

**Analyse der Funktion von Dystroglycan im frühen sich
entwickelnden ZNS mittels inhibierender Antikörper**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Uli Großhans

geboren in Landau/Pfalz

Mainz, 2007

*Natürlicher Verstand kann fast jeden Grad von Bildung ersetzen, aber
keine Bildung den natürlichen Verstand.*

Arthur Schopenhauer

22.02.1788 - 21.09.1860

dt. Philosoph

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.2	<i>Zielsetzung.....</i>	14
II.	Material und Methoden	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....</i>	15
2.1.2	<i>Verbrauchsmaterialien für die Molekularbiologie.....</i>	15
2.1.3	<i>Verbrauchsmaterialien für die Proteinbiochemie.....</i>	16
2.1.4	<i>Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur.....</i>	16
2.1.5	<i>Primäre Antikörper.....</i>	17
2.1.6	<i>Sekundäre Antikörper.....</i>	18
2.1.7	<i>Hühnereier.....</i>	19
2.1.8	<i>Vektoren und Oligonukleotide zur Herstellung eines rekombinanten Fusionsproteins</i>	19
2.2	Methoden	20
2.2.1	<i>Molekularbiologische Methoden.....</i>	20
2.2.2	<i>Zellbiologische Methoden.....</i>	25
2.2.3	<i>Proteinbiochemische Methoden.....</i>	26
2.2.4	<i>Neuroanatomische Methoden.....</i>	37
III.	Ergebnisse	43
3.1	<i>Herstellung und Charakterisierung eines Antikörpers gegen die Interaktionsstelle zwischen α- und β-Dystroglycan.....</i>	43
3.2	<i>Biochemischer Nachweis der Funktionalität des polyklonalen DygAB Antikörpers</i>	50
3.3	<i>Auswirkungen der Fab-Fragmentinjektionen auf die Entwicklung des embryonalen Hühnergewebes.....</i>	53
3.4	<i>Analyse der proliferierenden und postmitotischen Zellen</i>	59
3.5	<i>Untersuchung der Basalmembranintegrität</i>	62
3.6	<i>Analyse der apikalen und basalen Polarität von Neuroepithelzellen ...</i>	63

Inhaltsverzeichnis

3.7	<i>Untersuchung der OPL (Äußere Plexiforme Schicht) in der Hühnerretina älterer Embryonalstadien</i>	70
3.8	<i>Wachstumsverhalten der tectobulbären Axone im E7 Mesencephalon</i>	74
IV.	Diskussion	76
4.1	<i>Charakterisierung der neu generierten Antikörper DygAB</i>	76
4.2	<i>Morphologische Veränderung des Mesencephalons und der Retina nach Fab-Fragmentinjektionen</i>	78
4.3	<i>Mechanismen der morphologischen Veränderung des Hühnergewebes und der Neuroepithelzellen</i>	79
4.4	<i>Hyperproliferation der Neuroepithelzellen</i>	86
4.5	<i>Erhöhung der Anzahl postmitotischer Neuronen nach Fab-Fragmentinjektionen</i>	89
4.6	<i>Migrationsstörungen des embryonalen Gewebes</i>	90
4.7	<i>Rolle von Dystroglycan bei der Etablierung der Neuroepithelzell-Polarität</i>	92
4.8	<i>Einflussnahme von Dystroglycan mittels Fab-Fragmente auf das axonale Wachstum efferenter Axone des Mesencephalons</i>	95
4.9	<i>Einfluss von Dystroglycan auf die Augenentwicklung älterer Hühnerembryonen</i>	97
V.	Zusammenfassung	101
VI.	Literaturverzeichnis	102
VII.	Abkürzungsverzeichnis	120

I. Einleitung

Das Gehirn ist eines der komplexesten Gewebe, das wir kennen. Es reguliert und steuert sensorische und motorische Abläufe des Körpers und erlaubt uns, auf alle Reize unserer Umwelt adäquat zu reagieren. Es ist durch seine hochkomplexe Struktur das am wenigsten verstandene Organ im menschlichen Körper. Viele faszinierende Fragen müssen in der Zukunft noch auf molekularer und zellulärer Ebene beantwortet werden, um die Mechanismen zu verstehen, die zur Bildung dieser komplizierten Struktur führen.

Genetisch bedingte Erkrankungen, und von ihnen abgeleitete genetisch veränderte Tiere, erlauben grundlegende Einblicke in Mechanismen der Gehirnentwicklung, bzw. in die Funktion spezifischer Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des Dystrophin-assoziierten Glykoproteinkomplexes im sich entwickelnden ZNS (**z**entrales **N**ervensystem) analysiert. Mutationen in Komponenten dieses Proteinkomplexes führen zur Schwächung und zur progressiven Degeneration der Muskulatur und somit zu unterschiedlichen Formen von Muskeldystrophie (Campbell, 1995). Einige aus dieser heterogenen Gruppe von Erbkrankheiten führen nicht nur zur Degeneration der Skelettmuskulatur, sondern auch zu morphologischen Veränderungen innerhalb des ZNS. Die Ursachen dieser Veränderungen sind jedoch noch weitgehend unbekannt (Anderson et al., 2002).

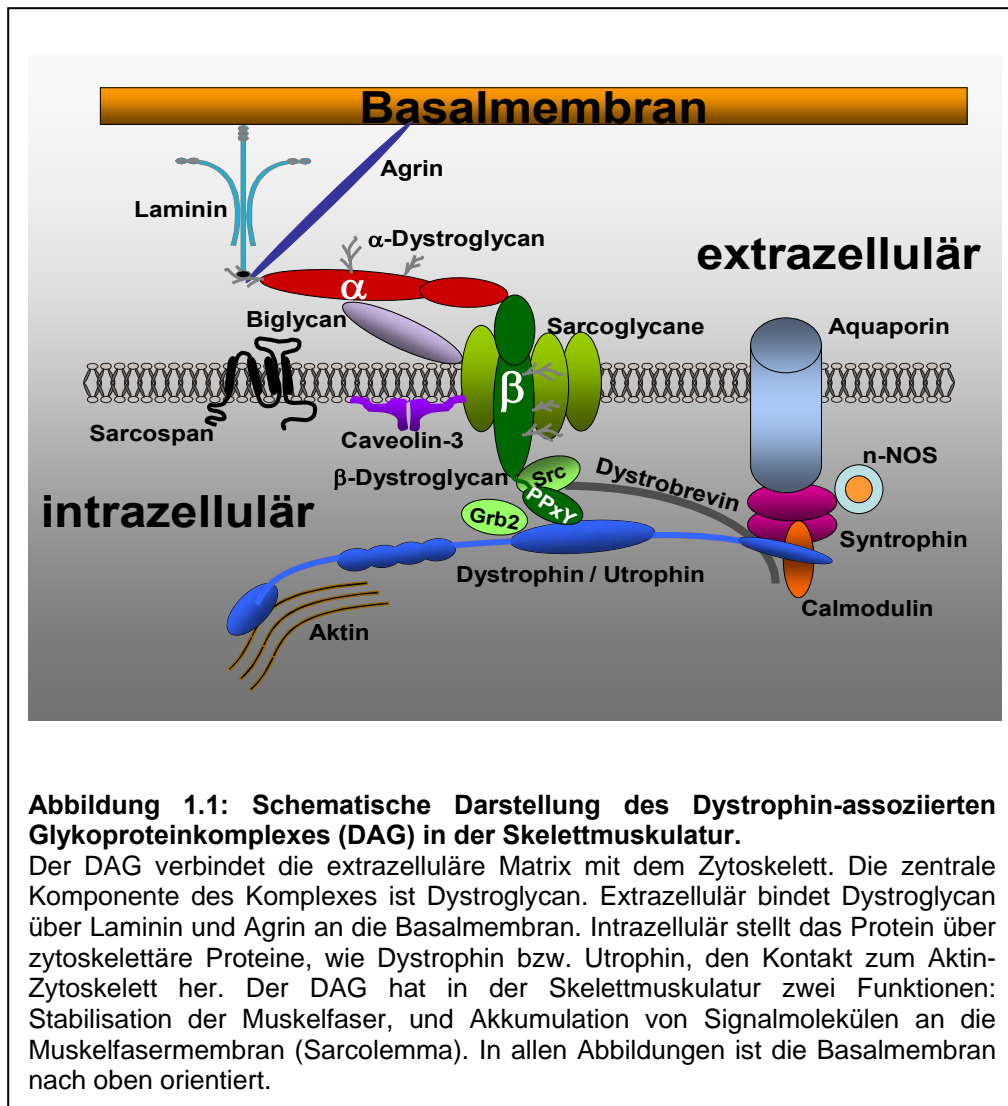
Die Zusammensetzung und die Funktion des Dystrophin-assoziierten Glykoproteinkomplexes wurde hauptsächlich in der Skelettmuskulatur beschrieben (Rando, 2001; Davies und Nowak, 2006). Dystroglycan stellt die zentrale Komponente des oligomeren membranassoziierten Proteinkomplexes dar. Diese zentrale Komponente wird von einem Gen (DAG1) als ein 895 Aminosäure langes Vorläuferprotein synthetisiert und posttranslational proteolytisch in zwei Teile gespalten (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993; Holt et al., 2000). Durch diese Spaltung entstehen das N-terminale, hochglykosylierte α -Dystroglycan und das ebenfalls glykosylierte transmembrane

β -Dystroglycan. Die Glykosylierung von α -Dystroglycan ist für seine Funktion und die Interaktionen mit seinen Bindungspartnern essentiell. Intrazellulär bindet das N-terminal liegende PPxY-Motiv, einer 15 Aminosäure umfassenden zytoplasmatischen Domäne, von β -Dystroglycan an die WW Domäne des C-Terminus von Dystrophin, der namensgebenden Komponente des Komplexes (Suzuki et al., 1992; Suzuki et al., 1994; Jung et al., 1995; Rosa et al., 1996; Huang et al., 2000). Neben der WW Domäne ist auch eine ZZ Domäne essentiell an der Bindung von Dystrophin an β -Dystroglycan beteiligt (Ishikawa-Sakurai et al., 2004). Zusätzlich wird diese Bindung durch eine EF-Hand ähnliche Domäne im Dystrophin verstärkt (Chung und Campanelli, 1999). Diese Interaktion der beiden Proteine wird reguliert durch eine Tyrosinphosphorylierung des C-terminal liegenden PPxY-Motivs von β -Dystroglycan (Ilsley et al., 2001). Die Verbindung des DAG zum intrazellulären Zytoskelett wird über die Bindung von F-Aktin an den N-Terminus von Dystrophin hergestellt (Rybakova et al., 1996; Rybakova et al., 2006). Extrazelluläre Bestandteile des Komplexes sind die Matrixproteine Agrin, Laminin und Biglycan. Diese Proteine binden alle an das hochglykosylierte α -Dystroglycan (Bowe et al., 1994; Matsumura et al., 1997; Hohenester et al., 1999; Bowe et al., 2000). Alpha Dystroglycan interagiert extrazellulär über O-verknüpfte Mannose Zuckerseitenketten mit der G-Domäne von Laminin 1 (LM 111) und 2, aber auch mit Agrin und Perlecan (Hohenester et al., 1999; Talts et al., 1999; Winder, 2001). Biglycan bindet dagegen, unabhängig von der Glykosylierung, über das Proteinrückrad an α -Dystroglycan (Bowe et al., 2000). Alpha-Dystroglycan interagiert über seinen C-Terminus mit der extrazellulären N-terminalen Region von β -Dystroglycan. Diese Interaktion ist unabhängig von Zuckerresten (Bozzi et al., 2001; Sciandra et al., 2001). Über die Interaktionen der beschriebenen Proteine wird die extrazelluläre Verbindung des Sarcolemmas (Muskel-fasermembran) mit der Basalmembran vermittelt (Barresi und Campbell, 2006).

Muskulatur besteht aus Muskelfasern, in denen jede einzelne Faser von einer Basalmembran umgeben ist. Basalmembranen sind eine kondensierte Form extrazellulärer Matrix, welche aus einem Kollagenetzwerk, und unterschiedlichen Matrixproteinen wie Laminin, Nidogen und Perlecan aufgebaut sind

(Costell et al., 1999; Sasaki et al., 2004). Die Basalmembran ist essentiell für die Stabilität jeder einzelnen Muskelfaser. Durch die molekulare Verbindung, die der DAG zwischen Basalmembran und dem intrazellulären Zytoskelett herstellt, können die Kräfte, die auf der Lipiddoppelschicht der Muskelfasermembran bei Kontraktion der Muskulatur lasten, kompensiert werden. Der DAG stabilisiert und schützt somit die Muskelfasern der Skelettmuskulatur vor mechanischen Schäden (Campbell und Stull J.T., 2003). Mutationen, die die Verbindung zwischen dem Aktin-Zytoskelett und extrazellulärer Matrix unterbrechen, sind die genetische Ursache unterschiedlicher Formen von Muskeldystrophieerkrankungen (Campbell, 1995). So führt die Unterbrechung dieser molekularen Verbindung, bei mechanischer Beanspruchung durch Kontraktion der Muskulatur, zum Reißen der Muskelfasern. Dies führt zum Absterben der Muskelzellen. Nach Degeneration und Phagozytose der Muskelfasern erfolgt durch Proliferation und Differenzierung von Satellitenzellen eine Neubildung von Muskelfasern und damit eine Regeneration der Muskulatur (Pasternak et al., 1995). Der progressive Verlust von Muskelmasse ergibt sich daraus, dass ab einem bestimmten Alter und ab einer bestimmten Muskelstärke sowie bei einer bestimmten Benutzungshäufigkeit der Muskulatur, die Regeneration nicht mehr die Degeneration kompensieren kann. Die Folge ist ein fortschreitender Verlust von Muskelmasse über viele Jahre, bis Jahrzehnte, hinweg.

Die Zusammensetzung des DAG ist sehr vielfältig und variiert innerhalb unterschiedlicher Gewebe. So wird Dystrophin an der neuromuskulären Endplatte durch das homologe Utrophin ersetzt (Ohlendieck et al., 1991; Tinsley et al., 1992; Blake et al., 1995). Utrophin ist in seinem strukturellen Aufbau Dystrophin sehr ähnlich, weil es die gleichen Bindungsdomänen enthält (Blake et al., 2002). Die Bindung von Utrophin an β -Dystroglycan wird ebenfalls, wie bei dem homologen Dystrophin, über eine Tyrosinphosphorylierung reguliert (James et al., 2000). Auch die Anwesenheit aller anderen Komponenten des DAG ist gewebespezifisch. Lediglich Dystroglycan, die Zentralkomponente des Komplexes, ist unabhängig von der Zusammensetzung und der Lokalisation, immer mit dem DAG assoziiert.



Es sind noch weitere Moleküle mit diesem Komplex assoziiert, die nicht direkt an der Ausbildung dieser molekularen Brücke zwischen extrazellulärer Matrix und Zytoskelett beteiligt sind. Dazu gehören die transmembranen Sarcoglycane (α - γ) und das Membranprotein Sarcospan, welches an γ -Sarcoglycan bindet (Crosbie et al., 1997; Chan et al., 1998; Crosbie et al., 1999). Delta-Sarcoglycan verbindet die verschiedenen Sarcoglycane direkt mit β -Dystroglycan (Yoshida et al., 1994; Lim und Campbell, 1998). Andere intrazelluläre Proteine, wie die Syntrophine (α , β 1 und β 2), Dystrobrevine (α und β) und die NO-Synthase, binden an den C-Terminus von Dystrophin und sind auf diese Weise mit dem DAG assoziiert (Blake et al., 1995; Ahn und Kunkel, 1995; Blake et al., 1996; Peters et al., 1997; Brenman und Bredt, 1997; Peters et al., 1998). Calmodulin, welches die Phosphorylierung von Dystrophin

und α 1-Syntrophin reguliert und die NO-Synthase, sind an einer Vielzahl von Signaltransduktionsprozessen beteiligt (Brennan und Bredt, 1996; Madhavan und Jarrett, 1999; Bredt, 1999). Das Adaptermolekül Grb2, welches an Signaltransduktion, sowie an Zytoskelett Organisationsprozessen beteiligt ist, bindet an den intrazellulären Bereich von β -Dystroglycan (Yang et al., 1995). Durch α -Syntrophin werden Wasserkanäle in Form von Aquaporinen an der Plasmamembran angereichert (Adams et al., 2001; Puwarawuttipanit et al., 2006).

Der Dystrophin-assoziierte Glykoproteinkomplex (DAG) hat in der Skelettmuskulatur zwei wesentliche Funktionen:

1. Er stellt in der Skelettmuskulatur eine molekulare Brücke zwischen extrazellulärer Matrix und des subsarcolemmale Aktin Zytoskelett dar und verleiht einzelnen Muskelfasern eine sehr große Stabilität (Ervasti und Campbell, 1993; Rybakova et al., 2000). Diese Stabilität verhindert, dass die Muskelfasern bei Kontraktion reißen. Eine Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen und Protein-Protein Interaktionen bilden diese molekulare Verbindung aus (siehe Abbildung 1.1).

Extrazelluläre Unterbrechung des DAG zwischen α -Dystroglycan und Laminin, durch Mutationen in der Laminin-2-Kette des Laminin Heterotrimers, führt zur kongenitalen Muskeldystrophie 1A (Kirschner und Bonnemann, 2004; Jimenez-Mallebrera et al., 2005). Hingegen bewirken Mutationen im Dystrophingen eine Unterbrechung der molekularen Verbindung des Zytoskeletts zur extrazellulären Matrix und führen zu anderen Formen von Muskeldystrophien, nämlich der Duchenne Muskeldystrophie (DMD) und der milder verlaufenden Form der Becker Muskeldystrophie (BMD). Die häufigste Form muskulärer Dystrophie ist jedoch die Muskeldystrophie vom Duchenne Typ (DMD). Die X-chromosomal rezessiv vererbte DMD ist eine der häufigsten Erbkrankheiten (betrifft 1 von 3300 neugeborenen Jungen) und führt zu schwerer fortschreitender Muskeldegeneration. Die Patienten sterben meistens im Laufe der dritten Lebensdekade aufgrund der Schwächung der Herz und Atemmuskulatur (Koenig et al., 1987; Anderson et al., 2002). Kürzlich konnte an Mausmutanten (Dp116/mdx^{4CV}-Mäusen) gezeigt werden, dass

ausschließlich Unterbrechung der molekularen Verbindung zwischen Zytoskelett und Basalmembran als primäre Ursache für die Entstehung der DMD angesehen werden kann. Diese Mäuse wurden in der Form genetisch manipuliert, dass sie nur eine deletierte Isoform von Dystrophin, nämlich das Dp 116, exprimieren. Die Mutationen im Dystrophingen (Dp 116) wurden so gewählt, dass die mechanische Verbindung des Aktin-Zytoskeletts zu der extrazellulären Matrix unterbrochen war, jedoch Signalmoleküle, wie die n-NOS, an der Plasmamembran akkumuliert werden konnten. Mäuse ohne funktionelles Dystrophin, mdx^{4CV} Mäuse (homologes Protein Utrophin wird hoch reguliert und ersetzt fehlendes Dystrophin), hatten leichtere Muskeldystrophie als Dp116/mdx^{4CV} Mäuse (Dp 116 ersetzt Utrophin), in denen die molekulare Verbindung gestört war, jedoch Signalmoleküle wie n-NOS an der Muskelfasermembran nachgewiesen werden konnten (Judge et al., 2006).

2. Des Weiteren dient er als Gerüst, an dem signaltransduzierende Moleküle intrazellulär an der Muskelfasermembran akkumuliert sind. Die signaltransduzierende Funktion des DAG wurde entdeckt, weil bei einer ganzen Reihe von Muskeldystrophien die molekulare Verbindung zwischen Basalmembran und Zytoskelett intakt ist, es aber trotzdem zur Degeneration der Muskulatur kommt (Rando, 2001). So haben zum Beispiel α -Dystrobrevin defiziente Mäuse intakte DAG Komponenten, weisen jedoch einen milden dystrophischen Phänotyp auf (Grady et al., 1999). Zu den Molekülen, die an dem DAG Gerüst assoziiert sind, zählen die n-NOS, Dystrobrevine, FAK (*focal adhesion kinase*) oder Grb2 (Wachstumsfaktor-Rezeptor-Bindeprotein), Caveolin 3 und verschiedene Serin- bzw. Threoninkinasen wie Fyn und Src-Kinasen (Yang et al., 1995; Bredt, 1999; Bushby, 1999; Russo et al., 2000; Sotgia et al., 2001).

Patienten mit muskulärer Dystrophie haben neben den schweren muskulären Muskelschädigungen auch zentralnervöse Störungen (Sunada et al., 1995; Blake und Kröger, 2000). So weisen DMD Patienten neben Sprachstörungen auch geistige Behinderungen auf (Hyser und Mendell, 1988; Lidov, 1996; Blake und Kröger, 2000; Anderson et al., 2002). Die Gehirne dieser Patienten zeigen allerdings nur geringe morphologische Veränderungen, wie fehlende Neuronen, corticale bzw. subcorticale

Glios, reduzierte Dendritenlänge und Verzweigung von Pyramidalneuronen (Jagadha und Becker, 1988).

Bei einigen Muskeldystrophien sind die zentralnervösen Symptome besonders schwer. Dabei handelt es sich um Dystrophien, die über Mutationen bestimmter Glykosyltransferasen induziert werden. Diese Enzyme katalysieren unterschiedliche Schritte bei der posttranslationalen Anheftung von Zuckerseitenketten im Golgi-Apparat. Eines der wesentlichen Zielsubstrate dieser Enzyme stellt α -Dystroglycan dar (Muntoni et al., 2002; Barresi und Campbell, 2006). Bisher wurden einige unterschiedliche Gene (POMT1, POMT2, POMGnT1, FKRP), die alle Sequenzhomologien zu Glykosyltransferasen haben, identifiziert (Muntoni und Voit, 2004). Mutationen in diesen unterschiedlichen putativen Glykosyltransferasen führen zu einer veränderten Glykosylierung von α -Dystroglycan. Alpha-Dystroglycan verliert somit die Fähigkeit, mit Laminin-2 oder mit anderen DAG-Matrixproteinen zu interagieren (Esapa et al., 2002). Die dadurch herbeigeführte Unterbrechung der Matrix-Zytoskelett Brücke führt auch hier zu den unterschiedlichen Formen muskulärer Dystrophien.

Mutationen im POMT1-Gen und POMT2-Gen verursachen das Walker-Warburg-Syndrom (WWS) (van Reeuwijk et al., 2004; van Reeuwijk et al., 2005). Diese Glykosyltransferasen besitzen eine O-Mannosyltransferase Aktivität und katalysieren den ersten Schritt der Anheftung von O-Mannosyl-Zuckern an α -Dystroglycan (Jurado et al., 1999; Beltran-Valero et al., 2002; Muntoni und Voit, 2004; van Reeuwijk et al., 2005). Eine andere Glykosyltransferase wird kodiert vom POMGnT1-Gen und heftet N-Acetylglucosamine an die Mannose Zuckerseitenketten an. Mutationen in diesem Enzym führen zur Muscle-Eye-Brain Disease (MEB) (Haltia et al., 1997; Yoshida et al., 2001; Beltran-Valero et al., 2002). Fukutin und Fukutin-related Protein (FKRP) sind putative Glykosyltransferasen, die an der Glykosylierung von Dystroglycan im Golgi-Apparat beteiligt sind. Patienten, die Mutationen in diesen zwei homologen Proteinen aufweisen, leiden unter der Fukuyama-Muskeldystrophie (FCMD), oder der kongenitalen Muskeldystrophie vom Typ 1C (MDC1C) (Fukuyama et al., 1981; Kobayashi et al., 1998; Brockington et al., 2001a). Ebenso führen

Mutationen im FKRP-Gen auch zu einer speziellen Form von Gliedergürtel Muskeldystrophien Typ2I (LGMD2I) (Brockington et al., 2001b; Boito et al., 2005).

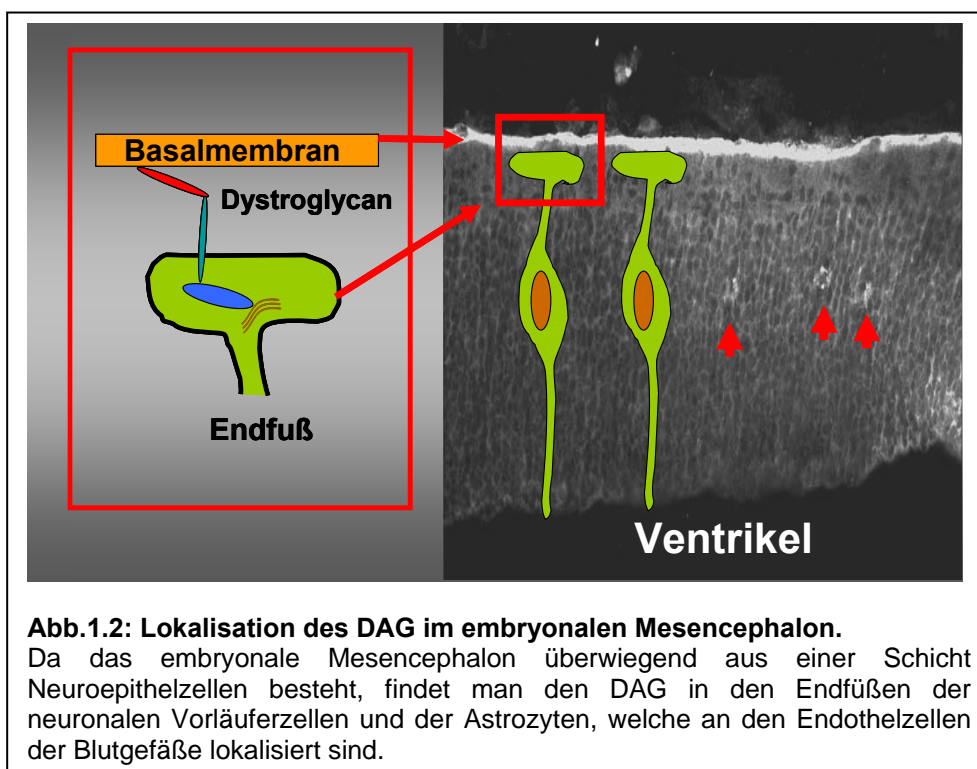
Patienten, die an WWS, MEB, oder FCMD leiden, haben neben der Degeneration der Skelettmuskulatur besonders schwere ZNS-Defizite. Diese ZNS-Defizite beinhalten kognitive Einschränkungen, geistige Behinderung und epileptische Anfälle, verbunden mit morphologischen Veränderungen des Gehirns. Das Gehirn weist massive strukturelle Veränderungen in Form eines so genannten „cobblestone cortex“ oder einer Lissenzephalie II aus. Diese zeichnet sich durch einen flachen Kortex mit fehlender oder stark verminderter Gyrierung (Hirnwindungen) aus (Kano et al., 2002; Muntoni und Voit, 2004). Weiterhin wurden vergrößerte Ventrikel, ein flacher Hirnstamm, Migrationsstörungen von Neuronen, gestörte Schichtung des neuronalen Gewebes, Heterotopias (Neuronen in abnormen Positionen), Ektopias (Neuronen außerhalb des Gehirns im subarachnoidalen Raum) und abnormale Differenzierung der Zellen im Kortex und im Cerebellum beschrieben (Cormand et al., 2001; Muntoni und Voit, 2004; van Reeuwijk et al., 2006).

Da Dystroglycan, außer in der Muskulatur, auch in unterschiedlichen Zellen und Regionen des Gehirns exprimiert wird, ist es nicht verwunderlich, dass es bei Patienten, die unter Muskeldystrophie leiden, zu einer Vielzahl von schweren morphologischen Veränderungen des Gehirns kommt. So kann man Dystroglycan und einige zytoplasmatische Komponenten in pyramidalen Neuronen, einigen Interneuronen des Kortex, Neuronen der CA1-CA3 Region des Hippocampus, Purkinje Zellen des Kleinhirns, im olfaktorischen Trakt, in den Basalganglien, im Thalamus, im Hypothalamus und im Hirnstamm lokalisieren (Gorecki et al., 1994; Tian et al., 1996; Zaccaria et al., 2001). Außerdem wird Dystroglycan nicht nur von Neuronen, sondern auch von Gliazellen (perivaskulären Astrozyten, Müller-Gliazellen), die den Kontakt mit ihren spezialisierten Endfüßen zu Blutgefäßen oder Pia mater herstellen, exprimiert (Tian et al., 1996; Koulen et al., 1998a; Zaccaria et al., 2001). Dystroglycan ist in diesen Zellen in den Endfüßen, an der Kontaktstelle zur Basalmembran, konzentriert (Blank et al., 1997; Koulen et al., 1998a).

Unterschiedliche Mausmutanten werden als Modellsystem zur Analyse der molekularen Grundlagen der muskulären Dystrophien herangezogen (Durbeej und Campbell, 2002). Transgene Mäuse (GFAP-Cre/DG^{lox/lox}-Mäuse), in denen Dystroglycan selektiv im ZNS funktionell über die Cre-loxP Methode inaktiviert wurde, weisen ähnliche morphologische Veränderungen im Gehirn auf, wie sie auch in Patienten mit WWS und MEB vorgefunden wurden (Moore et al., 2002). Die ZNS-Abnormalitäten dieser Mäuse beinhalten fehlplazierte Neuronen durch abnormale neuronale Schichtung (Heterotopias), Fusion der Hirnhemisphären im Cerebellum, Polymikrogyrie, Reduktion der Neuronen in der CA1 Region und lokal fehlplazierte granuläre Zellen im Hippocampus, Makrocephalie mit einer Gewebezunahme von etwa 20 %, und einer fragmentierten Basalmembran (Moore et al., 2002). Außerdem wurden Mausmutanten analysiert, die Mutationen im Gen LARGE aufweisen (Large^{myd} und Large^{vis}), das für eine Glykosyltransferase kodiert. Diese Mäuse stellen ein Tiermodell der MEB-Muskeldystrophie dar. Mutationen im Large-Gen verursachen eine veränderte Glykosylierung von α -Dystroglycan mit der Konsequenz, dass es nicht mehr mit seinen extrazellulären Interaktionspartnern (Laminin, Agrin) interagieren kann. Dies führt zur Unterbrechung seiner Verbindung zur Basalmembran (Grewal et al., 2001; Grewal und Hewitt, 2002; Lee et al., 2005). Diese Mäuse zeigen ebenfalls schwere morphologische Veränderungen des ZNS, die sehr ähnlich der Lissenzephalie bei MEB und FCMD Patienten sind. Die Gehirne dieser Mäuse beinhalten abnormale neuronale Schichten im Kortex (Heterotopias), Cerebellum und Hippocampus, eine fragmentierte Basalmembran, tangentielle Migrationsstörungen von Nervenzellen im Pons, im ventrolateralen Hinterhirn und ungeordnete Schichten des Kortex. Dabei sind die Grenzen der Schichten 1 und 2 des Kortex aufgelöst (Michele et al., 2002; Holzfeind et al., 2002; Qu et al., 2006). Außerdem besitzen diese Mäuse auch einen schweren Augenphänotyp. Dieser Phänotyp äußert sich durch strukturelle Unordnung bestimmter retinaler Schichten, wie der OPL (Äußere Plexiforme Schicht), abnormales Elektroretinogramm, Reduktion, verbunden mit abnormaler synaptischer Struktur, der Bändersynapsen in der OPL, reduzierter Anzahl von Photorezeptoren, fragmentierte innere Grenzmembran, sowie Anstieg der Anzahl retinaler Blutgefäße (Lee et al., 2005).

Die genaue Funktion von Dystroglycan in der frühen und späten ZNS Entwicklung und wie es durch Mutationen in Glykosyltransferasen oder DAG Komponenten zu ZNS-Abnormalitäten bei Muskeldystrophie-Patienten kommen kann wurde noch nicht genau aufgeklärt und soll im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersucht werden.

Aus technischen und praktischen Gründen, sowie aufgrund einer Vielzahl früherer Untersuchungen bzw. Dissertationen (Blank, 1999; Schröder, 2002; Tegeler, 2004) entschloss ich mich, die Funktion von Dystroglycan in der frühen embryonalen ZNS-Entwicklung im Tectum und in der späteren ZNS Entwicklung in der Retina zu untersuchen. Im frühen embryonalen ZNS besteht das gesamte Neuroepithel aus einer Schicht sich schnell teilender Neuroepithelzellen (pseudoeinschichtiges Epithel), die mit ihren spezialisierten Endfüßen an die Basalmembran adhären (siehe Abbildung 1.2). Der DAG ist in diesen Zellen an der Kontaktstelle zur Basalmembran konzentriert (Blank et al., 1997). Dystroglycan ist in den Endfüßen vornehmlich mit Utrophin und Dp71 als intrazelluläre Komponente assoziiert (Khurana et al., 1992; Blank et al., 1997; Claudepierre et al., 2000a; Blank et al., 2002). Da die Funktion von Dystroglycan in den Endfüßen der Neuroepithelzellen noch nahezu unbekannt ist, war es eine Zielsetzung dieser Arbeit, diese Funktion zu untersuchen.



Neuroepithelzellen sind die Vorläuferzellen aller Neuronen und Gliazellen im gesamten ZNS (Huttner und Kosodo, 2005; Götz und Huttner, 2005). Sie sind polare Zellen, die eine basolaterale und eine apikale Seite aufweisen. Sie besitzen eine radiale charakteristische Struktur und durchspannen die gesamte Breite des embryonalen ZNS Gewebes (siehe Abb.: 1.2). Diese charakteristische Struktur ist für die Funktion der Zellen wichtig. Sie ermöglicht es den Zellkörpern, während des Zellteilungszyklus von der Basalmembran, die das Neuralrohr umgibt, zur ventrikulären Seite des Neuroepithels zu wandern, um dort zu proliferieren (Sauer, 1935). Diese Wanderung erfordert eine interkinetische Kernwanderung (*INTERKINETIC NUCLEAR MIGRATION*), so dass sich die Zellkerne der Neuroepithelzellen, je nach Zellzyklusstadium, in unterschiedlichen Höhen zwischen Ventrikel und Basalmembran befinden (Götz und Huttner, 2005). Des Weiteren dient die radiale Struktur dieser Zellen neu generierten Neuronen als Leitstrukturen. Während der Embryonalentwicklung teilen sich diese speziellen neuronalen Vorläuferzellen sehr häufig. Diese Zellteilungen verlaufen zunächst symmetrisch und dienen der Vermehrung der neuronalen Vorläuferzellen des Neuralrohrs (Sauer, 1935; Caviness et al., 1995). Diese sich symmetrisch teilenden neuronalen Vorläuferzellen bilden ein pseudoeinschichtiges Epithel. Durch symmetrische Teilung der Zellen entstehen zwei identische Neuroepithelzellen, während durch asymmetrische Teilung eine Neuroepithelzelle und ein postmitotisches Neuron generiert werden (Chenn und McConnell, 1995; Huttner und Kosodo, 2005; Götz und Huttner, 2005). Die neu entstandenen postmitotischen Neuronen migrieren entlang der Fortsätze der neuronalen Vorläuferzellen Richtung basal, um ihre Position in dem neu entstehenden Gewebeverband einzunehmen (Noctor et al., 2001; Miyata et al., 2001; Parnavelas und Nadarajah, 2001).

Durch Teilung und Migration der neuronalen Vorläuferzellen entstehen aus dem pseudoeinschichtigen Epithel drei Schichten:

1. die Ventrikulärzone (**VZ**), in der die Zellen weiter proliferieren
2. die Intermediärzone (**IZ**), welche die Somata migrierenden Neuronen enthält

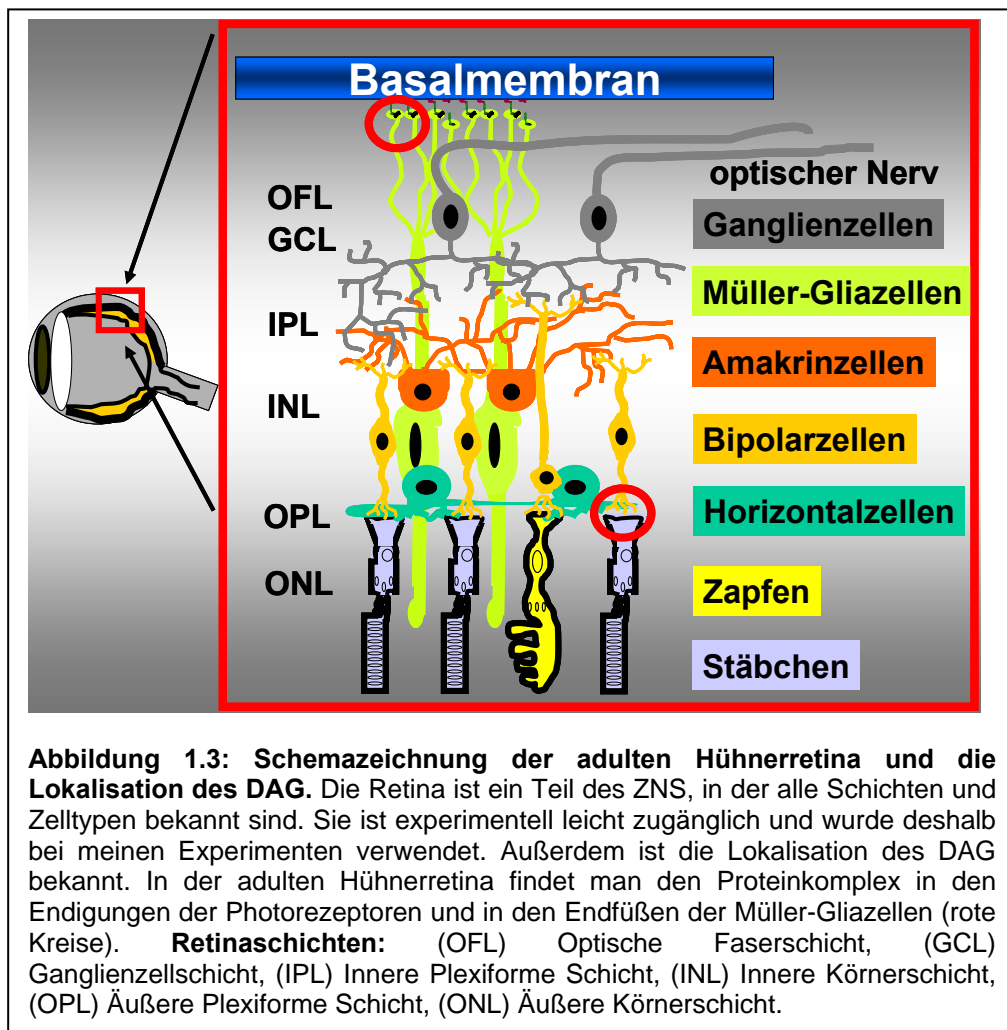
3. der Basalmembran (Pia) angelagerte Mantelzone (**MZ**), in der die differenzierten Neuronen ihre endgültige Position einnehmen

Neben der Untersuchung der Funktion von Dystroglycan in den Endfüßen der Neuroepithelzellen in der frühen ZNS Entwicklung, bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, die Rolle von Dystroglycan bzw. des DAG in älteren embryonalen Stadien zu analysieren. Aus technischen, wie auch aus praktischen Gründen, wurde die Retina für weitere Funktionsanalysen bevorzugt. Im Gegensatz zum Gehirn, das eine außerordentliche Komplexität aufweist, besteht die Retina aus nur wenigen, jedoch gut untersuchten Zelltypen in definierten Zellschichten. Sie entsteht durch die Ausstülpung des Diencephalons während der Ontogenese und ist deshalb ein Teil des ZNS. Aufgrund ihrer räumlichen Trennung vom Rest des Gehirns ist sie eine experimentell leicht zugängliche Region des ZNS.

Die Lokalisation des DAG in der adulten Retina ist aufgrund früherer Untersuchungen bekannt (Blake und Kröger, 2000). In der adulten Hühnerretina ist der DAG an zwei Positionen konzentriert: Innerhalb der OPL in den Terminalien der Photorezeptoren und in den Endfüßen der Müller-Gliazellen (siehe Abbildung 1.3). (Drenckhahn et al., 1996; Blank et al., 1997; Ueda et al., 1998; Blank et al., 2002; Jastrow et al., 2006). In der Säugetierretina ist der DAG noch zusätzlich in den Endfüßen der perivaskulären Astrozyten konzentriert (Koulen et al., 1998a; Claudepierre et al., 1999; Ueda et al., 2000). Der DAG ist in den Photorezeptorterminalien innerhalb der OLP (Äußere Plexiforme Schicht) mit Dystrophin (Dp) 260 assoziiert (die retinale Dystrophin-Isoform) und interagiert in den Endfüßen von Astrozyten und Müller-Gliazellen mit dem homologen Utrophin (Claudepierre et al., 2000b; Blank et al., 2002). Da bei älteren Stadien der DAG, im Gegensatz zu jüngeren Stadien, an zwei Positionen der Hühnerretina lokalisiert ist, konnte ich die Funktion von Dystroglycan an den Photorezeptorterminalien und in den Endfüßen der Müller-Gliazellen untersuchen.

Im Gegensatz zur Situation im adulten Auge ist der DAG im sich entwickelnden ZNS nur an einer Stelle konzentriert, nämlich in den Endfüßen der Neuroepithelzellen. Diese Konzentration findet sich im Tectum genauso wie in

der Retina und im Rückenmark (Moukhes und Carbonetto, 2001; Zaccaria et al., 2001; Blank et al., 2002). Es stellte sich also die Frage nach der Funktion des DAG während der Proliferation und Differenzierung von Neuroepithelzellen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Antikörperperturbation-Studien mit Antikörpern gegen Dystroglycan durchgeführt. Durch die Analysen der veränderten Entwicklung in Gegenwart von Antikörpern, sollten Hinweise auf die Funktion von Dystroglycan in den Neuroepithelzellen während der ZNS-Entwicklung erhalten werden. Des Weiteren sollten Untersuchungen älterer Stadien, durch Störung der Interaktion von α - und β -Dystroglycan in den Terminalien der Photorezeptoren und den Endfüßen der Müller-Gliazellen mittels Antikörpern, weitere Einblicke in die Funktion von Dystroglycan während der späteren ZNS Entwicklung gewähren. Dies erfolgte im Hinblick auf die Differenzierung der retinalen Zelltypen und Schichten, Synapsendifferenzierung und Verteilung.



