

**Die Funktion von Dystroglycan
in der Entwicklung des zentralen Nervensystems**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Jörn E. Schröder
Geb. in Landau/Pfalz

Mainz, 2003

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	MUSKULÄRE DYSTROPHIEN UND DER DYSTROPHIN ASSOZIIERTE GLYKOPROTEINKOMPLEX	1
1.1.1	<i>Zentralnervöse Symptome bei muskulären Dystrophien</i>	5
1.2	ZIELSETZUNG	11
2	ERGEBNISSE	12
2.1	KLONIERUNG VON HUHN-DYSTROGLYCAN	12
2.2	GENERIERUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN DIE DYSTROGLYCAN INTERAKTIONSTELLE	16
2.3	EUKARYONTISCHE EXPRESSION VON DYSTROGLYCAN	19
2.4	BIOCHEMISCHER NACHWEIS DER INTERAKTIONSDAMPFUNG DER AB-DYG-HIS ANTI-KÖRPER	22
2.5	AUSWIRKUNGEN DER ANTIKÖRPERINJEKTION AUF DIE ENTWICKLUNG DER HUHNRETINA.....	25
3	DISKUSSION	36
3.1	KLONIERUNG VON DYSTROGLYCAN UND CHARAKTERISIERUNG DER ANTIKÖRPER	36
3.2	STRUKTURELLE VERÄNDERUNGEN DER RETINA.....	38
3.3	MECHANISMEN DER BILDUNG RETINALER VERDICKUNGEN	39
3.3.1	<i>Morphologie der radiären Vorläuferzellen</i>	39
3.3.2	<i>Hyperproliferation der radiären Vorläuferzellen</i>	43
3.3.3	<i>Eine breitere Schichtung der Retina als Folge von Migrationsdefiziten</i>	46
4	MATERIAL UND METHODEN	49
4.1	MATERIAL	49
4.1.1	<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</i>	49
4.1.2	<i>Substanzen für die Molekularbiologie</i>	49
4.1.3	<i>Substanzen für die Proteinbiochemie</i>	49
4.1.4	<i>Substanzen für die Zellkultur</i>	49
4.1.5	<i>Substanzen für die Histologie</i>	50
4.1.6	<i>Primäre Antikörper</i>	50
4.1.7	<i>Sekundäre Antikörper</i>	50
4.1.8	<i>Oligonukleotide</i>	51
4.1.9	<i>Tiere</i>	51
4.2	METHODEN	52
4.2.1	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	52
4.2.2	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	59
4.2.3	<i>Zellbiologische Methoden</i>	65
4.2.4	<i>Neuroanatomische Methoden</i>	67
4.2.5	<i>EDV</i>	69
5	ZUSAMMENFASSUNG	71
6	LITERATURVERZEICHNIS	73
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	87
8	ANHANG	89

1 Einleitung

1.1 Muskuläre Dystrophien und der Dystrophin Assoziierte Glykoproteinkomplex

Muskuläre Dystrophien sind eine heterogene Gruppe erblicher, zum Teil letal verlaufender Krankheiten, die durch eine progressive Muskeldegeneration charakterisiert sind. Die genetische Grundlage für muskuläre Dystrophien sind Mutationen in Genen, die für einige Komponenten des Dystrophin Assoziierten Glykoproteinkomplexes (DAG) kodieren. Der DAG ist ein oligomerer, membranassoziierter Proteinkomplex, dessen Funktion hauptsächlich in der Muskulatur im Zusammenhang mit den muskulären Dystrophien bekannt ist (Straub and Campbell, 1997).

In der Muskulatur ist der DAG für die Verbindung zwischen der extrazellulären Basalmembran und dem Zytoskelett verantwortlich (Ervasti und Campbell, 1993). Die Muskulatur besteht aus gebündelten Muskelfasern, von denen jede einzelne von einer Basalmembran, einer Grenzschicht zwischen Bindegewebe und nicht-bindegewebigen Bestandteilen, umgeben ist. Basalmembranen sind eine kondensierte Form extrazellulärer Matrix und bestehen aus einem Kollagen- und Laminingерüst, welches von Proteoglycanen und anderen Proteinen verfestigt wird. Die Basalmembran der Muskelfasern ist essentiell für die Stabilität und Funktion der Muskulatur. Die enormen Kräfte, die bei der Kontraktion der Muskulatur auf die Zellmembran wirken, können nur kompensiert werden, da die Verbindung von der extrazellulären Basalmembran zum intrazellulären Zytoskelett mittels des DAG den Muskelzellen zusätzliche Stabilität verleiht. In Abb. 1 sind die Komponenten des DAG aufgeführt, wie sie aus der Skelettmuskulatur bekannt sind. Extrazelluläre Bestandteile des Komplexes sind die Matrixproteine Agrin, Laminin und Biglycan. Diese Proteine binden an das ebenfalls extrazelluläre, hochglykosylierte α -Dystroglycan (Bowe et al., 1994; Matsumura et al., 1997; Hohenester et al., 1999; Bowe et al., 2000). Alpha-Dystroglycan bildet zusammen mit dem transmembranen β -Dystroglycan die zentrale Einheit des DAG, den Dystroglycan-Komplex. Dystroglycan wurde im Zusammenhang mit der Erforschung der Grundlagen muskulärer Dystrophien kloniert und als Teil des DAG identifiziert (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992, 1993). Dystroglycan wird von einem Gen (DAG1) auf zwei Exonen codiert. Bei der Translation entsteht ein einzelnes Glykoprotein, welches posttranslational proteolytisch in zwei Teile gespalten wird: Das N-terminale,

hochglykosylierte, extrazelluläre Matrixprotein α -Dystroglycan und das C-terminale, wenig glykosylierte Transmembranprotein β -Dystroglycan (Holt et al., 2000). Der Glykosylierungsgrad von Dystroglycan ist gewebs- und entwicklungsspezifisch reguliert. Die Glykosylierung ist essentiell für die Interaktion von Dystroglycan mit seinen Bindepartnern und kann die Funktion und Zusammensetzung des Komplexes bestimmen. Die EZM Moleküle Agrin, Perlecan und verschiedene Laminine binden calciumabhängig über Laminin G-ähnliche (LG) Domänen an die Zuckerseitenketten von α -Dystroglycan (Talts et al., 1999; Hohenester et al., 1999), Biglycan bindet dagegen unabhängig von Zuckerresten über das Proteinrückrad an α -Dystroglycan (Bowe et al., 2000). Alpha-Dystroglycan interagiert über eine ca. 35 Aminosäuren lange Domäne in seinem C-Terminus mit dem extrazellulären, N-terminalen Bereich von β -Dystroglycan. Diese Interaktion ist ebenfalls nicht glykosylierungsabhängig (Di Stasio et al., 1999; Sciandra et al., 2001; Bozzi et al., 2001). Als wichtige und namensgebende intrazelluläre Komponente bindet Dystrophin über eine WW-Domäne an das prolinreiche N-terminale Ende von β -Dystroglycan (Suzuki et al., 1992, 1994; Jung et al., 1995; Rosa et al., 1996, Sudol et al., 1996, Pires et al., 2001). Zusätzlich wird diese Bindung von einer EF-Hand-ähnlichen Domäne im Dystrophin verstärkt (Chung et al., 1999). Über eine Tyrosinphosphorylierung im intrazellulären C-terminalen Teil von β -Dystroglycan kann die Interaktion mit Dystrophin reguliert werden (Ilsley et al., 2001). Die Verbindung des DAG zum intrazellulären Zytoskelett wird über die Bindung von F-Aktin an den N-Terminus von Dystrophin hergestellt (Hammonds, 1987; Koenig et al., 1988; Way et al., 1992). Durch die Summe dieser Protein-Protein-Interaktionen wird eine molekulare Brücke zwischen der EZM und dem Zytoskelett gebildet, die entscheidend für die Stabilität der Muskelfaser ist (Henry und Campbell 1996).

Es sind noch weitere Moleküle mit dem Komplex assoziiert, die nicht direkt an dieser molekularen Verbindung zwischen Matrix und Zytoskelett beteiligt sind. Dazu gehören die transmembranen Sarcoglycane (α - γ) und das Membranprotein Sarcospan, welches an γ -Sarcoglycan bindet (Chan et al., 1998; Crosbie et al., 1997, 1999). Intrazellulär binden die Syntrophine (α , β 1 und β 2) und Dystrobrevine (α und β) an den C-Terminus von Dystrophin (Blake et al., 1995, 1998; Ahn et al., 1992, Sadoulet-Puccio et al., 1996; Peters et al., 1997 a und b, 1998). Calmodulin, welches die Phosphorylierung von Dystrophin und α 1-Syntrophin reguliert, und die neuronale NO-Synthase, die an Dystrophin und Syntrophin bindet, sind an

verschiedenen Signalübertragungswegen beteiligt (Anderson et al., 1996; Madhavan et al., 1999; Brenman et al., 1995, 1996). Über die Bindung von Grb2 an den intrazellulären Bereich von β -Dystroglycan ist zusätzlich eine Verbindung zum Ras/Raf-Kinase-Weg hergestellt (Yang et al., 1995).

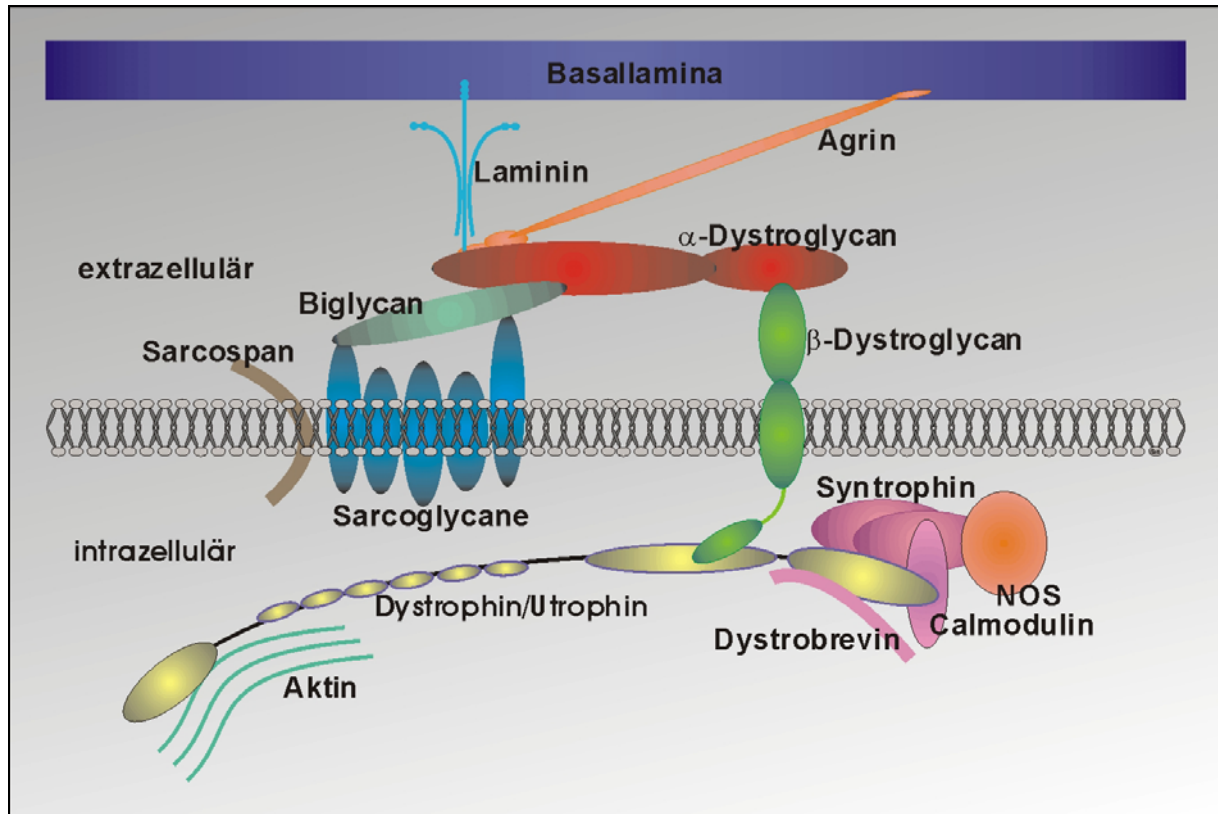


Abb. 1 Schematische Darstellung des Dystrophin Assoziierten Glykoproteinkomplexes (DAG) – Der Komplex setzt sich aus Komponenten zusammen, die verschiedenen Bereichen zugeordnet werden können. Im extrazellulären Bereich sind Komponenten der Basalmembran wie Agrin und Laminin und zellmembranassoziierte Proteine wie Biglycan und α -Dystroglycan angesiedelt. Transmembrankomponenten sind Sarcospan, die Sarcoglycane und β -Dystroglycan, wobei Letzteres die Verbindungen zu intrazellulären Proteinen des DAG herstellt. Intrazellulär ist die Kernkomponente Dystrophin oder das homologe Utrophin lokalisiert. Beide können die Verbindung zum Aktinzytoskelett herstellen, daneben besitzen sie jedoch auch Bindungsdomänen für weitere Proteine, wie die Syntrophine und Dystrobrevine. Diese Komponenten ermöglichen wiederum die Rekrutierung weiterer intrazellulärer Proteine, wie der NO-Synthase (NOS), Caveolin und weiterer Komponenten, die zum Teil Signaltransduktionsfunktionen beinhalten.

Es gibt zwei Hypothesen, wie Gen-Mutationen in Komponenten des DAG die muskulären Dystrophien verursachen können. Eine Theorie beruht auf der Annahme, daß Mutationen zur Unterbrechung der EZM-Zytoskelett-Verknüpfung und damit zu einer strukturellen Labilität der Muskelfaser führen (Campbell, 1995). Die Muskelfaser kann der mechanischen Beanspruchung nicht mehr standhalten und die Zellmembran reißt bei der Kontraktion. Dies führt zum Absterben der Muskelzellen und damit zur Degeneration der Muskulatur (Petrof et al., 1993; Pasternak et al., 1995). Im Anfangsstadium der Dystrophien wird die Degeneration durch

Regeneration neuer Muskelfasern kompensiert, in späteren Stadien sinkt die Regenerationsrate jedoch, was zum progressiven Verlauf der Krankheit führt. Je nachdem, welche Komponente der Verbindung durch Mutationen betroffen ist, entstehen verschiedene Ausprägungen der muskulären Dystrophie. Zum Beispiel verursachen Mutationen in der EZM-Komponente Laminin-2 verschiedene Congenitale Muskuläre Dystrophien (CMD; Helbling-Leclerc, et al., 1995). Die Duchenne Muskuläre Dystrophie (DMD) oder die klinisch milder verlaufende Becker Muskuläre Dystrophie (BMD) werden durch verschiedene Punkt-, Frameshift- und Nonsense-Mutationen im 2,5 Megabasen langen Dystrophin-Gen ausgelöst (Koenig et al., 1987). Die DMD ist eine der häufigsten Erbkrankheiten. Sie wird X-chromosomal vererbt und führt zu schwerer progressiver Muskeldegeneration mit dem Tod der Patienten im 3. Lebensjahrzehnt (Eine Zusammenfassung der muskulären Dystrophien und ihren genetischen Grundlagen findet man bei Cohn und Campbell, 2000).

Die zweite Theorie erklärt die Tatsache, daß Mutationen in Genen einiger Komponenten, die nicht an der direkten Verbindung zwischen EZM und dem Zytoskelett beteiligt sind, ebenfalls zu muskulären Dystrophien führen. Der DAG hat demnach neben der rein mechanischen Verknüpfung von Basalmembran zu Zytoskelett noch die Funktion, Moleküle, die an Signalübertragungswegen beteiligt sind, in spezifischen Zellkompartimenten zu lokalisieren. Mausmutanten mit einer Dystrobrevin-Defizienz zeigen einen dystrophischen Phänotyp, obwohl der Komplex erhalten bleibt und dadurch die molekulare Verbindung weiterhin besteht. Dagegen sind einige Signalmoleküle wie NOS nicht mehr an der Zellmembran lokalisiert, so daß bestimmte Signalkaskaden unterbrochen sind und es auf diese Weise zur Muskeldegeneration kommt (Grady et al., 1999). Beim Menschen führen Mutationen im α -Dystrobrevin-Gen zum Barth-Syndrom mit Symptomen der dilatativen Kardiomyopathie (Ichida et al., 2001).

Der Aufbau des DAG ist sehr heterogen. Er variiert in verschiedenen Geweben und sogar innerhalb der Muskelfasern. Dystrophin, welches in den extrasynaptischen Bereichen der Muskulatur die intrazelluläre Komponente des DAG darstellt, wird an der neuromuskulären Endplatte durch das homologe Utrophin ersetzt (Nyugen et al., 1991; Tinsley et al., 1992; Blake et al., 1995). Utrophin ist in seinem strukturellem Aufbau sehr ähnlich zu Dystrophin und enthält dieselben Bindungsdomänen (Morris et al., 1998). Die Bindung von Utrophin an β -Dystroglycan

wird wie bei Dystrophin ebenfalls über eine Tyrosinphosphorylierung geregelt (James et al., 2000). Auch die Beteiligung von Syntrophinen, Dystrobrevinen und weiteren intrazellulären Komponenten ist abhängig von der Lokalisation des DAG. Lediglich Dystroglycan, die zentrale transmembrane Komponente des DAG, ist unabhängig von der Zusammensetzung und Lokalisation des DAG immer mit diesem assoziiert. Die physiologische Bedeutung dieser unterschiedlichen Komplexzusammensetzungen ist bisher unbekannt.

1.1.1 Zentralnervöse Symptome bei muskulären Dystrophien

Viele Komponenten des DAG werden außer in der Muskulatur auch im ZNS exprimiert. Dystrophin, Dystroglycan und einige zytoplasmatische Komponenten kommen in pyramidalen Neuronen und einigen Interneuronen des Kortex, Neuronen der CA1-CA3 Region des Hippocampus, Purkinje Zellen des Kleinhirns, im Olfactorischen Trakt, in den Basalganglien, im Thalamus, im Hypothalamus und im Hirnstamm vor. Dystroglycan ist auch in Zellen vorhanden, die kein Dystrophin enthalten, in denen statt dessen aber Utrophin, oder spezielle, verkürzte Formen von Dystrophin exprimiert werden. Dazu gehören Körnerzellen des Hippocampus und Neurone des Thalamus und Hypothalamus (Lidov et al., 1990, 1993; Gorecki et al., 1994; Tian et al., 1996; Zaccaria et al., 2001). Dystroglycan wird außer von Neuronen auch von Gliazellen gebildet, die Kontakte zur Basalmembran der Blutgefäße oder Pia mater herstellen. Dystroglycan ist in diesen Zellen in spezialisierten Endfüßen an der Kontaktstelle zur Basalmembran konzentriert (Tian et al., 1996; Blank et al., 1997; Koulen et al., 1998) und dort vornehmlich mit Utrophin als intrazellulärer Komponente des Komplexes assoziiert (Khurana et al., 1992).

Patienten mit muskulärer Dystrophie haben neben den schweren muskulären Symptomen auch zentralnervöse Störungen (Sunada et al., 1996). Bei DMD Patienten sind ZNS Defizite beschrieben, die von leichten Sprachstörungen bis hin zu geistiger Behinderung reichen (Hyser und Mendell 1988; Lidov, 1996, Blake und Kröger, 2000). Morphologisch wurden kleinere Defekte im Gehirn der Patienten, wie fehlende Neurone, Gliosis und veränderte Dendriten von Pyramidalneuronen beschrieben (Jagadha und Becker, 1988).

Besonders schwer sind die zentralnervösen Symptome bei Patienten der Muscle-Eye-Brain-Disease (MEB; Santavuori et al., 1989), dem Walker-Warburg Syndrom (WWS; Walker, 1942; Warburg, 1978) und besonders der Fukuyama CMD (FCMD; Fukuyama et al., 1981). Neben der schweren muskulären Dystrophie zeigen

diese Patienten einen ZNS-Phänotyp, bei dem neben kognitiven Einschränkungen, diese Patienten sind geistig behindert und neigen zur Epilepsie, auch sehr stark die Morphologie des Gehirns betroffen ist. Das Gehirn weist massive strukturelle Veränderungen auf, die als „cobblestone cortex“ bezeichnet werden. Dieser zeichnet sich durch eine Lissenzephalie, einem desorganisierten Kortex mit variabler Dicke und Kleinhirnhypoplasie aus. Weiterhin wurden vergrößerte Ventrikel, ein flacher Hirnstamm und Migrationsdefekte der Neurone beschrieben (Cormand et al., 2001; Kano et al., 2002). Die Augenentwicklung dieser Patienten ist ebenfalls stark beeinträchtigt. Es bilden sich unter anderem Glaukome und Myopien.

Die genetische Grundlage der MEB, des WWS und der FCMD sind jedoch nicht Mutationen in Genen, die für Komponenten des DAG kodieren, sondern in Genen von Enzymen, die wichtig für die posttranslationale Glykosylierung von Dystroglycan sind. Diese Krankheiten werden durch Mutationen in den Genen der Glykosyltransferasen O-linked Mannose 1,2-N-Acetyl-Glucosamin-Glykosyltransferase (POMGnT1; Yoshida et al., 2001; Beltran-Valero et al., 2002), Fukutin (Kobayashi et al., 1998) und dem Fukutin-Related-Protein (FKRP) (Brockington et al., 2001 a, b und c) verursacht. Die Gene kodieren alle für verschiedene Glykosyltransferasen, deren gemeinsames Substrat α -Dystroglycan ist. Alpha-Dystroglycan, das aus Muskelbiopsiematerial dieser Patienten isoliert wurde, weist eine reduzierte Glykosylierung auf und hat eine verringerte Affinität zu den EZM - Proteinen Agrin, Laminin und Neurexin (Michele et al., 2002).

Da die molekularen Grundlagen dieser Symptome am Menschen nicht im Detail geklärt werden können, werden unterschiedliche Mausmutanten als Modellsysteme muskulärer Dystrophien verwendet (Durbeej und Campbell, 2002). Darunter auch eine Mausmutante (*myd* Maus) mit einer Mutation im Gen LARGE, das ebenfalls für eine N-Acetyl-Glukosamin-Glykosyltransferase codiert. Eine Mutation von LARGE führt auch zu einer veränderten Glykosylierung von α -Dystroglycan (Grewal et al., 2001). Die Gehirne dieser Mäuse zeigen morphologische Veränderungen, die sehr ähnlich der Lissenzephalie bei MEB und FCMD Patienten ist. Die Schichtung des Kortex ist desorganisiert und die Grenze zwischen Schicht I und II ist aufgelöst. Ausgelöst werden diese Symptome vermutlich unter anderem durch Defekte in der neuronalen Migration während der Entwicklung. Die Migrationsdefizite betreffen zum Beispiel eine Population von Körnerzellen im Cerebellum und Hippocampus, die außerhalb ihres eigentlichen Zielgebietes markiert

werden können und Neurone des Kortex, die in die Molekularschicht einwandern (Michele et al., 2002, Holzfeind et al., 2002). Bisher konnte nicht geklärt werden, wie die Modifikation von Dystroglycan diese Effekte auslösen kann.

Eine Funktion von Dystroglycan ist die Kondensation der extrazellulären Matrix während der Ausbildung der Basalmembranen (Henry und Campbell; 1998). Mäuse mit einer Dystroglycan-Defizienz sterben sehr früh in der Entwicklung aufgrund einer fehlerhaften Ausbildung essentieller Basalmembranen, wie der Reicherts Membran (Williamson et al., 1997). Deshalb könnten Defekte in der ZNS-Basalmembranen auch Auslöser der gestörten ZNS-Entwicklung bei der muskulären Dystrophie sein. Das komplette zentrale Nervensystem ist von den Meningen, den Hirnhäuten umgeben, bestehend aus der äußersten Pachymeninx bzw. Dura mater und der inneren Leptomeninx aus Arachnoidea mater und Pia mater (Pia). Die Struktur der Basalmembran ist abhängig von den Quervernetzungen und Bindungen der Proteine wie Collagen IV, Laminin, Perlecan und Nidogen untereinander (Timpl und Dziadek, 1986; Timpl und Brown, 1996). Die genaue Zusammensetzung und daraus folgend die Funktion der Basalmembranen ist gewebsabhängig. Es liegt nahe, daß die ZNS Defekte durch Veränderungen von Dystroglycan auch auf eine veränderte Funktion der Basalmembranen zurückzuführen sind. Übereinstimmend damit war es möglich, durch Induktion einer selektiven Defizienz von Dystroglycan im ZNS neben zentralnervösen Symptomen wie Makrozephalie und neuronalen Migrationsstörungen auch einen partiellen Verlust der Basalmembran zu induzieren (Moore et al., 2002). Die Unterbrechungen der Basalmembran könnten die defekte Gehirnentwicklung und die Fehler der neuronalen Migration erklären. Alpha-Dystroglycan, das aus der Muskulatur und dem Gehirn der *myd* Mutanten isoliert wurde, zeigt ebenfalls verringerte Bindungsaffinität zu EZM Molekülen wie Agrin, Laminin und Neurexin und in den Untersuchungen der *myd* Mausmutanten werden auch Störungen der Struktur der Basalmembran beschrieben (Michele et al., 2002). Im Gehirn der *myd* Mäuse ist die EZM Komponente Laminin an der Basalmembran reduziert und Komponenten des DAG wie α -Dystroglycan, β -Dystroglycan, Dystrophin und Syntrophin sind nicht länger an den Astrozyten-Endfüßen lokalisiert. Dies bedeutet, daß die veränderte Glykosylierung von α -Dystroglycan die Interaktion zu seinen Liganden verringert und dadurch der komplette DAG nicht mehr korrekt assembliert werden kann (Michele et al., 2002; Holzfeind et al., 2002).

Bisher konnte jedoch nicht geklärt werden, welche Funktion Dystroglycan in den Gliazellendfüßen hat und wie eine Störung der Dystroglycan-Funktion zu den beschriebenen zentralnervösen Symptomen der muskulären Dystrophie Patienten und der *myd* Maus führen. In dieser Arbeit sollte deshalb die Funktion von Dystroglycan in der Entwicklung des Nervensystems am Beispiel der Retina untersucht werden.

Die Retina bietet sich als Modellsystem an, da sie zum Einen durch ihre leichte Zugänglichkeit und den zum Gehirn vergleichsweise einfachen Aufbau ein hervorragendes System für funktionelle Analysen ist. Zum Anderen ist in der Retina die Lokalisation und Zusammensetzung des DAG sehr gut beschrieben (Blank et al., 1997, 2002; Koulen et al., 1998; Blake und Kröger, 2000). Im Folgenden soll der Aufbau der Retina kurz erläutert werden. Die Huhnretina (Abb. 2A) besteht aus 5 neuronalen Zelltypen und einem Gliazelltyp, die in horizontalen Schichten angeordnet sind. Die Photorezeptoren mit ihren lichtsensitiven Segmenten bilden die äußere Körnerschicht (ONL). Die äußere plexiforme Schicht (OPL) enthält die Synapsen, in denen die Photorezeptoren das Signal an die nachfolgenden Zellen, die Bipolarzellen, weitergeben. Die Somata der Bipolarzellen, sowie der querverschaltenden Horizontal- und Amakrinzellen, bilden die innere Körnerschicht (INL). In der inneren plexiformen Schicht sind die synaptischen Verschaltungen der Bipolarzellen zu den Ganglienzellen der Ganglienzellschicht (GCL) lokalisiert. Diese Ganglienzellen sind weitprojizierende Neurone, die über ihre Axone in der Faserschicht (OFL) durch den Sehnerv die Verbindungen zu den Gehirnregionen herstellen, in denen die nachgeschalteten Prozesse des Sehens stattfinden. Die neuronale Retina wird vom Glaskörper durch eine Basalmembran, die Innere Grenzmembran (ILM) abgeteilt. Der vorherrschende Gliazelltyp in der Retina ist die Müller-Gliazelle (MGZ). Sie durchspannt die komplette Retina von der skleralen äußeren Grenzmembran bis zur vitrealen inneren Grenzmembran. Die MGZ stellen an der ILM mit ihren Endfüßen einen Kontakt zur Basalmembran her. In der vaskularisierten Wirbeltierretina existiert neben den MGZ noch ein zweite Gliazelltyp, der perivaskuläre Astrocyt, der mit seinem Endfüßen einen Kontakt zu den Blutgefäßendothelien bildet.

Dystroglycan ist in der adulten Huhnretina in zwei Bereichen lokalisiert: innerhalb der OPL in den Photorezeptor-Terminalien, sowie an der Kontaktstelle der Endfüße der radiären Müller-Gliazellen zur Basalmembran (Abb. 2B; Drenckhahn et

al., 1996; Blank et al., 1997, 2002). In der vaskularisierten Säugerretina ist Dystroglycan zusätzlich noch an den Kontaktstellen zwischen Astrozytenendfüßen und Blutgefäßen konzentriert (Montanaro et al., 1995; Koulen et al., 1998; Ueda et al., 1998, 2000, Claudepierre et al., 1999). An den beiden unterschiedlichen Lokalisationen besitzt der DAG in der Huhnretina auch verschiedene Zusammensetzungen. In den Photorezeptor-Terminalien ist der DAG mit Dystrophin als intrazellulärer Komponente assoziiert, dagegen ist in den Endfüßen der Gliazellen Dystrophin gegen Utrophin ausgetauscht (Claudepierre et al., 2000). Außer der Zusammensetzung des DAG ist auch seine Assoziation mit der EZM in beiden Bereichen unterschiedlich. Die Injektion von Collagenase in Hühneraugen, eine Methode die selektiv die ILM der Retina entfernt (Halfter et al., 1998; Halfter et al., 2000; Hering et al., 2000), hat unterschiedliche Auswirkungen auf die Integrität des DAG in den beiden Bereichen. Während der DAG an den Photorezeptoren unverändert bestehen bleibt, sind nach dem Verdau der ILM die Komponenten des DAG nicht mehr in den Endfüßen der Gliazellen konzentriert. Diese Unterschiede deuten darauf hin, daß der DAG in den verschiedenen Lokalisationen auch unterschiedliche Aufgaben ausübt. In der frühen Retinaentwicklung ist Dystroglycan lediglich an der Basalmembran lokalisiert (Blank et al., 2002). In diesen frühen Stadien besteht die Retina, sowie das gesamte frühe Neuroepithel, lediglich aus einer einzelnen Schicht sich schnell teilender, radiärer neuroepithelialer Vorläuferzellen. Alle Zellen des ZNS entstehen während der Entwicklung durch Differenzierung und Wanderung aus diesen proliferierenden radiären Zellen. Sie durchspannen mit ihren Fortsätzen das gesamte Neuroepithel und adhären mit Endfüßen an die Basalmembran, die den Endfüßen der MGZ sehr ähnlich sind. In diesen Endfüßen sind die Komponenten des DAG an der Kontaktstelle zur Basalmembran konzentriert. Durch Teilung und Migration der Zellen entstehen aus dem einschichtigen Epithel drei Schichten, die Ventrikulärzone (VZ), in der die Zellen weiterhin proliferieren, die Intermediärzone (IZ), welche die Somata migrierender Neurone enthält und die der Pia angelagerten Mantelzone (MZ), in der differenzierte Neurone ihre endgültige Position einnehmen.

In der embryonalen Retina ergibt sich deshalb die Möglichkeit, selektiv die Funktion von Dystroglycan an der Kontaktstelle der Endfüße radiärer Zellen zur Basalmembran und seine Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems zu untersuchen.

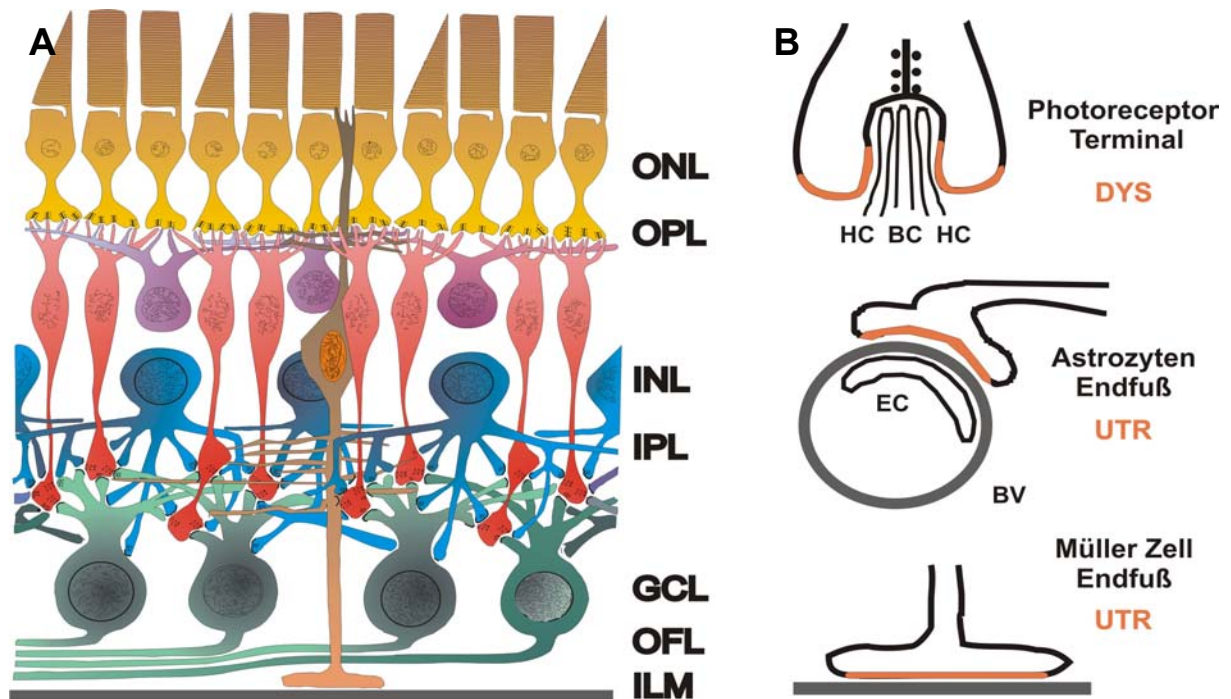


Abb. 2 Schematische Darstellung der Retina und der Lokalisation des DAG in der Retina – A: die Schichtung der Retina mit den typischen Zelltypen; Photorezeptoren (gelb) mit den Somata in der Äußeren Körnerschicht (ONL); deren synaptische Verbindungen zu Horizontalzellen (lila) und Bipolarzellen (rot) in der Äußeren Plexiformen Schicht (OPL); Horizontal- Bipolar und Amakrinzellen (blau) bilden zusammen die Innere Körnerschicht (INL); die Retina Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht (GCL); ihre Dendriten mit den synaptischen Eingängen in der Inneren Plexiformen Schicht (IPL); die Axone der RGZ verlaufen in der Optischen Faserschicht (OFL). Die Retina wird vom Glaskörper durch die Innere Grenzmembran (ILM) abgegrenzt. Der vorherrschende Gliazelltyp der Retina ist die Müller Gliazelle (braun). **B:** Der DAG, in rot dargestellt, ist in der adulten Retina an drei Stellen lokalisiert. An den Photorezeptorterminalien, wobei hier Dystrophin die intrazelluläre Komponente ist, und in den Endfüßen von Astrozyten und Müller Gliazellen, wobei hier Dystrophin durch Utrophin ersetzt ist. In den Endfüßen befindet sich der DAG direkt an der Kontaktstelle zwischen Endfuß und angrenzender Basalmembran (Blake und Kröger, 2000).

