markierter RNA Sonden untersucht. Hierfür wurden *Tardbp*-spezifische *antisense*-mRNA Proben verwendet. Für die *Tardbp*-mRNA Expression und Lokalisation wurden Mausembryonen der Stadien E7.5, E8.5, E9.0 und E11.5 untersucht. Das Kontrollexperiment wurde unter Verwendung des komplementären *sense*-Stranges als Sonde für die *in-situ* Hybridisierung durchgeführt. Die *sense*-Sonde lieferte kein spezifisches Hybridisierungssignal in den Mausembryonen (Daten nicht gezeigt).

Der 7.5 Tage alte Embryo zeigte eine Violettfärbung sowohl im Epiblasten als auch im Trophoblasten (Abb. 38), was mit der Antikörperfärbung korrespondiert (Abb. 29C). Embryonales als auch extraembryonales Gewebe wurde hier mittels der RNA-Sonde angefärbt. Am Embryonaltag 8.5 konnte eine intensive Anfärbung der Neuralfalte beobachtet werden. Die *Tardbp*-mRNA Expression des sich entwickelnden ZNS wurde auch an Tag 9.0 gesehen, da sowohl im Neuralrohr als auch im Pros-, Mes- und Rhombencephalon eine starke *Tardbp* Expression detektiert werden konnte (Abb. 38). Der Aortenbulbus zeigte ebenfalls ein starkes Hybridisierungsmuster, das sich wiederum mit der lacZ Färbung deckte (Abb. 36).

Tag 11.5 zeigte eine starke *Tardbp* mRNA-Detektion im Telen- und Rhombencephalon sowie im Neuralrohr (Abb. 38). Auffällig ist auch die Färbung der vorderen und hinteren Extremitätenknospen sowie des 1. und 2. Branchialbogens, aus denen sich Mandibeln (1.) und Zugenbein (2.) entwickeln (Theiler, *The house mouse, Atlas of embryonic development*, 1989). Allerdings ist während dieses Stadiums keine Expression im Herzen zu erkennen, was nach der Anfärbung des Aortenbulbus an Tag 9 und der lacZ-Färbeergebnisse zu erwarten gewesen wäre.

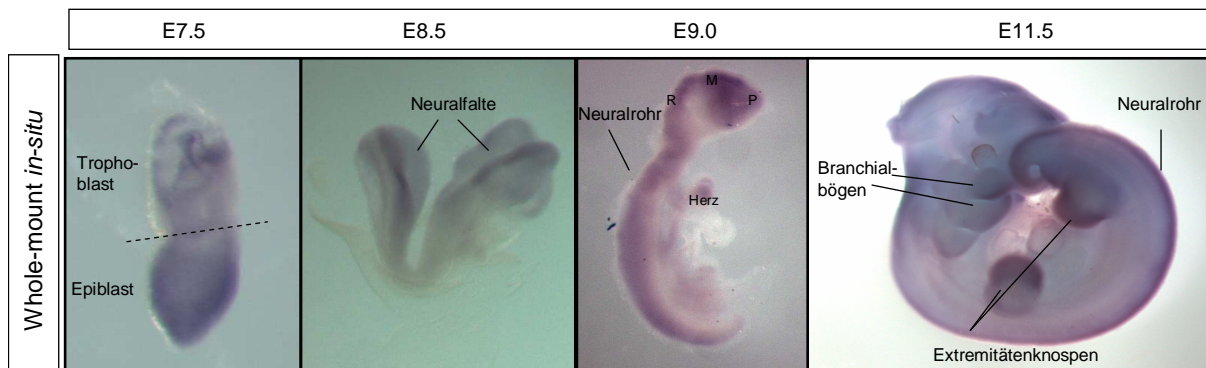


Abb. 38: Whole mount in-situs an Wildtyp Embryonen bestätigen teilweise die Antikörper-Färbung. Der Embryo zeigt an Tag E7.5 eine ubiquitäre *Tardbp* Expression, ebenso wie an Tag E8.5 mit einer starken Anfärbung der Neuralfalte. Um Tag E9 sind insbesondere das Neuralrohr und das Herz angefärbt, ebenso wie an Tag E11.5, an dem eine starke Anfärbung der Extremitätenknospen und der Branchialbögen detektiert wird. Allerdings ist an Tag E11.5 keine *Tardbp*-Expression im Herzen detektiert worden; Dies wurde jedoch bei β -Gal Färbungen an Embryonen zwischen Tag 9 und 11 bereits gezeigt.

Vergleicht man nun die lacZ- und Antikörper-Färbungen mit der *whole mount in-situ* Hybridisierung, so stellt man Gemeinsamkeiten und Diskrepanzen fest: Die Neuralfalte der 8.5 Tage alten Embryonen ist in allen drei Färbemethoden stark detektiert worden und zeigt eine Übereinstimmung aller drei Expressionsstudien. In den älteren Embryonen findet man zu jedem Zeitpunkt *Tardbp*-Expression in neuronalen Geweben, speziell im Neuralrohr, im Rhombencephalon und im Telencephalon. Die lacZ-Färbung im Herzen von E9.5 und E10 ist mit der Antikörperfärbung und der ISH nicht bestätigt worden (Daten nicht gezeigt), allerdings konnte die kalte *whole mount*-ISH eine Anfärbung des Aortenbulbus (E9.0) bestätigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Hybridisierungsergebnisse aller untersuchten Embryonalstadien eine ubiquitäre Expression von *Tardbp* in den Regionen des sich entwickelnden ZNS zeigen.

VII. Diskussion

Zur Analyse von Krankheits-assoziierten Proteinen werden bevorzugt murine Tiermodelle verwendet, um mit Hilfe von Expressionsstudien und phänotypischen Analysen an *k.o.*-Tieren pathogenen Proteinen gezielter auf die Spur zu kommen und letztendlich deren Signalwege zu entschlüsseln. Nur mit diesem Verständnis ist es möglich, gezielt Krankheiten zu behandeln oder sogar zu heilen. Ein Feld, das noch viele Fragen diesbezüglich offen lässt, ist das der neurodegenerativen Erkrankungen FTLD und ALS, das immer mehr in den Fokus von Genetikern und Pathologen rückt. Hauptakteur dieser Krankheiten ist das Protein TDP-43, das in weit mehr neurodegenerativen Erkrankungen als FTLD und ALS eine Rolle spielt. Charakteristisch für pathogenes TDP-43 sind die überwiegend cytoplasmatischen Zelleinschlüsse, die aus verkürzten, chemisch modifizierten und ubiquitinierten TDP-43 Fragmenten bestehen und zum Zelltod führen. Betroffen sind hier überwiegend (Moto-) Neuronen und Gliazellen.

Um die Biologie von TDP-43 besser verstehen zu können, wurde ein *gene trap* Mausmodell mit mutiertem TDP-43 etabliert, das die Unentbehrlichkeit des multifunktionalen Proteins TDP-43 bereits während der frühen Mausembryogenese aufdeckte.

VII.1. TDP-43 ist essentiell während der Implantation und Gastrulation

Die *gene trap* Mutante unterstreicht mit ihrem starken Phänotyp die Notwendigkeit von TDP-43 während der Embryogenese. Es konnte mit dieser Studie belegt werden, dass homozygote TDP-43 Mausmutanten einen frühen letalen Phänotyp zeigen und zwischen E3.5 und E7.5 absterben. Die Genotypisierung von Mausembryonen verschiedenen Alters aus *het x het* Verpaarungen zeigte, dass TDP-43 *knock-out* Mutanten nur bis zum Stadium der Blastulation lebensfähig sind. Während in heterozygoten Embryonen kein Defekt in diesen Stadien festgestellt wurde, starben die homozygoten Embryonen zwischen dem Zeitpunkt der Implantation (E4.5) und Gastrulation (E7.5) ab (Tab. 2).

VII.1.1. SMN Inaktivierung führt zu einem massiven Zelltod im frühen Mausembryo

Bereits in früheren Studien konnte ein ähnlich früher Phänotyp bei Verlust des SMN-Gens, das ebenfalls in neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielt, beobachtet werden. SMN ist ebenfalls wie TDP-43 zwischen Mensch und Maus hoch konserviert. Dieses Protein wird sowohl in neuronalen als auch in nicht-neuronalen Geweben exprimiert (Lefebvre et al, 1995), interagiert ebenso wie TDP-43 mit RNPs, und zeigt bezüglich seiner Funktionalität auch Parallelen zu TDP-43. SMN ist wie TDP-43 hauptsächlich im Kern lokalisiert und hat vermutlich durch die Assoziation mit Nukleosomen (Liu et al, 1996) eine Funktion im RNA-Metabolismus.

SMN^{-/-} Embryonen zeigen nach der Kompaktierung der Morula morphologische Veränderungen und Degeneration, was zur frühen Letalität noch vor der Implantation führt. Ab dem Embryonaltag 2.5 wurde ein Entwicklungsstopp sowie Apoptose beobachtet. Wie in TDP-43^{-/-} Mutanten koinzidiert das frühe Absterben der SMN Mutanten mit dem Verlust des mütterlichen Genprodukts im Embryo (Schrank et al, 1997). Die Notwendigkeit dieser in Neurodegeneration involvierten Gene während der frühen Embryogenese lässt daraus schließen, dass Gene, die im adulten Tier in Neuronen und Gliazellen eine essentielle Funktion haben, auch schon während der frühen Embryogenese in undifferenzierten Zelle eine lebensnotwendige Aufgabe übernehmen können.

VII.1.2. Wie kommt der frühe Phänotyp der homozygoten TDP-43 Mutante zustande?

VII.1.2.1. Exkurs: Zellschicksal während der frühen Embryogenese

Bereits vor der Implantation entwickeln sich aus der Maus Blastozyste (E3.5) zwei unterschiedliche Zelllinien, die zum einen das embryonale Gewebe generieren und zum anderen das extraembryonale Gewebe bilden. Während dieses einzigartigen Entwicklungsstadiums kommt es in den sich entwickelnden Zelllinien entweder zum Verlust oder zur Aufrechterhaltung von Pluripotenz. Im Trophektoderm (TE), das die innere Zellmasse (ICM) der Blastozyste umgibt, findet in der Zellprogrammierung ein

Verlust von Pluripotenz statt, verursacht durch den aktivierten Transkriptionsfaktor Cdx2 (*caudal type homeodomain protein*). Cdx2 reprimiert im Trophectoderm den Pluripotenz-erhaltenden Faktor Oct4 und induziert so die Zelldifferenzierung zum Trophoblasten und zur Plazenta (Ralston et al, 2010). Fötale Zelltypen werde von dieser Linie nicht mehr gebildet (Tanaka et al, 1998). Im Gegensatz zu diesem ersten Differenzierungsschritt bilden sich aus der ICM, die im Blastozystenstadium über Oct4 reguliert wird, alle übrigen fötalen Zelltypen, die einen Embryo entstehen lassen sowie die extraembryonalen Membranen Allantois und Labyrinth (Rossant und Cross, 2001). Oct4 erhält die Repression der Trophoblast-induzierenden Gene in der ICM (Beddington und Robertson, 1998). Das aus diesen Zellen kein Trophoblast bzw. Plazentagewebe gebildet wird hängt auch von drei weiteren Trophoblast-induzierenden Faktoren, nämlich Eomes, Gata3 und Tead4, ab. Eomes wird zum Überleben und zur Reifung des Trophoblasten benötigt und übernimmt die Rolle der Proliferation (Strumpf et al, 2005). Die Differenzierung der trophoctodermalen Zellen läuft parallel zur Proliferation und wird von den Genen Gata3, Tead4 bzw. Cdx2 ausgelöst. Der Faktor Tead4, der *upstream* von Cdx2 agiert, reguliert als Hauptkomponente die Trophoblastenentwicklung. Konstitutiv aktives Tead4 ist sogar ohne Cdx2 in der Lage, die Trophoblastenbildung zu induzieren (Nishioka et al, 2008). Ein weiterer Faktor, der in Trophoblasten-Stammzellen angereichert ist, ist Gata3, der ebenfalls von Cdx2 unabhängig ist aber ein *downstream* gelegenes Zielgen von Tead4 ist. Gata3 treibt die Trophoblasten-Differenzierung im Ektoplazentarkonus und die Trophoblasten-Reifung an (Ralston et al, 2010).

Defekte der Trophoblast-spezifischen Gene lösen einen Implantationsdefekt aus, da über den Trophoblasten die Kontaktaufnahme zwischen embryonalen und mütterlichen Gewebe stattfindet. Dies ist zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft und zur Weiterentwicklung des Embryos essentiell.

VII.1.2.2. Maus-Mutanten, die einen Implantations-Phänotyp zeigen

Die TDP-43-Mutante zeigt einen früh letalen Phänotyp zum Zeitpunkt der Implantation. *In vitro* Explantate zeigten, dass TDP-43 eine vermeintliche Rolle in der Trophoblast-Entwicklung haben könnte (Abb. 35).

Bereits beschriebene Implantationsphänotypen zeigen eine ähnliche Ausprägung wie homozygote TDP-43 Mutanten. So wurde für die Cdx2 Null-Mutante das Absterben

in der Prä-Implantationsphase zwischen E3.5 und E5.5 festgelegt (Chawengsaksophak et al, 1997). Mit einem tetraploiden *rescue*-Experiment konnte gezeigt werden, dass der Implantationsdefekt mit einer gestörten Trophoblasten-Entwicklung assoziiert ist und nicht durch einen Fehler in der ICM entsteht. *Cdx2*^{-/-} Mutanten bilden wie TDP-43^{-/-} Mutanten *in vitro* als isolierte Blastozysten keine Trophoblasten Auswüchse aus. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass Epithel-Marker in den homozygoten *Cdx2* Mutanten fehlen, wodurch keine weitere Differenzierung und Aufrechterhaltung des TE in der späteren Blastozyste gefördert wird und es zum Zerfall der Blastozyste kommt. *Cdx2* ist somit der früheste TE spezifische TF, der essentiell für die TE Etablierung und Funktion ist. Durch die Repression der Pluripotenz-erhaltenden Gene Oct4 und Nanog bestimmt *Cdx2* das Zellschicksal. *Cdx2* ist während des 2-Zellstadiums bis zum 8-Zellstadium im gesamten Embryo exprimiert (Yamanaka et al, 2006). In der frühen Blastozyste (128 Zellen) verlagert sich die *Cdx2*-Expression allerdings auf die äußere Zellschicht (Tesar, 2005). Die Entwicklung der TDP-43-Mutante bis zum Blastozystenstadium ist nur über das mütterliche Genprodukt aus der Oozyte gewährleistet.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der während der Trophoblasten-Entwicklung benötigt wird, ist das T-Box Protein Eomesodermin (Eomes). Während *Cdx2* für die Etablierung und den Erhalt der Integrität des TE verantwortlich ist, ist das *downstream* gelegene Eomes entscheidend für die Differenzierung und Proliferation. Eomes *k.o.*-Embryonen überleben bis zum Zeitpunkt E6.5- E7.5 *in utero* und zeigen einen ähnlich früh letalen Phänotyp wie *Cdx2*-Mutanten. *In vitro* Auswuchs Experimente zeigten das Fehlen des Trophoblasten in homozygoten Mutanten (Russ et al, 2000), allerdings konnten Eomes^{-/-} Mutanten im Gegensatz zu *Cdx2*^{-/-} Mutanten, die nicht mehr im Stande waren, aus der *Zona Pellucida* zu schlüpfen, eine Decidua-Antwort induzieren. Zusätzlich zu der Funktion im TE konnte die Notwendigkeit von Eomes in der fortlaufenden embryonalen Entwicklung gezeigt werden. Eomes wird während der anterior-posterioren Achsenbildung benötigt und ist ein essentieller Faktor während der Mesoderm- und Endoderm-Entwicklung (Arnold et al, 2008). Hier kann man Parallelen zu TDP-43 ziehen. Denn TDP-43 ist wie Eomes auch im embryonalen Gewebe zum Zeitpunkt E7.5 exprimiert und zeigt denselben früh letalen Phänotyp zum Zeitpunkt der Implantation.