Zielsetzung

Ziel der Arbeit war die Herstellung von Antikörpern gegen Dystroglycan, und die Anwendung dieser Antikörper zur Störung der Funktion von Dystroglycan im sich entwickelnden Gehirn. Die Antikörper sollten extrazellulär die Interaktion zwischen α - und β -Dystroglycan inhibieren und so die Verbindung des Zytoskeletts zur extrazellulären Matrix unterbrechen. Daraus sollte sich die Möglichkeit ergeben, mehr über die Funktion des DAG bei der ZNS-Entwicklung zu erfahren und, unter Umständen, die Ursachen der schweren morphologischen Veränderungen des ZNS, die bei bestimmten muskulären Dystrophien auftreten, besser verstehen zu können. Insbesondere sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Kann ein spezifisches polyklonales Serum hergestellt werden, das die Interaktion von α - mit β -Dystroglycan hemmt?
2. Führen Injektionen von affinitätsgereinigten Fab-Fragmenten dieses polyklonalen Serums, in das Tectum bzw. in das Auge, zur Funktionsstörung von Dystroglycan und somit zu morphologischen Veränderungen in den Geweben, speziell in der Morphologie der Neuroepithelzellen?
3. Kann man aufgrund der Veränderung der embryonalen Gewebestruktur mittels Fab-Fragmentinjektionen Rückschlüsse auf die Funktion von Dystroglycan in den Endfüßen der Neuroepithelzellen ziehen?
4. Wie wirken sich Fab-Fragmentinjektionen, im Hinblick auf die Proliferation, Differenzierung und Etablierung von Polarität auf die Neuroepithelzellen aus?
5. Welche Bedeutung haben Fab-Fragmentinjektionen, bezogen auf das Wachstumsverhalten der tectobulbären Axone im embryonalen Mesencephalon?
6. Welche Konsequenzen haben Fab-Fragmentinjektionen in das Auge älterer Hühnerembryonen, im Hinblick auf die Retinaentwicklung, speziell auf die Entwicklung der OPL (Äußere Plexiforme Schicht)?
7. Können die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mögliche Rückschlüsse oder Hinweise auf das Entstehen zentralnervöser Störungen und die damit verbundenen morphologischen Veränderungen des ZNS bei Muskeldystrophiepatienten liefern?

II. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merk, Applichem, Life Technologies oder Sigma bezogen. Für die Zellkultur wurden Verbrauchsmaterialien von Falcon, Greiner und Nunc verwendet.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien für die Molekularbiologie

<u>Material</u>	<u>Firma</u>
Agarose	Roth
Orange G	Sigma
DNA Standard	MBI Fermentas
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
Ethidiumbromid	Sigma
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
T4 DNA Kinase	MBI Fermentas
DNase I	MBI Fermentas
Oligonukleotide	MWG
Taq-DNA-Polymerase	Promega/Clontech
IPTG	Promega
LB Medium	Life Technologies
LB Agar	Life Technologies
Glycerin	Roth

Material und Methoden

2.1.3 Verbrauchsmaterialien für die Proteinbiochemie

<u>Material</u>	<u>Firma</u>
Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	Roth
Coomassie	Roth
Silbernitrat	Roth
DTT	Roth
Formaldehyd (37%)	Sigma
Nitrozellulose	Schleicher & Schuell
Milchpulver	Sucofin
Fotosensitive Filme	Amersham Bio
Western Blot-Detektions-Kit	Pierce
Entwickler und Fixierer	Kodac
Harnstoff	Roth
Ni-Agarose	Qiagen
Fab-Fragment-Purifikation-Kit	Pierce
Gu-Hydrochlorid	Roth
Flag-Agarose	Sigma

2.1.4 Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

<u>Material</u>	<u>Firma</u>
DMEM	Sigma
FCS	PAA
Penicillin	Life Technologies
Streptomycin	Life Technologies
Pyruvat	Life Technologies
Lipofectamin	Life Technologies
Superfekt	Qiagen

Material und Methoden

2.1.5 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Charakterisierung
Agrin #46	Kaninchen	1 : 1000 IHC (IHC, siehe VII.)	Eigenproduktion	Tsen et al. 1995
AChE (3D10)	Maus	1 : 100 IHC	K. Tsim	Tsim et al., 1992
BrdU (Bu20a)	Maus	1 : 100 IHC	Dako	
Chicken N- Cadherin Ncd2	Ratte	1 : 50/100 IHC	C. Redies	Gänzler-Odenthal und Redies, 1998
Chicken Occludin	Kaninchen	1 : 25 IHC	S. Tsukita	Furuse et al., 1993
β -Dystroglycan (43 DAG/8D5)	Maus	1 : 2 IHC 1: 50 WB (WB; siehe VII.)	L.Anderson; C.Slater	Bewick et al., 1993
α -Dystroglycan (α -Dyg sh)	Schaf	1 : 1000 IHC 1 : 5000 WB	Pineda	Blank et al., 1999
α -Dystrobrevin 1CF-FL	Kaninchen	1 : 250 IHC		Blake et al., 1998
Dystroglycan AB-Dyg-His	Kaninchen	1 : 500 IHC 1 : 1000 WB	Pineda	Dr. Arbeit von Jörn E. Schröder 2002
Ng-Cam (G4)	Maus	1 : 1000 IHC	F. Rathjen	Kuhn et al. 1991
Integrin beta 1 Mab Ig22	Maus	1 : 100 IHC	Hering et al., 2000	Tomaselli et al., 1988; Agius et al.,1996
Utrophin mAB20C5	Maus	1 : 5 IHC	D. R. Blake	Bewick et.al., 1992
Vimentin (3B4)	Maus	1 : 500 IHC	Roche	Heid et al., 1988
Zonula occludens 1T8754mAB	Maus	1 : 1 IHC	S. Tsukita	Furuse et. Al., 1993

2.1.6 Sekundäre Antikörper

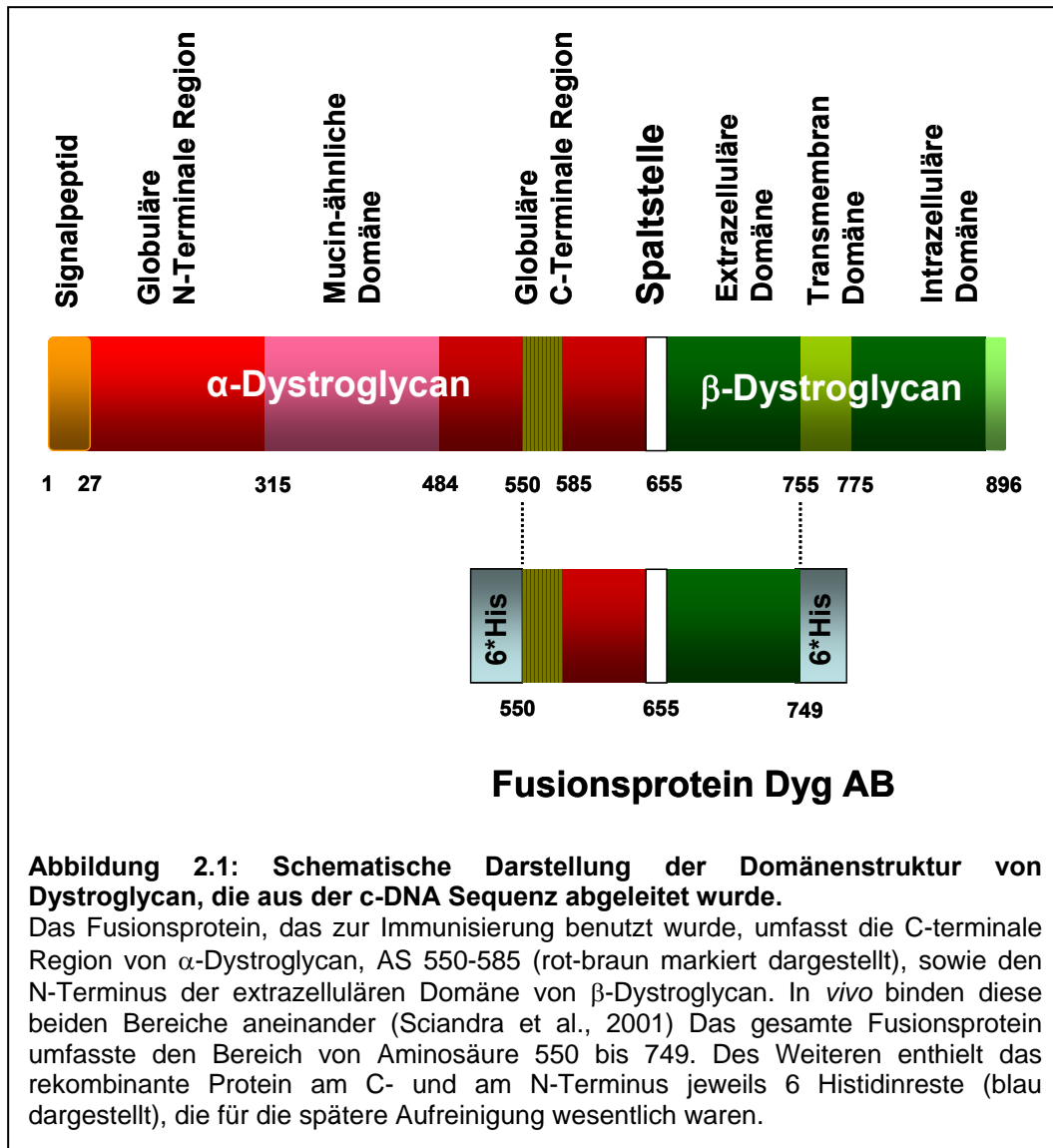
Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti IgG Alexa 488/594	Kaninchen	1 : 1000 1 Std RT (Std, RT; siehe VII.)	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Anti HRP	Kaninchen	1 : 5000 1 Std RT	Amersham, Freiburg; Dianova, Hamburg
Anti IgG Alexa 488/594	Maus	1 : 1000 1 Std RT	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Anti IgG Alexa 488/594	Maus	1 : 1000 1 Std RT	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Anti HRP	Maus	1 : 5000 1 Std RT	Amersham, Freiburg; Dianova, Hamburg
Anti IgG Alexa 488/594	Schaf	1 : 1000 1 Std RT	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Anti IgG Alexa 488/594	Schaf	1 : 1000 1 Std RT	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Anti Cy3	Ratte	1 : 400 1 Std RT	Dianova, Hamburg
Anti IgG Alexa 488/594	Maus	1 : 1000 1 Std RT	Molecular Probes, Eugene, OR, USA

2.1.7 Hühnereier

Es wurden befruchtete Hühnereier der Rasse Withe Leghorn (*gallus gallus domesticus*) von der Firma Freddy's Hühnerhof GmbH & Co. KG geliefert. Die Eier wurden bei 11-12°C gelagert, und bei Bedarf bei 37,8°C und 60 - 65 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutgerät der Firma Ehret GmbH und Co. KG bebrütet. Das Entwicklungsstadium der Eier wurde nach Hamburger und Hamilton (1951) bestimmt und in Tagen angegeben. Die Befruchtungsrate der Eier lag bei durchschnittlich 80 bis 90 %.

2.1.8 Vektoren und Oligonukleotide zur Herstellung eines rekombinanten Fusionsproteins

Die Herstellung des Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe der PCR-Methode. Es wurden für die Amplifizierung eine Hühner c-DNA (Schröder, 2002) als Matrize und die sequenzspezifischen Oligonukleotide AB-Dyg-Hind III als Reversprimer und ADysF3-BamHI als Forwardprimer verwendet. Der Bereich zwischen Aminosäuren 550 und 749, also die gesamten Interaktionsdomänen von α - und β - Dystroglycan, wurde amplifiziert (Bozzi et al., 2001; Sciandra et al., 2001). Als Polymerase wurde die Advantage II von Clontech, wegen Ihrer Korrekturlesefunktion, verwendet. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Expressionsvektor PET 28a (Novagene, Bad Soden) kloniert. Hierbei wurden die Schnittstellen HindIII und BamHI verwendet. Durch Einklonieren des Inserts in den richtigen Leserahmen des Vektors, wurden am 3'- und am 5'-Ende Histidine angehängt. Da Histidine mit Nickel-Ionen interagieren, konnte das rekombinante Protein über eine Ni-(Nitrilotriacetat-Säure) NTA Säule aufgereinigt werden (Hochuli, 1988).



2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Die Polymerasekettenreaktion PCR

Mit einer PCR kann man definierte DNA Stränge eines bestimmten Ausgangsmaterials *in vitro* schnell vervielfältigen (Saiki et al., 1985). Primer binden an bekannten DNA-Sequenzen und rahmen so den zu vermehrenden (amplifizierenden) DNA Abschnitt ein. Die spezifisch bindenden Oligonukleotide werden mit Hilfe einer DNA-Polymerase verlängert, so dass neue Kopien des eingerahmten DNA-Abschnitts entstehen. Ein 50 μ l PCR Ansatz enthielt folgende Komponenten: dd H₂O 36,5 μ l, 10 x Advantage II PCR-Puffer 5 μ l, dNTP`s 20 mM

Material und Methoden

entspricht 2 µl, Matrize 2 µl c-DNA, jeweils 20 pm Vorwärts- und Rückwärtsprimer, entspricht je Primer 2 µl, Advantage II 0,5 µl. Der Ansatz wurde in einen Thermocycler der Firma Biometra überführt, und über folgendem Programm amplifiziert: 3 Minuten 95° C (1 x Zyklus), 20 Sekunden 95° C, 30 Sekunden 63° C Annealing und 1 Minute 72° C, insgesamt 25 Zyklen, 10 Minuten 72° C (1 x Zyklus). Nach Ablauf der PCR-Reaktion wurde ein Teil des Ansatzes auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Diese Kontrolle bestätigte, ob auch das gewünschte DNA-Fragment amplifiziert wurde.

Oligonukleotide werden als Startmoleküle in einer PCR-Reaktion, oder Sequenzierungsreaktion, als so genannte Primer verwendet, um DNA Fragmente zu vermehren (amplifizieren). Man benötigt bei jeder Reaktion zwei Primer, mit Sense- und Antisense-Orientierung, die in unterschiedliche Richtungen amplifizieren. Es wurden unterschiedliche Sense-Primer mit einem bereits bewährten Antisense-Primer kombiniert und daraufhin getestet, um ein optimales PCR-Produkt zu erhalten. Die in der Tabelle markierten Primer (Fettdruck unterlegte Primer) wurden für die PCR verwendet.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz 5' - 3'</u>	<u>Orientierung</u>
AB-Dyg- Hind III rev	AGG AAA GCT TAT CGT CCT CAC TGC TCT TCT C	Antisense
ADysF3- bamH I frw	CGC GGA TCC GAG AAT TCG TGG GTC CAG TTC	Sense
ADysF2- bamH I frw	CGC GGA TCC AAT TCG TGG GTC CAG TTC AAC	Sense
ADysF1- bamH I frw	CGCGGA TCC TCG TGG GTC CAG TTC AAC AGC	Sense

2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wird angewendet, um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen (Sambrook et al., 1989). Dabei richtet sich der prozentuale Anteil der Agarose nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente. Je kleiner die DNA-Fragmente, desto höher der Agaroseanteil und je größer die Fragmente, desto geringer ist der prozentuale Agaroseanteil. Die Proben wurden mit einem DNA-Auftragepuffer (40 % Sacarose, 1 mM EDTA, OrangeG) versetzt, auf das Agarosegel aufgetragen und in einer Elektrophorese-Kammer bei einer Spannung von 50-180 Volt aufgetrennt. Als Laufpuffer wurden TBE- oder TAE-Puffer verwendet. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (ETBR) zur Agarose erfolgte die Anfärbung der DNA-Fragmente. Mit Hilfe eines Gel-Dokumentationsgerätes von Stratagene konnten nun die DNA-Banden unter UV-Beleuchtung sichtbar gemacht und ausgewertet werden.

2.2.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, die aus einem präparativem Gel isoliert werden sollten, wurden mit dem Ethidiumbromid-freien Blue-View-System von Sigma sichtbar gemacht. Die DNA erschien dabei im Tageslicht als blaue Banden. Die DNA Banden wurden mit einem Skalpell herausgetrennt und über ein Gelextraktions-Kit von Qiagen aufgereinigt. Da kein UV-Licht für dieses Verfahren verwendet werden musste, welches die DNA schädigen kann, war die spätere Einklonierung in ein Klonierungs-bzw. Expressionsvektor effektiver als das herkömmliche Verfahren mit Ethidiumbromid.

2.2.1.4 Zero-Blunt TOPO-Klonierung

Da die Klonierung von Fragmenten mit stumpfen Enden über das Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit von Invitrogen GmbH sehr effektiv ist, wurden die PCR Fragmente zuerst aufgereinigt und mit diesem Verfahren in einen Vektor kloniert. Dieses Verfahren konnte als Vorstufe der eigentlichen Klonierung verwendet werden. Das Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit enthält einen linearisierten pCR-Blunt II-TOPO-Vektor, der mit einer aktivierten Topoisomerase kombiniert ist. Diese

Topoisomerase ist über ein Thyrosinrest an das 3`Ende des Vektors gekoppelt. Die Phosphotyrosylbindung zwischen DNA und Enzym kann durch die 5`-Hydroxylgruppe des zugegebenen PCR-Fragments attackiert werden (Shuman, 1991). Dadurch wird das Enzym freigesetzt und das DNA-Fragment mit seinen stumpfen Enden in den Vektor integriert. Durch die Integration des gewünschten DNA-Amplifikats wird das auf dem Vektor liegende lethale E.coli Gen *ccdB* (*control of cell death*), welches mit dem C-Terminus des LacZ α -Fragments fusioniert ist, unterbrochen (Bernard et al., 1994). Expression des *ccdB* Proteins vergiftet die bakterielle Gyrase (Topoisomerase Typ II) und verursacht den Zelltod (Bernard und Couturier, 1992; Bernard et al., 1993). Ligation eines PCR-Amplifikats hingegen unterbricht die Expression des *ccdB* Proteins und sichert das Überleben der prokaryontischen Zellen. Ein Blau-Weiß-Screening ist deshalb nicht erforderlich, da auf den Selektionsplatten nur positive Klone überleben. Da diese Methode eine sehr hohe Effizienz mit sich bringt, gewinnt man eine unbegrenzte Menge PCR-Amplifikate, die man wiederum für eine erfolgreiche Klonierung in einem Expressionsvektor verwenden kann (Shuman, 1994). Um die Korrektheit der Sequenz zu überprüfen, wurden die im TOPO-Vektor vorliegenden Konstrukte der Firma GATC-Biotech AG in Konstanz sequenziert.

2.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Um ein DNA-Fragment in die Restriktionsschnittstelle eines Vektors zu integrieren, muss zuerst der Vektor, bzw. das DNA Fragment mit geeigneten Restriktionsnukleasen geschnitten werden. Bei dem DNA Einbau in den Vektor katalysieren die Ligasen die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen freien 5`Phosphatgruppen des DNA-Fragments, und freien 3`Hydroxylgruppen des Vektors. Enthält der Vektor nach der Restriktion zwei stumpfe Enden, oder zwei komplementäre Überhänge, besteht die Gefahr, dass die Vektor-Enden miteinander ligieren, so dass kein DNA-Fragment eingebaut werden kann. Um das zu verhindern, wurden die 5`Enden der linearisierten Plasmide mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Der Ligationsansatz (dH₂O, DNA-Fragment, Vektor, Ligase-Puffer, Ligase) wurde bei 15°C drei Stunden lang inkubiert. Danach wurde die Ligase für 10 Minuten bei 68°C inaktiviert.

2.2.1.6 Transformation

Die Wanderung der DNA in die Zellen wird durch eine kurzzeitige Temperaturerhöhung auf 42°C induziert. Das Ziel der Transformation ist eine gezielte Vermehrung der Bakterien mit aufgenommenen Fremd-DNA-Fragmenten. Da der Transformationsansatz auf so genannten Selektionsplatten (z.B. Antibiotika-Platten) ausplattiert wird, findet auf den Platten eine gezielte Selektion der Bakterien, zwischen denen die DNA aufgenommen und solchen die keine DNA aufgenommen haben, statt. Zur praktischen Durchführung wurden zu 500 µl kompetente *E.coli* Bakterien 1-2 µl Ligationsansatz hinzugefügt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der 90 Sekunden andauernde, bei 42°C nachfolgende, Hitzeschock induzierte die Aufnahme von Fremd-DNA. Der Ansatz wurde noch einmal für zwei Minuten auf Eis inkubiert, mit 400 µl SOC Medium versetzt und 120 Minuten bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 220 upm geschüttelt. Das Ausplattieren des Transformationsansatzes erfolgte auf Antibiotika-Platten, die über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

2.2.1.7 Aufreinigung und Lagerung von Plasmiden aus *E.coli*

Es wurden Klone von einer Selektionsplatte gepickt, jeweils ein Klon in 5 ml LB-Medium mit Antibiotika gegeben und bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 220 upm über Nacht inkubiert. Durch Zugabe von Antibiotika sollten sich nur die *E.coli* Zellen vermehren, die über das aufgenommene Plasmid die entsprechenden Resistenzgene tragen. So findet bei der Vermehrung der Bakterien wiederum eine Selektion statt. Die Bakterien konnten jetzt über die Plasmid-Aufreinigungssysteme von Qiagen aufgereinigt werden. Benutzt wurde das System Quiaprep8 Mini-Kit (Qiagen, Hilden) für kleinere Mengen Plasmide (5 ml Bakterienkultur) und QIAfilter™ Plasmid-Maxi-Kit (Qiagen, Hilden) für größere Mengen (200 ml Bakterienkultur).

Um einen Klon über einen längeren Zeitraum lagern zu können, wurde eine Übernachtkultur einer Bakterien suspension 1:1 mit 60 %igem Glycerol versetzt, gut gemischt und bei -80°C eingefroren.

2.2.1.8 Restriktionsverdau von DNA

Um die aus Bakterien gewonnenen Plasmide zu analysieren, wurde ein analytischer Verdau mit Hilfe von Restriktionsenzymen durchgeführt. Somit konnte festgestellt werden, ob der Plasmid das richtige einklonierte Gen enthielt. Der 10 µl Restriktionsansatz enthielt: Plasmid-DNA, spezifischer Restriktionspuffer, Enzym, dH₂O. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte über 1-2 Stunden in einem 37°C Inkubator. Der Restriktionsansatz und ein DNA-Längenstandard (Marker) konnten nun zur weiteren Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen werden

2.2.1.9 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Nucleinsäuren lässt sich durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm ermitteln. Eine OD 260 von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, bzw. 30 µg/ml einzelsträngiger DNA (Oligonukleotide) und 40 µg/ml bei RNA. Die Konzentrationsbestimmungen wurden mit einem handelsüblichen Photometer der Firma Bio-Rad durchgeführt.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung, Transfektion und Analyse von HEK-Zellen

Die verwendete menschliche embryonale Nierenzelllinie (HEK293) wurde in einer Flasche mit einem Kulturmedium, bestehend aus DEMEM, 10 %igem FKS, 1 %igem Pyruvat und 1%igem Penicillin/Streptomycin, in einem 37°C CO₂-Inkubator kultiviert. Der Inkubator hatte einen CO₂ Gehalt von 10 % und eine relative Luftfeuchtigkeit von 95%. Die Zellen wurden 1:10 passagiert, d.h. mit PBS gewaschen und in eine neue Kulturflasche überführt.

Bei der Transfektion werden Expressionsplasmide mit einem eukaryontischen Promotor in die Zellen eingeschleust. Bei der transienten Transfektion liegt dieser Expressionsplasmid nur vorübergehend, also transient, in der Zelle vor. Somit exprimieren nach der Transfektion ungefähr 50 % der Zellen das rekombinante

Protein für etwa 12 bis 24 Stunden. Die Transfektionen wurden meist mit dem Transfektionsreagens Lipofektamin2000 (Invitrogen), nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Liposomentransfektion. Die zu transfizierende DNA wird in Vesikeln, welche aus einer Lipiddoppelschicht bestehen, eingeschlossen und über Endozytose in die Zellen eingebracht.

Die HEK Zellen wurden in 24-Well Gewebeplatten auf Deckgläschen transfiziert und kultiviert. Hierfür wurden vorher die Deckgläschen mit unterschiedlichen Substraten beschichtet, um die Adhäsion der Zellen zu gewährleisten. Fibronectin und Poly-L-Lysin (Sigma) waren hierfür sehr gut geeignet. Das exprimierte rekombinante Protein konnte nun mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, um das Zellkulturmedium zu entfernen. Danach folgte ein Fixierschritt mit 4 % igem PFA für die Dauer von 5-7 Minuten. Das rekombinante Protein konnte nun mittels Antikörperfärbung, wie unter 2.2.4 Neuroanatomische Methoden beschrieben, nachgewiesen werden.

2.2.2.2 Isolation von Proteinen aus transfizierten Zellen

Die heterogene Expression von Dystroglycan wurde mittels Westernblot untersucht. Hierfür wurden transfizierte Zellen einer 25 cm² Kulturflasche in 1,5 ml Lysepuffer (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Nonidet P40, 1 % Triton X100, Proteaseinhibitoren von Roche, Mannheim) aufgenommen und mehrfach durch die Kanüle einer Spritze gezogen (20G und 26G). Das Homogenisat wurde 30-45 Minuten auf Eis inkubiert und danach bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand konnte nun 1:2 mit SDS-Probepuffer versetzt und die Proteine bei etwa 95°C 3-5 Minuten lang denaturiert werden.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 SDS-Gelelektrophorese

Proteine wurden mittels der Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt (SDS-Page). Hierfür wurden 4-5 %ige Sammelgele und 10-15 %ige

Trenngele gegossen. Als Marker wurden, je nach Verwendung des Gels, Standard Proteinmarker, sowie Prestained-Marker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet. Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit SDS-Probepuffer (mit oder ohne Mercaptoethanol, je nach Anwendung) versetzt und bei 95°C 5 Minuten lang denaturiert. Die Trennung der Proteine erfolgte in einem Proteinlaufpuffer (Sambrook et al., 1989) bei einer Stromstärke von 120 Volt.

2.2.3.2 Coomassie-und Silberfärbung

Nach dem Auftrennen im elektrischen Feld wurden die Proteine mittels einer Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht. Hierfür wurde die kolloidale Coomassie-Lösung von Roth verwendet. Das Polyacrylamidgel konnte in der blauen Farblösung über Nacht auf einem Schüttler inkubiert werden. Am nächsten Tag wurde das Gel so lange mit dH₂O entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden im Gel sichtbar waren.

Um geringere Mengen von Protein auf dem SDS-Gel sichtbar zu machen, konnte die Coomassie-Färbung nicht angewendet werden. Hierfür wurden die Proteine mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Die an Proteine gebundenen Silberionen werden unter Anwendung starker Reduktionsmittel (37 %iges Formaldehyd) zu metallischem Silber reduziert. Die Gele wurden mit EtOH fixiert, in dH₂O rehydriert und die Proteine mit DTT reduziert. Nach der Inkubation mit 0,1%igem Silbernitrat wurde mehrfach mit dH₂O gewaschen, und die Banden mittels Entwicklerlösung sichtbar gemacht. Die Entwicklungsreaktion erfolgte im Dunkeln und konnte nach etwa 10 Minuten mit Zitronensäure gestoppt werden. Danach wurden die Gele ausgiebig mit dH₂O gewaschen und die Proteinbanden analysiert.

2.2.3.3 Western Blot

Mittels der Western Blot-Methode kann man spezifische Proteine innerhalb eines Proteingemisches analytisch nachweisen. Proteine, die in einem elektrischen Feld aufgetrennt worden sind, werden dazu auf PVDF- oder Nitrozellulosemembranen transferiert und mittels spezifischer primärer Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis erfolgt über einen sekundären Antikörper, der gegen die F_C Region des primären Antikörpers gerichtet ist. Dieser Antikörper ist meist an

ein Enzym gekoppelt, das nach Zugabe eines spezifischen Substrats eine chemische Reaktion, in Form einer Bande, erkennen lässt. Die Western Blot-Methode wurde nach Burnette durchgeführt (Burnette, 1981). Um größere Proteine effektiver auf die Nitrozellulose oder die PVDF Membran zu transferieren, wurde die Nassblot-Technik bevorzugt. Dazu wurden die auf einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine in einem Elektrophoresetank (Amersham Bioscience, Freiburg), gefüllt mit Nassblotpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS, 20 % Ethanol), auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das Blotting der Proteine erfolgte für die Dauer von 3 Stunden bei 176 mA und 4°C. Um Proteinbanden nach dem Blotting nachzuweisen, wurde die Membran mit einer reversiblen Ponceau-Farblösung inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschen der Membran in 1xTBS. Die Absättigung aller Bindungsstellen des Blots erfolgte über eine Inkubation in 5%iger TBS-Milchpulverlösung (Blockierungslösung) über Nacht. Am nächsten Tag wurde der Blot mit den in Blockinglösung verdünnten primären Antikörpern bei Raumtemperatur zwei Stunden lang inkubiert. Nach den 3-maligen, je 10 Minuten andauernden Waschschritten mit 1%iger TBS-Milchpulverlösung (Waschlösung), erfolgte eine weitere Inkubation mit sekundärem Peroxidase-gekoppeltem Antikörper (POD-Antikörper), für etwa eine Stunde bei Raumtemperatur. Um nach der Inkubation die überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurde der Blot erneut drei Mal 10 Minuten lang mit Waschlösung gewaschen. Danach konnten die Protein Banden mittels Chemieluminiszenzsubstrat von Pierce und photosensitiven Filmen detektiert werden.

2.2.3.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinkonzentrationen wurden mittels des BCA-Systems von Pierce nach Herstellerangaben bestimmt. Kupferionen (Cu^{+2}) binden Proteine und werden in alkalischer Lösung zu Cu^{+1} reduziert. Diese Reduktion führt zu einer Farbreaktion des Protein-Kupfergemisches, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt. Die Absorptionmessungen wurden auf Mikrotiterplatten und mittels eines Immunoreaders von BioRad, München, durchgeführt. Zur Erstellung von Eichgeraden wurden bei jeder Messung definierte Verdünnungsreihen an Rinderserumalbuminen (BSA), oder Immunglobulinen als Standard mitgeführt.

2.2.3.5 Methanol-Chloroform-Fällung von Proteinen

Proteine, die in einer Lösung in geringen Konzentrationen vorliegen, müssen meist zur weiteren Analyse aufkonzentriert werden. Dies wurde mittels einer Methanol-Chloroform-Fällung erreicht. Hierzu wurde zu 100 µl Proteinlösung 400 µl Methanol gegeben, kräftig gemischt und anschließend bei 9000 xg 1 Minute zentrifugiert. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform wurde die Lösung ebenfalls gemischt und 1 Minute lang bei 9000 xg zentrifugiert. Durch Zugabe von 300 µl Wasser und Zentrifugation bei 9000 xg für 2 Minuten, erfolgte die Trennung der Lösung in 3 Phasen. Das Protein war nun in der Interphase lokalisiert. Die obere Phase wurde verworfen und zu der Restlösung 300 µl Methanol gegeben. Das ausgefallene Protein konnte jetzt durch einen letzten Zentrifugationsschritt für die Dauer von 10 Minuten bei 9000 xg pelletiert werden. Das Methanol wurde verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur für weitere Analysen getrocknet.

2.2.3.6 Aufreinigung von Dystroglycan mittels WGA-Lektin

Lektine sind Proteine, die reversibel Mono- und Polysaccharide, oder Zuckerreste von Glykoproteinen binden. Weizenkeimagglutinin (WGA; *wheat germ agglutinin*) wird häufig verwendet, um glykosylierte Proteine zu isolieren. Da α - und β -Dystroglycan glykosylierte Proteine sind, konnten diese mittels WGA (bindet Zuckerreste) aus Hühnergeweben (Herz, Gehirn, Muskel, Retina) isoliert werden (Sugita et al., 2001). Dazu wurde das Gewebe mit Homogenisationspuffer (50 mM Tris-HCL pH 7,4; 500 mM NaCl; 1% Triton X-100; Proteaseinhibitoren) bei 4° C behandelt und gepottert (mechanische Zerkleinerung des Gewebes). Das Homogenisat wurde 2 Stunden lang bei 4° C inkubiert und danach bei 56 000 rpm in einer Ultrazentrifuge 30 Minuten lang bei 4° C zentrifugiert. Als nächstes erfolgte die Inkubation des Überstandes mit dem WGA-Lektin über Nacht bei 4° C, unter ständigem Schütteln. Die WGA-Matrize wurde mittels einer Säule mit dem 4-fachen Säulenvolumen gewaschen (50 mM Tris-HCL pH 7,4; 500 mM NaCl; 0,1 % Triton X-100; Proteaseinhibitoren). Die Elution der gebundenen glykosylierten Proteine erfolgte über eine Konkurrenz der Lektin-Bindungsstellen, durch eine hohe

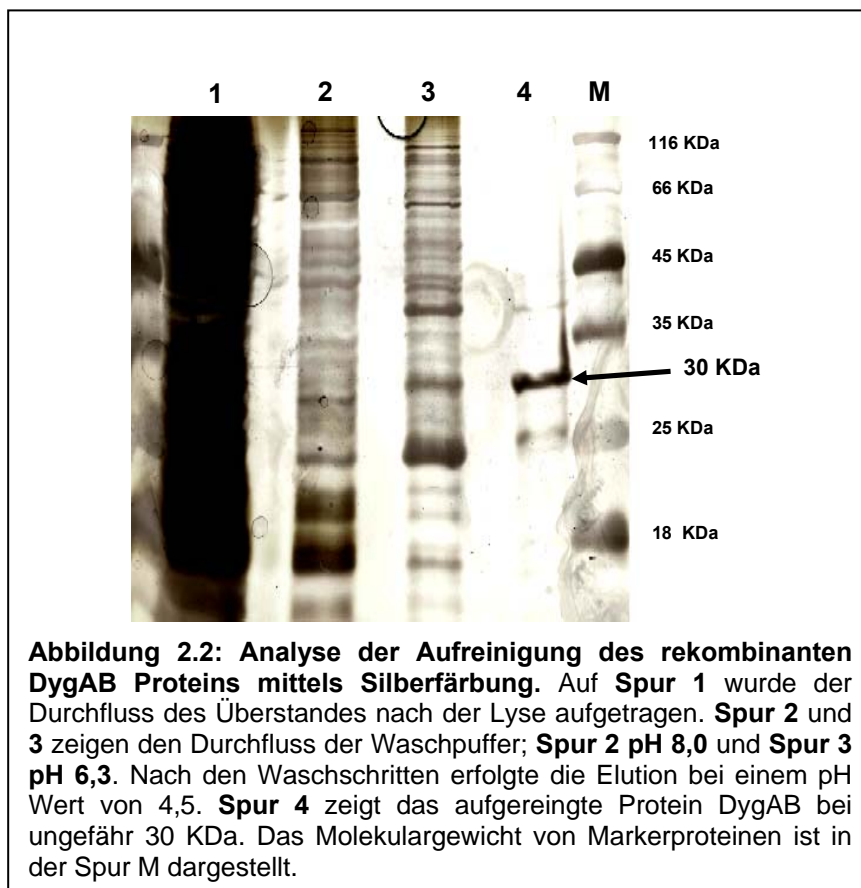
Konzentration von N-Acetylglucosamin (50 mM Tris-HCL pH 7,4; 500 mM NaCl, 1 % Triton X-100; 0,3 M N-Acetylglucosamin).

2.2.3.7 Expression und Aufreinigung von rekombinantem DygAB Protein

Für die Expression größerer Mengen rekombinanten Proteins nutzt man den Syntheseapparat von *E.Coli* Expressionsbakterien (BL21 von Stratagene). Ein Plasmid (pET28a; Novagene), das den prokaryontischen T7 Promotor enthält, hinter dem sich das Ziel-Gen befindet, wurde in BL21 Bakterien transformiert. Durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalacosid) Zugabe konnte die Expression des rekombinanten Proteins induziert werden, weil der T7 Promotor aktiviert wurde. Die Aufreinigung des DygAB Proteins erfolgte unter Anleitung des QIAExpressionist, einem Handbuch von Qiagen aus Januar 2000 (*A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*). Die Aufreinigung wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, da es für die Antikörperproduktion nicht notwendig war, die native Konformation des Proteins zu erhalten. Aus dem gleichen Grund konnten nahezu alle selbst hergestellten Puffer größere Mengen Harnstoff enthalten. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD (optischen Dichte) von 0,8 und einer Menge von 0,8 mM IPTG. Nach 2 Stunden Induktionszeit, bei 37°C, wurden die Bakterien abzentrifugiert und mit einem speziellen Lysepuffer (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-Cl; 8 M Harnstoff oder 6 M GuHCl, eingestellt mit NaOH auf pH 8,0) behandelt. Um eine effektive Lyse zu erzielen, mussten die Bakterien gepottert (mechanische Behandlung) und mit Ultraschall sonifiziert werden. Dadurch wurden die Proteine weitgehend freigesetzt und konnten nach einem weiteren Zentrifugationsschritt im Überstand des Bakterienlysats lokalisiert werden. Die weitere Aufreinigung des rekombinanten DygAB Proteins, aus dem im Überstand vorhandenen Proteingemisches, erfolgte mittels einer Nickel-NTA-Agarose-Säule. Das rekombinante Protein enthielt je am N- und C-Terminus 6 Histidine, die an Nickel reversibel binden können. Dadurch, dass die 6 Histidine (am N- und C-Terminus) innerhalb des Proteingemisches nur im Fusionsprotein lokalisiert waren, war gewährleistet, dass nur das rekombinante DygAB Protein aufgereinigt wurde. Das Protein bindet bei einem alkalischen pH Wert von 8,0 und kann über einen sauren pH Wert von 4,5 wieder von der Säule eluiert werden. Alle Puffer, die für die

Material und Methoden

Aufreinigung verwendet wurden, enthielten die gleichen Bestandteile, nämlich 100 mM NaH_2PO_4 ; 10 mM Tris-Cl; 8 M Harnstoff, hatten aber unterschiedliche pH Werte. Der Lyse bzw. Äquilibrierungspuffer war auf pH 8.0 eingestellt; der pH Wert beim Waschpuffer lag bei 6,3 und der des Elutionspuffers bei 4,5. Alle Puffer wurden steril filtriert. Für die weitere Verwendung des eluierten Proteins war es notwendig, eine Dialyse gegen PBS durchzuführen. Schrittweise Dialyse gegen PBS, mit unterschiedlichen Konzentrationen von Harnstoff, hatte den Vorteil, dass das Protein in Lösung blieb. So konnte der größte Teil des Proteins in PBS überführt und für die Immunisierung zweier Kaninchen verwendet werden. Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels Gelelektrophorese, anschließender Coomassie- oder Silberfärbung und Western Blot.



2.2.3.8 Aufreinigung der DygAB Antikörper aus Kaninchenserum

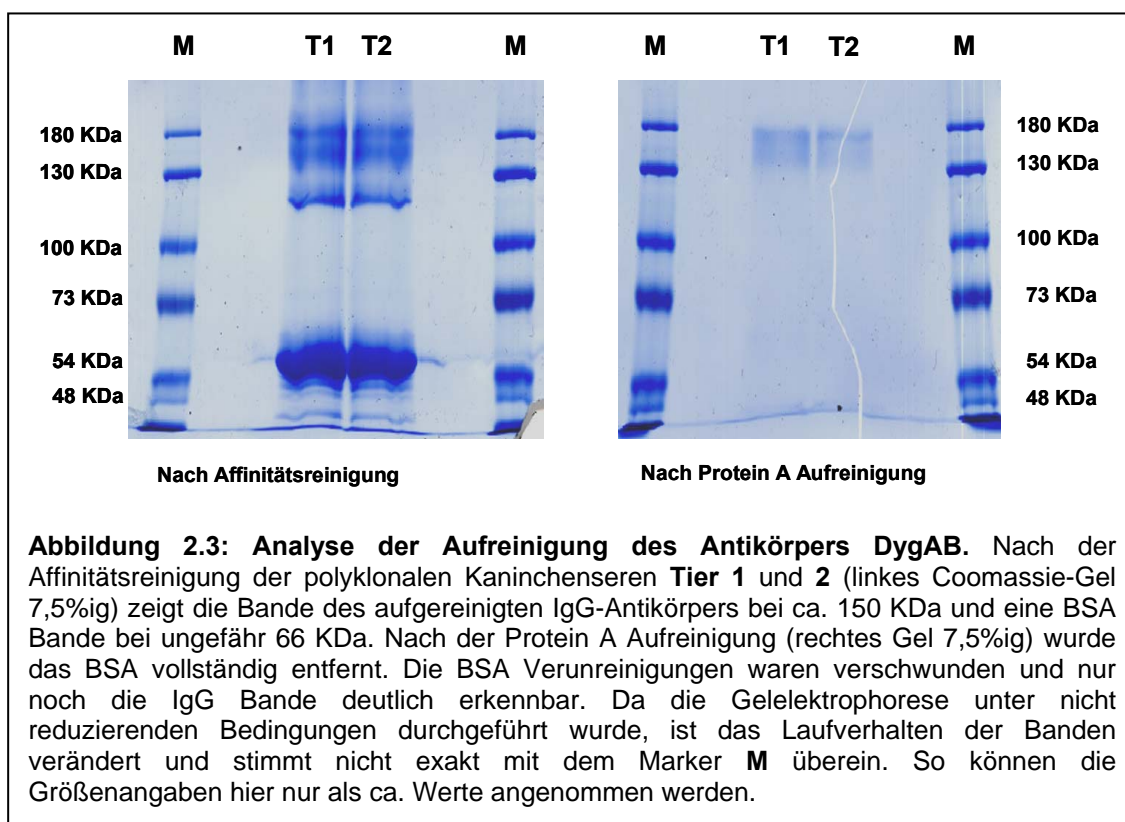
Aus 500 ml Bakterienkultur konnten ungefähr 3 mg Protein DygAB aufgereinigt werden. Das aufgereinigte Protein DygAB wurde mittels Western Blot und einem spezifischen Schaf-anti-Dystroglycan Antikörper (Herrmann et al., 2000) analysiert.

Zur Immunisierung der Tiere wurden je Injektion 200-500 µg Protein benötigt. Die Immunisierung (*Boost*: mehrere Impfungen zur Verstärkung der Immunantwort) der Kaninchen erfolgte am Tag 20, 30, 40 und 61 (Immunisierungsprotokoll, Pineda Antikörperservice, Berlin). Nach 90 Tagen wurde den Tieren Blut entnommen. Danach erfolgte die Aufreinigung des aus dem Blut gewonnenen Kaninchenserums, der spezifischen IgG Antikörper mittels Affinitätschromatographie. Die Immunisierung der Kaninchen und Herstellung einer Säule mit an Sepharose gebundenem rekombinantem Protein DygAB (5 mg Protein je Affinitätschromatographiesäule), wurde von der Firma Pineda Antikörperservice in Berlin durchgeführt. Für die Affinitätschromatographie der Antikörper wurde die Säule zuerst mit 20 ml Puffer A (0,01 M Tris-HCL pH 7,5; 0,5 M NaCl; 0,02 % Natriumazid) äquilibriert. Danach erfolgte das Auftragen des Kaninchenserums (maximal 25 ml). Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Sepharosesäule mit Puffer A gewaschen (mindestens 20 ml). Es wurden 20 ml Elutionspuffer (0,2 M Glycin-HCL pH 2,5-3,0; 0,5 M NaCl, 0,02 % Natriumazid) verwendet, um die Bindung der spezifischen Antikörper an ihr Antigen (rekombinantes DygAB Protein) zu lösen. Die Antikörper wurden in einer Lösung, bestehend aus 5 ml 1 M Tris-HCL pH 7,5-8,0 und 10 mg BSA, eluiert. Durch die sofortige Neutralisierung kann einer Schädigung bzw. Inaktivierung des Antikörpers durch den sauren pH-Wert des Elutionspuffers vorgebeugt werden. Am Ende der Elution musste der pH-Wert des Antikörpers noch einmal überprüft und gegebenenfalls auf 7,0-8,0 mit 1 M Tris-HCL eingestellt werden.