1.2 Zielsetzung

Mutationen in Genen einiger Komponenten des Dystrophin-Assoziierten Glycoproteinkomplex führen nicht nur zu schweren degenerativen Erkrankungen der Muskulatur, sondern haben auch Auswirkungen auf die Entwicklung und Funktion des ZNS. Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion des DAG in der sich entwickelnden Retina zu analysieren. Dies geschah durch die Untersuchung von Dystroglycan, der zentralen Komponente des DAG. Dazu sollten im einzelnen folgende Fragen geklärt werden:

- Wie lautet die cDNA-Sequenz von Huhn-Dystroglycan?
- Zeigt die Huhn-Dystroglycan-Sequenz Homologien zu der anderer Spezies?
- Läßt sich Huhn-Dystroglycan rekombinant exprimieren und wird es richtig prozessiert?
- Können Antikörper, die gegen die Interaktionsdomänen von α - und β -Dystroglycan hergestellt wurden, die Bindung der beiden Proteine inhibieren?
- Führt die Injektion dieser Antikörper in das Auge sich entwickelnder Hühnerembryonen zu einer veränderten Retinaentwicklung?
- Lassen sich aus solchen Veränderungen Rückschlüsse auf die Funktion von Dystroglycan an der Kontaktstelle von radiären Gliazellen und der inneren Grenzmembran der Retina ziehen?

2 Ergebnisse

2.1 Klonierung von Huhn-Dystroglycan

Voraussetzung für funktionelle Experimente auf RNA-, DNA- und Proteinebene war es, die gesamte Huhn-Dystroglycan-cDNA zu klonieren. Dystroglycan war bereits aus mehreren Spezies wie Mensch (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993), Kaninchen (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992), Maus (Gorecki et al., 1994), Rind (Shimizu, online 1997) und Drosophila (Takeuchi et al., online 2001) kloniert worden. Die entsprechende cDNA-Sequenz aus Huhn war jedoch nicht bekannt. Die Klonierung des Bereichs der cDNA, der für α -Dystroglycan codiert, erfolgte mittels RT-PCR. Dabei diente Gesamt-RNA aus embryonalem Hühnermuskel (E17) als Matrize. Für die PCR wurden degenerierte Primer aus stark konservierten Bereichen im N-terminalen Bereich von Dystroglycan eingesetzt. Dadurch konnte ein etwa 800 bp großes Stück am 5'Ende der Dystroglycan-Sequenz ermittelt werden, welches für die Aminosäuren 41 bis 295 codiert. Von diesem Bereich ausgehend konnten mittels einer 5'RACE mehrere Produkte generiert werden, die sowohl das Startcodon, als auch darüber hinaus Teile der 5'UTR beinhalten. Auf diese Weise konnten weite Bereiche der cDNA-Sequenz aus Huhn amplifiziert, kloniert und sequenziert werden. Die codierende Region für α -Dystroglycan und einen Teil des β -Dystroglycan wurde ermittelt (Abb. 3). Jedoch war es mit dieser Methode nicht möglich, das 3'Ende der Dystroglycan-Sequenz zu erhalten. Es ist anzunehmen, daß der hohe GC-Gehalt in diesem Bereich der Sequenz oder dadurch hervorgerufene Sekundärstrukturen, eine Amplifikation während der RT-PCR verhindern. Die letzten 211 Basenpaare weisen einen GC Gehalt von 71% auf, wohingegen der GC Gehalt des gesamten Moleküls nur 63% Prozent beträgt.

Als alternative Methode zur RT-PCR wurde deshalb die Analyse einer Cosmid Datenbank durchgeführt. Der unbekannte Teil des Dystroglycan-Genes wurde mittels Restriktion aus einem Cosmid herausgeschnitten und an den bestehenden cDNA Klon, der durch RT-PCR generiert wurde angefügt. Auf diese Weise war es möglich, die komplette cDNA Sequenz von Dystroglycan zu erhalten. Zusätzlich ergab die Klonierung über 5'RACE zusätzliche Informationen über die 5'UTR und die Klonierung aus den Cosmiden, mit einer Schnittstelle unterhalb des Stopcodons auch über Bereiche der 3'UTR von Dystroglycan (Abb. 3)

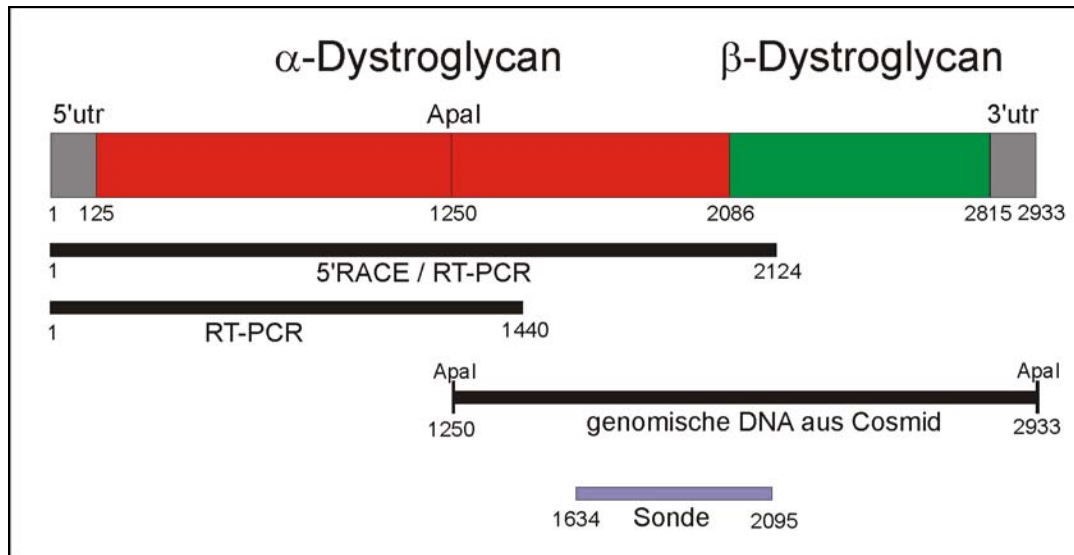


Abb. 3 Klonierungsschema von Dystroglycan – Die Sequenz zwischen Bp 1 und 2124 wurde durch 5'RACE und degenerative RT-PCR ermittelt. Daraus konnte die Sonde (Bp 1634 bis 2095) für die Analyse der Cosmid-Datenbank abgeleitet werden. Die Klonierung des gesamten Dystroglycans erfolgte in zwei Schritten. Die C-terminale Hälfte bis Bp 1440 wurde mittels einer RT-PCR vervielfältigt und in den pCRII Vektor cloniert. Ein aus dem Cosmid mit Apal herausgeschnittenes Fragment wurde danach wiederum über die Apal-Schnittstelle in dieses Plasmid hineinkloniert. Dadurch entstand das Gesamt-Dystroglycan-Konstrukt inklusive der beiden UTR's.

Die Sequenzierung der Dystroglycan-Klone (pCRDAG 1-3) ergab ein Produkt von 2933 bp Länge (Anhang Abb. 26). Davon 125 bp 5'UTR, 117 bp 3'UTR und einer Huhn-Dystroglycan-Sequenz von 2691 bp Länge, die für ein Protein mit 896 Aminosäuren codiert, davon 654 Aminosäuren für α -Dystroglycan mit einem errechneten Molekulargewicht von 71,3 kDa und 242 Aminosäuren für β -Dystroglycan mit einem Gewicht von 23,4 kDa. Das tatsächliche Molekulargewicht liegt jedoch bei beiden Proteinen erheblich höher, da sie *in vivo* glykosyliert vorliegen. Die Proteinsequenz weist hohe Homologie zu anderen Spezies auf.

Prozent	Huhn	Mensch	Maus	Kaninchen	Rind
Mensch	78,4				
Maus	79,0	93,2			
Kaninchen	78,7	93,5	93,1		
Rind	78,4	92,9	92,4	91,4	
Drosophila	24,9	24,9	24,8	24,2	25,2

Tabelle 1) Homologievergleich der Proteinsequenzen einiger Spezies – Die Homologien zueinander sind in Prozent angegeben

Einige Sequenzmotive zeigen eine besonders hohe Konservierung zwischen den Spezies (Abb. 4). Dazu gehören einige Glykosylierungsstellen, besonders in der zentralen Mucin-ähnlichen Domäne, die spezifische enzymatische Schnittstelle zwischen α - und β -Dystroglycan (AA 654 – 655) und der Bereich der Transmembrandomäne (AA 755 – AA 775, TMpredict). Die cytoplasmatische C-terminale Bindungsstelle an Dystrophin ist bis hin zu Drosophila hochkonserviert.

		Section 9																																																														
(513)	513	520	530	540	550	560	576																																																									
Huhn (509)	A	W	E	G	T	F	E	V	K	I	P	S	D	T	F	Y	D	K	E	D	T	T	T	D	K	L	Q	L	T	L	K	L	K	E	Q	M	I	E	E	N	S	W	V	Q	F	N	S	T	S	Q	L	M	Y	G	M	P	D	R	S	H	V	G		
Mensch (508)	A	W	E	G	T	F	E	V	K	I	P	S	D	T	F	Y	D	H	E	D	T	T	T	D	K	L	L	T	L	K	L	R	E	Q	L	V	G	E	K	S	W	V	Q	F	N	S	N	S	Q	L	M	Y	G	L	P	D	S	S	H	V	G			
Maus (506)	A	W	E	G	T	F	E	V	K	I	P	S	D	T	F	Y	D	M	E	D	T	T	T	D	K	L	L	T	L	K	L	R	E	Q	L	V	G	E	K	S	W	V	Q	F	N	S	N	S	Q	L	M	Y	G	L	P	D	S	S	H	V	G			
Kaninchen (508)	A	W	E	G	T	F	E	V	K	I	P	S	D	T	F	Y	D	K	E	D	T	T	T	D	K	L	L	T	L	K	L	R	E	Q	L	V	G	E	K	S	W	V	Q	F	N	S	N	S	Q	L	M	Y	G	L	P	D	S	S	H	V	G			
Rind (508)	A	W	E	G	T	F	E	V	K	I	P	S	D	T	F	Y	D	M	E	D	T	T	T	D	K	L	L	T	L	K	L	R	E	Q	L	V	G	E	K	S	W	V	Q	F	N	S	N	S	Q	L	M	Y	G	L	P	D	S	S	H	V	G			
Drosophila (423)	S	L	G	Q	L	L	V	Y	K	W	P	A	D	T	F	Y	A	N	D	M	-	-	-	Q	L	T	L	T	K	T	R	H	L	E	L	S	P	R	H	O	L	Q	F	D	S	K	N	E	E	F	Y	G	I	P	K	S	G	D	I	G				
Consensus (513)	A	W	E	G	T	F	E	V	K	I	P	S	D	T	F	Y	D	E	D	T	T	T	D	K	L	L	T	L	K	L	R	E	Q	L	V	G	E	K	S	W	V	Q	F	N	S	N	S	Q	L	M	Y	G	L	P	D	S	S	H	V	G				
		Section 10																																																														
(577)	577	590	600	610	620	630	640																																																									
Huhn (573)	K	H	E	Y	F	M	H	A	T	D	K	G	G	L	S	A	V	D	A	F	E	I	H	V	H	K	R	P	H	G	D	K	S	P	V	K	F	K	A	R	L	E	G	D	H	S	A	V	A	M	D	I	H	K	K	I	M	L	V	K	K	L	A	L
Mensch (572)	K	H	E	Y	F	M	H	A	T	D	K	G	G	L	S	A	V	D	A	F	E	I	H	V	H	R	R	F	Q	G	D	R	A	P	A	R	F	K	A	K	T	V	G	D	P	A	L	V	L	N	D	I	H	K	K	I	A	L	V	K	K	L	A	F
Maus (570)	K	H	E	Y	F	M	H	A	T	D	K	G	G	L	S	A	V	D	A	F	E	I	H	V	H	R	R	F	Q	G	D	R	A	P	A	R	F	K	A	R	L	A	G	D	P	A	F	V	V	N	D	I	H	K	K	I	A	L	V	K	K	L	A	F
Kaninchen (572)	K	H	E	Y	F	M	H	A	T	D	K	G	G	L	S	A	V	D	A	F	E	I	H	V	H	R	R	F	Q	G	D	R	A	P	A	R	F	K	A	K	T	V	G	D	P	A	F	V	V	N	D	I	H	K	K	I	A	L	V	K	K	L	A	F
Rind (572)	K	H	E	Y	F	M	H	A	T	D	K	G	G	L	S	A	V	D	A	F	E	I	H	V	H	R	R	F	Q	G	D	R	A	P	A	R	F	K	A	L	T	G	D	P	A	A	V	T	N	D	I	H	K	K	I	A	L	V	K	K	L	A	F	
Drosophila (484)	S	E	E	Y	L	L	V	A	E	D	S	G	G	L	S	A	H	D	A	L	V	W	W	S	P	A	P	K	R	D	F	G	-	F	F	K	A	Y	L	S	I	K	H	E	R	F	N	A	D	L	Q	E	-	-	K	F	V	E	R	V	A	K		
Consensus (577)	K	H	E	Y	F	M	H	A	T	D	K	G	G	L	S	A	V	D	A	F	E	I	H	V	H	R	R	F	Q	G	D	R	A	P	A	R	F	K	A	L	G	D	P	A	F	V	V	N	D	I	H	K	K	I	A	L	V	K	K	L	A	F		
		Section 11																																																														
(641)	641	650	660	670	680	690	704																																																									
Huhn (637)	A	F	G	D	R	N	S	T	I	T	V	Q	D	I	A	K	-	-	-	S	I	V	W	E	W	T	M	N	T	L	P	L	E	P	-	-	C	P	R	E	Q	I	R	T	L	S	K	K	I	A	E	D	S	G	G	A	S	P	A	F	S			
Mensch (636)	A	F	G	D	R	N	S	T	I	T	L	Q	N	I	T	R	G	-	-	-	S	I	V	W	E	W	T	M	N	T	L	P	L	E	P	-	-	C	P	K	E	Q	I	A	G	L	S	R	R	I	A	E	D	D	G	K	P	R	P	A	F	S		
Maus (634)	A	F	G	D	R	N	S	T	I	T	L	Q	N	I	T	R	G	-	-	-	S	I	V	W	E	W	T	M	N	T	L	P	L	E	P	-	-	C	P	K	E	Q	I	I	G	L	S	R	R	I	A	E	D	D	G	K	P	R	P	A	F	S		
Kaninchen (636)	A	F	G	D	R	N	S	T	I	T	L	Q	N	I	T	R	G	-	-	-	S	I	V	W	E	W	T	M	N	T	L	P	L	E	P	-	-	C	P	K	E	Q	I	T	G	L	S	R	R	I	A	E	D	D	G	K	P	R	P	A	F	S		
Rind (636)	A	F	G	D	R	N	S	T	I	T	L	Q	N	I	T	R	G	-	-	-	S	I	V	W	E	W	T	M	N	T	L	P	L	E	P	-	-	C	P	K	E	Q	I	T	A	L	S	R	R	I	A	E	D	D	G	K	P	R	P	A	F	S		
Drosophila (545)	L	M	G	D	P	T	T	G	Q	I	Q	I	R	S	I	T	H	D	S	D	C	T	I	W	N	F	Y	N	T	T	L	V	R	K	H	N	S	C	R	E	K	E	V	A	M	T	B	S	V	Y	L	N	S	D	L	S	L	R	E	A	A	K		
Consensus (641)	A	F	G	D	R	N	S	T	I	T	L	Q	N	I	T	R	G	-	-	-	S	I	V	W	E	W	T	M	N	T	L	P	L	E	P	-	-	C	P	K	E	Q	I	G	L	S	R	R	I	A	E	D	D	G	K	P	R	P	A	F	S			
		Section 12																																																														
(705)	705	710	720	730	740	750	768																																																									
Huhn (695)	M	I	L	Q	E	E	F	K	P	L	N	V	S	W	V	G	S	G	S	C	G	H	I	Q	F	W	P	V	T	K	D	G	R	V	I	S	E	A	T	P	T	L	A	A	G	K	D	P	E	K	S	S	E	-	D	D	V	Y	L	H	T	V	I	P
Mensch (694)	M	A	L	E	P	D	F	K	A	T	S	I	T	V	T	G	S	G	S	C	R	H	L	O	F	I	P	W	V	P	P	R	V	P	S	E	A	P	P	T	E	V	P	D	R	D	P	E	K	S	S	E	-	D	D	V	Y	L	H	T	V	I	P	
Maus (692)	M	A	L	E	P	D	F	K	A	L	S	I	A	V	T	G	S	G	S	C	R	H	L	O	F	I	P	W	A	P	P	P	P	G	S	A	A	P	A	T	E	V	P	D	R	D	P	E	K	S	S	E	-	D	D	V	Y	L	H	T	V	I	P	
Kaninchen (694)	M	A	L	E	P	D	F	K	A	T	S	I	A	V	T	G	S	G	S	C	R	H	L	O	F	I	P	W	A	P	P	P	I	P	S	V	T	P	P	T	E	V	P	D	R	D	P	E	K	S	S	E	-	D	D	V	Y	L	H	T	V	I	P	
Rind (694)	M	A	L	E	P	D	F	K	A	M	S	I	T	V	T	G	S	G	S	C	R	H	L	O	F	I	P	W	A	P	P	M	R	V	P	S	E	A	P	A	T	E	V	P	D	R	D	P	E	K	S	S	E	-	D	D	V	Y	L	H	T	V	I	P
Drosophila (609)	R	A	L	G	P	E	L	N	L	T	M	F	S	W	V	P	F	S	I	C	H	H	T	E	N	I	D	T	M	Q	L	D	Y	I	P	-	-	-	-	-	-	S	R	P	E	E	P	T	H	K	S	S	F	G	E	D	Y	M	I	T	F	W	P	
Consensus (705)	M	A	L	E	P	D	F	K	A	T	S	I	S	V	T	G	S	G	S	C	R	H	L	O	F	I	P	W	A	P	P	R	V	P	S	E	A	P	P	T	E	V	P	D	R	D	P	E	K	S	S	E	-	D	D	V	Y	L	H	T	V	I	P	
		Section 13																																																														
(769)	769	780	790	800	810	820	832																																																									
Huhn (758)	A	V	W	V	A	A	I	L	L	V	A	G	I	I	A	M	I	C	Y	R	K	K	-	R	K	G	L	T	I	E	D	-	-	-	Q	A	T	F	I	K	K	G	V	P	I	I	F	A	D	E	L	D	S	K	P	P	P	S	S	S	M	P		
Mensch (757)	A	V	W	V	A	A	I	L	L	V	A	G	I	I	A	M	I	C	Y	R	K	K	-	R	K	G	L	T	I	E	D	-	-	-	Q	A	T	F	I	K	K	G	V	P	I	I	F	A	D	E	L	D	S	K	P	P	P	S	S	S	M	P		
Maus (755)	A	V	W	V	A	A	I	L	L	V	A	G	I	I	A	M	I	C	Y	R	K	K	-	R	K	G	L	T	I	E	D	-	-	-	Q	A	T	F	I	K	K	G	V	P	I	I	F	A	D	E	L	D	S	K	P	P	P	S	S	S	M	P		
Kaninchen (757)	A	V	W	V	A	A	I	L	L	V	A	G	I	I	A	M	I	C	Y	R	K	K	-	R	K	G	L	T	I	E	D	-	-	-	Q	A	T	F	I	K	K	G	V	P	I	I	F	A	D	E	L	D	S	K	P	P	P	S	S	S	M	P		
Rind (757)	A	V	W	V	A	A	I	L	L	V	A	G	I	I	A	M	I	C	Y	R	K	K	-	R	K	G	L	T	I	E	D	-	-	-	Q	A	T	F	I	K	K	G	V	P	I	I	F	A	D	E	L	D	S	K	P	P	P	S	S	S	M	P		
Drosophila (667)	I	W	I	V	A	M	L	V	A	A	S	I	I	A	C	C	L	H	W	C	Q	R	S	G	N	E	L	G	D	E	E	E	R	K	S	F	R	A	K	G	I	P	V	I	F	Q	D	E	Y	E	E	-	K	P	E	I	G	N	K	S	P			
Consensus (769)	A	V	W	V	A	A	I	L	L	V	A	G	I	I	A	M	I	C	Y	R	K	K	-	R	K	G	L	T	I	E	D	-	-	-	Q	A	T	F	I	K	K	G	V	P	I	I	F	A	D	E	L	D	S	K	P	P	P	S	S	S	M	P		
		Section 14																																																														
(833)	833																																																															

2.2 Generierung von Antikörpern gegen die Dystroglycan Interaktionsstelle

Um die Interaktion zwischen α - und β -Dystroglycan zu inhibieren, wurden Antikörper generiert, die spezifisch die Bindedomänen von α - und β -Dystroglycan erkennen und mit den Proteinen in Konkurrenz um die Bindungsstellen treten können (Abb. 5). Eine Unterbrechung der Dystroglycan-Interaktion sollte dann eine Störung der Funktion von Dystroglycan und dem DAG induzieren. Dazu war es nötig, ein Antigen für die Immunisierung zu erzeugen, welches die entsprechenden Domänen beider Proteine enthält. Hierbei war es von großem Vorteil, daß die cDNA von Dystroglycan für beide Proteine codiert, die Bereiche der späteren Bindungsdomänen in unmittelbarer Nähe zueinander liegen und daß Bakterien die Protease fehlt, die Dystroglycan spaltet. Deshalb ist es möglich, die terminalen Enden von α - und β -Dystroglycan als Fusionsprotein zu exprimieren und Antikörper gegen die beiden interagierenden Proteine zu erhalten.

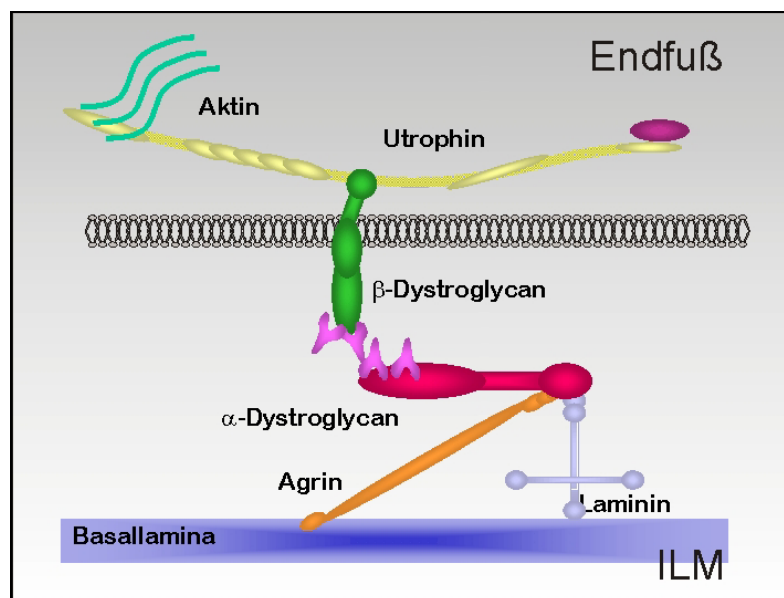


Abb. 5 Schemazeichnung der Antikörperinhibition – Die neu generierten Antikörper (rosa) sollen die Interaktionsdomänen von Dystroglycan erkennen und die Bindung von α - und β -Dystroglycan an der Kontaktstelle zwischen dem Endfuß der radiären Zelle und der Basalmembran (ILM) stören.

Aus der Dystroglycan-Sequenz wurde der codierende Bereich zwischen Aminosäure 564 und 749 ausgewählt (Abb. 6). Dieser Bereich enthält zum einen die Bindungsstellen beider Proteine (Scandira et al., 2001) und zum anderen nur wenige putative Glykosylierungsstellen. Eine postrtranslationale Glykosylierung könnte dazu führen, daß die Antikörper gegen das rekombinante Protein die glykosylierten Formen des nativen und denaturierten Proteins nicht erkennen.

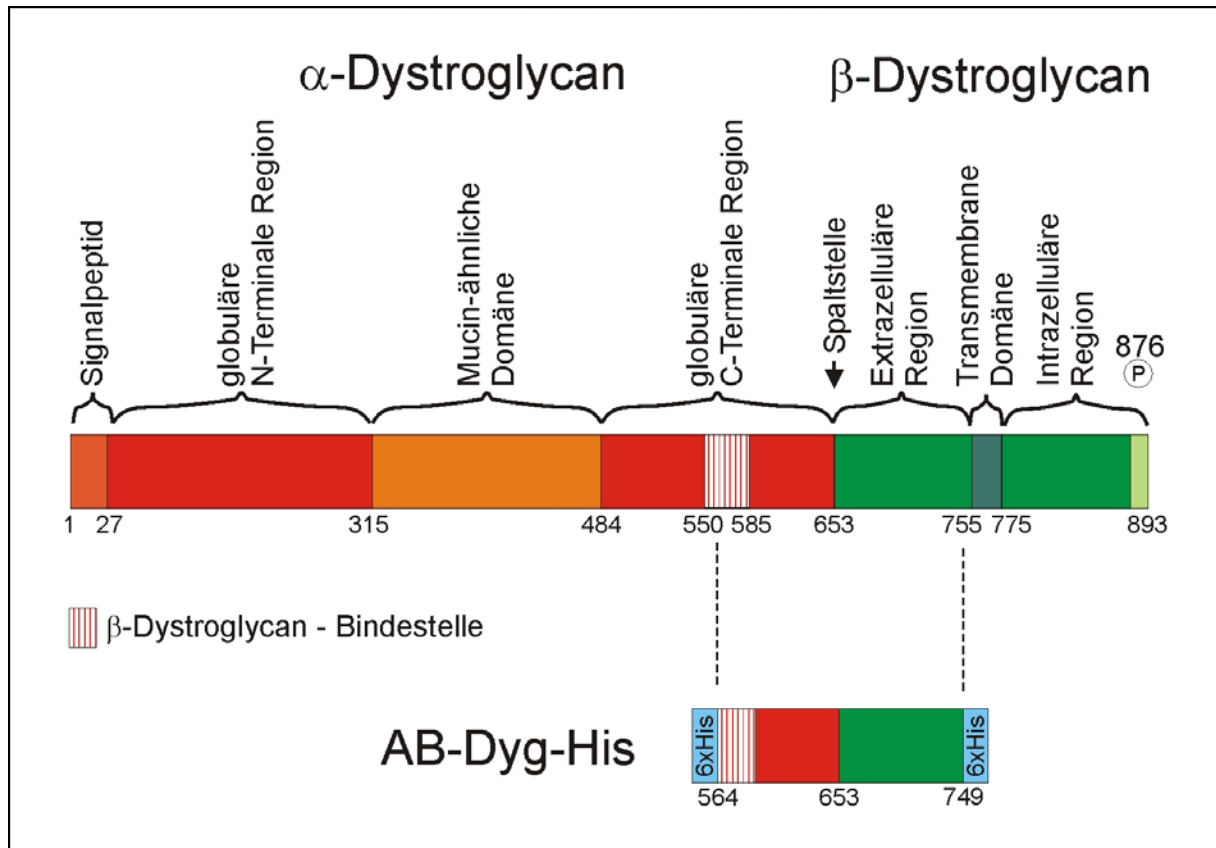


Abb. 6 Domänenstruktur von Dystroglycan und des Fusionsproteins AB-Dyg-His – In rot dargestellt α -Dystroglycan, bestehend aus der N-terminalen globulären Domäne AA 27-315, die hochglykosylierte Mucin-ähnliche Domäne von 315 bis 484 und der C-terminalen globulären Region von 484 bis 653, letztere enthält auch die Bindestelle für β -Dystroglycan (550 bis 585). In grün β -Dystroglycan mit der extrazellulären Domäne 653 bis 755, die Transmembrandomäne von 755 bis 775 und die intrazelluläre Region 775 bis 893, letztere enthält die Phosphorylierungsstelle 876, welche die Bindung an Dystrophin/Utrophin reguliert. AB-Dyg-His umfaßt 564 bis 749, somit enthält es den größten Teil der β -Dystroglycan Bindestelle, das C-terminale Ende von α -Dystroglycan und die komplette extrazelluläre Region von β -Dystroglycan. Zusätzlich enthält AB-Dyg-His zur spezifischen Aufreinigung zwei repetitive Histidinenden.

Die Immunisierung zweier Kaninchen (Tier 1, T1 und Tier 2 ,T2) und die Antiserumgewinnung wurde von der Firma Pineda Antikörper (Berlin) durchgeführt. Um die Spezifität der Antiseren (AB-Dyg-His T1 und AB-Dyg-His T2), der entsprechenden affinitätsgereinigten Antikörper (ABT1 und ABT2) und der daraus hergestellten Fab-Fragmente (FabT2) zu bestimmen, wurden alle sowohl in der Immunzytochemie, als auch im Western Blot charakterisiert. Die Immunfärbung in der adulten Huhnretina zeigt für die beiden Antikörper ein etwas unterschiedliches Muster (Abb. 7). Die Färbung mit ABT1 zeigt eine starke Konzentration von Dystroglycan an der inneren Grenzmembran und eine schwache Anfärbung der IPL und OPL. ABT2 detektiert Dystroglycan sehr stark an den Photorezeptorterminalien in der OPL, die Basalmembran und IPL werden dagegen schwächer markiert. Die Färbemuster entsprechen denen, die auch mit anderen anti-Dystroglycan-

Antikörpern (Blank et al., 2002) beschrieben wurden. In Muskelschnitten färben beide Antikörper entsprechend der bekannten Verteilung von Dystroglycan die gesamte Muskelfasermembran (nicht gezeigt).

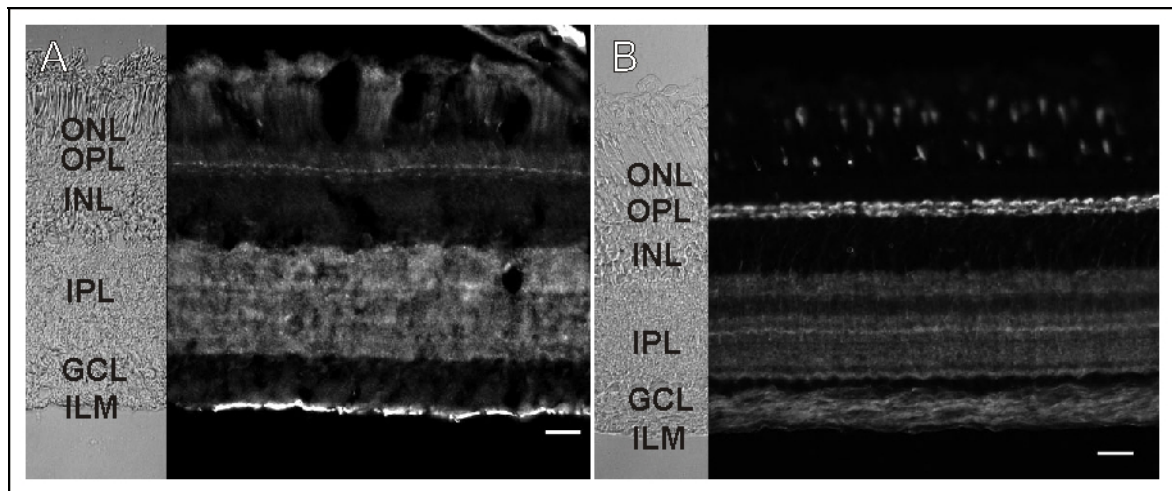


Abb. 7 Immunzytochemische Charakterisierung der AB-Dyg-His Antikörper – Schnitte adulter Huhnretina, in **A** ABT1, Eine starke Färbung der Basalmembran (ILM), schwächere Färbung in der IPL und OPL; in **B** ABT2, starke Färbung in der OPL und schwächer in der Basalmembran und der IPL. Mit beiden Antikörpern ist zusätzlich eine Färbung in der IPL und teilweise in den äußeren Segmenten der Photorezeptoren zu erkennen.

Im Western Blot zeigen sich ebenfalls leichte Unterschiede in der Spezifität der beiden Antikörper. In Abb. 8A ist ein Western Blot gezeigt, in dem in jeder Spur Zellysate von Dystroglycan exprimierenden HEK293 Zellen aufgetragen wurden. Spur 1 und 2 ist der Vergleich der beiden AB-Dyg His Antiseren. Diese erkennen mehrere Banden, von denen eine in der Höhe von 100 kDa und größer α -Dystroglycan entspricht, und eine Bande auf der Höhe von 43 kDa β -Dystroglycan darstellt. Die anderen Banden sind auf unspezifische Bindungen des Serums zurückzuführen. Dies wird in den Spuren 3 und 4 deutlich, die mit den affinitätsgereinigten Antikörpern inkubiert wurden und lediglich Banden entsprechend α - und β -Dystroglycan erkennen lassen. Die Spuren 5 und 6 enthalten erwartungsgemäß keine Banden, da hier die Präimmunseren der Tiere eingesetzt wurden. Zur Kontrolle wurden in Spur 7 und 8 bereits beschriebene Antikörper benutzt, die jeweils spezifisch entweder α -Dystroglycan (α -Dyg sh) oder β -Dystroglycan (8D5) erkennen.

Zusätzlich zu den Dystroglycan exprimierenden Zellen wurden die Antikörper auch auf Lysaten von Gewebeproben getestet. Im Western Blot in Abb. 8B wurde in den Spuren 1 und 3 Proteinextrakt aus Muskelgewebe (Msk) und in den Spuren 2 und 4 Proteinextrakt aus Retinagewebe (Ret) aufgetragen. Wie schon bei den

Zelllysaten markiert ABT1 α -Dystroglycan stärker als ABT2. Beta-Dystroglycan wird von beiden Antikörpern ungefähr gleich gut erkannt. Die zusätzliche Bande bei ca. 60 kDa könnte ein unglykosyliertes, α -Dystroglycan-Fragment sein (Esapa et al., 2002). Die neu generierten Antikörper gegen AB-Dyg-His erkennen somit in der Immunzytochemie und im Western Blot spezifisch α -Dystroglycan und β -Dystroglycan.