Die beiden Phänotypen der homozygoten Mutanten *Cdx2* und Eomes sterben durch die Blockierung der frühen TE Differenzierung. Dies könnte auch bei TDP-43

Mutanten der Auslöser der frühen Letalität sein.

VII.1.2.3. Wie kann TDP-43 während dieser frühen Zellschicksalsbestimmung in den molekularen Mechanismus integriert werden?

TDP-43 könnte einen direkten, positiven Einfluß auf Trophoblast-initiiierende Gene, wie *Cdx2*, haben. Denn die Trophoblastentwicklung fehlt gänzlich in homozygoten TDP-43 Mausmutanten.

Die Untersuchung der direkten Beeinflussung von TDP-43 auf *Cdx2* würde in einem *knockdown* Experiment mit *Cdx2*-exprimierenden Trophoblast-Stammzellen verifiziert werden. Mit molekularbiologischen Methoden wie qPCR oder Western Blot könnte die veränderte *Cdx2* Expression in diesen Zellen bei einem transienten TDP-43 *knockdown* nachgewiesen werden. Wird eine verringerte Menge an *Cdx2* bei einem TDP-43 *silencing* detektiert, so ist sowohl die *Cdx2* Expression als auch die Trophoblasten-Initiierung von TDP-43 abhängig (Abb. 39).

Cdx2 wäre somit ein direktes *target* von TDP-43 während der frühen Maus-Embryogenese. Dies würde die bedeutende Funktion von TDP-43 in der frühen Embryonalentwicklung widerspiegeln und die frühe Letalität der *Tdp-43*^{-/-} Embryonen erklären.

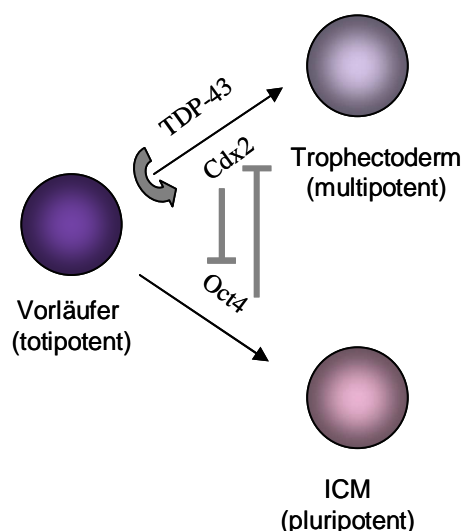


Abb. 39: TDP-43 als vermeintlicher Interaktionspartner des Trophoblast- initiierenden *Cdx2* Transkriptionsfaktors. Die Trophoblasten- bzw. ICM-spezifischen Gene *Cdx2* und *Oct4* hemmen sich gegenseitig, um die Differenzierung in embryonales und extraembryonales Gewebe zu initiieren. TDP-43 spielt in diesem Model neben *Cdx2* eine zusätzliche Rolle in der Entwicklung von multipotenten Trophoblastenzellen, indem es *Cdx2* positiv reguliert.

VII.1.3. Maus-Mutanten mit Plazenta-Defekt

TDP-43 zeigt neben der Trophoblastenexpression auch eine starke Expression im Labyrinth zum Zeitpunkt E10.5. Wie durch den tetraploiden *rescue* gezeigt wurde, ist TDP-43 am extraembryonalen Phänotyp beteiligt. Inwiefern könnte TDP-43 aber eine Rolle während der Plazentation spielen?

Eine funktionsfähige Plazenta findet man in der murinen Entwicklung erst nach Embryonaltag 10. Während der Blastulation und des Prozesses der Plazentation wird der Keim mit den notwendigen Metaboliten durch Resorption von der Uterusflüssigkeit ernährt. Mit einer funktionsfähigen Plazenta finden der Gasaustausch, Nährstoffaustausch, die Hormonbildung und die Immunreaktion durch Diffusion oder aktiven Transport über die feinen Verästelungen im Labyrinth der Plazenta statt (Schnorr und Kressin, 2001).

Während der Plazentation differenzieren Trophoblastenzellen in spezielle Untertypen (Abb. 40). Die Fusion der Allantois und des Chorions bewirkt die Differenzierung der drei distinkten Trophoblaststrukturen, die bis zum Ende der Schwangerschaft persistieren: Labyrinth, Spongiotrophoblast und Trophoblast-Riesenzellen. Diese Gewebe entstehen aus einem Netzwerk verschiedenster Faktoren und gewährleisten eine erfolgreiche Funktion des fötalen und mütterlichen Austausches.

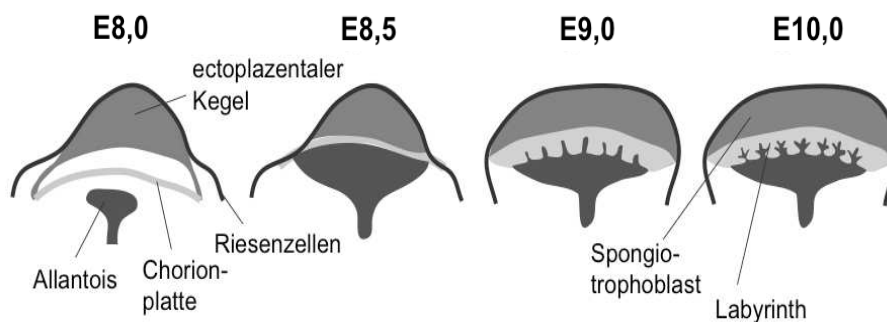


Abb. 40: Murine Plazenta-Entwicklung von Embryonaltag 8 bis 10 (modifiziert nach Cross, 2005).

Ein Faktor, der während der Labyrinth-Entstehung eine wichtige Rolle übernimmt ist der TF *Gcm1* (*glial cells missing1*). Um den Zeitpunkt E8.0 ist *Gcm1* in der Chorionplatte exprimiert. Später erstreckt sich die Expression an den Spitzen der

Verästelungen entlang, im Syncytiotrophoblast und im Labyrinth. Gcm1 übernimmt eine zentrale Rolle in der Interaktion zwischen Chorion-Trophoblastzellen und Allantois-Mesodermzellen (Anson-Cartwright et al, 2000). Es wurde gezeigt, dass Gcm1 eine essentielle Funktion während der chorioallantoiden Verzweigung übernimmt, denn Gcm1^{-/-} Mutanten fehlt das *branching* und das Labyrinth-Gewebe. Diese Mutanten sterben *in utero* an Embryonaltag 10 aufgrund des Plazenta-Defektes.

Das späte Absterben der Gcm1 Null-Mutante zum Zeitpunkt E10 verglichen mit der Cdx2 Mutante zeigt, dass Gcm1 lediglich eine Funktion in der Plazenta bzw. in extraembryonalem Gewebe übernimmt. Die Gcm1 Mutante ist bis E9.0 normal entwickelt. Erst zum Zeitpunkt E9.5 findet man einen Defekt in der chorioallantoiden Morphogenese, denn in diesem Stadium bekommt Gcm1 seine funktionelle Bedeutung (Anson-Cartwright et al, 2000).

Dass Plazenta Phänotypen keine Rolle im Embryo übernehmen zeigte auch die Mash2-Mutante. Mash2 (*mammalian achaete scute homologous gene 2*) ist ein *Helix-Loop-Helix* TF, der in extraembryonalen Trophoblast-Zelllinien exprimiert ist. Die Expression von Mash2 konnte im Ektoplazentarkonus, dem Chorion, deren Derivate und in der Plazenta nachgewiesen werden. Den Mash2^{-/-} Mutanten, die an Embryonaltag 10 sterben, fehlt das Schwammgewebe gänzlich und bilden lediglich ein unterentwickeltes Chorion aus (Guillemot et al, 1994). Eine tetraploide Aggregation konnte den extraembryonalen Phänotyp retten und die Etablierung des Schwammgewebes ersetzen.

Vergleicht man die Plazenta-Phänotypen Gcm1 und Mash2 mit der Tdp-43 Mutante, ist eine Diskrepanz bezüglich des tetraploiden *rescue* zu sehen, da der Tdp-43 Phänotyp nicht gänzlich gerettet werden konnte, wie die nekrotischen Embryonen zwischen E8.5 und E10.5 zeigten. Bei den komplementierten homozygoten Embryonen konnte offensichtlich nur die Implantation und die beginnende Plazenta-Generierung mit Hilfe des zusätzlichen extraembryonalen Wildtyp-Gewebes gerettet werden. Dies zeigt, dass die Funktion des verantwortlichen Gens nicht nur extra-embryonaler Natur ist.

VII.1.4. Tdp-43 ist am embryonalen Phänotyp beteiligt

Der zusätzliche embryonale Phänotyp konnte mit der analysierten *gene trap*

Mauslinie D045A10 noch nicht gezeigt werden. Allerdings wurde dieser Phänotyp bereits in vorangegangenen Studien beschrieben. Eine Zusammenfassung dieser Studien ist im Anhang (Kapitel IX.2.) aufgeführt. Wie Publikationen von Sephton et al. (2010) und Wu et al. (2009) unlängs zeigten, ist TDP-43 ein wichtiger Faktor während der Proliferation der ICM. Ein Funktionsverlust von TDP-43 führt demzufolge durch einen Defekt der ICM zur frühen Letalität des Embryos. Wie *in vitro* Kultivierungen von Blastozysten zeigten, fehlt in homozygoten Embryonen das Wachstum (Proliferation) der ICM (Wu et al, 2009), so dass die fortlaufende Entwicklung des Embryos nicht mehr stattfinden kann (Wang und Dey, 2006). Mittels Immunfärbungen konnte der Verlust von TDP-43 in der ICM der *k.o.*-Blastozyste gezeigt werden (Wu et al, 2009). Das Überleben der homozygoten Embryonen bis zur Blastula war nur mit maternalem TDP-43 aus der Oozyte möglich. Restliches maternales TDP-43 konnte in homozygoten Mutanten bis zum Morula-Stadium histologisch nachgewiesen werden (Wu et al, 2009).

Ein Organismus, in dem kein embryonaler Phänotyp beobachtet werden konnte, ist die Taufliege *D. melanogaster*. Mittels chromosomaler Deletion wurde eine TDP-43 *loss-of-function* Mutante generiert, die bis zum Puppenstadium lebensfähig war, jedoch nicht schlüpfen konnte. Ein geringer Prozentsatz der TDP-43^{-/-} Fliegen, die fähig waren zu schlüpfen, zeigten zu 100 % Bewegungsdefizite und eine verkürzte Lebensspanne, allerdings keine auffälligen Morphologien (Feiguin et al, 2009). Diese Studie belegt, dass in einem phylogenetisch niederen Organismus TDP-43 während der Embryogenese keine so bedeutende Funktion wie in *M. musculus* einnimmt, was mit dem fehlenden extraembryonalen Gewebe, das nur bei Reptilien, Vögeln und Säugern vorkommt, begründet werden kann.

VII.1.5. Zwei-Promotoren Theorie im TDP-43 Lokus

Expressionsstudien an frühen Embryonalstadien (E7.5) haben gezeigt, dass TDP-43 ubiquitär exprimiert wird. Es bestand jedoch eine Diskrepanz zwischen der Antikörperfärbung und der β -Gal-Färbung im Stadium E7.5. Lediglich mit der Immunfärbung konnte eine komplette TDP-43-Detektion im gesamten Embryo nachgewiesen werden. Die β -Gal-Aktivität hingegen färbte nur die Zellen des Epiblasten und der Allantois blau (Abb. 29). Das extraembryonale Ektoderm zeigte keinen blauen Niederschlag. Aufgrund der Diskrepanz zwischen Antikörper- und β -

Gal-Färbung wurde eine zwei-Promotoren Hypothese aufgestellt, die besagt, dass ein zweiter Promotor stromabwärts des ersten ATGs und der β geo Insertion für die extraembryonale Expression verantwortlich sein könnte. Da die Transkripte des zusätzlichen Promotors aber nicht mit der stromaufwärts gelegenen *gene trap* Reporter-kassette abgefangen werden können, fehlt die Detektion dieser zusätzlichen Promotor-Aktivität in der β -Gal-Färbung.

Die zwei-Promotoren Hypothese konnte mit einem 5'RACE Experiment bestätigt werden, da weitere Transkripte identifiziert wurden, die am 5' Ende um 21 bzw. 51 Nukleotide verkürzt waren und im Leserahmen zum nächsten ATG lagen. Durch bioinformatische Vorhersageprogramme wurde ebenfalls ein weiterer Promotor im Intron 1 prognostiziert, der sich stromaufwärts des zweiten ATG befindet und als Promotor der verkürzten, alternativen Transkripte fungieren könnte. Zu erwähnen ist, dass in einer bereits vorangegangenen Studie gezeigt wurde, dass sich in *Tardbp* bereits eine weitere Promotorregion befindet (Nishimoto et al, 2010). Hier generiert ein alternativer Transkriptionsstart in Exon 3 ein trunkiertes Protein, dem die NLS fehlt.

Ein bekanntes und experimentell bestätigtes Beispiel für ein zwei-Promotoren System ist das *Sall4* (*spalt-like 4*) Gen. Mit zwei unterschiedlichen Mauslinien, *Sall4-1a* und *Sall4-1b* konnten unterschiedliche Expressionsmuster und Funktionen der verschiedenen Isoformen während der frühen Embryonalentwicklung gezeigt werden. Die Transkripte *Sall4-1a* und *Sall4-1b* initiieren von zwei unterschiedlichen Promotorregionen: Während der *Sall4-1a*-Promotor überwiegend im extraembryonalen Gewebe agiert um die PD (proximal-distale)-Achsenbildung zu induzieren, erhält die *Sall4-1b* Isoform die ICM/Epiblast-Identität im Eizylinder. Zum Zeitpunkt der Gastrulation fungieren *Sall4-1a* und *Sall4-1b* gemeinsam mit der Wnt/ β -catenin Signalwirkung um die AP (anterior-posterior)-Achse zu verlängern (Uez et al, 2008).

Die Theorie der zweiten Promotorregion in *Tardbp* sollte in Zukunft noch experimentell untermauert werden. Eine funktionelle Charakterisierung dieser fraglichen Region könnte zeigen, welche *cis*- oder *trans*-Faktoren in der Regulation der alternativen Transkription eine Rolle spielen und inwiefern die Transkriptionsinitiatoren positiv oder negativ auf die Transkription wirken. Hier könnte eine duale Funktion verborgen liegen, die die Transkription des zweiten Promotors sowohl hemmt als auch schwächt und sich so selbst reguliert. Wenn diese

alternativen Transkripte hauptsächlich im Trophoblasten beziehungsweise im extraembryonalem Gewebe generiert werden, wie durch die Antikörperfärbung und β -Gal-Färbung sichtbar wurde, so sollte der zweite Promotor im adulten Tier keine entscheidende Rolle mehr spielen. Auch in späteren Embryonalstadien, wo der Embryo frei von extraembryonalem Gewebe ist, wurde keine Diskrepanz zwischen Immunfärbung und β -Gal-Aktivität festgestellt. Diese Beobachtung untermauert die Trophoblast spezifische Promotoraktivität (Abb. 41).

