

Die Rolle des *Doublecortin*-Gens in neuronalen Vorläuferzellen während Migration und Neurogenese

*Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der
Naturwissenschaftlichen Fakultät III
- Biologie und Vorklinische Medizin -
der Universität Regensburg*

vorgelegt von

Claudia Karl, geb. Kriedel

2004

Promotionsgesuch eingereicht am: 24.11.2004
Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2005
Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Inga D. Neumann
Prof. Dr. Jürgen Winkler

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Armin Kurtz
1. Prüfer (Erstgutachten): Prof. Dr. Inga D. Neumann
2. Prüfer (Zweitgutachten): Prof. Dr. Jürgen Winkler
3. Prüfer: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Zusammenfassung | 6 |
| 1. Einleitung | 7 |
| 1.1. Neurale Stammzellen und Neurogenese | 9 |
| 1.2. Proliferation, Migration und Differenzierung: Wie die Hirnrinde beim Menschen entsteht | 12 |
| 1.3. Zelluläre und molekulare Mechanismen der Wanderung von Nervenzell-Vorläufern | 14 |
| 1.4. Störungen der neuronalen Migration führen zu Fehlbildungen des Gehirns beim Menschen | 17 |
| 1.5. Das <i>Doublecortin(DCX)-Gen</i> | 22 |
| 1.6. Das Protein Doublecortin und die DCX-Domänen | 23 |
| 1.7. Doublecortin und dessen vermutete Rolle für die Signaltransduktion bei der neuronalen Migration | 27 |
| 1.8. Expression von Doublecortin bei der Embryonalentwicklung | 30 |
| 1.9. Doublecortin als Marker für die adulte Neurogenese | 31 |
| 1.10. Promotoren in proteinkodierenden Genen der Eukaryonten | 34 |
| 1.11. Reportersysteme in der Biologie | 37 |
| 2. Material und Methoden | 40 |
| 2.1. Material | 40 |
| 2.1.1. Chemikalien | 40 |
| 2.1.2. Verbrauchsmaterial | 40 |
| 2.1.3. Standards | 41 |
| 2.1.4. Verwendete Programme | 41 |
| 2.1.5. Verwendete Geräte | 41 |
| 2.2. Methoden | 42 |
| 2.2.1. Nukleinsäuretechniken | 42 |
| 2.2.1.i. Isolierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren | 42 |
| 2.2.1.ii. Reverse Transkription von mRNA und Polymerasekettenreaktion | 42 |
| 2.2.1.iii. Klonierung von PCR-Produkten | 43 |
| 2.2.1.iv. Sequenzierung des regulatorischen Bereichs auf dem Maus- <i>DCX</i> -Gen | 48 |
| 2.2.2. Zellkulturmethoden | 48 |
| 2.2.2.i. Zelllinien | 48 |
| 2.2.2.ii. Gewinnung und Differenzierung primärer Zellen aus dem fötalen Telencephalon der Maus (MEF-Zellen) | 49 |
| 2.2.2.iii. Stabile Transfektion von COS7-Zellen und live-Mikroskopie | 50 |
| 2.2.2.iv. Transiente Transfektion von Zelllinien bzw. fötalen, telencephalen Zellen aus der Maus (MEF-Zellen) <i>in vitro</i> | 50 |
| 2.2.3. Gewebekulturen | 51 |
| 2.2.3.i. Organotypische Explantkulturen des Hippocampus junger Mäuse (P 3-7) | 51 |
| 2.2.3.ii. Explantkulturen aus adultem Bulbus olfactorius der Maus | 52 |
| 2.2.3.iii. Ballistische Transfektion von Gewebekulturen | 52 |
| 2.2.4. Transgene Tiere | 52 |
| 2.2.4.i. Herstellung transgener Mauslinien | 52 |
| 2.2.4.ii. BrdU-Markierung neu gebildeter Zellen während adulter Neurogenese | 53 |
| 2.2.4.iii. Fluoreszenzaktivierte Anreicherung Reporter-exprimierender Zellen aus transgenen Tieren (Durchfluszytometrie) | 54 |

| | |
|---|------------|
| 2.2.5. Proteinbiochemische Methoden | 54 |
| 2.2.6. Immunfärbungen an Zellen und Geweben | 55 |
| 2.2.6.i. Immunzytochemische Untersuchung von Zellkulturen | 55 |
| 2.2.6.ii. Mikroskopie und Auswertung der Zellkultur-Immunhistologie | 56 |
| 2.2.6.iii. Immunhistochemische Untersuchung von Gewebe | 56 |
| 2.2.6.iv. Quantitative Auswertung der Immunfärbungen an Geweben | 58 |
| 2.2.7. Elektrophysiologische Methoden | 60 |
| 2.2.8. Genetische Analyse von Patienten | 61 |
| 3. Ergebnis I: Molekulare Mechanismen von Doublecortin und der Einfluss von Doublecortin-Mutationen | 62 |
| 3.1. Lissenzephalie und Doublecortex in zwei Familien mit Mutationen im Doublecortin-Gen | 63 |
| 3.2. Wildtyp- und mutiertes Doublecortin binden an Mikrotubuli in COS7-Zellen | 67 |
| 3.3. Mitotische Defekte in DCX-exprimierenden COS7-Zellen | 70 |
| 4. Ergebnis II: Identifizierung und in vitro Charakterisierung der regulatorischen Region des Doublecortin-Gens | 75 |
| 4.1. Eingrenzung und Beschreibung der regulatorischen Region des Doublecortin-Gens für die Spezies Mensch, Maus und Ratte | 77 |
| 4.2. Spezifische Aktivität der regulatorischen Region des humanen Doublecortin-Gens in Zellkulturen neuronalen Ursprungs | 84 |
| 4.3. Spezifische Aktivität der DCX-regulatorischen Region in jungen Neuronen aus embryonalen Primärkulturen des Maus-Telenzephalons | 89 |
| 4.4. Elektrophysiologische Eigenschaften junger Neurone mit aktiver DCX-regulatorischer Region in Maus-Primärkulturen | 94 |
| 4.5. Spezifische Aktivität der DCX-regulatorischen Region in DCX-exprimierenden Zellen aus postnatalen und adulten Gewebekulturen | 97 |
| 4.6. Deletionsmutanten bestimmen relevante Bereiche der humanen DCX-regulatorischen Region | 100 |
| 4.7. Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Aktivität der humanen DCX-regulatorischen Region <i>in vitro</i> | 101 |
| 5. Ergebnis III: Expression von Reporterproteinen unter Kontrolle der DCX-regulatorischen Region <i>in vivo</i> | 103 |
| 5.1. Expression von Doublecortin und neuronale Differenzierung in Zonen adulter Neurogenese in der Maus | 106 |
| 5.2. Expression von verschiedenen Reporterproteinen unter Kontrolle der DCX-regulatorischen Region im transgenen Tiermodell | 109 |
| 5.3. Expression von Reporterprotein und endogenem DCX im Verlauf der Entwicklung und in verschiedenen Organen huDCX3509-EGFP-transgener Mäuse | 111 |
| 5.4. Ko-Expression spezifischer Marker in Zellen mit aktiver DCX-regulatorischer Region in huDCX3509-EGFP-transgenen Tieren | 114 |
| 5.5. Expressionsvergleich von endogenem DCX und EGFP unter Kontrolle DCX-regulatorischer Sequenzen in transgenen Tieren | 118 |
| 5.6. Neubildung von Nervenzellen in huDCX3509-EGFP-transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen | 119 |

| | |
|--|------------|
| 5.7. Expression von Doublecortin und EGFP im Gyrus dentatus mit zunehmendem Alter transgener Tiere | 122 |
| 5.8. Experimentelle Anfallsserie und Expression von EGFP im Gyrus dentatus huDCX3509-transgener Tiere | 123 |
| 5.9. Fluoreszenzaktivierte Anreicherung neuronaler Vorläuferzellen aus postnatalen huDCX3509-Reportermäusen | 124 |
| 6. Diskussion | 126 |
| 6.1. Physiologische Rolle Doublecortins während embryonaler und adulter Neurogenese | 127 |
| 6.1.1. Mögliche Aufgaben von DCX während Proliferation und Determinierung neuronaler Vorläuferzellen | 127 |
| 6.1.2. Vermutete Rolle von DCX während der Migration neuronaler Vorläuferzellen | 129 |
| 6.1.3. Mögliche Funktion Doublecortins während neuronaler Differenzierung und Reifung | 132 |
| 6.1.4. Mögliche Rolle Doublecortins für die Plastizität des adulten Gehirns | 136 |
| 6.2. Doublecortin-Mutationen und die Pathophysiologie DCX-assoziiierter neuronaler Migrationsstörungen | 138 |
| 6.2.1. Symptome bei Patienten mit DCX-assoziierten neuronalen Migrationsstörungen sind je nach Art der Mutation und Expressionsmuster variabel | 138 |
| 6.2.2. Der klinisch beobachtete Schweregrad einer DCX-Mutation korreliert mit dem Funktionsverlust des mutierten Allels <i>in vitro</i> | 140 |
| 6.3. Identifizierung und <i>in vitro</i> Charakterisierung der regulatorischen Region des Doublecortin-Gens | 146 |
| 6.3.1. Expression von DCX und EGFP unter Kontrolle DCX-regulatorischer Sequenzen ist spezifisch für neuronale Vorläuferzellen <i>in vitro</i> | 146 |
| 6.3.2. Die identifizierte 3,5 kbp-DCX-regulatorische Region enthält mögliche Bindestellen für neuronal spezifisch exprimierte Transkriptionsfaktoren | 149 |
| 6.3.3. Verschiedene Wachstumsfaktoren zeigen keinen direkten Einfluss auf die Aktivität der DCX-regulatorischen Region <i>in vitro</i> | 152 |
| 6.3.4. Die Identifizierung der DCX-regulatorischen Region verspricht die Aufklärung neuronaler Migrationsstörungen unbekannter Genese bei Patienten | 152 |
| 6.3.5. Mögliche Anwendungen der DCX-regulatorischen Region in Therapie und Grundlagenforschung | 153 |
| 6.4. Neurogenese-Reportermäuse | 155 |
| 6.4.1. DCX wird in adulten neurogenen Regionen der Maus transient in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert | 155 |
| 6.4.2. Verschiedene Linien transgener Tiere exprimieren Reportergene in vergleichbarem Muster | 156 |
| 6.4.3. Expression von Reporterprotein in huDCX3509-EGFP-transgenen Tieren ist spezifisch für endogen DCX-exprimierende Zellen und Gewebe | 157 |
| 6.4.4. EGFP ist unter Kontrolle der huDCX3509-regulatorischen Region spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen transgener Tiere exprimiert | 159 |
| 6.4.5. Nutzen des DCX-transgenen Reportermodeells im Vergleich zu anderen transgenen Reportersystemen für Neurogenese in Mäusen | 161 |
| 6.4.6. Verwendung des DCX-transgenen Reportermodeells unter Neurogenese-modulierenden Bedingungen | 162 |
| Literaturverzeichnis | 169 |
| eigene Publikationen / Patentanmeldungen | 184 |
| Verzeichnis der Abkürzungen | 185 |
| Danksagung | 187 |

Zusammenfassung

Doublecortin/DCX ist ein X-chromosomal kodiertes Protein, das während der Embryonalentwicklung des zentralen Nervensystems und während adulter Neurogenese in Säugetieren spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert wird. Das Protein ist nur vorübergehend in diesem Zelltyp und weder in Stammzellen, noch in adulten Nervenzellen nachweisbar. Dieses Expressionsmuster macht DCX zu einem einzigartigen Marker für Neurogenese. DCX stabilisiert Mikrotubuli, interagiert auch mit anderen Zytoskelett-Komponenten, verschiedenen Proteinkinasen sowie weiteren intrazellulären und membranständigen Molekülen. Darüber hinaus ist die molekulare Funktion Doublecortins jedoch weitgehend unklar. *DCX*-Mutationen führen beim Menschen zu neuronalen Migrationsstörungen, daraus resultieren während der Entwicklung charakteristische Gehirnfehlbildungen (Lissenzephalie / Bandheterotopie-Spektrum). DCX wird einerseits für neuronale Migration z.B. bei der Entstehung des zerebralen Kortex benötigt, findet sich andererseits aber in den kaum migrierenden, neuronal determinierten Zellen des Hippocampus, was auf zusätzliche Funktionen des Proteins über neuronale Migration hindeutet.

Die vorliegende Promotion beschreibt neue Aspekte zur Funktion von DCX und etabliert basierend auf dem Vorläuferzell-spezifischen Expressionsmuster den *DCX*-Promotor als Neurogenese-Reporter. Die Arbeit **1)** zeigt die molekulare Funktionsweise des Proteins DCX anhand seiner Affinität zum Mikrotubuli-System im Spindelapparat; an Patienten beschriebene *DCX*-Mutationen setzten die Fähigkeit zur Mikrotubuli-Bündelung herab und bewirkten einen verminderten Einfluss von DCX auf Mitose. **2)** identifiziert regulatorische Sequenzen des *DCX*-Gens und beschreibt deren spezifische Aktivität in neuronalen Vorläuferzellen *in vitro*. **3)** etabliert mittels Expression von Reporterproteinen unter Kontrolle der *DCX*-regulatorischen Region ein Reportersystem für Neurogenese im Tiermodell; dieses Modell ermöglicht in Zukunft bildgebende Verfahren zur Analyse von Neurogenese, sowie weiterführende Untersuchungen zur Molekular- und Zellbiologie neuronaler Vorläuferzellen.

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit ist ein Baustein auf dem Weg zu einem besseren Verständnis der molekularen und zellulären Grundlagen von Neurogenese. Neurogenese, die Neuentstehung von Nervenzellen, ist ein komplexer Vorgang, der sich aus Proliferation, Induktion, Spezifizierung, Migration, Differenzierung und Überleben neu gebildeter Zellen im zentralen Nervensystem (ZNS) zusammensetzt und der auf unterschiedlicher Ebene vielfältig reguliert wird. Neurale Stammzellen, der Ausgangspunkt der Neurogenese, sind charakterisiert durch ihre Fähigkeit zur Proliferation, Selbsterneuerung und Differenzierung in neuronale und gliale Zelltypen.

Obwohl in den vergangenen Jahren viele Komponenten, welche Neurogenese beeinflussen können, entdeckt wurden, weiß man immer noch zu wenig über die Identität der beteiligten Zelltypen und die molekularen und zellulären Mechanismen, denen sie unterliegen. Ein besseres Verstehen von Neurogenese ist Voraussetzung zur klaren Einsicht in patho-physiologische Prozesse, welche mit Neurogenese verknüpft sind, und Voraussetzung für eine zukünftige klinische Anwendung neuraler Stammzellen. Neurologische Erkrankungen sind häufig durch den Verlust neuronaler Zellen gekennzeichnet. Um abgestorbene Neurone zu ersetzen, gilt es besonders, neuronale Induktion, Determinierung und Differenzierung zu fördern. In diesem Zusammenhang ist die Migration neuronaler Vorläuferzellen ein entscheidender Prozess, da sie oft mit neuronaler Induktion, Determinierung und Differenzierung einhergeht. Zudem kann sich nach Läsionen des ZNS zwar die Neurogeneserate steigern, jedoch scheint häufig die Migration der neu entstandenen Nervenzellen in den Läsionsbereich hinein limitiert zu sein. Besondere Beachtung verdienen deshalb Fragen nach den Mechanismen dieser zellulären Migration und nach der Identität der migrierenden Vorläuferzellen.

Dem dieser Arbeit übergeordneten Projekt liegt folgendes Konzept zugrunde:

- i) Die Migration neuronaler Vorläuferzellen unterliegt komplexen, genetisch bedingten Regulationsmechanismen, Mutationen der beteiligten Gene können deshalb zu neuronalen Migrationsstörungen führen. Aufgabe des Projektes ist das Erarbeiten und Durchführen humangenetischer Tests bei neuronalen Migrationsstörungen.
- ii) Identifizierte Gene und Proteine werden darüber hinaus funktionellen Tests

unterzogen, um ihre physiologische Rolle sowie die patho-physiologischen Ursachen der assoziierten Migrationsstörungen zu verstehen. iii) Aus der Gruppe der untersuchten Gene werden jene herausgegriffen, deren Expression ausschließlich mit neuronaler Migration assoziiert ist, weshalb sie als Marker für Neurogenese dienen können. iv) Um die Regulation ausgewählter Gene zu verstehen, werden Promotorstudien durchgeführt, welche im nächsten Schritt die Etablierung innovativer Reporter-Systeme *in vitro* (mittels Zellkulturen) und *in vivo* (mittels transgener Mäuse) erlauben. v) Diese Reporter-Systeme dienen zur Visualisierung, Identifizierung und Isolierung neuronaler Vorläuferzellen sowie zu deren molekularer Analyse, und als Reporter für Neurogenese bzw. für die Modulation von Neurogenese.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung des *Doublecortin-(DCX)*-Gens, eines mit neuronaler Migration assoziierten Gens, und seines Promotors (Kap. 4); dargestellt wird darüber hinaus die Verwendung des Promotors als Reporter der Neurogenese (Kap. 5). Ein weiterer Teil der Arbeit umfasst Ergebnisse aus molekularen Analysen am Doublecortin-Protein, wobei auch der Einfluss von Doublecortin-Mutationen untersucht wurde (Kap. 3).

Einleitend werden nun die wissenschaftlichen Grundlagen des oben skizzierten Konzeptes zusammengefasst: Ausgehend von der Biologie neuraler Stammzellen geht es dabei um die Migration neuronaler Vorläuferzellen, insbesondere während der kortikalen Embryonalentwicklung, sowie um die molekularen Grundlagen dieser zellulären Wanderung. Außerdem wird auf genetisch bedingte neuronale Migrationsstörungen eingegangen, um dann das bisher Bekannte zum *Doublecortin*-Gen zusammenzufassen. Grundsätzliches zu eukaryonten Promotoren sowie zu den Eigenschaften von Reportersystemen führen hin zum zentralen Thema dieser Arbeit: der Instrumentalisierung der regulatorischen Region des *Doublecortin*-Gens als Reporter für Neurogenese.

1.1. Neurale Stammzellen und Neurogenese

Neurale Stammzellen (NSZs) zeichnen sich durch zwei Eigenschaften aus: die Fähigkeit zur **Selbst-Erneuerung** und zur **Ausbildung spezialisierter Zelltypen**, wie Neurone, Astrozyten und Oligodendroglia (Abb. 1.1). Seit man weiß, dass es nicht nur im embryonalen Nervensystem eine Vielzahl von Stammzellen gibt, sondern dass auch das adulte Gehirn der Säugetiere einschließlich dem des Menschen sich begrenzte Plastizität erhalten hat (Carpenter, 1999; Nunes, 2003), sind NSZs verstärkt in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Zum einen scheinen Reize aus der Umgebung die Neurogenese beeinflussen zu können (Gould, 1999; Kempermann, 2002), aber auch Verletzungen, z.B. durch eine zerebrale Ischämie, können die Neurogeneserate im adulten Gehirn erhöhen (Jiang, 2001; Jin, 2001).

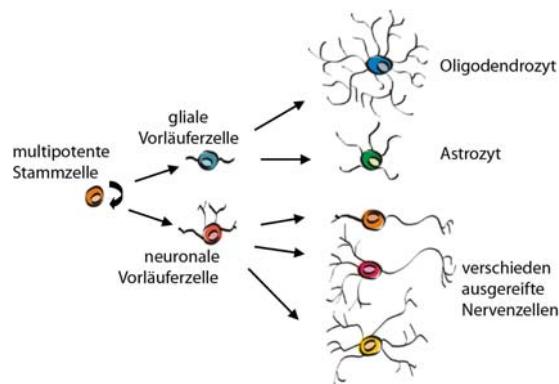


Abb.1.1 Neurale Stammzellen und ihre Nachkommen. Neurale Stammzellen sind multipotent, können sich selbst erneuern sowie in Astrozyten, Oligodendrozyten und Nervenzellen ausreifen. Im Vergleich zur Stammzelle besitzt die unreife Vorläuferzelle ein eingeschränktes Entwicklungspotential.

Dieses Wissen um die Anwesenheit und Aktivität von Stammzellen im adulten Gehirn hat die Hoffnung geweckt, adulte NSZs künftig therapeutisch einzusetzen zu können: Zellverluste, wie sie bei neurodegenerativen Erkrankungen, also z.B. dem Morbus Parkinson, oder auch nach akuten Ereignissen wie einer Ischämie eintreten, könnten mittels Stammzellen ausgeglichen werden. Hierfür könnte man entweder die endogenen Stammzellen des Gehirns gezielt stimulieren, oder körpereigene NSZs *in vitro* heranzüchten und in betroffene Regionen transplantieren. Die Voraussetzung jedoch, um Stammzell-basierte Therapie sicher und effizient zu machen, wäre ein detaillierteres Wissen darüber, was Stammzell-Proliferation und -Differenzierung im einzelnen beeinflussen kann; insbesondere besteht auch ein Mangel an Markern, um NSZs und ihre Nachkommen eindeutig zu charakterisieren (Gangemi, 2004).

Stammzellen findet man an vielen Orten im Körper, so zum Beispiel im hämatopoetischen oder im mesenchymalen System, sowie im ZNS. Stammzellen lassen sich unterschiedlich einteilen: i) bezüglich des ontogenetischen Entwicklungsgangs in embryonale bis adulte Stammzellen, ii) bezüglich der Potenz als totipotent bis multipotent, und iii) gemäß ihrer Spezifität für bestimmte Organe. Gemeinsam ist allen Stammzellen die Fähigkeit, sich zu teilen sowie sich selbst zu erneuern. Neurale Stammzellen kennzeichnen darüber hinaus, dass sie im fötalen oder adulten Gehirn vorhanden sind, sich selbst erneuern und zugleich neuronal und glial ausreifen können (Abb. 1.1). Umstritten ist derzeit, inwieweit organ-spezifische Stammzellen ihre Spezifität – z.B. für das hämatopoetische System – auch wieder verlieren können, um Zellen anderer Gewebe – z.B. des Nervensystems – zu produzieren. Es gab zahlreiche Hinweise, dass zunächst organspezifische Stammzellen ihr Programm umstellen (Trans-Differenzierung) oder im Prozess der De-Differenzierung ihre Spezifität auf mehrere Organe ausweiten können. So ließen sich beispielsweise hämatopoetische Zellen *in vitro* und *in vivo* neuronal differenzieren (Brazelton, 2000; Jiang, 2003; Mezey, 2000; Priller, 2001a; Priller, 2001b). Allerdings sind diese Daten in Frage gestellt, seit man weiß, dass Knochenmarkszellen nach Transplantation mit anderen Zellen fusionieren können (Alvarez-Dolado, 2003).

Ursprungsort für neurale Stammzellen während der Entwicklung ist die Wand des Neuralrohres (s. auch Kap. 1.2). In diesem Neuroepithel vergrößert sich zunächst der Stammzellpool, bevor asymmetrische Teilungen einsetzen: die eine Tochterzelle verbleibt als Stammzelle im Epithel, die andere wandert als neuronale Vorläuferzelle in den entstehenden Hirnmantel (zerebraler Kortex) ein (Sidman, 1973), um am Zielort zur Nervenzelle auszureifen (Caviness, 1995; Couillard-Despres, 2001). Nachfolgend werden auch Astrogliazellen gebildet, Oligodendrozyten entstehen am Ende der Embryonalentwicklung bis nach der Geburt. Von Embryo zum adulten Organismus verringert sich der Anteil der Stammzellen dramatisch – bei der Maus z.B. von 50% in der Wand des Neuralrohres zum Embryontag 8,5 bis hin zu weniger als 1% in der Subventrikulärzone (SVZ) am ersten Lebenstag (Temple, 2001).

Neuronale Vorläuferzellen wandern während embryonaler Neurogenese entlang strahlenförmig ausgerichteter Fasern, den radialen Gliazellen, an ihren Bestimmungsort im zerebralen Kortex (s. Kap. 1.2). Radiale Gliazellen scheinen

jedoch neben ihrer Weg weisenden Funktion bedeutende Stammzellaktivität zu besitzen (Heins, 2002; Malatesta, 2003; Malatesta, 2000). Man glaubt, dass sie diese Eigenschaft bis in den adulten Organismus hinein behalten (Alvarez-Buylla, 2001).

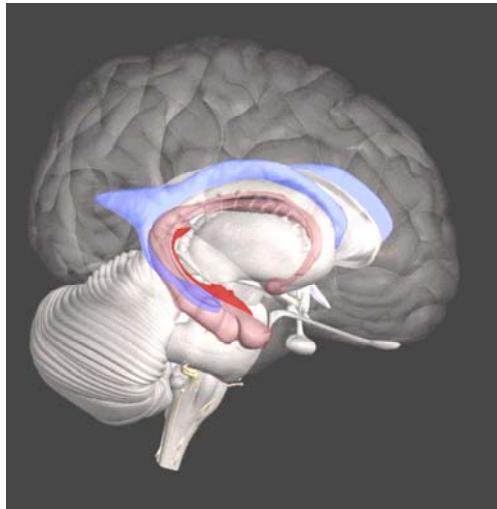


Abb. 1.2: Neurogene Zonen und neurale Stammzellen des adulten Gehirns. Neurale Stammzellen befinden sich im Hippocampus (rot) und in der lateralen Ventrikellwand (blau). Sie erneuern sich selbst (symmetrische Teilungen) und bilden in asymmetrischen Teilungen die Vorläufer von reifen Gliazellen und Neuronen (modifizierte 3D-Abbildung aus interBRAIN, Topographische Anatomie des ZNS des Menschen)

Seit den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wird vermutet, dass es aktive NSZs auch im adulten Gehirn geben könnte (Altman, 1965; Altman, 1967). Vor wenigen Jahren konnte gezeigt werden, dass adulte Neurogenese direkt mit der Anwesenheit multipotenter NSZs verknüpft ist (Gage, 2000), wobei proliferierende NSZs unter physiologischen Bedingungen nur in zwei Gehirnregionen gefunden wurden: in der lateralen Ventrikellwand und im Hippocampus (Abb. 1.2). Welcher der dort lokalisierten Zelltypen die eigentliche Stammzelle darstellt, ist derzeit umstritten, vermutlich sind es jedoch spezialisierte Subtypen von GFAP-exprimierenden Astrozyten (Alvarez-Buylla, 2001; Doetsch, 1999; Gotz, 2002; Heins, 2002; Malatesta, 2000; Sanai, 2004; Seri, 2001).

Um ausgehend von der Stammzelle über die Zwischenstufe unreifer Vorläuferzellen zur ausdifferenzierten Nervenzelle zu gelangen, sind zahlreiche Entscheidungen auf Ebene des zellulären Programms notwendig. Welche Faktoren diese Entscheidungen beeinflussen, ist nur teilweise verstanden, allerdings kennt man einige der beteiligten Genprodukte und löslichen Faktoren: Von sonic hedgehog, Sox 1-3, und Notch/Hes weiß man, dass sie den Stammzell-Status einer Zelle erhalten können, während u.a. C/EBP, Mash1, Neurogenin 1/2, NeuroD und Math3 neuronale Gene aktivieren und – unter Anwesenheit von Wachstumsfaktoren wie PDGF und bFGF – neuronale Differenzierung fördern können (Gangemi, 2004). Neben diesen genetischen sind es jedoch auch epigenetische Faktoren, welche neuronale

Differenzierung aus Stammzellen lenken (Hsieh, 2004): hierzu zählt man z.B. den Einfluss neurogener Transkriptionsfaktoren auf die Aktivität des Chromatins.

1.2. Proliferation, Migration und Differenzierung: Wie die Hirnrinde beim Menschen entsteht

Die Neurone der Hirnrinde (zerebraler Kortex) des Menschen werden nicht an Ort und Stelle gebildet. Ihre Vorläufer entstehen während der Entwicklung des Embryos in einer tieferen Schicht, in der so genannten ventrikulären Zone, welche das frühe Neuralrohr auskleidet. Neuronale Vorläuferzellen sondern sich als postmitotische Zellen aus diesem mit Stammzellen besetzten Epithel ab und wandern über mehrere Hundert Zell-Längen zu ihrem Bestimmungsort im entstehenden zerebralen Kortex. Ein ganzes „Orchester“ an Proteinen reguliert die Kortex-Entstehung, allerdings ist das Wissen über die „Instrumente“ des „Orchesters“ und deren Zusammenspiel noch lückenhaft, unter anderem weil es bisher kaum spezifische Marker für neuronale Vorläuferzellen gibt.

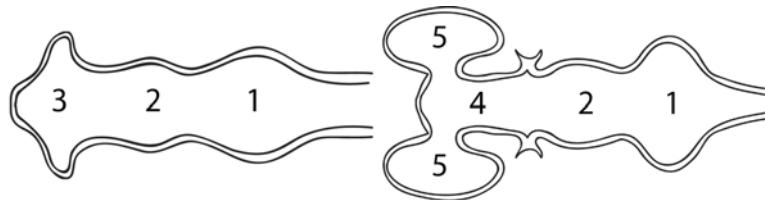


Abb. 1.3. Entstehung der Gehirnanlagen. Das Gehirn des Menschen geht aus dem rostralen Ende des Neuralrohrs hervor, welches sich zunächst in drei Wachstumszonen unterteilt: Rhombenzephalon (1), Mesenzephalon (2) und Prosenzephalon (3). Im weiteren Verlauf bilden sich aus dem Prosenzephalon das Dienzephalon (4) sowie die beiden Bläschen des Telenzephalons (5). *nach Redecker et al., 2000*

Das Gehirn des Menschen geht aus dem rostralen Anteil des embryonalen Neuralrohrs hervor. Dieser Anteil spaltet sich auf in drei Wachstumszonen: aus der Richtung des Rückenmarks gesehen folgt zunächst das Rhombenzephalon, danach das Mesenzephalon und schließlich das Prosenzephalon, welches sich später in zwei telenzephale Bläschen sowie das Dienzephalon aufgliedert (Abb. 1.3) (Redecker, 2000). Die Wand der telenzephalen Bläschen des Neuralrohrs, auch Ventrikelwand oder ventrikuläre Zone (VZ) genannt, ist Ursprungsort neuronaler Vorläuferzellen im Gehirn des Menschen (Caviness, 1973; Caviness, 1995; Takahashi, 1996).

In der epithelialen, also zweidimensionalen Struktur der VZ teilen sich die Zellen symmetrisch in gleichartige, proliferierende Tochterzellen. Um jedoch aus der

einzelligen Stammzell-Schicht die komplexe, dreidimensionale Struktur des erwachsenen Gehirns zu bilden, müssen sich Zellen aus dieser Schicht absondern. Etwa am Embryonaltag 11 (E 11) der Maus bzw. in der 5. Schwangerschaftswoche beim Menschen (Meyer, 2000; Sidman, 1973), beginnen die Zellen sich asymmetrisch zu teilen: eine der beiden Tochterzellen verbleibt als Stammzelle im Epithel, die andere wandert in den sich entwickelnden Gehirnmantel ein, ohne weitere Teilungen zu durchlaufen. Migrierende, postmitotische Zellen werden neuronale Vorläuferzellen genannt (Meyer, 2000).

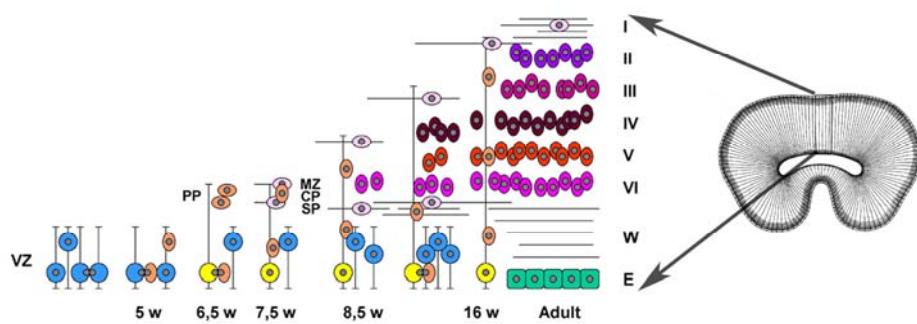


Abb. 1.4. Physiologische Kortexentwicklung beim Menschen. Zellen der Ventrikulärzone (VZ) wandern in die frühe Marginalzone („preplate“, PP) ein und spalten sie in die Marginalzone (MZ) und die „subplate“ (SP) auf. Weitere Zellen wandern in die so gebildete korticale Platte („cortical plate“, CP) ein und lagern sich außen auf zuvor eingetroffenen Zellen an. Ergebnis sind die sechs Schichten (I-VI) des zerebralen Kortex (w = Schwangerschafts-Woche). Wie rechts in der Übersicht gezeigt, grenzt die VZ an das Lumen des Neuralrohrs.

Das Auswandern der ersten Welle neuronaler Vorläuferzellen führt zur frühen Marginalzone oder „preplate“ (Marin-Padilla, 1978) (Abb. 1.4). Nachfolgende Zellen wandern – entlang radialer Gliazellen (Rakic, 1971) – in diese frühe Marginalzone ein, spalten sie so in einen inneren („subplate“) und einen äußeren („marginal zone“) Anteil auf, während sie selbst die korticale Platte bilden. Der äußere Teil oder die Marginalzone umfasst die Cajal-Retzius Zellen und formt die künftige Schicht I des ausgereiften Neokortex. Das Einwandern weiterer Wellen an postmitotischen Zellen in die korticale Platte erfolgt von innen nach außen: die zuletzt angekommenen Zellen durchstoßen – entlang radialer Gliazellen – die zuvor angelagerte Schicht (Angevine, 1961; Caviness, 1973). Hierdurch entstehen zwischen Embryonaltag 14 und 18 der Maus sowie zwischen der 8. und 24. Schwangerschaftswoche beim Menschen die sechs Schichten des zerebralen Kortex in einem so genannten "inside-out-layering", also von innen nach außen geschichtet. Neben der radialen Migration können junge Neurone auch im rechten Winkel zu den Gliazellen, also parallel zur Oberfläche in den

Kortex einwandern. Beschrieben ist diese auch tangentielle Migration genannte Art der Fortbewegung für GABAerge Neurone, welche von der mittleren ganglionischen Eminenz in den Kortex wandern (Anderson, 1997; O'Rourke, 1995; Parnavelas, 2000).

Ist die Gehirnoberfläche des menschlichen Fötus bis zum dritten Schwangerschaftsmonat noch relativ glatt, so kommt es in der Folge zur Ausbildung der so genannten Gyri oder Falten, welche auch das adulte Gehirn kennzeichnen. Sie entstehen vermutlich wegen der vergrößerten Oberfläche der oberen gegenüber den unteren Kortex-Schichten (Volpe, 1995).

1.3. Zelluläre und molekulare Mechanismen der Wanderung von Nervenzell-Vorläufern

Während der Entstehung des zerebralen Kortex des Menschen unterscheidet man drei Phasen: **Proliferation, Migration und Differenzierung**. Vorläuferzellen werden aus Stammzellen in der ventrikulären Zone gebildet und wandern in den Kortex ein; in der Zielregion angelangt, differenzieren sie und integrieren in das neuronale Netzwerk. Eine genaue Kontrolle von Proliferation, Migration und Differenzierung ist Voraussetzung, um die komplexe Struktur des adulten Kortex aufzubauen (Walsh, 2000), wobei keineswegs ganz verstanden ist, was genau diese Prozesse auf molekularer Ebene reguliert. Wie andere bewegliche Zellen auch, werden neuronale Vorläuferzellen in **drei Schritten** vorwärts bewegt. Auf das **Vorstrecken von Zellausläufern** folgt die **Translokation des Zellkerns**, schließlich werden **apikale Zellanteile** in Bewegungsrichtung **nachgezogen** (Horwitz, 1999).

Die notwendige Feinabstimmung neuronaler Migration erfolgt auf der Ebene einzelner Zellen. Gesteuert wird sie meist über Signale von außen, von extrazellulärer Matrix oder löslichen Substanzen, die Zellen anlocken oder abstoßen können. Tatsächlich verwirklicht wird die Migration mittels des Zytoskeletts der wandernden Zelle selbst: das Gerüstsystem aus z.B. Aktin, Tubulin sowie assoziierten Motorproteinen wird laufend umgebaut und treibt die Zelle voran. Entscheidend beeinflusst wird die Zellarchitektur dabei durch Genprodukte wie etwa Proteinkinasen, welche die Dynamik des Zytoskeletts regulieren (Nadarajah, 2002).

Neuronale Migration findet im gesamten Nervensystem statt, ist jedoch am besten untersucht für die Entstehung des zerebralen Kortex. Man unterscheidet drei Typen neuronaler Migration. Die bekannteste ist die **radiale Migration**: hier wandern neuronale Vorläuferzellen entlang radialer Gliazellen, ausgehend von der ventrikulären Zone, in Richtung der Pia in den entstehenden zerebralen Kortex ein. Ähnliches ist auch für das Cerebellum beschrieben, wo während der Entwicklung Zellen aus der proliferativen äußeren Schicht in die innen liegende Granulärzellenschicht einwandern (Rakic, 1971). Wegen der engen Assoziation von Dendriten, Zellkörper und nachfolgenden Fortsätzen mit radialen Gliafasern wird dieser Typ auch gliophile Migration genannt. Das eng anliegende Gleiten der neuronalen Vorläufer auf den radialen Gliafasern ist als Lokomotion beschrieben: Die Länge des vorantastenden Auslänglers bleibt konstant, Zellsoma und Ausläufer bewegen sich synchron vorwärts (Hatten, 1990).

Sobald die Zellen mit der Spitze ihres Auslänglers die Pia erreicht haben, verkürzt und verdickt sich dieser und zieht den Zellkörper nach (nukleäre Translokation), der nachfolgende Ausläufer verlängert sich. Nukleäre oder somale Translokation, also die saltatorische Fortbewegung des Zellkörpers durch Verkürzen voranschreitender Zellanteile, wie sie am Ende der radialen Migration beobachtet wird, dominiert auch in den frühen Phasen der Gehirnentwicklung. Man glaubt, dass zu dieser Zeit der Kortex noch dünn genug ist, um den einwandernden Zellen ein Anheften an die Pia zu ermöglichen, während ihr Zellkörper noch in der ventrikulären Zone liegt; beobachtet werden kann somale Translokation z.B. während der Ausbildung der frühen Marginalzone (Nadarajah, 2001). Schlüsselposition im Aufbau der sechs Schichten des Kortex nimmt das Protein Reelin ein. Wie Studien an Mausmutanten gezeigt haben, scheint es für die korrekte Schichtung von innen nach außen essentiell zu sein (Rice, 1999; Rice, 2001).

Neben radialer kennt man **tangentielle Migration**, sie erfolgt parallel zur Gehirnoberfläche und etwa im rechten Winkel zu den glialen Fasern, die Spitze der migrierenden Zelle besitzt einen Wachstumskegel ähnlich dem axonalen Wachstumskegel (Marin, 2001a). Hier migrieren die späteren Interneurone des Kortex vom ventralen ins dorsale Telencephalon in einem saltatorischen Migrations-Modus durch Translokation ihrer Zellkerne. Auf den Weg gebracht werden diese neuronalen

Zellen vermutlich durch Gradienten von nur teilweise bekannten, sezernierten Substanzen wie Slit1 (Yuan, 1999; Zhu, 1999), Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF) (Powell, 2001) oder bestimmten Semaphorinen (Marin, 2001b). Da die Interneurone unabhängig von radialen Glia wandern, vermutete man als Substrat Axone oder das kortikofugale Fasersystem des sich entwickelnden Kortex; ihre Wanderung wird deshalb auch als „neurophil“ beschrieben (Gray, 1990; Metin, 1996).

„**Chain migration**“ nennt man die Wanderung neuronaler Vorläuferzellen von der SVZ durch den rostral-migratorischen Strom (RMS) zum Bulbus olfactorius (BO), wo sie zu GABAergen und dopaminergen Interneuronen der Granulär- und Periglomerulär-Zellschicht differenzieren (Luskin, 1993a). Die Zellen wandern im RMS als klar umgrenzter Zellstrang in einem Tunnel aus glialen Zellen und in engem gegenseitigem Kontakt, ohne ein gliales oder neuronales Gerüst zu benötigen (Doetsch, 1996). PSA-NCAM, die polysialisierte Form des Neuronalen Zell-Adhäsionsmoleküls, gilt als essentiell für diesen Vorgang (Hu, 2000), Slit wirkt offenbar als Chemorepellent (Wu, 1999), auch Netrin-1 und dessen Rezeptoren, Integrine und Reelin sollen beteiligt sein (Hack, 2002; Murase, 2002).

Radiale Migration, tangentielle Migration und „chain migration“ sind völlig unabhängig reguliert und unterscheiden sich z.B. in der Anwesenheit von axonalen Wachstumskegeln oder dendritischen Fortsätzen. Dennoch bewegt sich jede wandernde Zelle im Prinzip ähnlich vorwärts, lediglich die zeitliche Abstimmung der einzelnen Elemente (Vorstrecken von Ausläufern, Nukleokinesis und Nachziehen von zurückbleibenden Ausläufern) bewirkt scheinbar unterschiedliche Bewegungsabläufe: ein gleichmäßiges Gleiten aller Zellbestandteile oder die saltatorische Fortbewegung z.B. des Zellkerns (Nadarajah, 2002).

Der erste Schritt, das **Vorstrecken von Zellausläufern** geschieht überwiegend vermittelt durch Aktin-Mikrofilamente, deren Dynamik kontrolliert wird über GTPasen wie Rho, Rac und Cdc42 (Luo, 2002). Ohne funktionierendes Aktingerüst ist die Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien unmöglich, und damit auch jegliche Migration der Zelle (Rivas, 1995). Filamin 1, das die Membranproteine Integrin $\beta 1$ und $\beta 2$ mit Aktin vernetzt, gilt als essentiell für das Auswandern postmitotischer Neurone aus der ventrikulären Zone (Fox, 1999).

Der zweite Schritt, die **Translokation des Zellkerns**, auch Nukleokinesis genannt, erfolgt dagegen mit Hilfe von Mikrotubuli (MT). Im Detail ist es bei Säugern z.B. das Protein LIS1, welches unterstützt durch die Motorproteine Dynein und Dynaktin den Transport des Zellkerns entlang der MT-Fasern steuert (Wynshaw-Boris, 2001). Im letzten Schritt der Zellwanderung werden zurückbleibende **Ausläufer verkürzt** und in Wanderungs-Richtung nachgezogen, begleitet von einem Umbruch bezüglich verschiedener Zell-Zell-Kontakte.

1.4. Störungen der neuronalen Migration führen zu Fehlbildungen des Gehirns beim Menschen

Nicht immer gelingt es den neuronalen Vorläuferzellen während der Entwicklung, ihren vorbestimmten Platz einzunehmen. Sind ganze Gruppen von Zellen fehlerhaft oder nicht weit genug gewandert, können makroskopische Veränderungen am Aufbau des Gehirns resultieren, die auch Heterotopien genannt werden: fehlgeleitete Zellen sammeln sich an Stellen außerhalb ihrer eigentlichen Zielregion, was zu Epilepsie sowie einer verlangsamten geistigen Entwicklung führen kann. Der folgende Überblick ist auf Fehlbildungen (Malformationen) des Gehirns beschränkt, welche auf einer gestörten Wanderung neuronaler Vorläuferzellen beruhen. Häufige Auslöser dieser Migrationsstörungen sind Defekte an den für Migration verantwortlichen Genen. Anhand solcher Mutationen hat man in den vergangenen Jahren eine Vielzahl neuronaler Migrations-assozierter Gene entdeckt. Diese sind – neben der diagnostischen Bedeutung für die jeweiligen Patienten – wichtige Kandidaten, wenn es um die Identifizierung von Neurogenese-Regulatoren und -Markern geht.

Seit der zunehmenden Verbreitung leistungsstarker Bildgebung auf der Basis von Magnet-Resonanz diagnostiziert man neuronale Migrationsstörungen häufiger, ca. 25% der Epilepsie-Fälle bei Kindern und Erwachsenen werden auf sie zurückgeführt (Pilz, 1998). Tabelle 1.1. fasst die neuronalen Migrationsstörungen und die an ihrer Entstehung beteiligten Gene zusammen.

| Defekt / Phänotyp | Störung betrifft ... | Gen + (locus) | Erbgang | Funktion d. Proteins |
|--|--|---|--|---|
| periventrikuläre noduläre Heterotopie | ...den Beginn der Migration | <i>Filamin 1</i> (Xq28) | X-chromosomal | Aktin-Bindeprotein |
| klassische Lissenzephalie und Doublecortex | ...das Fortsetzen der Migration | <i>LIS1</i> (17p13.3) <i>Doublecortin</i> (Xq22.3-q23) | <i>LIS1</i> autosomal dominant; <i>Doublecortin</i> : X-chromosomal | bindet an Mikrotubuli |
| Lissenzephalie mit verkleinertem Cerebellum | ...das Eindringen neuronaler Vorläufer in frühe Marginalzone | <i>RELN</i> (7q22) | autosomal rezessiv | extrazelluläres Signal für Neurone |
| Cobblestone-Lissenzephalie | ...das Ende der Migration | <i>Fukutin</i> (9q31-33) | autosomal rezessiv | extrazelluläres Signal für Neurone |
| X-chrom. Lissenz. mit abnormen Genitalien (XLAG) | ...? (genaue Rolle von ARX noch unklar) | <i>ARX</i> (Xq22.12) | X-chrom. | Homeobox-Gen, evtl. TF für GABAerge Differenzierung |

Tabelle 1.1. Überblick neuronaler Migrationsstörungen beim Menschen in zeitlicher Reihung, abhängig davon, welche Phase der Migration beim jeweiligen Krankheitsbild betroffen ist. Aufgeführt sind Gene, deren fehlerhafte Expression beim Menschen mit den jeweiligen Störungen assoziiert wurde.

Man kann genetisch bedingte Malformationen danach einteilen, zu welchem Zeitpunkt des Wanderungsprozesses die Störung eintritt. In Fällen der periventrikulären nodulären Heterotopie ist durch eine Mutation im X-chromosomal kodierten **Filamin-1**-Gen schon die Initiation der Migration von Neuronen-Vorläufern unterbunden (Fox, 1998). Bei betroffenen weiblichen Föten beginnen lediglich jene Zellen in den Kortex einzuwandern, welche im Rahmen der Mosaik-Bildung das X-Chromosom mit dem mutierten Allel stillgelegt haben. Vorläuferzellen, in denen das defekte Genprodukt exprimiert wird, sammeln sich unmittelbar im Bereich der Ventrikelwand („periventrikulär“) an, um dort runde „Knoten“ (lat. nodi) zu bilden (Abb. 1.5 B). Betroffene Frauen entwickeln häufig als junge Erwachsene Epilepsie, vererben sie das defekte Allel an ihre hemizygoten Söhne, so sterben diese während der Entwicklung (Huttenlocher, 1994). Filamin A, das 280 kD umfassende Protein zum *Filamin-1*-Gen, quervernetzt Membranproteine mit Aktin und ist deshalb essentiell für Migration.

Sobald Neuronen-Vorläufer die ventrikuläre Zone verlassen, müssen sie mehrere hundert Zell-Längen weit in die kortikale Platte einwandern. Bei der Lissenzephalie,

ist diese Wanderung nur teilweise ausgeprägt, Ergebnis ist ein nur aus vier statt sechs Schichten bestehender, verdickter Neokortex mit mehr oder weniger glatter Oberfläche (Agyrie/Pachygyrie), wobei die meisten Zellen sich in der vierten, äußeren Schicht ansammeln (Abb. 1.5 D) (Jellinger, 1976). Assoziiert wird diese klassische Form der zerebralen Fehlbildung mit Defekten in den Genen **LIS1** (Reiner, 1993) und **Doublecortin** (Gleeson, 1998).

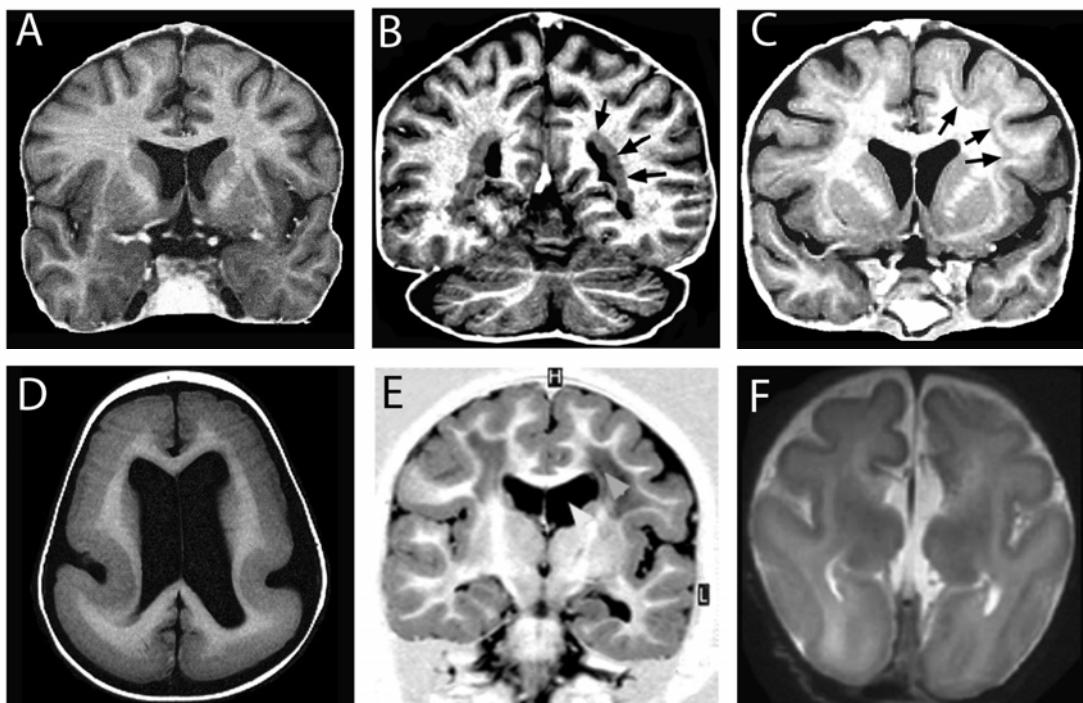


Abb. 1.5. MRT Aufnahmen neuronaler Migrationsstörungen und assoziierte Gene. Schwarze Pfeile markieren die Lage heterotoper Neurone. A) normales Gehirn B) perinoduläre Heterotopie (*Filamin 1*) C) Doublecortex-Syndrom (*Doublecortin*) D) Lissenzephalie (*Doublecortin*, *LIS1*, *RELN*) E) Cobblestone-Lissenzephalie (z.B. *Fukutin*) F) XLAG (*ARX*).

LIS1 ist auf Autosom 17 zu finden und kodiert die α -Untereinheit der Platelet-Activating Factor Acetylhydroxylase (PAFAHIBI). Bereits ein defektes Allel – entsprechend einer 50%igen Reduzierung des LIS1-Spiegels – führt zum Phänotyp der Lissenzephalie (Abb. 1.5 D) (Gleeson, 2000a). Dabei ist die pathophysiologische Bedeutung der PAFAHIBI für die Lissenzephalien noch ungeklärt (Dobyns, 1993; Hattori, 1994). LIS1 soll jedoch funktionell regulierend auf den Umbau des Zytoskeletts wirken und so die Zellwanderung beeinflussen (s. auch Kap. 1.6.).

Das **Doublecortin**-Gen ist wie *Filamin 1* auf dem X-Chromosom kodiert. Beschrieben sind Missense-, Nonsense- und Splice-Mutationen sowie Deletionen und Insertionen. Betroffene Frauen, welche zwei Kopien des *Doublecortin*-Gens tragen,

sind meist heterozygot für eine Mutation. Als Folge einer zufälligen Stilllegung eines der beiden X-Chromosome im Leben einer Zelle, exprimiert ein Teil der Neuroblasten das gesunde Allel. Diese Zellen wandern während der Embryonalentwicklung regelgerecht, die sechs Schichten des Kortex können sich ungehindert ausbilden, auch die Gyrierung der Kortexoberfläche ist normal. Wenn Neuroblasten dagegen das kranke Allel exprimieren, so verbleiben sie in der weißen Substanz auf halber Strecke zwischen ventrikulärer Zone und Kortex (Barkovich, 1994). Dies resultiert in einem zusätzlichen Band grauer Substanz in der zentralen weißen Substanz und wird als subkortikale Bandheterotopie bezeichnet (Double-Cortex-Syndrom, Abb. 1.5 C).

Die betroffenen Frauen leiden typischerweise beginnend mit der Pubertät unter Epilepsie, haben zum Teil eine leicht verzögerte geistige Entwicklung, oder aber die zerebrale Migrationsstörung bleibt klinisch inapparent. Meist korreliert die Dicke des heterotopen Bands mit der Schwere der Symptome. *Doublecortin*-Mutationen bei Männern, welche nur ein X-Chromosom tragen, sind nur limitiert vom Phänotyp eines *LIS1*-Defektes zu unterscheiden (Abb. 1.5 D). Die Betroffenen zeigen eine Lissenzephalie mit glatter Gehirnoberfläche ohne Gyrierung und den nur rudimentär geschichteten Kortex. Die geistige Entwicklung dieser Patienten ist stark verlangsamt und sie leiden meist unter einer schweren Epilepsie (des Portes, 1998a; des Portes, 1998b; Gleeson, 1998). Andererseits können auch Männer vom Doublecortex-Syndrom betroffen sein, wenn die *DCX*-Mutation als somatisches Mosaik vorliegt (Aigner, 2003; Kato, 2001; Poolos, 2002). Die unterschiedlichen Ausprägungsformen identischer Mutationen ergeben sich aus der X-chromosomalen Kodierung des *Doublecortin*-Gens und werden unter dem Überbegriff Lissenzephalie / Subkortikale Bandheterotopie Spektrum zusammengefasst.

Darüber hinaus sind Lissenzephalien mit verkleinertem Cerebellum beschrieben (Farah, 1997; Hourihane, 1993), die oft auf Mutationen im Gen ***RELN*** beruhen (Hong, 2000). Das Gen kodiert mit 65 Exons (10 kbp genomische Sequenz) die 3461 Aminosäuren (AS) des Proteins Reelin. Das Glycoprotein Reelin wird von den Cajal-Retzius Zellen im äußeren Kortex sezerniert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Beendigung der Migration (Hartfuss, 2003). Bei einem *RELN*-Defekt ist – bei glatter Gehirnoberfläche – die kortikale Schichtung umgekehrt, später eintreffende

Neurone können nicht durch die zuvor angekommenen Zellen hindurchwandern, auch das initiale Aufspalten der Marginalzone wird verhindert (Abb. 1.5 D).

Die korrekte Beendigung der Migration ist im Fall der **Cobblestone-Lissenzephalien** gestört. Sie zählen zu den Lissenzephalien, bei denen neben Gehirn-Malformationen oft auch Defekte an Muskulatur und Augen auftreten (Fukuyama, 1981; Lichtig, 1993; Santavuori, 1989). Mutationen an verschiedenen, autosomal rezessiv vererbten Genen können für diese Erkrankungen verantwortlich sein; beschrieben ist z.B. die Fukuyama-Kongenitale-Muskeldystrophie (**Fukutin-Gen**) (Saito, 2000), die „Muscle-Eye-Brain“-Erkrankung (*POMGnTI*-Gen) (Yoshida, 2001) oder das Walker-Warburg-Syndrom (*POMTI*-Gen) (Beltran-Valero de Bernabe, 2002). Den Neuronen fehlt im Fall der Cobblestone-Lissenzephalien auf ihrer Wanderung gleichsam das Stopp-Signal, sie durchstoßen stattdessen die Pia und lagern sich außerhalb an, was zur Pflasterstein (*engl. cobblestone*) -artigen Oberfläche führt (Abb. 1.5 E) (Gelot, 1995; Squier, 1993).

Eine andere Form der Lissenzephalie, welche mit Fehlbindungen an Genitalien einhergeht, wird **XLAG** (X-linked lissencephaly with abnormal genitalia) genannt. Den ausschließlich männlichen Patienten fehlt das Corpus callosum, die Ventrikel sind vergrößert und der Kortex ist leicht verdickt (Abb. 1.5 F). Auch hier tritt – oft schon intrauterin – Epilepsie auf, die Temperatur-Regulation der Patienten kann gestört sein (Dobyns, 1999). Mutationen im X-chromosomal kodierten, dem aristaless Gen aus *Drosophila* verwandten Homeobox Gen **ARX**, wurden mit diesem Krankheitsbild assoziiert (Kitamura, 2002; Uyanik, 2003). Es kodiert mit 5 Exons für 1688 bp und ist als Transkriptionsfaktor für die GABAerge Differenzierung wichtig (Colombo, 2004; Kitamura, 2002).

1.5. Das *Doublecortin(DCX)*-Gen

Das Krankheitsbild der X-chromosomal dominanten Fehlbildung, welches bei betroffenen Männern Lissenzephalie mit schwerer Epilepsie und geistiger Retardierung hervorruft, bei Frauen einen deutlich milderden Verlauf nimmt und von einer "Doublecortex" genannten subkortikalen Bandheterotopie begleitet ist, war bereits in vielen Familien beobachtet worden (Barkovich, 1994; Palmini, 1991). Schließlich wurde 1998 durch zwei unabhängige Gruppen das dazugehörige Gen (des Portes, 1998a; Gleeson, 1998) auf dem X-Chromosom in der Region Xq22.3-q23 lokalisiert und *Doublecortin* oder kurz *DCX* genannt.

| | genomische Sequenz | mRNA | Protein |
|------------------------------------|---------------------------------------|--|---|
| <i>Homo sapiens</i> (H.s.) | 118.399 bp LocusLink Xq22.3-q23 | Var. 1: 9.406 bp Var. 2: 9.069 bp Var. 3: 2.222 bp Var. 4: 9.122 bp | Var. 1: 441 AS Var. 2: 356 AS Var. 3: 360 AS Var. 4: 360 AS |
| PubMed# | NT_025319 (2480067-2598466) | Var. 1: NM_000555 Var. 2: NM_178152 Var. 3: NM_178153 Var. 4: NM_178151 | Var. 1: NP_000546 Var. 2: NP_835365 Var. 3:AAH27925 Var. 4: NP835364 |
| <i>Mus musculus</i> (M.m.) | 69.592 bp LocusLink XF2 | 8.982 bp (Var. 2: 4.011 bp Var. 3: 4.102 bp Var. 4: 4.102 bp) | 360 AS (Var. 2: 365 AS Var. 3: 365 AS Var. 4: 365 AS) |
| PubMed# | NT_039718 (2702653-2772244) | NM_010025 BC056391 BC062974 BC057010 | NP_034155 AAH56391 AAH62974 AAH57010 |
| <i>Rattus norvegicus</i> (R.n.) | 68.709 bp LocusLink Xq14 | 8.814 bp | 365 AS |
| PubMed# | NW_048037 (5118640-5187348) | NM_053379 | NP_445831 |

Tabelle 1.2. Zusammenfassung der Genbank-Zugangsdaten sowie der Sequenzgrößen des *DCX*-Gens aus Mensch, Maus und Ratte.

Das *DCX*-Gen besteht beim Menschen aus neun Exons, welche zusammen eine mRNA von rund 9,5 Kilobasen (kb) kodieren, die genomische Sequenz ist ca. 118,4 kb lang. Auffällig ist die ca. 7 kb lange, untranslatierte Region im Exon 9, welche möglicherweise die Stabilität der mRNA beeinflusst (des Portes, 1998b). Auch die *Doublecortin*-Gene der Maus und der Ratte wurden kloniert (Sossey-Alaoui, 1998); (Bai, 2003). Beide zeigen hohe Homologie zur humanen Sequenz, auf mRNA-Ebene beträgt diese Homologie 81% (Ratte) bis 90% (Maus), auf Protein-Ebene sogar rund

98 % (basierend auf NCBI Blast) (eigene Daten, s. Kap. 4.1). Die Datenbank-Zugangscodes (PubMed) der bezüglich des *Doublecortin*-Gens für die Spezies Mensch, Maus und Ratte veröffentlichten Sequenzen sind in Tabelle 1.2. zusammengefasst.

Unbekannt war bisher der genaue Transkriptions-Start des DCX-Proteins in den verschiedenen Spezies, lückenhaft auch das Wissen bezüglich alternativen Splicings. Lediglich für das humane Gen gab es Hinweise auf alternatives Splicing der ersten drei nicht kodierenden Exons mit dem ersten kodierenden Exon (Exon 4) (Strausberg, 2002), nicht jedoch für die Transkripte aus Maus und Ratte.

Der am häufigsten benutzte Translationsstart liegt beim Menschen im Exon 4, es gibt jedoch ein weiteres Startkodon im Exon 3. Wird dieses strangauflärts liegende Startkodon verwendet, verlängert sich das Protein am N-Terminus um 42 AS. Inwieweit dieser alternative Translationsstart auch relevant ist, bleibt derzeit unklar. Bei Maus und Ratte fehlt offenbar das zum Exon 3 des Menschen homologe Exon (eigene Daten, s. Kap. 4.1). Der einzige bislang bekannte Translationsstart liegt bei Maus und Ratte auf dem zum Exon 4 des Menschen homologen Exon.

1.6. Das Protein Doublecortin und die DCX-Domänen

Die Sequenzen der DCX-mRNA von Mensch, Maus und Ratte kodieren ein stark hydrophiles, basisches Protein von rund 360 AS, beim Menschen eventuell N-terminal verlängert um 42 AS (s. Kap. 1.5.). Der isoelektrische Punkt liegt bei 10. Rechnerisch ergibt sich aus der AS-Sequenz eine Größe von 40 kD für das Protein, im Western Blot stellt es sich bei 45 bis 55 kD dar. Datenbank-Zugangscodes und weitere Informationen für das DCX-Protein bezüglich der Spezies Mensch, Maus und Ratte sind in Tabelle 1.2. zusammengefasst.

Man hatte *Doublecortin*-Mutationen in Fällen neuronaler Migrationsstörungen beobachtet und so schließlich auch das Gen kartiert. Die offenkundige Bedeutung für die Wanderung neuronaler Vorläuferzellen ließ Spekulationen über die Funktion des Proteins zu; man vermutete einen Zusammenhang mit dem Zytoskelett. Tatsächlich fand man **Kolokalisation von Doublecortin und dem MT-Netzwerk** in kultivierten kortikalen Neuronen – eine Wechselwirkung, die zerstört werden konnte, sobald man das MT-Netzwerk mittels Colchicin depolymerisierte (Gleeson, 1999a). Dass es sich

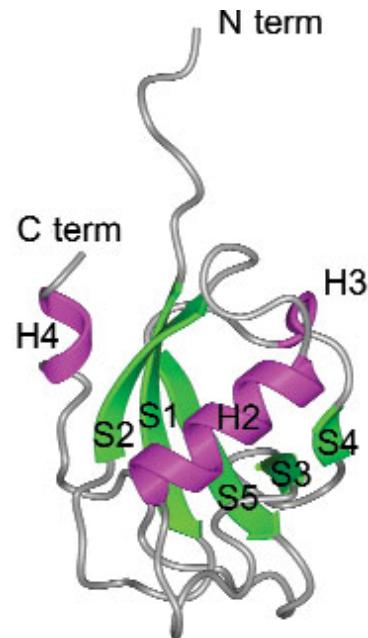
hierbei um echte Wechselwirkung zwischen Doublecortin und MT und nicht nur um Kolokalisation handelte, konnte an zytosolischen Extrakten aus Gehirn-Gewebe gezeigt werden (Gleeson, 1999a). Doublecortin sedimentierte aus diesen Extrakten gemeinsam mit MT-Fraktionen. Doublecortin war darüber hinaus in der Lage, als rekombinant hergestelltes, aufgereinigtes Protein *in vitro* MT zu bündeln und zu stabilisieren, und zwar in direkter Wechselwirkung ohne zusätzliche Bindungspartner (Francis, 1999). Auch DCX-Mutanten können MT bündeln, was auf eine breitere Bedeutung des DCX-Proteins für die neuronale Migration über das MT-Bindeverhalten hinaus verwies (Horesh, 1999; Taylor, 2000a; Yoshiura, 2000).

Doublecortin wurde zunächst den MT-assoziierten Proteinen (MAPs) zugeordnet. Allerdings ergab die Protein-Sequenz keine Homologie zu anderen MAPs, man fand stattdessen eine **neuartige Bindestelle für MT**: Doublecortin besitzt zwei dieser „DCX-Domäne“ genannten MT-Bindestellen, die als Tandem zwischen den AS-Resten 47 bis 135 sowie 174 bis 259 angeordnet sind (Kim, 2003). Die beiden je ca. 90 AS langen Domänen sind in ihrer AS-Zusammensetzung zu 27% identisch und zu 47% konserviert (Taylor, 2000a). Die überwiegende Zahl der bei Patienten gefundenen Mutationen auf dem *DCX*-Gen liegen im Bereich dieser MT-Bindedomänen (Sapir, 2000; Taylor, 2000a). Neben dem 30 kD großen N-terminus mit den beiden je 11 kD großen MT-Bindedomänen besitzt DCX noch einen Serin-Prolin-reichen C-Terminus, der für das Binden an MT nicht benötigt wird, jedoch mit Clathrin-assoziierten Proteinen sowie mit verschiedenen Protein-Kinasen interagiert (Friocourt, 2001; Gdalyahu, 2004; Tanaka, 2004).

Struktur-Untersuchungen an rekombinant herstelltem Protein führten zu der Entdeckung, dass DCX-Domänen große Struktur-Verwandtschaft mit den GTPase-bindenden Ubiquitininen haben. Die N-terminale Domäne des DCX-Proteins beispielsweise setzt sich zusammen aus einem gemischten β -Blatt bestehend aus fünf β -Strängen sowie einer grossen α -Helix, die in die konkave Öffnung des β -Blatts eingefügt ist. Begrenzt wird die Struktur durch zwei weitere 3_{10} -Helices (Abb. 1.6) (Kim, 2003). Vergleichbare Faltungsmuster finden sich bei Ubiquitininen wie z.B. der Ras-Bindedomäne von RalGDS (Huang, 1998). Da zwischen Mitgliedern der DCX-Familie und der Ubiquitin-Familie keine signifikante Übereinstimmung in der Protein-Sequenz besteht, ist ein gemeinsamer Ursprung der beiden Familien unwahrscheinlich.

Ubiquitine sind GTPase bindende Proteine, und auch Tubulin besitzt GTPase-Eigenschaften, woraus sich vermutlich die strukturelle Verwandtschaft zwischen DCX-Domänen und Ubiquitin erklärte (Kim, 2003).

Abb. 1.6. Sekundär-Struktur der humanen N-terminalen DCX-Domäne. grün: β -Blatt, violett: α -Helix., Erläuterungen s. Text aus Kim et al., 2003



Die Interaktion von Doublecortin mit Tubulin wurde an aufgereinigten Proteinen *in vitro* studiert (Moores, 2004). Elektronenmikroskopie zur Protein-Protein-Wechselwirkung ergab, dass DCX spezifisch an die natürlicherweise in Zellen vorkommenden, aus 13 Protofilamenten (PF) bestehenden MT-Fasern bindet und darüber hinaus die Entstehung eben dieser 13-PF-Fasern initiieren kann; der Serin-Prolin-reiche C-Terminus trägt wohl zur Spezifität der Bindung an genau diese Tertiärstruktur des Tubulins bei (Moores, 2004). Die Autoren konnten nachweisen, dass DCX – vermutlich mit der N-terminalen MT-Bindedomäne – in der Grube zwischen den einzelnen PFs an die MT-Fasern andockt und sie dadurch optimal stabilisiert. Hierbei handelt es sich um eine neuartige Interaktion mit MT, die bisher so für MAPs nicht beschrieben ist. Die C-terminale MT-Bindedomäne scheint nicht so eng an MT-Filamente gebunden und spielt wohl – dank ihrer Affinität zu Tubulin-Heterodimeren (Kim, 2003; Taylor, 2000a) – eine Rolle bei der Nukleation von MT-Fasern aus Tubulin-Untereinheiten.

DCX-Domänen, also die zuerst für das Doublecortin-Protein beschriebenen MT-Bindedomänen, fanden sich – charakteristischerweise im Tandem – auch auf anderen ZNS-spezifischen Genen (Abb. 1.7) wie der *Doublecortin like kinase* (*DCLK* oder

DCAMKL1) (Lin, 2000), auf dem *Retinitis Pigmentosa (RP1)*-Gen (Sullivan, 1999) sowie auf dem *Doublecortin-domain-containing-Gen-1 (DCDC1)* (Zeng, 2003).

DCLK ist ein stark konserviertes Gen, das während der Embryonalentwicklung des humanen Gehirns exprimiert ist. Es besitzt neben der MT-Bindedomäne eine Serin-Threonin-Kinase-Domäne; die genaue Funktion des Gens beim Menschen ist unbekannt (Burgess, 1999). Für das zu *DCLK* homologe Protein in *Caenorhabditis elegans*, ZYG-8, ist allerdings gezeigt, dass es während der Embryonalentwicklung MT bündeln und stabilisieren kann (Gonczy, 2001). Das *RP1*-Gen besitzt ebenfalls zwei DCX-Domänen und ist in 5 bis 10% der Fälle autosomal dominanter Retinopathien mutiert, einer Erkrankung, die zunächst zu Nachtblindheit, später zu völliger Erblindung führen kann (Sullivan, 1999). Kürzlich beschrieben wurde *DCDC1*, ein Protein das hauptsächlich im Hoden-Gewebe von Säugern aber auch im Gehirn anzutreffen ist, wobei die Expression im fötalen Gehirn stärker ist als im adulten (Zeng, 2003).

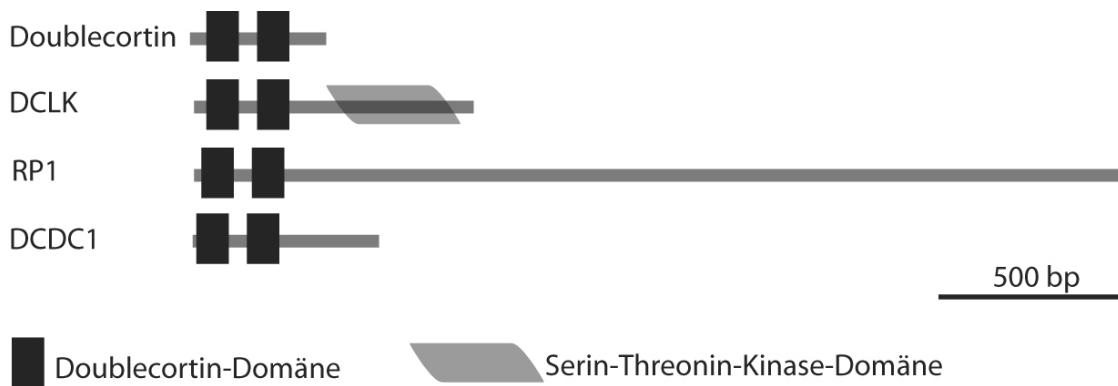


Abb. 1.7. Vorkommen von DCX-Domänen auf einigen eukaryonten Proteinen. Erläuterungen s. Text.

1.7. Doublecortin und dessen vermutete Rolle für die Signaltransduktion bei der neuronalen Migration

Doublecortin kann MT binden und stabilisieren und zählt deshalb zu den MT-assozierten Proteinen (MAPs). Arbeiten, in denen die Expression von DCX durch Knockout oder siRNA unterdrückt wurde, bestätigten die Bedeutung von DCX für die neuronale Migration (Bai, 2003; Corbo, 2002). Neben MT wurden in den letzten Jahren aber auch mehr und mehr alternative **Interaktionspartner** für Doublecortin entdeckt. Immer deutlicher wird auch das Bild bezüglich der Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen. Hieraus leitet sich die Hypothese ab, dass Doublecortin – reguliert durch das **Phosphorylierungsmuster** – die wandernde Nervenzelle durch die verschiedenen Phasen ihrer Metamorphose begleitet und regulierend auf die Morphologie der Zelle wirkt, mit anderen Worten in die Signaltransduktion junger Nervenzellen eingreift (Abb. 1.8) (Reiner, 2004).