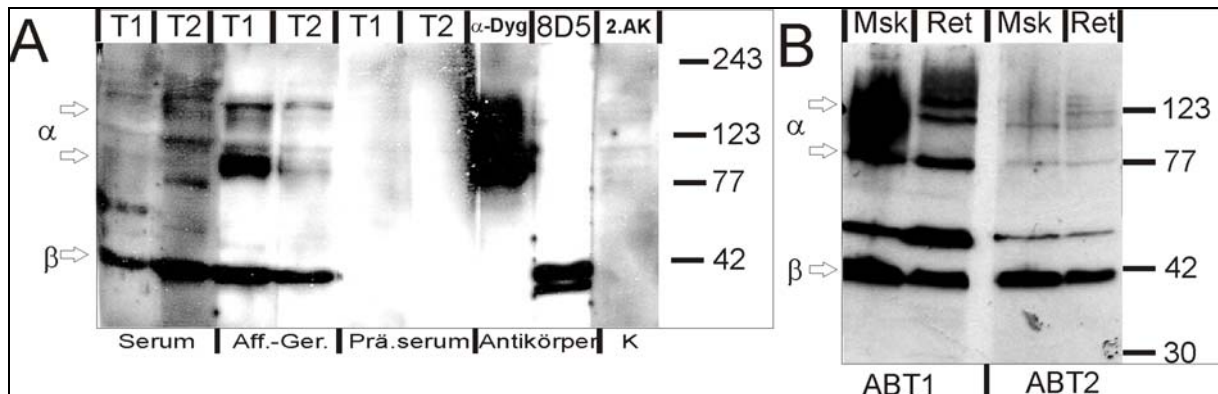


Abb. 8 Western Blots mit Antiseren und Antikörpern gegen Dystroglycan - In A AB-Dyg-His Antiseren und affinitätsgereinigten Antikörper von T1 und T2 (ABT1 und ABT2) auf Zelllysaten von stabil transfizierten HEK Zellen in Spur 1 und 2 erkennen die Seren von T1 und T2 schwach α - und stark β -Dystroglycan, daneben sind einige zusätzliche Banden zu erkennen. Die affinitätsgereinigten Antikörper (Aff.-Ger.) detektieren spezifische Banden bei 100 bis 160 kDa, was ungefähr der Größe von α -Dystroglycan in verschiedenen Glykosylierungsformen entspricht, außerdem eine starke Bande bei 43 kDa, was dem Molekulargewicht von β -Dystroglycan entspricht. Die Blotstreifen „Prä.serum“ wurden mit den entsprechenden Präimmunseren von Tier 1 und 2 behandelt und zeigen keine Banden. Die „Antikörper“-Blotstreifen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen α -Dystroglycan (α -Dyg sh) und β -Dystroglycan (8D5) behandelt. Der Blotstreifen K wurde lediglich mit dem sekundären Antikörper behandelt. Die AB-Antikörper wurden ebenfalls auf Gewebeproben von embryonalem Huhn getestet. Dafür wurden Proteinaufreinigungen von E19 Huhnmuskel (Msk) und -retina (Ret) aufgetragen. Auch hier wird deutlich, daß β -Dystroglycan von beiden Antikörpern ungefähr gleich erkannt wird, während α -Dystroglycan in beiden Geweben von ABT1 besser erkannt wird.

2.3 Eukaryontische Expression von Dystroglycan

Um die korrekte Expression und Spaltung des klonierten Dystroglycan-Konstruktes zu überprüfen, wurde die klonierte cDNA in HEK293 Zellen exprimiert. Zudem konnte durch die rekombinante Expression eine große Menge Protein produziert und somit für spätere biochemische Experimente verwendet werden. Für die eukaryontische Expression wurde der für Dystroglycan kodierende Bereich in den eukaryontischen Expressionsvektor pCMV-Tag1 kloniert. Dieser Vektor hat neben der Möglichkeit der Proteinexpression über einen eukaryontischen Promotor den zusätzlich Vorteil, an die terminalen Enden des Proteins zusätzliche Peptidsequenzen anzufügen. Somit enthält in diesem Falle der N-Terminus von α -Dystroglycan ein FLAG Epitop (DYKDDDDK) und der C-Terminus von

β -Dystroglycan ein c-myc Epitop (EQKLISEEDL; Abb. 9). Gegen beide Epitope sind spezifische Antikörper vorhanden. Dadurch ist es möglich, das exprimierte Protein nicht nur über proteinspezifische Antikörper nachzuweisen, sondern auch über anti-FLAG und anti-c-myc Antikörper. Dies ist sinnvoll, um rekombinantes Protein von eventuell endogen hergestelltem Protein in der Immunzytochemie unterscheiden zu können. Darüber hinaus ermöglicht es die spezifische Aufreinigung des rekombinant exprimierten Proteins, zum Beispiel für Mutationsanalysen.

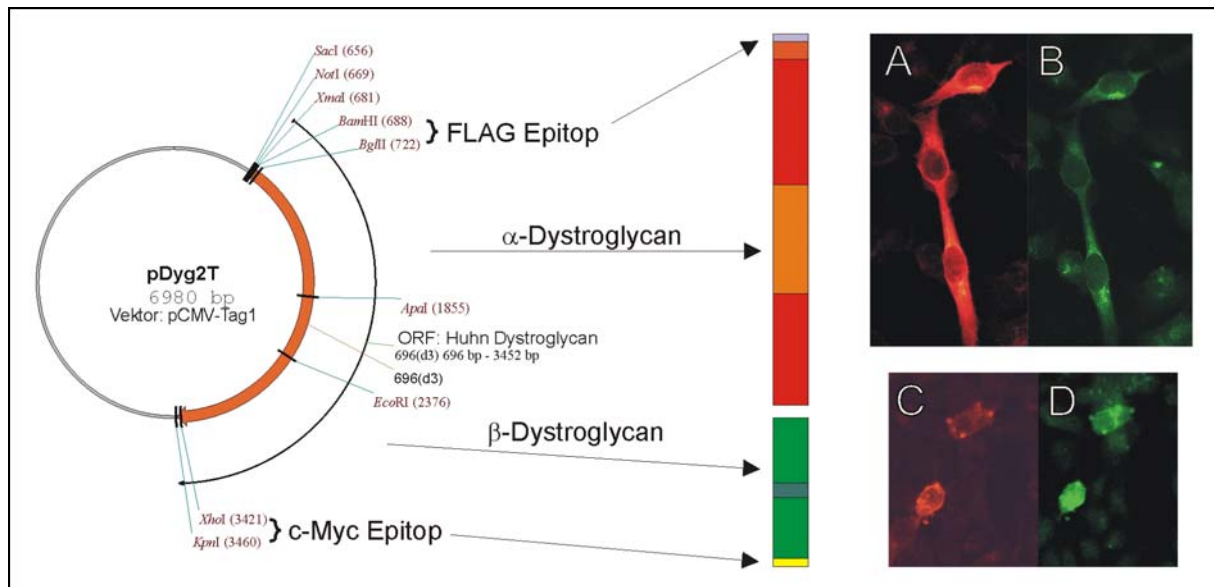


Abb. 9 Eukaryontische Expression von Dystroglycan – Links der Expressionsvektor mit der codierenden Region für α - und β - Dystroglycan und den zusätzlichen Epitopen (FLAG und c-myc). A-D) transiente Transfektionen; die Expression wurde überprüft mit A) anti-c-myc Antikörper, B) ABT1, C) ABT2 und D) anti-FLAG-Antikörper.

Die Expression von Dystroglycan wurde in der Immunzytochemie und im Western Blot mit bereits beschriebenen Antikörpern gegen α -Dystroglycan (Blank et al., 1999) und β -Dystroglycan (Bewick et al., 1993) untersucht. Die Immunzytochemie zeigt deutlich die Expression von Dystroglycan, das sowohl mit proteinspezifischen Antikörpern, als auch mit Antikörpern gegen die zusätzlichen Epitope detektiert werden kann (Abb. 9). Der Western Blot belegt zusätzlich die korrekte posttranslationale Spaltung in α - und β -Dystroglycan (Abb. 8 und Abb. 10).

Transiente Transfektionen führen immer nur zu einer in ihrem prozentualen Anteil schwankenden Subpopulation von transfizierten Zellen. Stabile Transfektionen sind zwar zeitlich aufwendiger, ergeben jedoch eine homogene Gruppe transfizierter Zellen. Dies führt zu einer größeren Gesamtmenge an exprimiertem Protein bei gleicher Zellzahl, zum andern sind *in vitro* Experimente exakter und

reproduzierbarer, da sie auf einem einheitlichen und gleichbleibenden Zelltypus beruhen. Deshalb wurde eine Zelllinie hergestellt, die stabil Dystroglycan exprimiert.

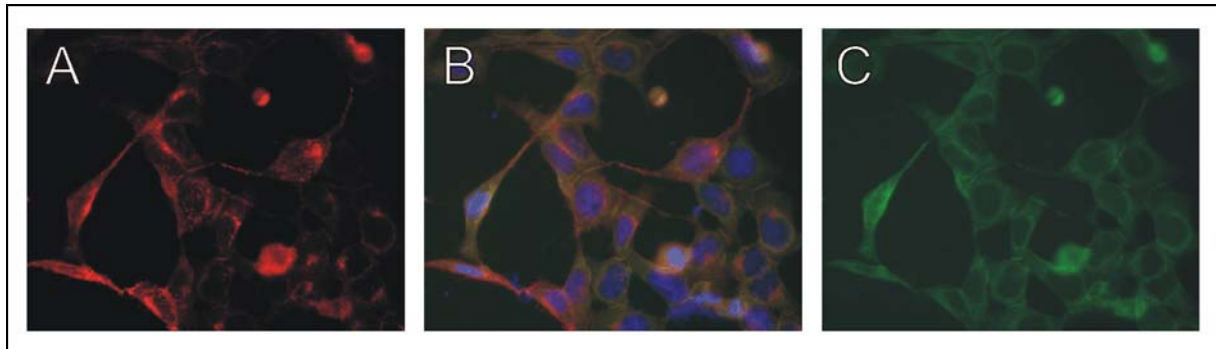


Abb. 10 Immunologische Analyse nach der stabilen Transfektion – A) anti β -Dystroglycan, C) anti α -Dystroglycan, B) Überlagerung aus A) und C) und in blau DAPI-Färbung der Zellkerne, alle Zellen sind positiv für α - und β -Dystroglycan

Die Expression von Dystroglycan wurde immunzytochemisch und mittels Western Blot überprüft. Die Immunzytochemie zeigte eine homogene Zellpopulation Dystroglycan exprimierender Zellen (Abb. 10A-C). Der Western Blot zeigte eine deutliche Bande zwischen 66 und 160 kDa, die α -Dystroglycan mit den verschiedenen Glykosylierungen entspricht, und ebenso eine Bande bei ca. 43 kDa, die β -Dystroglycan entspricht (Abb. 11). Ein Vergleich zwischen Zelllysaten und dem Zellkulturüberstand zeigte, daß α -Dystroglycan sowohl an die Zellen gebunden, also im Zelllysat vorkommt, zusätzlich dazu jedoch auch in löslicher Form im Zellüberstand zu detektieren war. Beta-Dystroglycan war dagegen nur im Zelllysat vorhanden. Bemerkenswert ist, daß im Zelllysat ein großes Spektrum verschiedener α -Dystroglycan Glykosylierungsformen erkannt wird, während im Überstand nur kleinere, d.h. geringer glykosylierte Formen vorkommen. Dies weist auf die glykosylierungsabhängige Adhäsion von α -Dystroglycan an die Zelloberfläche hin.

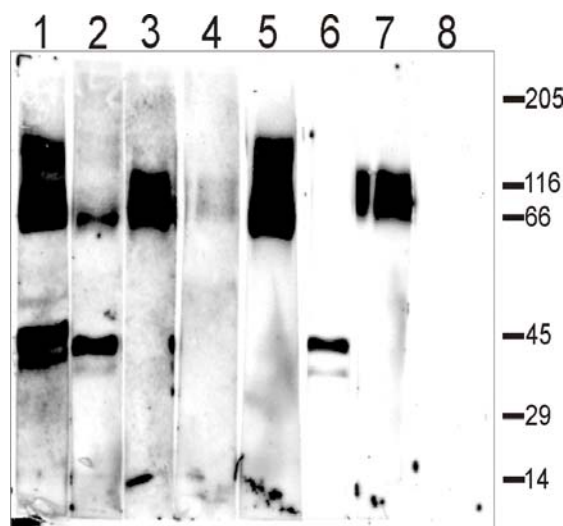


Abb. 11, D) Westernblot mit Lysat 1,2,5,6 und Zellkultur-überstand 3,4,7,8 stabil transfizierter Zellen. Detektion mit ABT1 1,3; ABT2 2,4; anti α -Dystroglycan 5,7; 8D5 6,8. ABT1 und ABT2 detektieren im Lysat beide Dystroglycane. Im Überstand wird dagegen nur α -Dystroglycan erkannt. Auffällig sind die unterschiedlichen α -Dystroglycan formen in Lysat und Überstand.

2.4 Biochemischer Nachweis der Interaktionsinhibition der AB-Dyg-His Antikörper

Mit einer Coimmunpräzipitation sollte gezeigt werden, daß die neu generierten Antikörper die Bindung zwischen α - und β -Dystroglycan inhibieren können. Dazu wurde das rekombinante α -Dystroglycan mittels Immunpräzipitation über an Agarosekügelchen gekoppelte Antikörper gegen das FLAG-Epitop aus dem Lysat stabil transfizierter Zellen isoliert. Die spezifische Aufreinigung von α -Dystroglycan wurde durch Western Blots überprüft und bestätigt. Im Lysat transfizierter Zellen werden α - und β -Dystroglycan erkannt, dagegen ist nach der Immunpräzipitation im Pellet nur noch α -Dystroglycan enthalten. Als Kontrolle wurde dasselbe Experiment mit untransfizierten Zellen durchgeführt. Im Lysat ist hier nur eine geringe Menge von α - und β -Dystroglycan vorhanden. Alpha-Dystroglycan, aber nicht β -Dystroglycan, wird durch die Immunpräzipitation im Pellet angereichert. GAPDH wird weder im Ansatz mit Lysat transfizierter Zellen noch im Kontrollansatz mit dem Lysat untransfizierter Zellen immunpräzipitiert (nicht gezeigt).

Zu diesem an die Agarose-Kügelchen gebundenen α -Dystroglycan wurden nun verschiedene Mengen des bakteriell exprimierten AB-Dyg-His Protein gegeben. Dieses Protein enthält den kompletten extrazellulären Bereich von β -Dystroglycan und kann somit an das rekombinante α -Dystroglycan binden. Nach einer erneuten Präzipitation der Agarose-Kügelchen ist ungebundenes AB-Dyg-His im Überstand und an α -Dystroglycan gebundenes Protein dagegen im Eluat des Pellets zu finden. Die Beeinträchtigung der Bindung durch die Antikörper wird im Mengenverhältnis von ungebundenem AB-Dyg-His im Überstand zu gebundenem Protein im Eluat meßbar. In Abb. 12 sind Ausschnitte der Western Blots zwischen einem Molekulargewicht von 14 und 30 kDa gezeigt.

In Abb. 12A ist als Standard das reine AB-Dyg-His Proteins aufgetragen. Die Detektion mit dem α -Dyg-sh Antikörper zeigt eine starke Bande bei ungefähr 27 kDa. Zur Analyse der Coimmunpräzipitation wurde jeweils der Überstand, der dritte Waschschrift und das Eluat auf das Gel aufgetragen. Bei Zugabe von 1 μ l (380ng) rekombinantes Protein zu α -Dystroglycan ist bei der Inkubation mit 1 μ l Präimmunserum sind 99% des detektierten Proteins im Eluat zu erkennen. Das bedeutet, fast die gesamte Menge an eingesetztem Protein hat an α -Dystroglycan gebunden und wurde co-immunpräzipitiert. Der Überstand des dritten Waschschrifts enthält kein Protein. Bei der Inkubation mit dem ABT2 Antikörper ist das Verhältnis

zwischen Überstand und Eluat dagegen umgekehrt, im Eluat sind nur 10% des detektierten Proteins enthalten. Das bedeutet, der Antikörper hat die Bindung des AB-Dyg-His Proteins an α -Dystroglycan blockiert, so daß es nicht coimmunpräzipitiert werden kann. Das rekombinante Protein bleibt zu 90% im Überstand zurück. Bei einer 5fachen erhöhten (5 μ l; 1,9 μ g) Menge an AB-Dyg-His bindet unter Anwesenheit des Präimmunserums 75 % des detektierten Proteins an α -Dystroglycan. Trotz der Inkubation mit ABT2 werden nun 50% des Proteins coimmunpräzipitiert. Die große Menge an Protein übersteigt die Blockierungsmöglichkeiten von ABT2, so daß mehr Protein trotz Antikörperanwesenheit an α -Dystroglycan binden kann und somit coimmunpräzipitiert wird. Diese Experimente wurden nochmals wiederholt. Dabei wurde das rekombinante Protein im Westernblot mit dem Antikörper ABT1 detektiert. Dieser ist, da er gegen AB-Dyg-His generiert wurde, um ein vielfaches sensitiver. Deshalb konnten auch geringere Proteinmengen im Assay eingesetzt werden. In Abb. 12B sind die Ergebnisse dargestellt. Die Bindungsinhibition ist mit diesem Antikörper schon bei einer Proteinmenge von 0,1 μ l AB-Dyg-His detektierbar. Eine stufenweise Erhöhung der Proteinkonzentration um das 5, 10 und 50fache bei gleichbleibender Antikörpermenge macht die Konkurrenz zwischen Antikörper und Protein deutlich. Bei zunehmender Proteinmenge wird immer mehr Protein trotz der Anwesenheit des Antikörpers coimmunpräzipitiert.

Auffällig ist, daß bei der Detektion mit dem ABT1 Antikörper unterhalb der Hauptbande eine zusätzliche schwächere Bande bei ca. 17 kDa sichtbar wird. Dabei handelt es sich um ein Abbauprodukt des AB-Dyg-His Proteins.

Die Coimmunpräzipitation zeigt, daß der Antikörper ABT2 die Interaktion von α -Dystroglycan mit dem Fusionsprotein hemmt. Dies ist konsistent mit der Annahme, daß Antikörper gegen die Bindungsdomänen von α - und β -Dystroglycan deren Interaktion inhibieren.

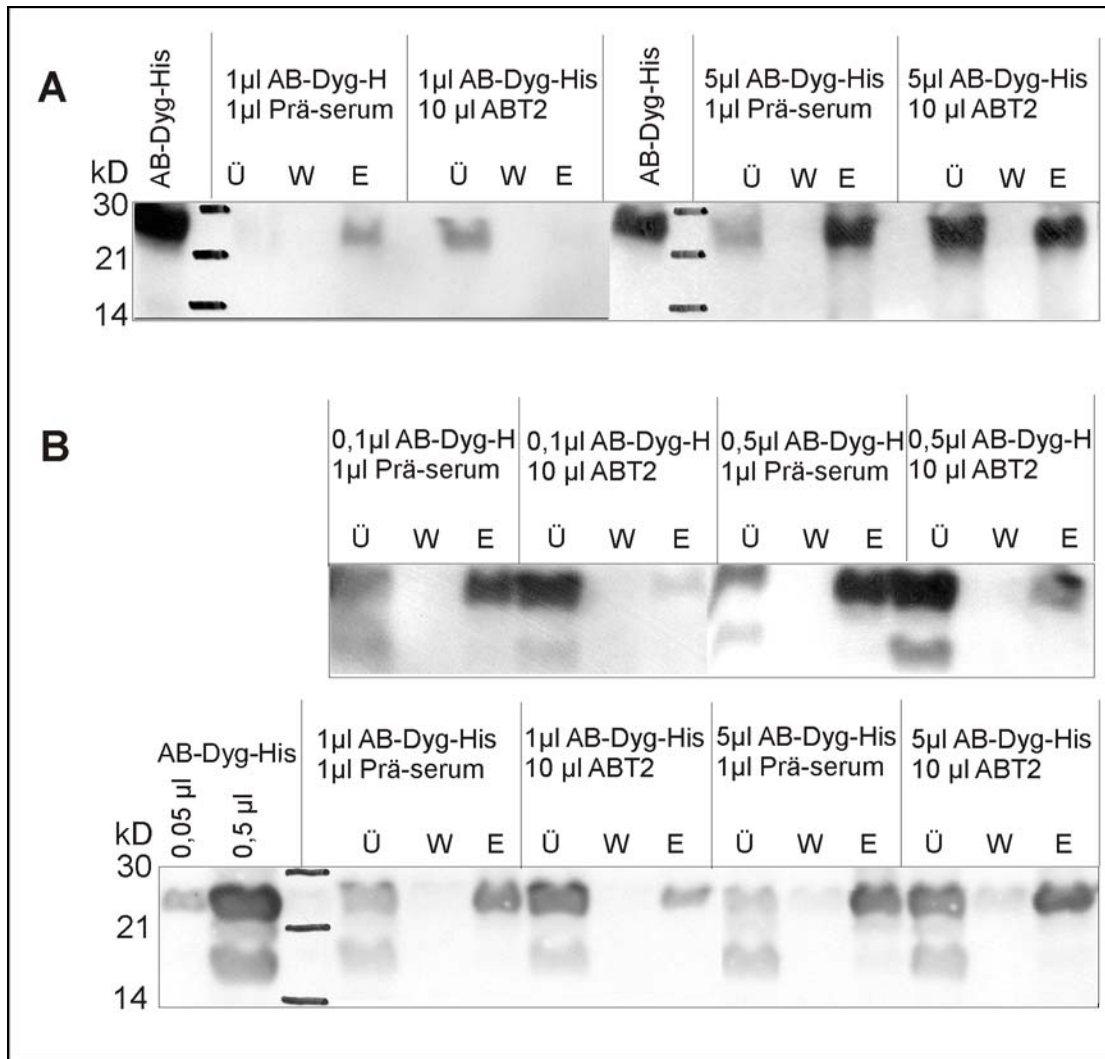


Abb. 12 Co-Immünpräzipitation von α -Dystroglycan und AB-Dyg-His unter Einfluß des ABT2 Antikörpers – Die Abbildungen zeigen jeweils Ausschnitte aus Western Blots zwischen 14 und 30 kDa. Die Co-Immünpräzipitation wurde mit gleichbleibenden Mengen von an Anti-FLAG Agarose-Kügelchen gebundenem α -Dystroglycan durchgeführt, die Mengen an Präimmunsrum oder ABT2 Antikörper wurden ebenfalls konstant gehalten. Die Menge an rekombinantem AB-Dyg-His Protein wurde entsprechend der Angaben (1 µl entspricht 380 ng Protein) verändert. Auf das SDS-PA-Gel wurden jeweils Überstand (Ü), Waschschritt (W) und Eluat (E) aufgetragen. In **A** wurde AB-Dyg-His mit dem α -Dyg sh Antikörper detektiert. Dabei wird deutlich, das bei Inkubation von α -Dystroglycan mit AB-Dyg-His unter Anwesenheit von Präimmunsrum der größte Teil des Proteins an α -Dystroglycan bindet und somit auch präzipitiert wird. Dagegen verhindert die Anwesenheit von ABT2 diese Bindung und die größte Menge von AB-Dyg-His verbleibt im Überstand. In **B** wurde mit dem ABT1 Antikörper detektiert. Dieser ist sensitiver und erkennt schon geringere Proteinmengen. Diese Detektion zeigt dasselbe Ergebnis. Zusätzlich wird eine zweite Bande erkannt, die sich als Abbauprodukt von AB-Dyg-His herausstellt, da es Antikörperabhängig an α -Dystroglycan binden kann, von dem α -Dyg sh Antikörper nicht erkannt wird. Es handelt sich daher um ein N-terminal verkürztes Abbauprodukt. Diese Biochemische Analyse zeigt, daß der ABT2 Antikörper die Bindung von α - und β -Dystroglycan beeinflussen kann.

2.5 Auswirkungen der Antikörperinjektion auf die Entwicklung der Huhnretina

Nachdem die Interaktion zwischen α - und β -Dystroglycan durch die Antikörper *in vitro* gehemmt werden konnte, sollte durch *in ovo* Injektionen der affinitätsgereinigten Antikörper und der Fab-Fragmente diese Interaktion auch *in vivo* gestört werden. Für die Injektion der Antikörper in das rechte Auge von Hühnerembryonen wurde das Entwicklungsstadium E6 gewählt. In diesem Stadium ist das Auge bereits gut entwickelt, die Retina jedoch noch weitgehend undifferenziert. Sie besteht aus zwei Schichten. Zum Einen der ventrikulären Zone, die aus radiären proliferierenden neuroepithelialen Vorläuferzellen besteht, aus denen sowohl die Müller Glia-Zellen als auch alle neuronalen Zelltypen hervorgehen. Zum Anderen der vitrealen Mantelzone, welche die migrierenden und differenzierenden Neuroblasten enthält. (Mey und Thanos, 1992). Der DAG ist zu dieser Zeit lediglich im Bereich der inneren Grenzmembran, an der Kontaktstelle der radiären Zellen und der Basalmembran konzentriert (Blank et al., 2002).

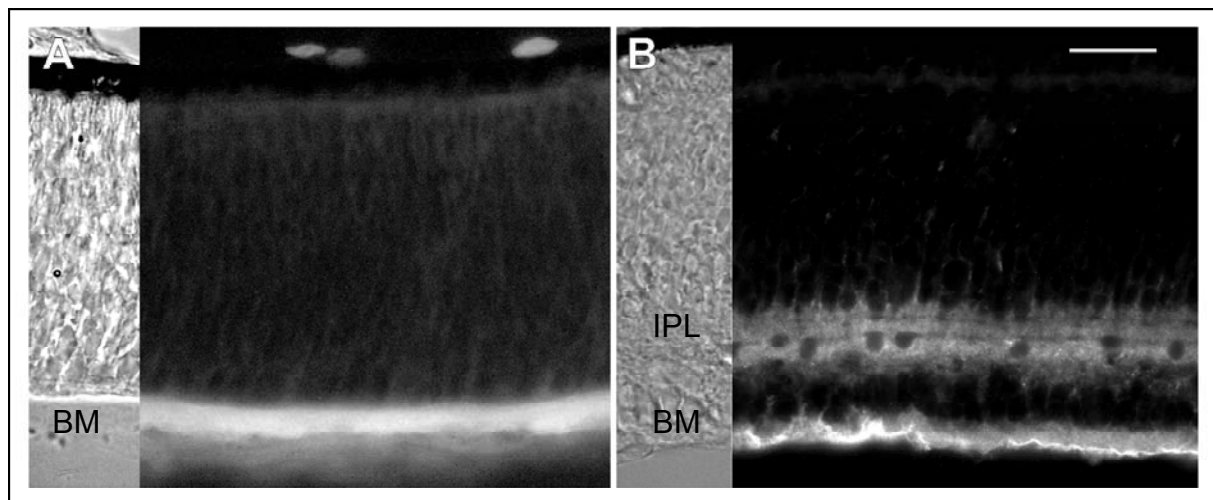


Abb. 13 Lokalisation der Fab-Fragmente nach der Injektion – Detektion der Fab-Fragmente durch 2. Antikörper; in A) E6 Retina: hier sind die Fab-Fragmente ausschließlich an der Basalmembran (BM) lokalisiert; in B) E10 Retina: hier wurden die Fab-Fragmente außer in der Basalmembran auch in der sich entwickelnden IPL detektiert. Der Skalierungsbalken entspricht 20 μ m.

Einmalige Injektionen zum Zeitpunkt E6 in das Auge der Embryonen zeigten 24 Std nach der Injektion keine sichtbaren Veränderungen der Morphologie der Retina (nicht gezeigt). Eine Anfärbung der injizierten und gebundenen Fab-Fragmente durch sekundäre Antikörper zeigt jedoch deutlich, daß die Fab-Fragmente im Stadium E6 spezifisch an Dystroglycan in der Basalmembran binden. Zu späteren Stadien sind die injizierten Fab-Fragmente auch im Bereich der sich entwickelnden

IPL lokalisiert (Abb. 13). Die Antikörper sind also in der Lage, nach der intraoculären Injektion in das Retinagewebe einzudringen und an natives Dystroglycan zu binden.

Die Injektionen wurden drei Tage lang alle 24 Stunden durchgeführt. Nach vier Tagen (E10) wurden die Augen entnommen, fixiert, geschnitten und mikroskopisch untersucht. Die Retinae behandelter Embryonen wiesen schon bei lichtmikroskopischer Analyse ungewöhnliche Verdickungen auf (Abb. 14).

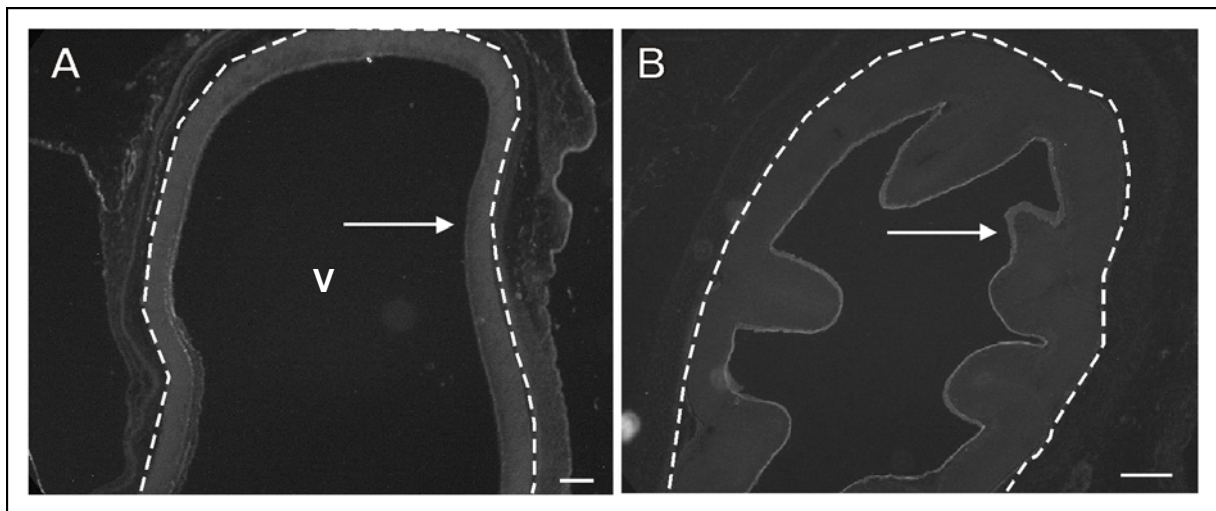


Abb. 14 Übersichtsaufnahme der embryonalen Huhnretina nach Injektion - in A) von Präimmenserum; in B) von ABT2 Fab-Fragmenten. Deutlich werden die Unterschiede in der Retinastruktur (innerhalb der weißen Markierung). Nach Präimmenseruminjektion hat die Retina eine gleichförmige, einheitliche Morphologie, dagegen zeigen sich nach ABT2 Injektion deutliche Veränderungen, die retinalen Verdickungen (Pfeil). (V, Glaskörper) Der Skalierungsbalken entspricht 150µm.

Im Gegensatz zu Retinae, in die als Kontrolle PBS, Präimmenserum oder Kontrollantikörper injiziert wurden, zeigte die Retina an einigen Stellen auffällige Verdickungen, die in den vitrealen Raum hineinreichten. Diese Verdickungen waren über die gesamte Retina verteilt, jedoch am häufigsten im ventro-nasalen und ventro-temporalen Bereich der Retina zu finden. Dies entspricht dem Bereich, der gegenüber der Injektionsstelle lokalisiert ist. Das neurale Gewebe liegt in den Verdickungen gleichmäßig am scleralen Bindegewebe an, ist jedoch in den Glaskörper hinein verdickt. Die Zellen innerhalb der Verdickungen besitzen nicht mehr die typische radiäre Ausrichtung wie in der Kontrollretina und nicht betroffenen Bereichen der injizierten Retinae. Die Verdickungen unterscheiden sich untereinander in ihrer Größe, der Ausdehnung des Übergangsbereichs zwischen normaler Retinastruktur und Verdickung und im Grad der zellulären Veränderung innerhalb der retinalen Verdickung. Eine eingehendere Analyse zeigte, daß die Entstehung der Verdickungen progressiv verläuft. Die Größe der Wucherungen nahm mit der Anzahl der Injektionen und der Inkubationsdauer zu. Dies führt bis hin zur

Auflösung der kompletten retinalen Struktur und des Zellverbandes 5 Tage nach Beginn der Injektionen (nicht gezeigt). Die Detailanalysen zu einzelnen Zelltypen und der Proliferation innerhalb der Wucherungen wurden an solchen Bereichen dokumentiert und ausgewertet, in denen die Verdickungen zum einen deutlich ausgebildet waren, die Zellen jedoch noch nicht den Kontakt zueinander verloren hatten.

Der DAG ist in frühen Stadien der Retinaentwicklung ausschließlich an der inneren Grenzmembran in den Endfüßen der radiären Zellen lokalisiert (Blank et al., 2002). Um zu überprüfen, ob die Antikörperinjektionen Auswirkung auf die Basalmembran oder die Lokalisation von Dystroglycan an der Basalmembran haben, wurden Färbungen an Retinae, in denen sich nach der Injektion Verdickungen ausgebildet hatten, durchgeführt. Zum Einen mit Antikörpern gegen Agrin, einer Komponente der Retinabasalmembran (Köger und Mann, 1996), zum Anderen mit Antikörpern gegen β -Dystroglycan. In den nicht-betroffenen Bereichen der Retina markieren die anti-Agrin Antikörper die Basalmembran (Abb. 15A (Pfeilspitze); C; E). Beta-Dystroglycan ist in diesen Bereichen in den Endfüßen der radialen Zellen konzentriert und erscheint lichtmikroskopisch mit Agrin kolokalisiert. (Abb. 15B (Pfeilspitze); D; F). In Bereichen der retinalen Verdickungen markiert der anti-Agrin Antikörper ebenfalls die Basalmembran (Abb. 15A (Pfeil); G; I). Im Gegensatz zu den unveränderten Bereichen der Retina erscheint die Basalmembran hier breiter und einige Zellkörper liegen innerhalb der Basalmembran. Die Färbung gegen β -Dystroglycan ist in den Verdickungen dagegen nicht mehr an der Basalmembran vorhanden (Abb. 15B (Pfeil); H; J). Dies bedeutet, daß durch die Injektion der Antikörper β -Dystroglycan entweder nicht mehr in den Endfüßen der radialen Zellen subzellulär konzentriert ist, oder aber die Endfüße sind nicht mehr an die Basalmembran adhärirt sind.