Alternative Hypothesen neben der Zwei-Promotoren Theorie wären

- a) Gewebe-spezifisches Spleißen von Tdp-43, das einen Verlust der β geo Insertion und der Reporteraktivität verursachen würde oder
- b) die Störung von extra-embryonalen Ektoderm- (ExE-) *enhancern*, ausgelöst durch die *gene trap* Insertion.

Diese alternativen Theorien könnten mit einem weiteren *gene trap* Mausmodell, dessen β geo-Insertion weiter *downstream* der bekannten Insertion liegen würde, untersucht werden.

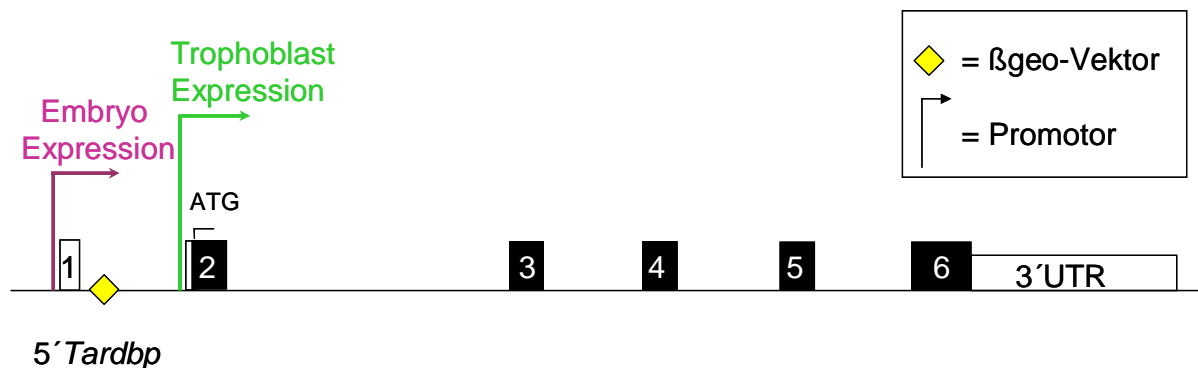


Abb. 41: Zwei unterschiedliche Promotorregionen im murinen *Tardbp* Gen. Zusätzlich zur ersten Transkriptions-Initiationsstelle wird eine zweite Promotorregion im Intron 1 vermutet. 5' RACE Ergebnisse bestätigten mit der Identifizierung von verkürzten Transkripten die Möglichkeit eines zusätzlichen Promotors (Abb. 30). Dem zweiten Promotor könnte die Aufgabe der Transkriptionsinitiierung im Trophoblast zugeschrieben werden. Diesen am 5'Ende verkürzten Fragmenten fehlt die β geo Kasette, wodurch es zu keiner β -Gal-Aktivität kommt und der Trophoblast im Embryonalstadium E7.5 frei von Blaufärbung ist (Abb. 29).

Es wurde bereits eine *gene trap* Mausmutante publiziert, deren Insertion stromabwärts der hier beschriebenen Insertion liegt (Sephton et al, 2009). Diese Mausmutante trägt einen pGT1Lxf-Vektor im Intron 2 des *Tardbp* Gens, woraus eine

Fusion des 5` Exons und des β geo Reporters entsteht. Die lacZ Färbung zeigt eine unterschiedliche Expression im Vergleich zu der hier analysierten Mutante (Abb. 42). Die Expression der Neuralleistenzellen, die in Abbildung 38 zum Zeitpunkt E10.5 deutlich sichtbar ist, fehlt gänzlich in der $Tardbp^{pGT1Lxf}$ Mutante. Dafür zeigt diese Mausmutante eine Anfärbung des restlichen Neuralrohrs mit den neuronalen Vorläuferzellen. Insgesamt ist die β -Gal-Aktivität intensiver und zeigt keine Streuung wie in der D045A10 Mutante. Dieser Vergleich verdeutlicht, dass durch die Insertion im Intron 1 TDP-43 Expression verloren geht. Eine stromabwärts gelegene Insertion fängt scheinbar mehr Transkripte auf, die zusätzlich im Embryo durch einen weiteren Promotor initiiert werden.

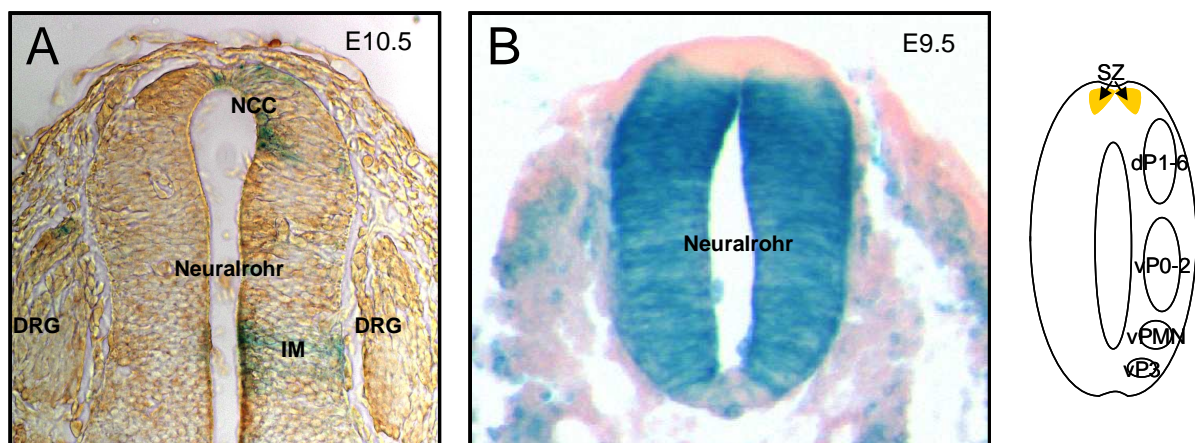


Abb. 42: Vergleich der lacZ-Färbungen von 10.5 bzw. 9.5 Tage alten Embryonen verschiedener *gene trap* Mutanten. A) Die lacZ Färbung der *gene trap* Mutante mit der β geo Insertion in Intron 1 zeigt eine schwache Expression im Neuralrohr. Scheitelzellen (Neuralleistenzellen) und Vorläuferzellen der intermediären Motoneurone (IM) zeigen β -Gal Aktivität. B) Die lacZ Färbung der *gene trap* Mutante mit der β geo Insertion in Intron 2 zeigt eine gegensätzliche Blaufärbung im Neuralrohr. Das gesamte Neuralrohr ist intensiv gefärbt, bis auf den Bereich der *neural crest cells* (aus Sephton et al, 2010). Schematische Darstellung des Neuralrohrs (rechts): dP1-6: dorsale Vorläuferzellen, vP0-2: ventrale Vorläuferzellen der Interneurone, vPMN: ventrale Vorläuferzellen der Motoneurone, vP3: ventrale Vorläuferzellen, SZ: Scheitelzellen.

VII.2. TDP-43 Phänotyp im adulten Tier

Zur Studien der Motorik von adulten Tieren standen aufgrund der frühen Letalität der Nullmutante nur heterozygote Tiere zur Verfügung, die auf den ersten Blick keine Unterschiede zum Wildtyp zeigten. In fünf Monate alten heterozygoten Männchen waren die motorischen Fähigkeiten im Vergleich zu Kontrolltieren reduziert. Bei zwölf Monate alten Männchen wurde dieselbe phänotypische Ausprägung verstärkt beobachtet (Abb. 25). Der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante ist somit

genotyp- und altersabhängig und steigert sich bei einjährigen Tieren. Die Analyse von Skelettmuskulatur der vorderen Extremitäten zeigte keine regenerativen Strukturen der Muskelfasern in den mutanten Tieren, das auf Verlust der Motorik hindeuten würde (Abb. 26). Auch die Anzahl an Motorneurone im ventralen Horn des Rückenmarks war in den Mutanten unverändert (Abb. 28). Somit konnte das Defizit in der Balance, der Koordination und dem explorativen Verhalten der heterozygoten Männchen nicht mit morphologischen Beobachtungen geklärt werden. Die Zentren für Koordination, Balance und Exploration, die im Gehirn im temporalen Lobar liegen, könnten allerdings eine reduzierte Anzahl an Neuronen bzw. eine reduzierte synaptische Verschaltung im vorderen Hirnlappen aufweisen, was es noch zu untersuchen gilt. Eine Atrophie von präsynaptischen Termini konnte in *Drosophila* mit TDP-43 Deletion gezeigt werden (Feiguin et al, 2009). Diese morphologische Modifikation am synaptischen Terminus wirkt sich in lokomotorischen Defiziten der Tiere aus. Die Insekten zeigen kein normales Gehen, sind unfähig zu Fliegen und haben spastische, unkoordinierte Bewegungen (Feiguin et al, 2009). Somit könnte TDP-43 in *Drosophila* eine regulatorische Funktion am synaptischen Terminus der Motoneurone innehaben. Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeit zum Menschen könnte auch in humanen Motoneurone TDP-43 diese Funktion zugeschrieben werden. Diese Ausprägung würde in Patienten aber nur in einer abgeschwächten Form sichtbar werden, denn die Mutationen bei familiärer ALS werden autosomal dominant vererbt und liegen nur in heterozygoter Form vor. Dasselbe trifft für die getesteten murinen Männchen zu, deren Mutation sich ebenfalls nur auf einem Allel befindet und die phänotypische Ausprägung von milder Natur ist.

VII.2.1. Veränderungen in heterozygoten Tieren auf molekularer Ebene

Das Proteinlevel von TDP-43 zeigte in Gehirngewebe von heterozygoten Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern eine 20-30 % ige Reduktion. Auf mRNA Level war die Menge an *Tardbp*-Transkripten um ca. 39 % reduziert. Der Umfang von TDP-43 war auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene bei Verlust eines intakten Allels somit nicht um die erwarteten 50 % reduziert. Dies deutet daraufhin, dass die Zelle eine Reduktion von TDP-43 um die Hälfte nicht toleriert. Ein bis jetzt unbekannter Rückkopplungsmechanismus könnte den Level von TDP-43 über einen

gewissen Schwellenwert von mehr als 50 % halten, wenn sich der positive Effekt auf TDP-43 erhöht. In Abbildung 20 des vorangegangenen Kapitels wurde bereits ein Model für eine mögliche Rückkopplungsschleife zur Regulation von TDP-43 vorgestellt. Der Faktor, der TDP-43 auf zellulärer Ebene in diesem Model reguliert, ist eine kurze, nicht-kodierende microRNA.

Es wurden mit mehr als zwei Vorhersageprogrammen (miRanda, RNA22, RNAhybrid) unterschiedliche miRNA gefunden, die zu Tdp-43 eine hohe Bindungsenergie aufweisen. Bereits in Buratti et al. (2010) wurde gezeigt, das Tdp-43 mit einigen miRNAs eine signifikante Interaktion eingeht. So liegt die Hypothese eines negativen Rückkopplungsmechanismus mit miRNAs, die das Transkript von TDP-43 bei nur einem intakten Allel hochregulieren, nahe. Allerdings könnten noch weitere Faktoren, die schon während der miRNA Biosynthese einen Einfluß auf TDP-43 ausüben, eine Rolle spielen. Dies soll im folgenden Kapitel erörtert werden.

VII.2.2. Exkurs: miRNA Prozessierung

MicroRNAs sind kleine, 22 Nukleotide lange, nicht kodierende RNA-Moleküle, die die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene durch Translationsinhibierung und Destabilisierung der Ziel-mRNA regulieren (Filipowicz, 2008). MiR entstehen aus langen, primären Transkripten, sogenannten pri-miRNAs, die zu 90 % Prozent aus intronischen Sequenzen stammen. Nur 10 Prozent entstehen aus exonischen, protein-kodierenden oder nicht-kodierenden Transkripten (Kim und Kim, 2007, Rodriguez et al, 2004). Die primäre miRNA wird im Nukleus mittels des Drosha Komplexes zu einer kurzen hairpin-Vorläufer premiRNA prozessiert (Lee et al, 2003). Diese premiRNA wird über Exportin-5 ins Cytoplasma exportiert und dort durch eine weitere RNA Polymerase III, die dem Dicer-Protein Komplex zugehört, zu einer reifen doppelsträngigen miRNA mit einer Länge von 22 Nukleotiden synthetisiert (Liu et al, 2008). Ein Strang der reifen miRNA inkorporiert mit dem „*RNA inducing silencing complex*“ (RISC) und inhibiert auf diesem Wege durch Destabilisierung von Ziel-mRNA die Translation bestimmter Gene (Liu et al, 2008).

VII.2.3. miRNAs in neurodegenerativen Erkrankungen

Der durch miRNAs geleitete RNA-*silencing*-Pfad ist ein Gen-regulierender Prozess, der in allen eukaryotischen Zellen vorkommt (Bartel, 2009). Ungefähr 90 % aller Gene werden durch miRNAs reguliert (Miranda, 2006). miRNAs sind Schlüsselregulatoren der Genexpression, die auch während der Entwicklung und in neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielen. Es werden eine Reihe von Genen durch miRNAs reguliert, die in der neuronalen Entwicklung, dem Neuritenwachstum und der Synapsenbildung involviert sind. Hier könnte auch die Verbindung zu neurodegenerativen Erkrankungen wie FTLD, ALS und anderen Neurodegenerationen liegen, in denen TDP-43 Einschlüsse gefunden wurden. Als Beispiel dient die prominente Demenzform Alzheimer. Hier wurde gezeigt, dass miRNAs an der Expressions-Regulation des APP-Spaltenzym BACE beteiligt sind (Provost, 2010). *In vivo* Experimente zeigten ein reduziertes Expressionslevel der miR-298 und der miR-329 im Hippocampus von APPSwe/PS1 Mäusen (Boissonneault et al, 2009), das zu einer erhöhten BACE1 Expression und zu einer verstärkten A β Formation führte (Provost, 2010). Auch mit PGRN, das sich regulatorisch stromaufwärts von TDP-43 befindet und im pathogenen Mechanismus von FTLD involviert ist, finden miR Interaktionen statt. Neben der Mir-29b, die destabilisierend auf das hPGRN Transkript wirkt, sind noch weitere miRNA an der PGRN-Regulation beteiligt (Jiao et al, 2010), wie miR-588 oder miR-659 (Rademakers et al, 2008). Auch TDP-43 interagiert bewiesenermaßen mit miRNAs (Buratti et al, 2010).

VII.2.4. Bereits bekannte miRNA Interaktion mit TDP-43

Mittels eines *microarrays* wurde in TDP-43 ausgezehrten Zellen ein signifikant herunterreguliertes beziehungsweise signifikant hochreguliertes miRNA-Molekül entdeckt, let-7b und miR-663 (Buratti et al, 2010). Beide miRs interagieren mit TDP-43. Sowohl let-7b als auch miR-663 verfügen über eine ausreichende Anzahl an [UG]_n-Wiederholungen, die für die Bindung mit TDP-43 essentiell sind (Buratti et al, 2010). Allerdings sind die Binde-consensus Sequenzen von let-7b und miR663 nicht optimal, wodurch es nur zu einem Modulationseffekt der miR-Expression durch TDP-43 kommt.

