

Funktionelle Analyse von Dystroglycan in der sich entwickelnden Hühnerretina durch *in ovo*-Elektroporation

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Marion Tegeler
geboren in Oldenburg

Mainz, 2004

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1	MATERIAL	14
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	14
2.1.2	Materialien für Molekularbiologische Verfahren	14
2.1.3	Materialien für die Zellkultur.....	18
2.1.4	Materialien für die Immunhistochemie	19
2.1.5	Reagenzien für Proteinbiochemische Verfahren.....	23
2.1.6	Materialien für die Histologie	26
2.2	METHODEN.....	26
2.2.1	Molekularbiologische Verfahren	26
2.2.2	Zellkulturverfahren	29
2.2.3	Immunhistologische Methoden.....	30
2.2.4	cDNA Injektion und <i>in ovo</i> Elektroporation	34
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden	38
III.	ERGEBNISSE.....	42
3.1	ANALYSE DER EGFP-EXPRESSION MIT „OPEN-BOOK“-PRÄPARATION	42
3.2	MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN.....	43
3.3	ANALYSE DER PROTEINEXPRESSION IM WESTERN-BLOT SOWIE DER VERTEILUNG DER MUTIERTEN KONSTRUKTES IN DER RETINA.....	50
3.4	QUANTIFIZIERUNG DER PROLIFERIERENDEN ZELLEN	53
3.6	UNTERSUCHUNG DER INTEGRITÄT DER BASALMEMBRAN	59
3.7	ANALYSE DER POLARITÄT VON NEUROEPITHELZELLEN	60
3.8	WACHSTUMSVERHALTEN DER RETINALEN GANGLIENZELLAXONE.....	70
IV.	DISKUSSION.....	75
4.1	TECHNIK MIKROELEKTROPORATION.....	76
4.2	ÜBERPRÜFUNG DER PROTEINEXPRESSION	79
4.3	MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DER NEUROEPITHELZELLEN.....	81
4.4	EINFLUSS VON DYSTROGLYCAN AUF DIE PROLIFERATION VON NEUROEPITHELZELLEN	86
4.5	EINFLUSS VON DYSTROGLYCAN AUF DIE DIFFERENZIERUNG DER NE-ZELLEN	93
4.6	VERÄNDERUNG DER POLARITÄT IN NEUROEPITHELZELLEN DURCH DYSTROGLYCAN ...	93
4.7	FEHLERHAFTER SCHICHTUNG POSTMITOTISCHER NEURONE	95
4.8	WACHSTUMSVERHALTEN DER AXONE RETINALER GANGLIENZELLEN	97
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	100
VI.	LITERATURVERZEICHNIS.....	101
VII.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	120

I. Einleitung

Das Gehirn ist die komplexeste bekannte Struktur. Es regelt die Aufnahme und Integration aller sensorischen und motorischen Einflüsse und erlaubt uns deshalb auf Reize der Umwelt adäquat zu reagieren. Das Gehirn ist aber zusätzlich noch Sitz des Bewußtseins und beeinflusst maßgeblich unsere Individualität. Die Komplexität des Gehirns und damit seine Funktionen entwickeln sich über einen längeren Zeitraum und die Analyse der molekularen und zellulären Mechanismen, die zur Bildung dieser hochkomplexen Struktur führen, gehört zu den faszinierenden Fragen der modernen Biologie.

Wichtige Aufschlüsse über grundlegende Mechanismen der Gehirnentwicklung bieten genetisch bedingte Erkrankungen, da durch das Studium der Veränderungen auf die Funktion spezifischer Moleküle geschlossen werden kann – auch wenn die Mechanismen bei diesem Ansatz nicht immer leicht zu analysieren sind. In der vorliegenden Arbeit soll die Funktion vom sogenannten Dystrophin-assoziierten Glykoproteinkomplex (DAG) im sich entwickelnden ZNS untersucht werden. Mutationen in diesem Komplex sind die genetische Grundlage einiger verschiedener Formen von Muskeldystrophie (Campbell, 1995), einer heterogenen Gruppe von Erbkrankheiten, deren gemeinsames Merkmal eine fortschreitende Degeneration und Schwächung der Skelettmuskulatur ist. Neben diesen Veränderungen in der Skelettmuskulatur haben Muskeldystrophie Patienten (und auch die entsprechenden Tiermodelle) zusätzlich noch Veränderungen im Zentralnervensystem, deren Ursachen weitgehend unbekannt sind (Anderson et al., 2002). Da mich in meiner Arbeit die Funktion des DAG im ZNS beschäftigt hat, möchte ich im Folgenden zuerst den Dystrophin-assoziierten Proteinkomplex einführen.

Der Dystrophin assoziierte Proteinkomplex ist ein multimerer heterogener Proteinkomplex, der aus intrazellulären, transmembranen und extrazellulären Proteinen besteht. Seine Zusammensetzung und Funktion wurden fast ausschließlich in der Skelettmuskulatur charakterisiert (Rando, 2001). Dort verbindet der DAG das subsarkolemmale Aktin Zytoskelett mit der Extrazellulären Matrix. Dies geschieht über Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen einer Vielzahl von Proteinen. Intrazellulär bindet das spektrin-ähnliche Protein Dystrophin (welches das erste Protein des DAG darstellt, das identifiziert wurde und deshalb dem DAG seinen Namen gab) zum einen an die Aktin Filamente und zum anderen an das Transmembranprotein Dystroglycan.

Dystroglycan ist die zentrale Komponente des DAG und besteht aus zwei Untereinheiten, die als α - und β -Dystroglycan bezeichnet wurden (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992). Alpha Dystroglycan ist ein extrazelluläres Matrixprotein, das mit anderen Proteinen der extrazellulären Matrix interagieren kann. Die Extrazelluläre Matrix in der Skelettmuskulatur besteht im Wesentlichen aus einer Basalmembran, die jede einzelne Skelettmuskelfaser umhüllt wie ein durchlässiges Netz und dadurch die Lipiddoppelschicht der Zellmembran mechanisch stabilisiert (Ervasti und Campbell, 1993). Die Zusammensetzung und die verschiedenen Interaktionen innerhalb des DAG sind in der Abbildung 1.1 schematisch dargestellt und sollen im folgenden Abschnitt näher geschildert werden.

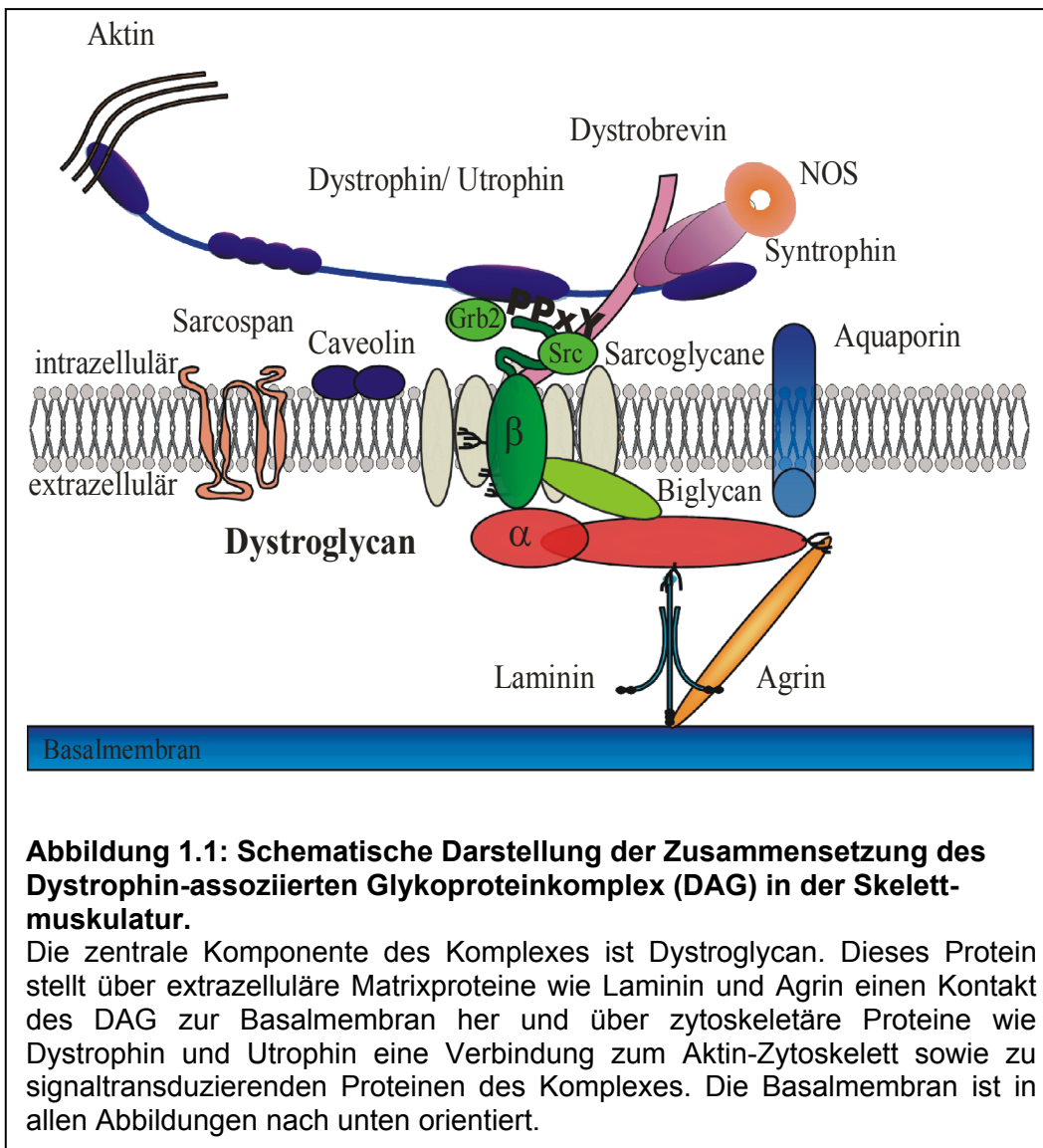
Der zentrale Bestandteil des DAG ist Dystroglycan. Dystroglycan wird von einem Gen, dem *dag1*-Gen, als ein 895 Aminosäuren langes Vorläuferprotein synthetisiert und posttranslational durch eine noch unbekannte Protease in zwei Untereinheiten gespalten, α - und β -Dystroglycan (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993; Holt et al., 2000). Beide Proteine sind trotz der proteolytischen Spaltung fest aber nicht-kovalent miteinander assoziiert. Die Signifikanz der proteolytischen Spaltung ist unbekannt.

Alpha Dystroglycan ist ein hochglykosyliertes Matrixprotein. Es bindet über O-Mannose Zuckerseitenketten an die Laminin-G Domänen von Laminin 1 und 2, Agrin und Perlekan sowie im Zentralnervensystem an Neurexine (Hohenester et al., 1999; Talts et al., 1999; Sugita et al., 2001; Winder, 2001). Auf diese Weise wird die Bindung der Muskelfaser Zellmembran mit der Basalmembran vermittelt. Aber Dystroglycan hat zusätzlich noch eine Funktion bei der Biosynthese dieser Basalmembran (Henry und Campbell, 1998). Aufgrund dieser großen Bedeutung bei der Bildung von Basalmembranen sterben Dystroglycan-defiziente Mäuse schon sehr früh in der Entwicklung am Embryonaltag E6.5, da die Bildung der Reichertsmembran, einer der ersten Basalmembranen im Embryo, nicht stattfinden kann. Dies verhindert die Einnistung des Embryos im Uterus und sorgt für ein Absterben des Embryos (Williamson et al., 1997). Mutationen im Dystroglycangen sind beim Menschen nicht bekannt.

In der Skelettmuskulatur interagiert die C-terminale Domäne von α -Dystroglycan über eine 35 Aminosäuren lange Region mit der N-terminalen Domäne von β -Dystroglycan, einem Typ I Transmembranprotein (Sciandra et al., 2001). Beta-Dystroglycan bindet

wiederum intrazellulär an Dystrophin und sein strukturelles Homolog Utrophin (Blake et al., 1996b; Huang et al., 2000). Dystrophin ist ein sehr großes Zytosolprotein und wird vom *dmd*-Gen kodiert. Es besitzt vier N-terminal verkürzte Isoformen Dp 260 (Retina), Dp 140 (Gehirn; Niere), Dp 116 (Peripheres Nervensystem) und Dp 71 (ubiquitär), deren Expression entwicklungsabhängig und gewebsspezifisch durch insgesamt 7 intronische Promotoren reguliert wird (D'Souza et al., 1995; Lederfein et al., 1992; Matsumura et al., 1993; Lidov et al., 1995). Alle Dystrophin Isoformen gehören zur Familie der α -Actinin- β -Spektrin Proteine, die eine charakteristische Struktur aufweisen. Sie besitzen alle mit Ausnahme von Dp 71 eine N-terminale Aktinbindedomäne, eine zentrale stabförmige Region mit Spektrin-ähnlichen repetitiven Segmenten, sowie eine kurze WW-Domäne und eine cysteinreiche Domäne am C-Terminus des Proteins. Die WW-Domäne des C-Terminus bindet an das PPXY-Motiv innerhalb der relativ kurzen, 15 Aminosäuren umfassenden cytoplasmatischen Domäne von β -Dystroglycan, während die N-terminale Domäne mit dem Aktin-Zytoskelett interagiert (Rybakova et al., 1996; Huang et al., 2000). Dystrophin kann an der Neuromuskulären Endplatte durch Utrophin ersetzt werden (Tinsley et al., 1998). Die beiden Proteine weisen eine Identität von annähernd 80 % auf (Love et al., 1989; Ishiura et al., 1990) und sind strukturell und funktionell austauschbar. Die spezifische Funktion von Utrophin ist unbekannt.

Weitere Proteine, die an den DAG assoziiert sind, sind die verschiedenen Sarcoglycane. Delta-Sarcoglycan verbindet die verschiedenen Sarcoglycane direkt mit β -Dystroglycan (Yoshida et al., 1994; Lim und Campbell, 1998). Eine entscheidende Rolle der Sarcoglycane besteht möglicherweise darin, Dystroglycan an der Plasmamembran zu stabilisieren (Holt et al., 1998; Roberds et al., 1993; Chan et al., 1998). Auch andere intrazelluläre Proteine wie die Syntrophine (α , β 1 und β 2), Dystrobrevine (α und β) und die neurale NO-Synthase binden an die C-terminale Domäne von Dystrophin und sind auf diese Weise mit dem DAG assoziiert (Blake et al., 1995; Brenman et al., 1995; Ahn und Kunkel, 1995; Blake et al., 1996a; Peters et al., 1998). Die neuronale NO-Synthase ist ebenfalls an einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen beteiligt (Bredt, 1999). Durch α -Syntrophin werden zusätzlich auch Wasserkanäle wie die Aquaporine oder PSD93 an der Plasmamembran angereichert (Horio et al., 1997). PSD93 ist zum Beispiel auch an der Aggregation von Kaliumkanälen wie den Kir4.1-Kanälen beteiligt. Die Aggregation dieser Kanäle erfolgt vermutlich über Laminin, an das dann wiederum α -Dystroglycan bindet (Ishii et al., 1997).



Der DAG hat in der Skelettmuskulatur zwei wesentliche Funktionen: Zum einen wird durch die vielen Protein-Protein Interaktionen eine molekulare Brücke zwischen dem Aktin-Zytoskelett und der extrazellulären Matrix gebildet, die den einzelnen Muskelfasern eine große mechanische Stabilität verleiht (Campbell, 1995; Michele und Campbell, 2003). Zum anderen dient der DAG als Gerüst für die Adhäsion von einer Vielzahl signaltransduzierender Moleküle, die aufgrund der Interaktion mit dem DAG an bestimmten subzellulären Kompartimenten lokalisiert werden, wo sie ihre Funktion ausüben können (Blake und Kröger, 2000). Diese beiden Funktionen sollen im Folgenden detailliert dargestellt werden: Mutationen, die die Verbindung zwischen Matrix und Zytoskelett unterbrechen sind die genetische Ursache von verschiedenen Formen der Muskeldystrophieerkrankung. Diese

Verbindung kann an vielen Stellen unterbrochen werden. Bei der Kongenitalen Muskeldystrophie 1C zum Beispiel ist die Verbindung zwischen Matrix und Zytoskelett auf der Ebene der Interaktion zwischen α -Dystroglycan und Laminin unterbrochen. Bei der häufigsten Form von Muskeldystrophie, der Muskeldystrophie vom Duchenne Typ, ist Dystrophin mutiert, sodass der transmembrane Anteil des DAG nicht mehr mit dem Zytoskelett interagieren kann. Die Folge der Unterbrechung der molekularen Brücke zwischen Matrix und Zytoskelett ist eine mechanische Schwächung der einzelnen Muskelfasern. Diese Muskelfasern reißen im Zuge der Kontraktion ein. Dies führt zu einer Degeneration der Muskelfasern, die allerdings zumindestens anfänglich noch durch eine Regeneration kompensiert werden kann. Im Laufe der Entwicklung, abhängig von dem Typ der Muskeldystrophie, kommt es dann zu einer progressiven Schwächung und zu einem Verlust von Muskelmasse, weil die Regeneration nicht mehr mit der Degeneration mithalten kann. Der Teufelskreis aus Regeneration und Degeneration verschiebt sich zuungunsten der Regeneration mit der Folge eines progressiven Verlustes von Muskelmasse. Dies führt bei Patienten mit Duchenne Muskeldystrophie dazu, dass sie im Alter von ungefähr 20 Jahren an den Rollstuhl gefesselt sind und meist in der dritten Lebensdekade sterben aufgrund der zu großen Schwächung der Atem- und Herzmuskulatur.

Doch auf welche Weise wird die mechanische Schwächung der Muskelfasern ausgelöst. Eine Hypothese basiert darauf, dass Mutationen in Proteinen, die mit α - und β -Dystroglycan interagieren, den Zusammenbau des DAG im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi Apparat beeinträchtigen und somit die Insertion der Proteine in die Membran verhindern (Noguchi et al., 2000). Ein Beispiel hierfür wäre eine Mutation im Dystrophingen. An einem Tiermodell, der *mdx*-Maus, in dem Vollängen-Dystrophin deletiert ist, konnte gezeigt werden, dass dies zum Verlust des DAG an der Plasmamembran führt. (Ervasti et al., 1990; Cox et al., 1993). Die mechanische Verbindung der Basalmembran zum Aktin-Zytoskelett ist unterbrochen (Rybakova et al., 2000). Neben dem Verlust zahlreicher Proteine an der Membran, findet auch ein Abbau des Aktin-Zytoskelett unterhalb des Sarcolemmas statt (Rybakova et al., 2000). Dies könnte eine Ursache der beobachteten Labilität der Muskelfasern darstellen. Genauere Untersuchungen an dystrophischen Mäusen ergaben, dass die Deletion der C-terminalen Domäne von Dystroglycan eine ähnliche Auswirkung auf den Zusammenbau des Proteinkomplexes hat, wie Dystrophin (Kanagawa et al., 2004). Die Überexpression N-terminal verkürzter Dystroglycanproteine, in denen der C-Terminus erhalten bleibt, verhindert die Dissoziation des DAG an der Membran von

dystrophischen MCK-Dystroglycan $-/-$ Mäusen, die eine Muskelkreatinkinase (MCK)-Promotor abhängige Deletion von Dystroglycan in der Skelettmuskulatur aufweisen (Kanagawa et al., 2004). Die Verbindung von Dystroglycan und dem DAG zum Aktin-Zytoskelett scheint somit von entscheidender Bedeutung für den Zusammenbau des Komplexes zu sein.

Eine weitere Funktion des DAG ist seine Rolle als Gerüst zu fungieren, an das eine ganze Reihe von Proteinen adhären können und somit subzellulär in bestimmten Kompartimenten (hier die subsarcolemmale Zellmembran) konzentriert werden. Diese Funktion wurde postuliert, weil bei einer ganzen Reihe von Muskeldystrophien die molekulare Verbindung zwischen Matrix und Zytoskelett noch vorhanden ist, es aber trotzdem zur Degeneration der Muskulatur kommt. Dies führte zur Entdeckung, dass mit dem DAG assoziierte Proteine signaltransduzierende Funktion haben (Rando, 2001). Zu diesen Proteinen gehört: nNOS, die Dystrobrevine, FAK (focal adhesion kinase) oder Grb2 (Wachstumsfaktor-Rezeptor-Bindeprotein) verschiedene Serin- und Threoninkinasen wie Fyn und Src-Kinasen oder Akt (Yang et al., 1995; Bredt, 1999; Russo et al., 2000; Sotgia et al., 2001). Beispielsweise reguliert Dystroglycan über Grb2 und FAK den Phosphoinositol-3-phosphatweg (PI3K) über die Phosphorylierung von stromabwärts gelegenen Effektoren wie Akt und GSK3 β in Muskelfasern (Sonoda et al., 1999; Langenbach und Rando, 2002). Dieser Reaktionsweg ist deshalb so erwähnenswert, da er verschiedene Faktoren aktiviert, die die Proliferation noch undifferenzierter Muskelzellen, der sogenannten Satellitenzellen, die innerhalb der Muskulatur liegen, unterstützt und Apoptosevorgänge unterdrückt (Montanaro et al., 1999; Sun, 1999). Auch die veränderte Verteilung der neuronalen NO-Synthase in α -Dystrobrevin $-/-$ Mäusen führt zu einem verstärkten Abbau der Muskelfasern. Somit wird deutlich, dass Mutationen in Proteinen des DAG, die die mechanische Verbindung unterbrechen oder die Verteilung von signaltransduzierenden Proteinen verändern, zu einer Abnahme der Skelettmuskelmasse führen können und auf diese Weise Muskeldystrophien induzieren können.

Eine der wesentlichen Erkenntnisse der letzten 3 Jahre ist, dass nicht nur Mutationen im DAG Muskeldystrophien hervorrufen können, sondern dass bei einigen Dystrophien auch Mutationen in Proteinen auftreten, die nicht Teil des DAG sind. In diesen Fällen finden sich die Mutationen in Glykosyltransferasen. Diese Enzyme katalysieren unterschiedliche Schritte in der Anheftung spezifischer Zuckerseitenketten während der posttranslationalen

Prozessierung von Proteinen im Golgiapparat. Eines der wesentlichen Substrate dieser Enzyme ist α -Dystroglycan (Muntoni et al., 2002). Wie bereits weiter oben erwähnt, geschieht die Interaktion von α -Dystroglycan mit der extrazellulären Matrix über die Kohlenhydrat Seitenketten. Wenn die Glykosyltransferasen durch die Mutationen in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, kommt es zu einer veränderten Glykosylierung und damit zu einer Beeinträchtigung der Bindung von α -Dystroglycan an andere Matrixproteine. Somit wird die molekulare Brücke zwischen Matrix und Zytoskelett unterbrochen mit den weiter oben geschilderten Konsequenzen: Einer mechanischen Instabilität der Muskelfasern und damit einem Teufelskreis aus Degeneration und Regeneration der Skelettmuskulatur, der zum langsamen Verlust der Muskulatur führt (Michele et al., 2002).

Bisher wurden drei verschiedene Glykosyltransferasen identifiziert, die an der Glykosylierung von α -Dystroglycan beteiligt sind. Die Mutation in diesen Glykosyltransferasen führt zu unterschiedlichen Muskeldystrophien. POMT1 vermittelt den ersten Schritt der Anheftung von O-Mannosyl-Zuckern an α -Dystroglycan. Mutationen in diesem Protein verursachen das Walker Warburg Syndrom (WWS; Jurado et al., 1999; Cormand et al., 2001; Beltran-Valero et al., 2002; Michele und Campbell, 2003). POMGnT1 führt zur Muscle-Eye-Brain Disease und heftet N-Acetylglucosamine an die Mannose-Zuckerseitenketten an (Haltia et al., 1997; Jurado et al., 1999; Cormand et al., 2001). Patienten, die unter Fukuyama-Typ-Muskeldystrophie (FCMD) und kongenitaler Muskeldystrophie vom Typ 1C (MDC1C) leiden, weisen Mutationen in zwei homologen Proteinen auf, Fukutin und Fukutin-related Protein (FKRP; Fukuyama et al., 1981; Kobayashi et al., 1998; Brockington et al., 2001). Diese Proteine gehören ebenfalls zu einer Familie von Glykosyltransferasen und sind an der Glykosylierung von Dystroglycan im Golgi-Apparat beteiligt (Esapa et al., 2002).

Patienten, die an Muskeldystrophie leiden, weisen neben der Degeneration der Skelettmuskulatur auch einen sehr schweren ZNS-Phänotyp auf (Anderson et al., 2002), da Dystroglycan und der DAG außer in der Muskulatur auch im ZNS exprimiert werden. Dystroglycan ist dort in einigen Interneuronen des cerebralen Cortex, in Neuronen der CA1-CA3 Region des Hippocampus, sowie in granulären Zellen, Neuronen und Purkinje Zellen des Cerebellums, im Olfaktorischen Trakt, in den Basalganglien, im Thalamus, im Hypothalamus sowie im Hirnstamm vorhanden (Tian et al., 1996; Zaccaria et al., 2001). Im cerebralen Cortex können die Glykosyltransferase Fukutin (FCMD) und α -Dystroglycan

vorwiegend in migrierenden Neuronen lokalisiert werden. Im Cerebellum konnte POMPGnT1 (MEB) und Fukutin (FCMD) mit Dystroglycan zu Beginn der neuronalen Migration in Purkinje Zellen und auch Bergmann-Gliazellen, die als Stützstrukturen für die Migration postmitotischer granulärer Zellen dienen, sowie in den granulären Zellen und Neuronen des Cerebellums kolokalisiert werden (Henion et al., 2003). Dystroglycan wird dort vorwiegend in postsynaptischen Spezialisierungen exprimiert. In den Körnerzellen des Hippocampus und in den Neuronen des Thalamus und Hypothalamus ist Dystroglycan intrazellulär häufig mit Utrophin oder den verkürzten Isoformen von Dystrophin assoziiert anstelle von Dystrophin (Tian et al., 1996; Zaccaria et al., 2001). Dystroglycan ist auch in den Endfüßen von perivaskulären Astrocyten und Gliazellen an den Kontaktstellen zur Basalmembran der Blutgefäße oder der Pia mater (Tian et al., 1996; Blank et al., 1997; Koulen et al., 1998) sowie in den Endothelzellen der Blutgefäße und in Schwann-Zellen enthalten. In den Endfüßen von Astrocyten und Gliazellen ist Dystroglycan ebenfalls hauptsächlich mit Utrophin assoziiert (Khurana et al., 1992). Dystroglycan wird somit ubiquitär im ZNS exprimiert und ist zudem ein beständiger, zentraler Bestandteil des DAG, während die Assoziation der anderen Proteine in den verschiedenen ZNS-Regionen variieren kann. Die ZNS-Defekte, die in den verschiedenen Muskeldystrophien auftreten, werden ursächlich von den Mutationen im DAG hervorgerufen, sie sind nicht progressiv und keine Folgeerscheinung der Muskeldegeneration. Der DAG spielt also eine wichtige Rolle bei der normalen Funktion des ZNS (Muntoni et al., 2002; Montanaro und Carbonetto, 2003). Die ZNS Defizite sind sehr heterogen. Sie reichen von milden kognitiven Defekten, wie Sprachstörungen bis hin zu schwerer geistiger Behinderung.

Der ZNS Phänotyp ist besonders schwer bei den Muskeldystrophien, die durch Mutationen in den Glykosyltransferasen hervorgerufen werden. Dort findet man Störungen in der neuronalen Migration und in der Schichtung des ZNS, Nervenzellen finden sich in abnormen Positionen (Heterotopias), sowie eine abnormale Differenzierung der Zellen im cerebralen Cortex und im Cerebellum (Muntoni und Voit, 2004). Die Basalmembran ist an vielen Stellen zerstört und ihre Zerstörung ist möglicherweise eine der Ursachen der beobachteten Veränderungen. Die unkontrollierte Wanderung von Zellen durch die entstandenen Bruchstellen innerhalb der Basalmembran bewirkt die Entstehung von Ektopias, Nervenzellen und Gliazellen, die sich außerhalb des Gehirns im subarachnoidalen Raum befinden. Während der weiteren Entwicklung verursacht die fragmentierte Basalmembran die Verschmelzung benachbarter Hirnlappen, durch Fusion des

austretenden Gewebes. Auf diese Weise bildet sich ein sogenannter „cobblestone“-Cortex oder eine Lissencephalie Typ II aus, ein Cortex, der eine glatte Oberfläche besitzt statt der üblichen Hirnwindungen (Muntoni und Voit, 2004). Im peripheren Nervensystem ist außerdem die Myelinisierung der Schwann Zellen verzögert. So konnte gezeigt werden, dass die selektive Deletion von Dystroglycan in den Schwann Zellen von Mäusen eine fehlerhafte Faltung der Myelinschicht verursacht (Saito et al., 2003). Nicht ausreichend myelinisierte Axone verlangsamten die Fortleitung von Nervensignalen. Betroffene Patienten leiden daher unter Wahrnehmungs- und motorischen Koordinationsstörungen, die unabhängig von dem progressiv verlaufenden Muskelschwund auftreten. Dies führt häufig auch zu Muskelkrämpfen und einem massiven Muskelzittern bei den Erkrankten.

Die ZNS-Defekte sind nicht nur auf den Cortex beschränkt, sondern auch in anderen Bereichen finden sich teilweise schwere Veränderungen (Muntoni und Voit, 2004). Beispielsweise tritt im Auge eine starke retinale Dysplasie auf, die durch eine veränderte Schichtung und eine Hyperproliferation nicht differenzierter atypischer Zellen gekennzeichnet ist. Dies führt häufig zum vollständigen Verlust des Sehvermögens. Die Retina kann sich auch vollständig ablösen aufgrund der fehlenden Basalmembran. Häufig ist auch die Augenhöhle verformt, was zu Kurzsichtigkeit führen kann. Veränderungen des Augeninnendruckes können zur Ausbildung des Grünen Stars beitragen (Muntoni und Voit, 2004).

Dass die Ursachen für die schweren ZNS Veränderungen durch Mutationen im DAG verursacht werden, wird durch einige gentechnisch veränderte Mäuse nahegelegt. Zum Beispiel treten bei einer Maus, deren Dystroglycane selektiv im ZNS funktionell inaktiviert wurde (GFAP-Cre/DG^{lox/lox}) schwere Veränderungen auf, wie sie auch bei MEB und WWS Patienten beobachtet wurden (Moore et al., 2002a). Die Basalmembran ist allerdings wesentlich schwerer beeinträchtigt als in Large^{Myd} Mäusen und FCMD-Patienten. Large^{Myd} Mäuse stellen ein Tiermodell der MEB-Muskeldystrophie dar. In diesen Mäusen fehlt die Glykosyltransferase Large. Eine Konsequenz der Mutation von Large ist die abnormale Glykosylierung von Dystroglycan und die Unterbrechung seiner Verbindung zur Basalmembran. Diese Mäuse leiden unter Myodystrophie (Myd). Die ZNS-Abnormalitäten umfassen fehlplazierte Neurone, durch eine abnormale neuronale Schichtung (Heterotopias) und Differenzierung im cerebralen Cortex, Ektopias, Fusionen der Hirnhemisphären im Cerebellum, Polymikrogyria, Lissencephalie Typ II, „cobblestone cortex“, sowie eine

Reduktion der Neurone in der CA1 Region und lokal fehlplazierte granuläre Zellen im Hippocampus. Das Corpus Callosum der Mäuse ist allerdings gut ausgebildet, die Ventrikelgröße normal und auch die vorderen cerebralen Arterien zeigen keine strukturellen Veränderungen. Erstaunlicherweise tritt eine Makrocephalie mit einer Gewebezunahme von annähernd 20 % auf (Moore et al., 2002b). Außerdem haben diese Mäuse ein verändertes hippocampales LTP – möglicherweise eine Erklärung für die kognitiven Defizite, die nicht auf morphologische Veränderungen bei der neuronalen Migration und Differenzierung zurückzuführen sind.

Welche Rolle der DAG im sich entwickelnden ZNS spielt und wie die Mutationen in den verschiedenen Proteinen des DAG und den Glykosyltransferasen eine veränderte ZNS-Pathologie verursachen können, ist unbekannt und sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersucht werden. Aus technischen und praktischen Gründen aber auch aufgrund der Vielzahl von früheren Untersuchungen aus dem Labor Kröger habe ich mich entschieden, die Funktion des DAG in der Retina zu untersuchen. Die Retina ist ein leicht zugänglicher Teil des ZNS. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass der DAG in der adulten Retina an drei Stellen konzentriert ist (Blake und Kröger, 2000): Den Endfüßen von radialen Gliazellen, den Endfüßen von perivaskulären Astrozyten und den Terminalien von Photorezeptoren. Mutationen, die die Funktion des DAG in Photorezeptoren beeinflussen, haben ein verändertes Elektroretinogramm zur Folge. Die Funktion des DAG in den Endfüßen der Gliazellen ist unbekannt. Diese Funktion zu untersuchen war das Ziel der vorliegenden Arbeit. Diese Zellen bieten sich für eine Untersuchung an, weil der DAG in den Endfüßen bereits sehr früh konzentriert wird, zu einem Zeitpunkt an dem Photorezeptoren und andere Zellen noch nicht differenziert sind. Die Zusammensetzung des DAG unterscheidet sich jedoch an dieser Stelle etwas von der in der Muskulatur. In den Gliazellen ist der DAG nicht mit Dystrophin, sondern mit Utrophin und Dp71 komplexiert (Drenckhahn et al., 1996; Blank et al., 1997; Blank et al., 2002).

In frühen Entwicklungsstadien der Retina ist der DAG ausschließlich in den Endfüßen der sogenannten Neuroepithelzellen konzentriert (Blank et al., 2002). Neuroepithelzellen sind die Vorläufer von allen Nerven- und Gliazellen im gesamten Zentralnervensystem (Hartfuss et al., 2001; Parnavelas und Nadarajah, 2001; Malatesta et al., 2003; Fishell und Kriegstein, 2003; Anthony et al., 2004). Sie haben eine charakteristische radiäre Struktur und durchspannen die gesamte Breite des Neuralrohres bzw. der Retina. Neuroepithelzellen

sind polare Zellen mit einer basolateralen Seite und einer apikalen Seite. Die basale Seite ist mit einem Endfuß an der Basalmembran (der Plabasalmembran im Gehirn bzw. die Innere Grenzmembran in der Retina) verankert. Diese radiäre Struktur ist wichtig für die Funktion der Neuroepithelzellen. Während der frühen Embryonalentwicklung teilen sich die Neuroepithelzellen sehr häufig. Diese Zellteilungen verlaufen zunächst symmetrisch und dienen der Vermehrung der neuralen Vorläuferzellen des Neuralrohrs (Chenn und McConnell, 1995; Caviness et al., 1995). Die Neuroepithelzellen bilden ein pseudo-einschichtiges Epithel. Ein Charakteristikum dieser Zellen ist, dass ihre Zellkörper während ihres Zellteilungszyklus von der Basalmembran, die das Neuralrohr umgibt, zur ventrikulären Seite des Neuroepithels wandern, um dort zu proliferieren (Sauer, 1935). Diese Wanderung erfordert die Translokation des Zellkerns, so dass sich die verschiedenen Nuklei je nach Zellzyklusstadium in unterschiedlichen Höhen zwischen Ventrikel und Basalmembran befinden. Dabei korreliert die Position des Zellkörpers mit spezifischen Phasen des Zellzyklus. Die Mitosephasen finden ventrikulär (in der Retina auf der Pigmentepithelseite) statt und die S-Phase läuft nur in den Zellkörpern ab, wenn sie sich an der Plaseite (der dem Glaskörper zugewandten Seite in der Retina) befinden.

Die Differenzierung von Neuroblasten aus Neuroepithelzellen erfolgt durch eine asymmetrische Teilung. Dabei entstehen eine postmitotische Nervenzelle und eine sich weiter teilende Neuroepithelzelle. Die neuentstandenen postmitotischen Neurone wandern entlang der Fortsätze der bestehenden Neuroepithelzellen in ihre Schicht. Die Regulation dieser Proliferationsvorgänge und der Zellschicksaldetermination im Zentralnervensystem sind noch nahezu unbekannt.

Da Dystroglycan in den Endfüßen von Neuroepithelzellen an der Grenze zur Basalmembran konzentriert ist, stellt sich die Frage nach seiner Funktion während der Proliferation und der Differenzierung von Neuroepithelzellen. Diese Frage soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Der Ansatz, den ich gewählt habe ist die funktionelle Störung des DAG durch *in ovo* Elektroporation von spezifischen mutierten Konstrukten von Dystroglycan, dem zentralen Bestandteil des DAG. Diese Konstrukte sollten dominant-negativ bzw. funktionsinhibierend auf die Proliferation und Differenzierung von Neuroepithelzellen in Gegenwart von endogenem Dystroglycan wirken. Eine Analyse der Neuroepithelzellen nach Transfektion der verschiedenen Konstrukte sollte Aufschlüsse über die Funktion des DAG in der sich entwickelnden Retina geben.

Die Hoffnung war, nicht nur die Funktion des DAG in diesen speziellen Zellen zu untersuchen, sondern auch mehr über die Rolle des DAG im sich entwickelnden ZNS und die Ursachen für die schweren ZNS Defekte bei Muskeldystrophiepatienten zu erfahren.

Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von Dystroglycan in der sich entwickelnden Hühnerretina zu untersuchen. Dazu wurden verschiedene modifizierte Dystroglycan-cDNAs neben endogenem Dystroglycan überexprimiert. Dies geschah mit Hilfe der *in ovo* Elektroporation von Neuroepithelzellen während der sehr frühen Embryonalentwicklung. Zwei Konstrukte wurden hergestellt und in Neuroepithelzellen überexprimiert: ein nicht-spaltbares und ein C-terminal verkürztes Dystroglycanprotein.

Die Fragen, die mit diesen Experimenten beantwortet werden sollten, waren:

1. Eignet sich die *in ovo* Elektroporation zur Untersuchung der Funktion des DAG im ZNS?
2. Welche Funktion besitzt der DAG in den Endfüßen der Neuroepithelzellen und welche Konsequenzen ergeben sich aus der Überexpression der beiden Konstrukte?
3. Welche Bedeutung hat die proteolytische Spaltung von Dystroglycan im Zusammenhang mit der Proliferation, Differenzierung und Etablierung von Polarität in den Neuroepithelzellen?
4. Welche Konsequenzen ergeben sich aus der Überexpression der mutierten Dystroglycanproteine auf das Wachstumsverhalten von Axonen postmitotischer Neurone, wie den retinalen Ganglienzellen?
5. Können mit Hilfe dieser Experimente die Ursachen für die ZNS Defekte bei Erkrankungen an Muskeldystrophie erklärt werden?

II. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

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

2.1.2 Materialien für Molekularbiologische Verfahren

2.1.2.1 Bakterienstämme

E.coli XL1-Blue: recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' pro AB ϕ ZΔM15Tn10(Tet^r)] (Stratagene, Amsterdamm, Niederlande)

E.coli Top10: F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 gal U gal K rpsL (Str^R) end A1 nupG (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

2.1.2.2 Medien, Lösungen und Antibiotika für die Bakterienkultivierung

LB-Medium: für 1 Liter: 10g Bacto-Trypton; 5g Hefe-Extrakt; 5g NaCl; pH-Wert auf 7,5 einstellen und autoklavieren (Life Technologies).

LB-Selektions-medium: LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin, bzw. 50µg/ml Kanamycin (Life Technologies).

LB-Agarplatten: LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar, 100µg/ml Ampicillin, bzw. 50µg/ml Kanamycin

S.O.C.-Medium: für 1 Liter: 2 % Bacto-Trypton; 0,5% Hefe-Extrakt; 10mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl; 10mM MgSO₄; 20mM Glucose (Invitrogen GmbH, Karlsruhe); gebrauchsfertig geliefert.

Ampicillin: 1000x Stammlösung: 100mg/ml sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C. Die

Zugabe des Ampicillins erfolgt erst nach dem Autoklavieren des Mediums.

Kanamycin: 1000x Stammlösung: 50mg/ml sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C . Die Zugabe des Kanamycins erfolgt erst nach dem Autoklavieren des Mediums.

Einfriermedium: LB-Medium mit 60% Glycerin.

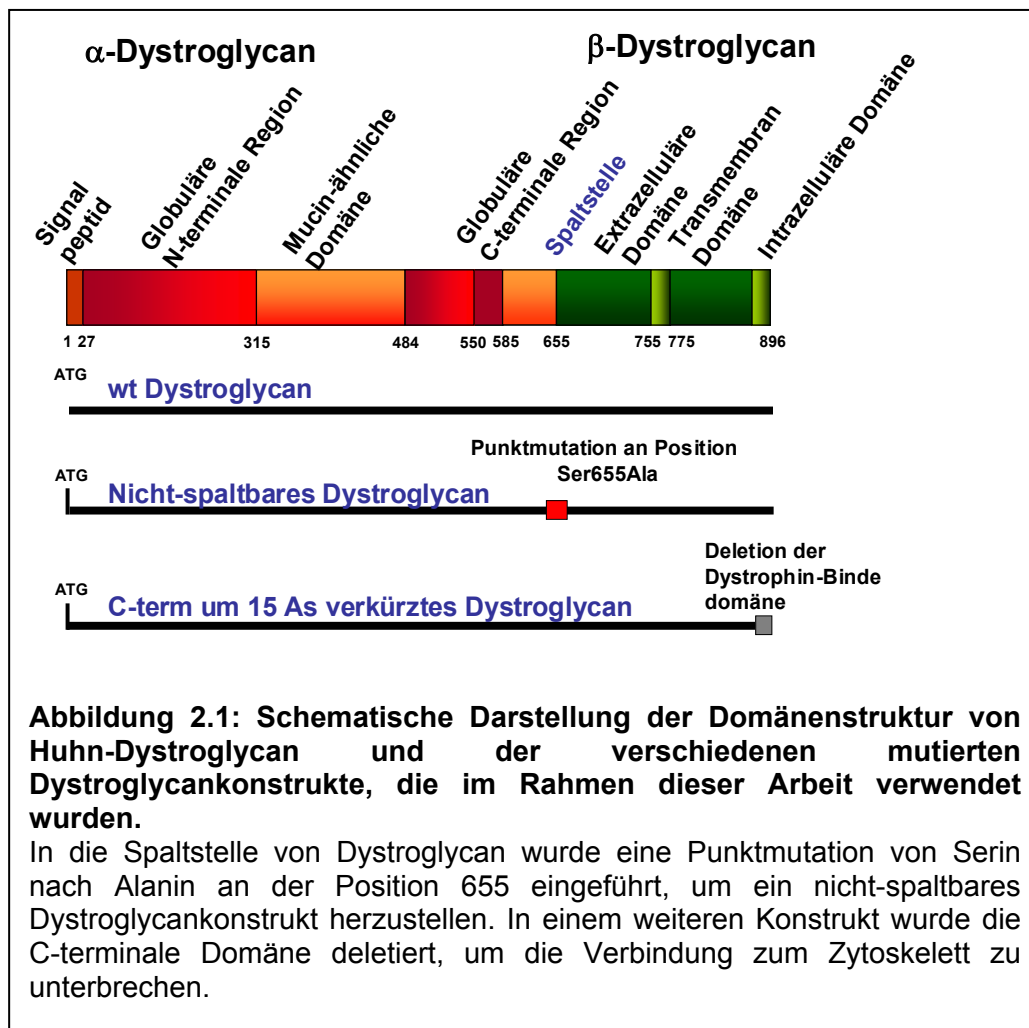
2.1.2.3 Vektoren und Oligonukleotide

Dystroglycankonstrukte

Die Herstellung folgender Dystroglycankonstrukte erfolgte durch Amplifikation mit der Advantage II-PCR und den unten aufgeführten Oligonukleotiden. Zur Herstellung des Vektors CH655DG-pDyg2T wurde die kodierende Region von Dystroglycan unter die Kontrolle der „Immediate early“-Promotor/Enhancer Region von HCMV in die BglIII und XhoI-Restriktionsschnittstelle des pCMV-Tag1-Vektor kloniert (Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Daraufhin erfolgte die Modifikation der kodierenden Dystroglycan-cDNA durch Einfügen einer Punktmutation an der Position 655 von Serin nach Alanin (Esapa et al., 2003). Diese Punktmutation hat zur Folge, dass das Protein *in vitro* nicht mehr proteolytisch gespalten wird (Esapa et al., 2003). Welche biologische Rolle die Spaltung von Dystroglycan *in vivo* spielt, sollte im ZNS von Hühnerembryonen untersucht werden. Der CH655DG-pDyg2T-Vektor wurde mit den angegebenen Primern sequenziert um ein Flag-Epitop an das Dystroglycan-Fragment anzuhängen und daraufhin in den pMES Vektor umkloniert. Zusätzlich war zur Detektion der exprimierten DNA im Gewebe N-terminal ein „Flagtag“-Epitop angehängt worden.