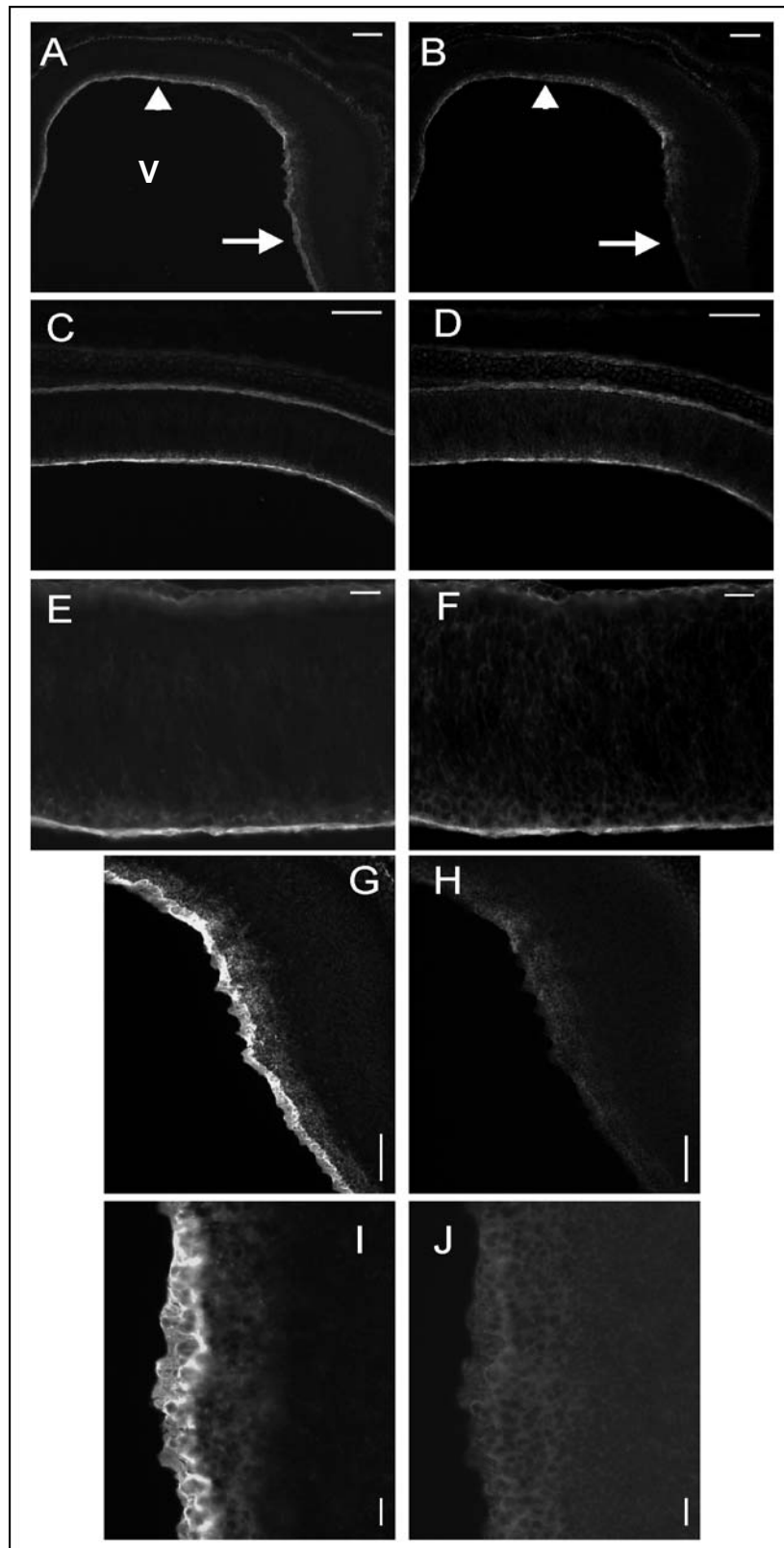


Abb. 15 Co-lokalisierung von Agrin und β -Dystroglycan nach Antikörperinjektion – A,C,E,G,I) Agrin; B,D,F,H,J) β -Dystroglycan ; A,B) Übersichtsaufnahme der Retina mit normaler Retinastruktur (Pfeilspitze) und retinaler Verdickung (Pfeil); C,D,E,F) Vergrößerung der normalen Bereiche; G,H,I,J) Vergrößerung der retinalen Verdickung; Agrin ist in allen Bereichen der Retina an der Basalmembran lokalisiert, Dystroglycan fehlt in der retinalen Verdickungen. (V, Glaskörper) Der Skalierungsbalken entspricht in A,B,C,D,G,H) 50 μ m und in E,F,J,I) 20 μ m

Um zu untersuchen, ob sich die Zellmorphologie der radiären neuroepithelialen Vorläuferzellen innerhalb der Verdickungen verändert hat, wurden Immunfärbungen gegen Vimentin durchgeführt. Vimentin ist ein gewebespezifisches und entwicklungsabhängig reguliertes Intermediärfilamentprotein. Antikörper gegen Vimentin markieren sowohl Müller Glia-Zellen als auch radiale Zellen (Seigel et al., 1996). Die immunzytochemische Untersuchung der Retina von Kontrolltieren mit Antikörpern gegen Vimentin zeigte in der Übersicht eine einheitliche Struktur der Retina und eine radiäre Anordnung der RZ (Abb. 16A). Vor allem bei höherer Vergrößerung wurde die radiäre Ausrichtung der Filamente deutlich (Abb. 16C). Die Retina nach Antikörperbehandlung (Abb. 16B) war deutlich verdickt. Die Vimentinmarkierung zeigte eine Auflösung der radiären Anordnung der RZ. Bei höherer Vergrößerung war auffällig, daß die Zellen eine deutlich abgerundete Form hatten und nicht mehr die gesamte Retina durchspannten (Abb. 16D). Dies ist ein Hinweis darauf, daß die radiären Zellen durch die Antikörperperturbation und den eventuell daraus folgenden fehlenden Kontakt der Endfüße zur Basalmembran ihre Morphologie verändern. Diese Veränderungen der RZ Morphologie sind in Abb. 16E schematisch dargestellt.

Um zu untersuchen, ob die morphologisch veränderten RZ noch in der Lage sind, den Teilungszyklus zu durchlaufen, und um auszuschließen, daß die oben geschilderten Beobachtungen auf ein Absterben der RZ zurückzuführen sind, wurden Markierungen mit BrdU durchgeführt. Die Applikation von BrdU und eine darauffolgende Immunfärbung mit einem anti-BrdU Antikörper ermöglichen die Identifizierung von Zellen, die nach der BrdU-Zugabe den Teilungszyklus durchschritten und das Nukleotidanalogen in die DNA eingebaut haben. Die BrdU-positiven Zellkerne in der Kontrollretina waren gleichmäßig, ungefähr in der Mitte zwischen skleraler und vitrealer Grenze lokalisiert und hatten eine spindelförmige Morphologie (Abb. 17A). Innerhalb der retinalen Verdickungen waren viele Zellkerne durch die BrdU-Färbung markiert. Die Zellen hatten in den drei Stunden der BrdU-Inkubation den Zellzyklus durchlaufen, sind also in der Lage sich zu teilen. Die Zellkerne zeigten jedoch eine veränderte Lokalisation innerhalb der Retina. Sie lagen nun zu einem erhöhten Anteil im skleralen, ventrikulären Bereich der Retina. Die Morphologie der markierten Zellkerne war ebenso verändert wie die Zellform der radiären Zellen, also abgerundet und nicht mehr spindelförmig (Abb. 17B).

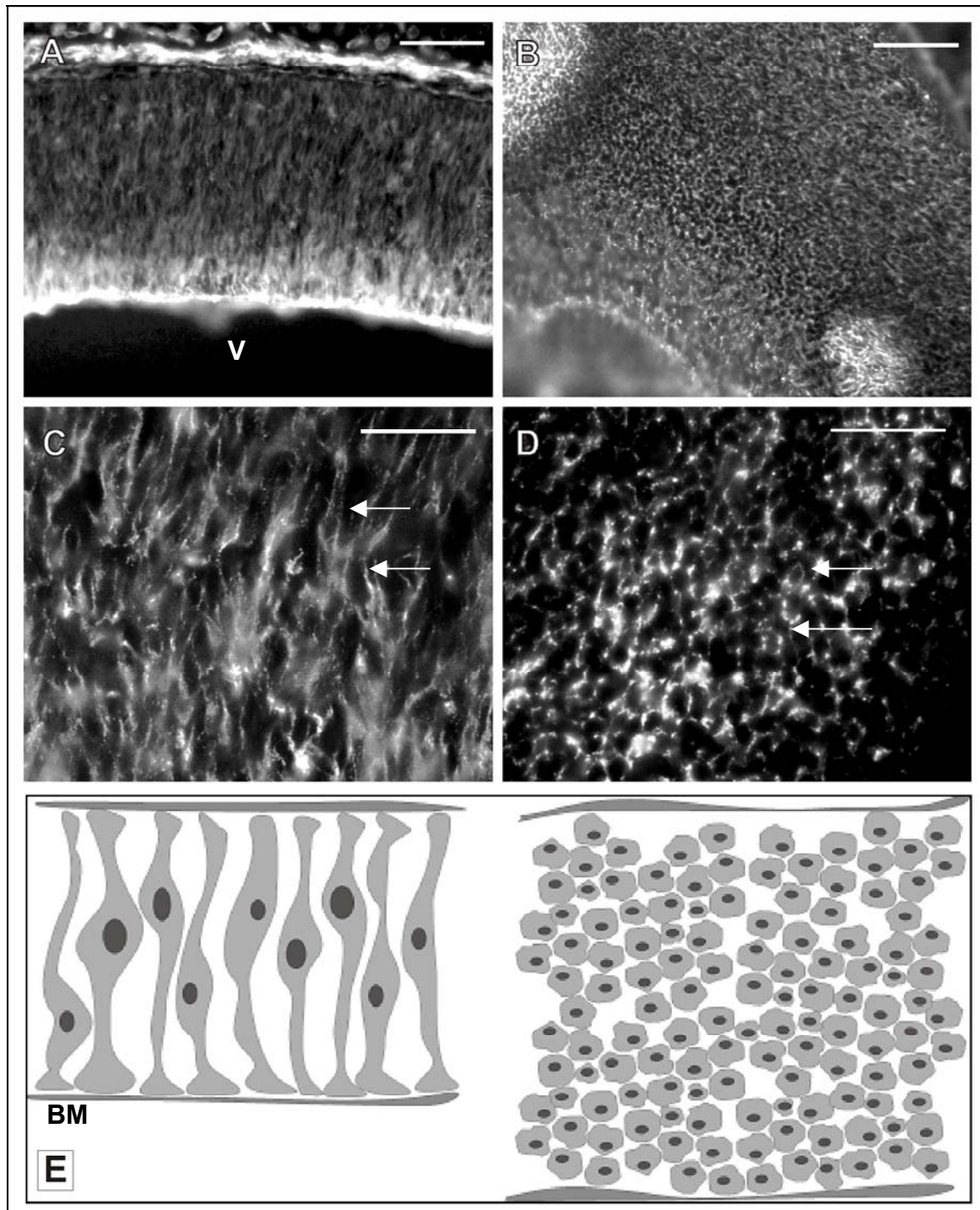


Abb. 16 Vergleich der Vimentinmarkierung zwischen Kontrolle und Verdickung – A,C) Kontrolle; B,D) Verdickung; C,D) Vergrößerung von A,B); E) Schematische Darstellung der Situation; In der Kontrolle zeigt die Vimentinfärbung die langgestreckte, radiäre Morphologie der RZ, die gestreckten Filamente sind sichtbar (Pfeile in C) im Gegensatz ist die Form der RZ in den Verdickungen abgerundet (Pfeile in D). Dadurch erscheint die Struktur der Retina ungeordnet (B). (BM; Basalmembran; V, Glaskörper) Der Skalierungsbalken entspricht in A,B) 50µm in C,D) 20µm.

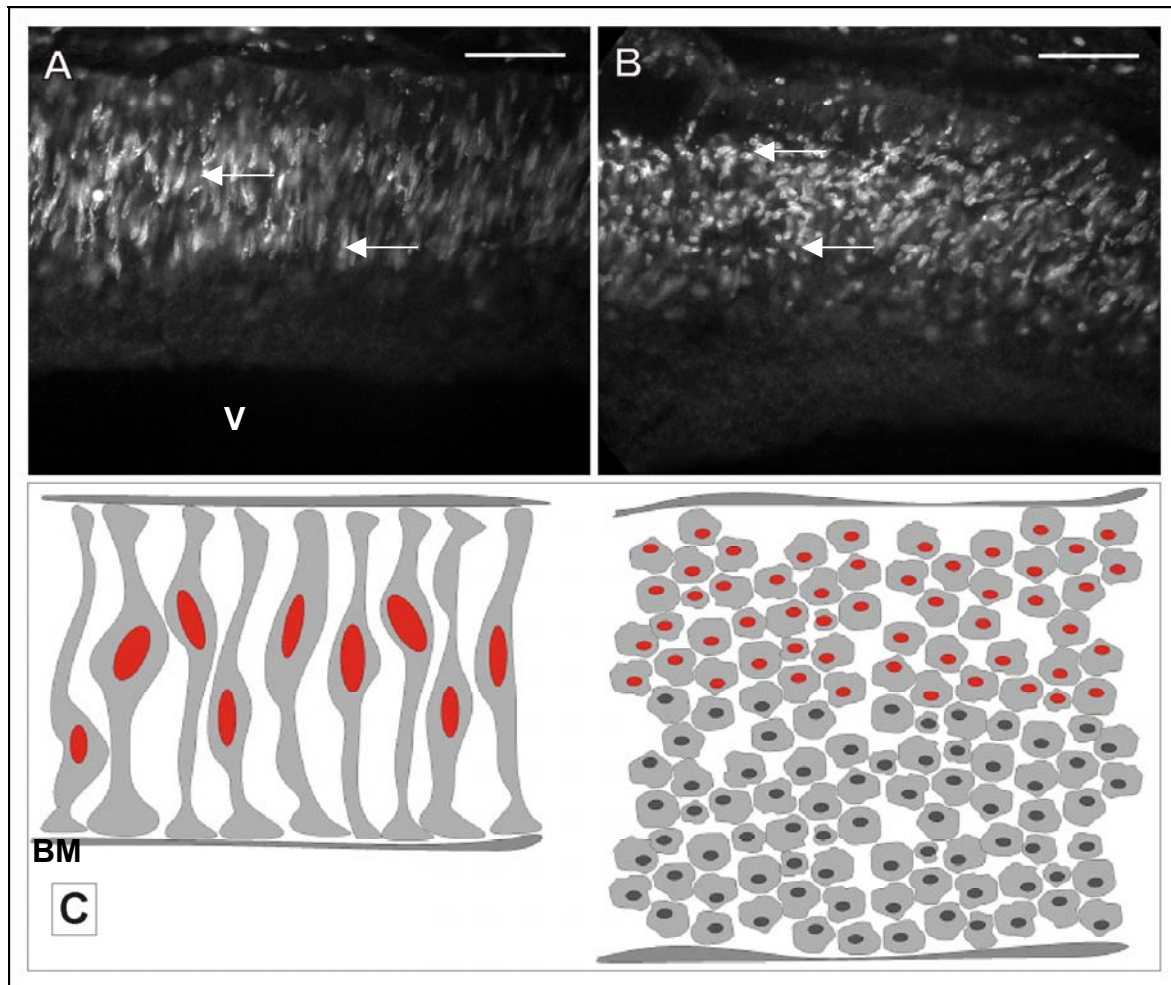


Abb. 17 Vergleich der BrdU-Markierung zwischen A) Kontrolle und B) Verdickung – Die markierten Zellkerne (rot in C) haben in der Kontrolle eine Spindel-Form (Pfeil in A) und sind im medianen Bereich der Retina lokalisiert. In den Verdickung findet immer noch Proliferation statt, die Kerne haben jedoch eine runde Form (Pfeil in B) und befinden sich eher im skleralen Bereich der Verdickung. In C) ist die Situation in einer Schemazeichnung dargestellt (BM, Basalmembran; V, Glaskörper). Der Skalierungsbalken entspricht 50µm.

Um zu analysieren, ob sich die Anzahl der markierten Zellen durch die Injektionen verändert, wurde die Zahl der markierten Zellkerne pro Retina-Segment (100µm) ermittelt. Die Anzahl der BrdU-positiven Zellkerne war in den Bereichen der Verdickungen fast doppelt so hoch wie in gleichen Bereichen der Kontrollretina (Abb. 18). Es fand demnach innerhalb der Verdickungen eine erhöhte Proliferation statt.

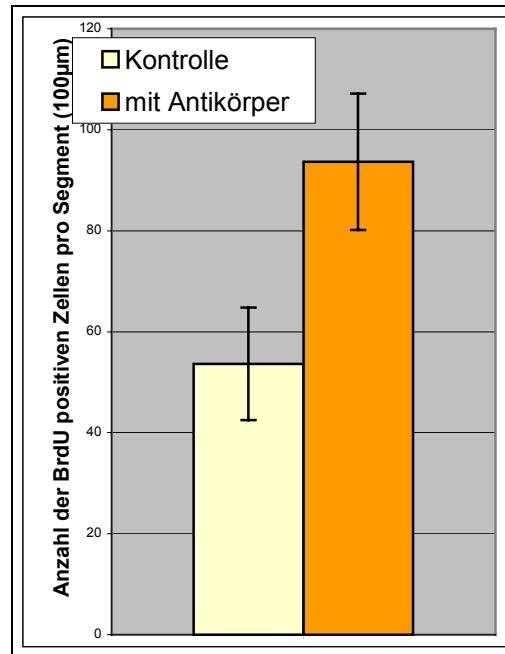


Abb. 18 Quantitative Analyse der Proliferation - Vergleich der BrdU markierten Zellkerne pro Retinaabschnitt (Segment) zwischen Kontrolle und Verdickung. Dargestellt sind die durchschnittlichen Werte pro 100µm Segment, für die Kontrolle 53 und Verdickung 93, zusätzlich sind die Standardabweichungen dargestellt mit +/-11,1 in der Kontrolle und +/-13,5 in der Verdickung; N= 3; Students t-Test: $p < 0,05$

Nach der Teilung werden die postmitotischen Zellen entweder erneut zu radiären neuroepithelialen Vorläuferzellen, oder aber die neu gebildeten Zellen differenzieren zu Müller Glia Zellen oder Nervenzellen. Postmitotische Neuroblasten migrieren entlang der RZ von der ventrikulären Zone in die entsprechende zelltypspezifische Position in der Mantelzone. Um zu untersuchen, ob die veränderte Morphologie und Teilungsrate der radiären Vorläuferzellen in den Verdickungen einen Einfluß auf die Zellentwicklung und Migration haben, wurde Immunfärbungen gegen Markerproteine differenzierter Zellen durchgeführt.

AChE ist ein Marker für differenzierte Neurone in der Retina (Layer; 1991). AChE positive Zellen bildeten in der normal entwickelten Kontrollretina eine definierte Schicht am vitrealen Rand der Retina (Abb. 19A, C ;Pfeil). Nach der Antikörperinjektion markierten die Antikörper gegen AChE in den retinalen Verdickungen zum Einem wesentlich mehr differenzierte Zellen, zum Anderen nahmen diese, im Gegensatz zur Kontrolle, eine breitere Schicht ein. Sie befanden sich jedoch ebenfalls im eher vitrealen Bereich der Retina (Abb. 19B, D; Pfeil).

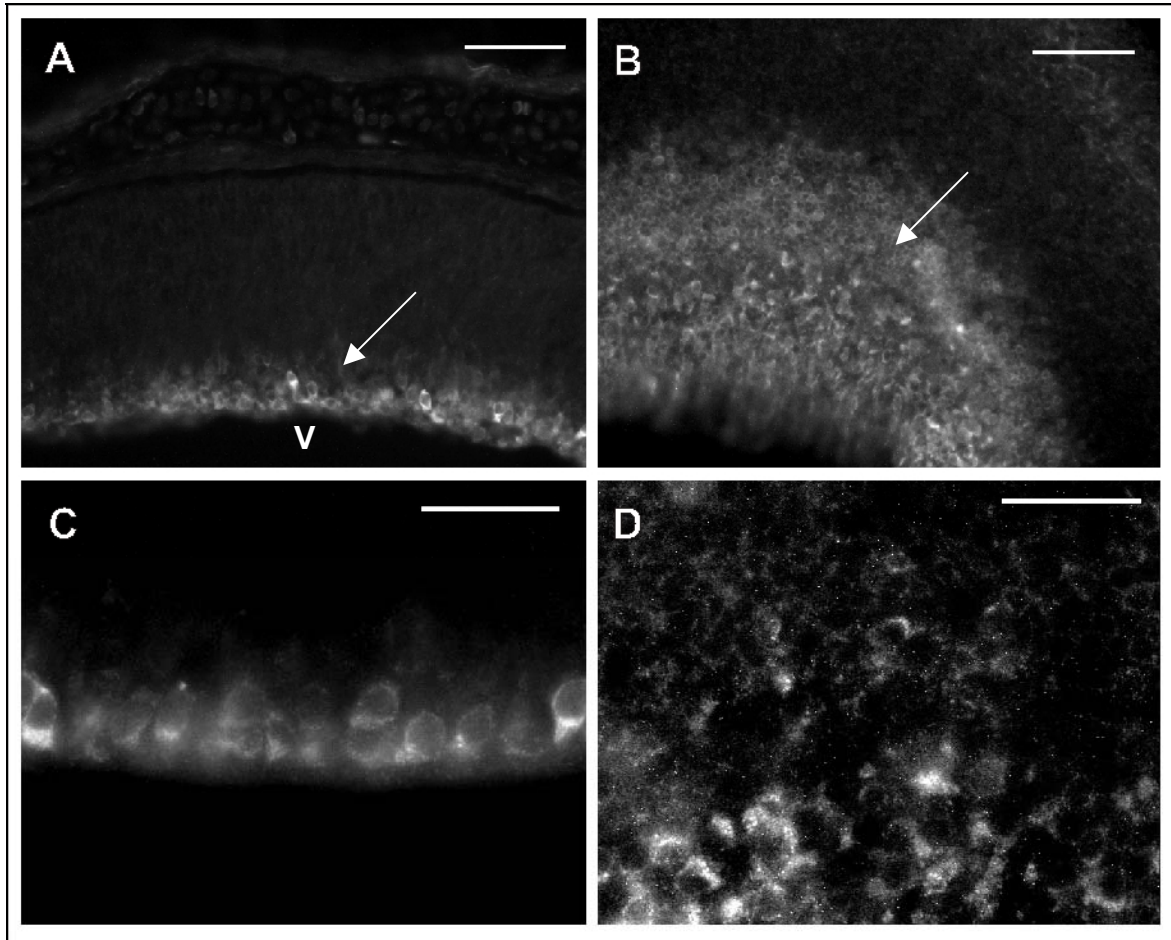


Abb. 19 Vergleich der AChE-markierung zwischen Kontrolle und Verdickung – A,C) Kontrolle; B,D) Verdickung; C,D) Vergrößerung von A,B) In der Kontrolle wandern die differenzierten Zellen zum vitrealen Bereich (V; Glaskörper) der Retina und bilden dort eine dünne Schicht (Pfeil in A). Dagegen sind in den Verdickungen wesentlich mehr Zellen differenziert, diese nehmen einen weiteren Bereich ein und bilden keine klare Schichtung (Pfeil in B). Der Skalierungsbalken entspricht in A,B) 50 μ m in C,D) 20 μ m.

Während AChE ein Marker aller früh differenzierten Zellen innerhalb der Retina ist, markiert eine Immunfärbung gegen Thy-1 nur differenzierte retinale Ganglienzellen (RGZ; Barnstable und Dräger, 1984). Diese bildeten in der normalen Retina am innersten vitrealen Rand der Retina eine dünne Schicht. (Abb. 20A, C). Die Antikörperinjektion führte zu einer stark erhöhte Anzahl von RGZ und einer verbreiterten RGZ-Schicht innerhalb der Retina (Abb. 20B, D). Die Differenzierung zu RGZ war demnach nicht gestört, sondern es zeigte sich übereinstimmend mit der AChE-Färbung eine signifikant erhöhten Anzahl an differenzierten Neuronen. Dementsprechend war die Retinaganglienzellschicht verbreitert.

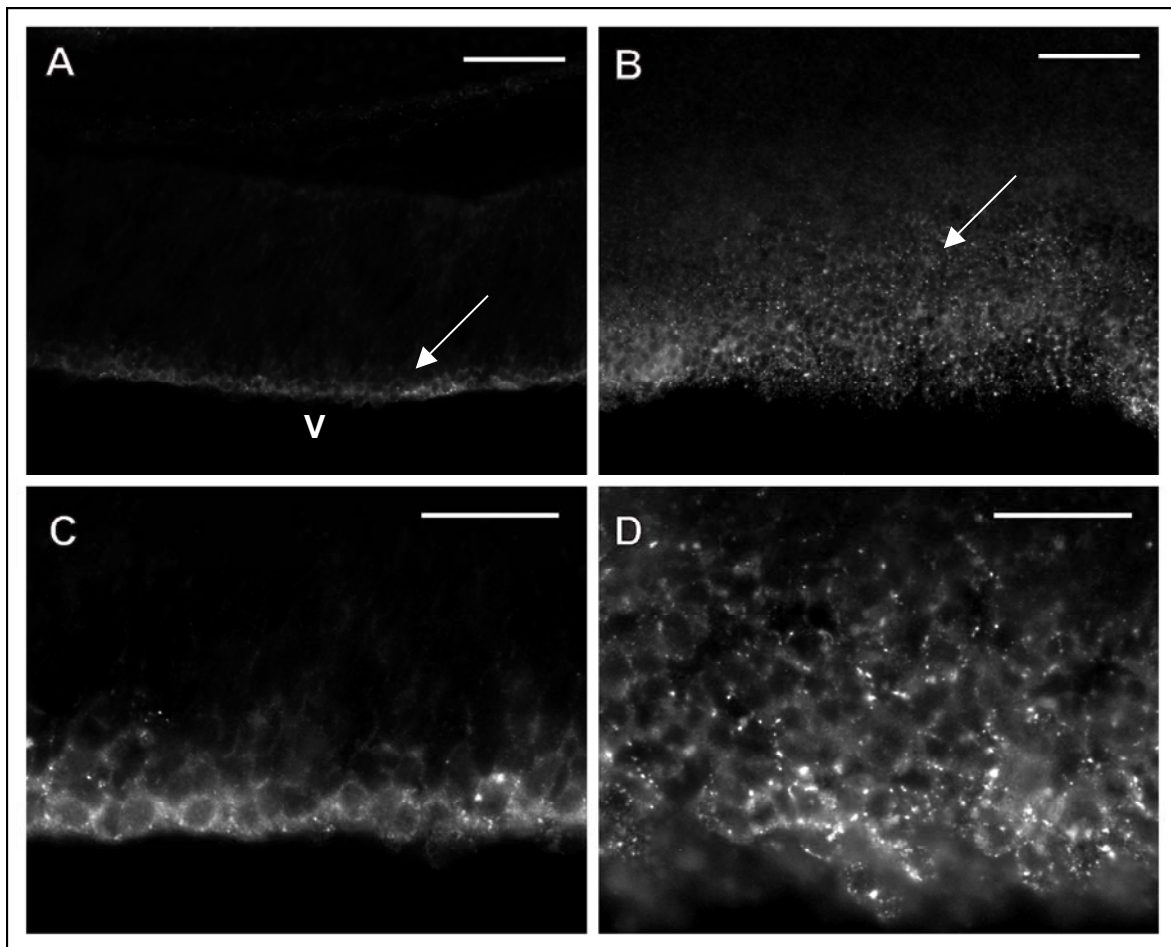


Abb. 20 Vergleich der Thy-1-markierung zwischen Kontrolle und Verdickung – A,C) Kontrolle; B,D) Verdickung; C,D) Vergrößerung von A,B) In der Kontrolle wandern die Retina Ganglienzellen zum vitrealen Bereich (V; Glaskörper) der Retina und bilden dort eine dünne Schicht (Pfeil in A). Dagegen sind in den Verdickungen wesentlich mehr Zellen zu Retina Ganglienzellen differenziert, diese nehmen einen weiteren Bereich ein und bilden keine klare Schichtung (Pfeil in B). Der Skalierungsbalken entspricht in A,B) 50µm und in C,D) 20µm.

Die RGZ-Axone bilden in der Retina Faszikel und laufen in Axonbündeln unterhalb der Basalmembran zum Sehnerv. Ng-CAM ist ein Marker für Axone (Kuhn et al., 1991). Die Immunfärbung gegen Ng-CAM zeigte in der Kontrolle die Lokalisation der Axonbündel in einer schmalen Linie in der Faserschicht entlang der Basalmembran. In höherer Vergrößerung werden die kompakten Faszikel der Axone sichtbar (Abb. 21A, C). Nach Antikörperbehandlung waren diese Axonbündel in einem breiteren Bereich zu finden. Die Axone kamen jedoch nun aus tieferen Bereichen der Retina, da die Lage der Thy-1 positiven RGZ auch in tiefere Bereiche der Retina hineinreichte (Abb. 21B, D). Die Axone bildeten jedoch immer noch Faszikel und wuchsen entlang der vitrealen Seite der Retina. Die Faszikulation und das Axonwachstum schienen durch die Antikörperbehandlung nicht beeinflusst zu werden.

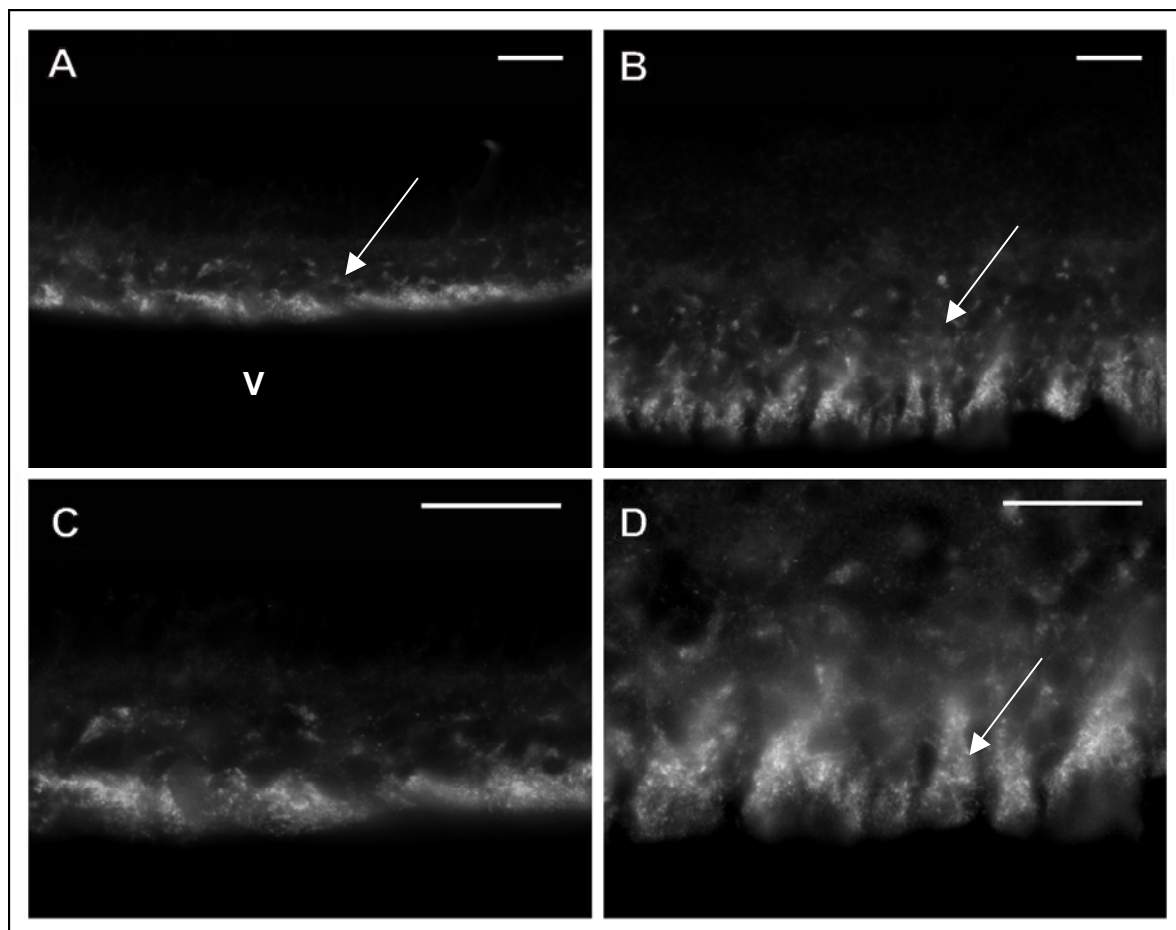


Abb. 21 Vergleich der Axone zwischen Kontrolle und Verdickung anhand einer Ng-CAM-Färbung – In der Kontrolle A,C) bilden die RGZ Axone aus die faszikulieren und als Axonbündel an der Basalmembran entlangwachsen (Pfeil in A), dies ist auch in den Verdickungen der Fall jedoch bilden hier die Axonbündel ein breiter Schicht innerhalb der Retina (Pfeil in B). Auch in den retinalen Verdickungen faszikulieren die Axone und wachsen in Bündeln (Pfeil in D). (V; Glaskörper) Der Skalierungsbalken entspricht in A,B) 50µm und in C,D) 20µm.

3 Diskussion

Dystroglycan ist die zentrale Komponente des DAG und daher essentiell für die Funktion des DAG. Im Gegensatz zur Muskulatur, wo der DAG durch die Verbindung von EZM und Zytoskelett zur Stabilität der Muskelfasern beiträgt, ist seine Funktion im ZNS bisher vollkommen unbekannt. In dieser Arbeit wurde die Dystroglycan-Sequenz von Huhn ermittelt und Antikörper gegen die Interaktionsdomänen von α -Dystroglycan und β -Dystroglycan hergestellt. Mit den Antikörpern wurde die Interaktion zwischen den beiden Proteinen erst *in vitro* und daraufhin auch *in vivo*, während der Entwicklung der Retina, inhibiert. Die Ergebnisse zeigen, daß eine Inhibition der Dystroglycan–Interaktion zu morphologischen Veränderungen in Teilen der embryonalen Huhnretina führt. Es entwickeln sich retinale Verdickungen, in denen die radiären Zellen ihre langgestreckte Form verlieren und sich abrunden. Zudem kommt es an diesen Stellen zur Hyperproliferation der Zellen. Die Differenzierung der postmitotischen Zellen zu Neuronen findet weiterhin statt, aber aufgrund der Hyperproliferation bilden sich wesentlich mehr Neurone. Ebenso wie in der Kontrollretina sind diese Neurone auch im vitrealen Teil der Retina lokalisiert und entsenden Axone, allerdings sind die Neurone nicht mehr in der Lage, die geordnete Schichtung der Retina aufzubauen. Somit induziert die Interaktionsinhibition von Dystroglycan die Morphologieveränderung der radiären Vorläuferzellen und dies wirkt sich auf den Teilungszyklus der RZ, die Migration sowie Lokalisation der differenzierten Neurone aus.

3.1 Klonierung von Dystroglycan und Charakterisierung der Antikörper

Die Klonierung von Huhn-Dystroglycan ergab eine Sequenz, die für ein 895 Aminosäuren langes Protein codiert. Der Vergleich mit der Dystroglycan-Sequenz aus anderen Spezies zeigt Bereiche sehr hoher Homologien. Einige putative O-Glycosylierungsstellen in der zentralen Mucin-ähnlichen Domäne, sowie zwei putative N-Glycosylierungsstellen (AA 140 NGSY; AA 662 NNLT) sind konserviert. Dagegen sind zwei N-Glycosylierungsstellen in Maus und Mensch vorhanden (Maus: AA 639 NCSS und AA 647 NITR), die im Huhn nicht enthalten sind. Diese beiden Glycosylierungen liegen innerhalb der Erkennungsdomänen der Antikörper und könnten deshalb mit der Detektion von Dystroglycan aus Maus oder Mensch interferieren. Bemerkenswert ist der hohe Grad der Konservierung in einigen

Bereichen bis hin zu *Drosophila*. Dies läßt darauf schließen, daß die Funktion von Dystroglycan von großer Bedeutung für den Organismus ist und deshalb nur wenige spontane Mutationen toleriert werden.

