

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR
NEUROLOGIE
PROF. DR. MED. U. BOGDAHN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Etablierung transgener Zelllinien zur Visualisierung der Aktivität
des Doublecortin-Promotors als Modell der Neurogenese *in vitro***

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Eike Quehl

2008

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR
NEUROLOGIE
PROF. DR. MED. U. BOGDAHN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Etablierung transgener Zelllinien zur Visualisierung der Aktivität
des Doublecortin-Promotors als Modell der Neurogenese *in vitro***

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Eike Quehl

2008

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ludwig Aigner
2. Berichterstatter:	PD Dr. Christa Buechler
Tag der mündlichen Prüfung:	16.01.2009

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	7
1.1 Neurale Stammzellen.....	8
1.2 Neurogenese	11
1.3 Methoden zum Nachweis und Analyse der Neurogenese	12
1.4 Doublecortin als spezifischer Marker der Neurogenese.....	14
1.4.1 Historischer Rückblick	14
1.4.2 Expression von Doublecortin	16
1.4.3 Doublecortin als spezifischer Marker der Neurogenese	17
1.5 Der Doublecortin-Promotor.....	20
1.6 Reportersysteme	22
1.7 Neurogene und immortalisierte Zelllinien.....	25
2. MATERIAL UND METHODEN.....	28
2.1 Material	28
2.1.1 Chemikalien.....	28
2.1.2 Verbrauchsmaterial	29
2.1.3 Verwendete Kits	29
2.1.4 Standards.....	29
2.1.5 Verwendete Programme und Online-Angebote	29
2.2. Methoden.....	31
2.2.1 Zellkulturmethoden.....	31
2.2.1.1 Zelllinien.....	32
2.2.1.2 Differenzierungsprotokolle.....	32
2.2.1.3. Live-Mikroskopie der Zellkulturen	33
2.2.1.4. Stabile Transfektion der Ntera2- und Hela-Zelllinien	33
2.2.1.5. Klonierung der stabil transfizierten Zelllinien mit Hilfe der Durchflusszytometrie	35
2.2.2. Nukleinsäuretechniken	37
2.2.2.1. Isolierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	37
2.2.2.2 Reverse Transkription von mRNA und Polymerasekettenreaktion	37
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden.....	40
2.2.4. Immunhistochemische Analyse der Zellkulturen.....	41
3. ERGEBNISSE.....	44
3.1 Ergebnis I: Expression von DCX in neuronalen Zelllinien und der Einfluss von Differenzierungsbedingungen	44
3.1.1 Morphologisches Erscheinungsbild der Zelllinien vor und nach Differenzierung mit Retinolsäure	44
3.1.2 Immunhistochemische Darstellung der Expression neuronaler Marker vor und nach Differenzierung mit Retinolsäure	47
3.1.3 Veränderungen der Doublecortin-Expression unter dem Einfluss der Differenzierung im Western-Blot und der RT-PCR.....	49
3.2 Ergebnis II: Etablierung eines Modells der neuronalen Determinierung <i>in vitro</i> mit Hilfe transgener Zelllinien	52
3.2.1 Etablierung transgener Zelllinien.....	52

3.2.2	Morphologisches Erscheinungsbild der transgenen Zelllinien vor und nach Differenzierung mit Retinolsäure	53
3.2.3	Induktion neuronaler Marker und des DCX-EGFP-Reportersystems in den transgenen Zelllinien unter Differenzierung	54
3.2.4	Vergleich der Expression des Doublecortins und des DCX-Promotor kontrollierten EGFPs in den transgenen Zellen unter Differenzierung	56
4.	DISKUSSION	59
4.1	Identifizierung zur Expression von Doublecortin induzierbarer Zelllinien.....	60
4.2	Etablierung transgener Zelllinien als Modell der neuronalen Determinierung <i>in vitro</i>	64
4.3	Schlußfolgerungen	68
5.	ZUSAMMENFASSUNG	69
6.	ABKÜRZUNGEN	71
7.	LITERATURVERZEICHNIS	72
	LEBENS LAUF	81
	DANKSAGUNGEN	82

1. Einleitung

In der vorliegenden Promotionsarbeit werden neue Methoden vorgestellt, die eine umfangreichere und vereinfachte Analyse der molekularen und zellulären Grundlagen der Neurogenese ermöglichen und zu einem besseren Verständnis der Nervenzellentstehung führen könnten.

Erkrankungen und Schädigungen des zentralen Nervensystems gehen mit einem Zellverlust einher, der im Gegensatz zu anderen Geweben des menschlichen Organismus nicht in ausreichendem Maße ausgeglichen werden kann. Voraussetzung für eine Regeneration ist das Vorhandensein von Stammzellen, die durch Selbsterneuerung, Proliferation mit anschließender Spezifizierung, Migration und weiterer Differenzierung den Zell- und Funktionsverlust kompensieren.

Im zentralen Nervensystem entstehen die neuronalen und glialen Zellen aus neuralen Stammzellen als Ausgangspunkt der Neurogenese. Nahezu alle Nervenzellen des Menschen werden während der Embryogenese und in der frühen postnatalen Phase gebildet. Die anschließende Unterdrückung der Neurogenese und die Unfähigkeit des Ersatzes abgestorbener Nervenzellen wirken vermutlich stabilisierend auf die komplexe Struktur des Nervensystems. Dass neurale Stammzellen auch im adulten zentralen Nervensystem existieren und über neuronale Vorläuferzellen in begrenztem Maße neue Nervenzellen entstehen, konnte erst relativ spät nachgewiesen werden ^{1,1-3}. Es zeigte sich, dass neuronale Stammzellen zwar in vielen Regionen des erwachsenen Säugergehirns vorkommen ⁴, es jedoch *in vivo* nur in der Subventrikulärzone (SVZ) der lateralen Ventrikelwand sowie im Gyrus dentatus des Hippocampus zu einer nennenswerten Neurogenese kommt.

Der komplexe Vorgang der Neurogenese wird durch viele verschiedene Komponenten beeinflusst, von denen in den vergangenen Jahren einige identifiziert werden konnten ^{5,6}. Insgesamt ist jedoch zu wenig über die beteiligten Zellen und die molekularen Mechanismen bekannt. Ein gutes Verständnis der Neurogenese ist aber Voraussetzung für zukünftige klinische Anwendungen, in der ein Verlust von Nervenzellen entweder durch Steigerung der adulten Neurogenese oder/und durch Zelltransplantationen ausgeglichen werden könnte. Eine alleinige Förderung der

Proliferation ist jedoch nicht ausreichend, so scheint die Migration und Integration der Nervenzellen in den Bereich der Läsion hinein trotz gesteigerter Neurogenese limitiert zu sein. Vielmehr sind weitere Erkenntnisse über die Mechanismen der Migration der neuronalen Vorläuferzellen sowie deren weitere Differenzierung und Integration in das bestehende komplexe Gefüge hinein essentiell. Deren Erforschung ist derzeit noch durch einen Mangel an geeigneten Methoden erschwert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mit Hilfe innovativer Reportergensysteme eine Visualisierung spezifischer Gen-Aktivität neuronaler Vorläuferzellen *in vitro* (mittels Zellkulturen) zu erreichen und damit eine Methode zu etablieren, die eine weitere und vereinfachte Analyse der Neurogenese sowie deren Modulation und Regulation ermöglicht.

1.1 Neurale Stammzellen

Stammzellen sind verantwortlich für die Entstehung und Erneuerung von Gewebe und zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung durch symmetrische Zellteilung aus. Außerdem besitzen sie durch asymmetrische Zellteilung die Fähigkeit zur Ausbildung spezialisierter Zelltypen. Die Potenz einer Stammzelle beschreibt dabei die Bandbreite von Zelldifferenzierungen, die aus der Stammzelle hervorgehen kann. Die embryonalen Stammzellen besitzen noch die Eigenschaft einer sogenannten Totipotenz. Sie sind in der Lage, alle im Organismus vorkommenden Zelltypen auszubilden, also den Organismus an sich zu generieren. Diese Potenz schränkt sich in der weiteren Entwicklung der Stammzellen durch Induktionsvorgänge ein. Pluripotente Stammzellen sind in der Lage, über die jeweilige Organ- bzw. Keimblattgrenze hinaus Zellen zu bilden. Beschränkt sich das Differenzierungspotential der Stammzelle auf Zelltypen eines bestimmten Gewebes bzw. eines Organs, so spricht man von Multipotenz.

Noch nicht endgültig geklärt ist die Frage, in wieweit diese Stammzellen ihre Gewebsspezifität wieder verlieren können, um dann Zellen anderer Gewebe zu produzieren. So gab es zahlreiche Hinweise, dass zunächst organspezifische Stammzellen ihr Programm im Sinne einer Transdifferenzierung auf ein anderes

Gewebe umstellen oder aber ihre Spezifität im Sinne einer De-Differenzierung auf weitere Organe ausweiten. So ließen sich hämatopoetische Stammzellen bereits mehrmals *in vitro* und *in vivo* neuronal differenzieren⁷⁻¹¹. Seit jedoch bekannt ist, dass hämatopoetische Stammzellen nach Transplantation mit anderen Zellen fusionieren können¹², sind diese Daten wieder in Frage gestellt.

Die neuronalen Stammzellen des zentralen Nervensystems gehören zu den gewebsspezifischen multipotenten Zellen. Sie sind somit in der Lage, sich kontinuierlich selbst zu erneuern und können über neuronale bzw. gliale Vorläuferzellen in Astrozyten, Oligodendrozyten bzw. in Nervenzellen ausreifen¹³.

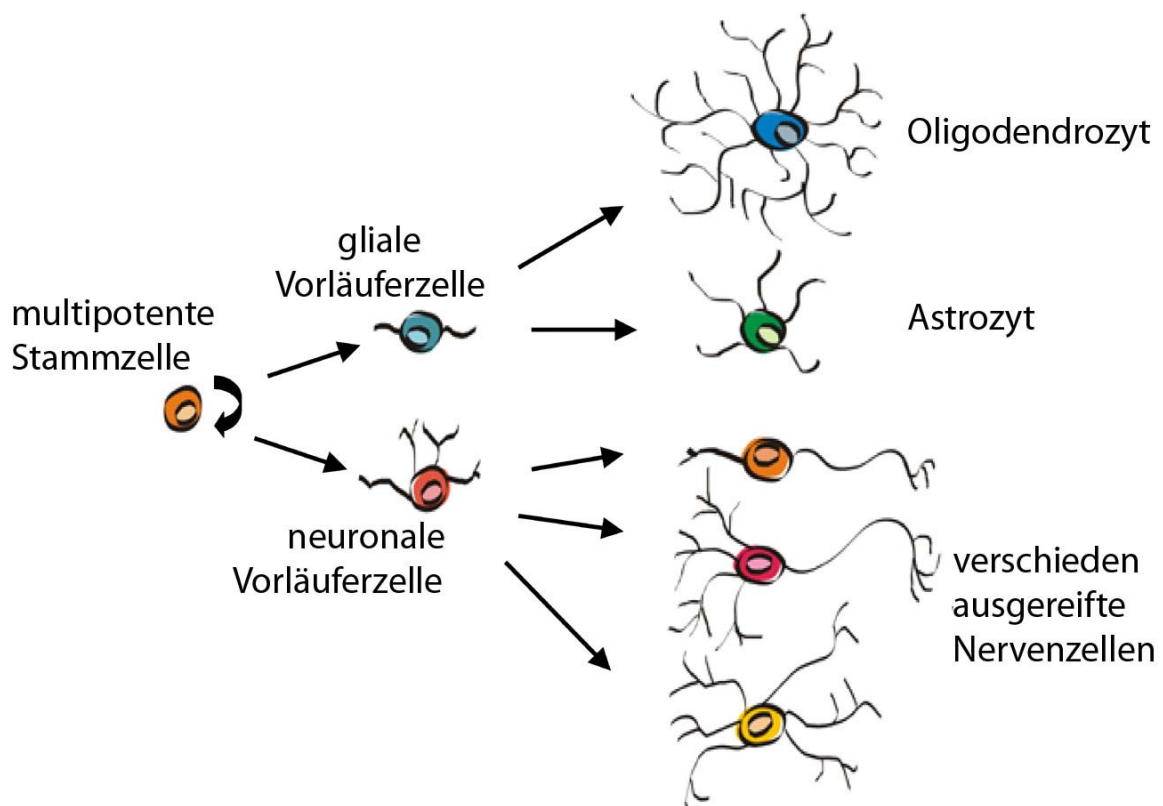


Abb. 1: **Neurale Stammzellen und ihr Differenzierungspotential.** Neurale Stammzellen sind multipotent, können sich selbst erneuern und in Astrozyten, Oligodendrozyten sowie Nervenzellen ausreifen. Im Vergleich zur Stammzelle ist die Vorläuferzelle weiter determiniert und besitzt ein eingeschränktes Entwicklungspotential.

Während der Embryogenese ist die Wand des Neuralrohres Entstehungsort der neuronalen Stammzellen. Durch symmetrische Teilung entsteht zunächst ein größerer Pool an Stammzellen, bevor in asymmetrischen Teilungen Tochterzellen entstehen, die als neuronale Vorläuferzellen in den entstehenden Hirnmantel einwandern¹⁴. Am Zielort angelangt, differenzieren sie sich weiter in vollständige Nervenzellen^{15,16} und bilden ein neuronales Netzwerk, unterstützt durch die im weiteren Verlauf vermehrt

gebildeten Astrogliazellen. Oligodendrozyten entstehen erst ab dem Ende der Embryogenese bis nach der Geburt. Im Gegensatz zu anderen Geweben verringert sich der Anteil der Stammzellen vom Embryo zum adulten Organismus dramatisch. In der Wand des Neuralrohres der Maus z.B. sind an Tag 8,5 der Embryonalentwicklung unter den neural determinierten Zellen bis zu 50 % Stammzellen zu finden, einen Tag nach der Geburt besteht nur noch ein relativer Anteil von ca. 1 % in der Subventrikulärzone ¹⁷.

Das viele durch Nervenzellverlust verursachte neurologische Krankheiten im adulten Gehirn nicht durch Regeneration spontan ausheilen, ist ein häufig beobachtetes Phänomen. Dies mag zu der Theorie geführt haben, dass Nervenzellen nicht im Stande sind zu proliferieren bzw. dass keine Stammzellen existieren. So vertrat der spanische Neuroanatom Santiago Ramon y Cajal Anfang des letzten Jahrhunderts die Hypothese: „Alles kann sterben - nichts regenerieren“ ¹⁸.

In den 60er Jahren aber fanden sich erste Hinweise auf die Existenz von aktiven neuronalen Stammzellen im adulten Säugerhirn. In einer 1965 veröffentlichten Untersuchung konnten mit Hilfe von ³H-Thymidin-Markierungen erstmals neu entstandene Nervenzellen im ZNS nachgewiesen werden, deren Ursprung bzw. deren Entstehung jedoch zunächst weiter Rätsel aufgab ¹. Ein überzeugender Nachweis neu entstehender Neurone gelang erst in den 90er Jahren ², der sich in der Folge auch beim Menschen bestätigte ¹⁹. Vor wenigen Jahren gelang es, die adulte Neurogenese in einen direkten Zusammenhang mit der Anwesenheit von multipotenten neuronalen Stammzellen zu setzen ^{20,21}. In weiteren tierexperimentellen Versuchen konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Regionen des erwachsenen Gehirns, unter anderem dem Striatum, dem Neocortex und dem Rückenmark, neuronale Stammzellen isoliert werden können ^{4,22}. Allerdings können proliferierende Stammzellen in größerer Anzahl nur in zwei Gehirnregionen gefunden werden: im Gyrus dentatus des Hippocampus und in der lateralen Wand der Ventrikel ²³⁻²⁵.

1.2 Neurogenese

Bei der Entstehung neuer Nervenzellen während der Embryogenese sowie in den oben erwähnten Regionen des adulten Gehirns kann man verschiedene Phasen unterscheiden. Zuerst kommt es zu einer lokalen Proliferation der neuralen Stamm- und Vorläuferzellen, bevor es zu einer Migration der Tochterzelle in die Zielregion kommt. Am Ort der Bestimmung angelangt, durchlaufen die Zellen eine weitere neuronale Differenzierung mit Integration in das bestehende neuronale Netzwerk, Aussprossung von Zellfortsätzen und Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten.

Um die komplexe Struktur des Kortex aufzubauen bzw. zu erneuern, ist auf zellulärer und molekularer Ebene eine genaue Kontrolle von Proliferation, Migration und Differenzierung notwendig ²⁶. Wie es zu einer Induktion und Stimulation der Neurogenese kommt und welche molekularen Prozesse dabei ablaufen, ist auch aufgrund mangelnder Untersuchungsmethoden bisher noch unzureichend erforscht. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass bei vermehrtem Lernen mehr neue Nervenzellen gefunden werden können und umgekehrt eine gesteigerte Neurogenese die Lernleistung bei Mäusen erhöht ²⁷. Eine reizreiche Umgebung und physikalisch Aktivität hat also eine Stimulation der Neurogenese zur Folge ^{23,28}. Eine Läsion im zentralen Nervensystem ²⁹ sowie Wachstumsfaktoren wie bFGF ³⁰ oder auch eine Unterdrückung von Apoptosesignalen ³¹ gelten als weitere Induktoren.

Nach der Proliferation der Stammzellen kommt es zu einer Migration der neuronalen Vorläuferzellen, die sich in drei aufeinander folgenden Schritten vorwärts bewegen. Nach dem Vorstrecken von Zellausläufern folgt die Translokation des Zellkerns. Anschließend wird der restliche Teil der Zelle nachgezogen ³². Gesteuert wird dieser Prozess vor allem von der umgebenden extrazellulären Matrix und löslichen Substanzen, die der Zelle eine Annäherung oder eine Abstoßung und somit die entsprechende Wanderungsrichtung signalisieren. Diese Mediatoren greifen in der Zelle v. a. in die Regulation der Gene von Proteinkinasen ein, die die Dynamik des Zytoskeletts regulieren. Über diesen fortlaufenden Umbau der Zytoarchitektur wird die Wanderung der Zellen verwirklicht ³³. Einige der an dieser Migration und deren Regulation beteiligten Proteine, u. a. Doublecortin ³⁴, Filamin-1 ³⁵, Reelin ³⁶ konnten bereits identifiziert werden ¹⁶.

1.3 Methoden zum Nachweis und Analyse der Neurogenese

Zur Zeit basieren die Nachweismethoden zur Darstellung der Neurogenese hauptsächlich auf der Markierung von sich teilenden Zellen. Eine Markierung gelingt u.a. mit sogenannten Mitosemarkern wie Ki-67 oder PCNA sowie retroviralen Infektionen. Dabei ist eine Entscheidung, um welchen weichen Art von Zellen es sich handelt, primär nicht möglich.

Mit der Einführung der ^3H -Thymidin (^3H -dT) autoradiographischen Methode in den sechziger Jahren gelang es erstmals sich teilende Zellen im Hippocampus, dem olfaktorischen Bulbus sowie im Kortex von Ratten und Katzen nachzuweisen^{1,37}. ^3H -dT wird dabei in Zellen aufgenommen, die in Vorbereitung auf die Mitose DNA synthetisieren, und kann somit als Marker für Zellteilungen und im Verlauf als Marker der neu entstandenen Zellen gewertet werden. Entscheidender Nachteil dieser Methode ist, dass alle proliferierenden Zellen zur Darstellung kommen und eine Festlegung auf den entstandenen Zelltypus, z.B. ob es sich um eine Stammzelle, eine gliale oder neuronale Zelle handelt, nur schwer möglich ist.

Der Einsatz von Thymidin-Analoga wie z.B. 5'-Bromo-2'-Desoxy-Uridin (BrdU) ist heute ein weit verbreitetes Nachweisprinzip. Nach systemischer Gabe und Einbau von BrdU in die DNA von proliferierenden Zellen^{3,38} können die so markierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten mit primären Antikörpern entsprechend dargestellt werden³⁹. Auch mit BrdU ist über die Art der entstandenen Zellen keine direkte Aussage möglich, aber es hat gegenüber ^3H -dT den Vorteil der einfacheren Nachweisbarkeit und der einfacheren Kombination mit immunhistochemischen Markern. Eine Kombination mit verschiedenen immunhistochemischen Markern ermöglicht eine weitere Identifizierung und Charakterisierung der markierten Zellen. Im Gyrus dentatus konnten in diesem Zusammenhang neu entstandene Granulärzellen nachgewiesen werden^{2,3,40}.