Für die Herstellung der verkürzten Dystroglycan cDNA und Wt-Dystroglycan wurde der pDyg2T-Vektor mit den angegebenen Primern amplifiziert, so dass einerseits ein um 15 Aminosäuren verkürztes Dystroglycan-Amplifikat (CHd15CTDG) erzeugt werden konnte und andererseits ein Wt-Dystroglycanfragment mit geeigneten Restriktionsschnittstellen für die Klonierung versehen wurde. Dem verkürzten Dystroglycankonstrukt fehlt die Utrophin Bindedomäne. Dies hat zur Folge dass cytosolische Proteine wie Utrophin und Dp71 nicht mehr an den DAG binden können und der Zusammenbau des gesamten Komplexes im

Golgi Apparat möglicherweise beeinträchtigt ist. An das verkürzte Dystroglycan-Amplifikat wurde zusätzlich C-terminal ein Flag-Epitop angehängt. Die erzeugten Dystroglycanamplifikate wurden zunächst „blunt-end“ in den pcDNA4/TO-Vektor kloniert. Dieser Vektor enthält eine aktivierte Topoisomerase, die die „Blunt-end-Klonierung“ von PCR-Amplifikaten erleichterte (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Alle Konstrukte wurden in die BamHI- und XbaI-Restriktionsstelle unter die Kontrolle eines β -Aktin Promotors aus Huhn in den pMES-Vektor kloniert (Swartz et al., 2001b). Der β -Aktin Promotor aus Huhn gewährleistet die Expression des Proteins in Hühnerzellen. Dieser bicistronische IRES-Vektor (interne Ribosomen Eintrittsstelle) war für die Elektroporation hervorragend geeignet, denn er enthielt neben dem Dystroglycankonstrukt auch eine EGFP-Sequenz (Enhanced green fluorescent protein), das als eine interne Kontrolle in denselben Zellen exprimiert werden konnte (Anregungswellenlänge: 488 nm; Emissionswellenlänge 507 nm). Die hergestellten Vektoren wurden anhand ihres Restriktionsmusters überprüft und sequenziert.



Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden als Startermoleküle (Primer) für die Amplifikation von cDNA durch PCR oder für Sequenzierungsreaktionen verwendet. Sie wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) oder der Firma IBA (Göttingen) bezogen.

Bezeichnung	Sequenz: 5' - 3'	Orientierung
DysDEGflag.f rw	TCTAGAATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGATC	Sense
DysGSP.rev	GGATCCCTAAGGGGGGACGTAGGGCGG	Antisense
DGGSP15C.fr w	TCTAGAATGACTGTTGGATGTGTCCCGCAGC	Sense
DGDEG15C.r ev	GGATCCCTAGATCTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCATCG GGCGGGAGC	Antisense

2.1.2.4 Puffer und Reagenzien für die Agarosegelelektrophorese

TBE-Puffer: 45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA.

DNA-Auftrags-

puffer(5X): 0,001 % Orange G w/v; 40 % w/v Sucrose; 0,1 M EDTA, 0,5 %
SDS

Ethidiumbromid-

Stammlösung: 10 mg/ ml (Roth GmbH, Karlsruhe)

BlueView –

Färbekristalle: gebrauchsfertig (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

2.1.3 Materialien für die Zellkultur

2.1.3.1 Adhärente Zellen

HEK293: Humane embryonale Nierenzellen der Zelllinie 293 (ACC 305)
HEK293-Zellen wurden ursprünglich aus humaner embryonaler Niere isoliert. Die Zelllinie ist durch einen Adenovirus Typ 5 transformiert.

2.1.3.2 Kulturmedien, Puffer und Antibiotika für die Zellkultur

Kulturmedium

für HEK293-Zellen: DMEM (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) supplementiert mit 10% (v/v) FKS, 2mM L-Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin (Gibco BRL, Glasgow, Schottland).

PBS-Puffer

(Phosphate

Buffered Saline): 136mM NaCl, 26mM KCl, 8mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,5mM KH₂PO₄.

Penicillin-Strepto-

mycin: Bakterizid wirkendes Antibiotikum, (Stammlösung 10000 µg/ ml Streptomycin; 10000 U/ml Penicillin); Endkonzentration: 0,1 mg/ml Streptomycin; 100 U/ml Penicillin

Einfriermedium: 90% (v/v) FKS (Fötales Kälberserum) (PAA), 10% (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid).

Fibronektin: 1 mg/ ml Stammlösung (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

2.1.4 Materialien für die Immunhistochemie

2.1.4.1 Erstantikörper

Antikörper	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung	Literatur- angabe
ACHE mAb 3D10	Maus	K. Tsim	IHC: 1: 100 (Huhn) 2 h RT	Randall et al., 1987
Agrin #46	Kaninchen	Eigene Herstellung	IHC: 1:1000 1 h RT (Huhn)	Tsen et al., 1995
anti Bromodeoxy- uridin (Klon Bu20a)	Maus	Dako Cytomation GmbH, Göttingen	IHC: 1:100 2 h RT	
α -Dystrobrevin 1CF-FL	Kaninchen		IHC: 1:250 1 h RT	Blake et al., 1998
Dystroglykan AB- Dyg-His	Kaninchen	Pineda Eigene Herstellung	WB: 1:500	
Dystroglykan beta 43DAG/8d5	Maus	L. Anderson	IHC: 1:5 WB: 1: 50	Bewick et al., 1993
Flag-M2	Maus	Sigma	IHC: 1:500 WB: 1:1000	
Flag	Kaninchen	Rockland Immuno-	IHC: 1:500	

Material und Methoden

		chemica	WB: 1: 5000	
GFP	Kanninchen; Maus	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	IHC: 1:500	
Integrin beta 1 Mab Ig22	Maus	Hering et al., 2000	IHC: 1:100	Tomaselli et al., 1988; Agius et al., 1996
Chicken N- Cadherin Ncd2	Ratte	C. Redies	IHC: 1:50/ 1:100	Gänzler- Odenthal und Redies, 1998
NF 68 NR4	Maus	Sigma	IHC: 1:1000	
Ng-CAM G4	Maus	F. Rathjen	IHC: 1:1000	Kuhn et al., 1991
Chicken Occludin	Kaninchen	S. Tsukita	IHC: 1:25	Furuse et al., 1993
Huhn-Utrophin mAb20C5	Maus	D. R. Blake	IHC:1:5	Bewick et al., 1992
Vimentin VIM 3B4	Maus	Boehringer Ingelheim	IHC: 1: 500	Heid et al., 1988
Zonula occludens 1 T8754 mAb (Hybridoma- überstand)	Maus	S. Tsukita	IHC: 1:1	Furuse et al., 1993

2.1.4.2 Zweitantikörper

Antikörper	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung
Anti IgG Alexa 488	Kanninchen	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	1:1000 1 h RT
Anti IgG Alexa 594	Kanninchen	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	1:1000 1 h RT
Anti HRP	Kanninchen	Amersham, Freiburg; Dianova, Hamburg	1:5000 1 h RT
Anti IgG Alexa 488	Maus	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	1:1000 1 h RT
Anti IgG Alexa 594	Maus	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	1:1000 1 h RT
Anti HRP	Maus	Amersham, Freiburg; Dianova, Hamburg	1:5000 1 h RT
Anti IgG Alexa 488	Schaf	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	1:1000 1 h RT
Anti IgG Alexa 594	Schaf	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	1:1000 1 h RT
Anti HRP	Schaf	Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA	1:5000 1 h RT
Anti Cy3	Ratte	Dianova, Hamburg	1:400 1 h RT

2.1.4.3 Reagenzien für die Herstellung und Färbung von Gefrierschnitten

4%ige PFA-Lösung: 4 g PFA in 100 ml 1XPBS

10xPBS-Puffer: 1,36 M NaCl; 0,027 M KCl; 0,1 M Na₂HPO₄; 0,02 M KH₂PO₄
auf pH 7,4 mit HCl eingestellt, autoklaviert

30 %ige Sucrose-Lösung: 30 g Sucrose in 100 ml A. bidest gelöst

Tissue Freezing

Medium: gebrauchsfertig, (Leica Instruments GmbH, Nussloch)

Gelatine-Chrom-

alaunlösung: 2,5 g Gelatine; 0,5 g ChromIII-Kaliumsulfat, auf 1 Liter mit Wasser auffüllen, bei 56 °C gelöst und vor Gebrauch filtriert.

Einbett-Medium

Citifluor AF1: gebrauchsfertig (Plano GmbH, Wetzlar)

4 %PFA: 4 g PFA pro 100 ml 1xPBS-Puffer pH 7,3; bei 80 °C gelöst

10xPBS-Puffer: 1,36 M NaCl; 0,027 M KCl; 0,1 M Na₂HPO₄; 0,02 M KH₂PO₄
auf pH 7,4 mit HCl eingestellt, autoklaviert

Blockpuffer: 1xPBS pH 7,4; 1 % BSA; 0,2 % 100xTriton

Waschpuffer: 1xPBS pH 7,4; 0,1 % BSA; 0,2 % 100xTriton

2.1.5 Reagenzien für Proteinbiochemische Verfahren

2.1.5.1 Reagenzien für die Membranpräparation von Zellen und Gewebe:

Zellysepuffer: 50mM Tris; 500mM NaCl; 2 mM EDTA; 1 % Nonidet P40; 1 % TritonX100; 1 Tablette Complete-EDTA-free-Proteasen Inhibitoren Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) auf 50 ml Zellysepuffer; 2 ml Aliquots bei -20 °C gelagert

10xPBS-Puffer: 1,36 M NaCl; 0,027 M KCl; 0,1 M Na₂HPO₄; 0,02 M KH₂PO₄ auf pH 7,4 mit HCl eingestellt, autoklaviert

SDS-Proben-

auftragspuffer: 125 mM Tris-Base/ pH 6,8; 4 % SDS; 20 % Glycerin; 10 % β-Mercaptoethanol; 0,001 % Bromphenolblau; Volumen mit A.bidest auffüllen;

Homogenisations-

puffer: 50mM Tris-HCl pH 7,4; 500mM NaCl; 1%Triton X-100; 1 Tablette Complete-EDTA-free-Protease Inhibitoren Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) auf 50 ml Homogenisationspuffer; 2 ml Aliquots bei - 20 °C gelagert

Elutionspuffer

(WGA): 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,1% Triton X-100; 0,3 M N-Acetylglucosamin

SDS-Proben-

auftragspuffer: 125 mM Tris-Base/ pH 6,8; 4 % SDS; 20 % Glycerin; 10 % β-Mercaptoethanol; 0,001 % Bromphenolblau; Volumen mit A.bidest

auffüllen;

WGA-Agarose: gebrauchsfertig; (Vektor Laboratories, Burlingame, CA, USA)

2.1.5.3 Reagenzien für die Polyacrylamidgelelektrophorese und für Western Blots

SDS-Proben-

auftragspuffer: 125 mM Tris pH 6,8; 20 % Glyzerin; 4 %
SDS; 10 % β -Mercaptoethanol; 0,01 % Bromphenolblau

10xElektro- phoresepuffer

Laemmli: 250 mM Tris-Base; 2,5 M Glycin pH 8,3; 1 % SDS

1xElektro phoresepuffer

Laemmli: 25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS

4x-Trenngelpuffer: 375 mM Tris-Base pH 8,8; 0,1 % SDS

4x-Sammelgel- puffer:

125 mM Tris-Base pH 6,8; 0,1 % SDS

TEMED

(N, N, N'; N'-

Tetramethylethyl-

diamin): gebrauchsfertig; (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

10 % APS

(=Ammonium-

peroxosulfat): 10 g APS (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) in 100 ml
A. bidest gelöst

9%iges Trenngel: 2,6 ml 1XTris pH 8,8; 3 ml 30% Acrylamidlg; 50 μ l 10 % APS-Lsg
(1:200); 10 μ l TEMED (1 μ l/ml); 3,8 ml A.bidest

3%iges Sammel-

gel: 1,5 ml 1XTris pH 6,8; 0,8 ml 30% Acrylamidlg; 30 µl 10% APS (1:200); 6 µl TEMED (1µl/ml); 30 µl Bromphenolblaulsg zur Anfärbung der Gel-Taschen.

Prestained Protein

Ladder-Marker

10-180 kDa: gebrauchsfertig; (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

10xNaßblotpuffer: 25mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS;

1x Naßblotpuffer: 2,5mM Tris-Base; 19,2 mM Glycin; 0,01 % SDS; 20 % Ethanol; in A.bidest.

1x TBS-Puffer: 50 mM Tris-Cl pH 7,5; 30 mM NaCl auf 1 Liter mit A.bidest aufgefüllt.

Blocking-Lösung: 5 %ige Milchpulverlösung in 1xTBS (Naturaflor, Glücksklee, Sucofin; Real; Mainz)

Wasch-Lösung: 1 %ige Milchpulverlösung in 1xTBS (Naturaflor, Glücksklee, Sucofin; Real; Mainz)

Entwicklerlösung: 1 Teil Kodak LX24 Entwicklerkonzentrat und 3 Teile A.bidest mischen (1:4).

Fixiererlösung: 1 Teil Kodak AL4 Fixierkonzentrat und 3 Teile A. bidest mischen (1:4).

0,05 % Ponceau-

Lösung: gebrauchsfertig

2.1.6 Materialien für die Histologie

2.1.6.1 Hühnereier

Befruchtete Eier der Rasse White Leghorn (*Gallus gallus domesticus L.*) wurden von der Firma Freddy's Hühnerhof GmbH & Co. KG in Worms geliefert. Die Eier wiesen eine Befruchtungseffizienz von annähernd 90 % auf. Direkt nach der Lieferung wurden die Eier bei 10 °C gelagert, um die Entwicklungsfähigkeit dieser Eier für mindestens eine Woche sicherzustellen. Die Bebrütung der Eier erfolgte in einem Brutgerät der Firma Ehret GmbH und Co. KG, das eine optimale Temperatur von 37,8 °C und eine Luftfeuchtigkeit von ca. 70 % gewährleistete. Die Bruteier wurden jeweils waagrecht mit den spitzen Enden zueinander auf bewegliche Rollen gelegt. Diese Rollen vermitteln das Wenden der Eier in einem 4 stündigen Intervall. Das Stadium der Entwicklung wurde nach Hamburger und Hamilton (HH) bestimmt (Hamburger und Hamilton, 1951).

2.1.6.2 Reagenzien für die Präparation von Tektum und Augen

10xPBS-Puffer: 1,36 M NaCl; 0,027 M KCl; 0,1 M Na₂HPO₄; 0,02 M KH₂PO₄
auf pH 7,4 mit HCl eingestellt, autoklaviert

Hanks-Lösung: gebrauchsfertig; (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
Hanks Pulver auf 1 Liter mit A. bidest auffüllen pH 7,3; 0,35 g
Natriumhydrogencarbonat/Liter zusetzen;

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Verfahren

2.2.1.1 Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien

Zur Herstellung von Flüssigkulturen wurden 200ml steriles LB-Medium (zur DNA-Präparation nach dem Maxipreprotokoll von Qiagen, Hilden) oder 3ml steriles LB-Medium (zur DNA-Gewinnung nach dem Minipreprotokoll von Qiagen, Hilden) mit einer Einzelkolonie angeimpft und in der Gegenwart eines entsprechenden Antibiotikums über Nacht bei 37°C in einem Inkubationsschüttler bei 200 upm inkubiert. Die Kryokonservierung der Bakterien erfolgte in einer LB-Flüssigkultur kurz vor Erreichen der stationären Phase, die mit 60% sterilem Glycerin versetzt und gut gemischt worden war. Die so erhaltenen Kulturen

sind bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sehr lange haltbar.

2.2.1.2 Transformation kompetenter XL1-Blue

Die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* erfolgte nach der „Hitzeschock-Methode“. Dazu wurden ca. 100 ng des zu transformierenden Plasmids bzw. 20 μl eines Ligationsansatzes in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 100 μl der auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte der sogenannte Hitzeschock für 90 Sek. bei 42°C im Wasserbad. Danach wurden die Bakterien kurz auf Eis gekühlt und anschließend mit ca. 250 μl S.O.C.-Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) versetzt und 1,5 Std. bei 37°C unter Schütteln bei 200upm inkubiert. In dieser Zeit wird das Antibiotika-Resistenzgen des transformierten Plasmids exprimiert. Schließlich wurden unterschiedliche Mengen der Bakteriensuspension auf geeignete Selektionsplatten ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.2.1.4 Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäure

Alle gängigen Manipulationen von Nukleinsäure wie Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierungsreaktionen sowie Ligationen wurden nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 2001) oder nach den Angaben des Herstellers der Enzyme (New England Biolabs GmbH, Frankfurt; Fermentas GmbH, St Leon-Rot; Invitrogen GmbH, Karlsruhe) durchgeführt.

Die Konzentration von Nukleinsäuren lässt sich durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm ermitteln. Eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doppelsträngiger DNA bzw. 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ einzelsträngiger DNA (Oligonukleotide) und 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei RNA.

2.2.1.5 PCR

Es wurde eine Advantage 2 -PCR (Clontech, Palo Alto, CA, USA) gemäß der Methode von Saiki et. al. (1988) mit einem Gesamtvolumen von 50 μl zur exponentiellen Vermehrung der modifizierten Dystroglykan-Konstrukte durchgeführt. Die PCR-Reaktion beinhaltete dabei folgende Komponenten: 5 μl 10 x Advantage 2 PCR Puffer (Gibco BRL), 1 μl 10mM dNTPs (Gibco BRL), 10pmol 5' Oligonukleotid, 10pmol 3' Oligonukleotid, 1 μl Template-DNA, 1 μl 50x Advantage 2 Polymerase Mix (Gibco BRL), auf 50 μl mit *A. bidest*. Die PCR-Amplifikationen wurden in einem Thermocycler (Biometra) nach Angaben des

Herstellers durchgeführt. Zur Bestimmung der Größe und der Ausbeute der amplifizierten PCR-Produkte wurden jeweils 15µl des PCR-Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen.

Plasmid-Liste:

Plasmidname	Template	Oligonukleotide
DG-pMES (Wt-Dystroglycan)	pDyg2T	DysDEGFlag.frw DysGSP.rev
CH655DGT-pMES (Nicht-spaltbares Dystroglycan)	CH655DG-pDyg2T	DysDEGFlag.frw DysGSP.rev
CHd15CTDG-pMES (Verkürztes Dystroglycan)	pDyg2T	DGGSP15C.frw DGDEG15C.rev

2.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die zu analysierenden DNA-Proben wurden im Agarosegel in horizontalen Elektrophorese-Kammern bei Spannungen zwischen 50 und 180 V (in Abhängigkeit von der Größe der Elektrophoresekammer) aufgetrennt. Die Gele wurden durch Aufkochen der Agarose und unter Zusatz von Ethidiumbromid zur Färbung (Endkonzentration 400 ng/ml; Nachweisgrenze von Nukleinsäuren: 1,5 ng/mm²) hergestellt. Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer verwendet. Jede Probe wurde mit 1/5 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt und aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde GenerulerTM1kb DNA-Ladder (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet.

2.2.1.7 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit kommerziellen Aufreini-gungsverfahren nach Herstellerangaben durchgeführt (Qiagen, Hilden). DNA-Banden mit einem Gehalt über 40 ng erschienen dabei nach Verwendung eines BlueView Nucleic acid stain TAE-Puffers bei sichtbarem Licht als blaue Banden im Gel. Für Fragmente <100bp und >10 kbp wurde der Qiagen-Gelextraktions-Kit, der auf Bindung der DNA an Glasperlen basiert, verwendet; für Fragmente >300 bp wurden Qiaquick-Säulen verwendet.

2.2.1.8 Zero Blunt TOPO-Klonierung

Der Zero Blunt[®] Topo[®] PCR Cloning Kit enthält einen linearisierten pCR-BluntII-Topo-Vektor, der mit einer aktivierten Topoisomerase, isoliert aus dem Vaccinia Virus, kombiniert ist. Diese Topoisomerase ist über einen Tyrosinrest an das 3'-Ende des Vektors gekoppelt. Die Phosphotyrosylbindung zwischen DNA und Enzym kann durch die 5'-Hydroxylgruppe des zugegebenen PCR-Amplifikates attackiert werden. Dadurch wird das Enzym freigesetzt und das Amplifikat blunt end in den Vektor integriert. Durch die Integration des gewünschten Konstruktes wird das auf dem Vektor enthaltene lethale E. coli Gen ccdB, welches mit dem C-Terminus des LacZ α -Fragmentes fusioniert ist, unterbrochen (Bernard et al., 1994). Somit sterben die Zellen, die den nicht-rekombinanten Vektor enthalten nach der Ausplattierung ab. Ein Blau-Weiß-Screening ist daher nicht erforderlich. Die Zero Blunt Topo-Klonierung wurde mit dem Zero Blunt[®] Topo[®] PCR Cloning Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Sequenzierung der modifizierten Konstrukte wurde durch die GATC Biotech AG in Konstanz ausgeführt.

2.2.2 Zellkulturverfahren

2.2.2.1 Kultivierung, Passagieren, Kryokonservieren und Transfizieren von Zellen

Humane embryonale Nierenzellen wurden in DMEM-Medium in einem CO₂-Inkubator bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 10% und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Diese Bedingungen garantieren die Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes der CO₂/Bicarbonat-gepufferten Medien. Das Passagieren der Zellen erfolgte nachdem sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte (jeweils nach 4 bis 7 Tagen). Dazu wurden die Zellen mit 2ml PBS gespült. Zur Ablösung der adhärennten Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurden die Zellen in 3ml Kulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:3 in neue Kulturflaschen ausgesät. Zum Einfrieren wurden die Zellen 1 x in PBS gewaschen und durch Resuspension in Kulturmedium vom Zellkulturflaschenboden abgelöst. Daraufhin wurden die Zellen mit 5ml Zellkulturmedium resuspendiert und 5 Min. bei 1200 x g zentrifugiert. Dann wurden je 1-5 x 10⁶ Zellen in vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert. Je 1,8ml wurden in Cryotubes überführt und in eine ethanolgefüllte Einfrierbox gegeben, die bei -70°C eine Einfrierate von 1-2°C/Min. sicherstellt. Zur Rekultivierung der Zellen wurden diese in einem Wasserbad zügig bei 37°C aufgetaut und in vorgewärmtem Medium resuspendiert, kurz zentrifugiert und in das entsprechende Kulturmedium ausgesät. Um die zytotoxische Wirkung des DMSO so gering

wie möglich zu halten, wurde unmittelbar nach dem Anwachsen der Zellen ein Mediumwechsel durchgeführt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen verdünnt. 10µl dieser Zellsuspension wurden in eine Neubauerzählkammer überführt. Es wurden mindestens 3 äußere Großquadrate ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl/ml erfolgte durch die Formel: $N/n \times V \times 10^4$ (mit N= Zahl der gezählten Zellen; n= Zahl der ausgezählten Großquadrate; V=Verdünnungsfaktor; 10^4 Kammerfaktor). Es wurden 5×10^4 Zellen pro well in eine 24-well-Platte ausgesät.

Sterile Deckgläschen wurden in die Vertiefungen einer 24 well Platte gelegt. Die Beschichtung dieser Deckgläschen erfolgte mit Fibronectin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml. Nach einer 2 stündigen Inkubation bei 37°C im Brutschrank, konnten die wells 1 x mit 1 ml PBS gewaschen und dann bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

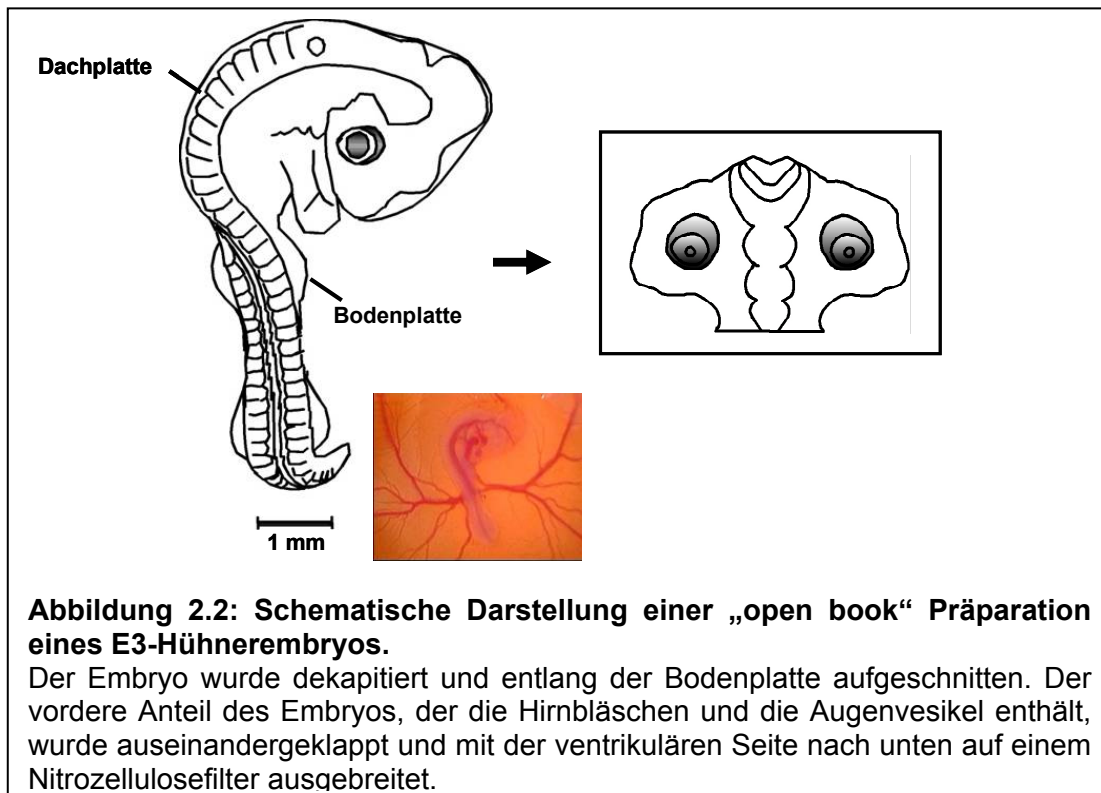
Die transienten Transfektionen wurden mit dem Transfektionsreagenz SuperFekt nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Qiagen, Hilden). Die Plasmid-DNA (Konzentration:1– 4µg/µl) wurde mit serumfreiem Zellkulturmedium auf 60µl aufgefüllt. Dann wurden 3-12µl SuperFekt-Transfektionsreagenz zugegeben. Das verdünnte SuperFekt-Transfektionsreagenz wurde nun nach einer Inkubationszeit von 10 Min mit serumhaltigem Zellkulturmedium auf 350 µl aufgefüllt. Danach wurden die DNA-SuperFekt-Komplexe auf die ausgesäten HEK293- oder COS7-Zellen getropft, die zuvor frisches Kulturmedium erhalten hatten. Nach einer 8-std. Inkubationszeit wurden die Zellen mit 1ml Zellkulturmedium versetzt und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Tansfektionseffizienz nach Transfektion eines Plasmides, das für das „ Enhanced Green fluorescent protein“ (EGFP), aus der Qualle *Aequorea victoria* kodiert (Zolotukhin, 1996), betrug annähernd 10%. Mit pMES-Vektor transfizierte Zellen leuchten bei Betrachtung im Fluoreszenz-Mikroskop grün.

2.2.3 Immunhistologische Methoden

2.2.3.1 „Open-Book“- Präparation von E3-Hühnerembryonen

Um die Expression der modifizierten Dystroglycan cDNA und die Transfektionseffizienz der Methode zu überprüfen, wurde 24 Std nach der Elektroporation eine „Open-Book-Präparation“ an Embryonaltag 3 (HHStadium 11) durchgeführt (Hamburger und Hamilton, 1951; Abb 2.2). Dazu wurden die Embryonen zunächst dekapitiert, in eine Petrischale mit Hanks-Lösung übertragen und dann mit einer Irisschere entlang der

Bodenplatte aufgeschnitten. Die beiden Hälften wurden auseinandergebreitet und mit der ventrikulären Seite nach unten auf einem Nitrocellulosefilter befestigt. Die Filter mit den Embryos wurden kurz in 1 x PBS gewaschen und dann 10 Min. in 4%iger PFA-Lösung



fixiert. Danach wurde der Filter auf einem Objektträger mit dem Eindeckmedium Citifluor AF1 eingedeckt und die EGFP Expression konnte an einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

2.2.3.2 Präparation der Retina

Zur Untersuchung der Retinastruktur erfolgte die Präparation der injizierten Hühnerretina 4 Tage nach der Elektroporation. Dazu wurden die Embryonen zunächst dekapitiert, um beide Augen vorsichtig mit einer Pinzette herauslösen zu können. Der Sehnerv wurde mit einer Schere durchtrennt. Die Präparation des Auges erfolgte in Hanks-Lösung zur Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes. Überschüssiges Bindegewebe konnte vorsichtig mit einer Pinzette entfernt werden. Mit Hilfe einer geeigneten Irisschere wurde das Auge entlang der Ora Serrata geöffnet. Durch vorsichtiges Anheben der Iris kam die Retina zum Vorschein. Nun wurde die Iris durch Einschneiden an 4 Stellen bis zum Austrittspunkt des Sehnervs geöffnet. Der gallertartige Glaskörper wurde entfernt.

Letzten Endes konnte die Retina kleeblattförmig auf einem Nitrocellulose-Filter ausgebreitet werden. Die ausgebreitete Retina wurde 1 x in PBS gewaschen und dann 10 Min. in 4 %iger PFA-Lösung fixiert. Das Fixierungsmittel wurde kurz in PBS ausgewaschen. Danach wurde der Filter auf einen Objektträger übertragen und mit einem Pap Pen (Dako Cytomation GmbH, Göttingen) umrundet. Nun konnte eine immunhistochemische Färbung der Retina durchgeführt werden.

2.2.3.3 Präparation des Tektums an Embryonaltag 4

Zum Nachweis der injizierten Proteine im Western-Blot wurde das Tektum der Hühnerembryonen 2 Tage nach der Elektroporation präpariert (Kröger und Niehörster, 1990; Kröger und Schwarz, 1990). Hierzu wurden die Hühnerembryonen zunächst dekapitiert und die Köpfe in Hank's-Lösung übertragen. Das Tektum wurde mit einer Pinzette herausgelöst. Dann wurden die oberen Hautschichten und die Aderhaut des Tectums entfernt. Die Tekta wurden in einem Eppendorfgefäß auf Eis gesammelt und anschließend mit einer entsprechenden Menge Homogenisationspuffer überschichtet wie im Abschnitt Membranpräparation von Proteinen aus Gewebe beschrieben. Zum Einfrieren wurden diese 10 Min. in 4%iger PFA-Lösung fixiert und 3 x 5 Min. in PBS gewaschen. Dann erfolgte eine Inkubation der Köpfe über Nacht bei 4°C in 30 %iger Sucroselösung, bevor diese schonend in Stickstoff eingefroren werden konnten.

2.2.3.4 Herstellung von Gefrierschnitten und deren Färbung

Nach der Präparation wurden die Gewebestücke für 10 Min in 4 %iger PFA-Lösung fixiert. Danach wurde das Fixierungsmittel 3 x für jeweils 5 Min durch Waschen in 1XPBS-Lösung aus dem Schnitt herausgelöst. Die Zugabe von 30 %iger Sucroselösung entzieht dem Gewebe Fixierungsmittel und Wasser, senkt den Gefrierpunkt und verhindert damit die Bildung größerer Eiskristalle beim Einfrieren. Das Gewebe wurde in der Sucroselösung über Nacht bei 4 °C gelagert. Daraufhin wurden Aluminiumgefäße geformt und mit dem Einbettmedium Tissue Freezing Medium (Leica Instruments GmbH, Nussloch) gefüllt. Das Gewebestück wurde nun direkt aus der Sucrose in die Aluminiumform überführt und schonend in Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der eingefrorenen Gewebestücke erfolgte bei -20 °C.

Die Objektträger wurden in eine Gelatine-haltige Lösung getaucht und dann über Nacht bei RT zum Trocknen aufgestellt. Die Gelatine gewährleistet eine effektivere Haftung der Gefrierschnitte auf dem Objektträger.

Der Kryostat wurde auf $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und die gefrorenen Schnitte mit dem Einbettmedium Tissue Freezing Medium (Leica Instruments GmbH, Nussloch) auf einen Block gefroren und in den Kryostaten eingespannt. Es wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von $10\text{ }\mu\text{m}$ hergestellt. Die Trocknung der Gefrierschnitte erfolgte 4 Std. oder über Nacht bei RT. Danach wurden die angefertigten Schnitte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die indirekte Immunfluoreszenzanalyse dient zum Nachweis der Expression von Proteinen in Zellen und Gewebe. Dieser Nachweis erfolgt durch die Inkubation mit geeigneten Antikörpern, die mit einem fluoreszierenden Marker gekoppelt sind. Die Fluoreszenz dieses Markers kann unter dem Fluoreszenzmikroskop leicht detektiert werden. Um die Expression der modifizierten Dystroglycankonstrukte überprüfen zu können, wurden adhärente Zellen wie die HEK293-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und am folgenden Tag mit der modifizierten Dystroglycan cDNA transfiziert. Nach 48 Std. erfolgte die Fixierung der Zellen in 4%igem PFA für 10 Min. Danach wurden die Zellen für jeweils 5 Min. 3 x mit PBS gewaschen und mit $200\mu\text{l}$ Blockingpuffer zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen überschichtet. Der Nachweis von spezifischen Proteinen in Gewebeschnitten erforderte es, dass diese, vor der 30 minütigen Inkubation mit Blocking-Lösung, mit einem Pap Pen (Dako Cytomation GmbH, Göttingen) umrundet wurden. Die Umrundung erfolgte um den Antikörper zu konzentrieren. Daraufhin wurden Zellen oder Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper in der oben angegebenen Konzentration 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung des überschüssigen Antikörpers wurden diese 3 x mit Waschpuffer gewaschen. Nach Zugabe von $200\text{ }\mu\text{l}$ eines geeigneten Sekundärantikörpers auf Zellen und Gewebe wurden diese erneut 3 x mit Waschpuffer gewaschen. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte eine 10 minütige Anfärbung der Zellkerne mit Bisbenzimid Hoechst 33342 in einer Konzentration von $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Bisbenzimid Hoechst bindet bevorzugt an AT-reiche Regionen doppelsträngige DNA und emittiert nach Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop blaues Licht. Abschließend wurde 1x mit A.bidest zur Entfernung des BSA und 1 x mit auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühltem absoluten Ethanol gewaschen. Die Einbettung von Zellen und Geweben erfolgte mit Citifluor AF1 (Plano GmbH, Wetzlar). Die gefärbten Schnitte und Zellen konnten daraufhin am Fluoreszenzmikroskop (Leica) ausgewertet werden.

2.2.3.8 Quantifizierung der BrdU und AChE-Färbungen

Zur Bestimmung der Anzahl proliferierender Zellen wurden BrdU-positive Zellen in einem $100\text{ }\mu\text{m}$ Retinasegment in 3 voneinander unabhängigen Präparaten ausgezählt. Die

Quantifizierung der differenzierten Zellen erfolgte auf die gleiche Weise durch Auszählung der AChE-markierten Zellen. Die Gesamtzellzahl wurde durch Auszählung der Bisbenzimid-markierten Zellkerne bestimmt. Als Kontrollen dienten jeweils nichttransfizierte und mit Leervektor transfizierte Präparate.

2.2.4 cDNA Injektion und in ovo Elektroporation

Zur Herstellung der Mikroelektrode wurde ein Gefäß mit 0,8 M NaOH Lösung gefüllt. Ein Wolframdraht wurde an das Anodenkabel angeschlossen. Das eisenhaltige Kathodenkabel wurde in die Flüssigkeit gehängt. Nach Anschluß des Spannungsgerätes erfolgte eine Elution des Metalls in die Lösung, da Wolfram ein erheblich negativeres Normalpotential aufweist als Eisen, ist es das unedlere Metall und wird zersetzt. Die Reaktion entspricht der, die auch in einem Galvanischen Element stattfindet. Dabei wurde die Mikroelektrode auf ca. 40 µm angespitzt. Die Breite der Spitze in µm wurde mit einem entsprechenden Meßinstrument (List-Medical-Electronic, Darmstadt) ausgemessen.

Die Mikrokapillaren wurden mit einem Pullgerät unter genau festgelegten Bedingungen durch Anlegen einer bestimmten Stromstärke hergestellt. Der Kapillaren-Außendurchmesser wurde auf etwa 1,6 µm und der Kapillaren-Innendurchmesser auf 1,24 µm eingestellt. Die Überprüfung der Durchmesser der Mikrokapillaren (Brand, Wertheim) erfolgte mit einem entsprechenden Meßinstrument (List-Medical-Electronic, Darmstadt).

Um die verschiedenen Dystroglycankonstrukte *in vivo* exprimieren zu können und die Auswirkung der Überexpression dieser Konstrukte über einen längeren Zeitraum *in vivo* dokumentieren zu können, wurde die Hühnerretina als ein leicht zugängliches und *in ovo* kultivierbares Modellsystem gewählt. Das Auge ist ontogenetisch eine Ausstülpung des Diencephalons und gehört damit zum ZNS. Die entsprechend mutierte cDNA wurde sehr früh in der Entwicklung, am Embryonaltag 2 im HH Stadium 11 (Hamburger und Hamilton, 1951) in den linken Augenvesikel injiziert. Dazu wurden die Hühnerembryonen 48 Stunden in einem Brutgerät bebrütet. Die für die Präparation notwendige Absenkung des Hühnerembryos erfolgte durch die Entfernung von etwa 1 ml Flüssigkeit mittels einer Spritze an der stumpfen Seite des Eies. Mit einer Pinzette konnte das Ei nun geöffnet werden ohne den darunterliegenden Embryo zu verletzen. Die über dem Embryo liegende Vitellinmembran wurde entfernt. Die Ablösung der Membran ermöglicht eine gezielte Injektion und reduziert unter anderem auch den Widerstand, der bei der Injektion auf die

Mikrokapillare trifft. Die modifizierten Dystroglycankonstrukte wurden in HH Stadium 11 Hühnerembryonen (Hamburger und Hamilton, 1951) in den linken Augenvesikel injiziert. Die Injektionen wurden insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass der Augenvesikel zu diesem Zeitpunkt wesentlich leichter zugänglich ist, in diesem frühen Stadium injiziert und nicht in späteren Stadien. In späteren Stadien war es kaum möglich mit der Mikrokapillare die oberen Hautschichten und die Blutgefäße zu durchdringen.