Mutationen im **LIS1**-Gen beim Menschen verursachen Lissenzephalien, die nicht vom Bild einer *DCX*-assozierten Lissenzephalie zu unterscheiden sind. In der Maus beobachtete man beim Fehlen eines der beiden Gene in Knockout-Tieren identische Defekte in der Schichtung des Hippocampus (Corbo, 2002; Hirotsune, 1998). Wegen des übereinstimmenden Phänotyps der Knockout-Tiere vermutete man, dass die beiden Proteine interagieren könnten. Gemeinsam ist LIS1 und DCX die Fähigkeit, an MT zu binden, wenn auch die MT-Bindedomäne von LIS1 nicht strukturell mit der von DCX verwandt ist. Tatsächlich fand man bei der Untersuchung rekombinanter Proteins im Bereich der AS 52 bis 133 des DCX-Proteins eine Domäne, an der DCX zum einen homodimerisieren kann, zum anderen auch an LIS1 bindet. Beobachtet wurde außerdem eine erhöhte Affinität von LIS1 an MT, wenn diese zuvor an DCX gebunden hatten (Caspi, 2000).

Im Gegensatz dazu scheinen die beiden Proteine in neuronalen Vorläuferzellen unterschiedlich verteilt zu sein: LIS1 ist vor allem im Bereich des Zellsomas von proliferierenden wie post-mitotischen Neuronen anzutreffen; es scheint über die Interaktion mit dem Dynein-Motorprotein-Komplex sowie anderen Proteinen am Zentrosom an der Translokation des Kerns wandernder Zellen beteiligt zu sein (Gupta,

2002). Ausserdem fand man heraus, dass LIS1 vermittelt durch Dynein am vesikulären Transport retrograd aus den Zellausläufern hin zum Zellkern teilnimmt (Liu, 2000b).

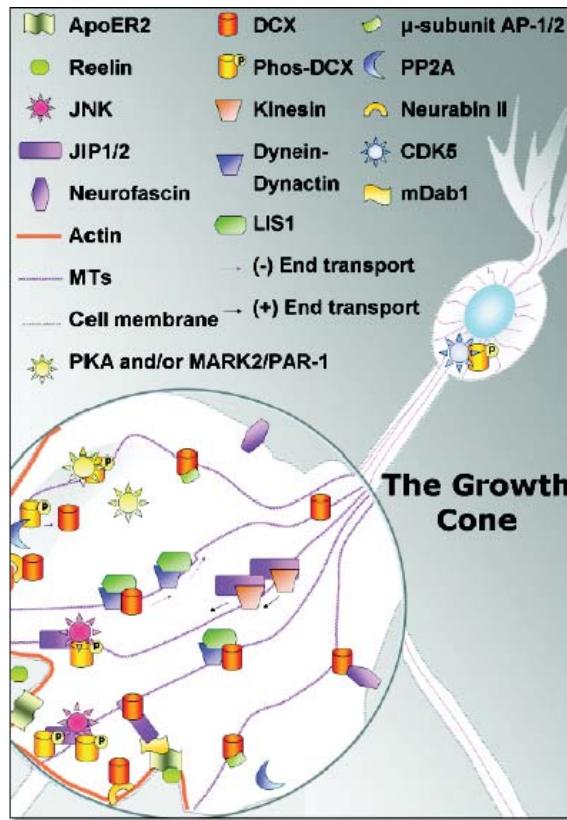


Abb. 1.8. Zusammenfassung der für Doublecortin postulierten Interaktionspartner in der jungen Nervenzelle. Erläuterungen s. Text. aus Reiner et al., 2004

Doublecortin dagegen wird streng reguliert und überwiegend in postmitotischen Neuronen exprimiert, nur vereinzelt fand sich Korrelation von DCX mit Zellteilungs-Markern wie Ki-67 (s. Kap. 4.2 und (Brown, 2003). Ähnlich wie LIS1 kann DCX jedoch offenbar den Transport von Vesikeln vermitteln: nachgewiesen ist die Interaktion von DCX mit $\mu 1$ und $\mu 2$. Letztere sind Untereinheiten der AP-1 und AP-2 Adaptor-Komplexe, welche für den Clathrin-vermittelten vesikulären Transport zwischen dem Golgi-Netzwerk und Endosomen essentiell sind. Als Bindestelle für $\mu 1$ und $\mu 2$ auf dem DCX-Protein wurde der Serin-Prolin-reiche C-Terminus identifiziert, und hier das Tetrapeptid YLPL (Friocourt, 2003; Schaar, 2004). Aufgabe von DCX in diesem Zusammenhang könnte es sein, an der Spitze wandernder Zellen die notwendige Anlagerung von Membranbestandteilen zu steuern oder aber auch – vermittelt über bestimmte Rezeptoren – eine gerichtete Migration der Zellen zu ermöglichen (Friocourt, 2003).

Ein möglicher, membranständiger Interaktionspartner von DCX ist das Transmembran-Protein **Neurofascin**. Es zählt zur Familie der L1 Zell-Adhäsions Moleküle aus der Immunglobulin-Superfamilie. Doublecortin und Neurofascin konnten aus Membran-Extrakten embryonalen Ratten-Gehirns gemeinsam immunpräzipitiert werden, und Neurofascin findet sich im Gehirn embryonaler Ratten genau wie Doublecortin vorwiegend in Regionen neuronaler Migration und ist hier in die Signaltransduktion eingeschaltet (Kizhatil, 2002).

Doublecortin wird während der Hirnentwicklung reguliert exprimiert und verändert seinen Phosphorylierungs-Zustand (Francis, 1999; Gleeson, 1999a). Verschiedene Studien weisen im übrigen darauf hin, dass Doublecortin abhängig vom Phosphorylierungs-Grad in seinen Bindeeigenschaften gegenüber MT verändert werden kann – mit möglicherweise regulierendem Einfluss auf die neuronale Migration. Zahlreiche Stellen auf der AS-Sequenz des DCX-Proteins eignen sich für die Phosphorylierung durch bestimmte Kinasen. So errechnete man z.B. für die nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase **cAbl** am Tyrosin 70 des DCX-Proteins einen möglichen Angriffspunkt (Matsumoto, 2001). Nachgewiesen ist darüber hinaus die Phosphorylierung von DCX am Serinrest 297 durch **Cdk5**, eine während der Hirnentwicklung reguliert exprimierte Kinase mit dem Kofaktor p35; Phosphorylierung durch Cdk5 senkte *in vitro* die Fähigkeit von Doublecortin, an MT zu binden (Tanaka, 2004).

Gemäß einer weiteren Untersuchung sollen die Serin-Threonin-Kinasen **Mark2** und **PKA** als Gegenspieler zur **Protein Phosphatase 2a** (PP2a) die Eigenschaften von DCX *in vitro* modulieren, wobei auch hier die Phosphorylierung von DCX dessen Affinität zu MT herabsetzte (Schaar, 2004). Die Autoren sehen in diesem Gleichgewicht aus Kinase und Phosphatase-Aktivität einen Mechanismus, mittels dessen DCX das Ausstrecken neuronaler Fortsätze in migrierenden und differenzierenden Neuronen regulieren könnte. Auch die Proteinkinase **JNK** phosphoryliert DCX an mindestens drei verschiedenen Stellen (Gdalyahu, 2004). Gemäß einer Hypothese der Autoren könnte DCX hier Baustein in einem größeren Signalkomplex sein, der von einem oder mehreren Stützproteinen zusammengehalten wird; tatsächlich fand man Interaktion von DCX mit **JIP1** und **JIP2**, welche mit der JNK-Kinase interagieren.

Zwischen Aktin-Fasern oder Neurofilamenten und Doublecortin gibt es offenbar keine direkte Assoziation in der Immunhistologie (Gleeson, 1999a). Nachgewiesen wurden allerdings indirekte Wechselwirkungen über zusätzliche Proteine wie das F-Aktin Bindeprotein Neurabin II, welches eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von dendritischen Fortsätzen spielt (Tsukada, 2003).

1.8. Expression von Doublecortin bei der Embryonalentwicklung

Die Expression von Doublecortin korreliert während der Embryonalentwicklung des Menschen mit der Wanderung neuronaler Vorläuferzellen. Das Protein ist zu diesem Zeitpunkt spezifisch im ZNS, vor allem im Gehirn, weit verbreitet. Vor der Geburt findet man es darüber hinaus sowohl beim Menschen als auch beim Nager im Rückenmark, jedoch nicht in anderen Organen oder im Muskel (Francis, 1999; Mizuguchi, 1999; Qin, 2000).

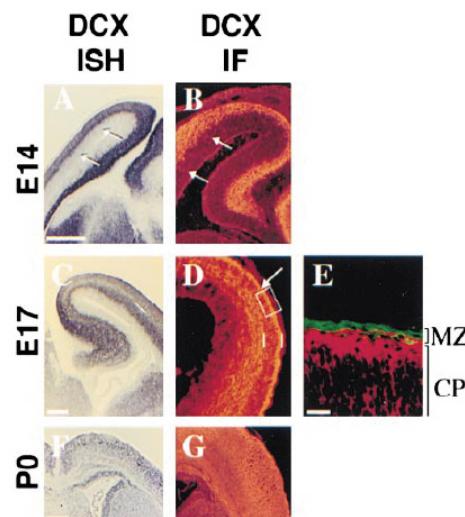


Abb. 1.9. Expression von Doublecortin im embryonalen Kortex der Maus. Expression von DCX in postmitotischen Neuronen des sich entwickelnden zerebralen Kortex der Maus. (A und B) Doublecortin wird zuerst in der Subventrikulär- und Intermediärzone (Pfeile) exprimiert, hier gezeigt mittels *in situ* Hybridisierung (ISH) und Immunfluoreszenz (IF) am Sagittalschnitt zum Embryontag (E) 14. Auch an E17 findet sich starke Expression, gezeigt im Koronarschnitt für den sich entwickelnden Kortex, mit der höchsten Expression unter und an der Außengrenze der kortikalen Platte (C und D) sowie schwächerer Expression in tieferen Schichten der kortikalen Platte und damit in Zellen, die ihre Wanderung bereits zuvor beendet haben. (E) zeigt einen Ausschnitt aus D in höherer Auflösung mit DCX- (rot) und Reelin-Immunoreaktivität (grün), wobei Reelin in Cajal-Retzius Neuronen der Marginalzone (MZ) exprimiert ist, und DCX in der kortikalen Platte (CP) mit stärkerer Expression in den äußeren Bereichen. (F) und (G) zeigen die deutlich reduzierte DCX-Expression am Postnataltag (P) 0 im Koronarschnitt. Mess-Skala 250 µm (A–D), 50 µm (E), 500 µm (F und G). aus Gleeson et al., 1999

Doublecortin ist bereits in der **6. Schwangerschaftswoche beim Menschen**, beginnend mit der Ausbildung der frühen Marginalzone, immunhistologisch

nachzuweisen (Meyer, 2002). Man fand es in den neuroepithelialen Zellen der Ventrikulärzone und in der neu entstehenden kortikalen Platte (Qin, 2000). Die stärkste Expression war mit der Phase kortikaler Migration assoziiert (12. bis 20. Woche); sobald die meisten Neurone ihre Wanderung beendet hatten (bis zur 28. Woche), nahm die Expression des Proteins ab (Meyer, 2002; Qin, 2000). In Studien zur Gehirnentwicklung bei **Mäusen** hatte man gesehen, dass DCX ab dem Embryonaltag (**E**) **10,5** schwach im Neuroepithel exprimiert ist, ab E 11,5 bis in die frühe postnatale Phase war das Protein im gesamten Gehirn und auch im Rückenmark und den dorsalen Wurzelganglien stark exprimiert (Francis, 1999).

Besonders deutliche DCX-Immunoreaktivität in der Maus fand man während der sogenannten terminalen Migration, der Phase, in der sich die im äußersten Kortex angekommenen Zellen von den radialen Glia lösen und ihre Wanderung beenden (Abb. 1.9) (Gleeson, 1999a); vergleichbares beobachtete man auch beim Menschen (Meyer, 2002). Die jungen Neurone scheinen den letzten Schritt durch die obere Kortexschicht unabhängig von radialen Glia durch Translokation des Zellkörpers durchzuführen. Vermutet wird, dass DCX in dieser Phase nötig ist, um Veränderungen am MT-Netzwerk zu steuern (Meyer, 2002).

DCX kann darüber hinaus in tangentiall wandernden Neuronen, welche unabhängig von glialen Stützzellen migrieren, detektiert werden. DCX kann die Dynamik von MT spezifisch regulieren und ist für die tangentiale Migration und die Wanderung unabhängig von radialen Gliazellen unerlässlich (Meyer, 2002).

1.9. Doublecortin als Marker für die adulte Neurogenese

Im Säuger-Gehirn werden während der Embryonalentwicklung große Mengen an Nervenzell-Vorläufern gebildet und mittels fein regulierter Stimuli an ihren Zielort herangeführt. Im Vergleich dazu ist im erwachsenen Gehirn, z.B. der Nager, die Fähigkeit zur **Nervenzell-Neubildung** deutlich eingeschränkt. Sie ist auf eng umgrenzte Gebiete wie den Gyrus dentatus des **Hippocampus** und die **SVZ** reduziert, kann jedoch durch verschiedene Stimuli angeregt werden. Hierzu gehören das vermehrte Absterben von Nervenzellen als „negativer Reiz“ einerseits, aber auch „positive Reize“ wie körperliche Aktivität, abwechslungsreiche Umgebung oder auch bestimmte Wachstumsfaktoren wie FGF-2, IGF-1, VEGF oder Erythropoetin (Aberg,

2000; Dash, 2001; Jin, 2002; Kempermann, 1997; Kuhn, 1997; Liu, 1998; Parent, 1997; Shingo, 2001; van Praag, 1999a).

Während im Hippocampus neu gebildete Neurone ihren Entstehungsort kaum verlassen, wandern postmitotische Zellen aus der SVZ des Nagerhirns als neuronale Vorläuferzellen entlang des RMS weite Strecken in den BO, wo sie als Interneurone dienen (Alvarez-Buylla, 1997). Auf dem Weg in den BO exprimieren junge Neurone Doublecortin, aber auch hippocampale Neurogenese korreliert mit DCX-Expression (Abb. 1.10).

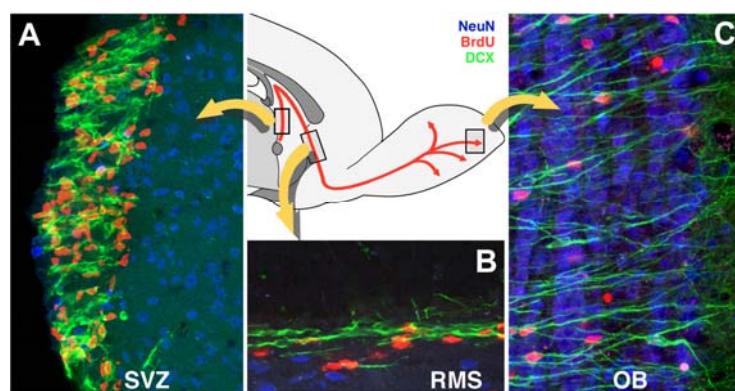


Abb. 1.10. Expression von Doublecortin während adulter Neurogenese in der Ratte. Expression von Doublecortin (grün) in (A) der Subventrikulärzone (SVZ), (B) im rostral-migratorischen Strom (RMS) und (C) im Bulbus olfactorius (OB), zusammen mit BrdU (Basenanalogen) (rot) zu verschiedenen Zeitpunkten nach BrdU-Applikation. NeuN (blau) markiert adulte Neurone. Das Schema im Zentrum verweist auf die anatomische Position der Bildausschnitte. Hier nicht gezeigt: Doublecortin-Expression korreliert in der adulten Ratte auch mit der Neuentstehung von Nervenzellen im Hippocampus. aus Brown et al., 2003

Untersuchte man den zeitlichen Zusammenhang zwischen Doublecortin-Expression und Zell-Neubildung in adulten Ratten (Brown, 2003; Rao, 2004), so zeigte sich, dass Doublecortin **transient** in migrierenden und post-mitotischen neuronalen Vorläuferzellen exprimiert ist, wobei die Expression zwei Wochen nach Entstehung der Zellen (detektiert über den Einbau des Basen-Analogons Bromodesoxy-Uridin (BrdU) in die genomische DNA) am höchsten war. Etwa 90% der zwei Wochen zuvor BrdU-markierten Zellen exprimierten zu diesem Zeitpunkt DCX, während nach einem Monat kaum noch Doublecortin in den zuvor gebildeten Zellen nachweisbar war, und stattdessen adulte neuronale Marker wie NeuN mit BrdU korrelierten (Brown, 2003). Wie auch andere Untersuchungen mit täglichen BrdU-Injektionen während 12 Tagen gezeigt haben, sind offenbar rund 90% der Doublecortin exprimierenden Zellen neu gebildete Zellen (Rao, 2004). Doublecortin

korreliert darüber hinaus mit frühen neuronalen Antigenen, ist jedoch nicht in glialen oder undifferenzierten Zellen zu finden (Brown, 2003; Rao, 2004; Steiner, 2004).

Wenn Nervenzellen vermehrt absterben – ausgelöst beispielsweise durch eine Ischämie oder Epilepsie – ist die Neurogenese-Rate des adulten Gehirns gesteigert (Gould, 1997; Snyder, 1997). Beobachtet wurde auch, dass neu gebildete Nervenzellen dann zum Teil von ihren üblichen Pfaden wie etwa dem RMS abwichen und stattdessen auf die Läsion zusteuerten; dabei exprimierten sie DCX (Lois, 1994; Lois, 1996; Luskin, 1993b).

Nachdem man in Neuronen des Kortikothalamus von Mäusen **Apoptose** induziert hatte, waren wenig später neuronale Verknüpfungen in diesem Gebiet wiederhergestellt, wobei die beteiligten Zellen das Basen-Analogon BrdU inkorporiert hatten und Doublecortin exprimierten; neu entstandene Neurone waren offenbar aus der proliferativen Zone in der Ventrikelwand zur Läsion gewandert (Magavi, 2000). Induzierte man in Ratten durch die Gabe von Pilocarpin-Hydrochlorid **Epilepsie**, fand auch dann Gewebs-Untergang und anschließend vermehrt Neurogenese statt, neuronale Vorläuferzellen wurden vom RMS abgelenkt und wanderten in Richtung des läsionierten Kortexgebiets (Parent, 2002).

Durch den vorübergehenden Verschluss der mittleren Gehirn-Arterie (A. cerebri media) kann bei Ratten eine **Ischämie** mit anschließendem Gewebsuntergang induziert werden. In solchen Versuchen wurde eine Zunahme von Neurogenese über den vermehrten Einbau von BrdU in Zellen sowohl der SVZ als auch des RMS und des Hippocampus detektiert; neu entstandene Zellen exprimierten DCX (Jiang, 2001; Jin, 2001). Gerichtete Migration neuronaler Vorläuferzellen zu den geschädigten Arealen in Kortex oder Striatum war gekoppelt mit DCX-Expression, später fand man NeuN in diesen Zellen (Arvidsson, 2002; Jin, 2003; Nakatomi, 2002).

Wie in diesem und dem vorherigen Kapitel dargelegt, ist Doublecortin spezifisch während der Neuentstehung von Nervenzellen im embryonalen und adulten Organismus exprimiert. Somit ist DCX ein entscheidender Marker für junge Neurone und Neurogenese. Um diese Eigenschaft Doublecortins direkt nutzbar zu machen, befasst sich die vorliegende Arbeit mit einer funktionellen Analyse des *Doublecortin*-Promotors und mit der Verwendung des Promotors in Reportersystemen.

Reporterproteine sollten unter Kontrolle der – zunächst einzugrenzenden – *DCX*-regulatorischen Region exprimiert werden, um so den *DCX*-Promotor als ideales Werkzeug zur Identifizierung und Isolierung neuronaler Vorläuferzellen einer Anwendung zuzuführen. In den folgenden Kapiteln werden deshalb Aktuelles zu eukaryontischen Promotoren sowie die Grundlagen von Reportersystemen zusammengefasst.

1.10. Promotoren in proteinkodierenden Genen der Eukaryonten

Die Entwicklung eines Embryos aber auch die Ausbildung spezialisierter Zelltypen im adulten Organismus: beides bedarf der genauen Kontrolle von Genexpression in jeder einzelnen Zelle. Nur so kann – im Körper zeitlich und örtlich reguliert – die richtige Auswahl aus den mindestens 35.000 Genen des Menschen (McPherson, 2001; Venter, 2001) getroffen und in Protein umgeschrieben werden. Gene, welche die Information zur Herstellung von Proteinen tragen, werden bei Eukaryonten von der **RNA-Polymerase II (Pol II)** in primäre mRNA umgeschrieben. Start dieser Transkription ist der Promotor, ein Abschnitt genomischer DNA, der gegenüber Pol II gleichsam als Wegweiser für den Start des Gens dient. Essentiell ist neben Pol II eine Vielzahl von allgemeinen und spezifischen Transkriptionsfaktoren, welche das Enzym in seiner punktgenauen und gerichteten Tätigkeit unterstützen (Hahn, 2004).

Die Erkennung der Promotorsequenz durch Transkriptionsfaktoren stellt gleichsam die unterste Ebene dar, auf der die Ausprägung zellulärer Eiweiße reguliert wird (van Driel, 2003). Auf einer übergeordneten Ebene wird Genexpression über Unterschiede im **Aggregatzustand des Chromatins** gelenkt: Chromatin, die von Histon gestützte Sekundärstruktur der DNA-Doppelhelix, kann unterschiedlich dicht gepackt sein, worin sich auch die Aktivität der betroffenen Gene widerspiegelt (Eberharter, 2002). Nochmals übergeordnet ist die sogenannte **nukleäre Ebene der Gen-Regulation**: im Interphase-Zellkern gibt es umgrenzte Bereiche, die sich in der Aktivität des dort gelagerten Chromatins unterscheiden (Carmo-Fonseca, 2002). Es wird vermutet, dass innerhalb der dynamischen 3D Struktur des Zellkerns eine Trans-Aktivierung von Genen möglich ist: bestimmte Loci könnten demnach andere beeinflussen und – vermittelt über den Kondensationszustand des Chromatins –

stilllegen oder aktivieren (Csink, 1996). Genauer soll hier nun auf die unterste oder **Sequenz-Ebene** genannte Form der Genregulation eingegangen werden.

Bevor die Transkription von Genen durch Pol II beginnen kann, müssen zunächst gen-spezifische Faktoren in der Nähe des späteren Startpunktes andocken. Sie ermöglichen dann etwa durch Dekondensation des Chromatins, dass allgemeine **Transkriptionsfaktoren (TFs)** an den sogenannten **Kern-Promotor** herangeführt werden (Cosma, 2002). Zu den allgemeinen Faktoren zählt beispielsweise das TATA-Bindepotein (TF II D), welches eine Plattform für weitere Elemente wie TF II A und B und schließlich auch für Pol II sowie TF II F, E und H bietet (Lee, 2000). Im nächsten Schritt wird dieser erst noch geschlossene Proteinkomplex aktiviert, er verändert seine Konformation, während in einem ATP-abhängigen Prozess 11 bis 15 Basenpaare im Bereich des Transkriptionsstarts zum Einzelstrang aufgeschmolzen werden; ausgehend vom so genannten offenen Komplex kann nun die primäre mRNA durch Pol II begonnen und verlängert werden (Wang, 1992).

Zelltyp-spezifisch exprimierte Gene weisen ganz individuelle Start-Sequenzen auf, dies ist gleichsam Voraussetzung für ihre regulierte Expression. Die Region rund 35 bp strangauf- und strangabwärts des Transkriptionsstarts ist als **Kern-Promotor** definiert (Smale, 2003) (Abb. 1.11.). Er enthält meist mehrere Grundmotive wie zum Beispiel TATA-Box oder Inr-Element, die ganz verschieden kombiniert sein können und so einen wichtigen Beitrag zur individuellen Expression des Gens leisten (Butler, 2002; Smale, 2001). Bei diesen kurzen Schlüssel-Sequenzen handelt es sich nicht um feststehende Motive, es gibt stattdessen Variationen eines Grundschemas, viele Elemente können mehrfach vor dem Gen-Anfang stehen, es gibt aber auch Promotoren ohne jedes bekannte Motiv (Smale, 2003).

Darüber hinaus kennt man bei regulierten Genen im größeren Umkreis um den Transkriptionsstart weitere Bindestellen, welche spezifische TFs binden, die dann wie oben beschrieben den Weg der allgemeinen TFs zum Kern-Promotor bereiten. Außerhalb des Kern-Promotors oft um Position -80 liegt auch die nach ihrer Konsensussequenz benannte **CAAT-Box**, welche beispielsweise im Fall des *β-Globin*-Gens starke Bedeutung für die Effizienz des Promotors hat (Wong, 1988). So genannte **Enhancer**-Sequenzmotive können – mit ähnlichen Aufgaben wie die TF-Bindestellen

ausgestattet – manchmal Tausende von Basenpaare strangauflärts oder -abwärts des Gens oder auch auf den Introns innerhalb des Gens liegen (Li, 1994a; Merli, 1996).

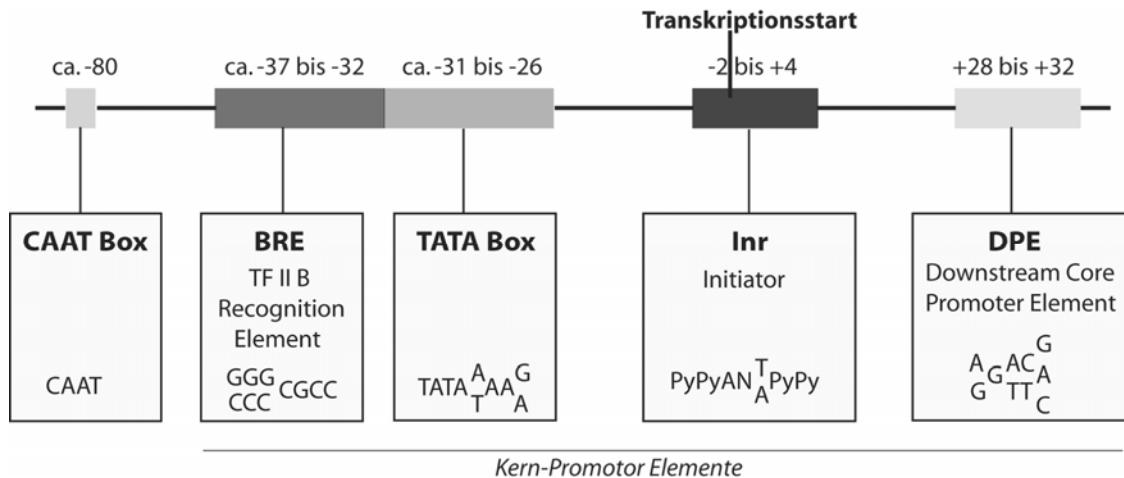


Abb. 1.11. Konsensus-Sequenz eukaryonten Promotoren mit Elementen des Kern-Promotors. Dargestellt ist eine Auswahl von Sequenz-Elementen mit deren Konsensus-Sequenzen, welche in eukaryonten Promotoren in wechselnder Zusammenstellung vorzufinden sind, aber auch ganz fehlen können. So kann z.B. TATA allein stehen, oder zusammen mit BRE, Inr oder DPE. DPE dagegen ist auf die Anwesenheit von Inr angewiesen. nach Smale und Kadonaga, 2003

Ein wichtiges Grundelement vieler eukaryonten Kern-Promotoren ist die **TATA-Box**. Diese AT-reiche Sequenz liegt ca. 30 Nukleotide strangauflärts des Transkriptionsstarts und ist Andockstelle für das TATA-Bindeprotein (TF II D). Für eine gerichtete Transkription durch Pol II reicht TATA allein nicht aus, zusammen mit weiteren TF-Bindestellen wird einerseits die Richtung der Transkription festgelegt, andererseits das Enzym Pol II korrekt am Transkriptionsstart platziert (Li, 1994b). Zu diesen weiteren Bindestellen zählt man das Initiator- oder **Inr-Element**, das **BRE-Element** (Erkennungsstelle für den TF II B), oder das **DPE** („Downstream Core Promoter Element“, strangabwärts gelegenes Element des Kern-Promotors); aus dem Vergleich von Promotorsequenzen mehrerer hundert Gene ergibt sich die Konsensus-Sequenz, die Abfolge der an der jeweiligen Position häufigsten Basen (Abb. 1.11) (Smale, 2003).

1.11. Reportersysteme in der Biologie

Als Reporterproteine bezeichnet man ganz allgemein Proteine, die sich in Zellen leicht nachweisen lassen. Sie dienen so in der jeweiligen zellbiologischen Fragestellung als eine Art Indikator. Am häufigsten zeigen sie dabei die Aktivität eines Promotors (s. Kap. 1.10.) an, die Promotorsequenz wird dazu in geeigneten Plasmid-Vektoren vor das Reportergen gesetzt. Reporterproteine können aber auch gleichzeitig mit zelleigenen Eiweißen hergestellt werden und so deren Aufenthaltsort im Gewebe oder in bestimmten Kompartimenten von Zellen anzeigen. Hierfür setzt man Reporterprotein und zelleigenes Protein unter die Kontrolle eines gemeinsamen Promotors, die Eiweiße werden dann je nach Konstrukt entweder gleichzeitig oder als ein großes, fusioniertes Protein synthetisiert. Nicht allein die einfache Nachweisbarkeit qualifiziert ein Protein zum Reporter. Weitere wichtige Anforderungen sind: das Protein sollte nicht schon endogen in den Zellen vorhanden und möglichst ungiftig sein; bestimmte Untersuchungen verlangen darüber hinaus nach einer Quantifizierbarkeit des synthetisierten Reporterproteins (Alam, 1990).

Oft dienen **Zellkulturen** als überschaubares *in vitro* System, um Reportergene unter einem Promotor zu exprimieren. Mäuse sind wegen ihrer Ähnlichkeit mit größeren Säugetieren und dem Menschen bezüglich Physiologie sowie Größe und Zusammensetzung des Genoms häufige **Modellorganismen** für Promotorstudien *in vivo* (Hadjantonakis, 2001). Moderne Bildgebungsverfahren ermöglichen in den vergangenen Jahren einen – im wahrsten Sinne des Wortes – direkten Blick auf biologische Prozesse, sogar unmittelbar im lebenden Tier (Hadjantonakis, 2003).

Für das **Quantifizieren von Promotoraktivität** eignet sich z.B. das Enzym Chloramphenicol-Acetyltransferase (**CAT**), das den Acetylrest von Acetyl-CoA auf Chloramphenicol überträgt. Im entsprechenden Test wird ein Zell-Lysat mit markiertem Acetyl-CoA und Chloramphenicol inkubiert. Nachteil dieses Assays ist unter anderem die mit 50 Stunden sehr lange Halbwertszeit des Enzyms in der Zelle (Davey, 1995). Ein weiteres, quantitativ in eukaryonten Zellen nachweisbares Reporterprotein ist das **β-Galactosidase**-Gen aus dem Bakterium *Escherichia coli* (Scoble, 2002). Enzymaktivität wird sowohl für CAT als auch für β-Galactosidase je nach Substrat colorimetrisch, fluoreszent oder chemilumineszent gemessen.

Luziferase, ein Enzym aus Glühwürmchen (*Photinus pyralis*), eignet sich wegen seiner hohen Sensitivität als Reporterprotein besonders in Studien an schwachen Promotoren. Die kurze Halbwertszeit des Proteins von drei Stunden qualifiziert es darüber hinaus für Induktionsstudien. Luziferase setzt proportional zur Enzymmenge Licht frei, das in einem Luminometer quantitativ erfasst werden kann. Die Reaktion erfolgt durch die Zugabe des Substrats Luziferin zusammen mit ATP und Mg²⁺ zum Zelllysat. Durch Kotransfektion von Zellen mit der unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors stehenden Quallen-Luziferase aus *Renilla reniformis* sind interne Standards möglich (s. Kap. 2.) (Ford, 1995).

Der **qualitative Nachweis** von Reporterproteinen sollte eine klare Ja-Nein-Antwort zur Aktivität eines Promotors liefern und das Reporter-Protein mit möglichst geringem Aufwand – etwa durch direktes Beobachten unterm Mikroskop - detektierbar sein. Qualitative Nachweismethoden eignen sich, um die Aktivität eines Promotors einer Zellpopulation *in vitro* oder bestimmten Geweben eines Organismus zuzuordnen. **β-Galactosidase**-Aktivität z.B. lässt sich nicht nur quantitativ messen, sondern auch qualitativ beobachten, indem man X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactosid) als Substrat zugibt, Blaufärbung zeigt dann Enzymaktivität an. Nachteil ist, dass Gewebe oder Zellen vor der Detektion fixiert werden müssen.

Fluoreszierende Proteine wie z.B. das monomere **Green Fluorescent Protein** (GFP) (Prasher, 1992) strahlen – durch UV-Licht angeregt – sichtbares Licht ab, und zwar ohne die Zugabe von Substraten oder Kofaktoren. Damit sind fluoreszierende Reporterproteine einfach unterm Fluoreszenzmikroskop in lebenden oder fixierten Zellen nachweisbar und eignen sich dank fehlender Zytotoxizität für qualitative Promotorstudien an transgenen Tieren (Hadjantonakis, 2001).

Das aus der Qualle *Aequorea victoria* klonierte GFP wurde mit Hilfe gezielter Sequenz-Mutationen für die Expression in Säugerzellen optimiert und kann in seiner verstärkten Form als „enhanced“ (engl. = verstärkt) GFP oder EGFP schneller und sensitiver in Zellen nachgewiesen werden (BD/Clontech, Heidelberg). Durch weitere Manipulation am GFP erzeugte man Proteine, die unterm Mikroskop blau (ECFP, enhanced cyan fluorescent protein) oder gelb (EYFP, enhanced yellow fluorescent protein) erscheinen. Das Gen **DsRed**, welches für ein rot fluoreszierendes Protein kodiert, stammt dagegen aus einem anderen Organismus als GFP. Es wurde

ursprünglich aus einer Koralle kloniert und eignet sich zusammen mit EGFP für die simultane Detektion z.B. von zwei verschiedenen Promotoraktivitäten in Zellen oder Organismen. DsRed ist ein tetrameres Protein, das auf geringe Aggregation und schnellere Expression in Säugerzellen optimiert wurde und in dieser verbesserten Form als DsRed2 auf dem Markt ist (BD/Clontech, Heidelberg).

Wie überall in der Biologie werden auch für die Erforschung der Neurogenese Reporterproteine vielfältig eingesetzt, beispielsweise exprimiert unter Kontrolle des neuronalen Stammzell-spezifischen Enhancers des *Nestin*-Gens, des pan-neuronalen *Tubulin-alpha1*-Promotors, des oligodendroglialen Vorläuferzell-Promotors der 2',3'-zyklischen Nukleotid 3'-Phosphodiesterase (*CNP*), des postmitotischen neuronalen *Tis21*-Lokus, des neuronalen Vorläuferzell-spezifischen regulatorischen Elements des *Proopiomelanocortin*(*POMC*)-Gens und des neuronalen Stammzell-spezifischen Lokus des *TLX*-Gens (Frisen, 1995; Gloster, 1994; Gravel, 1998; Haubensak, 2004; Overstreet, 2004; Shi, 2004).

Für die vorliegende Arbeit wurden Reporterproteine mittels gentechnischer Verfahren unter die Kontrolle der regulatorischen Sequenz des *Doublecortin*-Gens gestellt, für Kontrollen exprimierte man Reporterproteine unter dem konstitutiv aktiven Promotor des Cytomegalie-Virus (s. auch Kap. 2.). Reporter-Konstrukte mit *DCX*-regulatorischer Sequenz wurden sowohl in verschiedene Zellkulturen transient transfiziert, als auch zur Herstellung transgener Mäuse verwendet. Im ersten Fall kommt es durch die Aufnahme eines zirkulären Vektors in die kultivierten Zellen zur vorübergehenden Expression des Reporters. Diese Expression ist jedoch nicht stabil und endet mit dem Abbau der Fremd-DNA durch Nukleasen. Im Falle transgener Tiere dagegen ist die Fremd-DNA – zusammengesetzt aus der regulatorischen Region, dem Reportergen und einem Poly-Adenylierungssignal – als lineares Fragment stabil ins Genom eingebaut; dies geschieht nach Injektion des Sequenzabschnitts in befruchtete Eizellen von Mäusen oder Ratten per nicht-homologer Rekombination (s. auch Kap. 2). Das Transgen kann auf Nachkommen übertragen werden. Wegen der direkten Nachweisbarkeit unterm Fluoreszenzmikroskop kamen für qualitative Assays die Fluoreszenzproteine EGFP und DsRed2 zum Einsatz, für quantitative Assays bevorzugte man wegen der hohen Sensitivität und der Möglichkeit zur internen Standardisierung Luziferasen aus *Photinus pyralis* und *Renilla reniformis*.

2. Material und Methoden

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Merck, Darmstadt, bezogen.

2.1. Material

In diesem Kapitel sind Materialien und deren Herkunft aufgeführt, die nicht eigens im Methodenteil erwähnt werden.

2.1.1. Chemikalien

| Chemikalie | Firma |
|---|---------------------------------|
| Acrylamid-Bisacrylamid 30% (v/v) /0,8% (v/v) | Bio-Rad Laboratories, München |
| Agarose für DNA-Elektrophorese | Invitrogen, Karlsruhe |
| Ammoniumpersulfat (APS) 10% w/v | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Bovine Serum-Albumin (BSA) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Dimethylsulfoxid | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Ethanol p.A. | Merck-Schuchardt, Hohenbrunn |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Ethyldiamin-Tetraacetat | Merck-Schuchardt, Hohenbrunn |
| Ethylenglykol | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| 2-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Natriumpyrvat | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) | Merck-Schuchardt, Hohebrunn |
| dNTPs | Peqlab Biotechnologie, Erlangen |
| Oligonukleotide | MWG-Biotech, Ebersberg |
| Polyethylenglykol (PEG 8000) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Saccharose | Merck-Schuchardt, Hohenbrunn |
| N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamid (TEMED) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Triton-X100 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Xylencyanol | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

2.1.2. Verbrauchsmaterial

| Material | Firma |
|-----------------------------|---|
| Deckgläser und Objektträger | Menzel Gläser, Braunschweig |
| Reaktionsgefässe | Eppendorf, Hamburg; Falcon BD, Heidelberg; Sarstedt, Nümbrecht; TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Pipettenspitzen | Sarstedt, Nümbrecht |
| Whatman-Papier | Whatman Int. Ltd., Maidstone, England |
| Zellkultur-Gefässe | TPP, Trasadingen, Schweiz Greiner bio-one, Frickenhausen |

2.1.3. Standards

| Nukleinsäurestandards: | Hersteller |
|--|------------------------|
| DNA-Längenstandard III, Größenverteilung 0,12 bis 21,2 kbp, λ -DNA, gespalten mit <i>EcoRI</i> und <i>HindIII</i> | Roche, Grenzach-Wyhlen |
| DNA-Längenstandard VIII, Größenverteilung 0,02 bis 1,1 kbp, PuCBM21 DNA, gespalten mit <i>HpaII</i> , und PuCBM21 DNA, gespalten mit <i>DraI</i> und <i>HindIII</i> | Roche, Grenzach-Wyhlen |
| Protein-Gelelektrophorese-Standards: | Hersteller |
| MagicMark Proteinstandard, Bandenspektrum 20 bis 120 kDa | Invitrogen, Karlsruhe |

2.1.4. Verwendete Programme

| Programm | Hersteller |
|--------------------------------------|---|
| Adobe Illustrator 10 | Adobe, San Jose, CA, USA |
| Adobe Photoshop, Version 7.0 | Adobe, San Jose, CA, USA |
| ALIGN, Version 3.2 | Biology Workbench of the San Diego Supercomputer Center: http://workbench.sdsc.edu |
| Analysis Color View 3.0 | Soft Imaging Systems, Münster |
| Blastn | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ |
| Gene construction kit, Version 2.5.6 | Textco Inc., West Lebanon, NH, USA |
| ImageJ | http://rsb.info.nih.gov/ij/ |
| Microsoft Office für MacOS X | Redmond, WA, USA |
| Prism 4, Version 4.0a für Macintosh | GraphPad Software, San Diego, CA, USA |
| Spot 3.5.9. für MacOS | Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA |

2.1.5. Verwendete Geräte

| Gerät | Hersteller |
|---|--|
| Blockthermostat Thermomixer Eppendorf 5436 | Eppendorf, Hamburg |
| Consort E835 Netzgerät | Consort, Tumhout, Belgien |
| Fastblot Elektroblotter | Biometra, Göttingen |
| Fluoreszenzmikroskop Leica DMR mit SPOT Dokumentationssystem | Leica, Solms Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA |
| inverses Fluoreszenz-Mikroskop für die Zellkultur: Olympus IX70 mit Color View Dokumentationssystem | Olympus, Hamburg Soft Imaging Systems, Münster |
| konfokales Scanning-Lasermikroskop mit Leica Confocal Software | Leica, Heidelberg |
| Kühl-Tischzentrifuge Eppendorf 5417R | Eppendorf, Hamburg |
| Minigel Twin Apparatur für SDS-PAGE | Biometra, Göttingen |
| Photodokumentation Ethidiumbromid Gele | MWG-Biotech, AG, Ebersberg |
| Sorvall RC5Cplus Zentrifuge | Kendro Laboratory Products, Langenselbold |
| Thermocycler Mastercycler gradient | Eppendorf, Hamburg |
| Tischzentrifuge Eppendorf mini spin plus | Eppendorf, Hamburg |

2.2. Methoden

2.2.1. Nukleinsäuretechniken

Falls nicht anders vermerkt, stammten alle Enzyme von New England Biolabs (Frankfurt a.M.).

2.2.1.i. Isolierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

Isolierung von Nukleinsäuren. Genomische DNA wurde aus kultivierten Zellen oder aus Gewebe mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits (Qiagen, Hilden) extrahiert. RNA wurde mit Hilfe des RNeasy-Kits (Qiagen, Hilden) aus Zellen oder Gewebe aufgereinigt.

Quantifizierung von Nukleinsäuren. Die Konzentration der Nukleinsäuren in Lösung wurde in Quarzküvetten (Quarzglas-Suprasil, 100 µl, Hellma, Müllheim) mit einem Spektralphotometer (Ultrospec 2000, Amersham-Pharmacia, Freiburg) bestimmt. Eine Absorption bei 260 nm ($A_{260\text{nm}}$) von 1 entsprach einer Konzentration von 50 µg/ml genomicscher DNA, 40 µg/ml RNA oder 20 µg/ml bei Oligonukleotiden. Der Quotient aus den Absorptionen bei 260 und 280 nm ($A_{260\text{nm}/280\text{nm}}$) lieferte einen Anhaltspunkt für die Reinheit der Präparation, wobei Werte um 1,8 für DNA und 2,0 für RNA angestrebt wurden.

Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren. DNA wurde zu analytischen und präparativen Zwecken in 0,7 bis 2,0%igen Agarose-Gelen mit 0,5 x TBE-Laufpuffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8.0) elektrophoretisch nach Molekulargewicht aufgetrennt (Auftragspuffer, 10 x Konzentrat: 0,3% w/v Bromphenolblau, 0,3% w/v Xylencyanol, 0,02 M EDTA pH 8.0, 60% v/v Glycerin). Die Auf trennung erfolgte unter einer Feldstärke von 5 V/cm. Agarose-Gele waren mit Ethidium-Bromid (EtBr, Endkonzentration 0,5 µg/ml) versetzt, wodurch sich DNA indirekt nachweisen ließ: Angeregt durch UV-Strahlung ($\lambda = 254$ nm) wird vom EtBr-Molekül sichtbares Licht ($\lambda = 590$ nm) zurückgeworfen; diese Fluoreszenz ist deutlich stärker, wenn EtBr an DNA gebunden vorliegt.

2.2.1.ii. Reverse Transkription von mRNA und Polymerasekettenreaktion

Reverse Transkription von RNA in cDNA. Da RNA nicht als Template in der Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction", PCR) dienen kann, musste dem Vermehrungsschritt immer die reverse Transkription (RT) vorausgehen, in der zur RNA komplementäre ("complementary") DNA oder cDNA hergestellt wird. Diese Erststrangsynthese geschah mit Hilfe des RETROScript Kits (Ambion, Austin, Texas, USA). Dabei wurde 2 µg RNA zusammen mit Erststrang-Primern (Random Decamer Primer) während 3 min bei 85°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzubrechen. Unter Anwesenheit von dNTPs (0,5 mM je dNTP), 100 Units MMLV Reverser Transkriptase sowie 10 Units RNase-Inhibitor in RT-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) erfolgte die Synthese von cDNA während 60 min bei 42°C im Thermocycler. Während 10 min bei 92°C wurde das Enzym Reverse Transkriptase inaktiviert.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Spezifische Sequenz-Abschnitte der so gewonnenen cDNA wurden anschließend in einer PCR vermehrt. Dies geschah mittels zweier für den zu vermehrenden Abschnitt spezifischer Primer (Konzentration je 0,3 pM) und dem Enzym *Taq*-DNA-Polymerase (1 Unit/25 µl; Roche, Grenzach-Wyhlen) unter Anwesenheit von je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in PCR Puffer (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8,3). Auf einen zweiminütigen Denaturierungsschritt (94°C) folgten 30 bis 35 Zyklen, jeweils mit 45 s bei 94°C, 30 s bei der je nach Primersequenz variierenden Annealing-Temperatur (56 - 61°C) sowie 2-3 min Elongation bei 72°C. An diese zyklische Temperaturfolge schloss sich ein letzter Elongationsschritt (8 min bei 72°C). Neben cDNA dienten auch genomische DNA oder bakterielle Plasmide als Template der PCR.

Synthese von PCR-Produkten zur Klonierung in bakterielle Vektoren. Zur Vermehrung von DNA-Abschnitten, die später in Expressions-Vektoren eingefügt werden sollten, wurde unter Einhaltung der Empfehlungen des Herstellers das Expand High Fidelity PCR System (Roche, Grenzach-Wyhlen) verwendet, welches durch die Kombination aus *Taq*-Polymerase und *Pwo*-Polymerasen eine mehr als 30fach höhere Lesegenauigkeit bietet als die *Taq*-Polymerase allein.

2.2.1.iii. Klonierung von PCR-Produkten

Allgemeines. PCR-Produkte oder Restriktions-verdaute Vektoren wurden vor molekularbiologischen Arbeiten aus 1% (w/v) Agarose/0,5 x TBE-Gelen aufgereinigt und so von möglicherweise störenden Substanzen wie z.B. Salzen, Nukleotiden oder Enzymen getrennt. Die Isolierung der PCR-Produkte oder Vektorfragmente aus den Agaroseblöckchen erfolgte mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden). Alle Ligationen wurden mit T4-DNA-Ligase gemäß den Empfehlungen des Herstellers (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) durchgeführt. Die korrekte Basenfolge aller erstellten Konstrukte wurde in direkter Sequenzierung unter Verwendung des DNA-Sequencers 373 (Applied Biosystems, Darmstadt) überprüft.

Klonierung der humanen cDNA-von DCX und Mutagenese. Die kodierende Sequenz der humanen DCX-cDNA wurde in einer PCR amplifiziert, als Template diente eine humane fötale cDNA Bank (Invitrogen, Karlsruhe). Die verwendeten Oligonukleotide begrenzten den Bereich zwischen den Nukleotiden 43 und 1122 der cDNA-Sequenz, welche unter der Genbank-Zugangs-Nummer AF040255 einzusehen war. Gerichtete Mutagenese dieser cDNA wurde in einem zweistufigen PCR-Protokoll durchgeführt: Es wurden zwei gegensätzlich ausgerichtete Primer entworfen, welche beide die einzufügende Mutation enthielten und deren Sequenz rund um die zu mutierende Zielsequenz in der cDNA überlappte; in getrennten PCR-Ansätzen wurden zunächst Produkte ausgehend von der mutierten Zielsequenz in Richtung je eines der beiden cDNA-Enden hergestellt; die Produkte aus diesen beiden Ansätzen überlappten um rund 10 Nukleotide im Bereich der Mutation und dienten in einer zweiten PCR als Template, wobei nur noch die Primer an den Enden der cDNA zum Einsatz kamen; diese zweite PCR führte zur Amplifikation einer DCX-cDNA in voller Länge, jedoch mit der eingefügten Mutation. Wildtyp- und mutierte Kodierungssequenzen des DCX-Gens wurden anschließend in den Vektor pEGFP-N1 (BD/Clontech, Heidelberg) eingefügt, wobei unter Einhaltung des Leserahmens Fusionsproteine aus dem DCX-Polypeptid und EGFP entstanden. Die Expression dieser Fusionsproteine

stand unter Kontrolle des CMV(Cytomegalie-Virus)-Promotors. Die Konstrukte sind im Folgenden als **pDCX-EGFP**, **pDCX(A71S)-EGFP** und **pDCX(R192W)-EGFP** bezeichnet.

Klonierung der regulatorischen Bereiche des humanen DCX-Gens. Abgeleitet von der partiellen humanen X-chromosomalen Sequenz, einsehbar unter der GenBank Nummer NT_025319, wurden zwei Oligonukleotide entworfen: 5' Primer AAC ACC TAT TAA TGC CCA, Position - 3523 bis - 3506 relativ zum ATG-Start-Kodon des *DCX*-Gens; 3' Primer TCA GAC ACC TGA GCC TGG GAG AA, Position -15 bis -37. Diese Oligonukleotide begrenzen ein 3509 bp großes Fragment strangauwärts des *DCX*-Start-Kodons. Nach dem Vorbild humaner genomischer DNA aus fötalen kortikalen neuronalen Vorläuferzellen (Wachs, 2003) wurde ein 3,5 kbp großes Fragment vermehrt, mittels DNA-Polymerase I (Klenow Fragment) und 33 µM dNTPs mit stumpfen Enden ausgestattet, um dann durch T4 Polynukleotid Kinase unter Anwesenheit von 1,8 mM ATP phosphoryliert zu werden.

Aus dem Expressionsvektor pEGFP-N1 (BD/Clontech, Heidelberg) wurde der CMV-Promotor in einem Restriktionsverdau mit den Enzymen *AseI* und *NheI* entfernt. Das resultierende DNA-Fragment von 4,1 kbp, entsprechend dem linearisierten pEGFP-N1 Vektor ohne den CMV-Promotor, wurde unter Anwesenheit von 33 µM dNTPs durch DNA-Polymerase I (Klenow Fragment) mit stumpfen Enden versehen. Der linearisierte, verkürzte Vektor wurde zum Ring ligiert. Ergebnis war ein pEGFP-N1 Vektor ohne Promotor, genannt pEGFP-1.

Um die 3509 bp umfassende regulatorische Region des *DCX*-Gens in den Vektor pEGFP-1 einzufügen, wurde dieser in einem Restriktionsverdau mit dem Enzym *SmaI* linearisiert, die 3509 bp lange humane *DCX*-regulatorische Sequenz und der linearisierte Vektor wurden in einer Ligation verknüpft. Im resultierenden, ca. 7,7 kbp großen Konstrukt, genannt **phuDCX3509-EGFP**, kontrolliert die regulatorische Region des *DCX*-Gens die Expression des Reportergens EGFP. phuDCX3509-EGFP enthält 19 bp MCS zwischen regulatorischer Region und EGFP Start-Kodon. Dieser Abstand entspricht dem zwischen regulatorischer Region und Start-Kodon im humanen *DCX*-Gen (Abb. 2.1).

Herstellung von phuDCX3509-DsRed2. Die 3509 bp große regulatorische Sequenz wurde darüberhinaus in einen Vektor eingefügt, in dem sie die Expression des roten Fluoreszenzproteins DsRed2 steuert. Der Promotor-lose Vektor pDsRed2-1 (BD/Clontech, Heidelberg) wurde in einem Restriktionsverdau mit *SalI* und *BamHI* linearisiert und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert; es resultierte ein DNA-Fragment von 4,1 kbp. Vektor phuDCX3509-EGFP wurde ebenfalls mit *SalI* und *BamHI* aufgespalten, das 3,5 kbp große regulatorische Fragment aufgereinigt und in den vorbereiteten pDsRed2-1 Vektor mittels T4 DNA-Ligase eingefügt. Es ergab sich der Vektor **phuDCX3509-DsRed2**, in dem die 3509 bp große regulatorische Sequenz die Expression des Proteins DsRed2 kontrolliert. Für Kontroll-Transfektion von Fluoreszenz-Reportern in den untersuchten primären Kulturen bzw. den Zelllinien wurde der Vektor **pEGFP-N1** (BD/Clontech, Heidelberg) verwendet, der die Expression von EGFP unter Kontrolle des konstitutiv aktiven „immediate early“ Promotors aus dem Cytomegalie-Virus (PCMV IE) ermöglichte (Abb. 2.1).

Herstellung von phuDCX3509-FFLuci. Die 3509 bp große regulatorische Sequenz wurde auch in einen Vektor eingefügt, in dem sie die Expression des Luziferase-Gens aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) steuerte. Hierzu wurde das humane regulatorische Fragment des DCX-Gens mittels der Enzyme *Bam*HI und *Kpn*I aus dem Vektor phuDCX3509-EGFP extrahiert. Der Vektor pG13-Basic (Promega, Mannheim), der die Sequenzinformation für die Glühwürmchen-Luziferase jedoch keinen Promotor enthielt, wurde mit Hilfe der Enzyme *Bgl*II und *Kpn*I linearisiert und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. *Bam*HI und *Bgl*II sind Isoschizomere. Das 3,5 kbp große Fragment mit der DCX-regulatorischen Sequenz und der 4,8 kbp große linearisierte Vektor wurden mittels T4 DNA-Ligase zum Vektor **phuDCX3509-FFLuci** zusammengefügt (Abb. 2.1). Für Kontroll-Transfektionen wurde der Vektor **pRL-CMV** (Promega, Mannheim) verwendet, der die Expression der Luziferase aus dem Seeschwamm *Renilla reniformis* unter Kontrolle des konstitutiv aktiven Cytomegalie-Virus-Promotors (PCMV IE) ermöglichte.

Konstruktion von Deletionsmutanten des phuDCX3509-EGFP bzw. des phuDCX3509-FFLuci. Um die notwendigen und hinreichenden Abschnitte auf der 3509 bp großen regulatorischen Sequenz näher einzugrenzen, wurden Deletionsvektoren in pEGFP-1 und pG13-Basic konstruiert. In den erstellten Vektoren kontrollierten jeweils verschiedene Abschnitte des 3509 bp großen Fragments die Expression von Reportergenen. Tabelle 2.1 zeigt eine Zusammenfassung der Arbeitsschritte, die zu den Deletionsmutanten geführt haben, Abb. 2.2 eine Auswahl der Deletionsvektoren im Bild.

Vermehrung der erstellten Vektoren in Escherichia coli. Die erstellten Konstrukte wurden in *Escherichia coli* Stbl2 (Invitrogen, Karlsruhe) vermehrt, die zuvor durch Inkubation mit LB-DMSO (10% v/v LB, 5% w/v PEG, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) während 30 min auf Eis für die Aufnahme zirkulärer DNA kompetent gemacht worden waren. Selektion der Bakterien mit aufgenommenem DNA-Plasmid erfolgte über Zusatz des jeweiligen Antibiotikums zu LB-Agar oder -Flüssigmedium. Antibiotika wurden in folgenden Endkonzentrationen verwendet: Ampicillin 50 µg/ml, Chloramphenicol 34 µg/ml, Kanamycin 10 µg/ml. Bakterien-Klone wurden in LB mit 15% (v/v) Glycerin bei –80°C aufbewahrt.

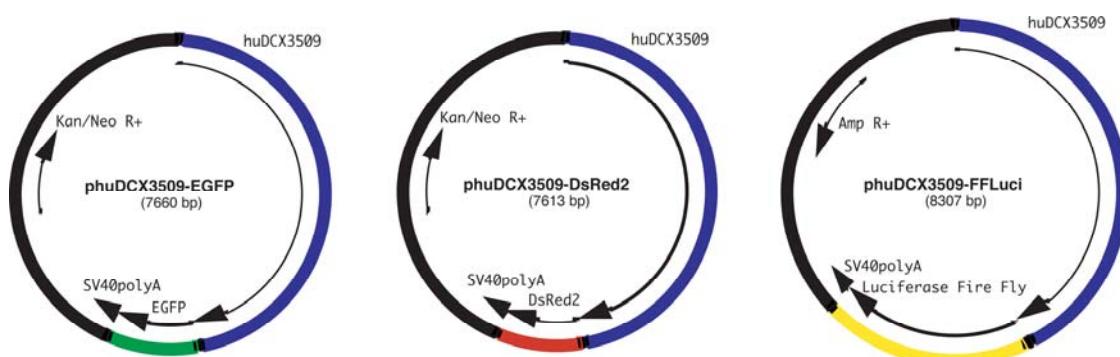


Abb. 2.1. Vektoren zur Expression von Reporterproteinen (EGFP, DsRed2, Luziferase aus Glühwürmchen) unter Kontrolle der humanen DCX-regulatorischen Region (huDCX3509).

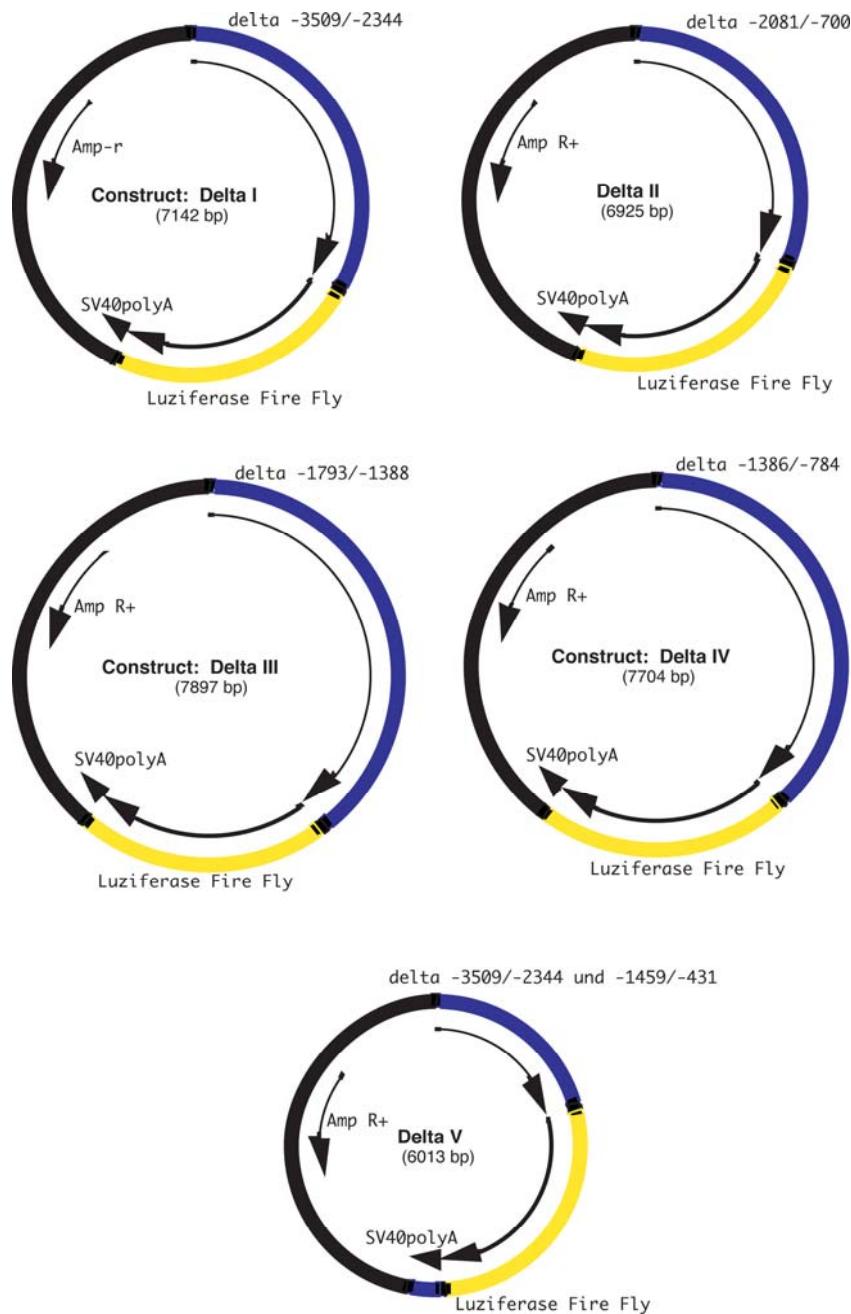


Abb. 2.2. Deletionsvektoren Δ (Delta) I bis V mit verkürzten Fragmenten der humanen 3509 bp-DCX-regulatorischen Region zur Kontrolle der Expression von Luziferaser aus Glühwürmchen (*Photinus pyralis*).

| Vektor / Kurzbezeichnung d. Deletionsmutante mit Reporterprotein | deletierte Bereiche auf dem 3509 bp Fragment | Vorgehensweise (Primer in 5' → 3' Orientierung) |
|--|--|--|
| phuDCX(Δ-3509/-2344)EGFP Delta I (EGFP) | 1-1165 | Klonierung eines verkürzten PCR Produkts (Primer forward CTT TTT ACT TCT ATC TTC CAT AA, Primer reverse TCA GAG ACC TGA GCG TGG GAG AA) in <i>SmaI</i> Schnittstelle von pEGFP-1 |
| phuDCX(Δ-3509/-2344)FFLuci Delta I (Luziferase) | 1-1165 | Umklonierung des <i>KpnI/BamHI</i> -Fragmentes (huDCX(Δ-3509/-2344)) aus phuDCX(Δ-3509/-2344)EGFP in den <i>KpnI/BglII</i> * geschnittenen Vektor pGL3-Basic |
| phuDCX(Δ-2081/-700)EGFP Delta II (EGFP) | 1428-2809 | Restriktionsverdau (Vektor phuDCX3509-EGFP) mit <i>BstXI</i> , Herstellen von stumpfen Enden, Ringschluß |
| phuDCX(Δ-2081/-700) FFLuci Delta II (Luziferase) | 1428-2809 | Umklonierung des <i>KpnI/BamHI</i> -Fragmentes (huDCX(Δ-2081/-700)) aus phuDCX(Δ-2081/-700)EGFP in den <i>KpnI/BglII</i> * geschnittenen Vektor pGL3-Basic |
| phuDCX(Δ-1793/-1388)EGFP Delta III (EGFP) | 1716-2121 | Entfernen der <i>SacI</i> Schnittstelle an Pos. 38 von phuDCX3509-EGFP durch Verdau mit <i>XhoI</i> und <i>EcoRI</i> , Herstellen von stumpfen Enden, Ringschluß; Restriktionsverdau des resultierenden Vektors mit <i>SacI</i> , Ringschluß |
| phuDCX(Δ-1793/-1388)FFLuci Delta III (Luzif.) | 1716-2121 | Umklonierung des <i>KpnI/BamHI</i> -Fragmentes (huDCX(Δ-1793/-1388)) aus phuDCX(Δ-1793/-1388)EGFP in den <i>KpnI/BglII</i> * geschnittenen Vektor pGL3-Basic |
| phuDCX(Δ-1386/-784)EGFP Delta IV (EGFP) | 2123-2725 | Restriktionsverdau (Vektor phuDCX3509-EGFP) mit <i>BbsI</i> und <i>BlpI</i> , Herstellen von stumpfen Enden, Ringschluß |
| phuDCX(Δ-1386/-784)FF-Luci Delta IV (Luzif.) | 2123-2725 | Umklonierung des <i>KpnI/BamHI</i> -Fragmentes (huDCX(Δ-1386/-784)) aus phuDCX(Δ-1386/-784)EGFP in den <i>KpnI/BglII</i> * geschnittenen Vektor pGL3-Basic |
| phuDCX(Δ-3509/-2344)(Δ-1459/-431)EGFP Delta V (EGFP) | 1-1165; 2050-3078 | Klonierung zweier PCR-Produkte , die in zweistufiger PCR zusammengefügt wurden (Primer 1f CTT TTT ACT TCT ATC TTC CAT AA, Primer 1r CCC AGG CAT GCC AGT AAG GCT TTG CTT TGC; Primer 2f CAT GTT TGG GGG ATT TTC AGC TAT TTC AAA ATC TCC, Primer 2r TCA GAG ACC TGA GCG TGG GAG AA) in <i>SmaI</i> Schnittstelle von pEGFP-1 |
| phuDCX(Δ-3509/-2344)(Δ-1459/-431)FFLuci Delta V (Luzif.) | 1-1165; 2050-3078 | Umklonierung des <i>KpnI/BamHI</i> -Fragmentes (huDCX(Δ-3509/-2344)(Δ-1459/-431)) aus phuDCX(Δ-3509/-2344)(Δ-1459/-431)EGFP in den <i>KpnI/BglII</i> * geschnittenen Vektor pGL3-Basic |
| phuDCX(Δ-3509/-1909) EGFP Delta VI (EGFP) | 1-1599 | Restriktionsverdau (Vektor phuDCX3509-EGFP) mit <i>AseI</i> und <i>EcoRI</i> , Herstellen von stumpfen Enden, Ringschluß |
| phuDCX(Δ-3509/-2344)(Δ-1761/-1)EGFP / FFLuci Delta VII | 1-1166; 1748-3509 | Klonierung eines verkürzten PCR Produkts (Primer forward AAG GTA CCT TTT TAC TTC TAT CTT C, Primer reverse AAC CAT GGA AAA CCA ATC TCT CTA TG) in <i>SmaI</i> Schnittstelle von pEGFP-1 / pGI3-Basic |
| phuDCX(Δ-3509/-1910)(Δ-1761/-1)EGFP / FFLuci Delta VIII | 1-1599; 1748-3509 | Klonierung eines verkürzten PCR Produkts (Primer forward AAG GTA CCT AAT CAT AGG AGG TTG GG, Primer reverse AAC CAT GGA AAA CCA ATC TCT CTA TG) in <i>SmaI</i> Schnittstelle von pEGFP-1 / pGI3-Basic |
| phuDCX(Δ-3509/-1556)(Δ-733/-1)EGFP EGFP / -FFLuci Delta IX | 1-1953; 2776-3509 | Klonierung eines verkürzten PCR Produkts (Primer forward AAG GTA CCG TGA GTT TGA TGT TCC TT, Primer reverse AAC CAT GGG CTG GGG GGA AAA AGG AT) in <i>SmaI</i> Schnittstelle von pEGFP-1 / pGI3-Basic |

Tabelle 2.1. Zusammenfassung der Klonierungsschritte zur Erzeugung von Deletionsmutanten in phuDCX3509-EGFP und pGl3-Basic. *BamHI und BglII sind Isoschizomere.

2.2.1.iv. Sequenzierung des regulatorischen Bereichs auf dem Maus-*DCX*-Gen

Eine Bacmid-Bank, die etwa elfmal das Genom der Maus in Stücken von 25 bis 300 kbp widerspiegelte (RPCI-23 BAC II, RZPD Deutsches Resourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin-Charlottenburg, Bank hergestellt von Dr. Pieter de Jong, Kazutoyo Osoegawa, Minako Tateno am Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY, USA), wurde in einem PCR-gestützten Screening auf Klone untersucht, die den Bereich des *DCX*-ATG-Startkodons der Maus abdecken sollten. Hierzu dienten die Oligonukleotide 5' TTG GAC ATT TTG ACG AAC GA, Position +13 bis +32 relativ zum Startkodon und 3' CCC TTC TTC CAG TTC ATC CA, Position +365 bis +346. Alle etwa 184.320 Klone der Bacmid-Bank waren für ein primäres Screening zu 60 DNA-Pools zusammengefasst. Positive Proben aus diesem primären Screening führten zu sekundären DNA-Pools. Aus den Koordinaten der positiven Proben in diesem sekundären Screening ergaben sich schließlich einzelne Bacmid-Klone. Die beiden für den vermehrten Sequenzabschnitt positiven Klone RPCIB731G16462Q2 und RPCIB731H1192Q2 basierten auf dem Vektor pBACe3.6 und wurden in direkter Sequenzierung näher untersucht (DNA Sequencer 373, Applied Biosystems, Darmstadt); auf ihnen waren je etwa 25 kbp genetischer DNA versammelt. Die für den Bereich strangaußwärts des ATG-Startkodons ermittelte Sequenz wurde an genetischer DNA aus C57Bl/6Ncr Mäusen überprüft.

2.2.2. Zellkulturmethoden

Allgemeines. Die Kultur eukaryonten Zellen erfolgte in Wasserdampf-gesättigter, 5% CO₂ enthaltender Atmosphäre bei 37°C im Begasungsbrutschrank (HERAcell, Heraeus/Kendro, Hanau), im Folgenden mit „unter Zellkulturbedingungen“ abgekürzt. Alle Arbeiten an den Zellkulturen wurden zum Schutz vor Kontamination an einer Sicherheitswerkbank ausgeführt (HERAsafe, Heraeus/Kendro). Falls nicht anders angegeben, stammten die in der Zellkultur verwendeten Lösungen von PAN Biotech (Aidenbach), Plastik-Kultur-Gefäße von TPP (Trasadingen, Schweiz).

Bestimmung der Zellzahl. Die Bestimmung der Zellzahl geschah mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer, wobei tote Zellen unter Anwesenheit von Trypanblau (Endkonzentration 0,2% w/v, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) von der Zählung ausgeschlossen wurden.

Einfrier- und Aufzuprotokoll. Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in Kryotubes (Nunc, Wiesbaden) in flüssigem Stickstoff bei -179°C, das Einfriermedium bestand aus dem jeweiligen Grundmedium, angereichert mit 20% (v/v) FKS sowie 10% (v/v) DMSO.

2.2.2.i. Zelllinien

Alle Zelllinien wurden im Abstand von 3 bis 5 Tagen unter Trypsinbehandlung (Trypsin/EDTA 0,05%/0,02%) vereinzelt und im Verhältnis 1:5 bis 1:10 neu ausgesät. Folgende immortalisierte Zelllinien wurden verwendet:

| Name der Zelllinie und Herkunft | Kulturmedium |
|---|---|
| COS7 (ATCC U.S.A., # CRL-1651) | DMEM, angereichert mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 4 mM L-Glutamin, 1,5 g/l Natrium-Bicarbonat, 4,5 g/l Glukose |
| CTX TNA2 (ECACC # 98102213) | DMEM, ergänzt durch 10% (v/v) fötales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1,5 g/l Natrium-Bicarbonat, 1 mM Natrium-Pyruvat |
| D283Med (ATCC U.S.A. # HTB-185) | MEM (Eagle) mit Earle's BSS, angereichert durch 10% (v/v) fötales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1,5 g/l Natrium-Bicarbonat, 1 mM Natrium-Pyruvat, 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren |
| HEK293 (BD/Clontech, Heidelberg) | siehe Cos7 |
| N20.1 (Verity, 1993), von A. T. Campagnoni, University of California, Los Angeles, USA zur Verfügung gestellt | Proliferationsbedingungen: Ham's-F12/DMEM 1:1 mit 2,4 g/l Glukose, 0,18 g/l L-Glutamine, 100 U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 22,5 mg/l Geneticin bei 33°C; Differenzierung: 4 Tage, 39°C |
| Neuro2A (ATCC U.S.A. # CCL-131) | siehe D283Med |

2.2.2.ii. Gewinnung und Differenzierung primärer Zellen aus dem fötalen Telenzephalon der Maus (MEF-Zellen)

Zellen aus dem fötalen Gehirn der Maus ("mouse embryonic forebrain", MEF-Zellen) wurden gemäß eines modifizierten, zuvor beschriebenen Protokolls (Wachs, 2003), isoliert. Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit der European Communities Council Directive (86/609/EEC) und gemäß den Richtlinien des Instituts für Neurologie durchgeführt. Schwangere C57Bl/6NcrI Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld) wurden anästhesiert und getötet, die Uteri entnommen und in eiskalte Dulbeccos Phosphat-gepufferter Salzlösung (DPBS; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) eingelegt. 10,5 bis 12,5 Tage alte Föten wurden aus den Uteri herausgelöst, die Gehirne der Föten entnommen und von umgebendem Gewebe abgetrennt. Die Gehirne wurden einmal in eiskaltem DPBS gewaschen, für 5 min bei 120 x g zentrifugiert, und das Pellet in PPD-Lösung (0,01% w/v Papain (Worthington Biochemicals, Lakewood, NJ, USA), 0,1% w/v Dispase II (Roche, Grenzach-Wyhlen), 0,01% w/v DNase I (Worthington Biochemicals, England) und 12,4 mM MgSO₄ in HBSS ohne Mg⁺⁺/Ca⁺⁺ (PAN)) für 30 bis 40 min bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde alle 10 min durch eine 10-ml-Plastikpipette trituriert, die dissozierten Zellen wurden anschließend während 5 min bei 120 x g geerntet und zweimal in Neurobasal-Medium gewaschen. Anschließend wurden 2,5 x 10⁵ Zellen pro cm² in Neurobasal-Medium (angereichert mit B27 1:50 v/v (Invitrogen/Gibco, Karlsruhe), 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin und 5% v/v fötalem Kälberserum) in Kulturgefäßen ausgesät, die mit Poly-Ornithin (250µg/ml) / Laminin (15 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) beschichtet worden waren.