Diese Methoden haben den gemeinsamen entscheidenden Nachteil, dass die markierenden Substanzen dem lebenden Organismus zur Markierung der proliferierenden Zellen appliziert werden muss, Auswertungen aber erst post mortem möglich sind. Dies schließt Studien am Menschen, an entnommenen Biopsaten sowie

Untersuchungen post mortem praktisch aus und erschwert Verlaufsbeobachtungen lebender Organismen. Neben dieser Einschränkung von Untersuchungsobjekten kommen weitere versuchstechnische Probleme hinzu. Bei zu geringer Gabe von BrdU werden möglicherweise sich teilende Zellen nicht oder nur unzureichend markiert. Bei einer Überdosierung jedoch kommt es zu toxischen Reaktionen. Weitere Fragezeichen stehen hinter möglichen Wechselwirkungen und deren Auswirkungen zwischen markierenden Substanzen, Organismus, den zu untersuchenden Faktoren und Substanzen möglicher Therapieansätze, die die Neurogenese beeinflussen sollen^{41,42}.

Eine genaue Aussage über das Ausmaß der Neurogenese *in vivo* war bisher v.a. durch eine Kombination einer Markierung proliferierender Zellen und anschließendem immunhistochemischem Nachweis neuronaler Marker in diesen Zellen möglich. Es bedurfte daher weiterer Analysemöglichkeiten ohne die Notwendigkeit einer *in vivo*-Applikation, die dennoch eine genauere, quantitative Analyse der Neurogenese und im Besonderen ihrer Modulation ermöglicht. Da die Anzahl der entstehenden neuronalen Vorläuferzellen ein direktes Maß der Neurogeneserate ist, wäre ein Marker entscheidend, der spezifisch diese Zellpopulation zur Darstellung bringt. Dabei wäre es wünschenswert, dass nur diejenigen Zellen zur Darstellung kommen, die bereits neuronal determiniert, aber noch nicht endgültig in ein Neuron ausdifferenziert sind. Somit unterbliebe die unerwünschte Markierung von Stamm- und glialen Zellen.

Weitere Analysemöglichkeiten der Neurogenese stellen primäre Zellkulturen neuraler und neuronaler Stammzellen *in vitro* dar. Begrenzter Zugang zu kultivierbaren Zellen sowie deutlich erschwerte und nicht standardisierte Kulturbedingungen limitieren den Einsatz sowie die Aussagekraft der entsprechenden Versuchsergebnisse. Weiterhin besteht das Problem der Inhomogenität der extrahierten Zellpopulation. Hier bedarf es entsprechender Marker zur besseren Eingrenzung spezieller Subpopulationen.

In diesem Zusammenhang hat sich in den letzten Jahren Doublecortin als Marker der Neurogenese etabliert, da eine Expression in praktisch allen neuronalen Vorläuferzellen nachgewiesen werden konnte.

1.4 Doublecortin als spezifischer Marker der Neurogenese

Die ca. 118,4 Kilobasen lange genomische Sequenz des menschlichen Doublecortin-Gens ist auf dem X-Chromosom in der Region Xp22.3-q23 lokalisiert. Es kodiert ein stark hydrophiles, basisches Protein bestehend aus rund 360 Aminosäuren mit einer Größe von ca. 45 kD. Dieses Protein wird den Microtubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) zugeordnet und spielt eine wichtige Rolle in der Migration neuronaler Vorläuferzellen. Aufgrund dieser spezifischen Expression in den neuronalen Vorläuferzellen ist DCX ein Marker der Neurogenese.

1.4.1 Historischer Rückblick

Das Doublecortin-Gen konnte im Zusammenhang mit einer X-chromosomal dominant vererbten, neuronalen Migrationsstörung, dem so genannten Double-Cortex-Syndrom, identifiziert und lokalisiert werden. Durch die eingeschränkte Migrationsfähigkeit der Nervenzellen bildet sich neben der normalen Hirnrinde eine weitere subkortikale Nervenzellschicht aus, es entsteht ein Doublecortex (siehe Abb.2). Aufgrund der X-chromosomalen Vererbung zeigen sich bei der Typ 1-Lissenzephalie die Krankheitsverläufe im männlichen Geschlecht wesentlich ausgeprägter als die der weiblichen Erkrankten. Der klinische Verlauf kann von leichter Epilepsie (Beginn in Kindheit oder Adoleszenz mit Schulproblemen) bis hin zu therapierefraktären Krampfanfällen und schwerster geistiger Behinderung reichen. Weitere Symptome sind Schluckstörungen, Fütterprobleme und ein abnormer Muskeltonus ^{43,44}. Im Jahre 1998 konnte dann das betroffene Gen von zwei unabhängigen Forschungsteams auf dem X-Chromosom nachgewiesen werden und wurde nach der entstehenden Fehlbildung Doublecortin oder DCX benannt ^{45,46}.

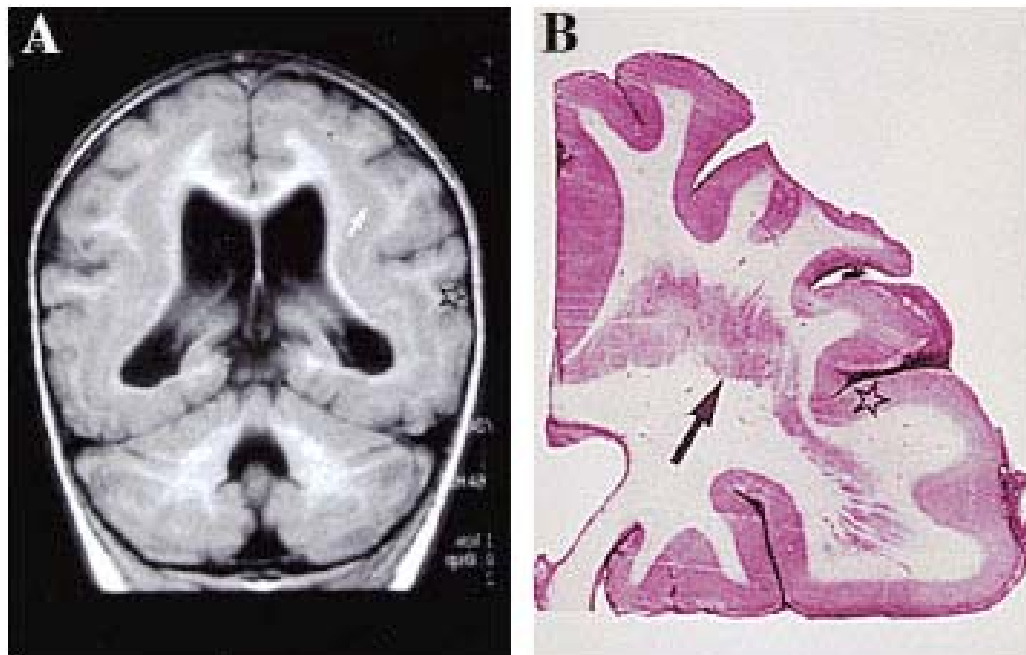


Abb. 2: Double-Cortex-Syndrom

A: MRT einer Patientin, Sagittalschnitt des Kortex und Cerebellums ; B: Postmortem, Sagittalschnitt des Hirns; Stern: normale Hirnrinde; Pfeil: zusätzliche subkortikale Nervenzellschicht, im Sinne eines zweiten Kortex. ⁴⁶

Die eindeutige Assoziation zwischen diesem Gen und der Migration neuronaler Vorläuferzellen führten zu der Vermutung, dass ein Zusammenhang zum Zytoskelett bestehen müsse. Tatsächlich konnte in der folgenden Zeit in kultivierten Neuronen eine Kolo-kalisation von Doublecortin und dem Mikrotubuli (MT)-Netzwerk nachgewiesen werden. Durch die Gabe von Colchicin zur Depolymerisation der MT-Strukturen konnte diese Wechselwirkung aufgehoben werden ³⁴. Aufgrund der Fähigkeit von DCX Mikrotubuli zu bündeln und zu stabilisieren ⁴⁷ wurde es den MT-assoziierten Proteinen, den so genannten MAP's, zugeordnet. Die Bindungseigenschaften gegenüber den MT scheinen dabei abhängig zu sein vom Phosphorylierungs-Zustand des Doublecortin. Dabei setzt eine Phosphorylierung von Doublecortin dessen Affinität zu Mikrotubuli *in vitro* herab ⁴⁸. Die Autoren folgerten, dass durch das Gleichgewicht aus Kinase und Phosphatase-Aktivität eine Regulation der Expansion von Zellfortsätzen und damit der Migration von neuronalen Vorläuferzellen ermöglicht wird.

1.4.2 Expression von Doublecortin

Die Expression von Doublecortin kann während der Embryonalentwicklung vor allem in postmitotischen Neuronen nachgewiesen werden und korreliert eng mit dem Auftreten von migrierenden, neuronalen Vorläuferzellen. Dabei ist das Protein spezifisch im zentralen Nervensystem anzutreffen, dort ist es vor allem im Gehirn weit verbreitet, jedoch auch im Rückenmark des Menschen sowie des Nagers vor der Geburt zu finden. Nicht nachzuweisen ist DCX jedoch in anderen Organen und Geweben des Organismus^{47,49,50}. Bereits ab der 6. Schwangerschaftswoche ist Doublecortin beim Menschen immunhistologisch nachweisbar⁵¹ und konnte in neuroepithelialen Zellen der Ventrikulärzone sowie in der kortikalen Platte gefunden werden⁵⁰. Die Expression findet in der 12.-20. Woche, der Phase der kortikalen Migration, seinen Höhepunkt, um ab der 28. Woche wieder abzufallen, wenn die meisten Neurone ihre Migration abgeschlossen haben.

Mit dem starken Rückgang der Neurogenese ab der 28. Schwangerschaftswoche und der damit einhergehenden starken Verminderung der Aktivität des Doublecortin-Promotors, beschränkt sich dessen Vorkommen im adulten Gehirn im wesentlichen auf die Regionen mit kontinuierlicher Neuentstehung von Nervenzellen. Zu diesen Regionen gehört der Gyrus dentatus des Hippocampus sowie eine Region unterhalb der Seitenventrikel, die Subventrikulärzone (SVZ), siehe Abb. 3.

Im Gyrus dentatus des Hippocampus entstehen ein Leben lang neue Nervenzellen am Rande der Granulärzellschicht, in welche sie anschließend einwandern und sich integrieren^{2,3,52}. Diese kontinuierliche Proliferation ist mit dem Alter abnehmend und wird mit Lern- und Gedächtnisprozessen in Zusammenhang gebracht^{3,23,53}.

Eine ähnliche Korrelation zwischen der Anwesenheit des DCX- Proteins und der Entstehung neuer Nervenzellen besteht in der Wand der Seitenventrikel. Die hier neu entstehenden Zellen bleiben jedoch im Gegensatz zu den Zellen der Hippocampus-Region nicht ortständig, sondern wandern größtenteils als postmitotische, neuronale Vorläuferzellen entlang des RMS (rostral-migratorischer Strom) weite Strecken in den Bulbus olfactorius. Dort angelangt, differenzieren und integrieren sie sich als Granulärzellen und periglomeruläre Neurone⁵⁴⁻⁵⁷. Außerhalb

dieser Regionen ist eine Aktivität des DCX-Promotors im adulten ZNS zwar nachweisbar, DCX-Protein ist jedoch nicht bzw. nur vereinzelt nachweisbar⁵⁸.

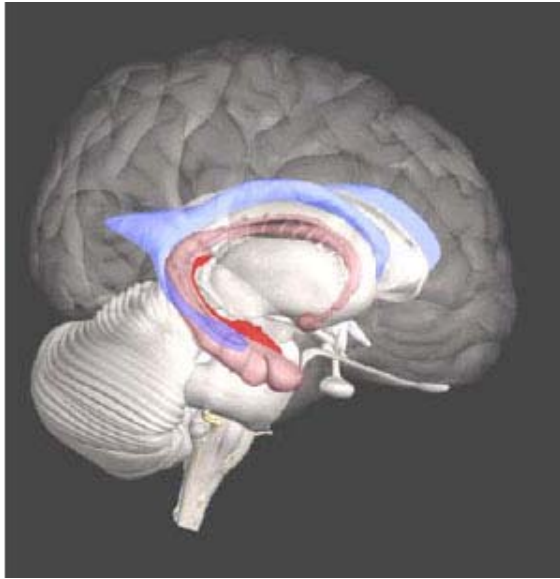


Abb. 3: Neurogene Zonen und neurale Stammzellen des adulten Gehirns. Neurale Stammzellen befinden sich im Hippocampus (rot) und in der lateralen Ventrikelwand (blau). Sie erneuern sich selbst (symmetrische Teilungen) und bilden in asymmetrischen Teilungen die Vorläufer von reifen Gliazellen und Neuronen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

1.4.3 Doublecortin als spezifischer Marker der Neurogenese

Im adulten Gehirn ist die Nervenzell-Neubildung stark eingeschränkt und eng auf die oben genannten Regionen begrenzt, jedoch ist durch verschiedene Faktoren und Einflüsse eine Steigerung der Neurogenese möglich, die mit einer Aktivierung des DCX-Promotors korrelieren. Zu den stimulierenden Faktoren gehören zum einen eine reizreiche Umgebung, körperliche Bewegung oder bestimmte Wachstumsfaktoren wie FGF-2, IGF-1, VEGF oder Erythropoetin^{28,30,59-65}.

Ein weiterer Faktor ist das vermehrte Absterben von Nervenzellen z.B. durch Traumata, Ischämien oder Epilepsien, die zu einer gesteigerten Neurogenese führt^{66,67}. So konnte nach einem provozierten Gewebsuntergang durch einen vorübergehenden Verschluss der mittleren Gehirnarterie im Hippocampus und der Subventrikulärzone eine Steigerung der Nervenzell-Neubildungen gezeigt werden, die mit einer DCX-Epression einherging^{7,68}. Weiterhin konnte nach gezielter Apoptose von Neuronen des

Kortikothalamus an Mäusen eine gewisse Regeneration nachgewiesen werden, die offenbar von proliferierenden Zellen der Subventrikulärzone ausging. Die eingewanderten Zellen, die in den apoptotischen Arealen das neuronale Netzwerk erneuerten, hatten Bromodesoxy-Uridin (BrDU) inkorporiert und exprimierten Doublecortin⁶⁹.

Umgekehrt lässt sich DCX im Falle einer Gliogenese nicht nachweisen, weder unter physiologischen Bedingungen noch reaktiv nach induzierten epileptischen Anfällen bzw. Rückenmarksläsionen an Mäusen. Auch bei der Regeneration von Axonausläufern differenzierter Nervenzellen kommt es zu keiner erneuten Induktion des DCX-Promotors⁷⁰.

Insgesamt zeigt das DCX-Expressionmuster (Abb. 4) einen festen zeitlichen Ablauf, der im Zusammenhang mit der Neubildung von Zellen in adulten Ratten untersucht wurde^{57,71}. Dabei wurden neu entstandene Zellen über den Einbau des Basen-Analogons Bromodesoxy-Uridin (BrDU) in die genomische DNA markiert sowie die Co-Expression mit Doublecortin detektiert. Es zeigte sich, dass Doublecortin transient in migrierenden und post-mitotischen neuronalen Vorläuferzellen exprimiert ist. Die Expression erreicht nach etwa sieben bis zehn Tagen seinen Höhepunkt. Zu diesem Zeitpunkt exprimieren etwa 90% der zuvor BrDU-markierten Zellen Doublecortin. Anschließend sinkt die DCX-Expression ab bis nach etwa 4 Wochen kaum noch Doublecortin nachzuweisen ist. Stattdessen korrelieren dann adulte, neuronale Marker wie NeuN mit BrDU-markierten Zellen^{57,72}.

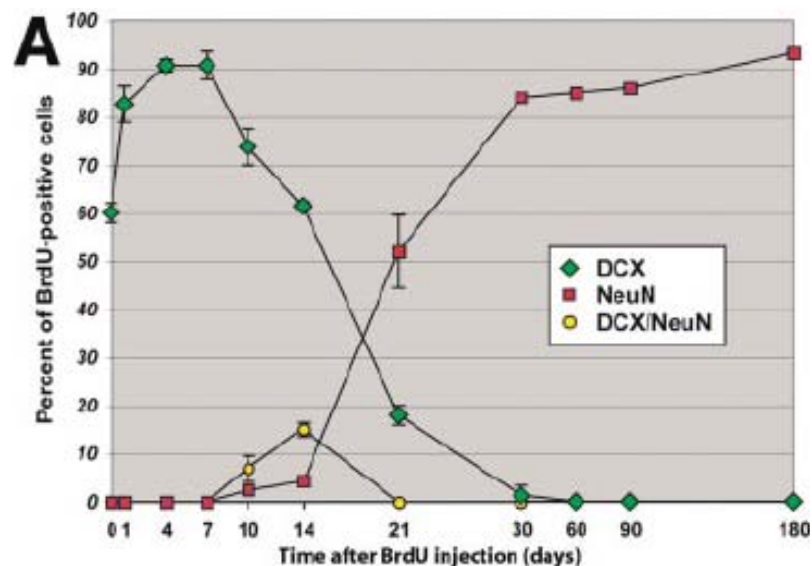


Abb. 4: zeitliche Ablauf des DCX-Expressionsmusters in neu entstandenen Zellen des gyrus dentatus nach Injektion von BrdU in zwei Monate alten Ratten. Veränderungen der Expression von DCX und NeuN über 180 Tage in Prozent aller BrdU-positiven Zellen. DCX (grün), NeuN (rot), NeuN and DCX (gelb); aus ⁵⁷

Dabei zeigt sich weder eine Kolokalisation von Doublecortin mit Nestin, einem Marker für pluripotente, neurale Stammzellen ⁷³, noch mit GFAP, einem bekannten glialen Marker ⁷⁰. Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen den DCX-exprimierenden Zellen und fehlender Expression von Antigenen undifferenzierter, glialer oder apoptotischer Zellen nachgewiesen werden ^{57,71,74}.

Doublecortin wird ausschließlich bei der Neuenstehung von Nervenzellen im embryonalen sowie im adulten zentralen Nervensystem exprimiert. Doublecortin ist dabei spezifisch in den neuronalen Vorläuferzellen nachweisbar unter Ausschluss pluripotenter, neuraler und glial determinierter Stammzellen. DCX als spezifischer Marker erscheint also ideal, um eine weitere Analyse der neuronalen Determinierung und Neurogenese zu ermöglichen. Im Folgenden wird der Doublecortin-Promotor vorgestellt, sowie ein Überblick über die Funktionsweise von Reportersystemen und über etablierte, immortale Zelllinien gegeben.

1.5 Der Doublecortin-Promotor

Die genau regulierte Expression der genetischen Information der verschiedenen Zellen ist die entscheidende Voraussetzung für die Entstehung und Erhaltung von spezialisiertem Gewebe sowohl embryonal als auch im adulten Organismus. Regulatorische Sequenzen genomischer DNA am Anfang eines Genes, sogenannte Promotoren, steuern über das Ausmaß der gebildeten mRNA die Gen-Expression. Die mRNA kodiert in der sogenannten Translation an den Ribosomen die Bildung von Enzymen und weiteren Proteinen, die zur Aufrechterhaltung der notwendigen physiologischen Zellprozesse von Nöten sind. Diese Promotoren, die sich von Gen zu Gen unterscheiden, sind Ausgangspunkt der Entstehung primärer mRNA durch die RNA-Polymerase II (Pol II) bei Eukaryonten.

Fast alle Promotoren Protein-kodierender Gene beinhalten als Grundstruktur den Kernpromotor, der die sogenannte TATA-Box und eine Startsequenz umfasst, sowie DNA-Sequenzen, über die regulierende Faktoren gebunden werden können. Der Kernpromotor alleine ist ausreichend, um eine Transkription zu initiieren und umfasst meist ca. 100 bp. Es existieren außer der TATA-Box weitere Grundmotive wie das Inr-Element oder die CAAT-Box, die in verschiedenen Variationen auftauchen können. Alle diese Bindestellen können fehlen, einzeln oder auch in verschiedenen Kombinationen vorhanden sein^{75,76}.