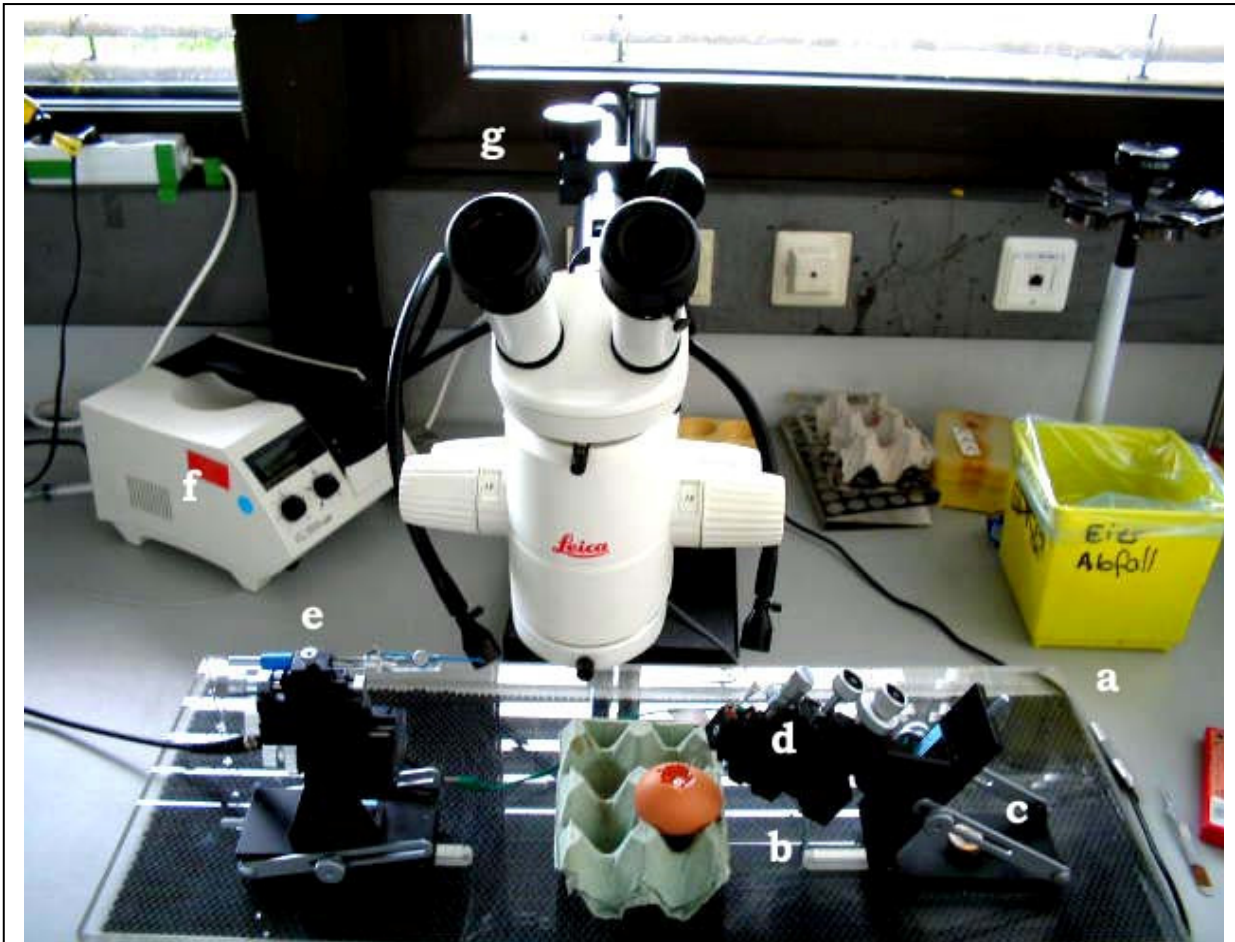
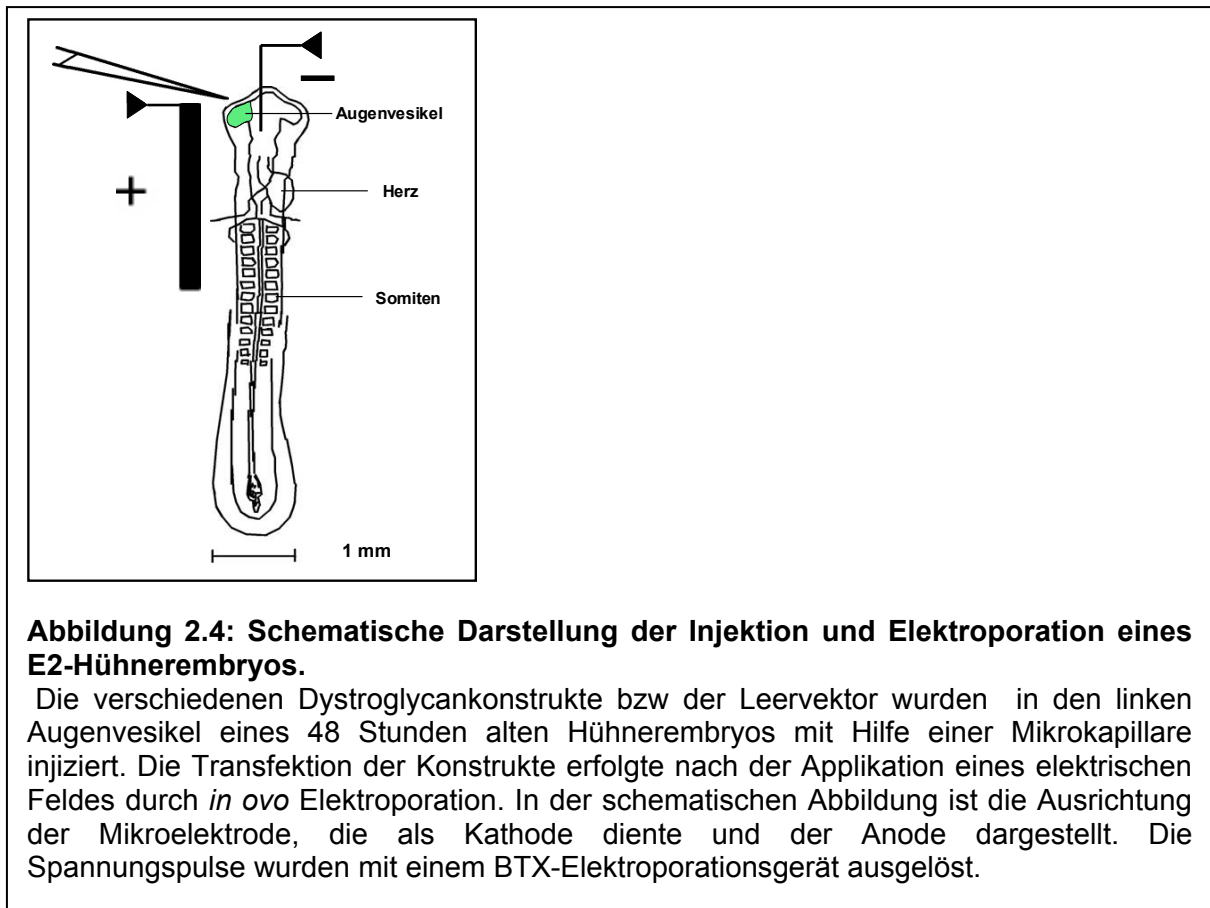


Abbildung 2.3: Aufbau der Elektroporationsapparatur

Diese Elektroporationsapparatur umfasst zwei Mikromanipulatoren (d), die mit Hilfe einer Flügelschraube (c) beweglich in einer Vertiefung (b) innerhalb der Plastikunterlage (a) verankert sind. Durch die Lösung dieser Schraube ist eine Bewegung entlang der Rinne (b) in der Plastikunterlage in Richtung des Untersuchungsobjektes möglich. An diesen Mikromanipulatoren wurden jeweils eine Goldelektrode als Anode (e) auf der linken Seite und eine Mikrokapillare als Kathode an der rechten Seite befestigt. Durch verschiedene Schrauben kann der Mikromanipulator (d) in den verschiedenen Dimensionen bewegt werden. Auch der Eintrittswinkel der Elektroden und Mikrokapillaren kann durch Kippen des Gerätes variiert werden (d). Die schwarze Unterlage, unterhalb der Plastikplatte verhindert ein Verrutschen der Apparatur während der Elektroporation und ermöglicht eine schnelle Demontage der Anlage, so dass der Raum auch noch für andere Zwecke genutzt werden kann. Die Hühnerembryonen konnte dann mit Hilfe der Mikromanipulatoren sehr exakt unter dem Binokular (g) und durch eine optimale Ausleuchtung (f) des Embryos in den linken Augenvesikel injiziert werden. Die Applikation der elektrischen Pulse erfolgte durch ein Btx-Elektroporationsgerät.

Für die Applikation eines elektrischen Feldes nach der Injektion wurde ein BTX-Elektroporationssystem 830 verwendet (BTX, San Diego, CA, USA) mit den dazugehörigen Mikromanipulatoren (Q-Biogen, Deutschland; Abb. 2.3). Die Anode, eine goldbeschichtete Elektrode (Länge: 5mm; Durchmesser 0,5 mm; BTX, San Diego, CA, USA), wurde parallel zur Längsachse des Embryos ausgerichtet. Durch die Applikation elektrischer Pulse werden dann temporär Poren in den Zellen geöffnet, durch die das DNA-Konstrukt von der Zelle aufgenommen werden kann. Die Zellen an der Anodenseite wurden somit mit dem injizierten Konstrukt transfiziert. Ein großes Problem bestand jedoch darin, dass die gängige Elektroporationsmethode zur Überexpression von Proteinen in den winzigen Augenvesikel



sich als wenig geeignet erwies. Die herkömmlichen 5 mm Elektroden gaben die für eine effiziente Transfektion notwendigen Spannungspulse an den gesamten Embryo weiter. Fünfzig Prozent der Embryonen überlebten diese Prozedur nicht, da durch Verwendung dieser Methode spannungsempfindlichere Bereiche in ihrer Differenzierung und Entwicklung

schwerwiegend geschädigt wurden (Momose et al., 1999). Unter diesem Gesichtspunkt war die Einschränkung des elektrischen Feldes, auf den für die Transfektion vorgesehenen Teilbereich des Embryos, in diesem Fall den Augenvesikel, notwendig. Diese Begrenzung des elektrischen Feldes erforderte die Verwendung einer Mikroelektrode aus Wolframdraht, die an der Spitze auf 40 µm angespitzt wurde (Momose et al., 1999). Da die optimalen Elektroporationsparameter nicht bekannt waren, wurden unterschiedliche Bedingungen gewählt, um eine möglichst hohe Überlebensrate bei einer ebenso hohen Transfektionseffizienz zu gewährleisten. Dabei wurden DNA Konzentration, Spannung, Anzahl der Pulse, sowie Pulsdauer und Intervalldauer zwischen den einzelnen Pulsen variiert. Die Applikation von 5 Pulsen mit einer Spannungsstärke von 15 V, einer Dauer von 25 msec und einem Pulsintervall von 100 msec erwies sich als geeignet, um sowohl eine effektive Transfektion der Zellen als auch eine entsprechende Überlebensrate von annähernd 90 % sicherzustellen. Die DNA-Konstrukte wurden in einer Konzentration von 4 µg/µl in einem Volumen von ca 0,5 µl eingesetzt und mit einer Mikrokapillare in das Lumen der Augenvesikel injiziert (Abb. 2.4; Hamburger und Hamilton, 1951). Dabei wurde der linke Augenvesikel vollständig mit der Flüssigkeit gefüllt. Die Transfektion der Zellen erfolgte wiederum nach Anlegen eines elektrischen Feldes. Nach Beendigung der Elektroporation wurden die Öffnung der Eier mit einer hochviskösen Silikonsalbe (Roth, Karlsruhe) bestrichen und mit Frischhaltefolie bedeckt, um ein Austrocknen des Hühnerembryos während der weiteren Bebrütung zu verhindern. Die Eier wurden dann wieder in das Brutgerät zurückgestellt und je nach Versuchsbedingung 1-11 Tage weiter kultiviert und danach präpariert. Zur Markierung der proliferierenden Zellen in der sich entwickelnden Hühnerretina wurde 3 Stunden vor der Präparation 4 Tage nach Injektion und Elektroporation ein BrdU-Puls verabreicht. BrdU ist ein Nucleotidanalogen, das in die DNA von S-Phase Zellen einbaut wird und dann mit anti-BrdU Antikörpern nachgewiesen werden kann. Es wurden 100 µl BrdU in einer Konzentration von 10 mg/ml direkt auf den Embryo gegeben.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Membranpräparation von Zellen und Geweben

Zur Homogenisation wurden 10^6 HEK Zellen in 35 mm Schalen ausgesät und transfiziert. 24 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen 1x in PBS gewaschen. Zur Ablösung der Zellen von der Kulturschale wurden die Zellen in neuem Kulturmedium

resuspendiert und 5 Min. bei 1200 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Ein zusätzlicher Waschschrift in PBS ermöglichte die Entfernung des an den Zellen haftenden Kulturmediums. Dann erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 5 Min. bei 1200 upm. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Daraufhin wurden die Zellen mit 1ml des Zellysepuffers versetzt und 2 h bei 4°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das 2-fache Volumen SDS-Probenauftragspuffer zugegeben. Der Ansatz wurde bei 95 °C in einem Thermoblock erhitzt. 10 µl des Probenansatzes wurde auf ein 9 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Es wurde ein 9 %iges Gel verwendet, um α - und β -Dystroglycan im gleichen Gel nachweisen zu können.

Zur Homogenisation von 0,5 g Gewebe wurde 1 ml Homogenisationspuffer verwendet. Es wurden 30 Retinae oder 20 Tekta aus E4-E6-Hühnerembryonen präpariert und mit der entsprechenden Menge an Homogenisationspuffer versetzt. Das Gewebe wurde durch einen Wheaton-Potter zerkleinert und 2 h bei 4°C gelagert (Sugita et al., 2001). Dann wurde der Ansatz mit dem 2-fachen Volumen an SDS-Probenauftragspuffer versetzt. Die Probe wurde 5 Min. bei 95 °C im Thermoblock erhitzt und bei -20 °C gelagert. Zur Abtrennung grober Zelltrümmer wurde das Homogenisat vor der Zugabe des Probenauftragspuffers 3 Min. bei 4 °C und 1000xg und zur Trennung der Membran und Zytosolfraktion dann nochmals 15 Min. bei 4°C und 100000xg zentrifugiert. Es wurden jeweils 10 µl der Probe auf ein 9%iges Polyacrylamidgel aufgetragen.

Zur Aufreinigung der Proteine nach der WGA-Methode wurden diese nach der 2 std.Inkubation bei 4°C bei 140000xg für 30 Min zentrifugiert und der Überstand mit WGA-Agarose über Nacht bei 4°C inkubiert (Sugita et al., 2001). Die zu isolierenden Glykoproteine binden dabei bevorzugt an die Lektin-gekoppelte Agarose und könne auf diese Weise angereichert und aufgereinigt werden. Die WGA (Wheat-germ-agglutinin)-Agarose wurde mit Homogenisationspuffer gewaschen und die Glykoproteine anschließend mit Elutionspuffer eluiert. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976).

2.2.5.3 Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

Die Proteinexpression in Gewebe und in HEK-Zellen wurde durch Polyacrylamidgelelektrophorese in einem diskontinuierlichen Puffersystem aus Tris-Glycinpuffern analysiert (Laemmli, 1970). Dabei wurden die im Gewebe und in Zellen exprimierten Proteiner durch β -Mercaptoethanol reduziert und durch die Bindung an das

Detergenz SDS denaturiert. Der entstehende negativ geladene SDS-Proteinkomplex wandert im elektrischen Feld durch eine Polyacrylamidmatrix definierter Porengröße zur Anode. Die Proteine werden anhand ihres Stokes-Radius und damit anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Die hydrophilen Zuckerketten glykosylierter Proteine binden jedoch kein SDS, so daß diese im Vergleich zu nichtglykosylierten Proteinen ein atypisches Laufmuster im Gel aufweisen. Dies resultiert in einer breiter verlaufenden Bande. Um α - und β -Dystroglycan nebeneinander in einem Gel nachweisen zu können, wurden 9%ige Polyacrylamid-Trenngele hergestellt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit kolloidaler Coomassielösung angefärbt. Das Coomassie bindet dabei irreversibel an die Proteinbanden. Es wurden 10 ml Coomassielösung mit A. bidest auf 30 ml aufgefüllt und dann noch einmal 10 ml Ethanol 96%ig reinst hinzugegeben. Das entsprechende Gel wurde dann bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Anschließend wurde das Gel über Nacht oder für 4 Std. in A.bidest überführt und konnte dann getrocknet werden. Zur Trocknung der Polyacrylamidgele wurden diese über Nacht bei 4°C in eine 4%ige Glycerinlösung gelegt. Das Trocknen erfolgt unter Vakuum 1 Std. bei 65 °C.

Der Western-Blot wurde nach der Methode von Burnette durchgeführt (Burnette, 1981). Dazu wurden die auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine in einem Elektrophoresetanksystem (Amersham Bioscience, Freiburg) auf eine Nitrocellulose- (Schleicher und Schuell, Stadt) oder Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF; Immobilon von Millipore, Schwalbach) transferiert. Um die Proteinbindestellen zu aktivieren wird dem Transferpuffer in der Regel 20 % absoluter technischer Ethanol zugesetzt. Bei PVDF-Membranen ist zusätzlich ein Vorquellen in Ethanol notwendig, da diese Membranen nicht durch wässrige Lösungen benetzt werden können. Das Blotten der Proteine erfolgte 3 Std. bei 8 V und 4°C. Die Anfärbung der Nitrocellulosemembran erfolgte in 0,05%iger Ponceaulösung. Diese Färbelösung hat eine Nachweisgrenze von ungefähr 50 ng Protein pro Bande. Die Färbung ist reversibel und kann durch 1x Waschen in PBS-Lösung wieder rückgängig gemacht werden. Anschließend wurde der Blot in 5 %iger Milchpulverlösung über Nacht bei 4 °C inkubiert, um überschüssige/unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und somit den Blot für die nachfolgende Antikörperfärbung vorzubereiten.

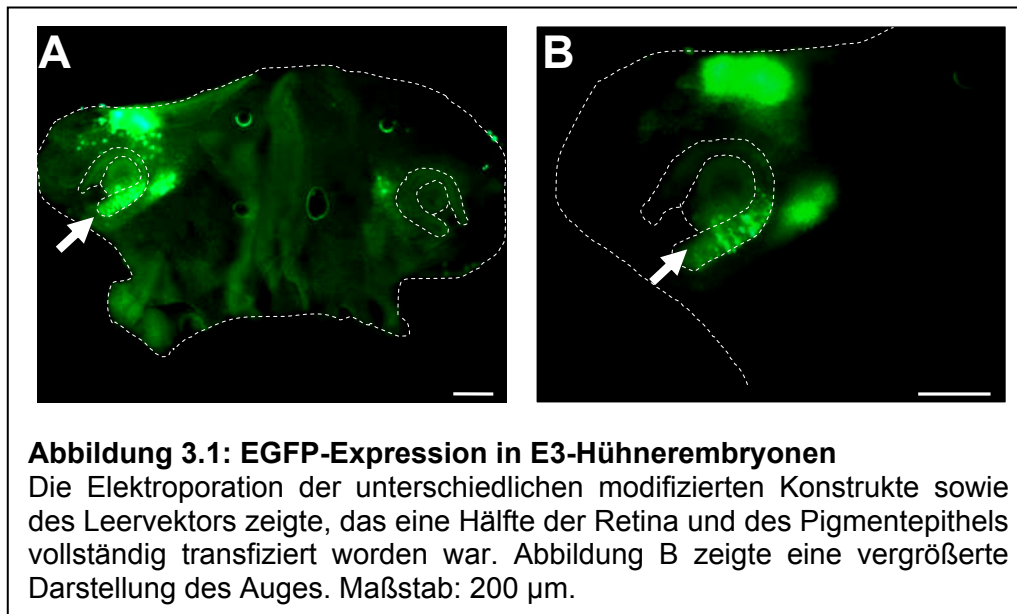
Die nachfolgende Färbung diente dem Nachweis der im Gewebe und in Zellen exprimierten Proteine. Dazu wurden zunächst die unspezifischen Bindungsstellen bei 4°C über Nacht in 5 %iger Milchpulverlösung abgesättigt. Dann wurde der Erstantikörper in der entsprechenden Verdünnung in 5 %iger Milchpulverlösung hinzugegeben. Die Inkubation

erfolgt in der Regel 2 - 3 Std. bei RT. Daraufhin wurde der Blot 10 Min und 2x 5 Min in 1 %iger Milchpulverlösung gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Nach der Zugabe von mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpern in der entsprechenden Konzentration, wiederum verdünnt in 5 %iger Milchpulverlösung wurde der Blot 1 Std. bei RT inkubiert. Das Waschen erfolgte 1 x 10 Min und 1x 5 Min in 1 %iger Milchpulverlösung. Der letzte Waschschrift wurde 5 Min mit PBS durchgeführt. Dann wurde der Blot mit PBS benetzt luftblasenfrei auf einer Glasplatte ausgebreitet und in eine dafür vorgesehene Filmkassette gelegt. Peroxidase-gekoppelte Antikörper katalysieren die Oxidation von Luminol und erzeugen damit eine Chemilumineszenz, die einen Film an den entsprechenden Stellen belichtet. Das ECL-Substrat-Lösung 1 und 2 wurden zu gleichen Teilen (Pierce, Bonn) gemischt und gleichmäßig über dem Blot verteilt. Anschließend wurde eine Klarsichtfolie luftblasen- und faltenfrei über den Blot gezogen. Der Blot wurde 1 Min bis 2 Std. mit einem Hyperfilm (Amersham, Freiburg) exponiert. Danach wurde der Blot für 1Min. in Entwicklerlösung, dann kurz in Stopplösung eingetaucht und schließlich in Fixierlösung fixiert, bis der Film klar aussah. Die Fixierersalze wurden mit klarem Wasser abgespült und es wurde wiederum noch einmal mit A. bidest gespült. Dann wurde der Film zum Trocknen aufgehängt.

III. Ergebnisse

3.1 Analyse der EGFP-Expression mit „open-book“-Präparation

Um die Effizienz, die Selektivität und das Ausmaß der Transfektion durch *in ovo* Elektroporation zu beurteilen, wurde die EGFP Fluoreszenz 24 Stunden nach der Elektroporation des leeren pMES Vektors ausgewertet. Diese Untersuchung ergab, dass die Fluoreszenz auf die Retina und das Pigmentepithel des linken, auf der Anodenseite gelegenen Auges beschränkt blieb und ein Großteil der Zellen transfiziert worden war. 70% der Embryonen wiesen in der Regel Fluoreszenz auf. In 50% dieser Embryonen war eine Hälfte der Retina vollständig transfiziert. Das kontralaterale Auge zeigte dagegen keinerlei

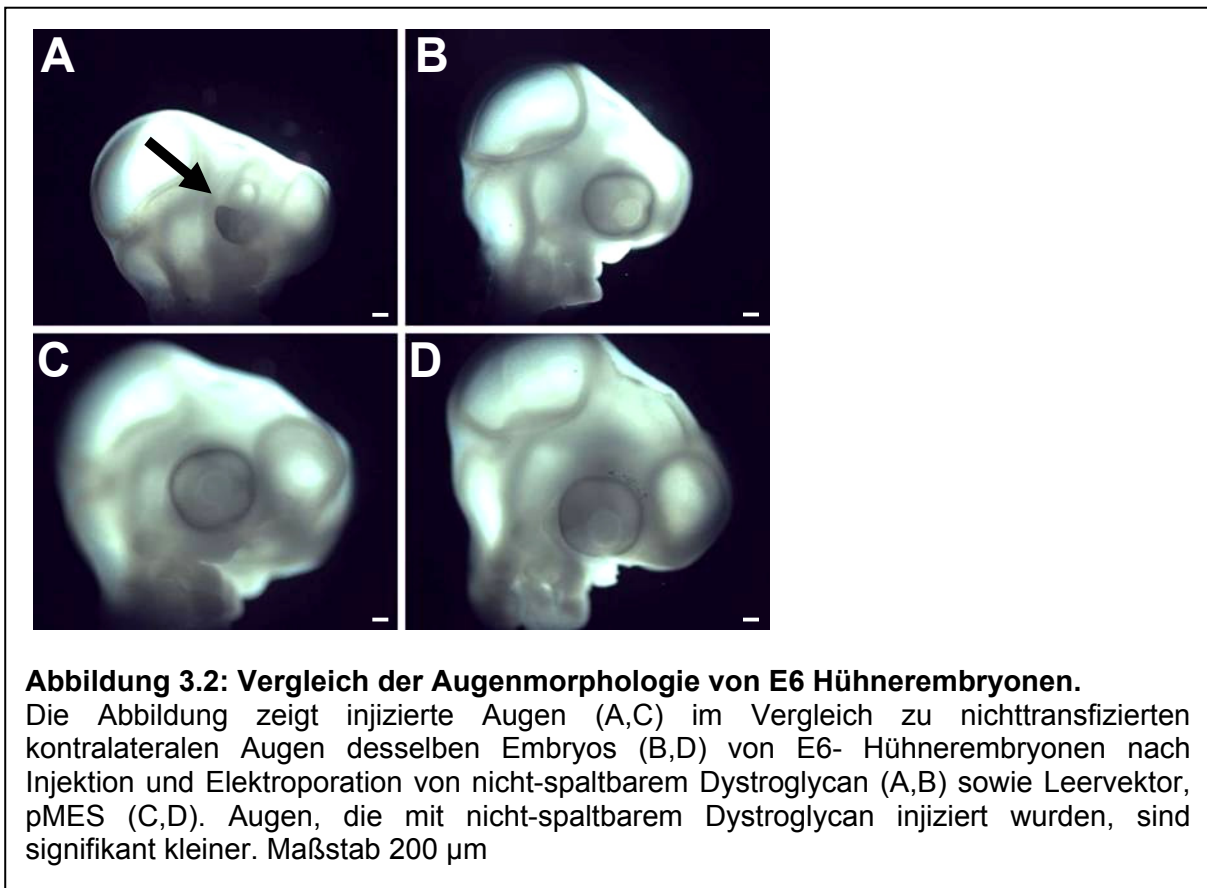


Fluoreszenz und diente deshalb in allen folgenden Experimenten als Negativkontrolle. In einigen seltenen Fällen war zusätzlich Fluoreszenz im ventralen Vorderhirnbereich an der Einstichstelle der Mikrokapillare sichtbar (siehe Abbildung 3.1). Die an dieser Stelle detektierbare EGFP-Expression war eine Folge austretender cDNA nach der Injektion in den Augenvesikel. Die Transfektion des ventralen Vorderhirnbereichs hatte jedoch keine Auswirkungen auf die weitere Augenentwicklung und wurde daher vernachlässigt. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Proteine an der gewünschten Stelle exprimiert wurden. Dies bestätigte die Effizienz der gewählten Methode. DNA-Konzentration wie auch Spannungspulse waren in adäquatem Maß eingesetzt worden, um eine optimale

Elektroporation und damit eine effiziente Transfektion der Retina zu gewährleisten.

3.2 Morphologische Veränderungen

Um die Beschaffenheit der Augen nach der Transfektion von Leervektor, Wt-Dystroglycan sowie verkürztem und nicht-spaltbarem Dystroglycan untersuchen zu können, wurde der Augendurchmesser bestimmt. Retinae, die mit dem nicht-spaltbaren Dystroglycankonstrukt transfiziert worden waren, zeigten gravierende Veränderungen (Abb. 3.2 A). Die Augen waren im Vergleich zu nichttransfizierten kontralateralen (Abb. 3.2 B) und auch zu Augen, die mit einem der anderen Dystroglycankonstrukte oder mit dem Leervektor

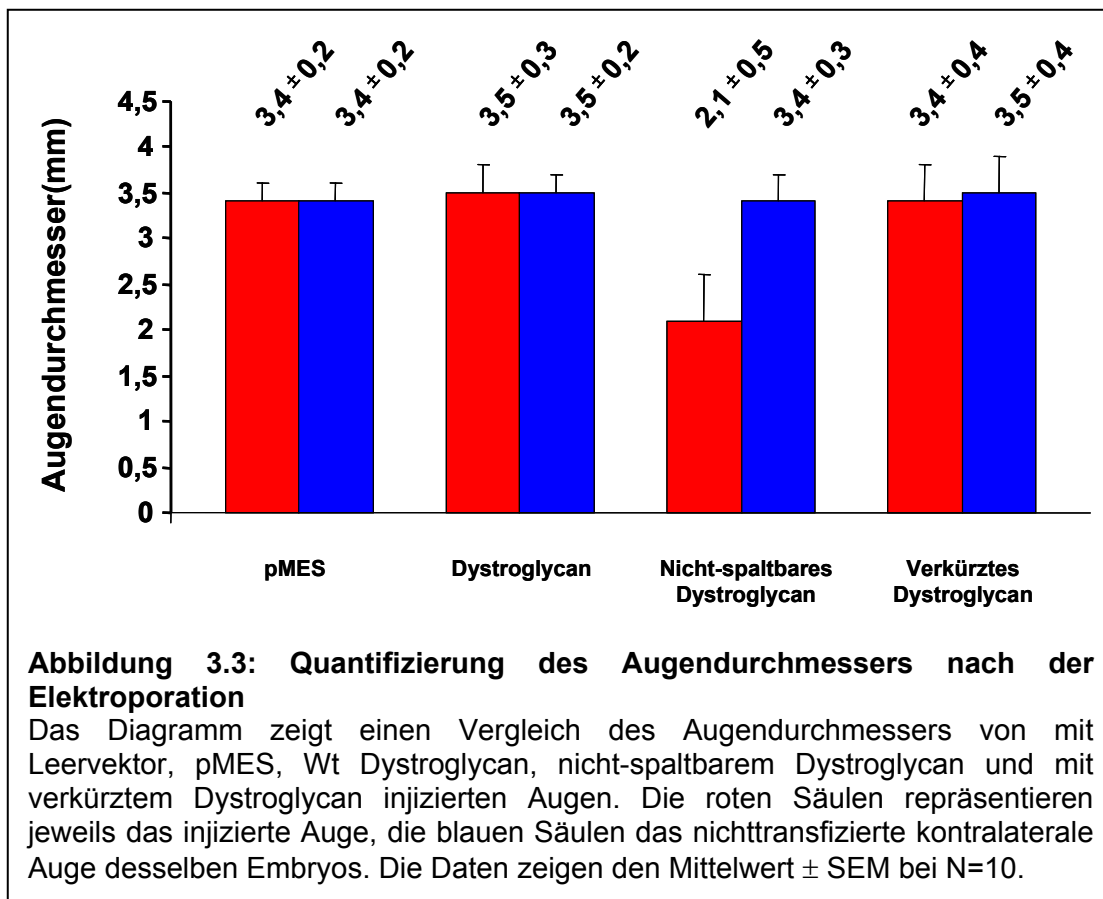


(Abb. 3.2 C) transfiziert worden waren, signifikant kleiner.

Um diese Beobachtung zu quantifizieren wurde der Augendurchmesser von jeweils 10 Embryonen, die mit den verschiedenen Dystroglycankonstrukten transfiziert worden waren, ermittelt (Abb 3.3). Der Augendurchmesser war nach Injektion des Leervektors pMES $3,4 \pm 0,2$ mm und nach Elektroporation von Wt-Dystroglycan $3,5 \pm 0,3$ mm groß.

Ergebnisse

Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant von den nichttransfizierten, kontralateralen Augen desselben Embryos ($3,4 \pm 0,2$ mm und $3,5 \pm 0,2$). Eine Expression von Wt-Dystroglycan und die Elektroporation selbst hatten demnach keinen Einfluss auf den Augendurchmesser. Die Transfektion des verkürzten Dystroglycankonstruktes zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Größe des Augendurchmessers. Augen, die mit dem nicht-spaltbaren Dystroglycankonstrukt injiziert worden waren, wiesen dagegen eine dramatische Reduktion auf einen Wert von $2,1 \pm 0,5$ mm auf. In nichttransfizierten, kontralateralen Augen desselben Embryos konnten derartige Veränderungen nicht beobachtet werden. Die Unterschiede sind also direkt auf die Überexpression des nicht-spaltbaren Dystroglycans zurückzuführen, da weder die angelegte Spannung noch die Injektionsart oder die cDNA



selber einen Einfluss auf die Entwicklung des Auges hatten.

Um zu untersuchen, ob die Veränderung des Augendurchmessers Auswirkungen auf die Struktur von retinalen Zellen hatte, wurden die Retinae der Hühnerembryonen, die mit

Ergebnisse

den verschiedenen Dystroglycankonstrukten injiziert worden waren, mit Antikörpern gegen EGFP, um transfizierte Zellen von nichttransfizierten Zellen unterscheiden zu können, gefärbt. Anschließend wurde eine Bisbenzimidinfärbung zur Markierung der Zellkerne durchgeführt. Die Abbildung 3.4 zeigt eine Übersicht über die an Embryonaltag 6 präparierten Augen nach der Elektroporation von Leervektor pMES (Abb 3.4 A,E,I) und Wt-Dystroglycan (Abb 3.4 B,F,J) ist sowohl die Augengröße als auch die Retinadicke im zentralen Bereich der Retina vergleichbar den Werten, die bei unbehandelten Retinae ermittelt wurden. Dabei ist anzumerken, dass in der Retina ein Entwicklungsgradient von zentral nach peripher existiert. Der zentrale Bereich ist ungefähr 2 Tage weiter entwickelt als der periphere Bereich der Retina. Für die Auswertung wurde deshalb nur im zentralen Bereich der Retina die Dicke bestimmt. Dementsprechend ist die Dicke der Retina zentral und peripher unterschiedlich.

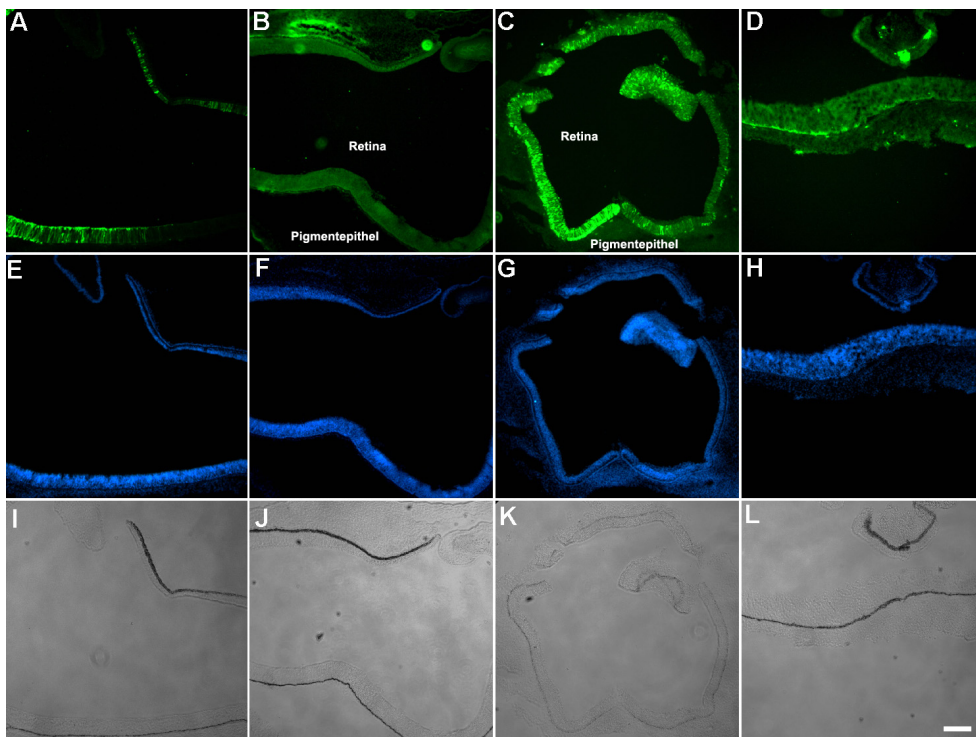


Abbildung 3.4: Vergleich von Übersichtsfärbungen nach Injektion der unterschiedlichen Dystroglycan cDNA. Die immunhistochemische Färbung von E6 Hühnerretina wurde mit Antikörpern gegen EGFP (A-D) und Färbelösung Bisbenzimid (E-H) durchgeführt. Die Bilder (I-L) zeigen Phasenkontrastaufnahmen der Augen. Die Retinae (A,E,I) wurden mit Leervektor, (B,F,J) mit Wt-Dystroglycan, (C,G,K) mit nicht-spaltbarem Dystroglycan und (D,H,L) mit verkürztem Dystroglycan elektroporiert. Nach der Elektroporation der Augen mit nicht-spaltbarem Dystroglycan entwickelten die Embryonen ein signifikant kleineres Auge. Die Retinadicke war drastisch reduziert. Im Gegensatz dazu war die Retinadicke nach der Transfektion von verkürztem Dystroglycan verdickt. Maßstab 200 µm.

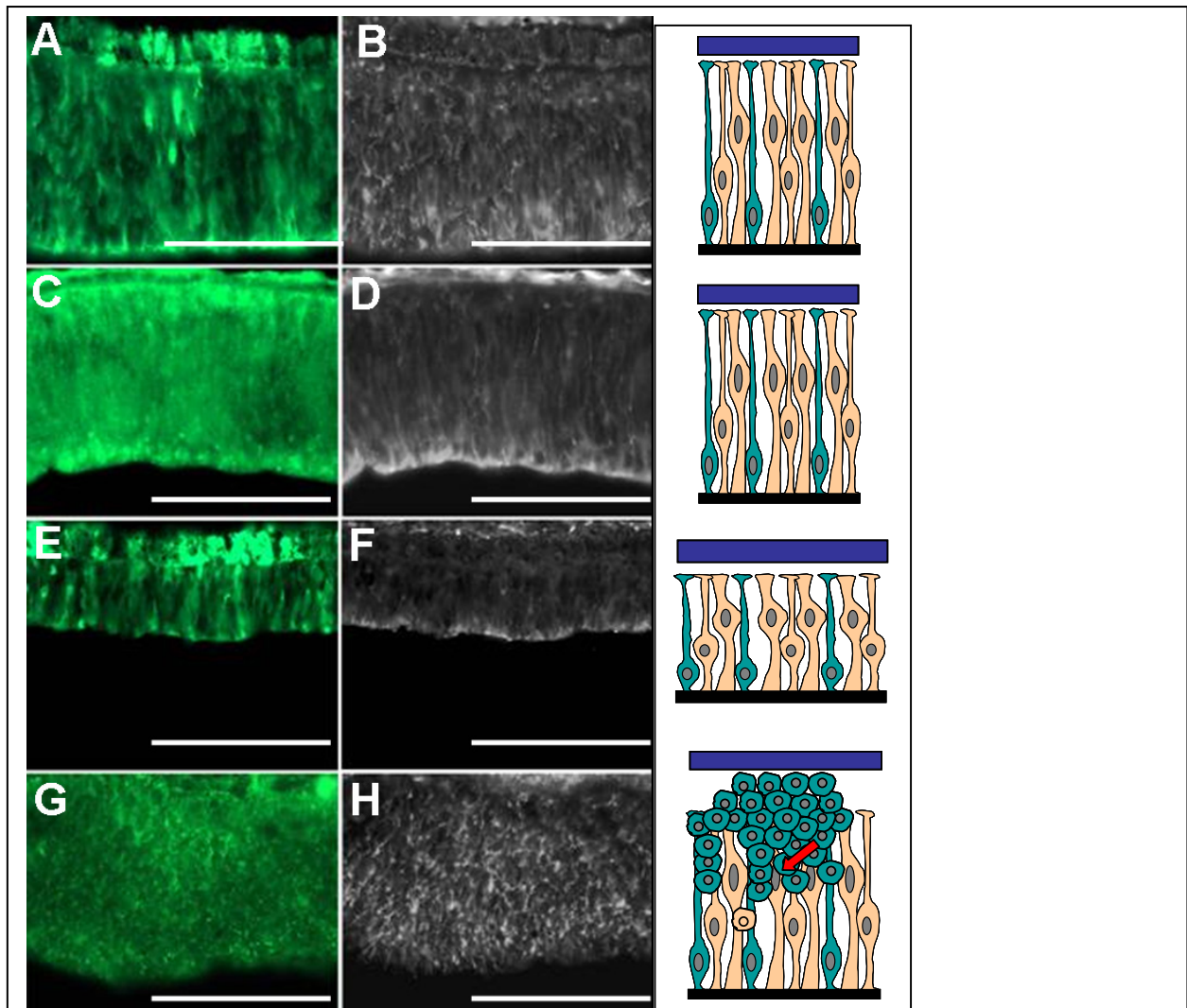


Abbildung 3.5: Analyse der Zellmorphologie durch Vimentinfärbung.

Die Abbildung zeigt die immunhistochemische Färbung von E6-Hühnerretina mit Antikörpern gegen EGFP (A,C,E,G) und Vimentin (B,D,F,H) nach Elektroporation von Leervektor pMES (A,B), wt Dystroglycan (C,D), nicht-spaltbarem Dystroglycan (E,F) und verkürzter Form von Dystroglycan (G,H). Maßstab 100 µm. Die schematische Darstellung der Retina am rechten Rand zeigt die jeweilige vorherrschende Morphologie der Zellen. Nach der Elektroporation von verkürztem Dystroglycan hatten sich die Zellen abgerundet (roter Pfeil). Bei der Überexpression der anderen Dystroglycanproteine blieb die radiäre Morphologie erhalten.

Dies ist auch in nichttransfizierten kontralateralen Augen desselben Embryos erkennbar. Im Gegensatz dazu zeigt sich nach der Elektroporation von nicht-spaltbarem Dystroglycan, das das Auge sehr viel kleiner ist und die Retinadicke im zentralen Bereich reduziert ist (Abb. 3.4 C,G,K). Nach der Transfektion des verkürzten Dystroglycans ist der zentrale Bereich dagegen verdickt (Abb. 3.4 D,H,L).

Um die Morphologie einzelner Zellen in diesen verkleinerten Augen im Vergleich zu den anderen Augenpräparaten näher untersuchen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen an E6-Hühnerembryonenaugen mit Antikörpern gegen Vimentin durchgeführt. Vimentin ist ein Intermediärfilament, das entwicklungsabhängig in den verschiedenen Geweben exprimiert wird und in der Retina ein Marker für radiäre Gliazellen und Neuroepithelzellen ist (Kamei et.al., 1998; Blank et al., 2002). Die gleichzeitige Färbung mit Antikörpern gegen EGFP zeigte den transfizierten Bereich der Retina. Die Abbildung 3.5 fasst die Ergebnisse dieser Färbung zusammen. Nach der Transfektion von Leervektor pMES (Abb 3.5 A,B) und Wt-Dystroglycan (Abb 3.5 C,D) und der Anfärbung mit Vimentin zeigten die Neuroepithelzellen ihre normale, palisadenförmige Morphologie mit einem typischen langgezogenen Ausläufer, der sowohl an der Basalmembran als auch an der ventrikulären Seite der Retina adhäriert war. Dies konnte auch in nichttransfizierten kontralateralen Retinae derselben Embryos beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese radiäre, palisadenförmige Morphologie blieb auch nach der Transfektion von nicht-spaltbarem Dystroglycan erhalten. Die Retinabreite sowie die Gesamtanzahl der Zellen waren allerdings stark reduziert – wie bereits in Abbildung 3.3. beschrieben. Nach der Überexpression von verkürztem Dystroglycan trat dagegen der entgegengesetzte Effekt auf. Die Zellen hatten ihre radiäre Struktur verloren und sich abgerundet. Die Zellzahl und die Retinabreite waren stark angestiegen. Im Bereich der transfizierten Zellen hatten sich Verdickungen innerhalb der Retina gebildet, die weit in den vitrealen Raum des Auges hineinreichten. Die nichttransfizierten kontralateralen Retinae desselben Embryos sowie die mit Leervektor, Wt-Dystroglycan und nicht-spaltbarem Dystroglycan elektroporierten Präparate, zeigten keine derartigen Veränderungen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von Leervektor, Wt-Dystroglycan und nicht-spaltbarem Dystroglycan keine Auswirkung auf die Zellmorphologie hatte. Die Transfektion von verkürztem Dystroglycan führte dagegen zu einer Abrundung der Zellen und zum Verlust der radiären Struktur. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Neuroepithelzellen den Kontakt ihres Endfußes zur Basalmembran verloren hatten und sich abgerundet hatten. Die

Ergebnisse

Reduktion der Retinadicke bei dem nicht-spaltbaren Dystroglycan und die Verdickungen beim verkürzten Dystroglycan deuten darauf hin, dass Dystroglycan möglicherweise einen Einfluss auf die Proliferation der Neuroepithelzellen hat.