2.2.2.iii. Stabile Transfektion von COS7-Zellen und *live*-Mikroskopie

Zur Überexpression von Fusionsproteinen, bestehend aus dem DCX-Polypeptid und EGFP, wurden COS7-Zellen unter Anwesenheit von Lipofectamine (Invitrogen, Karlsruhe) mit den entsprechenden Expressions-Vektoren (pDCX-EGFP, pDCX(A71S)-EGFP und pDCX(R192W)-EGFP) gemäß den Empfehlungen des Herstellers transfiziert. Stabil transfizierte Zellklone wurden durch Geneticin bei einer Konzentration von 500 µg/ml (Life Technologies, Paisley, Schottland) selektiert.

Zum Beobachten der transfizierten, lebenden Zellen in Kultur diente eine am inversen Mikroskop Olympus IX70 angebrachte Inkubationskammer; diese Kammer ermöglichte über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg stabil 37°C sowie eine 5% CO₂-enthaltende Atmosphäre.

2.2.2.iv. Transiente Transfektion von Zelllinien bzw. fötalen, telenzephalen Zellen aus der Maus (MEF-Zellen) *in vitro*

Transiente Transfektion von Zelllinien. Zellen der fünf verschiedenen Linien wurden in Plastik-Kulturgefäßen mit 6 x 10 cm² Fläche (6-Well-Platten) unter einer Dichte von 2,5 x 10⁴ Zellen pro cm² jeweils einen Tag vor der Transfektion ausgesät. Zum Aussähen der sich in Suspension vermehrenden D283Med Zellen waren die Kulturplatten zuvor mit Poly-Ornithin (250µg/ml) und Laminin (15 µg/ml) beschichtet worden. Für die Transfektion wurden 3 µg Plasmid und 5 µl Metafectene (Biontex Laboratories, München) je 10-cm²-Schale verwendet, in einem Endvolumen von 2 ml gemäß den Angaben des Herstellers. Nach 12 Stunden wurde das Medium gewechselt, einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und unter einer Dichte von 7,5 x 10⁴ Zellen pro cm² erneut ausgesät, diesmal auf Poly-Ornithin/Laminin-beschichteten Glas-Deckgläsern in 12 x 4-cm²-Kulturgefäßen (12-Well-Platten), und für 24 Stunden bis zur immuncytochemischen Analyse kultiviert.

Transiente Transfektion von MEF-Zellen. MEF-Zellen wurden direkt auf den Poly-Ornithin/Laminin-beschichteten Glas-Deckgläsern (je 4 cm²) oder, für proteinbiochemische Untersuchungen, in beschichteten 10-cm²-Gefäß (6-Well-Platten) transfiziert, auf denen sie vier Tage zuvor ausgesät worden waren, um eine differenzierte Kultur zu bilden. Verwendet wurden 0,3 µg Plasmid zusammen mit 0,75 µl Metafectene je 1 cm² Oberfläche gemäß den Angaben des Herstellers. Für die Transfektion mit Luziferase-Vektoren waren die Zellen – im Hinblick auf die spätere Detektion im Luminometer – in 96-Well Luziferase-Platten (0,3 cm² je Well, Greiner bio-one, Frickenhausen) ausgesät worden, die zuvor ebenfalls mit Poly-Ornithin/Laminin beschichtet worden waren. Das Medium wurde nach 12 Stunden gewechselt, Zellen wurden für weitere 3-4 Tage unter Zellkulturbedingungen aufbewahrt und dann auf Expression von Reporter oder Markern untersucht.

Wachstumsfaktoren. Um zu untersuchen, inwieweit sich die Aktivität der humanen DCX-regulatorischen Region durch die Anwesenheit von verschiedenen Wachstumsfaktoren nach der Transfektion modulieren ließ, wurden diese im Zuge des Mediumwechsels beigegeben. Faktoren wurden in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt: 1mM all trans-Retinoic-Acid (RA, Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 20 ng/ml rhBDNF (Alomone Labs, Jerusalem, Israel), 100 ng/ml rmVEGF (R&D

Systems, Wiesbaden), 20 ng/ml rhEGF (R&D Systems), 20 ng/ml rhFGF basic (R&D Systems) mit 2 μ g/ml Heparin (Sigma-Aldrich), 20 ng/ml rhNT-3 (R&D Systems), 20 ng/ml rhNT4 (R&D Systems), 10 ng/ml rhTGFbeta (R&D Systems).

Luziferase-System. Die Expression der Luziferase-Reporterproteine aus *Photinus pyralis* (Glühwürmchen) bzw. aus dem Seeschwamm *Renilla reniformis* wurde nachgewiesen mit Hilfe des Dual Glo Luciferase Assay Systems (Promega, Mannheim) im Luminometer (Anthos Labtec Instruments, Wals, Österreich). Die beiden Luziferasen aus *Photinus sp.* bzw. *Renilla sp.* haben jeweils eigene Substrate, was eine getrennte Detektion ihrer Aktivitäten erlaubt. Somit lässt sich nach einer Ko-Transfektion mit beiden Reportergen in einer Kulturschale das gemessene Ergebnis aus dem experimentellen Promotor mit dem Ergebnis aus dem konstitutiv aktiven Kontrollpromotor (CMV_{IE}) vergleichen, und die Reaktion so normalisieren:

$$\text{Normalisierte Reaktion [%]} = \frac{\text{experimenteller Reporter}}{\text{Kontroll Reporter}} \times 100\%$$

Der experimentelle Promotor kontrolliert dabei die Glühwürmchen-Luziferase, der Kontroll-CMV-Promotor die *Renilla*-Luziferase. Die Ko-Transfektion von CMV-*Renilla*-Reporter bietet eine interne Kontrolle für jede Transfektion, die errechneten, normalisierten Werte lassen sich im Gegensatz zu den absoluten Werten mit den Ergebnissen aus anderen Experimenten vergleichen. Zur Detektion der Luziferaseaktivität wurden die Zellen lysiert und Luziferin, das Substrat des Glühwürmchen-Enzyms, zugegeben. Letzteres katalysierte die Reaktion:



Die Lichtintensität war proportional zur Glühwürmchen-Luziferase-Aktivität und wurde im Luminometer gemessen, bevor durch Zugabe eines zweiten Puffers die erste Lichtreaktion unterdrückt und das Substrat der *Renilla*-Luziferase, Coelenterazin, angeboten wurde. *Renilla*-Luziferase katalysierte unten stehende Reaktion, Ergebnisse wurden wie oben angegeben in normalisierte Werte umgerechnet:



2.2.3. Gewebekulturen

2.2.3.i. Organotypische Explantkulturen des Hippocampus junger Mäuse (P 3-7)

Organotypische Schnittkulturen wurden gemäß eines zuvor beschriebenen Protokolls angefertigt (Prang, 2001; Stoppini, 1991). Drei bis fünf Tage alte C57Bl/6NcrI Mäuse (Postnataltag P 3-7) (Charles River Laboratories, Sulzfeld) wurden anästhesiert, getötet und dekapitiert. Hippocampi wurden entnommen und in eiskaltes Präparationsmedium (MEM, angereichert mit 2mM Glutamax, pH 7.3) überführt. Transversale Schnitte von 200 oder 400 μ m Dicke wurden mit dem Tissue-Chopper (McIllwain, USA) hergestellt und auf Membranen (Millicell-CM, Millipore, Schwalbach) überführt. Schnittkulturen wurden für 4 bis 6 Tage bis zur Transfektion unter Zellkulturbedingungen in Inkubationsmedium (50% v/v MEM, 25% v/v Basal-MEM, 25% v/v hitzeaktiviertes Pferdeserum, 0,65% w/v Glukose und 2mM Glutamax) aufbewahrt, das alle zwei Tage gewechselt wurde.

2.2.3.ii. Explantkulturen aus adultem Bulbus olfactorius der Maus

Der Riechkolben (Bulbus olfactorius) wurde aus 5 Wochen alten C57Bl/6NcrI Mäusen präpariert, kurz in DPBS gewaschen und mit einer Rasierklinge zerkleinert. Das Gewebe wurde auf 100% Matrigel (BD, Heidelberg) in Differenzierungsmedium (Neurobasal-Medium, angereichert mit B27 1:50 v/v (Invitrogen/Gibco, Karlsruhe), 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin und 5% v/v fötalem Kälberserum) ausgesät. Anschließend wurde während 7 d unter Zellkulturbedingungen gewartet, bis ausreichend viele Zellen für die Transfektion aus den Gewebestücken ausgewandert waren.

2.2.3.iii. Ballistische Transfektion von Gewebekulturen

Während sich aus Einzelzellen herangezogene Zellkulturen transient mit DNA-Lipid-Komplexen transfizieren lassen, verlangt die transiente Transfektion von Zellen in Gewebeverbänden nach einer spezialisierten Methode. Hier wurde ein zuvor beschriebenes Protokoll (Schiedlmeier, 1994) sowie die Apparatur für ballistische Transfektion des Lehrstuhls für Genetik der Universität Regensburg benutzt. Zu transfizierende DNA (Vektoren phuDCX3509-DsRed2 und als Kontrollplasmid pDsRed2-N1) wurde zunächst mittels Ethanol-Fällung an 1,5 bis 3,0 µm große, sphärische Goldpartikel (Alfa Aesar, Karlsruhe) gebunden, dies unter einem DNA zu Gold Verhältnis von 1:1 (w/w). 10 µl der je 1µg DNA bzw. Gold enthaltenden Suspension wurden dann in einen Swinney-Filterhalter (13 mm Durchmesser, Millipore, Schwalbach) eingebracht. Der Filterhalter war über ein Schlauchsystem mit einer Helium-Druckgasflasche verbunden, DNA-Goldpartikel wurden bei einem Druck von 400 kPa (4 Bar) während ca. 0,1 s aus einem Abstand von 6 cm auf das Gewebe geschossen. Transfiziertes Gewebe wurde nach 1 bis 2 Tagen in 4% (w/v) PFA während 2 h bei R.T. fixiert, dreimal für 10 min in DPBS gewaschen und bis zur immunhistologischen Untersuchung in Kryoprotekt-Lösung (25% v/v Glycerin, 25% v/v Ethylenglycol, 0,1 M PO₄³⁻-Puffer) bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4. Transgene Tiere

Allgemeines. Mäuse wurden in einem Hell-Dunkel-Zyklus von je 12 h gehalten; sie hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Futter. Alle Tierexperimente wurden gemäß der European Communities Council Directive (86/609/EEC) und gemäß den Richtlinien des Institutes für Neurologie durchgeführt.

2.2.4.i. Herstellung transgener Mauslinien

Zur Herstellung der transgenen Mauslinien wurden je 100 µg phuDCX3509-EGFP bzw. 100 µg phuDCX3509-DsRed2 Vektor unter Verwendung der Enzyme *Af*II und *Xho*I einem Restriktionsverdau unterzogen. Es resultierte jeweils ein DNA-Fragment von ca. 4,5 kbp, das die humane regulatorische Sequenz des *Doublecortin*-Gens, die kodierenden Sequenzen für eines der beiden Fluoreszenzproteine sowie ein SV40 Polyadenylierungs-Signal enthielt. Regulatorische Region, Reporterprotein und Polyadenylierungssignal werden im Folgenden auch kurz "Transgen" genannt. Das entsprechende

Transgen, welches das *Luziferase*-Gen aus dem Glühwürmchen unter Kontrolle der *DCX*-Kontrollregion stellt (5,5 kbp), wurde aus 100 µg phuDCX3509-FFLuci mit *KpnI* und *BamHI* ausgeschleust.

Alle resultierenden transgenen Fragmente (ca. 4,5 kpb bzw. 5,5 kpb groß) wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese vom restlichen, linearisierten Vektor abgetrennt, gefolgt von einer Extraktion unter Verwendung des Geneclean Kits (Bio 101, Carlsbad, CA, USA). Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden unter einer Konzentration von 1 ng/µl in einer Lösung von 10 mM Tris/0,1 mM EDTA in den Pronukleus von B6C3F1 Maus-Embryonen im 1 Zell-Stadium injiziert. Die überlebenden Embryonen wurden noch am selben Tag in die Eileiter von scheinschwangeren, 0,5 Tage postkoitalen CD-1 Empfängermausen gepflanzt. Mit der Herstellung der transgenen Tiere war Qinzhang Zhu (Mikroinjektions-Einheit des Clinical Research Institute of Montreal, Quebec, Canada) beauftragt.

Identifizierung der huDCX3509-EGFP, huDCX3509-DsRed2 bzw. huDCX3509-FFLuci transgenen Mäuse. Genomische DNA aus den Schwanzspitzen der Nachkommen wurde auf den Gehalt an Transgen (huDCX3509-EGFP, huDCX3509-DsRed2 oder huDCX3509-FFLuci) mit Hilfe eines PCR-gestützten Screenings untersucht. Nach Inhalationsnarkose der Tiere durch Isofluoran (1-Chlor-2,2,2-trifluorethyl-difluormethylether, Abbott, Wiesbaden) wurde ein etwa 3 mm langes Stück von der Schwanzspitze der Mäuse mit einem Skalpell abgetrennt, und DNA aus dem Gewebe extrahiert (DNeasy Tissue Kits (Qiagen, Hilden)). Um die Anwesenheit der Reporter-Gene in der genomischen DNA festzustellen, wurden PCRs mit den folgenden Oligonukleotiden durchgeführt:

| Reportergen | Oligonukleotide |
|--|--|
| EGFP | Oligo 5' AAG TTC ATC TGC ACC ACC GGC Oligo 3' CTT TAC TTG TAC AGC TCG TCC |
| DsRed2 | Oligo 5' CTG TCC CCC CAG TTC CAG T Oligo 3' CGT TGT GGG AGG TGA TGT CCA G |
| Luziferase aus <i>Photinus pyralis</i> | Oligo 5' TCA AAG AGG CGA ACT GTG TG Oligo 3' TTT TCC GTC ATC GTC TTT CC |
| Aktin | Oligo 5'ATG AAG ATC CTG ACC GAG CG Oligo 3'TAC TTG CGC TCA GGA GGA GC |

Aktin-Primer dienten als interne Kontrolle für das grundsätzliche Funktionieren der PC-Reaktion in jedem Ansatz. Das folgende PCR-Protokoll kam zur Anwendung:

94°C, 2 min;
30 Zyklen: 94°C, 45 s; 59°C, 45 s; 72°C, 2 min;
72°C, 8 min

PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (1,5 % w/v Agarose/0.5 x TBE Gel) analysiert, transgene Tiere wurden durch die Anwesenheit eines 587 bp (EGFP), 436 bp (DsRed2) bzw. 333 bp (Glühwürmchen-Luziferase) PCR Produkts identifiziert, die Kontroll-Aktin Bande lag bei 700 bp. Mäuse, die das Transgen in genomische DNA integriert hatten, wurden mit C57BL/6Ncr1 Mäusen (Charles River Laboratories, Sulzfeld) gekreuzt, um die Kolonie zu expandieren.

2.2.4.ii. BrdU-Markierung neu gebildeter Zellen während adulter Neurogenese

Um die genomische DNA sich teilender Zellen *in vivo* zu markieren, wurde den Tieren intraperitoneal BrdU (5'Bromo-2'Desoxy-Uridin) in einer Konzentration von 50 mg je kg Körpergewicht injiziert. Hierzu wurde eine sterile Lösung von 10 mg/ml BrdU in DPBS verwendet.

2.2.4.iii. Fluoreszenzaktivierte Anreicherung Reporter-exprimierender Zellen aus transgenen Tieren (Durchflusszytometrie)

Aus Gewebe gewonnene, mittels PPD-Lösung dissozierte Zellen (siehe 2.2.2.ii) wurden während 10 min bei 120 x g zentrifugiert, ein- bis zweimal in PBS gewaschen und unter einer Dichte von 1 x 10⁶ Zellen/ml in PBS mit 0,25 mM EDTA aufgenommen. Nach Filtration durch ein Nylon-Netz (Porenweite 35 µm) wurden die Zellen bis zur fluoreszenzaktivierten Zellsortierung auf Eis aufbewahrt. Durchflusszytometrie erfolgte am FACStarPlus (BD-Biosciences, Heidelberg) des Lehrstuhls für Pathologie am Klinikum der Universität Regensburg, wobei Zellen nach physikalischen (z.B. Größe) und biologischen Charakteristika (z.B. Fluoreszenz) getrennt und in Kulturgefäßen gesammelt wurden.

2.2.5. Proteinbiochemische Methoden

Gewinnung von Proteinextrakten. Zur Herstellung von Proteinextrakten aus Zellkulturen wurden diese zunächst mit Hilfe eines Zellschabers in DPBS von der Unterlage, einer 6-Well-Kulturschale, abgelöst. Nach 5 min Zentrifugation bei 200 x g wurde das Zellpellet in SUB-Puffer (0,5% w/v Natrium-Dodecyl-Sulfat, 8M Harnstoff, 2% v/v β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Das Material wurde homogenisiert, indem man es mindestens 5 mal durch eine auf eine 2-ml-Einwegspritze aufgesetzte Injektionsnadel mit 0,9 mm Durchmesser presste. Tieren entnommenes Gewebe wurde kurz auf Trockeneis zwischengelagert, dann in SUB-Puffer aufgenommen und mit Hilfe eines elektrischen Drills während mehreren min bei R.T. homogenisiert. Das Zell- oder Gewebelysat wurde anschließend 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und aus ihm die Konzentration an Protein nach der Methode von Bradford bestimmt. Proteinextrakte wurden bei -20°C gelagert.

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot. 2 - 5 µg Protein je Spur wurden 1:6 (v/v) mit denaturierendem Puffer (0,35 M Tris-HCl pH 6.8, 30% v/v Glycerin, 10% w/v SDS, 0,6 M DTT, 0,012% w/v Blomphenolblau in dH₂O) versetzt und für 5 min aufgekocht, auf ein 12,5% SDS-PAA-Gel geladen, bei 2 mA/cm der Größe nach aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran mit 0,45 µm Porengröße (Protran BA 85, Schleicher+Schuell, Dassel) geblottet (2,5 mA/cm², 0,7 h). Das anschließende Blockieren der Membran, Waschen und auch die Inkubation mit Antikörpern geschahen in Gelatine-Westernpuffer (20 mM Tris-HCl pH 7.3, 0,9% w/v NaCl, 1% v/v Fischhaut-Gelatine (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 0,1% v/v Tween-20).

Um Doublecortin, EGFP oder Aktin immunologisch nachzuweisen, wurde die Membran für zwei Stunden bei R.T. gegenüber unspezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen blockiert. Anschließend wurden die geblotteten Proteine über Nacht bei 4°C folgenden Antikörpern ausgesetzt: anti-DCX (Ziegen IgG, 1:1000, Santa Cruz, California, USA), anti-EGFP (Ziegen IgG, 1:1000, Rockland, Gilbertsville, PA, USA) oder anti-Aktin (Kaninchen IgG, 1:5000, Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Membranen wurden am nächsten Tag viermal für 10 min auf einem Rotationsschüttler gewaschen und danach mit Meerrettich-Peroxidase-konjugierten anti-Ziege-IgG (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) oder anti-Kaninchen-IgG (Dianova, Hamburg) Antikörpern (Verdünnungen 1:50.000) für 2 h bei R.T. inkubiert.

Nach 3 bis 4 weiteren Waschschritten erfolgte Detektion der Peroxidase-Aktivität, gestützt auf das ECL-Plus Western Blotting Detection System (Amersham-Pharmacia, Freiburg).

Lumineszenz wurde auf Röntgenfilmen (Hyperfilm, Amersham-Pharmacia, Freiburg) detektiert. Die Expression von DCX und EGFP während der Entwicklung in transgenen Mäusen wurde quantitativ anhand der Intensität des Signals auf dem Röntgenfilm erfasst; dies geschah mittels densitometrischer Auswertung unter Verwendung der Software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), wobei zwei Westernblots unabhängig erstellt und ausgewertet wurden. Das Ausmaß der Expression von EGFP und DCX auf verschiedenen Entwicklungs-Stufen wurde anhand des Werts zum Postnataltag 0 normalisiert.

2.2.6. Immunfärbungen an Zellen und Geweben

2.2.6.i. Immunzytochemische Untersuchung von Zellkulturen

Gemäß der hier beschriebenen Methode wurden die unter 2.2.2. beschriebenen Zellkulturen sowie auch die unter 2.2.3.ii. beschriebenen Explantkulturen aus dem BO adulter Mäuse immunzytochemisch untersucht.

Nach 30 min Fixieren bei R.T. in Phosphat-gepuffertem 4% Paraformaldehyd (4% w/v PFA, 2,5 mM NaOH, 0,4 mM CaCl₂, 50 mM Sucrose, 0,1 M NaPO₄) wurden die auf Glas-Deckgläschen adhärenten Zellen dreimal für 10 min in TBS (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) gewaschen, um anschließend 1 h in Histologie-Gelatinepuffer (0,1 M Tris-HCl pH 7.5, 0,15 M NaCl, 1% w/v bovines Serumalbumin, 0,2% v/v Fischhaut-Gelatine und 0,1% v/v Triton X-100) bei R.T. zu blockieren. Über Nacht wurde bei 4°C mit primären IgG-Antikörpern in Gelatinepuffer inkubiert:

| Antikörper | Hersteller | Verdünnung |
|---|---|------------|
| Kaninchen anti-Calbindin | Swant, Bellinoza, Schweiz | 1:2000 |
| Maus anti-Calretinin | Swant, Bellinoza, Schweiz | 1:1000 |
| Kaninchen anti-Cholinacetyltransferase (ChAT) | Chemicon, Temecula, CA, USA | 1:2000 |
| Ziege anti-Doublecortin | Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA | 1:1000 |
| Kaninchen anti-GABA | Chemicon, Temecula, CA, USA | 1:500 |
| Kaninchen anti-Galactocerebroside AB142 | Chemicon, Temecula, CA, USA | 1:250 |
| Kaninchen anti-GFAP | Dako, Glostrup, Dänemark | 1:1000 |
| Kaninchen anti-Ki67 | Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK | 1:500 |
| Maus anti-Map-2a/b | Sigma-Aldrich, Taufkirchen | 1:250 |
| Maus anti-Nestin | BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA | 1:500 |
| Kaninchen anti-Serotonin (5-HT) | Diasorin, Stillwater, MN, USA | 1:500 |
| Maus anti-βIII-Tubulin, clone 5G8 | Promega, Mannheim | 1:500 |
| Kaninchen anti-Tyrosin Hydroxylase | Chemicon, Temecula, CA, USA | 1:500 |
| Kaninchen anti-Neurofilament 200 | Chemicon, Temecula, CA, USA | 1:500 |

Am nächsten Tag erfolgten zwei Waschschrifte à 10 min in Histologie-Gelatinepuffer bei R.T., die sekundären Fluorochrom-konjugierten Antikörper wurden anschließend 1:500 im selben Puffer verdünnt und 2 h bei R.T. mit den Zellen inkubiert. Verwendet wurden Rhodamin Red-X-konjugierte-, Cy5-konjugierte- und Fluorescein(FITC)-konjugierte Esel anti-Maus, Kaninchen und Ziege anti IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg). Zur Gegenfärbung der Zellkerne diente 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid-Hydrat (0,25 µg/ml, DAPI, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) oder To-pro-3 (1 mM, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Nach dem letzten Waschschritt wurden die Proben kurz in DPBS gewaschen und mit Fluoromount-Medium (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) auf Objektträger aufgezogen. Bei Oberflächen-Antigenen ist die immunhistologische Detektion empfindlich gegenüber der Anwesenheit von Triton X-100. Dieses Detergens wurde dann nicht zum Gelatinepuffer gegeben; bei Doppelfärbungen wurde erst das Oberflächenantigen unter Vermeidung von Triton X-100 detektiert, nach einer weiteren Fixierung wurde dann in Histologie-Gelatinepuffer mit Triton X-100 permeabilisiert und schließlich gegen das zelluläre Antigen gefärbt.

2.2.6.ii. Mikroskopie und Auswertung der Zellkultur-Immunhistologie

Bestimmung verschiedener Parameter im Vergleich zur Gesamtzellzahl. Das konfokale Scanning-Lasermikroskop ermöglichte unter den Anregungs-Wellenlängen 488 nm, 568 nm und 647 nm die getrennte Detektion von EGFP bzw. FITC, DsRed bzw. Rhodamin sowie Cy5 bzw. To-pro-3. Unter einer Vergrößerung von 250x je Probe wurden 5 zufällig gewählte Gesichtsfelder ausgezählt. Dabei wurde zunächst die Gesamtzahl der im Gesichtsfeld vorhandenen Zellen über die Kernfärbung bestimmt, anschließend je nach Ansatz die Zahl der Reportergen-exprimierenden oder für den gefärbten Marker positiven Zellen, woraus sich Prozentwerte ergaben. Der Mittelwert aus den fünf Gesichtsfeldern wurde errechnet und dem Ergebnis der Auswertung anderer Parameter gegenübergestellt. Daten wurden in drei aufeinander folgenden Experimenten ermittelt, Standardabweichungen sind als +/- Werte angegeben. Statistische Untersuchungen erfolgten mit Hilfe des Student's *t*-Test (Prism 4, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Bestimmung der Verteilung verschiedener Marker auf transfizierte Zellen. Am konfokalen Lasermikroskop wurden unter einer Vergrößerung von 400x je Probe 40 Zellen, die das Reportergen EGFP exprimierten, zufällig ausgewählt. Diese wurden auf Expression des jeweils zu detektierenden Markers untersucht, und die ermittelten Zahlen den Ergebnissen aus der Untersuchung anderer Marker gegenüber gestellt. Daten wurden in drei aufeinander folgenden Experimenten ermittelt.

2.2.6.iii. Immunhistochemische Untersuchung von Gewebe

In Immunfärbungen untersucht wurden entweder organotypische Schnitt-Kulturen (2.2.3.i) oder am Schlittenmikrotom bzw. Kryostaten gewonnene Gewebeschnitte (im Folgenden beschrieben).

Perfusionsfixierung. Vor Beginn der Perfusionsfixierung wurden die Mäuse tief narkotisiert, und zwar mit einer Mischung aus Ketamin (24,8 mg/ml; 10% Ketamin, WDT, Garbsen), Acepromazinmaleat (0,248 mg/ml; Vetranquil, Sanofi-Ceva GmbH, Düsseldorf) und Xylazinhydrochlorid (1,26 mg/ml; Rompun, Bayer, Leverkusen). Den Tieren wurde anschließend der

Brustraum geöffnet, eine Perfusionsnadel wurde in die linke Herzkammer eingeführt und bis zur Aorta vorgeschoben. Anschließend wurde die rechte Vorhof des Herzens geöffnet, um venöses Blut abfließen zu lassen. Für 5 min wurde über die Perfusionsnadel eisgekühltes 0,9% (w/v) NaCl in den Blutkreislauf des Tieres gepumpt, schließlich wurde ebenfalls für 5 min mit 4% (w/v) PFA in 100 mM Phosphat-Puffer, pH 7.4, durchströmt. Die Tiere wurden schließlich dekapiert, und das Gehirn entnommen, um es sofort in 4% (w/v) PFA, gelöst in 100 mM Phosphat-Puffer, bei 4°C für 24 h nachzufixieren. Das Gewebe wurde für mindestens 48 h bei 4°C in 30% (w/v) Saccharose/100 mM Phosphat-Puffer gelagert, danach in Kryoprotekt-Lösung (25% v/v Glycerin, 25% v/v Ethylen-Glykol, 50 mM Phosphat-Puffer, pH 7.4) aufbewahrt.

Gewebeschnitte am Schlittenmikrotom. Geschnitten wurde das perfusionsfixierte Gewebe auf einem modifizierten Schlittenmikrotom (SM 2000 R, Leica, Bensheim). Ein speziell angefertigter Kupferschlitten erlaubte das Auffrieren der Gehirne. Hierzu wurde er mit einem Trockeneis-Ethanolgemisch vorgekühlt. Gehirne wurden auf einer Schicht Einbettmedium (Tissue Tek, Sakura, Torrance, CA, USA) festgefroren und mit Trockeneis überhäuft. Nach Durchfrieren des Gewebes wurden Schnitte von 25-40 µm Dicke erstellt und in Kryoprotekt-Lösung bei -20°C gelagert.

Schneiden im Kryostaten. Unfixierte Gehirne wurden im Kryostaten (CM 3000, Leica, Bensheim) zu 14 µm geschnitten. Die Schnitte wurden direkt auf Adhäsionsobjektträger (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgebracht und getrocknet, anschließend bei -80°C aufbewahrt.

Immunfärbungen. Färbung wie Waschschrifte erfolgten unter ständigem Schütteln in Zellkulturschalen, Netzeinsätze (Corning, über Schubert und Weiss, München) ermöglichen das Umsetzen zwischen den verschiedenen Lösungen. Fixiertes und geschnittenes Gewebe wurde zunächst 3 x 10 min in TBS gewaschen.

Um in die genomische DNA eingebautes BrdU für Antikörper zugänglich zu machen, musste das Gewebe vorbehandelt werden: Die Schnitte wurden bei 65°C für 2 h in einer Lösung aus 0,3 M NaCl, 30 mM Citrat-Puffer, pH 7.0, 50% (v/v) Formamid inkubiert, danach 10 min gewaschen in 0,3 M NaCl, 30 mM Citrat-Puffer, pH 7.0, anschließend bei 37°C für 30 min in 2 M HCl inkubiert und schließlich in 0,1 M Borat-Puffer, pH 8.5, bzw. in TBS für je 10 min gewaschen. Gewaschene und eventuell für BrdU-Detektion vorbehandelte Schnitte wurden 60 min in Histologie-Gelatinepuffer (0,1 M Tris-HCl pH 7.5, 0,15 M NaCl, 1% w/v bovinen Serumalbumin BSA, 0,2% v/v Fischhaut-Gelatine und 0,1% v/v Triton X-100) blockiert. Primäre IgG-Antikörper wurden, verdünnt in Histologie-Gelatinepuffer, wie folgt eingesetzt, wobei über Nacht bei 4°C inkubiert wurde:

| Antikörper | Hersteller | Verdünnung |
|-------------------------|---|------------|
| Ratte anti-BrdU | Oxford Biotechnology, Oxford, UK | 1:250 |
| Ziege anti-Doublecortin | C-18, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA | 1:500 |
| Kaninchen anti-GFAP | Dako, Glostrup, Dänemark | 1:1000 |
| Maus anti-Nestin | BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA | 1:500 |
| Maus anti-NeuN | Chemicon, Temecula, CA, USA | 1:500 |
| Kaninchen anti-EGFP | Molecular Probes, Eugene, OR, USA | 1:1000 |

Chromogene Immundetektion (DAB-Färbung). Zur chromogenen Immunfärbung wurden die Schnitte anschließend 3 mal für 10 min gewaschen und mit Biotin-konjugierten, spezies-spezifischen Sekundärantikörpern inkubiert. Schnitte wurden danach in Peroxidase-Avidin-Lösung (Vectastain Elite ABC Kit) gemäß den Angaben des Herstellers (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) inkubiert. Peroxidase-Aktivität der Immun-Komplexe wurde sichtbar gemacht unter Verwendung einer Lösung aus 0,25 mg/ml 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 0,01% (v/v) H₂O₂ und 0,04% (w/v) NiCl₂ in TBS. Schnitte wurden auf Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen und mit Hilfe von Neo-Mount (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

Immundetektion mittels Epifluoreszenz. Gefolgt auf die Inkubation mit Primärantikörper über Nacht und nach drei 10 min Waschschritten wurde im Fall epifluoreszenter Immunfärbungen für 2 h bei R.T. mit dem spezies-spezifischen, Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Verwendet wurden, durchwegs in einer Verdünnung von 1:500: Rhodamin RedTM-X-konjugierte-, Cy5-konjugierte- und Fluorescein(FITC)-konjugierte Esel anti-Maus, Kaninchen und Ziege anti-IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg). Zur Gegenfärbung der Zellkerne diente 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid-Hydrat (0,25 µg/µl, DAPI, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) oder To-pro-3 (1 mM, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Nochmals wurde 3 mal gewaschen und am Ende auf Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Eindeckelmedium war Prolong (Prolong Antifade Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

2.2.6.iv. Quantitative Auswertung der Immunfärbungen an Geweben

Erfassung von Zellzahlen aus Gewebe-Immunfärbungen. Zur Quantifizierung von Immunfärbungen aus Gewebeschnitten wurde ein systematisches Zählprotokoll verwendet (Gundersen, 1988). Für jedes Tier wurde entsprechend einem Intervall von 200 µm jeder fünfte Schnitt der rechten Gehirn-Hemisphäre ausgewählt und immunhistochemisch gefärbt. Das Referenz-Volumen wurde mittels des halb-automatischen Stereologie-Systems (Stereoinvestigator, MicroBrightField, Colchester, VT, USA) errechnet. In der Granulärzellschicht des BO wurde die Anzahl BrdU-positiver Zellen innerhalb eines insgesamt 200 µm x 200 µm großen Zählrahmens bestimmt, der in Quadrate zu 50 µm x 50 µm unterteilt war. Positive Zellen, welche sich am Rand des Schärfebereichs sowie am äußeren Rand des Zählrahmens befanden, wurden nicht gezählt. Um die Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen in der jeweiligen Struktur zu ermitteln, erfolgte eine Hochrechnung der Zahlen auf das Gesamtvolumen. Zur Analyse der Zellzahlen im Gyrus dentatus des Hippocampus wurden keine Zählrahmen verwendet. Alle Endergebnisse bezogen sich auf eine Gehirn-Hemisphäre und müssen zur Bestimmung der Gesamtzahl je Gehirn verdoppelt werden.

Um das Ausmaß neuronaler Differenzierung aus neugebildeten Zellen zu bestimmen, wurde eine Auswahl an Schnitten (jeder fünfte Schnitt, entsprechend einem Intervall von 200 µm) je Tier am konfokalen Lasermikroskop untersucht, unter Verwendung des 40 x PL APO Öl-Objektivs (1,25 numerische Apertur) und einer Brennweite von maximal 2 µm. Durchschnittlich wurden 100 BrdU-positive Zellen pro Tier auf neuronale Differenzierung untersucht. Bestimmt wurden die Anzahl BrdU-positiver, nicht neuronaler Zellen, identifiziert über BrdU-Färbung alleine, sowie die Anteile

BrdU/DCX- und BrdU/NeuN-doppelt-positiver Zellen. BrdU/DCX- bzw. BrdU/NeuN-doppelt markierte Zellen wurden als neu gebildete Nervenzellen gewertet.

Statistische Auswertung. Daten sind als Durchschnittswerte +/- der Standardabweichung (SD) angegeben. Statistische Analysen wurden unter Verwendung des Student's *t*-Test durchgeführt (Prism 4, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Sofern nicht anders angegeben, wurden bei $p < 0,05$ Unterschiede als signifikant angenommen.

Analyse der Reporterexpression in neu gebildeten Zellen über die Zeit. Die Neubildung von Nervenzellen in huDCX3509-EGFP transgenen Mäusen sollte mit der Neurogenese in Wildtyp-Tieren verglichen werden. Hierzu wurden 2 Monate alte, heterozygote Tiere aus der huDCX3509-EGFP transgenen Linie und gleich alte Wildtyp-Tiere mit BrdU injiziert ($n_{\text{gesamt}}=110$, $n=5$ je Zeitpunkt). BrdU ist ein Basenanalagon, das in die genomische DNA sich teilender Zellen eingebaut wird; es kann als Tracer für nach dem Zeitpunkt der Injektion neu gebildete Zellen verwendet werden. Für kurzfristige Analysen (2 h, 1, 2, 4 d) genügte eine einzige BrdU-Injektion, um hohe zeitliche Auflösung der Zellneubildung zu erreichen. Für Mittel- und Langzeitanalysen (7, 10, 14, 21, 30 und 60 d), wurde BrdU täglich während der Tage 1 bis 4 injiziert, um so mehr Zellen markieren zu können. Dies sollte die natürliche Abnahme markierter Zellen über die Zeit ausgleichen (Winner, 2002). Aus der Anzahl der im BO und im Gyrus dentatus gefundenen, BrdU-markierten Zellen berechnete sich die Neurogeneserate, und ergaben sich die Zahlen zum Überleben neu gebildeter Zellen in den entsprechenden Geweben. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde auch nach Zelltyp-spezifischen Antigenen in BrdU-markierten Zellen geforscht, um so das Differenzierungs-Schicksal der neu gebildeten Zellen zu analysieren.

Untersuchung der Reporter-Expression nach experimentell induzierter Epilepsie. Drei Monate alte, heterozygote männliche Mäuse, die EGFP unter Kontrolle der DCX-regulatorischen Region exprimierten ($n = 3$, Gewicht 27-33 g), erhielten intraperitoneal 1 mg Scopolamin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) pro kg Körbergewicht, um die Wirkung von Pilocarpin auf periphere muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren zu verringern. 20 min später wurde den Tieren intraperitoneal 315 mg Pilocarpin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) je kg Körbergewicht verabreicht. Epileptische Anfälle, die zwischen 60 und 90 min dauerten, wurden anhand des Verhaltens der Tiere beurteilt. Alle behandelten Mäuse zeigten fortgesetzte konvulsivische Anfälle, so zum Beispiel beidseitige Muskelkontraktionen. Kontrolltieren ($n = 3$, Gewicht 27 – 33 g) wurde physiologische Salzlösung statt Scopolamin und Pilocarpin injiziert. An den 4 Folgetagen nach der epileptischen Episode wurde den Tieren täglich intraperitoneal BrdU injiziert, sie wurden 7 Tage nach den induzierten Anfällen getötet.

2.2.7. Elektrophysiologische Methoden

Elektrophysiologische Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Luhmann am Institut für Physiologie der Universität Mainz.

Coverslips mit primären MEF Zellen wurden 3 bis 4 d nach der transienten Transfektion mit phuDCX3509-EGFP in eine Messkammer (Volumen 3 ml) überführt und unter einer Rate von 1 – 2 ml/min mit Extrazellulärflüssigkeit überschichtet. Extrazellulärflüssigkeit setzte sich zusammen aus 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,01 mM Glycin, 10 mM Glukose und 15 mM HEPES. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur (20 - 24°C) durchgeführt, wobei ein videomikroskopisches System mit Differentiellem Interferenzkontrast (DIC) (Axioskop, Zeiss, Jena, mit Infrarotfilter KMZ 50-2, $\lambda_{\text{em}} = 750 \text{ nm}$, Brennweite 57 nm, Schott, Mainz) zum Einsatz kamen.

MEF-Zellen mit aktiver humarer *DCX*-regulatorischer Region wurden über die EGFP-Expression identifiziert. Patch-Clamp Ströme wurden gemäß eines zuvor etablierten Protokolls aufgezeichnet (Stuart, 1993). Patch-Pipetten (5-12 MΩ) waren aus Borosilikat-Röhrchen (2,0 mm Außen-, 1,16 mm Innen-Durchmesser; Science Products, Hofheim) unter Verwendung eines „vertical Puller“ (PP-83, Narishige, Tokyo, Japan) hergestellt worden. Sie waren gefüllt mit Pipetten-Lösung, zusammengesetzt aus 90 mM K-Glukonat, 5 mM NaCl, 0,06 mM CaCl₂, 0,6 mM EGTA, 15 mM HEPES, 2 mM Na₂-ATP, 0,5% w/v Biocytin (Sigma-Aldrich) und zur Aufzeichnung verbunden mit einem diskontinuierlichen Voltage-Clamp/Current-Clamp Amplifier (SEC05L, NPI, Tamm). Signale wurden verstärkt und digitalisiert (AD/DA-Umwandler, ITC-16, Heka, Lambrecht/Pfalz), sowie unter Verwendung der Software WINTIDA 4.11 (Heka, Lambrecht/Pfalz) gespeichert und weiterbearbeitet. Alle gemessenen Potentiale wurden um das Eigenpotential der Flüssigkeit von 10 mV korrigiert.

Zunächst wurden die Membranpotentiale gemessen, alle weiteren Messungen erfolgten unter einem Haltepotential von -60 mV. Zur Bestimmung von R_{input} wurden die Zellen gepulsten Strömen von -20 pA ausgesetzt. Die Amplitude der Aktionspotentiale wurde ausgehend vom gemessenen Schwellenwert bestimmt, die Dauer auf Höhe der Hälfte des Maximalwertes errechnet. Inkubation mit Tetrodotoxin erfolgte vor den Messungen für mindestens 4 min durch Zugabe zur Extrazellulärflüssigkeit, welche die Kulturen überschichtete. GABA wurde mittels Patch-Pipetten im direkten Umfeld der Zellen aufgetragen. Injiziertes Biocytin konnte in fixierten Zellen mittels Fluoreszenz-konjugiertem Avidin ähnlich wie in einer Immunfärbung detektiert werden.

2.2.8. Genetische Analyse von Patienten

Patienten, welche an Untersuchungen zur Auswirkung verschiedener Mutationen des *DCX*-Gens auf den klinischen Phänotyp teilnahmen, erfüllten die folgenden Kriterien: Sie stammten 1) entweder aus einer Familie, für die es Hinweise auf die chromosomale Vererbung von Doublecortex und/oder X-chromosomal assoziierter Lissenzephalie gab oder 2) aus einer Familie mit sporadischen Fällen beidseitiger subkortikaler Bandheterotopie, wie sie sich mittels MR-Bildgebung beobachten lässt.

Nachdem die Zustimmung der Patienten eingeholt worden war, wurde ihnen zum Zweck des Einschlusses in die Studie eine Blutprobe entnommen. Genomische DNA wurde aus den Blutzellen nach der Methode des QIAampBlood MidiKits (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die kodierenden Exons des *DCX*-Gens wurden selektiv PCR-amplifiziert und die Produkte in beiden Richtungen am DNA Sequencer 373 (Applied Biosystems, Darmstadt) sequenziert. Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen (single strand conformational polymorphisms, SSCP) wurden mit Hilfe von 10% Polyacrylamid/5% Glycerol- oder 6% Polyacrylamid-Gelelectrophorese detektiert, wobei die Banden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht wurden. Mutationen zeigten sich anhand der Anwesenheit zusätzlicher Banden neben den Banden für das Wildtypallel. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch vermessen (Analysis Software, Soft Imaging Systems, Münster), um das Ausmaß des somatischen Mosaiks bezüglich gesunder und mutierter Allele einzuschätzen zu können.

X-chromosomal Inaktivierung wurde gemäß eines zuvor beschriebenen Protokolls untersucht (Allen, 1992). Die Methode beruhte auf zwei Voraussetzungen: der Anwesenheit von Polymorphismen auf dem X-Chromosom, um zwischen mütterlichem und väterlichem X-Chromosom unterscheiden zu können, und einem unterschiedlichen Methylierungsmuster in aktiven und inaktiven X-Chromosomen. Allen et al. beschrieben eine *HpaII*-Schnittstelle in der Nähe eines polymorphen CAG-Repeats, welche in inaktiven X-Chromosomen methyliert ist. Für den Assay wurde ein Aliquot genomicscher DNA der Patientinnen mit dem Methylierungs-sensitiven Enzym *HpaII* restriktions-verdaut, für die anschließende PCR kamen Primer zum Einsatz, welche sowohl den Polymorphismus als auch die Methylierung einschlossen. Bei regelmäßiger Inaktivierung der beiden X-Chromosome in den Zellen sollten beide Allele jeweils ein Produkt in der PCR-liefern; aufgrund des Polymorphismus sollten sich die Allele anhand der Größe unterscheiden; wurde jedoch eines der beiden Allele bevorzugt inaktiviert, so erschienen die Banden in der Silberfärbung nicht gleichmäßig intensiv, was sich auch densitometrisch erfassen ließ. Densitometrie-Daten erlaubten Rückschluss auf das Ausmaß der Inaktivierung mütterlichen oder väterlichen X-Chromosoms.

3. Ergebnis I: Molekulare Mechanismen von Doublecortin und der Einfluss von *Doublecortin*-Mutationen

Fehlerhafte Ausprägung des Proteins Doublecortin kann die Migration neuronaler Vorläuferzellen beim Menschen stören. Von *DCX*-Mutationen betroffene Patienten zeigen entweder Lissenzephalie, eine schwere Fehlbildung des Gehirns mit glattem, nicht regelgerecht geschichtetem Kortex, oder eine mildere Form der Heterotopie, genannt Doublecortex-Syndrom, bei dem nur ein Teil der Nervenzellen falsch platziert ist. Innerhalb von Familien sind meist Frauen vom Doublecortex-Syndrom betroffen, während Männer unter Lissenzephalie leiden; diese Beobachtung legte eine wichtige Spur hin zur Entdeckung des Gens auf dem X-Chromosom (des Portes, 1998a; Gleeson, 1998).

Mutationen am *DCX*-Gen führen zu neuronalen Migrationsstörungen beim Menschen. Wurde die Expression des Proteins durch Knockout oder siRNA unterdrückt, so verhinderte dies neuronale Migration im Tiermodell (Bai, 2003; Corbo, 2002). Die Bedeutung Doublecortins für neuronale Migration legte funktionelle Zusammenhänge mit dem Zytoskelett nahe: Gezeigt ist die Ko-Lokalisation von Doublecortin mit dem MT-Netzwerk (Gleeson, 1999a). Struktur-Analysen ergaben, dass Doublecortin zwei für MT-assoziierte Proteine neuartige MT-Bindestellen besitzt, die als Tandem angeordnet sind (Kim, 2003). Kürzlich wurde mittels Elektronenmikroskopie der molekulare Mechanismus dieser Interaktion an aufgereinigten Proteinen *in vitro* aufgeklärt (Moores, 2004): DCX begünstigt demnach spezifisch die Entstehung der aus 13 Protofilamenten bestehenden MT-Fasern und stabilisiert diese, indem es in einer bisher für MAPs nicht beschriebenen Art und Weise in der Grube zwischen den einzelnen Protofilamenten an die MT-Fasern andockt (Moores, 2004). Überraschenderweise kann auch mutiertes DCX MT bündeln und stabilisieren (Horesh, 1999; Taylor, 2000a; Yoshiura, 2000). Dies deutet darauf hin, dass Doublecortin nicht nur vermittelt über das Bündeln von MT auf neuronale Migration bzw. neuronale Migrationsstörungen wirkt.

Ziel der im Kap. 3 dargelegten Versuche war es, den Einfluss verschiedener Mutationen des *Doublecortin*-Gens auf die funktionelle Rolle des Proteins zu

analysieren. Die beiden hier untersuchten Mutationen wurden in zwei Familien beschrieben, deren Mitglieder teilweise von Lissenzephalie oder Doublecortex-Syndrom betroffen waren. Zwischen dem klinischen Phänotyp mit unterschiedlichem Schweregrad und den molekularen Eigenschaften des mutierten Proteins sollte ein Zusammenhang hergestellt werden. Hierzu wurden mutierte sowie funktionelle Proteine in COS7-Zellen überexprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass funktionelles Doublecortin die Anaphase und Metaphase der Mitose in COS7-Zellen stark behinderte; Chromosomen konnten nur unter erschwerten Bedingungen auf die Tochterzellen verteilt werden. Verursacht war dieser Effekt vermutlich durch Interaktion Doublecortins mit dem MT-System in der Mitosespindel. In mutiertem Doublecortin ging der beobachtete Einfluss auf die Mitose teilweise verloren, wobei die Mutation, welche in Patienten die schwersten Missbildungen verursachte, die Mitose in COS7-Zellen am wenigsten störte.

3.1. Lissenzephalie und Doublecortex in zwei Familien mit Mutationen im *Doublecortin*-Gen

Zwei Familien, in denen Fälle von Lissenzephalie bzw. Doublecortex beobachtet wurden, haben an dieser Untersuchung teilgenommen (Abb. 3.1). Bei Familie A war an Position 71 des *DCX*-Gens statt eines Alanins ein Serin kodiert (A71S). Frauen aus dieser Familie, welche die Mutation trugen (AI.2, AII.8 und wahrscheinlich AII.3), entwickelten – beginnend etwa zur Zeit der ersten Menstruation - tonisch-klonische Krampfanfälle, ohne jedoch weitere klinische Symptome zu zeigen. Das MR-Bild des Gehirns einer der Frauen (AII.8) war auffällig: es zeigte ein Band heterotoper Zellen in der weißen Substanz zwischen den lateralen Ventrikeln und dem Kortex (Abb. 3.2); dieses Band war besonders deutlich im fronto-okzipitalen Bereich; der darüber liegende Kortex erschien normal gefaltet; die lateralen Ventrikel waren leicht vergrößert, und die Intelligenz der Patientin war unterdurchschnittlich. Das heterotope Band, eine Ansammlung fehlerhaft platzieter Nervenzellen, wurde als Auslöser der bei AII.8 im Alter von 13 Jahren beginnenden Epilepsie vermutet. Die beiden X-Chromosomen dieser Frau waren nicht gleichmäßig aktiv, das Muster der X-Inaktivierung, auch Lyonisation genannt, war vielmehr zugunsten eines der beiden X-Chromosomen verschoben (Abb. 3.1, Tabelle 3.1): das mutierte Allel wurde in etwa

67% der lymphoiden Zellen exprimiert. Möglicherweise lässt sich diese Beobachtung auch auf das ZNS übertragen, ein anderes Verteilungsmuster der Genprodukte aus den beiden Allelen im Gehirn ist allerdings nicht ausgeschlossen.

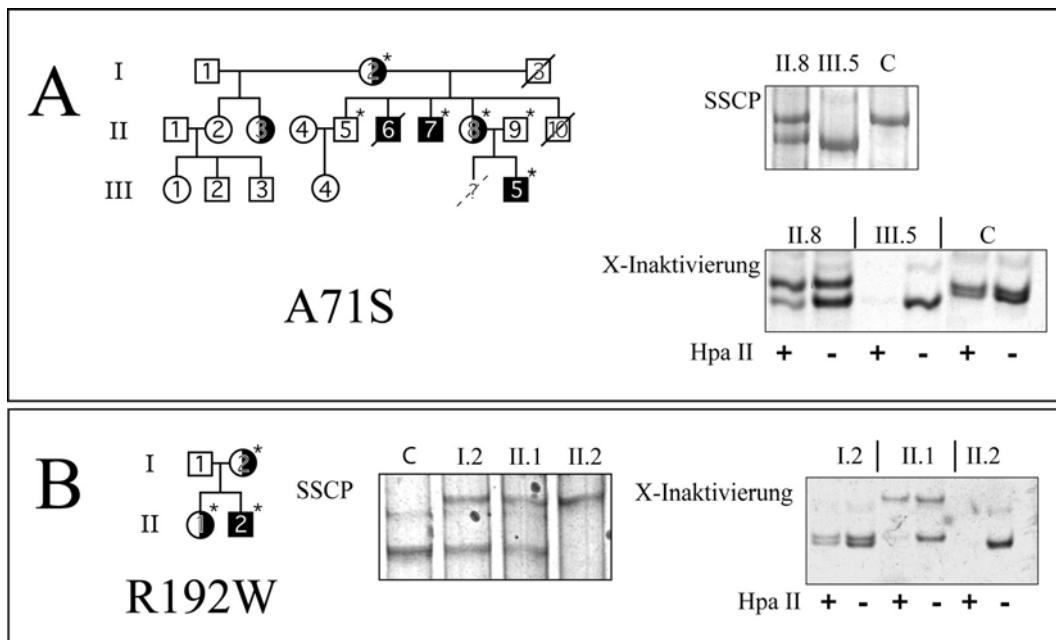


Abb. 3.1 Doublecortex und Lissenzephalie in zwei Familien und deren genetische Charakterisierung. Die beiden in den Familien A und B beobachteten Mutationen waren mittels Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (single strand conformation polymorphism, SSCP) detektiert worden, untersucht wurde auch das Muster der X-Inaktivierung (Kreis = weiblich, Viereck = männlich, Doublecortex = halb schattiert, Lissenzephalie = schwarz ausgefüllt, C = Kontrolle). Sternchen bezeichnen Familienmitglieder, die für die Studie Blut gespendet hatten. Mutiertes Allel wurde anhand der SSCP-Gele quantifiziert, das Muster der X-chromosomal Inaktivierung in einer PCR-gestützten Untersuchung bestimmt (zur Methode s. Kap. 2.2.8). Bemerkenswert war die Lyonisation zugunsten des mutierten X-Chromosoms in BII.1, und der ähnliche, wenn auch schwächere Effekt in AII.8.

Die von *DCX*-Mutationen betroffenen männlichen Mitglieder der Familie A (AII.6; AII.7 und AIII.5) litten beginnend wenige Wochen nach der Geburt unter tonisch-klonischen Krampfanfällen, waren stark in ihrer geistigen Entwicklung verzögert und körperlich schwer behindert. Patient AIII.5, der näher untersucht wurde, zeigte außer tonisch-klonischen auch atonische Krampfanfälle. Darüber hinaus war bei AIII.5 das zentrale Sehen beeinträchtigt, er konnte nicht gehen und nicht sprechen. Das zerebrale MR-Bild dieses Patienten zeigt eine bis auf den parietalen Kortex fehlende Gyrierung, der parietale Kortex war von Pachygryrie betroffen, die lateralen Ventrikel waren stark vergrößert (Hydrocephalus internus) (Abb. 3.2). Durch Medikamente ließ sich bei den Patienten AII.8 und AIII.5 die Epilepsie mildern, allerdings musste die Therapie häufig angepasst werden.

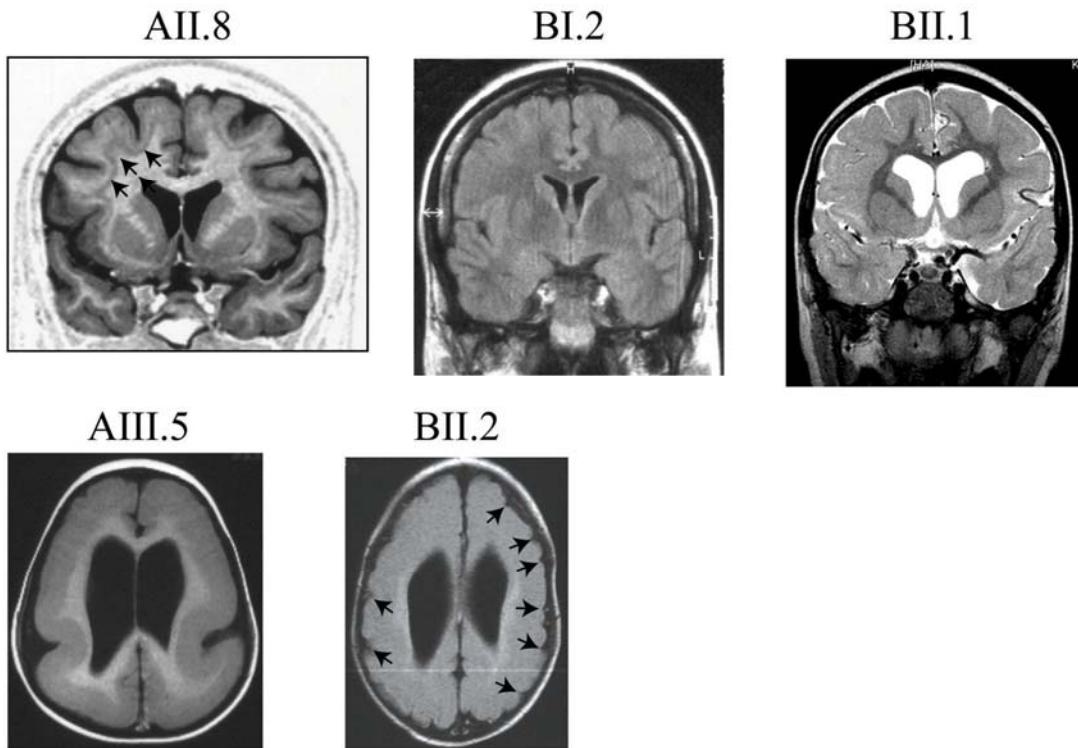


Abb. 3.2 Neuroradiologische Abbildungen (MR-Bildgebung) aus von Doublecortex/Lissenzephalie betroffenen Patienten. AII.8: eine von DCX(A71S)-Mutation betroffene Frau mit dem typischen subkortikalen Band grauer Substanz (Pfeile), auch Bandheterotopie genannt. BI.2: eine DCX(R192W) Trägerin ohne neuroradiologische Symptome. BII.1: 4jähriges Mädchen mit DCX(R192W) Mutation, diffusem Doublecortex-Syndrom und Auftreten eines einzigen breiten Bands grauer Substanz. AIII.5 und BII.2: unterschiedliche Grade der Lissenzephalie, Pfeile bezeichnen den pachygryischen bzw. polymikrogyrischen Kortex in BII.2.

| Patient | Anwesenheit mutierten Allels | Expression mutierten Allels ^a |
|---------|------------------------------|--|
| AII.8 | 50% ^b | 67% |
| BI.2 | 50% | 54% |
| BII.1 | 54% ^b | 76% |

Tabelle 3.1 Vorhandensein mutierten DCX-Allels und dessen quantitative Expression bei verschiedenen Patientinnen. ^aProzentsatz der Aktivität des X-Chromosoms mit mutiertem Allel gemäß X-Inaktivierungs-Assay an DNA aus Lymphozyten. ^bPatientin hatte heterozygote Mutation geerbt

In Familie B sind drei betroffene Individuen beschrieben, zwei weibliche und ein männliches. Die Familie suchte eine neurologische Klinik auf, nachdem bei Patient BI.2 im Alter von acht Wochen erstmals Krampfanfälle aufgetreten waren. MR-Bildgebung des männlichen Patienten zeigte ein lissenzephal und pachygryisches Gehirn mit besonderer Schwere der Symptome in fronto-parietalen Regionen, begleitet von verkleinertem Corpus callosum und vergrößerten lateralen Ventrikeln; in manchen Bereichen des Kortex wurde eine Band-Heterotopie gefunden (Abb. 3.2). Diese anatomischen Fehlbildungen spiegelten sich in einer schweren motorischen und kognitiven Behinderung des Patienten; das zentrale Sehen war beeinträchtigt. Im

Elektroenzephalogramm wurden bei BII.2 epileptische Anfälle detektiert, welche allerdings zuverlässig mit Medikamenten zu behandeln waren. Trotz der auch hier schwerwiegenden Gehirn-Malformationen gab es Unterschiede zum Patienten AIII.5 aus der ersten Familie. Entsprechend einer von Cardoso et al.(Cardoso et al., 2000) vorgeschlagenen Gradeinteilung, wonach komplette Agyrie mit „Grad 1“ und dünne subkortikale Bandheterotopie mit „Grad 6“ gleichgesetzt wird, konnte Patient AIII.5 dem Grad 1 und Patient BII.2 dem Grad 2 bis 3 zugeordnet werden.

Patient BII.2 wurde genetisch untersucht, und eine Mutation im *DCX*-Gen gefunden. Diese hatte zum Austausch eines Arginins gegen Tryptophan an der AS-Position 192 (R192W) geführt. Die Mutter von BII.2, welche seit dem Alter von 13 Jahren unter Epilepsie litt, war heterozygot bezüglich der Mutation R192W. Überraschenderweise zeigte die MR-Aufnahme dieser Patientin (BI.2) weder eine subkortikale Bandheterotopie noch andere Gehirnfehlbildungen (Abb. 3.2). Die Epilepsie der Mutter ließ sich wie beim Sohn erfolgreich medikamentös behandeln.

Eine Sequenzierung ergab, dass die Tochter von BI.2 ebenfalls das mutierte Allel auf einem ihrer X-Chromosomen trug. Gegen Abschluss der Untersuchungen war dieses Mädchen (BII.1) erst 4 Jahre alt und noch anfallsfrei, eine später im Leben auftretende Epilepsie kann bei ihr jedoch nicht ausgeschlossen werden. In der zerebralen MRT-Untersuchung dieser Tochter war eine diffuse Bandheterotopie zu sehen, welche besonders den fronto-parietalen Kortex betraf. Im frontalen Kortex berührte das Band heterotoper Neuronen den normalen Kortex, die graue Substanz war in dieser Region deshalb als ein einziges breites Band organisiert. In den parietalen und okzipitalen Regionen war das heterotope Band dünner und lag getrennt vom Kortex. Die lateralen Ventrikel des Mädchens waren leicht vergrößert, das Corpus callosum dagegen verkleinert (Abb. 3.2). Insgesamt gesehen schien sich die identische Mutation bei der Tochter (BII.1) stärker als bei der Mutter (BI.2) ausgewirkt zu haben. Um die Ursache dieser klinischen Unterschiede herauszufinden, wurden die X-chromosomalen Inaktivierungsmuster von Mutter und Tochter verglichen. Wie in Tabelle 3.1 aufgelistet, war das X-Chromosom mit dem von der Mutter (BI.2) geerbten mutierten Allel bei BII.1 bevorzugt aktiv. Im Gegensatz dazu fand sich bei BI.2 eine weitgehend zufällige Lyonisation. Die stärkere Expression des mutierten Allels bei der Tochter (Genotyp) könnte der Grund für den stärkeren klinischen Phänotyp sein.

3.2. Wildtyp- und mutiertes Doublecortin binden an Mikrotubuli in COS7-Zellen

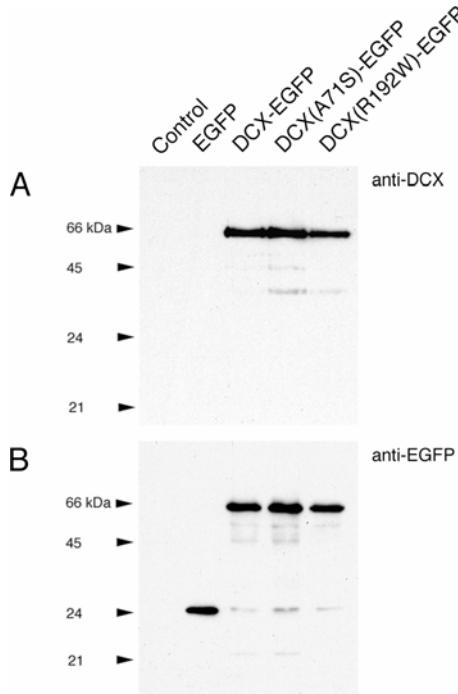


Abb. 3.3 Expressions-Analyse von DCX-EGFP-Fusionsproteinen in transfizierten COS7-Zellen. Westernblot von Lysaten aus transfizierten COS7-Zellen, markiert mit Antikörpern gegen A) DCX und B) EGFP. COS7-Zellen, transfiziert mit Expressionskonstrukten für DCX, zeigen eine starke Bande von 66 kD (A), zusammengesetzt aus DCX (MW 40 kD) und EGFP (MW 27 kD). Die drei verschiedenen DCX-Allele sind in ähnlichen Mengen exprimiert. Detektion von EGFP (B) auf einer zweiten, identischen Membran bestätigt die Anwesenheit des Doublecortin-EGFP-Fusionsproteins in transfizierten Zellen.

Um die molekularen Eigenschaften der beschriebenen DCX-Mutationen zu analysieren, wurden Expressions-Vektoren für mutierte oder Wildtyp-cDNAs erstellt. Die Allele waren in diesen Vektoren als Fusions-Protein gemeinsam mit dem Reportergen EGFP kodiert und wurden in COS7-Zellen nach Transfektion exprimiert. Zunächst wurde im Westernblot proteinbiochemisch nachgewiesen, dass untransfizierte und mit EGFP transfizierte COS7-Zellen kein endogenes DCX exprimierten (Abb. 3.3 A). Dagegen zeigten mit DCX-Expressionskonstrukten transfizierte COS7-Zellen eine deutliche Proteinbande im Westernblot auf einer Höhe von 66 kD, zusammen-

gesetzt offenbar aus den Molekulargewichten von DCX (40 kD) und EGFP (27 kD). In transienten Transfektionen wurden funktionales und mutiertes DCX in ähnlichem Umfang exprimiert, was auf vergleichbare Stabilität schließen ließ. Immunodetektion von EGFP auf einem Duplikat der Blotmembran (Abb. 3.3 B) bestätigte die Anwesenheit des Doublecortin-EGFP-Fusionsproteins in transfizierten Zellen.

DCX ist ein MT-bindendes Protein, welches MT bündeln kann (Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999; Horesh et al., 1999; Yoshiura et al., 2000). Als Fusionsprotein, bestehend aus DCX und fluoreszierendem EGFP, ließ sich die Verteilung von DCX in lebenden transfizierten COS7-Zellen sehr gut qualitativ

beobachteten. Das Fusionsprotein war zu kabelartigen Strukturen angeordnet (Abb. 3.4), ein Teil blieb im Zytoplasma gelöst. In der Immunzytochemie (Abb. 3.4 A-A'') war DCX mit EGFP ko-lokalisiert. Dieses Ergebnis bestätigte die Beobachtung aus dem Westernblot, wonach untransfizierte COS7-Zellen DCX nicht endogen exprimieren.

In DCX-transfizierten Zellen wurde das Protein gemeinsam mit Tubulin in MT-Bündeln gefunden (Abb. 3.4). MT waren in den mit *DCX*-Wildtyp-Allel transfizierten Zellen offensichtlich zu kräftigen Bündeln organisiert (Abb. 3.4 C-C'') und meist zu ringartigen Strukturen rund um den Zellkern angeordnet. Nicht transfizierte und EGFP-transfizierte Zellen besaßen dagegen ein feines, fibrilläres MT-Muster (Abb. 3.4 B-B''). DCX-überexprimierende Zellen waren eher kleiner, wohl verursacht durch die peri-nukleäre Konzentration von MT (Abb. 3.4 C-C'').

Interessanterweise waren auch die beiden mutierten Varianten des DCX-Proteins fähig, MT zu binden und zu bündeln. Die Expression der in Patienten gefundenen Mutanten führten ebenfalls zur Umorganisation des MT-Netzwerks (Abb. 3.4 D-E''), es bestanden jedoch qualitative Unterschiede zum Wildtyp-Allel. Die DCX(A71S) Mutante verursachte in transfizierten Zellen weniger ringartige Strukturen rund um den Kern als funktionelles DCX (Abb. 3.4 D-D''), das MT-Muster erschien vergleichsweise normal, die Zellen waren weniger geschrumpft. Dagegen ähnelten das MT-Gerüst und die Struktur von Zellen, welche mit der DCX(R192W)-Mutante transfiziert worden waren, mehr dem bei funktionellem DCX beobachteten Phänotyp (Abb. 3.4 E-E''). DCX(R192W) ließ COS7-Zellen in ähnlichem Umfang schrumpfen wie das Wildtyp-Allel.

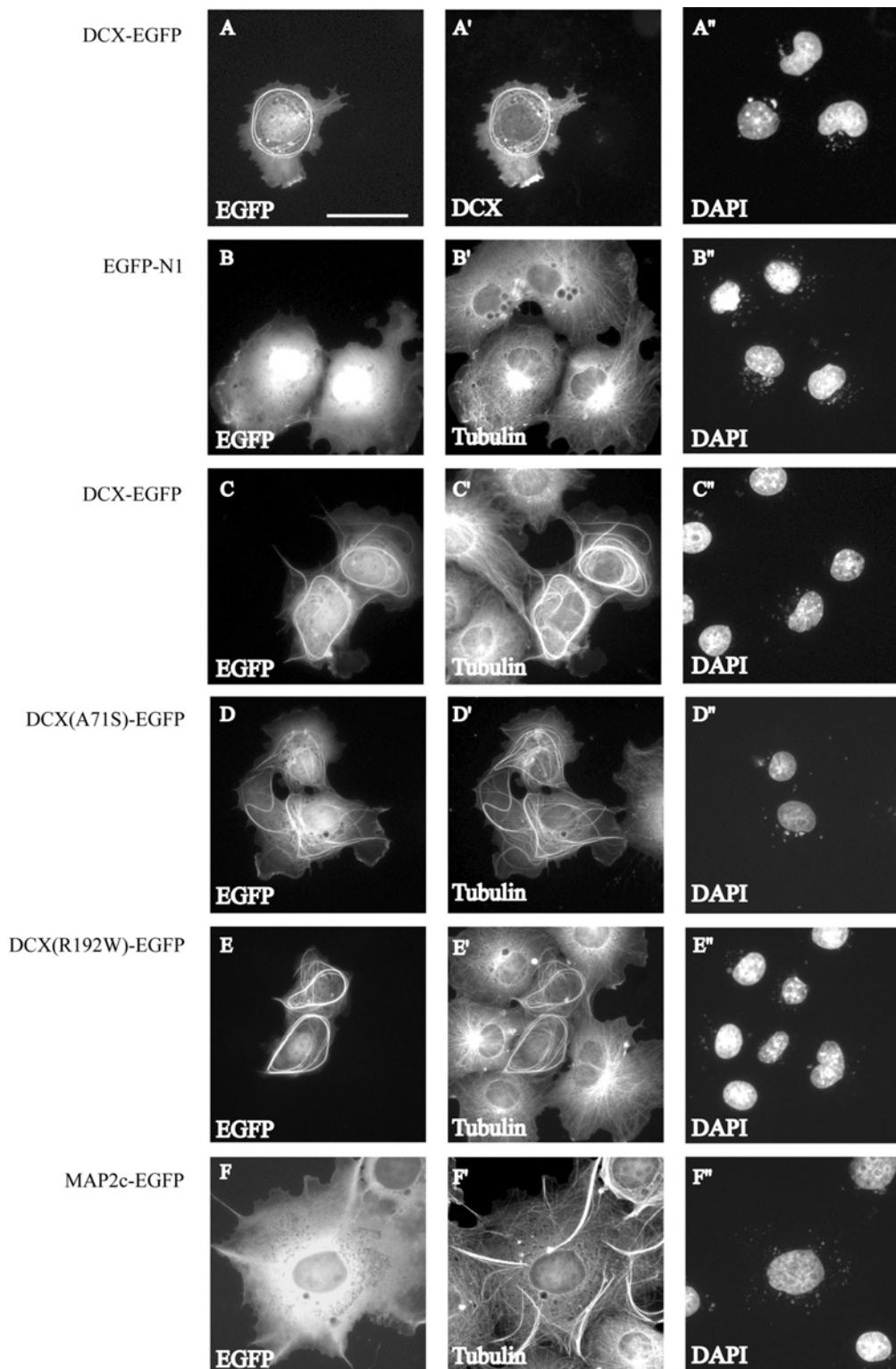


Abb. 3.4 Wildtyp- und mutiertes Doublecortin binden an Mikrotubuli in COS7-Zellen. COS7-Zellen wurden transfiziert mit: funktionellem DCX-EGFP (A und C), EGFP (B), DCX(A71S)-EGFP (D), DCX(R192W)-EGFP (E) und MAP2c-EGFP (F). Immunzytochemie wurde bezüglich DCX und alpha-Tubulin durchgeführt, Zellkerne mittels DAPI angefärbt. A und A' zeigen die Ko-Lokalisation des EGFP-Reportersignals mit der Immunodetektion von DCX. Wildtyp- (C) und mutierte DCX-Allele (D, E) binden und bündeln Mikrotubuli. MAP2c bindet und bündelt ebenfalls Mikrotubuli (F), hier waren die Bündel jedoch kürzer und schienen zentrifugal vom Zellkern aus angeordnet, während Bündel in DCX-transfizierten Zellen in dichten Knäueln organisiert waren. *Messbalken 40 µm*

Die Fähigkeit, MT zu binden und zu bündeln, ist nicht einzigartig für Doublecortin; diese Eigenschaft teilt das Protein mit vielen Mitgliedern der Familie MT-assozierter Proteine (MAPs) (Lewis et al., 1989; Kanai et al., 1989; Kanai et al., 1992; Burgin et al., 1994). In Kontroll-Experimenten wurden COS7-Zellen mit Vektoren transfiziert, welche die kodierende Sequenz für ein Fusionsprotein aus MAP2c und EGFP enthielten, subkloniert in den auch für DCX verwendeten Expressionsvektor. Auch in MAP2c-transfizierten Zellen waren MT stark gebündelt (Abb. 3.4 F-F’’), dennoch zeigte sich ein anderes Muster als bei DCX-überexprimierenden Zellen; insbesondere fehlten die ringartigen Strukturen rund um den Zellkern. MT-Bündel schienen während MAP2c-Expression in COS7-Zellen eher als kompakte Stränge angeordnet - ausgehend von zahlreichen MT-organisierenden Zentren rund um den Kern und ausstrahlend in die Peripherie der Zellen. Zusätzlich waren die mit MAP2c transfizierten Zellen im Vergleich zu den DCX-transfizierten größer und flacher.