Außerhalb dieses Kernpromotors bestehen weitere DNA-Abschnitte, die über korrespondierende Basensequenzen Transkriptionsfaktoren (TF) binden können und über verschiedene Mechanismen eine Aktivierung bzw. Inhibition des Transkriptions-Prozesses bewirken und so die Gen-Expression regulieren⁷⁷.

Damit es zu einer Initiation der RNA-Synthese kommt, muss zum einen der Promotor von der RNA-Polymerase II erkannt und gebunden werden, und zum anderen muss eine regulierte, unidirektionale Transkription gewährleistet sein. Dieser Vorgang wird durch Transkriptionsfaktoren (TF) ermöglicht und unterstützt, die über korrespondierende Basensequenzen an der genomischen DNA binden und u.a. den sogenannten Startkomplex bilden. Ist der Startkomplex gebildet und die Pol II ausgerichtet, kann die Transkription ablaufen.

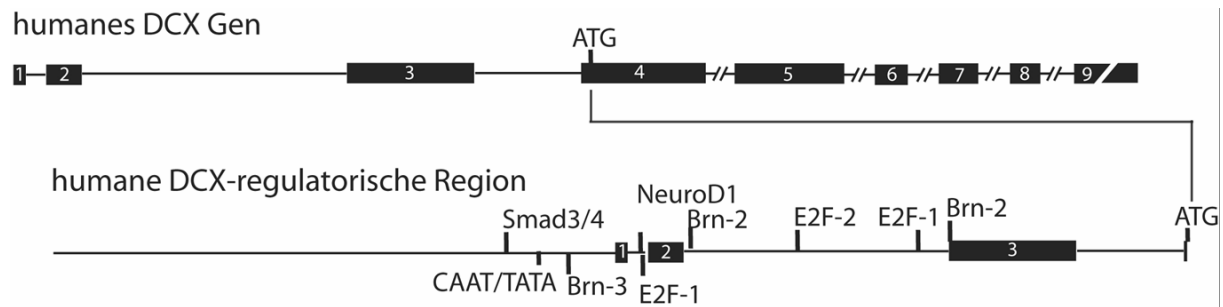


Abb. 5: Genstruktur und vermutliche regulatorische Abschnitte des humanen DCX-Gens; Vermutete Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren sowie CAAT/TATA-Box sind im Bereich der vermuteten regulatorischen Sequenz abgebildet. die schwarzen Kästchen markieren Exons ⁷⁸.

Für das 118,4 kbp lange, humane DCX-Gen (siehe Abb. 5) konnte als eine solche Promotor-Region ein 3509 bp großer DNA-Abschnitt beginnend mit dem ATG-Start-Codon strangaufwärts identifiziert werden. Weiterhin konnte eine Region vom -1983 bp bis zum -1976 bp als mögliche TATA-Box und eine Region vom -2079 bp bis zum bp -2071 als mögliche CAAT-Box gefunden werden. In weiteren Reporter-Gen-Versuchen konnte gezeigt werden, dass dieser Abschnitt zur Regulation des Doublecortin-Gens ausreichend ist und deren Aktivität mit der Expression von endogenem Doublecortin übereinstimmt ⁷⁸.

1.6 Reportersysteme

In vielen zellbiologischen Fragestellungen bedarf es Indikatoren zum Nachweis biochemischer Prozesse. Als solche Indikatoren werden u.a. Proteine eingesetzt, die sich in den Zellen leicht nachweisen lassen. Weitere wichtige Voraussetzungen von Reporterproteinen sind, dass solche Reporterproteine möglichst ungiftig sind, nicht schon endogen in den Zellen vorhanden sind und die physiologischen Zellprozesse möglichst wenig beeinflusst. Darüber hinaus kann für bestimmte Fragestellungen eine Quantifizierbarkeit des synthetisierten Reporterproteins nötig sein ⁷⁹.

Am häufigsten eingesetzt werden solche Reporter zur Aktivitätsbestimmung von Promotoren. Dabei wird die Promotorsequenz in geeignete Vektoren vor das Reportergen gesetzt und damit unter deren Regulation gestellt. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die Koproduktion von Protein und Reporterprotein unter der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors. Die dabei je nach Konstrukt gleichzeitig entstehenden Proteine oder auch das entstandene Fusionsprotein ermöglicht eine Darstellung der Verteilung in verschiedenen Geweben und Kompartimenten.

Je nach Fragestellung können in solchen Reportersystemen Proteine eingesetzt werden, die einen qualitativen oder/und einen quantitativen Nachweis ermöglichen. Der qualitative Nachweis sollte ohne großen Aufwand, etwa mit Hilfe eines Mikroskops, erfolgen können, eine klare Ja/Nein-Antwort zur Aktivität des Promotors liefern und eine grobe Zuordnung zu einer Zellpopulation bzw. eines Gewebes ermöglichen. Ein qualitativer Nachweis ist indirekt möglich über eine Enzymreaktion und dem Nachweis des umgesetzten Substrates, wie z.B. bei der β -Galactosidase, deren Aktivität nach Zugabe von X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid) durch eine Blaufärbung registriert werden kann. Nachteil dieser Methode ist die Entstehung von toxischen Metaboliten.

Ein direkter qualitativer Nachweis der Promotoraktivität ohne Zugabe von weiteren Substraten oder Kofaktoren gelingt u.a. mit Hilfe von fluoreszierenden Reporterproteinen. Ein solches Protein ist das Green Fluorescent Protein (GFP), das nach Bestrahlung mit blauem oder ultravioletttem Licht sichtbare, grüne Fluoreszenz emittiert ^{80,81}. Das aus der Qualle *Aequorea victoria* klonierte GFP wurde mit Hilfe gezielter Sequenz-Mutationen für die Expression in Säugerzellen in Hinblick auf

Toxizität und Fluoreszenz optimiert und kann in seiner verstärkten Form als „enhanced“ (*engl.* = verstärkt) GFP oder EGFP schneller und sensitiver in Zellen nachgewiesen werden (BD/Clontech, Heidelberg) ⁸². Die entscheidenden Vorteile bei dieser nicht invasiven Methode sind die fehlende Zytotoxizität und die einfache, real-time Darstellung sowohl an lebenden als auch an fixierten Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop. Weitere Beispiele sind das rot fluoreszierende Protein DsRed, das aus einer Koralle kloniert wurde, und die durch weitere Manipulationen am GFP erzeugten Proteine, die unter dem Mikroskop blau (ECFP, enhanced cyan fluorescent protein) oder gelb (EYFP, enhanced yellow fluorescent protein) erscheinen ⁸².

Zum quantitativen Nachweis werden meist Enzyme als Reporterproteine eingesetzt, die über den nachgewiesenen Umsatz zugesetzten Substrates das Ausmaß der Promotoraktivität reflektieren. Die Enzymaktivität kann je nach Substrat fluoreszent, chemilumineszent oder colorimetrisch gemessen werden. Bekannte Beispiele sind das bereits oben erwähnte und sowohl zum qualitativen wie zum quantitativen Nachweis in eukaryonten Zellen einsetzbaren Enzymes β -Galactosidase (lacZ) aus dem Bakterium *Escherichia coli* ⁸³ oder das Enzym Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT). Dieses Enzym mit dem Nachteil einer langen Halbwertszeit überträgt im Nachweistest den Acetylrest von zugesetztem, markiertem Acetyl-CoA auf das ebenfalls zugegebene Chloramphenicol ⁸⁴. Wegen seiner hohen Sensitivität wird das Enzym Luciferase aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) als Reporterprotein besonders für Studien an Promotoren mit schwacher Aktivität eingesetzt. Zum Nachweis werden den lebenden Zellen bzw. dem Zelllysat Luziferin sowie ATP und Mg^{2+} zugesetzt. In der folgenden Oxidation mit Sauerstoff wird die freigesetzte Energie proportional zur Enzymmenge als Lichtquanten freisetzt, das in einem Luminometer quantifiziert werden kann. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit des Luziferaseproteins sind auch Induktionsstudien möglich.

Solche Reportersysteme werden zum einen für Promotorstudien an Zellkulturen als übersichtliches *in vitro* System durchgeführt, zum anderen *in vivo* an Modellorganismen. Hierbei bieten sich Mäuse wegen der Analogie von Physiologie und Anatomie im Vergleich zum Menschen ⁸⁵ sowie der Möglichkeit einer genetischen Manipulation an.

Auch in der Erforschung der Neurogenese kommen diese Reportersysteme in verschiedenen Promotorstudien häufig zum Einsatz. So wurde die Expression des Reporterproteins lacZ u. a. unter die Kontrolle des für neuronale Stammzellen spezifischen Nestin-Gen Enhancers, des pan-neuronalen Tubulin-alpha1-Promotors und des ebenfalls neuronalen Stammzell-spezifischen Lokus des TLX-Gens gestellt⁸⁶⁻⁸⁸. Weiterhin regulierten u. a. das für neuronale Vorläuferzellen spezifische, regulatorische Element des Proopiomelanocortin (POMC)-Gens, der postmitotische neuronale Tis21-Lokus sowie der für neuronale Vorläuferzellen spezifische Doublecortin-Promotor die Produktion der Proteine EGFP und GFP^{78,89-91}.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Reporterproteine EGFP und Luciferase verwendet und deren Expression jeweils unter die Kontrolle des Doublecortin-Promotors gestellt. Das Reporter-Konstrukt wurde mit Hilfe eines zirkulären Vektors in kultivierte Zellen eingeschleust und durch weitergehende Selektion stabil und dauerhaft in das Genom der Zellen integriert. Mit den verwendeten, gentechnisch hergestellten Reportersystemen wurden bereits in anderen Studien transiente Transfektionen an Zellkulturen durchgeführt sowie zur Herstellung und Untersuchung transgener Mäuse erfolgreich eingesetzt^{78,89}. Im folgenden Kapitel 1.7 wird näher auf die für die Transfektionen verwendeten und in Kultur genommenen Zelllinien eingegangen.

1.7 Neurogene und immortalisierte Zelllinien

Zur Klärung und Untersuchung vieler biochemische und zellbiologische Fragestellungen v.a. in Bezug auf humane Zellen und Gewebe sind direkte Experimente am lebenden Objekt nicht möglich. In diesen Fällen kommen Analysen an verschiedensten Modellsystemen zum Einsatz, die möglichst vergleichbare Bedingungen bieten und somit übertragbare Ergebnisse liefern sollen. Ein solches Modellsystem bieten immortalisierte Zelllinien, die aus verschiedensten Tumorgeweben isoliert und kultiviert werden. Die Tumorzellen haben gegenüber den nicht entarteten Zellen den entscheidenden Vorteil der Immortalität und der unbegrenzten Teilungsfähigkeit. Allerdings sollten sie weiterhin die Charakteristika ihres Ursprungsgewebes aufweisen. Die Zellen werden schwimmend in Nährmedien z.B. als sogenannte Neurospheres oder am Boden eines Kulturgefäßes als sogenannter Zellrasen kultiviert. Diese Eigenschaften und die damit verbundene gute Verfügbarkeit und einfache Kultivierbarkeit macht sie zu einem optimalen, standardisierten in-vitro Versuchsmodell. Ein Beispiel ist die etablierte und weit verbreitete Hela-Zelllinie, die aus einem humanen Cervixkarzinom generiert wurde und deren Zellen epitheliale Charakteristika aufweisen ⁹².

Für die hier vorliegende Arbeit wurden Zelllinien gesucht und benutzt, die aus entarteten Zellen eines Gewebes neuronalen Ursprungs bzw. eines Gewebes stammen, das sich neuronal differenzieren lässt und am Anfang des neuronalen Differenzierungsweges steht.

Zelllinien neuronalen Ursprungs sind u.a. die D283 und die DAOY, die beide aus einem humanen Medulloblastom kultiviert wurden ^{93,94} und die aus einem menschlichen Neuroblastom stammenden SK-N-SH ⁹⁵.

Dagegen sind die PC-12 aus einem Phäochromozytom der Ratte und die Ntera/CloneD1-Zelllinie aus einem Keimzelltumor generiert und damit nicht-neuronalen Ursprungs. Eine neuronale Differenzierung ist bei diesen Zelllinien jedoch induzierbar, so bilden sich z.B. bei den PC-12 durch die Zugabe von NGF lange dendritenartige Zellausläufer ähnlich sympathischen Nervenzellen ⁹⁶.

Immortalisierte Zelllinien aus humanen Keimzelltumoren sind in diesem Zusammenhang besonders interessante Untersuchungsobjekte aufgrund der großen

Ähnlichkeit zu frühen embryonalen Zellen. Dies konnte an Mäusen v.a. für die in Teratokarzinomen vorkommenden Embryonalkarzinom-Stammzellen (EC) im Vergleich zu pluripotenten embryonalen Zellen gezeigt werden ⁹⁷. Zelllinien, die aus solchen Tumoren erzeugt wurden, bieten aufgrund ihrer Pluripotenz und ihrer einfachen Kultivierung und hohen Verfügbarkeit im Vergleich zu primären Zellkulturen ein hervorragendes *in vitro*-Versuchsmodell zur weiteren Analyse der molekularen Regulation zellulärer Determinierung und Differenzierung ⁹⁸.

Eine der am weitesten verbreiteten und am besten charakterisierten Zelllinie, die aus EC-Zellen eines Teratokarzinom generiert wurde, ist die NTera-2/Clone D1. Deren pluripotente Zellen können je nach Stimulus unterschiedliche Differenzierungswege einschlagen, so z.B. unter Zugabe von Retinolsäure neuronale Zellen ⁹⁹⁻¹⁰¹. Das Vitamin-A Derivat Retinolsäure wirkt dabei als früher Differenzierungsfaktor über eine Induktion von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren u.a in neuronalen Vorläuferzellen ¹⁰². Aufgrund dieser Eigenschaften wird die Zelllinie häufig als *in vitro* System zur Erforschung der humanen Neurogenese genutzt. Darüber hinaus konnte man sich in den letzten Jahren aus diesen Zellen gewonnene humane, postmitotische Neurone in verschiedenen experimentellen Studien zu Nutze machen ¹⁰³.

Wie in den vorhergehenden Abschnitten dargestellt, ist Doublecortin spezifisch in den neuronalen Vorläuferzellen unter Ausschluss pluripotenter, neuraler und glial determinierter Stammzellen nachweisbar. DCX erscheint daher ideal zur weiteren Analyse der neuronalen Determinierung und Neurogenese. In diesem Zusammenhang stehen bisher nicht ausreichend Methoden v.a. *in vitro* zur Verfügung. So war zu Beginn dieser Arbeit keine etablierte Zelllinie bekannt, die DCX exprimiert bzw. zu einer Expression induzierbar wäre. Mit Hilfe einer solchen Zelllinie in Kombination mit geeigneten Reportersystemen hätte man neue Instrumente in der Hand, die eine einfache, schnelle und kostengünstige Analyse der neuronalen Determinierung und Neurogenese unter verschiedensten Fragestellungen ermöglichen.

Ziel dieser Dissertation ist es daher eine Zelllinie zu identifizieren, die zu einer Expression von Doublecortin induzierbar ist. Eine solche Zelllinie stellt ein *in vitro* Modell der frühen neuronalen Determinierung dar. In einem zweiten Schritt soll mit Hilfe eines Reportersystems unter Kontrolle des Doublecortin-Promotors in einer

solchen Zelllinie ein Instrument geschaffen werden, dass eine weitere Analyse der Neurogenese und deren Modulation ermöglicht sowie zu einer weiteren Charakterisierung des DCX-Promotors beiträgt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

In folgenden Abschnitt werden alle im Text nicht gesondert aufgeführten Materialien aufgelistet.

2.1.1. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
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
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau 0,3% w/v	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbeccos Phosphat-gepufferte Salzlösung (DPBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA) pH 8.0	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Fischhaut-Gelatine 1% v/v	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	AppliChem, Darmstadt
β -Mercaptoethanol 2% v/v	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) 0,5% w/v	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Neuronal Growth Factor (NGF)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
dNTPs	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Poly-Ornithin (250 μ g/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Retinolsäure (Retinolsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamid (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Saccharose, Sucrose	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Tris-HCl-Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100 0,1% v/v	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylencyanol 0,3% w/v	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.2. Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Pipettenspitzen	Sarstedt AG, Nümbrecht
Prolong Antifade Kit	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Quarzküvetten Quarzglas-Suprasil, 100µl	Hellma, Mühlheim
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg Falcon BD, Heidelberg Sarstedt AG, Nümbrecht TPP, Trasadingen, Schweiz
Whatman-Papier	Whatman Int. Ltd., Maidstone, England

2.1.3. Verwendete Kits

1. DNeasy Tissue Kits (Quiagen, Hilden)
2. RNeasy-Kits (Quiagen, Hilden)
3. RETROscript Kits (Ambion, Austin, Texas, US)

2.1.4. Standards

1. DNA-Längenstandard VIII, Größenverteilung 0,02 bis 1,1 kbp, PuCBM21 DNA, gespalten mit *HpaII*, und PuCBM21 DNA, gespalten mit *DraI* und *HindIII* (Roche, Grenzach-Wyhlen)
2. Western MagicMark Proteinstandard, Bandenspektrum 20 bis 220 kDa (Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.5. Verwendete Programme und Online-Angebote

1. Rotor-GeneAnalysis Software 6.0 Corbett Research, Sydney, Australia
2. Adobe Photoshop, Version 8.0.1 Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA
3. Microsoft Office for Windows Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
4. SPOT Dokumentation Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA
5. Color View Dokumentation Soft Imaging Systems, Münster
6. Leica Confocal Software Leica, Heidelberg

2.1.6. Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Begasungsbrutschrank HERAcell	Heraeus/Kendro, Hanau
Blockthermostat Thermomixer Eppendorf 5436	Eppendorf, Hamburg
konfokales Scanning-Lasermikroskop	Leica, Heidelberg
Fastblot Elektrobloetter	Biometra, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Leica DMR	Leica, Solms
Fluoreszenz-Mikroskop invers Olympus IX70	Olympus, Hamburg
Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Hanau
Minigel Twin Apparatur für SDS-PAGE	Biometra, Göttingen
Mini-Zentrifuge C-1200	National LabNet, Woodbridge, NJ, USA
Photodokumentation Ethidiumbromid Gele	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus/Kendro, Hanau
Spektralphotometer Ultrospec 2000	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Thermocycler Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Eppendorf mini spin plus	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientfic-Industries, Bohemia, NY

2.2. Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

Allgemeines: Alle eukaryonten Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37° und in Wasserdampf-gesättigter, 5% CO₂ enthaltender Atomsphäre kultiviert, im Folgenden als „unter Zellkulturbedingungen“ bezeichnet. Zum Schutz vor Kontamination wurden alle Arbeiten mit den Zellkulturen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Alle dabei verwendeten Plastik-Kultur-Gefäße stammten von TPP (Trasadingen, Schweiz) oder Greiner Bio-One (Frickenhausen), die für die Zellkultur verwendeten Kulturmedien und Lösungen von PAN Biotech (Aidenbach).

Auftau- und Einfrierprotokoll: Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen nach Zentrifugation und Entfernung der Kulturmediums in einem Einfriermedium bestehend aus dem jeweiligen Grundmedium, 20% (v/v) fetales Kälberserum (FKS) sowie 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und in Kryotubes (Nunc, Wiesbaden) bei -179°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Reaktivierung wurde der Inhalt der Kryotubes in einem Wasserbad wieder erwärmt, zur Entfernung des Einfriermediums mit 50 ml Kulturmedium verdünnt, abzentrifugiert wieder in Kultur genommen.

Bestimmung der Zellzahl: Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neugebauer Zählkammer (Brand, Wertheim), wobei tote Zellen durch Markierung mit Trypanblau (Endkonzentration 0,2% w/v, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) von der Zählung ausgeschlossen wurden.