Um die Zellmorphologie einzelner transfizierter Zellen unabhängig von der transfizierten Umgebung näher untersuchen zu können, wurden die seltenen Fälle von einzelnen EGFP-exprimierenden Zellen in hoher Vergrößerung analysiert. Die Transfektion der Neuroepithelzellen mit dem Leervektor pMES (Abb. 3.6 A) und Wt-Dystroglycan (Abb. 3.6 B) resultierte erwartungsgemäß mit dem Erhalt der polaren radiären Morphologie. Ein Teil des Fortsatzes war an der Basalmembran verankert, der andere an der ventrikulären Seite der Retina. Diese radiäre Morphologie blieb auch nach der Transfektion des nicht-spaltbaren Dystroglycans (Abb. 3.6 C) weitgehend erhalten. Wie in den vorangegangenen Experimenten bereits geschildert, entwickelten sich gerade nach der Überexpression dieses Konstruktes signifikant kleinere Augen. Dies deutet darauf hin, dass die Zellproliferation der Zellen gestört ist oder die Apoptose der Neuroepithelzellen stark zugenommen hatte. Der Fortsatz erschien, wohlmöglich aufgrund der reduzierten Retinabreite, ebenfalls erheblich dicker. Während somit bei allen anderen verwendeten Konstrukten die charakteristische

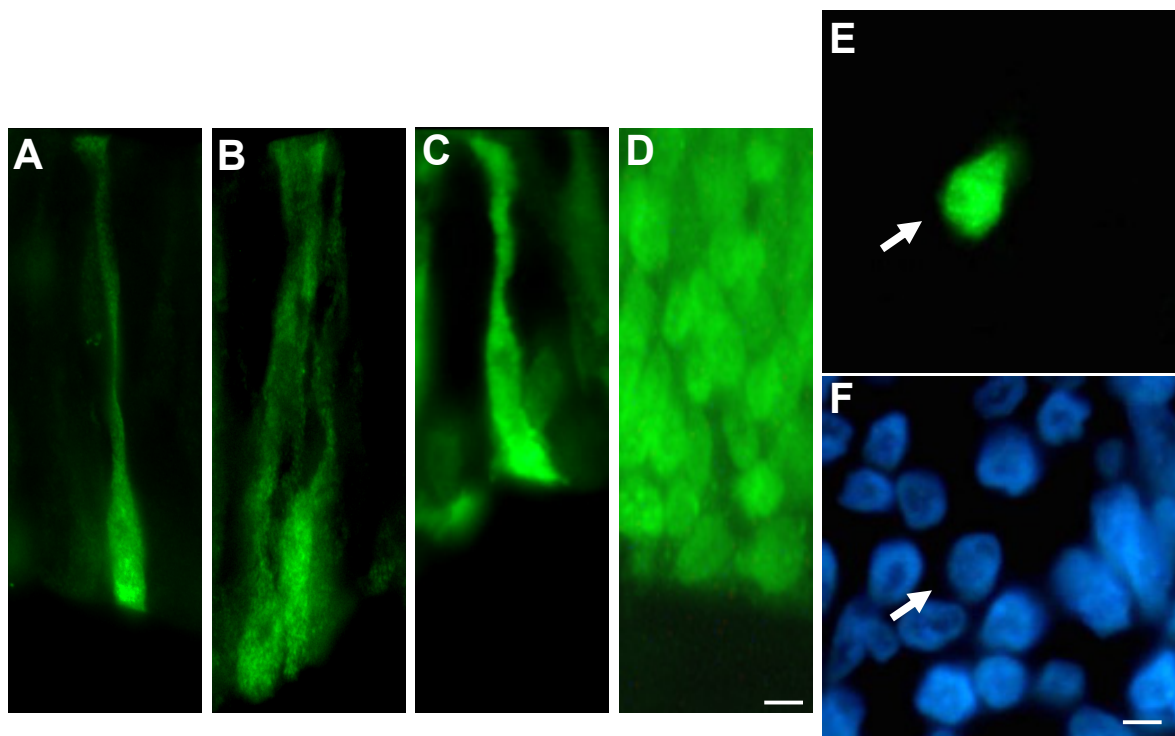


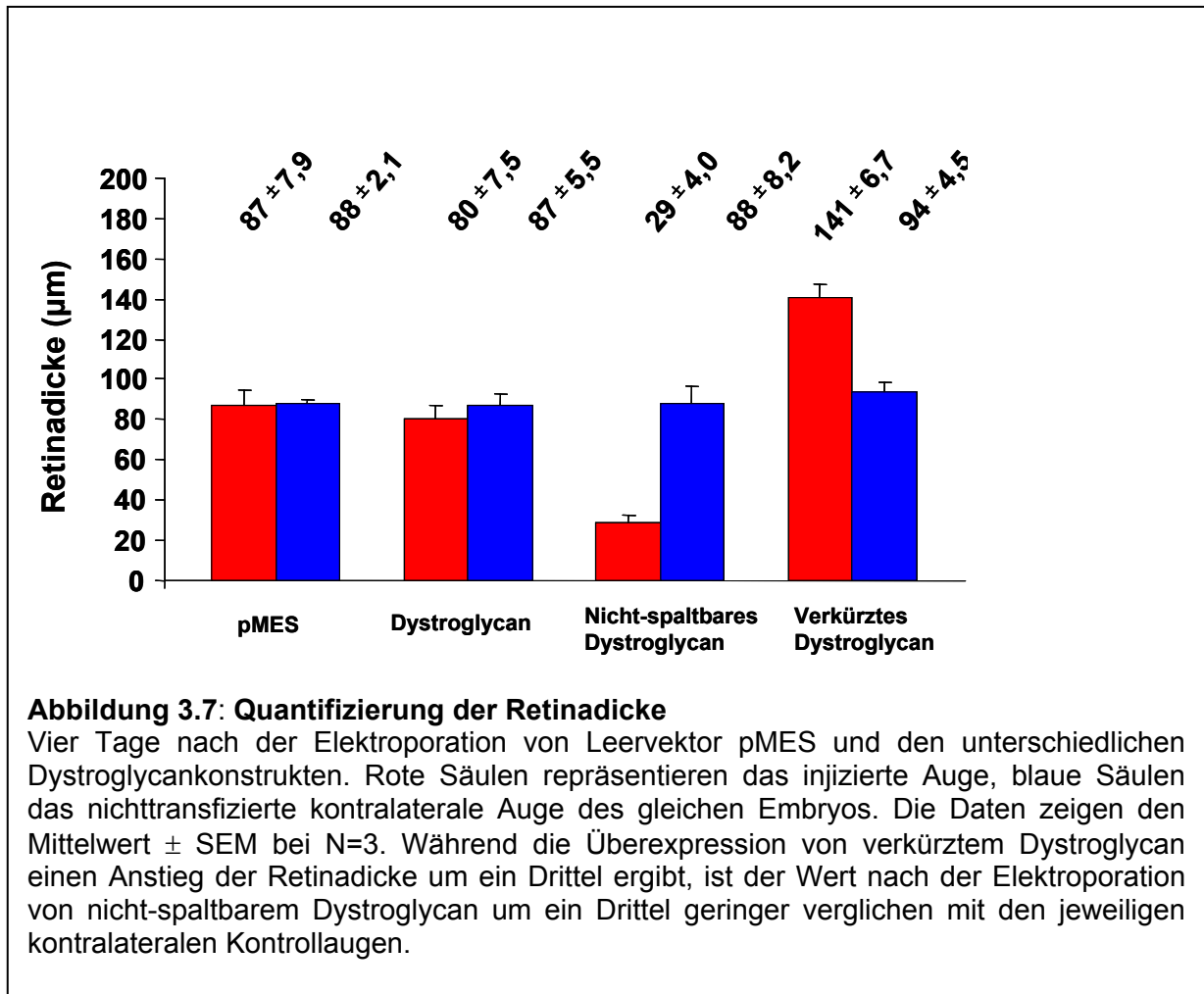
Abbildung 3.6: Morphologie von einzelnen transfizierten Neuroepithelzellen

Die Abbildung zeigt eine vergrößerte Darstellung EGFP-exprimierender Einzelzellen nach Elektroporation mit Leervektor, pMES (A), wt Dystroglycan (B), nicht-spaltbarem Dystroglycan (C) und verkürztem Dystroglycan (D,E,F). Abbildung E zeigt eine einzelne EGFP-exprimierende Zelle im Gewebeverband nach Transfektion des verkürzten Dystroglycan. In Abbildung F ist dazu im Vergleich die Bisbenzimidfärbung der Zellkerne des gleichen Bildausschnitts wie in E dargestellt. Nach der Überexpression des verkürzten Dystroglycan verlieren die Zellen ihren Endfuß an der Basalmembran und runden sich ab. Maßstab 10 μm .

Morphologie dieser Zellen unverändert blieb, hatten die Zellen nach der Transfektion des C-terminal verkürzten Dystroglycankonstrukts (Abb. 3.6 D, E, F) ihre bipolare, radiäre Morphologie verloren und sich abgerundet. Dabei blieb nur ein schmaler Zytoplasmasaum um den Zellkern herum erhalten, wie im Vergleich zur Kernfärbung mit Bisbenzimid erkennbar ist (Abb. 3.6 E,F).

Bevor der Frage nachgegangen werden konnte, auf welche Weise es zu derartig gravierenden morphologischen Veränderungen nach der Überexpression der modifizierten Konstrukte kommen konnte, sollten zunächst die Veränderungen innerhalb der Retina quantifiziert und einige Kontrollexperimente durchgeführt werden. Als erstes wurde deshalb die Retinadicke bestimmt (Abb. 3.7). Die Retinadicke nach Transfektion von Leervektor pMES und Wt-Dystroglycan lag bei $87 \pm 7,9$ und $80 \pm 7,5$. Diese Werte waren vergleichbar mit denen nichttransfizierter Kontrollen, bei denen eine Retinadicke von $88 \pm 2,1$ beziehungsweise $87 \pm 5,5$ erhalten wurde. Nach der Überexpression von nicht-spaltbaren Dystroglycan wurde dagegen eine um ein Drittel geringere Retinadicke von $29 \pm 4,0$ μm für das injizierte Auge und ein mit den Kontrollaugen übereinstimmender Wert von $88 \pm 8,2$ μm für die nichtinjizierten kontralateralen Augen ermittelt. Innerhalb der Verdickungen nach Transfektion des verkürzten Dystroglycans war die Retinadicke dagegen um einen Faktor von 1,6 auf einen Wert von $141 \pm 6,7$ μm angestiegen (Abb. 3.7).

Die erhaltenen Ergebnisse machen deutlich, dass die Überexpression von modifiziertem Dystroglycan einen großen Einfluss auf die Struktur der Retina und die Morphologie der Neuroepithelzellen hat.

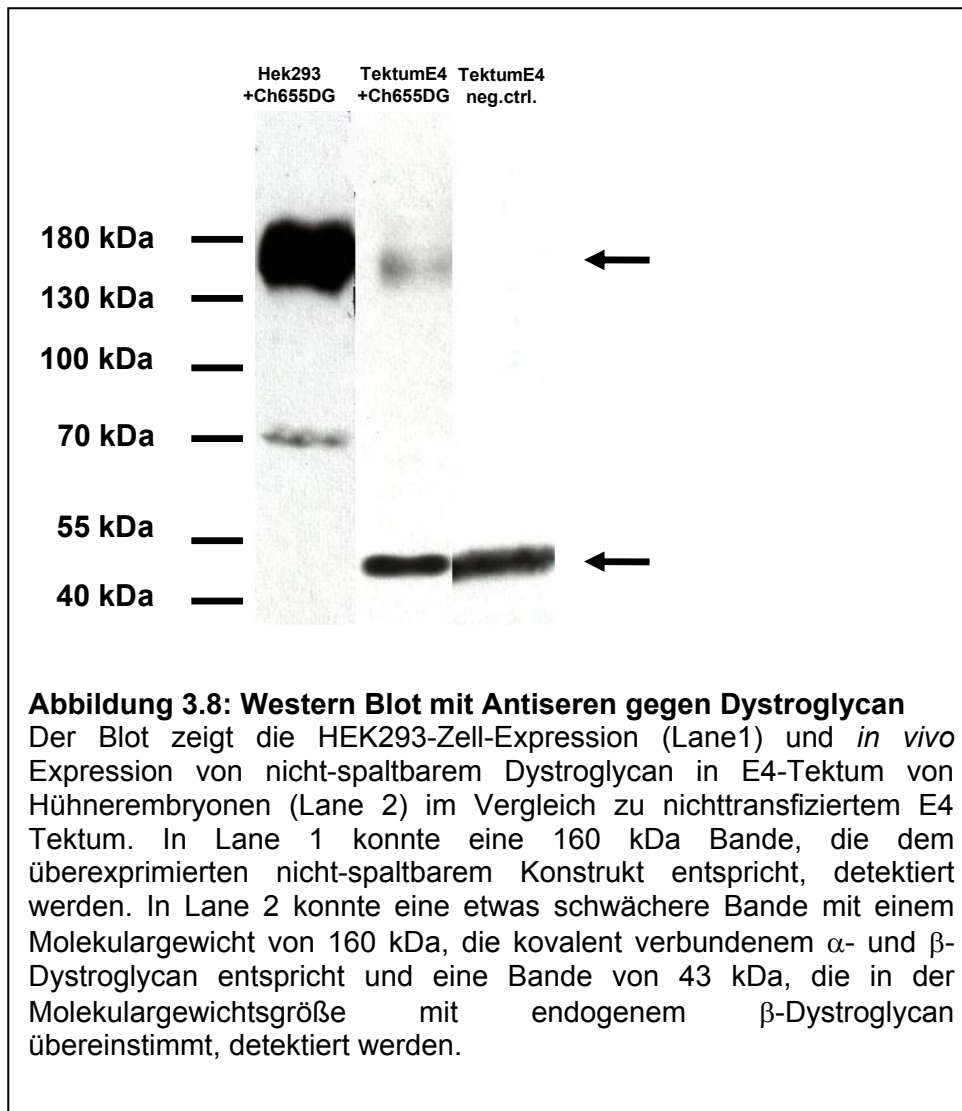


3.3 Analyse der Proteinexpression im Western-Blot sowie der Verteilung der mutierten Konstruktes in der Retina

Um zu untersuchen, ob das nicht-spaltbare Dystroglycan *in vivo* tatsächlich nicht durch Proteasen gespalten wird, wurde das Molekulargewicht von β -Dystroglycan nach Expression *in vitro* und *in vivo* bestimmt. Dazu wurde ein Antikörper verwendet, der gegen die letzten 15 Aminosäuren der C-terminalen Domäne von β -Dystroglycan gerichtet ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass α -Dystroglycan im Gehirn mit einem Molekulargewicht von 120 kDa exprimiert wird, während β -Dystroglycan eine Bande von 43 kDa ergeben sollte (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992; Gee et al., 1993). Idealerweise sollte somit im Fall des nicht-spaltbaren Dystroglycanproteins eine Bande von annähernd 160 kDa nachweisbar sein (Holt et al., 2000; Esapa et al., 2003).

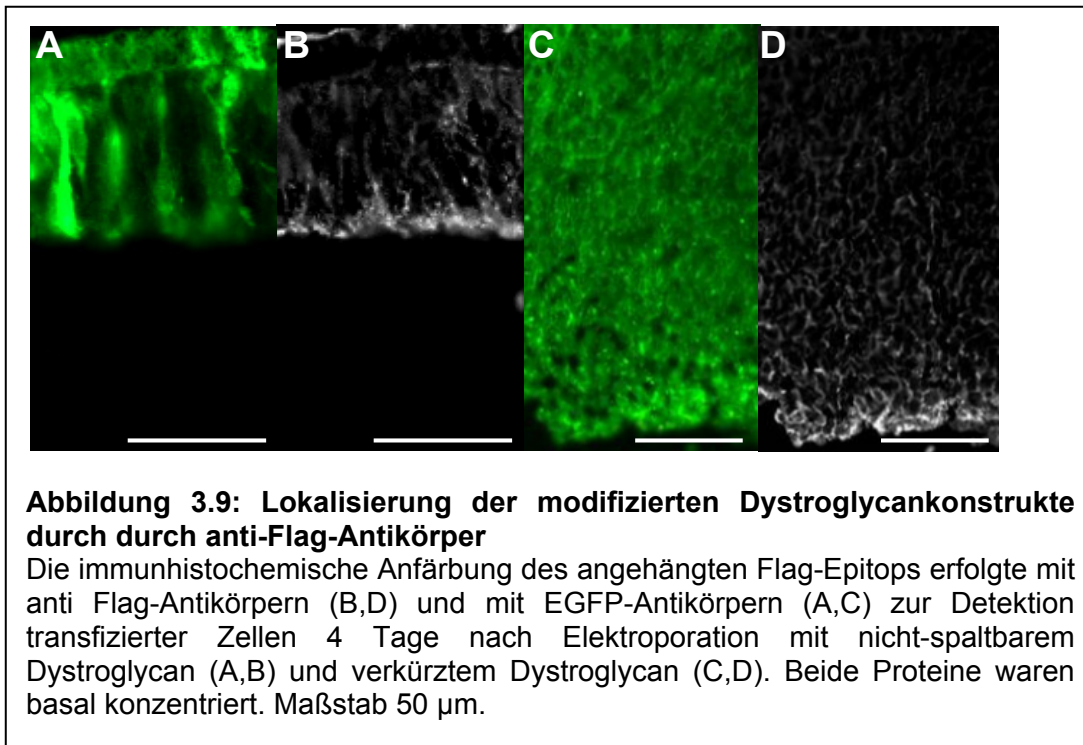
Die Western Blot Analyse von transfizierten HEK293 Zellen und von E4 Tecta (2 Tage nach

der Elektroporation) zeigte die Expression eines β -Dystroglycan-haltigen Proteins mit einem Molekulargewicht von annähernd 160 kDa, das in nichttransfiziertem Gewebe nicht nachweisbar war (Abb. 3.8). Dies zeigte, dass α - und β -Dystroglycan kovalent miteinander verbunden sind.



Es zeigt auch, dass das Dystroglycan Vorläuferprotein auch *in vivo* nicht gespalten wird und dass keine zusätzliche Spaltstelle innerhalb des Proteins vorhanden ist. In HEK 293 Zellen war neben dem nicht-spaltbaren Protein auch eine Proteinbande von ungefähr 70 kDa nachweisbar, die vermutlich einer noch nicht glykosylierten Form des nicht-spaltbaren Dystroglycans oder einem Abbauprodukt dieses Proteins entspricht. C-terminale

Spaltprodukte von Dystroglycan sind bereits mehrfach beschrieben worden (Esapa et al., 2003). Darüber hinaus war auf dem Blot *in vivo* eine Bande von 43 kDa vorhanden, die mit dem Molekulargewicht von endogenem β -Dystroglycan übereinstimmte (Abb. 3.8). Dies deutet darauf hin, dass die Synthese von endogenem Dystroglycan durch die Überexpression des nicht-spaltbaren Dystroglycankonstrukts nicht vollständig inhibiert



wurde.

Um zu untersuchen, ob die von den verschiedenen Konstrukten kodierten Dystroglycanproteine im Gewebe korrekt lokalisiert werden, wurden sie durch anti-Flag Antikörper 4 Tage nach der *in ovo* Elektroporation detektiert. Es zeigte sich dabei, dass sowohl nach der Überexpression von nicht-spaltbarem Dystroglycan als auch nach der Transfektion der verkürzten Form, das jeweilige Protein basal in den Endfüßen konzentriert war (Abb. 3.9 B,D). Die genetisch veränderten Dystroglycanproteine konnten somit innerhalb der Neuroepithelzellen trotz der Mutationen korrekt lokalisiert werden.

3.4 Quantifizierung der proliferierenden Zellen

Die Daten aus den Abbildungen 3.4 und 3.5 hatten nach der Überexpression von verkürztem Dystroglycan auf eine Hyperproliferation und nach der Transfektion von nicht-spaltbarem Dystroglycan auf eine abnehmende Zellproliferation hingedeutet. Um zu untersuchen, ob der Teilungszyklus der Neuroepithelzellen durch die Überexpression veränderter Dystroglycanformen beeinflusst wird, wurden Retinaschnitte nach Elektroporation der unterschiedlichen Dystroglycankonstrukte mit Antikörpern gegen EGFP (Abb. 4.0 A-D), zur Unterscheidung transfizierter und untransfizierten Zellen, und mit Bisbenzimid (Abb. 4.0 E-H), zur Detektion der Zellkerne sowie mit BrdU (Abb. 4.0 I-L), zur Markierung proliferierender Zellen, angefärbt.

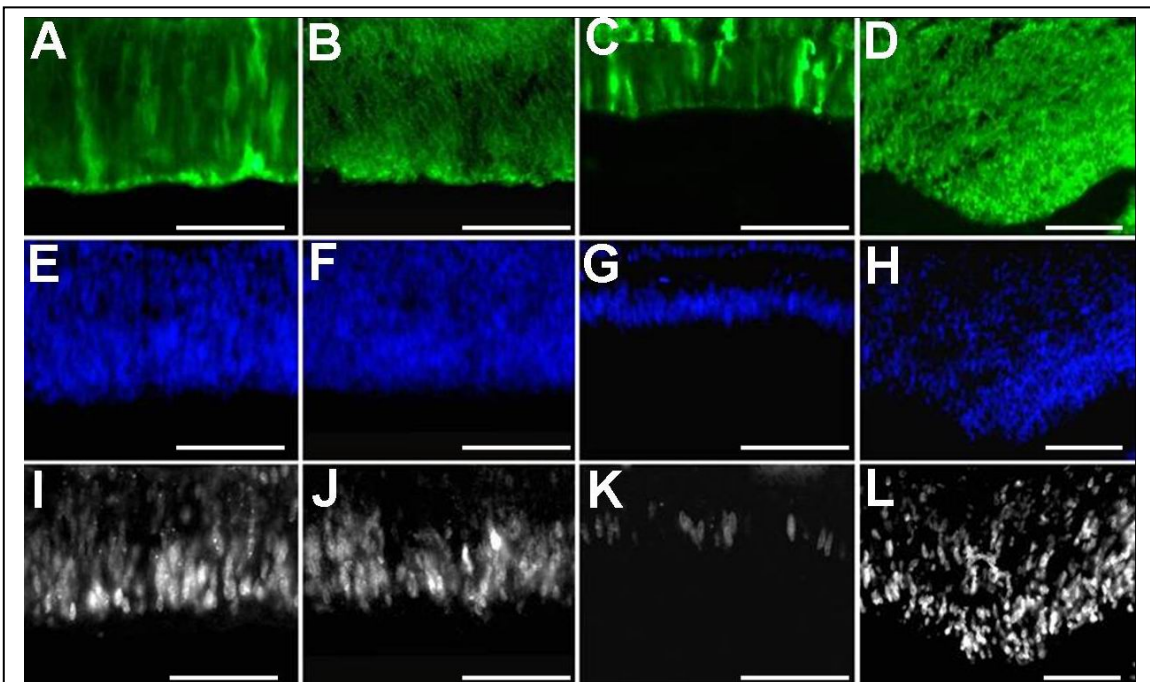


Abbildung 4.0: Analyse der Proliferation in der E6-Hühnerretina

Die Markierung proliferierender Zellen erfolgte nach der Applikation eines 3 stündigen BrdU Pulses. Die Detektion BrdU-positiver Zellkerne wurde durch eine immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen BrdU, einem Nucleotidanalogon (I-L) durchgeführt. Transfizierte Zellen wurden durch eine EGFP (A-D)-Anfärbung und Zellkerne durch eine Anfärbung mit der Bisbenzimid Färbelösung (E-H) nach Elektroporation von Leervektor, pMES (A,E,I), wt Dystroglycan (B,F,J), nicht-spaltbarem Dystroglycan (C,G,K) und verkürztem Dystroglycan (D,H,L) detektiert. Maßstab 100 µm.

Die Applikation dieses Nukleotidanalogs, ermöglicht die Bestimmung der Zellen, die während der Inkubationszeit durch die S-Phase gegangen waren und dabei während der DNA-Replikation das Nukleotidanalogs in die DNA eingebaut hatten. Es wurde ein BrdU Puls von 3 Stunden in einer Konzentration von 10 mg/ml appliziert. In den nicht-transfizierten kontralateralen Augen waren die BrdU positiven Zellen in einer breiten Schicht direkt unterhalb der Basalmembran angeordnet (Daten nicht gezeigt). Dies konnte auch in mit Leervektor pMES (Abb. 4.0 I) und Wt-Dystroglycan (Abb. 4.0 J) transfizierten Zellen beobachtet werden. Die Zellkerne der Neuroepithelzellen waren in einer charakteristischen Art und Weise über die gesamte Breite der Retina hinweg verteilt und wiesen eine typische ovale Form auf (Abb. 4.0 E,F).

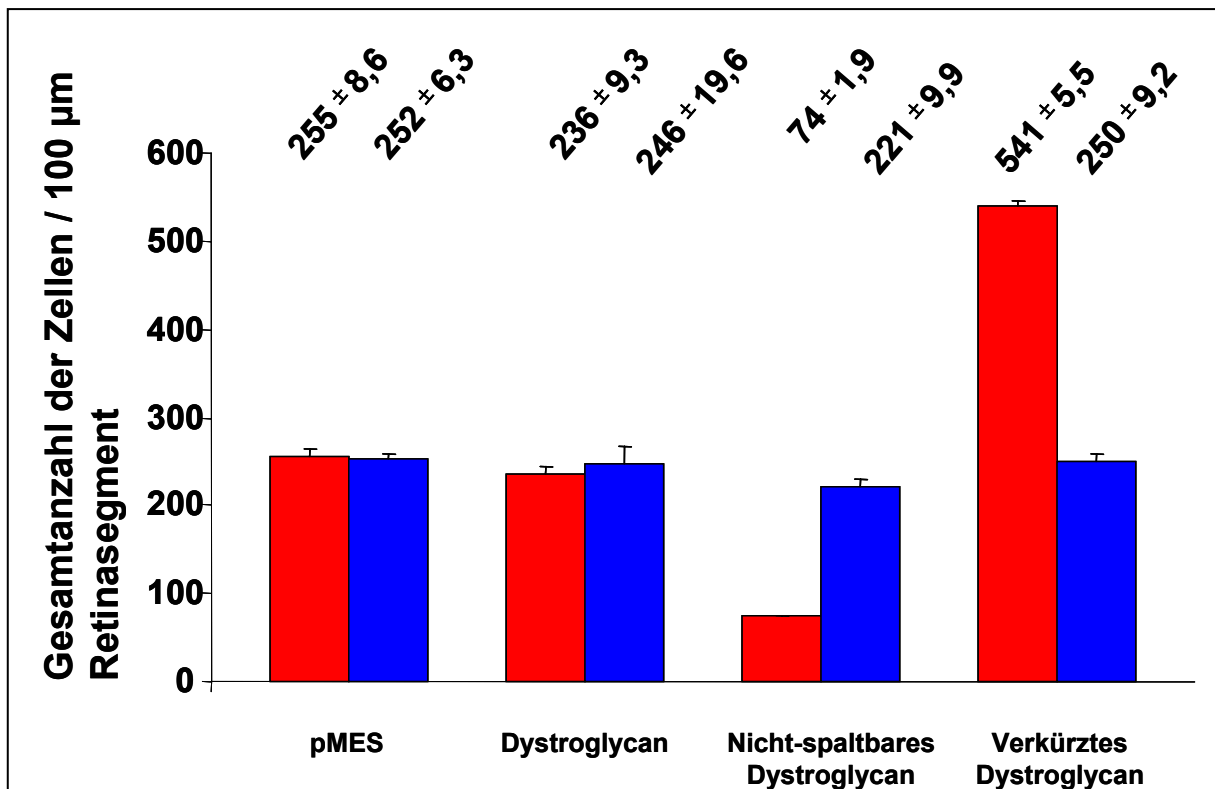
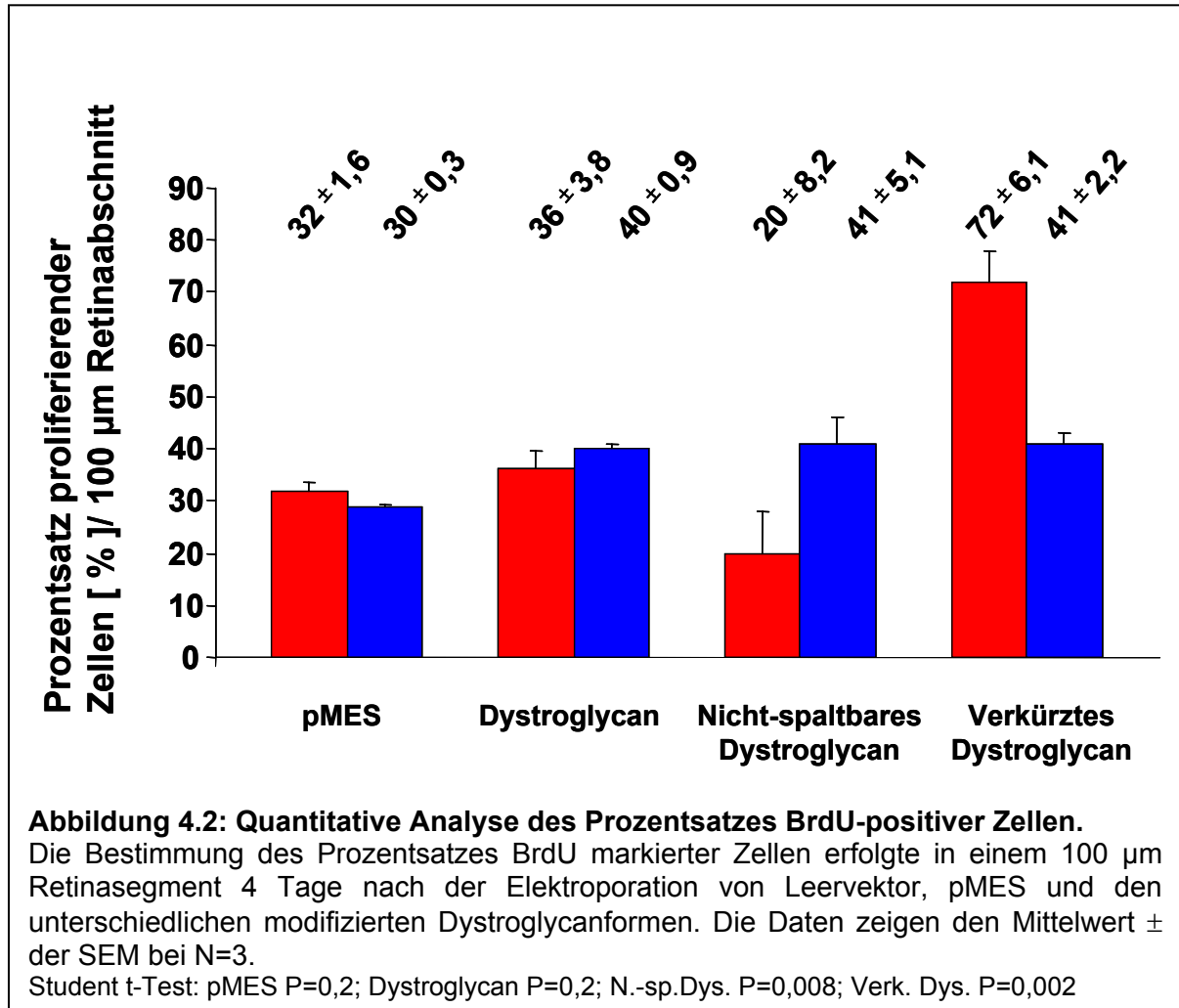


Abbildung 4.1: Quantitative Analyse der Gesamtzellzahl

Die Abbildung zeigt die Quantifizierung der Gesamtanzahl der Zellen 4 Tage nach der Elektroporation von Leervektor, pMES und den modifizierten Dystroglycanformen. Es wurden jeweils 3 Embryonen für jedes Konstrukt ausgezählt. Rote Säulen repräsentieren das injizierte Auge, blaue Säulen das nichttransfizierte kontralaterale Auge. Die Daten zeigen den Mittelwert ± SEM bei N=3.

Keiner dieser Zellkerne war pyknotisch oder zeigte Anzeichen fragmentierter DNA, wie sie beim Absterben der Zellen durch Apoptose sichtbar ist. Infolgedessen wurde weder durch die applizierte Spannung noch durch die Injektion in größerem Maße apoptotischer Zelltod induziert. Die Transfektion der nicht-spaltbaren Form von Dystroglycan (Abb. 4.0 C,G,K) zeigte im Gegensatz zu den Kontrollen eine deutliche Reduktion der BrdU-markierten Zellen. Erstaunlich war weiterhin, dass die Kerne nicht wie in den Kontrollen über die gesamte Retinabreite hinweg verteilt waren, sondern alle kurz unterhalb der Basalmembran lokalisiert waren (Abb. 4.0 G). Die langgezogene, ovale Form dieser Zellkerne war erhalten geblieben. Die Transfektion der Neuroepithelzellen mit dem verkürzten Dystroglycan (Abb. 4.0 D,H,L) führte zu einer Verdickung der Retina und einer Erhöhung der Anzahl an Neuroepithelzellen. Die Morphologie der Zellkerne hatte sich ebenfalls verändert. Sie erschienen abgerundet und nicht - wie in den Kontrollen - oval. Außerdem war eine deutliche Zunahme der Anzahl BrdU positiver Zellen zu beobachten. Diese Zellen waren in diesem Fall nicht ausschließlich kurz unterhalb der Basalmembran lokalisiert wie in den nichttransfizierten oder mit Leervektor transfizierten Schnitten, sondern über die gesamte Verdickung verteilt und befanden sich damit auch im ventrikulären Bereich der Retina (Abb. 4.0 L). Diese Beobachtungen wurden am Fluoreszenzmikroskop quantifiziert durch Auszählen der Gesamtzellzahl (Abb. 4.1) und der BrdU-markierten Zellen quantifiziert (Abb. 4.2). Retinae aus 3 verschiedenen Hühnerembryonen, die jeweils mit einer Dystroglycan cDNA elektroporiert worden waren, wurden untersucht. Die Quantifizierung der Gesamtzellzahl 4 Tage nach der Elektroporation von Leervektor und den unterschiedlichen modifizierten Dystroglycankonstrukten ergab ähnliche Werte für die mit pMES-Vektor, Wt-Dystroglycan und nichttransfizierten kontralateralen Augen der Hühnerembryonen. Im Gegensatz dazu konnte in mit nicht-spaltbarem Dystroglycan elektroporierten Augen eine um ein Drittel geringere Gesamtzellzahl ermittelt werden. Die Transfektion der Augen mit verkürztem Dystroglycan ergab im Gegensatz dazu eine doppelt so hohe Zellzahl wie in den Kontrollen oder mit pMES oder Wt-Dystroglycan transfizierten Augen. Die Auszählung der proliferierenden Zellen zeigte ein ähnliches Bild (Abb. 4.2). Nach Transfektion von Leervektor pMES und Wt-Dystroglycan ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zu nichttransfizierten kontralateralen Augen desselben Embryos. Die Elektroporation des nicht-spaltbaren Dystroglycankonstruktes zeigte eine Verminderung der proliferierenden Zellen um einen Faktor von 2, während nach der Transfektion des verkürzten Dystroglycankonstruktes der doppelte Prozentsatz BrdU positiver Zellen erhalten wurde. Zusammenfassend kann

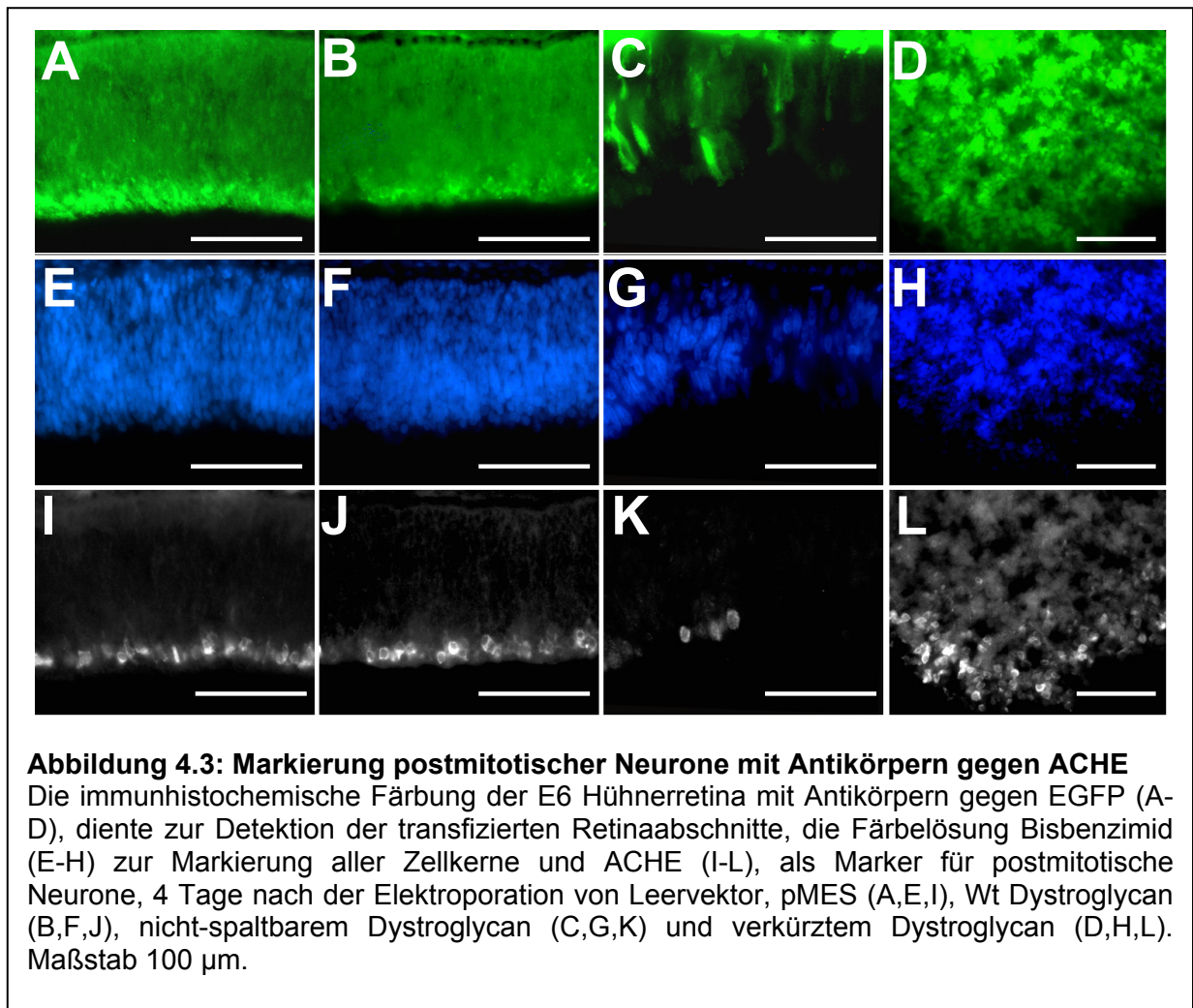
gefolgert werden, dass die Überexpression von modifizierten Dystroglycanformen einen



Einfluss auf die Proliferation und damit auf die Gesamtzellzahl von Neuroepithelzellen hat.

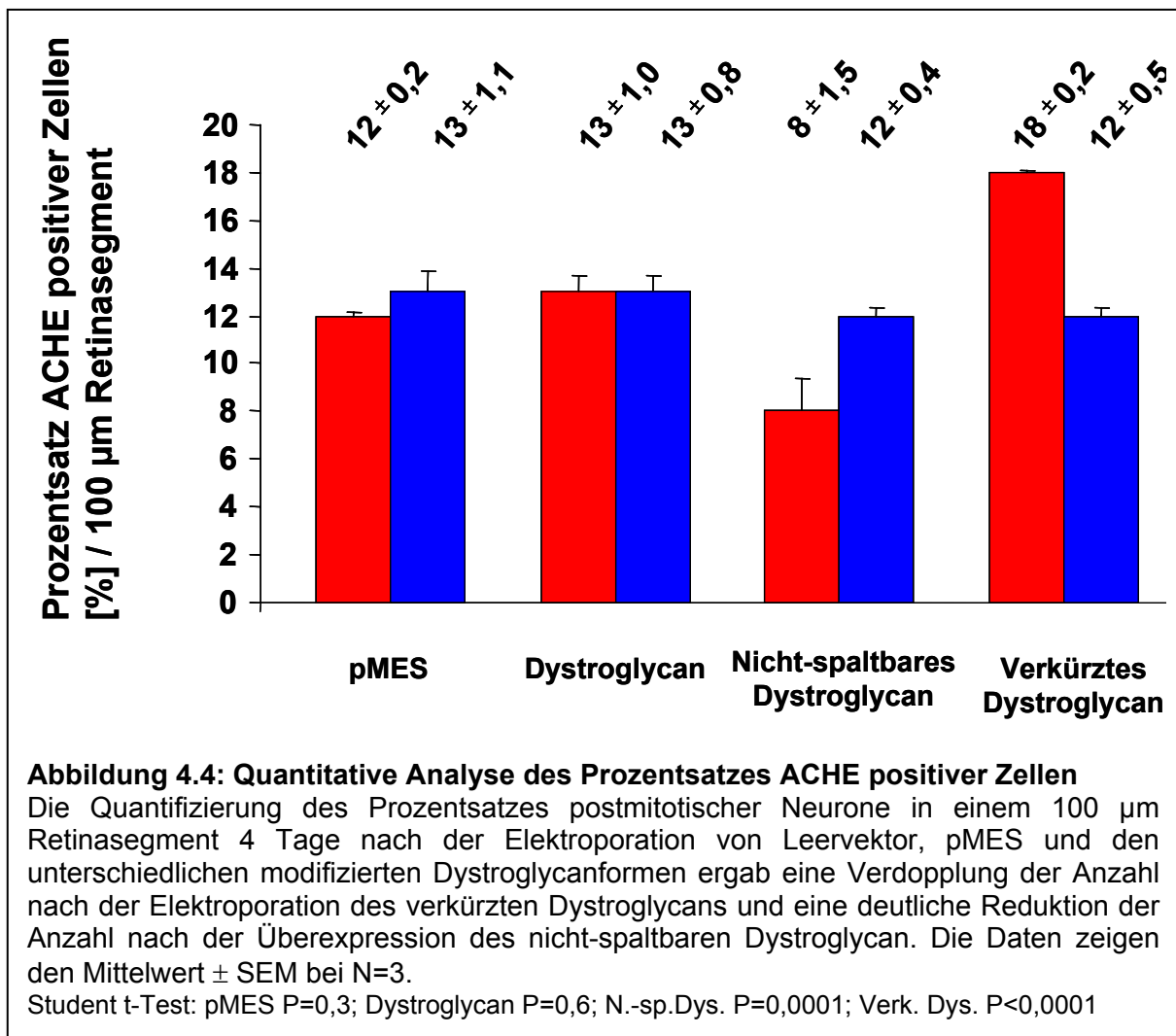
3.5 Quantifizierung der Anzahl postmitotischer Neurone

Da in den vorherigen Experimenten eine verringerte Gesamtzahl und verringerte Zahl von proliferierenden Zellen nach Transfektion des nicht-spaltbaren Dystroglycan und ein



erheblicher Anstieg nach der Elektroporation des verkürzten Dystroglycankonstruktes festgestellt worden war, sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob auch die Zahl postmitotischer Neurone verändert war. Dazu wurden transfizierte E6 Retinae mit Antikörpern gegen ACHE gefärbt. ACHE ist in frühen Retinastadien ein Marker für postmitotische Neurone (Layer et al., 1988). Eine Bisbenzimidfärbung der Zellkerne wurde ebenfalls durchgeführt, um die Gesamtzellzahl der Zellen bestimmen zu können. Nach Transfektion der Neuroepithelzellen mit Leervektor und Wt-Dystroglycan zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zum nichttransfizierten kontralateralen Auge (Daten nicht gezeigt). Die Elektroporation des nicht-spaltbaren Dystroglycans führte zu einer Abnahme der Anzahl postmitotischer Neurone (Abb. 4.3 K), während die Transfektion des verkürzten Dystroglycans zu einer deutlichen Zunahme der Anzahl postmitotischer Neurone führte (Abb. 4.3 L). Die Quantifizierung der Gesamtzahl postmitotischer Neurone in

Retinasegmenten von 100 µm Breite ergab für die Augen nach Transfektion von Leervektor pMES oder Wt-Dystroglycan keine Unterschiede gegenüber der Anzahl postmitotischer Neurone in nichttransfizierten kontralateralen Augen desselben Embryos (Abb 4.4). Nach Elektroporation des nicht-spaltbaren Dystroglycan zeigte sich allerdings eine Abnahme der Anzahl postmitotischer Neurone um einen Faktor von 1,5. Im Gegensatz dazu zeigte die Transfektion von verkürztem Dystroglycan eine Zunahme um ein Drittel der Zahl



postmitotischer Neurone. Zusammengefaßt zeigen diese Resultate, das die Transfektion von modifizierten Dystroglycankonstrukten nicht nur Auswirkungen auf die Proliferation von Zellen, sondern auch auf ihre Differenzierung hat.