3.3. Mitotische Defekte in DCX-exprimierenden COS7-Zellen

Der Versuch, unter Selektion mit Neomycin Klone stabil transfizierter COS7-Zellen zu selektieren, welche das Fusionsprotein aus DCX und EGFP exprimieren sollten, schlug wiederholt fehl: Sobald isolierte Klone in Kultur genommen wurden, stoppte ein Teil der Tochterzellen die Expression des DCX-EGFP-Proteins und überwuchs anschließend die restliche Kultur. Ausgehend von dieser Beobachtung wurden mögliche Einflüsse von DCX auf den Zellzyklus oder die Stabilität der Chromosomen untersucht.

Verglichen wurde zunächst der mitotische Apparat in untransfizierten COS7-Zellen mit dem in anderen COS7-Zellen, welche das Wildtyp-Allel von DCX überexprimierten: der Aufbau und das Erscheinungsbild erschien in DCX-überexprimierenden Zellen während der Metaphase gestört (Abb. 3.5 A-A’’ und B-B’’); die mitotische Spindel war oft unsymmetrisch gestaltet; es gab weniger Spindel-MT; die Chromosomen in der Metaphase-Platte waren schlecht organisiert und bildeten ein amorphes Aggregat statt der kompakten, im rechten Winkel zur Achse des Spindelapparates angeordneten Platte; Doublecortin war mit der mitotischen Spindel ko-lokalisiert.

Auch während der Anaphase beeinflusste die Expression von funktionellem DCX den Mitoseapparat (Abb. 3.5 C-C'' und D-D''): statt zur chromosomalen Platte angeordnet auf die Spindelpole zuzuwandern, waren die Chromosomen entlang der mitotischen Spindel verteilt; die mitotische Spindel war insgesamt länger als in untransfizierten Zellen und nicht klar in zwei Hälften getrennt (Abb. 3.5); manchmal migrierten alle Chromosomen (4n) zu nur einem der beiden Spindelpole.

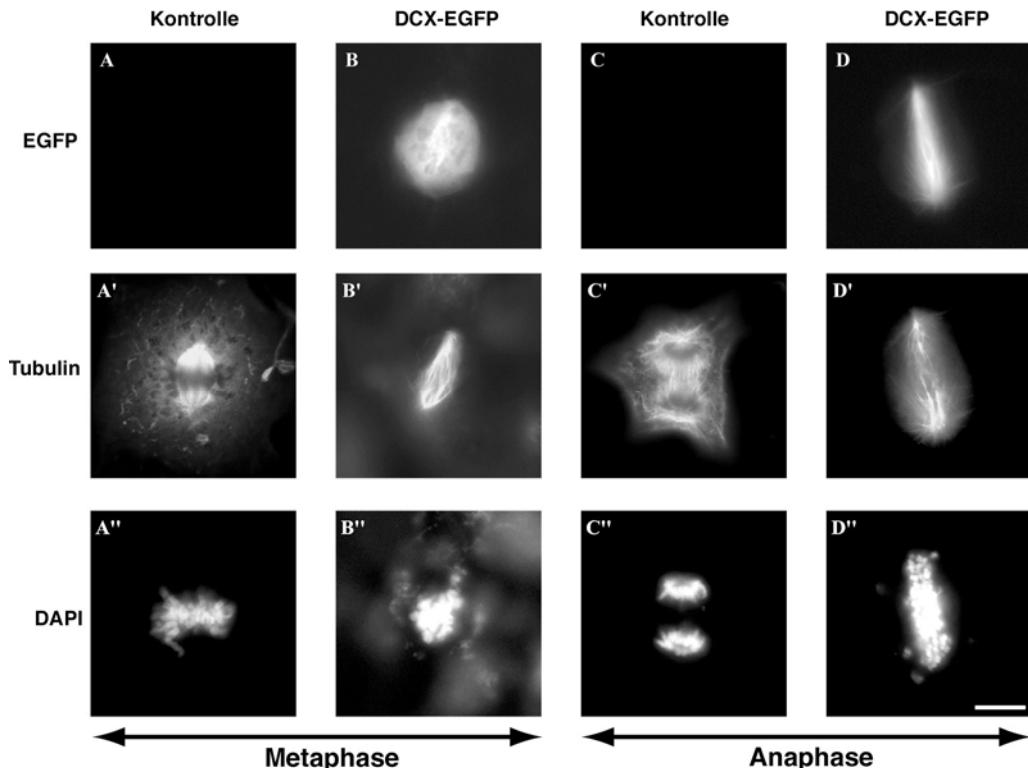


Abb. 3.5 Einfluss Doublecortins auf den Mitoseapparat in transfizierten COS7-Zellen. Gezeigt sind untransfizierte (A und C) oder DCX-EGFP transizierte (B und D) COS7-Zellen mit EGFP-Expression (A – D), Immunzytochemie von alpha-Tubulin (A' – D') und Kernfärbung mit DAPI (A'' – D''). A und B zeigen Zellen in Metaphase, C und D Zellen in Anaphase. Kontrollen zeigen den typischen Spindelapparat, DCX-EGFP-exprimierende Zellen zum Zeitpunkt der Metaphase (B, B'') dagegen einen unsymmetrischen mitotischen Apparat und zu Haufen aggregierte Chromosomen, während der Anaphase (D,D'') waren Chromosomen entlang der Mitosespindel angeordnet. Messbalken 10 µm

Der mitotische Prozess dauerte in DCX-überexprimierenden Zellen deutlich länger als in untransfizierten Zellen, Beispiele hierfür sind in Abb. 3.6 gezeigt: „normale“ Zellen beginnen ca. 53 Minuten nach Abbau der Kernmembran die Chromosomen zu dekondensieren, um anschließend auch das Zytoplasma auf die Tochterzellen zu verteilen; DCX-transfizierte Zellen dagegen sind nach 150 Minuten immer noch mit der Mitose beschäftigt.

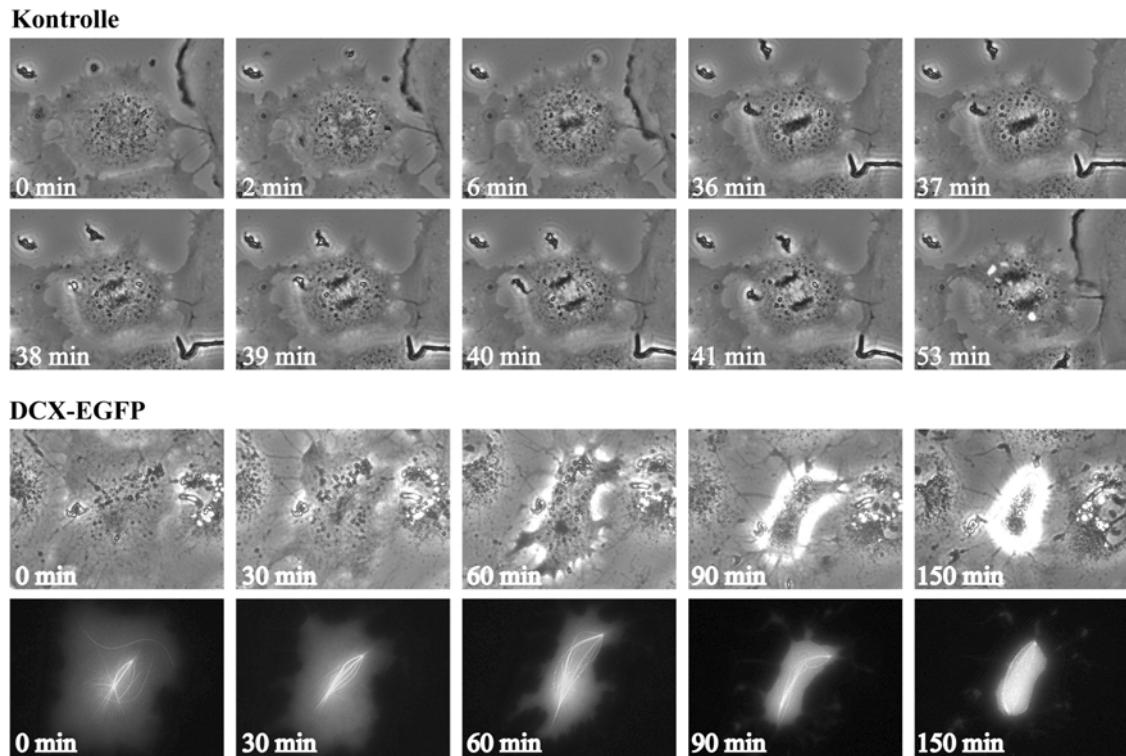


Abb. 3.6 Zeitrafferaufnahmen von mitotischen COS7-Zellen mit und ohne Expression von DCX. COS7-Kulturen wurden unterm inversen Mikroskop, umhüllt von einer Inkubations-Kammer, beobachtet, was stabile Zellkulturbedingungen während des Mikroskopierens ermöglichte. Sobald die Kernmembran sich aufgelöst hatte, wurden Zellen jede Minute fotografiert. Die in der oberen Hälfte der Abbildung dargestellte Zelle hat bereits 6 min nach dem Auflösen der Kernmembran eine Metaphaseplatte gebildet, weniger als 1 Stunde nach Beginn der Mitose dekondensierten sich die Chromosomen bereits wieder, die Zelle ging zur Zytokinese über. Im Gegensatz dazu zeigte die DCX-EGFP-exprimierende COS7-Zelle einen recht unförmigen Chromosomenhaufen zu Beginn der Mitose, eine Stunde nach dem Auflösen der Kernmembran waren die meisten Chromosomen in Richtung nur eines der beiden Spindelpole gewandert, auch nach 150 min war die DCX-EGFP-exprimierende Zelle immer noch in der Mitose gefangen. Die Gestalt der Mitosespindel lässt sich in dieser transfizierten Zelle anhand des DCX-EGFP-Signals in der unteren Reihe der Abbildung verfolgen.

Für nicht-transfizierte und für transfizierte Kulturen wurde der Anteil Zellen bestimmt, deren Gestalt während Metaphase und Anaphase von der Norm abwich. Kriterien, welche zur Einstufung als „normal“ führten, waren eine kompakte Organisation der Chromosomen in der Metaphaseplatte und die symmetrische Verteilung dieser Platte während der Anaphase. Tabelle 3.2 fasst zusammen, wie viele Zellen unter den verschiedenen Konstrukten jeweils von mitotischen Defekten betroffen waren. Demnach hatte die Expression mutierten Doublecortins andere Folgen als die Transfektion des Wildtyp-Allels: beim DCX(A71S)-Allel war die Mitose verglichen mit funktionellem DCX nur mäßig gestört; Expression von DCX(R192W) jedoch zog eine deutlich gestörte Mitose nach sich, wenn auch nicht im selben Umfang wie beim Wildtyp-Protein.

| Konstrukt | Prozentsatz gestörter Mitose | analysierte Zellen in Mitose |
|-----------------|------------------------------|------------------------------|
| Untransfiziert | 12% | 652 |
| EGFP-N1 | 19% | 112 |
| DCX-EGFP | 92% | 258 |
| DCX(A71S)-EGFP | 35% | 119 |
| DCX(R192W)-EGFP | 72% | 177 |
| MAP2c-EGFP | 17% | 167 |

Tabelle 3.2 Vergleichende Analyse der prozentualen Anteile von Zellen mit gestörter Mitose in COS7-Kulturen nach transienter Expression von DCX-Allelen und MAP2c.

Transfektion des Expressionsvektors für MAP2c führte dagegen nicht zu übermäßigen Fehlern bei der Mitose: der Anteil von Zellen mit abnormer Gestalt während Metaphase oder Anaphase war in transfizierten und untransfizierten Zellen innerhalb der Kultur gleich. Diese Beobachtung ließ den Schluss zu, dass nicht alle überexprimierten MAPs während Metaphase und Anaphase störend wirken. Die Eigenschaft - direkt oder über einen Interaktionspartner - in die Mitose einzugreifen, scheint demnach für Doublecortin spezifisch zu sein, pathogenetische Mutationen von DCX schwächen möglicherweise den Einfluss auf die Mitose. Der phänotypische Vergleich beider Mutationen mit den zellbiologischen Ergebnissen erbrachte einen interessanten Zusammenhang: die Mutation mit dem gravierendsten Phänotyp war auch die Mutation, welche auf die Mitose in COS7-Zellen am wenigsten störend wirkte (Abb. 3.7).

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass die Überexpression von funktionellem Doublecortin die Mitose in COS7-Zellen stark behindern kann; direkte oder indirekte Interaktion Doublecortins mit dem Spindelapparat führte dazu, dass Chromosomen während Anaphase und Metaphase nur unter erschwerten Bedingungen zu den Spindelpolen wanderten. Starke Affinität Doublecortins für MT, aus denen auch der Spindelapparat besteht, war bereits zuvor mehrfach gezeigt worden. Mutationen am DCX-Gen, wie sie in Patienten gefunden wurden, schwächen den Einfluss auf die Mitose ab, vermutlich verursacht durch die schwächere Affinität mutierten Proteins für MT. Dabei konnte ein Zusammenhang mit dem klinischen Bild bei Patienten hergestellt werden: die Mutation, welche in Patienten die anatomische Organisation des Kortex am schwersten störte, hatte in COS7-Zellen den geringsten Einfluss auf die Mitose.

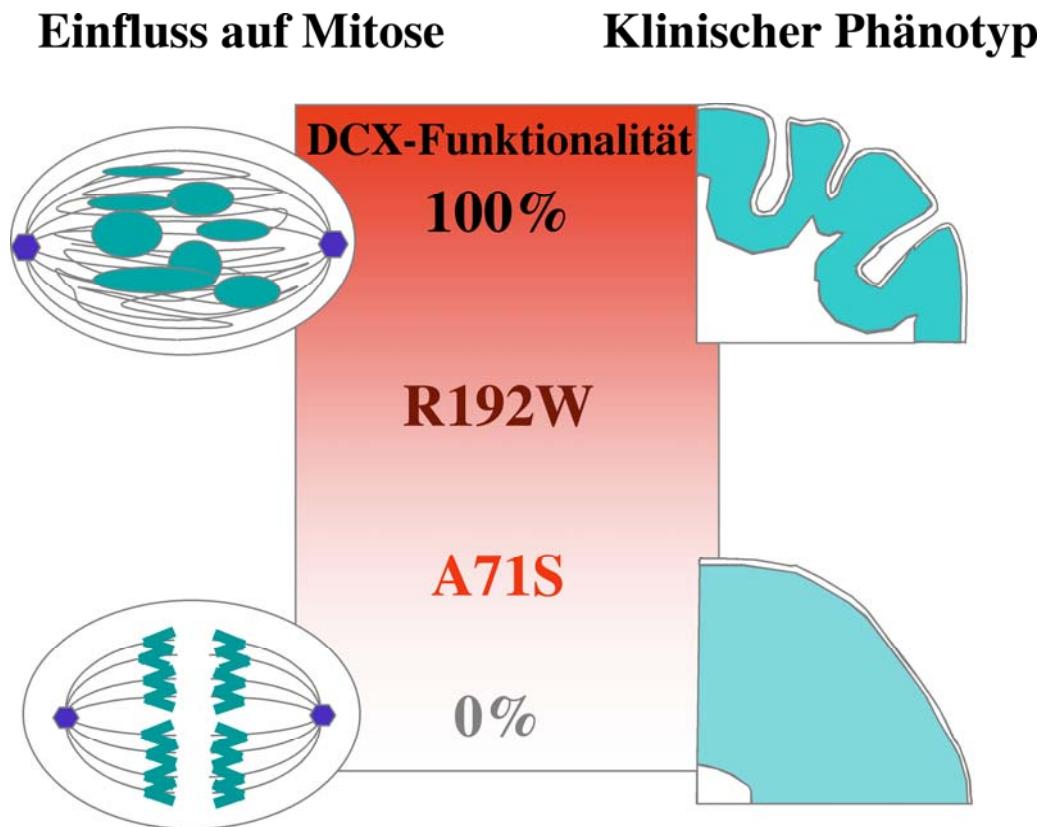


Abb. 3.7 Modell zur Funktionalität Doublecortins im Bezug auf Mitose und zur Korrelation von DCX-Mutanten mit dem klinischen Phänotyp. Doublecortin kann die Mitose in COS7-Zellen empfindlich stören. Dieser Einfluss wird durch DCX-Mutationen, welche im Menschen zu Heterotopien führen, abgeschwächt. Je weniger funktional DCX ist, umso weniger stört es die Mitose und umso weniger lässt es junge Neurone migrieren, umso schwerwiegender ist das klinische und neuroradiologische Erscheinungsbild der Patienten.

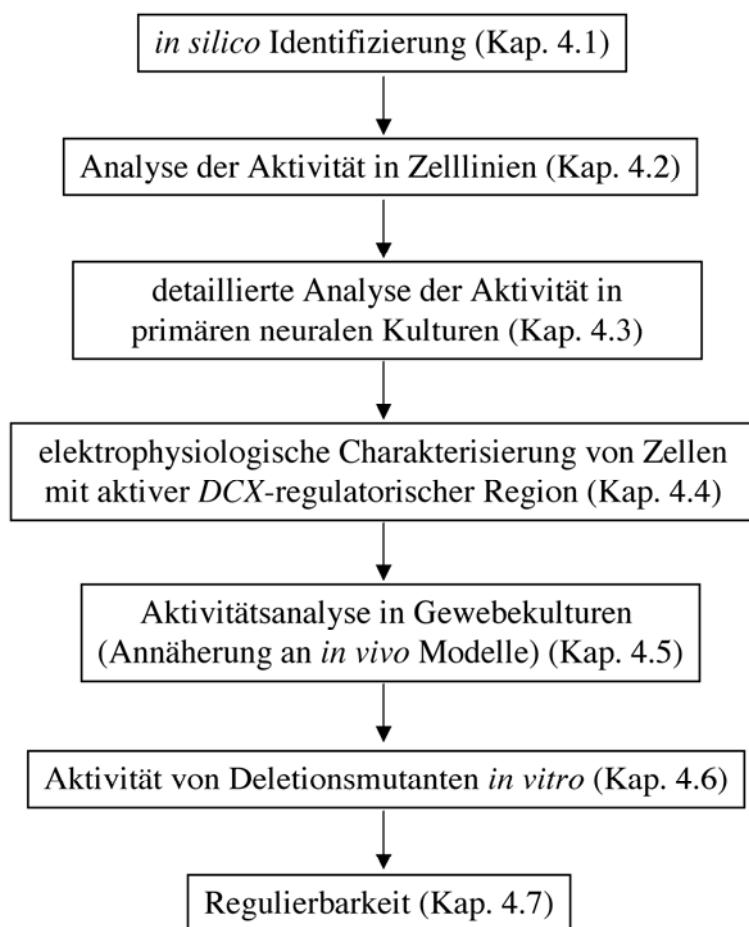
4. Ergebnis II: Identifizierung und *in vitro* Charakterisierung der regulatorischen Region des *Doublecortin*-Gens

Die regulierte Expression aller Gene eines Organismus ist Voraussetzung, um spezialisierte Gewebe aufzubauen, um Zellspezifität und Zellidentität zu erzielen, oder um bestimmte Enzyme für notwendige physiologische Prozesse bereitzustellen. Die Frage, wie einzelne Gene innerhalb eines Organismus reguliert werden, ist eine zentrale Frage der Biologie: Die Erforschung der Genregulation kann dazu führen, Zusammenhänge zwischen verschiedenen Proteinen herzustellen und die Proteine in übergeordnete Vorgänge – wie z.B. die Neurogenese – einzuordnen. Manche zellulären Eiweiße werden ausschließlich während bestimmter Vorgänge exprimiert, ihre Anwesenheit kann deshalb Rückschlüsse auf das zeitliche Auftreten dieser Prozesse erlauben. Solche Marker-Proteine können dadurch mithelfen, übergeordnete Vorgänge und Faktoren, welche auf diese einwirken, besser zu verstehen.

So individuell wie das zeitliche und örtliche Auftreten der verschiedenen Proteine im Organismus sind auch die Promotoren ihrer Gene. Solche regulatorischen Sequenzen stehen meist am Anfang eines Gens und steuern, in welchem Ausmaß mRNA und schließlich Protein hergestellt werden. Reporter-Proteine sind ein ideales Instrument, um die Aktivität von Promotoren darzustellen: Mittels gentechnischer Verfahren wird die Ausprägung des Reporters unter Kontrolle der regulatorischen Sequenz gestellt; die Aktivität des Reporters spiegelt dann die Aktivität des endogenen Proteins, ist aber viel leichter nachzuweisen (siehe Kap. 1.11). Werden Reportergene unter die Kontrolle eines spezifisch während bestimmter Prozesse aktiven Promotors gestellt, so können sie zur Visualisierung z.B. von Neurogenese oder zur Identifizierung bestimmter Zelltypen – wie etwa neuronaler Vorläuferzellen - dienen. Bevor der Promotor eines solchen zelltyp-spezifischen Gens jedoch als Indikator dienen kann, muss er zunächst eindeutig eingegrenzt werden. Auch hierzu eignen sich Reporterproteine: sie werden dafür unter die Kontrolle der postulierten regulatorischen Sequenz gestellt, an der Reporter-Expression lässt sich dann z.B. in Zellkulturen die Aktivität und Spezifität dieser Sequenz verfolgen.

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass Doublecortin spezifisch während der Neuentstehung von Nervenzellen im embryonalen und adulten Organismus exprimiert ist, weshalb es als interessanter Marker für junge Neurone und Neurogenese angesehen wird (siehe Kap. 1.8, 1.9). Der Promotor des Doublecortin-Gens ist demnach ein idales Instrument, um mittels Reportergen-Systemen neuronale Vorläuferzellen sichtbar zu machen oder anzureichern (siehe Kap. 1.10, 1.11). Zunächst ging es deshalb für die vorliegende Arbeit darum, regulatorische Sequenzen Doublecortins auf der genomischen DNA einzugrenzen. Kap. 4 beschreibt diesen Vorgang, und die Erprobung der eingegrenzten regulatorischen Region in verschiedenen Zell- und Gewebekultursystemen (für einen Überblick der Arbeitsschritte zu Kapitel 4 siehe Schema 4.1).

**Strategie zur Identifizierung und *in vitro* Charakterisierung
der regulatorischen Region des *Doublecortin*-Gens:**



Schema 4.1. Strategie zur Identifizierung und *in vitro* Charakterisierung der regulatorischen Region des Doublecortin-Gens

4.1. Eingrenzung und Beschreibung der regulatorischen Region des Doublecortin-Gens für die Spezies Mensch, Maus und Ratte

Die genomische Sequenz des humanen *DCX*-Gens umfasst 118,4 kbp, die hieraus transkribierte mRNA 9,5 kbp. Dieses Transkriptionsprodukt geht aus dem alternativen Splicing von 9 Exons hervor (des Portes, 1998a; Gleeson, 1998) (Abb. 4.1). Die ersten 3 Exons bilden das 5' Ende der mRNA, im vierten Exon eröffnet das ATG-Startkodon den 1080 bp weiten offenen Leserahmen, der ein Polypeptid von 360 AS kodiert. Im Exon 3 befindet sich ein weiteres Startkodon, von dem allerdings nicht bekannt ist, ob es tatsächlich verwendet wird; sollte dieses Startkodon funktionell sein, so würde sich das synthetisierte Polypeptid um 42 AS am N-Terminus verlängern (des Portes, 1998a). Als Besonderheit besitzt das *DCX*-Transkript eine sehr lange untranslatierte Region am 3' Ende, welche möglicherweise die Stabilität der mRNA beeinflusst (des Portes, 1998a).

Für die vorliegende Arbeit wurden kodierende Sequenzen der *Doublecortin*-Gene aus den drei Spezies verglichen, wobei große Übereinstimmung gefunden wurde: auf mRNA-Ebene betrug die Homologie zwischen Mensch und Ratte 81%, zwischen Mensch und Maus 90%, auf Protein-Ebene sogar rund 98 % (basierend auf NCBI Blast). Im nächsten Schritt wurden auch nicht-kodierende Abschnitte der Gene auf Homologie in den drei Spezies untersucht, um so regulatorische Sequenzen des *Doublecortin*-Gens einzugrenzen. Humane genomische DNA strangauwärts des Startkodons im Exon 4 wurde hierzu mit homologen Sequenzabschnitten der *DCX*-Gene von Maus und Ratte verglichen. Insgesamt 30 kbp genomischer DNA strangauwärts der ATGs in den *DCX*-Genen der drei Spezies wurden in globalen Alignments auf Übereinstimmungen untersucht. Die hierzu verwendeten Sequenzen sind unter den NCBI Genbank-Zugangsnummern NT_025319, NT_039718 und NW_048037 verfügbar. Nur innerhalb eines rund 3,5 kbp großen Fragments unmittelbar strangauwärts des Startkodons war die Basenfolge zu mehr als 85% identisch. Die offensichtlich starke Konservierung dieses genomischen Sequenzbereichs in den drei Spezies ließ ihn als bedeutsam für die Regulation des Gens erscheinen, weshalb sich die weiteren Experimente auf diese 3,5 kbp große Region beschränkten.

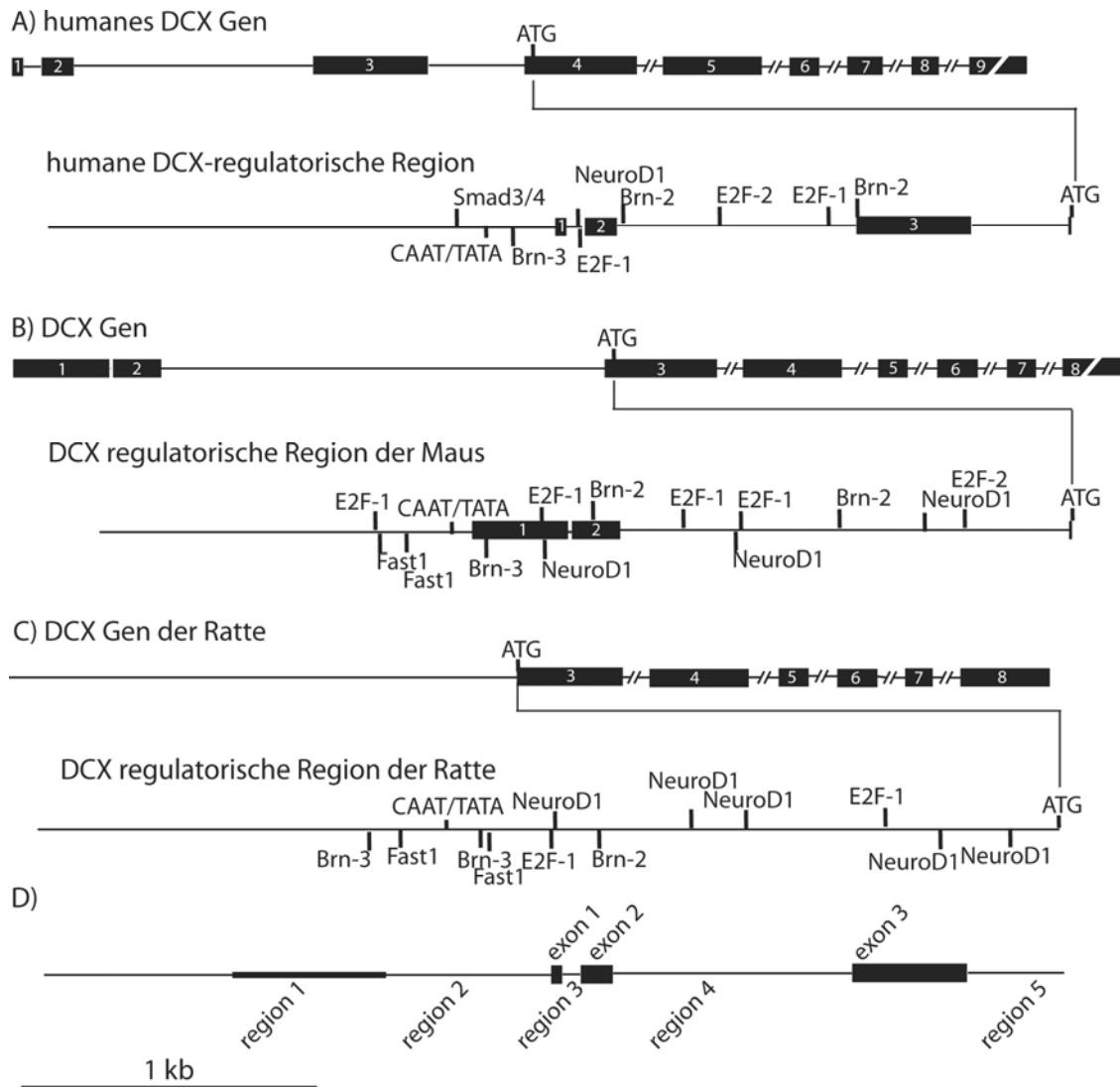


Abb. 4.1 Gen-Aufbau und regulatorische Regionen der DCX-Gene aus Mensch, Maus und Ratte. Der Aufbau sowie die Lage der vorgeschlagenen regulatorischen Regionen des DCX-Gens aus A) Mensch, B) Maus und C) Ratte sind gezeigt. Schwarze Rechtecke stehen für Exons, eingezzeichnet sind auch mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren (s. auch Tab. 4.2) sowie die CAAT/TATA-Boxen. Exons strangauwärts des ATGs im DCX-Gen der Ratte fehlen, da hierzu keine vollständigen cDNA-Sequenzen bekannt sind. D) bezeichnet Regionen unterschiedlicher Homologie (s. auch Tab. 4.1).

Mittels PCR wurde ein 3509 bp großer Abschnitt DNA unmittelbar strangauwärts des ATG-Startkodons in Exon 4 des humanen Gens vermehrt, als Template diente genomische DNA aus humanen fötalen, kortikalen, neuronalen Vorläuferzellen. Dieses Fragment wurde in ein Plasmid kloniert, das kodierende Sequenzen für das Reporterprotein EGFP enthielt (s. Kap. 2.2.1). Der resultierende Vektor wurde phuDCX3509-EGFP genannt.

| Region | Position auf humanem Gen rel. zum ATG [bp] | homologe Region auf Maus-Gen rel. zum ATG [bp] | % Identität Mensch / Maus | homologe Region auf dem Ratten-Gen rel. zum ATG [bp] | % Identität Mensch / Ratte |
|----------|--|--|---------------------------------|--|----------------------------------|
| Exon 1 | - 1776 to - 1739 | - 1802 to - 1765 | 100,0 | -1814 to - 1777 | 97,4 |
| Exon 2 | - 1679 to - 1571 | - 1706 to - 1592 | 79,6 | -1716 to -1601 | 80,3 |
| Exon 3 | - 747 to - 355 | - 744 to - 358 | 87,4 | - 744 to - 353 | 86,9 |
| Region 1 | - 2885 to - 2358 | - 2881 to - 2354 | 47,2 | - 2896 to - 2408 | 47,6 |
| Region 2 | - 2357 to - 1777 | - 2353 to - 1803 | 79,6 | - 2407 to - 1815 | 78,4 |
| Region 3 | - 1738 to - 1680 | - 1764 to - 1707 | 83,1 | - 1776 to - 1717 | 91,7 |
| Region 4 | - 1570 to - 748 | - 1591 to - 745 | 75,3 | - 1600 to - 745 | 74,4 |
| Region 5 | - 354 to - 22 | - 357 to - 23 | 79,1 | - 352 to - 23 | 78,3 |

Tab. 4.1 Homologie der vorgeschlagenen regulatorischen Regionen der DCX-Gene aus Mensch, Maus und Ratte. (s. auch Abb. 4.1 D)

Die 3,5 kbp große strangauwärts des ATG-Startkodons im Exon 4 des humanen Gens gelegene Region wurde nach Bindestellen für allgemeine und spezifische Transkriptionsfaktoren untersucht. Eine mögliche TATA-Sequenz wurde an Position – 1983 bis – 1976, und eine CAAT-Box zwischen – 2079 und – 2071 relativ zum ATG im Exon 4 gefunden (Abb. 4.1 A; Abb. 4.2 A). Im Maus-DCX-Gen liegt die TATA-Box zwischen – 2012 und – 2005, die CAAT-Box zwischen – 2111 und – 2103 relativ zum Startkodon (Abb. 4.1 B; Abb. 4.2 B). Die TATA-Box im DCX-Gen der Ratte liegt zwischen – 2024 und – 2018, eine CAAT-Box zwischen – 2125 und – 2117 strangauwärts des ATG (Abb. 4.1 C; Abb. 4.2 C).



Abb. 4.2.A Vorgeschlagene regulatorische Sequenz des humanen DCX-Gens. Die 3509 bp große Sequenz strangauwärts des humanen DCX-Gens ist gezeigt. Mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, CAAT- und TATA-Boxen sind unterstrichen, Exon-Sequenzen *kursiv* gedruckt.

1 TCCCATATGA AAGAAAGAAA ATAAATCCTT TTGTCCTCT CAGCCTGGG TACTTCACTC
 61 AGTATATCAT TTTCGGITCC ACACAAITTC TGCAAAATCT CATATAATTCA CATTAACTAG
 121 ATGGGTGATT AAAATCATGC ATATATCTTG CATTTCATT ACCCATTCACT CGTTAACAG
 181 ACATCTGGC TGTTTCTATT TTCTGGCTT TGTAATAGA GCAGGCCATAA ACACAGATAT
 241 GCAAGTGTCT CTATGGTAGG TTATAGTCTC CTTGGGTAT ATGCCAGGA GTGGGAAAGGT
 301 GAAACATTTA CCAATGTTT ACATAGTCT AAAATGTTT GGAGTCATGC TGGCCCTAGA
 361 GACCTAAGTG CTGGCAATT TTAGTAGCCA AGAAGGAGAA CAGAAGGAGA AAAATTTCAAG
 421 CAAA TGAGAG GTTCAGCTGG GCTACACAG GAGTTCCAGA ACAACTATCA CTAAAGCT
 481 GGACCCCTGAC TCGATAAAC AACTGACAA AACCTGGAG AAGTGCACCT TTTCAAATTCC

E2F-1

541 AGCCTTCACTG ATTCTGCAA CTATTTCCC GTTACTGTIC AATTACTAT TCCTAGTGCAC

Fast1

601 TTCGTTAAA AAACAACCAG TGTTGGATGC ATGAGCCGAA ATGTTAAAAA ATTTCATATI
 661 TTTTTTATTCTT CTTGAGAGA GATAAAAAGA GGAGATCTGT AATTTCCTAAG AAACCTGATT

CCAAT

721 TGGCCTGCT AGTCCAGCCA CTAGGGAGA GTTTTAGCC AGTAAATT GCAAATTTC
 781 TAAGAGAAG GGCTAGACAA TTGCTCATTA GAGCATTCTG AGCTTGGCTG TGCAAATCTT

TATA-Box

841 TTTTCCTAC CCTGCAATT CCTGCGGTI ATAACGAAA CCTTCTAGC TGTTAAATGCA

Bm-3

901 GGCTGTGAAAT TGAGAAAAA AAAGCATGTA ATTAAATCATCA GGAGGTTGGG GGTTGGCT
 961 AAGCTTCAGT TACAGGGAG AAGCTGGACA AGGCACTAGG ACCTAGAAGG CAACTATCCA
 1021 CCCTGGAGG AATTTCCTGC TTGGAGCTCA GACAAACAAAG GCA TAGAGAG ATTGGTTTC

E2F-1

1081 TTTCTCTAG CATCTCACCA CAACCAGGAG AAAACCGGTG AGTGGGCTT TCAGATGATT

NeuroD1

1141 TICAAGGAGA ATGTAACAGA TGTC AACCCAGG GAAAGCACAA GGACACGGC TTTCCTTCTC

E2F-2

1201 TGTGTGTTGG CCTCTTCTT CTCTTTTATT TGCTTATT TGAGGATT TTGTCCTCTA
 1261 AGATTCTACC TGGGATTTC CTTGGAAAAA GTGGGTTTGT TGAGTTTGT TGTCTCTTGT

Bm-2

1321 GATGCTTAATT TAGATAATAA GCACTTCTGA TTCTAAAGCT AGCTTTATT GCACAGGCTG
 1381 CCTGGGAAA ATGCTTGTCA CTATCTGA GGAGTGGC TCTTACTACT GCAGGTTGTC
 1441 TGACAGAGAC AAATGCTGAGC TCAGGATAGG TCATGGTAC ACTGAAAAA AAGGGGGTAC

1581 TGAGCCTGGC AAAATATACCA ACTACAGTC CTCCCTTATC TCCCTTCTCC CTGGTTCTT E2F-1
 1581 GCAAATCTCG ATGTCAGT ATATATAG CAGCTGAGCC CTCCTGTTT GTGAGTCCTT
 1621 TCCCTCCAT TTGAGATG AATGTTAATA GTGGTTTC TTGAGTGTCA CATTACCTT
 1681 GTAAGGGTTT AGGGTTGGG TTGTATTATT GGGTGCATG TTTCATTTGT TTGGACGTT
 1741 TTTTTCTG GTGGGGACG GGTCAGGGG GGTGAAATC CAAGCTGAC AGATGACTTT

Bm-2

1861 TTTTTCCCTT CCATCAATAC ACCTAAAGCA TAGACAAGT TGAAGTGAAT TGCCTGCTT
 1861 GAGGGAAAAA TATTCCTCA GTCAGGGAG AAACCCAGA CAATGAAGG TGTACCTACT
 1921 TGGAAAGTC CCA TGTGCTA TTCAAGGAC CATTGGGA TC TTTCACAA ATTATTCAT
 1981 TAAGAGGTG TGCTGCA TTCA ATTGGTGGG GAGGGATGA AACACCTGAA AGGAGAAAAA
 2041 GGATTCTGTG ACAAATGGA AATGAAAGGG AAGCAGAGCT AA TAGCTTGC TAAA TAACTG

2101 GGTTTTTCTG ACAATCCCTC CCCCTTTAG ACCCAGCTT ATTCTTATG GATGCCGTAT
 2161 AGGGCACCA GCTTGATGGG GAGAGGGTTT GATGAATAGC ACAAAAGCAC TGGGATTTCC

2221 CTGAGGGCTG TCCCTTTAAA AGAGAACTCT AGTTTATTCT GGGGGGGG ATACACAT
 2281 TAGAGCAGC AAAAAGGAC AAGGAAATAA AGTAATTAC CCCCCCTCTA GCCATTGTAT
 2341 TGAGATGCAA AGGCTGCTC CTACAGGGG TGCTGAACT TGCTGATGTC CCTCTGTTT
 2401 TCTTGTAGGG AATTAGTCA GGCTATGGT TCATTTACAA CTGTTAGTCA TGTGGCATG

NeuroD1

2461 TGTGAAGGAG CAGATGCCAG TTTTAATGTA TTTTGGCCGA AGTTACAAATT TGATAGGAGC
 2521 CACTGTCAAG AAGTCCAGG TTTTAAAGCT ATTTCAAAAC GCCCTCCCCA AATTGGACA

E2F-2

2581 GTGCCAAAG TGCCACCCCT TCTATCTCTT CCTCCCTATCC CCCCTCCAC CATTCACTG
 2641 TCAGCCTACT GCCAGGCC CTCCTCTTC TCTTAAAGA TCAATATTCC TGCAGGTCAG
 2701 GGACAAGCAG CAGATGGTC ACAGGCTTTT TCCAACCAAGT TC TTTCACAA GGCAGCAGAT
 2761 TGAGGCTG GATCTGGCTA ATTTTTAAAT CCTCCCTCTT CCCTTATCCA TCCTTATTCT
 2821 TTGCTCTCC TTATCTCCAC CCTTTCTCT AACAATCAGG TTGCTGTTGT TCCACCAAAAT

Abb. 4.2.B Vorgeschlagene regulatorische Sequenz des murinen DCX-Gens. Die 2881 bp große Sequenz strangauwärts des murinen DCX-Gens ist gezeigt. Mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, CAAT- und TATA-Boxen sind unterstrichen, Exon-Sequenzen *kursiv* gedruckt.

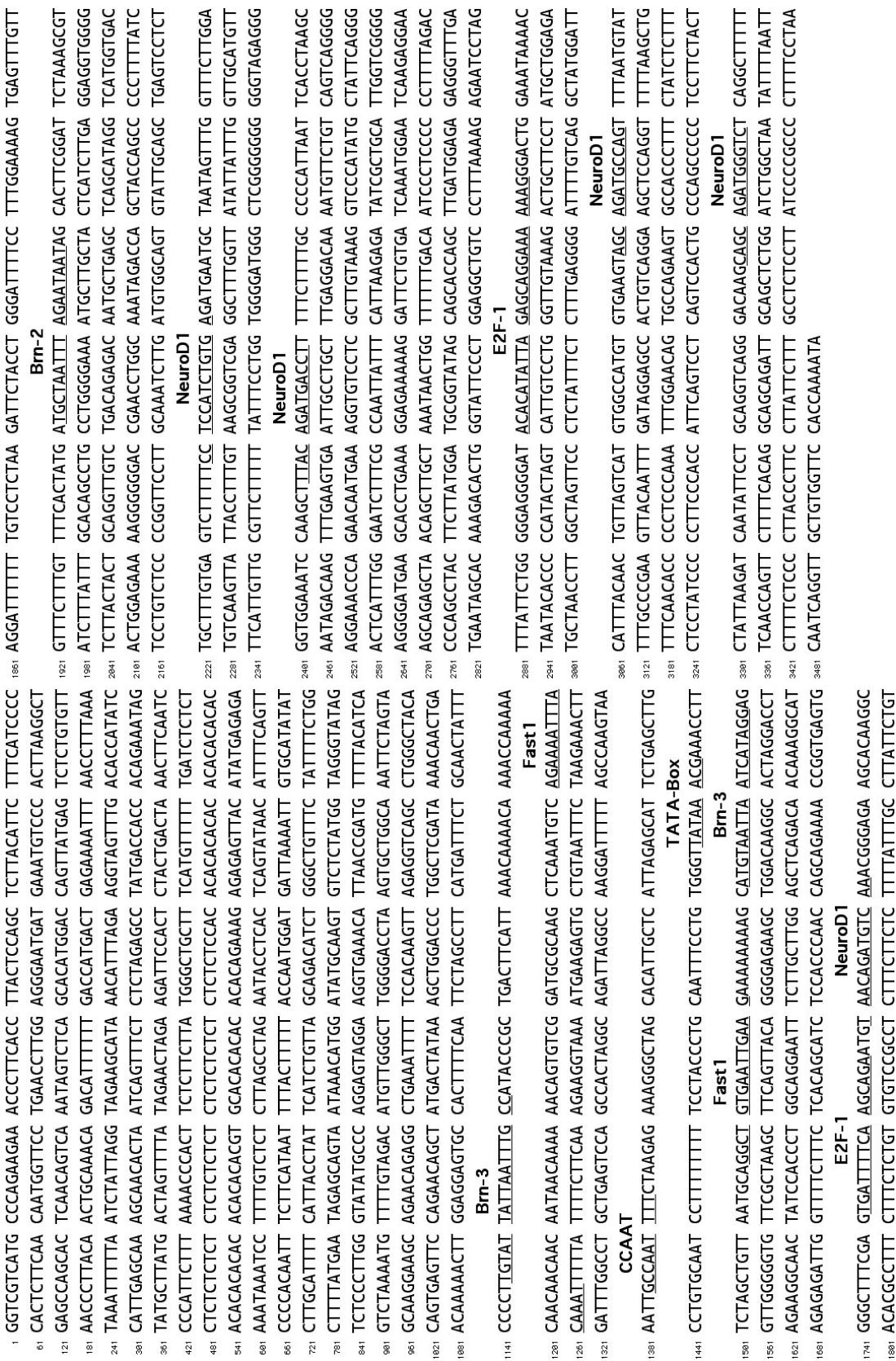


Abb. 4.2.C Vorgeschlagene regulatorische Sequenz des DCX-Gens der Ratte. Die 3510 bp große Sequenz strangauflärts des DCX-Gens der Ratte ist gezeigt. Mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, CAAT- und TATA-Boxen sind unterstrichen, Exon-Sequenzen *kursiv* gedruckt.

Ein weiteres Startkodon (– 359 bis – 357) ist für das humane Exon 3 beschrieben, allerdings hat man beim Menschen keine Proteine gefunden, welche um die zusätzlichen 42 AS N-terminal verlängert waren (des Portes, 1998a). Das *DCX*-Gen der Maus enthält eine zum humanen Exon 3 homologe Region, es scheint jedoch bei der Maus kein transkribiertes Exon 3 zu geben, wie sich in RT-PCR-Analysen zeigte. Hierfür wurde cDNA aus Maus-Telenzephalon zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung untersucht, vom Embryonaltag 10 bis zu adultem Gehirngewebe. Oligonukleotid-Paare, welche die Region zwischen Exon 3 und 4 überspannten, führten in der RT-PCR nicht zu einem Produkt (Abb. 4.3). Wurden Oligonukleotide zur Amplifikation der Abschnitte von Exon 1 zu Exon 4 oder von Exon 2 zu Exon 4 verwendet, so ergaben sich RT-PCR-Produkte; diese enthielten jedoch keine zum Exon 3 des Menschen homologen Sequenzen, wie sich in direkter Sequenzierung zeigte. Der zum humanen Exon 3 homologe Bereich auf dem murinen *DCX*-Gen wurde deshalb in der Übersichtskarte (Abb. 4.1 B) nicht als Exon eingezeichnet und auch bei der Nummerierung der Exons nicht berücksichtigt. Die vorgeschlagene regulatorische Region des *DCX*-Gens der Ratte enthält Sequenzen hoher Homologie zum entsprechenden humanen und murinen Sequenzabschnitt, allerdings sind in der Ratte bisher keine cDNA-Sequenzen beschrieben, welche über die Exons 3 bis 8 hinausgehen.

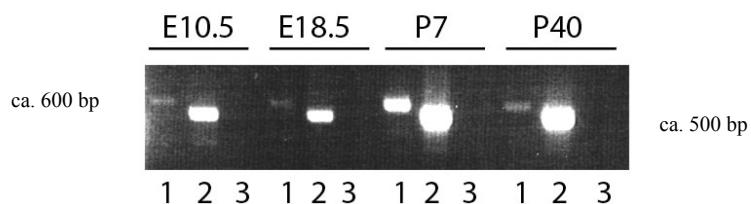


Abb. 4.3 PCR aus Maus cDNA unter Verwendung von Primern für die Exons 1 bis 4. RNA wurde aus Maus-Telenzephalon zum Embryonaltag (E) 10.5 oder 18.5 sowie aus Bulbus olfactorius zum Postnataltag 7 bzw. 40 gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Primer zur Amplifikation der cDNA-Abschnitte von Exon 1 bis 4 (1) und von Exon 2 bis 4 (2) lieferten Produkte von ca. 500 bzw. 600 bp Größe, Primer vom möglichen Exon 3 zum Exon 4 (3) dagegen kein Produkt in der RT-PCR.

Beim Vergleich der für die *DCX*-Gene von Mensch, Maus und Ratte vorgeschlagenen regulatorischen Sequenzen ließen sich mehrere Abschnitte voneinander abgrenzen, welche im Grad ihrer Homologie zueinander differierten. Interessant waren in diesem Zusammenhang Abschnitte strangabwärts der Region 1.

Diese Region, zwischen Region 2 und dem Startkodon gelegen, war in den drei Spezies zu mehr als 75 % homolog. Demnach schien es wahrscheinlich, dass relevante regulatorische Sequenzen sich innerhalb dieser Regionen befanden (Abb. 4.1 D und Tab. 4.1). Tatsächlich ergab die Suche nach möglichen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren mittels der Software Matinspector mehrere entsprechende Konsensus-Sequenzen, wie zum Beispiel Bindestellen für Brn-2, Brn-3, NeuroD1, E2F-1, E2F-2, Fast1, Smad3 und Smad4 (Abb. 4.1 und 4.2, Tab. 4.2).

| Transkriptionsfaktor-Bindestellen | Positionen auf humanem Gen rel. zum ATG [bp] | Positionen auf Maus-Gen rel. zum ATG [bp] | Positionen auf Ratten-Gen rel. zum ATG [bp] |
|-----------------------------------|--|--|--|
| Brn-2 | -1538 to -1522 -749 to -733 | -1559 to -1543 -746 to -730 | -1568 to -1552 |
| Brn-3 | - 1930 to -1914 | -1956 to -1940 | -2364 to -2348 -1968 to -1952 |
| NeuroD1 | - 1702 to -1690 | -1728 to -1716 -414 to -402 | -1740 to -1728 -1271 to -1259 -1093 to -1081 -413 to -401 -173 to -161 |
| E2F-1 | -1692 to -1678 -848 to -834 -762 to -748 | -2321 to -2307 -1746 to -1732 -1266 to -1252 -1082 to -1068 | -1758 to -1744 -600 to -586 |
| E2F-2 | -1214 to -1200 | -304 to -290 | |
| Smad3 | -2126 to -2118 | | |
| Smad4 | -2126 to -2118 | | |
| Fast1 | | -2308 to -2294 -2236 to -2222 | -2259 to -2245 -1993 to 1979 |

Tab. 4.2 Mögliche Transkriptionsfaktor-Bindestellen und ihre Lage relativ zum ATG. ermittelt durch Matinspector, www.genomatix.de

4.2. Spezifische Aktivität der regulatorischen Region des humanen Doublecortin-Gens in Zellkulturen neuronalen Ursprungs

Die hohe Homologie zwischen den drei Spezies sowie gefundene Transkriptionsfaktor-Bindestellen ließen den 3,5 kbp großen Abschnitt strangauwärts des *DCX*-Gens bedeutsam für die Regulation des Gens erscheinen. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde die Aktivität der Region in verschiedenen neuronalen und nicht neuronalen Zell-Typen untersucht, verwendet wurde die entsprechende genomische Region des humanen *DCX*-Gens. Die 3509 bp umfassende regulatorische Region des humanen *DCX*-Gens kontrolliert im Vektor phuDCX3509-EGFP die Expression des fluoreszenten Reporterproteins EGFP. Die Stärke der EGFP-Expression in transient transfizierten Zellen wurde als Indikator für die Aktivität der

DCX-regulatorischen Region in der jeweiligen Kultur gewertet. Verglichen wurden etablierte, immortalisierte Zelllinien wie die nicht neuronalen HEK293 und COS7, gliale Zellen wie die astrozytäre Linie CTX TNA2 und die oligodendrogliale Linie N20.1, sowie neuronale Zelllinien (die Medulloblastom-Linie D283 Med und die Maus Neuroblastom Linie Neuro-2a). Darüber hinaus wurde die Aktivität der *DCX*-regulatorischen Region in primären, neuronalen Vorläuferzellkulturen untersucht; hierzu waren Zellen des Telenzephalons von C57Bl/6NcrI-Mäusen zum Embryonaltag 10,5 bis 12,5 (hier kurz MEF-Zellen genannt) in Kultur genommen worden.

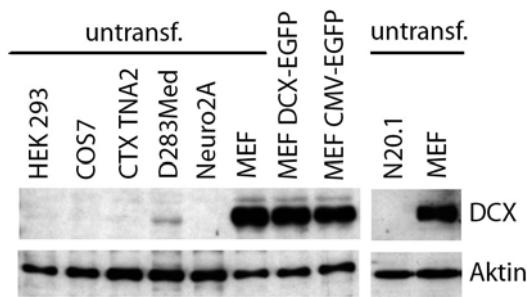


Abb. 4.4 Western Blot Analyse verschiedener Zelllinien bezüglich der Expression von DCX. Protein-Extrakte (5µg pro Spur) aus verschiedenen Zelllinien wurden auf die Anwesenheit von DCX bzw. zur Kontrolle auf die von Aktin untersucht. HEK293, COS7 = nicht-neuronale Zelllinien; CTX TNA2 = Astrozyten-Linie; N20.1 = Oligodendrozyten-Linie; D283 Med = humane Medulloblastom-Linie; Neuro-2a = Maus-Neuroblastom-Linie; MEF = primäre telenzephale Zellen der Maus (Embryonaltag 10.5 bis 12.5). Keine DCX-Expression fand sich in HEK293, COS7, CTX TNA2 und N20.1; D283 Med exprimierten niedrige Mengen DCX, Neuro-2a nicht detektierbare Mengen DCX. Beachtenswert ist die starke Expression von DCX in primären MEF-Kulturen. Transfektion mit phuDCX3509-EGFP oder pEGFP-N1 hatte keinen Einfluss auf die Menge endogenen Doublecortins in MEF-Zellen.

Mit Hilfe proteinbiochemischer Verfahren (Western Blot) wurde zunächst festgestellt, inwieweit die verschiedenen Kulturen endogen Doublecortin exprimierten. Keine DCX-Expression zeigten die nicht neuronalen Zelllinien HEK293 und COS7 sowie die astrozytäre Linie CTX TNA2 und die oligodendrogliale Linie N20.1 (Abb. 4.4). Humane Medulloblastom-Zellen (D283 Med) exprimierten geringe Mengen des Proteins, in der murinen Neuroblastom-Zelllinie Neuro-2a lag die DCX-Expression unterhalb des Grenzwerts der Detektion (Abb. 4.4). Große Mengen des Proteins fanden sich dagegen in Extrakten aus embryonalen Kulturen (MEF-Zellen) (Abb. 4.4).

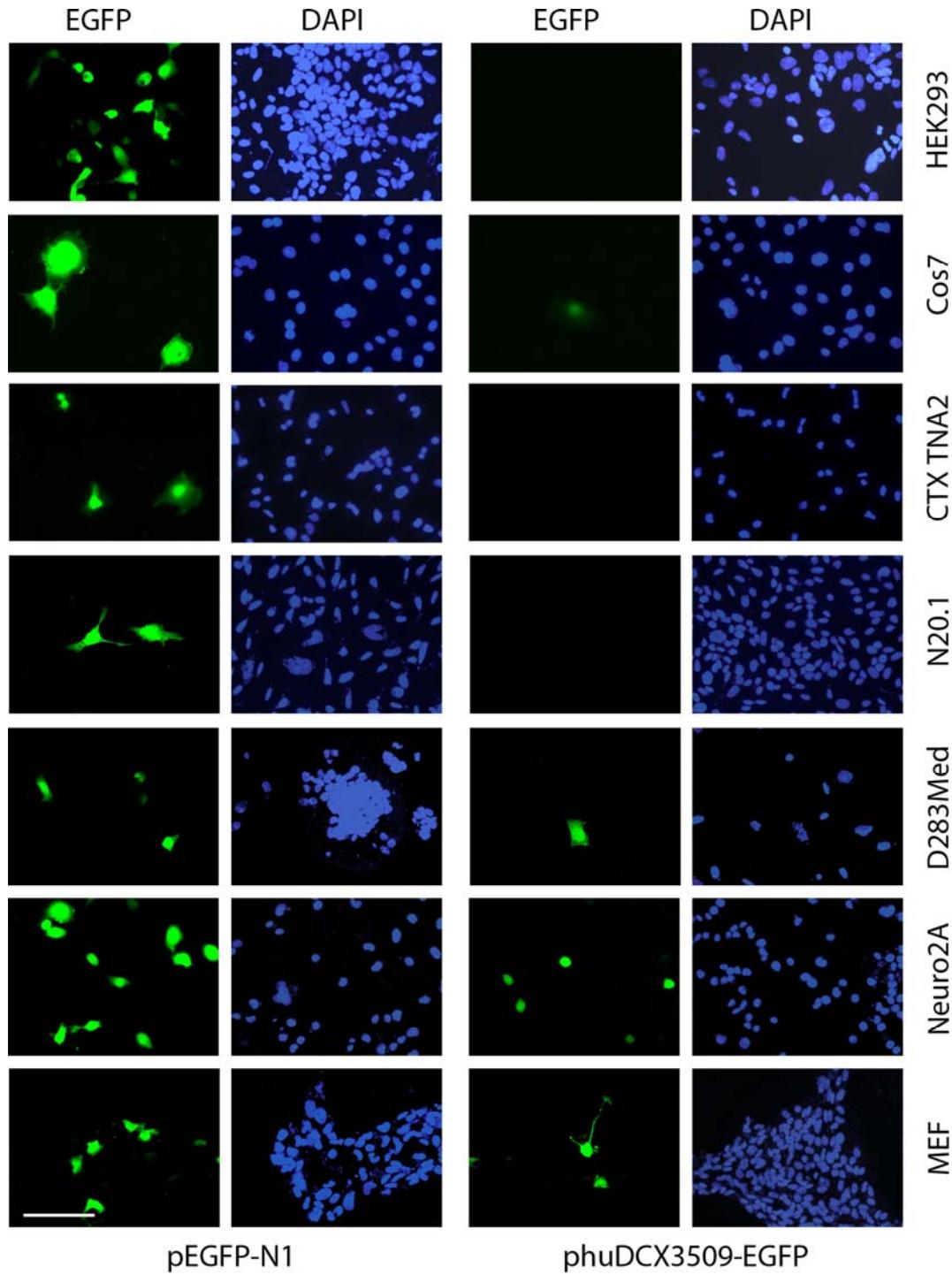


Abb. 4.5 Aktivität der humanen 3,5 kbp DCX-regulatorischen Region ist spezifisch für Zellen neuronalen Ursprungs. Verschiedene Zellkulturen wurden transient mit pEGFP-N1 oder phuDCX3509-EGFP transfiziert und bezüglich EGFP-Expression zwei Tage nach der Transfektion untersucht. EGFP-Reportersignal ist ohne Antikörper-Verstärkung dargestellt, Zellkerne wurden mittels DAPI sichtbar gemacht. Alle Zelllinien ließen sich transfizieren, da alle nach Transfektion mit pEGFP-N1 das Reportergen unter Kontrolle des ubiquitären CMV-Promotors exprimierten. Unter phuDCX3509-EGFP war der Reporter fast ausschließlich in neuronalen Zelltypen wie D283MED, Neuro2A und primären MEF-Zellen exprimiert, schwache Expression fand sich in COS7-Zellen. Messbalken 100 μ m.

In einem nächsten Schritt sollte die Expression von EGFP-Reporterprotein unter Kontrolle der *DCX*-regulatorischen Region verglichen werden mit EGFP-Expression unter Kontrolle des ubiquitären CMV-Promotors (Vektor pEGFP-N1). Ziel war es, die Aktivität der *DCX*-regulatorischen Region in den verschiedenen Zellkultursystemen zu bestimmen. Hierzu musste die unterschiedliche Transfizierbarkeit z.B. der immortalisierten Zelllinien gegenüber den primären Kulturen berücksichtigt, also ein interner Standard für jede Kultur gefunden werden. Dieser Standard war die Stärke der EGFP-Expression unter Kontrolle des ubiquitären CMV-Promotors, welche in parallel durchgeführten transienten Transfektionen beobachtet und quantifiziert wurde.

Kontroll-Transfektionen mit pEGFP-N1 zeigten, dass alle Zellkulturen transfizierbar waren und einzelne Zellen EGFP stark exprimierten (Abb. 4.5). Nach Transfektion mit phuDCX3509-EGFP war EGFP-Expression nicht oder kaum detektierbar in den nicht-neuronalen HEK293 und COS7, genauso wie in den glialen Linien CTX TNA2 und N20.1. Schwache EGFP-Expression fand sich in den neuronalen Zelllinien D283 Med und Neuro-2a, starke Expression in den primären MEF-Zellen (Abb. 4.5). Verglichen mit der neuronalen Linie Neuro-2a und den MEF-Zellen zeigten COS7 Zellen nach Transfektion mit phuDCX3509-EGFP schwache Expression des Reporterproteins (Abb. 4.5). Wurden die Ergebnisse aus dem Western-Blot (Abb. 4.4) den Ergebnissen zur EGFP-Expression unter Kontrolle der *DCX*-regulatorischen Region (Abb. 4.5) gegenübergestellt, so korrelierte das Vorhandensein endogenen Proteins stark mit der Reporter-Expression. Bemerkenswert war darüber hinaus, dass in primären MEF-Zellen die Menge endogenen Doublecortins konstant blieb, egal ob transfizierte oder untransfizierte Zellen betrachtet wurden (Abb. 4.4).

Um die Effizienz von Transfektion und Expression zu bestimmen, wurde ausgezählt, welcher Anteil der Zellen das EGFP-Reporterprotein unter Kontrolle der verwendeten Vektoren exprimierte. Obwohl alle Zellsysteme mit pEGFP-N1 transfizierbar waren, fanden sich doch deutliche Unterschiede. Unter Kontrolle des ubiquitären CMV-Promotors exprimierten 6% bis 14% der HEK293-, COS7- und Neuro-2a-Zellkulturen den Reporter EGFP, während CTX TNA2, D283 Med und primäre MEF-Zellen lediglich Transfektionsraten unter 3% erreichten (Abb. 4.6 A).

Im Vergleich dazu war der Anteil der unter Kontrolle der humanen *DCX*-regulatorischen Region EGFP-exprimierenden Zellen deutlich geringer, beobachtet

wurde allerdings hohe Spezifität der Expression für Zellen neuronalen Typs. Die relative Expressions-Effizienz des Vektors phuDCX3509-EGFP wurde errechnet, standardisiert über die Effizienz der Expression unter pEGFP-N1 (100 x Anteil der phuDCX3509-EGFP exprimierenden Zellen / Anteil der pEGFP-N1 exprimierenden Zellen). Hieraus errechnete sich, dass in bis zu 30,6% der phuDCX3509-EGFP transfizierten primären MEF-Zellen die 3509 bp große *DCX*-regulatorische Region aktiv war (Abb. 4.6 B). Geringere Expressions-Effizienz zeigten Neuro-2a und D283 Med (rund 7% bis 12%), inaktiv war die *DCX*-regulatorische Region in den nicht neuronalen Zelllinien A293, CTX TNA2 und N20.1. In COS7 Zellen war die *DCX*-regulatorische Region schwach aktiv (6,3%), was auf eine gewisse Durchlässigkeit der 3509 bp großen Region unter bestimmten zellulären Gegebenheiten schließen ließ. Ähnliches war zuvor für den in neuronalen Zellen spezifisch aktiven Tau-Promotor gefunden worden: er zeigte in COS7 Zellen ebenfalls schwache Aktivität (Heicklen-Klein, 2000).

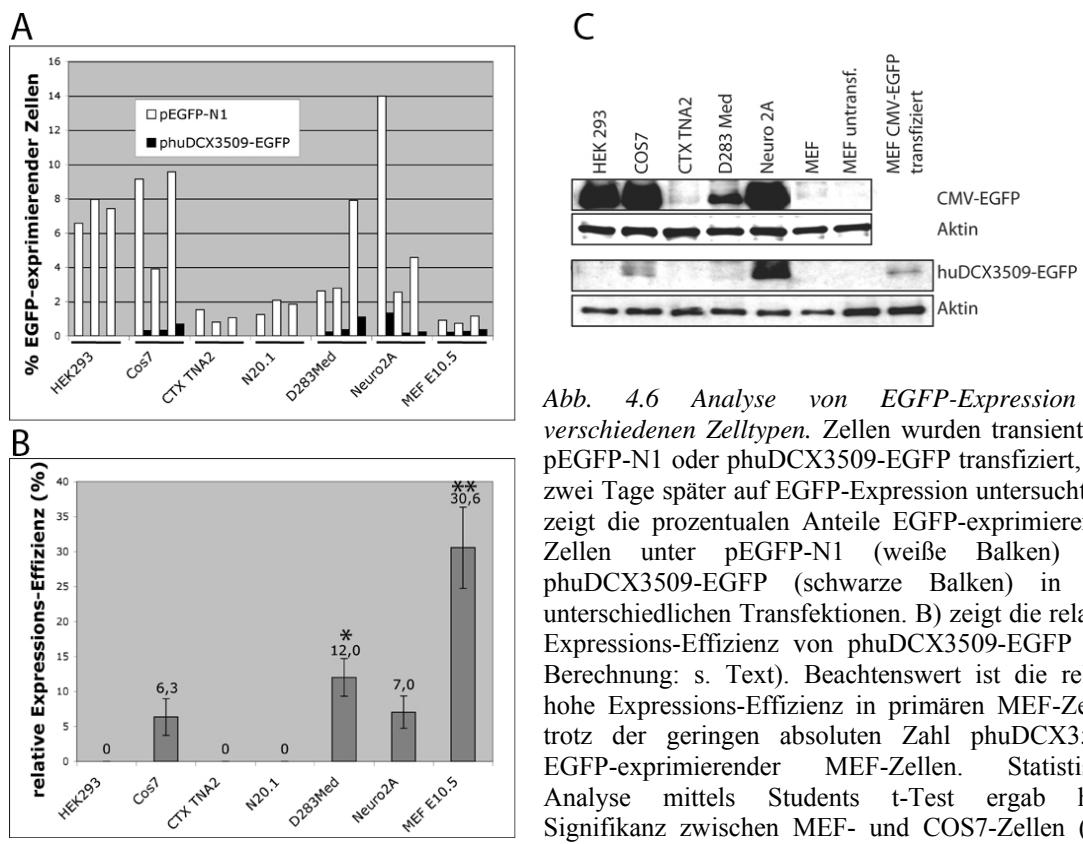


Abb. 4.6 Analyse von EGFP-Expression in verschiedenen Zelltypen. Zellen wurden transient mit pEGFP-N1 oder phuDCX3509-EGFP transfiziert, und zwei Tage später auf EGFP-Expression untersucht. A) zeigt die prozentualen Anteile EGFP-exprimierender Zellen unter pEGFP-N1 (weiße Balken) und phuDCX3509-EGFP (schwarze Balken) in drei unterschiedlichen Transfektionen. B) zeigt die relative Expressions-Effizienz von phuDCX3509-EGFP (zur Berechnung: s. Text). Beachtenswert ist die relativ hohe Expressions-Effizienz in primären MEF-Zellen trotz der geringen absoluten Zahl phuDCX3509-EGFP-exprimierender MEF-Zellen. Statistische Analyse mittels Students t-Test ergab hohe Signifikanz zwischen MEF- und COS7-Zellen ($p < 0,005$, $N = 3$, ***) und geringe Signifikanz zwischen D283Med- und COS7-Zellen ($0,1 > p > 0,05$, $N=3$, *). C) zeigt die Analyse entsprechender Transfektionen im Western Blot unter Detektion von EGFP bzw. Aktin (5 µg Protein je Spur).

In proteinbiochemischen Untersuchungen (Western Blot) zur Expression des EGFP-Reporters in transfizierten Zellen bestätigten sich diese Ergebnisse (Abb. 4.6 C): die verwendeten Zellkulturen exprimierten EGFP nach Transfektion mit pEGFP-N1 bereits in unterschiedlichem Ausmaß, waren demnach verschieden leicht transfizierbar; starke EGFP-Expression unter Kontrolle des ubiquitären CMV-Promotors fand sich für HEK293-, COS7- und Neuro2A-, schwächere für CTXKO29-, D283 Med- und MEF-Zellen; die Expression von EGFP unter Kontrolle der *DCX*-regulatorischen Region in COS7-, D283 Med- und Neuro2A-Zellen bestätigte sich, die Expression des Reporters in primären MEF-Zellen war im vorliegenden Western Blot aufgrund mangelnder Sensitivität des Assays nicht detektierbar (Abb. 4.6 C). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die 3509 bp große *DCX*-regulatorische Region spezifisch in Zellen neuronalen Ursprungs aktiv ist.

4.3. Spezifische Aktivität der *DCX*-regulatorischen Region in jungen Neuronen aus embryonalen Primärkulturen des Maus-Telenzephalons

Ausführlicher als in den immortalisierten Zellkulturen wurde die Aktivität der *DCX*-regulatorischen Region in primären neuronalen Vorläuferzellkulturen untersucht. Insbesondere sollte herausgefunden werden, inwieweit die Aktivität der Region nach transienter Transfektion von phuDCX-3509-EGFP mit der Aktivität des endogenen *DCX*-Promotors übereinstimmte.

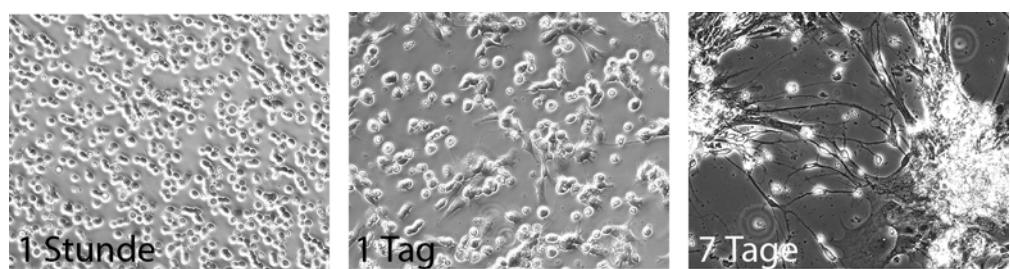


Abb. 4.7 Primäre telenzephale Vorläuferzellkulturen (MEF-Zellen) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Präparation, aus Mäusen zum Embryonaltag 10,5 bis 12,5 gewonnenen.

Als Kultursystem dienten die bereits unter 4.2. erwähnten, zum Embryonaltag 10,5 bis 12,5 aus Mäusen gewonnenen, dissozierten telenzephalen Vorläuferzellkulturen (MEF-Zellen). Zunächst wurde eine detaillierte Zelltypanalyse an diesem primären Zellkulturmodell durchgeführt, um speziell das *DCX*-Expressionsmuster zu untersuchen. Die primären MEF-Kulturen eigneten sich

besonders deshalb für die vorliegende Fragestellung, weil sie die verschiedenen Zelltypen des sich entwickelnden Nervensystems enthielten.

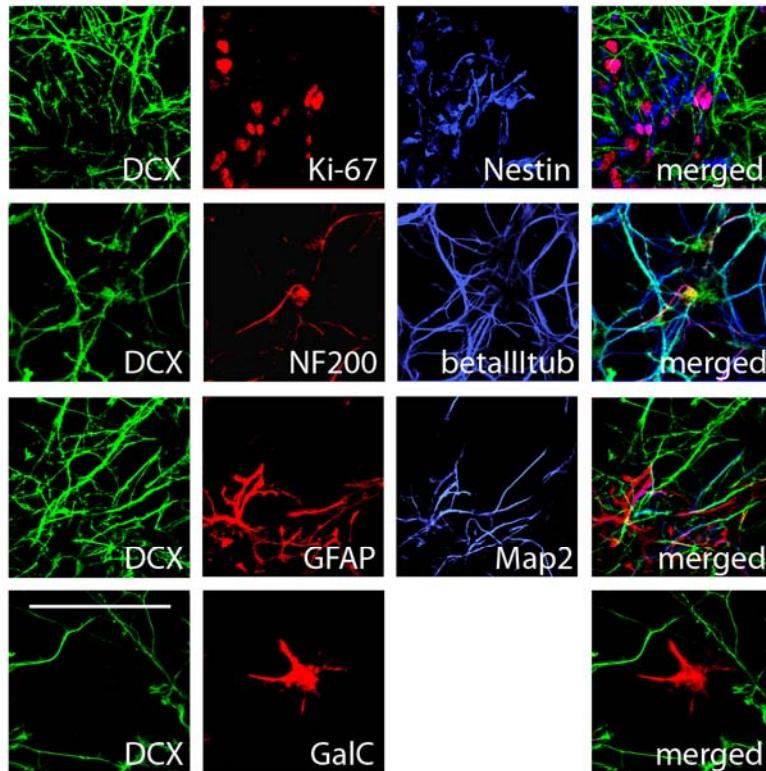
Abb. 4.7 zeigt Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Präparation. Die Zellen wurden ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren in 5 % FKS enthaltendem Neurobasal-Medium und auf Poly-Ornithin-/Laminin-beschichteten Oberflächen kultiviert. Nach Anheften der zunächst kugeligen Zellen an die Kulturschale bildeten die Zellen allmählich Ausläufer und schließlich differenzierte Kulturen.