Die Vollständigkeit und korrekte Prozessierung des neu klonierten Huhn-Dystroglycan-Konstruktes wurde durch heterologe Expression in HEK293 Zellen analysiert. Die Expression wurde mittels Immunzytochemie und Western Blot überprüft. Das rekombinante Dystroglycan wird glykosyliert und in α - und β -Dystroglycan gespalten. Beta-Dystroglycan kann in der Membranfraktion der Zelllysate angereichert werden. Alpha-Dystroglycan ist sowohl in der Membranfraktion, als auch im Zellkulturüberstand zu finden. Es wird also sekretiert und bindet an die Oberfläche der transfizierten Zellen. Bemerkenswert hierbei ist, daß im Western Blot Unterschiede in der Glykosylierung von membranassoziiertem und löslichem α -Dystroglycan festgestellt werden konnten. Hochglykosylierte α -Dystroglycan-Formen liegen lediglich zellassoziiert vor, während niedriger glykosylierte α -Dystroglycan-Formen darüber hinaus auch im Kulturüberstand zu finden sind. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß hochglykosyliertes Protein eine höhere Affinität zu membranassoziierten Komponenten besitzt. Von besonderem Interesse ist diese Beobachtung vor dem Hintergrund, daß die Glykosylierung von α -Dystroglycan wichtig für dessen Funktion in der Skelettmuskulatur und im ZNS ist, und daß Veränderungen in der Glykosylierung zu verschiedenen Krankheiten wie MEB und CMD führen. Die Funktion von α -Dystroglycan könnte durch den Grad der Glykosylierung bestimmt sein. Es wäre daher interessant zu analysieren, ob Mutationen der Glykosylierungsstellen und die daraus folgende Veränderung Einfluß auf die Bindung von α -Dystroglycan an Zelloberflächenrezeptoren oder extrazelluläre Matrixproteine hat. Dahingehend wurde zum Beispiel schon gezeigt, daß Defekte in Glykosyltransferasen zu veränderten Glykosylierungsmustern von α -Dystroglycan führen und dies die Bindung an EZM Proteine wie Laminin, Agrin und Neurexin vermindert (Michele et al., 2002; Espana et al., 2002).

Die für die Inhibitionsexperimente hergestellten Antikörper decken den kompletten extrazellulären Bereich von β -Dystroglycan und somit auch die Bindungsstelle an α -Dystroglycan ab. Der C-terminale Anteil von α -Dystroglycan enthält die Bindestelle für β -Dystroglycan zwischen Aminosäure 550 und 585 (Sciandra et al., 2001; Bozzi et al., 2001). Die Antikörper erkennen den größten Teil

dieser Bindungsdomäne und darüber hinaus noch den gesamten weiteren C-terminalen Bereich von α -Dystroglycan.

Die Spezifität der hergestellten Antiseren, der affinitäts-gereinigten Antikörper und Fab-Fragmente wurde in der Immunzytochemie, an transfizierten Zellen und Gewebeschnitten gezeigt. Für den Nachweis im Western Blot wurden Zelllysate transfizierter Zellen und Proteinextrakte von embryonalem Gewebe, wie Muskel und Retina verwendet. Diese Analysen ergaben, daß die beiden Antikörper spezifisch α - und β -Dystroglycan erkennen, die Seren aus verschiedenen Tieren jedoch auch unterschiedliche Bindungseigenschaften besitzen. Färbungen mit ABT1 zeigen deutlicher die Lokalisation von Dystroglycan an der Basalmembran und schwächer in den plexiformen Schichten, dagegen markierte ABT2 verstärkt Dystroglycan in der OPL. Für Immunfärbungen ist es daher besser, eine Mischung aus beiden Antikörpern zu benutzen. Im Western Blot erkennen beide Antikörper β -Dystroglycan sehr gut, dagegen wird α -Dystroglycan wesentlich stärker von ABT1 als von ABT2 detektiert. Für Western Blots bietet es sich deshalb an ABT1 zu verwenden. Für die Injektionen wurden zu Beginn beide Antikörper eingesetzt. Die beschriebenen Effekte traten allerdings nur bei der Injektion von ABT2 auf, infolgedessen wurde später nur noch ABT2 und Fab-Fragmente von ABT2 benutzt.

Mittels einer Coimmunpräzipitation wurde analysiert, ob ABT2 die Bindung zwischen α - und β -Dystroglycan inhibieren kann. Durch die Zugabe von ABT2 wurde die Bindung des rekombinant in Bakterien exprimierten Fusionsproteins AB-Dyg-His an das rekombinante α -Dystroglycan verhindert. Da die Bindung von bakteriell hergestellten Fragmenten von α - und β -Dystroglycan aneinander bereits in mehreren Publikationen beschrieben wurde (Di Stasio et al., 1999; Sciandra et al., 2001; Bozzi et al., 2001), unterstützen diese *in vitro* Ergebnisse die Annahme, daß die morphologische Veränderungen in der Retina durch eine Inhibition der Interaktion zwischen α - und β -Dystroglycan ausgelöst werden.

3.2 Strukturelle Veränderungen der Retina

Die Injektion der ABT2 Antikörper in die Augen von Hühnerembryonen hatten schwerwiegende morphologische Veränderungen zur Folge. Die Retina zeigte schon lichtmikroskopisch in Teilbereichen deutliche Verdickungen. Der Bildungsprozeß dieser Wucherungen war progressiv. Nach 48 Stunden waren eher leichte Verdickungen zu erkennen, während nach vier Tagen die Wucherungen in ihren

Ausmaßen zugenommen hatten. Nach 5 Tagen waren diese dann sehr groß und nahmen den größten Teil der Retina ein. Einzelne Zellen sind in den vitrealen Raum eingetreten. Auf eine statistische Analyse dieser späten Prozesse wurde verzichtet, da nicht genug Embryonen die wiederholten Injektionen über 5 Tage hinweg überlebten. Eine mögliche Erklärung für das lokale Auftreten der Verdickungen im ventro-nasalen und ventro-temporalen Teil der Retina ist, daß durch die lokale Injektion regional unterschiedliche Konzentrationen an Antikörpern entstanden und sich die Wucherungen primär in Bereichen erhöhter Konzentration an Fab-Fragmenten bildeten.

3.3 Mechanismen der Bildung retinaler Verdickungen

3.3.1 Morphologie der radiären Vorläuferzellen

Aus den von mir erhaltenen Ergebnissen kann ein Modell entwickelt werden, daß die Folgen der Antikörperinjektionen beschreibt und Prognosen über die Mechanismen macht, die der Veränderung der Morphologie der Retina zugrunde liegen. Dabei wird postuliert, daß die Inhibition der Dystroglycan-Interaktion Auswirkungen auf den Kontakt der RZ zur Basalmembran hat und daß dies die Zellproliferation und Migration stört.

In der frühen Entwicklung zum Zeitpunkt der Injektionen (E6) besteht die Retina, wie auch das übrige ZNS-Neuroepithel in frühen Entwicklungsstadien, hauptsächlich aus radiären, neuroepithelialen Vorläuferzellen. Dieser Zelltyp wurde lange von radiären Gliazellen innerhalb des sich entwickelnden ZNS unterschieden (Ramon y Cajal, 1911; Levitt et al., 1981, 1983). Neuere Ergebnisse haben jedoch gezeigt, daß es sich hierbei um identische Zelltypen handelt (Malatesta et al., 2000; Hartfuss et al., 2001; Miyata et al., 2001; Noctor et al., 2002; Tamamaki et al., 2001; Campbell and Götz, 2002; Götz et al., 2002). Einerseits exprimieren die radiären Zellen zelltypspezifische Marker von Gliazellen, wie GFAP und Vimentin, andererseits sind sie immer noch teilungsfähig und können als Vorläufer von Neuronen und Gliazellen dienen. Daneben kommt ihnen die Funktion der Leitstrukturen bei der Migration der Neurone zu. Die proliferierenden radiären Zellen bilden die Stammzellen bei der Entstehung des ZNS (Parnavelas und Nadarajah, 2001). Der Proliferationszyklus der RZ ist in Abb. 22 dargestellt. In der S-Phase, während der DNA-Synthese, ist der Kern am äußeren Rand des Epithels, zur Piabasalmembran hin, lokalisiert. Darauf folgt eine Translokation des Kerns in Richtung der Ventrikulärzone (VZ). Die Zelle durchläuft währenddessen die G2-

Phase. In der VZ wird dann die Mitose vollzogen. Dabei wird vor der Teilung der Endfuß von der Pia gelöst und zurückgezogen. Nach der Teilung adhärirt die radiäre Zelle wieder mit ihrem Endfuß an der Basalmembran. Der Kern wird mit Durchlaufen der G1-Phase wieder zum äußeren Rand des Neuroepithels transloziert. Die neu entstandene postmitotische Zelle wandert entlang des Fortsatzes der radiären Gliazelle in Richtung Pia und nimmt ihre endgültige Position ein. Der Proliferationszyklus beginnt erneut und die differenzierten Zellen bilden die typische Schichtung des ZNS.

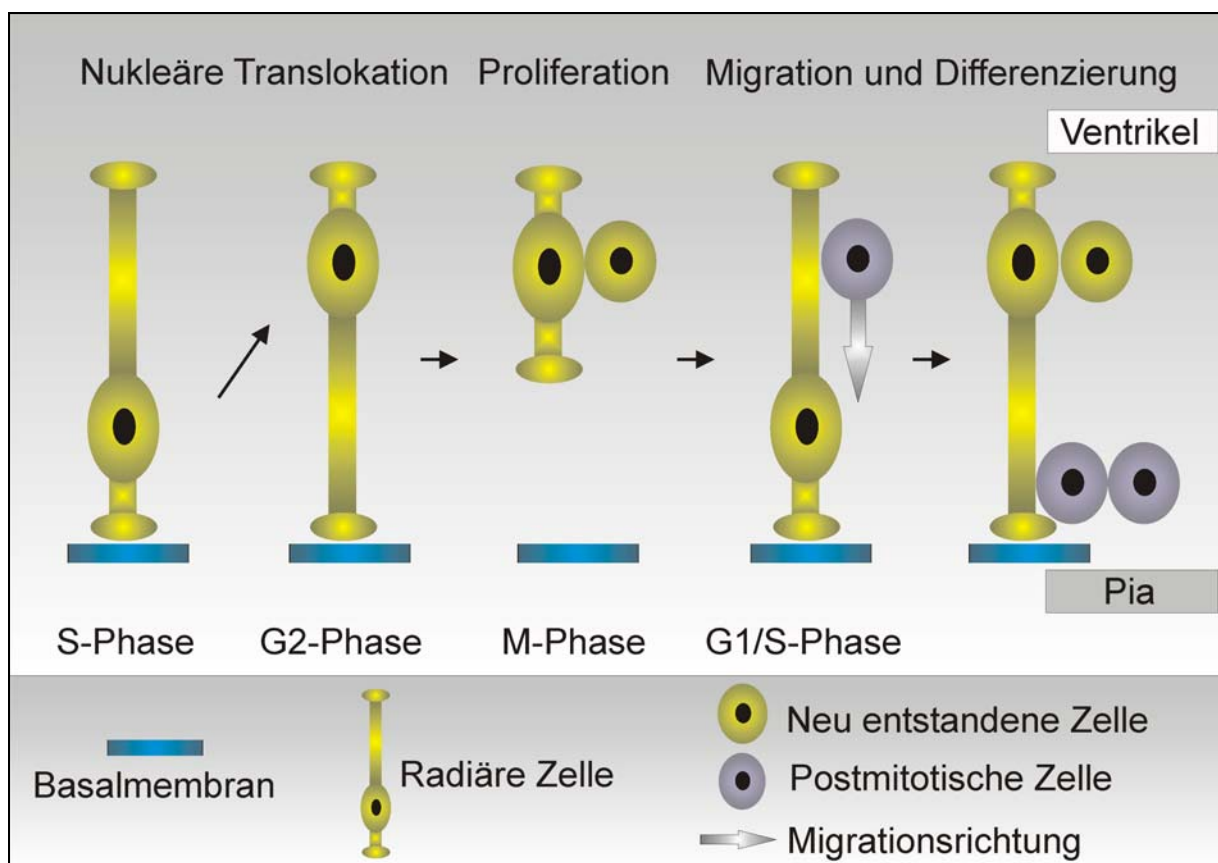


Abb. 22 Proliferationszyklus der radiären Zellen – Während der DNA-Replikation in der S-Phase ist der Nucleus der RZ im äußeren Bereich des Neuroepithels lokalisiert. Der Endfuß verbindet die RZ mit der BM. Während der G2-Phase wird die Translokation des Nucleus in die ventrikuläre Zone durchgeführt. Anschließend wird der Endfuß von der BM zurückgezogen und es kommt zur Mitose (M-Phase). Nach der Proliferation adhärirt der Endfuß wieder an die BM, und der Kern wandert zurück (G1/S-Phase). Der Proliferationszyklus kann von Neuem beginnen. Bei der asymmetrischen Teilung beginnt die neu entstandene Zelle zu differenzieren, sie wird postmitotisch und wandert entlang der RZ zu ihrer endgültigen Position. Die differenzierten Zellen bilden die Schichtung des neuronalen Gewebes.

Wie kann die Injektion der Antikörper die Morphologie der RZ verändern und die Funktion der Zellen stören? Normalerweise haben die RZ, solange sie an die Basalmembran adhärieren, eine gestreckte Form. Lediglich in der Phase der Zellteilung runden die RZ sich ab, nachdem sie den Kontakt zur Basalmembran gelöst und ihre Fortsätze zurückgezogen haben. Die Anfärbung der RZ mit einem

Antikörper gegen Vimentin nach den Injektionen macht sichtbar, daß in den retinalen Verdickungen, im Gegensatz zu der normalerweise überwiegend langgestreckten Morphologie, abgerundete Zellen vorliegen. Die Injektion der Antikörper gegen Dystroglycan führt zu einer morphologischen Umgestaltung der RZ. Die Wirkung der Antikörper kann also dahingehend interpretiert werden, daß die radiären Zellen durch die Antikörperbindung entweder dazu angeregt werden, ihre Fortsätze zurückzuziehen, oder aber die Aussendung eines neuen Fortsatzes bzw. dessen Adhäsion an die Basalmembran verhindert wird (Abb 23).

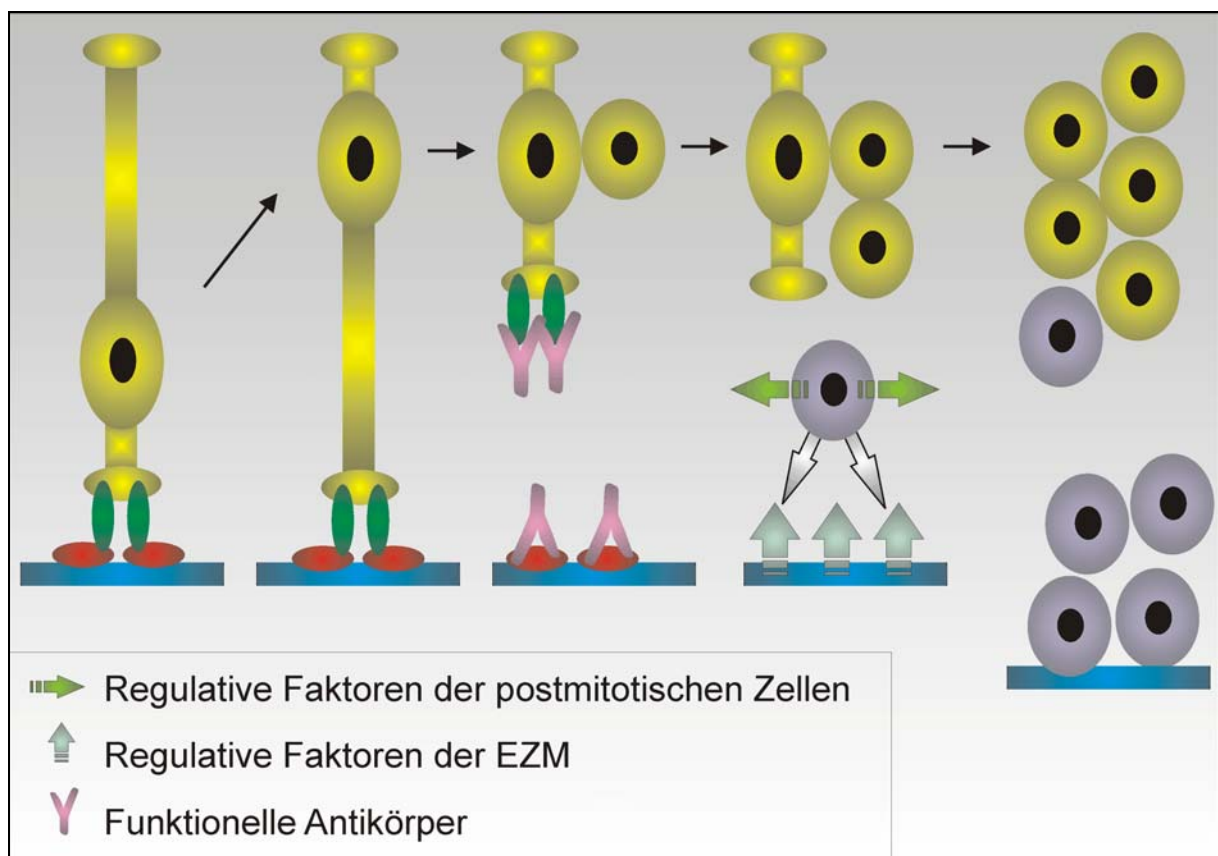


Abb 23 Störung des Proliferationszyklus durch die Antikörper – Der Proliferationszyklus der RZ beginnt wie in Abbildung 22 beschrieben. Nach der nukleären Translokation teilt sich die RZ. Im Gegensatz zum normalen Ablauf kann der Endfuß jedoch nicht mehr an die Basalmembran adherieren, da die an Dystroglycan gebundenen Antikörper eine korrekte Bindung des Endfußes an die Basalmembran über den DAG verhindern. Die RZ bleibt im abgerundeten Zustand in der VZ lokalisiert. Dies hat nun vielfältige Auswirkungen. Zum Einen fehlt die zytoskelettale Verankerung, um der Zelle ihre richtige Form zu geben. Dies hat Auswirkungen auf ihre Funktion und den Zellzyklus. Zum Zweiten fehlt die Kontaktstelle zur Basalmembran und zu den, normalerweise an den Fortsätzen entlangwandernden, postmitotischen Zellen. Sowohl die Membran als auch die Zellen enthalten oder sezernieren wichtige Faktoren, welche den Proliferationszyklus regulieren. Fehlt dieser Kontakt wird die Proliferation gestört und es kommt zur Hyperproliferation. Dadurch entstehen in kürzerer Zeit erheblich mehr neue Zellen. Diese differenzieren und migrieren, da jedoch nur noch wenige oder keine radiären Zellen in ihrer ursprünglichen Form als Leitsrukturen der Migration dienen können, kommt es zu Migrationsdefekten. Die erhöhte Anzahl neuer Zellen, die folglich gesteigerte Zahl differenzierter Zellen und die Migrationsdefizite führen zur breiteren Schichtung und letztendlich zu den retinalen Verdickungen.

Es bleibt zu klären, wie die Bindung der Antikörper an Dystroglycan diese morphologischen Veränderungen der RZ hervorrufen kann. In der frühen Entwicklung ist Dystroglycan ausschließlich an der Kontaktstelle von Basalmembran und RZ-Endfuß lokalisiert, daher ist seine Funktion auch auf diesen Bereich beschränkt. Eine Analyse der Basalmembran innerhalb der Verdickungen zeigte, daß die Basalmembran, wenn auch oft durch einige dislozierte Zellen leicht verändert, erhalten blieb und damit die Möglichkeit zur Adhäsion der RZ weiterhin bestand. Beta-Dystroglycan ist in den Verdickungen jedoch nicht mehr im Bereich der Basalmembran detektierbar. In der Muskulatur bewirkt der DAG die Verbindung zwischen EZM und Muskelfaser. Auf die Retina übertragen, könnte die Interaktion zwischen α -Dystroglycan und β -Dystroglycan die Bindung der RZ Endfüße an die Basallamina der inneren Grenzmembran vermitteln. Die Bindung der Antikörper inhibiert die Interaktion zwischen α - und β -Dystroglycan und eine Störung dieser Interaktion würde den Kontakt des DAG an die Basalmembran verhindern. In der Skelettmuskulatur führt die Störung einer mit dem DAG assoziierten Komponente des DAG oft dazu, daß auch die anderen Komponenten nicht mehr an der Zellmembran lokalisiert sind. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für die Komponenten in den Endfüßen der RZ beschrieben (Blank et al., 2002, Michele et al., 2002). Es ist anzunehmen, daß, wenn β -Dystroglycan als zentrale Komponente des gesamten DAG an der Basalmembran in den Verdickungen fehlt, auch eine Umverteilung der anderen DAG-Komponenten in den RZ stattfindet. Der DAG ist intrazellulär mit dem Zytoskelett verbunden (Claudepierre et al., 2000). Wenn der DAG nicht mehr in den Endfüßen konzentriert ist, kommt es zum Verlust der membranständigen Verankerung und somit zur Umgestaltungen des Zytoskeletts. Eine Folge davon könnte die runde Morphologie der RZ sein. Die Auswirkung der Antikörperinhibition ist vergleichbar mit dem Effekt, der durch den Collagenaseverdau der Inneren Grenzmembran, der Basalmembran der Retina, ausgelöst wird. Diese Behandlung führt neben neuronalen Entwicklungsdefekten auch zu einer veränderten Morphologie der radiären Gliazellen, deren Endfüße nicht länger an die Basalmembran adhären sind (Halfter et al., 2001). Eine weitere Folge des Verdaus der Basalmembran ist, daß die Komponenten des DAG nicht mehr in den Endfüßen konzentriert sind (Blank et al., 2002). Dies deutet darauf hin, daß die Funktion von Dystroglycan sehr eng mit der Basalmembran verknüpft ist.

3.3.2 Hyperproliferation der radiären Vorläuferzellen

Innerhalb der retinalen Verdickung haben die RZ nicht nur eine veränderte Form, sondern sie hyperproliferieren auch. Wie kann sich der fehlende Kontakt zwischen Endfuß und Basalmembran auf den Zellzyklus und die Proliferation auswirken? Im Folgenden sollen zwei Modelle diskutiert werden, wie die Inhibition der Dystroglycan-Interaktion dazu führen kann, daß extrinsische Faktoren, wie Signale von der Basalmembran oder aus dem Zell-Zell-Kontakt, die normalerweise in die Regulation des Zellzykluses eingreifen, nicht mehr wirken können und es dadurch zur Hyperproliferation kommt. Beiden Modellen liegt ein Eingriff in die Steuerung des Proliferationszykluses zugrunde (Abb 23).

Der Proliferationszyklus ist in vier Phasen aufgeteilt, die S-Phase der DNA Synthese, die Übergangsphase G1, die Mitose(M)-Phase und die G2-Phase. In der zwischen der M- und der S-Phase liegenden G1-Phase wird die Entscheidung getroffen, ob die Zelle ein weiteres mal den Zellzyklus durchläuft, oder aber ob sie in die G0-Phase eintritt und sich differenziert, also postmitotisch wird. Die G1-Phase ist entscheidend für die Länge des Zellzykluses, da ihre Dauer moduliert werden kann, die Dauer der anderen Phasen dagegen nicht (DiSalvo et al., 1995). Die G2-Phase zwischen S- und M-Phase dient unter anderem der DNA-Reparatur und der Vorbereitung auf die Mitose. Außerdem entscheidet sich hier, welcher Zelltyp bei der Teilung entsteht. Jede dieser Phasen steht unter Kontrolle der Cycline, deren Aktivität durch Phosphorylierung gesteuert wird. Dabei bilden sich Cyclin-CDK (Cyclin abhängige Kinasen) Komplexe, welche wiederum negativ durch CDKIs (CDK Inhibitoren) reguliert werden. Für jeden zellzyklusabhängigen Cyclin-CDK Komplex liegen auch die entsprechenden CDKIs vor. Eine Gruppe dieser CDKIs sind die Proteine der CIP/KIP Familie. CIP/KIP CDKIs verhindern den Eintritt der Zelle von der G1- in die S-Phase und somit das Fortschreiten des Zellzykluses. Die Zellen stoppen die Proliferation und beginnen die Differenzierung. Zwei Mitglieder dieser Familie sind p27^{Kip1} und p57^{Kip2}. Deletion der Gene dieser Proteine in Mäusen führt zu erhöhter Proliferation und Veränderungen in der Gewebemasse und Struktur der Retina (Dyer und Cepko, 2000, 2001). So führt die Deletion von p27 zu 20% größeren Tieren durch erhöhte Zellzahlen. Es wird vermutet, daß p27 von extrazellulären Faktoren induziert wird und seine Funktion auf den Austritt der Vorläuferzellen aus dem Zellzyklus beschränkt ist, da es die Differenzierung der einzelnen Zelltypen scheinbar nicht beeinflusst (Fero et al., 1996). Jedoch wurde beschrieben, daß die p27 Defizienz zur Störung der retinalen Schichtung führt, wobei

manche Zelltypen, wie zum Beispiel Photorezeptoren, eine erhöhte Anzahl aufweisen (Nakayama et al., 1996). Auch bei der p57 defizienten Maus wurde ein retinaler Phänotyp beschrieben. In der frühen Entwicklung führt der Verlust von p57 zu erhöhten Mitoseraten in der Retina und anderen Geweben (Zhang et al., 1997; Dyer and Cepko, 2000 und 2001). Es ist eindeutig, daß p27 und p57 die Proliferation in der embryonalen Retinaentwicklung steuern.

Das folgende Modell beruht auf dem Einfluß von Basalmembrankomponenten auf den Zellzyklus und stellt dar, wie durch die fehlende Interaktion der RZ zur Basallamina die Proliferation verändert werden könnte. Der Kontakt von Zellen an Basalmembrankomponenten kann den Zellzyklus und die Differenzierung über zelluläre Rezeptoren maßgeblich beeinflussen (Renshaw et al., 1997). So spielen zum Beispiel die transmembranen Integrine, als Rezeptoren mehrerer EZM-Moleküle, eine wichtige Rolle in der Signalvermittlung bei der Adhäsion an die Basalmembran. Neben ihrer Funktion in der Zellmigration (Galileo et al., 1992) haben sie entscheidenden Einfluß auf den Ablauf des Zellzyklusses, indem sie je nach Zeit und Gewebe die Proliferation über verschiedenen Signalwege induzieren oder inhibieren. (Hulleman et al., 1999; Hulleman und Boonstra, 2001; Schwarz und Assoian, 2001). Eine Aktivierung von Integrinen über den Kontakt zu EZM Komponenten oder durch Antikörper führt zur negativen Regulation von p27^{Kip1} und p21^{Cip1} und wirkt sich damit direkt auf die Regulation des Zellzyklusses aus (Bao et al., 2002). Die Zugabe von EZM Komponenten und Liganden von Integrinen wie Laminin (Drago et al., 1991) und Collagen IV (Ali et al., 1998) zu neuroepithelialen Zellen führt zu einer erhöhten Proliferationsrate dieser Zellen. Vitronektin dagegen inhibiert die Proliferation und induziert die sonic hedgehog abhängige Differenzierung der Vorläuferzellen (Pons et al., 2001). Wie sich im Einzelnen der Kontakt zur Basalmembran auf die Zellen auswirkt, ist sicherlich abhängig von vielen weiteren Komponenten, wie der Umgebung der Zellen, des Entwicklungszustandes des Gewebes und der Zusammensetzung der Basalmembran, sowie der Zusammensetzung der zellulären Rezeptoren für Matrixkomponenten.

Dystroglycan könnte in diesem subzellulären Kompartiment, der Kontaktzone der Basalmembran zur Zelle zwei wichtige Rollen spielen. Einerseits könnte es durch die Verbindung von Zytoskelett zur EZM diesen Kontakt herstellen und so die Interaktion der zellulären Rezeptoren mit den Liganden in der EZM erst ermöglichen. Eine Hemmung der Dystroglycan-Interaktion und ein folglich unterbrochener Kontakt

unterbricht auch die Signalübertragung von EZM zur Zelle. Dystroglycan kann aber auch direkt Einfluß auf Integrin-abhängigen Signalwege haben. Die Expression von einigen Integrin Untereinheiten, die an der Laminininteraktion beteiligt sind, ist abhängig von Dystroglycan (Cote et al., 2002). Darüber hinaus kann Dystroglycan auch selbst als Rezeptor für Basallaminakomponenten wie Laminin und Agrin dienen. An den DAG binden Komponenten, die an Signaltransduktionswegen beteiligt sind (Rando, 2001). In Gliazellendfüßen wird über α -Syntrophin so unter anderem der Wasserkanal Aquaporin-4 an der Membran lokalisiert (Frigeri et al., 2001; Neely et al., 2001). Eine fehlende Lokalisation von Dystroglycan an der Basalmembran in den Verdickung bedeutet, daß auch die DAG spezifischen Signalwege unterbrochen sind.

Dieses Modell macht einige Voraussagen bezüglich der Funktion von Dystroglycan im Gehirn, die voraussetzen, daß Dystroglycan neben der mechanischen Verbindung auch eine Rolle in den Signalwegen der Zellproliferation spielt. Eine inhibierte Expression von Dystroglycan im Nervensystem führt zu einer gestörten Cortexschichtung, Fusion der Hirnhemisphären und neuronalen Migrationsdefiziten (Moore et al., 2002). Insgesamt wurde eine Vergrößerung der Hirnmasse um 20% gemessen, sowie eine Steigerung der Gliazellzahl beobachtet. Daraus läßt sich schließen, daß der Verlust von Dystroglycan im ZNS einen Einfluß auf die Neuro- und Gliogenese hat, sowie auch die Inhibition der Dystroglycan-Interaktion in meiner Arbeit zur erhöhten Proliferation führt. Offen bleibt, ob Dystroglycan einen direkten Einfluß auf die Regulation des Zellzykluses hat. In Experimenten an Rinderaortenzellen wurden jedoch erste Hinweis auf die Beteiligung von Dystroglycan an der Proliferation gezeigt. Endotheliale Rinderaortazellen, die mit verschiedenen Dystroglycan-Konstrukten transfiziert wurden, weisen eine unterschiedliche Zellteilungsrate auf. Dabei vermehrten sich Zellen, die ein Vollängenkonstrukt von Dystroglycan überexprimierten, langsamer als Kontrollzellen. Die Überexpression der intrazelluläre Region von β -Dystroglycan alleine führte dagegen zu einer gesteigerten Proliferationsrate (Hosokawa et al., 2002). Auch wenn diese Ergebnisse noch weit entfernt von der Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen sind, könnten sie doch erste Hinweise auf eine direkte Beteiligung von Dystroglycan an der Proliferation der Zellen sein.

Neben dem ersten Modell, daß Dystroglycan eine Beteiligung an Signalwegen des EZM-Zell Kontakt zuschreibt, beruht ein weiteres Modell zur Erklärung der

Hyperproliferation darauf, daß postmitotische Zellen über lösliche Faktoren einen direkten Einfluß auf benachbarte proliferierende Vorläuferzellen haben. Ein Faktor, der die Expression des oben erwähnten CDK-Inhibitors $p57^{Kip2}$ aktiviert, ist PACAP (Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide; Cunningham and Roussel, 2001). PACAP ist ein 38 Aminosäuren langes Peptid, das ähnlich wie ein Wachstumsfaktor wirkt. Es wird von den Zellen sezerniert und wirkt in parakriner Weise auf Nachbarzellen. PACAP wird in der frühen Gehirnentwicklung hauptsächlich von postmitotischen Zellen exprimiert, während sein Rezeptor PAC1 von proliferierenden Vorläuferzellen gebildet wird (Waschek et al, 1998; Zhou et al., 1999). Die exogene Zugabe von PACAP führt zum Stop der Proliferation der Vorläuferzellen im Cortex. Eine Blockierung des PACAP Signalweges führt dagegen zur Steigerung der Proliferationsrate. Es handelt sich also um ein System, mit dem die Zellteilung im Neuroepithel reguliert wird (Suh et al., 2001; Waschek, 2002). Auf diese Art können postmitotische Zellen den Zellzyklus der noch teilungsfähigen Zellen regulieren. Die parakrine Signalübertragung durch PACAP und seinen Rezeptor findet in der Kontaktzone zwischen postmitotischen und mitotischen Zellen statt. In der frühen Retinaentwicklung könnte so eine Kontaktzone durch die Migration der Neuroblasten entlang der Fortsätze der RZ gebildet werden. Sind die Fortsätze der RZ zurückgezogen, muß die Migration der Neurone unabhängig von den Fortsätzen stattfinden. Daher könnte die Signalübertragung zwischen den Zellen fehlen. Die Folge wäre ein Fehlen des inhibitorischen Impulses durch PACAP, der Zellzyklus würde nicht angehalten, und es käme zur Hyperproliferation. In diesem Modell hätten der DAG und Dystroglycan keinen direkten Einfluß auf die Aktivierung der Proliferation, sondern es wären sekundäre Prozesse, wie die verhinderte Adhäsion an die Basallamina und die daraus folgende veränderte Zellmorphologie der RZ, die den Zellzyklus stören würden.

3.3.3 Eine breitere Schichtung der Retina als Folge von Migrationsdefiziten

Die breite Schichtung der differenzierten Zellen innerhalb der retinalen Verdickungen ist ein Anzeichen für Migrationsstörungen der Neurone, da diese nicht ihre genaue Position einnehmen können. Die schweren morphologischen Veränderungen des Gehirns von Fukuyama CMD und MEB-Patienten als Folge einer defekten α -Dystroglycan-Glykosylierung, werden mit Defekten bei der neuronalen Migration in Zusammenhang gebracht (Fukuyama et al., 1981; Santavuori et al., 1989). Ein weiterer Hinweis auf eine gestörte Migration in Abhängigkeit von

Dystroglycan, ist die veränderte Lokalisation einiger Neuronenpopulationen im Gehirn der *myd* Mausmutanten, die ein verändertes Glykosylierungsmuster für α -Dystroglycan aufweist (Michele et al., 2002, Holzfeind et al., 2002).

Wie kann Dystroglycan einen Einfluß auf die Migration postmitotischer Zellen ausüben? Dystroglycan ist eine wichtige Komponente für die Assemblierung und Stabilität der Basalmembran, fehlt es, kann die Basalmembran nicht mehr korrekt gebildet werden (Henry und Campbell, 1995). Die defekte Basalmembran, als Folge eines veränderten oder fehlende Dystroglycans, könnte also Ursache der veränderten Zellwanderung in der *myd* Maus oder DG-null sein (Moore et al., 2002; Michele et al., 2002). Daß Störungen der Integrität der Basalmembran zur Migrationsdefekten führen, wurde auch schon in Nidogen-Mausmutanten (Halfter et al., 2002), Integrin defizienten Mäusen (Graus Porta et al., 2001) und durch proteolytischen Verdau der Basalmembran (Halfter et al., 2001) gezeigt. Das in diesen Fällen beschriebene Austreten der Neurone in die Marginalzone in Bereichen poröser Basalmembranen kann als Folge der dort fehlenden Lamina und damit dem Verlust einer Barriere erklärt werden. Darüber hinaus waren die Endfüße der RZ in diesen Experimenten von der Basalmembran abgelöst und die Fortsätze zurückgezogen. Dies könnte entsprechend der Funktion der RZ, als Leitstrukturen der Zellwanderung, ebenfalls Migrationsdefekte auslösen.

Ich habe jedoch nach den Antikörperinjektionen keine Brüche in der Retinabasalmembran beobachtet. Eine zerstörte Basalmembran ist hier also nicht Ursache der veränderten Migration. Lediglich die Morphologie der RZ war verändert. So kann rückschließend die Dislokation der Neuronen und die daraus folgende gestörte Schichtung der Retina hauptsächlich mit den morphologischen Veränderungen der RZ erklärt werden. Dies deutet daraufhin, daß den migrierenden Neuronen die langgestreckten Fortsätze als Leitstrukturen fehlen und deshalb Migrationsdefekte auftreten (Abb 23).

