

**Charakterisierung des Cohen-Syndrom-assoziierten Proteins Coh1
während der Neurogenese im Cortex cerebri der Maus**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Stefanie Lommatzsch
aus Borna (bei Leipzig)

2018

Diese Arbeit wurde von Februar 2013 bis Februar 2018 im Rahmen des DFG-geförderten Projektes SE2266/01 „Charakterisierung des Cohen-Syndrom-Proteins COH1 als membran-assoziiertes Gerüstprotein für intrazelluläre Transportprozesse in der Entwicklung und Erhaltung von Nervenzellen“ unter Anleitung von Dr. rer. nat. Wenke Seifert am Institut für Vegetative Anatomie (Prof. Dr. S. Bachmann) der Charité - Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Sebastian Bachmann, Charité - Universitätsmedizin Berlin
2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Wahl, Freie Universität Berlin

Disputation am 15.11.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	V
Summary	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeiner Phänotyp des Cohen-Syndroms	1
1.1.1 Cohen-Syndrom	1
1.1.2 Das Protein COH1	4
1.1.3 Einfluss von <i>COH1</i> auf den Golgi-Komplex	4
1.1.4 Zusammenspiel von Golgi-Komplex und Zytoskelett	7
1.2 Neuronaler Phänotyp	10
1.2.1 Der Cortex cerebri und die Entwicklung einer Mikrozephalie.....	10
1.2.2 Einfluss von <i>COH1</i> auf das Corpus callosum	11
1.2.3 Assoziation von Veränderungen des Golgi-Komplexes mit neuronalen genetischen Erkrankungen	12
1.2.4 Auswirkungen eines Verlusts von <i>COH1</i> auf Neurone <i>in vitro</i>	13
1.3 Die Rolle des Golgi-Komplexes und der Mikrotubuli in der neuronalen Entwicklung	13
1.3.1 Die Neurogenese im Cortex cerebri	13
1.3.2 Polarisierung des Golgi-Komplexes in Neuronen.....	17
1.3.3 Die Funktion des Zytoskeletts in Neuronen	18
1.4 Zielstellung	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Antikörper	21
2.1.2 Chemikalien	22
2.1.3 Kits	24
2.1.4 Medien.....	24
2.1.5 Plasmide und siRNAs.....	25

2.1.6	Geräte und Software.....	25
2.2	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.1	Quantitative Analyse mittels <i>real time</i> -PCR.....	27
2.2.2	Klonierung.....	29
2.3	Zellkultur und Transfektion	34
2.3.1	Kultivierung von Säugerzellen.....	34
2.3.2	Lipid-basierte Transfektion	35
2.3.3	RNA-Interferenz (RNAi)	35
2.3.4	Nocodazol Behandlung	36
2.3.5	Immunzytochemie	36
2.4	Proteinanalytische Methoden.....	36
2.4.1	Zellaufschluss.....	36
2.4.2	SDS-PAGE und <i>immunoblotting</i>	37
2.4.3	Massenspektrometrie.....	41
2.4.4	Expression und Affinitätschromatographie von GST-Fusionsproteinen.....	41
2.4.5	<i>Crosslinking</i>	42
2.4.6	Aufreinigung der Antikörperseren (<i>GST pull down</i>)	43
2.5	Tierexperimentelle Arbeiten	43
2.5.1	Versuchstiere.....	43
2.5.2	Zu injizierende Konstrukte.....	43
2.5.3	<i>In utero</i> -Elektroporation.....	44
2.5.4	Anlegen einer Primärzellkultur aus kortikalen Neuronen	45
2.5.5	<i>Tracking</i> des Mikrotubuli-Plusendes.....	46
2.6	Organentnahme und Gewebepreparation.....	46
2.6.1	Gewebeaufbereitung.....	46
2.6.2	Anfertigung von Kryostat-Schnitten	47
2.6.3	<i>In situ</i> -Hybridisierung	47
2.6.4	Immunhistochemie	49
2.7	Statistik	49
3	Ergebnisse	51
3.1	Etablierung eines humanen und murinen COH1-Antikörpers.....	51
3.1.1	Etablierung der COH1-Antikörper für das <i>immunoblotting</i>	51
3.1.2	Etablierung der COH1-Antikörper für die Immunzytochemie.....	54
3.2	Der <i>knock down</i> von <i>Coh1</i> beeinflusst den Golgi-Komplex und das Zytoskelett	58
3.2.1	Der <i>Coh1 knock down</i> fragmentiert den Golgi-Komplex.....	58

3.2.2	Der <i>COH1 knock down</i> verändert β -Tubulin-Stränge	59
3.2.3	Der <i>COH1 knock down</i> stabilisiert Tubulin	60
3.3	Der <i>Coh1</i> -Phänotyp in kortikalen neuronalen Primärzellen	61
3.3.1	Etablierung von shRNA für die Transfektion in Säugetierzellen	61
3.4	Einfluss von <i>COH1</i> auf die Mikrotubuli	68
3.4.1	Einfluss von Nocodazol-Behandlung auf Mikrotubuli in HeLa-Zellen mit <i>COH1 knock down</i>	68
3.4.2	Zytoskelett in Neuronen	73
3.5	Etablierung der <i>in utero</i> -Elektroporation mit shRNA	76
3.5.1	Funktionstest der shRNA durch <i>in situ</i> -Hybridisierung	77
3.6	Migrationsstudien	79
3.6.1	Migrationsverhalten <i>Coh1</i> -defizienter kortikaler Neurone nach <i>in utero</i> -Elektroporation von shRNA	79
3.6.2	Einfluss auf die Anordnung der schichtspezifischen Marker <i>Cux1</i> und <i>Ctip2</i> nach einem <i>Coh1 knock down</i>	81
3.6.3	Einfluss eines <i>Coh1 knock downs</i> auf die schichtspezifische Markierung in Neuronen	87
3.7	Axonales Wachstum in der Cortex-Entwicklung unter <i>Coh1 knock down</i>	89
3.7.1	Projektion der Axone zum Corpus callosum nach <i>Coh1 knock down</i>	89
3.7.2	Der <i>Coh1 knock down</i> beeinflusst die Breite des Corpus callosums	91
4	Diskussion	92
4.1	Methodische Etablierungsarbeiten	93
4.1.1	Etablierung eines murinen <i>COH1</i> -AK	93
4.1.2	Etablierung einer funktionellen shRNA gegen <i>Coh1</i>	94
4.2	Einfluss von <i>COH1 knock down</i> auf zelluläre Strukturen und Funktionen	95
4.2.1	Der Einfluss von <i>COH1</i> auf die Ausbildung stabiler Mikrotubuli	95
4.2.2	Der Einfluss von <i>COH1</i> auf die Mikrotubuli-Nukleation	96
4.3	Die Rolle von <i>Coh1</i> in kortikalen Neuronen	97
4.3.1	Der <i>Coh1 knock down</i> verzögert das Auswachsen des längsten Neuriten	97
4.3.2	Der <i>Coh1 knock down</i> führt zu einer Hyperstabilisierung von Mikrotubuli	98
4.3.3	Der <i>Coh1 knock down</i> reduziert die Mikrotubuli-Dynamiken	99
4.4	<i>Coh1 knock down</i> in der <i>in utero</i> -Elektroporation	100
4.4.1	Etablierung der shRNA	100
4.4.2	<i>Coh1 knock down</i> hat einen minimalen Einfluss auf die Migration	100
4.4.3	<i>Coh1</i> hat keinen Einfluss auf das Corpus callosum	104