Abb. 4.8 A gibt einen Überblick, welche Zelltypen in der primären MEF-Kultur nach einer Woche unter Differenzierungsbedingungen anzutreffen waren. Zellen der Kulturen ließen sich mittels Antikörpern gegen verschiedene Marker anfärben: den Stammzellmarker Nestin, KI-67 als Marker für mitotische Zellen, die früh bis pan-neuronalen Marker DCX, Klasse III β -Tubulin und Map2, die schwere Untereinheit des Neurofilaments (NF-200) als adulten neuronalen Marker, sowie die glialen Marker GFAP (Astrozyten) und Galactocerebrosid (GalC) (Oligodendrozyten) (Abb. 4.8 A).

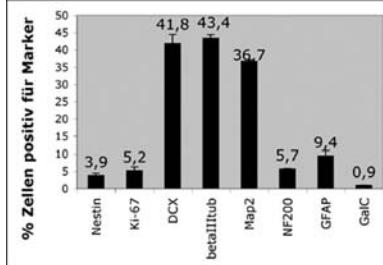
Ausgewertet wurde darüber hinaus, welchen Anteil der jeweilige Zelltyp nach 2 bzw. 7 Tagen an der primären Kultur hatte (Abb. 4.8 B, D). Nach sieben Tagen wurden zusätzlich Antikörper gegen verschiedene Neurotransmitter (Calbindin, Calretinin, CHAT, GABA, Serotonin, TH) eingesetzt, um eventuell neuronale Subtypen in den Kulturen aufzuspüren. Die Mehrheit der Zellen exprimierten spezifische Marker für neuronale Vorläuferzellen oder pan-neuronale Marker wie DCX, Klasse III β -Tubulin und Map2. Ein kleinerer Teil der Zellen exprimierte GFAP, wenige Zellen exprimierten Nestin, KI-67, Calbindin, Calretinin, GABA oder Serotonin. Für ChAT, TH und GalC fand sich praktisch keine Immunoreaktivität.

Zusätzlich wurde untersucht, welche dieser Marker gleichzeitig mit DCX in MEF-Zellen anzutreffen waren (Abb. 4.8 C, E). DCX-Expression ko-lokalierte mit früh-neuronalen Markern wie Klasse III β -tubulin (in 87,5% der DCX-exprimierenden Zellen nach 2 Tagen in Kultur; in 75,0% nach einer Woche in Kultur) und Map2 (in 67,5% nach 2 Tagen; in 87,5% nach einer Woche), einige DCX-positive Zellen waren gleichzeitig positiv für NF200 (3,3 % nach 2 Tagen; 13,3% nach einer Woche). Nach 2 Tagen war ein geringer Teil der DCX-exprimierenden Zellen noch mitotisch aktiv, detektiert über die Ko-Lokalisation mit KI-67 (5%). Keinerlei Ko-Lokalisation von

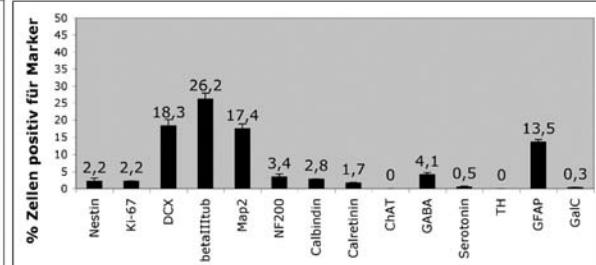
A



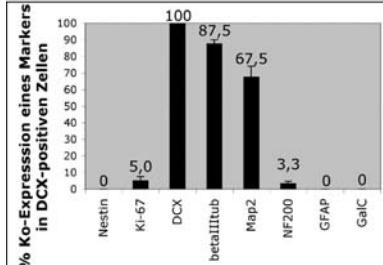
B



D



C



E

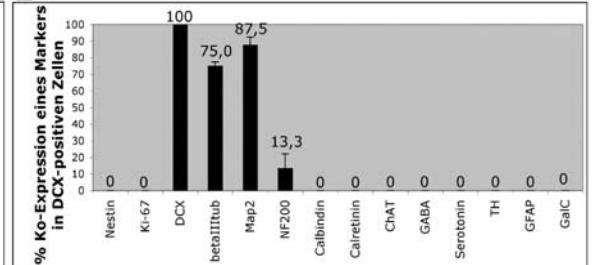


Abb. 4.8 Zelltypanalyse in primären Maus-Vorläuferzellkulturen (MEF-Zellen). A) Primäre MEF-Zellen wurden nach sieben Tagen in Kultur immunzytochemisch untersucht, „merged“ = Überlagerung. DCX-Expression war mit β III Tubulin und Map2 ko-lokaliert, z. T. auch mit NF200 und Ki-67, jedoch nicht mit Nestin, GFAP oder GalC. Messbalken 100 μ m B) – E) Quantitative Zelltypanalyse in MEF-Zellen nach 2 Tagen (B, C) und 7 Tagen (D, E). B) und D) prozentuale Anteile der Marker an der gesamten Kultur, C) und E) prozentuale Anteile der Ko-Expression in DCX-exprimierenden Zellen. DCX ist vornehmlich in jungen Neuronen vorhanden (Ko-Expression von β III Tubulin und Map2).

DCX fand sich dagegen mit Nestin, Calbindin, Calretinin, GABA, Serotonin, ChAT, TH, GFAP oder GalC. DCX-Expression war demnach im MEF-Zellkultursystem spezifisch für proliferierende neuronale Vorläuferzellen und junge Neurone. Das beobachtete Muster der DCX-Expression in primären MEF-Kulturen stimmt überein mit der bekannten Expression von DCX *in vivo*, weshalb sich das MEF-Kulturmodell gut für die vorliegende Promotoranalyse eignete.

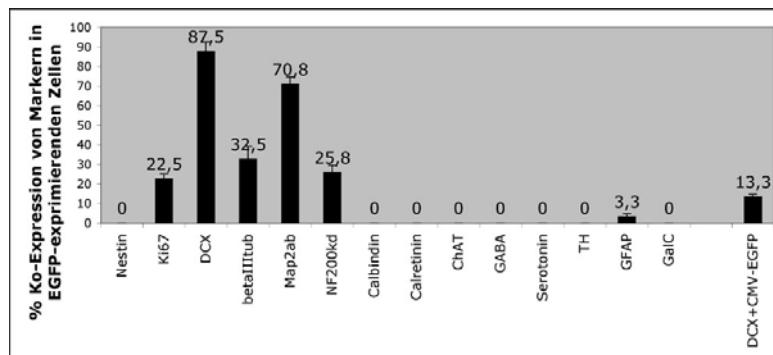


Abb. 4.9 Quantitative Analyse der Zell-Identität von MEF-Zellen mit aktiver DCX-regulatorischer Region. Primäre Maus-Vorläuferzellkulturen (MEF-Zellen) wurden transient mit phuDCX3509-EGFP transfiziert und drei Tage später auf EGFP-Expression und die Expression spezifischer Marker untersucht. Prozentuale Anteile EGFP-positiver Zellen, welche den jeweiligen Marker ko-exprimierten, sind gezeigt. Ebenfalls untersucht wurde DCX-EGFP-Ko-Expression nach Transfektion mit pEGFP-N1.

Als nächstes richtete sich der Blick auf diejenigen Zellen in der primären MEF-Kultur, welche das Reporterprotein EGFP nach transiente Transfektion mit phuDCX3509-EGFP exprimierten. Insbesondere sollten diese EGFP-positiven Zellen den in MEF-Zellen beschriebenen Zelltypen zugeordnet werden. Analysiert wurden die Eigenschaften phuDCX3509-EGFP exprimierender Zellen sowohl qualitativ (Abb. 4.10), als auch quantitativ (Abb. 4.9). In konfokaler Mikroskopie zeigte sich, dass die überwiegende Mehrheit der EGFP-exprimierenden Zellen endogenes DCX besaßen (87,5% der EGFP-exprimierenden Zellen) (Abb. 4.9, 4.10). Zellen mit EGFP-Reporterprotein exprimierten darüber hinaus Klasse III β -Tubulin (32,5%), Map2 (70,8%) und NF200 (25,8%). Ko-Expression mit Ki-67 fand sich in 22,5% der EGFP-positiven Zellen, dagegen exprimierte keine der EGFP-positiven Zellen Nestin oder GalC. Ein kleiner Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen war positiv für GFAP (3,3%). Letzteres könnte auf erleichterte Ko-Existenz neuronaler Marker mit GFAP unter Zellkulturbedingungen zurückzuführen sein. Die Gestalt EGFP-exprimierender Zellen – meist kleiner Zellkörper, umgeben von bipolar oder oligopolar angeordneten Neuriten – glich deutlich dem typischen Erscheinungsbild neuronaler Vorläuferzellen und junger Neuronen (Abb. 4.10).

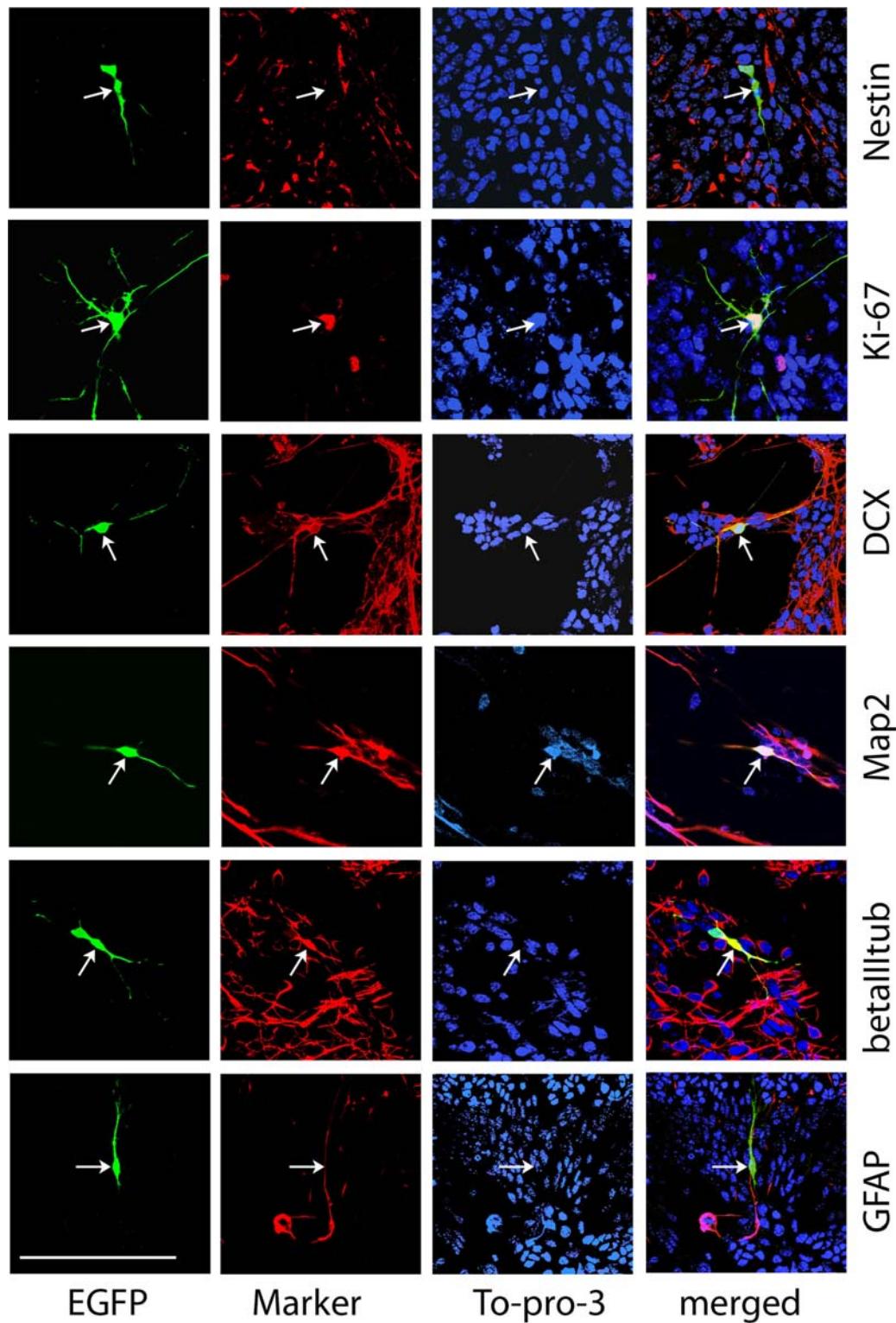


Abb. 4.10 Analyse der Zell-Identität in primären MEF-Zellen mit aktiver DCX-regulatorischer Region. Primäre MEF-Zellen wurden transient mit phuDCX3509-EGFP transfiziert und drei Tage später auf EGFP-Expression und die Expression spezifischer Marker untersucht. Linke Spalte zeigt EGFP-Expression, die zweite Spalte die Expression spezifischer Marker, die dritte zeigt Zellkerne nach To-pro-3-Anfärbung, ganz rechts ist die Überlagerung („merged“) der drei ersten Spalten zu sehen. EGFP-positive Zellen ko-exprimieren DCX, Map2 und β III Tubulin, z.T. auch Ki-67, sehr wenige GFAP, keine Ko-Expression wurde für Nestin gefunden. Messbalken 100 μ m.

Um auszuschließen, dass die Mehrheit der EGFP-positiven Zellen nur deshalb DCX exprimierte, weil sich dieser Zelltyp möglicherweise leichter transfizieren ließ, wurden MEF-Kulturen mit pEGFP-N1 transfiziert und nun auch hier in EGFP-positiven Zellen nach DCX-Expression gefahndet: 13,3% der EGFP-positiven Zellen exprimierten nach einer Woche in Kultur auch DCX. Diese Zahl ist vergleichbar mit dem Anteil endogen DCX-exprimierender Zellen von 18,3%, wie er nach einer Woche in den MEF-Kulturen ausgezählt worden war (Abb. 4.8 D); DCX-exprimierende Zellen sind demnach nicht präferentiell transfizierbar.

Zusammengefasst zeigt sich, dass die 3509 bp große *DCX*-regulatorische Region ausreichend ist für die spezifische Expression des EGFP Reporterproteins in neuronalen Vorläuferzellen. Zusätzlich lassen die gewonnenen Daten den Schluss zu, dass die Aktivität der 3509 bp großen Region mit dem Expressionsmuster endogenen Doublecortins übereinstimmt.

4.4. Elektrophysiologische Eigenschaften junger Neurone mit aktiver *DCX*-regulatorischer Region in Maus-Primärkulturen

Weitere Versuche sollten die Ergebnisse zur früh-neuronalen Spezifität der 3509 bp großen *DCX*-regulatorischen Region bestätigen. Hierzu wurden elektrophysiologische Untersuchungen an primären MEF-Kulturen durchgeführt, die transient mit phuDCX3509-EGFP transfiziert worden waren. 3 bis 4 Tage nach der Transfektion wurden EGFP-exprimierende Zellen, die mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops identifiziert wurden, einem Patch-Clamp unterzogen (Abb. 4.11 A). Nach Abschluss der Messungen war in einigen Zellen neben dem Reporterprotein EGFP und endogenem DCX auch Biocytin nachweisbar, welches über die Flüssigkeit in der Mess-Pipette in die Zellen diffundiert war (Abb. 4.11 B).

Insgesamt 6 EGFP-exprimierende und 2 nicht -exprimierende Zellen wurden vermesssen. Das Ruhemembranpotential der EGFP-exprimierenden Zellen lag bei $-42,5 \pm 7,7$ mV (mean \pm SD, n=6), der Eingangswiderstand (R_{input}) betrug 407 ± 173 M Ω . An den nicht EGFP exprimierenden Zellen wurde ein Membranpotential von $-39,0 \pm 22,6$ mV und ein Eingangswiderstand von $295 \pm 113,1$ M Ω detektiert. Die passiven Membraneigenschaften von EGFP-exprimierenden und nicht EGFP-exprimierenden Zellen waren demnach vergleichbar.

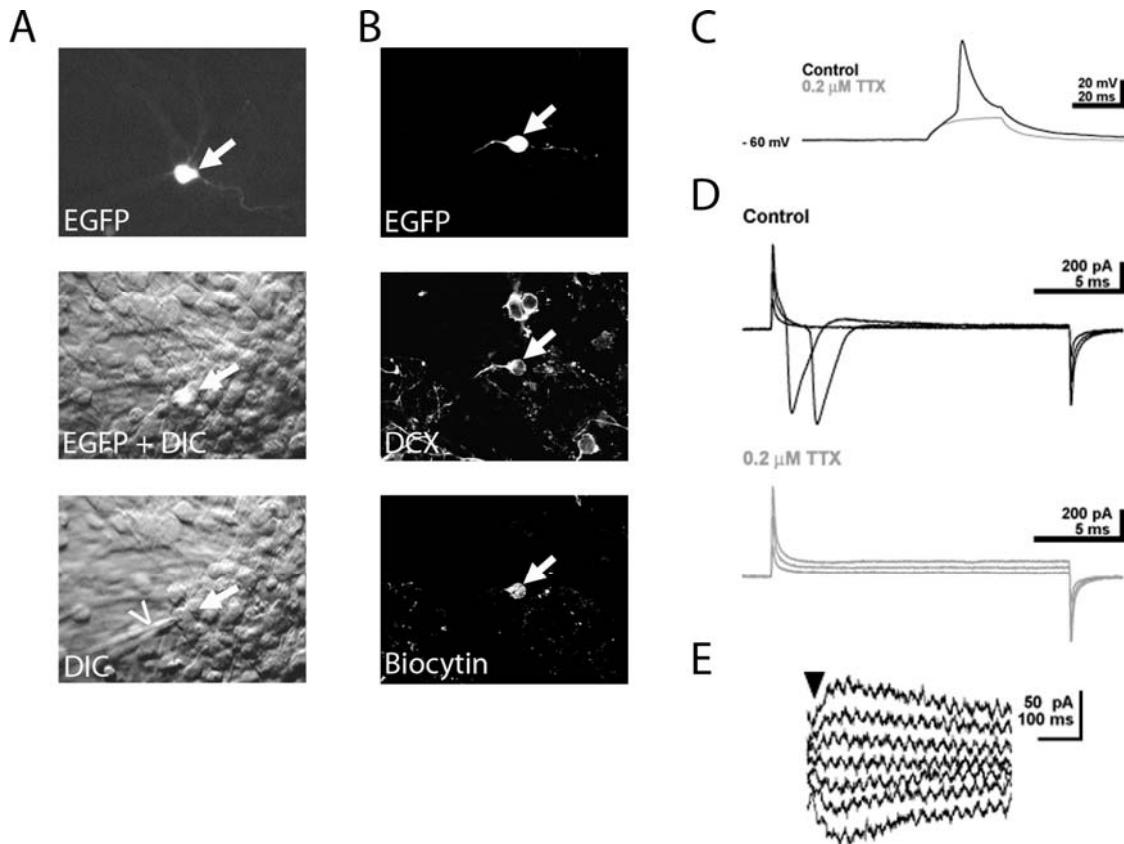


Abb. 4.11 Elektrophysiologische Untersuchung von MEF-Zellen mit aktiver DCX-regulatorischer Region. A) EGFP-exprimierende MEF-Zellen nach transiente Transfektion mit phuDCX3509-EGFP wurden im Fluoreszenzmikroskop identifiziert, Expression von EGFP alleine und gemeinsam mit dem differentiellen Interferenz-Kontrastbild (DIC) sind gezeigt, darunter ein Bild der selben Zelle während der Ableitung (Pfeilspitze = Lage der Mikropipette). B) Immunzytochemischer Nachweis von DCX in primären MEF-Zellen nach elektrophysiologischer Untersuchung. Untersuchte Zellen waren nachträglich über Biocytin-Markierung zu identifizieren, Biocytin war als 0,5% Lösung über die Mikropipette verabreicht worden. C) Eigenschaften von Aktionspotentialen in MEF-Zellen mit aktiver humaner DCX-regulatorischer Region: Aktionspotentiale konnten an einer Mehrzahl der untersuchten MEF-Zellen nach Membran-Depolarisation aufgezeichnet werden (schwarze Kurve). Durch Zugabe von 0,2 μM TTX (spezifischer Blocker Spannungs-abhängiger Na-Kanäle ließen sich Aktionspotentiale verhindern (graue Kurve). D) Unter voltage-clamp-Bedingungen aufgezeichnete Antworten primärer MEF-Zellen mit aktiver DCX-regulatorischer Region: Depolarisation der Membran von über -40 mV hatte einen schnellen Einwärtsstrom von Na^+ -Ionen zur Folge (schwarze Kurve), der durch die Zugabe von 0,2 μM TTX (graue Kurve) blockiert wurde. E) GABAerge Ströme an MEF-Zellen mit aktiver DCX-regulatorischer Region: Fokalapplikation von 1mM GABA führte zu Membranströmen, die sich bei - 40 mV umkehrten (Pfeilspitze = GABA Applikation (8ms)).

In 4 der 6 EGFP-exprimierenden und in den beiden nicht EGFP-exprimierenden Zellen der Kultur wurden Aktionspotentiale beobachtet. Diese hatten in EGFP-exprimierenden Zellen eine Schwelle von $-31,2 \pm 9,7$ mV (gegenüber $-38 \pm 0,8$ mV in nicht-EGFP exprimierenden Zellen), eine Amplitude von $29,5 \pm 18,4$ mV (gegenüber $30,9 \pm 1,4$ mV), und eine Dauer von $5,7 \pm 1,1$ ms (gegenüber $3,3 \pm 0,9$ ms). Die kleine Amplitude und die relativ lange Dauer der Aktionspotentiale der EGFP-exprimierenden Zellen sind charakteristisch für unreife Neurone.

Aktionspotentiale ließen sich im Verlauf der Messungen durch niedrige Konzentrationen des Natrium-Kanal-Blockers TTX (0,2 mM) vollständig unterdrücken (Abb. 4.11 C). In gleicher Weise wurde auch der einem Aktionspotential zugrunde liegende Natrium-Ionen Einstrom, ausgelöst durch eine Membran-Depolarisation von über –40 mV, durch TTX (0,2 μ M) vollständig verhindert (Abb. 4.11 D).

Während der Messungen wurden die Zellen auch auf das Vorkommen von GABA-Rezeptoren untersucht. Hierzu wurde den Zellen 1 mM GABA als kurzer Puls verabreicht, um anschließend auftretende Ströme zu vermessen. Bei 2 EGFP-exprimierenden Zellen fanden sich GABAerge Membranströme, was auf die Anwesenheit von GABA-Rezeptoren auf den vermessenen Zellen schließen ließ. Die Dichte der GABA-Rezeptoren war jedoch gering, wie sich aus der niedrigen Amplitude der GABAergen Membranströme ersehen ließ (Abb. 4.11 E) – eine Eigenschaft, die ebenso wie die Charakteristik der Aktionspotentiale unreifen Neuronen zuzuordnen ist.

Zusammenfassend lassen die elektrophysiologischen Daten den Schluss zu, dass phuDCX3509-EGFP-exprimierende Zellen unreife, GABAresponsive Neurone sind. Sie bestätigen die Daten aus den immunzytochemischen Untersuchungen zur Zellidentität. Demnach reicht die 3509 bp große DCX-regulatorische Region aus, um das Reporterprotein EGFP spezifisch in jungen Neuronen und neuronalen Vorläuferzellen zu exprimieren.

4.5. Spezifische Aktivität der DCX-regulatorischen Region in DCX-exprimierenden Zellen aus postnatalen und adulten Gewebekulturen

Die Aktivität der 3,5 kbp großen regulatorischen Region des *DCX*-Gens wurde nicht nur an fötalen Zellen, sondern auch an neuronalen Vorläuferzellen aus postnatalen und adulten neurongenen Zonen der Maus untersucht. Hierzu wurde Vektor phuDCX3509-DsRed2 mittels ballistischer Methoden transfiziert, und zwar in postnatale Schnittkulturen des Hippocampus und adulte Explantkulturen des BO. In phuDCX3509-DsRed2 kontrolliert die *DCX*-regulatorische Region die Expression des Reporterproteins DsRed2, der Vektor ist ansonsten identisch mit phuDCX3509-EGFP (s. auch Kap. 2.2.1). In adulten Primärkulturen exprimieren zwar weniger Zellen DCX als im fötalen System, die Aktivität der postulierten regulatorischen Region sollte jedoch ähnlich wie in fötalen Zellen mit der des endogenen Promotors übereinstimmen. Um dies zu bestätigen, wurden Reporterprotein-exprimierende Zellen auf ihren Gehalt an endogenen Markern mit Hilfe der Immunhistochemie untersucht, wobei neben DCX selbst auch NeuN als adulter neuronaler Marker und GFAP als Marker für gliale Zellen überprüft wurden.

Das System der hippocampalen Schnittkulturen eignete sich besonders für die vorliegenden Untersuchungen, da die Zellen in diesem Gewebeverband einerseits genetisch manipulierbar, sprich transfizierbar sind, andererseits jedoch das anatomische Umfeld teilweise erhalten bleibt. Zahlreiche Elemente spiegeln noch die *in vivo* Situation wie z.B. die Neurogenese in der Subgranulärzellenschicht und die vielfältigen Zellkontakte (Prang, 2001; Raineteau, 2004). Abb. 4.12 A zeigt eine Skizze zum Aufbau der hippocampalen Schnittkulturen.

Der adulte BO der Nager enthält eine große Zahl migrierender, DCX-exprimierender Zellen (Brown, 2003), Explantkulturen aus diesem Gewebe sind deshalb ein viel versprechendes System, um die Aktivität der *DCX*-regulatorischen Elemente in neuronalen Vorläuferzellen des adulten Tieres zu untersuchen. Die Migration neuronaler Vorläuferzellen aus Explantkulturen der SVZ und des BO in das umgebende Modell-Substrat (Matrikel) ahmt die *in-vivo*-Situation nach: Zellen migrieren aus der SVZ oder verteilen sich nach Verlassen des RMS innerhalb des BO (Abb. 4.13 A).

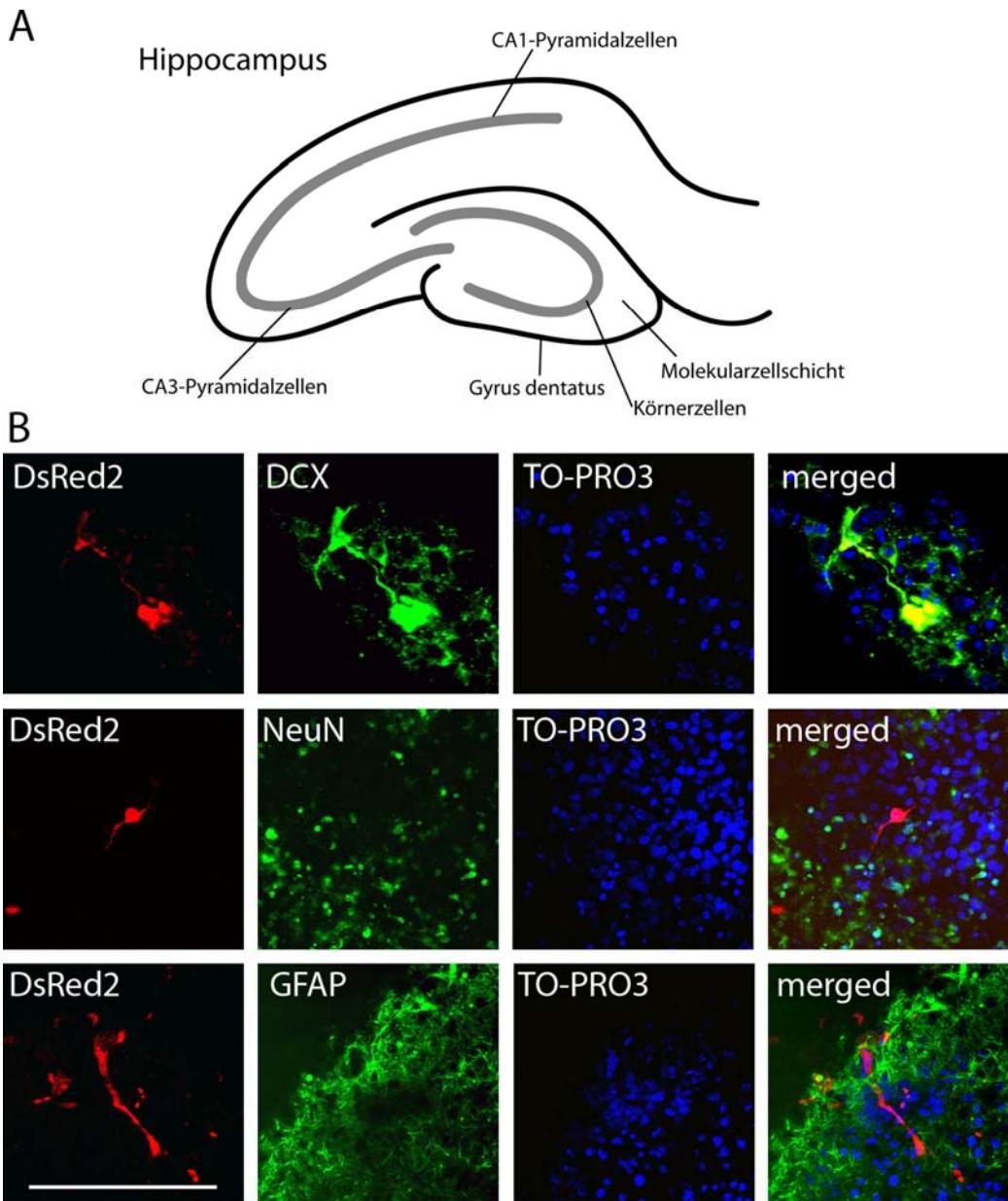


Abb. 4.12. Expression des DsRed2-Reporterproteins unter Kontrolle der humanen DCX-regulatorischen Region in postnatalem Gewebekulturen des Maus-Hippocampus. A) schematische Darstellung zum anatomischen Kontext hippocampaler Schnittkulturen B) Schnittkulturen aus postnatalem Maus-Hippocampus wurden ballistisch durch phuDCX3509-DsRed2 transfiziert und 3 Tage später immunhistochemisch untersucht. Rote Fluoreszenz fand sich in Ausläufer-tragenden Zellen mit an migrierende neuronale Vorläufer oder junge Neurone erinnernder Morphologie. DsRed2 war ko-exprimiert mit DCX, nicht mit NeuN oder GFAP. Messbalken 100 µm

Schnittkulturen aus postnatalem Hippocampusgewebe von Mäusen wurden ballistisch mit phuDCX3509-DsRed2 oder dem Kontrollvektor pDsRed2-N1 transfiziert. Letzterer stellt die Expression von DsRed2 unter Kontrolle des ubiquitären CMV-Promotors. Zwei bis vier Tage nach Transfektion wurde unter pDsRed2-N1 in bis zu 30 Zellen pro Schnitt Expression des Reporters gefunden, dagegen nur bis zu 5 Reporterprotein-exprimierende Zellen, wenn phuDCX3509-DsRed2 transfiziert

worden war. Zellen, welche DsRed2 unter Kontrolle des ubiquitären CMV-Promotors exprimierten, zeigten vielfältige Morphologie und erinnerten an Astrozyten, neuronale Vorläufer oder reife Neurone.

Die Vielfalt ließ vermuten, dass verschiedene Zelltypen während der verwendeten ballistischen Transfektion die Vektoren aufnehmen und das Reporterprotein exprimieren konnten. Schnitte, welche mit phuDCX3509-DsRed2 transfiziert worden waren, wurden genauer untersucht. In der Mehrzahl der 40 untersuchten Zellen, waren DsRed2-exprimierende Zellen bipolar und besaßen die morphologische Charakteristik von migrierenden neuronalen Vorläufern oder jungen Neuronen (Abb. 4.12 B). DsRed2-exprimierende Zellen ko-exprimierten endogenes Doublecortin, jedoch nicht NeuN oder GFAP (Abb. 4.12 B).

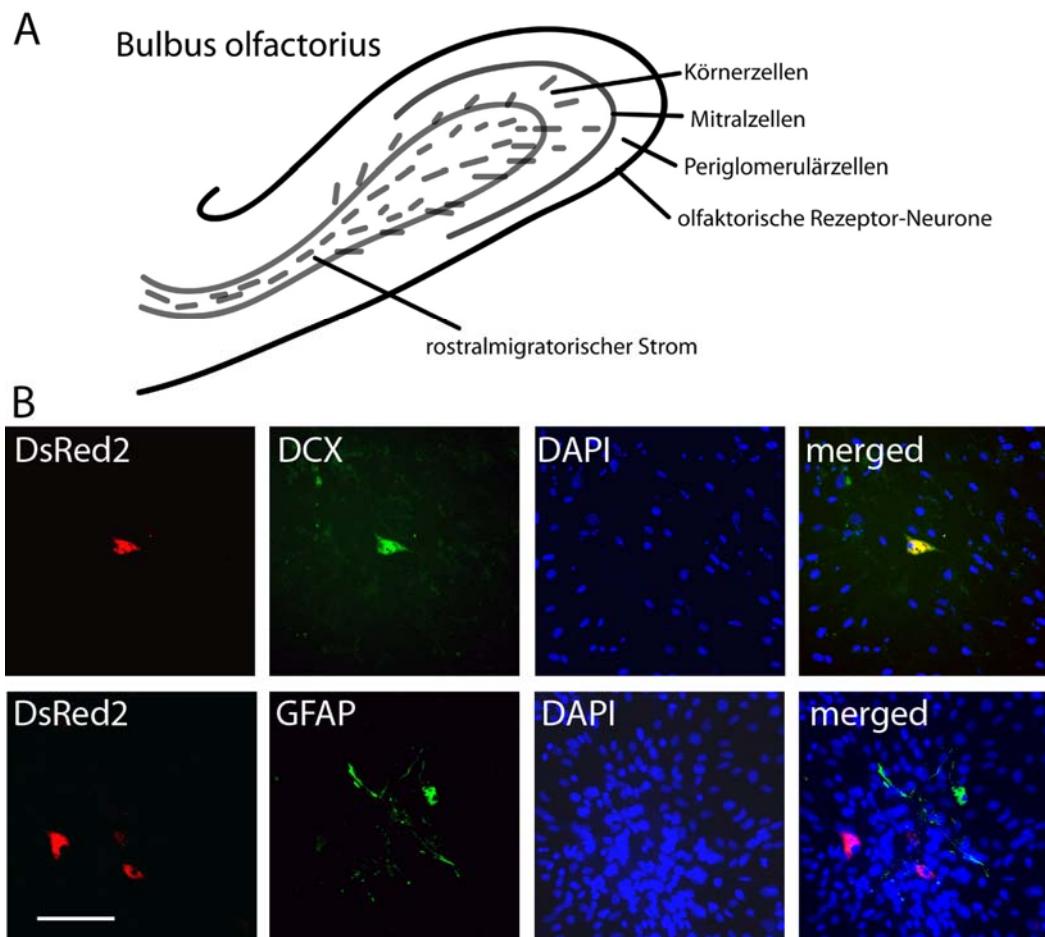


Abb. 4.13. Expression des DsRed2-Reporterproteins unter Kontrolle der humanen DCX-regulatorischen Region in adulten Gewebekulturen des Bulbus olfactorius. A) schematische Skizze des murinen Bulbus olfactorius (BO) B) Explantkulturen aus BO der adulten Maus wurden ballistisch durch phuDCX3509-DsRed2 transfiziert und 3 Tage später immunhistochemisch untersucht. DsRed2 war mit endogenem DCX, jedoch nicht mit GFAP ko-lokalisiert. Messbalken = 100 µm

Ballistische Transfektion adulter Explantkulturen aus dem BO hatte ein ähnliches Ergebnis wie die Transfektion der hippocampalen Schnittkulturen. Nach Transfektion mit phuDCX3509-DsRed2 exprimierten die Zellen das Reporterprotein DsRed2 gemeinsam mit DCX (21 von 25 DsRed 2 exprimierenden Zellen), jedoch nicht mit GFAP (Abb. 4.13 B). Somit konnte zusätzlich in hippocampalen und adulten BO-Kulturen gezeigt werden, dass die 3,5 kbp große *DCX*-regulatorische Region spezifisch in DCX-exprimierenden neuronalen Vorläuferzellen sowie jungen Neuronen aktiv ist.

4.6. Deletionsmutanten bestimmen relevante Bereiche der humanen *DCX*-regulatorischen Region

Die erste Untersuchung der 3,5 kbp großen Region strangauwärts des Startkodons im *DCX*-Gen hatte gezeigt, dass sich im 1,3 kbp großen Abschnitt oberhalb des Exons 3 besonders viele mögliche TF-Bindestellen befanden (Abb. 4.1, 4.2 A und Tab. 4.2). Um nun einen Eindruck von der Relevanz dieser theoretischen Bindestellen für die Expression von Reporterproteinen zu bekommen, wurde das 3,5 kbp große *DCX*-regulatorische Fragment in einen Vektor subkloniert, in dem es die Expression der Luziferase aus *Photinus pyralis* kontrollierte (phuDCX3509-FFLuci). Mehrere Sequenzabschnitte der *DCX*-regulatorischen Region wurden auf diesem Vektor deletiert. Der Vektor mit der gesamten 3509 bp großen Region sowie die verschiedenen Deletionsvektoren wurden anschließend in primäre MEF-Zellen transfiziert (s. auch Kap. 2.2.1; Abb. 4.14).

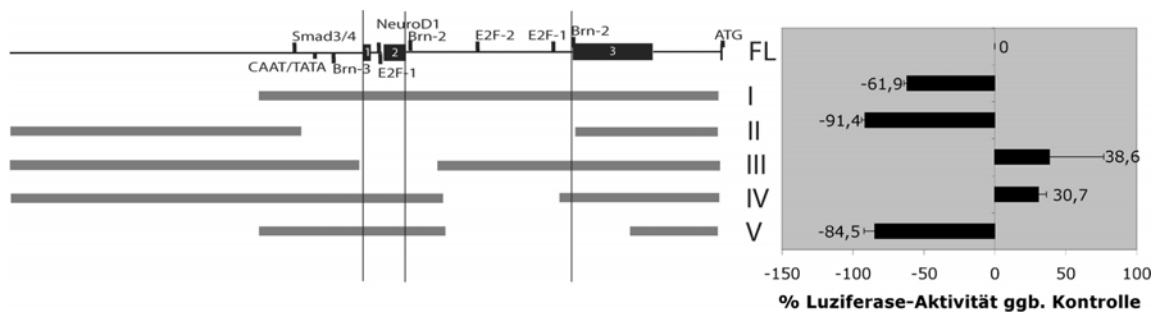


Abb. 4.14 Relevanz bestimmter Abschnitte der 3509 bp großen DCX-regulatorischen Region für die Expression von Reporterproteinen. Deletions-Konstrukte der 3509 bp großen DCX-regulatorischen Region wurden transient in primäre MEF-Zellen transfiziert, um zwei Tage später die Aktivität des Luziferase-Reporterenzymes aus *Photinus pyralis* zu messen. Als interne Standards dienten die Aktivität der Renilla-Luziferase unter Kontrolle des CMV-Promotors und das komplette 3,5 kbp *DCX*-regulatorische Fragment.

Deletions-Konstrukt ΔI ($\Delta -3509/-2344$) enthält Konsensus-Sequenzen von TF-Bindestellen, jedoch nicht die sich strangauwärts anschließende Region. ΔI zeigte verglichen mit phuDCX3509-FFLuci (=Kontrolle) reduzierte Promotoraktivität (-61,9%), was auf die Lage weiterer für die Expression des *DCX*-Gens wichtiger Sequenzen innerhalb der ersten 1165 bp schließen ließ. Im Deletions-Konstrukt ΔII ($\Delta -2081/-700$) fehlen alle postulierten TF-Bindestellen, die Expression des Repoterproteins ging hier auch fast vollständig verloren (-91,4% im Vergleich zur Kontrolle); dieses Ergebnis unterstützt die Bedeutung der hier deletierten Region. Ein ähnliches Resultat wurde auch für ΔV ($\Delta -3509/-2344$ und $\Delta -1459/-431$) erzielt (-84,5% im Vergleich zur Kontrolle). Demnach könnte das Fragment -2344 bis -1459 nicht ausreichen, um die volle Aktivität des Promotors herzustellen, obwohl dieser Abschnitt mehrere mögliche TF-Bindestellen enthält. Interessanterweise zeigten Deletionsvektor ΔIII ($\Delta -1793/-1388$) und ΔIV ($\Delta -1386/-784$) verstärkte Aktivität im Vergleich zur Kontrolle phuDCX3509-FFLuci (+38,6% and +30,7%). Erklären ließe sich dieses Ergebnis mit der Anwesenheit von Silencer-Elementen in diesen Regionen. Allerdings ist eine genauere Untersuchung der einzelnen Sequenzabschnitte nötig, um für die Expression des *DCX*-Gens essentielle Promotorelemente zu kartieren.

Um zu überprüfen, wie relevant die möglichen Bindestellen für E2F auf der *DCX*-regulatorischen Region für die Expression des Gens waren, wurden neurogene Regionen von Mäusen, in denen der E2F1-Lokus gezielt deletiert worden war, untersucht. Diese Mäuse zeigen reduzierte Neurogenese im adulten ZNS (Cooper-Kuhn, 2002). In der immunhistochemischen Analyse der Knockout-Tiere allerdings fanden sich DCX-exprimierende Zellen in SVZ, RMS, BO sowie im Hippocampus. Hieraus wurde geschlossen, dass das Fehlen von E2F1 allein nicht ausreicht, um Doublecortin-Expression zu verhindern.

4.7. Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Aktivität der humanen *DCX*-regulatorischen Region *in vitro*

Adulte Neurogenese wird von einer Vielzahl an Wachstumsfaktoren reguliert, und die Expression von DCX korreliert mit Neurogenese. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob es einen direkten Einfluss solcher Wachstumsfaktoren auf die Aktivität des *DCX*-Promotors gibt. Hierzu wurden primäre MEF-Zellen mit phuDCX3509-

FFLuci transfiziert und die Zellen einen Tag später mit verschiedenen Wachstumsfaktoren stimuliert, darunter BDNF, VEGF, EGF, FGF, TGF-beta, NT-3 und NT-4, oder Retinsäure (Vitamin A). Der regulierende Einfluss dieser Faktoren auf Neurogenese bzw. neurale Stammzellen war zuvor gezeigt worden (Enwere, 2004; Jang, 2004; Ostenfeld, 2004; Schanzer, 2004; Shetty, 2004). Zwei Tage nach dieser Behandlung wurde die Luziferaseaktivität in den transient transfizierten Zellen gemessen. Die Aktivität des Promotors war unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren nicht signifikant verändert (Abb. 4.15).

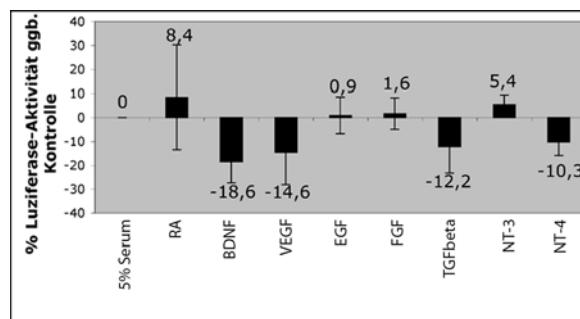


Abb. 4.15 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Aktivität der DCX-regulatorischen Region. Primäre MEF-Zellen wurden transient mit phuDCX3509-FFLuci transfiziert und einen Tag später mit verschiedenen Faktoren stimuliert, um zwei Tage später die Aktivität des Luziferase-Reporterenzyms aus *Photinus pyralis* zu messen. Als interne Standards dienten die Aktivität der *Renilla*-Luziferase unter Kontrolle des CMV-Promotors und das komplette 3,5 kbp DCX-regulatorische Fragment.

Für die Stimulierung mit Wachstumsfaktoren war der kurze Zeitabschnitt von zwei Tagen gewählt worden, um direkte Signaltransduktion nachzuweisen und nicht etwa die Zusammensetzung der Zellpopulationen zu verändern, was das Ergebnis hätte verfälschen können. Von den verwendeten Wachstumsfaktoren ist bekannt, dass sie Proliferation, Überleben und Reifung neuronaler Zellen beeinflussen, weshalb eine langfristige Verschiebung in den prozentualen Anteilen z.B. von Stammzellen oder Vorläuferzellen an der Kultur nicht auszuschließen war. Die geringe Zunahme an Aktivität unter dem Einfluss von Retinsäure, VEGF und FGF könnte auf eine verstärkte neuronale Reifung der Zellkultur zurückzuführen sein. Die Abnahme an Aktivität unter dem Einfluss von EGF ließe sich mit dem Effekt dieser Substanz auf neuronale Stammzellen erklären, welche nicht DCX exprimieren.

5. Ergebnis III: Expression von Reporterproteinen unter Kontrolle der *DCX*-regulatorischen Region *in vivo*

Während der Embryonalentwicklung ist Doublecortin in weiten Teilen des entstehenden Nervensystems exprimiert und wird für die Migration neuronaler Vorläuferzellen benötigt. Wird Doublecortin-Expression unterdrückt, so verhindert dies radiale Migration junger Neurone in den entstehenden Gehirnmantel (Bai, 2003; des Portes, 1998a; Gleeson, 1998). Nach der Geburt und im adulten Organismus sinkt – auf das gesamte Gehirn bezogen – die Expression des Proteins deutlich, ist jedoch weiterhin in Regionen adulter Neurogenese in großen Mengen anzutreffen: die Neuentstehung von Nervenzellen im Gyrus dentatus des Hippocampus und in der SVZ korreliert mit der DCX-Expression, das Protein findet sich auch im RMS, dem Strang migrierender Zellen, welcher von der Proliferation in der SVZ kontinuierlich unterhalten wird, und in dessen Zielgebiet, dem BO. Studien adulter Neurogenese an der Ratte haben gezeigt, dass Doublecortin nur vorübergehend in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert ist, jedoch weder in Stammzellen noch in adulten Nervenzellen (Brown, 2003; Rao, 2004). Die Eigenschaft, sowohl im Embryo als auch im adulten Gehirn in gerade entstehenden Nervenzellen ausgeprägt zu werden, macht Doublecortin zu einem idealen Kandidaten zur Markierung von Neurogenese. Die vorliegende Promotion verfolgt konsequent das Konzept, diese Marker-Eigenschaften zu nutzen, um neuronale Vorläuferzellen aufzuspüren, ermöglicht durch die Expression von Reporterprotein unter Kontrolle regulatorischer Sequenzen des *DCX*-Gens.

Hierfür musste die regulatorische Region zunächst eingegrenzt werden, um anschließend die Aktivität des definierten Sequenzabschnitts *in vitro* zu untersuchen (s. Kap. 4). Genomische DNA strangauwärts der *DCX*-Startkodons in drei Spezies (Mensch, Maus und Ratte) wurde verglichen, und dabei entscheidende Homologie nur innerhalb einer rund 3,5 kbp großen Region gefunden (s. Kap. 4.1). Um einen möglichst engen Bezug zum humanen System zu behalten, beschränkte man sich für alle weiteren Versuche dieser Arbeit auf die 3509 bp große, postulierte regulatorische Region des humanen *DCX*-Gens und stellte Reporterproteine (EGFP, DsRed2,

Glühwürmchen-Luziferase) unter deren Kontrolle. Wie die anschließenden *in vitro* Analysen an Zellkulturen zeigten, war dieser *DCX*-regulatorische Sequenzabschnitt spezifisch in immortalisierten Zellen neuronalen Ursprungs bzw. in primären neuronalen Vorläuferzellkulturen aus fötalen Mäusen aktiv (s. Kap. 4.2 – 4.4). Auch in adulten Gewebekulturen korrelierte die von der humanen *DCX*-regulatorischen Region gesteuerte Reporterexpression mit endogen detektiertem DCX (s. Kap. 4.5).

Diese an Zell- und Gewebekulturen beschriebene spezifische Aktivität der 3509-bp-Region in Vorläuferzellen, die endogen Doublecortin und andere früh neuronale Marker exprimierten, qualifizierte die genomische Region für weiterführende Versuche: der Sequenzabschnitt erschien als viel versprechendes Werkzeug zur Identifizierung von Neurogenese und von neuronalen Vorläuferzellen auch *in vivo*; die Reporterproteine EGFP, DsRed2 und Glühwürmchen-Luziferase wurden in transgenen Mausmodellen unter die Kontrolle der humanen *DCX*-regulatorischen Region gestellt (zur Methode s. Kap. 2); diese Tiere sind im Folgenden auch kurz mit dem Zusatz „huDCX3509-“ und dem jeweiligen Reporterprotein bezeichnet. Über Fluoreszenz oder Lumineszenz der Reporterproteine sollte in den Tieren einfach und schnell der Nachweis für die Neuentstehung von Nervenzellen geführt werden.

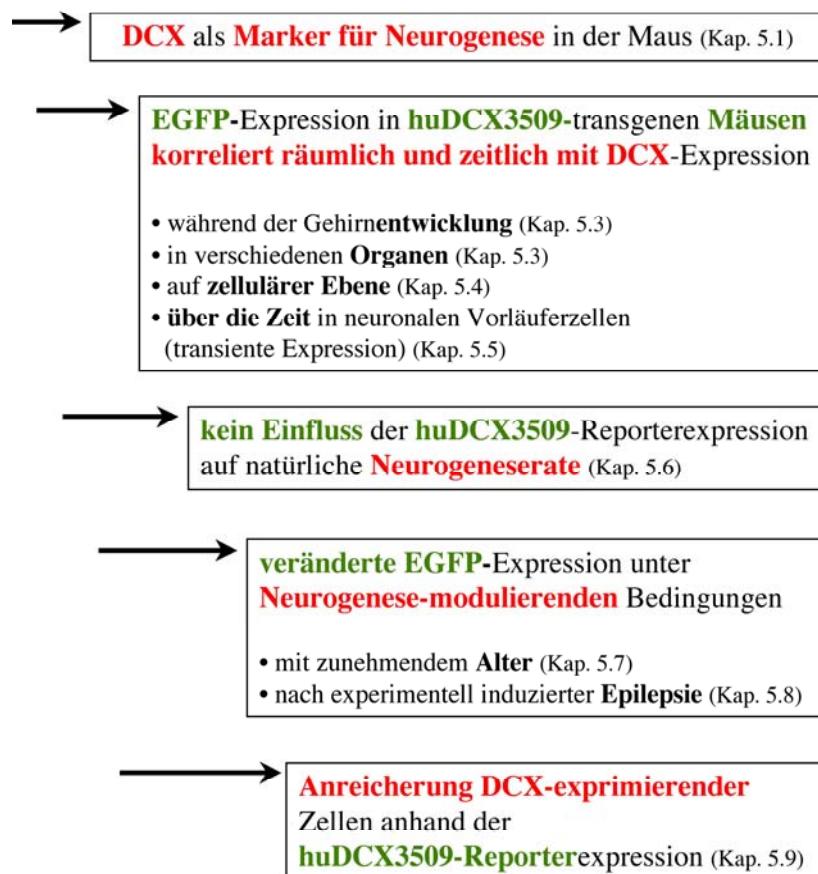
Kap. 5 umfasst eine erste Charakterisierung huDCX3509-EGFP-transgener Tiere (s. auch Schema 5.1): es beschreibt die Expression von Reporterprotein während der Entwicklung und in verschiedenen Organen. Untersucht wurde auch die Korrelation der Reporterexpression mit der Expression endogenen Doublecortins und anderer Marker in neurogenen Zonen des Gehirns. In Wildtyp- und huDCX3509-EGFP-transgenen Tieren wurde darüber hinaus überprüft, inwieweit DCX- bzw. EGFP-Expression mit der Neubildung von Nervenzellen korrelierten. Die transiente Expression von DCX während Neurogenese war an Ratten bereits zuvor beschrieben worden (Brown, 2003; Rao, 2004) und musste für die Maus noch bestätigt werden.

Die Expression von Reporterprotein unter Kontrolle der *DCX*-regulatorischen Region wurde für die vorliegende Arbeit unter physiologischen Bedingungen, aber auch unter bekannten, Neurogenese-modulierenden Bedingungen untersucht. Eine solche Validierung des Tiermodells ist Voraussetzung, um später Substanzen, deren Einfluss auf Neurogenese noch unbekannt ist, in diesem Tiermodell testen zu können. Neurogenese in adulten Tieren lässt sich gezielt steigern, z.B. durch physische

Aktivität (van Praag, 1999a); aber auch nach Verletzungen werden mehr Nervenzellen gebildet; Epilepsie führt ähnlich einer Verletzung zum Untergang von Neuronen im Gehirn mit anschließender Zunahme der Neurogeneserate und lässt sich in Versuchstieren experimentell induzieren (Parent, 1997); dagegen werden mit zunehmendem Alter weniger neue Nervenzellen gebildet (Kuhn, 1996).

Schließlich wurde versucht, Doublecortin-exprimierende Zellen aus huDCX3509-DsRed2 transgenen Mäusen anzureichern. Mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) wurden Zellen aus postnatalen transgenen Mäusen anhand der Expression des Reporters DsRed2 selektiert und in Kultur genommen, um nach Differenzierung der Zellen zu überprüfen, ob sie auch *in vitro* Eigenschaften neuronaler Vorläuferzellen besitzen. (Überblick zu Kap. 5: siehe Schema 5.1).

DCX-Expression und Aktivität der DCX-regulatorischen Region *in vivo*:



Schema 5.1. Schema zur *in vivo* Charakterisierung der huDCX3509-regulatorischen Region in huDCX3509-Reporterprotein-exprimierenden Mäusen

5.1. Expression von Doublecortin und neuronale Differenzierung in Zonen adulter Neurogenese in der Maus

Im huDCX3509-Reportermodell sollte Reporterexpression unter Kontrolle *DCX*-regulatorischer Sequenzen als Indikatorsystem für Neurogenese etabliert werden. Dabei lag die Annahme zu Grunde, dass die Expression von endogenem DCX im gewählten Tiermodell mit Neurogenese korrelierte. Als Modellsystem diente die Maus. Das Wissen zur Expression von endogenem DCX in Mäusen war zu Beginn der Untersuchungen allerdings noch lückenhaft: Nach welchem zeitlichen Muster DCX in neu gebildeten Zellen exprimiert ist, war nur für die neurogenen Zonen der Ratte untersucht worden (Brown, 2003). Ohne ausreichendes Wissen zur Expression des endogenen Proteins schien es jedoch schwierig, die Expression des Reportergens unter Kontrolle der *DCX*-regulatorischen Region zu bewerten und mit den Vorgängen während der Neurogenese in Zusammenhang zu bringen. Die folgende Untersuchung sollte überprüfen, ob Doublecortin auch bei der Maus transient in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert ist.

Um Daten zur Expression von DCX in neu gebildeten Zellen der Maus über die Zeit zu erheben, wurde adulten Mäusen intraperitoneal ein- oder mehrfach das Basenanalagon BrdU injiziert; die Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der BrdU-Gabe getötet; anschließend wurden mittels Immunhistochemie die neurogenen Zonen des Gehirns analysiert. Dabei wurde zum einen die Anzahl Zellen pro Struktur ermittelt, welche BrdU in genomische DNA eingebaut hatten, bzw. wurden die BrdU-markierten Zellen auf Expression endogener Marker untersucht, darunter DCX als früh- und NeuN als spät-neuronaler Marker. BrdU-Einbau wurde in diesem Zusammenhang als Indiz dafür gewertet, dass die genomische DNA der Zelle zu einem Zeitpunkt nach einer vorausgegangenen BrdU-Injektion gebildet worden war, es sich bei der Zelle also um eine seit dem Zeitpunkt der Injektion neu gebildete Zelle handelte. Mit mehreren aufeinanderfolgenden BrdU-Injektionen wurde der natürlichen Abnahme BrdU-markierter Zellen über die Zeit entgegengewirkt; mehrere BrdU-Injektionen waren bei Intervallen von mehr als einer Woche zwischen Injektion und Analyse erforderlich (Winner, 2002).

Zunächst wurde der Anteil aller **BrdU-positiven Zellen**, die **gleichzeitig DCX exprimierten**, im **Gyrus dentatus** des Hippocampus bestimmt (Abb. 5.1 A). Zwei Stunden nach BrdU-Gabe, also zum ersten untersuchten Zeitpunkt, waren BrdU und DCX in 22% der neu gebildeten Zellen gleichzeitig anwesend. BrdU/DCX-Ko-Markierung zu diesem frühen Zeitpunkt wurde als ein Indiz für DCX-Expression in proliferierenden Zellen gewertet. Zwischen dem zweiten und siebten Tag nach BrdU-Markierung war das Maximum BrdU-positiver und gleichzeitig DCX-exprimierender Zellen (>80%) erreicht. Danach wurde die Expression von DCX in den zuvor gebildeten Zellen offenbar rasch herunterreguliert: 30 Tage nach BrdU-Injektion waren nur noch 12% der BrdU-positiven Zellen auch positiv für DCX (Abb. 5.1 A).

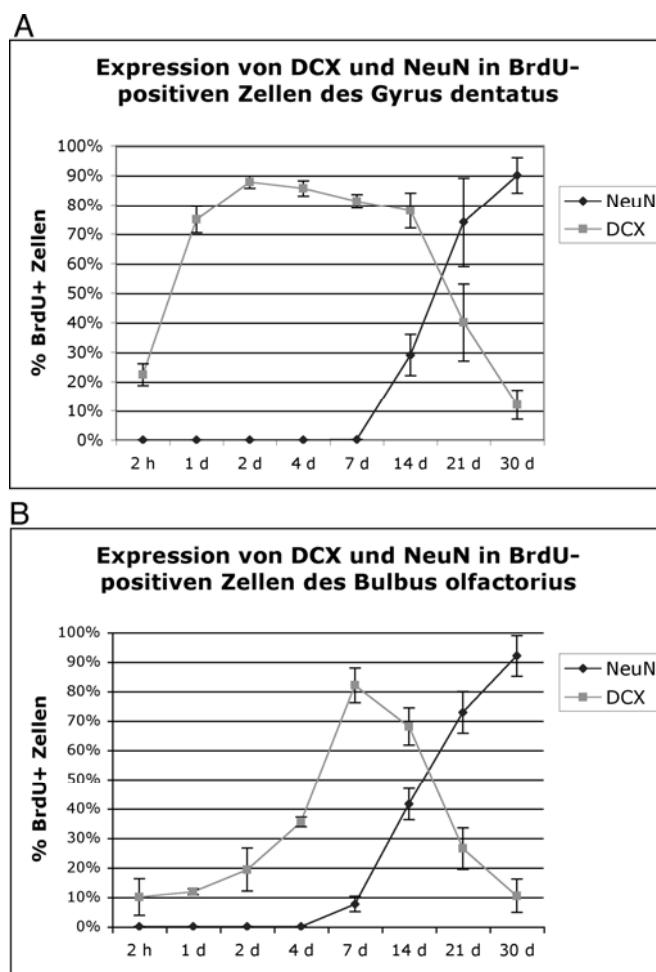


Abb. 5.1. Expression von DCX und NeuN in neu gebildeten Zellen in neurogenen Zonen adulter Mäuse. Nach Injektion von BrdU in C57Bl6/NcrI-Wildtyp-Mäuse wurde die Expression von DCX und NeuN in neugebildeten Zellen (identifiziert über die Anwesenheit des Basenanalogs BrdU in genomischer DNA) zu verschiedenen Zeitpunkten nach BrdU-Markierung analysiert. Untersucht wurden neurogene Zonen wie der Gyrus dentatus des Hippocampus (A) bzw. der Bulbus olfactorius (B). DCX war beginnend nach 2 h in neugebildeten Zellen und in bis zu 90% dieser Zellen exprimiert, wurde jedoch zu späteren Zeitpunkten (um 30 d nach BrdU-Injektion) deutlich herunterreguliert und von der Expression des adulten neuronalen Markers NeuN in den zuvor neu gebildeten Zellen abgelöst. *h = Stunde, d = Tag*

Um das weitere Schicksal neu gebildeter Zellen zu beurteilen, wurden BrdU-markierte Zellen auch auf die Expression von NeuN, einem adult-neuronalen Marker, untersucht. Im Hippocampus fanden sich NeuN/BrdU-doppelmarkierte Zellen erstmals 14 Tage nach BrdU-Injektion (Abb. 5.1 A). Ausschließlich zwischen Tag 14 und Tag 21 gab es darüber hinaus BrdU-positive Zellen, die sowohl DCX als auch NeuN exprimierten (in Abb. 5.1 A nicht dargestellt). Einen Monat nach den Injektionen nahm der Anteil BrdU-positiver, NeuN-exprimierender Zellen auf mehr als 90% zu. Die im Hippocampus neu gebildeten Zellen waren demnach zu einem Großteil zu neuen Nervenzellen geworden.

In der SVZ der lateralen Ventrikel des Gehirns werden die Vorläufer jener Zellen gebildet, die später zu Neuroblasten der Granulärzellschicht des BO ausdifferenzieren. Die Vorläufer der Granulärzellschicht wandern von ihrem Geburtsort in der SVZ eng aneinandergelagert über den RMS zum BO, wo sie sich in die Granulärzell- und die Periglomerulär-Zellschicht integrieren und mit der Expression reifer neuronaler Marker beginnen. Auf der gesamten Länge der SVZ-RMS-BO-Achse exprimieren Zellen Doublecortin. Zwischen dieser bekannten DCX-Expression und der von der SVZ-ausgehenden Neubildung von Nervenzellen sollte nun in Mäusen ein Zusammenhang hergestellt werden.

Hierzu wurde der **BO** zu verschiedenen Zeitpunkten nach BrdU-Injektion auf **BrdU/DCX-doppelpositive Zellen** untersucht. Zum frühen Zeitpunkt 2 h nach BrdU-Injektion exprimierten nur 9% der BrdU-markierten Zellen im BO Doublecortin (Abb. 5.1 B). Diese Zellen fanden sich vor allem an der Grenze des BO hin zum RMS und in der Granulärzellschicht des BO. BrdU-Einbau im BO so kurz nach der Injektion war wegen der geringen Ko-Lokalisation mit dem früh neuronalen Marker DCX vermutlich überwiegend auf die vor Ort stattfindende Mitose nicht neuronaler Zellen zurückzuführen; 2 h reichten nicht aus, um die Wanderung von der SVZ, dem Entstehungsort neuronaler Vorläufer, bis zum BO abzuschließen. Im Verlauf der nächsten Tage, sobald der Strom neu gebildeter Zellen aus der SVZ den BO erreicht hatte, nahm der Anteil DCX-exprimierender und BrdU-markierter Neuroblasten rasch zu: 7 Tage nach BrdU-Markierung waren 82% der BrdU-positiven Zellen im BO auch positiv für DCX (Abb. 5.1 B). NeuN war in neu gebildeten Zellen erstmals 7 Tage nach Injektion mit BrdU ko-lokaliert; nach 14 Tagen exprimierten 41% der BrdU-

markierten Zellen NeuN. Dreifach-Markierung von BrdU, DCX und NeuN zeigte sich in etwa 25% der BrdU-positiven Zellen am Tag 14 (in Abb. 5.1 B nicht gezeigt). Ähnlich wie im Hippocampus sank einen Monat nach Markierung die Zahl der BrdU/DCX-ko-exprimierenden Zellen innerhalb des BO auf niedrige Werte ab. Mit dem Rückgang von DCX in neu gebildeten Zellen nach 1 Monat nahm gleichzeitig der Anteil BrdU/NeuN-markierter Zellen auf etwa 90% zu. Die Mehrzahl neu gebildeter Zellen war demnach zu adulten Nervenzellen ausdifferenziert (Abb. 5.1 B).

In Mäusen konnte somit das bereits in Ratten beschriebene Expressionsmuster Doublecortins bestätigt werden: das Protein wurde transient und beginnend mit oder kurz nach der Zellteilung in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert, die später zu Nervenzellen ausreiften. Mit der Reifung der Zellen wurde gleichzeitig die Expression Doublecortins herunterreguliert. In einer kurzen Phase des Übergangs waren die Zellen positiv sowohl für Doublecortin, als auch für den adulten Marker NeuN.

5.2. Expression von verschiedenen Reporterproteinen unter Kontrolle der DCX-regulatorischen Region im transgenen Tiermodell

Doublecortin wird transient in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert; während der Embryonalentwicklung der Säuger ist es – bedingt durch die hohe Neurogeneserate in dieser Phase – weit verbreitet und stark exprimiert, im adulten ZNS persistiert Doublecortin in neurogenen Zonen. Auf das gesamte Gehirn bezogen, geht die DCX-Expression im adulten Organismus im Vergleich zur Zeit vor der Geburt stark zurück (Francis, 1999; Mizuguchi, 1999; Qin, 2000).

Es wurden 3 verschiedene Reporterproteine in transgenen Tieren unter Kontrolle der DCX-regulatorischen Region exprimiert: EGFP, DsRed2 und Glühwürmchen-Luziferase. Das Verfahren produzierte zwischen 50 und 100 Tieren in der ersten Generation, die in einem PCR-gestützten Screening aus Schwanzspitzen-DNA auf die Anwesenheit des Transgens untersucht wurden. Positive Tiere, die sogenannten Founder, begründeten verschiedene transgene Mauslinien. Je nach Reporterprotein wurden entweder mit 8 (EGFP), 7 (DsRed2) oder 7 Foundern (Luziferase) Zuchtlinien begonnen, wobei die transgenen Tiere mit C57Bl6/Ncrl Wildtyp-Mäusen gekreuzt wurden. Das Verpaaren mit Wildtyp-Tieren (C57Bl6/Ncrl) war für die ersten 8 bis 10 Generationen (F1 bis F10) nötig, um den genetischen Hintergrund aus B6C3F1-

Mäusen, die sich zum Erstellen der transgenen Linien besser eigneten, herauszukreuzen, anschließend sollte mit homozygoten Zuchten begonnen werden.

Die Nachkommen aus der Kreuzung transgener Founder mit Wildtyp-Mäusen waren entweder heterozygot oder negativ für das Transgen und mussten mittels PCR auf das Vorhandensein der Reporter-DNA in genomischer DNA untersucht werden. Nachdem an Tieren der verschiedenen Linien die Expression des Transgens in immunhistochemischen Schnitten untersucht und bewertet worden war, wurden nur wenige Zuchlinien für weiterführende Versuche ausgewählt.

Transgene Linien unterschieden sich anhand der Stärke der Expression. So exprimierten einzelne (zwischen 2 und 4 Linien je Reporterprotein) keinerlei Transgen in Gehirnschnitten. Das eingeschleuste Fragment war hier zwar auf der genomischen DNA vorhanden, da die Tiere im PCR-Screening positive Ergebnisse zeigten, die Expression des Reporterproteins war jedoch vermutlich bedingt durch den genomischen Kontext, in den sich das Transgen zufällig per nicht homologer Rekombination integriert hatte, stillgelegt. Transgene Linien, welche das Reporterprotein exprimierten, zeigten vergleichbare Muster der Expression, unterschieden sich jedoch – wahrscheinlich ebenfalls in Abhängigkeit vom genomischen Kontext des Transgens – in der Expressions-Intensität. Anzunehmen ist auch, dass je nach Linie eine unterschiedliche Anzahl der linearen, transgenen Fragmente in die genomische DNA rekombiniert waren, was Einfluss auf die Intensität der Reporterexpression haben sollte

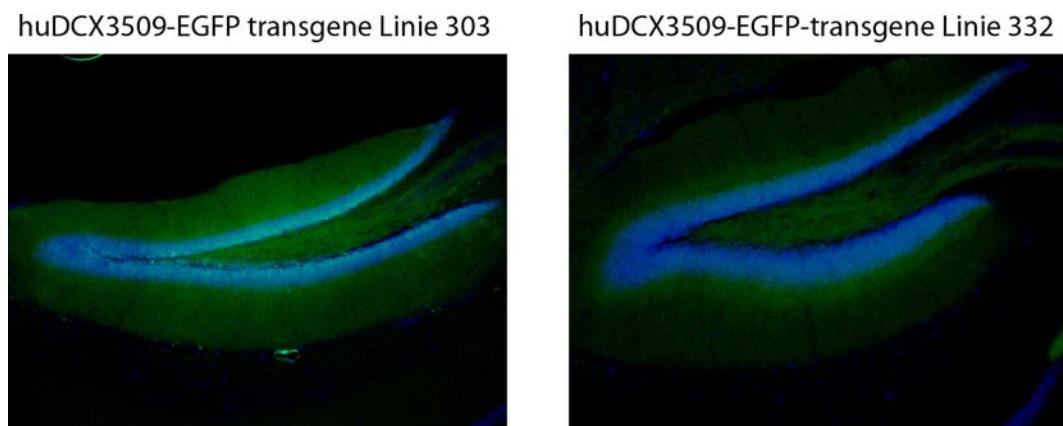


Abb. 5.2. Beispiel für die unterschiedlich starke Expression von Reporterprotein unter Kontrolle der DCX-regulatorischen Region in transgenen Mauslinien, dargestellt am Beispiel sagittaler Schnitte von Hippocampi aus den EGFP-transgenen Linien 303 und 332.

Abb. 5.2 zeigt im sagittalen Schnitt Hippocampi aus zwei verschiedenen EGFP-transgenen Linien: in beiden Linien ist das Reporterprotein spezifisch im Hippocampus exprimiert, Linie 303 zeigt jedoch deutlich stärkere Expression als Linie 332. Die Abb. 5.2 dient hier als Beispiel dafür, dass sich die erstellten transgenen Linien bezüglich der Reporter-Expressionsintensität unterscheiden. Einzelheiten zum Verteilungsmuster der Reporterproteine unter Kontrolle der *DCX*-regulatorischen Region sind ausführlicher in den nächsten Kapiteln (5.3 und 5.4) dargestellt.

Die im Folgenden geschilderten Versuche zur Validierung des transgenen Tiermodells beschränkten sich auf die Linie 303, in der das Reporterprotein EGFP unter Kontrolle der *DCX*-regulatorischen Region stand. Mäuse dieser Linie exprimierten im Vergleich zu anderen Linien das Transgen eher stark. Das Muster der Expression auch der anderen Reporterproteine (DsRed2 und Luziferase) war in allen transgenen Linien – sofern vorhanden – im Prinzip gleich, diese waren jedoch im Rahmen der vorliegenden Promotion nicht Gegenstand einer eingehenden Untersuchung.

5.3. Expression von Reporterprotein und endogenem DCX im Verlauf der Entwicklung und in verschiedenen Organen huDCX3509-EGFP-transgener Mäuse

In huDCX3509-EGFP-Reportermäusen steuert die humane *DCX*-regulatorische Region die Expression des fluoreszenten Reporterproteins EGFP. Um die Expression endogenen Doublecortins und EGFP-Reporterproteins über die Zeit in transgenen Tieren (Linie 303) zu vergleichen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung und postnatal Gehirne entnommen. Die Anwesenheit Doublecortins und EGFPs in den Gehirn-Homogenaten wurde im Westernblot überprüft (Abb. 5.3 A).