Zusammengefaßt ist die Funktion von Dystroglycan in der Entwicklung des ZNS vergleichbar zu der in der Muskulatur, wo der DAG die Verbindung zwischen EZM und Zytoskelett der Zellen herstellt. Dystroglycan verbindet die Basallamina mit den Endfüßen der RZ. In der Retina ist dieser Kontakt aber nicht nur wichtig für die Aufrechterhaltung der Struktur der RZ, sondern scheint darüber hinaus auch Einfluß auf den Zellzyklus dieser Zellen zu haben. Als Folge einer Störung dieser Verbindung

kommt es zu schweren morphologischen Veränderungen im ZNS. Eventuell sind diese Veränderungen in der frühen Entwicklung eine Erklärung für die ZNS-Veränderungen wie den „cobblestone cortex“ und die neuronalen Migrationsstörungen von Patienten mit MEB, Walker-Warburg Syndrom oder Fukuyama CMD.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

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

4.1.2 Substanzen für die Molekularbiologie

Agarose	Roth
Orange G	Sigma
DNA-Standard	MBI Fermentas
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
Ethidiumbromid	Sigma
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
T4 DNA Kinase	MBI Fermentas
DNase I	MBI Fermentas
Oligonukleotide	MWG
Taq-DNA Polymerase	Promega / Clontech
X-Gal	Promega
IPTG	Promega
LB-Medium	Life Technologies
LB-Agar	Life Technologies

4.1.3 Substanzen für die Proteinbiochemie

Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	Roth
Coomassie	Roth
Silbernitrat	Roth
DTT	Roth
Formaldehyd (37%)	Sigma
Nitrocellulose	Schleicher&Schuell
Milchpulver	Sucofin
Luminol	Sigma
Coumarsiure	Sigma
Photosensitive Filme	Amersham Biosciences
Entwickler und Fixierer	Kodak

4.1.4 Substanzen für die Zellkultur

DMEM	Sigma
FKS	PAA

Penicillin	Life Technologies
Streptomycin	Life Technologies
Gentamycin	Life Technologies
Pyruvat	Life Technologies

4.1.5 Substanzen für die Histologie

Objektträger	Marienfeld
Chromalaun	Bayer
Tissue Einbett Medium	Jung
Citifluor	Citifluor
BrdU	Sigma
DAPI	Sigma
Glaskapillaren	Brand
Stereolupe	Leica
Silikonsalbe	Bayer

4.1.6 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Charakterisierung
Agrin #46	Kaninchen	1:1000 IHC	Eigenproduktion	Tsen et al. 1995
β -Dystroglycan (43DAG/8D5)	Maus	1:2 IHC 1:50 WB	L.Anderson; C.Slater	Bewick et al., 1993
α -Dystroglycan (α -Dyg sh)	Schaf	1:1000 IHC 1:5000 WB	Pineda	Blank et al., 1999
α - und β - Dystroglycan (ABT1 /ABT2)	Kaninchen	1:1000 IHC 1:5000 WB	Pineda	Vorliegende Arbeit
Vimentin (3B4)	Maus	1:500 IHC	Roche	Heid et al., 1988
AChE (3D10)	Maus	1:100 IHC	K.Tsim	Tsim et al., 1992
Thy-1 (Ascites)	Maus	1:100 IHC	A.Rodriguez-Tebar, Madrid	French und Jeffrey, 1986
Ng-CAM (G4)	Maus	1:1000 IHC	F.Rathjen	Kuhn et al. 1991
BrdU (Bu20a)	Maus	1:100 IHC	Dako	
FLAG-FITC (M2)	Maus	1:100 IHC	Sigma	
c-Myc-Cy3 (9°10)	Maus	1:100 IHC	Sigma	

4.1.7 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-Maus-488/594 (HCA)	Ziege	1:2000	Molecular Probes

anti-Kaninchen-488/594 (HCA)	Ziege	1:2000	Molecular Probes
anti-Schaf-488/594	Esel	1:2000	Molecular Probes
anti-Maus- HRP	Ziege	1:5000	Dianova
anti-Kaninchen- HRP	Ziege	1:5000	Dianova
anti-Schaf- HRP	Esel	1:5000	Dianova

4.1.8 Oligonukleotide

Die Herstellung der Oligonukleotide erfolgt durch die Firma MWG (München)

Bezeichnung	Sequenz: 5'-3'	Orientierung
DGGSP1	ACTCTGAAGAAGCGGCCAC	Antisense
DGGSP2	CCACGGCCGGCACAGTCTCTCG	Antisense
DGGSPnest	GAGCACGGAGTGCATGGAGGCC	Sense
DGGSP 11	GGCGTGGCAGGCTTCAGAGTG	Antisense
DGGSP 13	ATCGACAGGGTGGACGCGTGGGAGGG	Sense
DGGSP 23	GACGCGTGGGAGGGGACTTACT	Sense
DGGSP 24	TACTCCCCGATGGTGTCTGTTGA	Antisense
DGGSP 35	GAAGATCTTCATGACTGTTGGATGTGTCCCGC	Sense
DGGSP 36	CCGCTCGAGCGGAGGGGGACGTAGGGCGG	Antisense
DGDEG 10	GGNGCRTTNGGPTCYTCR	Antisense
ADG2	CACGATGGAGCCCTTGGCGAT	Antisense
AB-Dyg-BamHI	AGGAGGATCCATGCCGGACCGCAGCCAC	Sense
AB-Dyg- HindIII	AGGAAAGCTTATCGTCCTCACTGCTCTTCTC	Antisense
Dyg1	GGTTGCCAGGACCCTTAGGA	Sense

4.1.9 Tiere

Die befruchteten Eier sowie adulte Hühner der Rasse White Leghorn (*gallus gallus domesticus*) wurden von einer lokalen Hühnerfarm (Gebr. Schneider, Mainz) bezogen. Die Eier wurden bei 12°C gelagert und nach Bedarf bei 37,8°C und 65% Luftfeuchtigkeit in einem Feuchtinkubator bebrütet. Die unterschiedlichen Stadien wurden nach Anzahl der Tage in der Embryoanentwicklung (E) definiert.

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgt durch Messung der Absorptionspektren der Basen und wurde photometrisch in wässriger Lösung durchgeführt. Die Messung der Absorption erfolgte bei 260 und 280 nm. Aus den erhaltenen Absorptionwerten wurde die Konzentration der Nukleinsäure berechnet und ihre Reinheit abgeschätzt. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Bei einem Quotienten E_{260} / E_{280} von 1,8 - 2,0 beträgt die Reinheit der DNA 70-95 %.

$OD_{260nm} = 1,0$ doppelsträngiger DNA entsprechen etwa 50 μg DNA / mL

$OD_{260nm} = 1,0$ einzelsträngiger DNA entsprechen etwa 33 μg DNA / mL

$OD_{260nm} = 1,0$ RNA entsprechen etwa 40 μg RNA / mL

4.2.1.2 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

Die Plasmide sind kleine, selbständige Einheiten genetischer Information, die unabhängig vom eigentlichen Genom in einer Bakterienzelle existieren können. Dadurch ist es möglich exogene Gene in Bakterien einzuschleusen. Unter Selektionsdruck werden diese Plasmide an die Nachkommen vererbt und dadurch vervielfältigt. Für die Aufreinigung von Plasmiden aus Bakterien wurden die Plasmidaufreinigungssysteme Qiaprep8 Miniprep und Qiafilter Maxiprep von Qiagen (Hilden) verwendet.

4.2.1.3 Elektrophorese von DNA

Die Auftrennung von PCR-Produkten oder Restriktionsfragmenten nach ihrer Größe erfolgte durch Agarosegelelektrophorese (Sambrook et al. 1989). Der Prozentsatz der Agarose wird dabei der Größe der zu erwartenden Fragmente angepaßt. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Auftragspuffer (40 % Saccharose, 1 mM EDTA, OrangeG) versetzt. Als Elektrophoresepuffer wurde TBE bzw. TAE verwendet. Die Anfärbung der DNA-Fragmente erfolgte durch Zugabe von 4 μl 10 mg/ml Etidiumbromid (EtBr) zu 100 ml Gel. Zur Größenbestimmung wurden geeignete DNA-Längenstandards verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Eagle Eye System von Stratagene.

4.2.1.4 Restriktion von DNA

Der analytische Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgte in 20 µl Gesamtvolumen, das 0,5 - 2 U einer Restriktionsendonuklease enthielt. Die Inkubation erfolgte in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben des Herstellers für 2 - 5 h bei 37°C. Anschließend wurde der Verdau mit Hilfe eines analytischen Agarosegels überprüft.

Der präparative Verdau von DNA erfolgte in 60 – 100 µl Gesamtvolumen, das 2 - 8 U einer Restriktionsendonuklease enthielt. Anschließend wurde die geschnittene DNA auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte DNA-Fragment präpariert.

Die Bestimmung der zu verwendenden Enzymmenge in U/µg DNA errechnet sich nach folgender Formel:

$$U/\mu\text{g} = \frac{\text{Länge des } \lambda\text{-Phagen Genom}}{\text{Länge der DNA}} \times \frac{\text{Anzahl der Schnittstellen der Ziel-DNA}}{\text{Anzahl der Schnittstellen im } \lambda\text{-Phagen}}$$

4.2.1.5 Aufreinigung aus Agarosegelen

Da EtBr mit der DNA interferiert und ebenso wie UV-Licht Strangbrüche induzieren kann, wurde zur Auftrennung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten die im später für die Proteinexpression eingesetzt werden sollten das EtBr freie BlueView System (Sigma; Schnelldorf) verwendet. Die DNA-Banden erscheinen dabei im Tageslicht als blaue Streifen. Diese wurden mit einem Skalpell herausgetrennt und die DNA daraus mit dem QIAex II System (Qiagen, Hilden) isoliert. Die DNA wurde in H₂O gelöst.

4.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Die Ligation ist der Einbau von DNA-Fragmenten in einen zuvor mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnittenen Vektor. Dabei katalysieren die Ligasen die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen freien 5'-Phosphatgruppen des Genfragments und freien 3'-Hydroxylgruppen des Vektors. Enthält der Vektor nach der Restriktion zwei stumpfe Enden oder zwei komplementäre Überhänge, so besteht die hohe Wahrscheinlichkeit, daß diese Enden mit sich selbst ligieren und somit kein DNA-Fragment eingefügt wird. Um eine Religation der Vektor-DNA zu verhindern, wurden die 5'-Enden der linearisierten Plasmide zunächst durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Die DNA wurde anschließend mit dem QIAquick-spin PCR Purification Kit von Qiagen gereinigt. Die Insertions- und Vektor-DNA wurde in einem Verhältnis von 1:1

bis 1:5 eingesetzt. PCR-Produkte die nach der Amplifikation direkt in einen dephosphorylierten Vektor eingefügt werden sollten, mußten davor durch eine Behandlung mit T4 DNA Kinase phosphoryliert werden. Die Ligation erfolgte nach der zyklischen Ligationsmethode (Lund et al., 1996). Dabei wurden die Ligationsansätze für 4 Stunden in einem zyklischen Temperaturspektrum mit einer Temperaturänderung von 0,5°C/ sek zwischen 10°C und 30°C inkubiert.

4.2.1.7 RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und PCR

Die Gesamt-RNA Isolierung aus Geweben wurde nach einer modifizierten Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt. Für die Durchführung mit Hilfe des Ultraspec-Reagenz wurde das Protokoll des Herstellers (Biotecx, Houston, TX, USA) befolgt. Nach der RNA Präparation erfolgte zum Verdau der chromosomalen DNA zusätzlich eine DNase I Inkubation. Hierbei wird die präparierte RNA mit 0,5 Einheiten DNase I pro µl RNA für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend durch eine Phenol/Chloroformextraktion gereinigt.

Die cDNA Synthese mittels Superscript II Reverser Transkriptase erfolgte nach Anleitung des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe). Als Starteroligonukleotide wurden entweder Oligo(dT)-Nukleotide und degenerierte Nukleotidhexamere eingesetzt. Die cDNA diente als Matrize für die Polymerase Kettenreaktion.

Die PCR dient der spezifischen exponentiellen Vervielfältigung eines DNA-Fragments. Der Sequenzabschnitt wird durch zwei Oligonukleotide festgelegt, die an beiden Seiten des gewünschten DNA-Abschnittes am codogenen bzw. anti-codogenen Strang binden. Die Oligonukleotide werden mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase mit dNTPs in 3'Richtung verlängert. Die so entstandene doppelsträngige DNA wird durch Denaturieren wieder getrennt und die Oligonukleotide können erneut binden.

Die Temperaturen die während dieses Zykluses verwendet werden sind von verschiedenen Voraussetzungen abhängig. Die Denaturierung findet standardisiert bei 94°C für 3 min statt, falls es sich jedoch um genomische DNA oder GC-reiche Matrizen handelt, muß bei höherer Temperatur und/oder für längere Zeit denaturiert werden. Die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide hängt von deren Schmelztemperatur ab, diese wiederum beruht auf deren Basenzusammensetzung. Die Verlängerung mittels der DNA-Polymerase findet bei 72°C statt. Ausnahmen stellen die Amplifikation langer Produkte oder die Verwendung vieler Zyklen, dann

kann die Temperatur auf 68°C herabgesetzt werden, um eine längere Haltbarkeit der Polymerase zu erreichen.

Zur Herstellung der Sonde für die Analyse der Cosmid-Datenbank wurden die Oligonukleotide DGGSP13 und ADG2 verwendet. Der Temperaturzyklus war hier 94° für 30 s, 62°C für 45 s und 72° für 1 min bei insgesamt 28 Zyklen.

Der unbekannte Bereich auf dem Cosmid in 3'Richtung der Sondensequenz konnte mit den Oligonukleotiden DGGSP13 und DGDEG10 vervielfältigt werden. Hierbei ist DGDEG10 ein degeneriertes Oligonukleotid. Dieses enthält an bestimmten Positionen Variationen. Die Sequenz des Oligonukleotides wird von der erwarteten Aminosäuresequenz abgeleitet. Da der genetische Code jedoch degeneriert ist und somit verschiedene Triplets für die selbe Aminosäure codieren können, müssen diese bei der Rücktranslation berücksichtigt werden. Der Temperaturzyklus war hier 94°C für 30 s, 62°C für 45 s und 72° für 1,5 min bei insgesamt 28 Zyklen.

Die Bestimmung des Fragmentes nach der Cosmid-Restriktion wurden die Oligonukleotide DGGSP23 und DGGSP24 verwendet. Hierbei war darauf zu achten, dass die aus dem Gel gereinigten Restriktionsfragmente Verunreinigungen anderer Fragmente enthielten. Deshalb wurde nach 10, 15, 20 und 25 Zyklen Proben aus den PCR-Ansätzen entnommen, nur dadurch konnte das entsprechende Fragment identifiziert werden. Der Temperaturzyklus war hier 94°C für 30 s, 62°C für 45 s und 72° für 1 min bei insgesamt 28 Zyklen.

Mit den Oligonukleotiden Dyg1 und DGGSP11 wurde ein großer Bereich von α -Dyroglycan vervielfältigt. Als Matrize diente cDNA aus Muskelgewebe von Huhn des Stadiums E17. Es wurde das High Fidelity PCR System von Roche benutzt, da diese Polymerasen mit einer Korrekturfunktion enthält und somit Fehler bei der späteren Proteinexpression vermieden werden. Der Temperaturzyklus war hier 94°C für 30 s, 62°C für 45 s und 72° für 2 min bei insgesamt 28 Zyklen.

Zur Vervielfältigung der Sequenz des rekombinanten Proteins AB-Dyg-His wurden die Oligonukleotide AB-Dyg-BamHI und AB-Dyg-HindIII verwendet. Der Temperaturzyklus war hier 94°C für 30 s, 62°C für 45 s und 72° für 1 min bei insgesamt 28 Zyklen.

Für die Vervielfältigung der Gesamtsequenz von Dyroglycan wurden die Oligonukleotide DGGSP35 und DGGSP36 eingesetzt. Hierbei wurde die Polymerase Advantage2 von Clontech verwendet, da diese als Einzige der getesteten

Polymerasen die Vervielfältigung ermöglichte. Der Temperaturzyklus war hier 95°C für 30 s, 72°C für 45 s und 72° für 4 min bei insgesamt 28 Zyklen. Die Anlagerungstemperatur lag bei 72°C, da nur hier ein einziges Produkt entstand.

4.2.1.8 5'RACE (rapid amplifikation of cDNA ends)

Das RACE-System macht eine Ampifikation und Charakterisierung unbekannter Sequenzen am 3' oder 5' Ende einer RNA-Sequenz möglich. Man benötigt dazu lediglich eine bekannte Sequenz von 50 bis 100 Bp. Bei der 5'RACE erfolgt zuerst eine cDNA-Synthese mit einem genspezifischen Primer (GSP1). Nach der cDNA-Synthese wird das Erstrangprodukt aufgereinigt. An das 3'Ende dieses Produkt wird im nächsten Schritt mit Hilfe einer Terminalen Deoxynukleotidyltransferase (TdT) ein homopolymerer Oligo(dC) Schwanz angehängt. Mit diesem Profukt als Matix wird eine PCR mit einem zweiten genspezifischen Primer (GSP2) und einem Anker-Primer (AAP, abridged anchor primer) der komplementär der angehängten Sequenz ist, durchgeführt. Falls notwendig kann kann mit einem zweiten Primer gegen die angehängte Sequenz (AUAP, abridged universal amplifikation primer) und einem weiteren genspezifischen Primer (GSPnest) eine weiter Amplifikation (nested PCR) erfolgen, um eine höhere Produktausbeute zu erzielen. Die durchführung der RACE erfolgte nach Anleitung des Herstellers (Life Technologies). Die erste Amplifikation erfolgte in 35 Zyklen mit 1 min bei 94°C, 1 min bei 55°C, 2min bei 72°C. Die nested PCR wurde in 30 Zyklen mit 30 s bei 94°C, 1,5 min bei 60°C, 1 min bei 72°C durchgeführt.

4.2.1.9 Analyse einer Cosmid-Datenbank

Cosmide sind spezielle Vektoren in welche ein großer Bereich genomischer DNA eingefügt werden kann. Eine Cosmid-Datenbank besteht aus vielen unterschiedlichen Bakterienklonen die jeweils ein Cosmid mit Abschnitten genomischer DNA enthalten. Die einzelnen Bakterienkolonien werden dann in Großansätzen daraufhin untersucht, ob sie ein Cosmid mit einer bekannten DNA-Sequenz enthalten. Dazu wird ein markiertes DNA-Fragment der bekannten Sequenz als Sonde eingesetzt. Diese Sonde bindet an die komplementäre Sequenz innerhalb des Cosmids. Durch die Detektion der Sonde nach der Bindung kann der Bakterienklon identifiziert werden, der ein Cosmid mit der bekannten Sequenz enthält. Dieses Cosmid wird aufgereinigt und kann nun hinsichtlich neuer Sequenzinformationen untersucht werden. Die Analyse einer embryonalen Huhn

Cosmid-Datenbank wurde am Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH in Heidelberg durchgeführt.

Als Hybridisierungssonde für die Analyse wurde ein Teil der bekannten Huhn Dystroglycan-Sequenz ausgewählt und mit spezifischen Primern amplifiziert (Abb. 5). Die Konzentration des 461 bp langen Fragments wurde photometrisch bestimmt, auf 4µg / 100µl eingestellt und an das Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH in Heidelberg gesandt. Die dort durchgeführte Analyse einer Cosmid-Datenbank von genomischer DNA aus dem Huhn ergab fünf positive Klone (MPM L2; MPM L0; MPM D0; MPM P0; MPM N1). Mittels PCR wurde von den Cosmiden ein bekannter Teil des Dystroglycans amplifiziert, kloniert und sequenziert. Dadurch konnte bestätigt werden, dass die Cosmide die richtige Sequenz enthielten.

4.2.1.10 Klonierung der kompletten Dystroglycan-cDNA

Durch PCR wurde verifiziert, daß der am weitesten zum 3'Ende gelegene, bekannte Teil von Dystroglycan auf den Cosmiden MPM L0 und MPM D0 vorhanden war. Diese beiden Cosmide wurde mittels eines Restriktionsenzym geschnitten, welches exakt einmal im bekannten Teil der Dystroglycan-Sequenz vorkommt, in diesem Falle Apal. Die Restriktionsmuster waren bei beiden Cosmiden gleich, so daß im Folgenden nur noch mit MPM L0 weitergearbeitet wurde. Aus dem Vergleich mit bereits bekannten Dystroglycan-Sequenzen anderer Spezies ließ sich die Mindestlänge zwischen dieser Schnittstelle und dem folgenden Stopcodon ableiten. Die Fragmente des geschnittenen Cosmids wurden aufgetrennt und isoliert. Jedes Fragment, das die minimale Länge hatte, wurde dann wiederum durch PCR daraufhin untersucht, ob es den bisher bekannten Bereich am 3'Ende enthält. Das positive Fragment wurde dann über die entsprechende Schnittstelle an das bereits durch RT-PCR klonierte cDNA-Fragment angehängt.

4.2.1.11 Klonierung von DNA-Fragmenten

PCR-Fragmente wurden nach der Aufreinigung aus Agarosegelen je nach verwendeter Polymerase kloniert. Fragmente bei denen ausschließlich *Taq*-Polymerase zur Vervielfältigung benutzt wurde, wurden mittels der dabei entstehenden 3'Adenosinüberhänge in den TOPO-TA-Vektor (Invitrogen) kloniert. Polymerasen mit Korrekturfunktion ergeben sehr wenige PCR-Fragmente mit Überhängen, sondern in der Überzahl stumpfe Enden. Solche Fragmente wurden über die Ligation stumpfer Enden in den Vektor pETBlue1 (Novagen, Bad Soden) oder mittels des Zero Blunt Systems (Invitrogen) in den Vektor pCRBlunt eingefügt.

Ausnahme dabei war die Klonierung des großen α -Dystroglycan-Fragments in den pCRIITOPO-Vektor, da hier trotz Polymerase mit Korrekturlesefunktion über Adenosinüberhänge kloniert wurde.

Die Klonierung von DNA-Fragmenten die aus Restriktionen entstanden sind, wurden gemäß der verwendeten Schnittstellen in Vektoren eingefügt, die zuvor mit denselben Enzymen verdaut wurden. Dies ermöglicht eine vorgegebene Orientierung des Fragments. So wurde der Vektor pET28a (Novagen) zuvor mit BamHI und HindIII verdaut und das AB-Dyg Fragment mittels derselben Enzyme aus pETBlue1 herausgeschnitten und eingesetzt. Das Apal Fragment aus dem Cosmid Lo wurde in den zuvor mit Apal verdauten Vektor pCRDyg1-5 eingesetzt. Hierbei war darauf zu achten, daß der Vektor mit nur einem Enzym geschnitten wurde und deshalb die Wahrscheinlichkeit der Religation sehr hoch war. Daher wurde dieser Vektor nach dem Verdau zur Vermeidung der Religation dephosphoryliert. Der Vektor pCMV-Tag1 (Stratagene, Amsterdam) wurde mit BglII und XhoI verdaut, bevor das aus pCRBlunt herausgeschnittene Gesamt-Dystroglycan-Fragment eingesetzt wurde.

Plasmid – Liste:

Plasmidname	Vektor	Matrize		Primer1/Enzym	Primer2/Enzym
pCRDyg1-5	pCRII-TOPO	Muskel cDNA	PCR	Dyg1	DGGSP11
pDagApa7	pBSK-	Cosmid Lo	Rest.	Apal	
pCRDAG1	pCRDyg1-5	pDagApa7	Rest.	Apal	Apal
pBDAGBX	pCRBLUNT	pCRDAG1	PCR	DGGSP35	DGGSP36
pDyg2T	pCMV-Tag1	pBDAGBX	Rest.	BglII	XhoI
pETBAB-Dyg	pETBlue1	Muskel cDNA	PCR	AB-Dyg-BamHI	AB-Dyg-HindIII
pETAB-Dyg	pET28a	pETBAB-Dyg	Rest.	BamHI	XhoI

4.2.1.12 Transformation

Durch die Transformation werden Plasmide in kompetente *E.coli*-Zellen übertragen. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgt mittels Antibiotika-Agarplatten. Bei Vektoren, die das lacZ Gen in der multiplen Restriktionsregion enthalten, kann mittels der sogenannten Blau-Weiß-Selektion auf X-Gal enthaltenden Agarplatten überprüft werden, welche Bakterien ein Plasmid mit einem eingefügten DNA-Fragment enthalten. Besitzt der Vektor inserierte DNA, wird das Leseraster des lacZ-Gens verschoben, bzw. unterbrochen und die Bildung der β -Galaktosidase unterbleibt. Dementsprechend erscheinen Zellen, die rekombinante Plasmide tragen, als weiße Kolonien, da X-Gal nicht umgesetzt wird.

Zu 10 μL Ligationsansatz wurden 200 μL Calcium-kompetenten Zellen pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Durch den nachfolgenden Hitzeschock bei 42°C für 90 sec wurde die Aufnahme der Plasmide induziert. Der Ansatz wurde nochmals für 2 min auf Eis inkubiert, mit 400 μL LB-Medium versetzt und für 45 min bei 37°C geschüttelt. Das Ausplattieren erfolgte auf Antibiotika/X-Gal-Platten, die über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden.

4.2.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.2.1 SDS-Gelelektrophorese

Die größenabhängige Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Es wurden 4 %ige Sammelgele und 10 %ige oder 15 %ige Trenngele verwendet. Als Größenmarker wurden entweder 5 μl Prestained-Marker (Roth, Karlsruhe) oder 10 μl Standard Proteinmarker (Amersham Biosciences, Freiburg) eingesetzt. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Gelauftrag mit 2x Proteinprobenpuffer im Verhältnis 1:2 versetzt und für mindestens 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Proteinlaufpuffer (Sambrook et al., 1989) bei einer Stromstärke von 120V.

4.2.2.2 Coomassie-Färbung

Zur Darstellung der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden die Gele in einer Coomassieblaulösung (0,1% Coomassie-Brilliant-Blue R250 ,10 % Essigsäure, 40 % vergällter Ethanol) für 30 min auf dem Schüttler inkubiert und anschließend unter mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung (10 % Essigsäure und 30 % vergällter Ethanol) so lange entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben.

4.2.2.3 Silberfärbung

Im Vergleich zur Coomassiefärbung ist die Silberfärbung von SDS-Gelen um ein vielfaches sensitiver. Dabei werden an die Proteine gebundenen Silberionen unter Anwendung starker Reduktionsmittel (37 % Formaldehyd) zu metallischem Silber reduziert. Die Gele wurden mit EtOH fixiert, in H₂O rehydriert und die Proteine mit 10 μM DTT für 20 min reduziert. Nach der 20 min Inkubation mit 0,1 % Silbernitratlösung wurde mehrfach kurz mit H₂O gewaschen. Die Gele wurden in Entwicklerlösung bis zum Erscheinen zufriedenstellender Banden geschüttelt und die Reaktion dann mit Zitronensäure gestoppt. Nach 10 min Inkubation unter

Lichtausschluß wurden die Gele ausgiebig gewaschen und elektronisch dokumentiert.

4.2.2.4 Western-Blot

Beim Western Blot wurden die auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine in einer Elektrotankblot-Apparatur (Amersham Biosciences) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Elektrotransfer der Proteine wurde für 120 min bei einer Spannung von 100 V in Transferpuffer bei 4°C durchgeführt. Die Membran wurde nach dem Blotten für 1 min in Ponceau Rot (Sigma) gefärbt, dies ermöglicht es die Effizienz des Blots zu überprüfen. Nach dem Färben wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen über Nacht in TBS (50 mM Tris pH 7,4; 30 mM NaCl) mit 5 % Milchpulver inkubiert. Die Proteine wurden mittels Peroxidase-gekoppeltem Antikörpern (POD-Antikörper) indirekt detektiert. Als primärer Antikörper diente ein Protein-spezifischer Antikörper, an den dann der HRP Antikörper binden konnte. Die Membran mit den Proteinen wurde 3x auf dem Schüttler gewaschen, 2 Std mit 10 ml Erstantikörperlösung der entsprechenden Verdünnung inkubiert, anschließend 3x gewaschen, mit 10 ml HRP-Antikörper für 1 h inkubiert und erneut 3x gewaschen. Die Waschschriffe bis hierhin erfolgten jeweils in TBS/5 % Milchpulver für 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde noch 2x mit TBS für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Die Detektion des gebundenen HRP-Antikörpers erfolgte mittels eines Chemieluminiszenzsubstrates (195nM Coumarsäure/DMSO; 1.25mM Luminol/DMSO; 9,18‰ H₂O₂; in 100mM Tris pH 8,5) und photosensitiven Filmen (Amersham Biosciences).

4.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinkonzentrationen wurden mit der Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Dieses Testprinzip beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliantblau G250 in saurer Lösung von 465 nm zu 595 nm durch die Bindung des Farbstoffs an Protein. Die Bestimmung wurde in Halbmikroküvetten durchgeführt. Die Durchführung erfolgte mit dem BioRad System (BioRad, München) nach Anleitung. Zur Erstellung von Eichgeraden wurden bei jeder Messung definierte Verdünnungsreihen an Rinderserumalbumin (BSA) oder Immunglobuline als Standard mitgeführt.

4.2.2.6 Isolierung membrangebundener Proteine

Zur Ankonzentration membrangebundener Proteine wurde eine einfache Methode der Aufreinigung von Membranfraktionen gewählt. Das Gewebe wurde in 1 ml Homogenisationspuffer (0,1 M Phosphatpuffer, 220 mM Mannose, 70 mM Sucrose, 4 mM HEPES, 1 mM EDTA, 100 µg/ml PMSF, 1 µg/ml Pepstatin, 10 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin) pro 0,5 g Gewebe homogenisiert. Grobe Zellbestandteile wurden durch eine Zentrifugation bei geringer Umdrehungszahl (1000 x g, 3 min, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde dann bei hoher Drehzahl (10000 x g, 15 min, 4°C) zentrifugiert, um die Membranfraktion zu pelletieren. Die Membranfraktion wurde erneut in einer geringen Menge Homogenisationspuffer aufgenommen.

4.2.2.7 Methanol-Chloroform Fällung von Proteinen

Da Proteine im Zellkulturüberstand oft nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, müssen diese ankonzentriert werden. Dies wurde mittels einer Methanol-Chloroformfällung erreicht. Zu 100 µl Zellkulturüberstand wurden 400 µl Methanol gegeben, kräftig gemischt und bei 9000 x g für 10 min zentrifugiert. 100 µl Chloroform wurden zugesetzt, wiederum gemischt und ebenfalls bei 9000 x g für 10 min zentrifugiert. Nach der Zugabe von 300µl H₂O wurde gemischt und für 2 min bei 9000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde verworfen. Zur unteren und Interphase wurde 300µl Methanol gegeben, kräftig gemischt und 2 min bei 9000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde 30 min bei RT getrocknet und in DMEM aufgenommen.

4.2.2.8 Expression von rekombinantem Protein

Die Expression eines rekombinanten Proteins in *E.coli* ermöglicht die Herstellung eines exogenen Proteins in großen Mengen. Ein Vektor (pET28a; Novagen), der den prokaryontischen T7Promotor enthält, hinter dem sich das gewünschte Gen befindet, wurde in die Bakterien (BL21; Stratagene) transformiert. Die das Plasmid enthaltenden Bakterien wurden dann mit IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid) induziert, wodurch der T7-Promotor aktiviert wird. Das Protein wurde mittels des BugBuster Systems (Novagen) und des His-Bind Purification Systems (Novagen) aufgereinigt. Nach einer Induktionszeit von 2 Std wurden die Bakterien lysiert. Die Einschlusskörper, welche das Protein enthalten, wurden durch Zentrifugation angereichert. Die in wässriger Lösung unlöslichen Einschlusskörper wurden in 6M Harnstoff denaturiert. Durch Säulenchromatographie wurde das AB-

Dyg-His Protein über die Bindung der Histidine an Nickel aufgereinigt (Abb. 24). Der Harnstoff wurde mittels Dialyse gegen PBS der Proteinlösung entzogen. Der Vorgang der Proteinexpression und Aufreinigung wurde mittels SDS-Gelelektrophorese, anschließender Coomassie Färbung und Western Blot überprüft. 10 mg des so aufgereinigten Proteins konnten zur Immunisierung zweier Kaninchen verwendet werden (Abb. 24).

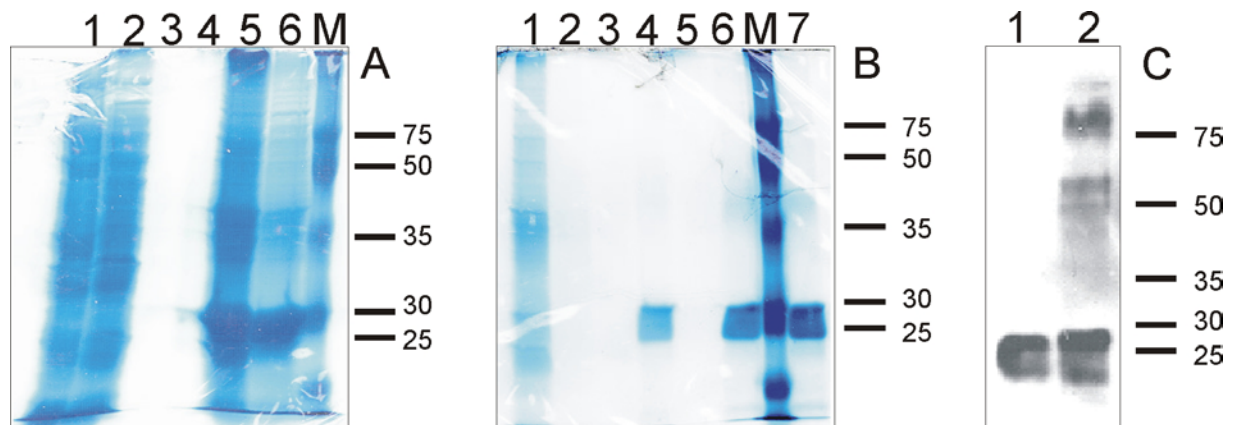


Abb. 24 Expression und Aufreinigung von AB-Dyg-His – In A sind die Schritte der Expression aufgetragen. 1) Lysat einer uninduzierten Bakterienkolonie, 2) der Überstand nach der Lyse, 3) und 4) Waschschrte der Einschlußkörperaufreinigung. 5) Pellet nach der Inkubation mit 6M Urea, 7) Überstand nach Inkubation mit 6 M Urea, In B sind die Schritte der Reinigung des Proteins aufgetragen. 1) Durchfluß durch die Säule nach Auftrag des Lysates (siehe A 6), 2) und 3) Waschschrte der Säule, 4) das Eluat und 5) Reinigung der Säule. 6) und 7) gereinigtes Protein; In C ein Blot mit einem Antikörper gegen Dystroglycan (α -Dyg sh) 1) gereinigtes Protein, 2) Lysat einer induzierten Bakterienkolonie

4.2.2.9 Aufreinigung der AB-Dyg-His Antikörper aus dem Serum

Das Antiserum aus den Kaninchen wurde nach 90 Immunisierungstagen entnommen. Die Isolierung der monospezifischen IgG-Fraktion aus dem Antiserum erfolgte mittels einer Affinitätschromatographie gegen das an Sepharose gekoppelten Proteins AB-Dyg-His. Die Immunisierung und Affinitätsreinigung wurde von der Firma Pineda Antikörper (Berlin) durchgeführt.