Um genügend Kaninchenserum zu erhalten, wurden die Tiere einige Monate länger am Leben gelassen und einmal im Monat weiter immunisiert. Die Blutentnahme und die Aufbereitung zum Serum (je Blutung 25 ml) erfolgte ebenfalls monatlich.

2.2.3.9 Weitere Aufreinigung der Antikörper und Herstellung der Fab-Fragmente

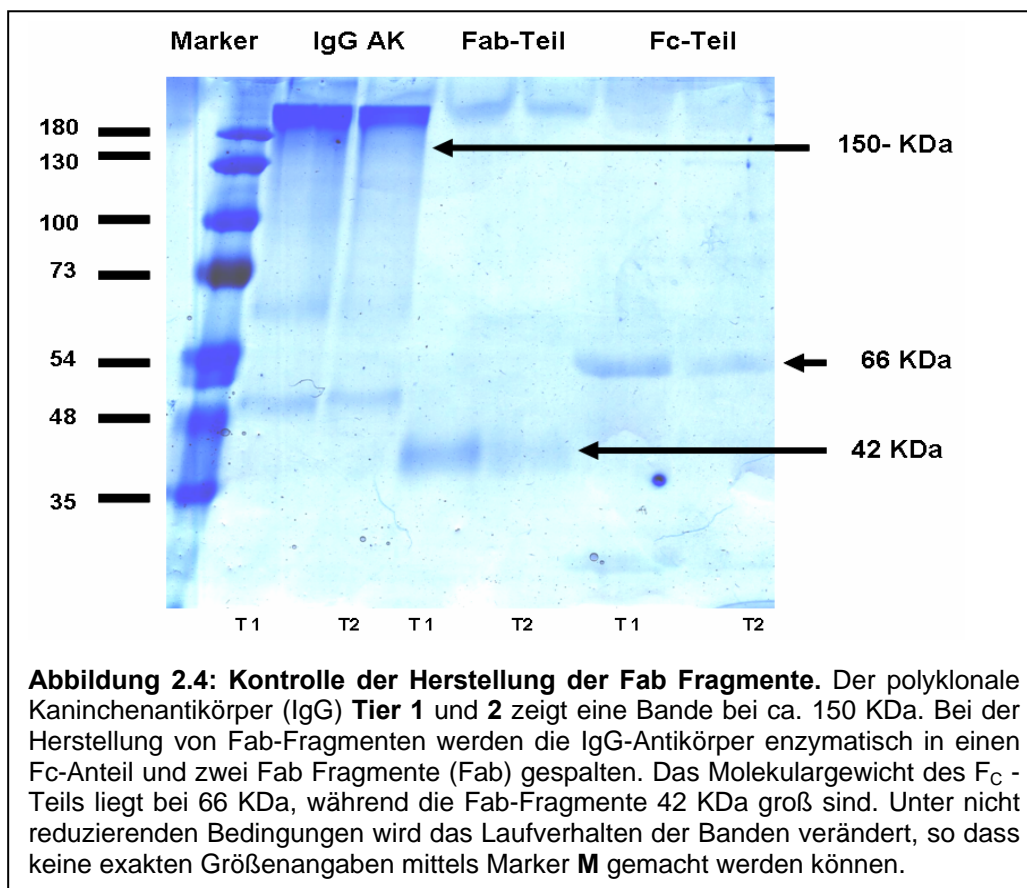
Nach der Affinitätsreinigung lagen die Antikörper in einem Puffer, bestehend aus Tris, Glycin, BSA und Natriumazid, vor. Je nach Verwendungszweck wurden die affinitätsgereinigten Antikörper in unterschiedliche Puffer überführt. Dazu wurden zunächst das BSA, mittels Affinity-Pak Protein A Säulen (Volumen 2,5 ml, Pierce, Bonn), entfernt. Protein A bindet den F_C-Teil von Kaninchen IgG Molekülen. Die Säulen wurden mit 12,5 ml 10 mM Tris pH 7,5 äquilibriert. Danach konnte man die Säule mit 8 ml (ungefähr 10 mg) der gereinigten polyklonalen Antikörper, beladen mit 25 ml 10 mM Tris, waschen und die gebundenen IgGs mittels 6 ml 0,1 M Glycin pH 2-3 eluieren. Die Protein A gereinigten Antikörper konnten jetzt, je nach Verwendungszweck, gegen PBS (für die Injektion) oder Natriumphosphat-Puffer (für die Herstellung der Fab-Fragmente), dialysiert werden. Zur Fab-Fragment-Produktion wurde das ImmunoPure[®] Fab System von Pierce, Bonn verwendet.



Immunglobuline **G** (IgG) bestehen aus zwei Ketten, einer schweren und einer leichten Kette, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Der variable

Teil der Antikörper besteht aus der leichten und einem Teil der schweren Kette und ist für die Spezifität der Antigenerkennung verantwortlich. Jedes IgG Molekül hat zwei variable Regionen. Liegen diese Regionen einzeln vor, spricht man von Fab-Fragmenten (*Fragment antigen binding*). Der konstante Teil, auch F_C-Teil (*Fragment crystallizable*) genannt, bestehend aus der schweren Kette, wird von den variablen Regionen durch Papain abgespalten. Dadurch entstehen monovalente Antikörper Fragmente, die jeweils nur ein Antigen binden und so nicht zu einer Kreuzvernetzung beitragen können. Außerdem können Fab-Fragmente keine Komplementproteine rekrutieren, da sie keinen F_C-Teil mehr besitzen. Dadurch kommt es bei *in vivo* Versuchen (Fab-Fragment-Injektionen) zu keiner Zellyse, verbunden mit Zelltod.

Nach Dialyse der Antikörper gegen Natriumphosphat/EDTA-Puffer wurden diese mit an Sepharosekügelchen gekoppeltem Papain, bei 37°C, über Nacht gespalten. Das Papain wurde danach durch Zentrifugation abgetrennt. Die Elution der Fab-Fragmente von der F_C-Region erfolgte über Säulenchromatographie mittels einer Protein A Säule. Die Analyse der getrennten F_C-Teile und Fab-Fragmente erfolgte über SDS-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung.



2.2.3.10 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wird benutzt, um ein spezifisches Protein und die mit ihm interagierenden Proteine aus einem Proteingemisch zu isolieren. Dazu verwendet man Antikörper, die gegen dieses zu isolierende Protein gerichtet sind und koppelt deren F_C-Region an eine feste Matrix, z.B. Agarose. Durch Inkubation der gekoppelten Antikörper mit dem Proteingemisch, binden die variablen Regionen des Antikörpers an sein Antigen. Darauf folgende Zentrifugationsschritte und Waschschriffe ermöglichen das Isolieren des Zielproteins.

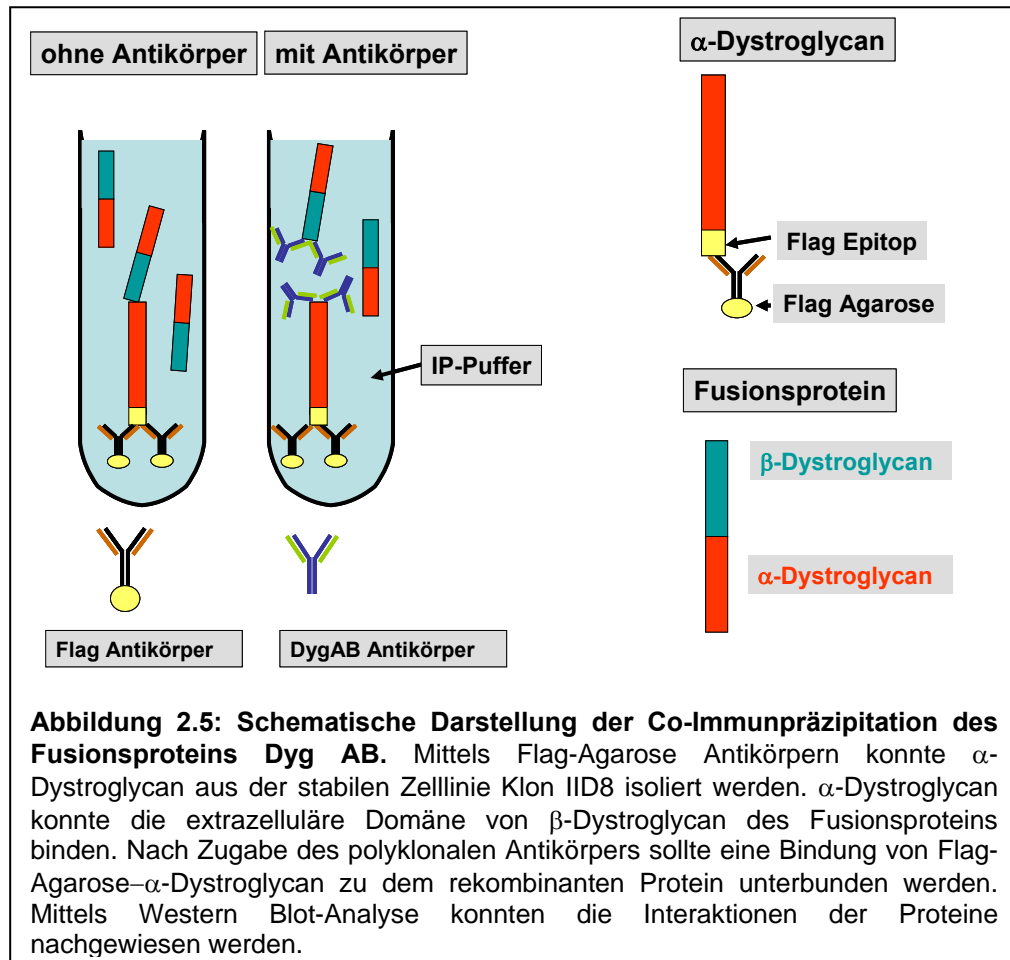
Um das rekombinante α -Dystroglycan (besitzt ein Flag-Epitop am N-Terminus) aus den stabil transfizierten HEK-Zellen (Klon IID8) aufzureinigen, wurden kommerziell erhältliche, mit anti-FLAG-Antikörpern beladene Agarosekügelchen von Sigma verwendet. Die Zellen einer 175 cm² Kulturflasche wurden kurz mit PBS gewaschen, danach mit einem 1 ml IP-Lysepuffer (10 mM Tris pH 7,4; 150 mM Na Cl; 1,25 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 0,05 % Tween 20; 0,5 % Triton X-100; 1% NP 40) versetzt und vom Kulturflaschenboden gelöst. Die Suspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Zum Scheren der genomischen DNA wurde das Zelllysat mit einer Spritze mehrmals durch eine 22G, dann durch eine 26G Kanüle, gezogen. Nun konnte das Lysat 20 Minuten lang auf Eis inkubiert werden. Zur Sedimentierung ungelöster Bestandteile wurde das Lysat 10 Min lang bei 10 000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nun konnten 500 μ l des Überstandes mit 40 μ l der nach Herstellerangaben (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) aufbereiteten Agarosekügelchen versetzt werden. Die Inkubation erfolgte unter ständigem Schütteln über Nacht bei 4°C, oder 1-2 Stunden lang bei Raumtemperatur. Die Suspension wurde kurz bei 10 000 g zentrifugiert und der Überstand mittels einer Insulinspritze vorsichtig abgenommen. Als nächstes war es notwendig, das Agarose-Proteinpellet mit je 500 μ l Waschpuffer (wie IP- Lysepuffer, aber ohne Triton und NP 40) zu waschen. Das Pellet wurde kurz aufgeschüttelt und durch Zentrifugation bei 10 000 g erneut pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur weiteren Analyse aufbewahrt. Nach 3 Waschschriffen konnten die Agarosekügelchen mit 50 μ l

β -Mercaptoethanol-haltigem SDS-Probepuffer für die Dauer von 5 Min bei 95° C inkubiert werden. Als letztes wurde der Probepuffer mit den Proteinen abgenommen, und als Eluat aufbewahrt. Die Analyse der Proben (Lysat, Überstand, Waschschrifte) erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese.

2.2.3.11 Co-Immunpräzipitation

Mittels der Co-Immunpräzipitation kann man Interaktionen zwischen Proteinen nachweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet, um zu untersuchen, ob die polyklonalen Antikörper in der Lage sind, Interaktionen zwischen α -Dystroglycan und dem rekombinanten Fusionsprotein DygAB zu unterbinden. Die Immunpräzipitation erfolgte, wie oben beschrieben, jedoch ohne letztendlich die Proteine mit SDS-Probepuffer zu eluieren. Die Agarosekügelchen wurden in 100 μ l IP-Waschpuffer aufgenommen. Das rekombinante Protein (1 μ g) wurde mit dem Antikörper Dyg AB (3,5 μ g), bei Raumtemperatur 1 Stunde lang, unter ständigem Schütteln, vorinkubiert. Danach konnten unterschiedliche Ansätze vorbereitet werden. Vorinkubierte Protein/Antikörper DygAB bzw. Präimmuserum (10 μ l)/Protein (1 μ g) wurden zu den Agarosekügelchen hinzugefügt und bei Raumtemperatur 2-3 Stunden lang, unter permanentem Schütteln, inkubiert. Die Agarosekügelchen konnten nun mit 100 μ l IP-Waschpuffer gewaschen werden. Nach drei Waschschriften erfolgte die Elution mit 50 μ l SDS-Probepuffer, ohne Mercaptoethanol für 5 Minuten bei 95° C, auf einem Eppendorf-Schüttler. Zur weiteren Analyse wurde der Überstand des ersten Waschschriftes, das Eluat, und der Überstand der Inkubation mit Präimmuserum oder Antikörpern, aufbewahrt. Die gesammelten Überstände wurden mittels Methanol-Chloroformfällung (siehe 2.2.3.5) aufkonzentriert, um vorhandene Proteine innerhalb nachfolgender Analysen besser detektieren zu können. Danach konnten die Proteine mittels Gelelektrophorese (15 %iges SDS-Gel) und nachfolgendem Western Blot untersucht werden. Es sollte untersucht werden, ob das immunpräzipitierte α -Dystroglycan mit dem

Fusionsprotein unter Zugabe von Präimmenserum interagiert und ob mittels Antikörpern die Interaktion zwischen beiden Proteinen gestört wird.



2.2.4 Neuroanatomische Methoden

2.2.4.1 Fab-Fragmentinjektionen in lebende Hühnerembryonen

Um die Funktion von Dystroglycan *in vivo* im ZNS von jungen Hühnerembryonen zu untersuchen, wurden die Antikörper in das Tectum von E4 (Tag 4) Embryonen, sowie in das Auge von E6-E15 Tieren, injiziert. Auch in früheren Studien wurde diese Methode für die Analyse der Funktion von Proteinen *in vivo* erfolgreich angewendet (Meyer und Henke-Fahle, 1995; Ganzler-Odenthal und Redies, 1998). Die Injektionen mussten mehrmals durchgeführt werden

Material und Methoden

(jeweils nach ungefähr 24 Stunden), da Fab Fragmente nach zirka 24 Stunden abgebaut waren (Honig et al., 2002). Eier wurden in einem Inkubator bis zum gewünschten Embryonalstadium bebrütet. Jetzt konnten die Eier geöffnet und für die Injektion vorbereitet werden. Um den Embryo etwas abzusenken und damit von der Eierschale zu lösen, wurde die Eierschale sowohl am stumpfen Ende des Eies, als auch direkt über dem Embryo, durchstoßen und Luft von der stumpfen Seite abgesaugt. Dadurch verlagert sich die Luftblase direkt über den Embryo und die Eierschale kann geöffnet werden, ohne den Embryo zu verletzen. Eine Fläche von etwa 3-4 cm² der Schale wurde vorsichtig entfernt. Danach konnte die Vitellinmembran, die über dem Embryo liegt, entfernt werden. Es war dabei zu beachten, dass kein Blutgefäß verletzt wird. Nach dem Freilegen des Embryos erfolgte die Injektion der Fab-Fragmente mittels einer mit einem Pullgerät ausgezogenen Glaskapillare (Brand, Wertheim; 10 µl Kapillaren). Die Injektionen erfolgten täglich, mit einem Abstand von 24 Stunden, an drei aufeinander folgenden Tagen. Das Injektionsvolumen richtete sich nach dem Entwicklungsstadium und der Größe des Gewebes. So wurde in das E4 Tectum ein Volumen von 1 µl bis 12 µl injiziert. Dies entsprach einer Menge von 0,2 µg – 2.1 µg Antikörpern. In älteren Stadien musste ein wesentlich größeres Volumen des Antikörpers, zwischen 10 µl und 20 µl, injiziert werden. Das entsprach einer Konzentration von 1,8 µg bis 3.5 µg Fab-Fragmente oder Antikörper, bei einer Konzentration von 0,175 mg/ml. Nach der Injektion wurden die Ränder der Eier mit Silikonpaste bestrichen und die Eiöffnung mit Frischhaltefolie abgedeckt. Danach konnten sich die Embryonen im Brutschrank weiter entwickeln. Injiziert wurden die affinitätsgereinigten Antikörper, sowie Fab-Fragmente DygABT1. Als Kontrollen wurden Präimmunserum, reines PBS, Fusionsprotein in Kombination mit Antikörpern und ein alternativer, nicht-funktionsinhibierender Antikörper gegen α-Dystroglycan eingesetzt. Die Überlebensrate lag bei jüngeren Embryonalstadien zwischen 60% und 90 %. Bei Injektionen in Embryonen zwischen E14 und E18 war die Sterblichkeitsrate wesentlich höher, so dass nur 20 - 40 % der Embryonen bis zum Tag der Analyse E18 überlebten.

2.2.4.2 Anfertigung von Kryoschnitten aus embryonalen Hühnergeweben

Ungefähr einen Tag nach der letzten Injektion konnte das embryonale Auge oder Tectum entnommen und das Gewebe in 4 %igem Paraformaldehyd (in PBS gelöst), 5 bis 10 Minuten lang fixiert werden. Um das PFA zu entfernen, erfolgten dreimal 5 Minuten andauernde Waschschriffe in PBS. Nach dem Fixieren und Waschen wurde das Gewebe in 30 %iger Sucroslösung (in PBS) über Nacht, bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag konnte das in Succrose eingelegte Gewebe mittels eines Einfriermediums (Tissue Freezing Medium, Leica Instruments GmbH, Nussloch), mit flüssigem Stickstoff, eingefroren werden. Es war dabei wichtig, die Orientierung des eingefrorenen Gewebes für die Weiterverarbeitung zu Kryoschnitten durch Markierungen kenntlich zu machen. Mittels eines Kryostaten (Leica Instruments GmbH, Nussloch) wurden aus dem eingefrorenen Gewebe Schnitte mit einer Dicke von 10-13 µm hergestellt. Die Schnitte wurden mit PBS, Gelatine und Chromalaun beschichteten Objektträgern aufgenommen, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und bei -20°C gelagert.

2.2.4.3 Direkte und indirekte Immunfluoreszenz

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, Gewebe oder Zellen immunhistochemisch zu färben, nämlich direkt oder indirekt. Bei der direkten Immunfluoreszenz bindet der an ein Chromophor gekoppelte primäre Antikörper an sein spezifisches Antigen. Dadurch kann man das Protein mittels eines Fluoreszenzmikroskops direkt detektieren. Bei der indirekten Färbung benötigt man einen primären und einen Chromophor-markierten, sekundären Antikörper. Der primäre Antikörper erkennt sein spezifisches Antigen, während der sekundäre Antikörper die F_C-Region des primären Antikörpers detektiert. Die Verstärkung der Fluoreszenz durch die sekundären Antikörper ist ein großer Vorteil gegenüber der direkten Methode. Eingefrorene Gewebeschnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mit Blockierungslösung (1 % BSA, 0,1 % Triton X-100; 1x PBS) behandelt (zirka 20 Minuten), um alle Bindungsstellen abzusättigen. Danach konnte der in Blockierungslösung verdünnte primäre Antikörper auf den Schnitt gegeben werden (2 Stunden RT oder über Nacht bei 4° C). Danach wurde der Kryoschnitt mit

Waschpuffer (0,1 % BSA, 0,1 % Triton X-100, 1x PBS) dreimal je 10 Minuten lang gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Jetzt erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für die Dauer von einer Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen, von je 5-10 Minuten Dauer, wurde dem Schnitt mittels eiskaltem Ethanol Wasser entzogen und die Antikörper fest an das Gewebe präzipitiert. Die gefärbten Kryoschnitte konnten nun mittels eines speziellen Einbettmediums (Citifluor AF1, Plano GmbH, Wetzlar) eingedeckelt werden. Die Analyse des Gewebes erfolgte über ein Fluoreszenzmikroskop von Leica.

2.2.4.4 Markierung und quantitative Analyse postmitotischer Zellen

Um postmitotische Zellen zu markieren, wurden mit einer Pipette 100 µl BrdU (10 mg/ml in PBS) tröpfchenweise auf das Tectum der mit Fab-Fragment und PBS injizierten Hühnerembryonen appliziert. Die Öffnung der Eier wurde dann wieder mittels Silikonpaste und Frischhaltefolie verschlossen und in einem Brutschrank weiter bebrütet. Drei Stunden später wurde das Tectum präpariert, fixiert und Kryoschnitte daraus angefertigt. Das in die DNA eingebaute BrdU konnte mittels indirekter Immunfluoreszenz angefärbt werden. Damit der anti-BrdU Antikörper an das intrazelluläre Epitop binden konnte, musste der Schnitt 10 Minuten lang mit 1 N HCL behandelt werden. Ansonsten wurde die Färbe-Methode so durchgeführt, wie unter Punkt 2.2.4.3 beschrieben. Zur quantitativen Analyse der BrdU positiven Zellen im Tectum wurden pro Experiment (injiziert mit Fab-Fragmenten und PBS) jeweils drei unabhängige Präparate ausgesucht. Die in diesen Präparaten (Fab-Fragment injiziert) enthaltenen Verdickungen hatten ungefähr vergleichbare Ausmaße. In den Verdickungen der Tectumschnitte wurden BrdU-positive Zellen innerhalb eines 100 µm großen Tectumsegments ausgezählt und daraus der Mittelwert bestimmt. Auch in den PBS injizierten (Kontrollen) Tecta wurden die BrdU markierten Zellen, je 100 µm Tectumsegment, in einigen ausgewählten dorsal liegenden Bereichen ausgezählt und ebenfalls der Mittelwert bestimmt. Der Mittelwert der BrdU markierten Zellen der PBS injizierten Tecta wurde den mit Fab-Fragment injizierten Tecta gegenübergestellt.

2.2.4.5 „Open Book“ Präparation von E 7 Tectum

Zur Untersuchung des axonalen Wachstums erfolgte die Präparation des Tectums 24 Stunden nach der letzten Fab-Fragmentinjektion. Die Hühnerembryonen wurden zunächst dekapitiert, um das Tektum vorsichtig mit einer Pinzette herausnehmen zu können. Mit einer Irisschere wurden dorsal die beiden Tectumhälften getrennt, bis man das Tectum mittels Pinzette auf einen Nitrozellulosefilter ausbreiten konnte. Jetzt wurde die darüber liegende Basalmembran entfernt und die darunter liegenden Axone nach Fixierung mittels immunhistologischer Methoden untersucht (Kröger und Niehörster, 1990; Kröger und Schwarz, 1990). Zur Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes wurde der ganze Vorgang in Hanks-Lösung durchgeführt.

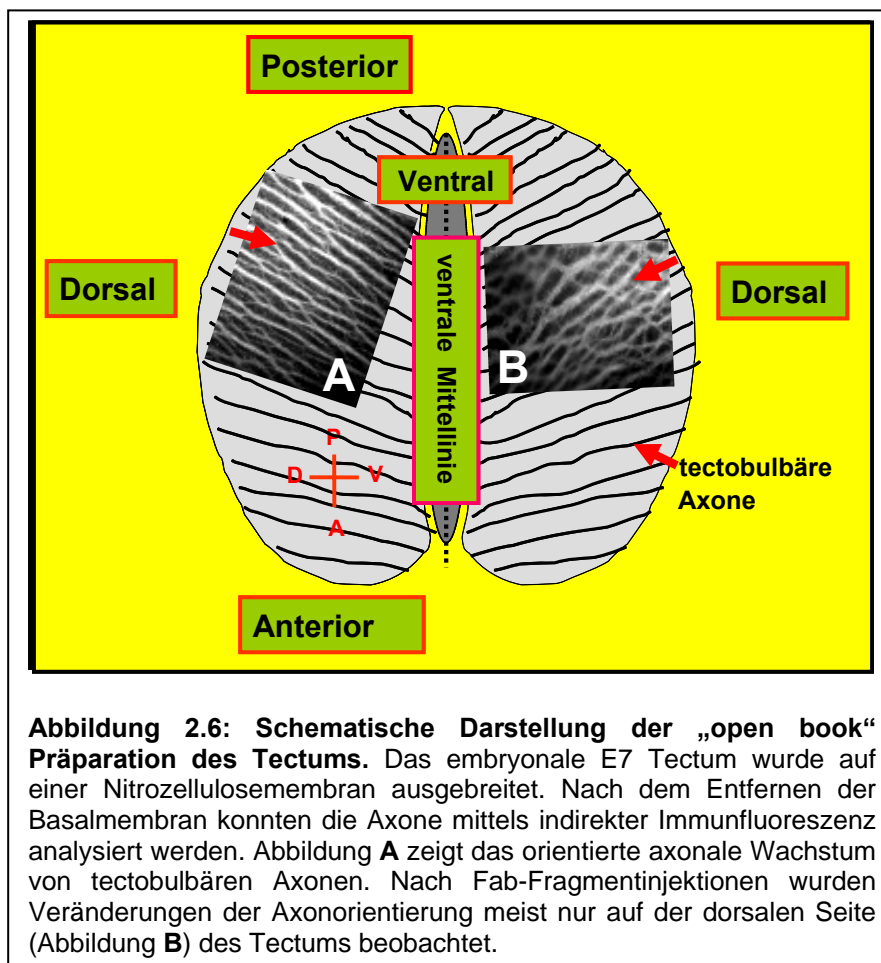


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der „open book“ Präparation des Tectums. Das embryonale E7 Tectum wurde auf einer Nitrozellulosemembran ausgebreitet. Nach dem Entfernen der Basalmembran konnten die Axone mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert werden. Abbildung **A** zeigt das orientierte axonale Wachstum von tectobulbären Axonen. Nach Fab-Fragmentinjektionen wurden Veränderungen der Axonorientierung meist nur auf der dorsalen Seite (Abbildung **B**) des Tectums beobachtet.

2.2.4.6 Basalmembranpräparation

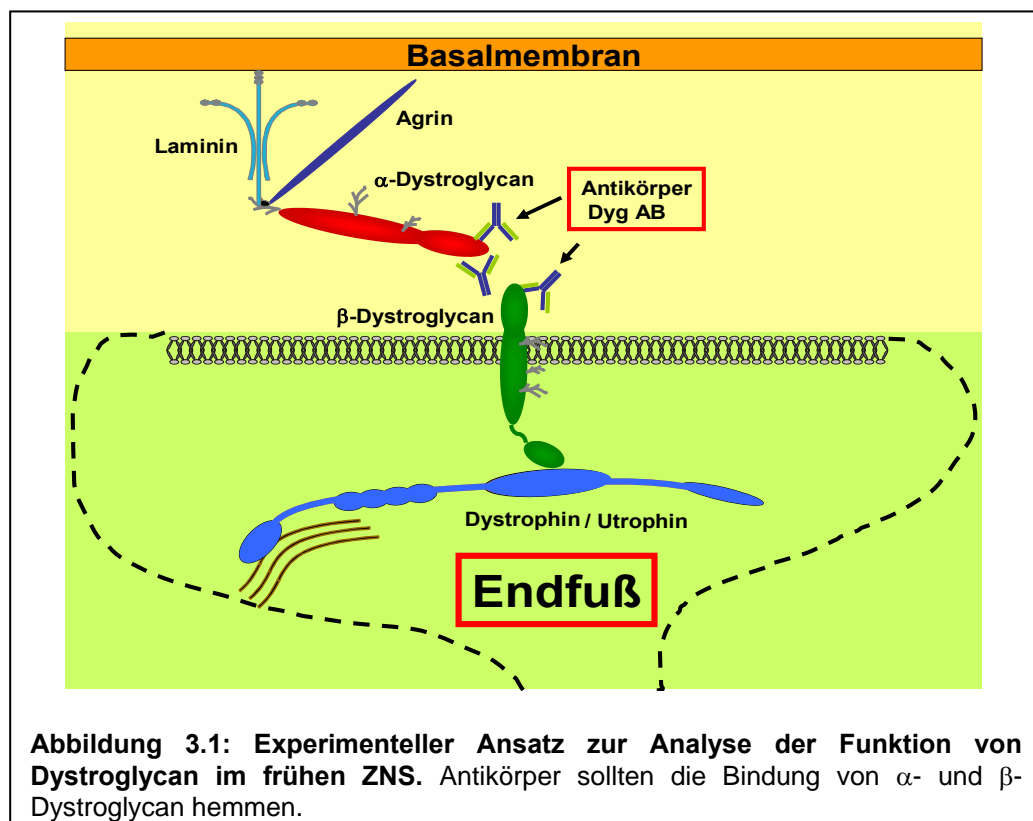
Es wurden von einem 10 Tage (E10) alten Hühnerembryo die Augen und danach die Netzhaut (Retina) präpariert. Die isolierte Retina wurde mit der Basalmembranseite nach oben auf einem Nitrozellulosefilter faltenfrei ausgebreitet. Deckgläschen wurden mit Poly-L-Lysin (in PBS verdünnt) benetzt und 2 Stunden lang bei 37° C inkubiert, mit dH₂O gewaschen und getrocknet.

Die ausgebreitete und an Nitrozellulose gebundene Retina wurde mit der Basalmembranseite nach unten auf ein Poly-L-Lysin (Sigma Aldrich) beschichtetes Deckglas transferiert. Durch das Trocknen des Gewebes adhärierte die Basalmembran an dem beschichteten Deckglas. Nun konnte der Filter mit dem Gewebe mittels Hanks-Lösung (Sigma Aldrich) und Pinzette entfernt werden. Danach wurde die an dem Deckglas gebundene Basalmembran mit 1%igem Triton, 1-2 Stunden bei 37° C inkubiert, um Zellreste bzw. Endfüße von radialen Vorläuferzellen zu entfernen (Halfter et al., 1987). Zuletzt wurde die Basalmembran mit Hanks-Lösung und Zellkulturmedium gewaschen. Die Lagerung der Basalmembran erfolgte in serumhaltigem Zellkulturmedium bei 37° C.

III. Ergebnisse

3.1 Herstellung und Charakterisierung eines Antikörpers gegen die Interaktionsstelle zwischen α - und β -Dystroglycan

Es wurde ein Antiserum gegen Dystroglycan hergestellt, das die Interaktion zwischen α - und β -Dystroglycan inhibieren sollte, um eine Unterbrechung des Dystrophin- assoziierten Glykoproteinkomplexes herbeizuführen. Durch die Unterbrechung der Dystroglycan-Interaktion sollte die molekulare Verbindung zwischen Matrix und Zytoskelett im ZNS unterbrochen werden und eine ähnliche Situation wie bei Muskeldystrophien erzeugt werden. Aufgrund der Veränderungen kann dann auf die Funktion von Dystroglycan und somit die Funktion des Dystrophin-assozierten Glykoproteinkomplexes im sich entwickelnden Zentralen Nervensystem geschlossen werden.

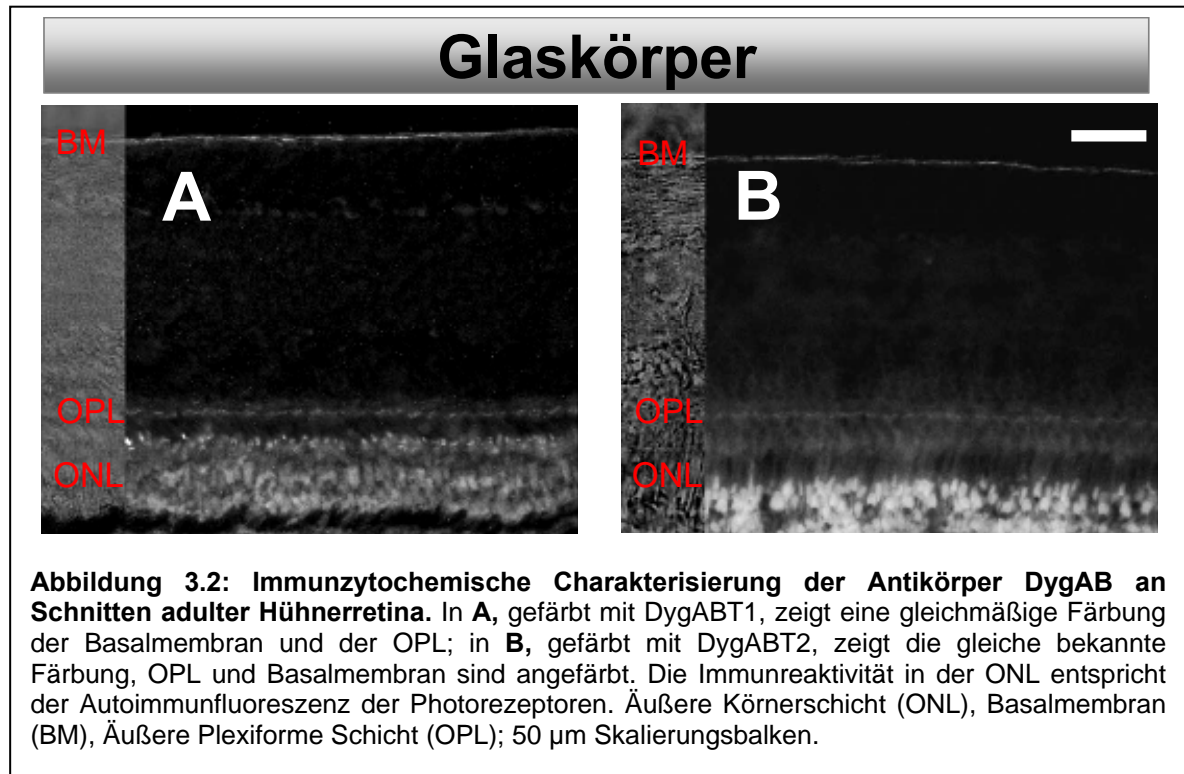


In frühen embryonalen Stadien bestehen die Retina und das gesamte Neuroepithel aus einer Schicht (Neuroepithelzellen) neuraler Vorläuferzellen. Neuroepithelzellen sind die Vorläufer aller Nerven und Gliazellen im gesamten Zentralnervensystem (Anthony et al., 2004; Huttner und Kosodo, 2005). Sie haben eine radiale Struktur und durchspannen die gesamte Breite des Neuralrohrs, bzw. der Retina. Die Neuroepithelzellen sind mit ihrem Zellendfuß an der Basalmembran (der Piabasalmembran im Gehirn, bzw. innere Grenzmembran in der Retina) verankert. Die Lokalisation von Dystroglycan in frühen Stadien beschränkt sich ausschließlich auf die Neuroepithelzellendfüße (Blank et al., 1997; Blank et al., 2002). Das neu generierte Serum sollte an dieser Stelle α und β -Dystroglycan erkennen und die Interaktion der beiden Proteine unterbinden (siehe Abb. 3.1).

Um das entsprechende Antiserum herstellen zu können, wurde ein Fusionsprotein generiert, das die gesamte extrazelluläre Domäne von β -Dystroglycan und ein kleines Stück der C-terminalen Domäne (AS 550-585) von α -Dystroglycan enthält. Diese Bereiche sind für die Interaktion der beiden Proteine verantwortlich. Da die c-DNA von Dystroglycan beide Proteine kodiert, war es möglich, mit einem einzelnen Primerpaar alle Bereiche der Bindungsdomänen zu amplifizieren, gegen die das Antiserum später gerichtet sein sollte. Der Bindungsbereich erstreckte sich von Aminosäure 550 bis 749 AS.

Es wurden zwei Kaninchen mit dem Fusionsprotein (Aminosäure 550-749), das die beiden Interaktionsdomänen enthielt, immunisiert (Bozzi et al., 2001; Sciandra et al., 2001). Die Spezifität und die Reaktivität der beiden unterschiedlichen Antiseren (DygABT1 und DygABT2), bzw. aus den daraus gewonnenen Fab-Fragmenten, wurde mit Hilfe der Immunzytochemie und Westernblotting bestimmt.

In der immunhistochemischen Analyse der adulten Hühnerretina färbten die beiden Antikörper DygABT1 und T2 dieselben Regionen gleich gut an, nämlich die OPL und die Basalmembran (Abb. 3.2). Dieses Färbemuster entspricht dem auch mit anderen anti-Dystroglycan Antikörpern beschriebenen (Blank et al., 2002).



Die Anfärbung von Dystroglycan mit den Antikörpern DygABT1 und T2 in adulten Hühnermuskelschnitten zeigte ebenfalls die bekannte Verteilung. Die gesamte Muskelfasermembran wurde angefärbt (Abb. 3.3 A, B). Ebenfalls färbten beide Antikörper auch, mit der Vollängen Dystroglycan c-DNA, transient transfizierte HEK-Zellen spezifisch an. Beide polyklonalen Antikörper (DygAB Tier 1 und 2) wiesen das gleiche Färbemuster innerhalb der adulten Retina und Muskelgewebe, sowie in transfizierten HEK-Zellen auf (Abb. 3.3). Somit erkannten beide Antikörper, in immunhistochemischen Färbungen, Dystroglycan mit der gleichen Spezifität.

Ergebnisse

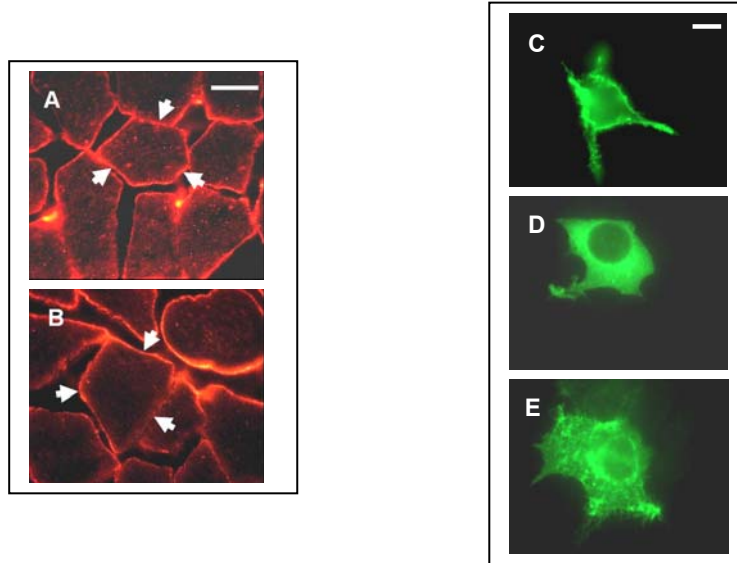


Abbildung 3.3: Adulter Hühnermuskel. In **A**, DygABT1 zeigt eine gleichmäßige Färbung der Muskelfasermembran; In **B**, DygABT2 färbt ebenfalls das Sarcolemma gut an (weiße Pfeilköpfe). Beide Antikörper färben spezifisch die Muskelfasermembran der Skelettmuskulatur. Skalierungsbalken 50 μm . **C, D, E** zeigt die Anfärbung von **transient transfizierten HEK-Zellen**. **C**, gefärbt mit 43DAG/8D5 als Kontrolle; in **D** DygAB Tier 1 und **E** DygAB Tier 2. Als Negativkontrollen dienten transfizierte Zellen, gefärbt mit Präimmunserum und nicht transfizierte HEK-Zellen, gefärbt mit dem spezifischen Serum DygAB (Daten nicht gezeigt). Skalierungsbalken 10 μm .

Da die Antikörper in den späteren Versuchen Dystroglycan auch im embryonalen ZNS erkennen sollten, wurden Tectumschnitte angefärbt. Als Kontrolle diente der kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper 43DAG/8D5 (hergestellt von Dr. Louise V.B. Anderson, General Hospital, Newcastle), der an die C-terminalen intrazellulären 20 Aminosäuren von β -Dystroglycan bindet (Bewick et al., 1993).

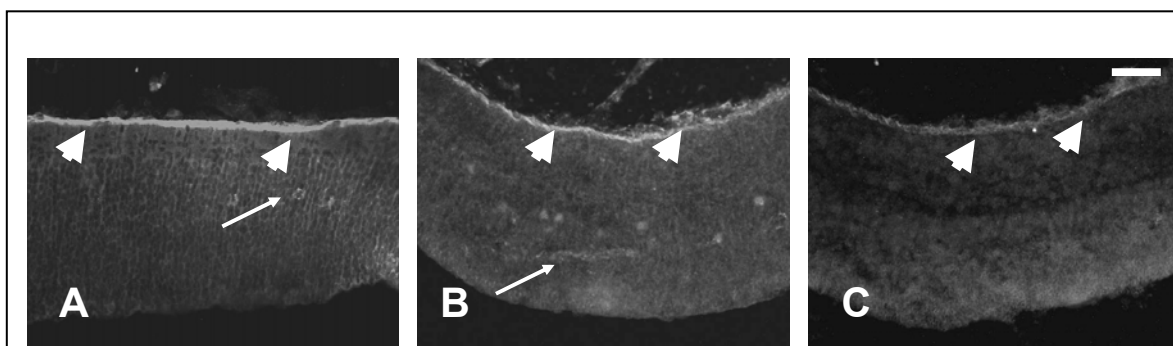


Abbildung 3.4: Embryonales Mesencephalon Tag 7 (E7). Schnitt **A**, wurde als Positivkontrolle mit dem kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörper 43DAG/8D5 gefärbt. Es wurde dabei die innere Grenzmembran (dicke Pfeile) des Tectumschnittes angefärbt. Ebenso ist eine deutliche Anfärbung der Blutgefäße erkennbar (dünne Pfeile). In **B**, wurde der Schnitt mit dem polyklonalen Antikörper DygAB Tier 1 gefärbt. Der Schnitt zeigt das gleiche Färbemuster wie in **A**. In **C**; der DygAB Tier 2 Antikörper markiert die piale Basalmembran schwächer, im Gegensatz zu den beiden anderen Antikörpern (wie in **A** und **B** gezeigt). Außerdem färbt er nicht die Blutgefäße an. Die Färbungen wurden alle unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Skalierungsbalken 50 μm .

Ergebnisse

Beide Antikörper färbten die piaie Basalmembran an der Außenseite des Tectums an. Jedoch detektierte nur der Tier 1 Antikörper sein Antigen an den Blutgefäßen genauso spezifisch wie der monoklonale Antikörper 43DAG/8D5 (Bewick et al., 1993), der als Kontrolle verwendet wurde (Abb. 3.4 A, B). Hingegen färbte der Tier 2 Antikörper die piaie Basalmembran schwächer an und erkannte die Blutgefäße nicht (Abb. 3.4 C). Zusammenfassend zeigen die immunhistochemischen Färbungen im Tectum, dass die beiden Antiseren DygAB Tier 1 und 2 Dystroglycan unterschiedlich gut detektieren.