4.5	COH1-massenspektrometrische Analyse.....	105
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	106
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	XIII
6	Publikationstätigkeit.....	XXIV
7	Eidesstattliche Erklärung.....	XXV
8	Danksagung	XXVI
9	Lebenslauf.....	XXVII

Zusammenfassung

Eine gestörte Neurogenese kann zu tiefgreifenden Entwicklungsstörungen des Gehirns führen und damit einhergehend schwerwiegende neurologische Symptome verursachen. Für Patienten mit Cohen-Syndrom sind postnatale Mikrozephalie und mentale Retardierung besonders prägnante klinische Merkmale. Das Cohen-Syndrom ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung und wird durch Mutationen im Gen *COH1* (*VPS13B*) verursacht. Das kodierte COH1-Protein ist ein peripheres Membranprotein, welches wahrscheinlich als Gerüstprotein an der zytoplasmatischen Golgi-Membran fungiert. Der Verlust von COH1 in Patienten-Fibroblasten und in siRNA-behandelten HeLa-Zellkulturen führt zu einer Fragmentierung des Golgi-*ribbon* in vereinzelte Stapel. Expressionsanalysen zeigten eine gleichmäßige Verteilung von *COH1* in verschiedenen Geweben. Mittels *in situ*-Hybridisierung an Gehirnschnitten wurde für murines *Coh1* eine spezifische Expression in kortikalen Neuronen der Schichten II-VI beobachtet. Dies lässt neben den klinischen Merkmalen der Patienten mit Cohen-Syndrom eine Rolle von COH1 während der Entwicklung des Cortex cerebri vermuten. Diese Arbeit untersucht die zellbiologischen und molekularen Funktionen von *Coh1* in neuronalen Zellen mit besonderem Fokus auf das Mikrotubuli-Netzwerk. Aufgrund des Fehlens eines Tiermodells für den Verlust von *Coh1* wurde hier die Methodik der *in utero*-Elektroporation angewendet und eine shRNA etabliert, welche einen partiellen *Coh1 knock down* in Neuronen des Cortex cerebri von Mäusen erzielt. Für die immunzytochemische und proteinbiochemische Detektion von murinem *Coh1* wurde ein eigener Antikörper etabliert. Die Integrität des Golgi-Komplexes wird durch zisternal und lateral angelagerte Strukturproteine und durch seine Verankerung am Zytoskelett reguliert. Neben der Fragmentierung und Fehlorientierung des Golgi-Komplexes wurde hier in primären kortikalen Neuronenkulturen der Maus eine vermehrte Stabilisierung und eine reduzierte Dynamik der Mikrotubuli nach *Coh1 knock down* gefunden. *In vitro*-Experimente an HeLa-Zellen zeigten darüber hinaus einen Verlust von Golgi-assoziiierter Mikrotubuli-Nukleation. Da Neuronen einer besonderen Polarisierung bedürfen, gehen diese Ergebnisse einher mit einem reduzierten Auswachsen des längsten Neuriten in kortikalen Neuronen *in vitro* und einer veränderten kortikalen Neuronenmigration *in vivo* nach shRNA-vermitteltem *Coh1 knock down*. Nach COH1-spezifischer GFP-*trap*-Ko-Immunpräzipitation identifizierte eine initiale Massenspektrometrie für COH1 eine molekulare Verbindung zu Mikrotubuli-assoziierten Transportvorgängen. Dabei konnte KIF1C, ein Minuspol-gerichtetes Mikrotubuli-assoziiertes Motorprotein als möglicher Interaktionspartner von COH1 identifiziert werden. KIF1C interagiert ebenfalls mit dem bereits bekannten COH1-Interaktionspartner RAB6 und ist für die Integrität des Golgi-Komplexes verantwortlich. Die molekulare Charakterisierung eines Zusammenhangs von Mikrotubuli-Organisation, Golgi-Funktion und COH1 wird weitere Einblicke in den

Pathomechanismus des Cohen-Syndroms bereitstellen. Darüber hinaus wird die Generierung eines genetisch determinierten *Coh1 knock out*-Modells zum besseren Verständnis der neuronalen Entwicklung beitragen.

Summary

Defective neurogenesis may lead to pervasive developmental disorders of the brain thereby causing severe neurological symptoms. Prominent clinical features of patients with Cohen syndrome are postnatal microcephaly and intellectual disability. Cohen syndrome is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the gene *COH1* (*VPS13B*). The encoded COH1 is a peripheral membrane protein, which most likely functions as a scaffold at the cytoplasmic Golgi membrane. Loss of *COH1* in fibroblasts whether obtained from patients or after siRNA-treatment in HeLa cells lead to a fragmentation of the Golgi ribbon into mini-stacks. Expression analyses of different tissues identified a uniform distribution for *COH1*. *In situ* hybridization of brain sections detected a specific expression in neurons of the cortical layer II-VI for murine *Coh1*. Besides the clinical signs of Cohen syndrome in patients this led to the hypothesis that COH1 is involved in the development of the cerebral cortex. This thesis focuses on the cell biological and molecular function of Coh1 in neuronal cells with special focus on the microtubule network. Due to the lack of a *Coh1* knock out model, I established *in utero* electroporation and a *Coh1*-specific shRNA to generate a partial *Coh1* knock down of neurons in the cortex cerebri of mice. For immunocytochemical and proteinbiochemical detection of murine Coh1 a homemade antibody was established. The integrity of the Golgi complex is regulated by cisternal and lateral attached structure proteins, as well as, by its anchorage to the cytoskeleton. My results show that besides the fragmentation and failed orientation of the Golgi complex, *Coh1* knock down causes an increased stability and a reduced dynamic of microtubules in primary cortical neurons of mice. Moreover, in *in vitro* experiments with HeLa cells I found a decrease in Golgi-associated microtubule nucleation. Since neurons need a special polarization, these results are consistent with reduced axonal outgrowth and abnormal cortical neuron migration after shRNA-mediated *Coh1* knock down. Finally, a COH1 specific GFP-trap co-immunoprecipitation that was followed by an initial mass spectrometry, identified a molecular link for a role of COH1 in microtubule-associated transport. Here, KIF1C, which is a minus-end microtubule-associated motor protein, was found as potential COH1 interaction partner. KIF1C also interacts with the COH1 interaction partner RAB6 and has a role in Golgi complex integrity. The molecular characterization of the intersection between microtubule organization, Golgi function and COH1 will provide insights in the pathomechanism of Cohen syndrome. Furthermore, the generation of a genetic determined *Coh1* knock out will facilitate the understanding of neuronal development.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primäre Antikörper	21
Tabelle 2: Sekundäre Antikörper	21
Tabelle 3: Chemikalien.....	22
Tabelle 4: Antibiotika.....	24
Tabelle 5: Enzyme mit dazugehörigen Puffern	24
Tabelle 6: Kits	24
Tabelle 7: Für die Zelllinien verwendete Medien	24
Tabelle 8: Medien für Bakterienkulturen	25
Tabelle 9: Bereits vorhandene Plasmide und siRNAs.....	25
Tabelle 10: Geräte	25
Tabelle 11: Software.....	26
Tabelle 12: Primer für die <i>real time</i> -PCR	28
Tabelle 13: Programm für eine <i>real time</i> -PCR.....	28
Tabelle 14: Endpunkt-PCR-Profil	29
Tabelle 15: klonierte Konstrukte für die Überexpression	30
Tabelle 16: klonierte shRNA-Konstrukte.....	30
Tabelle 17: Sequenzen der Standardprimer	33
Tabelle 18: Programm einer <i>touch down</i> -PCR.....	33
Tabelle 19: Trenngel.....	38
Tabelle 20: Sammelgel	39
Tabelle 21: Coomassie-Färbung.....	39
Tabelle 22: Silberfärbung	40
Tabelle 23: Puffer für die <i>in situ</i> -Hybridisierung	49