3.6 Untersuchung der Integrität der Basalmembran

Dystroglycan ist notwendig für die Assemblierung der geordneten Struktur von Proteinen der Extrazellulären Matrix zu einer Basalmembran und Abwesenheit von Dystroglycan während der Basalmembranbiosynthese verhindert die Bildung spezieller Basalmembranen. Daher sollte nun auch untersucht werden, ob die Expression

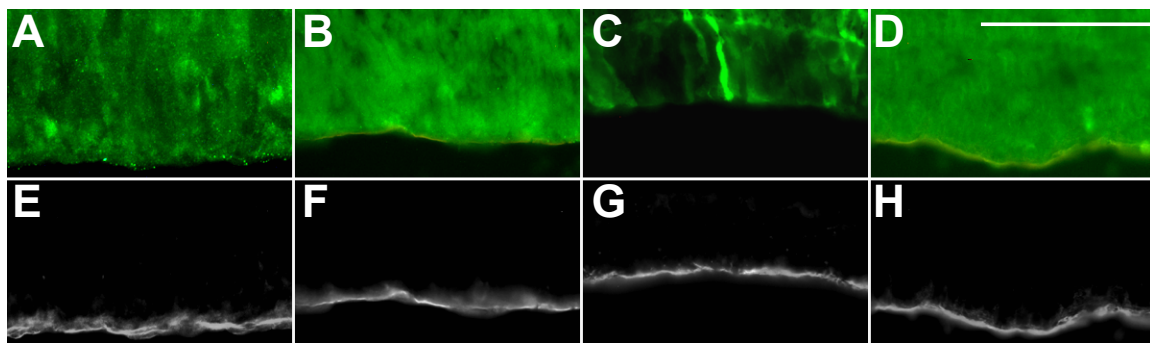


Abbildung 4.5: Analyse der Basalmembranintegrität in E6-Hühnerembryonen

Die Detektion transfizierter Zellen erfolgte mit Antikörpern gegen EGFP (A-D). Die Basalmembran konnte durch eine immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Agrin (E-H) 4 Tage nach der Elektroporation von Leervektor, pMES (A,E), Wt Dystroglycan (B,F), nicht-spaltbarem Dystroglycan (C,G) und verkürztem Dystroglycan (D,H) in allen Präparaten detektiert werden. Die Basalmembran zeigte keine Beeinträchtigung der Integrität. Maßstab 100 µm.

verschiedener Dystroglycankonstrukte einen Einfluss auf die Integrität der Basalmembran in der Retina hatte. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in der Verteilung der extrazellulären Matrixproteine Laminin, Nidogen und insbesondere Dystroglycan die Biosynthese der Basalmembranen entscheidend beeinträchtigen (Costell et al., 1999; Halfter et al., 2002; Yurchenco et al., 2004). Dies führte zu einer Fragmentierung der Basalmembran und verhinderte dann die Anheftung der Endfüße der Neuroepithelzellen an die Basalmembran. Der Kontakt zur Basalmembran geht auf diese Weise verloren und die Neuroepithelzellen ziehen ihren Fortsatz zurück (Halfter et al., 2002). Die in meiner Arbeit beobachteten Veränderungen könnten somit ebenfalls auf eine fragmentierte Basalmembran als eine Folgeerscheinung der Überexpression mutierter Dystroglycanproteine oder auch als Folge der gewählten Elektroporationbedingungen auftreten. Um dies auszuschließen, wurden immunhistochemische Färbungen von E6 Hühnerretina nach der Transfektion der verschiedenen Konstrukte mit Antikörpern gegen das extrazelluläre Matrixprotein Agrin durchgeführt, welches als Marker für die Integrität der

Basalmembran diente (Kröger und Mann, 1996). Aus der Abbildung 4.5 ist ersichtlich, dass die Integrität der Basalmembran nach Elektroporation der unterschiedlichen Konstrukte erhalten geblieben war. Es konnten in den transfizierten Bereichen keine Anzeichen für eine Fragmentierung der Inneren Grenzmembran gefunden werden. Die beobachteten Veränderungen können also nicht auf eine veränderte Basalmembranintegrität zurückgeführt werden.

3.7 Analyse der Polarität von Neuroepithelzellen

Da aus mehreren Studien bekannt ist, dass Dystroglycan die Polarität von Epithelzellen beeinflussen kann (Durbeej et al., 2001; Muschler et al., 2002; Deng et al., 2003), sollte die Polarität der Neuroepithelzellen nach der Elektroporation der

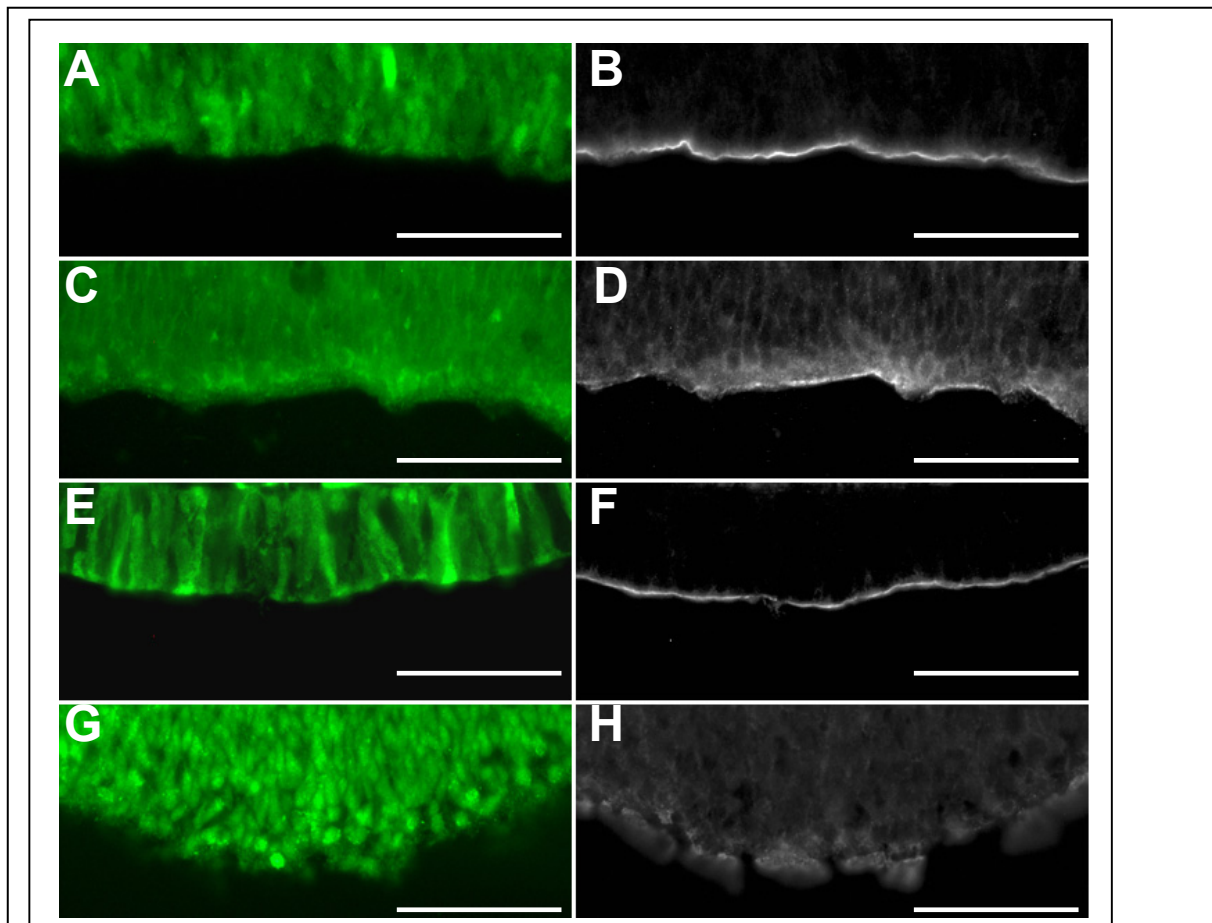
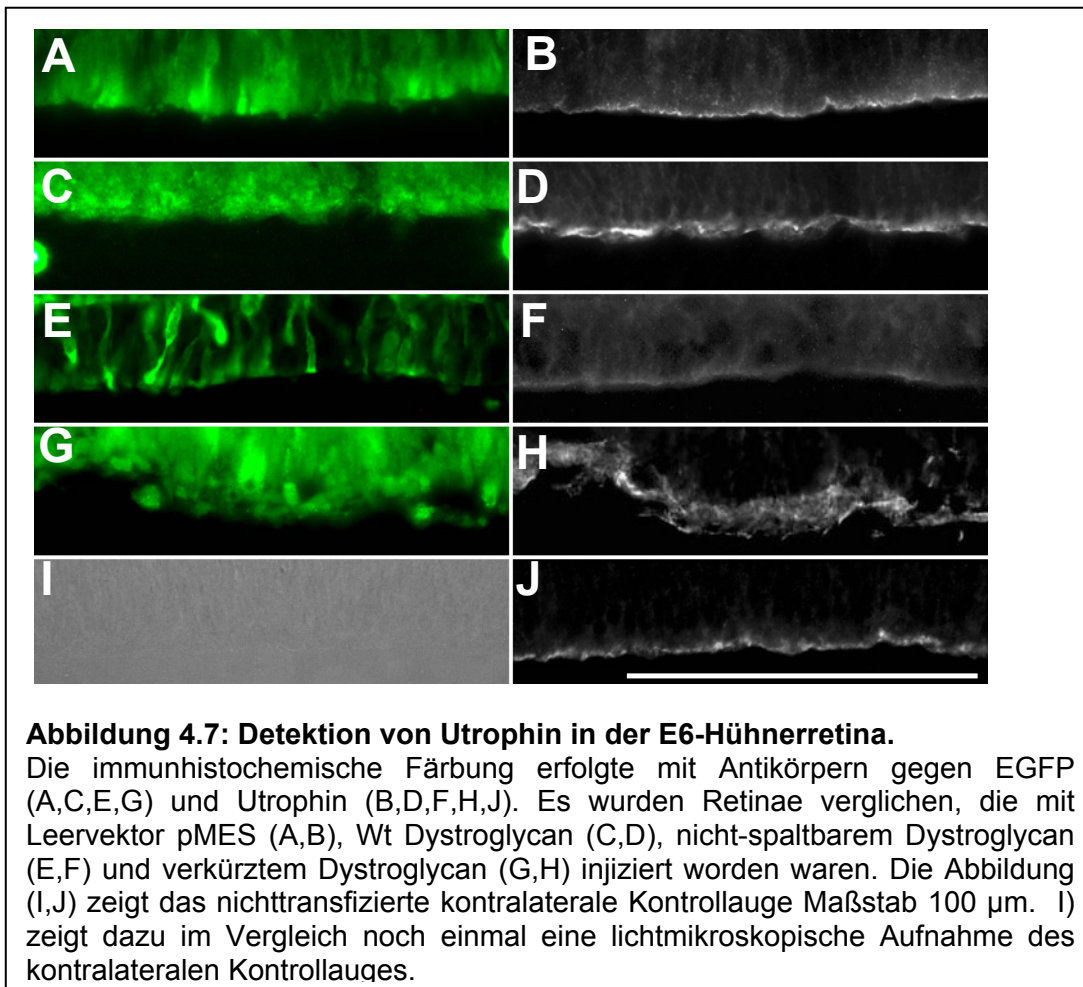


Abbildung 4.6: Anfärbung von β -Dystroglycan in der E6-Hühnerretina

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen EGFP (A,C,E,G) und 43 DAG/8d5 Antikörper (B,D,F,H). Dieser Antikörper erkennt die letzten 15 Aminosäuren des C-Terminus von β -Dystroglycan. Die Anfärbung fand 4 Tage nach der Elektroporation von Leervektor pMES (A,B), Wt Dystroglycan (C,D), nicht-spaltbarem Dystroglycan (E,F) und verkürztem Dystroglycan (G,H) statt. Maßstab 50 μ m.

Dystroglycankonstrukte untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine Analyse der Verteilung einiger entweder basal oder apikal konzentrierter Proteine durchgeführt. Als erstes wurden einige Komponenten des DAG untersucht, die vorwiegend an der basalen Seite der Retina lokalisiert sind. Einer dieser Marker war β -Dystroglycan. Es ist in diesem Entwicklungsstadium ausschließlich in den Endfüßen der Neuroepithelzellen an der Kontaktstelle zur Basalmembran konzentriert (Blank et al., 1997). Da es mit einem monoklonalem Antikörper nachgewiesen wurde, der die letzten C-terminalen Aminosäuren von β -Dystroglycan detektiert (Bewick et al., 1993), wird das überexprimierte C-terminal verkürzte Dystroglycankonstrukt nicht erkannt. Damit eignet sich dieser Antikörper für den selektiven Nachweis von endogenem Dystroglycan. Nach Transfektion von Leervektor pMES (Abb. 4.6 A,B) und nicht-spaltbarem Dystroglycan (Abb. 4.6 E,F) wurde eine ähnliche Verteilung von β -Dystroglycan wie in nichttransfizierten kontralateralen Augen beobachtet. Beta-Dystroglycan war in einer dünnen Linie direkt an der Basalmembran detektierbar. Dies entspricht der normalen Konzentration dieses Proteins in den Endfüßen der Neuroepithelzellen (Blank et al., 1997). Nach der Überexpression von Wt Dystroglycan war dieses Transmembranprotein ebenfalls in den Neuroepithelzellen konzentriert (Abb. 4.6 C,D). Nach der Transfektion des verkürzten Dystroglycans (Abb. 4.6 G,H) konnte nur noch eine schwache Anfärbung unterhalb der Basalmembran detektiert werden. Dies zeigte, dass endogenes β -Dystroglycan an der Plasmamembran der Endfüße reduziert war. Diese Abnahme könnte somit eine Folgeerscheinung der Abrundung der Zellen und des Verlustes des Proteins an der Basalmembran darstellen oder auf die Dissoziation des DAG-Komplexes während der Synthese zurückzuführen sein.

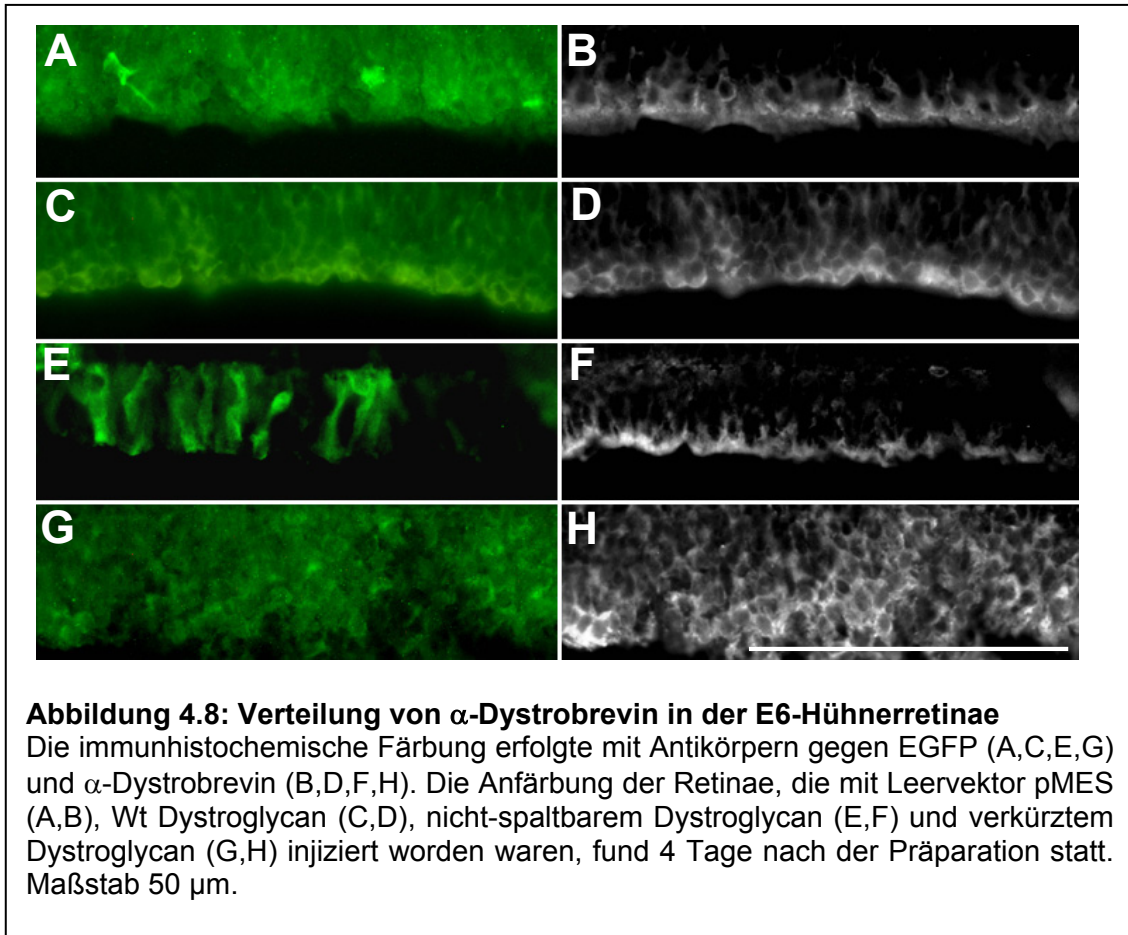
Um zu untersuchen, ob die Verteilung weiterer Proteine des DAG an der Membran verändert war, wurde in einem weiteren Versuchsansatz die Verteilung von Utrophin, einem zytoplasmatischen Protein des DAG, nach der Überexpression der verschiedenen Dystroglycanformen analysiert. Utrophin ist im Zytoplasma der Neuroepithelzellendfüße konzentriert. Das verkürzte Dystroglycan weist eine Deletion der Utrophin-Bindedomäne auf und es stellte sich deshalb zusätzlich die Frage, wie sich diese Deletion auf die Verteilung von Utrophin und seine Konzentration an der basalen Seite der Neuroepithelzellen auswirkt. Nach Transfektion von Leervektor pMES (Abb. 4.7 A,B) und Wt-Dystroglycan (Abb. 4.7 C,D) war die Utrophinverteilung in einer dünnen Schicht unterhalb der Basalmembran nachweisbar. Die nichttransfizierte kontralaterale Kontrolle zeigte ein ähnliches Bild (Abb. 4.7 J). Im Gegensatz dazu war nach der Transfektion von nicht-spaltbarem Dystroglycan



(Abb. 4.7 E,F) eine Reduktion von Utrophin unterhalb der Basalmembran erkennbar, während nach Elektroporation des verkürzten Dystroglycans (Abb. 4.7 G,H) ein wesentlich breiterer diffus verteilter Streifen nachweisbar war. Diese Anfärbung deutete auf eine Umverteilung von Utrophin hin, so dass es im Gegensatz zu den Kontrollen auch in apikal gelegenen Bereichen der Neuroepithelzellen lokalisiert werden konnte.

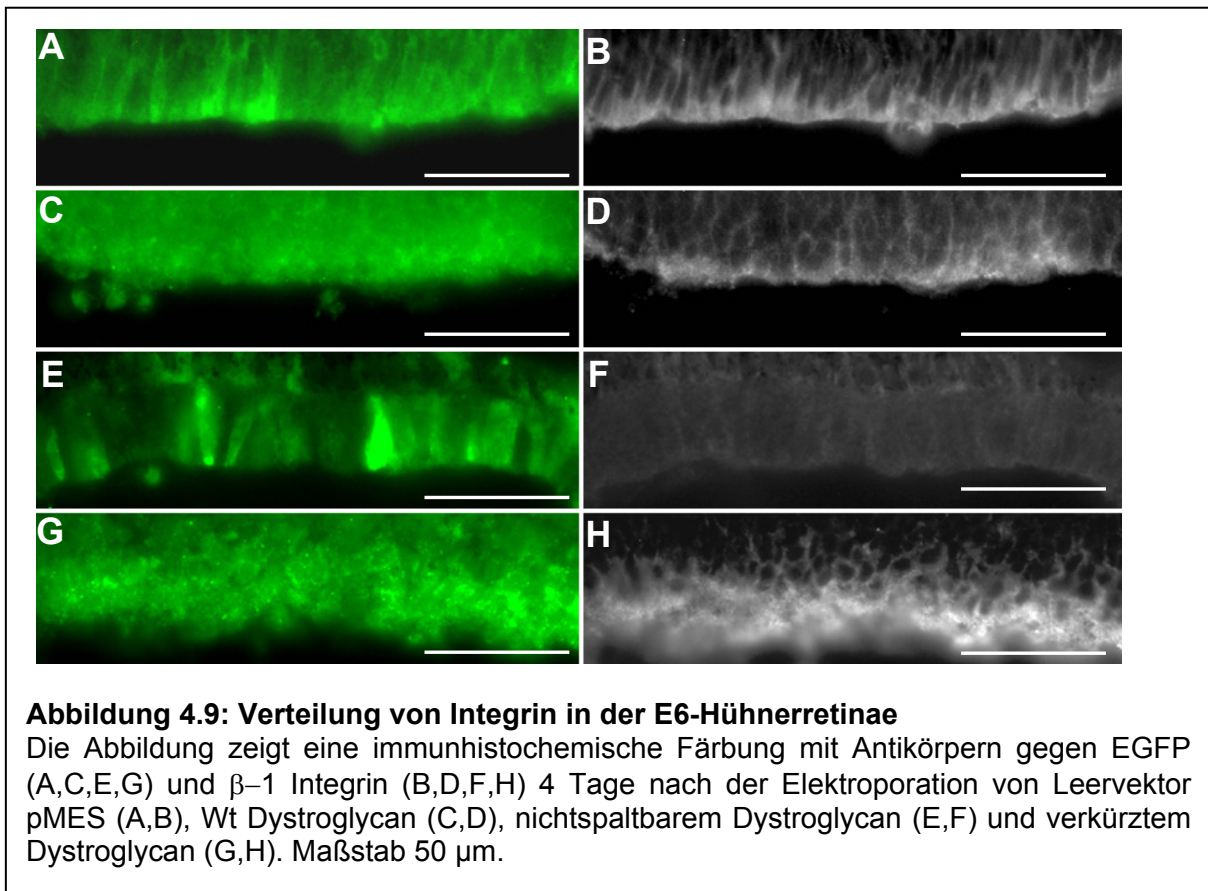
Um zu untersuchen, ob auch andere basal konzentrierte zytoskeletäre Proteine des DAG Veränderungen in ihrer Verteilung aufwiesen, wurden E6 Hühnerretinae 4 Tage nach der Elektroporation mit einem Antikörper gegen α -Dystrobrevin-1 angefärbt. Die Färbung zeigte nach der Transfektion von Wt-Dystroglycan (Abb. 4.8 C,D) und nicht-spaltbarem Dystroglycan (Abb. 4.8 E,F) keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu pMES transfizierten Augen (Abb. 4.8 A,B) oder nichttransfizierten kontralateralen Kontrollaugen desselben Embryos (Daten nicht gezeigt). Das Protein war in einer dünnen Linie unterhalb der Basalmembran nachweisbar. Nach der Elektroporation des verkürzten Dystroglycans,

konnte α -Dystrobrevin ähnlich wie Utrophin in einer breiten Schicht unterhalb der Basalmembran nachgewiesen werden. Somit hatte auch in diesem Versuch nach Transfektion des verkürzten Dystroglycankonstrukts eine Umverteilung stattgefunden.



Alpha-Dystrobrevin bindet an Utrophin. Utrophin kann nicht mehr an das überexprimiert verkürzte Dystroglycanprotein binden und ist daher umverteilt. Die Umverteilung von Utrophin und α -Dystrobrevin spricht auch dafür, dass endogenes Dystroglycan an der Membran reduziert ist. Beide Proteine können nicht mehr korrekt an der Plasmamembran konzentriert werden. Somit lässt sich folgern, dass möglicherweise der Zusammenbau der Proteine des DAG im Golgi Apparat beeinträchtigt ist, so dass diese möglicherweise vorzeitig abgebaut werden und deshalb wie endogenes Dystroglycan entweder nicht mehr an der Plasmamembran vorhanden sind oder umverteilt werden.

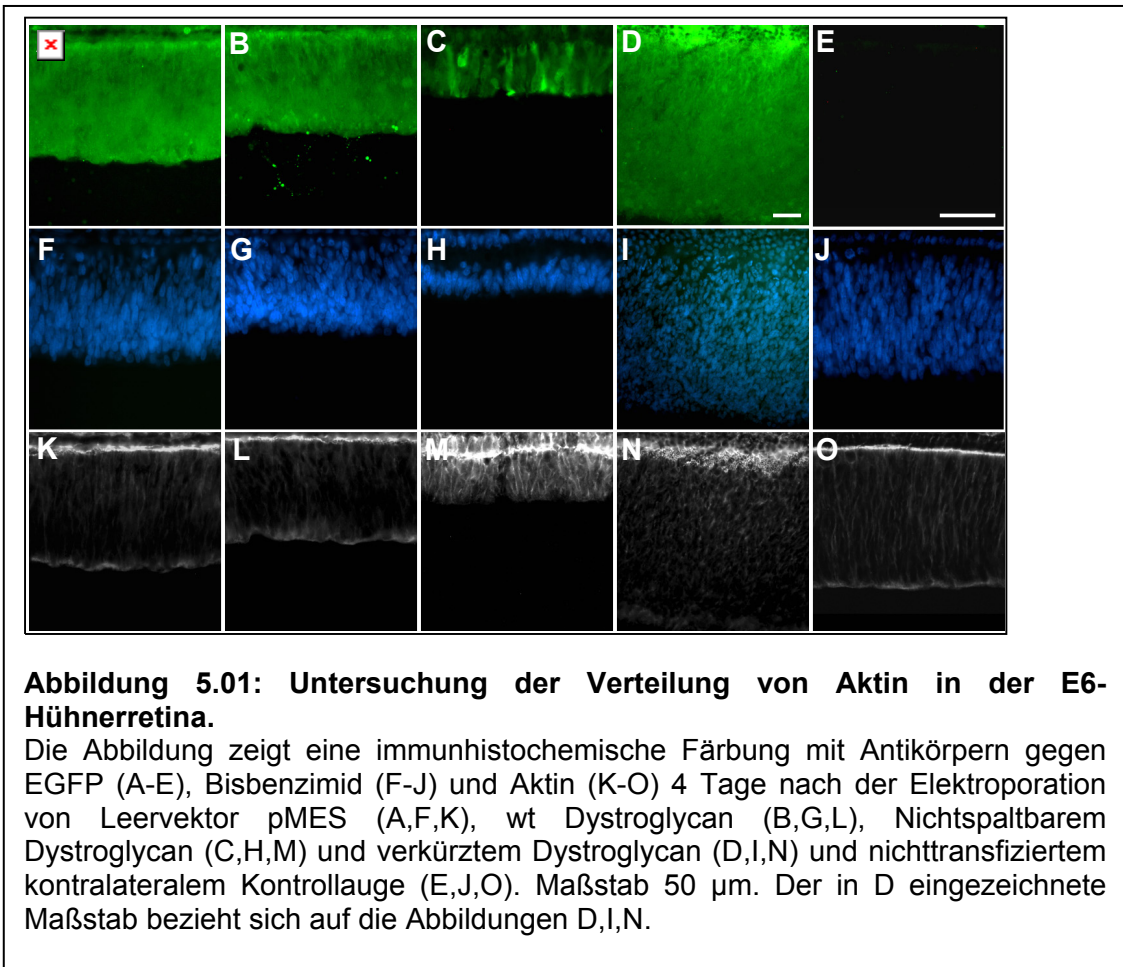
In einem weiteren Versuchsansatz sollte nun auch die Verteilung anderer Adhäsionsproteine innerhalb der Retina nach der Transfektion untersucht werden. Beta-1-



Integrine sind ebenfalls in den Endfüßen der Neuroepithelzellen konzentriert (Hering et al., 2000). Nach der Überexpression von Leervektor pMES (Abb. 4.9 A,B) und Wt- Dystroglycan (Abb. 4.9 C,D) konnten keine Veränderungen im Vergleich zu nichttransfizierten kontralateralen Augen, festgestellt werden (nicht gezeigt). Die Anfärbung war hauptsächlich an der basalen Seite der Neuroepithelzellen an der Zellmembran sichtbar. Nach der Transfektion des nicht-spaltbaren Dystroglycans war keine Integrin-Anfärbung mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu war es nach der Überexpression des verkürzten Dystroglycans in einer wesentlich breiteren Verteilung von β 1-Integrinen im basalen Bereich der Neuroepithelzellen detektierbar. Aus den zuvor beschriebenen Versuchen ging somit hervor, dass Dystroglycan einen Einfluss auf die Verteilung von Integrinen innerhalb der Zellmembran hatte und damit auch einen Einfluss auf die Polarität dieser Zellen ausübte. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl Proteine des DAG als auch die Integrine nach der Überexpression von verkürztem Dystroglycan in einer breiteren Schicht an der Plasmamembran verteilt waren, während diese Proteine nach der Elektroporation des nicht-spaltbaren Dystroglycans vermindert waren. Dies deutete darauf hin, dass Dystroglycan über die Verteilung einzelner basal exprimierter Proteine des DAG und die Beeinflussung

der Verteilung von Integrinen einen Einfluss auf die Polarität der Zellen ausübte.

Um zu klären, ob die Verteilung apikaler Zellmarker ebenfalls durch die Überexpression von Dystroglycan beeinträchtigt ist, wurden E6-Hühnerretinae mit Fluoreszenz-markiertem Phalloidin angefärbt. Phalloidin bindet an F-Aktin, welches vorwiegend im apikalen Bereich der Retina lokalisiert ist. Es bindet einerseits direkt an das Zonula occludens Protein 1 (ZO-1), ein Bestandteil von "tight junctions", die an der ventrikulären Seite des Neuroepithels angeordnet sind (Fanning et al., 1998), aber andererseits auch an Catenine innerhalb der "adhärens junctions", den sogenannten N-Cadherin/ Catenin-Komplexen (Jamora, 2002; Kobiela, 2004). Die Überexpression von Leervektor pMES (Abb. 5.01 A,F,K) und Wt-Dystroglycan (Abb. 5.01 B,G,L) zeigte erwartungsgemäß im Vergleich zu nichttransfizierten kontralateralen Kontrollretinae (Abb. 5.01 E,J,O) eine normale Verteilung von Aktin begrenzt auf den apikalen Bereich der Retina. Ein geringerer Anteil des Proteins war ebenfalls an der basalen Seite der Neuroepithelzellen konzentriert. In Retinae, die mit dem nicht-spaltbaren Dystroglycan transfiziert worden waren, war Aktin verstärkt an der apikalen Seite der Neuroepithelzellen, aber auch entlang des gesamten Zellfortsatzes im Cytoplasma der Zelle detektierbar (Abb. 5.01 C,H,M). Die Transfektion von verkürztem Dystroglycan (Abb. 5.01 D,I,N) ergab eine Anfärbung in Form eines wabenartigen Musters, das in einem breiten Streifen an der ventrikulären Seite der Retina detektiert werden konnte (Abb. 5.02). Dieses wabenartige Muster ergibt sich vermutlich aus der Hyperproliferation der Neuroepithelzellen, so dass mehr Zellen an ihrer apikalen Seite Aktinfilamente akkumulieren, die wiederum an sogenannte Adhäsionskomplexe an der ventrikulären Seite der Retina gebunden sind. Somit könnten diese Adhäsionskomplexe auch verändert sein. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Experimente eine veränderte Verteilung verschiedener apikaler wie auch basolateraler Marker innerhalb der Neuroepithelzellen zeigen.



Es sollte nun untersucht werden, ob diese beeinträchtigte Polarität zusammen mit den Veränderungen in der Zellmorphologie und im Zellzyklus auf veränderte Adhäsionsstrukturen zwischen den Zellen zurückzuführen sind. Die Adhäsionskomplexe dieser Zellen befinden sich an der apikalen Seite und bilden einen „Adhäsionsgürtel“ um die

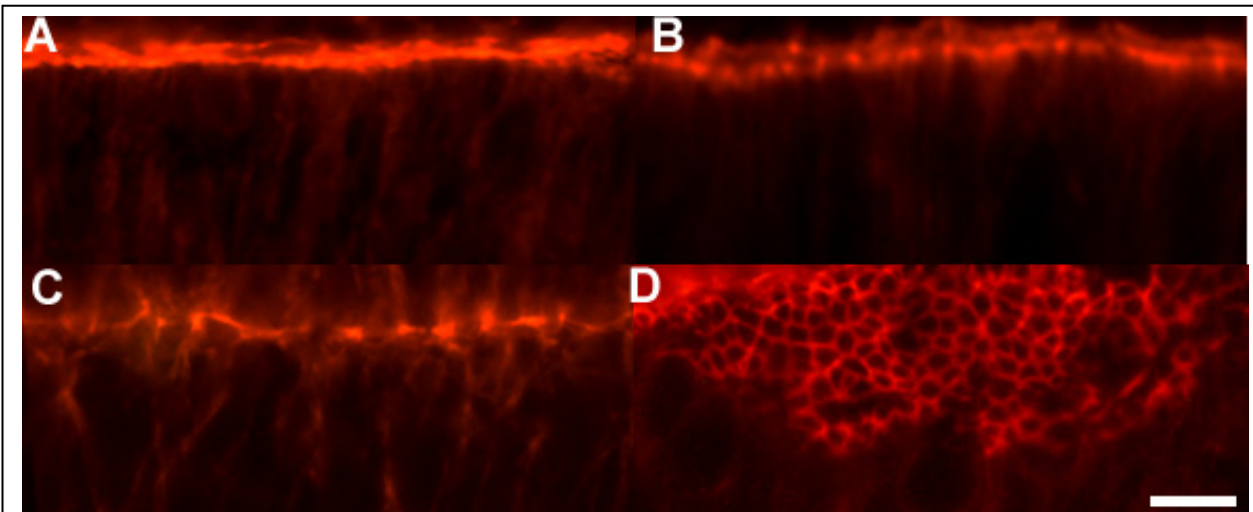
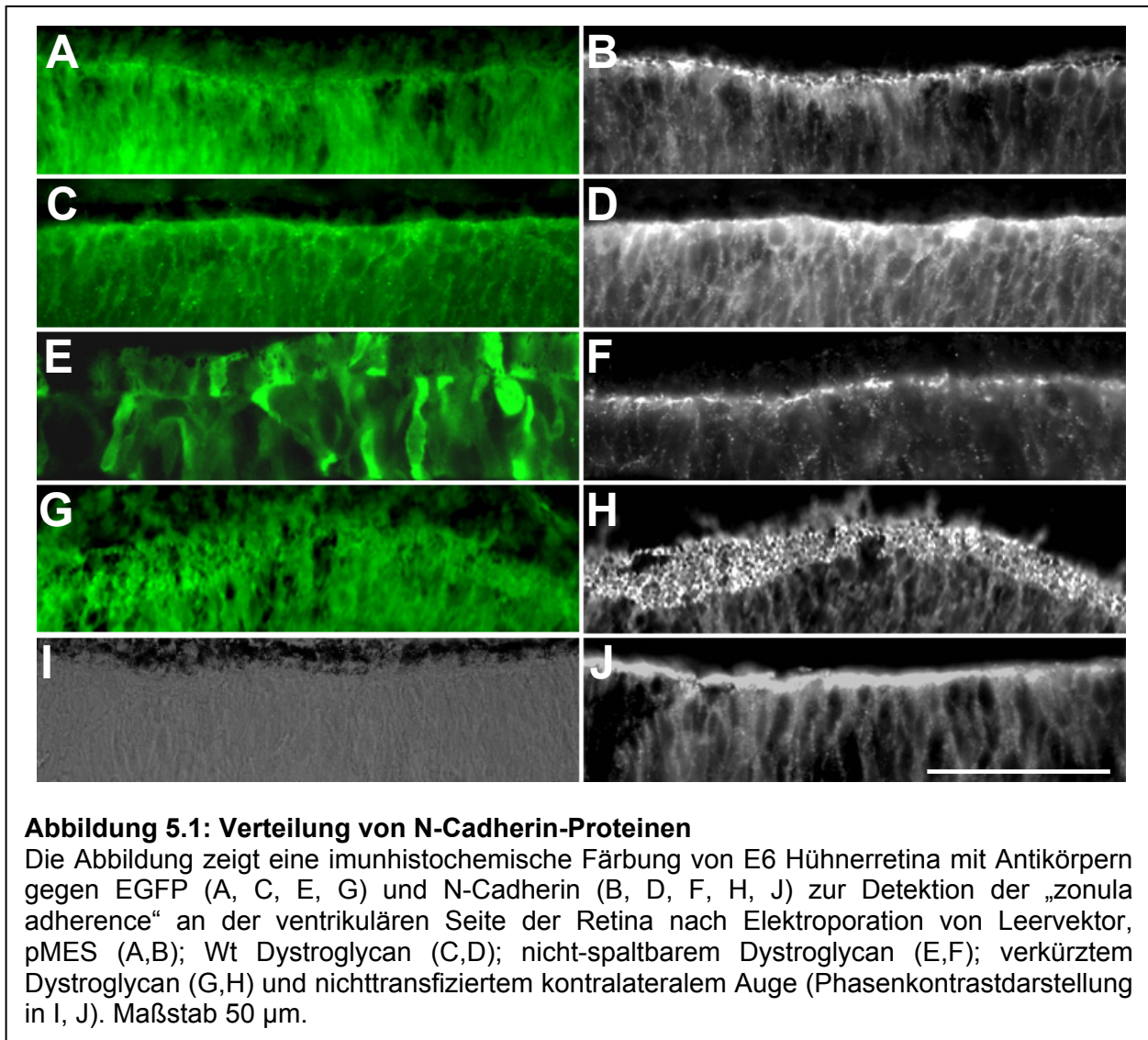


Abbildung 5.02: Vergrößerte Ansicht der Verteilung von Aktin in der E6-Hühnerretina. Die Abbildung zeigt die Verteilung von Aktin (A-D), 4 Tage nach der Elektroporation von Leervektor pMES (A), wt Dystroglycan (B), Nichtspaltbarem Dystroglycan (C) und verkürztem Dystroglycan (D). Nach der Überexpression von verkürztem Dystroglycan entsteht im Gegensatz zu den anderen transfizierten Retinapräparaten ein wabenartiges Anfärbungsmuster. Maßstab 10 μm .

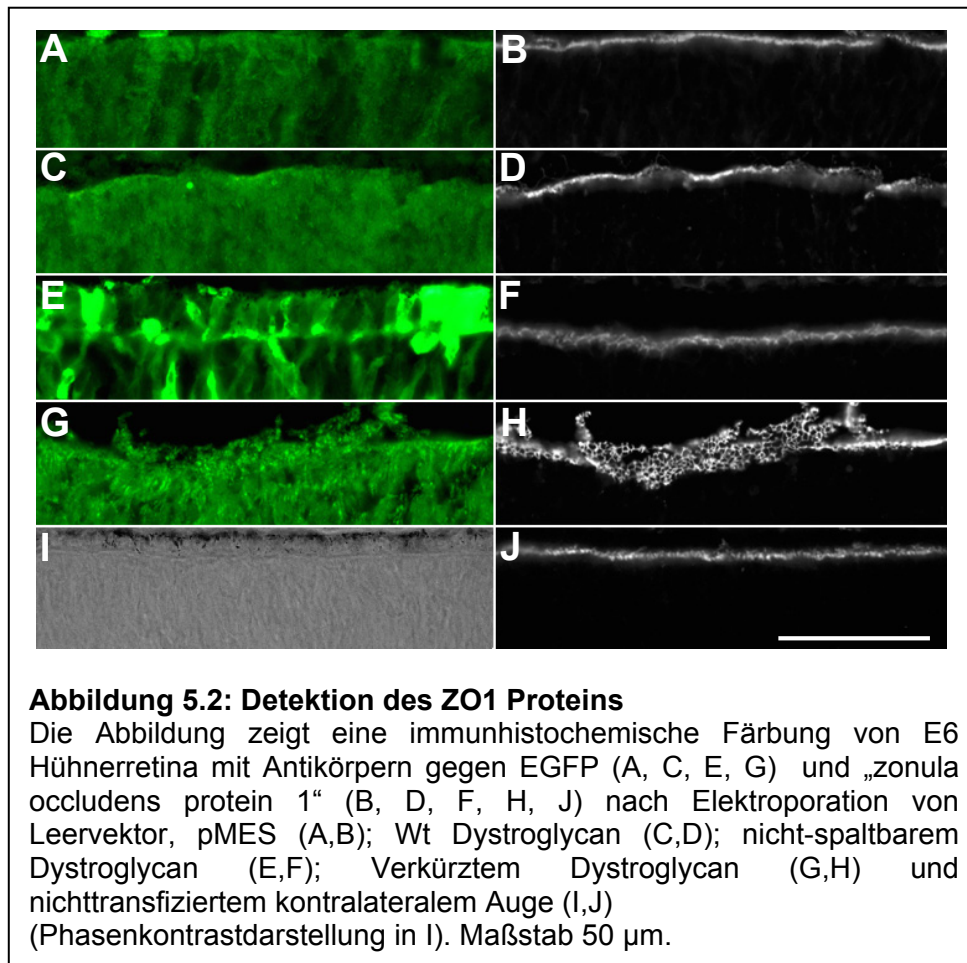
Neuroepithelzellen. Darüber hinaus schaffen sie eine adhäsive Verbindung zwischen den Fortsätzen der einzelnen Neuroepithelzellen. Eine der Hauptkomponenten dieses Adhäsionskomplexes ist der bereits erwähnte Cadherin/Catenin-Komplex, der wiederum eng mit dem apikalen Mikrofilamentnetzwerk wie auch mit dem Zytoskelett der Zelle verbunden ist. Dieses vom Adhäsionsgürtel vermittelte Netzwerk spielt gerade in der frühen Retinaentwicklung eine essentielle Rolle bei der Adhäsion der Zellen untereinander und somit im Aufbau eines charakteristischen epithelialen Gewebeverbandes (Jamora, 2002; Müller, 2003). Zusätzlich erlaubt diese Barriere nur einen eingeschränkten Austausch von Substanzen und bestimmten Proteinen zwischen apikaler und basaler Membrandomäne und ist somit insbesondere auch für die Etablierung von Polarität in diesen Zellen verantwortlich (Fleming et al., 2000; Tsukita et al., 2001; Müller, 2003).



Es stellt sich daher die Frage, ob diese Adhäsionsstrukturen durch die Überexpression von Dystroglycan beeinflusst werden.