Um die Reaktivität der beiden Antiseren weiter zu analysieren, wurden die aufgereinigten Antikörper mittels Westernblotting charakterisiert. Insbesondere sollte untersucht werden, ob die beiden Antikörper (DygAB Tier 1 und 2) fähig sind, sowohl α -als auch β -Dystroglycan gleich gut zu detektieren. Quellen für das Dystroglycan Protein waren eine stabil mit Dystroglycan transfizierte Zelllinie (293HEK Zellen Klon IID8) und embryonales Hühnergewebe.

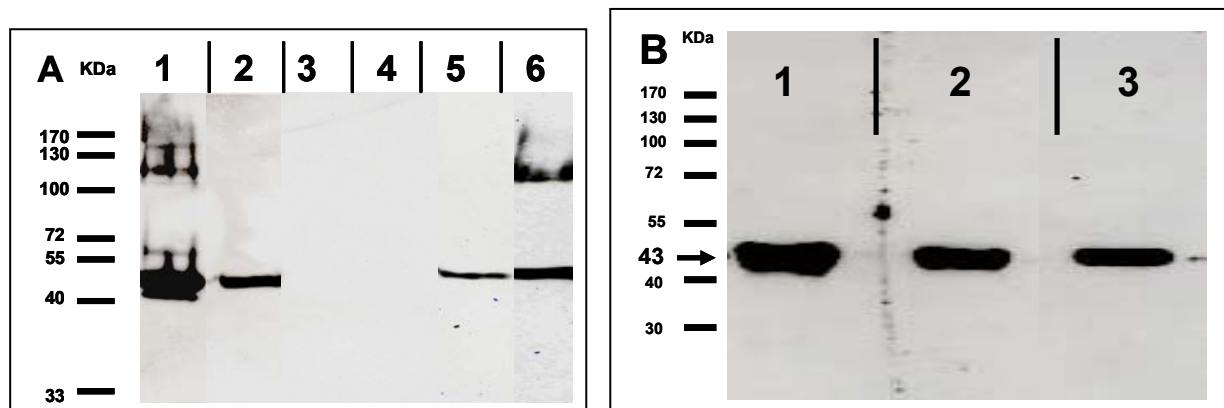


Abbildung 3.5: A, Charakterisierung des Antikörpers DygAB anhand der stabilen Zelllinie IID8-Lysat. In dem hier dargestellten Western Blot wurden als Positivkontrollen der kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper **43DAG/8D5 (Spur 5)**, der nur β -Dystroglycan erkennt und der polyklonale Antikörper **AB-Dyg-His (Spur 6)** (Schröder, 2002), der beide Proteine detektiert (α und β -Dystroglycan), verwendet. Die α -Dystroglycan-Banden liegen bei 100-160 KDa (entspricht den unterschiedlichen Glykosylierungsformen des Proteins), während die β -Dystroglycan-Bande bei 43 KDa liegt. Die **Präimmunseren Tier 1 (Spur 3)** und **Tier 2 (Spur 4)**, die als Negativkontrollen dienten, detektierten, wie erwartet, keine Banden. Der affinitätsgereinigte Antikörper **DygAB Tier 1 (Spur 1)** detektierte beide Proteine. Er erkannte eine Bande bei 43 KDa und Banden, die bei 100-160 KDa liegen. Dagegen detektierte der **DygAB Tier 2 (Spur 2)** Antikörper nur β -Dystroglycan (eine 43 KDa Bande). **B, zeigt einen Western Blot mit Hühnermuskellysat:** Beide Antikörper **DygAB Tier 1 (Spur 1)** und **Tier 2 (Spur 2)** detektierten nur die 43 KDa Bande, also β -Dystroglycan. Als Positivkontrolle wurde der monoklonale Antikörper **43DAG/8D5 (Spur 3)** verwendet.

Ergebnisse

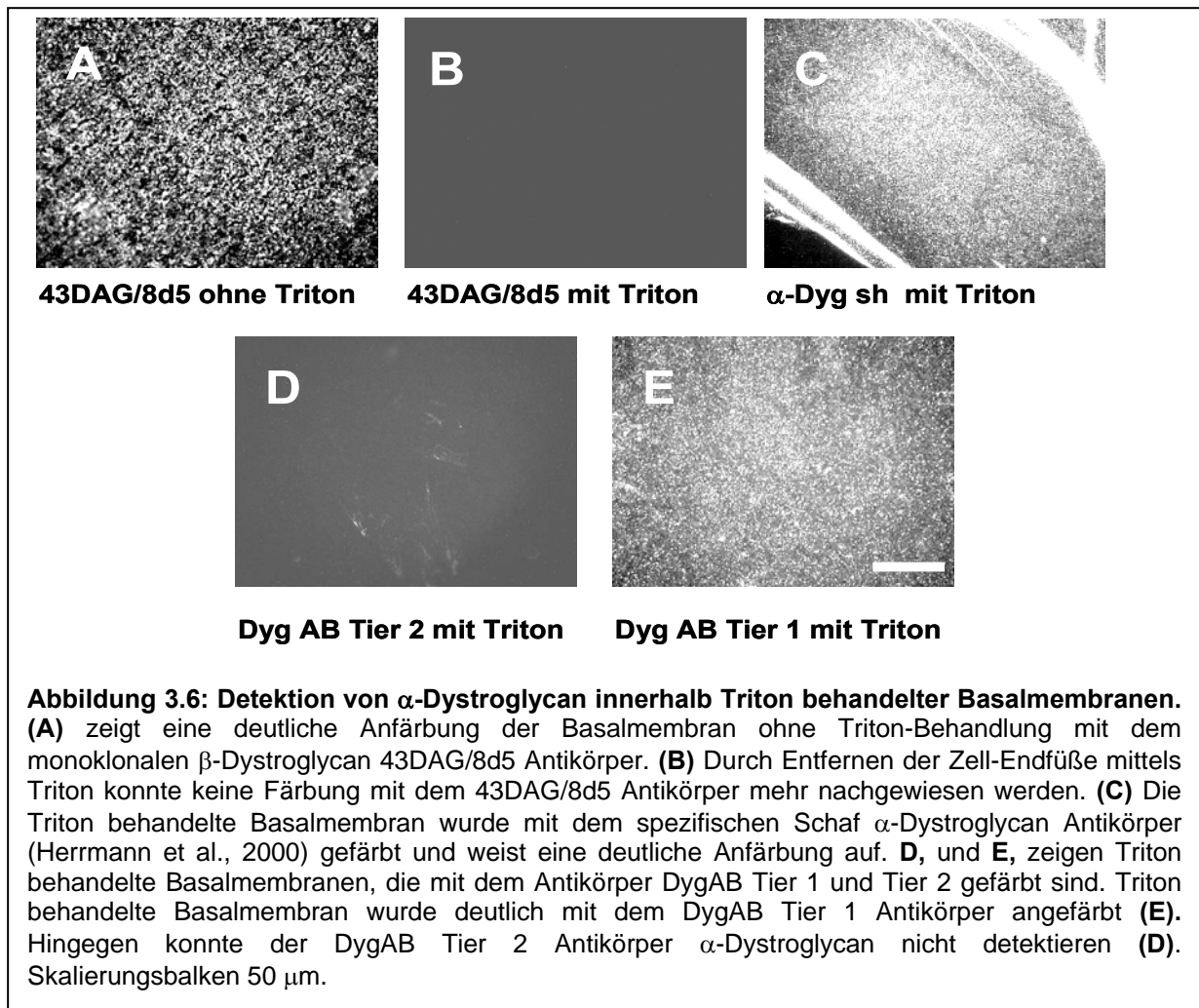
Im Westernblot zeigten sich Unterschiede in der Reaktivität der beiden affinitätsgereinigten Antikörper. Der polyklonale Antikörper DygAB Tier 1 detektierte α und β -Dystroglycan, während der Antikörper aus Tier 2 nur β -Dystroglycan erkannte (Abb. 3.5 A, Western Blot mit der stabil transfizierten Zelllinie Klon IID8). Im Western Blot mit Hühnermuskellysat erkannten beide Antiseren aus Tier 1 und 2 nur β -Dystroglycan (Abb. 3.5 B). Die Unterschiede in der Reaktivität zwischen den beiden Antiseren aus Tier 1 und 2 könnten daran liegen, dass hauptsächlich gegen die extrazelluläre β -Dystroglycanregion (möglicherweise die „*major immunogenic region*“) des injizierten Fusionsproteins eine Immunantwort in den Kaninchen ausgelöst wurde. Dadurch entstanden größtenteils Antikörper gegen β -Dystroglycan und nur zu einem geringen Anteil gegen α -Dystroglycan. Vermutlich enthält das Serum 2 verhältnismäßig weniger α -Dystroglycan Antikörper als das Serum 1. Deshalb konnte nur der Tier 1 Antikörper das rekombinante α -Dystroglycan (transfizierte Zelllinie Klon IID8) im Western Blot detektieren. Der generell geringe Anteil von α -Dystroglycan Antikörpern könnte ebenfalls den gegen α -Dystroglycan fehlenden Reaktivitätsverlust in Hühnergewebe und die starke Reaktivität gegen β -Dystroglycan erklären. Vermutlich konnten im Westernblot die verhältnismäßig wenigen, im Serum vorhandenen, α -Dystroglycan Antikörper eher größere Mengen rekombinantes α -Dystroglycan detektieren, als geringe Mengen aufgereinigtes α -Dystroglycan im Hühnermuskel. Zudem könnten vermutlich überwiegend α -Dystroglycan Antikörper gebildet worden sein, die einen kleinen, aber nicht den ganzen Bereich der Interaktionsdomäne (Bereich des injizierten Fusionsproteins) von α -Dystroglycan detektieren konnten. Möglicherweise waren die Epitope, auf Grund der Konfirmation des Proteins auf dem Hühnermuskellysat-Blot, den wenigen im Serum vorhandenen α -Dystroglycan Antikörpern nicht zugänglich.

Da der affinitätsgereinigte Antikörper DygAB Tier 1 im Westernblot mit Muskelgewebe-Proben kein α -Dystroglycan detektieren konnte, wurde versucht, mittels Triton behandelte Basalmembranen den Antikörper immunhistochemisch weiter zu charakterisieren. Triton ist ein Detergenz, das Zellmembranen permeabilisiert. In den Experimenten von Halfter et al. 1987 und Blank et al. 1997

Ergebnisse

konnte gezeigt werden, dass durch Triton-Behandlung anhaftende Neuroepithelzellendfüße und somit auch β -Dystroglycan, vollständig aus der präparierten Huhn-Basalmembran entfernt werden können (Halfter et al., 1987; Blank et al., 1997). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Triton behandelte Basalmembranen nur noch α -Dystroglycan enthielten. Diese Ergebnisse konnte ich für meine weitere Analyse des neu generierten Antikörpers DygAB verwenden.

Dazu wurden retinale Huhn-Basalmembranen (Embryonaltag 10) präpariert und mit Triton behandelt (siehe 2.2.4.6 Material/Methoden-Teil). Durch die Triton Extraktion wurde β -Dystroglycan, zusammen mit den Endfüßen der Neuroepithelzellen, von der Basalmembran entfernt (Halfter et al., 1987; Blank et al., 1997). Als Kontrolle, ob β -Dystroglycan vollständig aus der Basalmembran entfernt worden ist, wurden Basalmembranen vor und nach Triton Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper 43DAG/8D5 gefärbt (Gewebe 7 Minuten lang mit 4 %igem PFA fixiert und gefärbt, laut Protokoll, siehe 2.2.4.3 Material/Methode). Nur Triton unbehandelte Basalmembranen zeigten β -Dystroglycan Immunreaktivität (Abb. 3.6 A), im Gegensatz zu den mit Triton behandelten (Abb. 3.6 B). Um zu zeigen, dass die Triton behandelten Basalmembranen noch α -Dystroglycan enthielten, wurden sie mittels eines spezifischen Schaf α -Dystroglycan Antiserums angefärbt (Herrmann et al., 2000). Alpha Dystroglycan war in den Triton behandelten Basalmembranen detektierbar (Abb. 3.6 C). Um meine Hypothese zu stützen, dass der Antikörper DygAB Tier 1 α -Dystroglycan detektieren kann, wurden Triton behandelte Basalmembranen mit den neu generierten polyklonalen Antikörpern DygAB Tier 1 und 2 gefärbt (Abb. 3.6 D, E). Wie erwartet, erkannte nur DygAB Tier 1 α -Dystroglycan (Abb. 3.6 E). Dieses Resultat war vergleichbar mit dem Ergebnis der Charakterisierung des Antikörpers DygAB mittels Zelllysate IID8 Western Blot (siehe Abb. 3.5 A). Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass der Antikörper DygAB 1 (Tier 1) α - und β -Dystroglycan detektieren kann, während der DygAB 2 (Tier 2) nur β -Dystroglycan detektiert.



3.2 Biochemischer Nachweis der Funktionalität des polyklonalen DygAB Antikörpers

Um zu untersuchen, ob das Antiserum DygAB die Interaktion zwischen α und β -Dystroglycan *in vitro* unterbinden kann, wurden die affinitätsgereinigten Antikörper mittels Co-Immunpräzipitation und Western Blot weiter analysiert. Dazu wurde das rekombinante α -Dystroglycan aus dem Überstand der stabil-transfizierten Zelllinie Klon IID8 mittels Flag-Agarose isoliert. Untersuchung des Präzipitats ergab, dass nur α -Dystroglycan an die Flag-Agarose gebunden war und dass der Antikörper α -Dystroglycan erkannte (Daten nicht gezeigt).

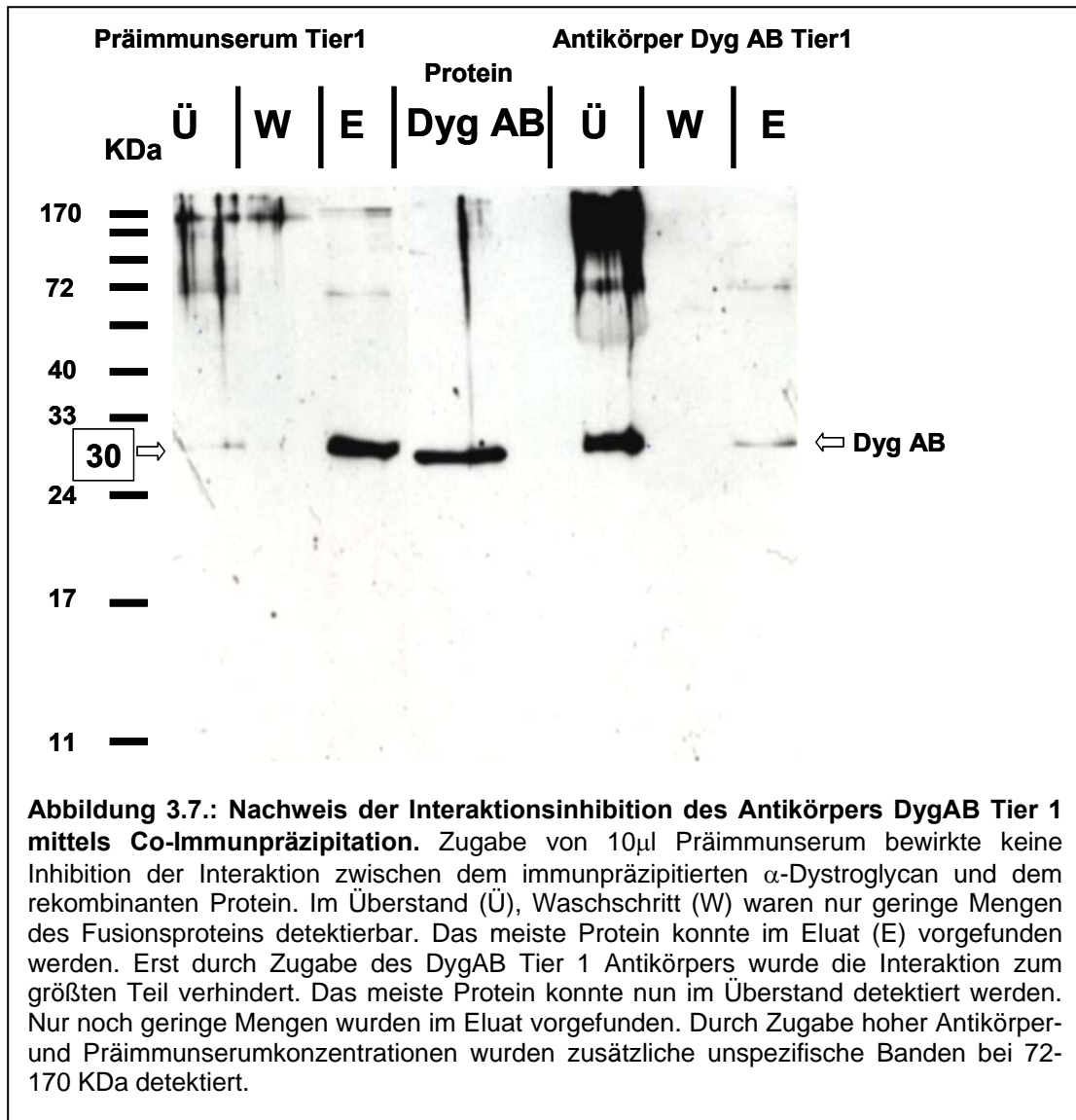
Ergebnisse

Die Co-Immunpräzipitation des rekombinanten Fusionsproteins erfolgte mittels Western Blot. Die Detektion des Fusionsproteins mit dem Schaf α -Dystroglycan Antiserum (Herrmann et al., 2000) zeigte eine Bande bei ungefähr 30 KDa. Weitere Proteinbanden, die bei 72-170 KDa lagen, wurden detektiert. Diese kamen durch die hohe Konzentration der hinzugefügten Antikörper und des Präimmunserums bzw. den für die Immunpräzipitation benutzten Flag-Antikörpern zustande. Der Blot wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt, um sicher zu stellen, dass die richtige Bande bei 30 KDa detektiert wird. Unter reduzierenden Bedingungen hätte man Schwierigkeiten, die Bande der leichten Kette der verwendeten Antikörper (25 KDa) mit der Bande des rekombinanten Proteins (30 KDa) auf dem Blot zu unterscheiden.

Es wurde zu dem an Flag-Agarose Kügelchen gebundenen α -Dystroglycan 1 μ g rekombinantes Protein und 10 μ l Präimmunserum Tier 1 gegeben. Das rekombinante Protein (Fusionsprotein) enthielt, unter anderem, den kompletten extrazellulären Bereich von β -Dystroglycan und sollte somit α -Dystroglycan binden können. Nach erneuter Präzipitation der Agarose Kügelchen konnten an α -Dystroglycan gebundenes Fusionsprotein im Eluat und nur geringe Mengen im Überstand nachgewiesen werden. Dieser Kontrollversuch zeigte, dass das isolierte α -Dystroglycan fähig war, das zugegebene Fusionsprotein zu binden. Um zu untersuchen, ob der Antikörper DygAB fähig war, die Interaktion zwischen α -Dystroglycan und dem extrazellulären Bereich von β -Dystroglycan des Fusionsproteins zu inhibieren, wurde in einem weiteren Ansatz zu dem präzipitierten α -Dystroglycan und dem Fusionsprotein 3,5 μ g des affinitätsgereinigten Antikörpers DygAB Tier 1 gegeben. Das meiste Protein war im Überstand lokalisiert und eine geringe Menge konnte im Eluat (Interaktion α -Dystroglycan mit Fusionsprotein) detektiert werden (siehe Abb. 3.7). Dieses Ergebnis ist mit der Hypothese kompatibel, dass das Antiserum aus Tier 1 die Interaktion zwischen α - und β -Dystroglycan hemmen kann. Im Gegensatz dazu konnte der DygAB Tier 2 Antikörper nicht die Interaktion zwischen dem α -Dystroglycan und dem Fusionsprotein

Ergebnisse

unterbinden, trotz gleicher Antikörperkonzentration (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde nur der DygAB Tier 1 Antikörper für alle weiteren Experimente verwendet.



Zusammenfassend haben die vorangegangenen Experimente gezeigt,

1. dass der neu generierte polyklonale Antikörper DygAB T1 und T2 α - und β -Dystroglycan im Hühnergewebe und in transient transfizierten HEK-Zellen spezifisch erkennt.
2. dass der T1 Antikörper α - und β -Dystroglycan auch im Western Blot spezifisch erkennt, während der T2 Antikörper nur β -Dystroglycan erkennt.

3. dass der Antikörper DygAB T1 fähig ist, in *in vitro* Co-Immunpräzipitationen die Interaktion von α -Dystroglycan mit der extrazellulären β -Dystroglycanregion des rekombinanten Proteins zu inhibieren.

Damit sind alle Voraussetzungen erfüllt, mit Hilfe des Antiserums die Interaktion *in vivo* zu hemmen und somit die Funktion von Dystroglycan im sich entwickelnden ZNS zu untersuchen.

3.3 Auswirkungen der Fab-Fragmentinjektionen auf die Entwicklung des embryonalen Hühnergewebes

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Antikörper DygABT1 die Interaktion zwischen α -Dystroglycan und β -Dystroglycan *in vitro* unterbindet, erfolgte die Störung dieser Interaktion *in vivo* in embryonalem Hühnergewebe. Für die *in vivo* Injektionen wurden Hühnerembryonen zwischen Entwicklungsstadium E4 bis E18 verwendet. Nachdem Injektionen im Abstand von 24 Stunden in das embryonale Tectum verabreicht wurden, wurde das Antikörper behandelte Hühnergewebe (24 Stunden nach der letzten Injektion) entnommen, Kryoschnitte hergestellt und lichtmikroskopisch untersucht.

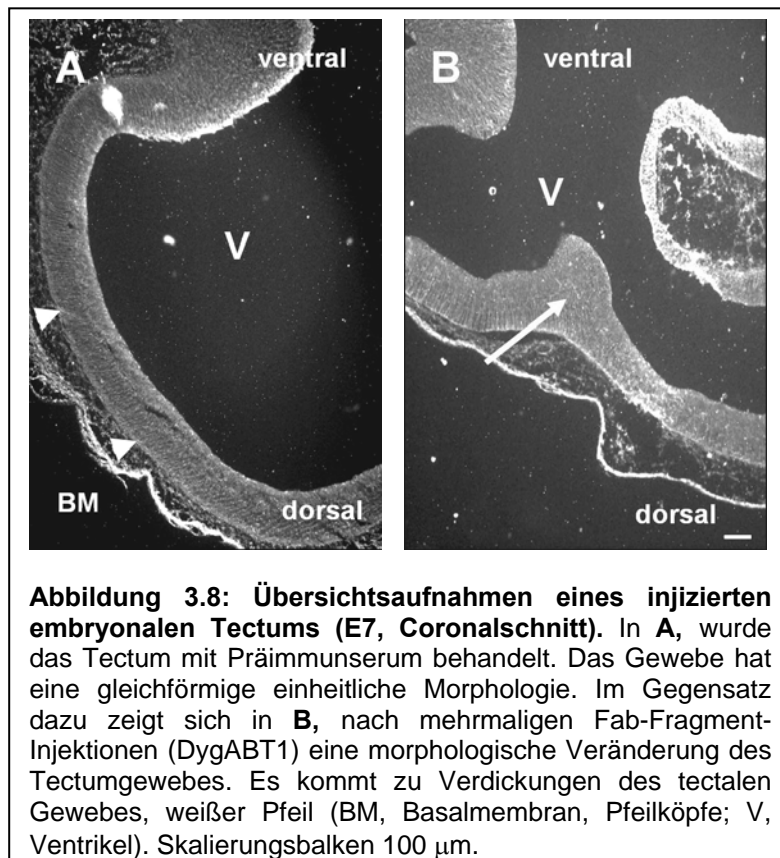
Eine einmalige Injektion in das embryonale Tectum (0,2 μ g Fab-Fragmente in 1 μ l PBS) zeigte keine sichtbare Veränderung der Gewebemorphologie. Jedoch konnte immunhistochemisch nachgewiesen werden, dass die Fab-Fragmente, oder Antikörper (DygABT1) durch den Glaskörper diffundierten und spezifisch Dystroglycan an der Kontaktstelle der radialen Vorläuferzellen und Basalmembran detektierten (Daten nicht gezeigt). In frühen Embryonalstadien ist der Dystrophin-assoziierte Glykoproteinkomplex (DAG) nur in diesem Bereich konzentriert (Blank et al., 2002). Deshalb wurde insbesondere dieser Bereich bei der weiteren Analyse beachtet.

Veränderungen des Gewebes in Form von kleineren und größeren Verdickungen konnten erst nach der zweiten (~ 1 μ g) und dritten (~ 1,9 μ g) Fab-oder

Ergebnisse

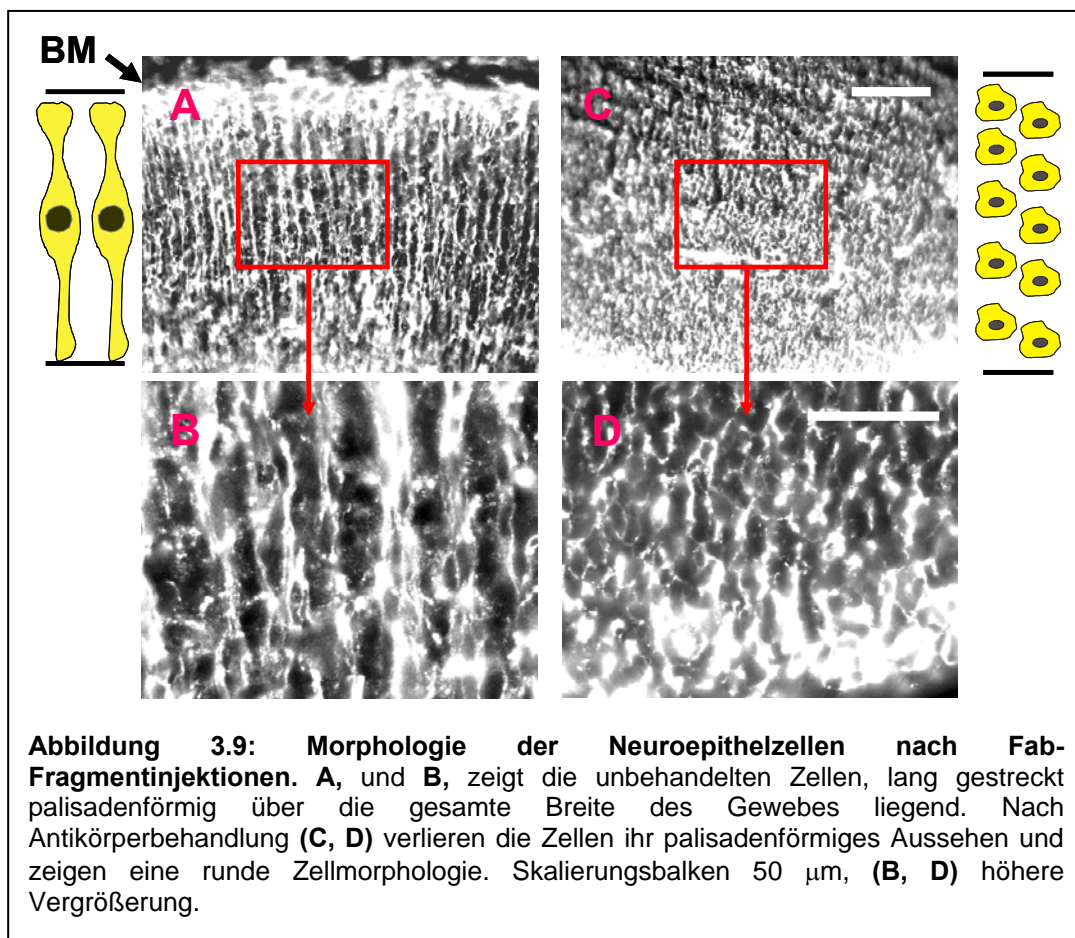
Antikörperinjektion (E4 - E6) lichtmikroskopisch beobachtet werden (Abbildung 3.8 B). PBS und Präimmunserum behandelte Präparate wiesen hingegen keine Verdickungen auf (siehe Abbildung 3.8 A). Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass eine einmalige Injektion nicht ausreicht, um eine sichtbare Veränderung des Gewebes zu induzieren. Erst mehrfache Injektionen mittels Fab-Fragmenten führen zu morphologischer Veränderung des Tectums.

Die gefundenen Fab-Fragment-induzierten Verdickungen im embryonalen Gewebe reichten weit in den ventrikulären Raum hinein und wurden ausschließlich dorsal, außerhalb des ventral liegenden Tegmentums, beobachtet. Die induzierten morphologischen Veränderungen des Gewebes konnten durch ihre dorsale Lokalisation klar von den ventral liegenden Verdickungen des Tegmentums unterschieden werden. Die Fab-Fragment-induzierten Verdickungen waren unterschiedlich groß, je nach Ausdehnung des Gewebes und Grad der zellulären Veränderung. Die unterschiedliche lokale Konzentration der Antikörper oder Fab-Fragmente könnte die Größenunterschiede der gefundenen Verdickungen erklären.



Ergebnisse

Um die Verdickungen zu untersuchen, wurde die Morphologie der Neuroepithelzellen innerhalb des Gewebes genauer analysiert, und mit der Morphologie der Neuroepithelzellen in nicht-betroffenen Bereichen verglichen. Dazu wurden Gewebepräparate mit anti-Vimentin-Antikörpern gefärbt. Vimentin ist ein Intermediärfilament, das entwicklungsabhängig in unterschiedlichen Geweben exprimiert wird und in den frühen Embryonalstadien als Marker für Neuroepithelzellen verwendet werden kann (Kamei, 1998; Blank et al., 2002). Die Neuroepithelzellen in nicht betroffenen Bereichen zeigen eine palisadenförmige radiale Zellmorphologie. Ihre Ausläufer erstreckten sich über die gesamte Breite des Gewebes, also von der Basalmembran (Pia), bis hin zum Ventrikel (siehe Abbildung 3.9 A, B). Nach Behandlung des Gewebes mit Fab-Fragmenten des Antiserums DygABT1 war die Zellmorphologie der Neuroepithelzellen innerhalb der Verdickungen zu abgerundeten Zellen ohne lange Ausläufer verändert (Abb. 3.9 C, D).



Ergebnisse

Um die Hypothese zu untersuchen, dass Dystroglycan nicht nur eine wichtige Rolle bei der ZNS-Entwicklung bei jüngeren, sondern auch bei älteren Embryonalstadien spielt, wurde ebenfalls die Funktion von Dystroglycan mittels Fab-Fragmentinjektionen in älteren Stadien (E12-E18) gestört.

Da das Tektum, bzw. das Gehirn, bei älteren Stadien eine außerordentliche Komplexität aufweist, wurde zur weiteren Analyse älterer Embryonalstadien das leicht zugängliche und einfach strukturierte Retinagewebe bevorzugt. Die Retina entsteht durch die Ausstülpung des Diencephalon während der Ontogenese und ist deshalb ein Teil des ZNS. Da alle retinalen Schichten und Zelltypen bekannt sind, war es bei älteren Embryonen einfacher, die Auswirkung der Injektionen auf das ZNS innerhalb der Retina zu untersuchen.

Tägliche PBS-, Präimmenserum-, Fab-Fragment- bzw. Antikörperinjektionen erfolgten in das rechte Auge von Embryonalstadien E12 bis E15 (erste Injektion 1,8 µg, zweite Injektion 2.6 µg, dritte und vierte Injektion jeweils 3,5 µg von Fab-Fragmenten oder Antikörper). Da im Embryonalstadium 18 alle retinalen Zelltypen differenziert sind, wurde die Retina erst in diesem Stadium entnommen. Somit konnte die Auswirkung der Injektionen auf die Differenzierung aller retinalen Zelltypen weiter analysiert werden. Die aus der E18-Retina hergestellten Kryoschnitte wurden lichtmikroskopisch und immunhistochemisch, mittels anti-Vimentin und anti-(PKC)-Proteinkinase C Antikörper, untersucht. Vimentin ist in diesem späten Stadium der Retinaentwicklung ein Marker für Müller-Gliazellen (Lemmon und Rieser, 1983; Seigel et al., 1996). Dagegen ist die PKZ ein Marker für Stäbchen-Bipolarzellen (Greferath et al., 1990; Blank et al., 1999a). Da die beiden in unserem Labor verwendeten Antikörper sehr gut in Hühnergewebe färben und die Zellmorphologie sehr gut dargestellt werden konnte, wurden die zwei retinalen Zelltypen, Müller-Glia- und Stäbchen-Bipolarzellen, zur weiteren morphologischen Analyse herangezogen.

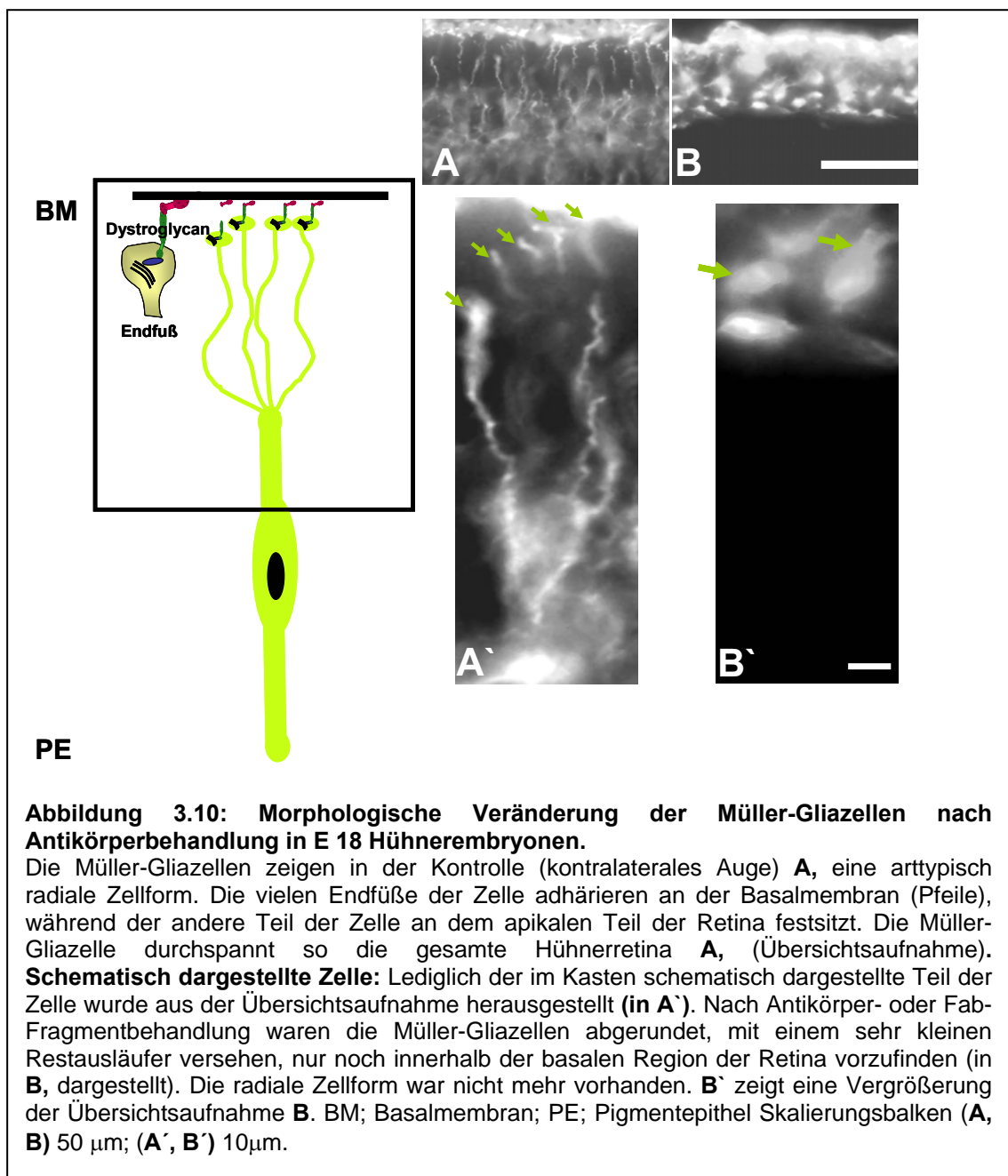
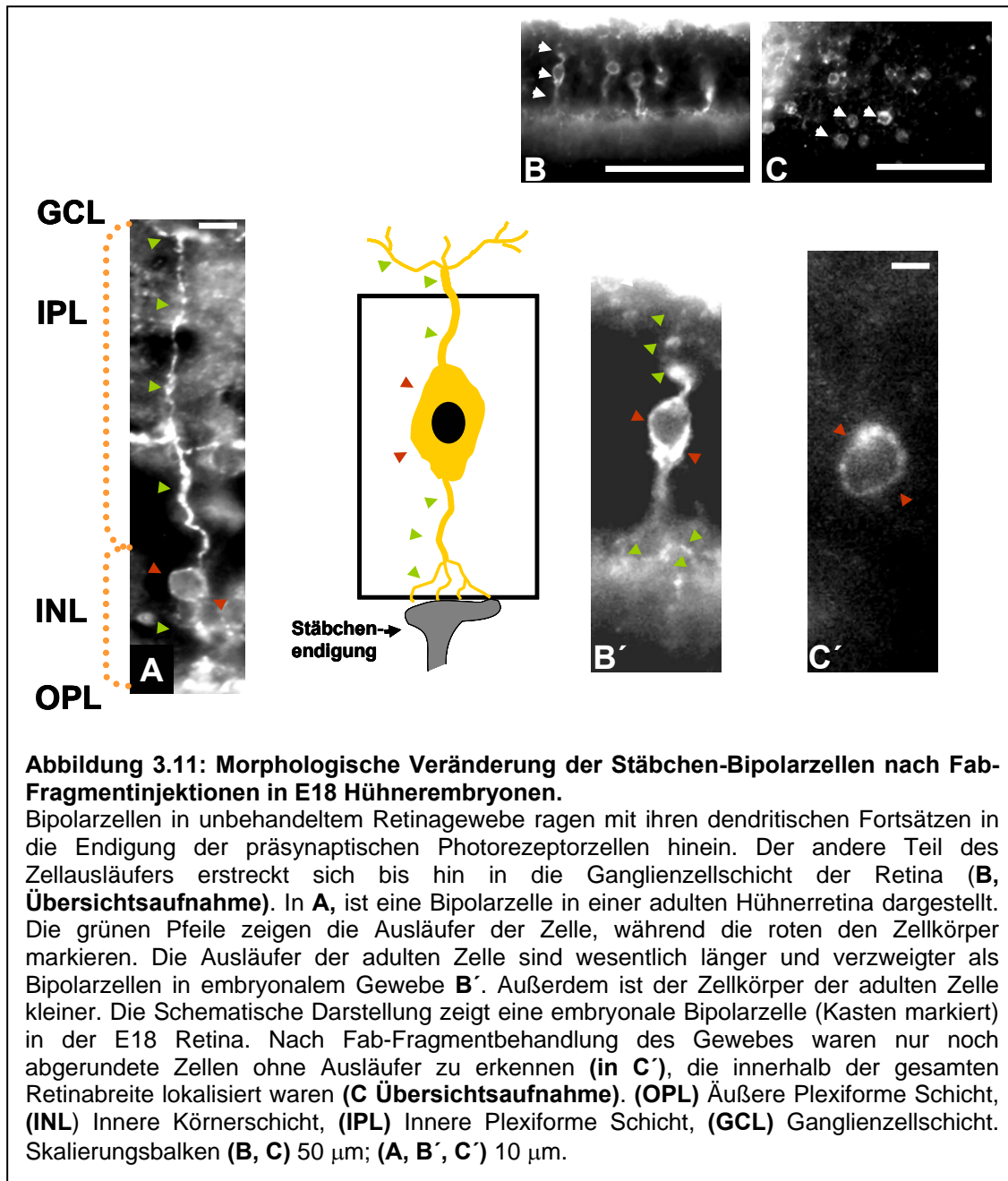


Abbildung 3.10: Morphologische Veränderung der Müller-Gliazellen nach Antikörperbehandlung in E 18 Hühnerembryonen.

Die Müller-Gliazellen zeigen in der Kontrolle (kontralaterales Auge) **A**, eine arttypisch radiale Zellform. Die vielen Endfüße der Zelle adhäreren an der Basalmembran (Pfeile), während der andere Teil der Zelle an dem apikalen Teil der Retina festsetzt. Die Müller-Gliazelle durchspannt so die gesamte Hühnerretina **A**, (Übersichtsaufnahme). **Schematisch dargestellte Zelle:** Lediglich der im Kasten schematisch dargestellte Teil der Zelle wurde aus der Übersichtsaufnahme herausgestellt (**in A'**). Nach Antikörper- oder Fab-Fragmentbehandlung waren die Müller-Gliazellen abgerundet, mit einem sehr kleinen Restausläufer versehen, nur noch innerhalb der basalen Region der Retina vorzufinden (**in B**, dargestellt). Die radiale Zellform war nicht mehr vorhanden. **B'** zeigt eine Vergrößerung der Übersichtsaufnahme **B**. BM; Basalmembran; PE; Pigmentepithel Skalierungsbalken (**A**, **B**) 50 μm ; (**A'**, **B'**) 10 μm .

Vor der Antikörperbehandlung, bzw. in den Kontrollen (Auge wurde injiziert mit PBS bzw. Präimmunserum), zeigten die Müller-Gliazellen ihre radiale Morphologie. Die Endfüße der Zellen adhärerten an der Basalmembran, während sich ihre apikalen Zellausläufer über die ganze Breite der Retina bis zur äußeren Körnerschicht erstreckten (Abb. 3.10 A). Nach der Behandlung mit Antikörpern oder Fab-Fragmenten verloren die Zellen in den Verdickungen ihre radiale Morphologie

(Abb. 3.10 B'). Immunhistochemisch waren nur noch die Zellkörper unterhalb der Basalmembran erkennbar (Abb. 3.10 B).



Auch Bipolarzellen zeigten nach den Injektionen morphologische Veränderung und eine ektopische Lokalisierung. Dieser retinale Zelltyp erstreckt sich mit seinen Fortsätzen von den präsynaptischen Endigungen der Photorezeptorzellen (Stäbchen und Zapfen) bis in die innere Plexiformschicht der Retina. Nach den Antikörper oder

Fab-Injektionen rundeten sich die Bipolarzellen ab und verloren ihre Fortsätze (Abb. 3.11 C, C').

Stäbchen-Bipolarzellen in adultem Gewebe besitzen lange und verzweigte Ausläufer, mit denen sie Kontakt zu anderen retinalen Zelltypen herstellen (Abb. 3.11 A). Hingegen haben Stäbchen-Bipolarzellen in embryonalen Geweben relativ kleine, unverzweigte Fortsätze (Abb. 3.11 B'). Außerdem ist der Zellkörper einer adulten Bipolarzelle auffällig kleiner als der einer embryonalen.

Zusammenfassend zeigen die vorangegangenen Experimente, dass Fab-Fragmentinjektionen morphologische Veränderungen von Neuroepithelzellen im ZNS in jüngeren, sowie auch bei älteren Embryonalstadien induzieren.