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Polymorphismen und Mutationen im Gen <i>COH1</i>	2
Abbildung 1.2: Die Organisation von MT am <i>cis</i> -Golgi-Komplex.	9
Abbildung 1.3: Vergleich von Mausgehirn (rechts) und Menschgehirn (links) hinsichtlich Anatomie und der Bereiche für die Wahrnehmung.....	11
Abbildung 1.4: Vergleich des Corpus callosum.	11
Abbildung 1.5: Zeitlicher Ablauf der Neurogenese.....	16
Abbildung 2.1: Klonierung von shRNA in den pSUPER.retro.neo+GFP.....	31
Abbildung 3.1: Spezifitätstest der murinen Coh1-Antikörper auf einzelne <i>Coh1</i> -Fragmente	52
Abbildung 3.2: Test des I-COH1-Antikörpers auf verschiedene HIS-markierte <i>COH1</i> -Konstrukte	53
Abbildung 3.3: Test des I-COH1-Antikörpers auf verschiedene Mengen eines GFP-markierten <i>COH1</i> -Konstruktes	54
Abbildung 3.4: Spezifitätstest in HeLa-Zellen mit COH1-Teilfragmenten.....	55
Abbildung 3.5: Spezifität des I-COH1-Antikörpers in kortikalen Neuronen	57
Abbildung 3.6: Fragmentierung des Golgi-Komplexes nach <i>Coh1 knock down</i>	58
Abbildung 3.7: Veränderte Tubulin-Strukturen nach <i>COH1 knock down</i> in HeLa-Zellen.....	59
Abbildung 3.8: HeLa-Zellen mit <i>COH1 knock down</i> bilden vermehrt acetyliertes Tubulin.....	61
Abbildung 3.9: Effizienztest der klonierten shRNAs auf Expressionsebene mittels <i>real time</i> -PCR	63
Abbildung 3.10: Phänotypische Veränderungen in HeLa-Zellen nach <i>Coh1 knock down</i> mittels shRNA	64
Abbildung 3.11: Expressionsanalyse von <i>Coh1</i> in verschiedenen Embryonalstadien der Maus.....	65
Abbildung 3.12: Einfluss von <i>Coh1 knock down</i> auf die Axonlänge in kortikalen Neuronen.....	66
Abbildung 3.13: Einfluss des <i>knock down</i> von <i>Coh1</i> auf die Golgi-Orientierung in kortikalen Neuronen.....	68
Abbildung 3.14: Auswirkungen von Nocodazol-Behandlung auf stabilisiertes Tubulin in HeLa- Zellen.....	69
Abbildung 3.15: Ausbildung von MTOC nach <i>COH1 knock down</i> in HeLa-Zellen	72
Abbildung 3.16: Die Wirkung von Nocodazol in kortikalen Neuronen	74
Abbildung 3.17: <i>Coh1</i> beeinflusst die <i>velocity</i> von Mikrotubuli in kortikalen Neuronen	76
Abbildung 3.18: Analyse der Effizienz von <i>Coh1</i> -spezifischer shRNA in <i>in utero</i> -elektroporierten Cortices der Maus.....	78
Abbildung 3.19: Migration der Neurone nach <i>in utero</i> -Elektroporation an E12,5.....	80
Abbildung 3.20: Migration der Neurone nach <i>in utero</i> -Elektroporation an E13,5.....	81
Abbildung 3.21: Zuordnung der Schichten zu den Aufteilungen des Cortex in zehn gleichgroße Bereiche	82

Abbildung 3.22: Verteilung von Cux1- und Ctip2-markierten GFP-positiven Neuronen nach <i>in utero</i> -Elektroporation an E12,5.....	84
Abbildung 3.23: Verteilung von Cux1- und Ctip2-markierten GFP-positiven Neuronen nach <i>in utero</i> -Elektroporation an E13,5.....	86
Abbildung 3.24: schichtspezifische Markierung nach <i>Coh1 knock down</i> bei Betrachtung der Gesamtzahl an GFP-markierten Neuronen	88
Abbildung 3.25: Projektion der GFP-markierten Axone zum Corpus callosum von E12,5- elektroporierten Tieren.....	89
Abbildung 3.26: Projektion der GFP-markierten Axone zum Corpus callosum von E13,5- elektroporierten Tieren.....	90
Abbildung 3.27: Quantifizierung der Dicke des Corpus callosum nach <i>Coh1 knock down</i>	91
Abbildung 4.1: Auswirkungen eines <i>COH1 knock down</i> auf verschiedene Zellkompartimente...	109

Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>amino acids</i> (Aminosäuren)
AK	Antikörper
BFA	Brefeldin A
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
CC	Corpus callosum
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
<i>Coh1</i>	Cohen-Syndrom-assoziiertes Gen in der Maus
Coh1	Cohen-Syndrom-assoziiertes Protein in der Maus
<i>COH1</i>	Cohen-Syndrom-assoziiertes Gen im Menschen
COH1	Cohen-Syndrom-assoziiertes Protein im Menschen
CP	<i>cortical plate</i> (Kortikalplatte)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DIV	<i>day in vitro</i> (Tag <i>in vitro</i>)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FA	Formaldehyd
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fötales Kälberserum)
<i> fwd</i>	<i>forward</i> , 5'-3' Richtung des Primers
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
GM	Golgi-Matrix
g	Erdbeschleunigung (g = 9,81 m/s)
Hek	<i>human embryonal kidney</i> (humane embryonale Nieren)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IPC	<i>intermediate progenitor cells</i> (zwischenliegende Vorläuferzellen)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	<i>kilo base</i> (Kilobasen, 1 kb = 1000 bp)
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i> (lysogene Brühe)
mAb	<i>monoclonal antibody</i> (monoklonaler Antikörper)
MIM	<i>Mendelian inheritance in man</i> , Datenbank humaner krankheitsrelevanter Gene
MT	Mikrotubuli
MTOC	<i>microtubule organization center</i> (Mikrotubuli-Organisationszentrum)
MZ	Marginalzone
NE	Neuroepitheliale Zellen
nsSNV	<i>non-synonymous single nucleotide variations</i> , Variation eines Einzelnukleotiden
OD ₆₀₀	optische Dichte einer wässrigen Lösung bei einer Wellenlänge von 600 nm
oRG	äußere radiale Gliazellen (<i>outer radial glia cell</i>)
P	postnataler Tag
pAb	<i>polyclonal antibody</i> (polyklonaler Antikörper)

PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
RAB	<i>ras-related in brain</i> , zerebrale RAS-Proteinfamilie
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
RG	radiale Gliazellen
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPE	<i>retinal pigment epithelium</i> (retinales Pigmentepithel)
RS	Restriktionsschnittstelle
RT	Raumtemperatur
<i>rev</i>	<i>reverse</i> , 3'-5' Richtung des Primers
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SP	Unterplatte (<i>subplate</i>)
SVZ	Subventrikularzone
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
UV	ultraviolett
V	Volt
V _H H	<i>heavy chain</i> Antikörper
Vol.	Volumeneinheiten
VPS/Vps	<i>vacuolar protein sorting</i> , vakuoläre Proteinsortierung
VZ	Ventrikularzone

Angewandte englische und lateinische Begriffe

<i>annealing</i>	Anlagerung von Primern an die DNA
<i>antisense</i>	5'-3' Richtung der DNA
<i>backbone</i>	„Rückgrat“ bei Plasmiden, welches nicht das <i>insert</i> betrifft
<i>beads</i>	Kugeln zum Binden von Antigenen
<i>blocking</i>	mögliche Bindestellen für Antikörper auf einer Membran blockieren
<i>capping</i>	Kappen-Protein am auswachsenden MT-Ende
<i>comets</i>	Kometen, welche bei Echtzeitaufnahmen beobachtet werden
<i>complete</i>	vollständig
<i>crosslinking</i>	Vernetzung von Proteinen
<i>dot blot</i>	qualitativer Nachweis von Proteinen („punktförmiger Klecks“)
<i>downstream</i>	nachgeschaltet innerhalb eines Signalweges
<i>forward</i>	5'-3' Richtung eines Primers
<i>founder effect</i>	Gründereffekt; genetische Abweichung einer isolierten Population
<i>frame</i>	Leserahmen eines Gens auf der DNA
<i>frameshift</i>	Leserasterverschiebung eines Gens auf der DNA
<i>full length</i>	cDNA mit voller Länge an bp
<i>gene silencing</i>	Stilllegung eines Gens
<i>growth cone area</i>	Zone des Wachstumskegels am Axon
<i>hairpin-loops</i>	Haarnadelschleife in der RNA
<i>heavy chain</i>	schwere Kette von Antikörpern
<i>immunoblotting</i>	Übertragung von Proteinen auf eine Membran mittels Western Blot und anschließende Inkubation der Membran mit Antikörpern
<i>in situ</i>	Nachweis von Nukleinsäuren in Zellen
<i>in utero</i>	in der Gebärmutter

<i>in vitro</i>	im Reagenzglas, unter künstlichen Bedingungen
<i>in vivo</i>	im lebendigem Organismus
<i>inset</i>	vergrößerter Ausschnitt aus einem Bild
<i>insert</i>	eingefügter Teil einer DNA-Sequenz
<i>knock down</i>	Herunterregulierung eines Gens
<i>live cell imaging</i>	Echtzeit-Aufnahmen von Zellen
<i>merge</i>	zusammenfügen mehrerer Signale bei mikroskopischen Aufnahmen
<i>midline</i>	Mittellinie am Corpus callosum
<i>missense</i>	sinnverändernde Mutation; Punktmutation, die durch Veränderung des Triplets den Einbau einer anderen Aminosäure verursacht
<i>nonsense</i>	sinnentstellende Mutation, Punktmutation, welche den Einbau eines nichtkodierenden Triplets verursacht und damit zum Stopp der Translation führt
<i>nontransfected</i>	nicht transfiziert
<i>one way</i>	einseitig gerichteter statistischer Varianztest
<i>plugged</i>	befruchtetes Weibchen direkt nach der Verpaarung
<i>plug-in</i>	Plugin, zusätzliches Programm
<i>postnatal</i>	nach der Geburt
<i>pull down</i>	herunterziehen, im Sinne von gekoppelten Proteinen aus einer Lösung ziehen
<i>random</i>	zufällig
<i>real time</i>	Echtzeit
<i>rescue</i>	Wiederherstellung des Ursprungszustands
<i>reverse</i>	3'-5' Richtung eines Primers
<i>ribbon</i>	Summe aller lateral verknüpfter Dictyosomen (=Stapel flacher Membranvesikel)
<i>scramble</i>	Kontroll-siRNA
<i>semi-dry</i>	halbtrocken, Methode des Übertragungsweges von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran
<i>sense</i>	3'-5' Richtung der DNA
<i>single domain</i>	einfache Domäne
<i>small hairpin</i>	kleine Haarnadel Strukturen der RNA
<i>small interfering</i>	kleine eingreifende RNA
<i>spacer</i>	Abstandshalter auf einer DNA-Sequenz
<i>spines</i>	Dornenfortsätze an Dendriten von Neuronen
<i>splice-site</i>	Insertion, Deletion oder Austausch von Nukleotiden an der Seite wo die DNA gespleißt wird
<i>tag</i>	Markierung eines Proteins
<i>template</i>	Ausgangsmaterial für eine PCR
<i>touch down</i>	Temperaturgradienten bei einer PCR
<i>tracking</i>	Verfolgung
<i>trafficking</i>	Transportprozesse in der Zelle
<i>trap</i>	Haftstelle an Antikörper-gekoppelten Materialien
<i>velocity</i>	Geschwindigkeit beim Auswachsen von MT
<i>vice versa</i>	und umgekehrt