Doublecortin-Expression fand sich beginnend mit Embryonaltag (E) 12 und bis nach der Geburt, einen sehr ähnlichen Verlauf nahm die Expression des EGFP-Reporterproteins. Das Maximum der Expression lag für beide Proteine um den Zeitpunkt der Geburt (Postnataltag (P) 0). Mit Hilfe von Densitometrie wurde die Stärke der Expression zu verschiedenen Zeitpunkten und aus mehreren unabhängig erstellten Westernblots gemessen, wobei der jeweilige Maximalwert mit 100%

gleichgesetzt wurde. Wurden diese Expressionskurven für EGFP und DCX überlagert, so waren sie nahezu deckungsgleich, allerdings schien die EGFP-Expression etwas länger anzuhalten als die Expression endogenen Doublecortins, vermutlich verursacht durch die längere Halbwertszeit des Reporterproteins im Vergleich zum DCX-Protein (Abb. 5.3. B). Über die Zeit betrachtet war die postulierte 3509-bp-DCX-regulatorische Region in transgenen Tieren in gleicher Weise aktiv wie der endogene DCX-Promotor.

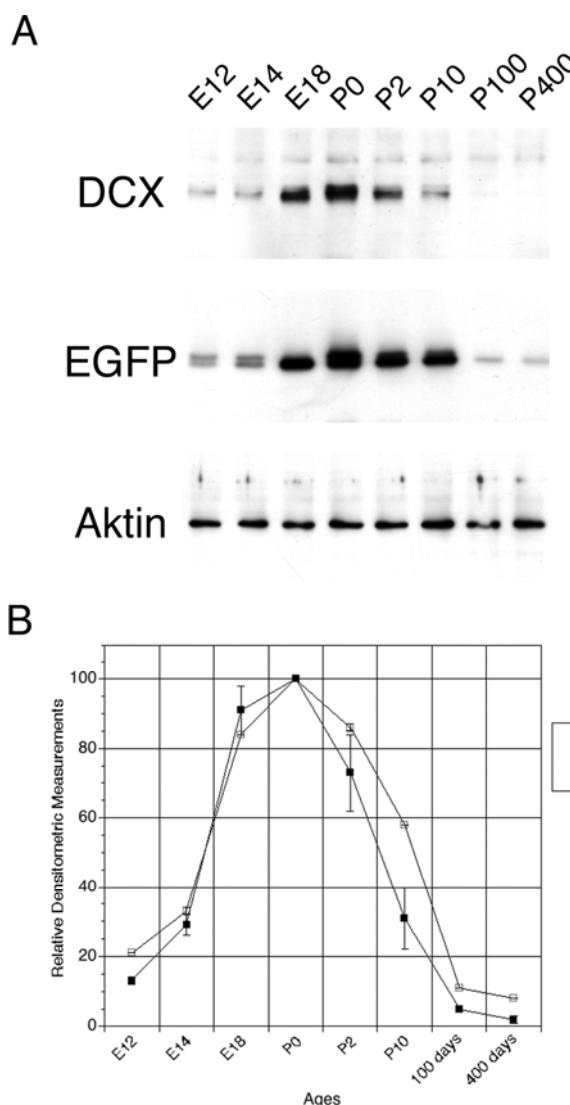


Abb. 5.3. Vergleich der Expression von endogenem DCX und EGFP-Reporter (unter Kontrolle der DCX-regulatorischen Region) aus Gehirn-Homogenaten transgener Tiere. A) Protein-biochemische Analyse von Homogenaten der Gehirne huDCX3509-EGFP-transgener Tiere, entnommen zu verschiedenen Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung und postnatal, mit immunologischer Detektion von endogenem DCX und EGFP-Reporter. Aktin diente als Kontrolle für gleichmäßige Beladung. B) Densitometrische Auswertung unabhängig erstellter Westernblots zur Bestimmung des relativen Expressionslevels des EGFP-Reporters im Vergleich zu endogenem DCX. Die Überlagerung der Expressionskurven zeigt, dass endogener und transgener Promotor im Verlauf der Entwicklung transgener Tiere vergleichbar aktiv und zeitlich reguliert waren. E, Embryontag; P, Postnatantag.

Doublecortin wird im adulten ZNS in Regionen aktiver Neurogenese exprimiert; hierzu zählt die SVZ mit dem angeschlossenen RMS und dem BO sowie der Gyrus dentatus des Hippocampus. Im Hippocampus findet sich DCX in jungen Neuronen an der Grenze zur Subgranulärzellschicht (Brown, 2003; Rao, 2004). Im Kortex ist

Doublecortin nur in wenigen Zellen anzutreffen, es gibt jedoch Doublecortin-mRNA in dieser Struktur (eigene Ergebnisse).

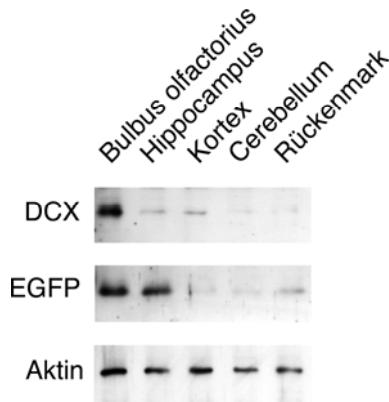


Abb. 5.4. Proteinbiochemische Analyse der Expression von endogenem DCX und EGFP-Reporter (unter Kontrolle der DCX-regulatorischen Region) in verschiedenen Regionen des adulten ZNS transgener Tiere. Homogenate von Bulbus olfactorius, Hippocampus, Kortex, Cerebellum und Rückenmark wurden in Westernblots auf die Expression von DCX und EGFP untersucht, Aktin-Immunoreaktivität diente als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung. Erläuterungen siehe Text.

Mittels proteinbiochemischer Methoden (Westernblot) wurde das Ausmaß der EGFP-Expression in verschiedenen ZNS-Regionen adulter, transgener Mäuse bestimmt und mit der Expression endogenen Doublecortins verglichen (Abb. 5.4). Starke Immunoreaktivität für beide Proteine fand sich in Homogenaten des BO, der Hippocampus exprimierte offenbar ebenfalls große Mengen Reporterprotein, jedoch weniger Doublecortin als der BO. Nahezu nicht nachweisbar waren DCX und EGFP in den Homogenaten von Kortex, Cerebellum und Rückenmark (Abb. 5.4).

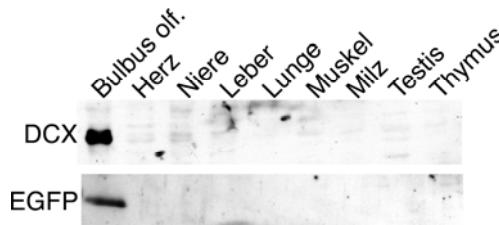


Abb. 5.5. Proteinbiochemische Analyse der Expression von endogenem DCX und EGFP-Reporter (unter Kontrolle der DCX-regulatorischen Region) in verschiedenen Organen adulter transgener Tiere. Homogenate wurden im Westernblot auf die Expression von DCX und EGFP untersucht. Erläuterungen siehe Text

Betrachtet man den gesamten Organismus, so ist Doublecortin spezifisch im Nervensystem exprimiert (Francis, 1999; Mizuguchi, 1999); mittels Westernblot sollte herausgefunden werden, ob dies in transgenen Tieren auch für das Reporterprotein EGFP unter Kontrolle der DCX-regulatorischen Region galt, oder ob die Reporterexpression auch in andere Organe streute. Aus adulten transgenen Tieren wurden verschiedene Organe entnommen und homogenisiert (Herz, Niere, Leber, Lunge, Muskel, Milz, Testis und Thymus). In den Westernblots aus den Organ-Homogenaten war sowohl die Expression von DCX als auch die von EGFP ausschließlich auf das Nervensystem bzw. auf dessen neurogene Regionen – beispielhaft gezeigt für den BO – beschränkt (Abb. 5.5).

Zusammengefasst erbrachten die Proteinanalyse eine große Übereinstimmung der Expression endogenen Doublecortins und EGFP-Reporterproteins, und zwar sowohl während der Entwicklung, als auch im Bezug auf die Verteilung in den Gehirnregionen und Organen adulter transgener Tiere. Die eingefügte *DCX*-regulatorische Region war demnach einerseits über die Zeit, aber auch im Bezug auf den Expressionsort betrachtet in nahezu gleicher Weise aktiv wie der endogene *DCX*-Promotor.

5.4. Ko-Expression spezifischer Marker in Zellen mit aktiver *DCX*-regulatorischer Region in huDCX3509-EGFP-transgenen Tieren

Die proteinbiochemischen Untersuchungen aus dem vorherigen Kapitel zeigten eine weitgehend übereinstimmende Expression endogenen Doublecortins und EGFP-Reporterproteins in Extrakten des gesamten Gehirns, in dessen Unterstrukturen sowie in den verschiedenen Organen. Im nächsten Schritt sollte nun mittels Immunhistochemie auf der Ebene einzelner Zellen nach Ko-Expression des Reporterproteins mit DCX sowie anderen endogenen Markern geforscht werden. Zunächst wurde die anatomische Verteilung des Reporterproteins in der EGFP-transgenen Linie 303 analysiert, basierend auf Fluoreszenzmikroskopie an fixierten Gewebeschnitten.

Abb. 5.6 zeigt die starke Expression des EGFP-Reporterproteins unter Kontrolle der *DCX*-regulatorischen Sequenz in neurogenen Regionen des adulten Gehirns. Dargestellt ist die Expression des Reporterproteins EGFP ohne zusätzliche Verstärkung durch einen Antikörper. Wie in der Übersichtsaufnahme des Gesamtgehirns und vergrößert in den Ausschnitten zu sehen, war grüne Fluoreszenz detektierbar im Gyrus dentatus des Hippocampus und in der SVZ der lateralen Ventrikel, ausgehend hiervon auch in den über den RMS zum BO wandernden Zellen und schließlich im BO selbst. Ähnlich wie schon im Westernblot (Abb. 5.4) gezeigt, war das Reporterprotein vor allem im Gyrus dentatus und im BO intensiv exprimiert. Einzelne Zellen außerhalb der neurogenen Zonen des Gehirns waren – in deutlich schwächerem Ausmaß – positiv für das Reporterprotein, so z.B. einige Zellen im Kortex. Negativ für EGFP-Reporterexpression war unter anderem das Cerebellum (Abb. 5.6).

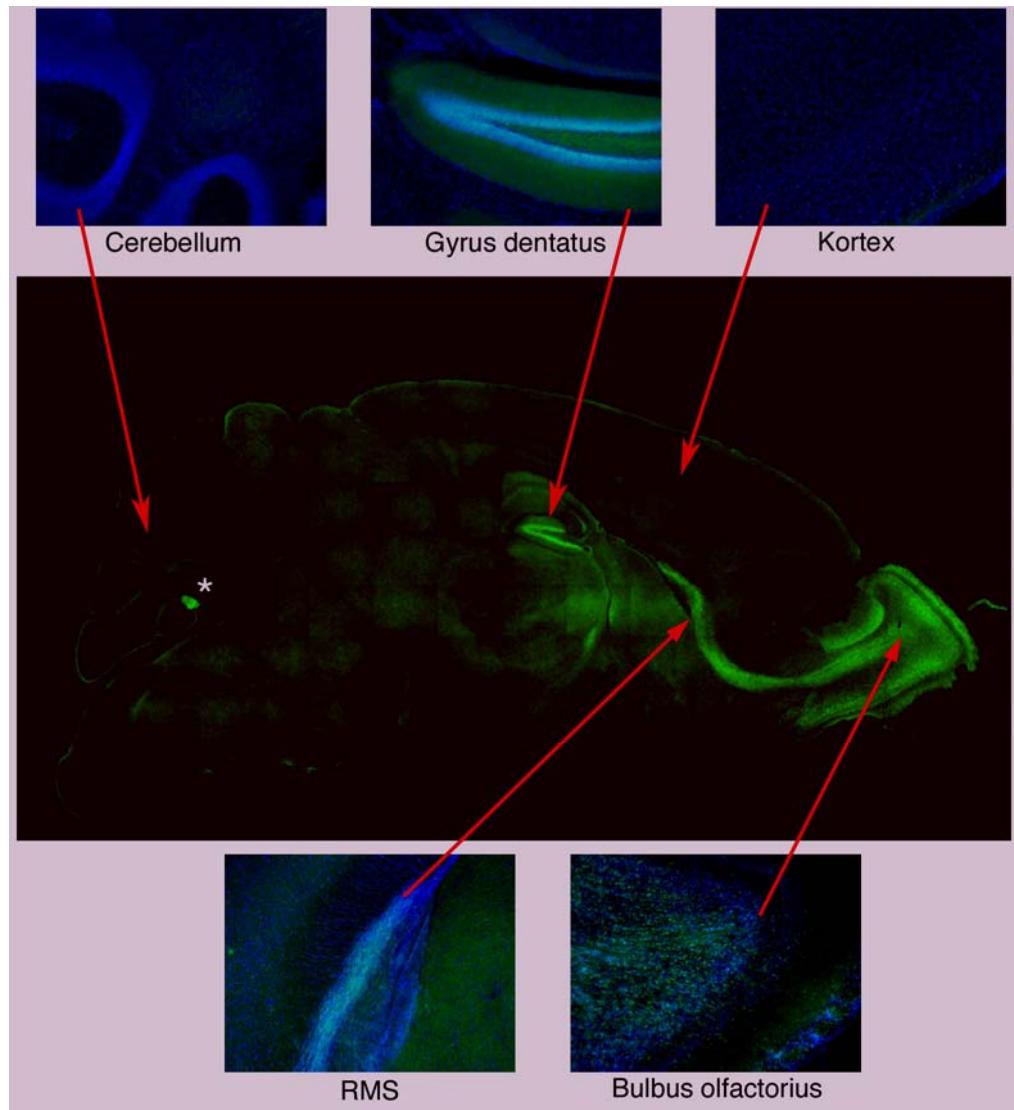


Abb. 5.6. Expression von EGFP-Reporterprotein im Gehirn einer huDCX3509-EGFP-transgenen Maus. Die Fluoreszenzaufnahme zeigt die Expression des EGFP-Reporters im adulten Gehirn anhand eines sagittalen Schnitts im Überblick (großes Bild) und in höherer Auflösung in ausgewählten Strukturen (kleine Bilder). * = Artefakt-Fluoreszenz im Cerebellum, entstanden aus einer Gewebsfalte. Erläuterungen siehe Text. grün: EGFP; blau: Kernfärbung (DAPI).

Das Transgen war demnach in anatomischen Strukturen des adulten Gehirns exprimiert, in denen zuvor auch endogenes Doublecortin nachgewiesen wurde (s. Einleitung Kap. 1.9, Abb. 1.10). Abb. 5.7 zeigt die Spezifität der EGFP-Expression für die neurogenen Regionen des adulten Gehirns, und zwar exemplarisch an den von der SVZ über den RMS zum BO wandernden Zellen.

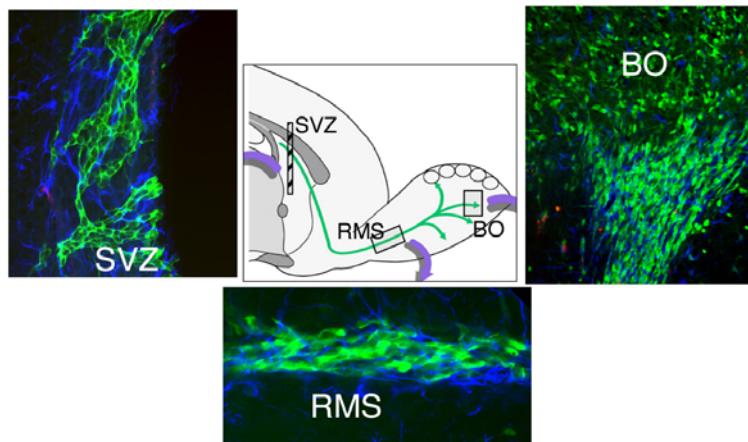


Abb. 5.7. Expression von EGFP-Reporterprotein unter Kontrolle der DCX-regulatorischen Region in transgenen Mäusen in SVZ, RMS und BO mit Übersichtsschema zur Lage der gezeigten Ausschnitte im Gehirn. SVZ, Subventrikulärzone; RMS, rostral-migratorischer Strom; BO, Bulbus olfactorius

Unter Verwendung Zelltyp-spezifischer Marker wurden im nächsten Schritt Zellen näher charakterisiert, welche das Transgen in den neurogenen Regionen exprimierten (Abb. 5.8). Die Expression des EGFP-Reporters wurde verglichen mit der Expression endogenen Doublecortins, GFAPs, Nestins und NeuNs. GFAP diente dabei als astroglialer Marker, Immunoreaktivität für GFAP kann jedoch auch auf eine Subpopulation neuraler Stammzellen hinweisen (Gotz, 2002). Nestin ist ein gängiger Marker für neurale Stammzellen (Lendahl, 1990). NeuN findet sich in den meisten, wenn auch nicht in allen adulten Neuronen.

Die Expression von endogenem DCX und EGFP zeigte in den untersuchten Regionen des adulten Gehirns transgener Mäuse gute Übereinstimmung (Abb. 5.8): sowohl im Gyrus dentatus, als auch in der SVZ sowie im BO korrelierten die beiden Proteine in der Mehrzahl der Zellen. EGFP-Reporter war im Gyrus dentatus des Hippocampus nicht mit dem Stammzellmarker Nestin und auch nicht mit GFAP kovalent. Endogen NeuN-exprimierende Zellen des Gyrus dentatus waren teilweise positiv für Reporterexpression.

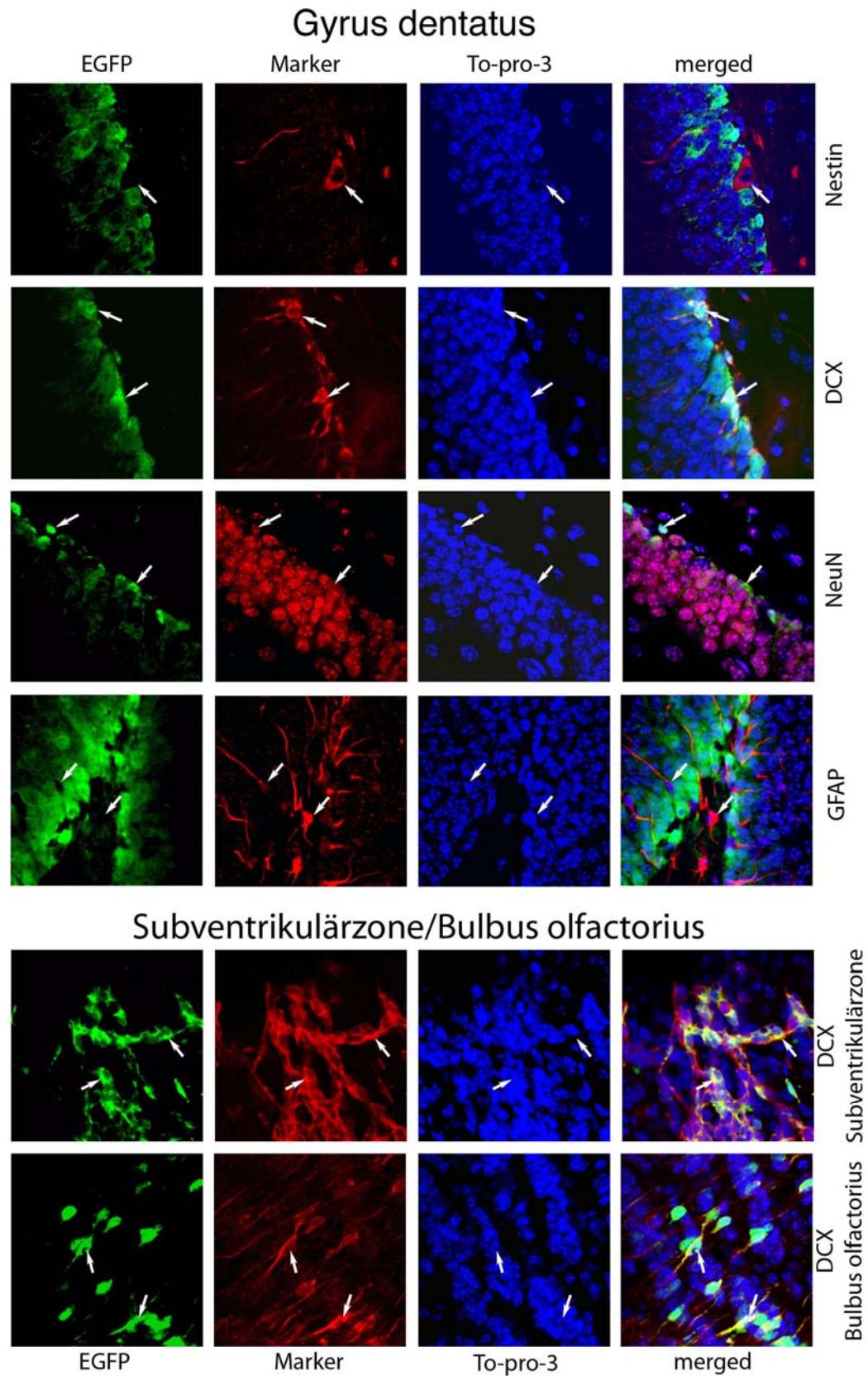


Abb. 5.8. Immunzytochemische Analyse zur Ko-Expression endogener Marker in EGFP-exprimierenden Zellen huDCX3509-EGFP-transgener Mäuse. Neurogene Regionen des adulten Gehirns transgener Tiere (Gyrus dentatus des Hippocampus, Subventrikulärzone, Bulbus olfactorius) wurden auf die Expression endogener Marker immunzytochemisch untersucht. Erläuterungen s. Text

Auffällig war, dass DCX-Expression sich in Reporter-ko-exprimierenden Zellen bis in die Ausläufer der Zellen hinein erstreckte, während EGFP-Reporter eher im Bereich des Zellsomas lokalisiert war. Die immunzytochemischen Daten aus den adulten Geweben der transgenen Tiere spiegelten demnach die bereits an fötalen Vorläuferzellkulturen gemachten Beobachtungen zur Ko-Expression endogener Marker in Zellen mit aktiver *DCX*-regulatorischer Region wider. EGFP-Expression war auch in transgenen Tieren auf neuronale Vorläuferzellen – hier identifiziert über die gleichzeitige Expression endogenen Doublecortins – beschränkt und nicht in Stammzellen oder glialen Zellen anzutreffen. Partielle Korrelation zwischen EGFP und NeuN entsprach den Daten zur Expression endogenen Doublecortins, das ebenfalls teilweise gleichzeitig mit NeuN in jungen Neuronen exprimiert ist.

5.5. Expressionsvergleich von endogenem DCX und EGFP unter Kontrolle *DCX*-regulatorischer Sequenzen in transgenen Tieren

Um in transgenen Tieren später allein anhand der Reporterexpression auf das Ausmaß der Neurogenese schließen zu können, musste nachgewiesen werden, dass der endogene *Doublecortin*-Promotor und die eingefügte 3509-bp-Region identisch reguliert waren. Zum Beobachten der Expression von Reporter-EGFP und endogenem Doublecortin zu verschiedenen Zeitpunkten in neu gebildeten Zellen wurden an den transgenen Tieren die Zahlen der im BO BrdU-markierten Zellen, die entweder DCX oder EGFP ko-exprimierten, ermittelt und diese beiden Werte verglichen.

2 h nach BrdU-Injektion fanden sich sowohl BrdU/DCX- als auch BrdU/EGFP-positive Zellen in geringer Menge (weniger als 10% bezogen auf alle BrdU-markierten Zellen) in der Granulärzellschicht des BO (Abb. 5.9). Zwischen 2 Stunden und 4 Tagen stieg die Zahl auf 23% in der DCX-Gruppe und auf 16% in der EGFP-Gruppe. Das Maximum von 77% BrdU/DCX-doppelpositiven Zellen war nach 7 Tagen erreicht, in der EGFP-Gruppe lag das Maximum nach 10 Tagen und bei 68%. Ab hier wurde in beiden Gruppen eine Abnahme BrdU-positiver Zellen festgestellt, bis nach 60 Tagen keine DCX/BrdU- oder EGFP/BrdU-markierten Zellen mehr anzutreffen waren. Beginnend 30 Tage nach BrdU-Injektion waren die meisten BrdU-positiven Zellen in der Granulärzellschicht NeuN-positiv, was darauf schließen ließ, dass sie zu adulten Neuronen herangereift waren (Abb. 5.9).

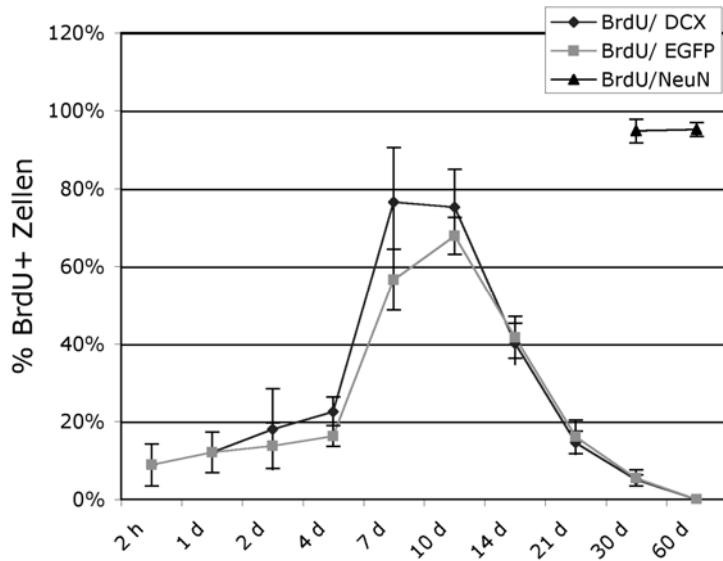


Abb. 5.9. Expression von endogenem DCX und EGFP bzw. NeuN in neu gebildeten Zellen des Bulbus olfactorius huDCX3509-transgener Tiere über die Zeit. Erläuterungen siehe Text. h = Stunde, d = Tag

Die Differenzierung eines Großteils neu gebildeter Zellen in adulte Neuronen spiegelte ein bereits in Wildtyp-Tieren beobachtetes Phänomen und machte deutlich, dass neuronale Differenzierung in huDCX3509-EGFP-Mäusen nicht signifikant beeinträchtigt war. Sowohl das Reporterprotein als auch endogenes Doublecortin wurden in den Tieren in neu gebildeten Zellen nur vorübergehend ausgeprägt, und die Expression mit der Reifung zu adulten Neuronen wieder abgeschaltet. Die Expression von Reporterprotein war dabei gegenüber der endogenen Doublecortins leicht verzögert.

5.6. Neubildung von Nervenzellen in huDCX3509-EGFP-transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen

Die regulatorische Region des *DCX*-Gens (huDCX3509) steuert in den transgenen Tieren die Expression von Reporterprotein. Expression endogenen Doublecortins charakterisiert neu gebildete, neuronale Vorläuferzellen ((Brown, 2003), s. Kap. 5.1). Über die einfach zu detektierende Expression des Reporters sollten huDCX3509-transgene Tiere später als Indikatorsysteme für Neurogenese dienen. Zunächst musste jedoch ausgeschlossen werden, dass die Reporterexpression allein schon Einfluss auf die Neurogeneserate in transgenen Tieren ausübte.

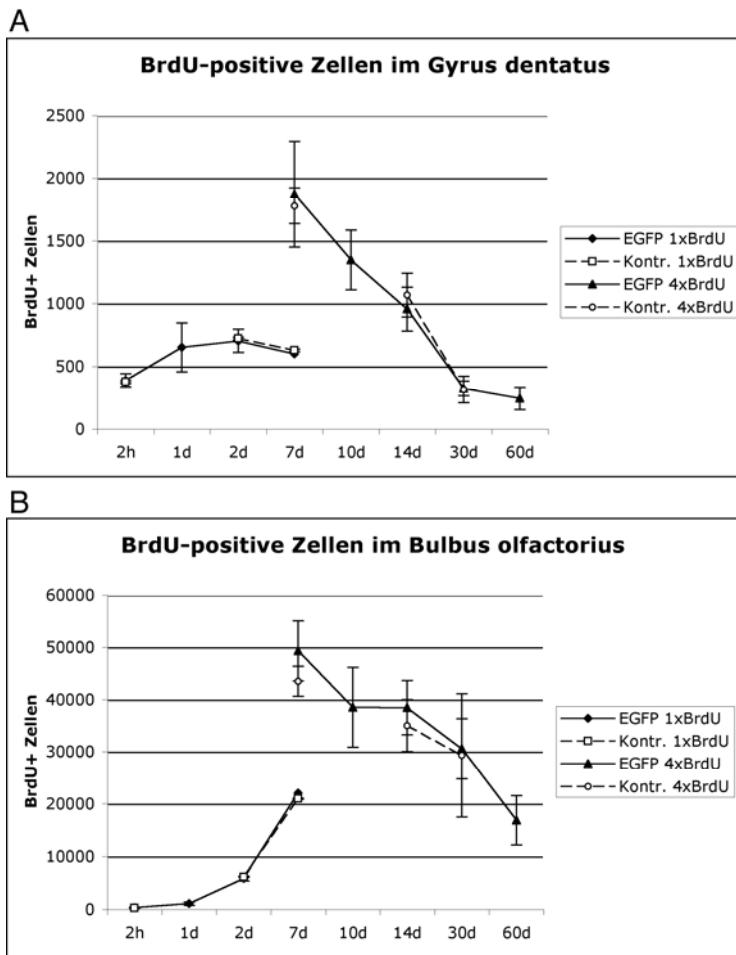


Abb. 5.10. Proliferation in neurogenen Zonen der adulten Maus: Vergleich von Wildtyp-Tieren mit huDCX3509-EGFP-transgenen Mäusen. Wildtyp-Tieren und huDCX3509-transgenen Mäusen wurde 1 x oder 4 x BrdU injiziert und nach einer bestimmten Zeit (2 h bis 60 d) die Anwesenheit des Basenanalogs BrdU in Zellen adulter neurogener Zonen (A: Gyrus dentatus des Hippocampus, B: Granulärzellschicht des Bulbus olfactorius) ausgezählt. Die Daten zur Proliferation in Wildtyp-Tieren unterschieden sich nicht von den in transgenen Mäusen gefundenen Ergebnissen. *h = Stunde, d = Tag*

Verfolgt wurden hierzu die dynamischen Veränderungen in den Populationen **neu gebildeter Zellen** des adulten Gyrus dentatus und des BO, und zwar sowohl in **Wildtyp-Kontrollen** wie auch in **huDCX3509-EGFP-Mäusen**. Dies geschah über das Auszählen BrdU-positiver Zellen in der Granulärzellschicht von Gyrus dentatus und BO zu verschiedenen Zeitpunkten nach BrdU-Gabe. Zum Auswerten des BrdU-Einbaus bis wenige Tage nach der Injektion wurde nur einmalig BrdU gegeben, ab einem Intervall von 7 Tagen zwischen Injektion und Analyse wurde BrdU an vier aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht. Verteilt über 60 Tage wurden insgesamt 8 verschiedene Zeitpunkte ausgewertet. Erfasst wurden **BrdU-markierte Zellen** im Gyrus dentatus des Hippocampus sowie in der Granulärzellschicht des BO; letztere beinhaltet die große Mehrheit der im BO BrdU-markierten Zellen.

In der **Granulärzellschicht des Gyrus dentatus** fanden sich bereits nach zwei Stunden und einer einzigen BrdU-Injektion 400 BrdU-markierte Zellen. Das Maximum von 2000 markierten Zellen war an Tag 7 erreicht; nach 30 Tagen war die Zahl BrdU-markierter Zellen auf 10% des Maximalwertes gesunken (Abb. 5.10 A).

In der **Granulärzellschicht des BO** überlebten dagegen deutlich mehr Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg. Zunächst hatten allerdings 2 Stunden nach BrdU-Injektion im BO nur sehr wenige, vor Ort noch teilungsfähige Zellen (ca. 300) das Basenanalogen integriert (Abb. 5.10 B). Ihre Zahl nahm innerhalb von 7 Tagen auf 20.000 neu gebildete Zellen in der einmalig injizierten Gruppe zu. Bei Tieren, die 4 mal BrdU erhalten hatten, wurde die Höchstmenge von 48.000 neuen Zellen pro BO ebenfalls 7 Tage nach BrdU-Injektion erzielt. Zwischen Tag 7 und Tag 60 sank die Zahl BrdU-markierter Zellen signifikant auf etwa 18.000 je BO. Der Vergleich dieses Schlusswertes mit dem nach 7 Tagen detektierten Maximum zeigte, dass rund 37% neu gebildeter Zellen nach 60 Tagen im BO auch überlebt hatten (Abb. 5.10 B).

Die für Wildtyp-Kontrolltiere ermittelten Zahlen bezüglich des BrdU-Einbaus unterschieden sich zu keinem untersuchten Zeitpunkt signifikant von den Ergebnissen aus *DCX*-EGFP-Tieren. Die Daten zur Proliferation waren in beiden Gruppen über den untersuchten Zeitraum hinweg vergleichbar: Das Maximum BrdU-markierter Zellen wurde zeitgleich nach 7 Tagen erreicht, die absolut ermittelten Zahlen neu gebildeter Zellen waren nahezu identisch. Dieser Befund konnte sowohl für den BO, als auch für den Hippocampus erhoben werden (Abb. 5.10). Demnach scheint die Expression des EGFP-Reporterproteins in huDCX3509-transgenen Mäusen keinen Einfluss auf die adulte Neurogeneserate auszuüben: Kinetik und Ausmaß der Proliferation in neurogenen Zonen des adulten Gehirns waren in Wildtyp- und transgenen Mäusen vergleichbar.

5.7. Expression von Doublecortin und EGFP im Gyrus dentatus mit zunehmendem Alter transgener Tiere

Ein Rückgang der Neurogenese in den Gehirnen adulter Tiere mit zunehmendem Alter war für Nager bereits zuvor beschrieben worden. Wie mehrfach anhand des reduzierten Einbaus von BrdU im Gyrus dentatus gezeigt, nimmt die Proliferation im Hippocampus mehr und mehr ab, je älter die Tiere werden (Kempermann, 1998; Kuhn, 1996; Seki, 1995). Sollte in transgenen Tieren, die unter Kontrolle *DCX*-regulatorischer Sequenzen EGFP exprimierten, die Reporterexpression mit dem Ausmaß der Neurogenese korrelieren, so sollte mit zunehmendem Alter der transgenen Tiere die EGFP-Expression im Hippocampus abnehmen.

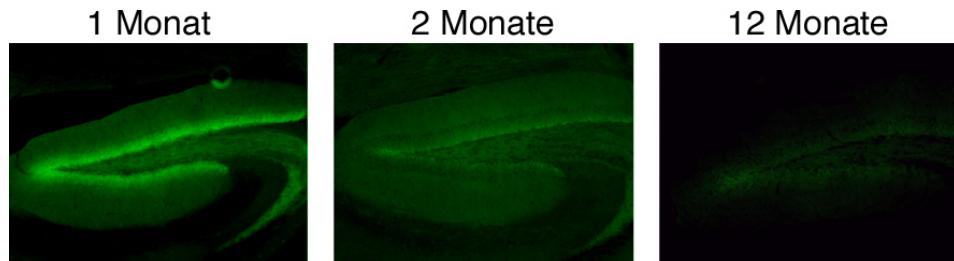


Abb. 5.11. Abnahme der EGFP-Expression unter Kontrolle der DCX-regulatorischen Region in transgenen Tieren mit zunehmendem Alter. Fluoreszenzaufnahmen des Gyrus dentatus des Hippocampus mit unverstärkter Expression des EGFP-Reporterproteins in grün unter Kontrolle der DCX-regulatorischen Region in 1, 2 und 12 Monate alten Tieren. Grüne Fluoreszenz rechts unten im Bild aus 1 und 2 Monate alten Tieren entspricht den Faserenden der Granulärzellen des Gyrus dentatus und dem Synapsenbereich mit den Neuronen der CA3-Region.

Wie Abb. 5.11 zeigt, fand sich in 1 Monat alten Tieren starke EGFP-Expression im Hippocampus. Die EGFP-Expression war bereits in 2 Monate alten Tieren deutlich und nach 12 Monaten weiter gegenüber dem Ausgangswert bei 1 Monat reduziert. Die Bilder (Abb. 5.11) zum Verlauf der Reporterexpression in huDCX3509-transgenen Tieren bestätigten die für Neurogenese in Mäusen beobachtete Tendenz von der abnehmenden Proliferation mit zunehmendem Alter. EGFP-Expression unter Kontrolle der DCX-regulatorischen Region nahm mit zunehmendem Alter in gleicher Weise ab, wie dies auch für endogenes DCX in Tieren erwartet würde, falls DCX-Expression als Indikator für neuronale Vorläuferzellen gewertet wird.

5.8. Experimentelle Anfallsserie und Expression von EGFP im Gyrus dentatus huDCX3509-transgener Tiere

Im gesunden Gehirn herrscht im Zusammenspiel der zahlreichen Nervenzellen ein Gleichgewicht elektrischer und chemischer Signale. Bei einem epileptischen Anfall wird dieses Gleichgewicht plötzlich gestört, und eine Vielzahl von Nervenzellen sendet teils synchronisiert Impulse aus, die wiederum andere Gehirnareale in Erregung versetzen. Epilepsie führt zum Untergang von Nervenzellen im betroffenen Areal des Gehirns. Das Absterben der Zellen kann jedoch ein Reiz sein, neue Zellen nachzubilden: Gezeigt ist nach einer Anfallsserie ein Anstieg der Rate hippocampaler Neurogenese; Anfälle, wie sie experimentell durch die Gabe von Pilocarpin auftraten, verursachten einen signifikanten Anstieg der Zellproliferation in der Granulärzellschicht des Gyrus dentatus. (Parent, 1997).

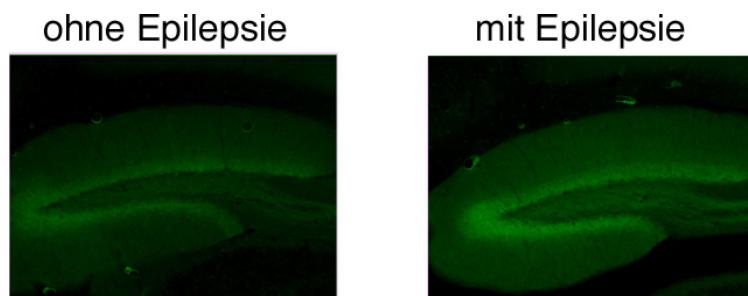


Abb. 5.12. Zunahme von EGFP-Expression in huDCX3509-EGFP-transgenen Mäusen nach experimentell induzierter Anfallsserie. Der Gyrus dentatus transgener Tiere nach experimentell induzierter Anfallsserie zeigt gegenüber nicht behandelten Tieren deutlich gesteigerte EGFP-Fluoreszenz, vermutlich verursacht durch die gesteigerte Proliferation in Folge des vermehrten Absterbens von Neuronen nach den epileptischen Episoden.

Für die vorliegende Studie wurde ebenfalls Pilocarpin verwendet, um eine Anfallsserie in den Tieren auszulösen. Wie aus vorangegangenen Veröffentlichungen erwartet, kam es zu einer Zunahme EGFP-exprimierender Zellen nach Pilocarpin-induzierten Anfällen in Mäusen (Abb. 5.12). Gesteigerte Reporterexpression konnte somit unter einer möglichen Bedingung, welche die Neurogenese bekanntermaßen steigert, nachgewiesen werden.

5.9. Fluoreszenzaktivierte Anreicherung neuronaler Vorläuferzellen aus postnatalen huDCX3509-Reportermäusen

Die Fluoreszenzaktivierte Anreicherung (*engl.* FACS-Sorting, *fluorescence activated cell sorting*) Reporter-exprimierender Zellen aus huDCX3509-transgenen Tieren führt zu einer möglichen Anwendung der transgenen Sequenz: Neuronale Vorläuferzellen könnten – identifiziert über die Aktivität der *DCX*-regulatorischen Region – aus den transgenen Tieren angereichert werden. Untersuchungen zum Schicksal der anschließend in Zellkultur *in vitro* oder nach Transplantation *in vivo* differenzierenden Zellen könnten Aufschluss geben zum endogenen Potential dieser Zellen und zur Regulation von Transgen-Aktivität über die Zeit.

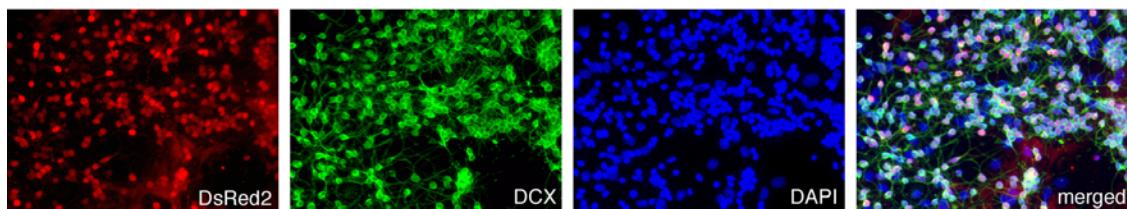


Abb. 5.13 Expression endogenen Doublecortins in FACS-angereicherten, DsRed2-exprimierenden telenzephalen Kulturen aus huDCX3509-DsRed2-transgenen Mäusen. Aus huDCX3509-transgenen, DsRed2-exprimierenden Reportermäusen wurden zum Postnataltag 1 bis 3 telenzephale Zellen gewonnen. Reporterexprimierende Zellen wurden mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS-Sortierung) angereichert und unter Differenzierungsbedingungen kultiviert. Gezeigt ist die Expression endogenen Doublecortins (DCX) in den angereicherten Kulturen nach 3 Tagen unter Differenzierungsbedingungen. DsRed2-Reporterexpression ist noch vorhanden und korreliert mit der Expression endogenen Doublecortins. *DAPI* = Kernfärbung

Mittels FACS-Sortierung waren Reporter-exprimierende Zellen aus den Gehirnen huDCX3509-DsRed2-transgener Tiere leicht anzureichern. Die aus den sehr jungen Tieren zum Postnataltag 1 bis 3 gewonnenen telenzephalen Zellen waren bereits vor dem Sortieren zu einem Großteil positiv für die Expression des Transgens. Auch endogenes Doublecortin ist zu diesem Zeitpunkt noch stark im Telenzephalon vertreten und nimmt erst nach Postnataltag 10 deutlich ab (s. Daten aus dem Westernblot, Abb. 5.3). Die Zellen wurden zu diesem frühen postnatalen Zeitpunkt (P 1-3) isoliert, um eine möglichst hohe Ausbeute DsRed2-positiver Zellen je Tier zu erzielen. Hohe Zelldichten (1×10^5 Zellen/cm 2) waren für das ausreichende Überleben der Zellen in den anschließenden Differenzierungs-Kulturen (in Neurobasal-Medium mit 5 % FKS auf Poly-Ornithin-/Laminin-beschichteten Glas-Deckgläsern) unerlässlich.

Die anhand des DsRed2-Reportersignals sortierten Zellen exprimierten nach 3 Tagen unter Differenzierungsbedingungen in Kultur zu etwa 80% das DsRed2-Reporterprotein und zu etwa zwei Dritteln endogen DCX; Immunoreaktivität für DCX korrelierte mit DsRed2-Reporterexpression (Abb. 5.13) und auch mit der Expression des pan-neuronalen Markers β -III-Tubulin, jedoch nicht mit dem glialen Marker GFAP (nicht gezeigt). Nach 8 Tagen in Kultur hatten mehr als die Hälfte der zuvor gesorteten, reporterexprimierenden Zellen das Reporterprotein abgeschaltet, die Expression endogenen Proteins war im Vergleich zum Wert bei drei Tagen auf etwa 1/3 zurückgegangen. Dagegen war β -III-Tubulin noch in etwa der Hälfte der Zellen vorhanden, die auch nach drei Tagen bereits den Marker exprimiert hatten.

Wurden Zellen des Telencephalons der transgenen Tiere in Kultur genommen, ohne auf die Expression von DsRed2 zu selektieren, so exprimierten diese Kulturen unsortierter Zellen nach 3 Tagen unter Differenzierungsbedingungen nur zu etwa einem Drittel das Reporterprotein und zeigten auch entsprechend weniger DCX- sowie β -III-Tubulin-Immunoreaktivität. Die Expression von DsRed2-Reporter, von DCX und β -III-Tubulin war auch in den unsortierten Kulturen nach 8 Tagen in vergleichbarem Ausmaß rückläufig wie in den sortierten Kulturen. Unsortierte Kulturen exprimierten nach 3 und nach 8 Tagen zu einem deutlichen Anteil (um 10%) den glialen Marker GFAP, während DsRed2-gesortete Zellen lediglich nach 8 Tagen und auch nur zu etwa 1 % GFAP-positiv waren.

6. Diskussion

Zwei Ziele bestimmten die vorliegende Arbeit: Einerseits sollte die funktionelle Rolle des zytoskelett-assoziierten, für neuronale Migration bedeutsamen Proteins Doublecortin (DCX) genauer definiert werden; andererseits galt es, die früh-neuronale Spezifität von DCX zu überprüfen und mittels der Identifizierung regulatorischer Sequenzen des Gens einer Anwendung zuzuführen; die Expression von Reporterproteinen unter Kontrolle der hierbei definierten *DCX*-regulatorischen Region sollte mit Ereignissen in neuronalen Vorläuferzellen korreliert werden. Die folgende Diskussion beschäftigt sich auf Grundlage der erzielten Ergebnisse und unter Berücksichtigung von Erkenntnissen aus der aktuellen Literatur mit

- der physiologischen Rolle Doublecortins während Neurogenese (Kap. 6.1)
- der Pathophysiologie von *DCX*-Mutationen bei Patienten und in zellbiologischen Assays *in vitro* (Kap. 6.2)
- der Identifizierung regulatorischer Sequenzen des *DCX*-Gens und Untersuchungen zu deren Aktivität *in vitro* (Kap. 6.3)
- und mit der Aktivität der *DCX*-regulatorischen Region im transgenen Mausmodell *in vivo* (Kap. 6.4).

6.1. Physiologische Rolle Doublecortins während embryonaler und adulter Neurogenese

Das *Doublecortin(DCX)*-Gen wurde im Zusammenhang mit neuronalen Migrationsstörungen beim Menschen identifiziert und auf dem X-Chromosom lokalisiert (des Portes, 1998a; des Portes, 1998b; Gleeson, 1998). Früh nach der Erstbeschreibung wurde anhand von *in vitro*- und zellulären Assays klar, dass DCX in der Zelle mit MT assoziiert sein kann (Gleeson, 1999a). Angesichts der streng regulierten Expression des Proteins ausschließlich in neuronalen Vorläuferzellen wurde darüber hinaus vermutet, dass DCX neben der MT-Bündelung noch weitere Aufgaben in diesem spezialisierten Zelltyp erfüllt. Es wäre in diesem Zusammenhang denkbar, dass DCX nicht nur statische Funktion als Zytoskelett-assoziiertes Protein, sondern in bestimmten zellulären Prozessen auch Signal-Funktion ausübt. Die Beschreibung zahlreicher Interaktionspartner von DCX, aber auch homologer Proteine mit DCX-ähnlichen MT-Bindedomänen in den letzten Jahren, erlauben nun Überlegungen zur molekularen Funktionsweise von Doublecortin und seiner Rolle im Rahmen der zellbiologischen Prozesse rund um Neurogenese und neuronale Vorläuferzellen.

6.1.1. Mögliche Aufgaben von DCX während Proliferation und Determinierung neuronaler Vorläuferzellen

Doublecortin ist während adulter Neurogenese transient in bis zu 4 Wochen alten neuronalen Vorläuferzellen anwesend und dabei auch in proliferierenden Zellen zu finden; dies wird aus der gleichzeitigen Expression des Zellteilungsmarkers Ki67 in DCX-positiven Zellen bzw. aus der frühen Expression von DCX in 2 Stunden zuvor BrdU-markierten, neu gebildeten Zellen ersichtlich (Brown, 2003) (eigene Ergebnisse, siehe Kap. 5.4). Während embryonaler Neurogenese ist DCX dagegen nicht in proliferierenden Zellen detektierbar, sondern auf postmitotische Zellen beschränkt (Francis, 1999).

In-vitro-Versuche mit Überexpression von DCX-EGFP-Fusionsproteinen in COS7-Zellen zeigen, dass DCX den natürlichen Ablauf der Mitose empfindlich stört. Der beobachtete Effekt basiert wohl unter anderem auf der Bündelung von MT im Spindelapparat und ist bei der Überexpression von Map2, einem anderen neuronal-

spezifischen, MT-assoziierten Protein, nicht zu beobachten (eigene Ergebnisse, s. Kap. 3.3). Der störende Einfluss auf Mitose nach Überexpression in COS7-Zellen könnte demnach eine physiologische Grundlage besitzen, zumal der stark MT-bündelnde Effekt spezifisch für DCX ist und nach Überexpression von Map2 nicht beobachtet wird: DCX könnte auch im physiologischen Umfeld – in neuronalen Vorläuferzellen – Einfluss auf Mitose ausüben.

DCX interagiert mit LIS1, einem anderen mit neuronalen Migrationsstörungen assoziierten Gen (Caspi, 2000). LIS1 behinderte nach Überexpression in COS7-Zellen ähnlich wie hier für DCX gezeigt die Mitose (Faulkner, 2000), für LIS1 selbst und hierzu homologe Proteine in anderen Spezies sind die Interaktion mit mitotischen Zytoskelettstrukturen sowie Aufgaben bei der Positionierung des Zellkerns während der Mitose beschrieben (Lei, 2000). LIS1 und DCX könnten angesichts dieser funktionellen Homologie, angesichts der Fähigkeit zur direkten Wechselwirkung miteinander sowie noch aus einem weiteren Grund ähnliche Aufgaben besitzen: Überexpression von DCX hebt die verlangsamte Migration von Lis1-/+ Neuronen *in vitro* auf, scheint Lis1 also zumindest bezüglich Migration in diesen Zellen ersetzen zu können (Tanaka, 2004).

Zusätzliche Substanz bekam die Theorie von einer Bedeutung Doublecortins für die Mitose in neuronalen Vorläuferzellen mit der Entdeckung eines zu DCX homologen Proteins in *Caenorhabditis elegans*, zyg-8. Zyg-8 wird für die asymmetrische Zellteilung benötigt und steuert dabei die korrekte Positionierung des Spindelapparates (Gonczy, 2001). Asymmetrische Zellteilung besitzt essentielle Bedeutung bei der Entscheidung von Zellschicksalen, wie etwa bei der asymmetrischen Teilung von Stammzellen in a) bereits in ihrer weiteren Entwicklung geprägte Vorläuferzellen und b) weiter teilungsfähige, pluripotente Stammzellen. Auf der Grundlage solcher asymmetrischen Teilungen wird in einem Gleichgewicht aus Proliferation und Differenzierung z.B. der zerebrale Kortex der Säugetiere ausgebildet (Meyer, 2000).

Zwar fehlt der Nachweis von Doublecortin-Expression während embryonaler Neurogenese in proliferierenden Zellen, jedoch macht ein weiterer Aspekt deutlich, dass DCX in diesen Zellen einen Einfluss auf Proliferation haben könnte: Wird in Mäusen während der Entwicklung DCX mit Beginn der Expression von Brain Factor-1

vorzeitig und in großer Menge exprimiert, so verursacht dies eine Mikrozephalie (persönliche Kommunikation mit Prof. Dr. O. Reiner, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel). Die Bildung von BF-1 geht normalerweise dem Auftauchen von endogenem DCX in neuronalen Vorläufern voraus; die vorzeitige Überexpression von DCX könnte in den genetisch manipulierten Tieren Proliferation verhindern, vielleicht mittels des hier *in vitro* beschriebenen störenden Einflusses auf Mitose (s. Kap. 3.3). In der Folge könnte sich dann ein kleineres Gehirn – die beobachtete Mikrozephalie – ergeben.

6.1.2. Vermutete Rolle von DCX während der Migration neuronaler Vorläuferzellen

Gemäß seines Expressionsmusters qualifiziert sich DCX als ein mit neuronaler Migration assoziiertes Protein. Mittels Immunzytochemie wird es unter anderem detektiert a) in migrierenden Vorläuferzellen, die während der Embryonalentwicklung entlang radialem Gliafasern in den entstehenden Kortex einwandern (Meyer, 2002; Qin, 2000), wobei das Unterdrücken der DCX-Expression in dieser Phase radiale Migration verhindert (Bai, 2003), b) während adulter Neurogenese in über den RMS zum BO sich bewegenden Vorläuferzellen (Rao, 2004), sowie c) nach Verletzungen des Gehirns in neu gebildeten Vorläuferzellen, die auf die läsierte Region zuwandern (Magavi, 2000). Die fehlerhafte Expression von DCX während der Embryonalentwicklung des Menschen führt zu neuronalen Migrationsstörungen und in der Folge zu charakteristischen Fehlbildungen des Gehirns wie Lissenzephalie oder Doublecortex-Syndrom (des Portes, 1998a; des Portes, 1998b; Gleeson, 1998).

Trotz dieser vielfachen Hinweise auf die migrations-assoziierte Expression von DCX ist immer noch unklar, welche Funktion DCX auf molekularer Ebene im Zusammenhang mit zellulärer Migration erfüllt, wenn auch die nach DCX-Mutationen gefundenen Gehirn-Fehlbildungen vermuten lassen, dass DCX die Migration entscheidend mitbestimmt. Zelluläre Migration geschieht in drei Schritten, vermittelt durch jeweils verschiedene Zytoskelett-Bestandteile: auf das überwiegend Aktin-vermittelte Ausstrecken von Filopodien und Lamellipodien folgt die MT-vermittelte Translokation des Zellkerns, schließlich werden zurückbleibende Ausläufer nachgezogen.

Neuronale Migration weicht im Prinzip von diesem allgemein auf Zellwanderung zutreffenden Schema nicht ab, stellt jedoch besondere Anforderungen an den migratorischen Apparat. Diese resultieren bei Säugern aus den besonders langen Strecken, die beispielsweise beim Aufbau des Kortex während der Embryonalentwicklung zurückgelegt werden müssen. Die dreidimensionale Struktur des Kortex, das Ergebnis der Migration unzähliger neuronaler Vorläuferzellen, bedarf zu ihrer Entstehung hochkomplexen Regelkreisen aus Proliferation und gerichteter Migration, wobei neben dem Zytoskelett auch spezifische Zell-Zell-Interaktionen und extrazelluläre Signalmoleküle entscheidend sind. In diesem Zusammenhang ist es wahrscheinlich, dass die spezialisierten Anforderungen an Migration in neuronalen Zellen auch spezialisierte Zellbestandteile und Moleküle erfordern. Untersuchungen an früh-neuronal spezifisch exprimierten Proteinen wie Doublecortin könnten möglicherweise Licht in die nur rudimentär verstandenen Prozesse bringen. Das Zusammenspiel der Faktoren aufzuklären, welche für neuronale Migration benötigt werden, stellt eine große Herausforderung der Zellbiologie dar.

DCX wurde ursprünglich als rein MT-assoziiertes Protein beschrieben und eine Interaktion mit Aktin ausgeschlossen (Gleeson, 1999a), weshalb DCX primär im Bereich des nuklear konzentrierten MT-Gerüsts, weniger in den Zellausläufern und in der Nähe der Membran, vermutet wurde. Vielfache Beobachtungen weisen allerdings darauf hin, dass DCX – direkt oder indirekt – auch mit Aktin interagieren könnte. In immunzytochemischen Analysen an differenzierten Kulturen fötaler, telencephaler Vorläuferzellen (primäre MEF-Zellen) findet sich DCX in den Aktin-reichen Wachstumskegeln, jenseits des von MT durchzogenen Bereichs (eigene Beobachtungen). Für mindestens ein Aktin-assoziiertes Protein ist die Bindung an DCX nachgewiesen: Neurabin II kann gemeinsam mit DCX aus Gehirnextrakten immuno-präzipitiert werden und interagiert im Bereich der C-terminalen DCX-Domäne sowie zu Beginn der Serin-Prolin-reichen Domäne mit DCX (Tsukada, 2003). Auch gibt es Hinweise, dass DCX an Filamin 1, ein ebenfalls Aktin-vermittelt wirkendes Protein, bindet (persönliche Kommunikation mit Orly Reiner, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel); Mutationen am X-chromosomal kodierten Filamin 1 verhindern beim Menschen während der Embryonalentwicklung

weitgehend die Migration neuronaler Vorläufer aus der SVZ und führen zum Bild der periventrikulären nodulären Heterotopie (Fox, 1998).

Seit Beschreibung des *DCX*-Gens ist die Affinität von Doublecortin zu MT etabliert. Die Einzigartigkeit der Bindedomäne und der drastische Unterschied zu anderen MT-assoziierten Proteinen in diesem funktionellen Bereich macht eine besondere Rolle Doublecortins für die Stabilisierung von MT in neuronalen Vorläuferzellen wahrscheinlich. Anders als „klassische“ MT-assoziierte Proteine, wie z.B. Map2 oder tau, bindet es nicht außen an der MT-Faser, sondern im Spalt zwischen den einzelnen Filamenten der Tertiärstruktur, wodurch es diese weit effektiver stabilisiert (Al-Bassam, 2002; Moores, 2004). Dies spiegelt sich auch im stark kondensierten MT-Muster in COS7-Zellen nach Überexpression von Doublecortin (s. auch eigene Ergebnisse, Kap. 3.2).

Für DCX ist die Interaktion mit LIS1 nachgewiesen, einem ebenfalls MT-assoziierten Protein, das unter anderem an der Translokation des Zellkerns beteiligt ist und mit Motorproteinen wie Dynein und Dynaktin zusammenwirkt; es bestehen große funktionelle Ähnlichkeiten zwischen LIS1 und DCX im Bezug auf die Interaktion mit dem Mitoseapparat, und Mutationen beim Menschen führen zu ähnlichen Krankheitsbildern (Gleeson, 2000a; Reiner, 2004).

Doublecortin kann durch mehrere Kinasen an verschiedenen Stellen des Proteins phosphoryliert werden, darunter Cdk5, JNK, Mark2, PKA und Abl (Gdalyahu, 2004; Matsumoto, 2001; Schaar, 2004; Tanaka, 2004). In diesem Zusammenhang gibt es die – bisher nicht verifizierte – Hypothese, wonach die Affinität von Doublecortin zu MT über das Muster seiner Phosphorylierung dynamisch reguliert sein könnte (Reiner, 2004).

Wie oben dargelegt, lässt sich Doublecortin während seiner vorübergehenden Expression in neuronalen Vorläuferzellen verteilt über die ganze Zelle finden: am Zellkörper, in den Zellausläufern und in neuronalen Wachstumskegeln. Die Möglichkeit der Interaktion mit so verschiedenen Zellbestandteilen wie z.B. Aktin und Tubulin sowie die Vielfalt an theoretischen Phosphorylierungsstellen (mit der Hypothese von hierdurch modulierter Affinität zu MT) – dies alles liefert ein recht vielschichtiges Bild der möglichen Rolle Doublecortins während der Migration

neuronaler Vorläuferzellen. Weiterführende Analysen sind nötig, um die Vielfalt der Hinweise zu vernetzen und Doublecortin in klar definierte Regelkreise einzuordnen.

Jedoch lässt sich vermuten, dass das Protein in der jungen, migrierenden Nervenzelle wichtige Signalfunktion übernimmt. In diesem Zusammenhang erscheint vor allem die Modulation von DCX-Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen von Bedeutung. Die Phosphorylierung von DCX durch Cdk5 beispielsweise bindet DCX an perinukleäre MT, jedoch nicht an MT in weiter außen liegenden Fortsätzen. DCX könnte so – in Abhängigkeit von Cdk5 – den Weitertransport des Zellsomas in Nervenzellen bewirken (Tanaka, 2004). Nach Phosphorylierung durch JNK dagegen war DCX mit Aktinfilamenten im Wachstumskegel ko-lokalisiert, was in der Folge das Aussprossen von Neuriten förderte (Gdalyahu, 2004); der Aufbau eines Neuriten ist der erste Schritt, mit dem postmitotische neuronale Vorläuferzellen in den Prozess der Migration eintreten.

6.1.3. Mögliche Funktion Doublecortins während neuronaler Differenzierung und Reifung

Die Expression von Doublecortin korreliert mit neuronaler Migration, ist jedoch nicht auf wandernde neuronale Vorläuferzellen beschränkt. Im adulten Hippocampus wird DCX in stationären Zellen während der Neurogenese exprimiert. Im BO eintreffende Zellen exprimieren DCX auch dann noch für gewisse Zeit, wenn sie ihre Migration bereits beendet haben. Dies gilt ebenfalls während der Embryonalentwicklung für die Zellen, welche die radialen Gliafasern bereits verlassen haben, um sich in der jeweiligen kortikalen Schicht zu plazieren (Meyer, 2002). Über die Zeit betrachtet, ist DCX-Expression sowohl im Hippocampus als auch im BO vergleichbar reguliert – bei ganz unterschiedlicher migratorischer Tendenz der in beiden Systemen DCX-exprimierenden Zellen (Brown, 2003; Rao, 2004) (eigene Ergebnisse, siehe Kap. 5.4).

Gemäß diesem Expressionsmuster sollte Doublecortin über das Vorantreiben von Zellwanderung hinaus Einfluss auf differenzierende neuronale Vorläuferzellen ausüben können. Die Fähigkeit Doublecortins, die Dynamik von MT und möglicherweise auch die von Aktin beeinflussen zu können, sowie die Beschreibung membranständiger Interaktionspartner von Doublecortin und die Assoziation

Doublecortins mit vesikulärem Transport lässt eine Beteiligung des Proteins bei Vorgängen rund um die neuronale Differenzierung vermuten.

Neuronale Differenzierung geht einher mit dem Knüpfen vielfältiger Zell-Zell-Kontakte und Synapsen und beginnt mit der Ausbildung von Neuriten, die sich zu Dendriten oder Axonen entwickeln. Neuriten sind definiert als dünne, ausgestreckte, dynamische, MT-verankerte Zellfortsätze, die durch aktives Auswachsen vom Zellkörper entstehen und von einem dynamischen, aktin-reichen Wachstumskegel gekrönt werden (Dehmelt, 2004). Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl Aktin als auch MT essentiell für das Aussprossen von Neuriten sind. MT dienen dabei einerseits als Transportweg für zusätzlich benötigte Membranbestandteile (Popov, 1993), möglicherweise auch für Signalmoleküle und Zell-Zell-Adhäsions-Proteine, und stabilisieren andererseits die Ausläufer von innen (Ingber, 1993). Aktin gestaltet zusammen mit Motorproteinen wie Myosin den Wachstumskegel und treibt ihn voran (Lin, 1996).

Gemäß klassischen Modellen sind Aktin- und MT-reiche Kompartimente in den Neuriten streng getrennt. Während besonderer Ereignisse wie z.B. dem Wenden von Wachstumskegeln oder dem Aufspalten von axonalen Fortsätzen könnte jedoch die Interaktion zwischen MT und Aktin essentiell sein (Dent, 2001). In diesem Zusammenhang wurde Proteinen, die MT und Aktinfilamente vernetzen können und Signalaustausch zwischen beiden Zytoskelett-Systemen ermöglichen, eine besondere Aufgabe zugesprochen: Sie könnten kontrollierend und regulierend in den Ablauf spezialisierter Vorgänge wie das gerichtete Auswachsen von Neuriten eingreifen (Dehmelt, 2004). Viel versprechende Kandidaten zur Vernetzung von Aktinfilamenten und MT sind MT-assoziierte Proteine, für die Affinität zu beiden Zytoskelettsystemen nachgewiesen ist. Hierzu zählt z.B. das neuronal spezifische, MT-assoziierte Protein Map2.

Map2 ist das im Gehirn am weitesten verbreitete MT-assoziierte Protein, mit Aufgaben bei MT-Aufbau und -Vernetzung und bei der Stabilisierung von Dendriten (Goedert, 1991). Für Map2 ist inzwischen neben der Interaktion mit MT auch die mit Aktin und Neurofilamenten nachgewiesen (Hirokawa, 1988; Ozer, 2000). Map2 scheint essentiell für die Entstehung und Stabilisierung von Neuriten: Die Überexpression von Map2 fördert in nicht-neuronalen Zellen das Aussprossen von

Fortsätzen (Hirokawa, 1994), umgekehrt verhindert das Unterdrücken von Map2-Expression in neuronalen Kulturen die Entstehung von Neuriten (Caceres, 1992). Map2 besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen; vermittelt durch Kinaseaktivität an diesen AS scheint ein regulierter Einfluss von Map2 auf MT-Stabilität und Aktin- sowie Tubulin-Interaktion möglich (Ozer, 2000).

Diese Beobachtungen machen mehrere Parallelen zwischen Map2 und Doublecortin deutlich, angefangen von der stabilisierenden Wirkung auf MT, über die Interaktion mit mehreren Zytoskelett-Komponenten bis hin zum regulierenden Einfluss von Kinasen auf die Affinität beider MAPs zu diesen Komponenten. Doublecortin könnte demnach ähnlich wie Map2 Signalrolle bei Neuriten-Entstehung und -Wachstum spielen. Interessante Befunde sind in diesem Zusammenhang die Ko-Lokalisation von JNK-phosphoryliertem DCX mit Aktinfilamenten im Wachstumskegel, und dass diese Ko-Lokalisation in der Folge das Aussprossen von Neuriten förderte (Gdalyahu, 2004).

Falls Doublecortin in Differenzierungs-Vorgänge eingreift, sollte sich das Fehlen von Doublecortin auf subzelluläre Strukturen in differenzierenden Zellen auswirken, ähnlich wie an Dendriten im Gehirn von Map2-Knockout-Tieren gezeigt: nach Verlust von Map2 waren hier unter anderem MT weniger stark vernetzt als bei Wildtyp-Tieren (Harada, 2002). Elektronenmikroskopie am Zytoskelett von differenzierenden jungen Neuronen in DCX-Knockout-Tieren (Corbo, 2002) wäre ein Weg, um Doublecortin bestimmte Aufgaben während neuronaler Differenzierung zuzuordnen.

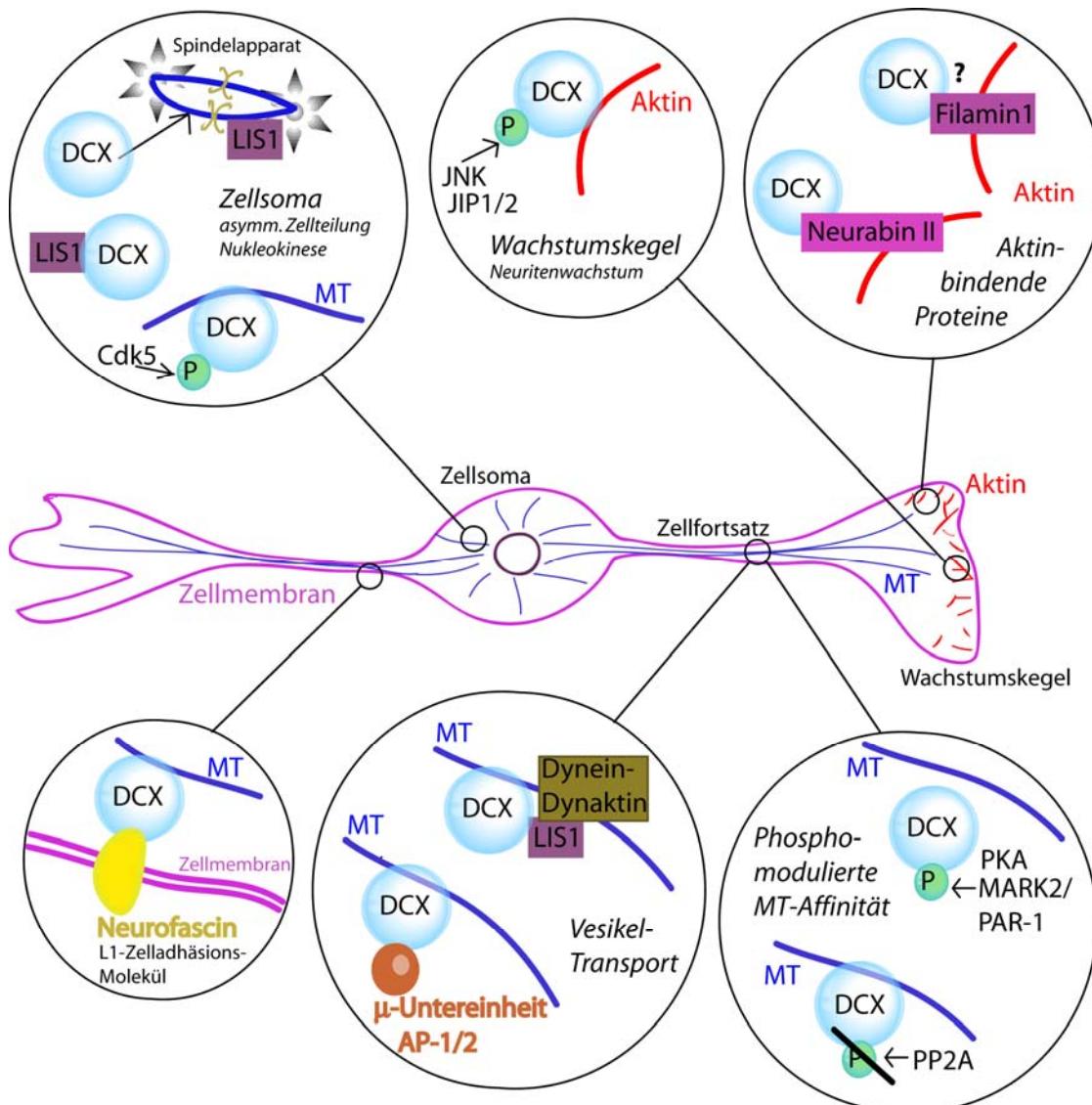
Die Ausbildung von Synapsen ist neben dem gerichteten Aussprossen von Axonen und Dendriten ein bedeutender Vorgang während neuronaler Differenzierung. Synapsen dienen im Nervensystem zum Austausch von Informationen zwischen Neuronen. Voraussetzung für ihre Entstehung ist die Herstellung eines physischen Kontakts zwischen dem Axon der präsynaptischen Zelle und der Membran des postsynaptischen Neurons, gefolgt von morphologischen Veränderungen an den beteiligten Zellen, mit dem Ergebnis der reifen Synapse, charakterisiert u.a. durch die Anwesenheit synaptischer Vesikel im Axon und entsprechender Rezeptoren in der postsynaptischen Membran (Sheng, 2002). Zell-Adhäsions-Moleküle oder CAMs (*engl. cell adhesion molecules*) bestimmen vermutlich entscheidend die Ausbildung dieses spezialisierten, asymmetrischen Zell-Zell-Kontakts zwischen axonalem

Wachstumskegel und dendritischem Fortsatz oder dem Zellkörper des postsynaptischen Neurons (Scheiffele, 2003).

Für die Beteiligung Doublecortins an der Ausprägung von Synapsen gibt es derzeit keine Anhaltspunkte, dennoch stellt die Synaptogenese ein gutes Beispiel dar, wie Ereignisse an der Zellmembran neuronale Differenzierung mitgestalten. Einige Anzeichen sprechen dafür, dass Doublecortin in der jungen Nervenzelle an ähnlichen Membran-gebundenen Vorgängen teilnimmt.

Als membranständiger Interaktionspartner für DCX wurde Neurofascin beschrieben, wobei DCX in Ko-Immunopräzipitations-Experimenten spezifisch mit der phosphorylierten Form von Neurofascin Kontakt aufnahm. Neurofascin zählt zur Familie der L1-Zelladhäsions-Moleküle (L1 CAMs). Neurofascin und DCX fanden sich während der Embryonalentwicklung gemeinsam in entstehenden axonalen Ausläufern. Im RMS des adulten Gehirns interagiert Doublecortin mit einem anderen Protein aus der Familie der L1-Zell-Adhäsionsmoleküle, welches jedoch die identische Phosphotyrosin-Sequenz aufweist wie Neurofascin (Kizhatil, 2002).