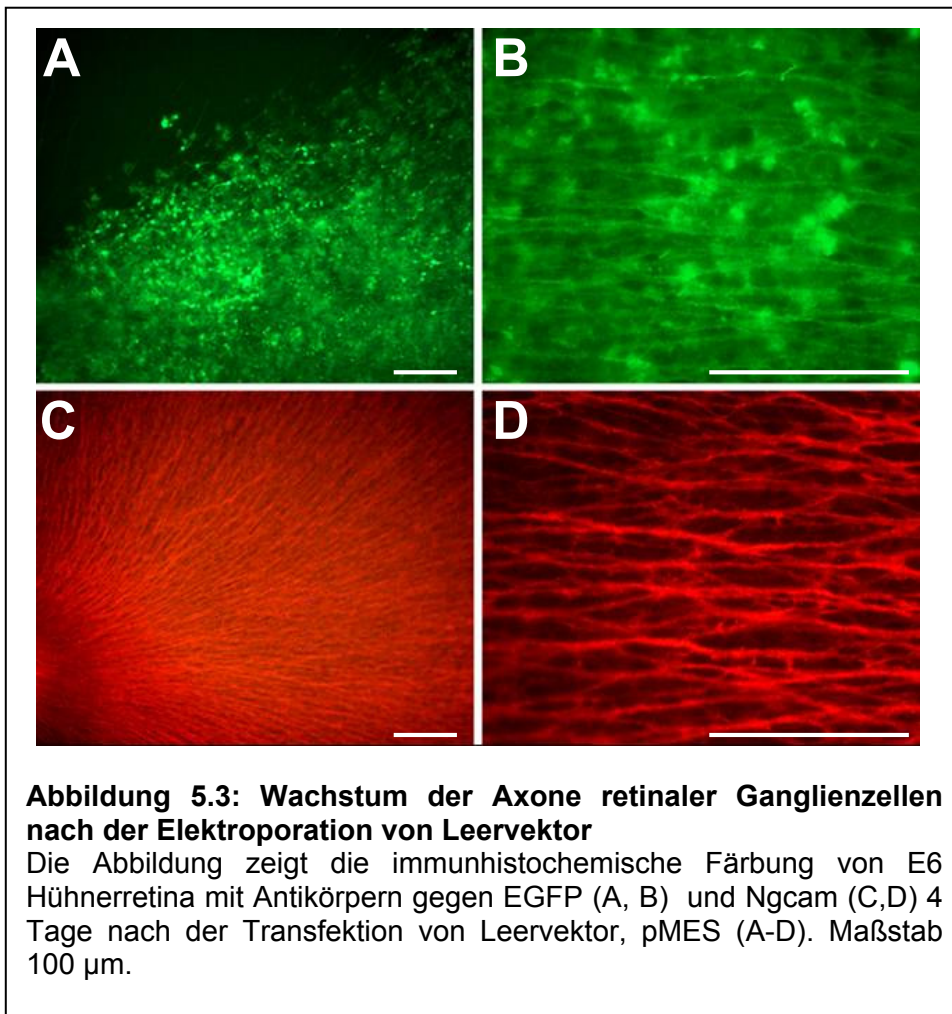
Um zu untersuchen, ob die Verteilung der Adhäsionskomplexe verändert war, wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen N-Cadherin, einem Marker für „adherence junctions“ (Abb. 5.1 B,D,F,H,J) und ZO1, einem Marker für „tight junctions“ (Abb. 5.2 B,D,F,H,J), an E6- Retinapräparaten durchgeführt. Dabei zeigten mit Leervektor pMES (Abb. 5.1,5.2 A,B), Wt-Dystroglycan (Abb. 5.1,5.2 C,D) und mit nicht-spaltbarem Dystroglycan (Abb. 5.1,5.2 E,F) transfizierte Hühnerembryonenretinae keine signifikanten Unterschiede in ihrer N-Cadherin- oder ZO1-Verteilung im Vergleich zu nichttransfizierten kontralateralen Augen desselben Embryos (Abb. 5.1,5.2 I,J). Da diese Adhäsionskomplexe

an der apikalen Seite der Neuroepithelzellen, benachbarte Fortsätze miteinander verbinden, konnten beide Proteine an der apikalen Seite zwischen den Endfüßen der Neuroepithelzellen detektiert werden. Im Gegensatz zu den Kontrollen war nach Transfektion des verkürzten Dystroglycans (Abb. 5.1,5.2 G,H) eine Verbreiterung der N-Cadherin bzw. ZO1 exprimierenden Schicht an der ventrikulären Seite erkennbar, die weit in die retinale Verdickung hineinreichte (Abb. 5.1,5.2 H). Trotz der Verbreiterung der angefärbten Schicht zeigte sich ein ähnliches wabenartiges Muster wie es nach der Markierung von Aktinfilamenten erhalten werden konnte. Diese ungewöhnliche Verteilung der Adhäsionskomplexe entsteht möglicherweise nach der übermäßigen Proliferation der Zellen. Es ist denkbar, dass durch den dramatischen Anstieg der Zellzahl auch mehr Zellen mit solchen Adhäsionskomplexen an der ventrikulären Seite der Retina nachweisbar sind. Die Übereinanderlagerung dieser Zellen könnte eine Erklärung für das wabenförmige Verteilungsmuster liefern. Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass die Überexpression von Dystroglykan einen deutlichen Einfluss auf die Verteilung dieser Komponenten hatte und außerdem einen entscheidenden Einfluss auf die Polarität der Zellen ausübte.



3.8 Wachstumsverhalten der retinalen Ganglienzellaxone

Aufgrund der Abrundung der Zellen nach der Überexpression von verkürztem Dystroglycan, kommt es zum Verlust des Fortsatzes und des Endfusses, der die Neuroepithelzelle an der Basalmembran verankert. Diese Endfüsse haben neben ihrer Adhäsionsfunktion für die Neuroepithelzellen an der Basalmembran auch die Funktion, als Leitstrukturen für Axone der sich in der Retina differenzierenden Neurone (retinale Ganglienzellen) zu dienen. Deshalb sollte geklärt werden, ob das Wachstumsverhalten der Axone retinaler Ganglienzellen beeinträchtigt war.



Die Wachstumskegel der Axone der retinalen Ganglienzellen nutzen für ihre Orientierung unterschiedliche repulsive und anziehende Leitmoleküle, um aus der Retina in das optische Tektum zu gelangen. Die Endfüße von Neuroepithelzellen exprimieren solche Signalmoleküle und dienen den Axonen retinaler Ganglienzellen als richtungsweisende Leitstrukturen für ihre Orientierung (Thanos und Mey, 2001). In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich die Neuroepithelzellen durch die Überexpression des verkürzten Dystroglycans abrunden und den Kontakt der Endfüße an der Basalmembran verlieren.

Um zu untersuchen, ob die Überexpression der unterschiedlichen Dystroglycankonstrukte einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Axone retinaler Ganglienzellen hat, wurde die Orientierung der retinalen Axone in Ganzgewebepräparaten der Retina untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Retinapräparate einerseits mit

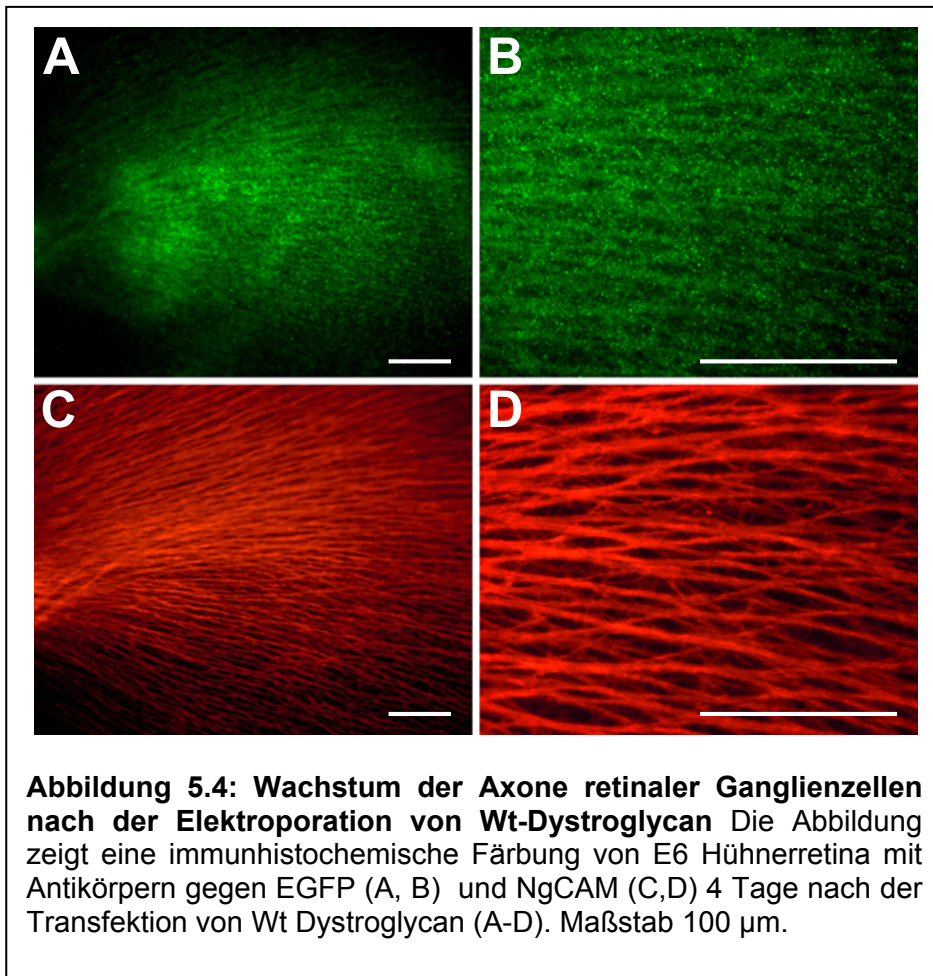
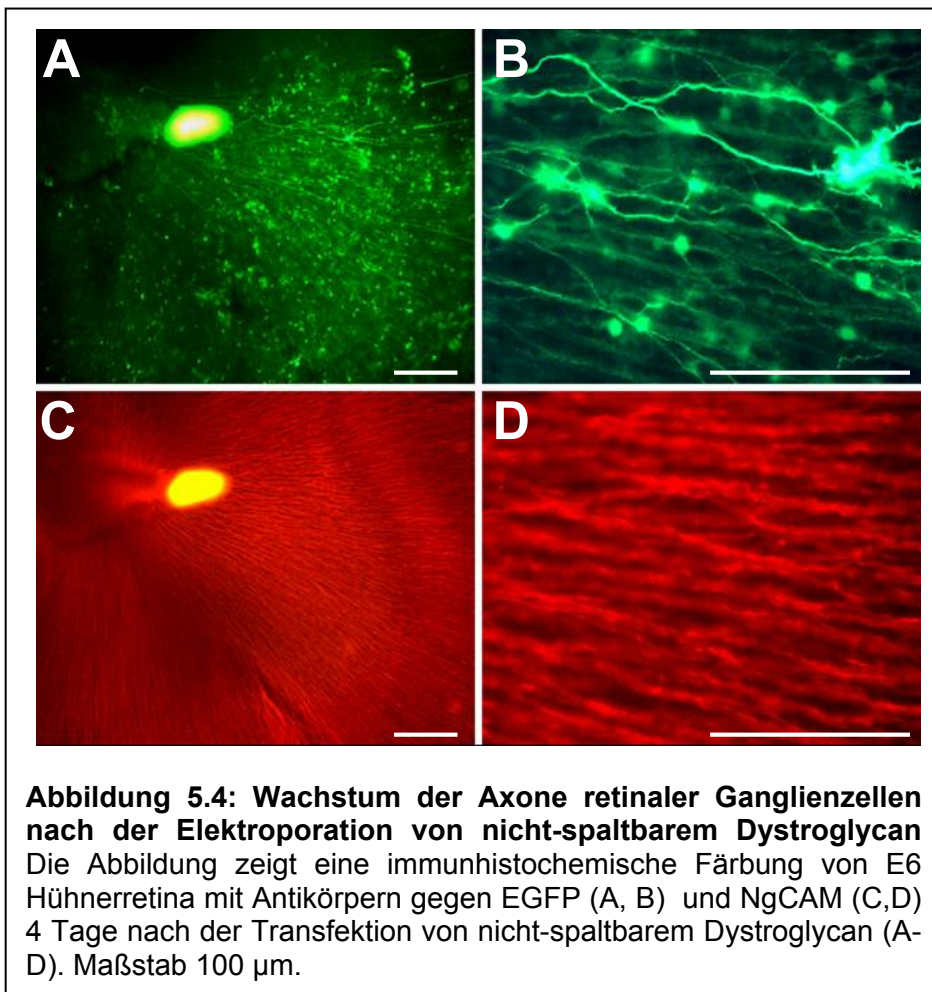


Abbildung 5.4: Wachstum der Axone retinaler Ganglienzellen nach der Elektroporation von Wt-Dystroglycan Die Abbildung zeigt eine immunhistochemische Färbung von E6 Hühnerretina mit Antikörpern gegen EGFP (A, B) und NgCAM (C,D) 4 Tage nach der Transfektion von Wt Dystroglycan (A-D). Maßstab 100 μm .

Antikörpern gegen EGFP, zur Detektion transfizierter Zellen, und andererseits auch mit Antikörpern gegen NgCAM („neuron-glia cell adhesion molecule“) angefärbt. NgCAM ist ein Zelladhäsionsmolekül, das ausschliesslich auf der Oberfläche von Axonen konzentriert ist und somit nicht die Zellkörper färbt, was die Analyse der axonalen Orientierung erleichtert. Die Axone retinaler Ganglienzellen wachsen innerhalb der Retina von der Peripherie zentripetal in Faszikeln auf den Austrittspunkt des optischen Nervis hin. Danach verlassen sie das Auge, und wachsen durch den optischen Nerv und den optischen Trakt ins Tectum opticum. Die Transfektion der Retina mit Leervektor pMES und den unterschiedlichen Dystroglycankonstrukten zeigte, dass die Mehrzahl der Axone transfiziert war. (Abb. 5.3 A). Nach Elektroporation von Leervektor pMES waren keine signifikanten Unterschiede im Orientierungsverhalten der Axone von retinalen Ganglienzellen zum nichttransfizierten kontralateralen Auge erkennbar (Daten nicht gezeigt). Nach Transfektion des nicht-spaltbaren Dystroglycans (Abb. 5.5 A-D) und Wt-Dystroglycans (Abb. 5.4 A-D) waren einzelne Axone erkennbar, die dramatische Richtungsänderungen aufwiesen und teilweise



im rechten Winkel zu den anderen Axonen wuchsen. Dies beschränkte sich nicht nur auf transfizierte Axone, auch nichttransfizierte Axone zeigten eine veränderte Orientierung. Die deutlichsten Effekte ergaben sich nach Elektroporation der verkürzten Dystroglycanform (Abb. 5.6 A-D). Hier war keine zentripetale Ausrichtung mehr erkennbar. Die Axone hatten ihre Orientierung zum optischen Nerv verloren. Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die Axone nach der Elektroporation von Wt-Dystroglycan und nicht-spaltbarem Dystroglycan nur gelegentlich Richtungsänderungen zeigten, während nach der Überexpression von verkürztem Dystroglycan die zentripetale Orientierung vollständig verlorgenegegangen war. Der Verlust der Orientierung ist konsistent mit dem Verlust der Endfüsse an der Basalmembran aufgrund der Abrundung der Zellen nach der Überexpression von verkürztem Dystroglycan.

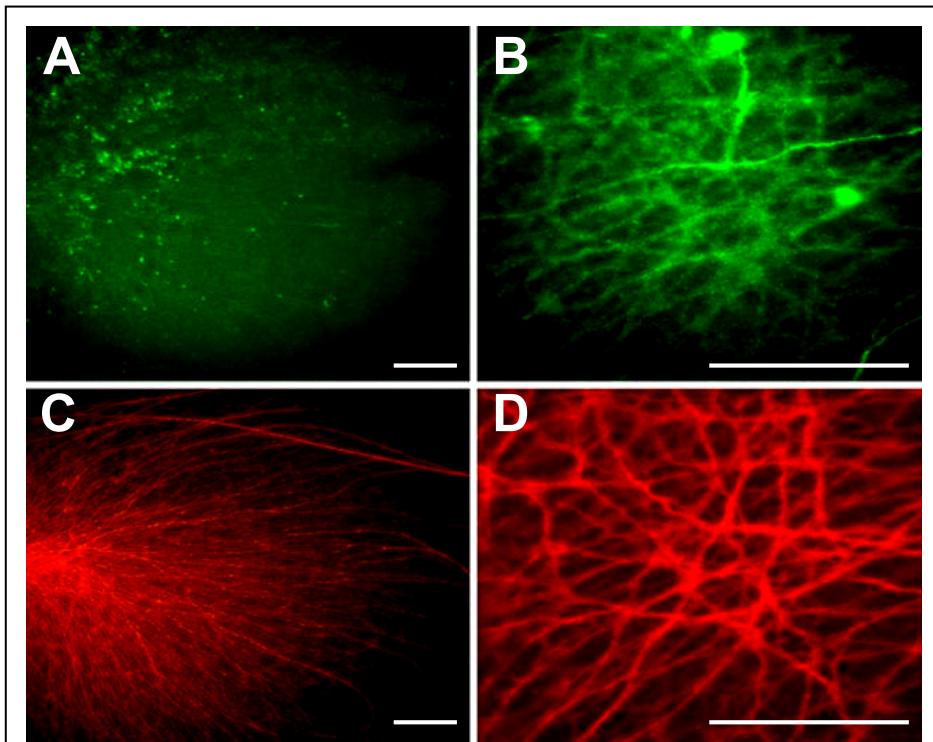


Abbildung 5.5: Wachstum der Axone retinaler Ganglienzellen nach der Elektroporation von verkürztem Dystroglycan Die Abbildung zeigt eine immunhistochemische Färbung von E6 Hühnerretina mit Antikörpern gegen EGFP (A, B) und NgCAM (C,D) 4 Tage nach der Transfektion von verkürztem Dystroglycan (A-D). Maßstab 100 µm.

IV. Diskussion

Dystroglycan ist die zentrale Komponente eines multimeren Komplexes, des Dystrophin-assoziierten Glykoproteinkomplexes (DAG). In der Skelettmuskulatur verbindet dieser Komplex die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett der Muskelfasern und gewährleistet auf diese Weise die Integrität der Fasern während der Kontraktion. Mutationen in Proteinen des DAG sind die molekulare Ursache für die verschiedenen Formen von Muskeldystrophie – genetisch bedingten Erkrankungen, in denen neben der progressiven Degeneration der Skelettmuskulatur auch ZNS Defekte auftreten. Die Funktion des DAG im ZNS und die Ursache für die ZNS Defizite sind weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene modifizierte Dystroglycan cDNA hergestellt und in die Augenvesikel von Hühnerembryonen, einem leicht zugänglichen Teil des ZNS, injiziert. So sollte die Funktion des DAG im sich entwickelnden ZNS untersucht werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Neuroepithelzellen nach der Transfektion eines um die dystrophinbindende Domäne verkürzten Dystroglycans, abrunden und ihre charakteristische radiäre Struktur verlieren. In den transfizierten Retinaabschnitten bildeten sich Verdickungen, in denen die Zahl der proliferierenden Zellen angestiegen war. Gleichzeitig war die Anzahl der differenzierten, postmitotischen Neurone erhöht. Diese Neurone waren außerdem im Vergleich zu den Kontrollen nicht mehr in einer schmalen Schicht an der vitrealen Seite der Retina lokalisiert, sondern über die ganze Retina verteilt. Die Analyse der Axone dieser Neurone ergab, dass auch diese in ihrer Orientierung gestört waren. Sie waren nicht mehr in der Lage, den Austritt des optischen Nerves zu finden und wuchsen stattdessen ungeordnet innerhalb der Retina. Viele Proteine des DAG waren an der Plasmamembran der Neuroepithelzellen umverteilt. Dies deutete auf eine Dissoziation des Komplexes an der Membran hin.

Im Gegensatz dazu führte die Expression eines nicht-spaltbaren Dystroglycans in Neuroepithelzellen zu einer deutlichen Reduktion des Augenvolumens und einer verminderten Proliferation und Differenzierung der Neuroepithelzellen. Zahlreiche Komponenten des Komplexes waren an der Basalmembran reduziert. Dies deutete auf eine veränderte Polarität der Neuroepithelzellen hin.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Dystroglycan und mit ihm der DAG einen entscheidenden Einfluss auf die Morphologie, Proliferation und Differenzierung von Neuroepithelzellen ausübt. Dies bewirkt als Konsequenz Veränderungen in der Wanderung, Lokalisation und im axonalem Wachstum von retinalen Ganglienzellen.

4.1 Technik Mikroelektroporation

Die Analyse von Genfunktionen ist nach der Flut an Informationen, die beispielsweise nach der Sequenzierung des humanen Genoms und des Hühnergenoms entstanden sind von entscheidender Bedeutung (The International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004; Wallis et al., 2004). Es existieren allein 10000 hirnspezifische, humane Gene, deren Funktion noch aufgeklärt werden muß. Dystroglycan ist eines der Gene, dessen Funktion im ZNS noch nahezu unbekannt ist.

Welche Funktion Dystroglycan im sich entwickelnden ZNS besitzt, sollte mit Hilfe der Elektroporation untersucht werden. Doch ist diese Methode für die Transfektion der Hühnerembryonen und für die Untersuchung des DAG und Dystroglycan im ZNS geeignet? Hierzu sollen im Folgenden die Vor- und Nachteile dieser Methode diskutiert werden:

Die Elektroporation von Hühnerembryonen erfordert die Injektion von cDNA in einen Hohlraum, in dem sich die DNA zunächst verteilt. Die Applikation eines elektrischen Feldes vermittelt dann auf schonende Art und Weise den Transfer der negativ geladenen DNA zur positiv geladenen Elektrode. Die applizierten elektrischen Pulse erzeugen transiente Poren in der Zellmembran durch die die Aufnahme der cDNA erfolgt. Die Schwierigkeit bestand bislang darin, dass diese elektrischen Pulse eukaryotische Zellen derartig schädigen, dass sie sterben. Die Verwendung einer schnellen Serie von kontrollierten quadratwelligen Pulsen, anstelle der bisher in der Bakteriologie eingesetzten glockenförmigen exponentiellen Pulse, konnte das Absterben eukaryotischer Zellen erstmals verhindern. Muramatsu et al. waren unter den ersten, die diese Technik erfolgreich am lebenden Hühnerembryo einsetzten (Muramatsu et al., 1996; Muramatsu et al., 1997). Diese wichtige und elegante Methode der Elektroporation wird heute routinemäßig von Hühnerembryologen genutzt und auch an vielen anderen lebenden Geweben und Organismen angewendet (Brown et al.,

2003). In einer Vielzahl von Arbeiten konnte diese Technik für den effizienten Gentransfer von cDNA in die Somiten und das Neuralrohr des Hühnerembryo weiter optimiert werden (Inoue und Krumlauf, 2001; Nakamura und Funahashi, 2001; Swartz et al., 2001a). Ein Nachteil der Methode besteht jedoch in der hohen Sterblichkeitsrate der Embryonen. Beispielsweise werden die Gewebestellen, an denen die Elektroden plziert werden, häufig verletzt, so dass die Durchblutung an dieser Stelle gestört ist (Funahashi et al., 1999). Hühnerembryonen bilden in der frühen embryonalen Entwicklung noch keine Blutgerinnungsfaktoren und sind daher Bluter, die bei einer Verletzung von Gefäßen augenblicklich verbluten und sterben. (Swartz et al., 2001a). Die Vergrößerung des Abstandes zwischen den Elektroden verhindert zwar die Schädigung des Embryos und seines Blutgefäßsystems, senkt aber gleichzeitig die Transfektionseffizienz. Eine erhöhte Spannung kann den Embryo ebenfalls verletzen und die Sterblichkeitsrate erhöhen. Eine Möglichkeit den Schaden zu minimieren, ist die Verwendung einer sogenannten Mikroelektrode mit einer Spitze von etwa 40 µm, die durch die Neuropore in den Embryo eingeführt werden kann. Diese Elektrode hat gegenüber größeren Elektroden den Vorteil, dass das elektrische Feld erheblich verkleinert wird und somit zielgerichteter elektroporiert werden kann. Die Überlebensrate 24 Stunden alter elektroporierter Embryonen kann auf diese Weise von zuvor 60 % auf annähernd 90 % gesteigert werden (Momose et al., 1999; Yasuda et al., 2000). Dies ist ein entscheidender Vorteil für die Durchführung von Langzeitexperimenten und deshalb wurde diese Methode auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Annähernd 80 % der Embryonen hatten 4 Tage nach der Elektroporation überlebt und konnten untersucht werden. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass die Elektrode aufgrund des verkleinerten elektrischen Feldes durch die Neuropore des Hühnerembryos in der Nähe des Zielgewebes plziert werden muß. Auf diese Weise wird Gewebe verletzt und häufig entstehen nach Applikation der elektrischen Pulse Luftblasen an der Elektrode. Diese Luftblasen müssen entfernt werden, um eine Schädigung des Gewebes zu verhindern. Auch die Einstichstelle der Injektionskanüle verletzt das Gewebe. Anhand der mit Leervektor injizierten Kontrollen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Schäden offensichtlich nur minimal sind und die Entwicklung des Auges und des Embryos nicht beeinträchtigten.

Ein weiterer Nachteil ist, dass die injizierte cDNA nicht in das Wirtschromosom integriert wird und daher nicht in der Zelle repliziert werden kann. Die Transfektion ist somit nur transient. Das Plasmid wird in Neuroepithelzellen nach über 20 Stunden aufgrund der

hohen Zellteilungsrate und der nicht vorhandenen Replikation nach der Elektroporation bei der Übertragung auf die Tochterzellen immer mehr verdünnt. Die Durchführung von Langzeitexperimenten, die über eine Dauer von 4 Tagen hinausgehen, wird dadurch erschwert. Experimente, die über einen längeren Zeitraum andauern, würden eine mehrfache Injektion und Elektroporation der Embryonen oder eine Anwendung in späten Stadien erfordern. Die Injektion in späteren Stadien ist jedoch aufgrund der Ausbildung der Blutgefäße, die den Embryo einhüllen, kaum möglich. Es muß außerdem berücksichtigt werden, dass die veränderten Konstrukte in Gegenwart des endogenen Proteins exprimiert werden. Dies kann mögliche Effekte kompensieren, so dass keine morphologischen Veränderungen im Gewebe erkennbar wären.

Die Vorteile dieser Technik gegenüber anderen Methoden, die einen effizienten Gentransfer gewährleisten wie beispielsweise auf Retroviren basierende Methoden (Lever et al., 1996; Iba, 2000), die „Gen-gun“-Technik (Brown et al., 2003) oder die Anwendung lipophiler Transfektionsreagenzien (Fukuda et al., 2000), bestehen einmal in dem wesentlich effizienterem Gentransfer, aber auch der besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und der Möglichkeit zur gezielten Transfektion spezifischer Zellen oder Zellgruppen sowie einer höheren Überlebensrate der Embryonen (Muramatsu et al., 1997; Swartz et al., 2001a). Für die effiziente Expression der Konstrukte ist jedoch auch ein geeigneter Expressionsvektor erforderlich. Für meine Experimente habe ich deshalb den pMES-Vektor verwendet (Swartz et al., 2001b). Dieser Vektor besitzt mit dem β -Aktin-Promotor aus Huhn eine besonders starke Promotor/Enhancer-Sequenz, die die effiziente Expression der cDNA Konstrukte in Hühnerzellen gewährleistet (Niwa und Miyazaki, 1991). Er ist bicistronisch und enthält eine IRES-Sequenz („Internal Ribosome Entry Site“), die gleichzeitig die Expression der gewünschten cDNA und des EGFP („Enhanced Green Fluorescent Protein“) erlaubt. Anhand der Fluoreszenz des EGFP-Proteins können dann transfizierte von nichttransfizierten Zellen unterschieden werden. Durch die Optimierung der Elektroporationsbedingungen (Variation der Spannung und der Anzahl der Pulse) konnte erreicht werden, dass 50-80 % der Embryonen 24 Stunden nach der Elektroporation EGFP-Fluoreszenz aufwiesen. In der Hälfte dieser Embryonen waren 50 % der Neuroepithelzellen der Retina transfiziert. Die Effizienz der Methode war somit sehr gut. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist, dass die modifizierten cDNA-Konstrukte häufig schon 2 Stunden nach der Injektion exprimiert werden und auf diese Weise weitaus schnellere und größere Effekte erzielt werden können (Momose et al., 1999) als beispielsweise durch retrovirale Infektionen,

da Retroviren mindestens 24 Stunden benötigen, um von der Zelle exprimiert zu werden. Neben diesen Vorteilen bietet die Elektroporation eine ganze Reihe weiterer Vorzüge. Die Elektroporation des Gewebes oder der Zellen kann lokal begrenzt angewendet werden, so dass das Überleben der Embryonen nicht beeinträchtigt wird und dennoch spezifische Effekte erzielt werden können. In transgenen „knock out“ Mäusen können die eingefügten Genmutationen zum Beispiel oft den frühen Tod der Embryonen oder schwerwiegende Veränderungen der Gewebestruktur verursachen. Dystroglycan-defiziente Mäuse sterben bereits in einem frühen Entwicklungsstadium (Williamson et al., 1997). Zudem ist die Herstellung transgener Tiere häufig sehr zeitaufwendig, mit erheblichen Kosten verbunden und die Charakterisierung dieser Tiere liefert oft nicht die erhofften Effekte. Durch Anwendung der Elektroporationstechnik können die modifizierten Dystroglycankonstrukte dagegen sehr schnell *in vivo* exprimiert werden. Auf diese Weise lässt sich innerhalb kürzester Zeit ermitteln, ob und welche Veränderungen sich nach der Expression dieser mutierten Proteine ergeben und viele Tiere überleben die Experimente. Zusammenfassend lässt sich also schliessen, dass die *in ovo* Elektroporation ein wichtiges Werkzeug darstellt, um interessante Gene und ihre Funktion studieren zu können. Es konnten weiterhin keine Dystroglycan-spezifischen Veränderungen festgestellt werden, was die Methode auch für die Untersuchung des DAG in Neuroepithelzellen als geeignet erscheinen lässt.

4.2 Überprüfung der Proteinexpression

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die durch *in ovo* Elektroporation injizierte Dystroglycan cDNA im Gewebe exprimiert wird und ob die heterolog exprimierten Proteine auch korrekt synthetisiert und lokalisiert werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob das Dystroglycankonstrukt mit einer Ser655Ala Mutation *in vivo* oder *in vitro* wirklich nicht gespalten wird. Es ist bekannt, dass Dystroglycan durch eine noch unbekannt aber ubiquitär vorkommende Protease in zwei Proteine gespalten wird, und dass die verwendete Mutation die Spaltung in transfizierten HEK Zellen verhindert (Esapa et al., 2003). Die Ergebnisse im Western-Blot bestätigten nun, dass ein Protein *in vitro* und *in vivo* exprimiert wird, dass ein Molekulargewicht hat, welches dem von nicht-gespaltenem Dystroglycan entspricht. Die beiden Proteine blieben kovalent aneinander gebunden. Somit war auch keine zusätzliche Spaltstelle im Protein vorhanden.

Da die korrekte Synthese und Glykosylierung des Proteins häufig eine Grundvoraussetzung für den Transport und die Insertion dieser Proteine in die Plasmamembran ist, und da Mutationen alle diese Prozesse unterbinden können, mußte geklärt werden, ob das modifizierte Protein in der gleichen Art und Weise wie endogenes Dystroglycan lokalisiert und prozessiert wird. Aus Arbeiten von Esapa et. al. (2003) war bekannt, dass das Konstrukt mit mutierter proteolytischer Spaltstelle zwar eine veränderte Glykosylierung besitzt, aber trotzdem normal in die Membran von transfizierten HEK Zellen inseriert wird. Mit Antikörpern, die gegen die extrazelluläre und intrazelluläre Domäne des nicht-spaltbaren Dystroglycans gerichtet sind, konnte gezeigt werden, dass das Protein in der richtigen Orientierung in die Membran eingesetzt wird (Esapa et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch den Nachweis des vom elektroporierten Konstrukt kodierten Proteins an der basalen Seite von Neuroepithelzellen bestätigt werden, dass das nicht-spaltbare Dystroglycanprotein auch *in vivo* an der Plasmamembran in den Endfüßen konzentriert ist. Alle in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sind wahrscheinlich also nicht durch eine gestörte Synthese oder aufgrund einer ektopischen Lokalisierung des exprimierten Proteins entstanden.

Vor einiger Zeit wurden Untersuchungen vorgestellt, die darauf hindeuten, dass die Überexpression von nicht-spaltbarem Dystroglycan in der Skelettmuskulatur von transgenen DGS654A Mäusen, die Synthese und Glykosylierung von endogenem Dystroglycan inhibieren (Jayasinha et al., 2003a; Jayasinha et al., 2003b). In meiner Arbeit konnte im Western Blot dennoch endogenes Dystroglycan mit einem Molekulargewicht von 43 kDa detektiert werden. Wie ist diese Diskrepanz erklärbar? Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür wäre, dass das endogene Protein in meinem Ansatz von der nicht zu unterschätzenden Anzahl nichttransfizierter Zellen synthetisiert wurde, die sich ebenfalls in der Membranpräparation befanden. Die Synthese des endogenen Dystroglycans von nichttransfizierten oder transfizierten Zellen ist im Western-Blot nicht unterscheidbar, da ganze Retinae/Tecta untersucht wurden. Es ist alternativ jedoch auch denkbar, dass die Überexpression des modifizierten Proteins in der Retina keine Reduktion des endogenen Dystroglycans hervorruft. Zusammenfassend bleibt die Frage ungeklärt, ob die Synthese von endogenem Dystroglycan durch die Überexpression von nicht-spaltbarem Dystroglycan inhibiert wird. Diese Frage muß in weiteren Versuchen geklärt werden und bleibt somit offen.

Die parallele Analyse der Expression des verkürzten Dystroglycans ergab, dass dieses Protein mit einem anti-Flag Antikörper in den Endfüßen der Neuroepithelzellen detektiert werden konnte. Erstaunlicherweise konnte mit einem Antikörper, der gegen die letzten 15 Aminosäuren von β -Dystroglycan gerichtet ist und der somit das modifizierte Protein nicht erkennt, kein endogenes β -Dystroglycan an der Membran detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass das endogene β -Dystroglycan nach der Transfektion von verkürztem Dystroglycan nicht mehr an der Plasmamembran der Neuroepithelzellen konzentriert ist. Es bleibt zu klären, ob das endogene Dystroglycan durch die Überexpression des mutierten Dystroglycans aus den Endfüßen verdrängt wurde, oder ob es in seiner Expressionsrate reduziert wurde.

4.3 Morphologische Veränderungen der Neuroepithelzellen

Neuroepithelzellen weisen eine charakteristische palisadenförmige Struktur auf. Diese Morphologie hatte sich nach der Transfektion des verkürzten Dystroglycans verändert. Die Zellen hatten ihren Kontakt zur Basalmembran verloren und sich daraufhin abgerundet. Dies konnte sowohl in einer immunhistochemischen Anfärbung des Intermediärfilaments Vimentin, als auch nach Einzelzellanalyse EGFP exprimierender Zellen bei hoher Vergrößerung gezeigt werden. Wie ist diese Abrundung der Neuroepithelzellen erklärbar?

Hierzu soll zunächst ein Modell entwickelt werden, das erklärt, in welcher Weise Dystroglycan die Morphologie der Neuroepithelzellen beeinflussen könnte. Das Modell basiert zum einen darauf, dass der DAG in den Endfüßen stark konzentriert ist (Blank et al., 1997; Blank et al., 2002) und zum anderen darauf, dass der DAG in der Skelettmuskulatur eine Verbindung zwischen Zytoskelett und extrazellulärer Matrix herstellt. Ich vermute, dass der DAG mit Hilfe von Dystroglycan in der Retina – ähnlich wie in der Skelettmuskulatur die Adhäsion der Neuroepithelzellendfüsse an die Basalmembran vermittelt. Durch die Überexpression der verschiedenen Konstrukte wird diese Adhäsion der Neuroepithelzellen an die Basalmembran beeinflusst. Das verkürzte Konstrukt sorgt für eine Ablösung der Endfüsse von der Basalmembran und das nicht-spaltbare Konstrukt für eine permanente Adhäsion. Alle weiteren Veränderungen ergeben sich aus der veränderten Bindung der Endfüsse an die Extrazelluläre Matrix. Dieses Modell wird durch folgende Beobachtungen unterstützt: Nach der Überexpression von verkürztem Dystroglycan kommt es zu einer Abnahme aller untersuchten DAG-Proteine in den Endfüßen. Dies würde zu einer

Reduktion der Adhäsionskräfte bei der Interaktion von den Endfüßen führen mit dem Ergebnis, dass die Neuroepithelzellen sich abrunden.

Die wahrscheinlichste Erklärung für die Reduktion des DAG in den Endfüßen ist wieder in Parallelität zur Skelettmuskulatur die gestörte Synthese und Prozessierung des DAG auf dem Weg vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi Apparat zur Zellmembran. Mutationen die die Interaktion von Proteinen des DAG beeinflussen, sorgen für einen gestörten Zusammenbau des Komplexes im Golgi mit der Folge, dass der gesamte Komplex die Zellmembran nicht erreicht, sondern schon vorher proteolytisch degradiert wird. Die Deletion der zytoplasmatischen Domäne von Dystroglycan inhibiert die Bindung von Dystroglycan an Utrophin und damit das Assembly des gesamten Komplexes. Dies führt zur Dissoziation des DAG mit dem Effekt, dass die Adhäsion der Endfüße an die Basalmembran gestört ist. Konsistent mit diesem Modell ist die andersartige Verteilung von DAG Proteinen in Neuroepithelzellen nach der Transfektion von verkürztem Dystroglycan. Utrophin und α -Dystrobrevin waren beispielsweise nicht mehr korrekt in den Endfüßen konzentriert, sondern in einer wesentlich breiteren Verteilung in den Endfüßen der Neuroepithelzellen an der Basalmembran detektierbar. Wie bereits weiter oben erwähnt, kommt es nach der Expression des verkürzten Dystroglycans zu einer Reduktion von endogenem Dystroglycan. Auch dies könnte ein Anzeichen für die Degradation des Komplexes vor dem Erreichen der Zellmembran sein. Zusammenfassend könnte somit die Überexpression von verkürztem Dystroglycan, die Adhäsion des Endfußes an die Basalmembran beeinträchtigen und auf diese Weise eine Abrundung der Zellen fördern.

Ist die Abrundung von Neuroepithelzellen ein außergewöhnlicher Prozess oder können Zellen, wie sie von mir nach der Injektion des verkürzten Dystroglycankonstruktes beobachtet wurden, auch in nichtbehandelten Embryonen beobachtet werden? Um diese Frage zu beantworten muß kurz auf den Zellzyklus von Neuroepithelzellen eingegangen werden. Der Zellzyklus von Neuroepithelzellen durchläuft die üblichen 4 Phasen. Allerdings ist das besondere, das jede dieser Phasen mit einer ganz bestimmten Lokalisation des Zellkerns verknüpft ist. In der S-Phase ist das Soma und der Zellkern an der basalen Seite der Neuroepithelzellen lokalisiert. Dort erfolgt die Replikation (Dyer und Cepko, 2001b). In der darauffolgenden G2-Phase erfolgt die Translokation des Zellkerns von der Basalmembran zur ventrikulären Schicht (Sidman et al., 1959a; Fujita, 1964; Götz et al., 2002). Diese Bewegung wird durch die Polymerisation von Aktin-Filamenten vermittelt.

Dabei umschließt das Aktin-Zytoskelett die Mikrotubuli, die maßgeblich am Transport des Zellkerns beteiligt sind, wie ein Käfig (Sidman et al., 1959b; Misson et al., 1988; Nadarajah et al., 2001). Die Neuroepithelzellen ziehen während der folgenden Mitosephase ihren Fortsatz vollständig von der Basalmembran zurück und runden sich in der ventrikulären Schicht vor der Zellteilung ab (Hinds et al., 1971a; Hinds et al., 1971b; Seymour und Berry, 1975; Levitt et al., 1983; Misson et al., 1988; Noctor et al., 2001). Die Translokation des Zellkerns entlang des Fortsatzes und die Aufrechterhaltung der gestreckten Struktur der Neuroepithelzelle setzt eine stabile Adhäsion dieser Zelle an die Basalmembran voraus. Dies wird durch die Endfüße vermittelt. Konsistent mit der Rolle der Endfüße an der Basalmembran ist die Beobachtung, dass nach Verdau der Basalmembran, die Neuroepithelzellen ihre Struktur verkürzen (Halfter, 1998; Halfter et al., 2001; Halfter et al., 2002). In der G1-Phase übernimmt die neuentstandene postmitotische Zelle diesen Fortsatz, um von der ventrikulären Schicht in die Mantelzone unterhalb der Basalmembran zu wandern und dort zu postmitotischen Neuronen zu differenzieren (Miyata et al., 2001b) oder sie wandert direkt an dem Fortsatz der neuroepithelialen Vorläuferzelle entlang in ihr Zielgebiet unterhalb der Basalmembran (Morest et al., 1970; Hartfuss et al., 2001; Noctor et al., 2001; Miyata et al., 2001a; Miyata et al., 2001b). Nun kann der Zellzyklus von neuem beginnen. Die Morphologie der Neuroepithelzellen ist somit nicht statisch, sondern sehr flexibel. Sie wechselt bereits während des normalen Proliferationszyklus zwischen gestreckter und abgerundeter Morphologie. Somit könnte die runde Form der Neuroepithelzellen nach der Überexpression von verkürztem Dystroglycan eine Folge der Ablösung des Endfusses von der Basalmembran darstellen.

Ist der DAG der einzige Komplex, der für die Aufrechterhaltung der palisadenartigen Struktur von Neuroepithelzellen verantwortlich ist? Eine andere große Familie von Oberflächenrezeptoren, die in den Endfüßen von Neuroepithelzellen konzentriert sind, sind Integrine (Hering et al., 2000). Integrine sind Transmembranproteine, die Rezeptoren für einige Matrixproteine, wie beispielsweise Laminin darstellen. Integrine wurden auch für die Anheftung des Endfusses an die Basalmembran verantwortlich gemacht (Cann et al., 1996; Hynes, 1992; Skeith et al., 1999; Graus-Porta et al., 2001). Der Cortex von adulten Mäusen mit einer Nestin-Promotor abhängigen Cre-Lox- Deletion des Integrin-Gens weist unterschiedliche Effekte auf. Das Fehlen von Integrin verhindert in diesen Mäusen das Assembly der Basalmembran. Die fragmentierte Basalmembran und der Verlust von Integrin in diesen Endfüßen unterbindet wiederum eine Adhäsion der Endfüße radialer Gliazellen.

Eine Konsequenz ist die Verkürzung dieser Fortsätze, die im cerebralen Cortex und im Cerebellum als Leitstrukturen für die Migration postmitotischer Neurone dienen. Der fehlende Kontakt dieser Leitstrukturen zur Basalmembran ist vermutlich als eine Ursache der abnormalen Schichtung der Neurone, sowie der Bildung von Ektopia und der Fusion benachbarter Hirnhemisphären in diesen Mäusen anzusehen. Dennoch sind diese Oberflächenrezeptoren nicht in der Lage, die Ablösung des Endfusses nach der Überexpression des verkürzten Dystroglycans zu kompensieren und den Kontakt des Endfusses zur Basalmembran in Abwesenheit von Dystroglycan zu stabilisieren und wiederherzustellen. Wie läßt sich dieser Widerspruch erklären? Ein Hinweis für eine mögliche Erklärung ergibt sich aus der Beobachtung, dass die Konzentration von Integrinen an der Grenzfläche zur Basalmembran verändert ist. Die Integrine, die im Rahmen dieser Arbeit nach der Überexpression des verkürzten Dystroglycans, detektiert wurden, waren in einer wesentlich breiteren Schicht unterhalb der Basalmembran nachweisbar. Diese veränderte Verteilung der Integrine könnte die Adhäsion des Endfusses an der Basalmembran beeinträchtigen und zur Abrundung der Zellen beitragen. Möglicherweise ist die Funktion der Integrine somit von ihrer korrekten Konzentration an der Grenzfläche zwischen Plasmamembran der Neuroepithelzellen und der Basalmembran abhängig. Doch wie kommt es zu dieser veränderten Verteilung? Dystroglycan und Integrine binden an unterschiedlichen Stellen im Lamininmolekül (Sonnenberg et.al., 1990; Gee et al., 1993; Yu und Talts, 2003). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, das Dystroglycan und Integrine an dasselbe Lamininmolekül binden und dann über dieses Protein miteinander interagieren, um eine möglichst feste mechanische Bindung des Endfußes an die Basalmembran zu erreichen. Dies könnte auch bedeuten, das eine veränderte Konzentration von Dystroglycan, wie sie beispielsweise nach der Überexpression von verkürztem Dystroglycan hervorgerufen wird, einen Einfluss auf die Verteilung von Integrinen an der Plasmamembran ausübt. Zusammengefaßt führt die Dissoziation des DAG an der Plasmamembran möglicherweise zur Ablösung des Endfußes. Aufgrund der veränderten Verteilung der Integrine kann dieser Prozess nicht kompensiert werden.