1 Einleitung

1.1 Allgemeiner Phänotyp des Cohen-Syndroms

1.1.1 Cohen-Syndrom

Cohen MM Jr. beschrieb 1973 zum ersten Mal das Cohen-Syndrom (COHEN SYNDROM: MIM 216550)¹, welches anfangs vor allem in der finnischen Population aufgrund eines *founder effects* (Gründereffekts) überrepräsentiert war². Erst nach und nach wurde erkannt, dass neben Mikrozephalie, typischer Gesichtsdysmorphie und mentaler Retardierung weitere klinische Merkmale wie Neutropenie, Myopie, Retinopathie, Kleinwuchs und Adipositas auftreten können und dass das Cohen-Syndrom auch in anderen Bevölkerungen repräsentiert ist³. Es handelt sich hierbei um eine autosomal rezessive Erbkrankheit, welche durch Mutationen im Gen *COH1* verursacht wird. *COH1* liegt auf dem Chromosom 8q22^{4,5}, umfasst 62 Exons und codiert das Protein COH1 mit einer Größe von ~450 kDa². Dabei gibt es zwei verschiedene Spleißvarianten: einmal mit Exon 28 (4022aa, NM_017890.3) und einmal mit Exon 28b (3997aa, NM_152564.3)⁶. Beide Varianten werden in humanem, adultem und embryonalem Hirngewebe, sowie in adultem Gewebe der Retina gleich stark exprimiert. In den übrigen Geweben wird Exon 28b fünfmal stärker exprimiert als Exon 28⁷. Für das homologe Gen in der Maus wurden keine alternativen Spleißvarianten entdeckt, hier existiert nur die ubiquitär exprimierte Variante mit Homologie zu Exon 28b (NM 177151.3)⁷. In *in situ*-Hybridisierungen von murinem Hirngewebe wurde eine Expression von *Coh1* sowohl in postnatalen Neuronen der kortikalen Schichten II - VI als auch in der Körnerschicht und der Purkinje-Schicht des Cerebellums beobachtet³. Diese Fakten sprechen für eine Rolle von *Coh1* in der späten Entwicklung des Gehirns und gehen einher mit der sich postnatal entwickelnden Mikrozephalie bei Patienten mit Cohen-Syndrom³. Das murine Gen *Coh1* codiert ein Protein von 3993 Aminosäuren. Aufgrund seiner partiellen Homologie zu dem Hefeprotein Vps13p in *Saccharomyces cerevisiae* gehört COH1 (auch VPS13B) neben VPS13A, C und D zu der VPS13-Familie.

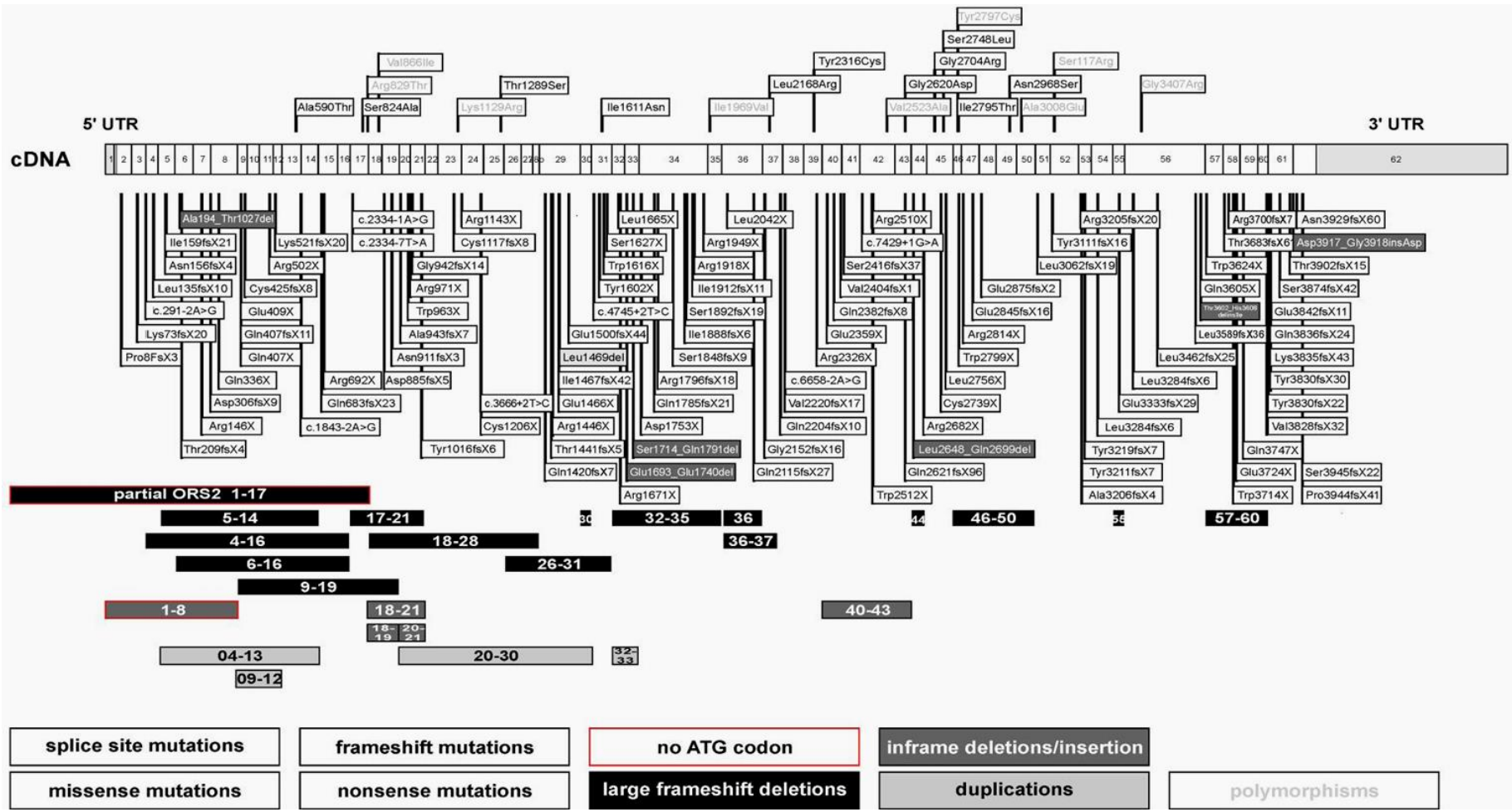
Bisher wurden über hundert verschiedene Mutationen für *COH1* beschrieben. Bei den meisten davon handelt es sich um eine *splice-site*-, *frameshift*- oder *nonsense*-Mutation. Nur selten ist die zugrundeliegende Mutation eine *missense*-Mutation (siehe Abbildung 1.1)⁷. Neuere Studien zeigen, dass das Cohen-Syndrom auch durch *copy number variation* (CNV) in *COH1* verursacht wird⁸. Dabei handelt es sich um Deletionen oder Duplikationen, welche

größer als 1 kb sind⁹. Die Mutationen liegen entweder kombiniert heterozygot oder homozygot vor.