TDP43 Interaktion mit miRs kann im Cytoplasma entweder einen induzierenden oder inhibierenden Effekt auf miR Zielgene haben: Die Interaktion mit pre-miRNA und reifer miR let-7b erhöht die Konzentration von miR-let7b im Cytoplasma, wodurch die Expression bestimmter Zielgene inhibiert wird. Die Bindung von TDP-43 an pre-miR663 verursacht hingegen eine Reduktion der miR663 Konzentration und einen Anstieg des Transkriptlevels von Epoxid Hydrolase 1 (EPHX1). Dieses Entgiftungsenzym reguliert oxidativen Stress in der Zelle (Buratti et al, 2010). Eine Anhäufung dieses Enzyms wurde bereits im Hippocampus von Alzheimer Patienten entdeckt (Liu et al, 2006). Somit wurde gezeigt, dass TDP-43 durch die Interaktion mit miRNAs regulatorische Effekte auslöst, die bereits in neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet wurden.

VII.2.5. Die Regulation von miRNAs erfolgt durch Mikroprozessoren

VII.2.5.1. Der Drosha Komplex

Der Drosha Komplex spielt eine entscheidende Rolle bei der Generierung von miRNAs und besteht aus einem Proteinverbund. Das größere Protein Drosha besitzt zwei RNaseIII-Domänen und eine doppelsträngige RNA-Bindedomäne. Zur primäRNA Erkennung interagiert Drosha mit dem Cofaktor Pasha (DGCR8), der neben den zwei doppelsträngigen Bindedomänen zur Erkennung der einzigartigen primäRNA Sequenzen auch eine stabilisierende Wirkung auf Drosha hat. Dieser funktionelle Komplex wird als Mikroprozessor bezeichnet (Denli et al, 2004; Gregory et al, 2004; Han et al, 2004). Sowohl Drosha als auch Pasha sind ubiquitär exprimiert und können zelltyp-spezifisch mit zusätzlichen Faktoren assoziieren und modifiziert werden (Landthaler et al, 2004). Die miRNA Prozessierung wird während der frühen Embryogenese gehemmt, denn die miRNA Expression führt zur Differenzierung der Zelle (Thomson et al, 2006). Es wurde bereits bewiesen, dass die Prozessierung von miRNAs durch Drosha in undifferenzierten Zellen unterdrückt ist (Thomson et al, 2006). Eine Fehlfunktion des Mikroprozessors hat Auswirkungen auf die gesamte Zellphysiologie. *In vitro* Experimente zeigten, dass ein Verlust des Dgcr8-Gens die miRNA Biosynthese unterdrückt, was wiederum zu Proliferations- und Differenzierungsdefekten in der Zelle führt (Wang et al, 2007).

Die Kontrolle der miRNA-Regulation erfolgt über einen Drosha/Pasha-*feedback loop*, der autoregulatorisch auf Drosha und Pasha selbst wirkt. In der Studie von Han et al, (2009) wurde gezeigt, dass Pasha einen positiven Einfluß auf Drosha ausübt sowie stabilisierend wirkt. Im Gegenzug dazu hat der Mikroprozessorkomplex einen negativen Einfluß auf das Transkript von DGCR8. Diese Autoregulation mit Rückkopplungsmechanismus hilft, die gefährlichen Schwankungen der Microprozessor-Aktivität in der Zelle zu minimieren.

Im Hinblick auf diese posttranskriptionelle Autoregulation wurde ein Kompensationseffekt in heterozygoten Dgcr8 Zellen beobachtet. Anstelle von erwarteten 50 % Protein, das von einem intakten Allel repräsentiert wird, wurde eine Hochregulation des Proteins von bis zu 80 % im Vergleich zum WT beobachtet. Dieselbe Hochregulation von Dgcr8 konnte ebenfalls auf mRNA Level gezeigt werden. Dies hat zur Folge, dass die Mikroprozessor-Aktivität bei Heterozygotie ebenfalls zu 80 % in der Zelle erhalten bleibt. In Stark et al. (2008) wurde gezeigt, dass im Gehirn von Dgcr8^{+/-} Tieren weniger miRNA prozessiert wird als in wildtypischen Tieren (Stark et al, 2008). Die Rückkopplungsregulation zwischen Drosha und Pasha scheint somit auch *in vivo* einen Effekt auf die miRNA Biogenese zu haben.

VII.2.5.2. TDP-43 ist am Drosha Komplex beteiligt und reguliert die miRNA Prozessierung

Als weitere Komponente des Mikroprozessorkomplexes wurde TDP-43 entdeckt. TDP-43 scheint als Cofaktor mit dem Drosha Komplex zu assoziieren und funktionell an der miRNA Synthese beteiligt zu sein (Strong, 2009). TDP-43 ist somit in der miRNA Prozessierung involviert und übt als kleine Untereinheit des Mikroprozessorkomplexes einen Effekt auf die miRNA Population in der Zelle aus. Ein mögliches Zusammenspiel zwischen Drosha, Pasha und TDP-43 sind in der Abbildung 43 dargestellt. Dieses hypothetische Rückkopplungsmodell würde die Hochregulation von TDP-43 in heterozygoten Tieren erklären. Zu erwähnen ist, dass dieses Modell nicht für einen Mechanismus während der (frühen) Embryogenese gilt, da zu diesem Zeitpunkt nur wenige miRNAs exprimiert sind. Die *feedback*-Regulation von TDP-43, die miRNAs miteinschließt, kann erst im geborenen bzw. adulten Tier stattfinden.

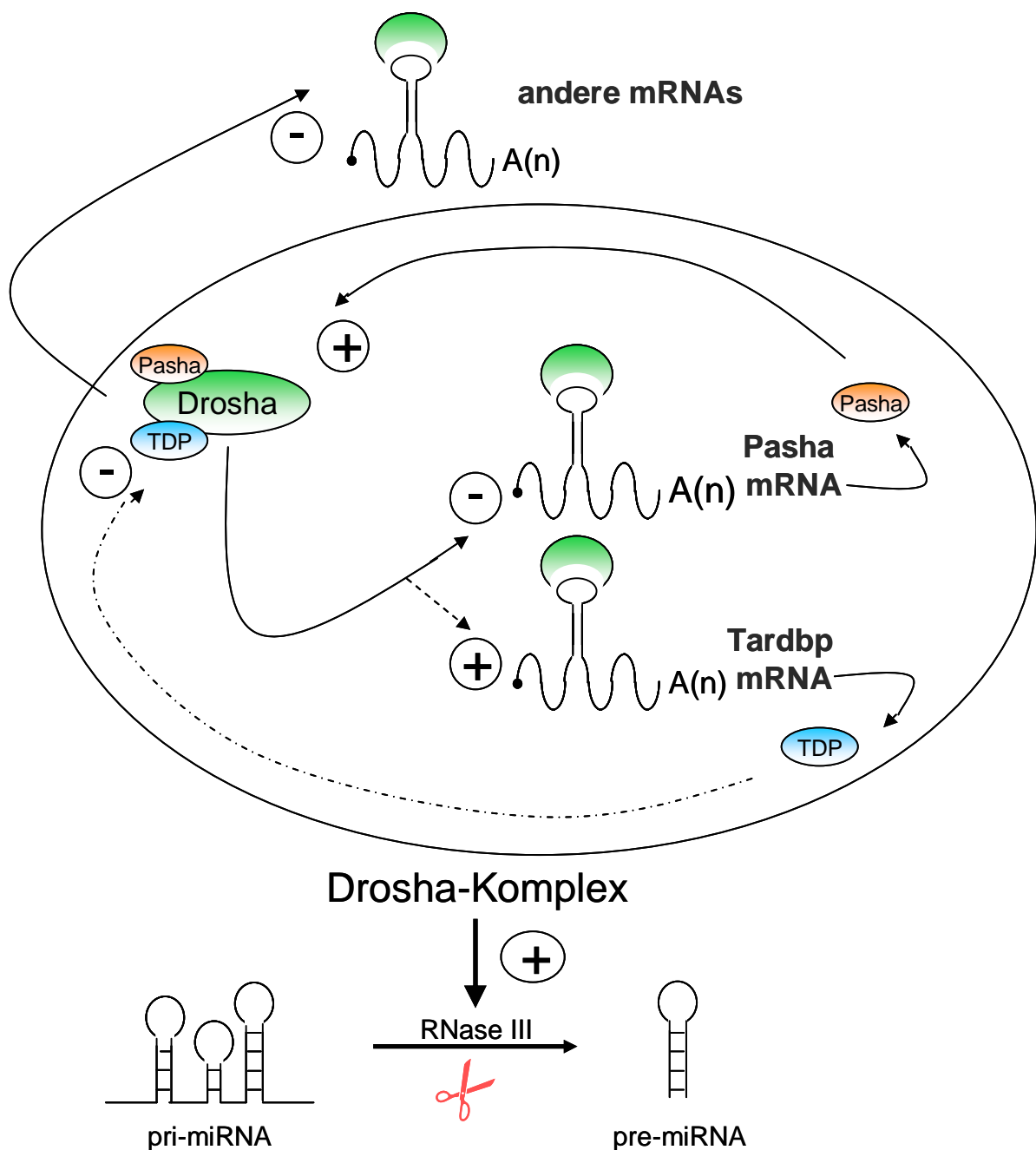


Abb. 43: Vermintlicher Mechanismus während der Initiierung des miRNA Prozessierungs-Komplexes. Drosha und Pasha regulieren sich selbst über einen negativen *feedback*-Mechanismus, indem Drosha die mRNA von Pasha und auch von noch weiteren mRNAs, die nicht in diesem Komplex wirken, destabilisiert. Das Protein Pasha andererseits assoziiert mit Drosha und übt einen positiven Effekt aus, wobei es Drosha bei seiner Aufgabe der miRNA Prozessierung unterstützt. Zusätzlich interagiert TDP-43 mit Drosha und übt einen negativen Effekt auf den Drosha/Pasha Komplex aus. Drosha alleine wiederum beeinflusst die mRNA Synthese von TDP-43 positiv. Der gesamte Drosha Komplex wird somit von zwei entgegengesetzten Rückkopplungsschleifen reguliert und übt in seiner Gesamtheit einen positiven Effekt auf die miRNA Prozessierung bzw. auf die RNase III aus. Der Mechanismus könnte die Hochregulation von TDP-43 in der Zelle durch den positiven Effekt von Drosha bei nur einem intakten Allel erklären.

VII.2.5.3. Überexpressionsassay von miR330 zeigte keinen Regulationseffekt

Die Hypothese der negativen Rückkopplungsschleife zur Regulierung von TDP-43 konnte mit dem miR330-Überexpressionsassay nicht bestätigt werden (siehe VI.2.4.5.). Mir330 scheint alleine keinen Effekt auf TDP-43 zu haben, jedoch könnten multiple Faktoren einen additiven Effekt auf das TDP-43 Transkript ausüben und als Komplex eine Regulation von TDP-43 herbeiführen. Eine ähnliche Situation liegt bei dem PGRN-Gen vor, das sich regulatorisch stromaufwärts von TDP-43 befindet und ebenfalls wie TDP-43 im pathogenen Mechanismus von FTLD eine Rolle spielt. Denn neben der miR-29b, die destabilisierend auf das hPGRN Transkript wirkt, sind noch weitere miRNAs an der PGRN-Regulation beteiligt (Jiao et al, 2010), wie miR-588 oder miR-659 (Rademakers et al, 2008).

VII.3. Risikofaktoren für FTLD-TDP und ALS

VII.3.1. Das sezernierte Protein Progranulin

Nicht nur Apoptose induziert die Caspase-Aktivität und somit die Bildung von CTFs, sondern auch eine verminderte Menge an PGRN. PGRN *in vitro knockdown*-Experimente zeigten eine direkte Stimulierung der Caspase-Aktivität und der Prozessierung von unlöslichen CTFs (Zhang et al, 2007). Der partielle Verlust von PGRN scheint bestimmte Funktionen in der Zelle zu inhibieren und in Neuronen Neurodegeneration auszulösen (Baker et al, 2006). In 20 % der familiären FTLD-TDP-Fälle sind neben den TDP-43 Mutationen PGRN Mutationen gefunden worden. PGRN ist ein sezerniertes Protein, das zur Wundheilung und als Wachstumsfaktor fungiert (Ahmed et al, 2007) und in Neuronen sowie Gliazellen des Gehirns weitläufig exprimiert ist (Daniel et al, 2000). PGRN Mutationen haben wie TDP-43 Mutationen autosomal dominante Erbgänge und zeigen Haploinsuffizienz (Baker et al, 2006). Die bekannten PGRN Mutationen sind *nonsense* Mutationen, die durch NMD (*nonsense mediated decay*) Null-Allele generieren (Cruts et al, 2006). Demnach sind alle PGRN-Mutationen *loss-of-function* Mutationen. Auch wenn die eigentliche Rolle von Progranulin im Gehirn noch nicht bekannt ist, könnte es für das Überleben von

Gehirnzellen verantwortlich sein, denn Patienten mit FTLD zeigen einen Mangel an diesem Wachstumsfaktor. PGRN aktiviert im diploiden Zustand MAPK und PI(3)K Signalkaskaden, die wichtige Funktionen wie Zellzyklus und Zellbeweglichkeit in Neuronen regulieren (He et al, 2003). Außerdem wird PGRN eine neurotrophische Eigenschaft zugewiesen sowie protektive Aufgaben bei Neuroinflammation (Ahmed et al, 2007). Neue Ergebnisse weisen darauf hin, dass Progranulin auch eine Rolle bei weiteren Gehirnerkrankungen spielt, bei denen Gehirnzellen absterben-beispielsweise bei der Alzheimer- oder der Parkinson-Neurodegeneration. Es wurden bereits PGRN Mutationen in AD Patienten gefunden, die ein erhöhtes Risiko für AD darstellen (Brouwers et al, 2008). PGRN fungiert somit auch als Indikator für AD. Inwiefern sich AD und FTLD überlappen beziehungsweise welche pathologischen Auswirkungen dieser Mutationen zugrunde liegen, muß noch erforscht werden. TDP-43 scheint von PGRN abhängig zu sein, denn eine Reduktion der PGRN-Konzentration führt zu einem erhöhten FTLD-TDP Risiko. Dieses stromaufwärts zu TDP-43 gelegene Zielgen scheint in einer Dosis-abhängigen Art und Weise entweder Neurodegeneration (bei Reduktion) oder Tumorgenese (bei Induktion) auszulösen (Cruts et al, 2006). Ersteres tritt in den Krankheiten FTLD-TDP und AD auf.

VII.3.2. Das noch unbekannte Transmembranprotein TMEM106B

Ein weiteres Gen, das mittels eines GWAS (*genome wide association screen*) neben PGRN als Risikofaktor für FTLD-TDP identifiziert wurde, ist das Transmembranprotein TMEM106B. Die Funktion dieses Proteins ist noch völlig unbekannt, allerdings wurde gezeigt, dass eine vermehrte TMEM106B Expression zu einem erhöhten FTLD-TDP Risiko führt (Van Deerlin et al, 2010). In Fällen der FTLD-TDP Erkrankung wurde ein 2.5-facher Anstieg von TMEM106B im frontalen Cortex, dem betroffenen Gewebe in FTLD, beobachtet. Dieser Expressionsanstieg wird durch Varianten, die aus 515 FTLD-TDP Patienten als SNPs identifiziert wurden, im 7p21 Locus ausgelöst. Die Polymorphismen tragen zu einem erhöhten genetischen Risiko der FTLD-TDP Erkrankung bei.