4.2.2.10 Reinigung der IgG Fraktion und Herstellung der Fab-Fragmente

Die Antikörper wurden in 25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,5 M NaCl, 1 mg/ml BSA und 0,1 % Natriumazid geliefert. Für die Injektionen war es nötig, diese in PBS zu überführen. Dazu wurden die Antikörper zuerst mit Affinity-Pak Protein Säulen (Pierce) gegen Protein A aufgereinigt. Die Säulen mit 2,5 ml Matrixvolumen wurden mit 12,5 ml 10 mM Tris pH 7,5 äquiliert. 8 ml der gereinigten IgG-Fraktion wurden aufgetragen. Nach dem Durchlauf wurde mit 25 ml 10 mM Tris gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden mit 6 ml 0,1 M Glycin pH 2-3 eluiert. Das Eluat mußte sofort mit 10 μ l 1M Tris pH 7,5 pro 100 μ l Eluat eingestellt werden. Je nach

Verwendungszweck folgte dann eine Dialyse gegen PBS (Gibco) oder 20 mM Natriumphosphat / 10 mM EDTA pH 7,5.

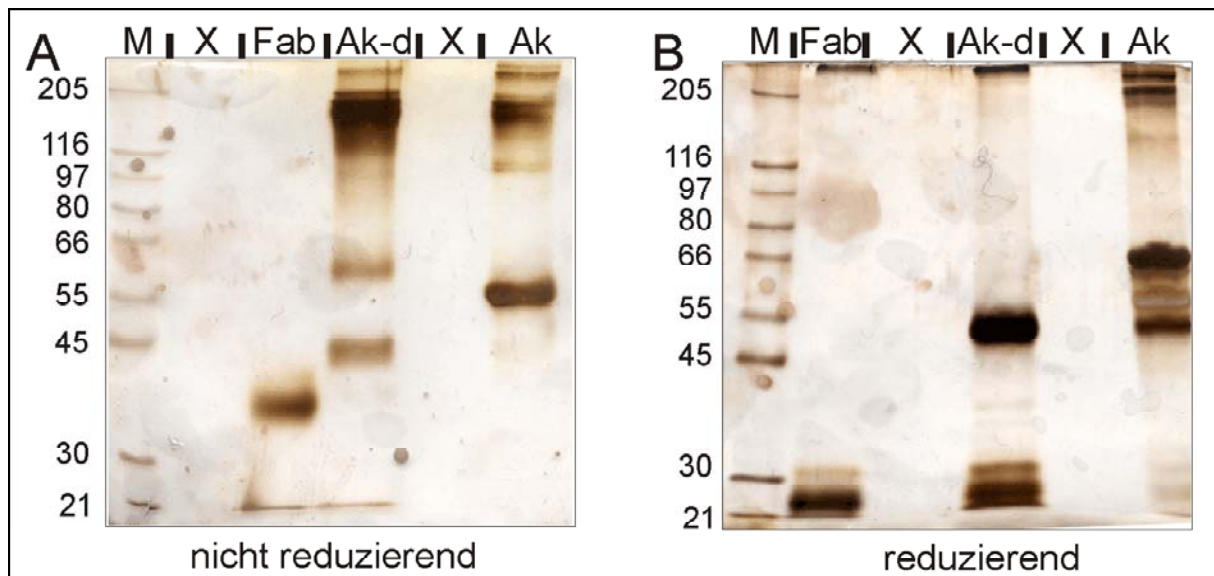


Abb. 25 Herstellung und Aufreinigung von Fab-Fragmenten – Silbergele nach Auftrennung von Fab - Fragmenten und Antikörpern unter A) nicht reduzierenden und B) reduzierenden Bedingungen. In A) laufen die Fab-Fragmente (Fab) bei ca. 42 kDa, während die Antikörper (Ak-d; Ak) bei ca. 150 kDa laufen. Die starke Bande bei ca. 66 kDa in Ak entspricht Rinderserumalbumin (BSA), das in dieser Probe noch vorhanden ist, diese fehlt bei Ak-d, da diese Proben schon dialysiert und Protein A gereinigt sind, dadurch wird das BSA abgetrennt. Die Banden bei ca. 66 und 45 kDa entspricht teilweise reduzierten Antikörpern. Die Größenangaben können hier nur als ca. Werte angenommen werden, da unter nicht reduzierenden Bedingungen das Laufverhalten verändert ist und nicht exakt mit dem des Markers übereinstimmt. In B) laufen die Fab-Fragmente bei ca. 25 kDa. Die Antikörper werden unter diesen Bedingungen in leichte Kette (25 kDa) und schwere Kette (50 kDa) aufgespalten. Die 66 kDa Bande in Ak entspricht wieder BSA. Die Antikörper und Fab-Fragmente die zur Injektion verwendet wurden zeigen einen hohen Reinheitsgrad.

Fab-Fragmente bestehen aus der variablen Region von Antikörpern plus eines Teils der konservativen Regionen der leichten und schweren Kette. Die Fc-Region, die zwei Fab-Fragmente miteinander verbindet wird abgespalten. Dadurch entstehen nur noch monovalente Stücke von Antikörpern, die jeweils nur ein Antigen binden können und so nicht zu einer Kreuzvernetzung beitragen können. Die Herstellung der Fab-Fragmente erfolgte mit dem ImmunoPure Fab- System (Pierce, Bonn). Dabei wurden die Antikörper in Natriumphosphat/EDTA eingesetzt. Diese wurden mit an Sepharose gekoppeltem Papain bei 37°C über Nacht enzymatisch gespalten. Das Papain wurde danach wieder abgetrennt. Die Fc-Fragmente wurden mittels der Säulenchromatographie über Protein A Bindung von den Fab-Fragmenten getrennt. Die Kontrolle der Fab-Fragmente erfolgte über SDS-Gelelektrophorese und anschließender Silberfärbung (Abb. 25).

4.2.2.11 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ist eine Methode, mit der man über Antikörperbindung spezifisch Proteine aus einem Zelllysat oder einem Proteingemisch aufreinigen kann. Dazu werden die Antikörper an ein unlösliches Substrat, in diesem Fall Agarose-Kügelchen, gebunden. Dieses kann man dann über Zentrifugation pelletieren und dadurch werden die gebundenen Proteine präzipitiert. Um das in HEK-Zellen rekombinant exprimierte α -Dystroglycan aufzureinigen, wurden mit anti-FLAG-Antikörpern beladene Agarose-Kügelchen (Sigma) eingesetzt.

Als Quelle für α -Dystroglycan wurde Zelllysat der stabil transfizierten Zelllinie IID8 verwendet. Die Zellen in einer 175cm² Kulturflasche wurden kurz mit PBS gewaschen und danach mit 1 ml IP-Lyispuffer (10 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 1,25 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 0,05 % Tween 20; 0,5 % Triton X100; 1 % NP40 bzw. Ipegal) versetzt und vom Kulturflaschenboden gelöst. Die Suspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Zum Scheren der Zellen wurde das Lysat mit einer Spritze mehrmals durch eine 22G Kanüle gezogen. Dieser Vorgang wurde mit einer 26G Kanüle wiederholt. Die Zellen wurden weitere 20 min auf Eis inkubiert. Zur Sedimentierung ungelöster Bestandteile wurde das Lysat 10 min bei 10000g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Ein halber Milliliter der Lysates wurde mit 40µl nach Anleitung des Herstellers aufbereiteten Agarose-Kügelchen versetzt und 1-2 Std bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Die Suspension wurde kurz bei 10000g zentrifugiert und der Überstand mittels einer Insulin-Spritze abgenommen, letzteres verhindert den Verlust zu vieler Agarose-Kügelchen. Die Agarose-Kügelchen wurden anschließend mit 500µl IP-Waschpuffer (wie IP-Lyispuffer aber ohne Triton und Ipegal) kurz geschüttelt und erneut pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und aufgehoben. Nach drei Waschsritten wurden die Agarose-Kügelchen mit 50 µl SDS-Probenpuffer mit β -Mercaptoethanol für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde der Probenpuffer abgenommen und als Eluat aufgehoben. Zur Analyse wurden Proben vom Lysat, dem Überstand, den Waschsritten (je 10 µl + 10 µl SDS-Probenpuffer) und Eluat (10 µl) auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen und aufgetrennt.

4.2.2.12 Coimmunpräzipitation

Die Coimmunpräzipitation dient zum Nachweis von Proteininteraktionen. In diesem Fall der Interaktion von α -Dystroglycan und dem rekombinanten Protein AB-Dyg-His. Die Immunpräzipitation erfolgte wie oben beschrieben, außer daß keine

Elution mit SDS-Proben-Puffer erfolgt, sondern die Agarose-Kügelchen in 100 µl IP-Waschpuffer aufgenommen wurden. Zu den Agarose-Kügelchen, an die α -Dystroglycan gebunden ist, konnte dann das AB-Dyg-His Protein und die Antikörper und Präimmenserum gegeben werden. Darauf folgte eine erneute Inkubation der Agarose-Kügelchen für 2h bei RT auf einem Eppendorf-Schüttler. Die Agarose-Kügelchen wurden drei mal mit 100µl IP-Waschpuffer gewaschen und die Proteine mit 50 µl SDS-Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol für 5 min bei 95 °C eluiert. Dadurch wurden lediglich die Proteine von den Agarose-Kügelchen gelöst, aber der Antikörper nicht denaturiert. Wie oben beschrieben wurden die Proben auf einem 15 % SDS-Gel analysiert.

4.2.3 Zellbiologische Methoden

4.2.3.1 Kultivierung von HEK293 Zellen

Die verwendeten HEK293 Zellen wurden von der Firma ACC bezogen. Als Kulturmedium wurde DMEM mit 10 % FKS, 1 % Pyruvat und 1%Penicillin/Streptomycin verwendet. Die Zellen wurden zwei mal pro Woche verdünnt und in neue Kulturflaschen umgesetzt.

Für Versuchsansätze, für die ein geringes Kulturvolumen erforderlich war, wurden die Zellen in 24- Schalen Gewebepplatten auf Deckgläschen kultiviert, die den Gewebepplatten entnommen werden konnten. Diese Deckgläschen mußten zuvor mit verschiedenen Substraten beschichtet werden, um eine Adhäsion der Zellen zu ermöglichen. Für die Fibronectinbeschichtung wurden sterile Deckgläschen mit 0,1 mg/ml Fibronectin (Sigma) in PBS 2 Std. bei 37°C inkubiert und 3 x mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden 3x mit PBS gewaschen und bis zur Aussaat der Zellen in DMEM bei 37°C aufbewahrt. Für die Lamininbeschichtung wurden sterile Deckgläschen zuerst mit 2h bei 37°C mit 0,05% Poly-L-Lysin (Sigma) in PBS inkubiert und 3x mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 10µg/ml Laminin (Sigma) in PBS 2 Std. bei 37°C. Die Deckgläschen wurden ebenfalls 3x mit PBS gewaschen und aufbewahrt.

4.2.3.2 Transiente und stabile Transfektion von HEK 293 Zellen

Die genetische Veränderung von tierischen und humanen Zellen eröffnet vielfältige Möglichkeiten zur funktionellen Analysen, sowie zur Produktion rekombinanter Proteine. Das Einbringen von Fremdgenen in eukaryontische Zellen nennt man Transfektion. Die DNA liegt zumeist in Form eines bakteriellen Plasmids

vor, das einen eukaryontischen Promotor enthält. Die Transfektionen wurden mit Lipofectamin2000 (Invitrogen) durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Liposomentransfektion, dies sind Kügelchen aus einer Lipiddoppelschicht, welche die zu transportierende DNA einschließen. Wenn sie mit den Membranen von Zellen verschmelzen, setzen sie die DNA ins Zellinnere frei. Die Transkription des eukaryontischen Promotors beginnt und das Fremdgen wird exprimiert. Bei der transienten Transfektion liegt diese Expressionsplasmid nur vorübergehend (transient) in der Zelle vor. Somit exprimieren nach der Transfektion 10 – 50 % der Zellen das entsprechende Protein für 12 bis 24 Std. Die Transfektion wurde mit ca. 75 % konfluenten HEK293 Zellen in einer 35 mm Schale mit 9µg pDyg2T und 36µl Lipofectamin2000 in DMEM durchgeführt. Am folgenden Tag wurden die transient transfizierten Zellen für die Analysen verwendet.

Durchschnittlich 0,1 % der Zellen nehmen das Fremdgen in ihr Genom auf. Bei der stabilen Transfektion werden die Zellen mittels eines Antibiotikums (Gentamycin) unter Selektionsdruck gestellt. Da das Plasmid (pDyg2T) zusätzlich zu dem Gen für Dystroglycan auch noch ein Resistenzgen gegen Gentamycin enthält, können Zellen, die das Gen ins Genom inseriert haben, überleben. Die Transfektion wurde mit ca. 75 % konfluenten HEK293 Zellen in einer 35 mm Schale mit 9µg pDyg2T und 36µl Lipofectamin2000 in DMEM durchgeführt. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und 1000 µg/ml Gentamycin zugegeben. Dieses Selektionsmedium wurde alle drei Tage erneuert. Nach 4maligem Mediumwechsel waren sehr viele Zellen abgestorben und die Ausläufer noch lebender Zellen konnten darunter erkannt werden. Die Zellen wurden von Schalenboden gelöst und vereinzelt. Zellen, die den Selektionsdruck überleben, adhäreren im Gegensatz zu den toten Zellen wieder. Nach einem erneuten Mediumwechsel waren nur noch Zellen vorhanden, die das Resistenzgen besitzen. Diese wurden bei ausreichender Dichte in Medium aufgenommen und soweit verdünnt, daß sie in den Konzentrationen von 10 Zellen/ml, 20 Zellen/ml und 30 Zellen/ml vorlagen. Jeweils 100µl dieser Verdünnungen wurden in die Vertiefung einer 96-Schalen Gewebekulturplatte überführt. Diese Platten wurden im Brutschrank inkubiert, bis in einzelnen Vertiefungen erste Zellklone sichtbar waren. Bereits dichtere Klone wurden einmal resuspendiert. Sobald die HEK Zellen den Boden einer Vertiefung komplett bedeckten, wurden sie in die Vertiefung einer 24-Schalen Gewebekulturplatte überführt. Ab diesem Zeitpunkt wurde dem Medium kein Selektionsantibiotikum mehr

zugesetzt. Sobald die HEK Zellen wiederum den Boden dieser Vertiefung überwachsen hatten, wurden sie in eine 35 mm Schale überführt. Bei ausreichender Dichte wurden die Zellen in einer 25 cm² Flasche kultiviert. Die Dystroglycan-Expression sowohl der transient, als auch der stabil transfizierten Zellen wurde mittels Western Blot und Immunzytochemie untersucht.

4.2.3.3 Aufreinigung von Protein aus transfizierten HEK Zellen

Für die Analyse der Protein-Expression mittels Western Blot wurden die transfizierten Zellen einer 25 cm² Flasche in 1,5 ml Lysispuffer (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % NP40, 0,5 % Triton X-100) aufgenommen und zur Homogenisation mehrfach durch die Kanüle (20G) einer Spritze gezogen. Dem Lysispuffer wurde das Complete Protease Inhibitor Reagenz (Roche, Mannheim) zugesetzt. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt und 3 µg Protein pro Spur im SDS-PAGE für den Western Blot verwendet.

4.2.3.4 Immunzytochemische Analyse der Proteinexpression in HEK Zellen

Eine einfache und schnelle Methode, um die Protein Expression von transfizierten HEK Zellen zu überprüfen, ist die Immunzytochemie. Dabei wird das exprimierte Protein über indirekte Immunfluoreszenz mittels Antikörperbindungen nachgewiesen. Die HEK Zellen wurden auf fibronectinbeschichteten Deckgläschen kultiviert bzw. transfiziert. Die Zellen wurden mit 4 % PFA 5 min fixiert. Die Immunzytochemie erfolgte wie unter 4.2.4.3 beschrieben.

4.2.4 **Neuroanatomische Methoden**

4.2.4.1 Injektionen von Antikörpern in die embryonale Hühneraugen

Ziel war es, die Proteininteraktion zwischen α - und β -Dystroglycan mittels Antikörperperturbation zu stören. Dazu wurden affinitätsgereinigte Antikörper und daraus hergestellte Fab-Fragmente in das rechte Auge von Hühnerembryonen injiziert. Eier des entsprechenden Stadiums wurden aus dem Brutschrank entnommen. Um den Embryo etwas abzusenken und damit von der Schale zu lösen wurde die Eierschale sowohl am stumpfen Ende des Eies, als auch direkt über dem Embryo durchstoßen. Dadurch wurde die Luftblase direkt über den Embryo verlagert. Die Schale wurde vorsichtig auf einer Fläche von ca. 4 cm² über dem Embryo entfernt. Die Vitellinmembran wurde sehr vorsichtig von der dorsalen Seite des Embryos her entfernt. Dabei ist darauf zu achten, daß keine größeren Blutgefäße verletzt werden. Mittels einer mit einem Puller ausgezogenen Glaskapillare wurden

nun 0,6 – 1 µg des Antikörpers bzw. der Fab-Fragmente in einem Volumen von 6 bis 10 µl injiziert, so daß eine Endkonzentration von ca. 0,2 µg/ml vorlag. Das Volumen richtete sich nach dem Entwicklungsstadium und nach der daraus resultierenden Größe des Auges. Die Injektion erfolgt mittels eines Luftdruck von ca. 1,25 Bar. Bei diesem Druck war der Ausstrom aus der Kapillare unter der Stereolupe gut zu kontrollieren, so daß keine Luftblasen injiziert wurden. Die Einstichstelle befand sich reproduzierbar zwischen der Fissur und einem lateral dazu gelegenen Blutgefäß am inneren, ventrotemporalen Rand der Iris, des rechten Auges. Ebenso war der Einstichwinkel und die Einstichtiefe reproduzierbar. Nach der Injektion wurde der Rand der Eiöffnung mit etwas Silikonsalbe bestrichen und die Eiöffnung mit Frischhaltefolie abgedeckt.

Injiziert wurden die affinitätsgereinigten Antikörper ABT1 und ABT2, sowie Fab-fragment von AB-Dyg-His T2. Als Kontrolle wurde gegen PBS dialysiertes Präimmenserum von Kaninchen 2, ein alternativer Antikörper gegen α -Dystroglycan und reines PBS eingesetzt.

Die Überlebensrate der Embryonen liegt pro Injektion bei ca. 60 – 80 %. So daß von 12 injizierten Embryonen nach drei Injektionen 2 bis 6 Embryonen zur Analyse verbleiben.

4.2.4.2 Präparation und Anfertigung von Kryoschnitten von embryonalen Hühneraugen

Vierundzwanzig Stunden nach der letzten Injektion wurden die Embryonen aus dem Ei entnommen und dekapitiert. Die Augen wurden vorsichtig aus dem Kopf entnommen und das umliegende Bindegewebe entfernt. Die Fixierung des Gewebes erfolgte in 4 % Paraformaldehyd in PBS für 10 oder 30 min. Nach der Fixierung wurden die Augen in 30 % Succrose für mindestens 3 Std, jedoch maximal 5 Std inkubiert. Zur Anfertigung von Kryoschnitten wurden die Augen der Succroselösung entnommen und in Tissue Tek Einbettmedium mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Kryoschnitte mit einer Dicke von 11 – 15 µm wurden angefertigt und auf Gelatine/Chromalaun beschichtete Objektträger aufgenommen. Die so angefertigten Schnitte wurden 1 – 2 Std getrocknet und bei –20°C gelagert.

Bei der Markierung postmitotischer Zellen wurden 100 µl BrdU (10 mg/ml) zu den Embryonen ins Ei gegeben. Nach 3 Std. Inkubationszeit wurden die Augen präpariert. Zum Nachweis der injizierten Antikörper wurden die Augen bereits 3 Std nach der Injektion präpariert und gefärbt.

4.2.4.3 Immunzytochemie

Die Immunzytochemische Anfärbung von Geweben erfolgte mittels der indirekten Immunfluoreszenz. Dazu wurden die bei -20°C gelagerten Kryoschnitte auf Raumtemperatur gebracht. Durch eine Inkubation mit der Blocklösung (1 % BSA/ 0,1 % Triton X100/ PBS) wurden unspezifische Bindungsstellen im Gewebe abgesättigt. In derselben Lösung erfolgte die Inkubation des Gewebes mit dem primären Antikörper in geeigneter Verdünnung für 2 Std bei RT oder 4°C über Nacht. Der Überschuss an Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit Waschlösung (0,1 % BSA/ 0,1 % Triton X100/ PBS) entfernt. Hierauf folgte die Inkubation mit dem entsprechenden fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper in Blocklösung. Auch hier wurde der Überschuss wieder durch Waschen entfernt. Für die Markierung von Zellkernen wurde im letzten 10 minütigen Waschschritt DAPI zugegeben. Das Gewebe wurde mit eiskaltem EtOH abs. entwässert und mit Citifluor (Citifluor, London) eingebettet. Die Analyse erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossener digitaler Kamera (Leica, Wetzlar).

4.2.4.4 Quantitative Auswertung der BrdU-positiven Zellen

Zur quantitativen Analyse der BrdU-positiven Zellen in der Retina wurden drei unabhängige Präparate ausgesucht. Die in diesen Präparaten enthaltenen Wucherungen hatten ein ungefähr gleiches Ausmaß. Diese Selektion verhindert zu hohe Schwankungen, da die Wucherungen zu verschiedenem Maße induziert werden können. Innerhalb dieser Wucherungen wurden die BrdU-positiven Zellen innerhalb von $100\mu\text{m}$ großen Retinasegmenten gezählt. Der Mittelwert dieser Zählungen wurde diesem Präparat zugeordnet. Als Kontrolle wurden drei Kontrollpräparate ausgewählt. Bei der Auszählung wurde darauf geachtet zu den Verdickungen vergleichbare Retinaabschnitte auszuwerten, um entwicklungsabhängige Differenzen zu minimieren. Auch hier wurden $100\mu\text{m}$ Segmente ausgezählt. Der Mittelwert dieser Zählung wurde dem Präparat zugeordnet. Mit diesen Werten wurde eine statistische Analyse anhand des Students t-Test durchgeführt.

4.2.5 EDV

Sequenzbearbeitungen wurden mit den Programmen Chromas (Technoelysium), Lasergene (DNASar), Vector NTI (Informax) und Husar (DKFZ), sowie dem BLAST Tool des NCBI durchgeführt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Corel Draw 10 (Corel) und Adobe Photoshop 5.5 (Adobe). Für die densitometrische

Analyse der Western Blots wurde das Programm Molecular Analyst verwendet. Statistische Analysen wurden mit dem Analyse-It Tool für Excel 2000 durchgeführt. Diese Arbeit wurde in Word 2000 (Microsoft) geschrieben.

5 Zusammenfassung

Alpha- und Beta-Dystroglycan sind die zentralen Komponenten des Dystrophin-Assoziierten-Glykoproteinkomplexes (DAG). Der DAG ist ein oligomerer Proteinkomplex, der in den Muskelfasern die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett verbindet und dadurch der Muskulatur die mechanische Stabilität bei der Kontraktion verleiht. Mutationen des DAG sind die genetische Grundlage für verschiedene Formen von muskulären Dystrophien. Muskuläre Dystrophien sind Krankheiten, die durch eine progressive Degeneration der Muskulatur charakterisiert sind, aber auch verschiedene ZNS-Defekte aufweisen. Die Funktion des DAG im ZNS ist bisher unbekannt.

In dieser Arbeit wurde die Funktion von Dystroglycan während der Entwicklung des Nervensystems am Beispiel der Huhn-Retina untersucht. In der frühen Retinaentwicklung ist Dystroglycan in den Endfüßen der radiären neuroepithelialen Vorläuferzellen an der Kontaktstelle zur Basallamina der inneren Grenzmembran konzentriert. Grundlage für die funktionellen Untersuchungen war die Klonierung von Huhn-Dystroglycan. Dieses weist sehr hohe Homologien zu Dystroglycan anderer Spezies auf. Anhand der neuen Sequenzdaten wurden Antikörper hergestellt, die spezifisch die Interaktionsdomänen zwischen α - und β -Dystroglycan im Huhn erkennen und die Verbindung der beiden Proteine inhibieren können. Die Antikörper und entsprechende Fab-Fragmente wurden *in ovo* in die Augen von Hühnerembryonen injiziert, um so die Funktion von Dystroglycan zu stören. Die Injektion der Antikörper führte zu einer partiellen Verdickung des Retinagewebes. Innerhalb dieser retinalen Verdickungen verloren die radiären Zellen ihre langgestreckte Morphologie und rundeten sich ab. Eine Funktion von Dystroglycan in den Endfüßen der neuroepithelialen Vorläuferzellen könnte die Aufrechterhaltung der langgestreckten Morphologie dieser Zellen sein. Dazu könnte der DAG, wie in der Muskulatur, eine Verbindung zwischen extrazellulärer Matrix und Zytoskelett herstellen. Neben der Veränderung der Form der radiären Zellen, erhöhte sich auch deren Proliferationsrate. Eine Störung der Dystroglycan-Interaktion wirkt sich also auch direkt oder indirekt auf den Zellzyklus aus und führt zur Hyperproliferation. Die Differenzierung postmitotischer Zellen ist nicht gestört, es bildeten sich sogar wesentlich mehr Neurone. Diesen war es jedoch nicht mehr möglich, die normale Schichtung der Retina auszubilden. Es ist anzunehmen, daß

den Neuronen die langgestreckten Fortsätze der nun runden neuroepithelialen Vorläuferzellen als Leitstrukturen für eine exakte Migration fehlen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind ein erster Hinweis darauf, daß Dystroglycan für die Adhäsion der Endfüße radiärer Zellen an die Basalmembran verantwortlich ist und Einfluß auf die Proliferation und Migration in der frühen Entwicklung des Nervensystems hat. Störungen dieser Funktionen könnten die Ursache für die späteren ZNS-Symptome von Dystrophiepatienten sein.

6 Literaturverzeichnis

- Ahn, A. H., Freener, C. A., Gussoni, E., Yoshida, M., Ozawa, E., und Kunkel, L. M.** (1996). The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 2724-2730.
- Ali, S. A., Pappas, I. S., und Parnavelas, J. G.** (1998). Collagen type IV promotes the differentiation of neuronal progenitors and inhibits astroglial differentiation in cortical cell cultures. *Brain Res.Dev.Brain Res.* **110**, 31-38.
- Anderson, J. T., Rogers, R. P., und Jarrett, H. W.** (1996). Ca²⁺-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 6605-6610.
- Bao, W., Thullberg, M., Zhang, H., Onischenko, A., und Stromblad, S.** (2002). Cell attachment to the extracellular matrix induces proteasomal degradation of p21(CIP1) via Cdc42/Rac1 signaling. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 4587-4597.
- Barnstable, C. J. und Drager, U. C.** (1984). Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience* **11**, 847-855.
- Beltran-Valero, D. B., Currier, S., Steinbrecher, A., Celli, J., Van Beusekom, E., Van Der, Z. B., Kayserili, H., Merlini, L., Chitayat, D., Dobyns, W. B., Cormand, B., Lehesjoki, A. E., Cruces, J., Voit, T., Walsh, C. A., Van Bokhoven, H., und Brunner, H. G.** (2002). Mutations in the O-Mannosyltransferase Gene POMT1 Give Rise to the Severe Neuronal Migration Disorder Walker-Warburg Syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* **71**, 1033-1043.
- Bewick, G. S., Nicholson, L. V. B., Young, C., und Slater, C. R.** (1993). Relationship of a dystrophin-associated glycoprotein to junctional acetylcholine receptor clusters in rat skeletal muscle. *Neuromuscular Disorders* **3**, 503-506.
- Blake, D. J., Tinsley, J. M., Davies, K. E., Knight, A. E., Winder, S. J., und Kendrick-Jones, J.** (1995). Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. [Review] [32 refs]. *Trends in Biochemical Sciences* **20**, 133-135.
- Blake, D. J., Tinsley, J. M., und Davies, K. E.** (1996). Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol.* **6**, 37-47.
- Blake, D. J., Nawrotzki, R., Loh, N. Y., Górecki, D. C., und Davies, K. E.** (1998). Beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 241-246.
- Blake, D. J. und Kröger, S.** (2000). The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends in Neurosciences* **23**, 92-99.

- Blank, M., Koulen, P., und Kröger, S.** (1997). Subcellular concentration of β -dystroglycan in photoreceptors and glial cells of the chick retina. *Journal of Comparative Neurology* **389**, 668-678.
- Blank, M., Koulen, P., Blake, D. J., und Kröger, S.** (1999). Dystrophin and beta-dystroglycan in photoreceptor terminals from normal and *mdx*^{3Cv} mouse retinae. *European Journal of Neuroscience* **11**, 2121-2133.
- Blank, M., Blake, D. J., und Kröger, S.** (2002). Molecular diversity of the dystrophin-like protein complex in the developing and adult avian retina. *Neuroscience* **111**, 259-273.
- Bowe, M. A., Deyst, K. A., Leszyk, J. D., und Fallon, J. R.** (1994). Identification and purification of an agrin receptor from *Torpedo* postsynaptic membranes - a heteromeric complex related to the dystroglycans. *Neuron* **12**, 1173-1180.
- Bowe, M. A., Mendis, D. B., und Fallon, J. R.** (2000). The small leucine-rich repeat proteoglycan biglycan binds to alpha-dystroglycan and is upregulated in dystrophic muscle. *Journal of Cell Biology* **148**, 801-810.
- Bozzi, M., Veglia, G., Paci, M., Sciandra, F., Giardina, B., und Brancaccio, A.** (2001). A synthetic peptide corresponding to the 550-585 region of alpha-dystroglycan binds beta-dystroglycan as revealed by NMR spectroscopy. *FEBS Letters* **499**, 210-214.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brenman, J. E., Chao, D. S., Xia, H., Aldape, K., und Brettt, D. S.** (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **82**, 743-752.
- Brenman, J. E., Chao, D. S., Gee, S. H., McGee, A. W., Craven, S. E., Santillano, D. R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M. F., Froehner, S. C., und Brettt, D. S.** (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* **84**, 757-767.
- Brockington, M., Blake, D. J., Prandini, P., Brown, S. C., Torelli, S., Benson, M. A., Ponting, C. P., Estournet, B., Romero, N. B., Mercuri, E., Voit, T., Sewry, C. A., Guicheney, P., und Muntoni, F.** (2001). Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha 2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *American Journal of Human Genetics* **69**, 1198-1209.
- Brockington, M., Blake, D. J., Prandini, P., Brown, S. C., Torelli, S., Benson, M. A., Ponting, C. P., Estournet, B., Romero, N., Voit, T., Sewry, C. A., Guicheney, P., und Muntoni, F.** (2001). A novel glycosyltransferase is mutated in a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha 2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *American Journal of Human Genetics* **69**, 268.

- Brockington, M., Yuva, Y., Prandini, P., Brown, S. C., Torelli, S., Benson, M. A., Herrmann, R., Anderson, L. V. B., Bashir, R., Burgunder, J. M., Fallet, S., Romero, N., Fardeau, M., Straub, V., Storey, G., Pollitt, C., Richard, I., Sewry, C. A., Bushby, K., Voit, T., Blake, D. J., und Muntoni, F. (2001).** Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Human Molecular Genetics* **10**, 2851-2859.
- Brown, S. C., Fassati, A., Popplewell, L., Page, A. M., Henry, M. D., Campbell, K. P., und Dickson, G. (1999).** Dystrophic phenotype induced in vitro by antibody blockade of muscle alpha-dystroglycan-laminin interaction. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 2)**, 209-216.
- Campbell, K. und Gotz, M. (2002).** Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends in Neurosciences* **25**, 235-238.
- Campbell, K. P. (1995).** Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* **80**, 675-679.
- Cavaldesi, M., Macchia, G., Barca, S., Defilippi, P., Tarone, G., und Petrucci, T. C. (1999).** Association of the dystroglycan complex isolated from bovine brain synaptosomes with proteins involved in signal transduction. *J. Neurochem.* **72**, 1648-1655.
- Chan, Y. M., Bonnemann, C. G., Lidov, H. G. W., und Kunkel, L. M. (1998).** Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture. *Journal of Cell Biology* **143**, 2033-2044.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Chung, W. und Campanelli, J. T. (1999).** WW and EF hand domains of dystrophin-family proteins mediate dystroglycan binding. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* **2**, 162-171.
- Claudepierre, T., Rodius, F., Frasson, M., Fontaine, V., Picaud, S., Dreyfus, H., Mornet, D., und Rendon, A. (1999).** Differential distribution of dystrophins in rat retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **40**, 1520-1529.
- Claudepierre, T., Mornet, D., Pannicke, T., Forster, V., Dalloz, C., Bolanos, F., Sahel, J., Reichenbach, A., und Rendon, A. (2000).** Expression of Dp71 in Müller glial cells: A comparison with utrophin- and dystrophin-associated proteins. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **41**, 294-304.
- Claudepierre, T., Dalloz, C., Mornet, D., Matsumura, K., Sahel, J., und Rendon, A. (2000).** Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Müller glial cells. *J. Cell Sci.* **113**, 3409-3417.
- Cohn, R. D. und Campbell, K. P. (2000).** Molecular basis of muscular dystrophies [Review]. *Muscle & Nerve* **23**, 1456-1471.

- Cormand, B., Pihko, H., Bayes, M., Valanne, L., Santavuori, P., Talim, B., Gershoni-Baruch, R., Ahmad, A., Van Bokhoven, H., Brunner, H. G., Voit, T., Topaloglu, H., Dobyns, W. B., und Lehesjoki, A. E.** (2001). Clinical and genetic distinction between Walker-Warburg syndrome and muscle-eye-brain disease. *Neurology* **56**, 1059-1069.
- Cote, P. D., Moukhles, H., und Carbonetto, S.** (2002). Dystroglycan is not required for localization of dystrophin, syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase at the sarcolemma but regulates integrin alpha(7B) expression and caveolin-3 distribution. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 4672-4679.
- Crosbie, R. H., Heighway, J., Venzke, D. P., Lee, J. C., und Campbell, K. P.** (1997). Sarcospan, the 25-kda transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 31221-31224.
- Crosbie, R. H., Lebakken, C. S., Holt, K. H., Venzke, D. P., Straub, V., Lee, J. C., Grady, R. M., Chamberlain, J. S., Sanes, J. R., und Campbell, K. P.** (1999). Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex. *Journal of Cell Biology* **145**, 153-165.
- Cunningham, J. J. und Roussel, M. F.** (2001). Cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of the central nervous system. *Cell Growth Differ.* **12**, 387-396.
- Di Stasio, E., Sciandra, F., Maras, B., Di Tommaso, F., Petrucci, T. C., Giardina, B., und Brancaccio, A.** (1999). Structural and functional analysis of the N-terminal extracellular region of beta-dystroglycan. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **266**, 274-278.
- DiSalvo, C. V., Zhang, D., und Jacobberger, J. W.** (1995). Regulation of NIH-3T3 cell G1 phase transit by serum during exponential growth. *Cell Prolif.* **28**, 511-524.
- Drago, J., Nurcombe, V., und Bartlett, P. F.** (1991). Laminin through its long arm E8 fragment promotes the proliferation and differentiation of murine neuroepithelial cells in vitro. *Experimental Cell Research* **192**, 256-265.
- Drenckhahn, D., Holbach, M., Ness, W., Schmitz, F., und Anderson, L. V. B.** (1996). Dystrophin and the dystrophin-associated glycoprotein, β -dystroglycan, co-localize in photoreceptor synaptic complexes of the human retina. *Neuroscience* **73**, 605-612.
- Durbeej, M. und Campbell, K. P.** (2002). Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models [Review]. *Current Opinion in Genetics & Development* **12**, 349-361.
- Dyer, M. A. und Cepko, C. L.** (2000). p57(Kip2) regulates progenitor cell proliferation and amacrine interneuron development in the mouse retina. *Development* **127**, 3593-3605.
- Dyer, M. A. und Cepko, C. L.** (2001). p27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations. *Journal of Neuroscience* **21**, 4259-4271.