Ausgehend von der finnischen Population mit Cohen-Syndrom, welche alle sehr ähnliche klinische Symptome aufwies, sind die Phänotypen der übrigen, weltweiten Populationen sehr variabel³. Prägnante neurologische Merkmale sind jedoch Mikrozephalie und mentale Retardierung. Aber auch hier gibt es Ausnahmen: Eine aktuelle klinische Studie beschreibt eine Patientin, welche Merkmale des Cohen-Syndroms zeigt, ohne mentale Retardierung aufzuweisen. Der Grund hierfür ist das Vorliegen von zwei kombinierten heterozygoten *splice-site*-Mutationen, bei denen vermutet wird, dass ein Restniveau an unverändertem *COH1* exprimiert wird¹⁰. Bei der Diagnostik gelten die nicht-obligaten Symptome wie ophthalmologische Probleme (schwere Myopie und/oder progressive Retinopathie) oder zyklische Neutropenie als eindeutig hinweisend für das Cohen-Syndrom⁷. Weitere fakultative Merkmale sind Adipositas, muskuläre Hypotonie, Skoliose oder Kleinwuchs. Bislang konnte keine eindeutige Phänotyp-Genotyp-Korrelation für das Cohen-Syndrom beschrieben werden.

Abbildung 1.1: Polymorphismen und Mutationen im Gen *COH1*

Die *COH1*-cDNA ist schematisch mit proportionalen Exongrößen dargestellt. Alle bislang bekannten Cohen-Syndrom-assoziierten Mutationen, die durch Vorhersagen eindeutig zu einem Funktionsverlust des *COH1*-Proteins führen, sind in der Abbildung unten aufgeführt. Putative nsSNV, die ebenfalls in Assoziation mit dem Cohen-Syndrom beschrieben sind, befinden sich oberhalb der cDNA. Die Abbildung ist modifiziert nach Seifert et al, 2009⁷. (Abbildung auf der nächsten Seite)



1.1.2 Das Protein COH1

Aufbau und Struktur

Entgegen initialer Annahmen konnte bereits gezeigt werden², dass COH1 kein integrales, sondern ein zytosolisches, peripheres Membranprotein ist¹¹. Ausgiebige Strukturanalysen ergaben eine Homologie der N-terminalen Aminosäuren 2-103 (PF12624), internen Aminosäuren 2606-2691 (PF06650) und C-terminalen Aminosäuren 3567-3707 (PF16909) von COH1 zu dem *vacuolar protein sorting-associated protein 13* (Vps13p) von *Saccharomyces cerevisiae* (InterProScan, <http://www.ebi.ac.uk/interpro/> am 17.01.2018).

Lokalisation und Funktion

Vps13p ist ein peripheres Membranprotein, welches den Transport von Proteinen zwischen dem prävakuolärem Kompartiment und dem *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) regelt^{12,13}. Außerdem wird dem Protein eine Rolle bei der Spindelpolorganisation¹⁴, der Endozytose und der Aktinfunktion¹⁵ zugesprochen.

Auch für das humane COH1 wurde gezeigt, dass es sich hierbei um ein peripheres Membranprotein handelt. Es lokalisiert an den Golgi-Komplex und Ko-lokalisiert vor allem mit dem *cis*-Golgi-Matrixprotein GM130. Die Lokalisation an den Golgi-Komplex wird wahrscheinlich durch den C-Terminus vermittelt¹¹. Für Vps13p wurden in *Saccharomyces cerevisiae* verschiedene Interaktionspartner identifiziert (The BIOGRID: <https://thebiogrid.org/31214/summary/saccharomyces-cerevisiae/vps13.html> am 17.01.2018). In einer ersten Studie konnte für das humane COH1 eine Interaktion mit RAB6 gezeigt werden, die analog zu der Interaktion von Vps13p mit Ypt6p (*yeast protein two 6 protein*) in *Saccharomyces cerevisiae* ist¹⁶. RAB6 ist ein Golgi-Komplex-assoziiertes Protein, welches am retrograden Transport von Vesikeln beteiligt ist¹⁷. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch die Deletion von *RAB6B* in HeLa-Zellen COH1 vermindert an den Golgi-Komplex angelagert wurde¹⁶.

1.1.3 Einfluss von *COH1* auf den Golgi-Komplex

Aufbau und allgemeine Funktion des Golgi-Komplexes

Der Golgi-Komplex, welcher erstmals durch Camillo Golgi beschrieben wurde¹⁸, schließt sich nach dem endoplasmatischen Retikulum (ER) um den Zellkern herum an. Er besteht aus einem Stapel mehrerer flacher Membranscheiben, den Zisternen. Dabei werden diese in die zum Kern zugewandte *cis*-Seite über die mediale Seite und die *trans*-Seite hin zum *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) in Richtung Zellmembran unterteilt¹⁹. Zusammengehalten werden

die Zisternen unter anderem durch große Proteinkomplexe wie Golgine, z.B. dem *golgi reassembly stacking protein* GRASP sowie durch ein sogenanntes Golgi *ribbon*, dessen seitliche Verknüpfungen besonders durch das Mikrotubulinetzwerk gebildet werden^{20–22}. Bei Behandlung mit Nocodazol, welches die Depolymerisierung der Tubulinstränge bewirkt, zerfällt dieses Gerüst in kleine, aber noch funktionsfähige, Stapel. Dies ist jedoch ein reversibler Prozess, da sich nach Auswaschen des Nocodazols der Golgi-Komplex wieder zusammenfügt und die Mikrotubuli (MT) erneut polymerisieren²³. Die Hauptaufgabe des Golgi-Komplexes besteht darin Vesikel aufzunehmen, die darin enthaltenen Proteine im Lumen der Zisternen zu modifizieren und durch erneute Vesikelabschnürung in anterograder oder retrograder Richtung an ihren Bestimmungsort weiterzuleiten²⁴. Bei den posttranslationalen Modifizierungen durch den Golgi-Komplex handelt es sich beispielsweise um Glykosylierungen von neu synthetisierten Proteinen und Lipiden. Hier wird an Seitenketten von Aminosäuren eine Glykosylgruppe angehängt. Es wird dabei hauptsächlich in sogenannte N-Glycosylierungen an der Seitenkette von Asparagin und O-Glykosylierungen an den Seitenketten von Threonin oder Serin unterschieden. Diese sind wichtig für die korrekte Faltung bestimmter Proteine, deren Affinität zu Bindungspartnern, deren Wasserlöslichkeit und zum Schutz vor Proteolyse²⁵.

Für die anterograde Weiterleitung der Proteine mit Hilfe des Golgi-Komplexes gibt es verschiedene Theorien²⁶. Der anterograde Transport von Proteinen aus dem ER erfolgt über COPII-Vesikel zur *cis*-Seite am Golgi-Komplex. Retrograd vom Golgi-Komplex zum ER erfolgt dies hauptsächlich durch COPI-Vesikel²⁷. Beide werden durch kleine aktivierte G-Proteine (*small GTPases*), wie ARF (*ADP-ribosylation factor*) oder SAR1 (*secretion associated ras related GTPase*), rekrutiert. Die Vesikel werden mit Hilfe des Hüllproteins Clathrin abgeschnürt und mit verschiedenen Adaptorprotein-Komplexen (AP) markiert. Diese vermitteln den Transport vom *trans*-Golgi Netzwerk zu den Endosomen (AP-1), die Endozytose an der Plasmamembran (AP-2) oder den Transport vom TGN zu den Lysosomen (AP-3)^{28,29}. Die Fission der Vesikel wird durch sogenannte SNAREs (*soluble N-ethyl maleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*) eingeleitet. Dabei handelt es sich vor allem um Transmembranproteine, welche in der jeweiligen Vesikel- oder Zielmembran eingebaut sind und sich gegenseitig erkennen und binden³⁰.