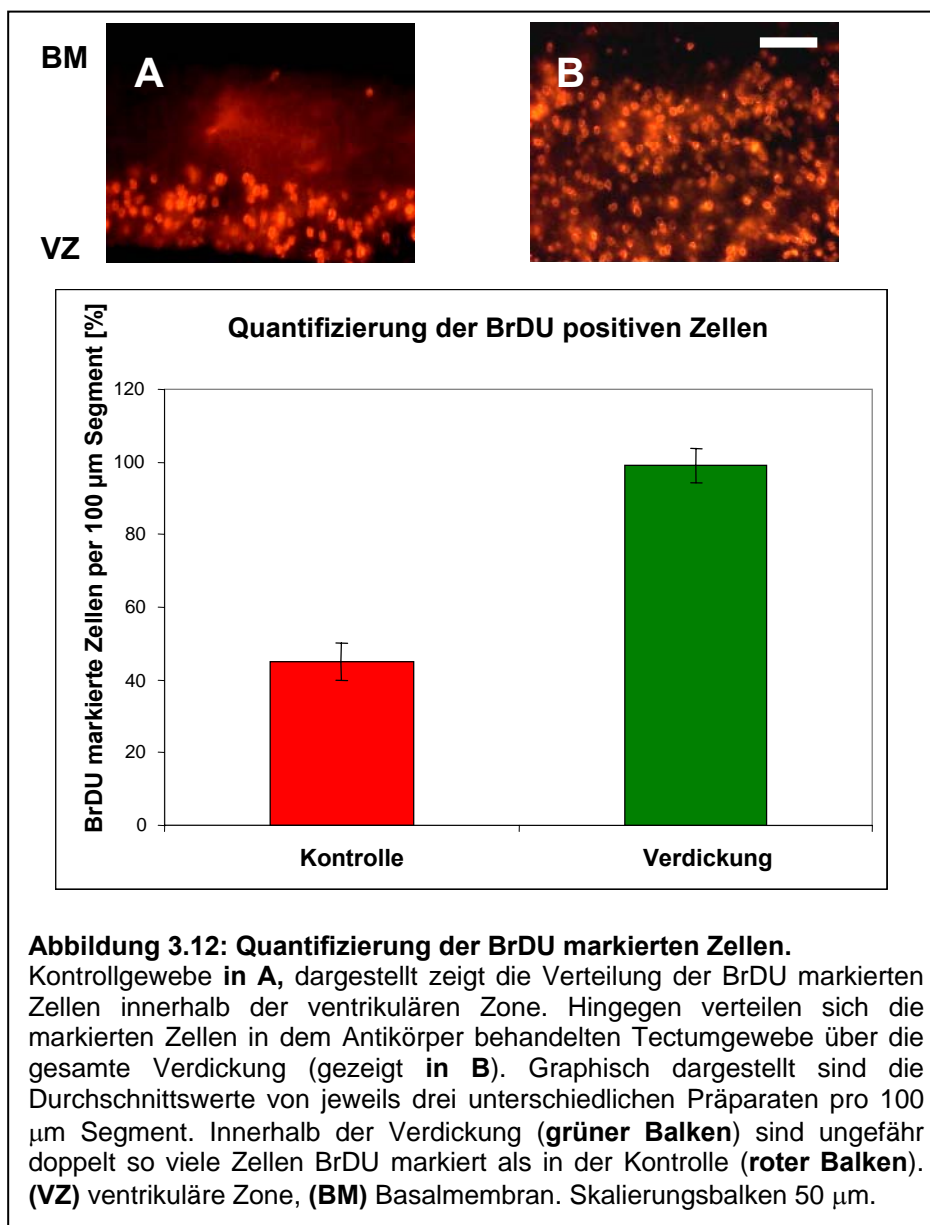
3.4 Analyse der proliferierenden und postmitotischen Zellen

Da das Neuroepithel des Tectums nach der Antikörperbehandlung morphologische Veränderung in Form von Verdickungen zeigte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass in diesen Bereichen der Retina oder des Tectums mehr Zellen durch eine erhöhte Proliferationsrate entstanden sind. Um diese Hypothese zu untersuchen und um zu analysieren, ob Fab-Fragmentinjektionen den Zellzyklus von Neuroepithelzellen beeinflussen, wurde das Gewebe mit Brom Desoxyuridin (BrdU) behandelt. BrdU ist ein Nukleotidanalogen, das während der S-Phase der Replikation in die DNA der Zellen eingebaut wird. Das stabil in die DNA inkorporierte BrdU kann dann mit Hilfe von anti-BrdU Antikörpern als Kernfärbung nachgewiesen werden. Nur die Zellkerne werden gefärbt, die im Inkubationszeitraum BrdU in ihre DNA eingebaut haben. Je schneller der Zellzyklus, desto mehr BrdU markierte Zellen entstehen innerhalb eines bestimmten Zeitraumes und sollten sich nach Fixierung anfärben lassen. Außerdem können anhand der BrdU Färbung proliferierende Zellen lokalisiert werden. Bei den von mir durchgeführten Experimenten wurde das BrdU in einem 3 Stunden langen Puls, mit einer Konzentration von 10 mg/ml appliziert. In den mit PBS behandelten Kontrollschnitten waren die proliferierenden Zellen hauptsächlich in der ventrikulären Zone des Tectums lokalisiert (siehe Abb. 3.12 A).

Ergebnisse

Hingegen waren die BrdU markierten Zellen nach Antikörper-oder Fab-Fragment Injektionen, innerhalb der Verdickungen, über die gesamte Breite des Tectums verteilt (Abb. 3.12 B). Die Zellkerne waren nicht pyknotisch und zeigten auch keine Anzeichen fragmentierter DNA, wie sie beim programmierten Zelltod (Apoptose) beobachtet werden. Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass die Injektion von Fab-Fragmenten oder Antikörpern Apoptose auslöst.

Die Quantifizierung der BrdU markierten Zellkerne wurde, wie im Material und Methodenteil (siehe 2.2.4.4) beschrieben, durchgeführt. Innerhalb der Verdickungen wurde nahezu die doppelte Anzahl von BrdU markierten Zellen vorgefunden, verglichen mit den Bereichen außerhalb der Verdickungen, oder innerhalb von Kontrollgewebe (siehe Graphik 3.12).

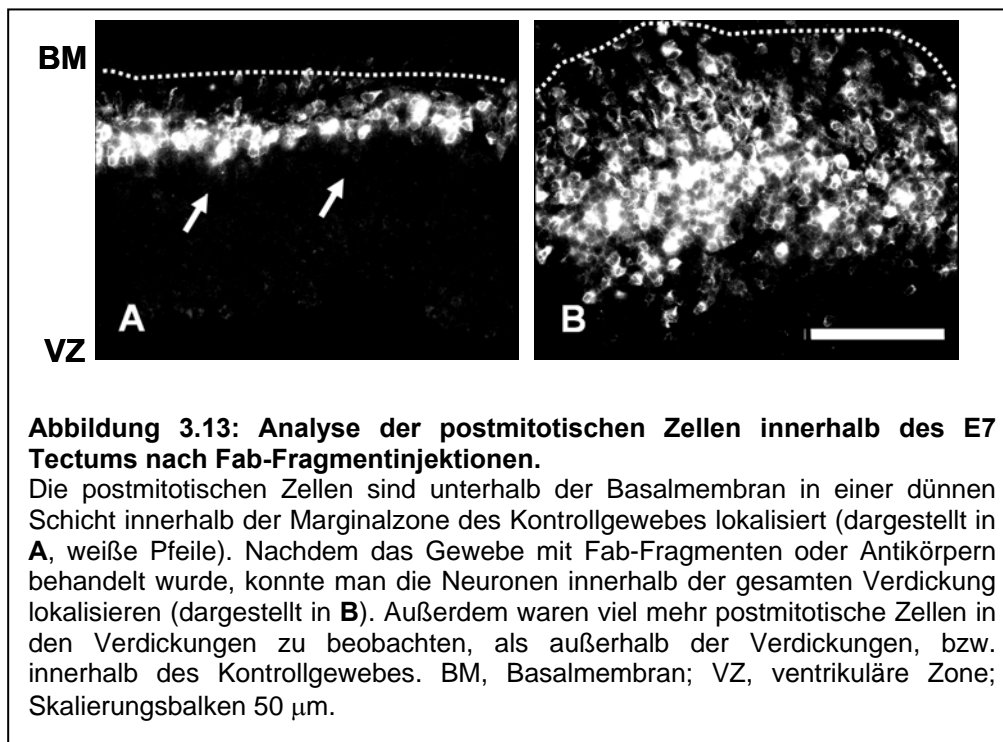


Ergebnisse

Dieses Experiment zeigt, dass es durch die Injektionen der anti-Dystroglycan Antikörper zu einer Hyperproliferation kommt. Die Verdickung des Neuroepitheliums ist also, mit hoher Wahrscheinlichkeit, auf eine erhöhte Zellzahl zurückzuführen.

Da innerhalb der Verdickungen Hyperproliferation beobachtet wurde, war es nun interessant zu untersuchen, ob auch eine vermehrte Anzahl postmitotischer Neuronen lokalisierbar war. Außerdem sollte gleichzeitig die Verteilung der Neuronen innerhalb der Verdickungen analysiert werden, da postmitotische Neuronen radiale Zellen für die Wanderung in ihre Zellschicht als Leitstrukturen benötigen (Noctor et al., 2001; Götz und Huttner, 2005).

Um die postmitotischen Zellen, bzw. Neuronen, innerhalb der Verdickungen zu untersuchen, wurde nun Kontrollgewebe und Fab-Fragment behandeltes Gewebe mit anti-AChE-Antikörpern gefärbt. AChE ist in frühen Embryonalstadien des Huhnes ein Marker für alle postmitotischen Neuronen (Layer et al., 1988).



In den Kontrollpräparaten (Injektionen mit PBS- oder Präimmenserum) waren die Neuronen nur unterhalb der Basalmembran in der Mantelzone (-siehe Einleitung) zu lokalisieren. Im Gegensatz dazu waren nach Fab-Fragmentinjektionen die

postmitotischen Neuronen, innerhalb der Verdickung, über das gesamte Tectumgewebe erkennbar.

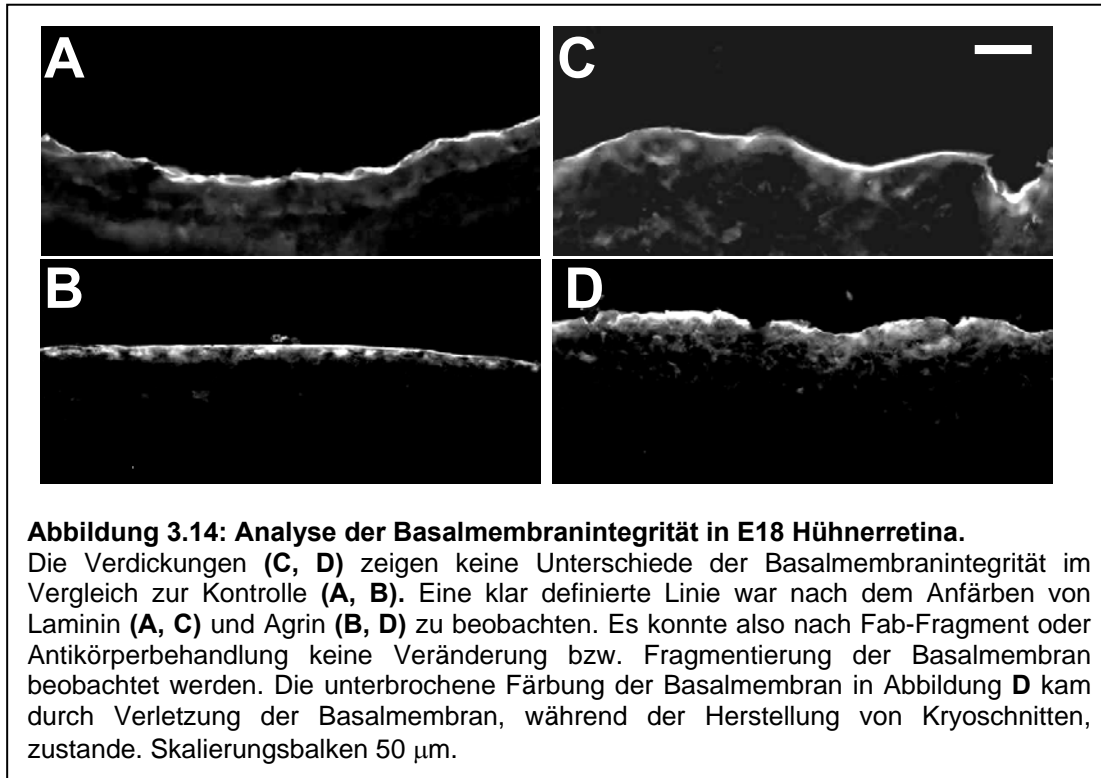
Zusammenfassend kann aus den geschilderten Experimenten geschlossen werden, dass nach Fab-Fragmentinjektionen nicht nur eine Erhöhung der Proliferation innerhalb der Verdickungen zu beobachten war, sondern auch erheblich mehr postmitotische Neuronen. Dies deutet auf einen Einfluss von Dystroglycan nicht nur auf den Zellzyklus, auf das Proliferations- und Migrationsverhalten der Neuroepithelzellen, sondern auch auf deren Differenzierung hin.

3.5 Untersuchung der Basalmembranintegrität

Frühere Analysen zeigten, dass Dystroglycan einen maßgeblichen Einfluss auf die Basalmembranbiosynthese ausübt. So resultierte die Deletion des Dystroglycan-Gens durch somatische Rekombination, ausgelöst durch Störung der normalen Ausbildung der Reichert's Membran, einer der ersten Basalmembranen, die während der Embryonalentwicklung gebildet wird, in pränatalem Tod des Mausembryos (Williamson et al., 1997). Immunhistochemische und histologische Analysen dieser Mausmutanten Embryos (Dyg^{-/-}) zeigten, dass Dystroglycan notwendig für die Anordnung und Organisation von Proteinen der extrazellulären Matrix zu einer Basalmembran ist (Henry und Campbell, 1998). So besteht die Grundstruktur der Basalmembran hauptsächlich aus einem Kollagennetzwerk (Kollagen IV und XVIII) und den Matrixproteinen Laminin, Nidogen und Agrin. Untersuchungen zeigten, dass Veränderungen in der Verteilung, oder Konzentration der extrazellulären Matrixproteine Laminin, Nidogen, Perlecan und Dystroglycan zu Störungen der Basalmembranbiosynthese führen. So kommt es zu einer Fragmentierung der Basalmembran (Costell et al., 1999; Halfter et al., 2002; Yurchenco et al., 2004).

Um auszuschließen, dass die Injektion von Fab-Fragmenten zu einer fragmentierten oder zerstörten Basalmembran führt, wurde die Integrität der Basalmembran in E7 Tectum (Daten nicht gezeigt) und E18 Retinae

(siehe Abbildung 3.14 A, B, C, D) immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Agrin und Laminin untersucht (Halfter et al., 1987; Kröger und Mann, 1996).

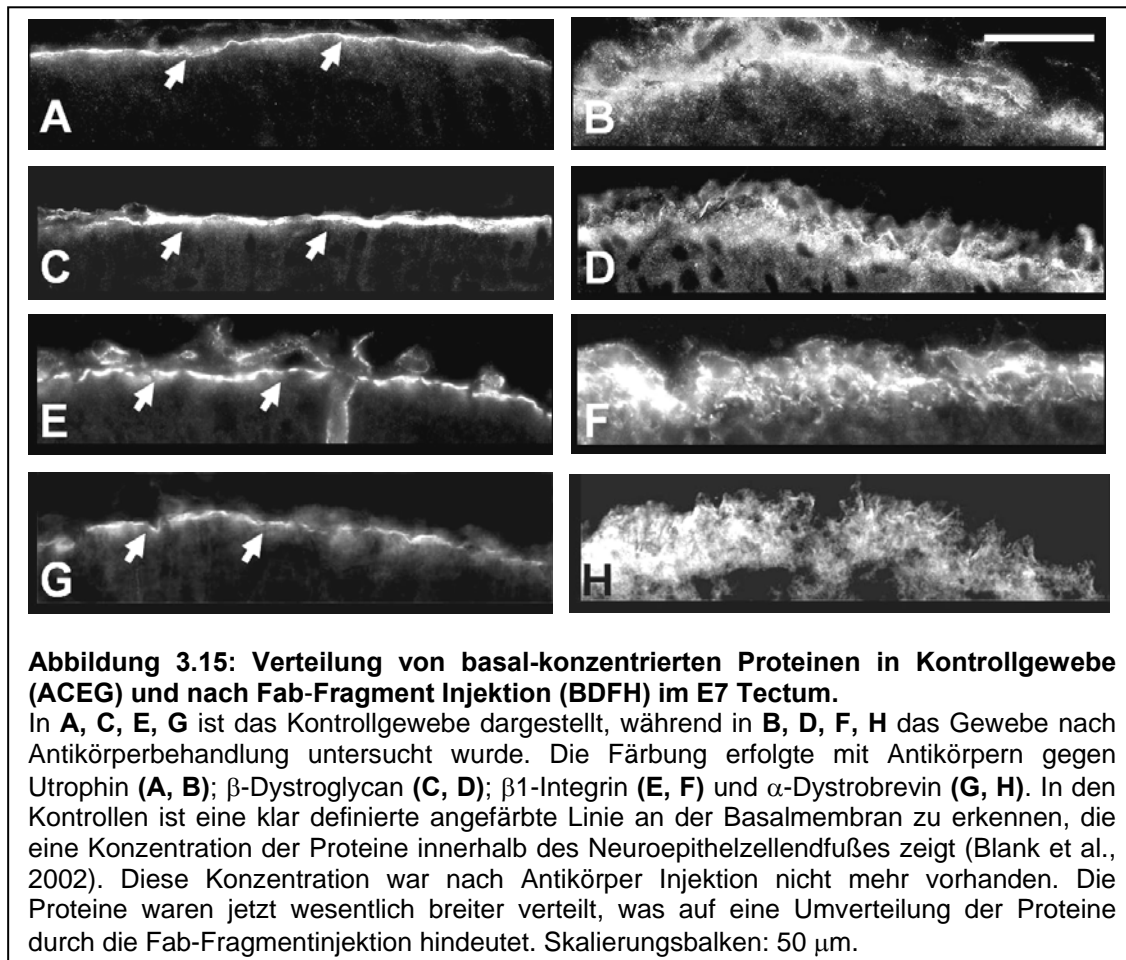


Es konnten im injizierten Tectum- und Retinagewebe keine fragmentierten oder zerstörten Bereiche anhand der Färbungen beobachtet werden. Stattdessen war die Basalmembranfärbung durchgängig ohne Unterbrechungen (Abb. 3.14 C, D). Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass die in meiner Arbeit untersuchten morphologischen Veränderungen des Gewebes nicht auf einen gestörten Zusammenbau der Basalmembran zurückzuführen sein können.

3.6 Analyse der apikalen und basalen Polarität von Neuroepithelzellen

Die Ausbildung einer Zellpolarität spielt bei vielen entwicklungsbiologischen Prozessen eine zentrale Rolle. Sie beruht im einfachsten Fall auf einer ungleichen Verteilung zytoplasmatischer oder membranständiger Komponenten in den Zellen. Häufig bildet die Polarität einer Zelle die Grundlage für gerichtete Sekretion,

Signalübertragung, oder lokales Zellwachstum. Oft ist Zellpolarität die Voraussetzung für eine Zellteilung und die daraus resultierenden unterschiedlichen Zellschicksale. Neuroepithelzellen sind, wie alle Epithelzellen, polar. Sie besitzen eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung an ihrer basalen und an ihrer apikalen Seite.



Da in einigen Studien gezeigt werden konnte, dass Dystroglycan die Polarität von Epithelzellen (Brust-, Lungen-, Speicheldrüsenepithel, sowie die Polarität von Follikelzellen und Oozyten) beeinflussen kann (Durbeej et al., 2001; Muschler et al., 2002; Deng et al., 2003), stellte sich die Frage, ob die Injektion der Antikörper auch die Polarität von Neuroepithelzellen beeinflusst. Um dies zu untersuchen, wurde zuerst die Verteilung basal liegender Proteine wie β -Dystroglycan, β 1-Integrin, α -Dystrobrevin und Utrophin, immunhistochemisch untersucht. An E7 Hühnerembryonen sind diese Proteine innerhalb der Endfüße der Neuroepithelzellen

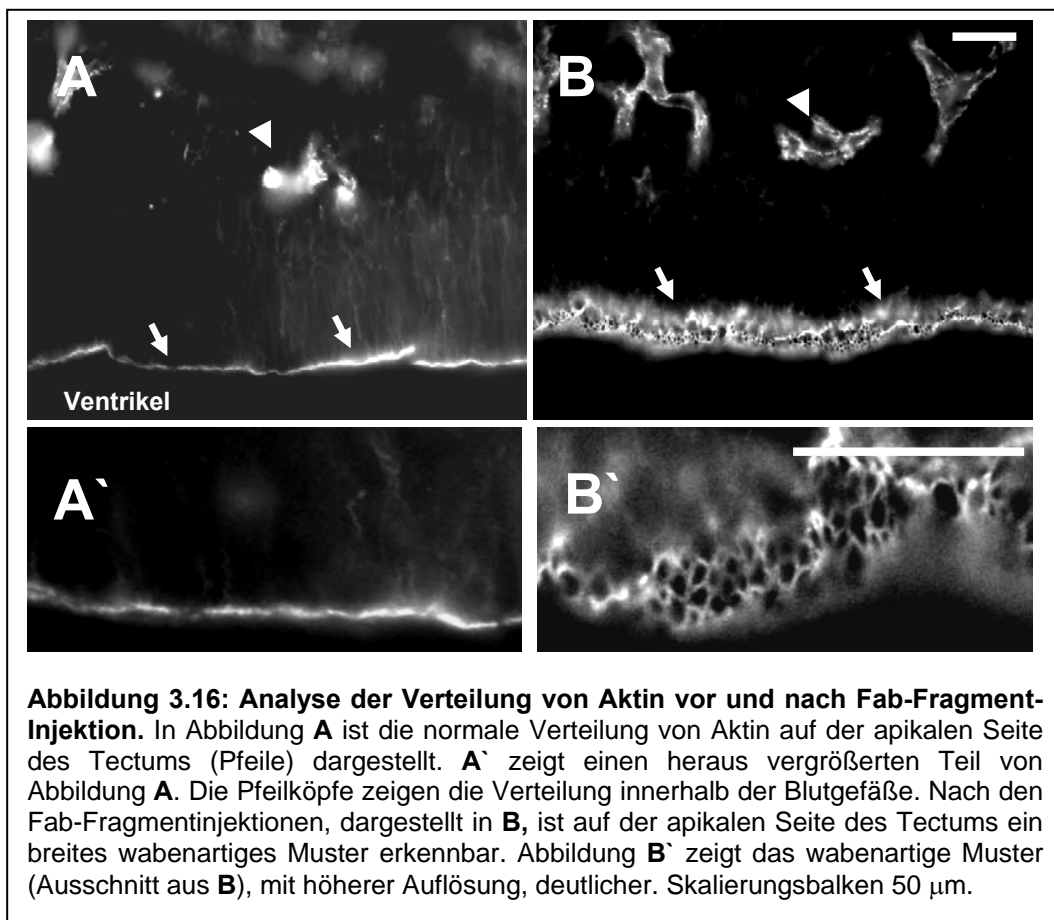
Ergebnisse

an der Kontaktstelle zur Basalmembran konzentriert (Abbildung 3.15 A, C, E, G) (Blank et al., 1997; Zaccaria et al., 2001). Nach Antikörperbehandlung konnte nur noch ein diffuser breiter Streifen unterhalb der Basalmembran angefärbt werden. Die Konzentration der Proteine an der basalen Seite der Neuroepithelzellen war nicht mehr zu erkennen (Abbildung 3.15 B, D, F, H). Dies deutete auf eine Umverteilung der Proteine und auf eine Beeinflussung der basalen Polarität durch Dystroglycan hin.

Um zu analysieren, ob auch die Verteilung apikal konzentrierter Proteine durch Fab-Fragmentinjektionen beeinflusst wird, wurde E7 Tectumgewebe mit Fluoreszenz-markiertem Phalloidin angefärbt. Phalloidin bindet an F-Aktin, welches in besonders hoher Konzentration im apikalen Bereich des Gewebes zu finden ist. F-Aktin bindet einerseits an das intrazelluläre periphere Membranprotein Zonula occludens (ZO1) (Drenckhahn und Dermietzel, 1988), welches wiederum an die transmembranen Proteine Claudin und Occludin bindet (Furuse et al., 1994). Zonula occludens (ZO1) Protein ist somit ein Bestandteil von „*tight junctions*“ (Fanning et al., 1998). Andererseits bindet F-Aktin an einige intrazelluläre Proteine, wie Catenine (α und β), Vinculin und α -Aktinin, die wiederum an die transmembranen Cadherine binden. Diese Adhäsionsproteine bilden zusammen mit den intrazellulären Ankerproteinen die so genannten „*adherence junctions*“ (Kobielak, 2004). Diese Adhäsionsstrukturen sind auf der apikalen Seite und innerhalb der Endothelzellen der Blutgefäße, des Mesencephalons, lokalisiert (Aaku-Saraste et al., 1996; Nico et al., 1999).

Im Kontrollgewebe (injiziert mit PBS- und Präimmenserum) war Aktin größtenteils auf der ventrikulären Seite des Mesencephalons zu finden (Abbildung 3.16 A, A'). Auch um die Blutgefäße herum war Aktin konzentriert. Die Verteilung von Aktin an den Blutgefäßen war nach Fab-Fragmentinjektionen unverändert (Abb. 3.16 A, B). Hingegen konnte man nach den Injektionen, an der ventrikulären Seite, eine veränderte Verteilung von F-Aktin in Form einer wabenartigen Struktur beobachten (Abb. 3.16 B, B'). Dieses wabenartige Muster könnte man auch beobachten, wenn man das Gewebe horizontal schneiden würde. Dann wäre Aktin um den apikal

liegenden und horizontal geschnittenen Fortsatz der Neuroepithelzelle verteilt. Außerdem könnten Einfaltungen des Gewebes ebenfalls diese Struktur hervorbringen. Jedoch wurde in meiner Arbeit bei der Präparation und Herstellung der Kryoschnitte darauf geachtet, dass das Gewebe nicht eingefaltet war. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der vorgefundenen Struktur um ein Schnitt-Artefakt handeln könnte.



Da die Verteilung von F-Aktin auf der apikalen Seite der Neuroepithelzellen Veränderungen zeigte, wurde untersucht, ob auch die Adhäsionskomplexe Veränderungen der Verteilung aufwiesen. Außerdem sollte analysiert werden, ob die Veränderungen des Neuroepithels im Tectum, und in der Retina, auf eine veränderte Verteilung von Adhäsionsstrukturen zurückzuführen sind.

Da „*tight junctions*“ eine natürliche Barriere zwischen apikaler und basaler Membrandomäne der Neuroepithelzellen darstellen, die nur den Transfer bestimmter

Proteine und Moleküle gewährleisten, geben sie ebenfalls Auskunft über deren Polarität (Fleming et al., 2000; Tsukita, 2001; Furuse et al., 2002). Andere Adhäsionsstrukturen, wie die „*adherence junctions*“, sind für die Formierung von Zell-Zell Kontakten zu Geweben essentiell. Sie erhalten und stabilisieren den Gewebeverband und gewährleisten die Etablierung der Polarität von Epithelzellen (Jamora, 2002). Einige Studien zeigten, dass Störungen der Funktion von N-Cadherin (z.B. mittels Fab-Fragmentinjektionen), zu morphologischen Veränderungen und veränderten Schichten des Tectumgewebes führen (Radice et al., 1997; Gänzler-Odenthal und Redies, 1998). Die Adhäsionsstrukturen sind auf der apikalen Seite lokalisiert und bilden einen Adhäsionsgürtel um die Neuroepithelzellen herum. Die apikalen Fortsätze der Zellen sind über diesen Adhäsionsgürtel miteinander verbunden.

Es wurde E7 Tectumgewebe mit Antikörpern gegen N-Cadherin und gegen das Zonula occludens (ZO1) Protein gefärbt. Kontrollgewebe zeigte, wie bereits bei Aaku Saraste et al. (1996) im Mesencephalon beschrieben, die Konzentration von N-Cadherin und Zonula occludens Protein 1 (ZO1) auf der ventrikulären Seite des Neuroepithels am apikalen Ende der Neuroepithelzellmembran (Abb.3.17 A, C).

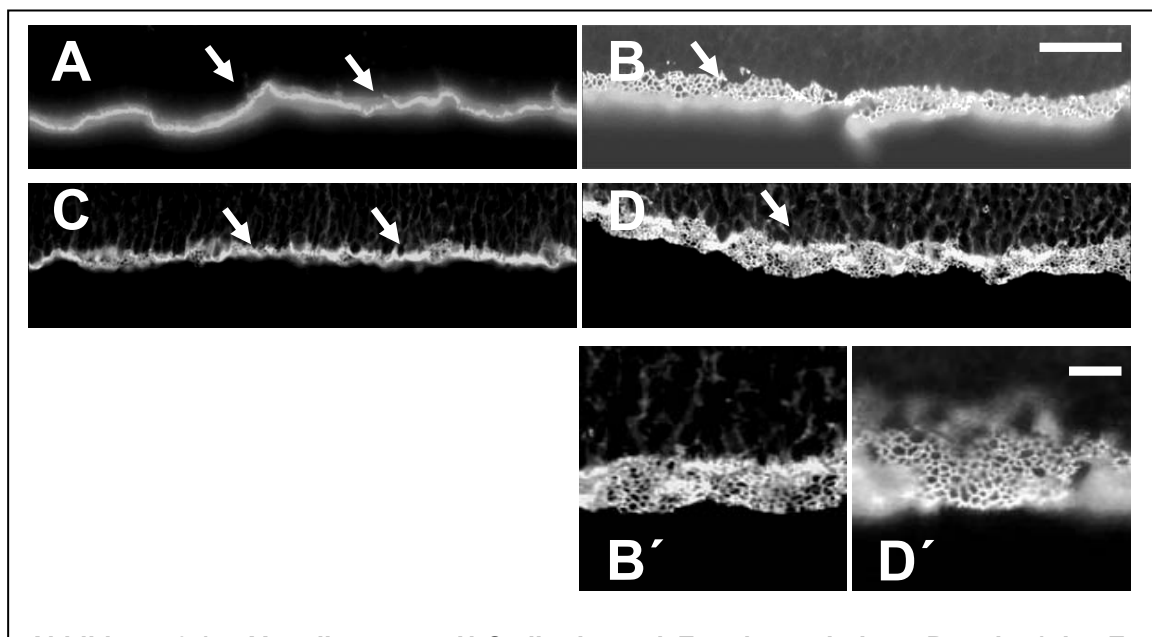


Abbildung 3.17: Verteilung von N-Cadherin und Zonula occludens Protein 1 im E7 Mesencephalon. Die Abbildungen zeigen immunhistochemische Färbungen mit Antikörper gegen ZO1 (A, B, B') und N-Cadherin (C, D, D'). Im Kontrollgewebe (A, C) war eine dünne angefärbte Linie (Pfeile) im apikalen Teil des Tectums erkennbar. Nach Fab-Fragment-Injektionen (B, D) konnte man apikal eine dicke, wabenartige Struktur beobachten. Abbildungen B' und D' zeigen die wabenartige Färbung deutlicher (heraus vergrößert von B und D). Skalierungsbalken 50 μm (A, B, C, D); 10 μm B' und D'.

Ergebnisse

Nach Fab-Fragmentinjektionen wiesen die Adhäsionskomplexe immer noch eine apikale Verteilung auf, nahmen jedoch einen größeren Bereich ein (Abb. 3.17 B, D, B', D'). Dieser Bereich war in seiner Ausbreitung den wabenartigen Strukturen der Aktin Verteilung sehr ähnlich (Abb. 3.16 B, B').

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass Dystroglycan einen Einfluss unterschiedlichen Ausmaßes auf die basale und apikale Polarität der Neuroepithelzellen ausübt. Nach den Fab-Fragmentinjektionen veränderte sich die Verteilung der untersuchten Proteine auf der basalen Seite. Hingegen blieb die Protein-Verteilung auf der apikalen bzw. ventrikulären Seite gleich. Stattdessen waren die Proteine, verglichen mit dem Kontrollgewebe, in einem größeren Bereich verteilt.

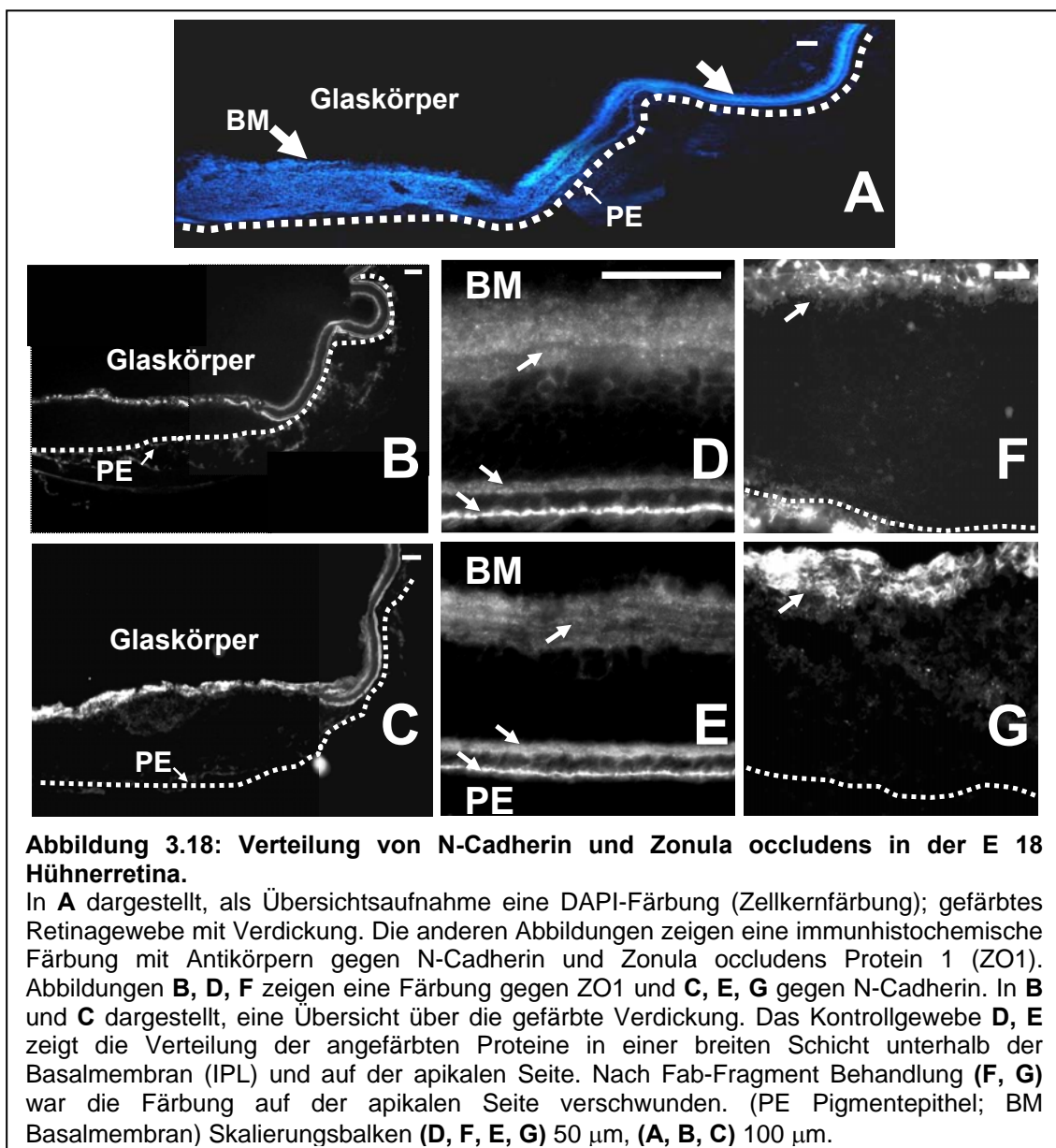
Um zu untersuchen, ob Dystroglycan einen Einfluss auf die Verteilung der Adhäsionskomplexe in älteren Embryonalstadien hat, wurde (E 18) Hühnergewebe mit Antikörpern gegen N-Cadherin und Zonula occludens Protein 1 gefärbt. Hühnerembryonen (E 12) wurden täglich (bis E 15) Fab-Fragmente in das rechte Auge injiziert. Drei Tage nach der letzten Injektion (E18) konnte die Retina entnommen und Kryoschnitte hergestellt werden.

Wie bei Aaku-Saraste et al. (1996) beschrieben, wird die Expression von Occludin (Marker für „*tight junctions*“) nach der Neurulation (Einstülpung der Neuralplatte zum Neuralrohr) herunterreguliert. Im Gegensatz dazu wird ZO1 Protein verstärkt weiter exprimiert (Aaku-Saraste et al., 1996). In nicht epithelialen Zellen (z.B. Hepatocyten) und in epithelialen Zellen, in denen „*tight junctions*“ nicht so gut entwickelt sind, bindet Zonula Occludens Protein 1 auch an Cadherine, einen Marker für „*adherence junctions*“. ZO1 ist also auch in „*adherence junctions*“ lokalisierbar (Itoh et al., 1993). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei den untersuchten Adhäsionskomplexen im Embryonalstadium 18 mit großer Wahrscheinlichkeit um „*adherence junctions*“ handelt.

Im Kontrollgewebe (injiziert mit PBS und Präimmenserum) konnte die Verteilung der Adhäsionsproteine auf der apikalen Seite, aber auch in einer breiten

Ergebnisse

Schicht unterhalb der Basalmembran (in der Inneren Plexiformen Schicht; IPL) nachgewiesen werden (Abb. 3.18. D, E) (Williams und Rizzolo, 1997; Wöhrn et al., 1998; Redies, 2000). Nach Fab-Fragmentinjektionen konnte man jedoch nur noch die Adhäsionsstrukturen in einem breiten Streifen unterhalb der Basalmembran nachweisen. Die Immunreaktivität, gerichtet gegen ZO1 und N-Cadherin, war in diesem Bereich verstärkt nachweisbar. Hingegen waren die apikalen Adhäsionskomplexe („*adherence junctions*“) nicht mehr detektierbar (Abb. 3.18. F, G).



Nach Fab-Fragmentinjektionen wiesen die Müller-Gliazellen eine abgerundete Zellmorphologie auf, verloren ihren apikalen Fortsatz und ihre Endfüße (siehe 3.3 Abbildung 3.10 B`). Außerdem waren die Zellen nur noch auf der basalen Seite, also in einem breiten Streifen unterhalb der Basalmembran, nachweisbar (siehe Abbildung 3.10 B). Es wäre also auch denkbar, dass andere retinale Zelltypen ebenfalls eine veränderte Morphologie aufwiesen und sich vermehrt auf der basalen Seite der Retina anlagerten, so dass dort vermehrt Adhäsionskomplexe akkumuliert wurden. Das könnte die beobachtete vermehrte Immunreaktivität (gegen das ZO1 Protein und N-Cadherin) unterhalb der Basalmembran erklären (siehe Abbildung 3.18 F, G). Hingegen weist der Immunreaktivitätsverlust der apikalen Seite auf einen möglichen Verlust apikal konzentrierter Proteine, bzw. Adhäsionsstrukturen, hin.

Zusammenfassend konnte in meiner Arbeit gezeigt werden, dass Fab-Fragmentinjektionen gegen Dystroglycan einen Einfluss auf die Verteilung basolateraler Proteine und apikal konzentrierter Proteine in frühen Embryonalstadien induzieren. Hingegen bewirken die Injektionen in älteren Stadien möglicherweise den Verlust von apikal konzentrierten Proteinen. Jedoch müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um dieses Ergebnis zu stützen.

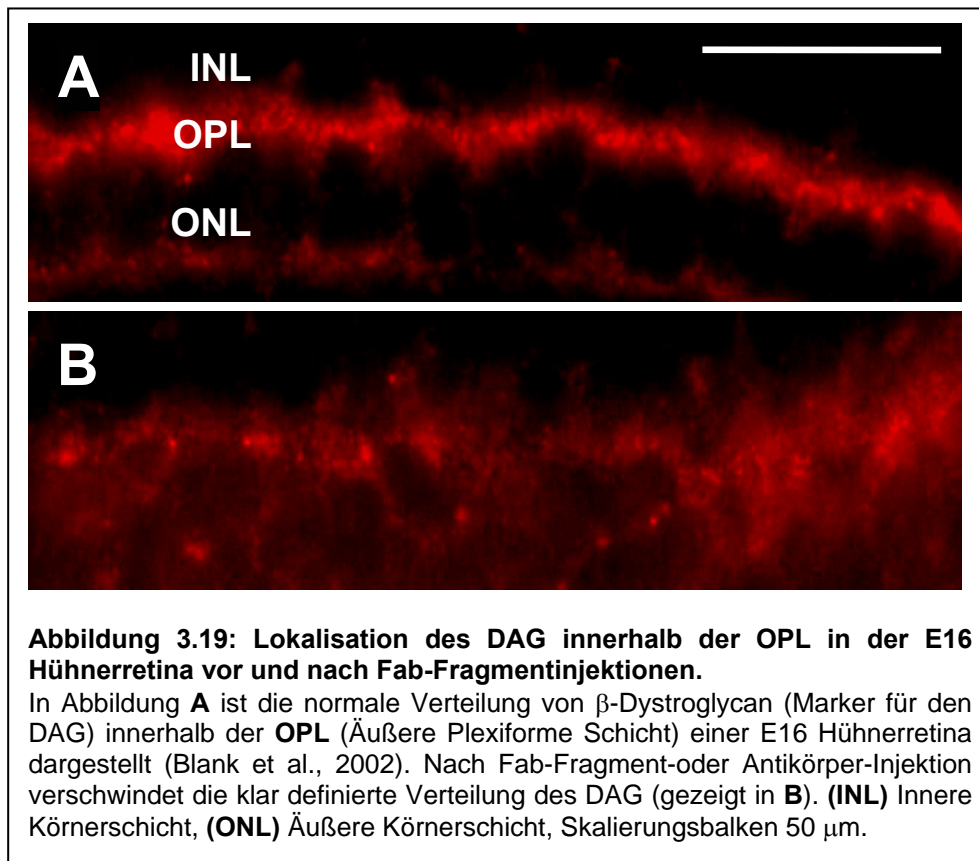
3.7 Untersuchung der OPL (Äußere Plexiforme Schicht) in der Hühnerretina älterer Embryonalstadien

In älteren Entwicklungsstadien ist Dystroglycan und somit der DAG, innerhalb der Retina, nicht nur in den Endfüßen von Müller-Gliazellen sondern auch in den Endigungen der Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) und der OPL (Äußere Plexiforme Schicht) konzentriert (Blank et al., 1999a; Blank et al., 2002; Jastrow et al., 2006). Somit war es interessant zu untersuchen, ob Fab-Fragmentinjektionen auch Auswirkungen auf die strukturelle Organisation der OPL haben. Studien haben gezeigt, dass Large^{vis} und Large^{myd} Mäuse die Mutationen in Form einer Deletion in ihrem Large-Gen (kodiert eine Glykosyltransferase) aufweisen und somit Modelle für kongenitale Muskeldystrophie Typ 1D darstellen, auch einen Augenphänotyp

Ergebnisse

besitzen. Dieser Phänotyp äußert sich unter anderem auch durch Desorganisation der OPL (Lee et al., 2005). Durch Mutation des Large-Gens weist α -Dystroglycan eine veränderte Glykosylierung auf, so dass es nicht mehr seine Liganden Agrin und Laminin binden kann (Esapa et al., 2002; Kanagawa et al., 2004). Dadurch wird die molekulare Brücke zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett unterbrochen. Fab-Fragmentinjektionen stören ebenfalls extrazellulär diese Verbindung und könnten möglicherweise einen ähnlichen Einfluss auf den Augenphänotyp aufweisen.