Im Gegensatz zur Abrundung der Zellen nach der Transfektion des verkürzten Dystroglycans, blieb die radiäre, langgestreckte Morphologie der Neuroepithelzellen nach der Überexpression des nicht-spaltbaren Dystroglycan erhalten. Wie ist dies erklärbar? Diese Ablösung wird verhindert, weil die Verbindung zwischen Endfuss und Basalmembran irreversibel ist aufgrund der jetzt kovalenten Verknüpfung von α - und β -Dystroglycan. Der

Endfuß bleibt daher permanent an der Basalmembran adhärirt, was eine Translokation des Zellkerns zur ventrikulären Seite verhindert. Eine ganze Reihe von Ergebnissen sprechen für die Annahme, dass eine Ablösung des Endfusses der Neuroepithelzellen für die Translokation des Zellkerns zur ventrikulären Seite während des Zellzyklus notwendig ist. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass die Zellkerne transfizierter Zellen kurz unterhalb der Basalmembran verbleiben, weil der Übergang zur nächsten Phase des Zellzyklus eine Ablösung des Endfusses benötigen würde. Da diese Ablösung nicht stattfinden kann, ist der Proliferationszyklus an dieser Stelle angehalten. Dies deutet darauf hin, dass alle Neuroepithelzellen nur bis zu einem bestimmten Punkt innerhalb des Zellzyklus gelangen, den sie dann aber nicht überschreiten können, da sie fest mit ihrem Fortsatz an der Basalmembran gebunden sind. Dies weist darauf hin, dass die proteolytische Spaltung von α - und β -Dystroglycan notwendig ist, um die Assoziation von α - und β -Dystroglycan reversibel zu machen. Diese Reversibilität der Bindung ist offensichtlich entscheidend für die Loslösung des Endfußes. Für die Fortsetzung des Zellzyklus ist es demnach unbedingt erforderlich, dass die Verbindung zwischen α - und β -Dystroglycan reversibel ist. Auch der geringere Retinadurchmesser, der nach der Transfektion des nicht-spaltbaren Konstruktes festgestellt werden konnte, unterstützt diese Hypothese. Es scheint so, als würden sich die Neuroepithelzellen zusammenziehen und auf diese Weise den Durchmesser vermindern, aber trotzdem nicht von der Basalmembran loskommen.

Eine alternative Erklärung für die ausschließlich palisadenförmige Morphologie von Neuroepithelzellen nach Transfektion des nichtspaltbaren Dystroglycan Konstrukt wäre, dass durch die Spaltung von α - und β -Dystroglycan wichtige Signale für die Proliferation und die Fortsetzung des Zellzyklus in das Zellinnere der Neuroepithelzellen weitergeleitet werden und dass diese Signaltransduktion durch die permanente Assoziation der beiden Proteine inhibiert wird. Diese Signaltransduktion erfordert möglicherweise Konformationsänderungen innerhalb des Proteins oder eine Dissoziation des Proteins von der Plasmamembran. Durch die kovalente Bindung der beiden Proteine könnte dieser Vorgang erschwert sein und die Signaltransduktion gestört. Zum Beispiel ist es möglich, dass der Beginn der Translokation des Zellkerns über eine Phosphorylierung reguliert wird. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Konformationsänderung im Dystroglycanmolekül, die die Bindung an das Zytoskelett über Utrophin reguliert. Bei einer kovalenten Bindung von α - und β -Dystroglycan ist möglicherweise diese Induktion der Konformationsänderung nicht

mehr möglich, da die notwendige molekulare Flexibilität nicht mehr vorhanden ist. Somit kann das Zytoskelett nicht mehr reguliert werden, was die Wanderung des Zellkerns verhindert, der die Ablösung von Utrophin und des mit ihm verbundenen Aktin-Zytoskeletts von der Dystroglycan-Bindungsstelle erfordert. So führt beispielsweise die adhäsionsabhängige Phosphorylierung von β -Dystroglycan durch eine noch nicht identifizierte Tyrosinkinase zur Dissoziation von Utrophin von der β -Dystroglycan Bindestelle (James et al., 2000b). Das phosphorylierte Dystroglycan wird an der Membran abgebaut und in Endosomen verpackt. Dort kann es dann mit der Tyrosinkinase c-Src kolokalisiert, detektiert werden. Auf diese Weise werden möglicherweise Signale in das Zellinnere weiterleitet (Sotgia et al., 2003). Konsistent damit ist die Beobachtung von Sotgia in der Skelettmuskulatur, das Tyrosin-phosphoryliertes β -Dystroglycan nicht in der Plasmamembran, sondern hauptsächlich in einem intrazellulären Vesikel in der Nähe der Basalmembran detektiert werden kann und dort mit c-Src assoziiert ist (Sotgia et al., 2003). Es ist nicht auszuschließen, dass dieser Prozess auch bei der Proliferation von Neuroepithelzellen eine Rolle spielt und dass eine Störung dieses Mechanismus Signaltransduktionswege, die die Proliferation der Neuroepithelzellen oder die hierzu notwendige Umbildung des Aktin-Zytoskelett steuern, unterbricht. Dies würde dann zu einer Arretierung der Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklus führen und die fehlende Proliferation der Neuroepithelzellen erklären.

Im Zusammenhang mit der Transfektion von nicht-spaltbarem Dystroglycan konnte in jedem Fall erstmals gezeigt werden, dass die proteolytische Spaltung von Dystroglykan in α - und β -Dystroglycan möglicherweise für die Ablösung des Endfußes von der Basalmembran und somit für die Fortsetzung des Zellzyklus von Neuroepithelzellen erforderlich ist. Die Überexpression eines nicht-spaltbaren Dystroglycans sorgt möglicherweise für eine feste Bindung des Endfusses der Neuroepithelzellen an die Basalmembran. Diese kovalente Bindung arretiert die Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklus und erhält auf diese Weise die langgestreckte Morphologie der Neuroepithelzellen.

4.4 Einfluss von Dystroglycan auf die Proliferation von Neuroepithelzellen

Durch die Überexpression des verkürzten Dystroglycans haben die Zellen nicht nur ihre radiäre Struktur verloren, sondern gleichzeitig ist ihre Proliferations- und Differenzierungsrate dramatisch angestiegen. Durch die vermehrte Zellteilung haben sich

Verdickungen in transfizierten Retinaabschnitten gebildet. Im Gegensatz dazu zeigte die Transfektion eines nichtspaltbaren Dystroglycans eine drastische Reduktion der Anzahl proliferierender und differenzierter Zellen. Diese Veränderungen können entweder als Folgeerscheinungen einer gesteigerten bzw. geringeren Zellteilung oder als Ursache einer erhöhten bzw. verminderten Apoptose entstehen. Gegen eine Veränderung der Zellzahl durch Apoptose spricht, dass keine Zellen mit fragmentierter DNA in der Retina nach der Transfektion des nicht-spaltbaren Dystroglycans nachweisbar waren. Fragmentierte DNA würde auf eine erhöhte Apoptoserate hindeuten. Eine erhöhte Apoptose erscheint daher eher unwahrscheinlich. Wie kann trotzdem ein Einfluß von Dystroglycan auf den Zellzyklus von Neuroepithelzellen stattfinden?

Es gibt zwei mir wahrscheinlich erscheinende Möglichkeiten, wie die Proliferation von Neuroepithelzellen, nach der Überexpression von verkürztem Dystroglycan oder der nicht-spaltbaren Form, beeinflusst werden könnte. Einmal kann Dystroglycan aufgrund seiner Konzentration in den Endfüßen der Neuroepithelzellen eine mechanische Verankerung zwischen der Extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett des Endfusses gewährleisten. Die Überexpression der modifizierten Konstrukte würde dann die Anheftung des Endfusses an die Basalmembran beeinflussen. Andererseits können durch die Überexpression modifizierter Dystroglycankonstrukte auch für die Proliferation der Neuroepithelzellen entscheidende Signaltransduktionswege unterbrochen werden. Diese beiden Möglichkeiten wurden bereits als Funktion des DAG in der Skelettmuskulatur beschrieben und sollen im Folgenden für Neuroepithelzellen diskutiert werden.

Zunächst einmal soll die Möglichkeit diskutiert werden, dass Dystroglycan eine mechanische Funktion in der Adhäsion des Endfußes an die Basalmembran ausübt und dass die Beeinträchtigung dieser Anheftung den Verlauf des Zellzyklus maßgeblich verändert. Die Überexpression des verkürzten Dystroglycankonstruktes und damit eines Proteins, dessen Interaktion mit zytosolischen Proteinen des DAG unterbrochen ist, führt zur Dissoziation des DAG während der Synthese (wie weiter oben bereits diskutiert) und zur Reduktion des endogenen Dystroglycans. Eine fehlende Adhäsion der Neuroepithelzellen an die Basalmembran hat dann morphologische Veränderungen zur Folge. Der Fortsatz verkürzt sich und die Neuroepithelzellen runden sich in der ventrikulären Zone ab. Es ist möglich, dass durch diesen Vorgang die Proliferation der Zelle induziert wird. Dies könnte durch Faktoren ausgelöst werden, die ausschließlich in der ventrikulären Schicht der Retina

vorhanden sind. Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass insbesondere die Unterbrechung des Kontaktes zur Basalmembran, die Zellteilung auslöst. Kollagen IV, ein Bestandteil der Basalmembran, hemmt beispielsweise die Proliferation kortikaler Vorläuferzellen *in vitro* (Ali et al., 1998). Eine Ablösung des Endfußes von der Basalmembran wäre somit notwendig, um mit der Proliferation der Zellen zu beginnen.

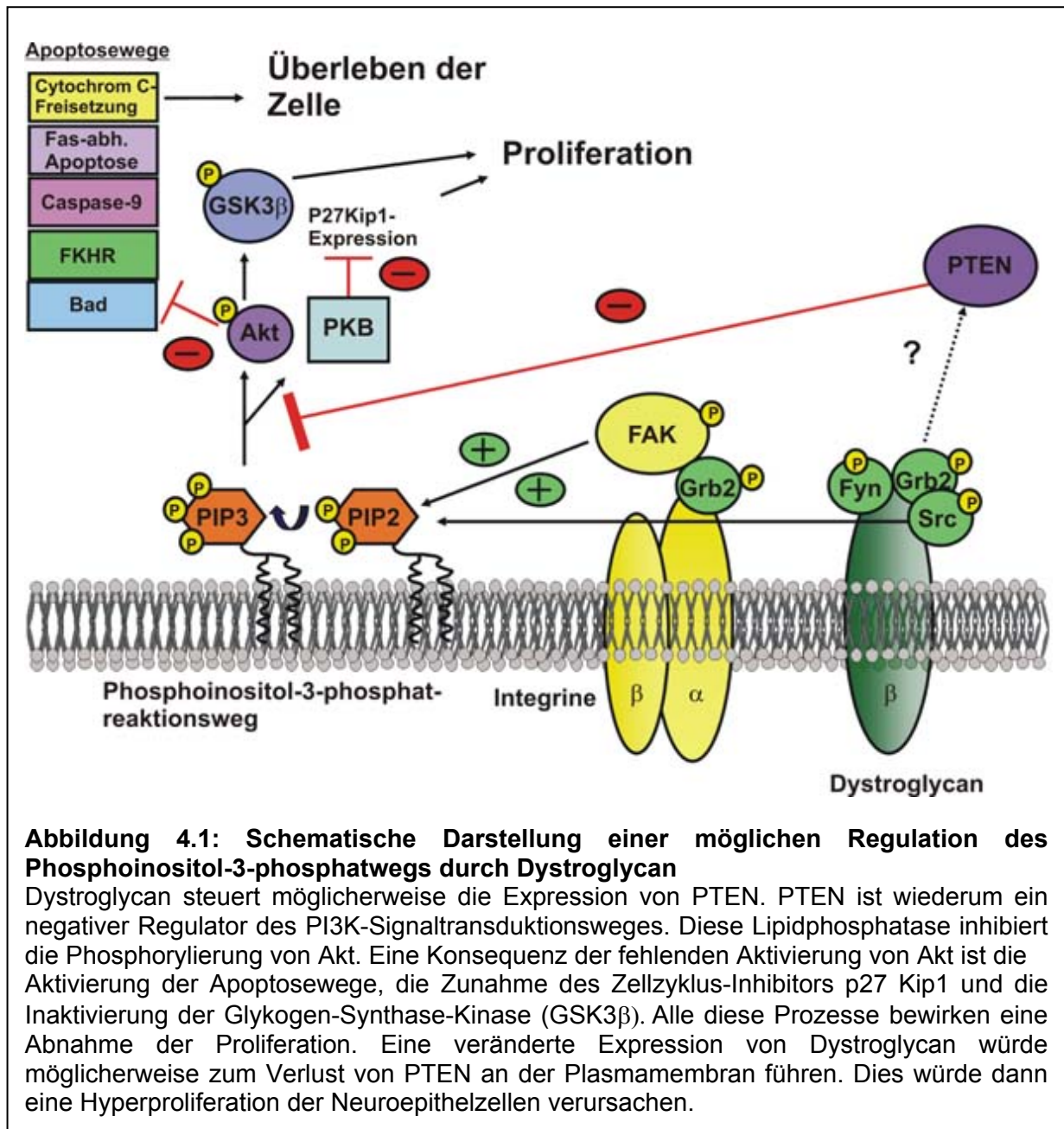
Es soll in diesem Zusammenhang jedoch auch noch ein Alternativmodell diskutiert werden. Es ist ebenfalls möglich, dass neben der Zerstörung der mechanischen Verbindung zwischen Endfuß und Basalmembran durch die Überexpression des verkürzten Konstruktes auch Signaltransduktionswege wie beispielsweise der PI3K-Weg unterbrochen werden, die die Zellproliferation steuern (McConnell und Kaznowski, 1991; James et al., 2000a; Langenbach und Rando, 2002). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, welche Faktoren generell in die Regulation des Zellzyklus involviert sind und in welchen Abschnitt der Zellzyklusregulation diese Faktoren eingreifen, um die Proliferation von Neuroepithelzellen zu steuern. Dazu soll im Folgenden zuerst die Regulation des Zellzyklus im Allgemeinen und dann speziell in Neuroepithelzellen geschildert werden. Darüber hinaus soll – als Alternative zur Hypothese, dass der DAG für die molekulare Bindung des Endfusses an die Basalmembran verantwortlich ist – dargestellt werden, dass durch die Überexpression der mutierten Dystroglycanproteine auch Signaltransduktionswege beeinflusst werden können, die wiederum einen Einfluss auf die Proliferation von Neuroepithelzellen ausüben.

Die Regulation der Zellproliferation kann an zwei verschiedenen Kontrollpunkten gesteuert werden, während der G1-Phase oder der G2-Phase (Pardee, 1989; Nurse, 1994). Die G1-Phase ist entscheidend für die Länge des Zellzyklus und ob eine Zelle in die G0-Phase eintritt und differenziert, während die G2-Phase den Fortlauf des Zellzyklus anhalten oder beschleunigen kann, um Schäden an der DNA vor einer erneuten Mitosephase beheben zu können. Der Übergang zwischen den einzelnen Phasen wird sehr präzise durch eine Familie von Proteinkinasen, die als Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) bezeichnet werden, kontrolliert. Die Assoziation von regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen, die nur zu bestimmten Zeitpunkten in bestimmten Phasen des Zellzyklus exprimiert und danach sehr schnell wieder abgebaut werden, mit den CDKs aktiviert die CDKs und die darauffolgende Phosphorylierung spezifischer Proteine initiiert die Progression von der G2 zur Mitosephase. Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen können den

Cyclin-CDK-Komplex inhibieren oder aktivieren (Nigg, 1995; Dirks und Rutka, 1997; Reed, 1997). Neben den Phosphorylierungsreaktionen regulieren auch Cyclinkinase-abhängige Inhibitoren (CDKI) die CDK Aktivität. Dazu gehören unter anderem die Inhibitoren der Cip/Kip Familie, wie zum Beispiel p27Kip1 und p57Kip2. Diese Inhibitoren verhindern den Eintritt der Zelle von der G1- in die S-Phase und somit ein Fortschreiten des Zellzyklus. Die Zellen beenden die Proliferation und beginnen mit der Differenzierung. Dieser allgemeine Regulationsmechanismus der Zellproliferation kann auch auf die Proliferation von Neuroepithelzellen angewendet werden. In der Maus wird p27Kip1 während der gesamten Retinaentwicklung insbesondere in deren proliferativen Zonen exprimiert (Levine et al., 2000; Dyer und Cepko, 2001a). Dies deutet darauf hin, dass es auch eine Rolle während der Proliferation von Neuroepithelzellen spielt. Konsistent mit dieser Idee ist die Beobachtung, dass die Deletion von p27Kip1 zu einer erhöhten Proliferationsrate der Neuroepithelzellen und zu Störungen der retinalen Schichtung führt (Nakayama et al., 1996; Dyer und Cepko, 2000; Dyer und Cepko, 2001a). In p27Kip1 „knockout“ Mäusen ist – neben vielen anderen Organen – auch das Gehirn vergrößert, da das Fehlen von p27Kip1 zu einer erhöhten Zellzahl und Zelldichte führt (Fero et al., 1996; Nakayama et al., 1996). Die ektopische Überexpression von p27Kip1 in retinalen Vorläuferzellen von *Xenopus* führt dagegen zu einer drastischen Abnahme der mitotischen Zellen (Ohnuma et al., 1999). Der Verlust von p57Kip2 in Mäusen führt in der frühen Entwicklung zu erhöhten Mitoseraten in der Retina und anderen Geweben (Zhang et al., 1997; Dyer und Cepko, 2000; Dyer und Cepko, 2001a). p27Kip1 und p57Kip2 sind somit im ZNS wichtige Regulatoren der Proliferation von Neuroepithelzellen.

Wie wird jetzt p27Kip 1 beispielweise reguliert und wie wirkt es auf die Proliferation? Die Regulation dieser Faktoren könnte über die Phosphoinosit-3-phosphatase PTEN induziert werden. Aus den Untersuchungen an PTEN^{-/-} ES Zellen geht hervor, dass es sich bei PTEN um einen negativen Regulator des Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) - Reaktionswegs handelt (Abb. 4.1; Sun, 1999). Dieser Reaktionsweg fördert insbesondere den Abbau von p27Kip1, das den Zellen einen rascheren Eintritt von der G1-Phase in die S-Phase ermöglicht und somit eine verstärkte Proliferation verursacht (Sun, 1999). Dieser Signaltransduktionsweg könnte somit entscheidend auf die Proliferation von Neuroepithelzellen im ZNS einwirken.

Wie kann Dystroglycan nun aber auf pKip und PTEN wirken und dadurch die Proliferation beeinflussen? Aufschlüsse dazu geben Arbeiten, in denen die Rolle von Dystroglycan in der Tumorzellproliferation untersucht wurde. Tumorzellen haben einen veränderten Proliferationszyklus und besitzen keine Kontakthemmung der Proliferation mehr – können also als „permanent proliferierend“ angesehen werden. Arbeiten von Muschler et al. an der kanzerogenen Tumorzelllinie T4-2, die vor einiger Zeit veröffentlicht wurden, zeigen, dass durch die Überexpression von Dystroglycan, eine gesteigerte Expression von PTEN induziert werden kann und auf diese Weise neben der Polarität der Zellen auch ihre Wachstumskontrolle wiederhergestellt wird (Muschler et al., 2002). Die Expression von PTEN erfolgt jedoch nur dann, wenn Dystroglycan eine Verbindung zur Basalmembran aufweist. Ist diese Verbindung zur Basalmembran unterbrochen, erfolgt keine Expression des Proteins und damit bleibt die Proliferation unreguliert (Muschler et al., 2002). Dies führt zu der Annahme, dass die Weitergabe von Signalen von der Basalmembran über Dystroglycan in das Zytoplasma für die Expression von PTEN notwendig ist. Die Überexpression von verkürztem Dystroglycan im Rahmen dieser Arbeit führt zur Umverteilung des DAG an der Plasmamembran der Neuroepithelzellen und zur Reduktion von endogenem Dystroglycan. Der Verlust von Dystroglycan in den Endfüßen der Neuroepithelzellen könnte somit die PTEN Expression reduzieren und auf diese Weise den Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) -Reaktionswegs verstärken. Dies würde zu einer Abnahme des Zellzyklus-Inhibitor p27Kip1, zu einer Hemmung der Apoptosereaktionswege und der verstärkten Aktivierung der Glykogen-Synthase-Kinase (GSK3 β) führen (Abb 4.1). Eine Konsequenz wäre die Hyperproliferation der Neuroepithelzellen. Im Gegensatz dazu könnte die Überexpression von nicht-spaltbarem Dystroglycan, die Expression von PTEN verstärken und auf diese Weise eine Inhibition des Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) -Reaktionswegs und der Proliferation induzieren. Die Beobachtung, dass eine verminderte Expression von Dystroglycan, wie sie nach der Überexpression der verkürzten Form, auch in dieser Arbeit auftritt, mit einem Anstieg der Proliferationsrate assoziiert ist, wird unterstützt durch Ergebnisse von Untersuchungen an Brust- und Prostatapräparaten. In diesen Experimenten wurde beobachtet, dass der Verlust von Dystroglycan an der Plasmamembran der Zellen häufig mit der Bildung von Tumoren assoziiert ist (Henry et al., 2001). Hier bewirkt also das Fehlen von Dystroglycan eine gesteigerte Proliferation und Tumorgenese. Auch der Verlust von PTEN bewirkt in Mäusen eine deutliche Vergrößerung des Gehirns, die auf eine gesteigerte Proliferation aufgrund eines schnelleren Durchschreitens des Zellzyklus zurückzuführen ist (Groszer et al., 2001). PTEN -/- ES-Zellen zeigen ebenfalls eine erhöhte



Proliferations- und Differenzierungsrate. (Sun, 1999). Der Verlust des Proteins wirkt sich somit negativ auf die Regulation der Neuroepithelzellproliferation aus. Dystroglycan könnte somit durch die Regulation von PTEN, das wiederum p27 Kip 1 über den PI3K-Weg reguliert den Proliferationszyklus der Neuroepithelzellen beeinflussen.

Doch welche intrazellulären Signalkaskaden könnten bei der Induktion der Proliferation durch Dystroglycan involviert sein? Eine verstärkte Aktivierung des PI3K-Reaktionsweges führt zur Phosphorylierung des Proteins Akt und damit auch seines Substrates, der Glykogen-Synthase-Kinase (GSK3 β), dessen Kinaseaktivität auf diese Weise inaktiviert wird. GSK3 β ist Bestandteil des β -Catenin-Degradationskomplexes, der den schnellen Abbau von β -Catenin im Cytosol durch das Proteasom gewährleistet. Der Inaktivierung von GSK-3 β folgt die reduzierte Phosphorylierung des β -Catenin-Proteins (Pap und Cooper, 1998). Nichtphosphoryliertes β -Catenin kann nicht mehr abgebaut werden und akkumuliert sowohl im Cytosol als auch im Zellkern. Dort induziert es als Coaktivator die Expression der LEF-1/TCF-Gene (Gat et al., 1999; DasGupta und Fuchs, 1999; Imbert et al., 2001). c-Myc ist beispielsweise eines der Proteine, dessen Transkription auf diese Art und Weise durch β -Catenin aktiviert werden kann. Dabei handelt es sich um einen sehr wichtigen Stimulator des Zellwachstum und der Proliferation, dessen Überexpression unkontrollierte Zellproliferation und die Entstehung von Krebszellen fördert (Hlsken und Behrens, 2000). c-Myc erhöht dabei die Transkription vieler Gene wie zum Beispiel die von Cyclin-D, das das Fortschreiten der Zelle durch den Zellzyklus begünstigt. Transgene Mäuse, die stabilisiertes β -Catenin Protein in neuralen Vorläuferzellen exprimieren, entwickeln vergrößerte Gehirne aufgrund einer gesteigerten Proliferation der Neuroepithelzellen (Chenn und Walsh, 2002). Die Inaktivierung von β -Catenin im embryonalen cerebralen Cortex und Hippocampus von Mäusen resultiert in einer reduzierten Zellproliferation (Machon et al., 2003). Die Regulation des PI3K-Reaktionsweg durch Dystroglycan könnte somit einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferation der Neuroepithelzellen ausüben. Dieser Einfluss müsste in weiteren Untersuchungen an Neuroepithelzellen charakterisiert werden.

Wie kann die reduzierte Neuroepithelzellproliferation nach der Überexpression von nicht-spaltbarem Dystroglycan erklärt werden? Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass nur ein proteolytisch gespaltenes Dystroglycan die Translokation des Zellkerns zur apikalen Seite der Retina und den Fortgang des Zellzyklus ermöglicht, weil eine Reversibilität der Interaktion zwischen α - und β -Dystroglycan notwendig ist. Diese Reversibilität ist nur bei proteolytisch prozessiertem Dystroglycan gegeben. Durch die Überexpression von nicht-spaltbarem Dystroglycan wird Dystroglycan dagegen nicht mehr in die α - und β -Untereinheit dissoziieren und damit wird der Endfuss irreversibel an der Basalmembran verankert. Dies

verhindert das Abrunden der Neuroepithelzellen und damit deren mitotische Teilung. Es wäre alternativ auch möglich, dass für die Proliferation wichtige Faktoren ausschließlich an der ventrikulären Seite der Retina vorhanden sind, die aber keinen Einfluss haben, weil das Soma der Neuroepithelzellen nie diese Schicht erreicht, sondern in der für die G2- und S-Phase typischen Lokalisation an der Basalmembran verbleibt. Zusammenfassend zeigen die erhaltenen Daten erstmals, dass eine reversible Assoziation von α - mit β -Dystroglycan für den Fortgang des Zellzyklus von entscheidender Bedeutung ist, und dass die Inhibition dieser Reversibilität die Proliferation von Neuroepithelzellen hemmt.

4.5 Einfluss von Dystroglycan auf die Differenzierung von Neuroepithelzellen

Wie ist die gesteigerte Differenzierung der Neuroepithelzellen nach der Elektroporation von verkürztem Dystroglycan und die verminderte nach der Überexpression von verkürztem Dystroglycan erklärbar? Möglicherweise beruht die Differenzierung der Neuroepithelzellen auf Faktoren, deren Funktion noch nicht im Detail beschrieben wurde. In Brustkrebsepithelzellen konnten solche Proteine, die als hAG-2 und hAG-3 bezeichnet wurden, nachgewiesen werden. Diese Proteine weisen eine ausgeprägte Homologie zu Zelldifferenzierungsfaktoren in *Xenopus* auf (Fletcher et al., 2003). Außerdem binden beide Faktoren an die extrazelluläre Domäne von Dystroglycan und werden in Brustkrebsepithelzellen verstärkt exprimiert (Fletcher et al., 2003). Es ist somit denkbar, das Dystroglycan über derartige Differenzierungsfaktoren einen Einfluss ausüben kann. Andererseits ist es auch möglich, das Dystroglycan über Pten und den PI3K-Signaltransduktionsweg Faktoren wie p27Kip1, einen Inhibitor der Zellproliferation, reguliert und somit die Differenzierung der Neuroepithelzellen entscheidend beeinflussen kann. Dystroglycan hat somit einen Einfluss auf die Differenzierung – allerdings ist nicht bekannt, ob dieser Einfluss auch in Neuroepithelzellen eine Rolle spielt.

4.6 Veränderung der Polarität in Neuroepithelzellen durch Dystroglycan

Neuroepithelzellen sind polare Zellen. Sie besitzen sowohl eine apikale wie auch eine basolaterale Domäne, die durch „adherence junctions“ und „tight junctions“ getrennt sind (Hinds et.al., 1971a; Shoukimas und Hinds, 1978; Aaku-Saraste et al., 1996). Wie kann die Überexpression des verkürzten und des nicht-spaltbaren Dystroglycans die Polarität von

Neuroepithelzellen und damit die Umverteilung apikaler und basolateraler Marker in diesen Zellen bewirken?

Dystroglycan könnte durch die Interaktion mit vielen verschiedenen Proteinen des DAG und über Signaltransduktionswege, die Anreicherung und Stabilisierung basaler und apikaler Proteine an der Plasmamembran der Neuroepithelzellen fördern und auf diese Weise Polarität in Neuroepithelzellen vermitteln. Der genaue Mechanismus, auf welche Weise Dystroglycan Polarität in diesen Zellen etabliert und die Verteilung basaler und apikaler Proteine steuert, ist jedoch noch unbekannt. Die Hypothese, dass Dystroglycan einen entscheidenden Einfluss auf die Polarität der Zellen ausübt wird jedoch durch eine Vielzahl von Arbeiten unterstützt. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Polarität der Zellen in Dystroglycan-defizienten Epithelzellen verlorenght und dieser Verlust zur Umverteilung verschiedener apikaler und basolateraler Markerproteine führt (Muschler et al., 2002). Auch in Dystroglycan-defizienten Oocyten in *Drosophila* konnte eine veränderte Verteilung apikaler Marker nachgewiesen werden (Deng et al., 2003). Die Ergebnisse zeigen, dass auch die Überexpression mutierter Dystroglycanproteine eine veränderte Verteilung apikaler und basaler Proteine hervorruft und damit zu einem Verlust der Zellpolarität innerhalb dieser Neuroepithelzellen führt. Es bleibt jedoch weiteren Untersuchungen überlassen, diesen Einfluss von Dystroglycan auf die Polarität in Neuroepithelzellen nachzuweisen und zu charakterisieren.

Eine andere Frage, die sich in diesem Zusammenhang stellte war, warum Adhäsionskomplexe wie „adherens junctions“ und „tight junctions“ in einer wesentlich breiteren Schicht nach der Überexpression des verkürzten Dystroglycans an der ventrikulären Seite der Retina detektiert werden konnten? In der Retina werden diese Adhäsionskomplexe zwischen den Fortsätzen benachbarter Neuroepithelzellen an der apikalen Seite der Zellen exprimiert. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen der apikalen Fortsätze der Neuroepithelzellen wird deutlich, dass diese Fortsätze durch die als „adherens junctions“ und „tight junctions“ bezeichneten Komplexe, miteinander verbunden sind (Hinds et.al., 1971a; Shoukimas und Hinds, 1978; Aaku-Saraste et al., 1996). Wie kommt es also zu einer breiteren Verteilung dieser Adhäsionskomplexe an der ventrikulären Seite der Retina?

Während der G2-Phase zu Beginn der Mitose wandern die Neuroepithelzellen zur ventrikulären Seite der Retina und runden sich ab, um dort zu proliferieren. Bei einer vertikalen Ausrichtung der Zellteilungsebene von basal nach apikal zu Beginn der Mitose werden die Adhäsionskomplexe gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt. Die Teilung verläuft symmetrisch (Kosodo et al., 2004). Es entstehen zwei Neuroepithelzellen. Im Gegensatz dazu zeigt sich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Zellen mit einer horizontalen Teilungsebene, dass die apikale Tochterzelle den gesamten Adhäsionskomplex erhält, während dieser in der anderen Zelle fehlt (Hinds et al., 1971a). Diese Teilung verläuft asymmetrisch und es entstehen zwei unterschiedliche Tochterzellen. Die eine Zelle erhält den vollständigen Adhäsionskomplex und wird zu einer Neuroepithelzelle (apikale Zelle) und die andere erhält den Adhäsionskomplex nicht und differenziert sich zu einem postmitotischen Neuron (basale Zelle; Kosodo et al., 2004). Die Elektroporation des verkürzten Dystroglycans führt zur Hyperproliferation dieser apikalen und basalen Zellen. Der Anstieg der Zellzahl der apikalen Zellen, erhöht die Anzahl der Neuroepithelzellen die einen Adhäsionskomplexe an der Membran exprimieren. Möglicherweise werden einige Zellen aufgrund der unnatürlich hohen Zellzahl und unter dem Druck, der im Gewebeverband entstehen kann, von der ventrikulären Seite der Retina in weiter skleral liegende Bereiche der Retina verdrängt. Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die Hyperproliferation der Zellen nach der Überexpression des verkürzten Dystroglycans auch eine Zunahme der apikalen Zellen mit Adhäsionskomplex bewirkt. Dies könnte eine Erklärungsmöglichkeit für die breite Verteilung der Adhäsionskomplexe an der ventrikulären Seite der Retina darstellen.

4.7 Fehlerhafte Schichtung postmitotischer Neurone

Wie ist die breite Verteilung postmitotischer Neurone innerhalb der Verdickungen der Retina nach der Elektroporation von verkürztem Dystroglycan erklärbar? In Retinae, die mit Wt-Dystroglycan, Leervektor oder nicht-spaltbarem Dystroglycan transfiziert worden waren, sind postmitotische Neurone in einer dünnen Schicht an der Glaskörperseite der Retina, kurz unterhalb der Basalmembran nachweisbar. Nach der Elektroporation von verkürztem Dystroglycan waren diese Neurone sowohl an der ventrikulären wie auch an der skleralen Seite in den retinalen Verdickungen detektierbar. Dies könnte ein Anzeichen für Migrationsstörungen von Neuronen entlang der Fortsätze von Neuroepithelzellen sein. Auf welche Weise kann ein verkürztes Dystroglycan derartige Migrationsstörungen hervorrufen?

Nach der Überexpression von verkürztem Dystroglycan ergibt sich eine veränderte Schichtung der differenzierten Neurone, die auch in einigen Formen von Muskeldystrophie wie FCMD, WWS und MEB beobachtet werden kann. Die schweren morphologischen Veränderungen im Gehirn dieser Patienten als Folge einer abnormalen Glykosylierung von α -Dystroglycan und der hieraus resultierenden reduzierten Bindung an seine extrazellulären Liganden, werden als Ursache der beobachteten Migrationsstörungen angesehen. Die Basalmembran der Patienten ist aufgrund der ineffizienten Glykosylierung von α -Dystroglycan sehr stark fragmentiert. An den Bruchstellen bilden sich sogenannte Ektopia. Die Zellen treten aufgrund des lokalen Verlustes der Basalmembran, die als eine Barriere wirkt, aus dem Gewebeverband aus. Eine veränderte Schichtung differenzierter Neurone, sogenannte Heterotopias sowie eine Lissencephalie vom Typ II werden ebenfalls beobachtet (Fukuyama et al., 1981; Haltia et al., 1997; Kobayashi et al., 1998; Yoshida et al., 2001; Cormand et al., 2001; Michele et al., 2002). Derartige Veränderungen können auch im Gehirn von chimären Mäusen mit einer Nestin-Promotor abhängigen Cre-Lox-Deletion von Dystroglycan nachgewiesen werden. Der Nestin-Promotor wird vorwiegend in Neuroepithelzellen exprimiert und damit auch in allen aus diesen Zellen entstehenden Neuronen und Gliazellen. Der Unterschied zu den histologischen Befunden bei kongenitalen Muskeldystrophien besteht in einer massiveren Zerstörung der Basalmembran und einem gravierenderen Phänotyp (Moore et al., 2002a). In all diesen Erkrankungen ist die Basalmembran stellenweise zerstört. In Arbeiten von Halfter et. al. konnte gezeigt werden, dass der proteolytische Verdau der Basalmembran Störungen in der neuronalen Migration verursacht (Halfter et al., 2001; Halfter et al., 2002). Dabei verhindert die zerstörte Basalmembran die Anheftung der Fortsätze von Neuroepithelzellen, die als Leitstrukturen für die Migration früher Neurone notwendig sind. Diese ziehen ihre Fortsätze zurück, runden sich ab und den Neuronen fehlt die Orientierung. Die gewebstypische Schichtung geht verloren. Dies kann auch in Integrin-defizienten Mäusen (Graus-Porta et al., 2001) wie in Nidogen-Mausmutanten beobachtet werden (Halfter et al., 2002), in denen ebenfalls poröse Basalmembranen nachgewiesen werden können. Nach der Elektroporation des verkürzten Dystroglycans war die Basalmembran jedoch noch intakt. Eine zerstörte Basalmembran kann somit nicht die Ursache der beobachteten veränderten Schichtung in der Retina sein. In Anlehnung an Untersuchungen von Halfter et al haben die Neuroepithelzellen jedoch in all diesen Erkrankungen ihren Kontakt zur Basalmembran verloren (Halfter et al., 2002). Somit wäre es denkbar, dass die Migrationsstörungen nach der Überexpression des verkürzten Dystroglycans hauptsächlich auf die Abrundung der Zellen zurückzuführen sind. Die

beobachtete breitere Schichtung der Neurone könnte somit eine Konsequenz des Verlustes der radiären Fortsätze sein, die als Leitstrukturen für die Migration früher Neurone notwendig sind. Die weite Verteilung der postmitotischen Neurone im apikalen wie auch im basalen Bereich der Retina spricht außerdem dafür, dass die Migration in einem frühen Entwicklungsstadium noch ohne Störung stattgefunden haben muß und vermutlich erst nach der Expression des verkürzten Dystroglycans beeinträchtigt worden ist, so dass noch eine Vielzahl der Neurone an der basalen Seite der Retina innerhalb der Verdickungen detektiert werden kann. Somit ist die breite Verteilung der differenzierten Neurone in der Retina möglicherweise hauptsächlich auf die morphologischen Veränderungen der Neuroepithelzellen nach der Überexpression des verkürzten Dystroglycans zurückzuführen. Die Wanderung der Neurone entlang der Fortsätze der Neuroepithelzellen in ihre Schicht, wird durch die Abrundung der Zellen verhindert. Die beobachteten Migrationsstörungen können somit mit dem Verlust der langgestreckten Fortsätze als Leitstrukturen für die Migration differenzierender Neurone erklärt werden.

4.8 Wachstumsverhalten der Axone retinaler Ganglienzellen

Nach der Überexpression von verkürztem Dystroglycan hatten die Axone von retinalen Ganglienzellen ihre Orientierung verloren. Wie kann die Überexpression von verkürztem Dystroglycan das Wachstumsverhalten dieser Axone auf so dramatische Weise beeinflussen? Eine Möglichkeit wäre, dass die Abrundung der Zellen nach der Transfektion des verkürzten Dystroglycans zur Ablösung des Neuroepithelzellendfußes von der Basalmembran führt und dass auf diese Weise die Leitstrukturen für die Orientierung der Axone retinaler Ganglienzellen verlorengehen. Die Leitstrukturen finden sich ausschliesslich auf den Endfüßen der Neuroepithelzellen. Durch die Expression von Oberflächenrezeptoren auf den Axonen retinaler Ganglienzellen, kann die Orientierung dieser Axone durch repulsive und anziehende Liganden beeinflusst werden (Stier und Schlosshauer, 1999). Wenn diese Axone in andere Bereiche der Retina gedrängt werden, verlieren sie ihre Orientierung (Stier und Schlosshauer, 1999). Konsistent mit der Hypothese, dass Orientierungsmoleküle auf den Endfüßen der Neuroepithelzellen lokalisiert sind, ist die Beobachtung, dass Axone, die in einer Umgebung ohne Endfüße wachsen, ihre Orientierung verlieren. Dies konnte nach dem proteolytischen Verdau der Basalmembran, bei dem die Endfüße der Neuroepithelzellen ihre Anheftungsstelle verlieren und sich zurückziehen, gezeigt werden (Halfter, 1998). Die Axone retinaler Ganglienzellen

verlieren unter diesen Bedingungen ihre Orientierung und wachsen – wie auch von mir nach Expression des verkürzten Konstruktes beobachtet – nicht mehr zentripetal auf den optischen Nerv zu. Die zentripetale Ausrichtung dieser Axone kann durch membranständige Liganden wie Ephrine und RGM gesteuert werden, die möglicherweise auf den Endfüssen der Neuroepithelzellen exprimiert werden und mit den Oberflächenrezeptoren des Wachstumskegels interagieren (Davis et al., 1994; Monschau et al., 1997; Drescher et al., 1997; Thanos und Mey, 2001; Monnier et al., 2002). Der Verlust der Endfüsse an der Kontaktstelle zur Basalmembran und die Abrundung der Neuroepithelzellen nach der Überexpression von verkürztem Dystroglycan ist konsistent mit dem orientierungslosen ungeordnetem Wachstum der Axone in der Retina, da die Leitstrukturen fehlen. Erstaunlicherweise war nach der Überexpression von Wt-Dystroglycan und nicht-spaltbarem Dystroglycan ein gelegentlicher Richtungswechsel einzelner transfizierter Axone aus einem Faszikel zu beobachten, obwohl die radiäre, langgestreckte Morphologie der Neuroepithelzellen hier erhalten geblieben war. In nichttransfizierten Kontrollen konnte dieser Richtungswechsel nicht beobachtet werden. Wie ist dies erklärbar?

Die Axone retinaler Ganglienzellen exprimieren unter anderem auch andere Zelladhäsionsmoleküle beispielsweise der Immunglobulin-Superfamilie wie Ng-CAM, N-CAM und Nr-CAM (neural adhesion molecules, CAM), sowie strukturell verwandte Glykoproteine wie R- und N-Cadherine und Integrine, die vorwiegend die Adhäsion der Axone untereinander vermitteln. Auf diese Weise gruppieren sich diese Axone zu Bündeln, die man als Faszikel bezeichnet (Brittis und Silver, 1994; Brittis und Silver, 1995; Brittis et al., 1996; Monnier et al., 2002) Diese Faszikelbildung kann beispielsweise durch interferierende Antikörper, die gegen diese Zelloberflächenglykoproteine wie zum Beispiel Neurofascin, G4 (neuroglial cell adhesion molecule, Ng-CAM) und F11 gerichtet sind, gestört werden (Arees und DeLong, 1977; Chang et al., 1987; Rathjen et al., 1987). Wird Dystroglycan in diesen Axonen überexprimiert, kann dies einen direkten Effekt auf die Adhäsion der Axone untereinander und an ihre Leitstrukturen ausüben. Dieser Effekt könnte eine Erklärung für die Richtungsänderung einzelner Axone nach der Überexpression von Wt-Dystroglycan und nicht-spaltbarem Dystroglycan liefern. Zusammenfassend zeigen die erhaltenen Daten, dass die Abrundung der Zellen nach der Überexpression des verkürzten Dystroglycans zu einem Verlust der Leitstrukturen der Axone retinaler Ganglienzellen führt. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass diese Axone ihre Orientierung verlieren. Bei der Elektroporation von Wt-Dystroglycan und nicht-spaltbarem Dystroglycan bleibt die radiäre Morphologie der

Neuroepithelzellen jedoch erhalten und dennoch ist die Richtungsänderung einzelner Axone feststellbar. Diese veränderte Orientierung ist jedoch eher eine direkte Konsequenz der Überexpression von Dystroglycan in diesen Axonen.