Ein weit diskutiertes Thema ist der Transport von großen multimeren Proteinkomplexen wie Prokollagen. Da diese Proteine zu groß sind, um im Vesikel transportiert zu werden, wurde zunächst angenommen, dass diese in kleineren Untereinheiten in Vesikeln über den Golgi-Komplex transportiert und erst am TGN wieder zusammengesetzt werden. Neuere Studien

belegen jedoch, dass sich große Proteine über die Reifung neuer Zisternen oder über MT-Verbindungen zwischen den Zisternen fortbewegen können^{23,31,32}.

Molekulare Zusammensetzung

Am Strukturerehalt und den Aufgaben des Golgi-Komplexes sind sehr viele Proteine beteiligt. Die größte Klasse ist die der *coiled-coil*-Golgine. Dazu gehören zum Beispiel p115, Giantin und GM130. Eines der bekanntesten Golgi-Proteine ist GM130. Bei GM130 handelt sich um ein peripheres Membranprotein, welches an der *cis*-Seite des Golgi-Komplexes sitzt³³. Über p115 wird es mit Giantin, welches sich in der Membran von COPI-markierten-Vesikeln befindet, gebunden und vermittelt so vermutlich die Anbindung an die Ränder des Golgi-Komplexes. Diese riesigen Proteinkomplexe sind nicht nur für den Erhalt des Golgi-Gerüsts wichtig, sie beteiligen sich auch am Vesikeltransport, der Glykosylierung und dem Ablauf der Zellteilung^{34,35}. Auch GRASP65 bindet an GM130³⁶. Es gehört zur Familie der *Golgi reassembly and stacking proteins* (GRASP), hat ebenfalls eine *coiled-coil*-Domäne und verbindet die Golgi-Zisternen vertikal (*cis-trans stacking*) miteinander³⁷.

Einfluss von COH1

Die molekularbiologische Funktion von COH1 konnte bisher nicht vollständig gezeigt werden. Es ist jedoch bekannt, dass COH1 am Golgi-Komplex lokalisiert ist und diese Lokalisierung vermutlich durch den C-Terminus vermittelt wird¹¹. Bisherige RNAi-Studien in HeLa-Zellen ergaben, dass unter Verlust von *COH1* der Golgi-Komplex fragmentiert vorliegt. Ultrastrukturelle Analysen von kultivierten Fibroblasten (HAF, *human adult fibroblasts*) aus Patienten mit Cohen-Syndrom zeigten das Vorliegen einzelner Golgi-Stapel mit einer normalen *cis-trans*-Orientierung, denen daraus schlussfolgernd die laterale Verknüpfung zum Golgi *ribbon* fehlt. Dies deutet darauf hin, dass COH1 an Aufbau und Erhalt des Golgi-Komplexes beteiligt ist¹¹. COH1 besitzt im Unterschied zu vielen anderen Golgi-assoziierten Proteinen (Golgine, wie GM130) keine *coiled-coil* Struktur. Über die bekannte Homologie zu Vps13p konnten keine weiteren Homologien, Domänen oder sonstige bekannte Struktur motive für COH1 vorhergesagt werden. Des Weiteren wird COH1 eine Rolle bei dem intrazellulären Transport zugeschrieben. Bei Fibroblasten von Cohen-Syndrom-Patienten wurde mit Hilfe der intrazellulären Markerproteine LAMP-2 (*lysosome-associated membrane protein 2*) und EEA1 (*early endosome antigen*) gezeigt, dass weniger Markierungen der *early endosomes* (frühe Endosomen) und vergrößerte Lysosomen vorliegen. Dies deutet auf eine Funktion von COH1 im endo-lysosomalen Signalweg hin³⁸. Da eine weitere wichtige Funktion des Golgi-Komplexes die

Glykosylierung ist, wurde in peripheren blutmononuklearen Zellen (PBMCs) von Cohen-Syndrom-Patienten die Expression von ICAM-1 und LAMP-2 getestet. Beide Proteine wurden normal exprimiert, jedoch mit einem geringeren Molekulargewicht. Das könnte aus einem Glykosylierungsdefekt resultieren³⁸. Dasselbe Resultat wurde auch bei siRNA-vermitteltem *Cohl knock down* in retinalen Pigmentepithelzellen (RPE) festgestellt. Hier war zusätzlich das Expressionslevel von ICAM-1 reduziert³⁸.

1.1.4 Zusammenspiel von Golgi-Komplex und Zytoskelett

Aufbau und allgemeine Funktion des Zytoskeletts

Das Zytoskelett besitzt drei dynamische Hauptbestandteile: die Aktinfilamente, die Intermediärfilamente und die Mikrotubuli (MT). Dabei übernehmen diese eine Vielzahl an zellulären Funktionen. Das Aktinfilament, auch Mikrofilament genannt, befindet sich in einer netzartigen Struktur vorwiegend an der Plasmamembran und nimmt dabei eine stützende Funktion für die ganze Zelle ein³⁹. Des weiteren sammeln sich Aktinfilamente an verschiedenen Stellen an, um beispielsweise die Phagozytose einzuleiten⁴⁰ oder mit anderen Zellen in Kontakt zu treten (*tight junctions*)⁴¹. Es ist außerdem für die Zellteilung wichtig. Dabei formen die Aktinfilamente zusammen mit den Myosinfilamenten den kontraktile Ring zur Abschnürung der Tochterzellen⁴². Durch Polymerisierung neuer Aktinfilamente trägt es auch zur Zellmigration bei⁴³. Die Intermediärfilamente verknüpfen die MT und die Mikrofilamente. Es gibt sechs verschiedene Klassen von Intermediärfilamenten. Sie dienen vor allem der mechanischen Stabilisierung der Zelle⁴⁴. Auch die MT dienen der Stützung der Zelle und beeinflussen damit deren Form. Sie sind ebenfalls an der Migration der Zelle und am intrazellulären Transport beteiligt⁴⁵. Das MT-Gerüst setzt sich aus verschiedenen Tubulinen zusammen. Die wichtigsten Untereinheiten sind die α - und β -Tubuline. Weiter sind noch δ - und ϵ -Tubulin bekannt, welche sich aber nur in den Zentriolen befinden. Sehr wichtig ist das γ -Tubulin, welches zwar kein Bestandteil der MT ist, aber benötigt wird, um neue MT am *microtubule organization center* (MTOC) der Zentrosomen oder des Golgi-Komplexes auszubilden (MT-Nukleation)⁴⁶. Die Untereinheiten der MT unterliegen einigen posttranslationalen Modifikationen, die zum Beispiel zu dessen Stabilisierung führen. So gibt es einige Zellen, welche nur stabile MT ausbilden, wenn sie sich in der mitotischen Teilung befinden. Dabei werden die α -Untereinheiten der Tubuline detyrosiniert und stabilisieren somit die MT, welche die Spindelfasern bilden^{45,47}. Neurone dagegen besitzen sehr viele stabile MT. Hier werden die α - und β -Tubuline polyglutamyliert sowie die α -Tubuline acetyliert, um die MT in den auswachsenden Axonen zu stabilisieren⁴⁸. Eine

weitere Form der Modifikation ist die Polyglycylierung, welche unter anderem bei den MT von Zilien und Flagellen vorkommt⁴⁹.