Wie die Überexpression von TMEM106B mit dem pathologischen Mechanismus von FTLD-TDP in Verbindung gebracht werden kann ist noch unklar, jedoch ist eine signifikante Assoziation zwischen dem TMEM106B Anstieg und der PGRN Mutationen in FTLD-TDP zu sehen, denn in Individuen mit PGRN Mutation konnte

ein erhöhtes TMEM106B mRNA-Level im Vergleich zu Individuen ohne PGRN Mutation nachgewiesen werden (Van Deerlin et al, 2010). Eine mutmaßliche, schematische Darstellung der Lokalisation und der Umverteilung von TDP-43, PGRN und TMEM106B bei Neurodegeneration wird in der Abbildung 44 gezeigt. Das fehlende PGRN in FTLN-TDP Patienten führt zu einer erhöhten Sensibilität der Zelle, was durch die toxische Wirkung von TDP-43 im Cytoplasma verstärkt wird. Das Transmembranprotein TMEM106B hat als vermeintlicher Rezeptor nicht mehr die Möglichkeit, Signale in den Kern zu senden, denn Zelleinschlüsse stören die Mobilität von vermeintlich modifizierten Liganden bzw. stromabwärts gelegenen Zielproteinen.

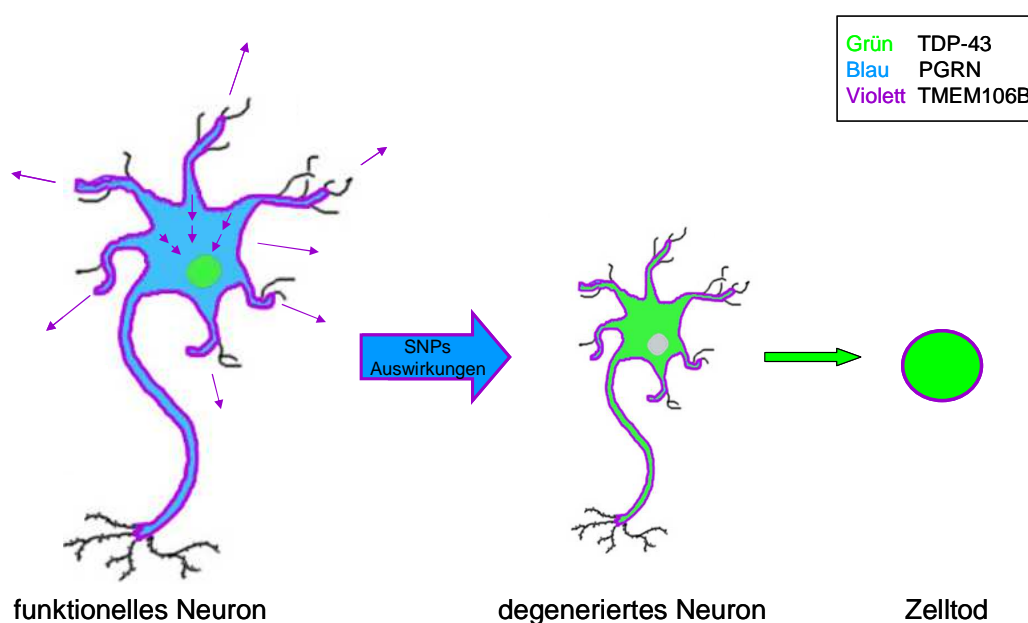


Abb. 44: Schematische Darstellung der Lokalisation bzw. Umverteilung von TDP-43 und der bekannten *upstream*-Zielgenen in einem degenerierten Neuron. Links) In der Wildtyp-Situation ist das Transmembranprotein TMEM106B (violett) in der Zellmembran eines gesunden Neurons lokalisiert und fungiert dort als vermeintlicher Rezeptor, der Signale in Form von modifizierten Liganden oder einer Signalkaskade zu Nachbarzellen bzw. in den Zellkern schickt. Im Zellkern ist TDP-43 (grün) als RNA Bindemolekül während Spleißvorgängen aktiv und bindet an mRNA Moleküle, um sie aus dem Kern zu transportieren. Das PGRN Protein (blau) hält sich im Cytoplasma auf und wirkt dort neurotrophisch bzw. entzündungshemmend, wenn Stress oder andere negative Faktoren auf die Zelle einwirken. Mitte) Bei Mutationen im PGRN oder TMEM106B Gen geschieht eine Umverteilung von TDP-43 vom Nukleus in das Cytoplasma, wo TDP-43 proteolytisch gespalten, chemisch modifiziert und ubiquitiniert wird. Die ubiquitinierten Fragmente aggregieren und bilden Zelleinschlüsse. Diese Zelleinschlüsse werden nicht durch Proteasomen abgebaut und führen letztendlich zum Zelltod. Auslöser für diese toxische Reaktion sind Mutationen im PGRN Gen bzw. TMEM106B Gen. Die PGRN Mutation erzeugt durch Haploinsuffizienz Null-Allele, wodurch die Zelle anti-inflammatorischen Schutz verliert und konventionelle Wachstumsfaktor-Signalwege unterbrochen werden. TMEM106B zeigt bei Polymorphismen eine erhöhte Expression, die ebenfalls zu noch unbekanntem Fehlfunktionen führt, die letztendlich TDP-43 aggregieren lassen und den Zelltod einleiten (rechts).

Ein Kreislauf, der das Krankheits-assoziiierende Protein TDP-43 in der Zelle reguliert, ist noch nicht bekannt. Allerdings können TMEM106B und PGRN mit TDP-43 in einer pathogenen Kaskade zusammengefasst werden, da sich das Transmembranprotein und das sezernierte Protein stromaufwärts von TDP-43 im FTLD-TDP Mechanismus befinden (Abb. 45A).

VII.3.1.3. Bekannte stromabwärts gelegene Zielgene von TDP-43

Welche Rolle pathogenes TDP-43 in der Zelle spielt und wie es letztendlich zum Zelltod kommt, ist noch unklar. Jedoch kann die normale Funktion von TDP-43 durch *upstream targets* charakterisiert werden. So ist die funktionelle Beteiligung von TDP-43 während der Transkription, des pre-mRNA Spleißens, der mRNA-Stabilität und des mRNA-Transports bereits in verschiedenen Zusammenhängen erklärt worden (Buratti et al, 2008).

Mittlerweile sind einige stromabwärts gelegene Zielgene bekannt, die von TDP-43 auf induzierende oder inhibierende Weise beeinflusst werden. In Abbildung 45B sind diese bekannten Zielgene von TDP-43 dargestellt und in Assoziation mit der entsprechenden Erkrankung gebracht worden. Die Transkriptions-Regulation und die Spleiß-Regulation können als Charakteristikum der regulatorischen Aufgaben von TDP-43 bezeichnet werden.

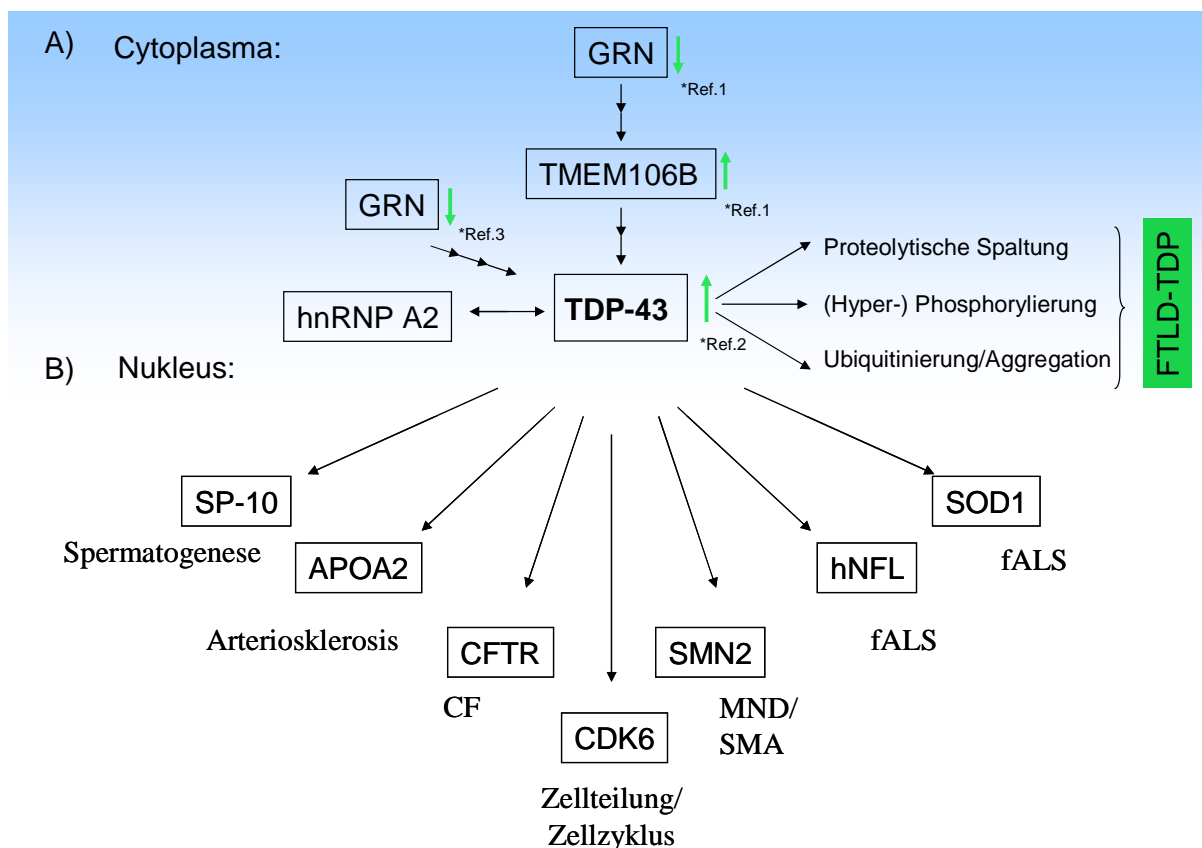


Abb. 45: A) Interaktionsmodell von TDP-43 mit Zielproteinen im Cytoplasma. Die stromaufwärts von TDP-43 gelegenen *targets* GRN und TMEM106B zeigen Risiko assoziierte Polymorphismen, die die GRN Expression (*Referenz 1: Van Deerlin et al, 2010) reduzieren und die TMEM106B Expression induzieren. PGRN-Mutationen zeigen in Patienten mit oder ohne TMEM106B-Polymorphismen (*Referenz 3: Cruts et al, 2006) über unbekannte Zwischenstufen einen Effekt auf TDP-43. Die Polymorphismen beider *upstream targets* verursachen eine Aggregation von TDP-43 im Cytoplasma, ausgelöst durch ein Überangebot von TDP-43 im Cytoplasma, das proteolytisch zu CTFs gespalten wird, (hyper-) phosphoryliert und im unlöslichen Zustand ubiquitiniert wird und aggregiert (*Referenz 2: Chen-Plotkin, 2010). Somit Verstopfen die Zellen und sterben ab, was FTLD-TDP auslöst.

B) Multikausalität von TDP-43 im Nukleus. Stromabwärts gelegene Zielgene von TDP-43 sind in verschiedenen Mechanismen der Zelle involviert und lösen bei Modifizierungen Krankheiten aus. TDP-43 kann zur Inhibierung von Spleiß-Prozessen mit dem Protein hnRNP A2 interagieren. Erläuterungen der stromabwärts gelegenen Zielgene folgen von links nach rechts:

Das Spermatid-Gen SP-10 wird von TDP-43 durch transkriptionelle Repression negativ beeinflusst und verhindert so die unreife Expression von SP-10 während der Spermatogenese. APOA2 und CFTR pre-mRNAs werden durch TDP-43 alternativ gespleißt, was zu Exon-Verlust führt und die Krankheiten Arteriosklerose bzw. Zystische Fibrose (CF) auslöst. Die Genexpressions-Modulation von CDK6-mRNA erhält den Zellzyklus und die Zellteilung. Fehlregulationen bei den Genen von SMN2, hNFL und SOD1 führen zu Defekten in Motoneuronen, was Motoneuronen-Erkrankungen (MND) wie Spinalmuskel-Atrophie (SMA) und familiäre ALS auslöst. TDP-43 verstärkt die Exon Aufnahme bei SMN2 mRNA und stabilisiert durch die Bindung an das 3'UTR die mRNA von hNFL.

VIII. Perspektiven

Die Eingliederung von TDP-43 in ein regulatorisches Netzwerk wird die Hauptaufgabe in naher Zukunft sein. Neben der Suche nach Protein-Interaktionspartnern besteht auch großes Interesse in der Identifizierung von *target* mRNAs.

Spezifische mRNA *targets* wurden bereits mit einem *microarray*-Expressionsprofil gescreent. Dem *screen* ging ein TDP-43 *knockdown* Experiment in HEK293E Zellen mit TDP-43-siRNA-Konstrukten voraus. Dieses *gene silencing* zeigte eine Effizienz von 90 % in den humanen ES-Zellen. Während die Expression von ALS/FTD assoziierten Genen keine Veränderungen durch den TDP-43 *knockdown* zeigten, so wurde die mRNA Expression von HDAC6 (Histon Deacetylase 6) durch das TDP-43 *silencing* signifikant beeinflusst bzw. herunterreguliert (Fiesel et al, 2010). Der Effekt konnte durch Retransfektion von wildtypischer TDP-43 cDNA aufgehoben werden.

Die HDAC6-Regulierung durch TDP-43 wurde auch *in vivo* in *D. melanogaster* nachgewiesen. Somit scheint TDP-43 für das physiologische Level der HDAC6-mRNA zuständig zu sein.

Da ein reduziertes HDAC6-Level zu einer verminderten Aggresomen Bildung führt und die Autophagozytose gehemmt wird, kann die TDP-43 Proteinopathie beziehungsweise das *gain-of-toxic-function* von TDP-43 im Cytoplasma mit der inhibierten HDAC6-Expression erklärt werden (Fiesel et al, 2010).

HDAC6 ist funktionell an der Transkription, der epigenetischen Repression und der Zellteilung beteiligt. Da TDP-43 in einer regulatorischen Beziehung zu HDAC6 steht, wird die ausgedehnte Beteiligung von TDP-43 an zellphysiologischen Vorgängen deutlich. Gerade dieser breite Einfluss von TDP-43 in verschiedenste molekulare Abläufe macht es so schwierig, TDP-43 in seiner funktionellen Rolle während der FTLD/ALS-Pathogenese zu entschlüsseln.

Wie sehr TDP-43 im Fokus der Forscher steht, wird durch die unzähligen Publikationen ersichtlich, die immer wieder neue Erkenntnisse über TDP-43 liefern. Erst vor kurzem wurden in ALS Patienten unterschiedliche Mutationen in dem Gen Optineurin (Optn) entdeckt, das die ALS Pathogenese beeinflusst (Maruyama et al, 2010). Die *missense* Mutation E478G in OPTN führt bei heterozygoten Patienten zu einer cytoplasmatischen Umverteilung von OPTN und zu cytoplasmatischen

Einschlüssen in Motoneuronen. Sowohl in sporadischen als auch in familiären ALS Fällen konnte OPTN in Zelleinschlüssen von Motoneuronen detektiert werden, die ebenfalls TDP-43 bzw. SOD-1 positiv waren. OPTN scheint somit ein genereller Marker für unterschiedliche ALS-Formen zu sein und in seiner Wirkung eine ausgedehnte ALS-Pathogenese abzudecken. Eine Beeinflussung des TDP-43-Mechanismus ist somit nicht auszuschließen. Zukünftig gilt es nun, diese Krankheits-assoziierten Gene in einen näheren Zusammenhang zu bringen.