2.2.1.1 Zelllinien

Die folgenden, immortalisierten Zelllinien wurden unter den oben genannten Kulturbedingungen gehalten, alle 3-7 Tage mit Hilfe von Trypsin (Trypsin/EDTA 0,05%/0,02%) vereinzelt und in den jeweiligen Kulturmedien im Verhältnis 1:10 bis 1:15 neu angesät:

Ntera-2 (ATCC U.S.A., # CRL-1973)	DMEM, ergänzt mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum, 4 mM L-Glutamin, 4,5 g/l Glucose, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
HELA (ATCC U.S.A., # CCL-2)	MEM(Eagle) mit Earle's BSS, angereichert mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 1mM Natrium-Bicarbonat, 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
SK-N-SH (ATCC U.S.A., # HTB-11)	Siehe HELA
DAOY (ATCC U.S.A., # HTB-186)	Siehe HELA
D283 Med (ATCC U.S.A., # HTB-185)	Siehe HELA
PC-12 (ATCC U.S.A., # CRL-1721)	RPMI 1640, ergänzt durch 10% Pferdeserum, 5% (v/v) fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin

2.2.1.2 Differenzierungsprotokolle

Alle Zelllinien wurden nach der Zellzahlbestimmung in einer Dichte von $1,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² in Plastik-Kultur-Gefäßen mit einer Fläche von 25 cm² oder 75 cm² ausgesät. Für die Zelllinien D283Med und PC-12 wurden diese Gefäße im Gegensatz zu den anderen Zelllinien vorher mit Poly-Ornithin (250 µg/ml) beschichtet, um ein adhärentes Wachstum zu gewährleisten.

Einen Tag nach Aussaat wurde dem Kulturmedium, anlehnend an ein bereits beschriebenes Differenzierungsprotokoll ¹⁰⁴, 10 μ M Retinolsäure zugesetzt. Das mit Retinolsäure versetzte Kulturmedium wurde über zwei Wochen alle drei Tage erneuert. Anschließend wurden die Zellen über weitere zwei Wochen nur noch mit dem jeweiligen Medium kultiviert.

Zusätzlich wurde ein weiteres spezifisches Protokoll ⁹⁶ zur Differenzierung der PC-12 eingesetzt. In diesem Fall wurden die Zellen zwei Wochen lang unter Kulturbedingungen mit 50 ng/ml NGF (Nerve Growth Factor) gehalten. Auch in diesem Fall wurden Medium und NGF alle drei Tage erneuert.

2.2.1.3. Live-Mikroskopie der Zellkulturen

Zellmorphologie: Zur Dokumentation der Zellmorphologie und deren Veränderungen konnte eine Live-Mikroskopie der Zellkulturen an einem Olympus IX-70 Mikroskop durchgeführt werden. Die daran angeschlossene Color View CC12 Kamera und das Dokumentationssystem ermöglichte es, Photos der lebenden Zellen *in vitro* zu machen. Die Morphologie der jeweiligen Zelllinien wurde an den Tagen 1, 7, 14, 21 und 28 des Differenzierungsprotokolls dokumentiert.

Expression von EGFP: In gleicher Weise konnte mit Hilfe der Live-Mikroskopie auch das Reporterprotein EGFP und dessen Modulation in den transgenen Zelllinien nachgewiesen werden. Dabei wurde die grünliche Fluoreszenz des EGFP in den Zellen unter der Anregungs-Wellenlänge von 488 nm detektiert und photographiert.

2.2.1.4. Stabile Transfektion der Ntera2- und Hela-Zelllinien

Transfektion der Zelllinien: Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 10 ml Medium $1,5 \cdot 10^5$ Zellen pro Plastik-Kulturgefäß auf einer Fläche von 75 cm² ausgesät. Für die Transfektion mit den entsprechenden Vektoren (phuDCX-Luciferase, phuDCX-EGFP, siehe Abb. 6), die die Sequenzen des Reportergens unter dem DCX-

Promotor beinhalteten, wurden je 3 µg Plasmid und 5 µl Metafectene (Biontex Laboratories, München) pro 10 cm² gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Nach zwölf Stunden Inkubationszeit wurde das Kulturmedium erneuert.

Nach Ablauf von drei Tagen konnte mit der Selektion von stabilen Transfektanten begonnen werden. Dies gelang mit Hilfe der auf den transfizierten Vektoren vorhandenen Geneticin-Resistenz. Transfizierte Vektoren werden nur in einzelnen Zellen stabil in das Genom integriert. Die übrigen Vektoren, die nur transient in den Zellen vorhanden sind, werden nach wenigen Tagen abgebaut und verlieren somit ihre Geneticin-Resistenz. Nach vier Wochen Selektion unter 250 µg/ml (Hela) bzw. 300 µg/ml (Ntera-2) Geneticin (G418, Invitrogen, Karlsruhe) überlebten nur diejenigen Zellen, in denen der Vektor stabil in das Genom integriert werden konnte. Aus dieser Zellpopulation wurden mit Hilfe des FACS-Sorters die transgenen Zelllinien kloniert.

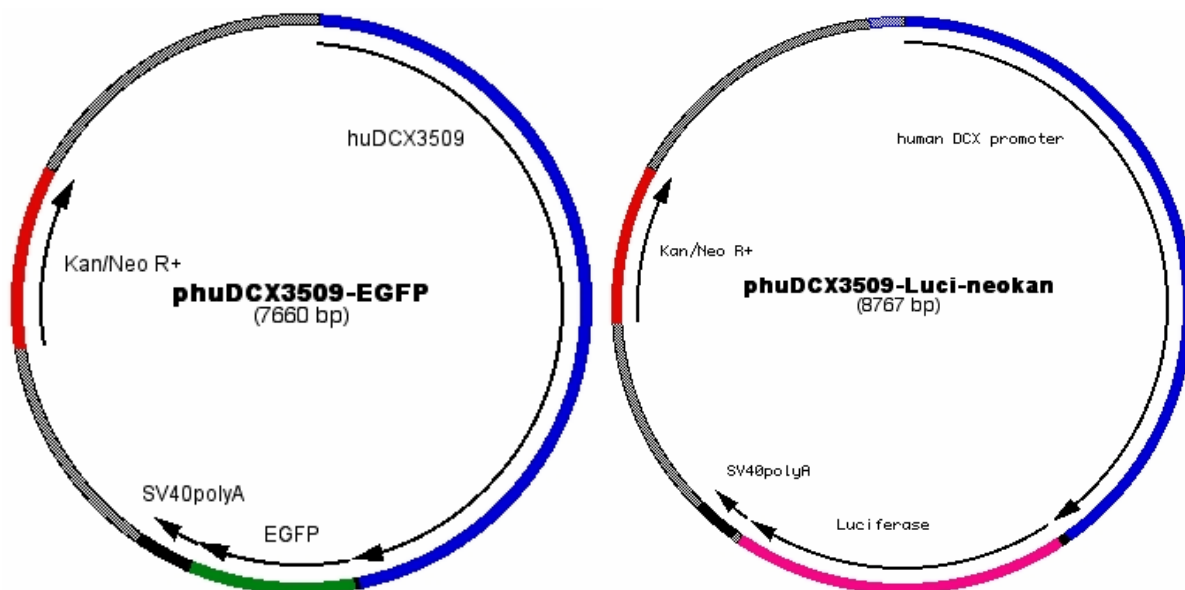


Abb. 6: links: Vektoren zur Expression von Reporterproteinen (EGFP) unter Kontrolle der humanen DCX-regulatorischen Region (huDCX3509)

Rechts: Vektoren zur Expression von Reporterproteinen (Luziferase aus Glühwürmchen) unter Kontrolle der humanen DCX-regulatorischen Region (huDCX3509).

2.2.1.5. Klonierung der stabil transfizierten Zelllinien mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Die selektierten, stabil transfizierten Zellen wurden trypsiniert, abzentrifugiert, ein- bis zweimal mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) DPBS gewaschen und in einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ c/ml in DPBS und 0,25 mM EDTA aufgenommen. Nach der Filtration durch ein Nylon-Netz (Porenweite 35 μ m) wurden die Zellen bis zur Sortierung auf Eis aufbewahrt. Die Durchflusszytometrie erfolgte am FACSSStarPlus (BD-Biosciences, Heidelberg) im Institut für Pathologie am Klinikum der Universität Regensburg. Dabei wurden tote Zellen mit Hilfe von Propidiumjodid ausgeschlossen, die lebenden Zellen nach biologischen Charakteristika (Fluoreszenz) selektioniert und je eine Zelle pro Well in einem 96-well-plate Kulturgefäß einsortiert.

Nachdem unter dem Mikroskop sichergestellt wurde, dass sich in jedem Well nur eine Zelle befand, wurden die überlebenden Klone über ein bis zwei Monate unter ständigem Selektionsdruck durch Geneticin weiterkultiviert und vermehrt. Abschließend wurde zur Identifizierung der transgenen Zelllinien mittels eines PCR-Screenings überprüft, ob das jeweilige Reporter-Gen fest in die DNA der Zellen integriert worden war. Nachdem mit dem DNeasy Tissue Kit die DNA aus den Zellen extrahiert worden war, wurde mit den folgenden Oligonukleotiden (siehe Tabelle 1) eine qualitative PCR (siehe Kap. 2.2.2.2.) durchgeführt und die vermehrte DNA mittels einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Aktin-Primer dienten dabei als interne Kontrolle für das grundsätzliche Funktionieren der PCR in jedem Ansatz. Die Integration des Vektors in die transgenen Zellen wurde durch die Anwesenheit eines 587 bp (EGFP) bzw. 333 bp (Glühwürmchen-Luziferase) großen PCR Produkts bestätigt, die Kontroll-Aktin Bande lag bei 700 bp.

Zelllinien in denen der feste Einbau des Reporter-Gens per PCR nicht nachweisbar war oder bei denen bereits im undifferenzierten Status EGFP nachweisbar war, wurden verworfen.

Reportergen	Oligonukleotide
EGFP	EGFP-fow GCT GAC CCT GAA GTT CAT CTG, EGFP-rev GGA CTT GAA GAA GTC GTG CTG
Luziferase <i>Photinus pyralis</i>	Oligo 5' TCA AAG AGG CGA ACT GTG TG Oligo 3' TTT TCC GTC ATC GTC TTT CC
Aktin	Actin-fow AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC, Actin-rev CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA

Tabelle 1: Primer-Sequenzen zum Nachweis der benutzten Reportengene

2.2.2. Nukleinsäuretechniken

2.2.2.1. Isolierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

Isolierung der Nukleinsäuren: Für die Nukleinsäurengewinnung wurden zunächst der konfluente Zellrasen aus einem T-75 Kulturgefäßen extrahiert und das Kulturmedium durch Zentrifugation entfernt. Anschließend konnte mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits (Quiagen, Hilden) genomische DNA, und durch Anwendung des RNeasy-Kits (Quiagen, Hilden) RNA isoliert werden.

Quantifizierung der Nukleinsäuren: Nach der Extraktion aus den Zellen wurde die Konzentration der Nukleinsäuren in Quarzküvetten (Quarzglas-Suprasil, 100µl, Hellma, Mühlheim) mit einem Spektralphotometer (Ultrospec 2000, Amersham-Pharmacia, Freiburg) bestimmt. Dabei entsprach eine Absorption von 1 bei 260 nm (A_{260nm}) einer Konzentration genomischer DNA von 50 µg/ml beziehungsweise von 40 µg/ml bei RNA.

2.2.2.2 Reverse Transkription von mRNA und Polymerasekettenreaktion

Reverse Transkription von RNA in cDNA: Da die extrahierte RNA nicht direkt als Untersuchungsmaterial und Vorlage in der Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction", PCR) dienen kann, musste dem Vermehrungsschritt immer die reverse Transkription (RT) vorausgehen, in der eine zur RNA komplementäre DNA-Sequenz ("complementary" DNA, cDNA) generiert 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) 3 min lang bei 85°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzubrechen. Anschließend erfolgte in einem Thermocycler bei 42°C über 60 min die Synthese von cDNA 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). Zur Inaktivierung des Enzyms Reverse Transkriptase wurden die Proben im letzten Schritt 10 min lang bei 92°C inkubiert.

Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Spezifische Sequenz-Abschnitte der so gewonnenen cDNA wurden anschließend mit Hilfe der Rotor-Gene 3000 Real-Time-PCR-Maschine (Corbett Research, Mortlake, Sydney, Australia) vermehrt und dabei gleichzeitig mit der Rotor-Gene 6.0 Software (Corbett Research, Mortlake, Australia) quantitativ ausgewertet. Dies geschah mittels Zugabe zweier für den zu vermehrenden Abschnitt spezifischer Primer (Konzentration je 0,3 µM, Sequenzen siehe Tabelle 2) sowie einem SYBR-Green Master Mix (Brilliant SYBR Green, Strategen), der die benötigten dNTPs, die Taq-Polymerase, einen PCR-Puffer und SYBR-Green enthielt. SYBR-Green bindet doppelsträngige DNA, und fluoresziert im gebundenen Zustand nach Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge. Je höher also die Menge an PCR Produkt ist, desto höher ist auch die beobachtete Fluoreszenz. Durch Messung der Fluoreszenz während jedes einzelnen PCR-Zyklus kann die Reaktionskinetik ermittelt und in Form eines Fluoreszenzgraphen dargestellt werden. Mit Hilfe von Standardproben kann rechnerisch auf die Anfangsmenge der cDNA rückgeschlossen werden und somit eine Aussage über die Menge der mRNA eines jeden Gens im Ansatz und damit das Ausmaß seiner Expression getroffen werden. Die Standardisierung und die Vergleichbarkeit der einzelnen Proben wurde ermöglicht durch eine zusätzliche Quantifizierung der 15S-rRNA als Maß für die eingesetzte Menge an total-RNA der jeweiligen Probe. Die Expression wurde zur Vergleichbarkeit als Ratio, z.B. EGFP/rRNA 15S-Ratio, dargestellt. Als 15S-rRNA-Primerpaar wurde der mitgelieferte 15S Primer (RETROSkript kit, Ambion) benutzt.

Das PCR-Protokoll der Rotor-Gene Maschine begann mit der Aktivierung der Taq-Polymerase über fünfzehn Minuten bei 95°C, gefolgt von 50 bis 60 Vermehrungszyklen, die aus je einer Phaselänge von 20 s bei 95°C, von 30 s bei 60°C und von 30 s bei 72°C bestanden. Zur Quantifizierung des DNA-Gehalts erfolgte nach jedem Zyklus eine automatische Messung der der Fluoreszenz, die von der DNA in Verbindung mit SYBR-Green ausging. An diese zyklische Temperaturfolge schloss sich über 20 min eine Meltingphase von 60 bis 99°C als Qualitätsnachweis an, um eine

Kontamination, Mispriming und Primer-Dimer-Artefakte auszuschließen und um sicherzugehen, dass nur die gewünschte Sequenz amplifiziert wurde.

Gen	Primer-Sequenz
EGFP	forward 5' - GCT GAC CCT GAA GTT CAT CTG -3' reverse 5' - GGA CTT GAA GAA GTC GTG CTG -3'
DCX	forward 5' - GGA AGG GGA AAG CTA TGT CTG -3' reverse 5' - TTG CTG CTA GCC AAG GAC TG -3'
Luziferase <i>Photinus pyralis</i>	forward 5' TCA AAG AGG CGA ACT GTG TG reverse 3' TTT TCC GTC ATC GTC TTT CC
rRNA 15S	Keine Angabe durch den Hersteller

Tabelle 2: Primer-Sequenzen der RT-PCR

Qualitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Zur Vermehrung spezifischer Sequenzen aus direkt isolierter DNA wie auch aus cDNA wurde eine PCR ohne gleichzeitige quantitative Messung durchgeführt. Dabei wurden je zwei für den zu vermehrenden Abschnitt spezifische Primer (Konzentration je 0,3 μ M, siehe Tabelle 1), das Enzym *Taq*-DNA-Polymerase (1 Unit/ 25 μ l; Roche, Grenzach-Wyhlen) zusammen mit 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) eingesetzt. Auf einen vierminütigen Denaturierungsschritt (94°C) folgten 30 Vermehrungszyklen, jeweils mit 45 s bei 94°C, 1 min bei 58°C sowie 2 min bei 72°C. Nach den Zyklen folgte ein letzter Elongationsschritt (8 min bei 72°C).

Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren: Zum qualitativen Nachweis wurde die in der PCR vermehrte DNA in 1,5% w/v Agarose-Gelen mit 0,5 x TBE-Laufpuffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0) elektrophoretisch bei einer Feldstärke von 5 V/cm 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). Um die aufgetrennte DNA indirekt nachweisen zu können, wurden die Agarose-Gele mit Ethidium-Bromid (EtBr, Endkonzentration 0,5 μ g/ml) versetzt. Angeregt durch UV-Strahlung (λ = 254 nm) wird vom EtBr-Molekül

sichtbares Licht ($\lambda = 590 \text{ nm}$) zurückgeworfen. An DNA gebundenes EtBr erzeugt eine deutlich stärkere Fluoreszenz, wodurch sich charakteristische Banden nachweisen lassen.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

Proteinextraktion: Zur Gewinnung von Proteinextrakten aus Zellkulturen wurden diese zunächst trypsinisiert, in DBPS aufgenommen und 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Um sicherzugehen, dass das Medium vollständig entfernt war, wurden weitere 1-2 Waschschr tte mit 10 ml DPBS durchgeführt. Das übrig bleibende Zellpellet wurde anschließend in 1,5 ml SUB-Puffer (0,5% w/v Natrium-Dodecyl-Sulfat, 8 M Harnstoff, 2% v/v β -Mercaptoethanol) resuspendiert und anschließend homogenisiert. Das homogenisierte Material wurde nun 10 min lang bei 10000 U/min zentrifugiert, um möglicherweise verbliebenen Zelldetritus vom Proteinextrakt zu entfernen. In dem so gewonnen Überstand wurde anschließend abgeschöpft und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Bradford mit einem Spektralphotometer (Ultrospec 2000, Amersham-Pharmacia, Freiburg) bei 595 nm bestimmt. Die Proteinextrakte wurden bei -80°C gelagert.

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot: 3 μg Protein je Spur wurden im Verhältnis 1:5 (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 dH_2O) versetzt und für 5 min aufgekocht. Anschließend wurde das Protein-Puffer-Gemisch in die Taschen eines 12,5% SDS-Polyacrylamid-Gel geladen und bei 2 mA/cm nach dem relativen Molekulargewicht aufgetrennt. Als Proteinstandard wurde der Western MagicMark eingesetzt. Im nächsten Schritt wurde das aufgetrennte Protein senkrecht zu bisherigen Laufrichtung auf eine Nitrocellulose-Membran mit 0,45 μm Porengröße (Protran BA 85, Schleicher+Schuell, Dassel) transferiert (2,5 mA/cm², 0,7 h) und damit immobilisiert.

Um die Proteine Doublecortin, EGFP und Aktin immunologisch sichtbar zu machen, wurde die Membran zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur gegenüber

unspezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen mit Gelatine-Westernpuffer (20 mM Tris-HCl pH 7.3, 0,9% w/v NaCl, 1% v/v Fischhaut-Gelatine, 0,1% v/v Tween-20) blockiert. Die weiteren Waschschr tte und die Inkubation mit Antikörpern wurden ebenfalls mit diesem Gelatine-Westernpuffer durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden die geblotteten Proteine über Nacht bei 4 C folgenden Antikörpern ausgesetzt: anti-DCX C-18 (Ziegen IgG, 1:1000, Santa Cruz, California, USA), anti-GFP (Ziegen IgG, 1:1000, Rockland, Gilbertsville, PA, USA) oder anti-Aktin (Kaninchen IgG, 1:5000, Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Am darauf folgenden Tag wurden die Membranen dreimal für 10 min auf einem Rotationsschüttler gewaschen und danach mit dem zweiten Antikörper (Verdünnungen 1:10.000) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert: Halocynthia-roretzi-Peroxidase (HRPox) anti-Ziege-IgG vom Kaninchen (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) bzw. HRPox anti-Kaninchen-IgG vom Esel (Dianova, Hamburg). Nach 3 bis 4 weiteren Waschschr tten erfolgte die Detektion der Peroxidase-Aktivität, gestützt auf das ECL-Plus Western Blotting Detection System (Amersham-Pharmacia, Freiburg). Dabei wurde die entstehende Lumineszenz auf Röntgenfilmen (Hyperfilm, Amersham-Pharmacia, Freiburg) detektiert.

2.2.4. Immunhistochemische Analyse der Zellkulturen

Die unter 2.2.1.1 beschriebenen Zellkulturen wurden nach dem im Folgenden beschriebenen Ablauf immunhistochemisch untersucht.