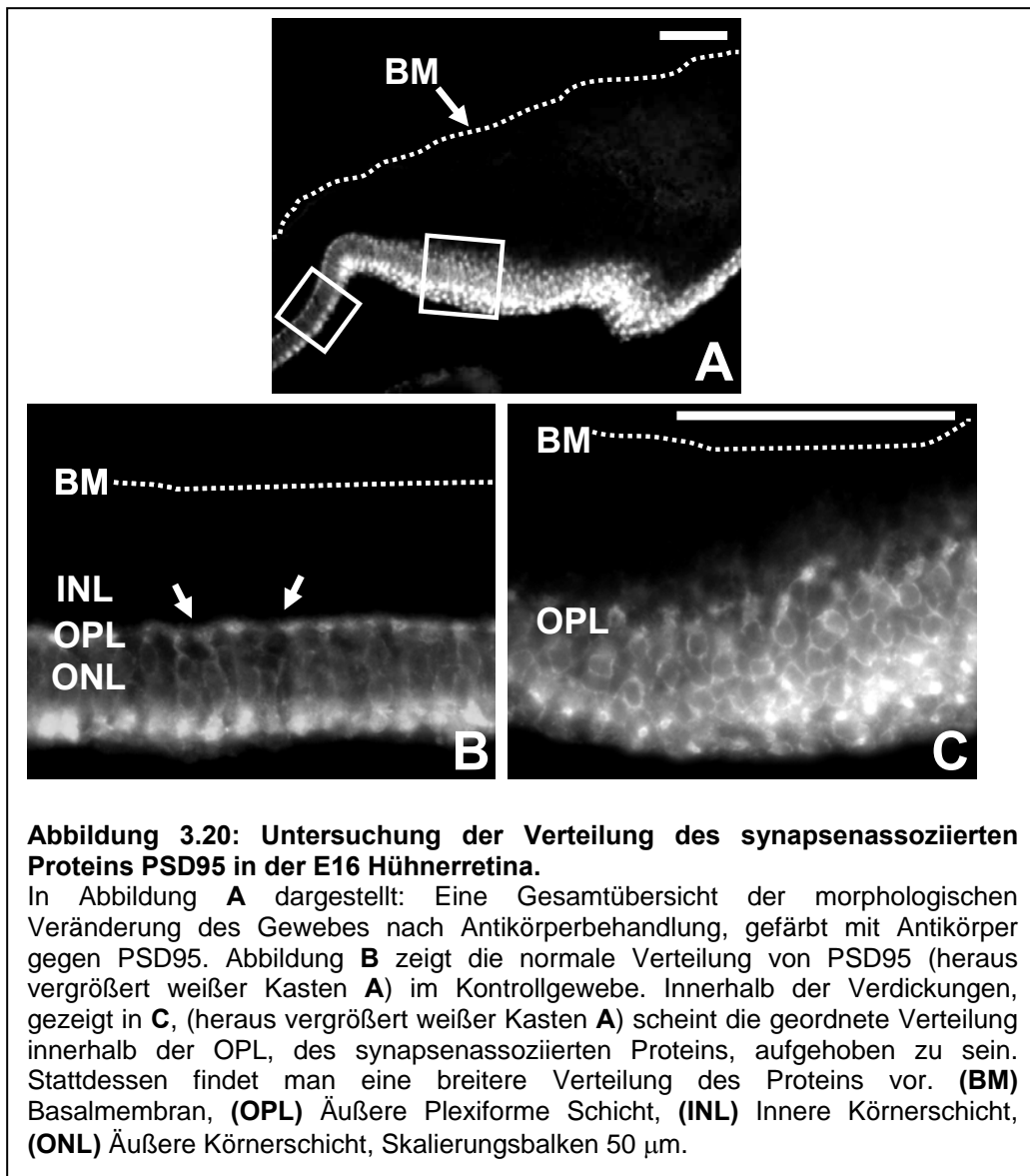
Es wurden Hühnerembryonen Tag 12, in jeweils 24 Stunden Abständen, drei Tage hintereinander mit Fab-Fragmenten bzw. Antikörpern behandelt. Etwa 24 Stunden nach der letzten Injektion wurde die Retina (E16) entnommen und immunhistochemisch untersucht. Um die Verteilung des DAG innerhalb der OPL zu untersuchen, wurde das E16 Hühnerretinagewebe mit dem monoklonalen Antikörper 43DAG/8D5, der spezifisch gegen β -Dystroglycan gerichtet ist, angefärbt (Bewick et al., 1993).



Im Kontrollgewebe (Retinae behandelt mit PBS und Präimmunserum) konnte man eine deutliche Immunreaktivität von β -Dystroglycan in der OPL erkennen (Blank et al., 1997; Blank et al., 2002). Auf Grund der beobachteten Färbemuster können Zapfen und Stäbchen in diesem embryonalen Stadium (E16) noch nicht unterschieden werden (Abbildung 3.19 A). Nach Fab-Fragmentinjektionen der Retina wies die Verteilung von Dystroglycan in den unbeeinflussten Bereichen das gleiche Färbemuster auf wie bei den Kontrollen. Innerhalb der Verdickung war die Dystroglycan Immunreaktivität jedoch nicht mehr alleine auf die OPL beschränkt. Es konnte auch eine schwache Immunreaktivität in der ONL beobachtet werden. Die Immunreaktivität schien jedoch insgesamt schwächer zu sein als bei der Kontrolle (Abbildung 3.19 B). Dies könnte auf eine breitere Verteilung des DAG, oder aber auf eine Reduktion des Proteins innerhalb der OPL hindeuten.

Als nächstes wurde die biochemische Zusammensetzung der Photorezeptorterminalien vor und nach Injektion analysiert. Dazu wurde E16 Hühnerretinagewebe mit Antikörpern gegen das synapsenassoziierte Protein PSD95 immunhistochemisch untersucht.

PSD95 ist ein peripheres Membranprotein aus der Familie der PDZ-Domänen-Proteine, welches im ZNS an der Verankerung von Glutamat-Rezeptoren NMDA-Typ an der Postsynapse beteiligt ist (Kornau et al., 1995). In der OPL ist es jedoch präsynaptisch mit den Terminalien der Stäbchen und Zapfen Photorezeptoren assoziiert (Koulou et al., 1998b). In frühen Embryonalstadien, also vor Ausbildung der Bändersynapsen in den Terminalien, liegt PSD95 breiter verteilt in der ONL und OPL vor. Jedoch in relativ alten embryonalen Stadien (E18 - E20), und in der adulten Hühnerretina, beschränkt sich die Verteilung des Proteins ausschließlich auf die OPL (Blank, 1999).

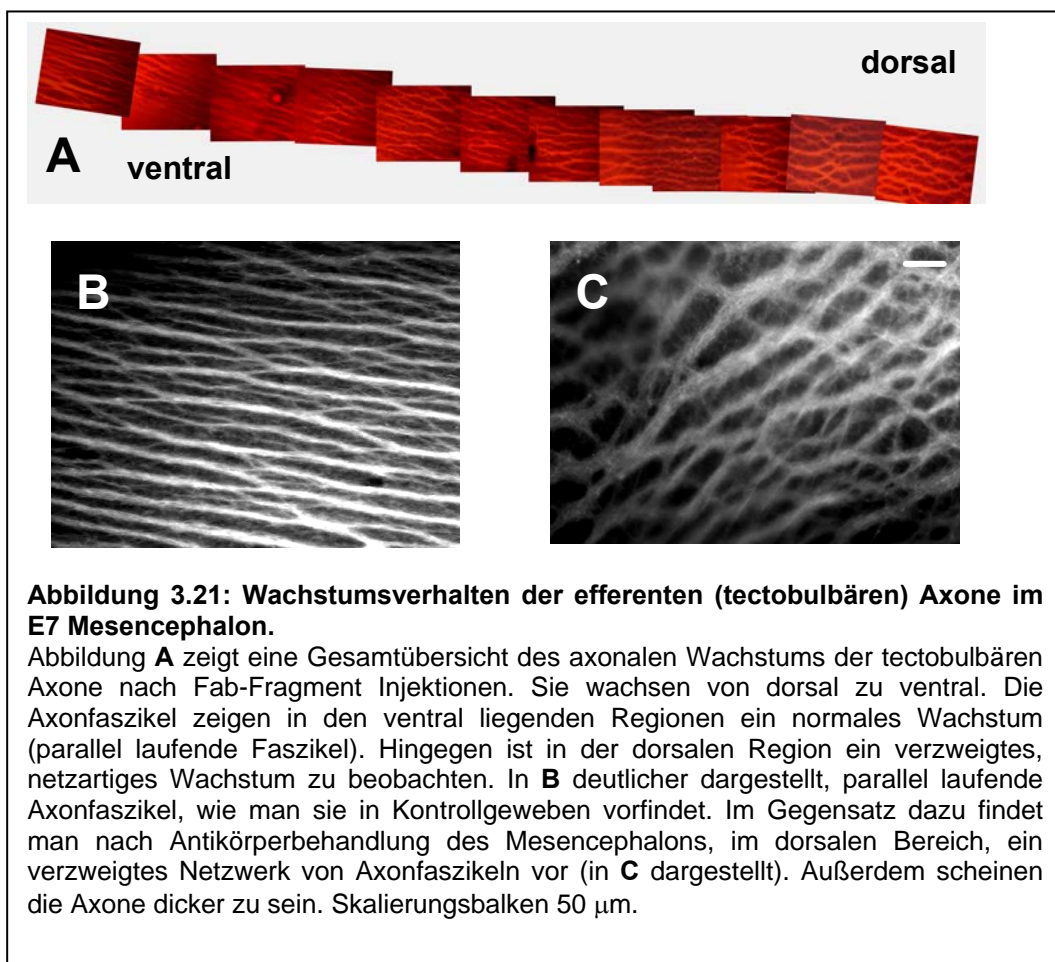


Im Kontrollgewebe und in den nicht beeinflussten Bereichen des injizierten Gewebes, lagen die Synapsen innerhalb der OPL in einer Reihe angeordnet vor (Abbildung 3.20 B, weiße Pfeile). Jedoch nach Fab-Fragmentinjektionen erschien das Protein PSD95 in einem breiteren Bereich innerhalb der Verdickung ungeordnet verteilt zu sein. Die klar definierte Verteilung des Proteins in der ONL, bis hin zu den Photorezeptorterminalien der OPL, wurde nach den Injektionen komplett aufgelöst. Die retinalen Schichten, wie OPL und ONL, konnten jetzt nicht mehr klar anhand der Färbung unterschieden werden.

Zusammenfassend haben die immunhistochemischen Analysen der OPL von älteren Entwicklungsstadien ergeben, dass Störung der Interaktion von Dystroglycan mittels Antikörpern, die Anordnung bzw. Verteilung von Dystroglycan (DAG) und der dort assoziierten Synapsen beeinflusst.

3.8 Wachstumsverhalten der tectobulbären Axone im E7 Mesencephalon

Als Folge von Störung der Interaktionsstellen von Dystroglycan über Fab-Fragmentinjektionen, rundeten sich die Zellen ab und verloren ihren Fortsatz mit dem Endfuß. Die Endfüße der Neuroepithelzellen dienen als Leitstruktur der tectobulbären Axone im Mesencephalon. Sie exprimieren sowohl Signal- oder Leitmoleküle, wie zum Beispiel Ephrine und Neurotrophine, als auch Adhäsionsmoleküle. Die Kombination dieser Moleküle ist für die richtige Orientierung des axonalen Wachstums unerlässlich (Thanos und Mey, 2001).



Es sollte untersucht werden, ob durch Fab-Fragmentinjektionen das axonale Wachstum beeinflusst wird. Behandeltes und unbehandeltes Gewebe wurde mit Antikörpern gegen Ng-CAM gefärbt, um das Wachstumsmuster der Axone mittels Fluoreszenzmikroskopie zu beobachten. Ng-CAM („*neuron-glia cell adhesion molecule*“) ist ein Zelladhäsionsmolekül, das ausschließlich auf Axonoberflächen exprimiert wird. Dadurch werden nur Axone angefärbt und keine Zellkörper.

Die efferenten (tectobulbären) Axone wachsen in Axonfaszikeln von dorsal zu ventral, bis zum Erreichen des ventral liegenden Tegmentums. Dort knicken sie um 90° ab und wachsen caudal, ipsilateral an der ventralen Mittellinie entlang, Richtung Rückenmark (Kröger und Schwarz, 1990; Shepherd und Taylor, 1995). Abbildung 3.21 A zeigt das Wachstumsmuster der Axone eines mit Antikörpern behandelten E7 Mesencephalons in Ganzgewebepräparation (open book). Die in Abbildung 3.21 A, B dargestellten ventral liegenden Axonfaszikel, in antikörperbehandeltem Gewebe, zeigen ein gerades, parallel verlaufendes Wachstumsmuster, wie bei Kröger und Schwarz (1990) beschrieben. In Kontrollen (unbehandeltes Gewebe, PBS oder Präimmunserum behandeltes Gewebe) wurde dieses Wachstumsmuster ebenfalls beobachtet. Im Gegensatz zum parallelen, unverzweigten Verlauf der Faszikel der tectobulbären Axone in den Präimmunserum oder PBS behandelten Tecta, verzweigen sich die Faszikel in den dorsal liegenden Regionen, also in den Bereichen, in denen Verdickungen vorgefunden wurden, zu einem verzweigten ungeordneten Netzwerk (Abb. 3.21 A, C). Außerdem scheinen die Faszikel in dieser Region dicker zu sein (Abb. 3.21 C).

Die Neuroepithelzellen haben in den dorsalen Bereichen des Mesencephalon (innerhalb der Verdickungen) den Kontakt zur Basalmembran verloren und sich abgerundet. Dadurch ging die Leitstruktur der Axone in Form der Neuroepithelzellendfüße verloren. Dystroglycan vermittelt den Kontakt des Neuroepithelzellendfußes zur Basalmembran. Dauerhaftes Ablösen des Endfußes durch Fab-Fragmentinjektionen und eine dadurch veränderte Zellmorphologie beeinflussen das axonale Wachstum der efferenten (tectobulbären) Axone des Mesencephalons. Zusammenfassend konnte in meiner Arbeit gezeigt werden, dass Fab-Fragmentinjektionen das axonale Wachstum des Tectums beeinflussen.

IV. Diskussion

Dystroglycan ist die zentrale Komponente des Dystrophin-assoziierten Glykoproteinkomplexes (DAG). In der Skelettmuskulatur verbindet der DAG die extrazelluläre Matrix mit dem Aktin-Zytoskelett. Diese molekulare Verbindung gibt jeder einzelnen Muskelfaser bei mechanischer Beanspruchung die notwendige Stabilität. Außerdem dient der DAG als Gerüst, an dem signaltransduzierende Moleküle an der Innenseite der Muskelfasermembran assoziiert sind. Mutationen innerhalb der DAG Komponenten führen zur Degeneration der Muskulatur und damit zu Muskeldystrophie. Einige Formen muskulärer Dystrophien, wie WWS, MEB, FCMD, weisen neben der Degeneration der Muskulatur auch schwere ZNS Defizite auf. Da die Ursachen der Entstehung dieser ZNS Abnormalitäten noch weitgehend unbekannt sind, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Rolle von Dystroglycan, bzw. des DAG, im sich entwickelnden ZNS zu untersuchen, um somit auf die Ursachen der schweren morphologischen Veränderung des Gehirns bei Muskeldystrophie-Patienten schließen zu können.

Hierzu wurden polyklonale Antikörper generiert, die die Interaktion zwischen α - und β -Dystroglycan *in vitro* und *in vivo* inhibieren. Fab-Fragmentinjektionen in das frühe embryonale Mesencephalon und in die Augen älterer Hühnerembryonen liefern, über die daraus resultierenden morphologischen Veränderungen des Gewebes, Aufschluss über die Funktion des DAG in diesen Geweben.

4.1 Charakterisierung der neu generierten Antikörper DygAB

Um das neu generierte polyklonale Serum für spätere Versuche erfolgreich einsetzen zu können, wurden die aufgereinigten Antikörper zunächst charakterisiert und folgende Fragen beantwortet: Ist das neu generierte polyklonale Serum fähig, Dystroglycan spezifisch zu erkennen? Können die Antikörper die Interaktion zwischen α - und β -Dystroglycan *in vitro* stören? Um diese Fragen zu klären, wurden die aus dem Serum gewonnenen polyklonalen affinitätsgereinigten Antikörper- oder

Fab-Fragmente mittels Immunhistochemie, Western Blot und Co-Immunpräzipitation weiter charakterisiert.

Die neu generierten Antikörper sollten den gesamten extrazellulären Bereich von β -Dystroglycan und die gesamten Interaktionsbindedomäne von α -Dystroglycan, die bei 550-585 Aminosäure liegt, detektieren (Bozzi et al., 2001; Sciandra et al., 2001). Um die Reaktivität der Antikörper gegen Dystroglycan zu untersuchen, wurden transient transfizierte HEK-Zellen und Hühnergewebeschnitte mit dem neu generierten anti-Dystroglycan Antikörper gefärbt. In all diesen Färbungen konnte die Verteilung von Dystroglycan mittels des polyklonalen Antikörpers nachgewiesen werden, was konsistent mit der Hypothese ist, dass die Antikörper Dystroglycan erkennen. Im Westernblot und in Basalmembran-Färbungen sollten die Antikörper DygAB Tier 1 und 2 zeigen, ob sie α - und β -Dystroglycan mit der gleichen Reaktivität erkennen können. In diesen Experimenten zeigten jedoch die beiden Seren Unterschiede hinsichtlich ihrer Reaktivität. Während das Tier 1 Serum beide Dystroglycane gleich gut erkennen konnte, detektierte das Tier 2 Serum nur β -Dystroglycan. Wie kann dieser Unterschied der Reaktivität zustande kommen? Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass im zweiten immunisierten Kaninchen (Tier 2) hauptsächlich eine Immunantwort gegen die extrazelluläre β -Dystroglycanregion des Fusionproteins ausgelöst wurde. Innerhalb dieser Region könnte möglicherweise die so genannte *major immunogenic region* lokalisiert sein. Dadurch wurden größtenteils Antikörper gegen β -Dystroglycan synthetisiert. Hingegen wurde im ersten Kaninchen (Tier 1) wahrscheinlich eine Immunantwort gegen das gesamte Fusionsprotein (α - und β -Dystroglycanregion) induziert. Als nächstes sollte analysiert werden, ob die Antikörper fähig waren, die Interaktion von α -Dystroglycan und β -Dystroglycan zu stören. Ich entschloss mich dazu, diese Frage mit Hilfe eines Co-Immunpräzipitations-Testsystems zu beantworten. Dieses Testsystem wurde mit beiden Seren Tier 1 und 2 durchgeführt, jedoch konnte nur das Serum aus Tier 1 die Interaktion unterbinden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die beiden Seren Dystroglycan mit der gleichen Spezifität detektieren können und dass zumindest das Serum aus Tier 1 für funktionsinhibierende Studien verwendet werden kann.

4.2 Morphologische Veränderung des Mesencephalons und der Retina nach Fab-Fragmentinjektionen

Beide Antikörper erkennen spezifisch Dystroglycan und DygAB Tier 1 hemmt *in vitro* die Interaktion von α - mit β -Dystroglycan. Daraus ergaben sich folgende Fragen: Können die neu generierten Antikörper- oder Fab-Fragmente die Funktion von Dystroglycan auch *in vivo* im sich entwickelnden ZNS stören? Beeinflusst die Störung der Interaktion zwischen α - und β -Dystroglycan mittels Antikörpern die Entwicklung des ZNS so, dass es zu morphologischen bzw. strukturellen Veränderungen führt?

Für die *in vivo* Injektionen in Hühnerembryonen wurden ausschließlich die DygAB Tier 1 Antikörper verwendet, da gezeigt werden konnte, dass diese *in vitro* die Interaktion der beiden Dystroglycane stören können. Fab-Fragmentinjektionen in den Ventrikel des Mesencephalons und in das Auge von Hühnerembryonen hatten schwerwiegende strukturelle Veränderungen des Gewebes zur Folge. Lichtmikroskopisch zeigten sich nach zwei- bzw. dreimaligen Injektionen von Fab-Fragmenten und Antikörpern an bestimmten Stellen starke Verdickungen des Gewebes. Nach zweimaligen Injektionen und einer Inkubationszeit von etwa 48 Stunden waren nur kleinere Verdickungen innerhalb des Mesencephalons und Retinagewebes zu erkennen. Etwa nach vier Tagen und dreimaligen Injektionen nahm die Breite des Neuroepithels, innerhalb der Verdickung, beträchtlich zu. Zudem konnten Verdickungen nur an bestimmten Regionen des Gewebes beobachtet werden. So traten sie in der Retina partiell über das gesamte Gewebe verteilt auf, während sie im Tectum nur in den dorsalen Bereichen beobachtet wurden. Warum induzieren Antikörper oder Fab-Fragmente nur an bestimmten Stellen Verdickungen und warum ist nicht das gesamte Gewebe betroffen? Eine mögliche Erklärung für

das lokale Auftreten sowie für die unterschiedliche Größe der gefundenen Verdickungen, könnte der Konzentrationsunterschied der Antikörper innerhalb des injizierten Gewebes sein. Diese Konzentrationsunterschiede entstehen aufgrund der lokalen Injektion der Antikörper. Es wurde zwar versucht, an unterschiedlichen Stellen zu injizieren, aber die daraus resultierende Antikörperkonzentration war nicht ausreichend, um morphologische Veränderungen zu induzieren. Erst mehrfache Injektionen an eine beliebig festgelegte Stelle des Huhnauges oder Tectums konnte eine so hohe Konzentration der Antikörper gewährleisten, dass sich Verdickungen unterschiedlicher Größe, innerhalb des Gewebes, entwickelten.

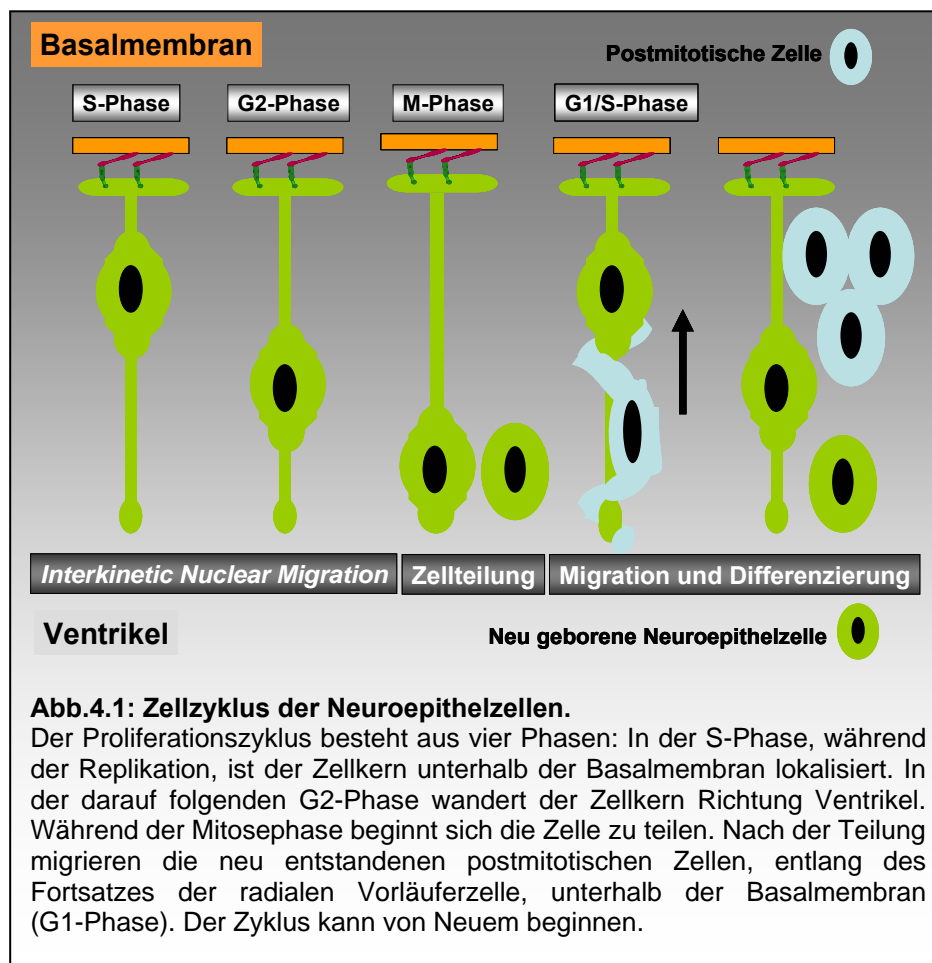
4.3 Mechanismen der morphologischen Veränderung des Hühnergewebes und der Neuroepithelzellen

Nach Fab-Fragmentinjektionen in das Auge oder Mesencephalon der Hühnerembryonen zeigten die Neuroepithelzellen, bzw. das embryonale Hühnergewebe, eine runde Zellmorphologie bei einer immunhistochemischen Anfärbung des Intermediärfilaments Vimentin. Wie können Fab-Fragmentinjektionen zu morphologischer Veränderung der Neuroepithelzellen führen? Um dieser Frage nachzugehen, muss zunächst ein Modell entwickelt werden, das erklären kann, welche Rolle Dystroglycan bei der Aufrechterhaltung der Morphologie von Neuroepithelzellen spielt. Dieses Modell basiert zum einen darauf, dass der DAG in den Endfüßen der Neuroepithelzellen konzentriert ist (Blank et al., 1997; Blank et al., 2002) und zum anderen darauf, dass er in der Skelettmuskulatur eine molekulare Verbindung zwischen extrazellulärer Matrix und dem Aktin-Zytoskelett herstellt. Ähnlich wie der DAG in der Skelettmuskulatur, der das Aktin-Zytoskelett mit der Basalmembran verbindet, vermittelt vermutlich Dystroglycan, in den Endfüßen der Neuroepithelzellen, in der embryonalen Retina und dem embryonalen Mesencephalon, den Kontakt zur Basalmembran. Mehrmalige Fab-Fragmentinjektionen inhibieren permanent den Kontakt der Neuroepithelzellendfüße an die Basalmembran. Daraus resultiert eine runde Zellmorphologie dieser speziellen Zellen.

Um der oben gestellten Frage, warum Fab-Fragmentinjektionen eine rundliche Morphologie der Zellen bewirken, weiter auf den Grund zu gehen, sollte man zunächst verstehen, welche Bedeutung Neuroepithelzellen im sich entwickelnden ZNS zukommt und wie der Zellzyklus dieser neuronalen Vorläuferzellen verläuft. Neuroepithelzellen sind neuronale Vorläuferzellen, aus denen alle Zelltypen des ZNS hervorgehen. Sie sind polare Zellen, die eine charakteristische palisadenförmige Struktur mit einer apikalen und basalen Seite aufweisen. In frühen Entwicklungsstadien bestehen die Retina und das gesamte ZNS-Neuroepithel ausschließlich aus diesen radialen neuroepithelialen Vorläuferzellen. Nach neuesten Erkenntnissen unterscheidet man drei Typen neuronaler Vorläuferzellen im sich entwickelnden Säugetier ZNS, nämlich die Neuroepithelzellen, radiale Gliazellen und basale/subventrikuläre Vorläuferzellen (Huttner und Kosodo, 2005; Götz und Huttner, 2005). Radiale Gliazellen und Neuroepithelzellen teilen als Gemeinsamkeit die interkinetische Wanderung des Zellkerns (*INTERKINETIC NUCLEAR MIGRATION*) während des Zellzykluses.

Der Proliferationszyklus der Neuroepithelzellen ist in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt. Die Lokalisation des Zellkerns innerhalb der Neuroepithelzelle korreliert mit der spezifischen Phase des Zellzyklus. In der S-Phase, während der DNA Replikation, migriert der Zellkern vom äußeren Rand des Epithels unterhalb der Basalmembran (Dyer und Cepko, 2001b). Der Kern wandert im Laufe der G2-Phase zur ventrikulären Zone und bleibt auch dort noch während der darauf folgenden Mitosephase lokalisiert (Sidman et al., 1959; Fujita, 1964; Götz et al., 2002). Noctor et al. beobachtete, dass der Fortsatz der radialen Gliazellen, innerhalb des Zellzykluses in jeder Phase, auch während der Mitosephase an der Basalmembran (Pia) lokalisiert bleibt (Noctor et al., 2001; Noctor et al., 2004). Auch ich gehe in meinem Modell des Zellzykluses der Neuroepithelzellen davon aus (Abbildung 4.1), dass der Endfuß der Neuroepithelzellen, in allen Zellzyklusphasen, an der Basalmembran adhäriert bleibt. Teilen sich die Zellen symmetrisch, entstehen zwei identische Neuroepithelzellen. Bei asymmetrischer Teilung entsteht jedoch eine Neuroepithelzelle und ein Neuron (Huttner und Kosodo, 2005). In der darauf folgenden G1/S Phase wandert der Zellkern zurück zur basalen Seite. Diese Phase

entscheidet letztendlich darüber, ob die Zelle postmitotisch wird oder wieder den Zellzyklus durchläuft. Die in der G1 Phase entstandene postmitotische Zelle übernimmt den Fortsatz der parentalen Zelle und wandert entlang des lang gestreckten Fortsatzes der neuroepithelialen Vorläuferzelle von der ventrikulären Zone in die Mantelzone unterhalb der Basalmembran ein (Morest et al., 1970; Hartfuss et al., 2001; Miyata et al., 2001; Noctor et al., 2001).



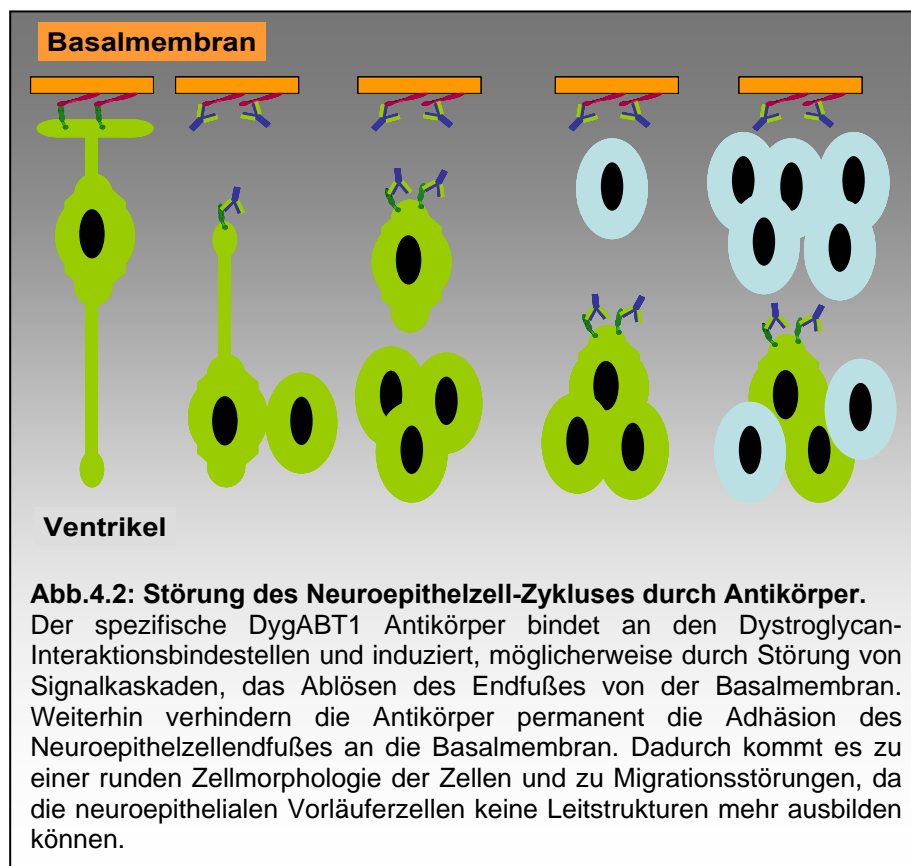
Die interkinetische Kernwanderung und die Aufrechterhaltung der stabilen gestreckten Zellform der Neuroepithelzellen setzen eine stabile Adhäsion des Zellendfußes an die Basalmembran voraus. Ferner ist der ständige Kontakt des Endfußes an der Basalmembran für die Ausbildung der lang gestreckten palisadenförmigen Struktur dieser Zellen notwendig. Außerdem spielen auch Signalkaskaden bei der Etablierung dieser Zellform eine wesentliche Rolle. So zeigen frühere Studien, dass die Reelin-Dab1 Signalkaskade für die Etablierung der

bipolaren Zellform von neuronalen Vorläuferzellen essentiell ist. Reelin ist ein großes Glykoprotein, das von radialen Gliazellen sowie von Neuronen, sekretiert wird. Reelin bindet an die Lipoproteinrezeptoren (*Apoer2*, *apolipoprotein receptor 2*; *Lrp8*, *low-density*) und sehr schwach an den *Vldlr* (*very low-density*) Rezeptor. Dabei wird *Dab1* (*cytosolic adapter protein disabled1 mouse*), das mit der zytoplasmatischen Domäne (NPXY) der Lipoproteinrezeptoren interagiert, durch die Src-Kinase (Thyrosin Kinase) Familie phosphoryliert. Ein dadurch entstehendes *downstream*, stromabwärts gelegenes Signal, führt zur Umstrukturierung des Zytoskeletts der Zelle (Förster et al., 2002; Hartfuss et al., 2003; Meyer et al., 2003). Auch in Reelin defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Reelin-Dab1 Signalkaskade ein wichtiger Bestandteil für die Etablierung dieser bipolaren Zellform ist. Die Radialen Gliazellen verlieren im Kortex dieser Mäuse ihre bipolare Struktur. Auch Vorläuferzellen, die *das brain lipid-binding protein* (Blbp) exprimieren, waren signifikant im Kortex von den Reelin Mutanten reduziert. Das Blbp fördert die bipolare Morphologie der radialen Zellen (Hartfuss et al., 2003).

Auch andere Signalkaskaden könnten bei der Etablierung der bipolaren Zellform der Neuroepithelzellen wichtig sein. So zeigen radiale Gliazellen in transgenen Mäusen, in denen der Transkriptionsfaktor Pax6 nicht mehr exprimiert wurde, ebenfalls Veränderungen ihrer Morphologie. Radiale Gliazellen exprimieren Pax6. Die radialen Vorläuferzellen im E16,5 Kortex der Pax6 Mutante weisen *in vivo* unorganisierte verkürzte Ausläufer und eine veränderte Morphologie auf. Die lang gestreckte bipolare palisadenförmige Struktur der Zellen geht im E16,5 Kortex teilweise verloren, im Vergleich zum WT Kortex. Auch in Zellkultur kultivierte, Pax6 defiziente (E14,5), corticale, radiale Gliazellen zeigen nach zwei Tagen eine veränderte Morphologie. Die Zellen haben eine multipolare Morphologie mit sehr kurzen Ausläufern und weisen, im Gegensatz zu WT Zellen, keine bipolare Struktur mehr auf (Götz et al., 1998).

In der Muskulatur bewirkt der DAG die Verbindung zwischen EZM und Muskelfaser. Auf das embryonale ZNS übertragen, könnte die Interaktion zwischen α -Dystroglycan und β -Dystroglycan die Bindung des Neuroepithelzellendfußes an die Basalmembran (Pia) vermitteln. Durch Injektion von Fab-Fragmenten oder

Antikörpern wird der Kontakt zwischen den beiden Dystroglycanen gestört und somit die Bindung des Endfußes an die Basalmembran unterbrochen. Möglicherweise induzieren die, an α -und β -Dystroglycan gebundenen, Antikörper oder Fab-Fragmente eine Störung von spezifischen Signalkaskaden, denen für die Etablierung der lang gestreckten palisadenförmigen Struktur der Neuroepithelzellen und somit für die Adhäsion des Endfußes an die Basalmembran eine essentielle Rolle zukommen. Durch Inhibition dieser Signalkaskaden wird das Ablösen des Endfußes von der Basalmembran gefördert. Des Weiteren verhindern die an Dystroglycan gebundenen Antikörper permanent die Adhäsion des Endfußes an die Basalmembran. Die Zellen runden sich ab und verlieren ihre bipolare Morphologie. Durch Verlust der bipolaren Morphologie dieser Zellen wird die interkinetische Kernwanderung gestört, und die Leitstruktur der neu entstandenen postmitotischen Zellen geht verloren. Durch den Verlust der Leitstrukturen kommt es zu Migrationsstörungen (siehe Abbildung 4.2).



Können auch noch andere Proteine, außer Dystroglycan, den Kontakt der Neuroepithelzellendfüße zu der Basalmembran vermitteln? Um diese Frage zu beantworten, sollte man zunächst die in den Endfüßen konzentrierten Proteine genauer betrachten. Außer Dystroglycan sind dort eine ganze Reihe von Proteinen lokalisiert. Darunter fällt auch die Proteinfamilie der Integrine (Hering et al., 2000). Integrine sind Transmembranproteine, die Rezeptoren für einige Matrixproteine, wie zum Beispiel, Laminin darstellen. Integrine sind Heterodimere, bestehend aus zwei miteinander assoziierten Glykoproteinketten (α - und β -Kette). Kürzlich konnte bei transgenen $mdx/\alpha7^{-/-}$ Mäusen (Mäuse, die kein funktionelles Dystrophin und Integrin Rezeptoren exprimieren) gezeigt werden, dass Integrine ($\alpha7$ Integrin) innerhalb der Skelettmuskulatur eine komplementäre funktionelle Rolle des DAG zukommt. So erhalten sie, wie auch der DAG, die funktionelle Integrität der einzelnen Muskelfasern, durch Adhäsion des Sarcolemmas an die Basalmembran (Rooney et al., 2006). Im Gehirn sind die Integrine ebenfalls wichtige Rezeptoren, denen in den Endfüßen der Neuroepithelzellen eine ähnliche Funktion wie in der Muskulatur zukommt. So fördern sie den Kontakt der Endfüße an die Basalmembran und unterstützen dadurch die funktionelle Integrität der Neuroepithelzellen (Hynes, 1992; Cann et al., 1996; Skeith et al., 1999; Graus-Porta et al., 2001). Corticale Neurone und Gliazellen exprimieren mehrere Mitglieder von der $\beta1$ -Klasse Integrin Familie (Pinkstaff et al., 1999). Diese Rezeptoren sind aus einer gemeinsamen $\beta1$ - Untereinheit, kombiniert mit unterschiedlichen α - Untereinheiten, aufgebaut. Mausmutanten, die keine Integrin $\beta1$ -Untereinheit im ZNS exprimieren (Inaktivierung aller $\beta1$ Klasse Rezeptoren), weisen ebenfalls ZNS Defizite, unter anderem auch veränderte Migration von corticalen Neuronen und eine fragmentierte Basalmembran auf (Graus-Porta et al., 2001). Fehlende Integrine in den Endfüßen verhindern das Adhären der neuronalen Vorläuferzellen an die Basalmembran. Die neuronalen Vorläuferzellen behalten allerdings ihre bipolare Zellform bei, so dass die Neuronen die Fortsätze weiterhin als Leitstruktur nutzen können. Dadurch kommt es zu einem weniger stark ausgeprägten ZNS Phänotyp, im Gegensatz zu der in meiner Arbeit beschriebenen Migrationsstörung. Auch die Studien von Haubst et al. bestätigen, dass der basale Kontakt des Endfußes zu der extrazellulären Matrix für die

Aufrechterhaltung der Basalmembranintegrität und für die neuronale Migration notwendig ist. Hingegen spielt die mechanische Bindung des Endfußes an die Basalmembran für die Proliferation und für die Differenzierung der Zellen keine Rolle. Sie analysierte dazu die Gehirne von Mäusen, in denen der basale Kontakt des Endfußes der radialen Gliazellen zu der extrazellulären Matrix gestört ist. Dazu zählen Mausmutanten, in denen die Nidogen-Bindungsdomäne von Laminin γ 1 Kette deletiert wurde, aber auch Gehirne von α 6 Integrin und Perlecan defizienten transgenen Mäusen (Haubst et al., 2006). Durch Migrationsstörung und fragmentierter Basalmembran kommt es vermutlich zu den schweren ZNS-Veränderungen, wie abnormale neuronale Schichten, Fusion benachbarter Hirnhemisphären, Bildung von Ektopias.

Warum können die Integrine, nach Fab-Fragmentinjektionen, nicht das Ablösen des Endfußes unterbinden? Wie lässt sich diese Beobachtung erklären? Nach Fab-Fragmentinjektionen waren die Integrine in einem breiten Streifen unterhalb der Basalmembran konzentriert. Möglicherweise haben sich die Integrine um die abgerundeten Zellen verteilt und so die Konzentration dieser Adhäsionsproteine zwischen der Kontaktstelle des Neuroepithelzellendfußes und Basalmembran verringert. Die veränderte Verteilung dieser Oberflächenrezeptoren könnte den stabilen Kontakt des Endfußes zur Basalmembran beeinträchtigt und so zur Abrundung der Zellen beigetragen haben. So tragen auch die Integrine zum Ablösen des Endfußes und zu der beobachteten rundlichen Zellform der radialen Zellen bei. Vermutlich benötigen die Neuroepithelzellen für eine stabile mechanische Bindung ihres Endfußes an die Basalmembran nicht nur Dystroglycan, sondern auch Integrine.

Dystroglycan könnte den Kontakt der Neuroepithelzellendfüße an die Basalmembran vermitteln und dabei eine den Integrinen übergeordnete Funktion besitzen. Fab-Fragmentinjektionen inhibieren die Adhäsion des Endfußes an die Basalmembran und induzieren somit den Verlust der bipolaren Zellform, Störung der interkinetischen Kernwanderung und Migrationsstörungen.

4.4 Hyperproliferation der Neuroepithelzellen

Nach Fab- oder Antikörperbehandlung des Mesencephalons wurde eine erhöhte Anzahl BrdU markierter Zellen gefunden. Daraus ergab sich die Frage, wie Fab-Fragmentinjektionen den Zellzyklus beeinflussen könnten, so dass es zu einer erhöhten Proliferation der Neuroepithelzellen kommt?