Zusammengefaßt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, das Dystroglycan die Adhäsion der Endfüße der Neuroepithelzellen an die Basalmembran vermittelt und dabei eine den Integrinen übergeordnete Funktion besitzt. Dabei gewährleistet Dystroglycan sowohl die Stabilität des DAG an der Plasmamembran, ist aber offensichtlich auch für die Regulation der Proliferation, Migration und Differenzierung der Neuroepithelzellen sowie zur Etablierung von Zellpolarität erforderlich. Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass die proteolytische Spaltung des Dystroglycanproteins für ein Fortschreiten des Zellzyklus notwendig ist. Die Abrundung der Neuroepithelzellen als Leitstrukturen für die Migration postmitotischer Neurone nach der Überexpression von verkürztem Dystroglycan ist konsistent mit der veränderten Schichtung der differenzierten Zellen sowie dem Orientierungsverlust ihrer Axone.

Die erhaltenen Ergebnisse liefern somit eine erste Evidenz für eine entscheidende Rolle Dystroglycans in der frühen ZNS – Entwicklung und möglicherweise auch eine Erklärung für den schwerwiegenden ZNS-Phänotyp der in einigen Formen von kongenitaler Muskeldystrophie wie FCMD, MEB oder WWS beobachtet werden kann.

V. Zusammenfassung

Alpha- und Beta-Dystroglycan, die zentralen Komponenten eines multimeren Dystrophin-assoziierten Proteinkomplexes wurden bislang im Wesentlichen in der Skelettmuskulatur charakterisiert. Dort stellt der DAG eine molekulare Verbindung zwischen dem Aktin-Zytoskelett der Muskelfaser und einer Basalmembran her, die die einzelne Muskelfaser umhüllt. Dystroglycan vermittelt auf diese Weise die mechanische Festigkeit der Muskelfasern während der Kontraktion. Außerdem dient der DAG als Gerüst für die Anlagerung von Proteinen. Mutationen in den strukturgebenden oder signaltransduzierenden Proteinen des DAG verursachen Muskeldystrophie. Besonders schwere Muskeldystrophien werden durch Mutationen hervorgerufen, die eine veränderte Glykosylierung von Dystroglycan und damit eine verminderte Bindung von α -Dystroglycan an Matrixproteine verursachen. Dies führt zu einer Beeinträchtigung der Basalmembranbiosynthese sowie sich daraus ergebende Störungen in der Migration, Schichtung und Differenzierung von Nervenzellen im ZNS. Welche Rolle Dystroglycan im sich entwickelnden ZNS spielt, sollte in dieser Arbeit an der Hühnerretina untersucht werden. Durch Anwendung der *in ovo* Elektroporation wurden zwei modifizierte Dystroglycankonstrukte in Neuroepithelzellen transfiziert. Die Überexpression eines verkürzten Dystroglycanproteins, verursachte eine Abrundung der Neuroepithelzellen. Dies führte zur Hyperproliferation der Zellen deren Folge die Bildung von Verdickungen in der Retina war sowie eine verstärkte Bildung postmitotischer Neurone. Die Elektroporation eines nicht-spaltbaren Dystroglycans, führte im Gegensatz dazu zu einer Abnahme der Anzahl proliferierender und differenzierender Nervenzellen. Als Konsequenz veränderte sich die Orientierung der Axone von retinalen Ganglienzellen. Nach der Überexpression des verkürzten Dystroglycans verloren die Axone ihre zentripetale Orientierung auf den optischen Nerv, während die Elektroporation von Wt-Dystroglycan und nichtspaltbarem Dystroglycan nur ein gelegentlichen Richtungswechsel der Axone verursachte.

Die Daten zeigen, dass Dystroglycan einen entscheidenden Einfluß auf die Proliferation, Differenzierung und Polarität der Neuroepithelzellen ausübt. Dies geschieht vermutlich durch die Vermittlung der Adhäsion des Endfußes von Neuroepithelzellen an die Basalmembran. Die Veränderungen nach der Überexpression der modifizierten Dystroglycankonstrukte liefern möglicherweise eine Erklärung für den ZNS-Phänotyp der sich bei verschiedenen Formen von Muskeldystrophie zeigt.

VI. Literaturverzeichnis

Aaku-Saraste, E., A. Hellwig, and W. B. Huttner. 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.

Agius, E., Y. Sagot, A. M. Duprat, and P. Cochard. 1996. Antibodies directed against the β 1-integrin subunit and peptides containing the IKVAV sequence of laminin perturb neurite outgrowth of peripheral neurons on immature spinal cord substrata. *J. Neurosci.* 71:773-786.

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

Ali, S. A., I. S. Pappas, and J. G. Parnavelas. 1998. Collagen type IV promotes the differentiation of neuronal progenitors and inhibits astroglial differentiation in cortical cell cultures. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 110:31-38.

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

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

Arees, E. A. and G. R. DeLong. 1977. Temporary contacts formed between developing optic fibers in the chick. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 37:211-216.

Beltran-Valero, D. B., S. Currier, A. Steinbrecher, J. Celli, E. Van Beusekom, Z. B. Van Der, H. Kayserili, L. Merlini, D. Chitayat, W. B. Dobyns, B. Cormand, A. E. Lehesjoki, J. Cruces, T. Voit, C. A. Walsh, H. Van Bokhoven, and H. G. Brunner. 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.

Bewick, G. S., L. V. B. Nicholson, C. Young, E. O'Donnell, and C. R. Slater. 1992. Different distributions of dystrophin and related proteins at nerve-muscle junctions. *Neuroreport* 3:857-860.

Bewick, G. S., L. V. B. Nicholson, C. Young, and C. R. Slater. 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 S. Kröger. 2000. The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends Neurosci.* 23:92-99.

- Blake, D. J., R. Nawrotzki, N. Y. Loh, D. C. Gorecki, and K. E. Davies. 1998.** beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:241-246.
- Blake, D. J., R. Nawrotzki, M. F. Peters, S. C. Froehner, and K. E. Davies. 1996a.** Isoform diversity of dystrobrevin, the murine 87-kDa postsynaptic protein. *J. Biol. Chem.* 271:7802-7810.
- Blake, D. J., J. M. Tinsley, and K. E. Davies. 1996b.** Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol.* 6:37-47.
- Blake, D. J., J. M. Tinsley, K. E. Davies, A. E. Knight, S. J. Winder, and J. Kendrick-Jones. 1995.** Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. [Review] [32 refs]. *Trends in Biochemical Sciences* 20:133-135.
- Blank, M., D. J. Blake, and S. Kröger. 2002.** Molecular diversity of the dystrophin-like protein complex in the developing and adult avian retina. *Neuroscience* 111:259-273.
- Blank, M., P. Koulen, and S. Kröger. 1997.** Subcellular concentration of β -dystroglycan in photoreceptors and glial cells of the chick retina. *J. Comp. Neurol.* 389:668-678.
- Bradford, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bredt, D. S. 1999.** Knocking signalling out of the dystrophin complex. *Nat. Cell Biol.* 1:E89-E91.
- Brenman, J. E., D. S. Chao, H. Xia, K. Aldape, and D. S. Bredt. 1995.** Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82:743-752.
- Brittis, P. A. and J. Silver. 1994.** Exogenous glycosaminoglycans induce complete inversion of retinal ganglion cell bodies and their axons within the retinal neuroepithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7539-7542.
- Brittis, P. A. and J. Silver. 1995.** Multiple factors govern intraretinal axon guidance: a time-lapse study. *Mol. Cell Biol.* 6:413-432.
- Brittis, P. A., J. Silver, F. S. Walsh, and P. Doherty. 1996.** Fibroblast growth-factor receptor function is required for the orderly projection of ganglion-cell axons in the developing mammalian retina. *Mol. Cell. Neurosci.* 8:120-128.
- Brockington, M., Y. Yuva, P. Prandini, S. C. Brown, S. Torelli, M. A. Benson, R. Herrmann, L. V. B. Anderson, R. Bashir, J. M. Burgunder, S. Fallet, N. Romero,**

- M. Fardeau, V. Straub, G. Storey, C. Pollitt, I. Richard, C. A. Sewry, K. Bushby, T. Voit, D. J. Blake, and F. Muntoni. 2001.** 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.
- Brown, W. R., S. J. Hubbard, S. J. Tickle, and S. A. Wilson. 2003.** The chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function. *Nature Rev. Genet.* 4:87-98.
- 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.
- Campbell, K. P. 1995.** Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80:675-679.
- Cann, G. M., A. D. Bradshaw, D. B. Gervin, A. W. Hunter, and D. O. Clegg. 1996.** Widespread expression of $\beta 1$ 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., T. Takahashi, and R. S. Nowakowski. 1995.** Numbers, time and neocortical neuronogenesis: A general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci.* 18:379-383.
- Chan, Y., C. Bonnemann, and L. M. Kunkel. 1998.** Molecular organization of the sarcoglycan complex in cultures mouse muscle cells. *Mol. Biol. Cell* 9:1216.
- Chang, S., F. G. Rathjen, and J. A. Raper. 1987.** Extension of neurites on axons is impaired by antibodies against specific neural cell surface glycoproteins. *J. Cell Biol.* 104:355-362.
- Chenn, A. and S. K. McConnell. 1995.** Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82:631-641.
- Chenn, A. and C. A. Walsh. 2002.** Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* 297:365-369.
- Cormand, B., H. Pihko, M. Bayes, L. Valanne, P. Santavuori, B. Talim, R. Gershoni-Baruch, A. Ahmad, H. Van Bokhoven, H. G. Brunner, T. Voit, H. Topaloglu, W. B. Dobyns, and A. E. Lehesjoki. 2001.** Clinical and genetic distinction between Walker-Warburg syndrome and muscle-eye-brain disease. *Neurology* 56:1059-1069.
- Costell, M., E. Gustafsson, A. Aszodi, M. Morgelin, W. Bloch, E. Hunziker, K. Addicks, R. Timpl, and R. Fassler. 1999.** Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J. Cell Biol.* 147:1109-1122.

- Cox, G. A., S. F. Phelps, V. M. Chapman, and J. S. Chamberlain. 1993.** New *mdx* mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin. *Nature Genetics* 4:87-93.
- D'Souza, V. N., T. M. Nguyen, G. E. Morris, W. Karges, D. M. Pillers, and P. N. Ray. 1995.** A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum. Mol. Gen.* 4:837-842.
- DasGupta, R. and E. Fuchs. 1999.** Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Dev.* 126:4557-4568.
- Davis, S., N. W. Gale, T. H. Aldrich, P. C. Maisonpierre, V. Lhotak, T. Pawson, M. Goldfarb, and G. D. Yancopoulos. 1994.** Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* 266:816-819.
- Deng, W. M., M. Schneider, R. Frock, C. Castillejo-Lopez, S. Baumgartner, and H. Ruohola-Baker. 2003.** Dystroglycan is required for polarizing the epithelial cells and the oocyte in *Drosophila*. *Dev.* 130:173-184.
- Dirks, P. B. and J. T. Rutka. 1997.** Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle- a review. *Neurosurgery* 40:1000-1015.
- Drenckhahn, D., M. Holbach, W. Ness, F. Schmitz, and L. V. B. Anderson. 1996.** Dystrophin and the dystrophin-associated glycoprotein, β -dystroglycan, co-localize in photoreceptor synaptic complexes of the human retina. *Neurosci.* 73:605-612.
- Drescher, U., F. Bonhoeffer, and B. K. Muller. 1997.** The Eph family in retinal axon guidance. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7:75-80.
- Durbeej, M., J. F. Talts, M. D. Henry, P. D. Yurchenco, K. P. Campbell, and P. Ekblom. 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 C. L. Cepko. 2000.** p57(Kip2) regulates progenitor cell proliferation and amacrine interneuron development in the mouse retina. *Dev.* 127:3593-3605.
- Dyer, M. A. and C. L. Cepko. 2001a.** p27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations. *J. Neurosci.* 21:4259-4271.
- Dyer, M. A. and C. L. Cepko. 2001b.** Regulating proliferation during retinal development. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:333-342.
- Ervasti, J. M. and K. P. Campbell. 1993.** A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.* 122:809-823.

- Ervasti, J. M., K. Ohlendieck, S. D. Kahl, M. G. Gaver, and K. P. Campbell. 1990.** Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 345:315-319.
- Esapa, C. T., M. A. Benson, J. E. Schröder, E. Martin-Rendon, M. Brockington, S. C. Brown, F. Muntoni, S. Kröger, and D. J. Blake. 2002.** Functional requirements for fukutin-related protein in the Golgi apparatus. *Hum. Mol. Genet.* 11:3319-3331.
- Esapa, C. T., G. R. B. Bentham, J. E. Schröder, S. Kröger, and D. J. Blake. 2003.** The effects of post-translational processing on dystroglycan synthesis and trafficking. *FEBS Lett.* 555:209-216.
- Fanning, A. S., B. J. Jameson, L. A. Jesaitis, and J. M. Anderson. 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., M. Rivkin, M. Tasch, P. Porter, C. E. Carow, E. Firpo, K. Polyak, L. H. Tsai, V. Broudy, R. M. Perlmutter, K. Kaushansky, and J. M. Roberts. 1996.** A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85:733-744.
- Fishell, G. and A. R. Kriegstein. 2003.** Neurons from radial glia: the consequences of asymmetric inheritance. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13:34-41.
- Fleming, T. P., T. Papenbrock, I. Fesenko, P. Hausen, and B. Sheth. 2000.** Assembly of tight junctions during early vertebrate development. *Seminars in Cell & Dev. Biol.* 11:291-299.
- Fletcher, G. C., S. Patel, K. Tyson, P. J. Adam, M. Schenker, J. A. Loader, L. Daviet, P. Legrain, R. Parekh, A. L. Harris, and J. A. Terrett. 2003.** hAG-2 and hAG-3, human homologues of genes involved in differentiation, are associated with oestrogen receptor- positive breast tumours and interact with metastasis gene C4.4a and dystroglycan. *Brit. J. Cancer* 88:579-585.
- Fujita, S. 1964.** Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.* 122:311-328.
- Fukuda, K., N. Sakamoto, T. Narita, K. Saitoh, T. Kameda, H. Iba, and S. Yasugi. 2000.** Application of efficient and specific gene transfer systems and organ culture techniques for the elucidation of mechanisms of epithelial-mesenchymal interaction in the developing gut. *Development Growth & Differentiation* 42:207-211.
- Fukuyama, Y., M. Osawa, and H. Suzuki. 1981.** Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama t. *Brain Dev.* 3:1-29.

Funahashi, J., T. Okafuji, H. Ohuchi, S. Noji, H. Tanaka, and H. Nakamura. 1999. Role of Pax-5 in the regulation of a mid-hindbrain organizer's activity. *Dev. Growth Diff.* 41:59-72.

Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1993. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123:1777-1788.

Gänzler-Odenthal, S. I. I. and C. Redies. 1998. Blocking N-Cadherin function disrupts the epithelial structure of differentiating neural tissue in the embryonic chicken brain. *Neurosci.* 18:5415-5425.

Gat, U., R. DasGupta, L. Degenstein, and E. Fuchs. 1999. *De novo* hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated β -catenin in skin. *Cell* 95:605-614.

Gee, S. H., R. W. Blacher, P. J. Douville, P. R. Provost, P. D. Yurchenco, and S. Carbonetto. 1993. Laminin-binding protein 120 from brain is closely related to the dystrophin-associated glycoprotein, dystroglycan, and binds with high affinity to the major heparin binding domain of laminin. *J. Biol. Chem.* 268:14972-14980.

Götz, M., E. Hartfuss, and P. Malatesta. 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.

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

Groszer, M., R. Erickson, D. D. Scripture-Adams, R. Lesche, A. Trumpp, and J. A. Zack. 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., S. C. Dong, M. Balasubramani, and M. E. Bier. 2001. Temporary disruption of the retinal basal lamina and its effect on retinal histogenesis. *Dev. Biol.* 238:79-96.

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

- Haltia, M., I. Leivo, H. Somer, H. Pihko, A. Paetau, T. Kivela, A. Tarkkanen, F. Tome, E. Engvall, and P. Santavuori. 1997.** Muscle-eye-brain disease: A neuropathological study. *Ann. Neurol.* 41:173-180.
- Hamburger, V. and H. L. Hamilton. 1951.** A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88:48-92.
- Hartfuss, E., R. Galli, N. Heins, and M. Götz. 2001.** Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev. Biol.* 229:15-30.
- Heid, H. W., I. Moll, and W. W. Franke. 1988.** Patterns of expression of trichocytic and epithelial cyokeratins in mammalian tissues. I. Human and bovine hair follicles. *Differentiation* 37:137-157.
- Henion, T. R., Q. Qu, and F. I. Smith. 2003.** Expression of dystroglycan, fukutin and POMGnT1 during mouse cerebellar development (vol 112, pg 177, 2003). *Molecular Brain Research* 114:177-178.
- Henry, M. D. and K. P. Campbell. 1998.** A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell* 95:859-870.
- Henry, M. D., M. B. Cohen, and K. P. Campbell. 2001.** Reduced expression of dystroglycan in breast and prostate cancer. *Human Pathology* 32:791-795.
- Hering, H., P. Koulen, and S. Kröger. 2000.** Distribution of the integrin β 1 subunit on radial cells in the embryonic and adult avian retina. *J. Comp. Neurol.* 424:153-164.
- Hinds et.al. 1971a.** Cell proliferation in the neural tube: an electron microscopic and Golgi analysis in the mouse cerebral vesicle. *Z. Zellforsch.* 115:226-264.
- Hinds et.al. 1971b.** 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 J. Behrens. 2000.** The Wnt signalling pathway. *J. Cell. Sci.* 113:3545-3546.
- Hohenester, E., D. Tisi, J. F. Talts, and R. Timpl. 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., R. H. Crosbie, D. P. Venzke, and K. P. Campbell. 2000.** Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide. *FEBS Lett.* 468:79-83.
- Holt, K. H., L. E. Lim, V. Straub, D. P. Venzke, F. Duclos, R. D. Anderson, B. L. Davidson, and K. P. Campbell. 1998.** Functional rescue of the sarcoglycan complex in the BIO 14.6 hamster using delta-sarcoglycan gene transfer. *Mol. Cell* 1:841-848.

Horio, Y., H. Hibino, A. Inanobe, M. Yamada, M. Ishii, Y. Tada, E. Satoh, Y. Hata, Y. Takai, and Y. Kurachi. 1997. Clustering and enhanced activity of an inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, by an anchoring protein, PSD-95/SAP90. *J. Biol. Chem.* 272:12885-12888.

Huang, X., F. Poy, R. G. Zhang, A. Joachimiak, M. Sudol, and M. J. Eck. 2000. Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nature Structural Biology* 7:634-638.

Hynes, R. O. 1992. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.

Iba, H. 2000. Gene transfer into chicken embryos by retrovirus vectors. *Dev. Growth Diff.* 42:213-218.

Ibraghimov-Beskrovnaya, O., J. M. Ervasti, C. J. Leveille, C. A. Slaughter, S. W. Sernett, and K. P. Campbell. 1992. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355:696-702.

Ibraghimov-Beskrovnaya, O., A. Milatovich, T. Ozcelik, B. Yang, K. Koepnick, U. Francke, and K. P. Campbell. 1993. Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum. Mol. Gen.* 2:1651-1657.

Imbert, A., R. Eelkeman, S. Jordan, H. Feiner, and P. Cowin. 2001. Delta N89 β -catenin induces precocious development, differentiation, and neoplasia in mammary gland. *J. Cell Biol.* 153:555-568.

Inoue, T. and R. Krumlauf. 2001. An impulse to the brain - using in vivo electroporation. *Nature Neurosci.* 4:1156-1158.

International Chicken Genome Sequencing Consortium. 2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432:695-716.

Ishii, M., Y. Horio, Y. Tada, A. Hibino, M. Ito, M. Yamada, T. Gotow, Y. Uchiyama, and Y. Kurachi. 1997. Expression and clustered distribution of an inwardly rectifying potassium channel, K_{ab-2} /Kir4.1, on mammalian retinal Müller cell membranes: their regulation by insulin and laminin signals. *J. Neurosci.* 17:7725-7735.

Ishiura, S., K. Arahata, T. Tsukahara, R. Koga, H. Anraku, M. Yamaguchi, T. Kikuchi, I. Nonaka, and H. Sugita. 1990. Antibody against the C-terminal portion of dystrophin crossreacts with the 400 kDa protein in the pia mater of dystrophin-deficient mdx mouse brain. *J. Biochem.* 107:510-513.

James, M., A. Nuttall, J. L. Ilsley, K. Ottersbach, J. M. Tinsley, M. Sudol, and S. J. Winder. 2000b. Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan regulates its interaction with utrophin. *J. Cell Sci.* 113:1717-1726.

James, M., A. Nuttall, J. L. Ilsley, K. Ottersbach, J. M. Tinsley, M. Sudol, and S. J. Winder. 2000a. 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.

Jayasinha, V., K. Hoyte, B. Xia, and P. T. Martin. 2003a. Overexpression of the CT GalNAc transferase inhibits muscular dystrophy in a cleavage-resistant dystroglycan mutant mouse. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 302:831-836.

Jayasinha, V., H. H. Nguyen, B. Xia, A. Kammesheidt, K. Hoyte, and P. T. Martin. 2003b. Inhibition of dystroglycan cleavage causes muscular dystrophy in transgenic mice. *Neuromusc. Dis.* 13:365-375.

Jurado, L. A. P., A. Coloma, and J. Cruces. 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 et.al. 1998. Visualization of mitotic radial glia lineage cells in the developing rat brain by Cdc2 kinase-phosphorylated vimentin. *Glia* 23:191-199.

Kanagawa, M., F. Saito, S. Kunz, T. Yoshida-Moriguchi, R. Barresi, Y. M. Kobayashi, J. Muschler, J. P. Dumanski, D. E. Michele, M. B. A. Oldstone, and K. P. Campbell. 2004. Molecular recognition by LARGE is essential for expression of functional dystroglycan. *Cell* 117:953-964.

Khurana, T. S., S. C. Watkins, and L. M. Kunkel. 1992. The subcellular distribution of chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in the brain. *J. Cell Biol.* 119:357-366.

Kobayashi, K., Y. Nakahori, M. Miyake, K. Matsumura, E. Kondo-Iida, Y. Nomura, M. Segawa, M. Yoshioka, K. Saito, K. Osawa, K. Hamano, Y. Sakakihara, I. Nonaka, Y. Nakagome, I. Kanazawa, Y. Nakamura, K. Tokunaga, and T. Toda. 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.

Kosodo, Y., K. Röper, W. Haubensak, A. M. Marzesco, D. Corbeil, and W. B. Huttner. 2004. Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *EMBO J.* 23:2314-2324.

- Koulen, P., M. Blank, and S. Kroger. 1998.** Differential distribution of beta-dystroglycan in rabbit and rat retina. *J. Neurosci. Res.* 51:735-747.
- Kröger, S. and S. Mann. 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 L. Niehörster. 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 U. Schwarz. 1990.** The avian tectobulbar tract: development, explant culture, and effects of antibodies on the pattern of neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 10:3118-3134.
- Kuhn, T. B., E. T. Stoeckli, M. A. Condrau, F. G. Rathjen, and P. Sonderegger. 1991.** Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J. Cell Biol.* 115:1113-1126.
- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Langenbach, K. J. and T. A. Rando. 2002.** Inhibition of dystroglycan binding to laminin disrupts the PI3K/AKT pathway and survival signaling in muscle cells. *Muscle & Nerve* 26:644-653.
- Layer, P. G., S. Rommel, H. Bülthoff, and R. Hengstenberg. 1988.** Independent spatial waves of biochemical differentiation along the surface of chicken brain as revealed by the sequential expression of acetylcholinesterase. *Cell Tiss. Res.* 251:587-595.
- Lederfein, D., Z. Levy, N. Augier, D. Mornet, G. Morris, O. Fuchs, D. Yaffe, and U. Nudel. 1992.** A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5346-5350.
- Lever, S. M., M. Yamagata, and J. R. Sanes. 1996.** Gene transfer using replication-defective retroviral and adenoviral vectors. *Methods Cell Biol.* 51:161-184.
- Levine, E. M., J. Close, M. Fero, A. Ostrovsky, and T. A. Reh. 2000.** p27Kip1 regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina. *Dev. Biol.* 219:299-314.
- Levitt, P., M. L. Cooper, and P. Rakic. 1983.** Early divergence and changing proportions of neuronal and glial precursor cells in the primate cerebral ventricular zone. *Dev. Biol.* 96:472-484.
- Lidov, H. G., S. Selig, and L. M. Kunkel. 1995.** Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum. Mol. Gen.* 4:329-335.

- Lim, L. E. and K. P. Campbell. 1998.** The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr. Opin. Neurol.* 11:443-452.
- Love, D. R., D. F. Hill, G. Dickson, N. K. Spurr, B. C. Byth, R. F. Marsden, F. S. Walsh, Y. H. Edwards, and K. E. Davies. 1989.** An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 339:55-58.
- Machon, O., C. J. van den Bout, M. Backman, R. Kemler, and S. Krauss. 2003.** Role of β -Catenin in the developing cortical and hippocampal neuroepithelium. *Neurosci.* 122:129-143.
- Malatesta, P., M. A. Hack, E. Hartfuss, H. Kettenmann, W. Klinkert, F. Kirchhoff, and M. Götz. 2003.** Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37:751-764.
- Matsumura, K., H. Yamada, T. Shimizu, and K. P. Campbell. 1993.** Differential expression of dystrophin, utrophin and dystrophin-associated proteins in peripheral nerve. *FEBS Lett.* 334:281-285.
- McConnell, S. K. and C. E. Kaznowski. 1991.** Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science* 254:282-285.
- Michele, D. E., R. Barresi, M. Kanagawa, F. Saito, R. D. Cohn, J. S. Satz, J. Dollar, I. Nishino, R. I. Kelley, H. Somer, V. Straub, K. D. Mathews, S. A. Moore, and K. P. Campbell. 2002.** Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 418:417-422.
- Michele, D. E. and K. P. Campbell. 2003.** Dystrophin-glycoprotein complex: Post-translational processing and dystroglycan function. *J. Biol. Chem.* 278:15457-15460.
- Misson et.al. 1988.** Mitotic cycling of radial glia cells of the fetal murine cerebral wall: a combined autoradiographic and immunohistochemical study. *Brain Research* 466:183-190.
- Miyata, T., A. Kawaguchi, H. Okano, and M. Ogawa. 2001a.** Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31:727-741.
- Miyata, T., A. Kawaguchi, H. Okano, and M. Ogawa. 2001b.** Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31:727-741.
- Momose, T., A. Tonegawa, J. Takeuchi, H. Ogawa, K. Umesono, and K. Yasuda. 1999.** Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Development Growth & Differentiation* 41:335-344.
- Monnier, P. P., A. Sierra, P. Macchi, L. Deitinghoff, J. S. Andersen, M. Mann, M. Flad, M. R. Hornberger, B. Stahl, F. Bonhoeffer, and B. K. Müller. 2002.** RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons. *Nature* 419:392-395.

- Monschau, B., C. Kremoser, K. Ohta, H. Tanaka, T. Kaneko, T. Yamada, C. Handwerker, M. R. Hornberger, J. Löschinger, E. B. Pasquale, D. A. Siever, M. F. Verderame, B. K. Muller, F. Bonhoeffer, and U. Drescher. 1997.** Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *EMBO J.* 16:1258-1267.
- Montanaro, F. and S. Carbonetto. 2003.** Targeting dystroglycan in the brain. *Neuron* 37:193-196.
- Montanaro, F., M. Lindenbaum, and S. Carbonetto. 1999.** alpha-Dystroglycan is a laminin receptor involved in extracellular matrix assembly on myotubes and muscle cell viability. *J. Cell Biol.* 145:1325-1340.
- Moore, S. A., F. Saito, J. G. Chen, D. E. Michele, M. D. Henry, A. Messing, R. D. Cohn, S. E. Ross-Barta, S. Westra, R. A. Williamson, T. HOSHI, and K. P. Campbell. 2002a.** Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature* 418:422-425.
- Moore, S. A., F. Saito, M. D. Henry, A. Messing, P. A. Low, L. Wrabetz, L. Feltri, and K. P. Campbell. 2002b.** Peripheral neuropathy with folded myelin sheaths in mice lacking Schwann cell dystroglycan. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61:174.
- Morest et.al. 1970.** A study of neurogenesis in the forebrain of the opossum pouch young. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 130:265-305.
- Müller, H. A. J. 2003.** Molecular networks controlling epithelial cell polarity in development. *Mech. Dev.* 120:1231-1256.
- Muntoni, F., M. Brockington, D. J. Blake, S. Torelli, and S. C. Brown. 2002.** Defective glycosylation in muscular dystrophy. *Lancet* 360:1419-1421.
- Muntoni, F. and T. Voit. 2004.** The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. *Neuromuscular Disorders* 14:635-649.
- Muramatsu, T., Y. Mizutani, Y. Ohmori, and J. Okumura. 1997.** Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos *in ovo*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 230:376-380.
- Muramatsu, T., Y. Mizutani, and J. Okumura. 1996.** Live detection of the firefly luciferase gene expression by bioluminescence in incubating chicken embryos. *Ann. Sci. Technol.* 67:906-909.
- Muschler, J., D. Levy, R. Boudreau, M. Henry, K. Campbell, and M. J. Bissell. 2002.** A role for dystroglycan in epithelial polarization: Loss of function in breast tumor cells. *Cancer Research* 62:7102-7109.

Nadarajah, B., J. E. Brunstrom, J. Grutzendler, R. O. L. Wong, and A. L. Pearlman. 2001. Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nature Neurosci.* 4:143-150.

Nakamura, H. and J. Funahashi. 2001. Introduction of DNA into chick embryos by *in ovo* electroporation. *Methods* 24:43-48.

Nakayama, K., N. Ishida, M. Shirane, A. Inomata, T. Inoue, N. Shishido, I. Horii, D. Y. Loh, and K. Nakayama. 1996. Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85:707-720.

Nigg, E. A. 1995. Cyclin dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17:471-480.

Niwa, H. Y. K. and J. Miyazaki. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108:193-199.

Noctor et.al. 2001. Neurons derived from radial glia cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409:714-720.

Noguchi, S., E. Wakabayashi, M. Imamura, M. Yoshida, and E. Ozawa. 2000. Formation of sarcoglycan complex with differentiation in cultured myocytes. *Eur. J. Biochem.* 267:640-648.

Nurse, P. 1994. Ordering phase and phase in the cell cycle. *Cell* 79:547-550.

Ohnuma, S., A. Philpott, K. Wang, C. E. Holt, and W. A. Harris. 1999. p27^{Xic1}, a Cdk inhibitor promotes the determination of glia cells in *Xenopus* retina. *Cell* 99:499-510.

Pap, M. and G. M. Cooper. 1998. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.* 273:19929-19932.

Pardee, A. B. 1989. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246:603-608.

Parnavelas, J. G. and B. Nadarajah. 2001. Radial glial cells. are they really glia? *Neuron* 31:881-884.

Peters, M. F., H. M. Sadoulet-Puccio, R. M. Grady, N. R. Kramarcy, L. M. Kunkel, J. R. Sanes, R. Sealock, and S. C. Froehner. 1998. Differential membrane localization and intermolecular associations of alpha-dystrobrevin isoforms in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 142:1269-1278.

Randall, W. R., K. W. Tsim, J. Lai, and E. A. Barnard. 1987. Monoclonal antibodies against chicken brain acetylcholinesterase. Their use in

immunopurification and immunochemistry to demonstrate allelic variants of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 164:95-102.

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.

Rathjen, F. G., J. M. Wolff, S. Chang, F. Bonhoeffer, and J. A. Raper. 1987. Neurofascin: a novel chick cell-surface glycoprotein involved in neurite-neurite interactions. *Cell* 51:841-849.

Reed, S. I. 1997. Control of the G1/S transition. *Cancer Surveys* 29:7-23.

Roberds, S. L., J. M. Ervasti, R. D. Anderson, K. Ohlendieck, S. D. Kahl, D. Zoloto, and K. P. Campbell. 1993. Disruption of the dystrophin-glycoprotein complex in the cardiomyopathic hamster. *J. Biol. Chem.* 268:11496-11499.

Russo, K., E. Di Stasio, G. Macchia, G. Rosa, A. Brancaccio, and T. C. Petrucci. 2000. Characterization of the beta-dystroglycan-growth factor receptor 2 (Grb2) interaction. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 274:93-98.

Rybakova, I. N., K. J. Amann, and J. M. Ervasti. 1996. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J. Cell Biol.* 135:661-672.

Rybakova, I. N., J. R. Patel, and J. M. Ervasti. 2000. The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J. Cell Biol.* 150:1209-1214.

Saito, F., S. A. Moore, R. Barresi, M. D. Henry, A. Messing, S. E. Ross-Barta, R. D. Cohn, R. A. Williamson, K. A. Sluka, D. L. Sherman, P. J. Brophy, J. D. Schmelzer, P. A. Low, L. Wrabetz, M. L. Feltri, and K. P. Campbell. 2003. Unique role of dystroglycan in peripheral nerve myelination, nodal structure, and sodium channel stabilization. *Neuron* 38:747-758.

Sauer, F. C. 1935. Mitosis in the neural tube. *Comp. Neurol.* 62:377-405.

Sciandra, F., M. Schneider, B. Giardina, S. Baumgartner, T. C. Petrucci, and A. Brancaccio. 2001. Identification of the beta-dystroglycan binding epitope within the C-terminal region of alpha-dystroglycan. *Eur. J. Biochem.* 268:4590-4597.

Seymour, R. M. and M. Berry. 1975. Scanning and transmission electron microscope studies of interkinetic nuclear migration in the cerebral vesicles of the rat. *J. Comp. Neurol.* 160:105-125.

Shoukimas, G. M. and J. W. Hinds. 1978. The development of the cerebral cortex in the embryonic mouse: An electron microscopic serial section analysis. *J. Comp. Neurol.* 179:795-830.

- Sidman, R. L., I. L. Miale, and N. Feder. 1959a.** Cell proliferation and migration of oligodendrocyte on astrocyte monolayers. *Exp. Neurol.* 1:322-333.
- Sidman, R. L., I. L. Miale, and N. Feder. 1959b.** Cell proliferation and migration of oligodendrocyte on astrocyte monolayers. *Exp. Neurol.* 1:322-333.
- Skeith, A., L. Dunlop, D. S. Galileo, and P. J. Linser. 1999.** Inhibition of β 1 integrin expression reduces clone size during early retinogenesis. *Dev. Brain Res.* 116:123-126.
- Sonnenberg et.al. 1990.** Integrin recognition of different cell-binding fragments of laminin (P1, E3, E8) and evidence that alpha 6 beta 1 but not alpha 6 beta 4 functions as a major receptor for fragment E8. *J. Cell Biol.* 110:2145-2155.
- Sonoda, Y., S. Watanabe, Y. Matsumoto, E. Aizu-Yokota, and T. Kasahara. 1999.** FAK ist the upstream signal protein of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt survival pathway in hydrogen peroxide-induced apoptosis of a human glioblastoma cell line. *J. Biol. Chem.* 274:10566-10570.
- Sotgia, F., G. Bonuccelli, M. Bedford, A. Brancaccio, U. Mayer, M. T. Wilson, R. Campos-Gonzalez, J. W. Brooks, M. Sudol, and M. P. Lisanti. 2003.** Localization of phospho-beta-dystroglycan (pY892) to an intracellular vesicular compartment in cultured cells and skeletal muscle fibers in vivo. *Biochemistry* 42:7110-7123.
- Sotgia, F., H. Lee, M. T. Bedford, T. Petrucci, M. Sudol, and M. P. Lisanti. 2001.** Tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan at its WW domain binding motif, PPxY, recruits SH2 domain containing proteins. *Biochemistry* 40:14585-14592.
- Stier, H. and B. Schlosshauer. 1999.** Cross-species collapse activity of polarized radial glia on retinal ganglion cell axons. *Glia* 25:143-153.
- Sugita, S., F. Saito, J. Tang, J. Satz, K. Campbell, and T. C. Südhof. 2001.** A stoichiometric complex of neurexins 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.
- Swartz, M., J. Eberhart, G. S. Mastick, and C. E. Krull. 2001a.** Sparking new frontiers: Using in vivo electroporation for genetic manipulations. *Dev. Biol.* 233:13-21.
- Swartz, M. E., J. Eberhart, E. B. Pasquale, and C. E. Krull. 2001b.** EphA4/ephrin-A5 interactions in muscle precursor cell migration in the avian forelimb. *Dev.* 128:4669-4680.

- Talts, J. F., Z. Andac, W. Gohring, A. Brancaccio, and R. Timpl. 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.
- Thanos, S. and J. Mey. 2001.** Development of the visual system of the chick II. Mechanisms of axonal guidance. *Brain Res. Rev.* 35:205-245.
- The International Human Genome Sequencing Consortium. 2001.** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
- Tian, M., C. Jacobson, S. H. Gee, K. P. Campbell, S. Carbonetto, and M. Jucker. 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., N. Deconinck, R. Fisher, D. Kahn, S. Phelps, J. M. Gillis, and K. Davies. 1998.** Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in *mdx* mice. *Nature Medicine* 4:1441-1444.
- Tomaselli, K. J., K. M. Neugebauer, J. L. Bixby, J. Lilien, and L. F. Reichardt. 1988.** N-Cadherin and integrins: Two receptor systems that mediate neuronal process outgrowth on astrocyte surfaces. *Neuron* 1:33-43.
- Tsen, G., W. Halfter, S. Kröger, and G. J. Cole. 1995.** Agrin is a heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 270:3392-3399.
- Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh. 2001.** Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:285-293.
- Wallis, J. W., J. Aerts, M. A. M. Groenen, R. P. M. A. Crooijmans, D. Layman, T. A. Graves, D. E. Scheer, C. Kremitzki, M. J. Fedele, N. K. Mudd, M. Cardenas, J. Higginbotham, J. Carter, R. McGrane, T. Gaige, K. Mead, J. Walker, D. Albracht, J. Davito, S.-P. Yang, S. Leong, A. Chinwalla, M. Sekhon, K. Wylie, J. Dodgson, M. N. Romanov, H. Cheng, P. J. DeJong, K. Osoegawa, M. Nefedov, H. Zhang, J. D. McPherson, M. Krzywinski, J. Schein, L. Hillier, E. R. Mardis, R. K. Wilson, and W. C. Warren. 2004.** A physical map of the chicken genome. *Nature* 432:761-764.
- Williamson, R. A., M. D. Henry, K. J. Daniels, R. F. Hrstka, J. C. Lee, Y. Sunada, O. Ibraghimov-Beskrovnya, and K. P. Campbell. 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 in Biochemical Sciences* 26:118-124.

Yang, B., D. Jung, D. Motto, J. Meyer, G. Koretzky, and K. P. Campbell. 1995. SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J. Biol. Chem.* 270:11711-11714.

Yasuda, K., T. Momose, and Y. Takahashi. 2000. Applications of microelectroporation for studies of chick embryogenesis. *Development Growth & Differentiation* 42:203-206.

Yoshida, A., K. Kobayashi, H. Manya, K. Taniguchi, H. Kano, M. Mizuno, T. Inazu, H. Mitsuhashi, S. Takahashi, M. Takeuchi, R. Herrmann, V. Straub, B. Talim, T. Voit, H. Tapaloglu, T. Toda, and T. Endo. 2001. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev. Cell* 1:717-724.

Yoshida, M., A. Suzuki, H. Yamamoto, S. Noguchi, Y. Mizuno, and E. Ozawa. 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.

Yu, H. and J. F. Talts. 2003. beta 1 Integrin and alpha-dystroglycan binding sites are localized to different laminin-G-domain-like (LG) modules within the laminin alpha 5 chain G domain. *Biochem. J.* 371:289-299.

Yurchenco, P. D., Y. S. Cheng, K. Campbell, and S. H. Li. 2004. Loss of basement membrane, receptor and cytoskeletal lattices in a laminin-deficient muscular dystrophy. *J. Cell Sci.* 117:735-742.

Zaccaria, M. L., F. Di Tommaso, A. Brancaccio, P. Paggi, and T. C. Petrucci. 2001. Dystroglycan distribution in adult mouse brain: A light and electron microscopy study. *Neuroscience* 104:311-324.

Zhang, P., N. J. Liegeois, C. Wong, M. Finegold, H. Hou, J. C. Thompson, A. Silverman, J. W. Harper, R. A. DePinho, and S. J. Elledge. 1997. Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 387:151-158.

VII. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. bidest	destilliertes Wasser
AEC	Aminoethylcarbazol
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> , Rockville, MD., USA.
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AMP	Adenosin-Monophosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumine)
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CO ₂	Kohlendioxid
D	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
Dp	Dystrophin
E	Embryonaltag
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure (Titrplex III)
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ERG	Elektroretinogramm
ES	Embryonale Stammzellen
et al.	und andere

Abkürzungsverzeichnis

EtBr	Ethidiumbromid
ETOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
Fab	Antigenbindendes Fragment
FCMD	<i>Fukuyama-type congenital muscular dystrophy</i>
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	fötale Kälberserum
g	Gramm
GCL	Ganglienzellschicht
gfp _n	„Humanisiertes <i>green fluorescent protein</i> “
gp	Glykoprotein
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethylsulfonsäure
HH	Hamburger und Hamilton
His	Histidin
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horse-radish peroxidase</i>)
Ig	Immunglobulin
ILM	Innere Grenzmembran (<i>inner limiting membrane</i>)
INL	Innere Körnerschicht (<i>inner nuclear layer</i>)
IPL	Innere plexiforme Schicht (<i>inner plexiform layer</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LG	Laminin G
LGMD2I	<i>Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2I</i>
M	Molar (Mol pro Liter)
m	milli
mA	Milliampere
mAK	monoklonaler Antikörper

Abkürzungsverzeichnis

M	Molar (Mol pro Liter)
MDC1C	<i>Congenital muscular dystrophy type 1 C</i>
MEB	<i>Muscle Eye Brain Disease</i>
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
mg	Milligramm
Min.	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
myd	Myosystrophie
Na-acetat	Natriumacetat
Neo	Neomycin-Phosphotransferase
Ngcam	neuronaies Adhäsionsmolekül
nm	Nanometer
NMJ	Neuromuskuläre Endplatte
OD	Optische Dichte
OFL	Optische Faserschicht (<i>optic fiber layer</i>)
ONL	Äußere Körnerschicht (<i>outer nuclear layer</i>)
OPL	Äußere plexiforme Schicht (<i>outer plexiforme layer</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>) mit Tween 20-Zusatz
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Konzentration der H ⁺ -Ionen in einer Lösung
PFA	Paraformaldehyd
pmol	picomol
pp	Phosphoprotein
PPi	anorganisches Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Sek.	Sekunde

Abkürzungsverzeichnis

SEM	„standard error of mean“
Std.	Stunde(n)
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
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
T _m	DNA-Schmelzpunkt
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
ÜN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
W	Watt
WWS	<i>Walker Warburg Syndrom</i>
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit (<i>weight per volume</i>)
x g	x-fache Erdbeschleunigung
x-Gal	5-Chlor-4-Brom-Indolyl- β -D-Galactosid
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