Anfertigung der immunhistochemischen Färbung: Die zu untersuchenden Zellen wurden auf mit Poly-Ornithin beschichteten Glas-Deckgläschen in einer Dichte von $1 \cdot 10^4$ c/cm² ausgesät und kultiviert. Für die immunhistochemische Untersuchung wurden die adhärenten Zellen über 30 min bei Raumtemperatur in Phosphat-gepuffertem 4%-igen Paraformaldehyd (4% w/v PFA, 2,5 mM NaOH, 0,4 mM CaCl₂, 50 mM Sucrose, 0,1 M NaPO₄) fixiert und anschließend dreimal für 10 min mit TBS (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) gewaschen. Nach dem folgenden Blockieren über eine Stunde mit Histologie-Gelatinepuffer (0,1 M Tris-HCl pH 7.4,

0,15 M NaCl, 1% w/v bovines Serumalbumin, 0,2% v/v Fischhaut-Gelatine und 0,1% v/v Triton X-100) wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit folgenden, primären IgG-Antikörpern in Gelatinepuffer inkubiert:

Primärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Ziege anti-DCX C18	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, US	1:250
Kaninchen anti-GFAP	Dako, Glostrup, Dänemark	1:1000
Maus anti-Map-2a/b	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:250
Kaninchen anti-Nestin	Millipore, Billerica, MA, US	1:200
Ziege anti-GFP	Rockland, Gilbertsville, PA, US	1:500
Kaninchen anti-GFP	Molecular Probes Inc., Eugene, OR, US	1:1000

Tabelle 3: primäre Antikörper

Am nächsten Tag folgten zur Entfernung der primären Antikörper bei R.T. zwei Waschschrte mit Histologie-Gelatinepuffer über je 10 min. Anschließend wurden die Zellen über zwei Stunden bei R.T mit sekundären Rhodamin Red-X (RhoX)-, Cy5-, Alexa 488nm- oder Fluorescein (FITC)-konjugierten Antikörpern vom Esel, die 1:500 in Histologie-Gelatinepuffer verdünnt wurden, inkubiert. Verwendet wurden dabei die in der folgenden Tabelle aufgeführten, konjugierten anti-Maus, anti-Kaninchen und anti-Ziege IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg).

Sekundärer Antikörper	Verdünnung
Esel anti-Ziege FITC	1:500
Esel anti-Ziege RhoX	1:500
Esel anti-Kaninchen FITC	1:500
Esel anti-Kaninchen RhoX	1:500
Esel anti-Kaninchen Cy5	1:500
Ziege anti-Kaninchen RhoX	1:500
Esel anti-Maus Cy5	1:500

Esel anti-Maus Rhox	1:500
Esel anti-Maus Alexa488nm	1:500
Ziege anti-GFP	1:500
Kaninchen anti-GFP	1:500

Tabelle 4: sekundäre Antikörper

Nach zwei weiteren Waschschritten zur Entfernung des sekundären Antikörpers schloss sich die Gegenfärbung der Zellkerne mit 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid-Hydrat (0,25 µg/µl, DAPI, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) an. Dem letzten Waschschriff folgte die Übertragung der Proben auf Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) mit Hilfe des. Eindeckelmediums Prolong (Prolong Antifade Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)

Mirkoskopische Auswertung der Zellkultur-Immunhistologie: Die auf Objektträgern immunzytochemisch markierten Zellkulturen wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskop Leica DMR (Leica, Solms) untersucht und mit dem SPOT Dokumentationssystem (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) dokumentiert. Zur mikroskopischen Analyse der immunzytochemischen Färbungen wurde auch das konfokale Scanning-Lasermikroskop zusammen mit der Leica Confocal Software (Leica, Heidelberg) eingesetzt. Dies ermöglichte unter den Anregungs-Wellenlängen 488 nm, 568 nm und 647 nm die Detektion von Alexa 488nm, FITC, Rhodamin sowie Cy5.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnis I: Expression von DCX in neuronalen Zelllinien und der Einfluss von Differenzierungsbedingungen

Im ersten Versuchsabschnitt sollte eine etablierte Zelllinie gefunden werden, bei der eine Doublecortin-Expression nicht vorhanden, jedoch induzierbar ist und somit die frühe neuronale Determinierung und Differenzierung imitieren. Daher wurden die ausgewählten Zelllinien einem vierwöchigen Differenzierungsprotokoll mit Retinolsäure unterzogen und jeweils vor und nach der Differenzierung auf Veränderungen der Expression des Doublecortins hin untersucht. Dies geschah auf vier Ebenen basierend auf der Morphologie, auf immunhistochemischen Untersuchungen, auf der Gen-Expression und auf dem Proteingehalt der Zellen. Zusätzlich zur Differenzierung mit Retinolsäure wurde die PC-12-Zelllinie einem spezifischem, bereits vorbeschriebenem Differenzierungsprotokoll durch Zusatz von NGF über 14 Tage unterzogen⁹⁶ und in gleicher Form auf eine Induktion von DCX hin untersucht.

3.1.1 Morphologisches Erscheinungsbild der Zelllinien vor und nach Differenzierung mit Retinolsäure

Um Aussagen über Veränderungen des Phänotyps treffen und im Verlauf darzustellen zu können, wurden die Zelllinien in den Kulturgefäßen zu verschiedenen Zeitpunkten photographiert. In Abb. 7 dargestellt sind Photographien an den Zeitpunkten Tag 1 und Tag 28 des Differenzierungsprotokolls.

Besonders ausgeprägt war die Metamorphose der Ntera-Zellkultur. Bereits nach wenigen Tagen veränderte sich der Phänotyp hin zu Zellen mit neuronalem Habitus. Dabei entstanden zum Teil mehrschichtige Zell-Cluster mit langen Zellausläufern, die

ein ausgedehntes und komplexes Netzwerk bildeten. Die D283-Zellen zeigten sich nach 28 Tagen in der Aufsicht flächig verbreitert und es fiel insgesamt eine Rarefizierung der Zellen bei vermehrtem Zelluntergang auf. Im Gegensatz dazu zeigten sich nach vier Wochen Differenzierung keine oder nur marginale Veränderungen des morphologischen Erscheinungsbildes bei den Zelllinien DAOY, Hela, PC-12 und SK-N-SH.

Zu beobachten war auch eine unterschiedlich starke Beeinflussung der Proliferation bei den verschiedenen Zelllinien durch die Retinolsäure. Bei einigen Zellkulturen (DAOY, SK-N-SH, Hela) war keine Beeinflussung im Sinne einer Wachstumshehmung nachweisbar, während es bei anderen zu einer Verlangsamung der Zellteilungsrate und zu einem verstärkten Zelluntergang kam (Ntera, PC-12 und D283).

Weiterhin dargestellt in Abb. 7, eingefügt in e', ist die Morphologie der PC-12-Zelllinie nach einer Differenzierung mit NGF über 14 Tage. Hier konnten die bereits vorbeschriebenen, phänotypischen Veränderungen beobachtet werden ⁹⁶; es bildeten sich lange, dendritenartige Zellausläufer, es entstand ebenfalls ein ausgedehntes Netzwerk.

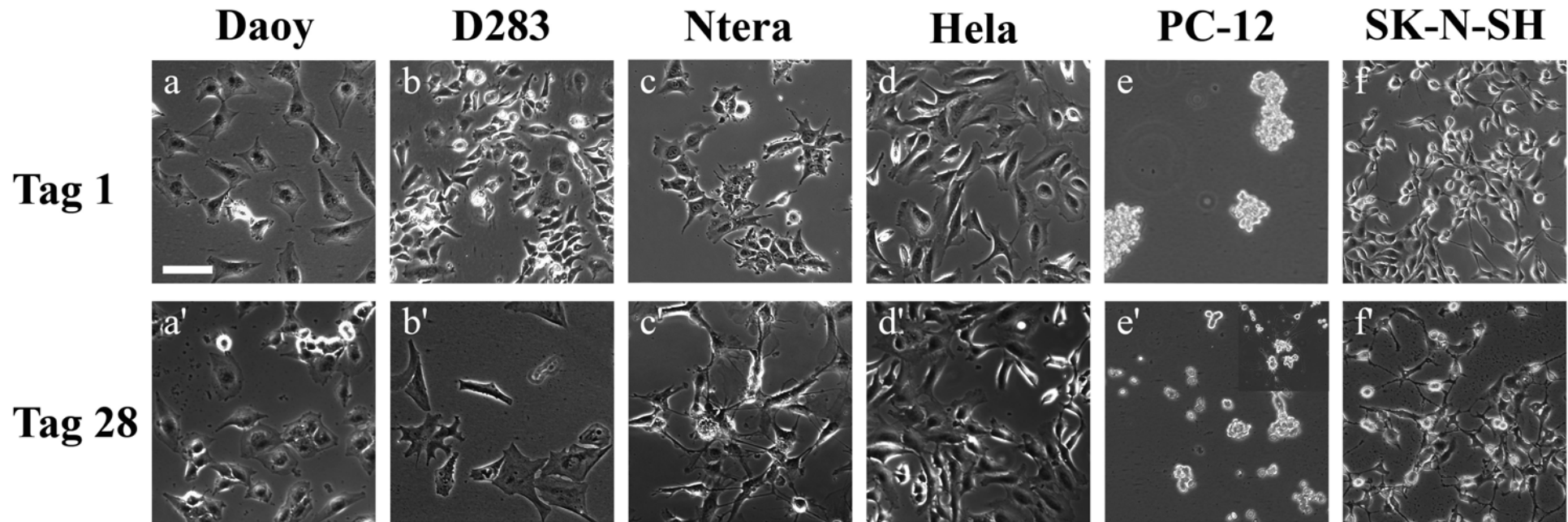


Abb. 7 a-f, a'-f': Veränderungen der Morphologie durch die Differenzierung in den verschiedenen Zelllinien. Lichtmikroskopische Aufnahmen aus den jeweiligen Zellkulturen am ersten (a-f) und letzten Tag (a'-f') des Differenzierungsprotokolls mit Retinolsäure. Auffällige Veränderungen des Phänotyps zeigten sich in den Zelllinien D283Med (b und b') und Ntera (c und c'). Keine bzw. kaum Veränderungen waren bei den restlichen Zelllinien nachweisbar: a, a' DAOY; b, b' D283Med; c, c' Ntera; d, d' Hela; e, e' PC-12; f, f' SK-N-SH.

3.1.2 Immunhistochemische Darstellung der Expression neuronaler Marker vor und nach Differenzierung mit Retinolsäure

Um eine neuronale Differenzierung und eine Induktion der DCX-Expression in den Zelllinien zu belegen, wurden mit gt-anti-DCX- bzw. ms-anti-Map2a/b-Antikörpern in einer Immunfärbung Doublecortin als Marker neuronaler Vorläuferzellen⁷⁰ und MAP2a/b als neuronalem Marker nachgewiesen.

In keiner der untersuchten Zelllinien, die an den Tagen 1 und 28 des Differenzierungsprotokolls fixiert und anschließend gefärbt wurden, war zu Beginn der Differenzierung Doublecortin oder MAP2a/b nachweisbar (Abb. 8 a-f). Nach vier Wochen zeigte sich in den Zellkulturen ein unterschiedliches Expressionsmuster der neuronalen Marker. So fand sich in der Ntera-Zellpopulation ein Netzwerk morphologisch veränderter Zellen mit dendritenartigen Ausläufern, in denen sowohl Doublecortin als auch Map2a/b deutlich nachweisbar war. Als Ausdruck einer Co-Expression von Doublecortin (grün fluoreszierend) und MAP2a/b (rot fluoreszierend) imponierten diese Zellen bei sich überlagernder Fluoreszenz gelblich (Abb. 8 c'). Morphologisch nicht veränderte Zellen zeigten keinen Nachweis von Doublecortin oder Map2a/b. In den D283Med-Zellkulturen war ebenfalls nach vier Wochen eine Expression von Doublecortin nachweisbar, die sich jedoch weniger stark ausgeprägt zeigte bei allenfalls schwachem Nachweis einer Co-Expression von MAP2a/b.

Umgekehrt verhielt es sich bei den PC-12: nach der Differenzierung konnte MAP2a/b nachgewiesen werden, ohne dass es Hinweise auf eine Doublecortin-Expression gab. In den Zelllinien DAOY- und SK-N-SH zeigten sich durch die Differenzierung in der Immunfluoreszenz keine Veränderungen im Expressionsmuster; in den Hela Zellkulturen gelang vereinzelt ein schwacher Nachweis von Map2a/b gefärbten Strukturen.

In der zusätzlich durchgeführten Differenzierung der PC-12 mit NGF war ebenfalls kein Hinweis auf eine DCX-Expression zu beobachten, aber es zeigte sich ein deutlicher Nachweis von Map2a/b in den Zellen und deren Ausläufern.

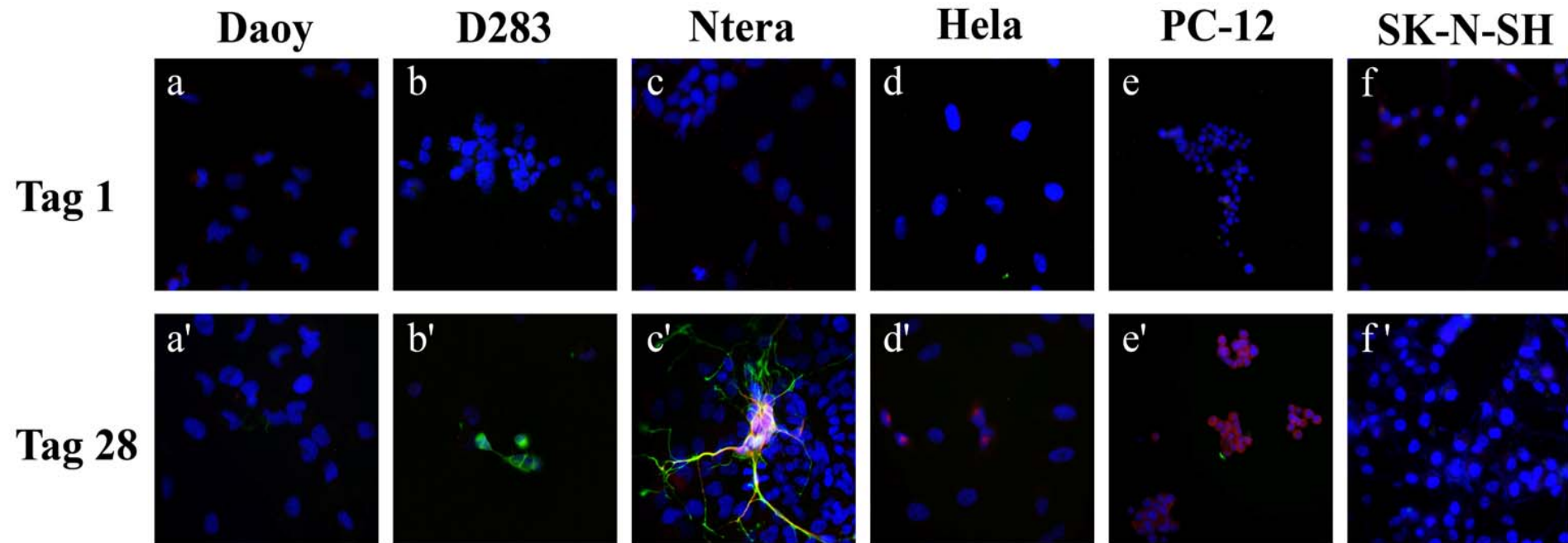


Abb. 8 a-f, a'-f': Veränderungen des immunhistochemischen Expressionsmusters der neuronalen Marker Doublecortin (grün), Map2a/b (rot) durch die Differenzierung in verschiedenen Zelllinien. Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen aus den jeweiligen Zellkulturen am ersten (a-f) und letzten Tag (a'-f') des Differenzierungsprotokolls mit Retinolsäure. Die mit DAPI durchgeführte Kernfärbung stellt sich **blau** dar. Durch die Differenzierung kam es zu einer Expression von DCX in den Zelllinien D283Med (b') und Ntera (c') und einer Expression von Map2ab in den Ntera (c') und den PC-12 (e'). In den Ntera kam zu einer deutlichen Co-Expression der Marker DCX und Map2ab (c'). a, a' DAOY; b, b' D283Med; c, c' Ntera; d, d' Hela; e, e' PC-12; f, f' SK-N-SH.

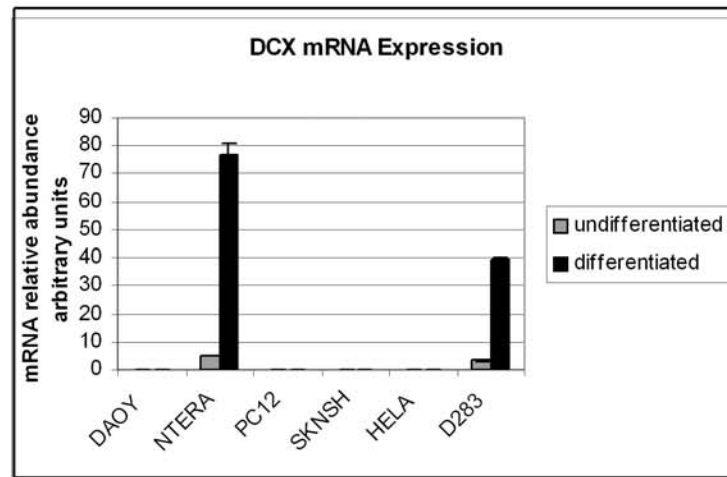
3.1.3 Veränderungen der Doublecortin-Expression unter dem Einfluss der Differenzierung im Western-Blot und der RT-PCR

In den folgenden Experimenten sollten die bisherigen Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen weitergehend analysiert und die durch die Differenzierung der Zelllinien verursachten Veränderungen der Gen-Expression quantifiziert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde zum einen mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR-Analyse der mRNA-Gehalt der Zellen gemessen und zum anderen der Doublecortin-Proteingehalt der Zellen im Western-Blot dargestellt (Abb. 9). Untersucht wurde das Homogenat aus den jeweiligen Zellkulturen an den Zeitpunkten Tag 1 und 28.

Um in der quantitativen RT-PCR-Analyse vergleichbare Werte zwischen den untersuchten Zelllinien zu erhalten, wurde die Doublecortin-mRNA-Expression ins Verhältnis zur konstanten rRNA-Expression gesetzt. Anschließend wurde die Doublecortin/rRNA-Ratio berechnet und verglichen. In allen undifferenzierten Zellen war Doublecortin-mRNA unterhalb der Nachweisgrenze. Nach Differenzierung kam es bei den Ntera von 4,83 ($\pm 0,071$) auf 76,62 ($\pm 4,51$) und bei den D283 von 3,33 ($\pm 0,18$) auf 39,72 ($\pm 0,39$) zu einem signifikanten 16- bzw. 12-fachen Anstieg der Doublecortin/rRNA-ratio. Für die übrigen Zelllinien konnten am Tag 28 keine signifikanten Veränderungen in der Doublecortin-Expression im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 nachgewiesen werden (Abb. 9 A).

Im Anschluss wurden zum weiteren Nachweis Western-Blots durchgeführt, die die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR-Analyse bestätigten. Es zeigte sich nach vier Wochen Differenzierung ein deutlich positiver Proteinnachweis für Doublecortin in dem Homogenat der Ntera-Zelllinie. Der Doublecortin-Protein Nachweis für die D283Med-Zellen zeigte sich etwas schwacher (Abb. 9 B).

A



B

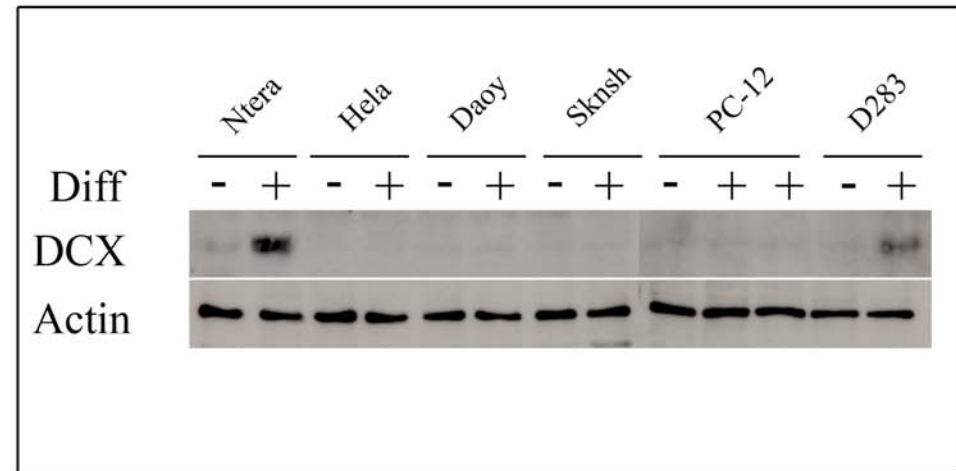


Abb. 9: Vergleich der DCX-Expression aus den Homogenaten der jeweiligen Zelllinien vor und nach Differenzierung mit Retinolsäure

A: quantitative RT-PCR Analyse aus dem Homogenat der jeweiligen Zelllinien an den Tagen 0 und 28 der Differenzierung. Dargestellt als vergleichbare Genratio DCX/rRNA. Es zeigte sich eine signifikante Induktion der DCX-mRNA in der Ntera- und der D283Med-Zelllinie.