Um dieser Frage nachzugehen, werden an dieser Stelle einige Theorien diskutiert, die zeigen sollen, wie der Zellzyklus der Neuroepithelzellen durch Inhibition der Funktion von Dystroglycan mittels Fab-Fragmenten beeinflusst werden kann. Aus diesem Grund sollen zunächst die Schlüsselfaktoren kurz erläutert werden, die für die Regulierung bzw. Steuerung des Zellzykluses verantwortlich gemacht werden. Der Zellzyklus ist in vier Phasen unterteilt, in die S-Phase der DNA-Synthese, die G2-Phase mit der Wanderung des Zellkerns Richtung Ventrikel, die Mitosephase und die G1/S Phase. Die G1/S Phase entscheidet über das Schicksal der Zelle im Hinblick darauf, ob sie postmitotisch wird, oder erneut den Zellzyklus durchläuft. Jede einzelne Phase des Zellzykluses wird reguliert von Cyclinen (Ross et al., 1996) und CDKs (*Cycline Dependent Kinasen*). Die CDKs gehören zur Familie der Serin-Threonin-Kinasen und sind nur in Komplexen mit ihrem zugehörigen Cyclin aktiv. Die Cyclin-CDK-Komplexe phosphorylieren und aktivieren dabei eine Reihe von Proteinen (z.B. Transkriptionsfaktoren) und Enzyme und steuern so den Zellzyklus (Nigg, 1995; Dirks und Rutka, 1997). Für jeden Abschnitt des Zellzykluses gibt es unterschiedliche Cyclin-CDK-Komplexe und die dazugehörigen Inhibitoren, so genannte CDKIs (*Cycline Dependent Kinasen Inhibitors*), die die Funktion der CDKs hemmen (Cunningham und Roussel, 2001). Eine Gruppe dieser Inhibitoren sind die Proteine der CIP/KIP Familie, wie zum Beispiel p27^{Kip1} und p57^{Kip2} (Dyer und Cepko, 2001a). Diese Inhibitoren verhindern den Eintritt der Zelle von der G1 in die S-Phase und somit das Fortschreiten des Zellzykluses. Die Zellen beenden die Proliferation und beginnen sich zu differenzieren (Dyer und Cepko, 2001b; Ohnuma und Harris, 2003). Mausmutanten, die keine p27^{Kip1} oder p57^{Kip2} Proteine exprimieren, weisen eine erhöhte Proliferationsrate der Neuroepithelzellen und gestörte retinale Schichten auf (Dyer und Cepko, 2000; Dyer und Cepko, 2001a). Außerdem besitzen p27^{Kip1} Mausmutanten (Mäuse, die kein p27^{Kip1} exprimieren) eine größere

Gewebemasse und somit einen stärkeren Körperbau aufgrund erhöhter Proliferation der Zellen, verglichen zu Wildtyp-Mäusen (Fero et al., 1996; Nakayama et al., 1996). Einflussnahme auf die Expression der beiden Negativregulatoren p27^{Kip1} oder p57^{Kip2} kann also den Zellzyklus der Neuroepithelzellen so beeinflussen, dass es zu einer erhöhten Proliferation führt. Es wäre also denkbar, dass Dystroglycan über bestimmte Faktoren, wie zum Beispiel den CDKIs, Einfluss auf den Zellzyklus und somit auch auf das Proliferationsverhalten von Neuroepithelzellen ausüben kann.

Eine mögliche Einflussnahme von Dystroglycan auf den Zellzyklus könnte über die Phosphoinosit-3-phosphatase (PTEN) induziert werden. PTEN ist ein negativer Regulator des Phosphatidylinositol-3-kinase-Reaktionswegs (PI3K). Dieser Reaktionsweg fördert insbesondere den Abbau des CDK-Inhibitors p27^{Kip1}, der den Eintritt der Zelle von der G1 Phase in die S-Phase verhindert. Durch den Abbau des p27^{Kip1} Proteins kann die Zelle rascher von der G1 in die S-Phase eintreten und es kommt zu einer verstärkten Proliferation (Sun, 1999). In einigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Expressionsverhalten des Tumorsuppressorgens PTEN im Zusammenhang mit der Proliferation von Epithelzellen steht. So wurden in transgenen Mäusen, in denen die PTEN Expression inhibiert wurde, aufgrund einer erhöhten Proliferationsrate, deutlich größere Gehirne, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, vorgefunden (Groszer et al., 2001). Ebenso wurde in PTEN ^{-/-} embryonalen Stammzellen eine erhöhte Proliferationsrate beobachtet (Sun, 1999). Untersuchungen von Tsutsui et. al. zeigen an Brusttumorzellen das Zusammenspiel zwischen der Expression von PTEN und p27^{Kip1} auf. So wurden in diesen Tumorzellen eine reduzierte PTEN Expression und eine gleichzeitig auftretende Reduktion der Expression des p27^{Kip1} nachgewiesen. Jedoch bewirkt eine Erhöhung der PTEN Konzentration immer auch eine Erhöhung des CDKIs p27^{Kip1} (Tsutsui et al., 2005). Diese Hypothese würde voraussetzen, dass Dystroglycan die Expression von PTEN beeinflussen kann. Untersuchungen von Muschler et. al. an der kanzerogenen Zelllinie T4-2 (-in der die Dystroglycan-Expression reduziert vorliegt) zeigen, dass Überexpression von Dystroglycan eine Hochregulierung des Tumorsuppressors PTEN induziert und dass infolgedessen die Polarität und die Wachstumskontrolle der Tumorzellen wieder hergestellt werden

(Muschler et al., 2002). Daraus lässt sich folgern, dass Dystroglycan einen starken Einfluss auf das Expressionsverhalten von PTEN ausübt. Wie können Störungen der Funktion von Dystroglycan, mittels Fab-Fragmenten, die Expression von PTEN bzw. p27^{kip1} beeinflussen? Möglicherweise bewirken Antikörperinjektionen, über Störung der Funktion von Dystroglycan, eine Reduktion der Expression von PTEN und verstärken auf diese Weise den Phosphatidylinositol-3-kinase-(PI3K) Reaktionsweg. Dieser Reaktionsweg würde dann die Abnahme des CDK-Inhibitors p27^{kip1} fördern. Durch Reduktion des p27^{kip1} Proteins kommt es zu einer nicht regulierten Proliferation, da die Zellen nicht mehr in der G1-Phase verbleiben, sondern den Zyklus unmittelbar erneut passieren.

Auch andere intrazelluläre Signalkaskaden, außer PTEN und p27^{kip1}, könnten an der in meiner Arbeit beobachteten erhöhten Proliferation beteiligt sein. So führt ein verstärkter Phosphatidylinositol-3-kinase-(PI3K) Reaktionsweg zur Phosphorylierung des Proteins AKT und seines Substrates der Glycogen-Synthase-Kinase (GSK3 β), dessen Kinaseaktivität dadurch inhibiert wird. Die Glycogen-Synthase-Kinase ist ein Bestandteil des β -Catenin-Degradationskomplexes, der den schnellen Abbau von β -Catenin im Zytosol gewährleistet. Die Inaktivierung der GSK3 β führt zu einer reduzierten Phosphorylierung des β -Catenin Proteins (Pap und Cooper, 1998). Nicht-phosphoryliertes β -Catenin kann nicht mehr abgebaut werden und akkumuliert im Zytosol, wie auch im Zellkern und aktiviert so als Co-Aktivatoren die Expression von LEF-1/TCF-Genen (Gat et al., 1998; DasGupta und Fuchs, 1999; Imbert et al., 2001). Eines der Proteine, dessen Transkription durch β -Catenin aktiviert wird, stellt c-Myc dar. Hierbei handelt es sich um einen sehr wichtigen Stimulator des Zellwachstums und der Proliferation, dessen Überexpression unkontrollierte Proliferation und die Entstehung von Krebs fördert (Hlsken und Behrens, 2000). Benaud und Dickson zeigten an menschlichen Brustepithelzellen, dass eine verstärkte Expression des onkogenen Transkriptionsfaktors c-Myc, in nicht an Substrat adhärierenden Epithelzellen, zu einer Aktivierung des E-CDK2 Komplexes, gekoppelt mit dem Anstieg von Cyclin E, führt. Dadurch wird die Destabilisierung und der Abbau von p27^{kip1} über den Ubiquitin-Proteasome

Signalweg gefördert (Benaud und Dickson, 2001). Reduktion des p27^{Kip1} Proteins führt wiederum zur Hyperproliferation der Epithelzellen.

Dystroglycan könnte über Regulierung einiger Signalreaktionswege, wie zum Beispiel dem oben beschriebenen PI3K-Reaktionsweg, einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferation der Neuroepithelzellen ausüben. Um jedoch die genauen Mechanismen oder Signalkaskaden zu identifizieren, die zu der in meiner Arbeit beobachteten Hyperproliferation führen könnten, müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

4.5 Erhöhung der Anzahl postmitotischer Neuronen nach Fab-Fragmentinjektionen

Nach den Fab-Fragmentinjektionen wurde in den verdickten Bereichen des Mesencephalons eine erhöhte Anzahl postmitotischer Zellen vorgefunden. Wie lässt sich dieses Resultat erklären? Untersuchungen von Sgambato et. al zeigen, dass Dystroglycan bei der Regulierung des Zellzykluses und für die Differenzierung von Epithelzellen eine wichtige Rolle einnimmt. So wurde zum Beispiel in den epithelialen Brustzellen HC11 nachgewiesen, dass eine Reduktion der Expression von Dystroglycan die Differenzierung der Epithelzellen zu spezifischen Brustepithelzellen inhibiert, während eine Überexpression eben diese Differenzierung induziert (Sgambato et al., 2006). Im ZNS ist die Differenzierung sicherlich komplizierter und vermutlich spielen bei der Differenzierung von Neuroepithelzellen zu postmitotischen Neuronen eine ganze Reihe von Faktoren eine wichtige Rolle. So nehmen zum Beispiel **Basic helix-loop-helix** (bHLH) Transkriptionsfaktoren als Hauptregulatoren bei der Neurogenese eine entscheidende Rolle ein. Einer dieser bHLH-Hauptregulatoren der Zelldifferenzierung stellt in der Mausretina das Math5 Protein dar. Retinale Vorläuferzellen, die kein Math5 exprimieren, weisen einen Verlust von p27^{Kip1} Protein auf und verlieren die Fähigkeit, sich zu differenzieren (Le et al., 2006). Außerdem reguliert Math5 die Differenzierung der Photorezeptoren der frühen Retina durch Inhibition anderer bHLH Transkriptionsfaktoren, nämlich NeuroD1 und Ngn2,

welche im aktiven Zustand die Differenzierung der Photorezeptoren fördern. Math5 reguliert somit die Differenzierung der retinalen Vorläuferzellen über die Beeinflussung anderer proneuraler Gene (Le et al., 2006).

Sgambato et al. konnte mittels den epithelialen Brustzellen HC11 nachweisen, dass deren Zelldifferenzierung zu spezifischen Brustepithelzellen, über das Expressionsmuster, von Dystroglycan reguliert wird (Sgambato et al., 2006). Auch in meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass Dystroglycan eine regulatorische Rolle bei der Differenzierung von Neuroepithelzellen zukommt. Durch Störung der Funktion von Dystroglycan, mittels Fab-Fragmenten, erhöhte sich die Anzahl postmitotischer Zellen. Somit könnte Dystroglycan die Differenzierung von Neuroepithelzellen über einen der oben beschriebenen Mechanismen oder Differenzierungsfaktoren beeinflussen.

4.6 Migrationsstörungen des embryonalen Gewebes

Nach Fab-Fragmentinjektionen waren die postmitotischen Neuronen nicht mehr in einer Schicht unterhalb der Basalmembran in der Marginalzone lokalisiert, sondern innerhalb der Verdickung über das gesamte Neuroepithel verteilt. Wie kann es zu diesen Migrationsstörungen kommen? Neu entstehende Neuronen benötigen Leitstrukturen, um den richtigen Platz im Gewebeverband des ZNS einnehmen zu können. Diese Leitstrukturen stellen neuronale Vorläuferzellen in Form von langen Fortsätzen zur Verfügung, entlang derer sie in die für sie spezifische Schicht wandern. So besitzen neuronale Vorläuferzellen, wie zum Beispiel die Neuroepithelzellen, nicht nur die Fähigkeit, alle Zelltypen im ZNS durch Zellteilung und Differenzierung zu generieren (Götz und Huttner, 2005), sondern dienen auch als Leitstrukturen der neu entstehenden Neuronen (Noctor et al., 2001; Noctor et al., 2004; Haubst et al., 2006).

Bei den unterschiedlichen Muskeldystrophien, die einen stark ausgeprägten ZNS Phänotyp besitzen, wie zum Beispiel FCMD, WWS und MEB, kann man ähnliche Störungen der neuronalen Migration beobachten, wie in der vorliegenden

Arbeit beschrieben. Neuronen wandern nicht in die richtigen Schichten, sondern weisen eine veränderte Lokalisation auf. Die molekulare Ursache für diese Störungen ist eine veränderte Glykosylierung von α -Dystroglycan (Fukuyama et al., 1981; Santavuori et al., 1989; Haltia et al., 1997; Kobayashi et al., 1998; Yoshida et al., 2001). Auch Myd-Mäuse (transgene Mäuse mit einer Mutation im Large-Gen, das eine Glykosyltransferase kodiert) besitzen eine veränderte Glykosylierung von α -Dystroglycan. Dystroglycan verliert die Fähigkeit, seine Liganden Laminin, Neurexin und Agrin zu binden. Die Gehirne dieser Mäuse zeigen ebenfalls Migrationsstörungen in Form einer veränderten Verteilung der Körner (*granule*) Neuronen im Cerebellum, Hippocampus und der Neuronen im cerebralen Kortex. Außerdem weisen sie eine gestörte Struktur und Eigenschaften der extrazellulären Matrix auf (Michele et al., 2002; Holzfeind et al., 2002). In einigen Studien wurde bereits gezeigt, dass Störungen der Basalmembranintegrität zu Migrationsstörungen bzw. veränderten Schichtung der Neuronen führen können. So wurden in Nidogen-Mausmutanten (Nidogen-Bindungsdomäne der Laminin γ 1 Kette wurde entfernt), β 1-Mausmutanten und bei GFAP-Cre/Dyg null Mäusen (Mäuse, die im ZNS kein Dystroglycan exprimieren) Migrationsstörungen beschrieben (Graus-Porta et al., 2001; Moore et al., 2002; Halfter et al., 2002). Diese Migrationsstörungen sind jedoch nicht so stark ausgeprägt, im Gegensatz zu denen, die von den anti-Dystroglycan induzierten. Die neuronalen Vorläuferzellen behalten ihre bipolare Morphologie bei und die migrierenden Neuronen können entlang der Fortsätze der radialen Gliazellen wandern. Sie wandern allerdings nicht bis unterhalb der Basalmembran, sondern in den subarachnoiden Raum ein. Die Basalmembran stellt in den fragmentierten Bereichen keine Migrationsgrenze für die migrierenden Neuronen mehr dar. Auch die Arbeiten von Halfter et al. zeigen, dass der Verlust der Basalmembran, durch proteolytischen Verdau, nur zu leichten Migrationsstörungen (Störungen der vertikalen Migration von Neuroblasten) führt. Die Zellen behalten ihre bipolare Zellform bei und verkürzen ihre Länge so, dass die Endfüße 30-50 μ m, von ihrem Anheftungspunkt an der Basalmembran, entfernt sind (Halfter und Schurer, 1998; Halfter et al., 2001).

In meiner Arbeit kann man als Ursache der beschriebenen abnormalen Migration eine fragmentierte Basalmembran ausschließen. Die Zellen verlieren nach den Fab-Fragmentinjektionen ihre bipolare Morphologie und verkürzen ihren Zellfortsatz. Diese morphologische Veränderung der Neuroepithelzellen könnte eine Erklärung für die in meiner Arbeit beschriebene Migrationsstörung liefern. Durch den Verlust der bipolaren Zellform verlieren die migrierenden postmitotischen Neuronen ihre Leitstrukturen, nämlich die Ausläufer der Neuroepithelzellen und es kommt zu einer stark ausgeprägten abnormalen Migration im embryonalen Mesencephalon (siehe Abbildung 4.2).

In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass Dystroglycan, bzw. der DAG, eine wesentliche Rolle beim Migrationsverhalten von Neuronen zukommt. Störungen der Funktion des DAG führen zur abnormalen neuronalen Schichtung des ZNS.

4.7 Rolle von Dystroglycan bei der Etablierung der Neuroepithelzell-Polarität

Neuroepithelzellen sind polare Zellen die – wie jede Epithelzelle – eine basolaterale und eine apikale Domäne besitzen. Der apikale und basale Bereich ist über Adhäsionskomplexe wie den „*tight junctions*“ und „*adherence junctions*“ voneinander getrennt (Aaku-Saraste et al., 1996). Diese Adhäsionsstrukturen sind auf der ventrikulären Seite des Neuroepithels am apikalen Ende der Neuroepithelzellmembran konzentriert (Aaku-Saraste et al., 1996). Die „*tight junctions*“ stellen eine natürliche Barriere dar, die nur bestimmte Proteine oder Moleküle passieren lassen und so die Polarität der Zelle begünstigen (Tsukita, 2001; Furuse et al., 2002). Adhäsionsstrukturen wie „*adherence junctions*“ hingegen erhalten den Gewebeverband, indem sie Zell-Zell Kontakte formieren und dadurch die Etablierung der Polarität der epithelialen Zellen gewährleisten (Jamora, 2002).

Apikal und basal lokalisierte Proteine stellen Marker für die Polarität der Zellen dar. Deshalb wurde die Verteilung apikal konzentrierter Proteine, wie F-Aktin, N-Cadherin und Zonula occludens Protein 1 (ZO1), nach den Fab-Fragmentinjektionen,

immunhistochemisch analysiert. ZO1 stellt einen Bestandteil der „*tight junctions*“ dar, während N-Cadherin ein Bestandteil der „*adherence junctions*“ ist (Fanning et al., 1998; Kobiela, 2004). Arbeiten von Gänzler-Odenthal und Redies zeigen, dass Störung der Funktion von N-Cadherine, mittels Antikörperinjektionen in das ZNS von Hühnerembryonen, morphologische Veränderungen im Tectum und im Thalamus bewirken. Beide Gewebe wiesen eine so genannte Rosettenbildung auf. Diese Rosetten entstanden durch die teilweise ventrikuläre Einfaltung des Gewebes. Innerhalb der Rosettenbildung ging die basale und apikale Orientierung der Neuroepithelzellen vollständig verloren. Die Zellen formierten sich strahlenförmig um die eingefaltete ependymale Linie (ventrikulärer Bereich), jedoch blieb die radiale Morphologie der Zellen weitgehend erhalten (Gänzler-Odenthal und Redies, 1998).

Es wurde jedoch in meiner Arbeit, innerhalb des Tectumgewebes, keine Rosettenbildung beobachtet. Stattdessen waren die Adhäsionskomplexe und F-Aktin, nach den Fab-Fragmentinjektionen, auf der apikalen Seite des Mesencephalon in einer breiteren Schicht angeordnet. Die Proteine wiesen eine unveränderte apikale Verteilung auf, waren aber in einem größeren Bereich innerhalb der ventral liegenden Seite verteilt. Das Verteilungsmuster dieser Proteine erinnerte an eine Bienenwabe. Wie kann man die veränderte Verteilung dieser Adhäsionskomplexe erklären? Im embryonalen Mesencephalon sind die Neuroepithelzellen über Adhäsionsstrukturen auf der apikalen Seite miteinander verbunden (Hinds und Ruffett, 1971; Shoukimas und Hinds, 1978; Aaku-Saraste et al., 1996). Während der symmetrischen Teilung werden die Adhäsionskomplexe gleichmäßig auf die beiden neu entstandenen Tochterzellen verteilt (Kosodo et al., 2004). Durch die erhöhte Proliferation, induziert durch Störung von Dystroglycan mittels Antikörper, wurden vermehrt Neuroepithelzellen auf der ventrikulären Seite generiert. Diese Zellen lagerten sich aufgrund von Platzmangel auf der apikalen Seite übereinander. Diese übereinander gelagerten Zellen könnten eine Erklärung für die in meiner Arbeit beobachtete, apikal lokalisierte, wabenartige Verteilung der Adhäsionskomplexe liefern.

Auch die Verteilung einiger basal konzentrierter Proteine, wie β -Dystroglycan, β 1-Integrin, α -Dystrobrevin und Utrophin, wurde auf Neuroepithelzellen immunhistochemisch untersucht. Diese Proteine wiesen nach den Injektionen eine veränderte Verteilung auf. Wie können Fab-Fragmentinjektionen die veränderte Verteilung der untersuchten basalen Proteine bewirken? Nach Störung der Interaktion der beiden Dystroglycane veränderten die Zellen ihre Morphologie und einige DAG-Komponenten waren nicht mehr zwischen der Kontaktstelle der Neuroepithelzellendfüße und Basalmembran konzentriert. Basolateral lokalisierte Proteine waren in apikalen Bereichen der Neuroepithelzellen des Mesencephalons nachweisbar. Das deutete auf eine gestörte Polarität der Zellen hin. Der DAG ist mit einigen signaltransduzierenden Molekülen assoziiert, die möglicherweise die Polarität über spezifische Signalreaktionswege fördern. Dystroglycan könnte durch die Interaktion unterschiedlicher Moleküle des DAG und über Signaltransduktionswegen, die Anreicherung und Stabilisierung basolateraler und apikal lokalisierter Proteine begünstigen. Für die Hypothese, dass Dystroglycan einen entscheidenden Einfluss auf die Polarität der Zellen ausübt, spricht auch die Studie von Deng et al., die die Funktion von Dystroglycan bei der Etablierung von Polarität in *Drosophila melanogaster* untersuchte. So wurde, unter anderem, die Polarität bei Dystroglycan-defizienten Follikelzellen untersucht. Epitheliale Follikelzellen besitzen, wie alle Epithelzellen, eine typisch apikal/basale Polarität. Ihre apikale Domäne ist den Keimbahnzellen zugewandt und ihre basale Seite kontaktiert die Basalmembran. Dystroglycan defiziente Follikelzellen verlieren ihre apikale/basale Polarität, da aus der einschichtigen Epithelzellschicht, mit einer apikalen und basalen Region, ein mehrschichtiges Epithelium entstanden ist (ohne diese epitheliale Orientierung). Außerdem konnte der Verlust der Polarität über Verteilungsänderung einiger apikaler Marker nachgewiesen werden. So wiesen apikal konzentrierte Proteine eine basale Lokalisation auf. Ferner wurde eine verringerte Anzahl basolateral lokalisierter Proteine beobachtet. Hingegen induzierte Überexpression von Dystroglycan eine Reduktion apikal lokalisierter Proteine (Deng et al., 2003). Vor kurzem wurde gezeigt, dass auf der basalen Seite des *Drosophila* Follikelzell-Epithelium die Interaktion von Dystroglycan mit Perlecan eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung der Basalmembran und somit bei der

Etablierung von Zellpolarität in Follikelzellen zukommt (Schneider et al., 2006). Im Wesentlichen stützen die Studien von Deng et al. und Schneider et al. die Daten der vorliegenden Arbeit, dass Dystroglycan eine wesentliche Rolle bei der Etablierung der basalen und apikalen Polarität der Neuroepithelzellen, spielt.

Auch andere Studien zeigen, dass Dystroglycan die Etablierung der Polarität von Epithelzellen fördert. So untersuchten Muschler et al. 2002 die Funktion von Dystroglycan in Brustepithelzellen. Hierzu wurden unterschiedliche Brust Karzinoma (Krebs) Zelllinien verwendet, in denen eine verringerte Expression von α -Dystroglycan und somit eine verringerte Bindung zu Laminin vorgefunden wurde. Er konnte anhand von Verteilungsänderung apikaler und basaler Polaritätsmarker den Verlust der Polarität, in einigen Zelllinien, in denen Dystroglycan verringert war, nachweisen. Überexpression von Dystroglycan in der Karzinoma Zelllinie T4-2 (Zelllinie ohne Polarität) bewirkt hingegen eine Etablierung von Polarität in diesen Zellen (Muschler et al., 2002).

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass Fab-Fragmentinjektionen in das Mesencephalon, zu Verteilungsänderung einiger apikaler und basaler Proteine und damit zu einem Polaritätsverlust innerhalb der Neuroepithelzellen, führen. Daraus lässt sich schließen, dass Dystroglycan für die Etablierung der Polarität in Neuroepithelzellen eine entscheidende Rolle zukommt.

4.8 Einflussnahme von Dystroglycan mittels Fab-Fragmenten auf das Wachstumsverhalten efferenter Axone des Mesencephalon

Die Wachstumskegel der ersten postmitotischen Neuronen im ZNS wachsen entlang der Neuroepithelzellendfüße und nutzen deren Endfuß-assoziierte Wegfindungsmoleküle (Thanos und Mey, 2001). Auf den Endfüßen der Neuroepithelzellen befinden sich eine Reihe von Oberflächenrezeptoren, die als Wegfindungsmoleküle der Axone notwendig sind. Eine der wichtigsten Wegfindungsmoleküle, die auf den Endfüßen exprimiert werden, stellt die Familie der Ephrine dar (Davenport et al., 1998; Stuckmann et al., 2001). Ephrine sind

Glykoproteine, die als Liganden so genannter Ephrin-Rezeptoren dienen. Trifft ein Wachstumskegel, auf dem Ephrin-Rezeptoren (Rezeptor-Tyrosinkinase) exprimiert werden, auf eine Zelle, die ein passendes Ephrin präsentiert, kollabieren an der Kontaktstelle deren Filopodien, während gleichzeitig an anderer Stelle neue Filopodien auswachsen. Es kommt zu einer Richtungsänderung und somit zu einer Steuerung des Axonwachstums. Auch unterschiedliche Adhäsionsproteine, die ebenfalls auf den Endfüßen exprimiert werden, wie zum Beispiel N-CAM, Nr-CAM und Ng-Cam, tragen zur richtigen Orientierung der Axone bei (Thanos und Mey, 2001).

Efferente (tectobulbäre) Axone wachsen innerhalb des Tectums von dorsal nach ventral. Sobald sie die ventrale Mittellinie erreicht haben, verändern sie abrupt ihre Wachstumsrichtung um 90° und wachsen entweder ipso- oder contralateral entlang der Mittellinie zum Metencephalon (Kröger und Schwarz, 1990; Shepherd und Taylor, 1995). Nach Fab-Fragmentinjektionen verlieren die Axone ihre Orientierung und wachsen ohne contra dorso-ventrale Orientierung. Wie kann Dystroglycan das Wachstumsverhalten der Axone des Mesencephalons beeinflussen? Arbeiten von Shcherbata et al. zeigen, dass Dystroglycan für das zielgerichtete axonale Wachstum essentiell erforderlich ist. So wurde bei der Analyse von Dystroglycan defizienten *Drosophila* Mutanten nicht nur Degeneration der Muskulatur, sondern auch eine strukturelle Veränderung des Gehirns, wie zum Beispiel, ein gestörtes Wachstumsverhalten von Axonen beobachtet (Shcherbata et al., 2007). Der Mechanismus, wie Dystroglycan das axonale Wachstumsverhalten beeinflusst, blieb allerdings ungeklärt. Die Ähnlichkeit des Phänotyps mit den Veränderungen im orientierten Wachstum von retinalen (Schröder et al., 2007) und in dieser Arbeit beschriebenen tectalen Axonen deutet auf einen mechanistischen Zusammenhang hin. Die nahe liegende Erklärung für den Verlust der Orientierung ist, dass die Störung der Interaktion zwischen α - und β -Dystroglycan durch die Injektion der Fab-Fragmente zum Verlust der Adhäsion der Endfüße an die Basalmembran und damit zu einem Verlust der Wegfindungsmoleküle in den Endfüßen führt. Es wurde schon in früheren Studien gezeigt, dass Wegfindungsmoleküle, die auf den Endfüßen der Neuroepithelzellen lokalisiert sind,

maßgeblich an der Orientierung der Axone beteiligt sein müssen. So beobachteten Stier und Schlosshauer bei ihren *in vitro* Experimenten mit Retina-Explantaten, dass die Endfüße der radialen Gliazellen bei der Wegfindung der Axone von retinalen Ganglienzellen eine essentielle Rolle einnehmen. Diese Axone wachsen, wenn sie in Gegenwart retinaler Gliazellendfüße kultiviert werden, zielgerichtet aus (Stier und Schlosshauer, 1999). Des Weiteren zeigen Experimente von Halfter et al., dass Axone, die in einer Umgebung ohne Endfüße wachsen, ihre Orientierung verlieren. Nach proteolytischem Verdau der Basalmembran verkürzt sich die Struktur der Neuroepithelzellen. Die Endfüße verlieren ihren Anheftungspunkt und ziehen sich zurück. Axone, die in dieser Schicht wachsen, verlieren ihr orientiertes Wachstum (Halfter und Schurer, 1998; Halfter, 1998).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Störung der Interaktion von α - und β -Dystroglycan, mittels Fab-Fragmenten, das Wachstumsverhalten efferenter Axone des Mesencephalons maßgeblich beeinflusst.

4.9 Einfluss von Dystroglycan auf die Augenentwicklung älterer Hühnerembryonen

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass Dystroglycan einen sehr großen Einfluss auf die ZNS Entwicklung von jüngeren Embryonalstadien ausübt, sollte die Funktion von Dystroglycan, im Hinblick auf die ZNS Entwicklung älterer embryonalen Stadien, analysiert werden. Um die Funktion von Dystroglycan in älteren Stadien untersuchen zu können, war die Retina, für alle weiteren Experimente, ein geeigneteres Gewebe als das Mesencephalon, da sie im Gegensatz zum Gehirn eine viel geringere Komplexität aufweist. Die Retina besteht aus wenigen, jedoch genau definierten Schichten, in denen sich präzise charakterisierte retinale Zelltypen befinden. Außerdem ist sie ein Teil des ZNS, weil sie während der Entwicklung aus einer Ausstülpung des Diencephalons entsteht (Rodieck, 1988). Für den Experimentator ist die Retina ein sehr leicht zugängliches Gewebe, dank ihrer exponierten Position. Des Weiteren ist die Lokalisation des DAG

in der adulten Retina, durch frühere Untersuchungen, genauestens bekannt. So findet man den DAG in der Säugetierretina an drei Stellen vor: In den Endfüßen von Müller-Gliazellen, den Endfüßen perivaskulärer Astrozyten und perisynaptisch lokalisiert in den Terminalien von Photorezeptoren (Blake und Kröger, 2000; Jastrow et al., 2006). Da jedoch die Hühnerretina, im Gegensatz zur Säugetierretina, keine Blutgefäße besitzt, ist dort der DAG nur in den Endfüßen der Müller-Gliazellen und den Terminalien der Photorezeptoren (Zapfen und Stäbchen) vorzufinden (Blank et al., 1997).

Vor dem Hintergrund, die Funktion von Dystroglycan bei der ZNS-Entwicklung in älteren embryonalen Stadien zu analysieren, ergaben sich eine Reihe von Fragen, von denen aber nur einige, im Rahmen dieser Arbeit, angesprochen wurden. Folgende Fragen sollten in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden: Können Injektionen die Retinaentwicklung maßgeblich beeinflussen? Welche Konsequenzen ergeben sich durch die Fab-Fragmentinjektionen für die OPL? Werden die Endfüße der Müller Gliazellen auch durch die Fab-Fragmentinjektionen betroffen? Um diese Fragen zu beantworten, entschied ich mich, Fab-Fragmente in das Auge von E12 Embryonen zu injizieren, da β -Dystroglycan in der OPL, in diesem embryonalen Stadium, schon immunhistochemisch nachweisbar ist (Blank et al., 2002). Außerdem sind die Müller-Gliazellen schon detektierbar und deutlich unterscheidbar von den anderen retinalen Zelltypen (Mey und Thanos, 2000). Daraus ergab sich die Möglichkeit, die Funktion des DAG durch Störung des Komplexes, mittels Antikörper oder Fab-Fragmenten, in den Photorezeptorterminalien innerhalb der OPL und in den Endfüßen der Müller-Gliazellen, in der sich entwickelnden Retina zu untersuchen.

Nach den täglichen Fab-Fragmentinjektionen, über insgesamt drei Tage, wurde die Retina (Embryonaltag E16-E18) entnommen und das Retinagewebe mit Hilfe unterschiedlicher Marker weiter analysiert. Dabei wurde eine Vielzahl morphologischer bzw. struktureller Veränderungen der Retina vorgefunden. So wiesen die Müller-Gliazellen und Stäbchen-Bipolarzellen, Zelltypen mit einer radiären Orientierung, die ähnlich ist wie die von Neuroepithelzellen, eine abgerundete Zellmorphologie auf. Außerdem waren die Müller-Gliazellen nur noch auf der

basolateralen Seite, unterhalb der Basalmembran, detektierbar. Wie können Fab-Fragmente die veränderte Morphologie der Zellen bewirken? Bei diesem Vorgang könnte ein ähnlicher Mechanismus wie in Kapitel 4.3 beschrieben, stattgefunden haben. So könnten Fab-Fragmente den Kontakt der Müller-Gliazellendfüße zur Basalmembran über Interaktionsstörungen von Dystroglycan unterbunden haben. Dabei könnten Signalkaskaden, ähnlich wie bei den Neuroepithelzellen beschrieben (siehe Kapitel 4.3), eine wesentliche Rolle spielen. Störung dieser spezifischen Signalkaskaden könnten das Ablösen der Zellendfüße von der Basalmembran sowie die Abrundung der Zellen fördern. Auch andere retinale Zelltypen, wie die Stäbchen-Bipolarzellen, verloren nach den Injektionen ihre radiäre Orientierung und waren nur noch als rundliche Zellen detektierbar. Wie kann diese Beobachtung erklärt werden? Bipolarzellen entstehen in der Retina relativ spät, nämlich am Embryonaltag E12, und reifen bis E18 (Mey und Thanos, 2000). Um zu migrieren benötigen sie, wie alle Neuronen, als Leitstrukturen neuronale Vorläuferzellen, unter anderem auch die Vorläufer der Müller-Gliazellen (Willbold und Layer, 1998). Möglicherweise kam es durch die Injektionen (E12-E15) zum Verlust der Leitstrukturen, da die Fab-Fragmente den Kontakt der neuronalen Vorläufer zur Basalmembran unterbunden haben, ähnlich wie in Kapitel 4.6 beschrieben. Vermutlich konnten Neuronen, unter anderem auch die Bipolarzellen, keine Zell-Ausläufer bilden, weil sie nicht in die für sie vorgesehene Schicht bzw. Position (INL, innere Körnerschicht) wandern konnten und dadurch möglicherweise keine Signale bekamen, die den Kontakt zu anderen retinalen Zelltypen, wie den Photorezeptoren, fördern. Auch andere Studien belegen, dass Dystroglycan für die Organisation retinaler Zellen bzw. Schichten unerlässlich ist. So wurde der Einfluss von Dystroglycan bei der Augenentwicklung in Froschembryonen ausgiebig untersucht. Aus der Herunterregulierung der Expression von Dystroglycan im ZNS von *Xenopus laevis* Embryonen resultierten ebenfalls schwerere strukturelle Veränderungen der Retina. So wurde unter anderem, in der Retina älterer Embryonalstadien, eine veränderte Verteilung von Photorezeptoren, Ganglienzellen und Bipolarzellen vorgefunden (Lunardi et al., 2006).

Für die Hypothese einer gestörten Migration retinaler Neuronen spricht auch die beobachtete veränderte Struktur der OPL, verbunden mit der veränderten

Verteilung von β -Dystroglycan sowie des synapsenassoziierten Protein PSD95. Auch die veränderte Verteilung der N-Cadherine (Marker für *adherence junctions*) und des ZO1-Proteins bestärkt die Annahme einer gestörten Migration und eine dadurch verursachte veränderte Struktur der Retina. In älteren Stadien bindet das ZO1-Protein auch an N-Cadherine und stellt deshalb ebenfalls ein Marker für *adherence junctions* dar (siehe Kapitel 3.6). N-Cadherine werden in der E18 Retina von den Photorezeptoren, Horizontalzellen und den Amakrinzellen exprimiert (Wöhrn et al., 1998). Nach den Fab-Fragmentinjektionen waren die apikal konzentrierten Adhäsionskomplexe nicht mehr detektierbar. Nur noch auf der basalen Seite konnten Adhäsionskomplexe mit einer größeren Intensität immunhistochemisch nachgewiesen werden. Vermutlich wurden retinale Zelltypen, die N-Cadherine exprimieren, auf der basolateralen Seite vermehrt akkumuliert. Eine gestörte Migration retinaler Neuronen könnte so die beobachtete, höhere Intensität der N-Cadherin und ZO1-Protein Immunreaktivität auf der basolateralen Seite erklären.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass Dystroglycan für die normale Entwicklung der Retina bzw. des ZNS, bei älteren Stadien ebenso wichtig ist wie bei jüngeren Embryonalstadien. Fab-Fragmentinjektionen induzieren eine veränderte Struktur der Retina, verbunden mit veränderten Schichten und einer veränderten Morphologie retinaler Zellen.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von Dystroglycan in jungen und späten Stadien des sich entwickelnden ZNS untersucht. Hierzu wurden Antikörper generiert, die fähig waren, *in vivo* die Interaktion zwischen α - und β -Dystroglycan zu stören. Die Antikörper oder Fab-Fragmente wurden in das Mesencephalon oder Auge lebender Hühnerembryonen injiziert, um aus den beobachteten Veränderungen die Funktion des DAG zu untersuchen.

Die Fab-Fragmentinjektionen führten zu Hyperproliferation, verbunden mit morphologischen Veränderungen der Neuroepithelzellen und Zunahme der Anzahl postmitotischer Neuronen. Ebenso wurde die basale und apikale Polarität von Neuroepithelzellen beeinflusst. Auch die Axonorientierung der tectobulbären Axone wurde durch die Injektionen gestört. In älteren embryonalen Stadien kam es, durch Fab-Fragmentinjektionen in die Augen von Embryonen, zu strukturellen Veränderungen der Retina, verbunden mit einer breiteren Verteilung des DAG, wie auch der Synapsen innerhalb der OPL. Die retinalen Zelltypen, wie Müller-Gliazellen und Stäbchen-Bipolarzellen, waren abgerundet und hatten ihre typische Zellform verloren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Dystroglycan einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferation, Migration, Polarität und Differenzierung der Neuroepithelzellen ausübt. Außerdem zeigen diese Daten, dass Dystroglycan nicht nur in der frühen embryonalen ZNS-Entwicklung eine maßgebliche Rolle spielt, sondern auch in späten Stadien. Die Ähnlichkeit der beobachteten Veränderungen nach Fab-Fragmentinjektionen legt nahe, dass einige Veränderungen im ZNS bestimmter Muskeldystrophieformen, durch Beeinflussung der Neuroepithelzellen im sich entwickelnden ZNS, verursacht werden.

VI. Literaturverzeichnis

Aaku-Saraste,E., Hellwig,A., and Huttner,W.B. (1996). Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure - remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev. Biol.* **180**, 664-679.

Adams,M.E., Mueller,H.A., and Froehner,S.C. (2001). In vivo requirement of the alpha-syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4. *J Cell Biol.* **155**, 113-122.

Ahn,A.H. and Kunkel,L.M. (1995). Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. *J Cell Biol.* **128**, 363-371.

Anderson,J.L., Head,S.I., Rae,C., and Morley,J.W. (2002). Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain* **125**, 4-13.

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

Barresi,R. and Campbell,K.P. (2006). Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci.* **119**, 199-207.

Beltran-Valero,D.B., Currier,S., Steinbrecher,A., Celli,J., Van Beusekom,E., Van Der,Z.B., Kayserili,H., Merlini,L., Chitayat,D., Dobyns,W.B., Cormand,B., Lehesjoki,A.E., Cruces,J., Voit,T., Walsh,C.A., Van Bokhoven,H., and Brunner,H.G. (2002). Mutations in the O-Mannosyltransferase Gene POMT1 Give Rise to the Severe Neuronal Migration Disorder Walker-Warburg Syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* **71**, 1033-1043.

Benaud,C.M. and Dickson,R.B. (2001). Adhesion-regulated G1 cell cycle arrest in epithelial cells requires the downregulation of c-Myc. *Oncogene* **20**, 4554-4567.

Bernard,P. and Couturier,M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J.Mol.Biol.* **226**, 735-745.

Bernard,P., Gabant,P., Bahassi,E.M., and Couturier,M. (1994). Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene.* **148**, 71-74.

Bernard,P., Kezdy,K.E., Van Melderren,L., Steyaert,J., Wyns,L., Pato,M.L., Higgins,P.N., and Couturier,M. (1993). The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J.Mol.Biol.* **234**, 534-541.

Bewick,G.S., Nicholson,L.V.B., Young,C., and Slater,C.R. (1993). Relationship of a dystrophin-associated glycoprotein to junctional acetylcholine receptor clusters in rat skeletal muscle. *Neuromusc.Dis.* **3**, 503-506.

Blake,D.J. and Kröger,S. (2000). The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends Neurosci.* **23**, 92-99.

- Blake,D.J., Nawrotzki,R., Peters,M.F., Froehner,S.C., and Davies,K.E.** (1996). Isoform diversity of dystrobrevin, the murine 87-kDa postsynaptic protein. *J Biol Chem.* **271**, 7802-7810.
- Blake,D.J., Tinsley,J.M., Davies,K.E., Knight,A.E., Winder,S.J., and Kendrick-Jones,J.** (1995). Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends Biochem.Sci.* **20**, 133-135.
- Blake,D.J., Weir,A., Newey,S.E., and Davies,K.E.** (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.* **82**, 291-329.
- Blank,M.** (1999). Der Dystrophin-assozierte Proteinkomplex in der Retina: Verteilung, Funktion, Entwicklung und Interaktionen. Dissertation, Fachbereich Biologie, Universität Mainz.
- Blank,M., Blake,D.J., and Kröger,S.** (2002). Molecular diversity of the dystrophin-like protein complex in the developing and adult avian retina. *Neurosci.* **111**, 259-273.
- Blank,M., Koulen,P., Blake,D.J., and Kröger,S.** (1999a). Dystrophin and beta-dystroglycan in photoreceptor terminals from normal and *mdx*^{3Cv} mouse retinae. *Eur J Neurosci.* **11**, 2121-2133.
- Blank,M., Koulen,P., and Kroger,S.** (1997). Subcellular concentration of beta-dystroglycan in photoreceptors and glial cells of the chick retina. *J Comp Neurol.* **389**, 668-678.
- Boito,C.A., Melacini,P., Vianello,A., Prandini,P., Gavassini,B.F., Bagattin,A., Siciliano,G., Angelini,C., and Pegoraro,E.** (2005). Clinical and molecular characterization of patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Arch Neurol.* **62**, 1894-1899.
- Bowe,M.A., Deyst,K.A., Leszyk,J.D., and Fallon,J.R.** (1994). Identification and purification of an Agrin receptor from Torpedo postsynaptic membranes - A heteromeric complex related to the Dystroglycans. *Neuron* **12**, 1173-1180.
- Bowe,M.A., Mendis,D.B., and Fallon,J.R.** (2000). The small leucine-rich repeat proteoglycan biglycan binds to alpha-dystroglycan and is upregulated in dystrophic muscle. *J Cell Biol.* **148**, 801-810.
- Bozzi,M., Veglia,G., Paci,M., Sciandra,F., Giardina,B., and Brancaccio,A.** (2001). A synthetic peptide corresponding to the 550-585 region of alpha-dystroglycan binds beta-dystroglycan as revealed by NMR spectroscopy. *FEBS Letters* **499**, 210-214.
- Bredt,D.S.** (1999). Knocking signalling out of the dystrophin complex. *Nat Cell Biol.* **1**, E89-E91.
- Brenman,J.E. and Bredt,D.S.** (1997). Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol.* **7**, 374-378.