- Dyer, M. A. und Cepko, C. L.** (2001). Regulating proliferation during retinal development. *Nat.Rev.Neurosci.* **2**, 333-342.
- Dyer, M. A. und Cepko, C. L.** (2001). The p57Kip2 cyclin kinase inhibitor is expressed by a restricted set of amacrine cells in the rodent retina. *J.Comp Neurol.* **429** , 601-614.
- Ervasti, J. M. und Campbell, K. P.** (1993). Dystrophin and the membrane skeleton. [Review]. *Curr.Opin.Cell Biol.* **5**, 82-87.
- Esapa, C. T., Benson, M. A., Schroder, J. E., Martin-Rendon, E., Brockington, M., Brown, S. C., Muntoni, F., Kroger, S., und Blake, D. J.** (2002). Functional requirements for fukutin-related protein in the Golgi apparatus. *Human Molecular Genetics* **11**, 3319-3331.
- Fero, M. L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C. E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L. H., Broudy, V., Perlmutter, R. M., Kaushansky, K., und Roberts, J. M.** (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* **85**, 733-744.
- French, P. W. und Jeffrey, P. L.** (1986). Partial characterization of chicken Thy-1 glycoprotein by monoclonal antibodies. *Journal of Neuroscience Research* **16**, 479-489.
- Frigeri, A., Nicchia, G. P., Nico, B., Quondamatteo, F., Herken, R., Roncali, L., und Svelto, M.** (2001). Aquaporin-4 deficiency in skeletal muscle and brain of dystrophic mdx mice. *Faseb Journal* **15**, 90-98.
- Fukuyama, Y., Osawa, M., und Suzuki, H.** (1981). Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama t. *Brain Dev.* **3**, 1-29.
- Galileo, D. S., Majors, J., Horwitz, A. F., und Sanes, J. R.** (1992). Retrovirally introduced antisense integrin RNA inhibits neuroblast migration in vivo. *Neuron* **9** , 1117-1131.
- Gotz, M., Hartfuss, E., und Malatesta, P.** (2002). Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Res.Bull.* **57**, 777-788.
- Górecki, D. C., Derry, J. M., und Barnard, E. A.** (1994). Dystroglycan: brain localisation and chromosome mapping in the mouse. *Hum.Mol.Gen.* **3**, 1589-1597.
- Grady, R. M., Grange, R. W., Lau, K. S., Maimone, M. M., Nichol, M. C., Stull, J. T., und Sanes, J. R.** (1999). Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nature Cell Biology* **1**, 215-220.
- Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., Orban, P., Klein, R., Schittny, J. C., und Muller, U.** (2001). beta

1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron* **31**, 367-379.

- Grewal, P. K., Holzfeind, P. J., Bittner, R. E., und Hewitt, J. E.** (2001). Mutant glycosyltransferase and altered glycosylation of alpha-dystroglycan in the myodystrophy mouse. *Nature Genetics* **28**, 151-154.
- Halfter, W. und Schurer, B.** (1998). Disruption of the pial basal lamina during early avian embryonic development inhibits histogenesis and axonal pathfinding in the optic tectum. *Journal of Comparative Neurology* **397**, 105-117.
- Halfter, W.** (1998). Disruption of the retinal basal lamina during early embryonic development leads to a retraction of vitreal end feet, an increased number of ganglion cells, and aberrant axonal outgrowth. *Journal of Comparative Neurology* **397**, 89-104.
- Halfter, W., Dong, S., Schurer, B., Osanger, A., Schneider, W., Ruegg, M., und Cole, G. J.** (2000). Composition, synthesis, and assembly of the embryonic chick retinal basal lamina. *Developmental Biology* **220**, 111-128.
- Halfter, W., Dong, S. C., Balasubramani, M., und Bier, M. E.** (2001). Temporary disruption of the retinal basal lamina and its effect on retinal histogenesis. *Developmental Biology* **238**, 79-96.
- Halfter, W., Dong, S., Yip, Y. P., Willem, M., und Mayer, U.** (2002). A critical function of the pial basement membrane in cortical histogenesis. *Journal of Neuroscience* **22**, 6029-6040.
- Hammonds, R. G.** (1987). Protein sequence of *dmd* gene is related to actin-binding domain of alpha-actinin. *Cell* **51**, 1-1.
- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., und Gotz, M.** (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Developmental Biology* **229**, 15-30.
- Heid, H. W., Moll, I., und Franke, W. W.** (1988). Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. I. Human and bovine hair follicles. *Differentiation* **37**, 137-157.
- Helbling-Leclerc, A., Zhang, X., Topaloglu, H., Cruaud, C., Tesson, F., Weissenbach, J., Tome, F. M., Schwartz, K., Fardeau, M. und Tryggvason, K.** (1995). Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat. Genet.* **11**, 216-218.
- Henry, M. D. und Campbell, K. P.** (1996). Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 625-631.
- Henry, M. D. und Campbell, K. P.** (1998). A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell* **95**, 859-870.
- Hering, H., Koulen, P., und Kröger, S.** (2000). Distribution of the integrin β 1 subunit on radial cells in the embryonic and adult avian retina. *Journal of Comparative Neurology* **424**, 153-164.

- Hohenester, E., Tisi, D., Talts, J. F., und Timpl, R.** (1999). The crystal structure of a laminin G-like module reveals the molecular basis of alpha-dystroglycan binding to laminins, perlecan, and agrin. *Molecular Cell* **4**, 783-792.
- Holt, K. H., Crosbie, R. H., Venzke, D. P., und Campbell, K. P.** (2000). Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide. *FEBS Letters* **468**, 79-83.
- Holzfeind, P. J., Grewal, P. K., Reitsamer, H. A., Kechvar, J., Lassmann, H., Hoeger, H., Hewitt, J. E., und Bittner, R. E.** (2002). Skeletal, cardiac and tongue muscle pathology, defective retinal transmission, and neuronal migration defects in the Largemyd mouse defines a natural model for glycosylation-deficient muscle - eye - brain disorders. *Human Molecular Genetics* **11**, 2673-2687.
- Hosokawa, H., Ninomiya, H., Kitamura, Y., Fujiwara, K., und Masaki, T.** (2002). Vascular endothelial cells that express dystroglycan are involved in angiogenesis. *Journal of Cell Science* **115**, 1487-1496.
- Hulleman, E., Bijvelt, J. J., Verkleij, A. J., Verrips, C. T., und Boonstra, J.** (1999). Integrin signaling at the M/G1 transition induces expression of cyclin E. *Experimental Cell Research* **253**, 422-431.
- Hulleman, E. und Boonstra, J.** (2001). Regulation of G1 phase progression by growth factors and the extracellular matrix. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 80-93.
- Hyser, C. L. und Mendell, J. R.** (1988). Recent advances in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neurol. Clinics* **6**, 429-453.
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J. M., Leveille, C. J., Slaughter, C. A., Sernett, S. W., und Campbell, K. P.** (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* **355**, 696-702.
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Milatovich, A., Ozcelik, T., Yang, B., Koepnick, K., Francke, U., und Campbell, K. P.** (1993). Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum. Mol. Gen.* **2**, 1651-1657.
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Sheffield, V. C., und Campbell, K. P.** (1993). Single base polymorphism in the DAG1 gene detected by DGGE and mismatch PCR. *Hum. Mol. Gen.* **2**, 1983-1983.
- Ichida, F., Tsubata, S., Bowles, K. R., Haneda, N., Uese, K., Miyawaki, T., Dreyer, W. J., Messina, J., Li, H., Bowles, N. E., und Towbin, J. A.** (2001). Novel gene mutations in patients with left ventricular noncompaction or Barth syndrome. *Circulation* **103**, 1256-1263.
- Ilisley, J. L., Sudol, M., und Winder, S. J.** (2001). The interaction of dystrophin with beta-dystroglycan is regulated by tyrosine phosphorylation. *Cellular Signalling* **13**, 625-632.

- Jagadha, V. und Becker, L. E.** (1988). Brain morphology in Duchenne muscular dystrophy: a Golgi study. *Pediatr. Neurol.* **4**, 87-92.
- James, M., Nuttall, A., Ilsley, J. L., Ottersbach, K., Tinsley, J. M., Sudol, M., und Winder, S. J.** (2000). Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan regulates its interaction with utrophin. *Journal of Cell Science* **113**, 1717-1726.
- Jung, D., Yang, B., Meyer, J., Chamberlain, J. S., und Campbell, K. P.** (1995). Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 27305-27310.
- Kano, H., Kobayashi, K., Herrmann, R., Tachikawa, M., Many, H., Nishino, I., Nonaka, I., Straub, V., Talim, B., Voit, T., Topaloglu, H., Endo, T., Yoshikawa, H., und Toda, T.** (2002). Deficiency of alpha-dystroglycan in muscle-eye-brain disease. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **291**, 1283-1286.
- Khurana, T. S., Watkins, S. C., und Kunkel, L. M.** (1992). The subcellular distribution of chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in the brain. *Journal of Cell Biology* **119**, 357-366.
- Kobayashi, K., Nakahori, Y., Miyake, M., Matsumura, K., Kondo-Iida, E., Nomura, Y., Segawa, M., Yoshioka, M., Saito, K., Osawa, M., Hamano, K., Sakakihara, Y., Nonaka, I., Nakagome, Y., Kanazawa, I., Nakamura, Y., Tokunaga, K., und Toda, T.** (1998). An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* **394**, 388-392.
- Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C., und Kunkel, L. M.** (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* **50**, 509-517.
- Koenig, M., Monaco, A. P., und Kunkel, L. M.** (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* **53**, 219-226.
- Koulen, P., Blank, M., und Kröger, S.** (1998). Differential distribution of beta-dystroglycan in rabbit and rat retina. *Journal of Neuroscience Research* **51**, 735-747.
- Kröger, S. und Mann, S.** (1996). Biochemical and functional characterization of basal lamina-bound agrin in the chick central nervous system. *European Journal of Neuroscience* **8**, 500-509.
- Kuhn, T. B., Stoeckli, E. T., Condrau, M. A., Rathjen, F. G., und Sonderegger, P.** (1991). Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *Journal of Cell Biology* **115**, 1113-1126.
- Layer, P. G.** (1991). Cholinesterases during development of the avian nervous system. *Cell. Mol. Neurobiol.* **11**, 7-33.

- Levitt, P., Cooper, M. L., und Rakic, P.** (1981). Coexistence of neuronal and glial precursor cells in the cerebral ventricular zone of the fetal monkey: an ultrastructural immunoperoxidase analysis. *Journal of Neuroscience* **1**, 27-39.
- Levitt, P., Cooper, M. L., und Rakic, P.** (1983). Early divergence and changing proportions of neuronal and glial precursor cells in the primate cerebral ventricular zone. *Developmental Biology* **96**, 472-484.
- Lidov, H. G., Byers, T. J., Watkins, S. C., und Kunkel, L. M.** (1990). Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. *Nature* **348**, 725-728.
- Lidov, H. G., Byers, T. J., und Kunkel, L. M.** (1993). The distribution of dystrophin in the murine central nervous system: an immunocytochemical study. *Neuroscience* **54**, 167-187.
- Lidov, H. G.** (1996). Dystrophin in the nervous system. *Brain Pathol.* **6**, 63-77.
- Lund, A. H., Duch, M., und Pedersen, F. S.** (1996). Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation. *Nucleic Acids Res.* **24**, 800-801.
- Madhavan, R. und Jarrett, H. W.** (1999). Phosphorylation of dystrophin and alpha-syntrophin by Ca²⁺-calmodulin dependent protein kinase II. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular* **1434**, 260-274.
- Malatesta, P., Hartfuss, E., und Gotz, M.** (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* **127**, 5253-5263.
- Matsumura, K., Yamada, H., Saito, F., Sunada, Y., und Shimizu, T.** (1997). The role of dystroglycan, a novel receptor of laminin and agrin, in cell differentiation. *Histology and Histopathology* **12**, 195-203.
- Mey, J. und Thanos, S.** (1992). Development of the visual system of the chick--a review. *J.Hirnforsch.* **33**, 673-702.
- Michele, D. E., Barresi, R., Kanagawa, M., Saito, F., Cohn, R. D., Satz, J. S., Dollar, J., Nishino, I., Kelley, R. I., Somer, H., Straub, V., Mathews, K. D., Moore, S. A., und Campbell, K. P.** (2002). Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* **418**, 417-422.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., und Ogawa, M.** (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* **31**, 727-741.
- Montanaro, F., Carbonetto, S., Campbell, K. P., und Lindenbaum, M.** (1995). Dystroglycan expression in the wild type and *mdx* mouse neural retina: synaptic colocalization with dystrophin, dystrophin-related protein but not laminin. *Journal of Neuroscience Research* **42**, 528-538.
- Moore, S. A., Saito, F., Chen, J. G., Michele, D. E., Henry, M. D., Messing, A., Cohn, R. D., Ross-Barta, S. E., Westra, S., Williamson, R. A., HOSHI, T.,**

- und Campbell, K. P.** (2002). Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature* **418**, 422-425.
- Morris, G. E., Sedgwick, S. G., Ellis, J. M., Pereboev, A., Chamberlain, J. S., und Nguyen, t. M.** (1998). An epitope structure for the C-terminal domain of dystrophin and utrophin. *Biochemistry* **37**, 11117-11127.
- Nadarajah, B. und Parnavelas, J. G.** (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat.Rev.Neurosci.* **3**, 423-432.
- Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., Loh, D. Y., und Nakayama, K.** (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* **85**, 707-720.
- Neely, J. D., Amiry-Moghaddam, M., Ottersen, O. P., Froehner, S. C., Agre, P., und Adams, M. E.** (2001). Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 14108-14113.
- Nguyen, T. M., Ellis, J. M., Love, D. R., Davies, K. E., Gatter, K. C., Dickson, G., und Morris, G. E.** (1991). Localization of the DMDL gene-encoded dystrophin-related protein using a panel of nineteen monoclonal antibodies: presence at neuromuscular junctions, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscles, and in proliferating brain cell lines. *Journal of Cell Biology* **115**, 1695-1700.
- Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Wong, W. S., Clinton, B. K., und Kriegstein, A. R.** (2002). Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *Journal of Neuroscience* **22**, 3161-3173.
- Parnavelas, J. G. und Nadarajah, B.** (2001). Radial glial cells. are they really glia? *Neuron* **31**, 881-884.
- Pasternak, C., Wong, S., und Elson, E. L.** (1995). Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *Journal of Cell Biology* **128**, 355-361.
- Peters, M. F., Adams, M. E., und Froehner, S. C.** (1997). Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *Journal of Cell Biology* **138**, 81-93.
- Peters, M. F., O'Brien, K. F., Sadoulet-Puccio, H. M., Kunkel, L. M., Adams, M. E., und Froehner, S. C.** (1997). Beta-dystrobrevin, a new member of the dystrophin family: Identification, cloning, and protein associations. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 31561-31569.
- Peters, M. F., Sadoulet-Puccio, H. M., Grady, R. M., Kramarcy, N. R., Kunkel, L. M., Sanes, J. R., Sealock, R., und Froehner, S. C.** (1998). Differential membrane localization and intermolecular associations of alpha-dystrobrevin isoforms in skeletal muscle. *Journal of Cell Biology* **142**, 1269-1278.

- Petrof, B. J., Shrager, J. B., Stedman, H. H., Kelly, A. M., und Sweeney, H. L.** (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 3710-3714.
- Pires, J. R., Taha-Nejad, F., Toepert, F., Ast, T., Hoffmuller, U., Schneider-Mergener, J., Kuhne, R., Macias, M. J., und Oschkinat, H.** (2001). Solution structures of the YAP65 WW domain and the variant L30 K in complex with the peptides GTPPPYTVG, N-(n-octyl)-GPPPY and PLPPY and the application of peptide libraries reveal a minimal binding epitope. *J.Mol.Biol.* **314**, 1147-1156.
- Pons, S., Trejo, J. L., Martinez-Morales, J. R., und Marti, E.** (2001). Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation. *Development* **128**, 1481-1492.
- Ramon y Cajal S.** (1911) Histologie du systeme nerveux de l'hommes et des vertebres. Paris: Maloine.
- Rando, T. A.** (2001). The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies [Review]. *Muscle & Nerve* **24**, 1575-1594.
- Renshaw, M. W., Ren, X. D., und Schwartz, M. A.** (1997). Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion. *EMBO Journal* **16**, 5592-5599.
- Rosa, G., Ceccarini, M., Cavaldesi, M., Zini, M., und Petrucci, T. C.** (1996). Localization of the dystrophin binding site at the carboxy terminus of β -dystroglycan. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **223**, 272-277.
- Sadoulet-Puccio, H. M., Khurana, T. S., Cohen, J. B., und Kunkel, L. M.** (1996). Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the Torpedo electric organ post-synaptic membrane. *Hum.Mol.Gen.* **5**, 489-496.
- Sambrook, J. F., Fritsch, E. F., und Maniatis, T.** Molecular cloning. 1989. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- Santavuori, P., Somer, H., Sainio, K., Rapola, J., Kruus, S., Nikitin, T., Ketonen, L., und Leisti, J.** (1989). Muscle-eye-brain disease (MEB). *Brain Dev.* **11**, 147-153.
- Schwartz, M. A. und Assoian, R. K.** (2001). Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J.Cell Sci.* **114**, 2553-2560.
- Sciandra, F., Schneider, M., Giardina, B., Baumgartner, S., Petrucci, T. C., und Brancaccio, A.** (2001). Identification of the beta-dystroglycan binding epitope within the C-terminal region of alpha-dystroglycan. *European Journal of Biochemistry* **268**, 4590-4597.

- Seigel, G. M., Mutchler, A. L., und Imperato, E. L.** (1996). Expression of glial markers in a retinal precursor cell line. *Mol. Vis.* **2**, 2.
- Straub, V. und Campbell, K. P.** (1997). Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr. Opin. Neurol.* **10**, 168-175.
- Sudol, M.** (1996). Structure and function of the WW domain. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **65**, 113-132.
- Suh, J., Lu, N., Nicot, A., Tatsuno, I., und DiCicco-Bloom, E.** (2001). PACAP is an anti-mitogenic signal in developing cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* **4**, 123-124.
- Sunada, Y., Edgar, T. S., Lotz, B. P., Rust, R. S., und Campbell, K. P.** (1995). Merosin-negative congenital muscular dystrophy associated with extensive brain abnormalities. *Neurology* **45**, 2084-2089.
- Suzuki, A., Yoshida, M., Yamamoto, H., und Ozawa, E.** (1992). Glycoprotein-binding site of dystrophin is confined to the cysteine-rich domain and the first half of the carboxy-terminal domain. *FEBS Lett.* **308**, 154-160.
- Suzuki, A., Yoshida, M., Hayashi, K., Mizuno, Y., Hagiwara, Y., und Ozawa, E.** (1994). Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. *Eur. J. Biochem.* **220**, 283-292.
- Talts, J. F., Andac, Z., Gohring, W., Brancaccio, A., und Timpl, R.** (1999). Binding of the G domains of laminin alpha 1 and alpha 2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO Journal* **18**, 863-870.
- Tamamaki, N., Nakamura, K., Okamoto, K., und Kaneko, T.** (2001). Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex. *Neurosci. Res.* **41**, 51-60.
- Tian, M., Jacobson, C., Gee, S. H., Campbell, K. P., Carbonetto, S., und Jucker, M.** (1996). Dystroglycan in the cerebellum is a laminin alpha 2-chain binding protein at the glial-vascular interface and is expressed in Purkinje cells. *European Journal of Neuroscience* **8**, 2739-2747.
- Timpl, R. und Dziadek, M.** (1986). Structure, development, and molecular pathology of basement membranes. *Int. Rev. Exp. Pathol.* **29**, 1-112.
- Timpl, R. und Brown, J. C.** (1996). Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* **18**, 123-132.
- Tinsley, J. M., Blake, D. J., Roche, A., Fairbrother, U., Riss, J., Byth, B. C., Knight, A. E., Kendrick-Jones, J., Suthers, G. K., Love, D. R., Edwards, Y. H., und Davies, K. E.** (1992). Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* **360**, 591-593.
- Ueda, H., Gohdo, T., und Ohno, S.** (1998). Beta-dystroglycan localization in the photoreceptor and Muller cells in the rat retina revealed by immunoelectron microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **46**, 185-191.

- Ueda, H., Baba, T., und Ohno, S.** (2000). Current knowledge of dystrophin and dystrophin-associated proteins in the retina. *Histol.Histopathol.* **15**, 753-760.
- Walker AE.** (1942) Lissencephaly *Arch Neurol Psychiatr* **48** 13-29
- Warburg, M.** (1978). Hydrocephaly, congenital retinal nonattachment, and congenital falciform fold. *Am.J.Ophthalmol.* **85**, 88-94.
- Waschek, J. A., Casillas, R. A., Nguyen, T. B., Diccico-Bloom, E. M., Carpenter, E. M., und Rodriguez, W. I.** (1998). Neural tube expression of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and receptor: potential role in patterning and neurogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 9602-9607.
- Waschek, J. A., Diccico-Bloom, E. M., Lelievre, V., Zhou, X., und Hu, Z.** (2000). PACAP action in nervous system development, regeneration, and neuroblastoma cell proliferation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **921**, 129-136.
- Waschek, J. A.** (2002). Multiple actions of pituitary adenylyl cyclase activating peptide in nervous system development and regeneration. *Developmental Neuroscience* **24**, 14-23.
- Way, M., Pope, B., Cross, R. A., Kendrick-Jones, J., und Weeds, A. G.** (1992). Expression of the N-terminal domain of dystrophin in E. coli and demonstration of binding to F-actin. *FEBS Lett.* **301**, 243-245.
- Williamson, R. A., Henry, M. D., Daniels, K. J., Hrstka, R. F., Lee, J. C., Sunada, Y., Ibraghimov-Beskrovnaia, O., und Campbell, K. P.** (1997). Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in *Dag1*-null mice. *Hum.Mol.Gen.* **6**, 831-841.
- Yang, B., Jung, D., Motto, D., Meyer, J., Koretzky, G., und Campbell, K. P.** (1995). SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 11711-11714.
- Yoshida, A., Kobayashi, K., Manya, H., Taniguchi, K., Kano, H., Mizuno, M., Inazu, T., Mitsuhashi, H., Takahashi, S., Takeuchi, M., Herrmann, R., Straub, V., Talim, B., Voit, T., Tapaloglu, H., Toda, T., und Endo, T.** (2001). Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Developmental Cell* **1**, 717-724.
- Zaccaria, M. L., Di Tommaso, F., Brancaccio, A., Paggi, P., und Petrucci, T. C.** (2001). Dystroglycan distribution in adult mouse brain: A light and electron microscopy study. *Neuroscience* **104**, 311-324.
- Zhang, P., Liegeois, N. J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J. C., Silverman, A., Harper, J. W., DePinho, R. A., und Elledge, S. J.** (1997). Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* **387**, 151-158.
- Zhou, C. J., Shioda, S., Shibamura, M., Nakajo, S., Funahashi, H., Nakai, Y., Arimura, A., und Kikuyama, S.** (1999). Pituitary adenylate cyclase-activating

polypeptide receptors during development: expression in the rat embryo at primitive streak stage. *Neuroscience* **93**, 375-391.

7 Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure
Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
BM	Basalmembran
Bp	Basenpaare
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CY3	Carboxymethylindocaynin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiolthreitol
E	Embryonaltag
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Etidiumbromid
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
Fab	Antigenbindendes Fragment
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
G	Gauge
GCL	Ganglienzellschicht (<i>ganglion cell layer</i>)
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethylsulfonsäure
His	Histidin
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IgG	Immunglobulin G
ILM	Innere Grenzmembran (<i>inner limiting membrane</i>)
INL	Innere Körnerschicht (<i>inner nuclear layer</i>)

IP	Immunpräzipitation
IPL	Innere plexiforme Schicht (<i>inner plexiform layer</i>)
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria Bertani</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NMJ	Neuromuskuläre Endplatte
OD	Optische Dichte
OFL	Optische Faserschicht (<i>optic fiber layer</i>)
ONL	Äußere Körnerschicht (<i>outer nuclear layer</i>)
OPL	Äußere plexiforme Schicht (<i>outer plexiform layer</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
U	Einheit (<i>unit</i>)
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-Indolyl- β -D-Galactosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Anhang

1 GGTGCCAGG ACCCTTAGGA TGAGGCTGCT GTGAGGAGTG GCAGACCCAC
 51 TGCCCGCACT GCCGTGCCTG CACGCCCCAC GTCCCCCCCC CGGCTGGAGC

M T V G C V P Q P ·

101 GCCGTCCGAG AGCCGCCGGG CAGA**ATG**ACT GTTGGATGTG TCCCGCAGCC

P F L G R T L L P V L L L A A S

151 CCCGTTCTTG GGGAGGACTT TGCTCCCAGT GCTGCTGCTC GCAGCCTCAG

A R C H W P S E P A E V V R D W E

201 CTCGCTGCCA CTGGCCCAGC GAGCCGGCAG AAGTGGTGCG GGA**CTGGGAA**

N Q L E A S M H S V L S D L R E T ·

251 AACCAGCTGG AGGCCTCCAT GCACTCCGTG CTCTCGGACC TCCGAGAGAC

. V P A V V G I P D S S A V V G R

301 TGTGCCGGCC GTGGTGGGGA TACCAGACAG CTCCGCCGTG GTGGGCCGCT

F F R V S I P T D L I A S N G E A

351 TCTTCAGAGT CTCCATCCCC ACAGATTTAA TTGCTTCCAA TGGAGAAGCA

V Q V S E A G K E S L P S W L H W ·

401 GTCCAGGTCT CCGAAGCTGG GAAGGAGTCT TTGCCTTCGT GGT**TACTG**

. N A E S S S L E G L P L D T D K

451 GAATGCGGAG AGCAGCTCCC TGAAGGGCT GCCCCTGGAC ACGGACAAGG

G V H Y I S V T T L Q P F P N G S

501 GCGTCCACTA CATCTCGGTG ACCACACTGC AGCCCTTCCC CAACGGCAGC

Y V P Q A A N V F S V E V H Q E D ·

551 TATGTGCCGC AGGCCGCCAA CGTCTTCTCC GTGGAGGTGC ACCAGGAGGA

. H S E P Q S V R A A A Q E A G D

601 CCACAGCGAG CCGCAGTCGG TCGAGCGGC AGCCCAGGAG GCGGGCGATG

A A P F V C G A E E P V T I L T V

651 CCGCGCCGTT CGTGTGCGGT GCGGAGGAGC CGGTCACCAT CCTGACCGTC

I L D A D L T K M T P K Q R I E L ·

701 ATCCTGGACG CCGATTTGAC AAAAATGACA CCAAAGCAGA GGATCGAACT

. L N R M R S F S E V E L H N M K

751 TTAAACAGA ATGAGGAGCT TCTCAGAGGT GGAGCTTCAC AACATGAAGT

L V P V V N N R L F D M S A F M A

801 TGTTCTCTGT TGTAATAAAC AGACTCTTTG ACATGTCGGC CTT**CATGGCT**

G P G N A K K V V E N G A L L S W ·

851 GGGCCGGGAA ACGCAAAGAA GGTGGTGGAA AACGGGGCCT TACTCTCGTG

. K L G C S L S Q N S V P N I S K

901 GAAACTGGGC TGTTCTTTGA GCCAAAACAG CGTCCCCAAC ATCAGCAAGG

V E A P A K E G T M S A R L G Y P

951 TTGAGGCCCC GGC**GAAAGAA** GGGACTATGT CTGCCCGCCT CGGCTACCCT

V V G W H I A N K K P H L P K R M ·

1001 GTGGTCCGCT GGCACATCGC TAACAAGAAA CCTCACCTCC CAAA**AAGGAT**

1051 . R R Q I N A T P T P L T A I G P
GCGACGGCAG ATCAACGCCA CCCCCACGCC TCTGACCGCC ATCGGACCCC

1101 P T T A A Q E P P T R I V P T P T
CCACCACCGC CGCTCAAGAG CCACCGACGC GGATCGTCCC CACCCCAGCG

1151 S P A I A P P T E T T A P P V R E ·
TCGCCCGCCA TCGTCCCCC CACGGAGACG ACGGCCCCGC CGGTCAGGGA

1201 . P I P L P R K P T V T I R T R G
GCCCATCCCG CTGCCGAGGA AGCCTACGGT CACCATCAGG ACGAGGGGCC

1251 P I V Q T P T L G P I Q P T R L V
CCATCGTGCA GACGCCACG CTCGGGCCGA TCCAGCCAAC CAGGCTGGTG

1301 E G T G T V S V P I R P T V P G Y ·
GAAGGCACTG GGACGGTCTC CGTGCCGATT CGCCCCACCG TGCCCGGCTA

1351 . V E P T A V I T P P T T T T K K
CGTGGAGCCC ACCGCGGTGA TCACGCCGCC CACCACCACC ACCAAGAAGC

1401 P R V S T L K P A T P S T T D S S
CCAGAGTGTC CACTCTGAAG CCTGCCACGC CGTCCACCAC GGATTCTCTC

1451 T A T T R R P T R R P K T P R P T ·
ACGGCGACGA CACGCAGGCC CACCCGCAGG CCCAAGACGC CCCGTCCCAC

1501 . K P P S T T R S T I S K L T T A
GAAGCCTCCC AGCACCACCC GCTCCACGAT CTCCAAGCTG ACCACCGCCT

1551 S P P T R V R T T A S G V P R P W
CCCCGCCAC CCGCGTGCGC ACCACGGCCA GCGGCGTCCC CCGGCCCTGG

1601 E P N E P P K L T N H I D R V D A ·
GAGCCAAACG AGCCGCCCAA GCTGACGAAC CACATCGACA GGGTGGACGC

1651 . W E G T Y F E V K I P S D T F Y
GTGGGAGGGG ACTTACTTCG AGGTGAAAAT ACCCTCGGAT ACTTTCTACG

1701 D K E D T T T D K L Q L T L K L K
ACAAGGAGGA TACCACCACT GACAAGCTGC AGCTGACCTT GAAGCTGAAG

1751 E Q Q M I E E N S W V Q F N S T S ·
GAGCAGCAA TGATCGAGGA GAATTCGTGG GTCCAGTTCA ACAGCACCAG

1801 . Q L M Y G M P D R S H V G K H E
CCAGCTCATG TACGGCATGC CGGACCGCAG CCACGTGGGG AAGCACGAGT

1851 Y F M Y A T D K G G L F A V D A F
ACTTCATGTA CGCCACCGAC AAAGGGGGGC TGTTTGCCGT GGACGCTTTT

1901 E I H V H K R P H G D K S P V K F ·
GAAATCCAG TCCACAAACG CCCGCACGGG GACAAATCCC CGGTGAAGTT

1951 . K A R L E G D H S A V A N D I H
CAAGGCCAGG CTGGAAGGAG ACCACAGCGC GGTGGCGAAC GACATCCATA

2001 K K I M L V K K L A L A F G D R N
AGAAGATCAT GCTGGTGAAG AAGCTGGCCC TGGCGTTCGG CGATAGGAAC

2051 S S T I T V Q D I A K G S I V V E ·
AGCAGCACCA TCACGGTGCA GGACATCGCC AAGGGCTCCA TCGTGGTGGA

. W T N N T L P L E P C P R E Q I
 2101 ATGGACCAAC AACACCCTGC CCCTGGAGCC CTGCCCCCGC GAGCAGATCC

 R T L S K K I A D D S G G P S P A
 2151 GGACTTTGAG CAAAAGATC GCGGACGACT CCGGGGGGCC GAGCCCCGGT

 F S N I L Q P E F K P L N V S V V ·
 2201 TTCTCCAACA TCCTGCAGCC GGAGTTCAAA CCTCTGAACG TGTCGGTCTG

 . G S G S C R H I Q F V P V T K D
 2251 GGGCTCCGGG AGCTGCAGGC ACATCCAGTT CGTCCCCGTG ACGAAGGACG

 G R V I S E A T P T L A A G K D P
 2301 GCAGGGTGAT CTCGGAGGCG ACGCCGACGC TGGCGGCTGG GAAGGACCCC

 E K S S E D D V Y L H T V I P A V ·
 2351 GAGAAGAGCA GTGAGGACGA TGTGTACCTT CACACCGTCA TCCCCGCCGT

 . V V A A I L L V A G I I A M I C
 2401 GGTGGTGGCC GCCATCCTGC TGGTGGCCGG CATCATCGCC ATGATCTGCT

 Y R K K R K G K L T I E D Q A T F
 2451 ACCGCAAGAA GAGGAAAGGG AAGCTGACCA TCGAAGACCA GGCCACGTTC

 I K K G V P I I F A D E L D D S K ·
 2501 ATTAAGAAGG GCGTGCCCAT CATCTTCGCC GACGAGCTGG ACGACTCCAA

 . P P P S S S M P L I L Q E E K A
 2551 GCCCCGCGG TCCTCCAGCA TGCCCTCAT CCTGCAGGAG GAGAAAGCCC

 P L P P P E Y P N Q S M P E T T P
 2601 CGCTGCCCC CCCGGAGTAC CCAACCAGA GCATGCCCGA GACCACGCCG

 L N Q D T I G E Y T P L R D E D P ·
 2651 CTCAACCAGG ACACCATCGG GGAGTACACG CCGCTGCGGG ACGAGGACCC

 . N A P P Y Q P P P P F T A P M E
 2701 CAACGCGCCG CCCTACCAGC CGCCCCCCC CTTACCGCT CCCATGGAGG

 G K G S R P K N M T P Y R S P P P
 2751 GGAAGGGCTC CCGCCGAAG AACATGACCC CCTACCGCTC CCCGCCGCC

 Y V P P
 2801 TACGTCCCC CT**TAA**CGAAC GGGACGCTCT CGGGGGGGG AGACGGGGCC

 2851 TCCGGTCCCA CACCGGTGCC GCCTGCGGGC CGGCCGCCCC CTTGCCGGCC

 2901 GGGAAGCCGA CATCCCAGCC CGCTCCCGAG CAG

Abb. 26 Dystroglycan-Sequenz von Huhn – Dargestellt sind alle ermittelten 2933 Bp, davon sind die ersten 124 bp 5'UTR, der Leserahmen beginnt mit dem ATG ab Position 125. Die codierende Region umfaßt 2691 bp bis bp 2815. Die letzten 118 bp gehören zur 3'UTR. Die ersten 28 Aminosäuren ab dem Startmethionin entsprechen dem Signalpeptid. Die spezifische Spaltstelle liegt vor dem Serin 655 (bp 2088-2091).