B: proteinbiochemische Analyse aus dem Homogenat der jeweiligen Zelllinie untersucht an den Tagen 0 und 28 der Differenzierung. Immunologischer Nachweis von Doublecortin im Western Blot. Actin diente dabei als Nachweis gleichmäßiger Beladung.

Die Zusammenschau der bisherigen Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen, der RT-PCR und des Western-Blots lässt den Schluss zu, dass es nach 28 Tagen Differenzierung mit Retinolsäure in zwei der untersuchten Zelllinien, Ntera und D283, zu einer Induktion von Doublecortin kommt. Diese Induktion geht mit Veränderungen des Phänotyps sowie dem Nachweis neuronaler Marker einher. Insgesamt war die Induktion bei den Ntera-Zellen wesentlich deutlicher ausgeprägt als in der D283Med-Zelllinie.

3.2 Ergebnis II: Etablierung eines Modells der neuronalen Determinierung *in vitro* mit Hilfe transgener Zelllinien

Nachdem es im ersten Teil der Dissertation gelungen war, Zelllinien zu identifizieren, in denen eine neuronale Differenzierung und die Expression von Doublecortin durch Retinolsäure induzierbar ist, sollte in einem zweiten Schritt mit Hilfe von Reportersystemen transgene, immortale Zelllinien entwickelt werden, die es u. a. ermöglichen, die Aktivität des Doublecortin-Promotors visuell darzustellen und die frühe neuronale Determinierung und Differenzierung weiter zu analysieren.

3.2.1 Etablierung transgener Zelllinien

Im Hinblick auf die bisherigen Ergebnisse schien die Ntera-Zelllinie bestens geeignet zu sein zur Etablierung einer solchen transgenen Zelllinie. Diese Zellen zeichneten sich durch eine bessere Induzierbarkeit des Doublecortin-Gens und der neuronalen Differenzierung sowie eine einfachere Kultivierung im Vergleich zu den D283 aus. Die nicht-induzierbare Hela-Zelllinie wurde als nicht-neuronale Kontrolle ausgesucht.

In einem ersten Schritt wurde die Reporter-Gensequenz *phuDoublecortin3509-EGFP*⁷⁸ durch Transfektion, Selektion und Klonierung fest in das Genom der jeweiligen Zelllinie integriert (Kap.2.2.1.3 + 4). Dabei entstanden die transgenen Zelllinien *NTERA*^{DCX-EGFP} und *HELA*^{DCX-EGFP}. Die erfolgreiche Integration wurde mittels einer PCR bestätigt (Abb. 10). Es fand sich im Gegensatz zu den nativen Kontroll-Zellen ein deutlicher Nachweis für die *phuDoublecortin3509-EGFP*-DNA-Sequenz in dem Genom der transgenen Zellen. In gleicher Weise wurden transgene Zelllinien mit der Reporter-Gensequenz *phuDoublecortin3509-Luciferase* generiert (*NTERA*^{DCX-Luci} und *HELA*^{DCX-Luci}).

In einem zweiten Schritt sollte die Funktionsfähigkeit des Reportersystems der neuen transgenen Zelllinien bestätigt werden. Um die Funktionsfähigkeit zu testen, wurden die transgenen Zelllinien analog zu den nativen Zellen dem in Kap. 2.2.1.2 beschriebenen Differenzierungsprotokoll unterzogen und in gleicher Weise auf eine Induktion und Expression des Doublecortins sowie des EGFPs hin untersucht. Die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

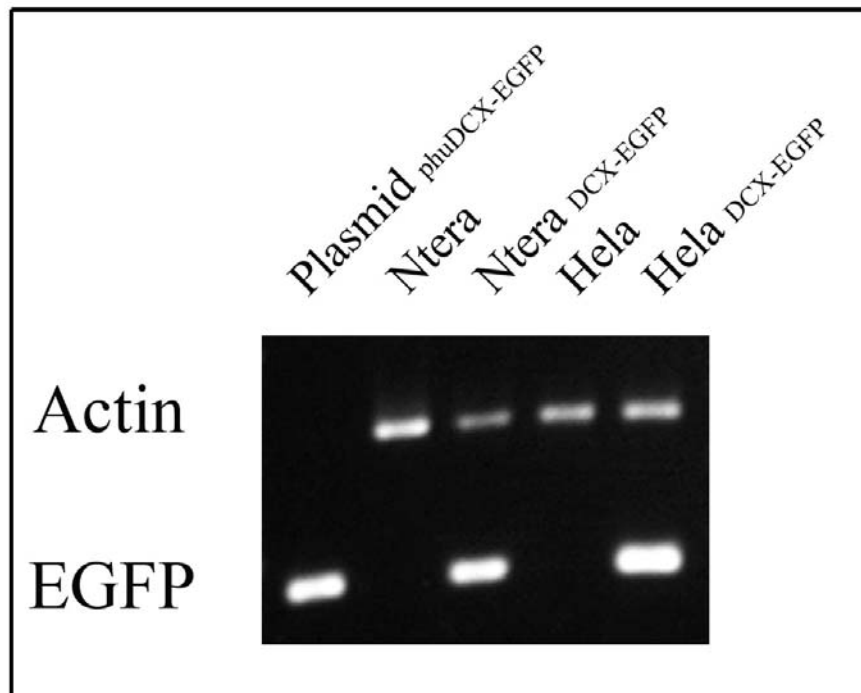


Abb. 10: PCR-Analyse zum Nachweis der erfolgreichen, dauerhaften Integration der *phuDoublecortin3509-EGFP-DNA-Sequenz* in das Genom der transfizierten Zellen. Eingesetzt wurden EGFP- und Actin-Primer. Actin wurde zur DNA- und das transfizierte Plasmid als Positivkontrolle eingesetzt. Der deutliche Nachweis von EGFP-DNA in den Ntera- und Hela-Zellen zeigt die erfolgreiche, stabile Integration des *phuDCX-EGFP* Konstruktes in das Genom der Zelllinie.

3.2.2 Morphologisches Erscheinungsbild der transgenen Zelllinien vor und nach Differenzierung mit Retinolsäure

Die transgenen Zelllinien zeigten ein ähnliches phänotypisches Verhaltensmuster unter Differenzierung wie die nicht-transfizierten Zellen in der

Kontrollkultur. In den vier Wochen kam es analog zu den Versuchen an den nativen Zellen bei den transfizierten Ntera zu deutlichen morphologischen Veränderungen hin zu einem neuronalen Phänotyp mit Ausbildung mehrschichtiger Zellverbände, die durch lange Zellausläufer einen netzwerkartigen Aufbau zeigten (Abb. 11 a, a'). Die transgenen Hela zeigten wie die native Zelllinie keine morphologischen Veränderungen unter Behandlung mit Retinolsäure, dargestellt in Abb. 11 c, c'.

3.2.3 Induktion neuronaler Marker und des DCX-EGFP-Reportersystems in den transgenen Zelllinien unter Differenzierung

An den transgenen Zellkulturen wurde im Verlauf der Differenzierung in regelmäßigen Abständen eine Live-Mikroskopie durchgeführt, um die grünliche Fluoreszenz des EGFP als Ausdruck einer Aktivierung des *phuDCX-EGFP*-Konstruktes detektieren und dokumentieren zu können. In den Kulturen der transgenen Ntera-Zelllinie war ab circa dem zehnten Tag eine zunehmende, grünliche Fluoreszenz zu beobachten, die sich bis zum 28. Tag noch deutlich, jedoch in abnehmendem Maße, nachweisen ließ. Am stärksten ausgeprägt war diese Fluoreszenz, die sich bis in die Ausläufer klar darstellte, in den Zellen mit neuronal verändertem Phänotyp (Abb. 11 b,b'). Im Gegensatz dazu war in der transfizierten Hela-Zellkultur sowie in den Kontrollzellen keine Fluoreszenz nachweisbar.

In den nachfolgenden immunhistochemischen Färbungen zeigten transgene und nicht-transfizierte Zellen im Hinblick auf die neuronalen Marker Map2ab und DCX ein identisches Expressionsmuster. Zusätzlich konnte nach Ablauf der 28 Tage bei den transgenen Ntera EGFP immunhistochemisch nachgewiesen werden (Abb. 11 e-g). Dabei konnte eine Co-Expression von EGFP, Doublecortin und Map2a/b die in diesen Zellen beobachtet werden (Abb. 11 h).

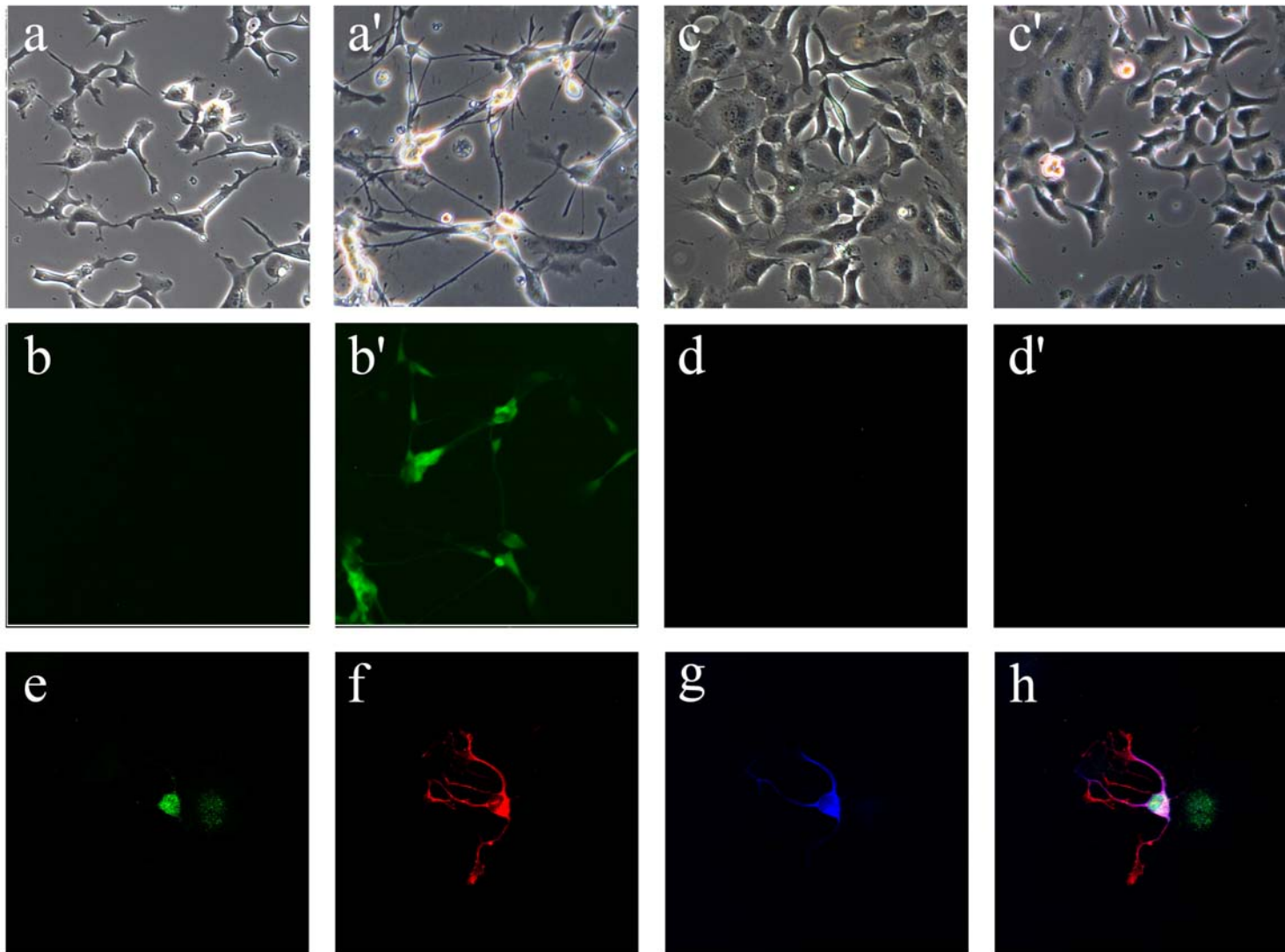


Abb. 11: a - d, a' - d': Veränderungen der Morphologie (a, a' und c, c') und der Fluoreszenz (b, b' und d, d') durch die Differenzierung in den transgenen Zelllinien. Licht- und entsprechende fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aus den jeweiligen Zellkulturen am ersten (a, b und c, d) und letzten Tag (a', b' und c', d') des Differenzierungsprotokolls mit Retinolsäure. Dabei zeigten sich bei den transgenen Ntera gegenüber den nativen Zellen analoge phänotypische Veränderungen (a') und eine durch grünliche Fluoreszenz gekennzeichnete Induktion des EGFP-Reporterproteins (b'). In den transgenen Hela waren keine Veränderungen der Morphologie oder der Fluoreszenz nachweisbar.

e-h: Immunhistochemische Analyse der transgenen Ntera-Zelllinie nach Differenzierung mit Retinolsäure. In den Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen zeigte sich eine Ko-Expression von DCX (rot, f), Map2ab (blau, g) und EGFP (grün, e), dargestellt in einer überlappenden Darstellung (h).

3.2.4 Vergleich der Expression des Doublecortins und des DCX-Promotor kontrollierten EGFPs in den transgenen Zellen unter Differenzierung

Zum Nachweis einer analogen Expression von Doublecortin in den nativen und den transgenen Zelllinien sowie zur Bestätigung der konkordanten Induktion von DCX und EGFP in den transgenen Zellen wurden RT-PCRs sowie Western Blots aus dem Homogenat der jeweiligen Zellen an den Tagen 1 und 28 durchgeführt.

Für die transgenen Ntera konnte dabei ein analoges Expressionsmuster im Vergleich zu den Zellen des Wildtyps nachgewiesen werden. Nach Abschluss der Differenzierung zeigte sich bei den transgenen Ntera in der RT-PCR ein vergleichbar signifikanter Anstieg der Doublecortin/rRNA-ratio von $3,2 (\pm 0,2)$ auf $82,8 (\pm 4,1)$ um das 26-fache (Abb. 12 A). Im Western-Blot war wie bei den differenzierten, nicht-transfizierten Zellen eine deutliche Doublecortin-Bande nachweisbar (Abb. 12 B).

Eine dem DCX konkordante Induktion und Expression von EGFP durch die Zugabe von Retinolsäure konnte ebenfalls gezeigt werden. So ließ sich in der RT-PCR ein 15-facher Anstieg der EGFP/rRNA-ratio von $7,31 (\pm 0,54)$ auf $103,5 (\pm 1,53)$ (Abb. 12 B) nachweisen. Eine EGFP-Expression ließ sich nach der Differenzierung auch im Western Blot nachweisen, die sich dort als kräftige Bande präsentierte (Abb. 12 A).

Bei den transfizierten Hela-Zellen bestätigten sich die Ergebnisse der Experimente an den Wildtyp-Zellen. In diesem Zusammenhang war es weder in der

RT-PCR noch im Western-Blot möglich, eine Induktion und Expression von EGFP und DCX nachzuweisen (Abb. 12).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass transgene und native Zellen während der Differenzierung eine identische Entwicklung durchlaufen und es bei transgenen und nicht-transfizierten Ntera zu einem analogen DCX-Expressionsmuster kommt. Weiterhin ließ sich zeigen, dass durch Retinolsäure eine Induktion des phuDCX-EGFP-Konstruktes in den transgenen Ntera möglich ist und diese sich konkordant zur Induktion von DCX verhält.

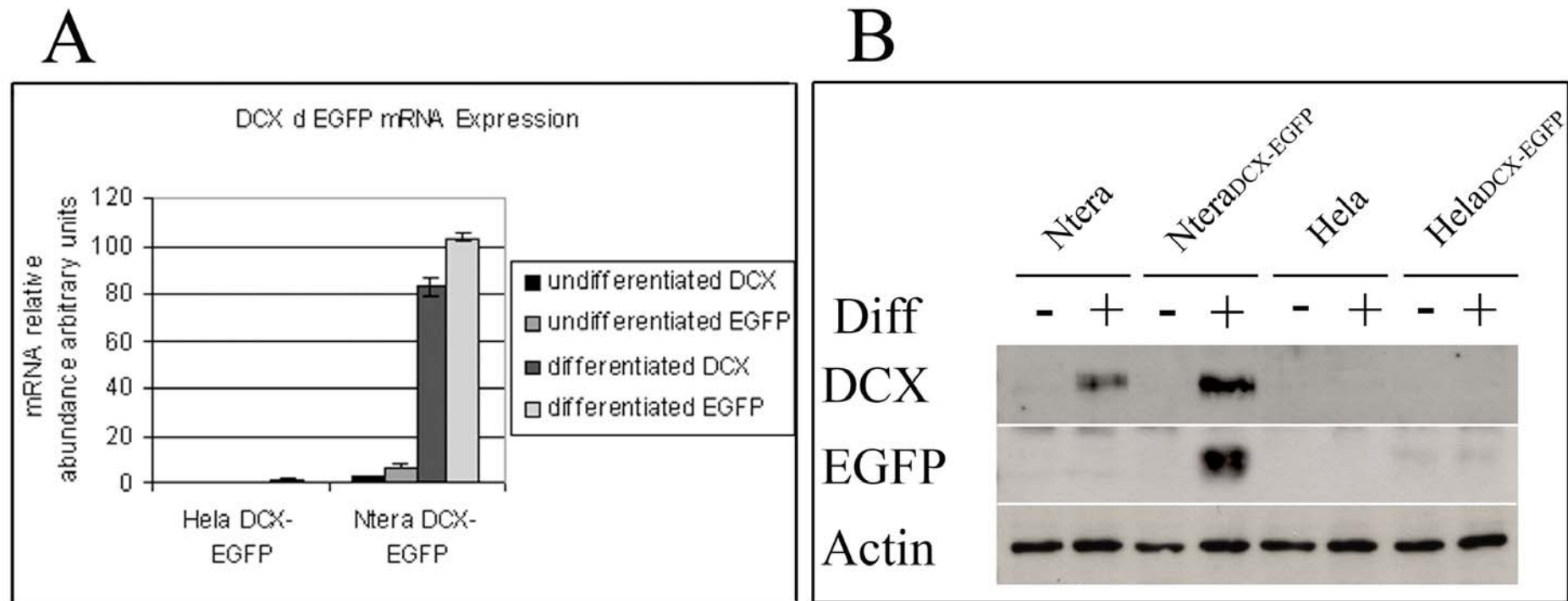


Abb. 12: Vergleich der DCX- und EGFP-Expression aus den Homogenaten der transgenen Zelllinien vor und nach Differenzierung mit Retinolsäure

A: quantitative RT-PCR Analyse aus dem Homogenat der transgenen Zelllinien an den Tagen 0 und 28 der Differenzierung. Dargestellt als vergleichbare Gen-ratio DCX/rRNA. Es zeigte sich eine signifikante und analoge Induktion der DCX und EGFP-mRNA durch die Differenzierung in der transgenen Ntera-Zelllinie. In den transgenen HeLa war kein Nachweis einer DCX- oder EGFP-Expression möglich.

B: proteinbiochemische Analyse aus dem Homogenat der transgenen und der entsprechenden nativen Zelllinie im Vergleich, untersucht an den Tagen 0 und 28 der Differenzierung. Immunologischer Nachweis von Doublecortin und EGFP im Western Blot. Actin diente dabei als Nachweis gleichmäßiger Beladung. Die analoge Nachweis von DCX und EGFP in der transgenen Zelllinie spricht für eine Funktionsfähigkeit des DCX-EGFP Reportersystems.