IX. Anhang

IX.1. Oligonukleotide und PCR-Bedingungen

Anwendung	Oligo-Name	Sequenz 5'-3'	PCR-Bedingungen	Zyklusanzahl
Genotypisierung	Tardbp1	ccaagtcccatggtgacaac	58°C, 1' 72°C, 1'	35 x
	Tardbp2	cgagtgttgcttcggagag		
	splirev1	gctagcttgccaaacctacaggtgg		
5'RACE	Exon3	actttcactgcagaggaagcatc	60°C, 1'	35 x
	Exon3-2 <i>nested</i>	ccattttcctttgttatctttggg	72°C, 1.5'	
5'RACE	Exon4	gtttacagtcacaccatcgccc	64°C, 1'	35 x
	Exon4-3 <i>nested</i>	ttaagatctttcttgacctgaacc	72°C, 1.5'	
miR330 Konstrukt Klonierung	mirR330_for_cloning	tgactccggtctccaggat	60°C, 40''	35 x
	mirR330_rev_cloning	gctctgcaggctggaacgaa	72°C, 1'	
miR330 Konstrukt Klonierung	miR330_BgIII_for	ttagatctgactccggtctccaggat	64°C, 1'	35 x
	miR330_BgIII_rev	ttagatctctctgcaggctggaacga	72°C, 1.5'	
RT-PCR	Nestin_for140	ctcgagcaggaagtggtagg	RT-PCR Bedingungen	40 x
	Nestin_rev140	gcctcttttggtcctttcc		
	Nestin_ProbeFAM	[6FAM]ggaggaaagtgtgaaggcaa[TAMRA]		
RT-PCR	miR330_for98	ttggcgatctctgcctctc	RT-PCR Bedingungen	40 x
	miR330_rev98	cctgtgctttgctcgttgg		
	miR330_ProbeFAM	[6FAM]gggcctgtgtcttaggctct[TAMRA]		
Klonierung	M13_for	GTA AACGACGCCAGT	52°C, 1'	35 x
	M13_rev	AACAGCTATGACCATG	72°C, 1'	
Antisense- Probe	as_Probe_for	GTACCCAATTGTGATAGT	62°C, 1'	35 x
	as_Probe_rev	AACGGTTATAGTTAGGTG	72°C, 1'	

Anwendung	Oligo-Name	Sequenz
Ligation	miR330_pUI4_for	5'gatctggatccgctgtctctggcctgtgtcttaggctttggc- ctctgactgagcaaagcacacggcctgcagagacagaattca 3'
	miR330_pUI4_rev	5'gatctgaattctgtctctgcaggccgtgtgcttgcagtcaga- ggccaaaagcctaagacacaggcccagagacagcggatcca 3'

IX.2. Zusammenfassung der publizierten TDP-43 k.o.-Mäuse

Autor	Art der Mutation	Letalität	Embryo Defekt	Embryonale Expression	Protein Level in +/-	mRNA Level in +/-	Verhalten
Wu et al, 2009	<i>gene targeting</i> , Gen-Deletion Exon 2 + 3	zwischen E3.5- E6.5	ICM	/	kein sign. Unterschied	kein sign. Unterschied	/
Sephton et al, 2010	<i>gene trapping</i> , pGT1Lxf in Intron 2	zwischen E3.5- E8.5	ICM	Vorderhirn-Vorläuferzellen, Mittelhirn, Hinterhirn, Neuroepithelium, Neuralrohr, DRG, Branchialbögen, Herz, Dickdarm, Somiten, Extremitätenknospen	kein sign. Unterschied	kein sign. Unterschied	/
Kraemer et al, 2010	<i>gene trapping</i> , pGT1Lxf in Intron 2	<i>in utero</i> ~ E7.5	/	/	kein sign. Unterschied	/	altersbedingte progressive Schwäche, motorische Defizite v.a. in der Greifkraft
Groß et al, <i>Revision</i>	<i>gene trapping</i> , pFlpRosaßgeo in Intron 1	zwischen E3.5- E7.5	Tropho- blast und ICM	Vorderhirn, Mittelhirn, Hinterhirn, Neuralrohr, Scheitelzellen, DRG, Branchialbögen, Herz, Extremitätenknospen	Reduktion um 25- 30%	Reduktion um ~39%	beeinträchtigte motorische Koordination und Balance, reduziertes Expolarationsverhalten

X. Abkürzungen

3p	3 prime
5p	5 prime
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	copy DNA
cpm	counts per minute
dATP	Desoxyadenintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E	Embryonaltag
ECL	Elektrochemische Lumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E.coli	Escherichia coli
et al	et alteres
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-Ethansulfonsäure
HRP	Horseradish/Meerrettich-Peroxidase
inkl.	inklusive
ISH	<i>in-situ</i> Hybridisierung
Kb	Kilobasenpaare
k.o.	knock-out
KDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertami

Lsg.	Lösung
μ	mikro
m	milli
M	Molarität
min	Minute
mRNA	messenger-RNA
Nr.	Nummer
Oligo	Oligonukleotid
p	p-Wert (Ergebnis eines Signifikanztests)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RE	Restriktionsenzym
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
sog.	sogenannt
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
Tris	Trishydromethylaminoethan
U	Unit
üN	über Nacht
v.a.	vor allem
Vol.	Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Lateinische Begriffe und Namen wurden kursiv geschrieben. Englische Fachbegriffe haben die inzwischen unüblichen deutschen Begriffe aus der Fachliteratur verdrängt und wurden daher in kursiver Schrift verwendet. Gene wurden gemäß der Nomenklatur des *International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice* abgekürzt und kursiv geschrieben. Proteine wurden ebenso wie die entsprechenden Gene abgekürzt aber nicht kursiv geschrieben. Aminosäuren sind im Ein- oder Drei-Buchstaben-Code angegeben. Chemische Elemente und Verbindungen sowie DNA modifizierende Enzyme (Restriktionsenzyme etc.) wurden mit ihren üblichen Symbolen abgekürzt.

XI. Referenzen

Abhyankar MM, Urekar C, Reddi PP. A novel CpG-free vertebrate insulator silences the testis-specific SP-10 gene in somatic tissues: role for TDP-43 in insulator function. *J. Biol. Chem.* 2007;282:36143–36154

Acharya KK, Govind CK, Shore AN, Stoler MH, Reddi PP. Cis-Requirement for the maintenance of round spermatid-specific transcription. *Dev. Biol.* 2006;295:781–790

Ahmed Z, Mackenzie IR, Hutton ML, Dickson DW. Progranulin in frontotemporal lobar degeneration and neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2007. 11;4:7

Alzheimer A, Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Z ges Neurol Psychiat.* 1911;4(356-385)

Anderson P, Kedersha N. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009.(6):430-6

Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry.* 1992;31: 10626–10633

Anson-Cartwright L, Dawson K, Holmyard D, Fisher SJ, Lazzarini RA, Cross JC. The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nat Genet.* 2000 Jul;25(3):311-4

Arai T, Hasegawa M, Nishihara M, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H. Frontotemporal dementia (FTD) and genetic mutations including progranulin gene. *Rinsho Shinkeigaku.* 2008. Nov;48(11):990-3

Arnold SJ, Huang GJ, Cheung AF, Era T, Nishikawa S, Bikoff EK, Molnár Z, Robertson EJ, Groszer M. The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone. *Genes Dev.* 2008 Sep 15;22(18):2479-84

Austin CP, Battey JF, Bradley A, Bucan M, Capecchi M, Collins FS, Dove WF, Duyk G, Dymecki S, Eppig JT, Grieder FB, Heintz N, Hicks G, Insel TR, Joyner A, Koller BH, Lloyd KC, Magnuson T, Moore MW, Nagy A, Pollock JD, Roses AD, Sands AT, Seed B, Skarnes WC, Snoddy J, Soriano P, Stewart DJ, Stewart F, Stillman B, Varmus H, Varticovski L, Verma IM, Vogt TF, von Melchner H, Witkowski J, Woychik RP, Wurst W, Yancopoulos GD, Young SG, Zambrowicz B. The knockout mouse project. *Nat Genet.* 2004 Sep;36(9):921-4

Auwerx J, Avner P, Baldock R, Ballabio A, Balling R, Barbacid M, Berns A, Bradley A, Brown S, Carmeliet P, Chambon P, Cox R, Davidson D, Davies K, Duboule D, Forejt J, Granucci F, Hastie N, de Angelis MH, Jackson I, Kioussis D, Kollias G, Lathrop M, Lendahl U, Malumbres M, von Melchner H, Müller W, Partanen J, Ricciardi-Castagnoli P, Rigby P, Rosen B, Rosenthal N, Skarnes B, Stewart AF, Thornton J,

Tocchini-Valentini G, Wagner E, Wahli W, Wurst W. The European dimension for the mouse genome mutagenesis program. *Nat Genet.* 2004 Sep;36(9):925-7

Ayala YM, Misteli T, Baralle FE. TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2008;105:3785–3789

Ayala YM, Pagani F, Baralle FE. TDP43 depletion rescues aberrant CFTR exon 9 skipping. *FEBS Lett* 2006;580:1339–1344

Ayala YM, Pantano S, D'Ambrogio A, Buratti E, Brindisi A, Marchetti C, Romano M, Baralle FE. Human, Drosophila, and C.elegans TDP43: nucleic acid binding properties and splicing regulatory function. *J Mol Biol.* 2005 May 6;348(3):575-88

Ayala YM, Zago P, D'Ambrogio A, Xu YF, Petrucelli L, Buratti E, Baralle FE. Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J Cell Sci.* 2008 Nov 15;121(Pt 22):3778-85

Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, Snowden J, Adamson J, Sadovnick AD, Rollinson S, Cannon A, Dwosh E, Neary D, Melquist S, Richardson A, Dickson D, Berger Z, Eriksen J, Robinson T, Zehr C, Dickey CA, Crook R, McGowan E, Mann D, Boeve B, Feldman H, Hutton M. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature.* 2006 Aug 24;442(7105):916-9

Bartel, DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004, 116, 281–297

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009 Jan 23;136(2):215-33

Beddington RS, Robertson EJ. Anterior patterning in mouse. *Trends Genet.* 1998 Jul;14(7):277-84

Bickel H. Epidemiologie der Demenzen. In: Förstl, H.; Bickel, H. & Kurz, A. (Hrsg.) Alzheimer Demenz. Grundlagen, Klinik und Therapie. Berlin, Heidelberg: New York, Springer, 1999, 9-32

Birnboim, H.C., Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979, 7, 1513-23

Boissonneault V, Plante I, Rivest S, Provost P. MicroRNA-298 and microRNA-328 regulate expression of mouse beta-amyloid precursor protein-converting enzyme 1. *J Biol Chem.* 2009 Jan 23;284(4):1971-81

Bose JK, Wang IF, Hung L, Tarn WY, Shen CK. TDP-43 overexpression enhances exon 7 inclusion during the survival of motor neuron pre-mRNA splicing. *J Biol Chem.* 2008 Oct 24;283(43):28852-9

Brodersen P, Voinnet O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Feb;10(2):141-8

Bradley A, Hasty P, Davis A, Ramirez-Solis R. Modifying the mouse: design and desire. *Biotechnology (N Y)*. 1992 May;10(5):534-9

Brouwers N, Slegers K, Engelborghs S, Maurer-Stroh S, Gijssels I, van der Zee J, Pickut BA, Van den Broeck M, Mattheijssens M, Peeters K, Schymkowitz J, Rousseau F, Martin JJ, Cruts M, De Deyn PP, Van Broeckhoven C. Genetic variability in progranulin contributes to risk for clinically diagnosed Alzheimer disease. *Neurology*. 2008 Aug 26;71(9):656-64

Brown SD, Peters J. Combining mutagenesis and genomics in the mouse--closing the phenotype gap. *Trends Genet*. 1996 Nov;12(11):433-5

Buratti E, Baralle FE. Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9. *J. Biol. Chem* 2001;276:36337-36343

Buratti E, Baralle FE. Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Front Biosci*. 2008 Jan 1;13:867-78

Buratti E, Baralle FE. The multiple roles of TDP-43 in pre-mRNA processing and gene expression regulation. *RNA Biol*. 2010 Jul 30;7(4)

Buratti E, Brindisi A, Giombi M, Tisminetzky S, Ayala YM, Baralle FE. TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *J. Biol. Chem* 2005;280:37572-37584

Buratti E, Brindisi A, Pagani F, Baralle FE. Nuclear factor TDP-43 binds to the polymorphic TG repeats in CFTR intron 8 and causes skipping of exon 9: a functional link with disease penetrance. *Am. J. Hum. Genet* 2004;74:1322-1325

Buratti E, De Conti L, Stuardi C, Romano M, Baralle M, Baralle F. Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels. *FEBS J*. 2010 May;277(10):2268-81

Buratti E, Dörk T, Zuccato E, Pagani F, Romano M, Baralle FE. Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *EMBO J*. 2001 Apr 2;20(7):1774-84

Burd CG, Dreyfuss G. RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *EMBO J*. 1994 Mar 1;13(5):1197-204

Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IR, Neumann M, Lee VM, Hatanpaa KJ, White CL 3rd, Schneider JA, Grinberg LT, Halliday G, Duyckaerts C, Lowe JS, Holm IE, Tolnay M, Okamoto K, Yokoo H, Murayama S, Woulfe J, Munoz DG, Dickson DW, Ince PG, Trojanowski JQ, Mann DM; Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol*. 2007 Jul;114(1):5-22

- Cairns NJ, Neumann M, Bigio EH, Holm IE, Troost D, Hatanpaa KJ, Foong C, White CL 3rd, Schneider JA, Kretzschmar HA, Carter D, Taylor-Reinwald L, Paulsmeyer K, Strider J, Gitcho M, Goate AM, Morris JC, Mishra M, Kwong LK, Stieber A, Xu Y, Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM, Mackenzie IR. TDP-43 in familial and sporadic frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin inclusions. *Am J Pathol.* 2007 Jul;171(1):227-40
- Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 2009 Feb 20;136(4):642-55
- Chawengsaksophak K, James R, Hammond VE, Kontgen, F, Beck F. Homeosis and intestinal tumours in *Cdx2* mutant mice. *Nature* 1997, 386, 84–87
- Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Nov;2(11):806-19
- Cooper TA, Wan L, Deyfuss G, RNA and Disease, *Cell* 2010, 136 (4): 777-793
- Cross JC, How to Make a Placenta: Mechanisms of Trophoblast Cell Differentiation in Mice – A Review, *Placenta.* 2005 Apr.26 Suppl A:S3-9
- Cruts M. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 2006, 442:920-924
- Cruts M, Kumar-Singh S, Van Broeckhoven C. Progranulin mutations in ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Curr Alzheimer Res.* 2006 Dec. 3(5):485-91
- Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J, Bateman A. Cellular localization of gene expression for progranulin. *J Histochem Cytochem.* 2000 Jul;48(7):999-1009
- Delacourte A. Tau pathology and neurodegeneration: an obvious but misunderstood link. *J Alzheimers Dis.* 2008 Aug;14(4):437-40
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004 Nov 11;432(7014):231-5
- Dickson DW, Josephs KA, Amador-Ortiz C. TDP-43 in differential diagnosis of motor neuron disorders. *Acta Neuropathol.* 2007 Jul;114(1):71-9
- Ding J, Hayashi MK, Zhang Y, Manche L, Krainer AR, Xu RM. Crystal structure of the two-RRM domain of hnRNP A1 (UP1) complexed with single-stranded telomeric DNA. *Genes Dev.* 1999 May 1;13(9):1102-15
- Doi H, Koyano S, Suzuki Y, Nukina N, Kuroiwa Y. The RNA-binding protein FUS/TLS is a common aggregate-interacting protein in polyglutamine diseases. *Neurosci Res.* 2010 Jan;66(1):131-3
- Dormann D, Capell A, Carlson AM, Shankaran SS, Rodde R, Neumann M, Kremmer E, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M, Haass C. Proteolytic processing of TAR DNA binding protein-43 by caspases produces C-terminal fragments with

disease defining properties independent of progranulin. *J Neurochem.* 2009 Aug;110(3):1082-94