Ein weiterer Befund stützt die Theorie von der möglichen Rolle Doublecortins für Neuritenwachstum, sowie gerichtetes Aussprossen von Axonen und Dendriten: Beschrieben ist die Interaktion mit AP1- und AP2-Adaptor-Komplexen und somit die Interaktion Doublecortins mit dem Clathrin-vermittelten Transport von Vesikeln (Friocourt, 2001; Gdalyahu, 2004; Tanaka, 2004). Die Anlagerung zusätzlicher Membranbestandteile zählt zu den wichtigen Vorgängen bei der Verlängerung von Zellausläufern. Die Einlagerung von neuen Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen in die neu gebildete Membran vermittelt der Zelle dabei die Möglichkeit zu spezifischen Zell-Zell-Kontakten und damit zur gerichteten Ausprägung der Neuriten. Doublecortin könnte wegen seiner Affinität zu AP1 und AP2 an diesen Vorgängen beteiligt sein (Friocourt, 2003; Schaar, 2004).



Schema 6.1. Überblick der molekularen Interaktionspartner Doublecortins in jungen Neuronen. zur Funktion der einzelnen Komponenten vergleiche 6.1 und 6.2. MT, Mikrotubuli, P, Phospho-Gruppe.

6.1.4. Mögliche Rolle Doublecortins für die Plastizität des adulten Gehirns

Im adulten Gehirn wird DCX in einigen wenigen Neuronen des Kortex exprimiert. Dies zeigt einerseits die Immunhistochemie, andererseits findet sich DCX-mRNA in Extrakten des adulten Kortex (eigene Daten). Die Neubildung von Nervenzellen im Kortex ist unter physiologischen Bedingungen, also ohne eine Verletzung des Gehirns wie z.B. durch eine Ischämie, nicht eindeutig nachgewiesen; auch gibt es im gesunden, unverletzten Kortex nach Markierungsexperimenten keine BrdU-positiven Zellen. Allerdings konnten aus humanem Kortexgewebe neurale Stammzellen isoliert werden (Arsenijevic, 2001). Multipotente, gliale Vorläuferzellen, die *in vitro* und nach Transplantation zu Neuronen und Glia ausdifferenzierten, fanden

sich in humaner, subkortikaler weißer Substanz (Nunes, 2003). Wenn kortikales Gewebe abstirbt, sei es durch gezielte Induktion von Apoptose, durch Epilepsie oder eine Ischämie, so finden sich kurz darauf neu gebildete, BrdU-markierte und auch DCX-exprimierende Zellen im betroffenen Gebiet; diese wandern jedoch aus den proliferativen Zonen wie etwa der SVZ zum läsionierten Areal und sind nicht im Kortex selbst entstanden (Arvidsson, 2002; Jin, 2003; Magavi, 2000; Nakatomi, 2002; Parent, 2002).

Da Doublecortin spezifisch in neu gebildeten, neuronalen Vorläuferzellen gefunden wird, Neurogenese unter physiologischen Bedingungen im Kortex jedoch nicht stattzufinden scheint, wirkt die vereinzelte Anwesenheit von Doublecortin in diesem speziellen Abschnitt des Gehirns auf den ersten Blick rätselhaft. DCX könnte jedoch im Kortex auf leicht andere Weise wirken als während der Neurogenese in SVZ und Hippocampus. Auf Grundlage der vermuteten Beteiligung von DCX an Neuritogenese (s. vorheriges Kap. 6.1.3) lässt sich spekulieren, dass das Protein für die Plastizität des Kortex eine Rolle spielt. Plastizität, das Knüpfen neuer Nervenverbindungen, setzt sich bis ins adulte Gehirn fort, wobei es zur Neubildung von Axonen und Dendriten sowie neuen Synapsen kommt (Butefisch, 2004; Fang, 2004; Kempermann, 2004b; Sowell, 2004).

6.2. Doublecortin-Mutationen und die Pathophysiologie DCX-assozierter neuronaler Migrationsstörungen

Im Zusammenhang mit DCX-assoziierten neuronalen Migrationsstörungen, subkortikaler Bandheterotopie und X-Chromosomal assoziierter Lissenzephalie sind die Symptome variabel und von verschiedenen Faktoren bestimmt. Einfluss ausüben auf das am Patienten beobachtete klinische Bild kann z.B. der Genotyp, das somatische Mosaik oder das Muster der X-Inaktivierung (Aigner, 2003; D'Agostino, 2002; Demelas, 2001; des Portes, 1998b; Gleeson, 2000b; Gleeson, 2000c; Kato, 2001; Matsumoto, 2001). Analysiert wurden für die vorliegende Arbeit Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp, das heißt zwischen der Art der festgestellten Mutationen und der Schwere der neurologischen Symptome bzw. der neuroanatomischen Fehlbildung bei Patienten. Verglichen wurden dazu zwei verschiedene *DCX*-Missense-Mutationen, A71S und R192W. Zusätzlich sind die verschiedenen Auswirkungen beschrieben, welche die so mutierten Proteine auf das MT-Netzwerk und auf die Mitose in COS7-Zellen hatten. Diese *in-vitro*-Effekte wurden mit der Schwere des Phänotyps (neurologisches Defizit / Ausmaß der zerebralen Migrationsstörung) korreliert (s. Kap. 3).

6.2.1. Symptome bei Patienten mit DCX-assoziierten neuronalen Migrationsstörungen sind je nach Art der Mutation und Expressionsmuster variabel

Die Untersuchungen an Patienten hatten gezeigt, dass die Träger der DCX(A71S)-Mutation stärker klinisch betroffen waren als Patienten, welche die DCX(R192W)-Mutation trugen. DCX ist auf dem X-Chromosom kodiert, weshalb Fehlbildungen bei männlichen Trägern von *DCX*-Missense-Mutationen eine gute Einschätzung dazu erlauben, welche Auswirkung die jeweilige Mutation auf die Funktionalität des DCX-Proteins hat: Jedes junge Neuron dieser Patienten exprimiert ausschließlich die mutierte Form von DCX. Es konnte gezeigt werden, dass die DCX(A71S)-Mutation verglichen mit der DCX(R192W)-Mutation bei männlichen Patienten zu einer schwereren Form der Lissenzephalie führte. In letzterem Fall, war die Gyrierung zum Teil noch ausgebildet, während sie im ersten Fall völlig fehlte.

In Frauen modulierte zusätzlich das Muster der X-chromosomalen Inaktivierung den Phänotyp der Trägerinnen von *DCX*-Missense-Mutationen: In den beiden charakterisierten Familien waren jeweils bei einer der Indexpatientinnen die verschiedenen X-Chromosomen eher zufällig stillgelegt. Bei der Patientin, welche das DCX(R192W)-Allel in gleichem Ausmaß wie das Wildtypallel exprimierte, konnte auf der Basis aktueller MRT-Bildgebung keine neuronale Heterotopie nachgewiesen werden. Dagegen besaß die Patientin mit DCX(A71S) ein deutliches subkortikales Band grauer Substanz und hatte eine schwere Epilepsie. Das nur leicht verschobene Muster der X-Inaktivierung in dieser Patientin war vermutlich nicht der Grund für diese Unterschiede im Phänotyp, vielmehr verhinderte wohl die Mutation A71S das korrekte Funktionieren des DCX-Proteins weit effektiver als die Mutation R192W.

Eine andere weibliche Anlageträgerin in dieser Studie besaß ein unregelmäßiges Muster der X-Inaktivierung, wobei das mutierte Allel bevorzugt exprimiert war. Dieses Indexpatientin trug die DCX(R192W)-Mutation und besaß eine deutlich ausgeprägte neuronale Heterotopie, zeigte allerdings noch keine neurologischen Symptome. Das MRT-Bild der Mutter, von der die erstgenannte Patientin die Mutation geerbt hatte, war dagegen unauffällig. Bei der Mutter war das mutierte zugunsten des gesunden Allels in verhältnismäßig mehr Zellen stillgelegt als bei der Tochter.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass sowohl die Lage einer Mutation auf dem Protein, aber auch das Ausmaß der Ausprägung mutierter Proteine den Phänotyp stark beeinflusst. Es lässt sich vermuten, dass die Schwere des Krankheitsbilds davon abhängt, welcher funktionale Anteil des Proteins durch die Mutation betroffen ist; klinisch relevante Mutationen scheinen zwangsläufig in funktionalen Bereichen lokalisiert: Die beiden hier untersuchten Mutationen A71S und R192W lagen wie fast alle an Patienten beschriebenen Missense-Mutationen von DCX im Bereich der MT-Bindedomänen (Sapir, 2000; Taylor, 2000b). Andere an Patienten beschriebenen Mutationen betrafen neben der MT-Affinität weitere Funktionen des Proteins: Der Austausch von Arginin gegen Histidin an Position 59 beispielsweise führte im mutierten Protein zum Verlust der Bindefähigkeit an phosphoryliertes Neurofascin (Kizhatil, 2002).

Die genaue Analyse des Phänotyps in Familien mit X-chromosomal assoziierter Lissenzephalie und Doublecortex-Syndrom erscheint demnach aus zwei Gründen

bedeutsam: Einerseits können die klinischen Daten Rückschluss auf Funktion bzw. funktionale Anteile des DCX-Proteins erlauben, andererseits sind für die betroffenen Patienten und ihre Angehörigen genauere Prognosen bezüglich ihres Krankheitsbildes möglich, je genauer sich die Folgen bestimmter Mutationen abschätzen lassen.

6.2.2. Der klinisch beobachtete Schweregrad einer DCX-Mutation korreliert mit dem Funktionsverlust des mutierten Allels *in vitro*

Nach seiner Entdeckung als MT-assoziiertes Protein wurde vermutet, dass DCX ausschließlich vermittelt über seine Bindefähigkeit an MT Funktion in der Zelle übernimmt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass in Patienten beobachtete DCX-Mutationen sich auf die Fähigkeit des Proteins zur Bindung an und zum Bündeln von MT auswirken sollten (Francis, 1999; Gleeson, 1999a; Horesh, 1999; Yoshiura, 2000). Die Entdeckung neuartiger MT-Bindedomänen am DCX-Protein, welche sich in ihrer globulären Struktur von der Struktur klassischer MT-assoziierter Proteine unterscheiden, unterstützt dieses Konzept. Die Domänen sind im Tandem (AS 47-135, AS 174-259) auf dem DCX-Polypeptid angeordnet, und in ihnen häufen sich die bei Patienten gefundenen Missense-Mutationen. Kurze Polypeptide, bestehend aus je einer der beiden Domänen, binden an Tubulin-Untereinheiten, wenn auch beide Domänen gemeinsam benötigt werden, um *in vitro* und in transfizierten COS7-Zellen an MT zu binden (Sapir, 2000; Taylor, 2000b). Daneben trägt das DCX-Polypeptid am C-Terminus noch eine Serin-Threonin-reiche Domäne.

Mehr als 25 Missense-Mutationen am DCX-Protein sind an Patienten beschrieben worden (Aigner, 2000; des Portes, 1998a; des Portes, 1998b; Gleeson, 2000a; Gleeson, 1998; Gleeson, 2000c; Gleeson, 1999b; Guerrini, 2003; Kato, 2001; Kato, 1999; Matsumoto, 2001; Pilz, 1999; Pilz, 1998). MT-Bindeversuche wurden *in vitro* an Polypeptiden mit Mutationen in mindestens zwölf verschiedenen Kodons des DCX-Gens unternommen (Sapir, 2000; Taylor, 2000b; Yoshiura, 2000). Überraschenderweise waren fast alle dieser in Patienten gefundenen mutierten DCX-Proteine dennoch in der Lage, an MT zu binden. Eine Ausnahme bildete das Kodon Y125; mehrere Allele mit verschiedenen Mutationen an dieser Stelle waren nicht mehr mit dem MT-Netzwerk *in vitro* ko-lokalisiert; die drastisch geänderte Konformation durch Austausch des Tyrosins 125 verhinderte eine Ko-Lokalisation (Yoshiura, 2000).

Die Tatsache, dass die meisten in Patienten gefundenen DCX-Mutanten immer noch MT binden und bündeln konnten, lässt sich unterschiedlich begründen. Die verwendeten *in-vitro*- und COS7-Zell-Transfektions-Assays könnten nicht ausreichend sensitiv sein, um feine Unterschiede in der Binde- und Bündel-Aktivität des Proteins deutlich zu machen. Andererseits besitzt DCX neben MT andere Interaktionspartner in der Zelle, wie z.B. Neurofascin (Kizhatil, 2002) oder Neurabin II (Tsukada, 2003). Auch ist die Phosphorylierung von DCX durch mindestens drei verschiedene Kinasen in jüngster Zeit beschrieben worden (Gdalyahu, 2004; Schaar, 2004; Tanaka, 2004), wobei vermutet wurde, dass DCX über seinen Phosphorylierungs-Zustand die Migration der neuronalen Zelle beeinflusst. In Patienten beobachtete Mutationen am DCX könnten die Interaktion mit anderen Partnern als MT verhindern, bzw. Phosphorylierung am DCX einschränken und somit ausserhalb der unmittelbaren Wirkung auf MT Einfluss auf neuronale Migration nehmen. Allerdings erscheint es schwierig, die Interaktion mutierten DCX-Proteins mit einer Vielzahl möglicher Partner *in vitro* zu untersuchen. DCX ist spezifisch in jungen Neuronen exprimiert, weshalb angenommen werden muss, dass in nicht-neuronalen Zellen die meisten Interaktionspartner für DCX fehlen. Deshalb eignen sich nicht-neuronale COS7-Zellen nur für Studien, die nicht über das MT-Bindeverhalten von *DCX*-Allelen hinausgehen.

Ähnlich wie in den erwähnten Untersuchungen (Sapir, 2000; Taylor, 2000a; Yoshiura, 2000), verhinderten die in der vorliegenden Arbeit analysierten DCX-Mutationen nicht das Binden der Polypeptide an MT, wenn auch einige qualitative Unterschiede deutlich wurden. Die Mutante, welche den schwersten klinischen Phänotyp hervorrief (A71S) konnte MT in COS7-Zellen am wenigsten bündeln. Der Unterschied in der Aktivität der verschiedenen DCX-Allele war noch deutlicher und auch quantifizierbar im Mitose-Assay. Hier bewirkte A71S die am schwächsten ausgeprägte Störung der Mitose, die klinisch mildere Mutation (R192W) beeinträchtigte die Mitose-Maschinerie sehr, das Wildtyp-Protein störte die Mitose am deutlichsten. Dies führte zu dem Modell, wonach DCX-Mutationen, welche die Ausrichtung der Spindelpole und das Fortschreiten der Mitose in COS7-Zellen kaum störten, einen Großteil ihrer Funktionalität eingebüßt hätten und deshalb in Patienten den schwersten klinischen Phänotyp verursachten. Um dies jedoch als allgemeingültiges Modell zu etablieren, welches die funktionellen Eigenschaften der

mutierten Proteine mit der Schwere des klinischen Phänotyps in Zusammenhang bringt, müssten weitere Mutationen untersucht werden.

Die Feinstruktur der DCX-Bindedomänen wurde kürzlich elektronenmikroskopisch untersucht (Moores, 2004). Demnach bindet die N-terminale DCX-Domäne in der Grube zwischen den einzelnen MT-Fasern der aus 13 Protofilamenten bestehenden Tertiärstruktur; die C-terminale Domäne liegt nicht so eng assoziiert am Rand der MT-Faser. Die beiden untersuchten Mutationen betreffen unterschiedliche DCX-Domänen: A71S die N-terminale, R192W die C-terminale Domäne. Die Mutation A71S wirkte sich dramatischer auf das MT-Binde- und Bündel-Vermögen von DCX aus, was nach den Ergebnissen von Moores et al. auch plausibel erscheint: Die locker mit der Faser verbundene C-terminale Domäne spielt demnach vermutlich eine Rolle bei der Rekrutierung von Tubulin-Monomeren zur Verlängerung der Fasern, während die N-terminale Domäne in der Grube zwischen den Protofilamenten die Fasern optimal stabilisiert. Diese stabilisierende Wirkung auf MT war mit der Mutation A71S im COS7-Zellkulturassay offenbar weitgehend verloren gegangen.

Lis1 ist ein anderes, ebenfalls mit neuronaler Migration assoziiertes Gen, das zugehörige Protein wird mit LIS1 bezeichnet. In mancher Beziehung verhält sich DCX ähnlich, jedoch nicht gleich wie LIS1. LIS1 bindet und bündelt MT (Sapir, 1997). Die Überexpression von LIS1 in COS7-Zellen stört Mitose (Faulkner, 2000): In Zellen mit gesteigerter (aber auch mit verminderter LIS1-Expression) dauerte die Mitose signifikant länger, und die Chromosomen ordneten sich nicht wie vorgesehen in der Metaphaseplatte an; darüber hinaus hatte die Überexpression von LIS1 deutliche Auswirkungen auf die Mitosespindel, resultierend in einem Verlust der eindeutigen Orientierung der Spindel. Die Deletion eines der beiden Lis1 Allele im sich entwickelnden *Drosophila*-Embryo führte zur fehlerhaften Positionierung des Zellkerns (Lei, 2000). An proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen wurde beobachtet, dass ein reduzierter Gehalt an LIS1 die Nukleokinese empfindlich störte (Hirotsune, 1998). Immunopräzipitation und Ko-Lokalisations-Experimente erbrachten, dass LIS1 mit zentrosomalen Proteinen interagiert, so z.B. mit dem Kinetochor und mit dem Dynein/Dynaktin-Komplex; Dynein und Dynaktin sind MT-verankerte Motorproteine der Zelle (Faulkner, 2000; Feng, 2000; Smith, 2000; Tai, 2002).

Für LIS1 sind sieben WD-Repeats (W Tryptophan, D Aspartat) beschrieben, es zählt damit zu einer Proteininfamilie mit vielfältigen Möglichkeiten zur Protein-Protein-Interaktion (Reiner, 1993; Sapir, 1997). LIS1 ist ein während der Evolution stark konserviertes Protein, und es sind mehrere homologe Proteine zum Säuger-Protein in anderen Spezies beschrieben worden, darunter in *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Drosophila melanogaster*. Nach funktionellen Untersuchungen an all diesen Proteinen wird postuliert, dass LIS1 und homologe Proteine während zellulärer Migration an der Translokation des Zellkerns teilnehmen und in die Positionierung des Nukleus während asymmetrischer Zellteilung eingreifen können. Über die nachgewiesene Interaktion mit Dynein, Dynaktin und MT sowie mit dem Zyttoplasmatischen Linkerprotein (CLIP-170) könnte LIS1 Einfluss auf Beladung und Dynamik von MT nehmen (Coquelle, 2002).

Wie LIS1 verursacht DCX ebenfalls mitotische Defekte und behindert das Fortschreiten der Zellteilung, wenn auch mit im Vergleich zu LIS1 leicht unterschiedlichen Konsequenzen: DCX bewirkt einen unsymmetrischen Aufbau des Spindelapparats und die Anhäufung der Chromosomen zu amorphen Aggregaten (s. Kap. 3.3). Die Expression beider Proteine hat demnach ähnliche Folgen, obwohl DCX und LIS1 keine Sequenzhomologie aufweisen: DCX benötigt zum Binden an MT zwei im Tandem angeordnete sogenannte DCX-Domänen, die bei LIS1 fehlen. Allerdings binden und bündeln beide Proteine MT *in vitro* und in lebenden Zellen (Francis, 1999; Gleeson, 1999a; Horesh, 1999; Sapir, 1997; Yoshiura, 2000). Mutationen an Lis1 oder DCX bewirken ähnliche neuronale Störungen: Beim Menschen verursachen Mutationen in einem der beiden Gene isolierte Lissenzephalie, wenn auch Unterschiede im klinischen Phänotyp bestehen, wie die mehr anterior oder posterior dominante Manifestation der Lissenzephalie (Pilz, 1998). Das gezielte Ausschalten eines der beiden Gene, DCX oder Lis1, ist in Mäusen – bei unterschiedlicher Ausprägung – letal: Während alle Lis1 -/- Tiere bereits vor der Geburt sterben, überleben einige der DCX -/- Tiere bis ins Erwachsenenalter; heterozygote Inaktivierung von DCX, aber auch die von Lis1 stört in Mäusen die Entwicklung des Hippocampus (Corbo, 2002; Hirotsune, 1998).

Die für diese Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass funktionelles DCX, aber auch – zu einem gewissen Grad – mutiertes DCX die Mitose empfindlich stören kann.

Zusätzliche biochemische Studien sind nötig um die funktionelle Rolle von DCX in der Zelle über das Binden und Bündeln von MT hinaus aufzuklären. Insbesondere ist beim neuronal spezifisch exprimierten DCX-Protein der im jeweiligen Assay gewählte zelluläre Hintergrund zu berücksichtigen. Auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse drängt sich allerdings die Vermutung auf, dass DCX ähnlich wie LIS1 wirken könnte. Unterstützt wird diese Theorie durch die Beschreibung einer DCX-ähnlichen Kinase in *Caenorhabditis elegans*, zyg-8, welche die Polymerisation von MT fördert und zur korrekten Positionierung des Spindelapparats nötig ist (Gonczy, 2001).

Es bleibt noch zu zeigen, ob der Einfluss von DCX auf den Mitoseapparat von physiologischer Relevanz ist, da DCX bisher während der Embryonalentwicklung nicht in sich teilenden Zellen gefunden wurde. Dagegen ist das Protein in proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen adulter neurogener Regionen exprimiert (Brown, 2003). Ähnlich wie das DCX-homologe Protein zyg-8, welches im Zusammenhang steht mit asymmetrischer Zellteilung in *C. elegans*, könnte DCX das Schicksal neu gebildeter, neuronaler Vorläuferzellen im adulten Organismus beeinflussen (Gonczy, 2001). Zum Beispiel könnte eine der Tochterzellen weiterhin teilungsfähig bleiben, während die andere wandert und sich zum ausgereiften Neuron entwickelt. Vermittelt durch die Regulation der Zellteilung in neuronalen Vorläuferzellen könnte DCX so Einfluss nehmen auf Anzahl und Verteilung ausgereifter Nervenzellen im Gehirn. Das Fehlen von DCX in embryonal proliferierenden Zellen könnte auf Unterschiede der Neurogenese zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung hindeuten: während im embryonalen Gewebe möglicherweise nur die Stammzellen proliferieren, könnten sich adulte neuronale Vorläuferzellen noch Teilungsfähigkeit erhalten haben. Dies könnte die unterschiedlichen Aufgaben von Neurogenese im embryonalen und adulten System widerspiegeln: In ersterem Fall wäre dies der Aufbau der komplexen Struktur „Kortex“, im anderen Fall hätte Neurogenese das gesamte Spektrum von der Reparatur beschädigter Areale über den Ersatz einzelner, abgestorbener Zellen bis hin zur Schaffung von neuronaler Plastizität abzudecken.

Die Beteiligung von DCX an Prozessen rund um die Mitose ist auch wahrscheinlicher geworden, seit direkte Interaktion zwischen DCX und LIS1 nachgewiesen ist (Caspi, 2000). DCX und LIS1 könnten demnach ko-exprimiert sein,

um während der Gehirnentwicklung oder im adulten System gemeinsam am selben zellulären Mechanismus teilzunehmen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Überexpression von DCX einen Migrations-Defekt in Lis1-/+ Neuronen kompensiert (Tanaka, 2004). Schließlich könnte DCX in Folge von Interaktion auch vermittelt durch LIS1 wirken.

Zusammenfassend lässt sich auf Basis des Gezeigten sagen, dass Mutationen im DCX-Gen die Fähigkeit des Proteins herabsetzen, mit Mitose zu interagieren. Dabei war der Einfluss auf Mitose *in vitro* umso stärker, je schwächer der Phänotyp ausgeprägt war, welchen die jeweilige Mutation bei Patienten bewirkt hatte. Der Phänotyp ist in diesem Zusammenhang definiert als eine Kombination aus dem neurologischen Defizit und dem Ausmaß der neuroanatomischen Migrationsstörung. Die Aufklärung der Mechanismen, durch die DCX das Fortschreiten der Mitose oder asymmetrische Zellteilung beeinflusst, könnte weitere Informationen dazu liefern, auf welche Weise das mutierte Protein Lissenzephalie und neuroanatomische Fehlbildungen beim Menschen verursacht.

6.3. Identifizierung und *in vitro* Charakterisierung der regulatorischen Region des Doublecortin-Gens

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden regulatorische Sequenzen des *DCX*-Gens identifiziert und zunächst *in vitro* charakterisiert (s. Kap. 4). Eingegrenzt wurde ein 3,5 kbp großes Fragment strangauwärts des *DCX*-ATG-Startkodons, welches ausreichte, um spezifisch die Expression von Reportergenen in primären neuronalen Vorläuferzellen und jungen Neuronen zu steuern. Gezeigt wurde diese Spezifität anhand dissoziierter Zell- und organotypischer Gewebekulturen neurogener Regionen, wobei immunzytochemische und elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt wurden. Aktivität des 3,5 kbp großen *DCX*-regulatorischen Fragments war mit der Expression endogenen Doublecortins ko-lokalisiert, was vermuten ließ, dass relevante Sequenzen zur Regulation von DCX-Expression innerhalb dieses Fragments enthalten waren. Reporter-exprimierende Zellen zeigten darüber hinaus bezüglich der Elektrophysiologie die Charakteristik unreifer Neurone.

6.3.1. Expression von DCX und EGFP unter Kontrolle *DCX*-regulatorischer Sequenzen ist spezifisch für neuronale Vorläuferzellen *in vitro*

Das Expressionsmuster von DCX in adulten neurogenen Regionen der Ratte *in vivo* war mehrfach untersucht worden; dabei wurde festgestellt, dass DCX spezifisch in neuronalen Vorläufern und jungen, unreifen Neuronen exprimiert ist (Brown, 2003; Rao, 2004). Diese *in vivo* beschriebene Population DCX-exprimerender Zellen ist nicht einheitlich und homogen, sondern vielmehr eine Mischung aus neu gebildeten Neuroblasten und bis zu 4 Wochen alten neuronalen Vorläuferzellen. Einige der DCX-exprimierenden neuronalen Vorläufer sind deshalb *in vivo* noch mitotisch aktiv, während andere mit der Expression des adulten Markers NeuN beginnen; das Fehlen von DCX in mehr als 4 Wochen alten Zellen macht es zu einem transient exprimierten Marker und damit zum Indikator für adulte Neurogenese *in vivo* (Brown, 2003; Kempermann, 2004a).

Zur Expression von DCX *in vitro* war dagegen viel weniger bekannt, und es gab auch kaum Daten bezüglich der Verwendung von DCX als Marker für Neurogenese in Zellkulturen. Gezeigt worden war z.B. an neuralen Stammzellkulturen aus Hippocampus, dass DCX in 30 bis 40% differenzierender Zellen exprimiert ist (Monje,

2003). DCX war während Differenzierung auch in retinalen Vorläuferzell-Kulturen nachzuweisen (Engelhardt, 2004).

Die vorliegende Arbeit demonstriert an fötalen, telenzephalen Kulturen aus der Maus die Ko-Lokalisation von endogenem DCX, aber auch von EGFP unter Kontrolle der 3,5 kbp *DCX*-regulatorischen Region, mit früh-neuronalen Markern, darunter Klasse III- β -Tubulin und Map2ab. Die Expression von DCX und EGFP korrelierte selten mit dem adulten Marker NF200 und nicht mit glialen oder Stammzell-Markern. Ko-Lokalisations-Analysen an den beschriebenen Zellkulturen trennten demnach die Population DCX-exprimierender Zellen streng von Nestin-exprimierenden Stammzellen, von der Gruppe glialer Vorläufer und von adulten Neuronen. Gleiches wurde auch an organotypischen hippocampalen Schnittkulturen und damit an einem Kulturmodell gezeigt, das der physiologischen Situation noch stärker angenähert war: Auch in diesen adulten Schnittkulturen war die *DCX*-Promotor gesteuerte Expression des Reporters DsRed2 nicht mit dem adulten neuronalen Marker NeuN ko-lokalisiert.

Zellen mit aktiver *DCX*-regulatorischer Region in fötalen telenzephalen Maus-Vorläuferzell-Kulturen zeigten darüber hinaus in mehrfacher Hinsicht unreife neuronale Charakteristik: Sie exprimierten genau wie DCX-positive Zellen *in vitro* noch keinen der in der Immunzytochemie überprüfbaren Neurotransmitter. Auch elektrophysiologische Daten bestätigten den unreifen neuronalen Charakter der Zellen mit aktiver *DCX*-regulatorischer Region; Unreife zeigte sich z.B. an der niedrigen Amplitude und der vergleichsweise langen Dauer der aufgezeichneten Aktionspotentiale. Ähnliche früh-neuronale Charakteristik in der Elektrophysiologie war zuvor für Reporter-exprimierende Zellen in hippocampalen Schnittkulturen von Mäusen gezeigt worden, welche EGFP unter Kontrolle des POMC-Promotors exprimierten (Overstreet, 2004). In diesen Mäusen war EGFP-Expression auf junge Neurone im Gyrus dentatus des Hippocampus beschränkt.

In der überwiegenden Zahl der hier untersuchten Kulturen waren Reportergene unter Kontrolle regulatorischer Sequenzen des *DCX*-Gens spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert, allerdings gab es unter den nicht-neuronalen Zellen zwei Ausnahmen: In COS7-Kulturen und in wenigen GFAP-exprimierenden fötalen Zellen, war die gefundene *DCX*-regulatorische Region schwach aktiv. Demnach wäre das 3,5 kbp große Fragment nicht vollkommen spezifisch für neuronale Zellen, wie zuvor auch

der Tau-Promotor, der ebenfalls in COS7-Zellen schwache Aktivität zeigte, ansonsten jedoch spezifisch in neuronalen Zellen exprimiert ist (Heicklen-Klein, 2000). Expression von EGFP unter Kontrolle DCX-regulatorischer Sequenzen in COS7-Zellen bzw. in GFAP-exprimierenden Zellen könnte andererseits auch auf *in vitro* Artefakte zurückzuführen sein, welche sich aus transienten Transfektions-Experimenten ergeben können. Möglich wäre, dass sich transfizierte DNA ins Genom integriert hatte oder die Zelle eine besonders hohe Kopienzahl des Transgens aufgenommen hatte und es deshalb zur unspezifischen Reporterexpression kam.

Die strikte Trennung DCX-exprimierender Zellen von der Gruppe neuraler Stammzellen wurde kürzlich durch Beobachtungen an einer transgenen Mauslinie in Frage gestellt, in der EGFP-Expression unter Kontrolle des Nestin-Enhancers steht; der Marker Nestin kennzeichnet neurale Stammzellen (Kronenberg, 2003). In diesen Tieren waren EGFP und DCX ko-lokalisiert. Reporter-Expression unter einem spezifischen Promotor reproduziert jedoch nicht zwangsläufig exakt das Expressionsmuster des dazugehörigen endogenen Proteins. Dies kann einerseits an der genomischen Umgebung liegen, in der das Transgen integriert ist, oder etwa am Fehlen genomicscher Elemente mit regulativen Aufgaben wie zum Beispiel der Introns. Auch können sich mRNA und Polypeptid von Reportergen und zelleigenem Gen bezüglich ihrer Halbwertszeit in der Zelle unterscheiden. In Xenopus-Embryonen injizierte mRNA für EGFP war sehr stabil und erzeugte für mehr als 21 Tage ein Fluoreszenzsignal (Verkhusha, 2003). In Nestin-EGFP-transgenen Tieren könnte demnach die größere Stabilität des Reporters in differenzierenden neuronalen Stammzellen Ursache dafür sein, dass DCX mit EGFP ko-lokalisiert ist. Ähnlich könnte auch in primären fötalen Vorläuferzellkulturen die größere Stabilität des transfizierten EGFPs der Grund sein, weshalb EGFP-positive Zellen teilweise auch den adulten Marker NF200 exprimieren.

Unglücklicherweise erlaubt die verwendete Methode der transienten Transfektion keine Langzeitanalysen zur Expression von Reporter und endogenen Markern. Deshalb ließen sich dynamische Veränderungen in der Promotoraktivität nicht *in vitro* verfolgen: erwartet würde eine Induktion der Aktivität während neuronaler Determinierung und ein Abschwächen der Aktivität während neuronaler Reifung, also die vorübergehende Expression des Reporterproteins analog zur

vorübergehenden Expression endogenen Doublecortins, wie sie *in vivo* an neuronalen Vorläuferzellen beschrieben ist (Brown, 2003). Nach transienter Transfektion mittels kationischer Lipide kommt es binnen weniger Tage zum Abbau der eingeschleusten Fremd-DNA in den transfizierten Zellen, und das Fluoreszenzsignal klingt automatisch ab (Felgner, 1987). Die immunzytochemischen bzw. elektrophysiologischen Daten stellen somit eine Momentaufnahme der Ko-Expression von EGFP-Reporter und endogenen Eigenschaften dar, wie sie nach einer Woche unter Differenzierungsbedingungen in der Kultur herrschen.

Dennoch lässt sich aus dem weitgehenden Fehlen adulter neuronaler Marker in Reporter-exprimierenden Zellen vermuten, dass in ausgereiften Neuronen die zellulären Signale zur Aktivierung des *DCX*-Promotors fehlen. Auch der Vergleich der Expressionsprofile von *DCX*-Promotorfragment und ubiquitärem CMV-Promotor deutet an, dass der *DCX*-Promotor während neuronaler Reifung herunterreguliert wird und in adulten Neuronen inaktiv ist. Darüber hinaus sind genauere Analysen zur dynamischen Regulation des *DCX*-Promotors jedoch unbedingt erwünscht. So ließe sich Doublecortin als transienter Marker für Neurogenese und neuronale Vorläuferzellen weiter etablieren. Hierzu eigneten sich stabile Transfektionen, die retrovirale Insertion des Promotor-Konstrukts oder das Studium der Aktivität des Konstrukts in transgenen Tieren (Daten zu huDCX3509-transgenen Reportertieren werden in Kap. 5 beschrieben und in Kap. 6.4 diskutiert).

6.3.2. Die identifizierte 3,5 kbp-*DCX*-regulatorische Region enthält mögliche Bindestellen für neuronal spezifisch exprimierte Transkriptionsfaktoren

Das 3,5 kbp *DCX*-regulatorische Element enthält mehrere mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, welche mit neuronaler Entwicklung in Zusammenhang stehen, darunter Brn-2, NeuroD1, E2F-1 und E2F-2. Die Transfektion von Deletionskonstrukten unterstrich die Relevanz der entsprechenden Regionen, auf denen diese Bindestellen lokalisiert waren. Dennoch sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch keine ausreichenden Daten erhoben worden, um die spezifische Rolle dieser Transkriptionsfaktoren für die globale Aktivität des *DCX*-Promotors abzusichern.

Hierzu fehlen noch Daten, welche zur Definition des so genannten Minimalpromotors des *DCX*-Gens führen könnten. Das bisher verwendete 3,5 kbp umfassende Fragment ist aller Wahrscheinlichkeit nach deutlich größer als der Sequenzabschnitt, welcher nötig und ausreichend sein sollte, um nach Aktivierung durch die richtigen Signale die Expression des *DCX*-Gens zu starten. Das Finden des Minimalpromotors wäre der unmittelbar nächste Schritt, um die Funktionsweise, die Regulation und die Aufgaben des *DCX*-Gens im zellulären Kontext näher beschreiben zu können. Wie an anderen neuronal-spezifisch exprimierten Genen gezeigt, sind Minimalpromotoren typischerweise nur um 100 Basenpaare groß (Benfante, 2004; Cheng, 2004; Ge, 2004; Heicklen-Klein, 2000).

Ein erster Schritt zum Auffinden des Minimalpromotors von *DCX* wurde mit der Kartierung der Exons 1 bis 3 des *DCX*-Gens der Maus in der vorliegenden Arbeit bereits begonnen. Für das *DCX*-Gen der Ratte sind Lage und Größe dieser Exons noch unbekannt. In Zukunft gilt es deshalb, die genauen Transkriptions-Startpunkte des Gens in den drei Spezies (Mensch, Maus, Ratte) zu kartieren. Dies ließe sich z.B. durch die Klonierung von cDNAs mit vollständigem 5'Ende aus fötalem Gehirn-Gewebe, wo DCX in großer Menge exprimiert ist, bewerkstelligen. Die Methode des RLM-RACE (RNA-Ligase-mediated Rapid Amplification of cDNA-Ends) erlaubt die selektive Anreicherung von cDNAs mit CAP-Strukturen am 5' Ende, also jener cDNAs, die ein unversehrtes 5'Ende besitzen; Sequenzierung der klonierten cDNAs führt anschließend zur eindeutigen Bestimmung des Transkriptionsstarts (Maruyama, 1994).

Strangauwärts der so definierten Startpunkte der mRNA müsste dann nach dem Minimalpromotor gesucht werden. Deletions-Konstrukte, die systematisch ein immer größer werdendes Stück strangauwärts des Transkriptionsstarts abdecken, könnten in transienten Transfektionen an MEF-Zellen getestet werden. In DNase Footprint Assays verweisen nicht für DNase-Verdau zugängliche Abschnitte regulatorischer Sequenzen auf die Anwesenheit von gebundenen Faktoren (Galas, 1978). Gelshift assays stellen fest, ob regulatorische Proteine an DNA-Stücke gebunden sind, indem sie verzögerte Migration dieser Stücke in Agarosegelen detektieren (Yang, 1998). Umgekehrt können – beim Verdacht auf die Bindung bestimmter Transkriptionsfaktoren –

Punktmutationen an der postulierten Bindestelle eingefügt werden, um das resultierende Fragment anschließend auf Aktivität *in vitro* zu überprüfen.

Für die in der vorliegenden Arbeit verwendete *DCX*-regulatorische Sequenz von 3,5 kbp waren in theoretischen Untersuchungen zahlreiche mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren kartiert worden. Frühere Untersuchungen an verschiedenen Knockout-Mauslinien verweisen auf mögliche Zusammenhänge zwischen einigen der kartierten Transkriptionsfaktoren und *DCX*-Promotoraktivität.

Zum Beispiel könnte Brn-2, ein Klasse III POU-Domäne Transkriptionsfaktor, das *DCX*-Gen aktivieren. Brn-2 wird in migrierenden neuronalen Vorläufern exprimiert und hier für die zellautonome Kontrolle der Migration entlang radialer Gliazellen benötigt (McEvilly, 2002). Darüber hinaus haben Mäuse mit gezielt ausgeschaltetem Brn-2-Gen neuronale Migrationsdefekte, wie sie in ähnlicher Weise nach Knockouts an der Reelin/Cdk5/DCX-Signalkaskade beobachtet wurden (McEvilly, 2002). NeuroD ist ebenfalls ein viel versprechender Transkriptionsfaktor-Kandidat für die Regulation von DCX-Expression, da es mehrere zellautonome neuronale Determinierungs- und Differenzierungs-Mechanismen reguliert. Das gezielte Ausschalten von NeuroD in Mäusen führte zu hippocampalen Fehlbildungen ähnlich dem in *DCX*-Knockoutmäusen beschriebenen Phänotyp (Corbo, 2002; Liu, 2000a). Die Zellzyklus-Regulatoren E2F-1 und E2F-2 könnten ebenfalls DCX-Expression regulieren. Allerdings zeigten Mäuse ohne E2F-1 keine offensichtlichen Gehirn-Fehlbildungen, die Rate adulter Neurogenese war in diesen Tieren im Vergleich zu Wildtypmäusen jedoch reduziert (Cooper-Kuhn, 2002). Andererseits erbrachten eigene Daten, dass beim Fehlen von E2F-1 in Mäusen die DCX-Expression während adulter Neurogenese nicht vermindert war.

Auf Grundlage der durchgeführten Untersuchungen an der 3,5-kbp-*DCX*-regulatorischen Region lässt sich derzeit nicht ausschließen, dass Regionen außerhalb der beschriebenen Transkriptionsfaktor-Bindestellen Einfluss auf *DCX*-Promotoraktivität besitzen. Demnach könnten zusätzliche oder auch andere als die vermuteten Transkriptionsfaktoren die Expression von DCX entscheidend anstoßen. Um Faktoren, welche für die Expression von Doublecortin nötig sind, eindeutig zu bestimmen, fehlt wie bereits oben ausgeführt die Definition des Minimalpromotors.

6.3.3. Verschiedene Wachstumsfaktoren zeigen keinen direkten Einfluss auf die Aktivität der DCX-regulatorischen Region *in vitro*

Um zu überprüfen, inwieweit sich die Aktivität der *DCX*-regulatorischen Region durch die Anwesenheit von verschiedenen Wachstumsfaktoren modulieren ließ, wurden transfizierte MEF-Zellen mittels verschiedener Faktoren stimuliert. Die Aktivität der *DCX*-regulatorischen Region war jedoch unter dem Einfluss der Faktoren gegenüber Kontrollen nicht signifikant verändert. Für die verwendeten Wachstumsfaktoren, darunter BDNF, VEGF, EGF, FGF, TGF-beta, NT-3 und NT-4 oder Retinsäure, war zuvor vielfältiger Einfluss auf Neurogenese und neurale Stammzellen nachgewiesen worden (Enwere, 2004; Jang, 2004; Ostenfeld, 2004; Schanzer, 2004; Shetty, 2004).

Offenbar besteht kein direkter Zusammenhang zwischen diesen Faktoren und der Regulation des *DCX*-Gens. Indirekte und langfristige Auswirkungen auf die Zahl DCX-exprimierender Zellen in der Kultur sind jedoch nach Applikation der Faktoren nicht auszuschließen, da die Korrelation von DCX-Expression und Neurogenese in den verwendeten Kulturen nachgewiesen ist. Um die unmittelbare Wirkung von Wachstumsfaktoren auf die *DCX*-regulatorische Region zu untersuchen, war bewusst ein sehr kurzer Zeitraum zwischen Zugabe des Faktors und Vermessen der Reporter-Expression gewählt worden, da indirekte Einflüsse ausgeklammert werden sollten. Sie hätten sich durch Veränderungen an der Kultur selbst ergeben können, resultierend in Verschiebungen bezüglich Proliferation, Überleben und Differenzierungsschicksal einzelner Zellpopulationen der gemischten Kultur. Die verwendeten Faktoren zielen vermutlich auf die Aktivierung von Gengruppen ab, die der Expression von DCX vorausgehen oder nachfolgen. Eine genaue Untersuchung der Faktoren in – hier bewusst vermiedenen – Langzeitstudien könnte deshalb die Einordnung des *DCX*-Gens in zelluläre Zusammenhänge und Regulationskaskaden erleichtern.

6.3.4. Die Identifizierung der *DCX*-regulatorischen Region verspricht die Aufklärung neuronaler Migrationsstörungen unbekannter Genese bei Patienten

Die Analyse der *DCX*-Promotoraktivität ist auch von klinischer Relevanz. Familien mit Fällen sowohl X-chromosomal assoziierter Lissenzephalie als auch subkortikaler Bandheterotopie hatten zur Beschreibung des *DCX*-Gens geführt

(Couillard-Despres, 2001; des Portes, 1998a; Gleeson, 1998). Seitdem wurden Missense-, Nonsense-, Deletions- und Insertions-Mutanten des *DCX*-Gens beschrieben und mit neuronalen Migrations-Störungen assoziiert (Aigner, 2000; Aigner, 2003; des Portes, 1998a; des Portes, 1998b; Gleeson, 1998; Gleeson, 2000b; Gleeson, 2000c; Gleeson, 1999b). Dennoch findet sich bei mindestens 20% der Patienten mit subkortikaler Bandheterotopie keine Mutation in kodierenden Abschnitten von *DCX* oder anderen Genen, die mit Migrationsstörungen assoziiert wurden, wie z.B. *Lis1* (Leventer, 2000). Es wäre möglich, dass einige dieser Patienten Mutationen an Schlüsselpositionen des *DCX*-Promoters tragen. Dies könnte in Folge verminderter Expression von *DCX* zu Defiziten bei der neuronalen Migration führen und die beobachteten Fehlbildungen erklären.

6.3.5. Mögliche Anwendungen der *DCX*-regulatorischen Region in Therapie und Grundlagenforschung

Zusätzlich zum diagnostischen Potential der *DCX*-regulatorischen Sequenz ließe sich auch eine therapeutische Anwendung ins Auge fassen. Die Steigerung der *DCX*-Expression, vermittelt durch das Einwirken auf regulatorische Sequenzen, um die Migration neuronaler Vorläuferzellen während der Entwicklung voranzutreiben, könnte Teil eines therapeutischen Ansatzes sein. Beschleunigte Migration von Vorläuferzellen nach Überexpression von *DCX* ist *in vitro* bereits gezeigt worden (Tanaka, 2004).

Während transgene Mäuse, welche Reporterprotein unter Kontrolle des *DCX*-Promoters exprimieren, die Hoffnung wecken auf Langzeit-Studien der Promotor-Regulation *in vivo*, so birgt die regulatorische Region auch *in vitro* noch zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten: Denkbar wäre die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung („FACS-Sorting“) transient transfizierter Zellen, um neuronale Vorläuferzellen aus gemischten Kulturen herauszufiltern. Dies wäre z.B. nützlich, um das Differenzierungspotential der so definierten Zellpopulation *in vitro* zu verfolgen, auch unter dem Einfluss bestimmter Wachstumsfaktoren. Ähnliche Versuche sind zuvor bereits unternommen worden, wobei Zellen nach transakter Transfektion von Reportergenen unter Kontrolle des früh-neuronalen Tubulin alpha1-Promotors fluoreszenz-aktiviert angereichert wurden (Wang, 2000). Aus Gewebe isolierte und

anschließend transient transfizierte Zellen lassen sich auch im Vorfeld von Transplantationen über fluoreszente Reporter-Expression im FACS-Gerät spezifisch aufkonzentrieren. So waren zuvor bereits aus humanen Gehirnbiopsien, nach transienter Reporter-Expression unter Kontrolle des P/hCNP2-Promotors, die Vorläufer von Oligodendrozyten isoliert worden, um deren Entwicklung *in vitro* zu verfolgen, allerdings mit der Vision, die Zellen später auch zur Zelltherapie am Menschen einzusetzen (Roy, 1999). Die stabile Transfektion von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) mit *DCX*-Reporterkonstrukten würde die Studie neuronaler Differenzierung in diesen Zellen ermöglichen, wobei sich bestimmte Vorgänge unmittelbar an der Expression des fluoreszenten Reporters ablesen ließen. Methoden zur stabilen Transfektion von ES-Zellen mit anschließender Analyse des Schicksals Reporter-exprimierender Zellen sind in mehreren Studien etabliert und kamen z.B. anhand Nestin-Enhancer gesteuerter Reporterexpression zum Einsatz (Andressen, 2001; Lenka, 2002).

Die vorliegende Arbeit umfasst die erste molekulare und zellbiologische Beschreibung eines *DCX*-regulatorischen Elements. Die genomische Region 3,5 kbp strangauwärts des *DCX*-Startkodons wurde als Träger der essentiellen regulatorischen Elemente zum Vorantreiben spezifischer Expression in neuronalen Vorläufern ausgemacht. Diese 3,5 kbp Region enthielt Gruppen von Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, z.B. Brn-2 und NeuroD, welche für die effiziente Förderung von Reporterprotein-Expression unter Kontrolle der regulatorischen Region nötig waren. Ergebnisse aus transgenen Mäusen, ausgestattet mit dem hier *in vitro* charakterisierten Konstrukt, werden im nächsten Kapitel diskutiert. Sie sollten auch in Zukunft dazu beitragen, die Spezifität des regulatorischen Elements und seine Dynamik im Verlauf der Neurogenese weiter aufzuklären.

6.4. Neurogenese-Reportermäuse

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingegrenzte, 3,5 kbp große Abschnitt genomicscher Sequenz des humanen *DCX*-Gens war *in vitro* spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen aktiv (s. Kap. 4 und 6.3) und wurde schließlich auch an transgenen Mäusen getestet (s. Kap. 5). Ergebnisse zur Aktivität der *DCX*-regulatorischen Region in den transgenen Tieren sollen im Folgenden diskutiert werden.

6.4.1. DCX wird in adulten neurogenen Regionen der Maus transient in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert

Nachdem sie durch Teilung aus Stammzellen hervorgegangen sind, können Zellen des embryonalen und adulten Nervensystems schrittweise zu Nervenzellen ausreifen. Während dieses Differenzierungsprozesses werden die Zellen neuronale Vorläuferzellen genannt und legen z.T. große Strecken vom Ort ihrer Entstehung in den proliferativen Zonen des Gehirns zum Bestimmungsort zurück. Doublecortin ist ein Zytoskelett-assoziiertes Protein, das spezifisch in neurogenen Zonen des Säugergehirns exprimiert ist, hier jedoch weder in Stammzellen noch in adulten Nervenzellen auftaucht, sondern spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen vorkommt (Brown, 2003; Rao, 2004; Steiner, 2004). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Indikatorsystem für Neurogenese zu entwickeln, und hierzu Reporterproteine unter Kontrolle des *DCX*-Promotors im Tiermodell zu exprimieren. Als Modellorganismus diente die Maus – wegen der Ähnlichkeit mit dem Menschen im Bezug auf Genomgröße und -Zusammensetzung, Ähnlichkeiten im Ablauf der Gehirnentstehung sowie großer Homologie der *DCX*-Gene beider Spezies.

Voraussetzung war, dass die Expression endogenen Doublecortins im gewählten Modellorganismus auch mit Neurogenese korreliert, Doublecortin also nur vorübergehend in neuronalen Vorläuferzellen der Maus anwesend ist. Nur dann wäre es möglich, Reporterprotein-Expression unter Kontrolle der experimentell eingegrenzten *DCX*-regulatorischen Region spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen des Modellorganismus anzutreffen.

Vorangegangene Untersuchungen hatten gezeigt, dass Doublecortin in adulten neurogenen Zonen der Ratte transient in jungen Neuronen exprimiert ist (Brown, 2003), für Mäuse fehlten jedoch entsprechende Daten. Analysen zum Einbau des

Basenanalogs BrdU in neu gebildete Zellen und zur Ko-Expression von DCX in diesen Zellen wurden durchgeführt (Kap. 5.1). Die Ergebnisse bestätigen das bereits in der Ratte ermittelte Expressionsmuster: Doublecortin findet sich in bis zu 30 Tage alten Zellen der neurogenen Zonen von BO und Hippocampus; neu gebildete Zellen exprimieren bereits nach 2 Stunden Doublecortin; das Maximum der DCX-Expression in BrdU-markierten Zellen ist abhängig von der betrachteten Region nach 2 bis 7 Tagen erreicht; danach sind BrdU und DCX in immer weniger Zellen ko-lokalisiert; DCX weicht schließlich in BrdU-markierten Zellen dem adulten neuronalen Marker NeuN. Diese Befunde bestätigen, dass DCX auch in Mäusen spezifisch in jungen Nervenzellen exprimiert ist. DCX-Expression scheint innerhalb der Nager mit Neurogenese zu korrelieren. Möglicherweise gilt das Prinzip von der „transienten Expression Doublecortins in neuronalen Vorläuferzellen“ auch für andere Säuger. Sollte dies zutreffen, so könnte anhand der DCX-Expression Neurogenese auch am Menschen näher untersucht werden, wo die routinemäßige Markierung proliferierender Zellen mit BrdU nicht vertretbar ist. Das Modellsystem Maus erscheint geeignet, um die Expression von Reporterprotein unter Kontrolle der *DCX*-regulatorischen Region *in vivo* zu analysieren.

6.4.2. Verschiedene Linien transgener Tiere exprimieren Reportergene in vergleichbarem Muster

Die Methode der Herstellung transgener Mäuse zur Expression von Reporterproteinen erzeugt eine Vielzahl verschiedener Tiere: Das transgene Fragment – bestehend aus regulatorischer Sequenz, Reportergen und PolyA-Signal – kann an mehr oder weniger beliebigen Stellen des Genoms der Mäuse integriert sein, da dieser Vorgang per nicht homologer Rekombination geschieht. Werden die transgenen Tiere aus verschiedenen Linien untereinander verglichen, so schwankt die Intensität der Reporterexpression unter anderem abhängig davon, welchen genomischen Hintergrund die Insertionsstelle aufweist (Gordon, 1981; Wall, 2001).

Diese Eigenschaft der Methode findet sich auch bei den für die vorliegende Arbeit generierten *DCX*-Reportermäusen bestätigt. Je nach Linie ist die Intensität der Reporterexpression unterschiedlich und reicht von starker Expression bis hin zu schwacher oder fehlender Expression. Gleichzeitig ist das Muster der Transgen-

Expression im Gewebe unabhängig von der Fluoreszenz-Intensität in allen analysierten Tieren sehr ähnlich.

Auch die Tiere, welche keinerlei Reporter exprimieren, haben gemäß PCR-Screening das Transgen ins Genom integriert – wenn jedoch auch in einem durch globale Mechanismen der Genregulation vorübergehend oder dauerhaft stillgelegten Bereich. Bei den Linien mit besonders intensiver Reporterexpression bezogen auf einzelne Zellen sind vermutlich besonders viele Kopien des Transgens ins Genom integriert. Das transgene Fragment neigt wegen seiner linearen Struktur und den kompatiblen Enden der Stücke dazu, deutlich mehr als einmal in genomische DNA zu rekombinieren (Gordon, 1981; Wall, 2001).

Leichte Unterschiede zwischen den Linien bestehen auch je nach verwendetem fluoreszenten Reporterprotein (EGFP oder DsRed2), wobei dies wohl auf Unterschiede in der Aggregations-Tendenz oder Stabilität dieser Fremdproteine zurückzuführen ist (Verkhusha, 2003). Die Zucht der Luziferase-Reportertiere hatte bei Abschluss dieser Arbeit erst begonnen, weshalb hierzu noch keine Ergebnisse vorlagen.

6.4.3. Expression von Reporterprotein in huDCX3509-EGFP-transgenen Tieren ist spezifisch für endogen DCX-exprimerende Zellen und Gewebe

Um als Reportermodell für Neurogenese zu dienen, sollten huDCX3509-EGFP-transgene Tiere endogenes DCX und Reporterprotein in vergleichbarem Muster exprimieren. Gefunden wurde mittels proteinbiochemischer und immunhistochemischer Verfahren die weitgehende Übereinstimmung der Expression in Tieren der Linie 303. EGFP- bzw. DCX-Expression wurde untersucht a) im Verlauf der Entwicklung, b) bezüglich verschiedener Organe, c) in verschiedenen Regionen des adulten ZNS und d) im Verlauf der Neubildung von Nervenzellen. In neu gebildeten Zellen adulter neurogener Zonen sind sowohl endogenes DCX als auch EGFP unter Kontrolle der postulierten *DCX*-regulatorischen Region transient exprimiert. Das erstellte *DCX*-Reportermodell eignet sich demnach, um Neurogenese *in vivo* zu studieren: Veränderungen an endogenem DCX spiegeln sich in veränderter EGFP-Expression wider. In wenigen Fällen weicht die Expression der beiden Proteine leicht voneinander ab, was im Folgenden diskutiert werden soll.

Im Verlauf der Entwicklung sind DCX und EGFP über die Zeit vergleichbar reguliert, allerdings persistiert EGFP tendenziell etwas länger im Gehirngewebe. Auch während der Neubildung von Nervenzellen – detektiert über die Anwesenheit von BrdU in DCX- bzw. EGFP-markierten Zellen – ist das EGFP-Signal über die Zeit betrachtet etwas dauerhafter als die Immunoreaktivität für endogenes DCX. Die längere Expression von EGFP gegenüber DCX ist vermutlich auf die größere Stabilität des Reporters gegenüber dem endogenen Protein zurückzuführen. Wie an Xenopus-Embryonen gezeigt, erzeugt die Injektion von EGFP-mRNA für mehr als 21 Tage ein grünes Fluoreszenzsignal in Zellen, dabei liegt die Halbwertszeit des EGFP-Proteins bei über 24 Stunden (Verkhusha, 2003). Ähnliche Stabilität der EGFP-mRNA oder des EGFP-Proteins wäre wohl auch in Mäusen zu erwarten. Dies übersteigt vermutlich die Lebensdauer endogener Transkripte, da DCX insgesamt ohnehin nur in bis zu etwa 30 Tagen alten neuronalen Vorläuferzellen anzutreffen ist (Brown, 2003) (Kap. 5.1).

Über die Regionen des gesamten Gehirns hinweg betrachtet korreliert die Expression von EGFP mit der DCX-Expression. Allerdings gibt es leichte Abweichungen abhängig davon, welche Methode zur Analyse der Proteinexpression verwendet wird: So findet sich im Westernblot DCX in Homogenaten des Kortex, jedoch kein EGFP im gleichen Homogenat, EGFP-Expression ist allerdings vereinzelt in der Fluoreszenzaufnahme des Gehirns in kortikalen Zellen zu beobachten. Der Westernblot ist in diesem Fall wohl nicht sensitiv genug, um die auf den gesamten Kortex bezogen recht spärliche EGFP-Expression abzubilden. Neurogenese ist für den adulten Kortex nicht schlüssig nachgewiesen (Picard-Riera, 2004), jedoch liefert die RT-PCR an RNA aus adultem Kortex der Maus cDNA-Transkripte für DCX (eigene Daten). DCX-Expression im adulten Kortex steht möglicherweise in Zusammenhang mit neuronalen Plastizitätsvorgängen in dieser Gehirnregion (s. Kap. 6.1.4).

DCX und EGFP-Reporter sind in transgenen Tieren weitgehend ko-exprimiert. Demnach sollte die 3509-bp-Region die notwendigen Abschnitte genomicischer DNA zur regulierten Expression von endogenem Doublecortin beinhalten. Ungenauigkeiten in der EGFP-Expression sind neben den zitierten Gründen möglicherweise auch auf Besonderheiten der ausgewählten Linie zurückzuführen: Je nach Insertionsstelle ins Genom der Maus und je nach Kopienzahl des inserierten Transgens kann die Intensität der Reporterexpression schwanken. Je mehr EGFP synthetisiert wird, umso länger

dauert es vermutlich auch, bis das Protein wieder abgebaut ist und umso stabiler ist das Fluoreszenzsignal. Statt herkömmlichem EGFP könnte versucht werden, instabile Formen fluoreszenter Proteine in transgenen Tieren zu exprimieren, um damit endogenes und transgenes Protein stärker zu korrelieren (Li, 1998).

Die in transgenen Mäusen aktive *DCX*-regulatorische Region ist von der humanen genomischen Sequenz des Gens abgeleitet. Dies könnte – verursacht durch geringe Sequenzabweichungen zwischen Mensch und Maus – die spezifische Expression von Reporterprotein im Tiermodell beeinträchtigen. In künftigen Experimenten sollte deshalb versucht werden, Reporterprotein auch unter Kontrolle regulatorischer Sequenzen der Maus *in vivo* zu exprimieren. Im übrigen gilt es – wie schon nach den *in-vitro*-Untersuchungen zur Aktivität der 3,5 kbp regulatorischen Region gefordert – den Minimalpromotor des *DCX*-Gens einzuzgrenzen, um so möglicherweise unspezifische Expression der Reporterproteine zu minimieren.

6.4.4. EGFP ist unter Kontrolle der huDCX3509-regulatorischen Region spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen transgener Tiere exprimiert

Während bisher lediglich die Übereinstimmung von endogenem Protein und Reporter betrachtet wurde, ging es im nächsten Schritt um die Korrelation von Reporterexpression auch mit anderen endogenen Markern. Dabei zeigt es sich, dass EGFP in adulten neurogenen Regionen der transgenen Mäuse spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert ist. Reporterexprimierende Zellen sind durch die gleichzeitige Anwesenheit endogenen Doublecortins charakterisiert, sowie durch das Fehlen des neuralen Stammzellmarkers Nestin und des glialen Markers GFAP. Ein kleiner Teil der Reporter-exprimierenden Zellen ist positiv für NeuN. Die Korrelation von EGFP mit dem adulten neuronalen Marker NeuN stellt insofern keinen Widerspruch dar, als NeuN-Expression auch in einem Teil der endogen DCX-exprimierenden Zellen anzutreffen ist (Brown, 2003), (s. eigene Ergebnisse Kap. 5.1). Ko-Lokalisation von EGFP und NeuN könnte im Tiermodell zum Teil auch auf größere Stabilität EGFPs gegenüber endogenem Doublecortin zurückzuführen sein.

Mittels Fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) konnten Zellen mit aktiver *DCX*-regulatorischer Region aus dem Telencephalon transgener Mäuse angereichert werden. Die Zellen exprimierten anschließend in Kultur zu großen Teilen endogenes

DCX sowie den pan-neuronalen Marker β -III-Tubulin, jedoch nicht den glialen Marker GFAP. Die FACS-Ergebnisse machen deutlich, dass Reporter-exprimierende Zellen aus transgenen Tieren in Differenzierungskulturen die Eigenschaften neuronaler Vorläuferzellen zumindest für den untersuchten Zeitraum weitgehend beibehalten. Beobachtet wurde im Vergleich zu den unsortierten Kulturen eine deutliche Anreicherung DCX-exprimierender Zellen. Weitere Experimente zum Schicksal dieser Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen sollten sich anschließen. Das transgene Tiermodell kombiniert mit FACS-Anreicherung schlägt so eine Brücke zurück zu den *in-vitro*-Assays (Kap. 4 und 6.3): Es erlaubt nach fluoreszenzaktivierter Zellsortierung Studien zum Schicksal der Zellen mit aktiver *DCX*-regulatorischer Region *in vitro*, und zwar in weit größeren Zelldichten, als sie durch transiente Transfektionen an fötalen Vorläuferzellkulturen erzielt werden könnten.

FACS-Anwendungen erscheinen auch im Vorfeld von Transplantationen sinnvoll, um so angereicherte Vorläuferzellen z.B. nach gezielten Läsionen am ZNS, in Versuchstiere zu transplantieren und ihre Differenzierung *in vivo* zu verfolgen. Auch die umstrittene Transdifferenzierung bzw. Dedifferenzierung z.B. hämatopoetischer Stammzellen in Zellen mit neuronaler Bestimmung (Castro, 2002; Cogle, 2004; Krause, 2001; Wagers, 2002) ließe sich anhand *DCX*-transgener Tiere überprüfen: Hämatopoetische Stammzellen müssten dazu aus *DCX*-Reportertieren isoliert und in Wildtypetiere übertragen werden. Die Expression von Reporterprotein unter Kontrolle *DCX*-regulatorischer Sequenzen im ZNS dieser transplantierten Tiere würde auf die Transdifferenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu neuronalen Vorläufern hinweisen. Bei Abschluss dieser Arbeit begann die Zucht mehrerer Linien transgener Ratten mit *DCX*-Reporterexpression. Ratten eignen sich wegen ihrer Größe und Robustheit besser als Mäuse für alle Versuche mit dem Ziel, Läsionierungsmodelle und Transplantation zu testen.

Die immunhistochemischen Analysen zur Expression von Doublecortin, Nestin, NeuN und GFAP in adulten Gehirnschnitten sollten in Zukunft auch auf embryonales Gewebe huDCX3509-EGFP transgener Tiere ausgedehnt werden. Doublecortin ist zwar während der Embryonalentwicklung ebenfalls spezifisch für neuronale Vorläuferzellen, korreliert hier jedoch nicht mit Proliferation (Francis, 1999). Grund dafür könnte sein, dass Doublecortin im Embryo andere Funktionen wahrnimmt als im

adulten Organismus (s. Kap. 6.1). Während der Embryonalentwicklung ist an den transgenen Tieren die Korrelation der Reporterexpression mit endogenem Doublecortin anhand von Westernblots nachgewiesen (s. eigene Ergebnisse Kap. 5.3). Immunhistochemische Analysen der embryonalen Gewebe könnten Aufschluss dazu liefern, mit welchen Markern die Expression des Reporters während der Entwicklung darüber hinaus korreliert, und ob es Unterschiede zu den Ergebnissen aus adulten Geweben gibt.

6.4.5. Nutzen des *DCX*-transgenen Reportermodells im Vergleich zu anderen transgenen Reportersystemen für Neurogenese in Mäusen

DCX-Reportertiere exprimieren EGFP und andere Reporterproteine unter Kontrolle der *DCX*-regulatorischen Region weitgehend spezifisch in neurogenen Regionen des adulten Gehirns, also im Gyrus dentatus des Hippocampus, in der SVZ, im RMS und im BO. Reporterexpression sowie die Expression endogenen Doublecortins erreicht das Maximum in ca. 7 bis 10 Tage alten Zellen des BO und sinkt nach mehr als 30 Tagen zugunsten des adult-neuronalen Markers NeuN auf Null ab. Reporterexprimierende Zellen lassen sich aus transgenen Tieren anreichern und exprimieren *in vitro* für gewisse Zeit endogenes Doublecortin sowie analog dazu das Reporterprotein.

Auf Basis von Nestin-Promotoraktivität lassen sich in einem anderen Tiermodell neurale Stammzellen identifizieren: Für diese Zellen mit aktivem Nestin-Enhancer ist gezeigt, dass sie *in vitro* proliferieren und sich selbst erneuern können, jedoch auch Neurone und Gliazellen hervorbringen (Kawaguchi, 2001). Transgene Tiere mit Expression von Fluoreszenz-Proteinen unter Kontrolle des pan-neuronalen T α 1 α -Tubulin-Promotors dagegen erlauben die Identifizierung neuronaler Vorläuferzellen sowie adulter Neurone anhand der Reporterexpression (Wang, 2000).

Mäuse, die Reporterprotein unter Kontrolle bestimmter 5'-flankierender Sequenzen des Proopiomelanocortin-Gens (POMC-Gen) exprimieren, zeigen EGFP-Expression spezifisch in bis zu 4 Wochen alten Zellen der Subgranulärzellenschicht des Hippocampus; EGFP-exprimierende Zellen in diesem Modell besitzen bezüglich Elektrophysiologie die Charakteristik unreifer Neuronen (Overstreet, 2004). Das POMC-transgene Modell ist damit noch am ehesten mit dem hier beschriebenen *DCX*-

Reportermodell vergleichbar, allerdings korreliert die Expression des Reporters im POMC-Modell nicht mit endogenem POMC und auch nicht mit migrierenden Vorläufern im RMS sowie im BO (Overstreet, 2004).

Das Kreuzen der unter verschiedenen Promotoren Reporter-exprimierenden Tiere führt zu einer weiteren interessanten Anwendung des *DCX*-Reportermodells: Die Nachkommen der Kreuzung exprimieren zwei verschiedene Fluoreszenzproteine z.B. EGFP unter dem Nestin-, α -Tubulin- oder dem POMC-Promotor sowie DsRed2 unter der *DCX*-regulatorischen Region. Dies könnte die gleichzeitige FACS-Anreicherung verschiedener Zellpopulationen mit Ko-Expression zweier Reporter oder exklusiver Expression nur eines der beiden Reporter ermöglichen. Eigenschaften und Differenzierungspotential der angereicherten Zellen könnten anschließend *in vitro* oder auch nach Transplantation *in vivo* untersucht werden. Anders als bei hämatopoetischen Stammzellen, die gut charakterisierte, den jeweiligen Zelleigenschaften zuzuordnende Oberflächenantigene besitzen, stellt die transgene Expression von Reporterproteinen im Tiermodell bei neuralen Zellen eine der wenigen Möglichkeiten dar, um native Zellen im FACS anzureichern (Sawamoto, 2001). In diesem Zusammenhang wäre es allerdings wünschenswert, instabile Varianten von EGFP oder anderen Reporterproteinen zu verwenden, um Überlagerungs-Artefakte in der Expression der verschiedenen Reporterproteine durch die große Stabilität herkömmlichen EGFPs zu vermeiden.

6.4.6. Verwendung des *DCX*-transgenen Reportermodells unter Neurogenese-modulierenden Bedingungen

Wie Analysen zum Einbau des Basenanalogs BrdU in neurogenen Zonen des adulten Gehirns zeigen, ist die Proliferationsrate in transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren unverändert. Das inserierte Transgen scheint in der Linie 303 die Vorgänge rund um Proliferation, Migration und Differenzierung nicht zu behindern und auch nicht zu beschleunigen.

Die Zahl BrdU-markierter Zellen nimmt in neurogenen Regionen sowohl der transgenen als auch der Wildtypmäuse über die Zeit deutlich ab: im BO nach 60 Tagen auf 37% des Maximums bei 7 Tagen, im Gyrus dentatus sogar auf nur 10% des ebenfalls nach 7 Tagen detektierten Maximalwertes. Das Absterben großer Teile neu-

gebildeter Zellen in den adulten neurogenen Regionen des Gehirns wird auf programmierten Zelltod (Apoptose) zurückgeführt (Biebl, 2000). Apoptose bewirkt z.B. während der Embryonalentwicklung des Gehirns, dass nur korrekt verknüpfte Nervenzellen erhalten bleiben (Oppenheim, 1991). Die Dynamik des Absterbens neu gebildeter Zellen, wie sie für den adulten BO der Ratte gezeigt wurde (Winner, 2002), ist den Ereignissen während embryonaler Neurogenese vergleichbar. Adulte Neurogenese könnte demnach im Bezug auf Apoptose ähnlichen Mechanismen unterliegen wie die embryonale Gehirnentwicklung. Neu gebildete Zellen sterben während adulter Neurogenese oft schon als junge Neurone ab; DCX-Expression wurde in gemäß TUNEL-Markierung apoptotischen Zellen detektiert (Winner, 2002).

Der hier gefundene starke Rückgang BrdU-markierter Zellen auf 37% im BO bzw. auf 10% im Gyrus dentatus übersteigt allerdings bisher erhobene Daten zum Verlust BrdU-markierter Zellen über die Zeit, die langfristig von einem nur etwa 50%igen Rückgang sprechen: Im BO der Ratte z.B. werden täglich mehrere Zehntausend neue Neurone gebildet, die im Verlauf der ersten Monate nach BrdU-Markierung etwa zur Hälfte wieder absterben (Biebl, 2000; Kato, 2000; Winner, 2002); auch in der Maus ist die starke Zunahme von mit dem radioaktiven Basenanalogenon ³H-desoxy-Thymidin-markierten Zellen im BO bis etwa zum Tag 15 nach Markierung beschrieben, nach 45 Tagen ist die Hälfte der neu gebildeten Zellen wieder abgebaut (Petreanu, 2002). Es lassen sich mehrere Gründe vermuten, warum im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Menge BrdU-markierter Zellen über die Zeit rascher abnahm: Versuche zur Markierung neu gebildeter Zellen mit BrdU unterscheiden sich meist bezüglich der Applikations-Frequenz und der verabreichten BrdU-Gesamtmenge, weshalb BrdU in manchen Fällen beschleunigt aus neu gebildeten Zellen ausverdünnt wird; auch ist BrdU kein stöchiometrischer Marker, da er mittels eines Antikörpers detektiert wird; Unterschiede in den Detektionsmethoden können deshalb zu abweichenden Ergebnissen führen (Nowakowski, 2000).

Die Kinetik des BrdU-Einbaus, wie sie an Wildtypmäusen und huDCX3509-transgenen Tieren beobachtet wurde, entspricht dennoch weitgehend den Erwartungen, die an Proliferation in adulten neurogenen Regionen unter physiologischen Bedingungen gestellt werden. Auch stimmen die Ergebnisse aus Wildtyp- und transgenen Tieren überein. Das DCX-Reportermodell erscheint demnach geeignet, um

anhand der Reporterexpression Neurogenese unter Bedingungen zu studieren, die diesen Prozess bekanntermaßen modulieren. Induktion oder Hemmung von Neurogenese sollte sich in veränderter Expression des Transgens spiegeln, ähnlich wie dies auch für endogenes DCX erwartet würde. Tatsächlich nimmt die Expression von EGFP im Hippocampus mit zunehmendem Alter der Tiere erwartungsgemäß deutlich ab, während das nach induzierter Epilepsie verletzte Gehirn mit vermehrter EGFP-Expression im Hippocampus reagiert.