4. Diskussion

Ziel der hier vorliegenden Dissertation ist es, mit Hilfe von immortalisierten, neuronalen Zelllinien ein Versuchsmodell *in vitro* zu entwickeln, dass sich die früh-neuronale Spezifität des Proteins Doublecortin (DCX) zu Nutze macht und mit Hilfe eines Reportersystems neue Möglichkeiten zur Analyse der neuronalen Differenzierung und Determinierung bietet. Um dieses Ziel zu erreichen sollte im ersten Schritt eine neuronale Zelllinie mit induzierbarer DCX-Expression identifiziert werden, um in einem zweiten Schritt ein Reportersystem unter der Kontrolle der DCX-regulatorischen Sequenz stabil in das Genom der Zelllinie einzubauen. Gegenstand der folgenden Diskussion sind daher unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur und der gewonnenen Erkenntnisse in Kapitel 3.1 die

Identifizierung einer zur Expression von Doublecortin induzierbaren Zelllinie

Sowie der gewonnenen Erkenntnisse in Kapitel 3.2 die

Etablierung einer transgenen Zelllinie als Modell der neuronalen Determinierung *in vitro*

4.1 Identifizierung zur Expression von Doublecortin induzierbarer Zelllinien

Die hier vorliegende Arbeit stellt eine aus den Zellen eines Keimzelltumors generierte Zelllinie vor, bei der unter dem Einfluss von Retinolsäure eine Expression von DCX induziert werden kann. Diese Induktion imitiert die frühe Differenzierungsphase neuraler Stammzellen über neuronale Vorläuferzellen zu adulten Neuronen und eröffnet somit neue Ansätze für weitere Methoden in der Analyse neuronaler Determination.

In den letzten Jahren hat sich Doublecortin als Marker für Neurogenese und neuronale Determination etabliert und wird spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen und jungen, unreifen Neuronen exprimiert ^{57,70,71,105}. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass mit Hilfe von DCX nicht nur ein qualitativer Nachweis, sondern auch eine Abschätzung der Neurogeneserate und deren Modulation ohne vorherige Durchführung einer *in vivo* Markierung proliferierender Zellen ⁷⁰ möglich ist. Eine Expression von Doublecortin konnte sowohl an neuronalen Vorläuferzellen *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden, sobald eine neuronale Differenzierung induziert wurde ^{78,89}.

In vivo konnte im zentralen Nervensystem von Ratten Doublecortin in neuronalen Vorläuferzellen über eine Zeitspanne von circa vier Wochen beobachtet werden. Die Expression zeigte dabei einen transienten Ablauf: In den pluripotenten, neuralen Stammzellen endet mit Beginn der neuronalen Differenzierung die Expression von Nestin ⁷³ und die Expression von DCX beginnt in den noch mitotisch aktiven Zellen. Diese Expression wird in den neuronalen Vorläuferzellen ca. vier Wochen lang aufrechterhalten und endet bei der weiteren Differenzierung zu adulten Neuronen, die dann Marker wie NeuN exprimieren ^{57,106}. Während dieser Zeit sind auch frühe, neuronale Marker wie Map2ab und β -III-Tubulin nachweisbar.

In vitro konnte zwar kürzlich an primären, embryonalen Zellen des Mäusevorderhirns (MEF) eine Expression von DCX nachgewiesen werden ⁷⁸, dennoch gibt es bisher wenig Daten über Studien mit DCX als Marker der Neurogenese *in*

vitro. Diese wurden ausschließlich an primären, neuronalen Zellkulturen durchgeführt und nicht an bereits etablierten Zelllinien. Weitere Beispiele sind der Nachweis von DCX in sich differenzierenden, neuronalen Stammzellkulturen, die aus Gewebe des Hippocampus gewonnen wurden ¹⁰⁷, und in sich differenzierenden, retinalen Vorläuferzellen ¹⁰⁸.

Untersuchungen an fötalen, telencephalen Zellkulturen der Maus zeigten ein Expressionsmuster, das den Erfahrungen an Ratten und Mäusen *in vivo* entspricht. Es zeigte sich eine Ko-Expression von Doublecortin mit den frühen neuronalen Markern Map2ab und β -III-Tubulin, aber keine Überlappung mit dem Stammzell-Marker Nestin, dem Marker differenzierter Neurone NeuN oder dem weit verbreiteten glialen Marker GFAP ⁷⁸. Diese Ergebnisse decken sich mit dem Expressionsmuster der in dieser Arbeit identifizierten Zelllinie Ntera/CloneD1. Auch hier kam es durch die Differenzierung zu einer Expression von DCX und Map2ab. GFAP war in geringem Maße nachweisbar, es gab jedoch keinen Hinweis auf eine Co-Expression von DCX und GFAP. Die Zellen sind neuronal determiniert, eine gliale Differenzierung in Astrozyten oder Oligodendrozyten findet nicht statt.

Da bisher noch keine etablierte Zelllinie im Zusammenhang mit einer DCX-Expression als Marker der Neurogenese bekannt war, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene etablierte Zelllinien einem bekannten Differenzierungsprotokoll unter Zugabe von Retinolsäure ausgesetzt ^{104,109} und anschließend auf eine Induzierbarkeit von DCX getestet. Dabei kam es bei den Ntera/CloneD1 und den D283 im Gegensatz zu den anderen getesteten Zelllinien zu einer Induktion der DCX-Expression. Übereinstimmend zeigten die Ergebnisse der Differenzierung eine Induktion von DCX-mRNA in der RT-PCR, einen Anstieg des DCX-Proteins im Western Blot sowie in den immunhistochemischen Färbungen. Diese Zunahme der DCX-Expression zeigte sich allerdings im Western-Blot nur für die Ntera/CloneD1 Zelllinie signifikant.

Eine vorbeschriebene, geringe DCX-Expression der D283Med Zelllinie bereits im undifferenzierten Stadium ⁷⁸, konnte in den Experimenten der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt und nachvollzogen werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten möglicherweise durch eine unterschiedliche Sensitivität der benutzten Antikörper oder

in unterschiedlich eingesetzten Mengen an Protein begründet sein bei insgesamt vermutlich nur gering im Bereich der Nachweisgrenze ausgeprägter Aktivierung und Expression.

Weiterhin bestätigte sich die neuronale Spezifität in den immunhistochemischen Färbungen besonders für die Ntera/CloneD1. So zeigte sich bei den Ntera/CloneD1 eine Kolokalisation von DCX mit dem neuronalen Marker Map2a/b, aber keine Überlappungen mit dem glialen Marker GFAP. Als weiterer Hinweis auf eine neuronale Differenzierung begannen die Ntera/CloneD1 Zellen bereits nach wenigen Tagen einen neuronalen Phänotyp zu entwickeln; die Teilungsrate ging zurück, es bildeten sich mehrschichtige Zellkonglomerate und ein ganzes Netzwerk aus langen Zellausläufern. Eine so eindruckliche Entwicklung war bei den D283Med-Zellen nicht nachvollziehbar. Die Ntera/CloneD1 erscheinen in diesem Zusammenhang aufgrund der eindeutigeren Ergebnisse im Vergleich zu den D283Med zur Entwicklung eines *in-vitro*-Modells der frühen Neurogenese deutlich geeigneter zu sein.

Die eingesetzte Retinolsäure ist ein bekannter, starker Induktor neuronaler Differenzierung^{102,110}, und eine neuronale Differenzierung des Ntera/CloneD1 konnte bereits in mehreren Studien belegt werden^{100,102,111}. Dabei zeigten sich den hier dargestellten Ergebnissen entsprechende Veränderungen. Während der Differenzierung entwickelten sich die Zellen phänotypisch zu Neuronen mit runden Zellkörpern und Zellausläufern. Sie formierten sich zu mehrschichtigen Clustern, wobei sich in der untersten Schicht neuronale Vorläuferzellen anordneten und sich in den oberen fortgeschrittenere, neuronale Entwicklungsstufen fanden, die Marker wie Map2b exprimierten. In weiteren Studien konnten nach der Differenzierung ebenfalls neuronale Marker wie GluR, MAP2, Tau and NeuN nachgewiesen werden¹⁰⁴. Es wurde deshalb schon länger postuliert, die Ntera2/CloneD1 entsprächen einer humanen, neuronalen Vorläuferzelllinie mit zum Teil erhaltenen Stammzellcharakteristika¹¹¹ und seien hervorragend geeignet für Studien der Neurogenese¹⁰⁴. Ob, wie *in vivo* nachgewiesen, der Expression von Nestin eine transiente DCX- und im Anschluss eine NeuN-Expression in den differenzierten Ntera2/CloneD1-Zellen folgt, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden und bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Die aufgeführten und diskutierten Ergebnisse und die Tatsache, dass DCX transient in der frühen Phase der neuronalen Differenzierung und Determinierung auftritt, lässt den Schluss zu, dass die Ntera/CloneD1 die frühe Differenzierungsphase neuraler Stammzellen imitiert. Zu dieser Aussage passen die Ergebnisse einer Genanalyse der Ntera Zelllinie nach Behandlung mit Retinolsäure. Dabei zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster wie bei frühen, neuronalen Zellen des posterioren ZNS¹⁰¹.

Ein entscheidender Vorteil der Ntera2/CloneD1-Zelllinie ist, neben der Imitation der frühen Neurogenese, deren unbegrenzte Verfügbarkeit und deren einfache, kostengünstige und standardisierte Kultivierbarkeit. Dies vereinfacht die Versuchsdurchführung und ermöglicht einen besseren Vergleich von erzielten Ergebnissen. Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass die Ntera2/CloneD1 hervorragend zum Einsatz als *in vitro* Modell zur weiteren Untersuchung der frühen, neuronalen Differenzierung und Determinierung geeignet sind.

4.2 Etablierung transgener Zelllinien als Modell der neuronalen Determinierung *in vitro*

Nachdem im ersten Schritt mit den Ntera-2/CloneD1 eine Zelllinie gefunden werden konnte, die neuronale Vorläuferzellen initiiert und dessen DCX-Expression induzierbar war, konnte auf dieser Grundlage in einem zweiten Schritt mit Hilfe eines Reportersystems transgene Zelllinien entwickelt werden, die eine Visualisierung der Aktivität der DCX-regulierenden Sequenz ermöglichen. Eine Aktivierung des DCX-Promotors steht dabei in einem direkten Zusammenhang mit dem Beginn der Neurogenese. Als ergänzende Untersuchungsmethoden wurden des Weiteren auf die gleiche Weise mit den Hela nicht-neuronale, transgene Zelllinien entwickelt. Mit diesen im Rahmen der vorliegenden Dissertation entwickelten, neuen Methoden eröffnen sich neue Möglichkeiten zur Erforschung neuronaler Determination und Differenzierung.

Zur Herstellung der transgenen Zelllinien wurde zunächst das bekannte Reportergen-Konstrukt *phuDCX-EGFP* und einer Neomycin-Resistenz⁷⁸ in die Zellen transfiziert, anschließend die stabil transfizierten Zellen mit Hilfe von Gentamycin selektioniert und mit Hilfe des FACS (Fluorescent-activated cell sorting) kloniert. Dabei wurden im FACS Gerät nur diejenigen Zellen berücksichtigt und herausgefiltert, die im undifferenzierten Zustand keinerlei grünliche Fluoreszenz als Ausdruck einer unspezifischen DCX-Promotor Aktivität aufwiesen. Der Erfolg der Vereinzelung der transgenen Zellen durch das FACS wurde manuell unter dem Mikroskop überprüft. Die Integration des Konstrukts in das Genom der transgenen Zelllinien konnte in einer PCR erfolgreich nachgewiesen werden. Die so entstandenen Klone wurden analog dem Differenzierungsprotokoll der Wildtyp-Zelllinien mit Retinolsäure behandelt, um die Funktionsfähigkeit des Reportersystems zu testen und eine Beeinflussung der Differenzierung durch das Reportergen auszuschließen.

In gleicher Weise wurden mit dem Reportergen-Konstrukt *phuDCX-Luci* verfahren und entsprechende transgene Zelllinien etabliert, die im Vergleich zu dem EGFP-Reportersystem eine Quantifizierung der Promotor-Aktivität ermöglichen. Eine Klonierung mit Hilfe des FACS wurde in diesem Fall ohne weitere Selektionierung

durch Fluoreszenz durchgeführt. Die entsprechenden Daten und Ergebnisse sind in die vorliegende Arbeit nicht eingearbeitet worden und sind Gegenstand weiterer Untersuchungen ¹¹².

In der vorliegenden Arbeit konnte die Funktionsfähigkeit des EGFP-Reportersystems bewiesen werden. Es konnte eine gleichgerichtete Induktion sowie eine Co-Lokalisation von DCX und EGFP im Rahmen der Differenzierung in der transgenen Zelllinie Ntera-2/CloneD1 demonstriert werden. Nach ca. 10-14 Tagen war es unter dem Fluoreszenzmikroskop möglich in der Zellkultur eine deutliche, grünliche Fluoreszenz nachzuweisen. Tendenziell war nach 28 Tagen eine leicht rückläufige Fluoreszenz zu beobachten. Auch die Morphologie der Zellen veränderte sich in unveränderter Weise hin zu einem neuronalen Phänotyp. Bestätigend gelang der Nachweis einer analogen Expression von DCX- und EGFP-mRNA in der RT-PCR, der analoge Nachweis von EGFP und DCX-Protein im Western Blot sowie in den immunhistochemischen Färbungen. In den Färbungen konnte eine Co-Lokalisation von DCX und EGFP in den Zellen belegt werden. Aufgrund der analogen Veränderungen der nicht transfizierten Ntera/CloneD1 im Vergleich zu den transgenen Zellen lässt sich festhalten, dass keine signifikante Beeinflussung des Differenzierungsprozesses durch das Reportergen besteht. Ob in den transgenen Ntera-2/CloneD1-Zellen durch die Differenzierung wie *in vivo* beschrieben ⁸⁹, ein konkordantes, transientes Expressionsmuster von DCX und EGFP abläuft, ist denkbar, konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die tendenziell abnehmende Fluoreszenz nach 28 Tagen kann als ein Hinweis auf eine transiente Expression interpretiert werden. Jedoch ist die abnehmende Fluoreszenz nicht eindeutig belegbar. Weiterhin ist aufgrund unterschiedlicher bzw. fehlender Stimulationsfaktoren unklar, ob *in vitro* im Gegensatz zu den *in vivo* Ergebnissen ein transientes Expressionsmuster abläuft oder es z.B. zu einer dauerhaften Expression kommt.

Die Ergebnisse und Erfahrungen mit dem Reportergen in immortalisierten Zelllinien, die im Rahmen dieser Dissertation entstanden, decken sich mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen dasselbe Reportergen-Konstrukt benutzt wurde. Vor kurzem konnte in diesen Studien eine mit DCX konkordante Reportergen-

Expression nachgewiesen werden, die spezifisch in jungen Neuronen und neuronalen Vorläuferzellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* auftrat^{78,89}.

Dabei konnte an transienten Transfektionen in primäre Zellkulturen aus dem Gehirn von Mäusen (MEF-Zellen: embryonale Fibroblasten der Maus) *in vitro* eine eindeutige Korrelation zwischen dem DCX-regulierten Reporterprotein und endogenem DCX gezeigt werden. Es zeigte sich ebenfalls eine zu den nicht-transfizierten Zellen unveränderte endogene DCX-Expression und somit keinerlei Beeinflussung durch die Transfektion oder das Reportersystem⁷⁸. Umgekehrt war bei Transfektionen an verschiedenen, etablierten Zelllinien glialer, oligodendroglialer und nicht neuronaler Herkunft weder ein Nachweis von DCX noch von Reporterprotein möglich, was für eine ausschließlich spezifische und gegen eine unspezifische Promotor-Aktivierung spricht. Die positiven Nachweise bei den transfizierten, neuronalen Zelllinien Neuro-2a und D283Med bestätigen diese Vermutung der spezifischen Aktivierung⁷⁸.

Mit dem oben genannten Konstrukt wurden auch transgen veränderte Mäuse gezüchtet. An diesen konnte ebenfalls eine konkordante Expression von DCX und dem Reporterprotein spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen und jungen Neuronen demonstriert werden⁷⁸. Diese Expression folgte ebenfalls dem transienten Verlaufsmuster über circa einen Monat und verschwand mit dem Auftauchen des adulten, neuronalen Markers NeuN, wie es an Untersuchungen an Ratten für DCX beschrieben wurde⁵⁷. Bei den transgenen Mäusen hatte die Expression des Reporterproteins weder einen Einfluss auf die endogene Produktion von DCX noch auf die Proliferation, das Überleben oder die Entwicklung neu entstandener Zellen^{78,89}.

Im Gegensatz zu den Ntera-2/CloneD1 war bei den transgenen Hela weder vor noch nach Behandlung mit Retinolsäure eine Induktion von DCX oder EGFP erkennbar, was diese Zelllinie als Negativkontrolle bzw. ergänzenden Untersuchungsmethode prädestiniert, die eine Unterscheidung zwischen direkter und indirekter Aktivierung des DCX-Promotors ermöglicht. So wäre es möglich, dass nur die Faktoren das Reportersystem der transgenen Hela aktivieren können, die eine direkte Stimulation des DCX-Promotors bewirken.

Ein großes Problem bisheriger Untersuchungen der Neurogenese war die schwierige Gewinnung von Untersuchungsmaterial, das hauptsächlich aus neu geborenen Nagetieren generiert wurde. Das Angebot für Experimente *in vivo* sowie *in vitro* an primären, neuronalen Zelllinien ist daher sehr begrenzt und kostenintensiv. Des Weiteren können das *in vivo* Labeling mit z.B. BrdU, die Bearbeitung und Fixierung der Proben Ergebnisse verfälschen und die Interpretation erschweren. Ein weiteres Problem sind die schwer zu standardisierenden und inhomogenen, primären Zellkulturen, die nur eine begrenzte Zeit kultiviert werden können.

Aufgrund der fast unbegrenzten Verfügbarkeit und der einfachen Kultivierbarkeit unter standardisierten Bedingungen der immortalen, anspruchslosen und transgen veränderten Zellen, ist die neu entwickelte transgene Zelllinie hervorragend als Screening-Methode geeignet, um Moleküle zu identifizieren, die die frühe neuronale Differenzierung beeinflussen. Interessant in diesem Zusammenhang sind Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, die bereits in der DCX-regulierenden Sequenz identifiziert werden konnten, unter anderem Brn-2, Brn-3, NeuroD1, E2F-1, E2F-2, Fast1, Smad3 und Smad4⁷⁸. Weiterhin zeigten sich in unserer Forschungsgruppe bereits positive Ergebnisse in Untersuchungen mit dem Transkriptionsfaktor Neurogenin 2 (Ngn2). Für diesen war bereits eine direkte Bindung und Aktivierung des DCX-Promotors vorbeschrieben¹¹³.

4.3 Schlußfolgerungen

Zusammenfassend konnte in der hier vorliegenden Dissertation jetzt eine Zelllinie identifiziert werden, die neurogene Vorläuferzellen unter Zugabe von Retinolsäure die Neurogenese imitiert und im Verlauf eine Induktion von DCX als Marker neuronaler Vorläuferzellen erfährt.

Weiterhin konnte durch die stabile Transfektion von lumineszierenden und fluoreszierenden Reportersystemen unter der Kontrolle des DCX-Promotors in die Ntera/CloneD1-Zellen transgene Zelllinien generiert werden, die neue und vereinfachte methodische Möglichkeiten zur Analyse der frühen Neurogenese sowie des DCX-Promotors schaffen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten transgenen Zelllinien bieten aufgrund des einfachen, direkten Nachweises der Neurogenese-Induktion in der Zellkultur ein einfaches Versuchsmodell für Reihenuntersuchungen im Sinne z.B. eines High Throughput Screenings, um Moleküle zu identifizieren, die die frühe Phase der neuronalen Differenzierung und Determinierung eingreifen und beeinflussen.

Mit Hilfe der transgenen Hela-Zelllinie könnten möglicherweise weitere Hinweise gefunden werden um Faktoren voneinander zu unterscheiden, die den DCX-Promotor direkt und indirekt beeinflussen. Auch eine Aussage über das Ausmaß der DCX-Promotoraktivierung durch entsprechende Faktoren ist über eine quantitative Analyse durch das Luciferase-Reportersystem möglich.