- Brenman,J.E. and Bredt,D.S.** (1996). Nitric oxide signaling in the nervous system. *Methods Enzymol.* **269**, 119-129.
- Brockington,M., Blake,D.J., Prandini,P., Brown,S.C., Torelli,S., Benson,M.A., Ponting,C.P., Estournet,B., Romero,N.B., Mercuri,E., Voit,T., Sewry,C.A., Guicheney,P., and Muntoni,F.** (2001a). Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha 2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet.* **69**, 1198-1209.
- Brockington,M., Yuva,Y., Prandini,P., Brown,S.C., Torelli,S., Benson,M.A., Herrmann,R., Anderson,L.V.B., Bashir,R., Burgunder,J.M., Fallet,S., Romero,N., Fardeau,M., Straub,V., Storey,G., Pollitt,C., Richard,I., Sewry,C.A., Bushby,K., Voit,T., Blake,D.J., and Muntoni,F.** (2001b). Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet.* **10**, 2851-2859.
- Burnette,W.N.** (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
- Bushby,K.M.** (1999). The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms. *Hum Mol Genet.* **8**, 1875-1882.
- Campbell,K.P.** (1995). Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* **80**, 675-679.
- Campbell,K.P. and Stull J.T.** (2003). Skeletal muscle basement membrane-sarcolemma-cytoskeleton interaction. *J Biol Chem.* **278**, 12599-12600.
- Cann,G.M., Bradshaw A.D., Gervin,D.B., Hunter,A.W., and Clegg D.O.** (1996). Widespread expression of beta1 integrins in the developing chick retina: evidence for a role in migration of retinal ganglion cells. *Dev Biol.* **180**, 82-96.
- Caviness,V.S.J., Takahashi,T., and Nowakowski,R.S.** (1995). Numbers, time and neocortical neuronogenesis: A general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci.* **18**, 379-383.
- Chan,Y., Bonnemann,C., and Kunkel,L.M.** (1998). Molecular organization of the sarcoglycan complex in cultures mouse muscle cells. *Mol Biol Cell.* **9**, 1216.
- Chenn,A. and McConnell,S.K.** (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* **82**, 631-641.
- Chung,W. and Campanelli,J.T.** (1999). WW and EF hand domains of dystrophin-family proteins mediate dystroglycan binding. *Mol.Cell Biol.Res.Commun.* **2**, 162-171.

- Claudepierre,T., Dalloz,C., Mornet,D., Matsumura,K., Sahel,J., and Rendon,A.** (2000a). Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Müller glial cells. *J.Cell Sci.* **113**, 3409-3417.
- Claudepierre,T., Mornet,D., Pannicke,T., Forster,V., Dalloz,C., Bolanos,F., Sahel,J., Reichenbach,A., and Rendon,A.** (2000b). Expression of Dp71 in Müller glial cells: A comparison with utrophin- and dystrophin-associated proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **41**, 294-304.
- Claudepierre,T., Rodius,F., Frasson,M., Fontaine,V., Picaud,S., Dreyfus,H., Mornet,D., and Rendon,A.** (1999). Differential distribution of dystrophins in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **40**, 1520-1529.
- Cormand,B., Pihko,H., Bayes,M., Valanne,L., Santavuori,P., Talim,B., Gershoni-Baruch,R., Ahmad,A., Van Bokhoven,H., Brunner,H.G., Voit,T., Topaloglu,H., Dobyns,W.B., and Lehesjoki,A.E.** (2001). Clinical and genetic distinction between Walker-Warburg syndrome and muscle-eye-brain disease. *Neurology* **56**, 1059-1069.
- Costell,M., Gustafsson,E., Aszodi,A., Morgelin,M., Bloch,W., Hunziker,E., Addicks,K., Timpl,R., and Fassler,R.** (1999). Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol.* **147**, 1109-1122.
- Crosbie,R.H., Heighway,J., Venzke,D.P., Lee,J.C., and Campbell,K.P.** (1997). Sarcospan, the 25-kda transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem.* **272**, 31221-31224.
- Crosbie,R.H., Lebakken,C.S., Holt,K.H., Venzke,D.P., Straub,V., Lee,J.C., Grady,R.M., Chamberlain,J.S., Sanes,J.R., and Campbell,K.P.** (1999). Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex. *J Cell Biol.* **145**, 153-165.
- Cunningham,J.J. and Roussel,M.F.** (2001). Cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of the central nervous system. *Cell Growth Differ.* **12**, 387-396.
- DasGupta,R. and Fuchs,E.** (1999). Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Dev.* **126**, 4557-4568.
- Davenport,R.W., Thies,E., Zhou,R.P., and Nelson,P.G.** (1998). Cellular localization of ephrin-A2, ephrin-A5, and other functional guidance cues underlies retinotopic development across species. *J Neurosci.* **18**, 975-986.
- Davies,K.E. and Nowak,K.J.** (2006). Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**, 762-773.
- Deng,W.M., Schneider,M., Frock,R., Castillejo-Lopez,C., Baumgartner,S., and Ruohola-Baker,H.** (2003). Dystroglycan is required for polarizing the epithelial cells and the oocyte in *Drosophila*. *Dev.* **130**, 173-184.

- Dirks,P.B. and Rutka,J.T.** (1997). Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle. *Neurosurgery* **40**, 1000-1015.
- Drenckhahn,D. and Dermietzel,R.** (1988). Organization of the actin filament cytoskeleton in the intestinal brush border: a quantitative and qualitative immunoelectron microscope study. *J Cell Biol.* **107**, 1037-1048.
- Drenckhahn,D., Holbach,M., Ness,W., Schmitz,F., and Anderson,L.V.B.** (1996). Dystrophin and the dystrophin-associated glycoprotein, beta- dystroglycan, co-localize in photoreceptor synaptic complexes of the human retina. *Neurosci* **73**, 605-612.
- Durbeej,M. and Campbell,K.P.** (2002). Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev.* **12**, 349-361.
- Durbeej,M., Talts,J.F., Henry,M.D., Yurchenco,P.D., Campbell,K.P., and Ekblom,P.** (2001). Dystroglycan binding to laminin alpha 1LG4 module influences epithelial morphogenesis of salivary gland and lung in vitro. *Differentiation* **69**, 121-134.
- Dyer,M.A. and Cepko,C.L.** (2000). p57(Kip2) regulates progenitor cell proliferation and amacrine interneuron development in the mouse retina. *Dev.* **127**, 3593-3605.
- Dyer,M.A. and Cepko,C.L.** (2001a). p27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations. *J Neurosci.* **21**, 4259-4271.
- Dyer,M.A. and Cepko,C.L.** (2001b). Regulating proliferation during retinal development. *Nat.Rev.Neurosci.* **2**, 333-342.
- Ervasti,J.M. and Campbell,K.P.** (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol.* **122**, 809-823.
- Esapa,C.T., Benson,M.A., Schröder,J.E., Martin-Rendon,E., Brockington,M., Brown,S.C., Muntoni,F., Kröger,S., and Blake,D.J.** (2002). Functional requirements for fukutin-related protein in the Golgi apparatus. *Hum Mol Genet.* **11**, 3319-3331.
- Fanning,A.S., Jameson,B.J., Jesaitis,L.A., and Anderson,J.M.** (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* **273**, 29745-29753.
- Fero,M.L., Rivkin,M., Tasch,M., Porter,P., Carow,C.E., Firpo,E., Polyak,K., Tsai,L.H., Broudy,V., Perlmutter,R.M., Kaushansky,K., and Roberts,J.M.** (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* **85**, 733-744.

- Fleming,T.P., Papenbrock,T., Fesenko,I., Hausen,P., and Sheth,B.** (2000). Assembly of tight junctions during early vertebrate development. *Seminars in Cell & Dev.Biol.* **11**, 291-299.
- Förster,E., Tielsch,A., Saum,B., Weiss,K.H., Johanssen,C., Graus-Porta,D., Müller,U., and Frotscher,M.** (2002). Reelin, Disabled 1, and beta 1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 13178-13183.
- Fujita,S.** (1964). Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. *J Comp Neurol.* **122**, 311-328.
- Fukuyama,Y., Osawa,M., and Suzuki,H.** (1981). Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama t. *Brain Dev.* **3**, 1-29.
- Furuse,M., Hata,M., Furuse,K., Yoshida,Y., Haratake,A., Sugitani,Y., Noda,T., Kubo,A., and Tsukita,S.** (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* **156**, 1099-1111.
- Furuse,M., Itoh,M., Hirase,T., Nagafuchi,A., Yonemura,S., Tsukita,S., and Tsukita,Sh.** (1994). Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol.* **127**, 1617-1626.
- Gänzler-Odenthal,S.I.I. and Redies,C.** (1998). Blocking N-cadherin function disrupts the epithelial structure of differentiating neural tissue in the embryonic chicken brain. *J. of Neurosci.* **18**, 5415-5425.
- Gat,U., DasGupta,R., Degenstein,L., and Fuchs,E.** (1998). *De novo* hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated β -catenin in skin. *Cell* **95**, 605-614.
- Gorecki,D.C., Derry,J.M., and Barnard,E.A.** (1994). Dystroglycan: brain localisation and chromosome mapping in the mouse. *Hum Mol Genet.* **3**, 1589-1597.
- Götz,M., Hartfuss,E., and Malatesta,P.** (2002). Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Res.Bull.* **57**, 777-788.
- Götz,M. and Huttner,W.B.** (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 777-788.
- Götz,M., Stoykova,A., and Gruss,P.** (1998). Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* **21**, 1031-1044.
- Grady,R.M., Grange,R.W., Lau,K.S., Maimone,M.M., Nichol,M.C., Stull,J.T., and Sanes,J.R.** (1999). Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nat Cell Biol.* **1**, 215-220.

Graus-Porta,D., Blaess,S., Senften,M., Littlewood-Evans,A., Damsky,C., Huang,Z., Orban,P., Klein,R., Schittny,J.C., and Muller,U. (2001). beta 1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron* **31**, 367-379.

Greferath,U., Grünert,U., and Wässle,H. (1990). Rod bipolar cells in the mammalian retina show protein kinase C- like immunoreactivity. *J Comp Neurol.* **301**, 433-442.

Grewal,P.K. and Hewitt,J.E. (2002). Mutation of Large, which encodes a putative glycosyltransferase, in an animal model of muscular dystrophy. *Biochim.Biophys.Acta* **1573**, 216-224.

Grewal,P.K., Holzfeind,P.J., Bittner,R.E., and Hewitt,J.E. (2001). Mutant glycosyltransferase and altered glycosylation of alpha-dystroglycan in the myodystrophy mouse. *Nat Genet.* **28**, 151-154.

Groszer,M., Erickson,R., Scripture-Adams,D.D., Lesche,R., Trumpp,A., and Zack,J.A. (2001). Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science* **294**, 2186-2189.

Halfter,W. (1998). Disruption of the retinal basal lamina during early embryonic development leads to a retraction of vitreal end feet, an increased number of ganglion cells, and aberrant axonal outgrowth. *J Comp Neurol.* **397**, 89-104.

Halfter,W., Dong,S.C., Balasubramani,M., and Bier,M.E. (2001). Temporary disruption of the retinal basal lamina and its effect on retinal histogenesis. *Dev Biol.* **238**, 79-96.

Halfter,W., Dong,S.C., Yip,Y.P., Willem,M., and Mayer,U. (2002). A critical function of the pial basement membrane in cortical histogenesis. *J Neurosci.* **22**, 6029-6040.

Halfter,W., Reckhaus,W., and Kröger,S. (1987). Nondirected axonal growth on basal lamina from avian embryonic neural retina. *J Neurosci.* **7**, 3712-3722.

Halfter,W. and Schurer,B. (1998). Disruption of the pial basal lamina during early avian embryonic development inhibits histogenesis and axonal pathfinding in the optic tectum. *J Comp Neurol.* **397**, 105-117.

Haltia,M., Leivo,I., Somer,H., Pihko,H., Paetau,A., Kivela,T., Tarkkanen,A., Tome,F., Engvall,E., and Santavuori,P. (1997). Muscle-eye-brain disease: A neuropathological study. *Ann.Neurol.* **41**, 173-180.

Hartfuss,E., Förster,E., Bock,H.H., Hack,M.A., Leprince,P., Luque,J.M., Herz,J., Frotscher,M., and Götz,M. (2003). Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. *Dev.* **130**, 4597-4609.

Hartfuss,E., Galli,R., Heins,N., and Götz,M. (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol.* **229**, 15-30.

- Haubst,N., Georges-Labouesse,E., De Arcangelis,A., Mayer,U., and Götz,M.** (2006). Basement membrane attachment is dispensable for radial glial cell fate and for proliferation, but affects positioning of neuronal subtypes. *Dev.* **133**, 3245-3254.
- Henry,M.D. and Campbell,K.P.** (1998). A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell* **95**, 859-870.
- Hering,H., Koulen,P., and Kröger,S.** (2000). Distribution of the integrin $\beta 1$ subunit on radial cells in the embryonic and adult avian retina. *J Comp Neurol.* **424**, 153-164.
- Herrmann,R., Straub,V., Blank,M., Kutzick,C., Franke,N., Jacob,E.N., Lenard,H.G., Kröger,S., and Voit,T.** (2000). Dissociation of the dystroglycan complex in caveolin-3-deficient limb girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* **9**, 2335-2340.
- Hinds,J.W. and Ruffett,T.L.** (1971). Cell proliferation in the neural tube: an electron microscopic and Golgi analysis in the mouse cerebral vesicle. *Z.Zellforsch.* **115**, 226-264.
- Hlsken,J. and Behrens,J.** (2000). The Wnt signalling pathway. *J.Cell.Sci.* **113**, 3545-3546.
- Hochuli,E.** (1988). Large-scale chromatography of recombinant proteins. *J Chromatogr.* **444**, 293-302.
- Hohenester,E., Tisi,D., Talts,J.F., and Timpl,R.** (1999). The crystal structure of a laminin G-like module reveals the molecular basis of alpha-dystroglycan binding to laminins, perlecan, and agrin. *Mol.Cell* **4**, 783-792.
- Holt,K.H., Crosbie,R.H., Venzke,D.P., and Campbell,K.P.** (2000). Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide. *FEBS Lett.* **468**, 79-83.
- Holzfeind,P.J., Grewal,P.K., Reitsamer,H.A., Kechvar,J., Lassmann,H., Hoeger,H., Hewitt,J.E., and Bittner,R.E.** (2002). Skeletal, cardiac and tongue muscle pathology, defective retinal transmission, and neuronal migration defects in the Large(myd) mouse defines a natural model for glycosylation- deficient muscle-eye-brain disorders. *Hum Mol Genet.* **11**, 2673-2687.
- Honig,M.G., Camilli,S.J., and Xue,Q.S.** (2002). Effects of L1 blockade on sensory axon outgrowth and pathfinding in the chick hindlimb. *Dev Biol.* **243**, 137-157.
- Huang,X., Poy,F., Zhang,R.G., Joachimiak,A., Sudol,M., and Eck,M.J.** (2000). Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nat Struct Biol.* **7**, 634-638.
- Huttner,W.B. and Kosodo,Y.** (2005). Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr Opin Cell Biol.* **17**, 648-657.

- Hynes,R.O.** (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25.
- Hyser,C.L. and Mendell,J.R.** (1988). Recent advances in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neurol.Clinics* **6**, 429-453.
- Ibraghimov-Beskrovnaya,O., Ervasti,J.M., Leveille,C.J., Slaughter,C.A., Sernett,S.W., and Campbell,K.P.** (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* **355**, 696-702.
- Ibraghimov-Beskrovnaya,O., Milatovich,A., Ozcelik,T., Yang,B., Koepnick,K., Francke,U., and Campbell,K.P.** (1993). Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum.Mol.Gen.* **2**, 1651-1657.
- Ilisley,J.L., Sudol,M., and Winder,S.J.** (2001). The interaction of dystrophin with beta-dystroglycan is regulated by tyrosine phosphorylation. *Cell Signal.* **13**, 625-632.
- Imbert,A., Eelkeman,R., Jordan,S., Feiner,H., and Cowin,P.** (2001). Delta N89 β -catenin induces precocious development, differentiation, and neoplasia in mammary gland. *J Cell Biol.* **153**, 555-568.
- Ishikawa-Sakurai,M., Yoshida,M., Imamura,M., Davies,K.E., and Ozawa,E.** (2004). ZZ domain is essentially required for the physiological binding of dystrophin and utrophin to beta-dystroglycan. *Hum Mol Genet.* **13**, 693-702.
- Itoh,M., Nagafuchi,A., Yonemura,S., Kitani-Yasuda,T., Tsukita,S., and Tsukita,S.** (1993). The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol.* **121**, 491-502.
- Jagadha,V. and Becker,L.E.** (1988). Brain morphology in Duchenne muscular dystrophy: a Golgi study. *Pediatr.Neurol.* **4**, 87-92.
- James,M., Nuttall,A., Ilisley,J.L., Ottersbach,K., Tinsley,J.M., Sudol,M., and Winder,S.J.** (2000). Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan regulates its interaction with utrophin. *J.Cell Sci.* **113**, 1717-1726.
- Jamora,C.** (2002). Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol.* **4**, E101-E108.
- Jastrow,H., Koulen,P., Altrock,W.D., and Kroger,S.** (2006). Identification of a beta-dystroglycan immunoreactive subcompartment in photoreceptor terminals. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **47**, 17-24.
- Jimenez-Mallebrera,C., Brown,S.C., Sewry,C.A., and Muntoni,F.** (2005). Congenital muscular dystrophy: molecular and cellular aspects. *Cell Mol Life Sci.* **62**, 809-823.

- Judge,L.M., Haraguchi,M., and Chamberlain,J.S.** (2006). Dissecting the signaling and mechanical functions of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Cell Sci.* **119**, 1537-1546.
- Jung,D., Yang,B., Meyer,J., Chamberlain,J.S., and Campbell,K.P.** (1995). Identification and Characterization of the Dystrophin Anchoring Site on Beta-Dystroglycan. *J Biol Chem.* **270**, 27305-27310.
- Jurado,L.A.P., Coloma,A., and Cruces,J.** (1999). Identification of a human homolog of the Drosophila rotated abdomen gene (POMT1) encoding a putative protein O-mannosyl- transferase, and assignment to human chromosome 9q34.1. *Genomics* **58**, 171-180.
- Kamei,Y.** (1998). Visualization of mitotic radial glial lineage cells in the developing rat brain by Cdc2 kinase-phosphorylated vimentin. *Glia* **23**, 191-199.
- Kanagawa,M., Saito,F., Kunz,S., Yoshida-Moriguchi,T., Barresi,R., Kobayashi,Y.M., Muschler,J., Dumanski,J.P., Michele,D.E., Oldstone,M.B.A., and Campbell,K.P.** (2004). Molecular recognition by LARGE is essential for expression of functional dystroglycan. *Cell* **117**, 953-964.
- Kano,H., Kobayashi,K., Herrmann,R., Tachikawa,M., Manya,H., Nishino,I., Nonaka,I., Straub,V., Talim,B., Voit,T., Topaloglu,H., Endo,T., Yoshikawa,H., and Toda,T.** (2002). Deficiency of alpha-dystroglycan in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun.* **291**, 1283-1286.
- Khurana,T.S., Watkins,S.C., and Kunkel,L.M.** (1992). The subcellular distribution of chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in the brain. *J Cell Biol.* **119**, 357-366.
- Kirschner,J. and Bonnemann,C.G.** (2004). The congenital and limb-girdle muscular dystrophies - Sharpening the focus, blurring the boundaries. *Arch Neurol.* **61**, 189-199.
- Kobayashi,K., Nakahori,Y., Miyake,M., Matsumura,K., Kondo-Iida,E., Nomura,Y., Segawa,M., Yoshioka,M., Saito,K., Osawa,K., Hamano,K., Sakakihara,Y., Nonaka,I., Nakagome,Y., Kanazawa,I., Nakamura,Y., Tokunaga,K., and Toda,T.** (1998). An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* **394**, 388-392.
- Kobielak,A.** (2004). alpha-catenin: At the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nature Rev.Mol.Cell Biol.* **5**, 614-625.
- Koenig,M., Hoffman,E.P., Bertelson,C.J., Monaco,A.P., Feener,C., and Kunkel,L.M.** (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* **50**, 509-517.

- Kornau,H.C., Schenker,L.T., Kennedy,M.B., and Seeburg,P.H.** (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* **269**, 1737-1740.
- Kosodo,Y., Röper,K., Haubensak,W., Marzesco,A.M., Corbeil,D., and Huttner,W.B.** (2004). Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *EMBO J.* **23**, 2314-2324.
- Koulen,P., Blank,M., and Kröger,S.** (1998a). Differential distribution of beta-dystroglycan in rabbit and rat retina. *J Neurosci Res.* **51**, 735-747.
- Koulen,P., Fletcher,E.L., Craven,S.E., Bredt,D.S., and Wässle,H.** (1998b). Immunocytochemical localization of the postsynaptic density protein PSD-95 in the mammalian retina. *J Neurosci Res.* **18**, 10136-10149.
- Kröger,S. and Mann,S.** (1996). Biochemical and functional characterization of basal lamina-bound agrin in the chick central nervous system. *Eur J Neurosci.* **8**, 500-509.
- Kröger,S. and Niehörster,L.** (1990). Isolation, characterization, and substrate properties of the external limiting membrane from the avian embryonic optic tectum. *J Neurosci Res.* **27**, 169-183.
- Kröger,S. and Schwarz,U.** (1990). The avian tectobulbar tract: development, explant culture, and effects of antibodies on the pattern of neurite outgrowth. *J Neurosci.* **10**, 3118-3134.
- Layer,P.G., Rommel,S., Bülthoff,H., and Hengstenberg,R.** (1988). Independent spatial waves of biochemical differentiation along the surface of chicken brain as revealed by the sequential expression of acetylcholinesterase. *Cell Tissue Res.* **251**, 587-595.
- Le,T.T., Wroblewski,E., Patel,S., Riesenberger,A.N., and Brown,N.L.** (2006). Math5 is required for both early retinal neuron differentiation and cell cycle progression. *Dev Biol.* **295**, 764-778.
- Lee,Y., Kameya,S., Cox,G., Hsu,J., Hicks,W., Maddatu,T., Smith,R., Naggert,J., Peachey,N., and Nishina,PM.** (2005). Ocular abnormalities in Large(myd) and Large(vls) mice, spontaneous models for muscle, eye, and brain diseases. *Mol Cell Neurosci.* **2**, 160-172.
- Lemmon,V. and Rieser,G.** (1983). The developmental distribution of vimentin in the chick retina. *Dev Brain Res.* **11**, 191-197.
- Lidov,H.G.** (1996). Dystrophin in the nervous system. *Brain Pathol.* **6**, 63-77.
- Lim,L.E. and Campbell,K.P.** (1998). The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr.Opin.Neurol.* **11**, 443-452.
- Lunardi,A., Cremisi,F., and Dente,L.** (2006). Dystroglycan is required for proper retinal layering. *Dev Biol.* **290**, 411-420.

- Madhavan,R. and Jarrett,H.W.** (1999). Phosphorylation of dystrophin and alpha-syntrophin by Ca²⁺-calmodulin dependent protein kinase II. *Biochim Biophys Acta.* **1434**, 260-274.
- Matsumura,K., Yamada,H., Saito,F., Sunada,Y., and Shimizu,T.** (1997). The role of dystroglycan, a novel receptor of laminin and agrin, in cell differentiation. *Histol Histopathol.* **12**, 195-203.
- Mey,J. and Thanos,S.** (2000). Development of the visual system of the chick - I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res Rev.* **32**, 343-379.
- Meyer,G., De Rouvroit,C.L., Goffinet,A.M., and Wahle,P.** (2003). Disabled-1 mRNA and protein expression in developing human cortex. *Eur J Neurosci.* **17**, 517-525.
- Meyer,S.U. and Henke-Fahle,S.** (1995). Antibodies against the T61 antigen inhibit neuronal migration in the chick optic tectum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 11150-11154.
- Michele,D.E., Barresi,R., Kanagawa,M., Saito,F., Cohn,R.D., Satz,J.S., Dollar,J., Nishino,I., Kelley,R.I., Somer,H., Straub,V., Mathews,K.D., Moore,S.A., and Campbell,K.P.** (2002). Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* **418**, 417-422.
- Miyata,T., Kawaguchi,A., Okano,H., and Ogawa,M.** (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* **31**, 727-741.
- Moore,S.A., Saito,F., Chen,J.G., Michele,D.E., Henry,M.D., Messing,A., Cohn,R.D., Ross-Barta,S.E., Westra,S., Williamson,R.A., HOSHI,T., and Campbell,K.P.** (2002). Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature* **418**, 422-425.
- Morest et.al.** (1970). A study of neurogenesis in the forebrain of the opossum pouch young. *Z.Anat.Entwicklungsgesch.* **130**, 265-305.
- Moukhles,H. and Carbonetto,S.** (2001). Dystroglycan contributes to the formation of multiple dystrophin-like complexes in brain. *J Neurochem.* **78**, 824-834.
- Muntoni,F., Brockington,M., Blake,D.J., Torelli,S., and Brown,S.C.** (2002). Defective glycosylation in muscular dystrophy. *Lancet* **360**, 1419-1421.
- Muntoni,F. and Voit,T.** (2004). The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. *Neuromuscul Disord.* **14**, 635-649.
- Muschler,J., Levy,D., Boudreau,R., Henry,M., Campbell,K., and Bissell,M.J.** (2002). A role for dystroglycan in epithelial polarization: Loss of function in breast tumor cells. *Cancer Res.* **62**, 7102-7109.

- Nakayama,K., Ishida,N., Shirane,M., Inomata,A., Inoue,T., Shishido,N., Horii,I., Loh,D.Y., and Nakayama,K.** (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* **85**, 707-720.
- Nico,B., Quondamatteo,F., Herken,R., Marzullo,A., Corsi,P., Bertossi,M., Russo,G., Ribatti,D., and Roncali,L.** (1999). Developmental expression of ZO-1 antigen in the mouse blood-brain barrier. *Brain Res Dev Brain Res.* **64**, 2598-2606.
- Nigg,E.A.** (1995). Cyclin dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* **17**, 471-480.
- Noctor,S.C., Flint,A.C., Weissman,T.A., Dammerman,R.S., and Kriegstein,A.R.** (2001). Neurons derived from radial glia cells establish radial units in neocortex. *Nature* **409**, 714-720.
- Noctor,S.C., Martinez-Cerdeno,V., Ivic,L., and Kriegstein,A.R.** (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci.* **7**, 136-144.
- Ohlendieck,K., Ervasti,J.M., Matsumura,K., Kahl,S.D., Leveille,C.J., and Campbell,K.P.** (1991). Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. *Neuron* **7**, 499-508.
- Ohnuma,S. and Harris,W.A.** (2003). Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron.* **40**, 199-208.
- Pap,M. and Cooper,G.M.** (1998). Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem.* **273**, 19929-19932.
- Parnavelas,J.G. and Nadarajah,B.** (2001). Radial glial cells. are they really glia? *Neuron* **31**, 881-884.
- Pasternak,C., Wong,S., and Elson,E.L.** (1995). Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J Cell Biol.* **128**, 355-361.
- Peters,M.F., Adams,M.E., and Froehner,S.C.** (1997). Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J Cell Biol.* **138**, 81-93.
- Peters,M.F., Sadoulet-Puccio,H.M., Grady,R.M., Kramarcy,N.R., Kunkel,L.M., Sanes,J.R., Sealock,R., and Froehner,S.C.** (1998). Differential membrane localization and intermolecular associations of alpha-dystrobrevin isoforms in skeletal muscle. *J Cell Biol.* **142**, 1269-1278.
- Pinkstaff,J.K., Detterich,J., Lynch,G., and Gall,C.** (1999). Integrin subunit gene expression is regionally differentiated in adult brain. *J Neurosci.* **19**, 1541-1556.

- Puwarawuttipanit,W., Bragg,A.D., Frydenlund,D.S., Mylonakou,M.N., Nagelhus,E.A., Peters,M.F., Kotchabhakdi,N., Adams,M.E., Froehner,S.C., Haug,F.M., Ottersen,O.P., and Amiry-Moghaddam,M.** (2006). Differential effect of alpha-syntrophin knockout on aquaporin-4 and Kir4.1 expression in retinal macroglial cells in mice. *Neurosci.* **137**, 165-175.
- Qu,Q., Crandall,J.E., Luo,T., McCaffery,P.J., and Smith,F.I.** (2006). Defects in tangential neuronal migration of pontine nuclei neurons in the *Largemyd* mouse are associated with stalled migration in the ventrolateral hindbrain. *Eur J Neurosci.* **23**, 2877-2886.
- Radice,G.L., Rayburn,H., Matsunami,H., KNUDSEN,K.A., Takeichi,M., and Hynes,R.O.** (1997). Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol.* **181**, 64-78.
- Rando,T.A.** (2001). The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* **24**, 1575-1594.
- Redies,C.** (2000). Cadherins in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* **61**, 611-648.
- Rodieck,R.W.** (1988). The primate Retina. *Comp. Primate Biol.* **4**, 203-278.
- Rooney,J.E., Welser,J.V., Flintoff-Dye,N.L., Kaufman,S.J., and Burkin,D.J.** (2006). Severe muscular dystrophy in mice that lack dystrophin and alpha7 integrin. *J Cell Sci.* **119**, 2185-2195.
- Rosa,G., Ceccarini,M., Cavaldesi,M., Zini,M., and Petrucci,T.C.** (1996). Localization of the dystrophin binding site at the carboxyl terminus of beta-dystroglycan. *Biochem Biophys Res Commun.* **223**, 272-277.
- Ross,M.E., Carter,M.L., and Lee,J.H.** (1996). MN20, a D2 cyclin, is transiently expressed in selected neural populations during embryogenesis. *J Neurosci.* **16**, 210-219.
- Russo,K., Di Stasio,E., Macchia,G., Rosa,G., Brancaccio,A., and Petrucci,T.C.** (2000). Characterization of the beta-dystroglycan-growth factor receptor 2 (Grb2) interaction. *Biochem.Biophys.Res.Com.* **274**, 93-98.
- Rybakova,I.N., Amann,K.J., and Ervasti,J.M.** (1996). A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J Cell Biol.* **135**, 661-672.
- Rybakova,I.N., Humston,J.L., Sonnemann,K.J., and Ervasti J.M.** (2006). Dystrophin and utrophin bind actin through distinct modes of contact. *J Biol Chem.* **281**, 9996-10001.
- Rybakova,I.N., Patel,J.R., and Ervasti,J.M.** (2000). The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J Cell Biol.* **150**, 1209-1214.

- Saiki,RK., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K., Horn,G., Erlich,H., and Arnheim,N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **4732**, 1350-1354.
- Sambrook,J.F., Fritsch,E.F., and Maniatis,T.** *Molecular cloning* (1989). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santavuori,P., Somer,H., Sainio,K., Rapola,J., Kruus,S., Nikitin,T., Ketonen,L., and Leisti,J.** (1989). Muscle-eye-brain disease (MEB). *Brain Dev.* **11**, 147-153.
- Sasaki,T., Fassler,R., and Hohenester,E.** (2004). Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol.* **164**, 959-963.
- Sauer,F.C.** (1935). Mitosis in the neural tube. *Comp.Neurol.* **62**, 377-405.
- Schneider,M., Khalil,A.A., Poulton,J., Castillejo-Lopez,C., Egger-Adam,D., Wodarz,A., Deng,W.M., and Baumgartner,S.** (2006). Perlecan and Dystroglycan act at the basal side of the Drosophila follicular epithelium to maintain epithelial organization. *Dev.* **133**, 3805-3815.
- Schröder,J.E.** (2002). Die Funktion von Dystroglycan in der Entwicklung des zentralen Nervensystems. Dissertation, Universität Mainz **1**, 1-92.
- Schröder,J.E., Tegeler M.R., Großhans U., Porten E., Blank M., Lee J., Esapa C., Blake D.J., and Kröger S.** (2007). Dystroglycan regulates structure, proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the developing vertebrate CNS. *Dev Biol.* **307**, 62-78.
- Sciandra,F., Schneider,M., Giardina,B., Baumgartner,S., Petrucci,T.C., and Brancaccio,A.** (2001). Identification of the beta-dystroglycan binding epitope within the C-terminal region of alpha-dystroglycan. *Eur.J.Biochem.* **268**, 4590-4597.
- Seigel,G.M., Mutchler,A.L., and Imperato,E.L.** (1996). Expression of glial markers in a retinal precursor cell line. *Mol Vis.* **2**, 2.
- Sgambato,A., Di Salvatore,M.A., De Paola,B., Rettino,A., Faraglia,B., Boninsegna,A., Graziani,C., Camerini,A., Proietti,G., and Cittadini,A.** (2006). Analysis of dystroglycan regulation and functions in mouse mammary epithelial cells and implications for mammary tumorigenesis. *J.Cell Physiol.* **207**, 520-529.
- Shcherbata,H.R., Yatsenko,A.S., Patterson,L., Sood,V.D., Nudel,U., Baker,D., and Ruohola-Baker,H.** (2007). Dissecting muscle and neuronal disorders in a Drosophila model of muscular dystrophy. *EMBO J.* **2**, 481-493.
- Shepherd,I.T. and Taylor,J.S.** (1995). Early development of efferent projections from the chick tectum. *J Comp Neurol.* **354**, 501-510.
- Shoukimas,G.M. and Hinds,J.W.** (1978). The development of the cerebral cortex in the embryonic mouse: An electron microscopic serial section analysis. *J Comp Neurol.* **179**, 795-830.

- Shuman,S.** (1991). Site-specific DNA cleavage by vaccinia virus DNA topoisomerase I. Role of nucleotide sequence and DNA secondary structure. *J Biol Chem.* **266**, 1796-1803.
- Shuman,S.** (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem.* **51**, 32678-32684.
- Sidman,R.L., Miale,I.L., and Feder,N.** (1959). Cell proliferation and migration of oligodendrocyte on astrocyte monolayers. *Exp.Neurol.* **1**, 322-333.
- Skeith,A., Dunlop,L., Galileo,D.S., and Linser,P.J.** (1999). Inhibition of β 1 integrin expression reduces clone size during early retinogenesis. *Dev Brain Res.* **116**, 123-126.
- Sotgia,F., Lee,H., Bedford,M.T., Petrucci,T., Sudol,M., and Lisanti,M.P.** (2001). Tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan at its WW domain binding motif, PPxY, recruits SH2 domain containing proteins. *Biochem.* **40**, 14585-14592.
- Stier,H. and Schlosshauer,B.** (1999). Cross-species collapse activity of polarized radial glia on retinal ganglion cell axons. *Glia* **25**, 143-153.
- Stuckmann,I., Weigmann,A., Shevchenko,A., Mann,M., and Huttner,W.B.** (2001). Ephrin B1 is expressed on neuroepithelial cells in correlation with neocortical neurogenesis. *J Neurosci.* **21**, 2726-2737.
- Sugita,S., Saito,F., Tang,J., Satz,J., Campbell,K., and Südhof,T.C.** (2001). A stoichiometric complex of neuexins and dystroglycan in brain. *J Cell Biol.* **154**, 435-445.
- Sun,H.** (1999). PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol-3,4,5,-triphosphate and Akt/ protein kinase B signaling pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 6199-6204.
- Sunada,Y., Edgar,T.S., Lotz,B.P., Rust,R.S., and Campbell,K.P.** (1995). Merosin-negative congenital muscular dystrophy associated with extensive brain abnormalities. *Neurology* **45**, 2084-2089.
- Suzuki,A., Yoshida,M., Hayashi,K., Mizuno,Y., Hagiwara,Y., and Ozawa,E.** (1994). Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. *Eur.J.Biochem.* **220**, 283-292.
- Suzuki,A., Yoshida,M., Yamamoto,H., and Ozawa,E.** (1992). Glycoprotein-binding site of dystrophin is confined to the cysteine-rich domain and the first half of the carboxy-terminal domain. *FEBS Lett.* **308**, 154-160.
- Talts,J.F., Andac,Z., Gohring,W., Brancaccio,A., and Timpl,R.** (1999). Binding of the G domains of laminin alpha 1 and alpha 2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J.* **18**, 863-870.

- Tegeler, M.** (2004). Funktionelle Analyse von Dystroglycan in der sich entwickelnden Hühnerretina durch in ovo-Elektroporation. Dissertation, Universität Mainz **1**, 1-125.
- Thanos, S. and Mey, J.** (2001). Development of the visual system of the chick II. Mechanisms of axonal guidance. *Brain Res Rev.* **35**, 205-245.
- Tian, M., Jacobson, C., Gee, S.H., Campbell, K.P., Carbonetto, S., and Jucker, M.** (1996). Dystroglycan in the cerebellum is a laminin alpha 2-chain binding protein at the glial-vascular interface and is expressed in Purkinje cells. *Eur J Neurosci.* **8**, 2739-2747.
- Tinsley, J.M., Blake, D.J., Roche, A., Fairbrother, U., Riss, J., Byth, B.C., Knight, A.E., Kendrick-Jones, J., Suthers, G.K., Love, D.R., Edwards, Y.H., and Davies, K.E.** (1992). Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* **360**, 591-593.
- Tsukita, S.** (2001). Claudins and the tight junction barrier. *Kidney Int.* **60**, 407.
- Tsutsui, S., Inoue, H.Y.K., Suzuki, K., Tahara, K., Higashi, H., Era S., and Mori, M.** (2005). Inactivation of PTEN is associated with a low p27Kip1 protein expression in breast carcinoma. *Cancer* **104**, 2048-2053.
- Ueda, H., Baba, T., and Ohno, S.** (2000). Current knowledge of dystrophin and dystrophin-associated proteins in the retina. *Histol.Histopathol.* **15**, 753-760.
- Ueda, H., Gohdo, T., and Ohno, S.** (1998). β -dystroglycan localization in the photoreceptor and Müller cells in the rat retina revealed by immunoelectron microscopy. *J.Histochem.Cytochem.* **46**, 185-191.
- van Reeuwijk, J., Brunner, H.G., and van Bokhoven, H.** (2004). Glyc-O-genetics of Walker-Warburg syndrome. *Clin Genet.* **67**, 281-289.
- van Reeuwijk, J., Janssen, M., van den Elzen, C., Beltran-Valero de Bernabe, D., Sabatelli, P., Merlini, L., Boon, M., Scheffer, H., Brockington M., Muntoni, F., Huynen, M.A., Verrips, A., Walsh, C.A., Barth, P.G., Brunner, H.G., and van Bokhoven, H.** (2005). POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet.* **42**, 907-912.
- van Reeuwijk, J.M.S., van den Elzen, C., Verrips, A.B.E., Muntoni, F., Merlini, L.S.H., Brunner, H.G., Guicheney, P., and van Bokhoven, H.** (2006). The expanding phenotype of POMT1 mutations: from Walker-Warburg syndrome to congenital muscular dystrophy, microcephaly, and mental retardation. *Hum Mutat.* **27**, 453-459.
- Willbold, E. and Layer, P.G.** (1998). Müller glia cells and their possible roles during retina differentiation in vivo and in vitro. *Histol Histopathol.* **13**, 531-552.
- Williams, C.D. and Rizzolo, L.** (1997). Remodeling of junctional complexes during the development of the outer blood-retinal barrier. *Anat.Rec.* **3**, 380-388.

- Williamson,R.A., Henry,M.D., Daniels,K.J., Hrstka,R.F., Lee,J.C., Sunada,Y., Ibraghimov-Beskrovnaya,O., and Campbell,K.P.** (1997). Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in *Dag1*-null mice. *Hum.Mol.Gen.* **6**, 831-841.
- Winder,S.J.** (2001). The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem Sci.* **26**, 118-124.
- Wöhrn,J.C.P., Puelles,L., Nakagawa,S., Takeichi,M., and Redies,C.** (1998). Cadherin expression in the retina and retinofugal pathways of the chicken embryo. *J Comp Neurol.* **396**, 20-38.
- Yang,B., Jung,D., Motto,D., Meyer,J., Koretzky,G., and Campbell,K.P.** (1995). SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem.* **270**, 11711-11714.
- Yoshida,A., Kobayashi,K., Manya,H., Taniguchi,K., Kano,H., Mizuno,M., Inazu,T., Mitsuhashi,H., Takahashi,S., Takeuchi,M., Herrmann,R., Straub,V., Talim,B., Voit,T., Tapaloglu,H., Toda,T., and Endo,T.** (2001). Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev.Cell* **1**, 717-724.
- Yoshida,M., Suzuki,A., Yamamoto,H., Noguchi,S., Mizuno,Y., and Ozawa,E.** (1994). Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by *n*-octyl β -D-glucoside. *Eur.J.Biochem.* **222**, 1055-1061.
- Yurchenco,P.D., Cheng,Y.S., Campbell,K., and Li,S.H.** (2004). Loss of basement membrane, receptor and cytoskeletal lattices in a laminin-deficient muscular dystrophy. *J.Cell Sci.* **117**, 735-742.
- Zaccaria,M.L., Di Tommaso,F., Brancaccio,A., Paggi,P., and Petrucci,T.C.** (2001). Dystroglycan distribution in adult mouse brain: A light and electron microscopy study. *Neurosci.* **104**, 311-324.

VII. Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
BM	Basalmembran
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
Bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAG	Dystrophin-Assoziierter-Glykoproteinkomplex
DMEM	<i>Dulbeccos modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DTT	1,4-Dithiothreitol
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fab	Antigenbindendes Fragment
FKS	Fötales Kälberserum
GCL	Ganglienzellschicht
gp	Glykoprotein
g	Erdbeschleunigung
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HH	Hamburger Hamilton
ILM	Innere Grenzmembran (<i>inner limiting membrane</i>)
INL	Innere Körnerschicht (<i>inner nuclear layer</i>)
IP	Immunpräzipitation

Abkürzungsverzeichnis

IgG	Immunglobulin G
ICH	Immunhistochemie
K	Kilo
kDa	Kilodalton
Kb	Kilobasen
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
M	Molar
ml	Milliliter
mg	Milligramm
myd	Myodystrophie
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
Min.	Minute
mAK	monoklonaler Antikörper
mA	Millimeter
Ngcam	neuronaies Adhäsionsmolekül
nm	Nanometer
NMJ	Neuromuskuläre Endplatte
Na-Acetat	Natriumacetat
OPL	Äußere Plexiforme Schicht (<i>outer plexiform layer</i>)
ONL	Äußere Körnerschicht (<i>outer nuclear layer</i>)
OD	Optische Dichte
OFL	Optische Faserschicht
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
Page	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Konzentration der H ⁺ -Ionen in einer Lösung
PFA	Paraformaldehyd
pmol	Picomol
PFA	Paraformaldehyd
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur

Abkürzungsverzeichnis

RNAi	RNA-interference
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
Std.	Stunde
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
T _m	DNA-Schmelzpunkt
U	Einheit (<i>unit</i>)
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehung pro Minute
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
WB	Westernblot
W	Watt
W _t	Wildtyp
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
xg	x-fache Erdbeschleunigung
ZNS	Z entrales N ervensystem
z.B.	zum Beispiel