Um jedoch EGFP-Expression und die Modulation adulter Neurogenese zweifelsfrei zu korrelieren, wären über die bloße Beobachtung von EGFP-Expression an histologischen Schnitten hinaus weitere Untersuchungen erwünscht. So müsste versucht werden, die Zahl Reporter-exprimierender Zellen zu quantifizieren. Dies ließe sich z.B. mittels FACS-Analyse hippocampaler Zellen durchführen. Die Neurogeneserate im Hippocampus könnte so anhand des Anteils EGFP-exprimierender Zellen in dieser Struktur bestimmt werden. Auf diesem einfachen und schnellen Weg ließe sich der Verlauf der Transgenexpression unter bekannten, Neurogenese modulierenden Bedingungen kontrollieren. Auch könnte diese Methode später zum Studium der Neurogenese am *DCX*-Reportermodell unter bisher nicht erforschten Bedingungen dienen. Bis dahin müsste das Tiermodell jedoch auch noch anhand weiterer etablierter Protokolle zur Modulation der Neurogenese untersucht werden, wie z.B. nach experimentell induzierter Ischämie (Jiang, 2001) oder nach gesteigerter physischer Aktivität („Running-Modell“) (van Praag, 1999a; van Praag, 1999b).

In verschiedenen Modellen für physischen wie auch für psychosozialen Stress, sowie an Tiermodellen zur Depression ist gezeigt, dass Stress oder Depression die Proliferations- und Neurogeneserate im Hippocampus senken (Czeh, 2002; Malberg, 2003; Tanapat, 1998; Tanapat, 2001). Dabei ist zu berücksichtigen, dass Tiermodelle zur Depression meist auch eine Stress-Komponente besitzen. Allerdings gibt es auch beim Menschen starke Hinweise darauf, dass depressive Störungen eine Folge von Stress sein können (Duman, 1997). Die Langzeitbehandlung mit verschiedenen Klassen von Antidepressiva führte im Tiermodell umgekehrt zu gesteigerter Zellproliferation und Neurogenese im Hippocampus (Malberg, 2000).

Seit diesen Beobachtungen besteht die Hypothese, dass reduzierte Zellproliferation im Hippocampus zur Pathophysiologie von Depression beiträgt, und

dass umgekehrt Antidepressiva unter anderem dadurch wirken, dass sie dem Absinken der Neurogeneserate im Hippocampus entgegenwirken. Seit kurzem ist auch gezeigt, dass Zellproliferation im Hippocampus nötig ist, damit Antidepressiva wirken können (Santarelli, 2003). *DCX*-Reportertiere wären demnach ein viel versprechendes Testsystem, um antidepressive Substanzen in pharmakologischen Studien zu testen, aber auch um die Folgen bestimmter Stressphänomene auf die Neurogeneserate an *DCX*-gesteuerter Reporterexpression abzulesen.

Obwohl die Validierung des Tiermodells als Neurogenese-Indikator noch nicht abgeschlossen ist, wecken die bisher gemachten Beobachtungen doch berechtigte Hoffnung, dass sich das Modell zum einfachen und schnellen Nachweis von Neurogenese eignen könnte: 1) *DCX*- und EGFP-Expression korrelieren in neu entstehenden Nervenzellen; 2) EGFP-exprimierende Zellen besitzen in der Immunhistochemie die Charakteristik neuronaler Vorläuferzellen; 3) EGFP-Expression ist – vermutlich analog zur Neurogenese – in den transgenen Tieren modulierbar. Bereits bei der Validierung zeigt sich dabei der wichtigste Vorteil des Modells gegenüber herkömmlichen Verfahren zur Analyse der Nervenzell-Neubildung: huDCX3509-Reporterexprimierende Zellen sind ohne vorherige Immunfärbung im Gewebe detektierbar und könnten mittels FACS-Analyse leicht quantifiziert werden; anhand der Luziferase-Mäuse könnte in Zukunft die Beobachtung von Reporterexpression sogar *in vivo* am lebenden Tier möglich sein. Protokolle für dieses sogenannte *in-vivo*-Imaging sind seit einigen Jahren etabliert (Bogdanov, 2002; Contag, 2002; O'Connell-Rodwell, 2002). Hochsensible Kameratechnik erlaubt in diesen Modellen die quantitative Detektion von Luziferase-emittiertem Licht durch Gewebe und Haut der lediglich betäubten Versuchstiere hindurch. Zeitreihen können anstatt an mehreren, an einzelnen Tieren in wiederholten Messungen durchgeführt werden.

Dagegen erfordern bisher verwendete Methoden zur Erforschung der Neurogenese die Markierung neu gebildeter Zellen mit dem Thymidin-Analogon BrdU, das Tieren systemisch (intraperitoneal oder oral) verabreicht werden muss. Anschließend erfolgen aufwendige und zeitintensive immunhistochemische Färbungen und manuelles Auszählen der unter Ko-Expression spezifischer Marker neu gebildeten Zellen. Mit der Verwendung von *DCX*-Reportermäusen als Neurogenese-Evaluations-

Werkzeug könnte einerseits die vorausgehende BrdU-Markierung entfallen, andererseits brächte der Verzicht auf Immunfärbungen sowie auf das manuelle Auszählen einen bedeutenden Zeit- und Materialvorteil mit sich. Durch *in-vivo*-Imaging ließen sich darüber hinaus viele Versuchstiere einsparen.

In der Neurogenese-Forschung könnten *DCX*-Reportermäuse daneben auch noch eine andere Lücke schließen, die entstanden ist, seit BrdU-Markierung als Hinweis auf neu gebildete Zellen umstritten ist (Nowakowski, 2000; Nowakowski, 2001; Rakic, 2002b): Auch während DNA-Reparaturprozessen wird BrdU oder das alternativ verwendete, radioaktive ^3H -desoxy-Thymidin (^3H -dT) in DNA eingebaut. BrdU und ^3H -dT sollten deshalb nicht ausschließlich als Indikator für Zellteilung, sondern allgemeiner für DNA-Synthese gewertet werden, weshalb die Untersuchung von BrdU- oder ^3H -dT-Markierung allein je nach Protokoll zu falsch positiven Ergebnissen bei der Detektion neu gebildeter Zellen führen kann (Rakic, 2002a). Zelluläre Antigene wie Ki-67 oder PCNA, finden sich nur in mitotischen Zellen, erlauben aber keine Aussage über das weitere Schicksal dieser Zellen.

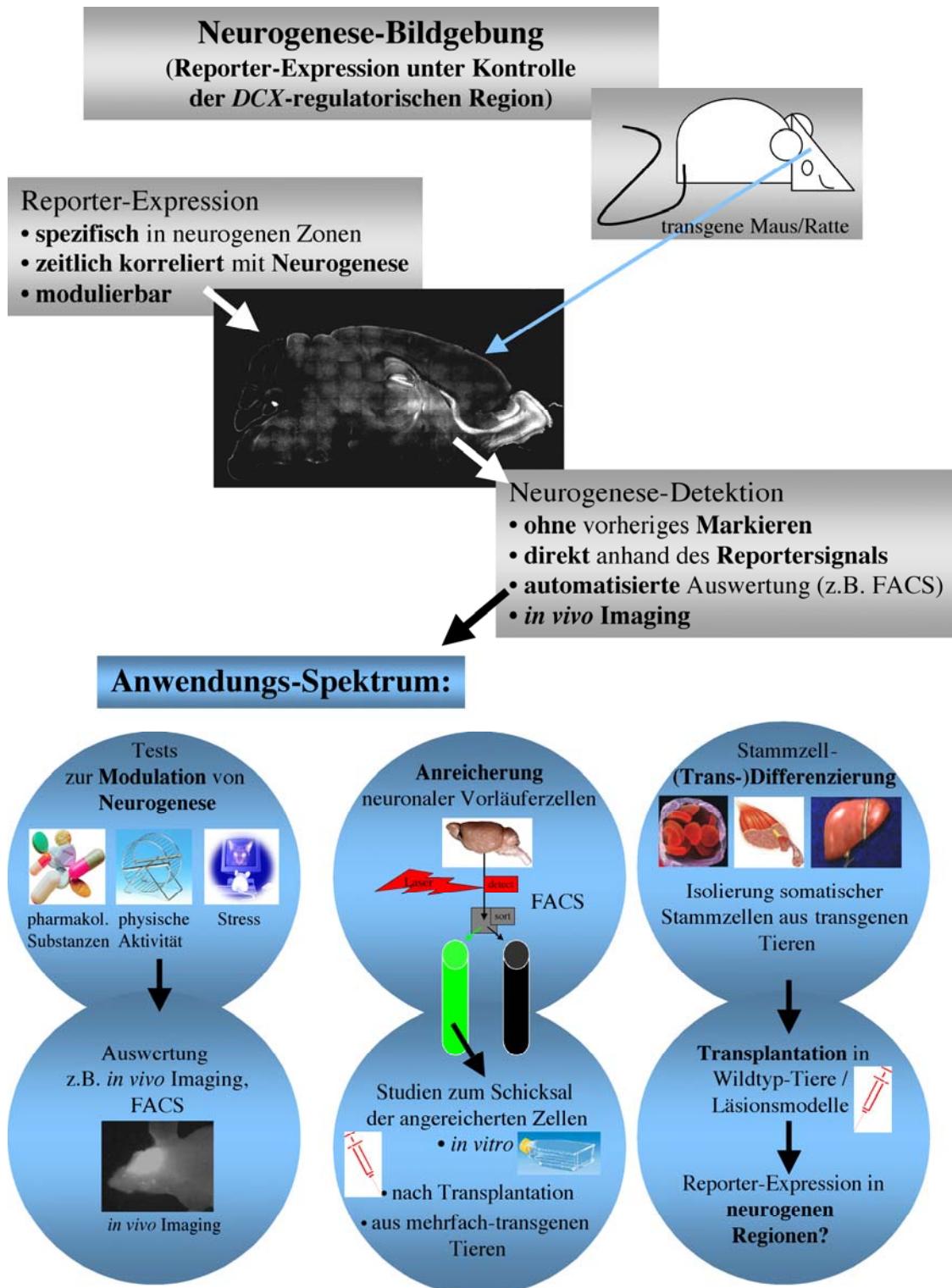
Retrovirale Vektoren zur Reporterexpression sind eine weitere Möglichkeit, um neu gebildete Zellen zu markieren, hierfür ist jedoch die vorherige Injektion viraler Partikel nötig. Anschließend integriert das virale Genom während der Zellteilung stabil ins Wirtszell-Genom, retroviral kontrollierte Reporterproteine werden während des gesamten Lebens der infizierten Zelle exprimiert, und die virale DNA wird auch an die Nachkommen der Zelle weitergegeben. Retrovirale Markierung eignet sich deshalb nur begrenzt, um die Modulation von Neurogenese zu verfolgen, insbesondere auch deshalb, weil nach viraler Infektion sowohl gliale, wie auch neuronale Zellen das Reporterprotein exprimieren (Luskin, 1994; Price, 1987; Song, 2002a; Song, 2002b; van Praag, 2002).

Doublecortin wird nicht in allen neu entstandenen Zellen exprimiert, sondern vermutlich spezifisch in den neu entstandenen Zellen, die später zu Neuronen ausdifferenzieren: DCX ist transient in neuronalen Vorläuferzellen zu finden (Brown, 2003; Rao, 2004; Steiner, 2004). Auch andere Marker sind mit diesen Vorläufern der Nervenzellen assoziiert, darunter PSA-NCAM und das Collapsin-Response-Mediator-Protein-4 (CRMP-4; Synonyme: TUC-4, TOAD-64). PSA-NCAM und CRMP-4 scheinen jedoch nicht auf diese Vorläuferzellen beschränkt zu sein; ihre Expression

beginnt nach der von DCX und dauert länger an (Seki, 2002). PSA-NCAM ist auch in adulten Neuronen während der Ausbildung neuer Synapsen exprimiert (Cremer, 2000) sowie *in vitro* in glialen Vorläufern (Ben-Hur, 1998). CRMP-4 wird nur in 50% der BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus ko-exprimiert (Cameron, 2001), im Vergleich zu den 90% BrdU-positiven Zellen, die gleichzeitig DCX in dieser Struktur exprimierten (Brown, 2003).

Um die neuronale Bestimmung DCX-bzw. EGFP-exprimierender Zellen in *DCX*-Reportermäusen über die Immunhistochemie hinaus abzusichern, wären elektrophysiologische Untersuchungen an Schnittkulturen *DCX*-transgener Mäuse sinnvoll: EGFP-exprimierende Zellen könnten anhand der Reporterexpression leicht identifiziert und auf das Vorhandensein von Aktionspotentialen oder synaptische Aktivität hin überprüft werden. Auch könnte so möglicherweise die Natur der einzelnen, Reporter-exprimierenden Zellen im Kortex der transgenen Tiere näher beschrieben werden.

Diskutiert wurden hier die bisher gemachten Beobachtungen zur Expression von Reporterprotein unter Kontrolle regulatorischer Sequenzen des *DCX*-Gens am *DCX*-transgenen Tiermodell. Demnach scheint die *DCX*-regulatorische Region in diesem Modell spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen aktiv zu sein und mit der Neuentstehung von Nervenzellen zu korrelieren. Die Reporterexpression ließ sich unter Bedingungen modulieren, die bekanntermaßen zu einer veränderten Neurogeneserate führen. In seiner Spezifität der Expression für neuronale Vorläuferzellen ist endogenes Doublecortin ein einzigartiger Marker, um Neurogenese *in vivo* zu verfolgen. Die Verwendung der *DCX*-regulatorischen Region im *DCX*-ReportermodeLL kann wegen der hier gezeigten engen Korrelation von endogenem und Reporter-Protein ein großartiges und extrem vielseitiges sowie elegantes Werkzeug sein, um in Zukunft Ablauf, Induktion und Hemmung von Neurogenese im Tiermodell zu studieren (s. Schema 6.2).



Schema 6.2. Neurogenese-Bildgebung (Reporter-Expression unter Kontrolle der DCX-regulatorischen Region). Voraussetzungen und mögliches Anwendungs-Spektrum.

Literaturverzeichnis

- Aberg, MA, Aberg, ND, Hedbacher, H, Oscarsson, J, und Eriksson, PS (2000). Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20, 2896-2903.
- Aigner, L, Fluegel, D, Dietrich, J, Ploetz, S, und Winkler, J (2000). Isolated lissencephaly sequence and double-cortex syndrome in a German family with a novel doublecortin mutation. *Neuropediatrics* 31, 195-198.
- Aigner, L, Uyanik, G, Couillard-Despres, S, Ploetz, S, Wolff, G, Morris-Rosendahl, D, Martin, P, Eckel, U, Spranger, S, Otte, J, et al. (2003). Somatic mosaicism and variable penetrance in doublecortin-associated migration disorders. *Neurology* 60, 329-332.
- Al-Bassam, J, Ozer, RS, Safer, D, Halpain, S, und Milligan, RA (2002). MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J Cell Biol* 157, 1187-1196.
- Alam, J, und Cook, JL (1990). Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem* 188, 245-254.
- Allen, RC, Zoghbi, HY, Moseley, AB, Rosenblatt, HM, und Belmont, JW (1992). Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 51, 1229-1239.
- Altman, J, und Das, GD (1965). Post-natal origin of microneurones in the rat brain. *Nature* 207, 953-956.
- Altman, J, und Das, GD (1967). Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature* 214, 1098-1101.
- Alvarez-Buylla, A (1997). Mechanism of migration of olfactory bulb interneurons. *Semin Cell Dev Biol* 8, 207-213.
- Alvarez-Buylla, A, Garcia-Verdugo, JM, und Tramontin, AD (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2, 287-293.
- Alvarez-Dolado, M, Pardal, R, Garcia-Verdugo, JM, Fike, JR, Lee, HO, Pfeffer, K, Lois, C, Morrison, SJ, und Alvarez-Buylla, A (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425, 968-973.
- Anderson, SA, Eisenstat, DD, Shi, L, und Rubenstein, JL (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* 278, 474-476.
- Andressen, C, Stocker, E, Klinz, FJ, Lenka, N, Hescheler, J, Fleischmann, B, Arnhold, S, und Addicks, K (2001). Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation. *Stem Cells* 19, 419-424.
- Angevine, JB, und Sidman, RL (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in mouse. *Nature* 192, 766-769.
- Arsenijevic, Y, Villemure, JG, Brunet, JF, Bloch, JJ, Deglon, N, Kostic, C, Zurn, A, und Aebsischer, P (2001). Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain. *Exp Neurol* 170, 48-62.
- Arvidsson, A, Collin, T, Kirik, D, Kokaia, Z, und Lindvall, O (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8, 963-970.
- Bai, J, Ramos, RL, Ackman, JB, Thomas, AM, Lee, RV, und LoTurco, JJ (2003). RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci* 6, 1277-1283.
- Barkovich, AJ, Guerrini, R, Battaglia, G, Kalifa, G, N'Guyen, T, Parmeggiani, A, Santucci, M, Giovanardi-Rossi, P, Granata, T, und D'Incerti, L (1994). Band heterotopia: correlation of outcome with magnetic resonance imaging parameters. *Ann Neurol* 36, 609-617.
- Beltran-Valero de Bernabe, D, Currier, S, Steinbrecher, A, Celli, J, van Beusekom, E, van der Zwaag, B, Kayserili, H, Merlini, L, Chitayat, D, Dobyns, WB, et al. (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.

- Ben-Hur, T, Register, B, Murray, K, Rougon, G, und Dubois-Dalcq, M (1998). Growth and fate of PSA-NCAM+ precursors of the postnatal brain. *J Neurosci* 18, 5777-5788.
- Benfante, R, Antonini, RA, Vaccari, M, Flora, A, Chen, F, Clementi, F, und Fornasari, D (2004). The expression of the human neuronal alpha3 Na⁺,K⁺-ATPase subunit gene is regulated by the activity of the Sp1 and NF-Y transcription factors. *Biochem J*.
- Biebl, M, Cooper, CM, Winkler, J, und Kuhn, HG (2000). Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 291, 17-20.
- Bogdanov, A, und Weissleder, R (2002). In vivo imaging of gene delivery and expression. *Trends Biotechnol* 20, S11-18.
- Brazelton, TR, Rossi, FM, Keshet, GI, und Blau, HM (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290, 1775-1779.
- Brown, JP, Couillard-Despres, S, Cooper-Kuhn, CM, Winkler, J, Aigner, L, und Kuhn, HG (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467, 1-10.
- Burgess, HA, Martinez, S, und Reiner, O (1999). KIAA0369, doublecortin-like kinase, is expressed during brain development. *J Neurosci Res* 58, 567-575.
- Butefisch, CM (2004). Plasticity in the human cerebral cortex: lessons from the normal brain and from stroke. *Neuroscientist* 10, 163-173.
- Butler, JE, und Kadonaga, JT (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 16, 2583-2592.
- Caceres, A, Mautino, J, und Kosik, KS (1992). Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* 9, 607-618.
- Cameron, HA, und McKay, RD (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435, 406-417.
- Carmo-Fonseca, M (2002). The contribution of nuclear compartmentalization to gene regulation. *Cell* 108, 513-521.
- Carpenter, MK, Cui, X, Hu, ZY, Jackson, J, Sherman, S, Seiger, A, und Wahlberg, LU (1999). In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Exp Neurol* 158, 265-278.
- Caspi, M, Atlas, R, Kantor, A, Sapir, T, und Reiner, O (2000). Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Hum Mol Genet* 9, 2205-2213.
- Castro, RF, Jackson, KA, Goodell, MA, Robertson, CS, Liu, H, und Shine, HD (2002). Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science* 297, 1299.
- Caviness, VS, Jr. (1973). Time of neuron origin in the hippocampus and dentate gyrus of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *J Comp Neurol* 151, 113-120.
- Caviness, VS, Jr., Takahashi, T, und Nowakowski, RS (1995). Numbers, time and neocortical neurogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci* 18, 379-383.
- Cheng, L, Jin, Z, Liu, L, Yan, Y, Li, T, Zhu, X, und Jing, N (2004). Characterization and promoter analysis of the mouse nestin gene. *FEBS Lett* 565, 195-202.
- Cogle, CR, Yachnis, AT, Laywell, ED, Zander, DS, Wingard, JR, Steindler, DA, und Scott, EW (2004). Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. *Lancet* 363, 1432-1437.
- Colombo, E, Galli, R, Cossu, G, Gecz, J, und Broccoli, V (2004). Mouse orthologue of ARX, a gene mutated in several X-linked forms of mental retardation and epilepsy, is a marker of adult neural stem cells and forebrain GABAergic neurons. *Dev Dyn*.
- Contag, CH, und Ross, BD (2002). It's not just about anatomy: in vivo bioluminescence imaging as an eyepiece into biology. *J Magn Reson Imaging* 16, 378-387.
- Cooper-Kuhn, CM, Vroemen, M, Brown, J, Ye, H, Thompson, MA, Winkler, J, und Kuhn, HG (2002). Impaired adult neurogenesis in mice lacking the transcription factor E2F1. *Mol Cell Neurosci* 21, 312-323.

- Coquelle, FM, Caspi, M, Cordelieres, FP, Dompierre, JP, Dujardin, DL, Koifman, C, Martin, P, Hoogenraad, CC, Akhmanova, A, Galjart, N, et al. (2002). LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway. *Mol Cell Biol* 22, 3089-3102.
- Corbo, JC, Deuel, TA, Long, JM, LaPorte, P, Tsai, E, Wynshaw-Boris, A, und Walsh, CA (2002). Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. *J Neurosci* 22, 7548-7557.
- Cosma, MP (2002). Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol Cell* 10, 227-236.
- Couillard-Despres, S, Winkler, J, Uyanik, G, und Aigner, L (2001). Molecular mechanisms of neuronal migration disorders, quo vadis? *Curr Mol Med* 1, 677-688.
- Cremer, H, Chazal, G, Lledo, PM, Rougon, G, Montaron, MF, Mayo, W, Le Moal, M, und Abrous, DN (2000). PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity. *Int J Dev Neurosci* 18, 213-220.
- Csink, AK, und Henikoff, S (1996). Genetic modification of heterochromatic association and nuclear organization in *Drosophila*. *Nature* 381, 529-531.
- Czeh, B, Welt, T, Fischer, AK, Erhardt, A, Schmitt, W, Muller, MB, Toschi, N, Fuchs, E, und Keck, ME (2002). Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 52, 1057-1065.
- D'Agostino, MD, Bernasconi, A, Das, S, Bastos, A, Valerio, RM, Palmini, A, Costa da Costa, J, Scheffer, IE, Berkovic, S, Guerrini, R, et al. (2002). Subcortical band heterotopia (SBH) in males: clinical, imaging and genetic findings in comparison with females. *Brain* 125, 2507-2522.
- Dash, PK, Mach, SA, und Moore, AN (2001). Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 63, 313-319.
- Davey, MR, Blackhall, NW, und Power, JB (1995). Chloramphenicol acetyl transferase assay. *Methods Mol Biol* 49, 143-148.
- Dehmelt, L, und Halpain, S (2004). Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J Neurobiol* 58, 18-33.
- Demelas, L, Serra, G, Conti, M, Achene, A, Matropaoolo, C, Matsumoto, N, Dudicek, LL, Mills, PL, Dobyns, WB, Ledbetter, DH, und Das, S (2001). Incomplete penetrance with normal MRI in a woman with germline mutation of the DCX gene. *Neurology* 2, 327-330.
- Dent, EW, und Kalil, K (2001). Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. *J Neurosci* 21, 9757-9769.
- des Portes, V, Francis, F, Pinard, JM, Desguerre, I, Moutard, ML, Snoeck, I, Meiners, LC, Capron, F, Cusmai, R, Ricci, S, et al. (1998a). doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum Mol Genet* 7, 1063-1070.
- des Portes, V, Pinard, JM, Billuart, P, Vinet, MC, Koulakoff, A, Carrie, A, Gelot, A, Dupuis, E, Motte, J, Berwald-Netter, Y, et al. (1998b). A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell* 92, 51-61.
- Dobyns, WB, Berry-Kravis, E, Havnerick, NJ, Holden, KR, und Viskochil, D (1999). X-linked lissencephaly with absent corpus callosum and ambiguous genitalia. *Am J Med Genet* 86, 331-337.
- Dobyns, WB, Reiner, O, Carrozzo, R, und Ledbetter, DH (1993). Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *Jama* 270, 2838-2842.
- Doetsch, F, und Alvarez-Buylla, A (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14895-14900.
- Doetsch, F, Caille, I, Lim, DA, Garcia-Verdugo, JM, und Alvarez-Buylla, A (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.
- Duman, RS, Heninger, GR, und Nestler, EJ (1997). A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 54, 597-606.

- Eberharter, A, und Becker, PB (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* 3, 224-229.
- Engelhardt, M, Wachs, FP, Couillard-Despres, S, und Aigner, L (2004). The neurogenic competence of progenitors from the postnatal rat retina in vitro. *Exp Eye Res* *in press*.
- Enwere, E, Shingo, T, Gregg, C, Fujikawa, H, Ohta, S, und Weiss, S (2004). Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci* 24, 8354-8365.
- Fang, TC, Alison, MR, Wright, NA, und Poulsom, R (2004). Adult stem cell plasticity: will engineered tissues be rejected? *Int J Exp Pathol* 85, 115-124.
- Farah, S, Sabry, MA, Khurabiet, A, Khaffagi, S, Rudwan, M, Hassan, M, Haseeb, N, Abulhassan, S, Abdel-Rasool, MA, Elgamal, S, et al. (1997). Lissencephaly associated with cerebellar hypoplasia and myoclonic epilepsy in a Bedouin kindred: a new syndrome? *Clin Genet* 51, 326-330.
- Faulkner, NE, Dujardin, DL, Tai, CY, Vaughan, KT, O'Connell, CB, Wang, Y, und Vallee, RB (2000). A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol* 2, 784-791.
- Felgner, PL, Gadek, TR, Holm, M, Roman, R, Chan, HW, Wenz, M, Northrop, JP, Ringold, GM, und Danielsen, M (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7413-7417.
- Feng, Y, Olson, EC, Stukenberg, PT, Flanagan, LA, Kirschner, MW, und Walsh, CA (2000). LIS1 regulates CNS lamination by interacting with mNudE, a central component of the centrosome. *Neuron* 28, 665-679.
- Ford, SR, Buck, LM, und Leach, FR (1995). Does the sulphydryl or the adenine moiety of CoA enhance firefly luciferase activity? *Biochim Biophys Acta* 1252, 180-184.
- Fox, JW, Lamperti, ED, Eksioglu, YZ, Hong, SE, Feng, Y, Graham, DA, Scheffer, IE, Dobyns, WB, Hirsch, BA, Radtke, RA, et al. (1998). Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 21, 1315-1325.
- Fox, JW, und Walsh, CA (1999). Periventricular heterotopia and the genetics of neuronal migration in the cerebral cortex. *Am J Hum Genet* Jul;65(1), 19-24.
- Francis, F, Koulakoff, A, Boucher, D, Chafey, P, Schaar, B, Vinet, MC, Friocourt, G, McDonnell, N, Reiner, O, Kahn, A, et al. (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 23, 247-256.
- Friocourt, G, Chafey, P, Billuart, P, Koulakoff, A, Vinet, MC, Schaar, BT, McConnell, SK, Francis, F, und Chelly, J (2001). Doublecortin interacts with mu subunits of clathrin adaptor complexes in the developing nervous system. *Mol Cell Neurosci* 18, 307-319.
- Friocourt, G, Koulakoff, A, Chafey, P, Boucher, D, Fauchereau, F, Chelly, J, und Francis, F (2003). Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cereb Cortex* 13, 620-626.
- Frisen, J, Johansson, CB, Torok, C, Risling, M, und Lendahl, U (1995). Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol* 131, 453-464.
- Fukuyama, Y, Osawa, M, und Suzuki, H (1981). Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama type - clinical, genetic and pathological considerations. *Brain Dev* 3, 1-29.
- Gage, FH (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438.
- Galas, DJ, und Schmitz, A (1978). DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res* 5, 3157-3170.
- Gangemi, RM, Perera, M, und Corte, G (2004). Regulatory genes controlling cell fate choice in embryonic and adult neural stem cells. *J Neurochem* 89, 286-306.
- Gdalyahu, A, Ghosh, I, Levy, T, Sapir, T, Sapoznik, S, Fishler, Y, Azoulai, D, und Reiner, O (2004). DCX, a new mediator of the JNK pathway. *Embo J* 23, 823-832.

- Ge, YW, Ghosh, C, Song, W, Maloney, B, und Lahiri, DK (2004). Mechanism of promoter activity of the beta-amyloid precursor protein gene in different cell lines: identification of a specific 30 bp fragment in the proximal promoter region. *J Neurochem* 90, 1432-1444.
- Gelot, A, Billette de Villemeur, T, Bordarier, C, Ruchoux, MM, Moraine, C, und Ponsot, G (1995). Developmental aspects of type II lissencephaly. Comparative study of dysplastic lesions in fetal and post-natal brains. *Acta Neuropathol (Berl)* 89, 72-84.
- Gleeson, JG (2000a). Classical lissencephaly and double cortex (subcortical band heterotopia): LIS1 and doublecortin [In Process Citation]. *Curr Opin Neurol* 13, 121-125.
- Gleeson, JG, Allen, KM, Fox, JW, Lamperti, ED, Berkovic, S, Scheffer, I, Cooper, EC, Dobyns, WB, Minnerath, SR, Ross, ME, und Walsh, CA (1998). Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* 92, 63-72.
- Gleeson, JG, Lin, PT, Flanagan, LA, und Walsh, CA (1999a). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23, 257-271.
- Gleeson, JG, Luo, RF, Grant, PE, Guerrini, R, Huttenlocher, PR, Berg, MJ, Ricci, S, Cusmai, R, Wheless, JW, Berkovic, S, et al. (2000b). Genetic and neuroradiological heterogeneity of double cortex syndrome. *Ann Neurol* 47, 265-269.
- Gleeson, JG, Minnerath, S, Kuzniecky, RI, Dobyns, WB, Young, ID, Ross, ME, und Walsh, CA (2000c). Somatic and germline mosaic mutations in the doublecortin gene are associated with variable phenotypes. *Am J Hum Genet* 67, 574-581.
- Gleeson, JG, Minnerath, SR, Fox, JW, Allen, KM, Luo, RF, Hong, SE, Berg, MJ, Kuzniecky, R, Reitnauer, PJ, Borgatti, R, et al. (1999b). Characterization of mutations in the gene doublecortin in patients with double cortex syndrome. *Ann Neurol* 45, 146-153.
- Gloster, A, Wu, W, Speelman, A, Weiss, S, Causing, C, Pozniak, C, Reynolds, B, Chang, E, Toma, JG, und Miller, FD (1994). The T alpha 1 alpha-tubulin promoter specifies gene expression as a function of neuronal growth and regeneration in transgenic mice. *J Neurosci* 14, 7319-7330.
- Goedert, M, Crowther, RA, und Garner, CC (1991). Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends Neurosci* 14, 193-199.
- Gonczy, P, Bellanger, JM, Kirkham, M, Pozniakowski, A, Baumer, K, Phillips, JB, und Hyman, AA (2001). zyg-8, a gene required for spindle positioning in *C. elegans*, encodes a doublecortin-related kinase that promotes microtubule assembly. *Dev Cell* 1, 363-375.
- Gordon, JW, und Ruddle, FH (1981). Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 214, 1244-1246.
- Gotz, M, Hartfuss, E, und Malatesta, P (2002). Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Res Bull* 57, 777-788.
- Gould, E, McEwen, BS, Tanapat, P, Galea, LAM, und Fuchs, E (1997). Neurogenesis in the Dentate Gyrus of the Adult Tree Shrew Is Regulated by Psychosocial Stress and NMDA Receptor Activation. *J Neurosci* 17, 2492-2498.
- Gould, E, Tanapat, P, Hastings, NB, und Shors, TJ (1999). Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends Cogn Sci* 3, 186-192.
- Gravel, M, Di Polo, A, Valera, PB, und Braun, PE (1998). Four-kilobase sequence of the mouse CNP gene directs spatial and temporal expression of lacZ in transgenic mice. *J Neurosci Res* 53, 393-404.
- Gray, GE, Leber, SM, und Sanes, JR (1990). Migratory patterns of clonally related cells in the developing central nervous system. *Experientia* 46, 929-940.
- Guerrini, R, Moro, F, Andermann, E, Hughes, E, D'Agostino, D, Carrozzo, R, Bernasconi, A, Flinter, F, Parmeggiani, L, Volzone, A, et al. (2003). Nonsyndromic mental retardation and cryptogenic epilepsy in women with doublecortin gene mutations. *Ann Neurol* 54, 30-37.

- Gundersen, HJ, Bendtsen, TF, Korbo, L, Marcusen, N, Moller, A, Nielsen, K, Nyengaard, JR, Pakkenberg, B, Sorensen, FB, Vesterby, A, und et al. (1988). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis* 96, 379-394.
- Gupta, A, Tsai, LH, und Wynshaw-Boris, A (2002). Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet* 3, 342-355.
- Hack, I, Bancila, M, Loulier, K, Carroll, P, und Cremer, H (2002). Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat Neurosci* 5, 939-945.
- Hadjantonakis, AK, Dickinson, ME, Fraser, SE, und Papaioannou, VE (2003). Technicolour transgenics: imaging tools for functional genomics in the mouse. *Nat Rev Genet* 4, 613-625.
- Hadjantonakis, AK, und Nagy, A (2001). The color of mice: in the light of GFP-variant reporters. *Histochem Cell Biol* 115, 49-58.
- Hahn, S (2004). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* 11, 394-403.
- Harada, A, Teng, J, Takei, Y, Oguchi, K, und Hirokawa, N (2002). MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J Cell Biol* 158, 541-549.
- Hartfuss, E, Forster, E, Bock, HH, Hack, MA, Leprince, P, Luque, JM, Herz, J, Frotscher, M, und Gotz, M (2003). Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. *Development* 130, 4597-4609.
- Hatten, ME, und Mason, CA (1990). Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia* 46, 907-916.
- Hattori, M, Adachi, H, Tsujimoto, M, Arai, H, und Inoue, K (1994). Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase [corrected]. *Nature* 370, 216-218.
- Haubensak, W, Attardo, A, Denk, W, und Huttner, WB (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3196-3201.
- Heicklen-Klein, A, und Ginzburg, I (2000). Tau promoter confers neuronal specificity and binds Sp1 and AP-2. *J Neurochem* 75, 1408-1418.
- Heins, N, Malatesta, P, Cecconi, F, Nakafuku, M, Tucker, KL, Hack, MA, Chapouton, P, Barde, YA, und Gotz, M (2002). Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci* 5, 308-315.
- Hirokawa, N (1994). Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6, 74-81.
- Hirokawa, N, Hisanaga, S, und Shiomura, Y (1988). MAP2 is a component of crossbridges between microtubules and neurofilaments in the neuronal cytoskeleton: quick-freeze, deep-etch immunoelectron microscopy and reconstitution studies. *J Neurosci* 8, 2769-2779.
- Hirotsune, S, Fleck, MW, Gambello, MJ, Bix, GJ, Chen, A, Clark, GD, Ledbetter, DH, McBain, CJ, und Wynshaw-Boris, A (1998). Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat Genet* 19, 333-339.
- Hong, SE, Shugart, YY, Huang, DT, Shahwan, SA, Grant, PE, Hourihane, JO, Martin, ND, und Walsh, CA (2000). Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations [In Process Citation]. *Nat Genet* 26, 93-96.
- Horesh, D, Sapir, T, Francis, F, Wolf, SG, Caspi, M, Elbaum, M, Chelly, J, und Reiner, O (1999). Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum Mol Genet* 8, 1599-1610.
- Horwitz, AR, und Parsons, JT (1999). Cell migration--movin' on. *Science* 286, 1102-1103.
- Hourihane, JO, Bennett, CP, Chaudhuri, R, Robb, SA, und Martin, ND (1993). A sibship with a neuronal migration defect, cerebellar hypoplasia and congenital lymphedema. *Neuropediatrics* 24, 43-46.
- Hsieh, J, und Gage, FH (2004). Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr Opin Genet Dev* 14, 461-469.

- Hu, H (2000). Polysialic acid regulates chain formation by migrating olfactory interneuron precursors. *J Neurosci Res* 61, 480-492.
- Huang, L, Hofer, F, Martin, GS, und Kim, SH (1998). Structural basis for the interaction of Ras with RalGDS. *Nat Struct Biol* 5, 422-426.
- Huttenlocher, PR, Taravath, S, und Mojtahebi, S (1994). Periventricular heterotopia and epilepsy. *Neurology* 44, 51-55.
- Ingber, DE (1993). Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J Cell Sci* 104 (Pt 3), 613-627.
- Jang, YK, Park, JJ, Lee, MC, Yoon, BH, Yang, YS, Yang, SE, und Kim, SU (2004). Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. *J Neurosci Res* 75, 573-584.
- Jellinger, K, und Rett, A (1976). Agyria-pachygyria (lissencephaly syndrome). *Neuropadiatrie* 7, 66-91.
- Jiang, W, Gu, W, Brannstrom, T, Rosqvist, R, und Wester, P (2001). Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 32, 1201-1207.
- Jiang, Y, Henderson, D, Blackstad, M, Chen, A, Miller, RF, und Verfaillie, CM (2003). Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1, 11854-11860.
- Jin, K, Minami, M, Lan, JQ, Mao, XO, Batteur, S, Simon, RP, und Greenberg, DA (2001). Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4710-4715.
- Jin, K, Sun, Y, Xie, L, Peel, A, Mao, XO, Batteur, S, und Greenberg, DA (2003). Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol Cell Neurosci* 24, 171-189.
- Jin, K, Zhu, Y, Sun, Y, Mao, XO, Xie, L, und Greenberg, DA (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11946-11950.
- Kato, M, Kanai, M, Soma, O, Takusa, Y, Kimura, T, Numakura, C, Matsuki, T, Nakamura, S, und Hayasaka, K (2001). Mutation of the doublecortin gene in male patients with double cortex syndrome: somatic mosaicism detected by hair root analysis. *Ann Neurol* 50, 547-551.
- Kato, M, Kimura, T, Lin, C, Ito, A, Kodama, S, Morikawa, T, Soga, T, und Hayasaka, K (1999). A novel mutation of the doublecortin gene in Japanese patients with X-linked lissencephaly and subcortical band heterotopia. *Hum Genet* 104, 341-344.
- Kato, T, Yokouchi, K, Kawagishi, K, Fukushima, N, Miwa, T, und Moriizumi, T (2000). Fate of newly formed periglomerular cells in the olfactory bulb. *Acta Otolaryngol* 120, 876-879.
- Kawaguchi, A, Miyata, T, Sawamoto, K, Takashita, N, Murayama, A, Akamatsu, W, Ogawa, M, Okabe, M, Tano, Y, Goldman, SA, und Okano, H (2001). Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. *Mol Cell Neurosci* 17, 259-273.
- Kempermann, G (2002). Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 22, 635-638.
- Kempermann, G, Brandon, EP, und Gage, FH (1998). Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol* 8, 939-942.
- Kempermann, G, Jessberger, S, Steiner, B, und Kronenberg, G (2004a). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27, 447-452.
- Kempermann, G, Kuhn, HG, und Gage, FH (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493-495.
- Kempermann, G, Wiskott, L, und Gage, FH (2004b). Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 14, 186-191.

- Kim, MH, Cierpicki, T, Derewenda, U, Krowarsch, D, Feng, Y, Devedjiev, Y, Dauter, Z, Walsh, CA, Otlewski, J, Bushweller, JH, und Derewenda, ZS (2003). The DCX-domain tandems of doublecortin and doublecortin-like kinase. *Nat Struct Biol* 10, 324-333.
- Kitamura, K, Yanazawa, M, Sugiyama, N, Miura, H, Iizuka-Kogo, A, Kusaka, M, Omichi, K, Suzuki, R, Kato-Fukui, Y, Kamiirisa, K, et al. (2002). Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat Genet* 32, 359-369.
- Kizhatil, K, Wu, YX, Sen, A, und Bennett, V (2002). A new activity of doublecortin in recognition of the phospho-FIGQY tyrosine in the cytoplasmic domain of neurofascin. *J Neurosci* 22, 7948-7958.
- Krause, DS, Theise, ND, Collector, MI, Henegariu, O, Hwang, S, Gardner, R, Neutzel, S, und Sharkis, SJ (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-377.
- Kronenberg, G, Reuter, K, Steiner, B, Brandt, MD, Jessberger, S, Yamaguchi, M, und Kempermann, G (2003). Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol* 467, 455-463.
- Kuhn, HG, Dickinson-Anson, H, und Gage, FH (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16, 2027-2033.
- Kuhn, HG, Winkler, J, Kempermann, G, Thal, LJ, und Gage, FH (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17, 5820-5829.
- Lee, TI, und Young, RA (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* 34, 77-137.
- Lei, Y, und Warrior, R (2000). The drosophila lissencephaly1 (DLis1) gene is required for nuclear migration [In Process Citation]. *Dev Biol* 226, 57-72.
- Lendahl, U, Zimmerman, LB, und McKay, RD (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-595.
- Lenka, N, Lu, ZJ, Sasse, P, Hescheler, J, und Fleischmann, BK (2002). Quantitation and functional characterization of neural cells derived from ES cells using nestin enhancer-mediated targeting in vitro. *J Cell Sci* 115, 1471-1485.
- Leventer, RJ, Pilz, DT, Matsumoto, N, Ledbetter, DH, und Dobyns, WB (2000). Lissencephaly and subcortical band heterotopia: molecular basis and diagnosis. *Mol Med Today* 6, 277-284.
- Li, X, und Noll, M (1994a). Compatibility between enhancers and promoters determines the transcriptional specificity of gooseberry and gooseberry neuro in the Drosophila embryo. *Embo J* 13, 400-406.
- Li, X, Zhao, X, Fang, Y, Jiang, X, Duong, T, Fan, C, Huang, CC, und Kain, SR (1998). Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem* 273, 34970-34975.
- Li, Y, Flanagan, PM, Tschochner, H, und Kornberg, RD (1994b). RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science* 263, 805-807.
- Lichtig, C, Ludatscher, RM, Mandel, H, und Gershoni-Baruch, R (1993). Muscle involvement in Walker-Warburg syndrome. Clinicopathologic features of four cases. *Am J Clin Pathol* 100, 493-496.
- Lin, CH, Espreafico, EM, Mooseker, MS, und Forscher, P (1996). Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron* 16, 769-782.
- Lin, PT, Gleeson, JG, Corbo, JC, Flanagan, L, und Walsh, CA (2000). DCAMKL1 encodes a protein kinase with homology to doublecortin that regulates microtubule polymerization. *J Neurosci* 20, 9152-9161.
- Liu, J, Solway, K, Messing, RO, und Sharp, FR (1998). Increased Neurogenesis in the Dentate Gyrus After Transient Global Ischemia in Gerbils. *J Neurosci* 18, 7768-7778.

- Liu, M, Pleasure, SJ, Collins, AE, Noebels, JL, Naya, FJ, Tsai, MJ, und Lowenstein, DH (2000a). Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 865-870.
- Liu, Z, Steward, R, und Luo, L (2000b). Drosophila Lis1 is required for neuroblast proliferation, dendritic elaboration and axonal transport. *Nat Cell Biol* 2, 776-783.
- Lois, C, und Alvarez-Buylla, A (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145-1148.
- Lois, C, Garcia-Verdugo, JM, und Alvarez-Buylla, A (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271, 978-981.
- Luo, L (2002). Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 601-635.
- Luskin, MB (1993a). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11, 173-189.
- Luskin, MB (1994). Neuronal cell lineage in the vertebrate central nervous system. *Faseb J* 8, 722-730.
- Luskin, MB, Parnavelas, JG, und Barfield, JA (1993b). Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat cerebral cortex originate from separate progenitor cells: an ultrastructural analysis of clonally related cells. *J Neurosci* 13, 1730-1750.
- Magavi, SS, Leavitt, BR, und Macklis, JD (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405, 951-955.
- Malatesta, P, Hack, MA, Hartfuss, E, Kettenmann, H, Klinkert, W, Kirchhoff, F, und Gotz, M (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37, 751-764.
- Malatesta, P, Hartfuss, E, und Gotz, M (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127, 5253-5263.
- Malberg, JE, und Duman, RS (2003). Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropharmacology* 28, 1562-1571.
- Malberg, JE, Eisch, AJ, Nestler, EJ, und Duman, RS (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20, 9104-9110.
- Marin, O, und Rubenstein, JL (2001a). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2, 780-790.
- Marin, O, Yaron, A, Bagri, A, Tessier-Lavigne, M, und Rubenstein, JL (2001b). Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 293, 872-875.
- Marin-Padilla, M (1978). Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat Embryol (Berl)* 152, 109-126.
- Maruyama, K, und Sugano, S (1994). Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* 138, 171-174.
- Matsumoto, N, Leventer, RJ, Kuc, JA, Mewborn, SK, Dudlicek, LL, Ramocki, MB, Pilz, DT, Mills, PL, Das, S, Ross, ME, et al. (2001). Mutation analysis of the DCX gene and genotype/phenotype correlation in subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet* 9, 5-12.
- McEvilly, RJ, de Diaz, MO, Schonemann, MD, Hooshmand, F, und Rosenfeld, MG (2002). Transcriptional regulation of cortical neuron migration by POU domain factors. *Science* 295, 1528-1532.
- McPherson, JD, Marra, M, Hillier, L, Waterston, RH, Chinwalla, A, Wallis, J, Sekhon, M, Wylie, K, Mardis, ER, Wilson, RK, et al. (2001). A physical map of the human genome. *Nature* 409, 934-941.
- Merli, C, Bergstrom, DE, Cygan, JA, und Blackman, RK (1996). Promoter specificity mediates the independent regulation of neighboring genes. *Genes Dev* 10, 1260-1270.
- Metin, C, und Godement, P (1996). The ganglionic eminence may be an intermediate target for corticofugal and thalamocortical axons. *J Neurosci* 16, 3219-3235.

- Meyer, G, Perez-Garcia, CG, und Gleeson, JG (2002). Selective expression of doublecortin and LIS1 in developing human cortex suggests unique modes of neuronal movement. *Cereb Cortex* 12, 1225-1236.
- Meyer, G, Schaaps, JP, Moreau, L, und Goffinet, AM (2000). Embryonic and early fetal development of the human neocortex. *J Neurosci* 20, 1858-1868.
- Mezey, E, Chandross, KJ, Harta, G, Maki, RA, und McKercher, SR (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290, 1779-1782.
- Mizuguchi, M, Qin, J, Yamada, M, Ikeda, K, und Takashima, S (1999). High expression of doublecortin and KIAA0369 protein in fetal brain suggests their specific role in neuronal migration. *Am J Pathol* 155, 1713-1721.
- Monje, ML, Toda, H, und Palmer, TD (2003). Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302, 1760-1765.
- Moores, CA, Perderiset, M, Francis, F, Chelly, J, Houdusse, A, und Milligan, RA (2004). Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Mol Cell* 14, 833-839.
- Murase, S, und Horwitz, AF (2002). Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J Neurosci* 22, 3568-3579.
- Nadarajah, B, Brunstrom, JE, Grutzendler, J, Wong, RO, und Pearlman, AL (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4, 143-150.
- Nadarajah, B, und Parnavelas, JG (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3, 423-432.
- Nakatomi, H, Kurisu, T, Okabe, S, Yamamoto, S, Hatano, O, Kawahara, N, Tamura, A, Kirino, T, und Nakafuku, M (2002). Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110, 429.
- Nowakowski, RS, und Hayes, NL (2000). New neurons: extraordinary evidence or extraordinary conclusion? *Science* 288, 771.
- Nowakowski, RS, und Hayes, NL (2001). Stem cells: the promises and pitfalls. *Neuropsychopharmacology* 25, 799-804.
- Nunes, MC, Roy, NS, Keyoung, HM, Goodman, RR, McKhann, G, 2nd, Jiang, L, Kang, J, Nedergaard, M, und Goldman, SA (2003). Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med* 9, 439-447.
- O'Connell-Rodwell, CE, Burns, SM, Bachmann, MH, und Contag, CH (2002). Bioluminescent indicators for in vivo measurements of gene expression. *Trends Biotechnol* 20, S19-23.
- O'Rourke, NA, Sullivan, DP, Kaznowski, CE, Jacobs, AA, und McConnell, SK (1995). Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Development* 121, 2165-2176.
- Oppenheim, RW (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14, 453-501.
- Ostenfeld, T, und Svendsen, CN (2004). Requirement for neurogenesis to proceed through the division of neuronal progenitors following differentiation of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2-responsive human neural stem cells. *Stem Cells* 22, 798-811.
- Overstreet, LS, Hentges, ST, Bumaschny, VF, de Souza, FS, Smart, JL, Santangelo, AM, Low, MJ, Westbrook, GL, und Rubinstein, M (2004). A transgenic marker for newly born granule cells in dentate gyrus. *J Neurosci* 24, 3251-3259.
- Ozer, RS, und Halpain, S (2000). Phosphorylation-dependent localization of microtubule-associated protein MAP2c to the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 11, 3573-3587.
- Palmini, A, Andermann, F, Aicardi, J, Dulac, O, Chaves, F, Ponsot, G, Pinard, JM, Goutieres, F, Livingston, J, Tampieri, D, und et al. (1991). Diffuse cortical dysplasia, or the 'double cortex' syndrome: the clinical and epileptic spectrum in 10 patients. *Neurology* 41, 1656-1662.
- Parent, JM, Valentin, VV, und Lowenstein, DH (2002). Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway. *J Neurosci* 22, 3174-3188.

- Parent, JM, Yu, TW, Leibowitz, RT, Geschwind, DH, Sloviter, RS, und Lowenstein, DH (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17, 3727-3738.
- Parnavelas, JG (2000). The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci* 23, 126-131.
- Petreanu, L, und Alvarez-Buylla, A (2002). Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 22, 6106-6113.
- Picard-Riera, N, Nait-Oumesmar, B, und Baron-Van Evercooren, A (2004). Endogenous adult neural stem cells: limits and potential to repair the injured central nervous system. *J Neurosci Res* 76, 223-231.
- Pilz, DT, Kuc, J, Matsumoto, N, Bodurtha, J, Bernadi, B, Tassinari, CA, Dobyns, WB, und Ledbetter, DH (1999). Subcortical band heterotopia in rare affected males can be caused by missense mutations in DCX (XLIS) or LIS1. *Hum Mol Genet* 8, 1757-1760.
- Pilz, DT, Matsumoto, N, Minnerath, S, Mills, P, Gleeson, JG, Allen, KM, Walsh, CA, Barkovich, AJ, Dobyns, WB, Ledbetter, DH, und Ross, ME (1998). LIS1 and XLIS (DCX) mutations cause most classical lissencephaly, but different patterns of malformation. *Hum Mol Genet* 7, 2029-2037.
- Poolos, NP, Das, S, Clark, GD, Lardizabal, D, Noebels, JL, Wyllie, E, und Dobyns, WB (2002). Males with epilepsy, complete subcortical band heterotopia, and somatic mosaicism for DCX. *Neurology* 58, 1559-1562.
- Popov, S, Brown, A, und Poo, MM (1993). Forward plasma membrane flow in growing nerve processes. *Science* 259, 244-246.
- Powell, EM, Mars, WM, und Levitt, P (2001). Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon. *Neuron* 30, 79-89.
- Prang, P, Del Turco, D, und Kapfhammer, JP (2001). Regeneration of entorhinal fibers in mouse slice cultures is age dependent and can be stimulated by NT-4, GDNF, and modulators of G-proteins and protein kinase C. *Exp Neurol* 169, 135-147.
- Prasher, DC, Eckenrode, VK, Ward, WW, Prendergast, FG, und Cormier, MJ (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233.
- Price, J, Turner, D, und Cepko, C (1987). Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 156-160.
- Priller, J, Flugel, A, Wehner, T, Boentert, M, Haas, CA, Prinz, M, Fernandez-Klett, F, Prass, K, Bechmann, I, de Boer, BA, et al. (2001a). Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 7, 1356-1361.
- Priller, J, Persons, DA, Klett, FF, Kempermann, G, Kreutzberg, GW, und Dirnagl, U (2001b). Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J Cell Biol* 155, 733-738.
- Qin, J, Mizuguchi, M, Itoh, M, und Takashima, S (2000). Immunohistochemical expression of doublecortin in the human cerebrum: comparison of normal development and neuronal migration disorders. *Brain Res* 863, 225-232.
- Raineteau, O, Rietschin, L, Gradwohl, G, Guillemot, F, und Gahwiler, BH (2004). Neurogenesis in hippocampal slice cultures. *Mol Cell Neurosci* 26, 241-250.
- Rakic, P (1971). Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res* 33, 471-476.
- Rakic, P (2002a). Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci* 22, 614-618.
- Rakic, P (2002b). Neurogenesis in adult primates. *Prog Brain Res* 138, 3-14.
- Rao, MS, und Shetty, AK (2004). Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 19, 234-246.

- Redecker, C, Hagemann, G, Gressens, P, Evrard, P, und Witte, OW (2000). [Cortical dysgenesis. Current views on pathogenesis and pathophysiology]. *Nervenarzt* *71*, 238-248.
- Reiner, O, Carrozzo, R, Shen, Y, Wehnert, M, Faustinella, F, Dobyns, WB, Caskey, CT, und Ledbetter, DH (1993). Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* *364*, 717-721.
- Reiner, O, Gdalyahu, A, Ghosh, I, Levy, T, Sapoznik, S, Nir, R, und Sapir, T (2004). DCX's phosphorylation by not just another kinase (JNK). *Cell Cycle* *3*, 747-751.
- Rice, DS, und Curran, T (1999). Mutant mice with scrambled brains: understanding the signaling pathways that control cell positioning in the CNS. *Genes Dev* *13*, 2758-2773.
- Rice, DS, und Curran, T (2001). Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* *24*, 1005-1039.
- Rivas, RJ, und Hatten, ME (1995). Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J Neurosci* *15*, 981-989.
- Roy, NS, Wang, S, Harrison-Restelli, C, Benraiss, A, Fraser, RA, Gravel, M, Braun, PE, und Goldman, SA (1999). Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter. *J Neurosci* *19*, 9986-9995.
- Saito, K, Osawa, M, Wang, ZP, Ikeya, K, Fukuyama, Y, Kondo-Iida, E, Toda, T, Ohashi, H, Kurosawa, K, Wakai, S, und Kaneko, K (2000). Haplotype-phenotype correlation in Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Am J Med Genet* *92*, 184-190.
- Sanai, N, Tramontin, AD, Quinones-Hinojosa, A, Barbaro, NM, Gupta, N, Kunwar, S, Lawton, MT, McDermott, MW, Parsa, AT, Manuel-Garcia Verdugo, J, et al. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* *427*, 740-744.
- Santarelli, L, Saxe, M, Gross, C, Surget, A, Battaglia, F, Dulawa, S, Weisstaub, N, Lee, J, Duman, R, Arancio, O, et al. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* *301*, 805-809.
- Santavuori, P, Somer, H, Sainio, K, Rapola, J, Kruus, S, Nikitin, T, Ketonen, L, und Leisti, J (1989). Muscle-eye-brain disease (MEB). *Brain Dev* *11*, 147-153.
- Sapir, T, Elbaum, M, und Reiner, O (1997). Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *Embo J* *16*, 6977-6984.
- Sapir, T, Horesh, D, Caspi, M, Atlas, R, Burgess, HA, Wolf, SG, Francis, F, Chelly, J, Elbaum, M, Pietrovksy, S, und Reiner, O (2000). Doublecortin mutations cluster in evolutionarily conserved functional domains. *Hum Mol Genet* *9*, 703-712.
- Sawamoto, K, Yamamoto, A, Kawaguchi, A, Yamaguchi, M, Mori, K, Goldman, SA, und Okano, H (2001). Direct isolation of committed neuronal progenitor cells from transgenic mice coexpressing spectrally distinct fluorescent proteins regulated by stage-specific neural promoters. *J Neurosci Res* *65*, 220-227.
- Schaar, BT, Kinoshita, K, und McConnell, SK (2004). Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons. *Neuron* *41*, 203-213.
- Schanzer, A, Wachs, FP, Wilhelm, D, Acker, T, Cooper-Kuhn, C, Beck, H, Winkler, J, Aigner, L, Plate, KH, und Kuhn, HG (2004). Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol* *14*, 237-248.
- Scheiffele, P (2003). Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annu Rev Neurosci* *26*, 485-508.
- Schiedlmeier, B, Schmitt, R, Muller, W, Kirk, MM, Gruber, H, Mages, W, und Kirk, DL (1994). Nuclear transformation of Volvox carteri. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 5080-5084.
- Scrable, H (2002). Say when: reversible control of gene expression in the mouse by lac. *Semin Cell Dev Biol* *13*, 109-119.
- Seki, T (2002). Expression patterns of immature neuronal markers PSA-NCAM, CRMP-4 and NeuroD in the hippocampus of young adult and aged rodents. *J Neurosci Res* *70*, 327-334.

- Seki, T, und Arai, Y (1995). Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport* 6, 2479-2482.
- Seri, B, Garcia-Verdugo, JM, McEwen, BS, und Alvarez-Buylla, A (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21, 7153-7160.
- Sheng, M, und Kim, MJ (2002). Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* 298, 776-780.
- Shetty, AK, Rao, MS, Hattiangady, B, Zaman, V, und Shetty, GA (2004). Hippocampal neurotrophin levels after injury: Relationship to the age of the hippocampus at the time of injury. *J Neurosci Res.*
- Shi, Y, Chichung Lie, D, Taupin, P, Nakashima, K, Ray, J, Yu, RT, Gage, FH, und Evans, RM (2004). Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. *Nature* 427, 78-83.
- Shingo, T, Sorokan, ST, Shimazaki, T, und Weiss, S (2001). Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 21, 9733-9743.
- Sidman, RL, und Rakic, P (1973). Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res* 62, 1-35.
- Smale, ST (2001). Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes Dev* 15, 2503-2508.
- Smale, ST, und Kadonaga, JT (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72, 449-479.
- Smith, DS, Niethammer, M, Ayala, R, Zhou, Y, Gambello, MJ, Wynshaw-Boris, A, und Tsai, LH (2000). Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nat Cell Biol* 2, 767-775.
- Snyder, EY, Yoon, C, Flax, JD, und Macklis, JD (1997). Multipotent neural precursors can differentiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11663-11668.
- Song, H, Stevens, CF, und Gage, FH (2002a). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417, 39-44.
- Song, HJ, Stevens, CF, und Gage, FH (2002b). Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci* 5, 438-445.
- Sossey-Alaoui, K, Hartung, AJ, Guerrini, R, Manchester, DK, Posar, A, Puche-Mira, A, Andermann, E, Dobyns, WB, und Srivastava, AK (1998). Human doublecortin (DCX) and the homologous gene in mouse encode a putative Ca²⁺-dependent signaling protein which is mutated in human X-linked neuronal migration defects. *Hum Mol Genet* 7, 1327-1332.
- Sowell, ER, Thompson, PM, und Toga, AW (2004). Mapping changes in the human cortex throughout the span of life. *Neuroscientist* 10, 372-392.
- Squier, MV (1993). Development of the cortical dysplasia of type II lissencephaly. *Neuropathol Appl Neurobiol* 19, 209-213.
- Steiner, B, Kronenberg, G, Jessberger, S, Brandt, MD, Reuter, K, und Kempermann, G (2004). Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 46, 41-52.
- Stopponi, L, Buchs, PA, und Muller, D (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37, 173-182.
- Strausberg, RL, Feingold, EA, Grouse, LH, Derge, JG, Klausner, RD, Collins, FS, Wagner, L, Shenmen, CM, Schuler, GD, Altschul, SF, et al. (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16899-16903.
- Stuart, GJ, Dodt, HU, und Sakmann, B (1993). Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflugers Arch* 423, 511-518.

- Sullivan, LS, Heckenlively, JR, Bowne, SJ, Zuo, J, Hide, WA, Gal, A, Denton, M, Inglehearn, CF, Blanton, SH, und Daiger, SP (1999). Mutations in a novel retina-specific gene cause autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 22, 255-259.
- Tai, CY, Dujardin, DL, Faulkner, NE, und Vallee, RB (2002). Role of dynein, dynactin, and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function. *J Cell Biol* 156, 959-968.
- Takahashi, T, Nowakowski, RS, und Caviness, VS, Jr. (1996). Interkinetic and migratory behavior of a cohort of neocortical neurons arising in the early embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci* 16, 5762-5776.
- Tanaka, T, Serneo, FF, Tseng, HC, Kulkarni, AB, Tsai, LH, und Gleeson, JG (2004). Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron* 41, 215-227.
- Tanapat, P, Galea, LA, und Gould, E (1998). Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci* 16, 235-239.
- Tanapat, P, Hastings, NB, Rydel, TA, Galea, LA, und Gould, E (2001). Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol* 437, 496-504.
- Taylor, KR, Holzer, AK, Bazan, JF, Walsh, CA, und Gleeson, JG (2000a). Patient mutations in doublecortin define a repeated tubulin-binding domain. *J Biol Chem* 275, 34442-34450.
- Taylor, KR, Holzer, AK, Bazan, JF, Walsh, CA, und Gleeson, JG (2000b). Patient mutations in doublecortin define a repeated tubulin-binding domain [In Process Citation]. *J Biol Chem* 275, 34442-34450.
- Temple, S (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112-117.
- Tsukada, M, Prokscha, A, Oldekkamp, J, und Eichele, G (2003). Identification of neurabin II as a novel doublecortin interacting protein. *Mech Dev* 120, 1033-1043.
- Uyanik, G, Aigner, L, Martin, P, Grobetta, C, Neumann, D, Marschner-Schafer, H, Hehr, U, und Winkler, J (2003). ARX mutations in X-linked lissencephaly with abnormal genitalia. *Neurology* 61, 232-235.
- van Driel, R, Fransz, PF, und Verschure, PJ (2003). The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J Cell Sci* 116, 4067-4075.
- van Praag, H, Christie, BR, Sejnowski, TJ, und Gage, FH (1999a). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13427-13431.
- van Praag, H, Kempermann, G, und Gage, FH (1999b). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neurosci* 2, 266-270.
- van Praag, H, Schinder, AF, Christie, BR, Toni, N, Palmer, TD, und Gage, FH (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030-1034.
- Venter, JC, Adams, MD, Myers, EW, Li, PW, Mural, RJ, Sutton, GG, Smith, HO, Yandell, M, Evans, CA, Holt, RA, et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
- Verity, AN, Bredesen, D, Vonderscher, C, Handley, VW, und Campagnoni, AT (1993). Expression of myelin protein genes and other myelin components in an oligodendrocytic cell line conditionally immortalized with a temperature-sensitive retrovirus. *J Neurochem* 60, 577-587.
- Verkhusha, VV, Kuznetsova, IM, Stepanenko, OV, Zaraisky, AG, Shavlovsky, MM, Turoverov, KK, und Uversky, VN (2003). High stability of Discosoma DsRed as compared to Aequorea EGFP. *Biochemistry* 42, 7879-7884.
- Volpe (1995). *Neurology of the newborn*, third edition edn (Philadelphia, W.B. Saunders Company).
- Wachs, FP, Couillard-Despres, S, Engelhardt, M, Wilhelm, D, Ploetz, S, Vroemen, M, Kaesbauer, J, Uyanik, G, Klucken, J, Karl, C, et al. (2003). High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells. *Lab Invest* 83, 949-962.
- Wagers, AJ, Sherwood, RI, Christensen, JL, und Weissman, IL (2002). Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297, 2256-2259.
- Wall, RJ (2001). Pronuclear microinjection. *Cloning Stem Cells* 3, 209-220.

- Walsh, CA, und Goffinet, AM (2000). Potential mechanisms of mutations that affect neuronal migration in man and mouse. *Curr Opin Genet Dev* 10, 270-274.
- Wang, S, Roy, NS, Benraiss, A, und Goldman, SA (2000). Promoter-based isolation and fluorescence-activated sorting of mitotic neuronal progenitor cells from the adult mammalian ependymal/subependymal zone. *Dev Neurosci* 22, 167-176.
- Wang, W, Carey, M, und Gralla, JD (1992). Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening. *Science* 255, 450-453.
- Winner, B, Cooper-Kuhn, CM, Aigner, R, Winkler, J, und Kuhn, HG (2002). Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 16, 1681-1689.
- Wong, WM, Lam, VM, Cheng, LY, und Tam, JW (1988). Genomic sequence of a Sprague-Dawley rat beta-globin gene. *Nucleic Acids Res* 16, 2342.
- Wu, W, Wong, K, Chen, J, Jiang, Z, Dupuis, S, Wu, JY, und Rao, Y (1999). Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 400, 331-336.
- Wynshaw-Boris, A, und Gambello, MJ (2001). LIS1 and dynein motor function in neuronal migration and development. *Genes Dev* 15, 639-651.
- Yang, VW (1998). Eukaryotic transcription factors: identification, characterization and functions. *J Nutr* 128, 2045-2051.
- Yoshida, A, Kobayashi, K, Manya, H, Taniguchi, K, Kano, H, Mizuno, M, Inazu, T, Mitsuhashi, H, Takahashi, S, Takeuchi, M, et al. (2001). Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 1, 717-724.
- Yoshiura, K, Noda, Y, Kinoshita, A, und Niikawa, N (2000). Colocalization of doublecortin with the microtubules: an ex vivo colocalization study of mutant doublecortin. *J Neurobiol* 43, 132-139.
- Yuan, W, Zhou, L, Chen, JH, Wu, JY, Rao, Y, und Ornitz, DM (1999). The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance. *Dev Biol* 212, 290-306.
- Zeng, L, Gu, S, Li, Y, Zhao, E, Xu, J, Ye, X, Wu, Q, Wang, L, Xie, Y, und Mao, Y (2003). Identification of a novel human doublecortin-domain-containing gene (DCDC1) expressed mainly in testis. *J Hum Genet* 48, 393-396.
- Zhu, Y, Li, H, Zhou, L, Wu, JY, und Rao, Y (1999). Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex. *Neuron* 23, 473-485.

eigene Publikationen / Patentanmeldungen

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit sind die folgenden Publikationen / Patentanmeldungen hervorgegangen bzw. in Planung:

Publikationen:

Couillard-Despres, S, Uyanik, G, Ploetz, S, **Karl, C**, Koch, H, Winkler, J und Aigner, L. (2004). Mitotic impairment by doublecortin is diminished by doublecortin mutations found in patients. *Neurogenetics*, 5, 2, 83-93.

Karl, C, Couillard-Despres, S, Prang, P, Munding, M, Kilb, W, Brigadski, T, Plötz, S, Mages, W, Luhmann, H, Winkler, J, Bogdahn, U und Aigner, L. Neuronal precursor-specific activity of a human doublecortin regulatory sequence. *accepted 09/2004, Journal of Neurochemistry*.

Couillard-Despres, S*, Winner, B*, **Karl, C***, Lindemann, G, Aigner, R, Laemke, J, Bogdahn, U, Winkler, J, Aigner, L. Targeted expression in neuronal progenitors *in vivo*. *in preparation, *equal contribution*.

Patentanmeldung:

Couillard-Despres, S, **Karl, C**, Kuhn, HG, Aigner, L. Use of regulatory sequence for specific, transient expression in neuronal determined cells. WO 2004067751.

Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|-------------------|---|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| AS | Aminosäure(n) |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenosin-5'-Triphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BrdU | 5'Bromo-2'Desoxy-Uridin |
| BSA | Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin) |
| C | Cytosin |
| °C | Grad Celsius |
| ca. | Circa |
| cDNA | complementary DNA, zur mRNA komplementäre DNA |
| CMV | Cytomegalie-Virus |
| D | Dalton |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidine |
| DAPI | 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid-Hydrat |
| DCX | Doublecortin |
| DIC | Differentieller Interferenzkontrast |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | N,N,-Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DPBS | Dulbeccos Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| dNTP | Desoxyribonukleotid-Triphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| E | Embryonaltag |
| ECACC | European Collection of Cell Cultures |
| EDTA | Ethylendiamino-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| EGFP | enhanced green fluorescent protein |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| EtOH | Ethanol |
| FACS | fluoreszenzaktivierte Zellsortierung |
| FITC | Fluorescein |
| FKS | fötales Kälberserum |
| g | Gramm |
| g | Einheit der Erdbeschleunigung |
| G | Guanin |
| GABA | Gamma-Aminobutyrat |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| h | Stunde(n) |
| HBSS | Hanks Balanced Salt Solution |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure) |
| dH ₂ O | destilliertes Wasser |
| IgG | Immunglobulin vom Subtyp gamma |
| Kap. | Kapitel |
| kbp | Kilobasenpaare |
| kD | Kilodalton |
| LB | Luria Broth |
| l | Liter |
| M | Maßeinheit der Molarität (mM = 10 ⁻³ M, µM = 10 ⁻⁶ M) |
| mA | Milliampere |
| MAP | Mikrotubuli(MT)-assoziiertes Protein |
| MEF-Zellen | primäre Zellkulturen aus dem Gehirn von Mäusen, zum Embryonaltag 10,5-12,5 gewonnen |
| MEM | Modified Eagles Medium |
| mg | Milligramm (10 ⁻³ g) |

| | |
|----------------------|---|
| mRNA | Messenger-RNA |
| MW | Molekulargewicht |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| μ | mikro (10^{-6}) |
| MMLV RT | reverse Transkriptase aus Murinem Leukämie Virus |
| MR(T) | Magnetresonanz(-Tomographie) |
| MT | Mikrotubulus, Mikrotubuli |
| nm | Nanometer (10^{-9} m) |
| NSZ | Neurale Stammzelle |
| O.D. _{x nm} | Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm |
| pA | Pico-Ampere (10^{-12} A) |
| P | Postnataltag |
| PAA | Polyacrylamid |
| PBS | mit Phosphat gepufferte NaCl-Lösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PF | Protofilament |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pH | negativer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration |
| Pol II | RNA-Polymerase II |
| R | elektrischer Widerstand |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Reverse Transkriptase |
| R.T. | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| s. | siehe |
| SD | standard deviation (= Standardabweichung) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SUB | Protein-Extraktionspuffer mit SDS, Harnstoff und β -Mercaptoethanol |
| SV 40 | Simian Virus 40 |
| SVZ | Subventrikulärzone |
| T | Thymidin |
| Taq-Polymerase | DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TBS | Tris-gepufferte Salzlösung |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| TF | Transkriptionsfaktor |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Tris-HCl | Tris-Puffer, pH mit Salzsäure eingestellt |
| U | Einheit (unit) |
| UV | Ultraviolettes Licht |
| V | Volt |
| VZ | ventrikuläre Zone |
| v/v | Volumen/Volumen (volume per volume) |
| w/v | Gewicht/Volumen (weight per volume) |
| w/w | Gewicht/Gewicht (weight per weight) |
| x | mal |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

Mein Dank gilt...

- Prof. Dr. Inga D. Neumann für ihre Offenheit und Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen, sowie die kontinuierliche Unterstützung.
- Prof. Dr. Jürgen Winkler für seine große Sorge und Mühe um das Gelingen dieser Arbeit und sein weises Wachen über die Geschicke der Arbeitsgruppe.
- Prof. Dr. Ulrich Bogdahn für die Möglichkeit, in den Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Regensburg tätig sein zu dürfen, und sein waches Interesse an dieser Arbeit.
- Dr. Ludwig Aigner, der ein Motor dieser Arbeit war, für das Vertrauen, den unentbehrlichen Rat und seinen Optimismus.
- Dr. Sébastien Couillard-Després für seine Aufmerksamkeit, Hilfsbereitschaft und das bereitwillige Teilen seiner scheinbar unerschöpflichen Expertise.
- Sonja Plötz für ihr herzliches Engagement und ihren großen Beitrag zur angenehmen Atmosphäre im Labor.
- Robert Aigner, Dr. Beate Winner, Dr. Hans-Georg Kuhn, Matthias Munding, Dr. Peter Prang, Dr. Jason Brown, Dr. Gökhan Uyanik, Gudrun Lindemann, Eike Quehl, Jörn Lämke, Maren Engelhardt, Maurice Vroemen, Dr. Frank-Peter Wachs, Dr. Norbert Weidner, Dr. Kathrin Pfeifer, Massimiliano Caioni, Dr. Zacharias Kohl, Johanna Tebbing, Antje Binnewies, Dr. Daniel Wilhelm und Dr. Christiana Cooper-Kuhn für Mitarbeit, Rat und Freundschaft.
- meinen „Kollaborateuren“ ausserhalb des Instituts für Neurologie, Dr. Wolfgang Mages, Dr. Werner Kilb, Tanja Brigadski, Prof. Dr. Heiko Luhmann, Petra Störtebecker und Dr. Philipp Sand.
- meinen Eltern und meinem Bruder Norbert, meinem Mann Franz und meiner Tochter Johanna.