Downs KM, Davies T. Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development.* 1993 Aug;118(4):1255-66

Dreyfuss G, Matunis MJ, Piñol-Roma S, Burd CG. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem* 1993;62:289–321

Feiguin F, Godena VK, Romano G, D'Ambrogio A, Klima R, Baralle FE. Depletion of TDP-43 affects *Drosophila* motoneurons terminal synapsis and locomotive behavior. *FEBS Lett.* 2009 May 19;583(10):1586-92

Fiesel FC, Voigt A, Weber SS, Van den Haute C, Waldenmaier A, Görner K, Walter M, Anderson ML, Kern JV, Rasse TM, Schmidt T, Springer W, Kirchner R, Bonin M, Neumann M, Baekelandt V, Alunni-Fabbroni M, Schulz JB, Kahle PJ. Knockdown of transactive response DNA-binding protein (TDP-43) downregulates histone deacetylase 6. *EMBO J.* 2010 Jan 6;29(1):209-21

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008 Feb;9(2):102-14

Fischer U, Kroiß M and Chari A, Wenn Muskeln die Nerven versagen. *Biospektrum,* 7/2007

Floss T, Schnütgen F. Conditional gene trapping using the FLEx system. *Methods Mol Biol.* 2008;435:127-38

Freibaum BD, Chitta RK, High AA, Taylor JP. Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery. *J Proteome Res.* 2010 Feb 5;9(2):1104-20

Friedel RH, Plump A, Lu X, Spilker K, Jolicoeur C, Wong K, Venkatesh TR, Yaron A, Hynes M, Chen B, Okada A, McConnell SK, Rayburn H, Tessier-Lavigne M. Gene targeting using a promoterless gene trap vector ("targeted trapping") is an efficient method to mutate a large fraction of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 13;102(37):13188-93

Friedrich G, Soriano P. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev.* 1991 Sep;5(9):1513-23

Fukuda H, Katahira M, Tsuchiya N, Enokizono Y, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H. Unfolding of quadruplex structure in the G-rich strand of the minisatellite repeat by the binding protein UP1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 1;99(20):12685-90

Ge WW, Volkening K, Leystra-Lantz C, Jaffe H, Strong MJ. 14-3-3 protein binds to the low molecular weight neurofilament (NFL) mRNA 3' UTR. *Mol Cell Neurosci.* 2007 Jan;34(1):80-7

- Ge WW, Wen W, Strong W, Leystra-Lantz C, Strong MJ. Mutant copper-zinc superoxide dismutase binds to and destabilizes human low molecular weight neurofilament mRNA. *J Biol Chem*. 2005 Jan 7;280(1):118-24
- Goedert M. Tau gene mutations and their effects. *Mov Disord*. 2005 Aug;20 Suppl 12:S45-52
- Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *Science*. 2006 Nov 3;314(5800):777-81
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, et al. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *Embo J* 1989;8:393–399.
- Goldman JS, Farmer JM, Wood EM, Johnson JK, Boxer A, Neuhaus J, Lomen-Hoerth C, Wilhelmsen KC, Lee VM, Grossman M, Miller BL. Comparison of family histories in FTL D subtypes and related tauopathies. *Neurology*. 2005 Dec 13;65(11):1817-9.
- Götz J, Ittner LM, Schonrock N, Cappai R. An update on the toxicity of Abeta in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008 Dec;4(6):1033-42.
- Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004 Nov 11;432(7014):235-40
- Guillemot F, Nagy A, Auerbach A, Rossant J, Joyner AL. Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature*. 1994 Sep 22;371(6495):333-6
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004 Dec 15;18(24):3016-27
- Han J, Pedersen JS, Kwon SC, Belair CD, Kim YK, Yeom KH, Yang WY, Haussler D, Blelloch R, Kim VN. Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell*. 2009 Jan 9;136(1):75-84
- Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2008 Jul;64(1):60-70.
- He Y, Smith R. Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. *Cell. Mol. Life Sci* 2009;66:1239–1256
- He Z, Bateman A. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. *J Mol Med*. 2003 Oct;81(10):600-12
- Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol*. 1988 Oct;107(4):1449-59

Hodges JR, Davies RR, Xuereb JH, Casey B, Broe M, Bak TH, Kril JJ, Halliday GM. Clinicopathological correlates in frontotemporal dementia. *Ann Neurol.* 2004 Sep;56(3):399-406.

Hogan B, Beddington R, Constantini F, and Lacy E, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2004, 2nd ed.

Holm, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 1979, 6, 65–70.

Horn C, Hansen J, Schnütgen F, Seisenberger C, Floss T, Irgang M, De-Zolt S, Wurst W, von Melchner H, Noppinger PR Splinkerette PCR for more efficient characterization of gene trap events. *Nat Genet.* 2007 Aug;39(8):933-4

Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed LA, Trojanowski J, Basun H, Lannfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd PR, Hayward N, Kwok JB, Schofield PR, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature.* 1998 Jun 18;393(6686):702-5

Iervolino A, Santilli G, Trotta R, Guerzoni C, Cesi V, Bergamaschi A, Gambacorti-Passerini C, Calabretta B, Perrotti D. hnRNP A1 nucleocytoplasmic shuttling activity is required for normal myelopoiesis and BCR/ABL leukemogenesis. *Mol Cell Biol.* 2002 Apr;22(7):2255-66

Igaz LM, Kwong LK, Chen-Plotkin A, Winton MJ, Unger TL, Xu Y, Neumann M, Trojanowski JQ, Lee VM. Expression of TDP-43 C-terminal Fragments in Vitro Recapitulates Pathological Features of TDP-43 Proteinopathies. *J Biol Chem.* 2009 Mar 27;284(13):8516-24

Igaz LM, Kwong LK, Xu Y, Truax AC, Uryu K, Neumann M, Clark CM, Elman LB, Miller BL, Grossman M, McCluskey LF, Trojanowski JQ, Lee VM. Enrichment of C-terminal fragments in TAR DNA-binding protein-43 cytoplasmic inclusions in brain but not in spinal cord of frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol.* 2008 Jul;173(1):182-94

Ingram EM, Spillantini MG., Tau gene mutations: dissecting the pathogenesis of FTDP-17. *Trends Mol Med.* 2002 Dec;8(12):555-62

Jiao J, Herl LD, Farese RV, Gao FB. MicroRNA-29b regulates the expression level of human progranulin, a secreted glycoprotein implicated in frontotemporal dementia. *PLoS One.* 2010 May 10;5(5):e10551

Josephs KA. Frontotemporal dementia and related disorders: deciphering the enigma. *Ann Neurol.* 2008 Jul;64(1):4-14

Josephs KA, et al. Neuropathologic features of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions with progranulin gene (PGRN) mutations. *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 2007;66:142–151

Joyner AL. Gene targeting and gene trap screens using embryonic stem cells: new approaches to mammalian development. *Bioessays*. 1991 Dec;13(12):649-56

Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat PF, Camu W, Meininger V, Dupre N, Rouleau GA. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 2008 May;40(5):572-4

Kadener S, Rodriguez J, Abruzzi KC, Khodor YL, Sugino K, Marr MT 2nd, Nelson S, Rosbash M. Genome-wide identification of targets of the drosha-pasha/DGCR8 complex. *RNA*. 2009 Apr;15(4):537-45

Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J*. 2007 Feb 7;26(3):775-83

Kovacs GG, Botond G, Budka H. Protein coding of neurodegenerative dementias: the neuropathological basis of biomarker diagnostics. *Acta Neuropathol*. 2010 Apr;119(4):389-408

Kovacs GG, Budka H. *Am J Pathol*. Prion diseases: from protein to cell pathology. 2008 Mar;172(3):555-65

Kovacs GG, Horvath S, Ströbel T, Puskas M, Bakos A, Summers DM, Will RG, Budka H. Genetic Creutzfeldt-Jakob disease mimicking variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009 Dec;80(12):1410-1

Kraemer BC, Schuck T, Wheeler JM, Robinson LC, Trojanowski JQ, Lee VM, Schellenberg GD. Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis. *Acta Neuropathol*. 2010 Apr;119(4):409-19

Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*. 1998 Feb;18(2):106-8

Kuo PH, Doudeva LG, Wang YT, Shen CK, Yuan HS. Structural insights into TDP-43 in nucleic-acid binding and domain interactions. *Nucleic Acids Res*. 2009 Apr;37(6):1799-808

Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH Jr. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2009 Feb 27;323(5918):1205-8

Kwong LK, Neumann M, Sampathu DM, Lee VM, Trojanowski JQ. TDP-43 proteinopathy: the neuropathology underlying major forms of sporadic and familial

frontotemporal lobar degeneration and motor neuron disease. *Acta Neuropathol.* 2007 Jul;114(1):63-70

Kwong LK, Uryu K, Trojanowski JQ, Lee VM. TDP-43 proteinopathies: neurodegenerative protein misfolding diseases without amyloidosis. *Neurosignals.* 2008;16(1):41-51

Laemmli UK, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug. 227, 680 – 685

Lagier-Tourenne C, Cleveland DW. Rethinking ALS: the FUS about TDP-43. *Cell.* 2009 Mar 20;136(6):1001-4

Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet.* 2010 Apr 15;19(R1):R46-64

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A,

- Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921
- Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol*. 2004 Dec 14;14(23):2162-7
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425:415–9
- Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995 Jan 13;80(1):155-65
- Lewczuk P, Esselmann H, Bibl M, Beck G, Maler JM, Otto M, Kornhuber J, Wiltfang J. Tau protein phosphorylated at threonine 181 in CSF as a neurochemical biomarker in Alzheimer's disease: original data and review of the literature. *J Mol Neurosci*. 2004;23(1-2):115-22
- Liu M, Sun A, Shin EJ, Liu X, Kim SG, Runyons CR, Markesbery W, Kim HC, Bing G. Expression of microsomal epoxide hydrolase is elevated in Alzheimer's hippocampus and induced by exogenous beta-amyloid and trimethyl-tin. *Eur J Neurosci*. 2006 Apr;23(8):2027-34
- Liu Q, Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J*. 1996 Jul 15;15(14):3555-65
- Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 2001, 25: 402-408
- Lomen-Hoerth C, Anderson T, Miller B. The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology*. 2002 Oct 8;59(7):1077-9
- Mackenzie IR, Baker M, West G, Woulfe J, Qadi N, Gass J, Cannon A, Adamson J, Feldman H, Lindholm C, Melquist S, Pettman R, Sadovnick AD, Dwosh E, Whiteheart SW, Hutton M, Pickering-Brown SM. A family with tau-negative frontotemporal dementia and neuronal intranuclear inclusions linked to chromosome 17. *Brain*. 2006 Apr;129(Pt 4):853-67
- Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, Kwong LK, Forman MS, Ravits J, Stewart H, Eisen A, McClusky L, Kretschmar HA, Monoranu CM, Highley JR, Kirby J, Siddique T, Shaw PJ, Lee VM, Trojanowski JQ. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol*. 2007 May;61(5):427-34
- Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, Kovacs GG, Ghetti B, Halliday G, Holm IE, Ince PG, Kamphorst W, Revesz T, Rozemuller AJ,

- Kumar-Singh S, Akiyama H, Baborie A, Spina S, Dickson DW, Trojanowski JQ, Mann DM. Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathol.* 2010 Jan;119(1):1-4
- Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H, Komure O, Matsuura S, Kobatake K, Morimoto N, Abe K, Suzuki N, Aoki M, Kawata A, Hirai T, Kato T, Ogasawara K, Hirano A, Takumi T, Kusaka H, Hagiwara K, Kaji R, Kawakami H. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 2010 May 13;465(7295):223-6
- Mann DM. A commentary on the diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1997 Jul-Aug; 18(4 Suppl):S51-2
- Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 2004 Aug 5;430(7000):631-9
- McCluskey LF, Elman LB, Martinez-Lage M, Van Deerlin V, Yuan W, Clay D, Siderowf A, Trojanowski JQ. Amyotrophic lateral sclerosis-plus syndrome with TAR DNA-binding protein-43 pathology. *Arch Neurol.* 2009 Jan;66(1):121-4
- Mercado PA, Ayala YM, Romano M, Buratti E, Baralle FE. Depletion of TDP 43 overrides the need for exonic and intronic splicing enhancers in the human apoA-II gene. *Nucleic Acids Res* 2005;33:6000–6010
- Michlewski G, Guil S, Semple CA, Cáceres JF. Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Mol Cell.* 2008 Nov 7;32(3):383-93
- Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 2006;126:1203–17
- Mitchell JD, Borasio GD, Amyotrophic lateral sclerosis, *Lancet* 2007; 369: 2031–41
- Nagy A, Rossant J, Production of completely ES cell-derived fetuses. In *Gene Targeting: A Practical Approach*, 1993, 147-179. IRL Press at Oxford University Press
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1993; 90: 8424–8.
- Neary D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S, et al. Frontotemporal lobar degeneration. A consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 1998;51:1546-54
- Neumann M, Kwong LK, Lee EB, Kremmer E, Flatley A, Xu Y, Forman MS, Troost D, Kretschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM. Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies. *Acta Neuropathol* 2009;117:137–149

- Neumann M, Kwong LK, Sampathu DM, Trojanowski JQ, Lee VM. TDP-43 proteinopathy in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis: protein misfolding diseases without amyloidosis. *Arch Neurol*. 2007 Oct;64(10):1388-94
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006 Oct 6;314(5796):130-3.
- Nishimoto Y, Ito D, Yagi T, Nihei Y, Tsunoda Y, Suzuki N. Characterization of alternative isoforms and inclusion body of the TAR DNA-binding protein-43. *J Biol Chem*. 2010 Jan 1;285(1):608-19
- Nishimura AL, Zupunski V, Troakes C, Kathe C, Fratta P, Howell M, Gallo JM, Hortobágyi T, Shaw CE, Rogelj B. Nuclear import impairment causes cytoplasmic trans-activation response DNA-binding protein accumulation and is associated with frontotemporal lobar degeneration. *Brain*. 2010 Jun;133(Pt 6):1763-71
- Nishioka N, Yamamoto S, Kiyonari H, Sato H, Sawada A, Ota M, Nakao K, Sasaki H. Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech Dev*. 2008 Mar-Apr;125(3-4):270-83
- Nonaka T, Arai T, Hasegawa M., The molecular mechanisms of intracellular TDP-43 aggregates *Brain Nerve*. 2009 Nov;61(11):1292-300
- Otis KO, Thompson KR, Martin KC. Importin-mediated nuclear transport in neurons *Curr Opin Neurobiol*. 2006 Jun;16(3):329-35
- Ou SH, Wu F, Harrich D, Garcia-Martinez LF, Gaynor RB. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J. Virol* 1995;69:3584–3596
- Pick A. Über die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie. *Prager Medizinische Wochenschrift* 1892;17:165-6
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Deepayan S, Package 'nlme', 2009 version 3.1-96
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997 Jun 27;276(5321):2045-7
- Portman DS, Dreyfuss G. RNA annealing activities in HeLa nuclei. *EMBO J*. 1994 Jan 1;13(1):213-21
- Provost P. Interpretation and applicability of microRNA data to the context of Alzheimer's and age-related diseases. *Aging (Albany NY)*. 2010 Mar 31;2(3):166-9

Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2010 Jan 28;362(4):329-44

Rademakers R, Eriksen JL, Baker M, Robinson T, Ahmed Z, Lincoln SJ, Finch N, Rutherford NJ, Crook RJ, Josephs KA, Boeve BF, Knopman DS, Petersen RC, Parisi JE, Caselli RJ, Wszolek ZK, Uitti RJ, Feldman H, Hutton ML, Mackenzie IR, Graff-Radford NR, Dickson DW. Common variation in the miR-659 binding-site of GRN is a major risk factor for TDP43-positive frontotemporal dementia. *Hum Mol Genet.* 2008 Dec 1;17(23):3631-42

Ralston A, Cox BJ, Nishioka N, Sasaki H, Chea E, Rugg-Gunn P, Guo G, Robson P, Draper JS, Rossant J. Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development.* 2010 Feb;137(3):395-403

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004 Oct;14(10A):1902-10

Rossant J, Cross JC. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet.* 2001 Jul;2(7):538-48

Russ AP, Wattler S, Colledge WH, Aparicio SA, Carlton MB, Pearce JJ, Barton SC, Surani MA, Ryan K, Nehls MC, Wilson V, Evans MJ. Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature.* 2000 Mar 2;404(6773):95-9

Rutherford NJ, Zhang YJ, Baker M, Gass JM, Finch NA, Xu YF, Stewart H, Kelley BJ, Kuntz K, Crook RJ, Sreedharan J, Vance C, Sorenson E, Lippa C, Bigio EH, Geschwind DH, Knopman DS, Mitsumoto H, Petersen RC, Cashman NR, Hutton M, Shaw CE, Boylan KB, Boeve B, Graff-Radford NR, Wszolek ZK, Caselli RJ, Dickson DW, Mackenzie IR, Petrucelli L, Rademakers R. Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet.* 2008 Sep 19;4(9):e1000193

Sampathu DM, Neumann M, Kwong LK, Chou TT, Micsenyi M, Truax A, Bruce J, Grossman M, Trojanowski JQ, Lee VM. Pathological heterogeneity of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions delineated by ubiquitin immunohistochemistry and novel monoclonal antibodies. *Am J Pathol.* 2006 Oct;169(4):1343-52

Sato T, Takeuchi S, Saito A, Ding W, Bamba H, Matsuura H, Hisa Y, Tooyama I, Urushitani M. Axonal ligation induces transient redistribution of TDP-43 in brainstem motor neurons. *Neuroscience.* 2009 Dec 29;164(4):1565-78

Schnorr B, Kressin M. Embryologie der Haustiere: Ein Kurzlehrbuch, Enke Verlag Stuttgart. 2006

Schnütgen F, Ghyselinck NB. Adopting the good reFLEXes when generating conditional alterations in the mouse genome. *Transgenic Res.* 2007 Aug;16(4):405-13

Schrank B, Götz R, Gunnensen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, Sendtner M. Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 2;94(18):9920-5

Scotto-Lavino E, Du G, Frohman MA. 5' end cDNA amplification using classic RACE. *Nat Protoc*. 2006;1(6):2555-62

Seelaar H, Schelhaas HJ, Azmani A, Küsters B, Rosso S, Majoor-Krakauer D, de Rijk MC, Rizzu P, ten Brummelhuis M, van Doorn PA, Kamphorst W, Willemsen R, van Swieten JC. TDP-43 pathology in familial frontotemporal dementia and motor neuron disease without Progranulin mutations. *Brain*. 2007 May;130(Pt 5):1375-85

Sephton CF, Good SK, Atkin S, Dewey CM, Mayer P 3rd, Herz J, Yu G. TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development. *J Biol Chem*. 2010 Feb 26;285(9):6826-34

Shiina Y, Arima K, Tabunoki H, Satoh J. TDP-43 dimerizes in human cells in culture. *Cell Mol Neurobiol*. 2010 May;30(4):641-52

Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, Nielsen JE, Hodges JR, Spillantini MG, Thusgaard T, Brandner S, Brun A, Rossor MN, Gade A, Johannsen P, Sørensen SA, Gydesen S, Fisher EM, Collinge J. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet*. 2005 Aug;37(8):806-8

Spillantini MG, Goedert M. Tau mutations in familial frontotemporal dementia. *Brain*. 2000 May;123 (Pt 5):857-9

Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997 Aug 28;388(6645):839-40

Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Belleruche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2008 Mar 21;319(5870):1668-72.

Stanford WL, Cohn JB, Cordes SP. Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet*. 2001 Oct;2(10):756-68

Stark KL, Xu B, Bagchi A, Lai WS, Liu H, Hsu R, Wan X, Pavlidis P, Mills AA, Karayiorgou M, Gogos JA. Altered brain microRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model. *Nat Genet*. 2008 Jun;40(6):751-60

Stewart HG, Mackenzie IR, Eisen A, Brännström T, Marklund SL, Andersen PM, Clinicopathological phenotype of ALS with a novel G72C SOD1 gene mutation mimicking a myopathy, *Muscle and Nerve* 2006, 33:701-706

Strong MJ. The evidence for altered RNA metabolism in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Neurol Sci*. 2010 Jan 15;288(1-2):1-12

- Strong MJ, Volkening K, Hammond R, Yang W, Strong W, Leystra-Lantz C, Shoosmith C. TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. *Mol. Cell. Neurosci* 2007;35:320–327
- Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoblast in the mouse blastocyst. *Development* 2005, 132, 2093-2102
- Talbot K, Ansorge O. Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: common pathways in neurodegenerative disease. *Hum Mol Genet.* 2006 Oct 15;15 Spec No 2
- Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A. K., Nagy, A. and Rossant, J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 1998, 282,2072 -2075
- Tesar PJ. Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos, *PNAS* 2005,102, no. 23 , 8239–8244
- Theiler, *The House Mouse: Atlas of Mouse Development*, Springer-Verlag, New York, 1989
- Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev.* 2006 Aug 15;20(16):2202-7
- Turner MR. Prolonged survival in motor neuron disease: a descriptive study of the King's database 1990–2002 *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 995-997
- Uez N, Lickert H, Kohlhase J, de Angelis MH, Kühn R, Wurst W, Floss T. Sall4 isoforms act during proximal-distal and anterior-posterior axis formation in the mouse embryo. *Genesis.* 2008 Sep;46(9):463-77
- Valdmanis PN, Dupre N, Bouchard JP, Camu W, Salachas F, Meininger V, Strong M, Rouleau GA. Three families with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia with evidence of linkage to chromosome 9p. *Arch Neurol.* 2007 Feb;64(2):240-5
- Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, Ganesalingam J, Williams KL, Tripathi V, Al-Saraj S, Al-Chalabi A, Leigh PN, Blair IP, Nicholson G, de Belleruche J, Gallo JM, Miller CC, Shaw CE. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science.* 2009 Feb 27;323(5918):1208-11
- Van Damme P, Martens L, Van Damme J, Hugelier K, Staes A, Vandekerckhove J, Gevaert K. Caspase-specific and nonspecific in vivo protein processing during Fas-induced apoptosis. *Nat Methods.* 2005 Oct;2(10):771-7
- Van Deerlin VM, Sleiman PM, Martinez-Lage M, Chen-Plotkin A, Wang LS, Graff-Radford NR, Dickson DW, Rademakers R, Boeve BF, Grossman M, Arnold SE, Mann DM, Pickering-Brown SM, Seelaar H, Heutink P, van Swieten JC, Murrell JR,

Ghetti B, Spina S, Grafman J, Hodges J, Spillantini MG, Gilman S, Lieberman AP, Kaye JA, Woltjer RL, Bigio EH, Mesulam M, Al-Sarraj S, Troakes C, Rosenberg RN, White CL 3rd, Ferrer I, Lladó A, Neumann M, Kretzschmar HA, Hulette CM, Welsh-Bohmer KA, Miller BL, Alzualde A, de Munain AL, McKee AC, Gearing M, Levey AI, Lah JJ, Hardy J, Rohrer JD, Lashley T, Mackenzie IR, Feldman HH, Hamilton RL, Dekosky ST, van der Zee J, Kumar-Singh S, Van Broeckhoven C, Mayeux R, Vonsattel JP, Troncoso JC, Kril JJ, Kwok JB, Halliday GM, Bird TD, Ince PG, Shaw PJ, Cairns NJ, Morris JC, McLean CA, DeCarli C, Ellis WG, Freeman SH, Frosch MP, Growdon JH, Perl DP, Sano M, Bennett DA, Schneider JA, Beach TG, Reiman EM, Woodruff BK, Cummings J, Vinters HV, Miller CA, Chui HC, Alafuzoff I, Hartikainen P, Seilhean D, Galasko D, Masliah E, Cotman CW, Tuñón MT, Martínez MC, Munoz DG, Carroll SL, Marson D, Riederer PF, Bogdanovic N, Schellenberg GD, Hakonarson H, Trojanowski JQ, Lee VM. Common variants at 7p21 are associated with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *Nat Genet.* 2010 Mar;42(3):234-9

Van der Putten H, Wiederhold KH, Probst A, Barbieri S, Mistl C, Danner S, Kauffmann S, Hofele K, Spooren WP, Ruegg MA, Lin S, Caroni P, Sommer B, Tolnay M, Bilbe G. Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J Neurosci.* 2000 Aug 15;20(16):6021-9

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* 2007 Dec 21;318(5858):1931-4

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R,

Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science*. 2001 Feb 16;291(5507):1304-51

Wakabayashi K, Engelender S, Yoshimoto M, Tsuji S, Ross CA, Takahashi H. Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2000 Apr;47(4):521-3

Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet*. 2006 Mar;7(3):185-99

Wang HY, Wang IF, Bose J, Shen CK. Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. *Genomics* 2004;83:130–139

Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blueloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet*. 2007 Mar;39(3):380-5

Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyraas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigó R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M,

Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002 Dec 5;420(6915):520-62

Watts GD, et al. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat. Genet* 2004;36:377–381

Wiles MV, Vauti F, Otte J, Füchtbauer EM, Ruiz P, Füchtbauer A, Arnold HH, Lehrach H, Metz T, von Melchner H, Wurst W. Establishment of a gene-trap sequence tag library to generate mutant mice from embryonic stem cells. *Nat Genet*. 2000 Jan;24(1):13-4

Williams KL, Durnall JC, Thoeng AD, Warraich ST, Nicholson GA, Blair IP. A novel TARDBP mutation in an Australian amyotrophic lateral sclerosis kindred. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009 Nov;80(11):1286-8

Winton MJ, Igaz LM, Wong MM, Kwong LK, Trojanowski JQ, Lee VM. Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *J Biol Chem*. 2008 May 9;283(19):13302-9

Winton MJ, Van Deerlin VM, Kwong LK, Yuan W, Wood EM, Yu CE, Schellenberg GD, Rademakers R, Caselli R, Karydas A, Trojanowski JQ, Miller BL, Lee VM. A90V TDP-43 variant results in the aberrant localization of TDP-43 in vitro. *FEBS Lett*. 2008 Jun 25;582(15):2252-6

Wu LS, Cheng WC, Hou SC, Yan YT, Jiang ST, Shen CK. TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis. *Genesis*. 2010 Jan;48(1):56-62

Yamanaka Y, A. Ralston, R. O. Stephenson, J. Rossant: Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Developmental Dynamics* 2006, 235, 2301-2314

Yokota O, Tsuchiya K, Terada S, Ishizu H, Uchikado H, Ikeda M, Oyanagi K, Nakano I, Murayama S, Kuroda S, Akiyama H. Basophilic inclusion body disease and neuronal intermediate filament inclusion disease: a comparative clinicopathological study. *Acta Neuropathol*. 2008 May;115(5):561-75

You Y, Browning VL, Schimenti JC. Generation of radiation-induced deletion complexes in the mouse genome using embryonic stem cells. *Methods*. 1997 Dec;13(4):409-21

Zambrowicz BP, Friedrich GA, Buxton EC, Lilleberg SL, Person C, Sands AT. Disruption and sequence identification of 2,000 genes in mouse embryonic stem cells. *Nature*. 1998 Apr 9;392(6676):608-11

Zhang YJ, Xu YF, Cook C, Gendron TF, Roettges P, Link CD, Lin WL, Tong J, Castanedes-Casey M, Ash P, Gass J, Rangachari V, Buratti E, Baralle F, Golde TE, Dickson DW, Petrucelli L. Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 May 5;106(18):7607-12

Zhang YJ, Xu YF, Dickey CA, Buratti E, Baralle F, Bailey R, Pickering-Brown S, Dickson D, Petrucelli L. Progranulin mediates caspase-dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43. *J Neurosci*. 2007 Sep 26;27(39):10530-4

XII. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wurst bedanken, der es mir ermöglichte, an seinem Institut meine Promotionsarbeit anzufertigen und mich während dieser Zeit durch sein Interesse an meiner Arbeit, seinen Ideen und seine Offenheit unterstützte.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Thomas Floss, der mich v.a. in der Zeit des experimentellen Arbeitens großartig unterstützte, bei Problemen immer ein offenes Ohr hatte und mir im Labor mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich möchte mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. Erwin Grill und Herrn Dr. Johannes Beckers für die Bereitschaft, die Prüfung durchzuführen und die Dissertation zu bewerten, bedanken.

Ein außerordentlicher Dank gilt meiner „Labormitstreiterin“ Laura, die durch unzählige Gespräche und Diskussionen während unserer Kaffeepausen einen wesentlichen Beitrag zu meiner guten Laune beigetragen hat. Mit ihr hat die Laborarbeit einen humoristischen *touch* bekommen, den ich nach ihrem Promotionsende sehr vermisst habe.

Ein sehr herzlicher Dank geht an meine Freundin Johanna, die mich während meiner Doktorarbeit seelisch unterstützte und mir beim Korrekturlesen hilfsbereit zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinen Laborkollegen, den Tierpflegerinnen und den technischen Assistentinnen Irina Rodionova, Helga Grunert und Susanne Bourier, die mich an der *bench*, in der ES-Zellkultur und im Maushaus unterstützten. Des weiteren möchte ich mich beim Injektionsteam Adrienne Tasdemir und Susanne Weidemann für die Mithilfe bei den tetraploiden Aggregationen und den Blastozystenisolierungen bedanken.

Ein weiterer Dank gilt dem Verhaltensteam von Frau Dr. Sabine Hölter-Koch, insbesondere Lisa Glasl, die sich bereit erklärt hatte, die motorischen Tests an den TDP-43 Tieren durchzuführen.

Zusätzlich möchte ich mich bei den Kollegen des gesamten IDG bedanken, die offen für Diskussionen und kooperativ in Notlagen waren, insbesondere Frau Dr. Theresa Fauß-Kessler für die statistische Auswertung und Herrn Dr. Dietrich Trümbach für die bioinformatischen Daten.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinem Vater,

bedanken, der mir mein Studium ermöglichte und mir in meinem Schaffen uneingeschränkte Freiheiten ließ. Außerdem möchte ich mich bei Ulla und Kalli sowie bei Tante Traudl bedanken, die mich v.a. während der Endphase der Promotion durch zahlreiches „Babysitting“ unterstützten.

Mein größter Dank gilt allerdings meinem Mann Björn und meinem Sohn Fynn, die mir auch in den schweren Zeiten zur Seite standen und mich nicht vergessen ließen, dass es noch andere Dinge gibt, die „die Welt im Innersten zusammenhält“.