Durch Isolierung von Zellen, die das Reportergen exprimieren, kann eine spezifische Zellpopulation im Sinne neuronaler Vorläuferzellen generiert und weiter charakterisiert werden: Welche Gene sind zu diesem Zeitpunkt aktiviert, welche Faktoren werden exprimiert?

5. Zusammenfassung

Doublecortin (DCX) ist ein X-chromosomal kodiertes Protein, das in Zusammenhang mit der Migration neuronaler Vorläuferzellen steht. Es wird während der Embryonalentwicklung des zentralen Nervensystems und im adulten Gehirn von Säugetieren spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen und jungen Neuronen exprimiert und ist nicht in Stammzellen oder adulten Nervenzellen nachweisbar. Dieses Expressionsmuster macht DCX zu einem einzigartigen Marker für Neurogenese.

Welche Faktoren die Expression von DCX und damit die frühe neuronale Determinierung beeinflussen, ist bisher wenig bekannt. Die weitere Erforschung der frühen Neurogenese gestaltet sich, auch aufgrund fehlender einfacher Untersuchungsmethoden *in vitro*, aufwendig, zeitintensiv und schwer standardisierbar.

Die vorliegende Promotion verfolgte daher das Ziel, mit Hilfe neuronaler, immortalisierter Zelllinien ein Modell der neuronalen Determinierung zu etablieren und dieses mit Hilfe von Reportersystemen der DCX-regulierenden Sequenz als Versuchsmodell nutzbar zu machen.

In dieser Dissertation konnte zum einen mit den immortalisierten, aus einem Keimzelltumor stammenden Ntera/CloneD1-Zellen nun eine Zelllinie identifiziert werden, die die neuronale Determinierung und Differenzierung unter Zugabe von Retinolsäure zu imitieren scheint und im Verlauf eine Induktion von DCX als Marker neuronaler Vorläuferzellen erfährt. So entwickelte sich nach Differenzierung mit Retinolsäure ein neuronaler Phänotyp und es konnte ein 16-facher Anstieg der DCX-mRNA Expression sowie des DCX-Proteins nachgewiesen werden. Weiterhin gelang der Nachweis einer Co-Expression mit dem neuronalen Marker Map2a/b.

In einem zweiten Schritt konnten durch eine stabile Transfektion von lumineszierenden und fluoreszierenden Reportersystemen unter der Kontrolle des DCX-Promotors in die Ntera/CloneD1-Zellen transgene Zelllinien generiert werden, die in Zellkultur den direkten Nachweis einer Induktion der neuronalen Differenzierung durch z. B. Retinolsäure ermöglichen.

Mit dieser Methode stehen nun neue und vereinfachte methodische Möglichkeiten zur Analyse der frühen Neurogenese sowie des DCX-Promotors zur Verfügung. So ermöglicht der einfache Nachweis der Neurogenese-Induktion in Zukunft ein High Throughput Screening beteiligter Wachstums- und Transkriptionsfaktoren der frühen neuronalen Differenzierung.

6. Abkürzungen

bp	Basenpaare
BrdU	5`Bromo-2`Desoxy-Uridin
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
DCX	Doublecortin
cDNA	complementary DNA, zur mRNA komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
kb	Kilobasen
kD	Kilo-Dalton
lacZ	β -Galactosidase
MAP	mikrotubulin assoziiertes Protein
MEF	mouse embryonic forebrain
MT	Mikrotubuli
mRNA	messenger RNA
NGF	nerve growth factor
PCR	polymerase chain reaction
Pol II	RNA-Polymerase II
RA	Retinolsäure
RMS	rostral-migratorischer Strom
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale-RNA
RT	reverse Transkription
R.T.	Raumtemperatur
SVZ	Subventrikulärzone
TF	Transkriptionsfaktor
TGF α/β	transforming growth factor α/β
v/v	Volumen/Volumen (volume per volume)
w/v	Gewicht/Volumen (weight per volume)

7. Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

1. Altman, J. & Das, G.D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp Neurol.* **124**, 319-335 (1965).
2. Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S. & Gould, E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* **56**, 337-344 (1993).
3. Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H. & Gage, F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* **16**, 2027-2033 (1996).
4. Palmer, T.D., Markakis, E.A., Willhoite, A.R., Safar, F. & Gage, F.H. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J. Neurosci.* **19**, 8487-8497 (1999).
5. Kuhn, H.G., Palmer, T.D. & Fuchs, E. Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **251**, 152-158 (2001).
6. Kempermann, G. & Gage, F.H. Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 129-136 (2002).
7. Jiang, Y. *et al.* Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100 Suppl 1**, 11854-11860 (2003).
8. Brazelton, T.R., Rossi, F.M., Keshet, G.I. & Blau, H.M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* **290**, 1775-1779 (2000).
9. Mezey, E., Chandross, K.J., Harta, G., Maki, R.A. & McKercher, S.R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* **290**, 1779-1782 (2000).
10. Priller, J. *et al.* Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat. Med.* **7**, 1356-1361 (2001).
11. Priller, J. *et al.* Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J. Cell Biol.* **155**, 733-738 (2001).
12. Alvarez-Dolado, M. *et al.* Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* **425**, 968-973 (2003).

-
13. Gage, F.H. Mammalian neural stem cells. *Science* **287**, 1433-1438 (2000).
 14. Sidman, R.L. & Rakic, P. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res.* **62**, 1-35 (1973).
 15. Caviness, V.S., Jr., Takahashi, T. & Nowakowski, R.S. Numbers, time and neocortical neurogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci.* **18**, 379-383 (1995).
 16. Couillard-Despres, S., Winkler, J., Uyanik, G. & Aigner, L. Molecular mechanisms of neuronal migration disorders, quo vadis? *Curr. Mol. Med.* **1**, 677-688 (2001).
 17. Temple, S. The development of neural stem cells. *Nature* **414**, 112-117 (2001).
 18. Berciano, J., Lafarga, M. & Berciano, M. Santiago Ramon y Cajal. *Neurologia* **16**, 118-121 (2001).
 19. Eriksson, P.S. *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* **4**, 1313-1317 (1998).
 20. Reynolds, B.A. & Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**, 1707-1710 (1992).
 21. Richards, L.J., Kilpatrick, T.J. & Bartlett, P.F. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 8591-8595 (1992).
 22. Palmer, T.D., Ray, J. & Gage, F.H. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol. Cell Neurosci.* **6**, 474-486 (1995).
 23. Kempermann, G., Kuhn, H.G. & Gage, F.H. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J. Neurosci.* **18**, 3206-3212 (1998).
 24. Kempermann, G., Brandon, E.P. & Gage, F.H. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr. Biol.* **8**, 939-942 (1998).
 25. Kempermann, G. & Gage, F.H. New nerve cells for the adult brain. *Sci. Am.* **280**, 48-53 (1999).
 26. Walsh, C.A. & Goffinet, A.M. Potential mechanisms of mutations that affect neuronal migration in man and mouse. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 270-274 (2000).
 27. Gould, E., Tanapat, P., Hastings, N.B. & Shors, T.J. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends Cogn Sci.* **3**, 186-192 (1999).

-
28. van Praag,H., Christie,B.R., Sejnowski,T.J. & Gage,F.H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 13427-13431 (1999).
 29. Fallon,J. *et al.* In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 14686-14691 (2000).
 30. Kuhn,H.G., Winkler,J., Kempermann,G., Thal,L.J. & Gage,F.H. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J. Neurosci.* **17**, 5820-5829 (1997).
 31. Biebl,M., Cooper,C.M., Winkler,J. & Kuhn,H.G. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci. Lett.* **291**, 17-20 (2000).
 32. Horwitz,A.R. & Parsons,J.T. Cell migration--movin' on. *Science* **286**, 1102-1103 (1999).
 33. Nadarajah,B. & Parnavelas,J.G. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 423-432 (2002).
 34. Gleeson,J.G., Lin,P.T., Flanagan,L.A. & Walsh,C.A. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* **23**, 257-271 (1999).
 35. Fox,J.W. *et al.* Mutations in filamin 1 Prevent Migration of Cerebral Cortical Neurons in Human Periventricular Heterotopia. *Neuron* **21**, 1315-1325 (1998).
 36. Dulabon,L. *et al.* Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* **27**, 33-44 (2000).
 37. Altman,J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat. Rec.* **145**, 573-591 (1963).
 38. Miller,M.W. & Nowakowski,R.S. Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res.* **457**, 44-52 (1988).
 39. Cooper-Kuhn,C.M. *et al.* Impaired adult neurogenesis in mice lacking the transcription factor E2F1. *Mol. Cell Neurosci.* **21**, 312-323 (2002).
 40. Seki,T. & Arai,Y. Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci. Res.* **17**, 265-290 (1993).
 41. Gould,E. & Gross,C.G. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J. Neurosci.* **22**, 619-623 (2002).

-
42. Rakic,P. Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J. Neurosci.* **22**, 614-618 (2002).
 43. Palmini,A. *et al.* Diffuse cortical dysplasia, or the 'double cortex' syndrome: the clinical and epileptic spectrum in 10 patients. *Neurology* **41**, 1656-1662 (1991).
 44. Barkovich,A.J. *et al.* Band heterotopia: correlation of outcome with magnetic resonance imaging parameters. *Ann. Neurol.* **36**, 609-617 (1994).
 45. des,P., V *et al.* doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1063-1070 (1998).
 46. Gleeson,J.G. *et al.* Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* **92**, 63-72 (1998).
 47. Francis,F. *et al.* Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* **23**, 247-256 (1999).
 48. Schaar,B.T., Kinoshita,K. & McConnell,S.K. Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons. *Neuron* **41**, 203-213 (2004).
 49. Mizuguchi,M., Qin,J., Yamada,M., Ikeda,K. & Takashima,S. High expression of doublecortin and KIAA0369 protein in fetal brain suggests their specific role in neuronal migration. *Am. J. Pathol.* **155**, 1713-1721 (1999).
 50. Qin,J., Mizuguchi,M., Itoh,M. & Takashima,S. Immunohistochemical expression of doublecortin in the human cerebrum: comparison of normal development and neuronal migration disorders. *Brain Res.* **863**, 225-232 (2000).
 51. Meyer,G., Perez-Garcia,C.G. & Gleeson,J.G. Selective expression of doublecortin and LIS1 in developing human cortex suggests unique modes of neuronal movement. *Cereb. Cortex* **12**, 1225-1236 (2002).
 52. Seri,B., Garcia-Verdugo,J.M., McEwen,B.S. & Alvarez-Buylla,A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* **21**, 7153-7160 (2001).
 53. Seki,T. & Arai,Y. Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport* **6**, 2479-2482 (1995).
 54. Doetsch,F., Garcia-Verdugo,J.M. & Alvarez-Buylla,A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.* **17**, 5046-5061 (1997).

55. Winner,B., Cooper-Kuhn,C.M., Aigner,R., Winkler,J. & Kuhn,H.G. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 1681-1689 (2002).
56. Betarbet,R., Zigova,T., Bakay,R.A. & Luskin,M.B. Dopaminergic and GABAergic interneurons of the olfactory bulb are derived from the neonatal subventricular zone. *Int. J. Dev. Neurosci.* **14**, 921-930 (1996).
57. Brown,J.P. *et al.* Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J. Comp Neurol.* **467**, 1-10 (2003).
58. Nacher,J., Crespo,C. & McEwen,B.S. Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 629-644 (2001).
59. Aberg,M.A., Aberg,N.D., Hedbacker,H., Oscarsson,J. & Eriksson,P.S. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* **20**, 2896-2903 (2000).
60. Dash,P.K., Mach,S.A. & Moore,A.N. Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury. *J. Neurosci. Res.* **63**, 313-319 (2001).
61. Jin,K. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 11946-11950 (2002).
62. Kempermann,G., Kuhn,H.G. & Gage,F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* **386**, 493-495 (1997).
63. Liu,J., Solway,K., Messing,R.O. & Sharp,F.R. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J. Neurosci.* **18**, 7768-7778 (1998).
64. Parent,J.M. *et al.* Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* **17**, 3727-3738 (1997).
65. Shingo,T., Sorokan,S.T., Shimazaki,T. & Weiss,S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J. Neurosci.* **21**, 9733-9743 (2001).
66. Snyder,E.Y., Yoon,C., Flax,J.D. & Macklis,J.D. 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 (1997).
67. Gould,E. & Tanapat,P. Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* **80**, 427-436 (1997).

-
68. Jin, K. *et al.* 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 (2001).
 69. Magavi, S.S., Leavitt, B.R. & Macklis, J.D. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* **405**, 951-955 (2000).
 70. Couillard-Despres, S. *et al.* Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 1-14 (2005).
 71. Rao, M.S. & Shetty, A.K. 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 (2004).
 72. Mullen, R.J., Buck, C.R. & Smith, A.M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* **116**, 201-211 (1992).
 73. Lendahl, U., Zimmerman, L.B. & McKay, R.D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**, 585-595 (1990).
 74. Steiner, B. *et al.* Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* **46**, 41-52 (2004).
 75. Smale, S.T. Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes Dev.* **15**, 2503-2508 (2001).
 76. Butler, J.E. & Kadonaga, J.T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* **16**, 2583-2592 (2002).
 77. Hahn, S. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 394-403 (2004).
 78. Karl, C. *et al.* Neuronal precursor-specific activity of a human doublecortin regulatory sequence. *J. Neurochem.* **92**, 264-282 (2005).
 79. Alam, J. & Cook, J.L. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal. Biochem.* **188**, 245-254 (1990).
 80. Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. & Cormier, M.J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233 (1992).
 81. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. & Prasher, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805 (1994).
 82. Cormack, B.P., Valdivia, R.H. & Falkow, S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33-38 (1996).

-
83. Scrable,H. Say when: reversible control of gene expression in the mouse by lac. *Semin. Cell Dev. Biol.* **13**, 109-119 (2002).
 84. Davey,M.R., Blackhall,N.W. & Power,J.B. Chloramphenicol acetyl transferase assay. *Methods Mol. Biol.* **49**, 143-148 (1995).
 85. Hadjantonakis,A.K. & Nagy,A. The color of mice: in the light of GFP-variant reporters. *Histochem. Cell Biol.* **115**, 49-58 (2001).
 86. Frisen,J., Johansson,C.B., Torok,C., Risling,M. & Lendahl,U. Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J. Cell Biol.* **131**, 453-464 (1995).
 87. Gloster,A. *et al.* 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 (1994).
 88. Shi,Y. *et al.* Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. *Nature* **427**, 78-83 (2004).
 89. Couillard-Despres,S. *et al.* Targeted transgene expression in neuronal precursors: watching young neurons in the old brain. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 1535-1545 (2006).
 90. Overstreet,L.S. *et al.* A transgenic marker for newly born granule cells in dentate gyrus. *J. Neurosci.* **24**, 3251-3259 (2004).
 91. Haubensak,W., Attardo,A., Denk,W. & Huttner,W.B. 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 (2004).
 92. SCHERER,W.F. & HOOGASIAN,A.F. Preservation at subzero temperatures of mouse fibroblasts (strain L) and human epithelial cells (strain HeLa). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **87**, 480-487 (1954).
 93. Friedman,H.S. *et al.* Establishment and characterization of the human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft D283 Med. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **44**, 592-605 (1985).
 94. Jacobsen,P.F., Jenkyn,D.J. & Papadimitriou,J.M. Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **44**, 472-485 (1985).
 95. Biedler,J.L., Helson,L. & Spengler,B.A. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* **33**, 2643-2652 (1973).

-
96. Greene,L.A. & Tischler,A.S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **73**, 2424-2428 (1976).
 97. Martin,G.R. Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science* **209**, 768-776 (1980).
 98. Andrews,P.W. Human teratocarcinomas. *Biochim. Biophys. Acta* **948**, 17-36 (1988).
 99. Lee,V.M. & Andrews,P.W. Differentiation of NTERA-2 clonal human embryonal carcinoma cells into neurons involves the induction of all three neurofilament proteins. *J. Neurosci.* **6**, 514-521 (1986).
 100. Andrews,P.W. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev. Biol.* **103**, 285-293 (1984).
 101. Houldsworth,J., Heath,S.C., Bosl,G.J., Studer,L. & Chaganti,R.S. Expression profiling of lineage differentiation in pluripotential human embryonal carcinoma cells. *Cell Growth Differ.* **13**, 257-264 (2002).
 102. McCaffery,P. & Drager,U.C. Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. *Cytokine Growth Factor Rev.* **11**, 233-249 (2000).
 103. Hong,C.S. *et al.* Contrasting role of presenilin-1 and presenilin-2 in neuronal differentiation in vitro. *J. Neurosci.* **19**, 637-643 (1999).
 104. Megiorni,F., Mora,B., Indovina,P. & Mazzilli,M.C. Expression of neuronal markers during NTera2/cloneD1 differentiation by cell aggregation method. *Neurosci. Lett.* **373**, 105-109 (2005).
 105. Arvidsson,A., Collin,T., Kirik,D., Kokaia,Z. & Lindvall,O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat. Med.* **8**, 963-970 (2002).
 106. Kempermann,G., Jessberger,S., Steiner,B. & Kronenberg,G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* **27**, 447-452 (2004).
 107. Monje,M.L., Toda,H. & Palmer,T.D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* **302**, 1760-1765 (2003).
 108. Engelhardt,M., Wachs,F.P., Couillard-Despres,S. & Aigner,L. The neurogenic competence of progenitors from the postnatal rat retina in vitro. *Exp. Eye Res.* **78**, 1025-1036 (2004).

-
109. Cheung,W.M., Fu,W.Y., Hui,W.S. & Ip,N.Y. Production of human CNS neurons from embryonal carcinoma cells using a cell aggregation method. *Biotechniques* **26**, 946-2, 954 (1999).
 110. Guan,K., Chang,H., Rolletschek,A. & Wobus,A.M. Embryonic stem cell-derived neurogenesis. Retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells. *Cell Tissue Res.* **305**, 171-176 (2001).
 111. Pleasure,S.J. & Lee,V.M. NTera 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *J. Neurosci. Res.* **35**, 585-602 (1993).
 112. Couillard-Despres,S. *et al.* Human in vitro reporter model of neuronal development and early differentiation processes. *BMC. Neurosci.* **9**, 31 (2008).
 113. Ge,W. *et al.* Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 1319-1324 (2006).

Lebenslauf

Eike Martin Quehl

geboren am 17.5.1979 in Heidelberg

Schulbildung:

1985 - 1989	Grundschule in Heidelberg und Salzhausen
1989 - 1999	Gymnasium Oedeme in Lüneburg
1996 - 1997	Highschool-Diploma in Argyle, Wisconsin, USA

Zivildienst:

1999 - 2000	Zivildienst im Krankenhaus Lüneburg
-------------	-------------------------------------

Studium:

2000 – 2007	Medizinstudium an der Universität Regensburg
April 2007	3. Staatsexamen und Approbation als Arzt

Berufliche Laufbahn:

seit Mai 2007	Weiterbildung zum Internisten in den Vivantes-Kliniken Berlin
---------------	---

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während dieser Arbeit begleitet, unterstützt und zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Ulrich Bogdahn für die Möglichkeit, in den Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Regensburg tätig sein zu dürfen.

Prof. Dr. Jürgen Winkler für die Betreuung meiner Arbeit in Ihrer Forschungsgruppe, die mir sehr gute Arbeitsbedingungen geboten hat.

Ein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Ludwig Aigner für seine vielen Anregungen, Ratschläge und Ideen und die außerordentlich große Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

Dr. Sebastien Couillard-Despres für die intensive Betreuung und die kontinuierliche Beratung mit unerschöpflicher Geduld sowie unerschöpflichem Wissen.

Dr. Claudia Karl, die mich mit großer Geduld in die Welt der Zellkulturen und Laborarbeit einführte.

Sonja Plötz für ihr großes Engagement im Labor und für Ihre unentbehrliche Unterstützung bei der technischen Durchführung meiner Arbeit.

Maren Engelhardt, Maurice Vroemen, Dr. Frank-Peter Wachs für die hilfreichen Tipps und die schönen Tage im Labor.

Dem gesamten Laborteam für Neurogenese / Neuroregeneration: u. a. Robert Aigner, Dr. Beate Winner, Matthias Munding, Maren Engelhardt, Maurice Vroemen, Dr. Frank-Peter Wachs, Dr. Norbert Weidner, Dr. Kathrin Pfeifer, Massimiliano Caioni, Dr. Zacharias Kohl.