Mikrotubuli-Nukleation

Die Nukleation oder Keimung neuer MT spielt sich hauptsächlich am Zentrosom ab⁵⁰. Neben den MTOC am Zentrosom wurden auch vereinzelte MTOC am Golgi-Komplex, den Mitochondrien und der Kernmembran identifiziert^{51,52}. Unabhängig von ihrem Ausgangsort benötigt die Nukleation von MT am MTOC γ -Tubulin⁴⁶. Dieses wird durch die Ausbildung des *γ -tubulin ring complex* (γ -TuRC) an die perizentrioläre Matrix (PCM) oder an die Golgi-Membran rekrutiert. Der γ -TuRC wird aus drei Kerneinheiten - den *γ -tubuline complex proteins* GCP4, GCP5 und GCP 6 - und mehreren *γ -tubulin small complexes* (γ -TuSC) gebildet. Ein γ -TuSC setzt sich aus zwei γ -Tubulinen sowie GCP2 und GCP3 zusammen⁵³. Der γ -TuRC ist über verschiedene Proteine (AKAP450, CDK5RAP2, Myomegalin, Ninein, Pericentrin und Zentrosomin) an der Golgi-Membran bzw. an dem Zentrosom verankert⁵⁴. Nach Ausbildung der MTOC wachsen die MT in Richtung Zellperipherie (Plusende) durch Anlagerung von α/β -Tubulin-Dimeren aus. Bei der Nukleation am Golgi-Komplex werden die auswachsenden MT in *cis-trans*-Richtung gleichzeitig durch verschiedene weitere Proteine wie EB1, EB3, AKAP450, MTCL1, GCC185 und CLASP in ihrer Polymerisierung gefördert und stabilisiert⁵⁵.

Nach Isolierung von Golgi-Fragmenten aus Neuronen wurde gezeigt, dass diese γ -Tubulin und AKAP450 enthalten, welche beide für die MT-Nukleation unabdingbar sind⁵⁶. AKAP450 wurde an der *cis*-Seite des Golgi-Komplexes lokalisiert. Der partielle *knock down* von *AKAP450* zeigte eine vollständige Depletion vom Golgi-Komplex, jedoch nicht vom Zentrosom⁵⁷. Auch das Fehlen des AKAP450-Bindungspartners CDK5RAP2 führte zu einer reduzierten Ausbildung von MT am Golgi-Komplex⁵⁸. AKAP450 bildet während der MT-Nukleation mit dem Golgi-assoziierten Protein GM130 einen Komplex. GM130 ist an der *cis*-Golgi-Seite angelagert und scheint bei der Rekrutierung der zytosolischen Proteine, welche für die MT-Nukleation benötigt werden, eine entscheidende Rolle zu spielen. Es assembliert diese an der *cis*-Seite des Golgi-Komplexes zu einem großen Proteinkomplex, welcher dann in der Lage ist, neue MT auszubilden. Nach Deletion von GM130, welche eine Fragmentierung des Golgi-Komplexes hervorrief, wurde AKAP450 losgelöst von der Golgi-Membran perizentrosomal angereichert gefunden⁵⁷.

Ein weiterer Faktor für das Auswachsen von MT sind die am Plusende vorhandenen *tracking*-Proteine (+TIP). Die Hauptbestandteile dieser +TIPs sind die *end-binding proteins*

(EB), welche die Struktur des Tubulins am auswachsenden Ende der MT erkennen⁵⁹. Säugerzellen besitzen drei verschiedene EB-Proteine (EB1, EB2 und EB3). Sind diese deletiert, liegen die nicht-zentrosomalen MT ungeordnet vor und die Polymerisation am Plusende der MT wird durch eine verminderte Rekrutierung weiterer +TIPs (CLIP-170 und CLASP1) negativ beeinflusst⁶⁰. Wundheilungs-Assays zeigten, dass sich EB-Mutanten langsamer bewegten als Wildtyp-Zellen und diese Zellen Schwierigkeiten hatten, den Golgi-Komplex in Richtung der Migration zu organisieren⁶⁰. In Experimenten mit Myoblasten führte die Deletion von EB3 zu einer Unordnung der MT, welche mit einer fehlenden Vergrößerung der Zelle und einer fehlenden Membranfusion einherging⁶¹. Auch für kortikale Neurone wurde beobachtet, dass die *Eb3 knock down*-MT verkürzt, gewunden und hyperstabilisiert vorlagen und deshalb langsamer zum Zellcortex migrierten⁶¹.

Viele Punkte deuten also darauf hin, dass die generelle Organisation der MT einen Einfluss auf den strukturellen Aufbau des Golgi-Komplexes hat. Dieser Zusammenhang wird durch Interaktion von Myomegalin (MMG), welches das Minus-Ende der MT zum Golgi-Komplex anheftet, weiter bestärkt. MMG bildet einen Komplex mit AKAP450⁶² und CAMSAP2⁵⁸. Hier schließt sich der Kreis zum Golgi-Komplex, denn AKAP450 wird von dem schon beschriebenen *cis*-Golgi-assoziierten Protein GM130 rekrutiert (siehe Abbildung 1.2).

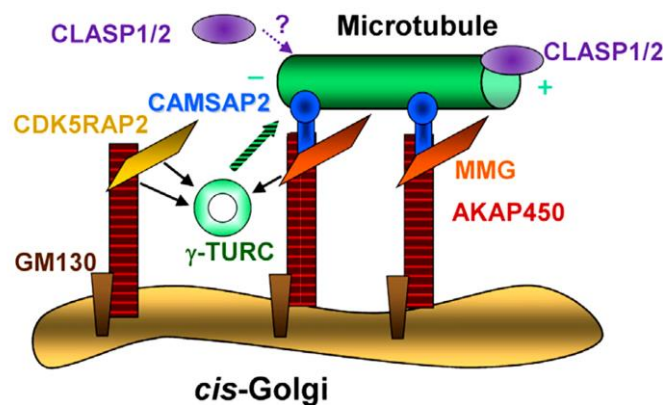


Abbildung 1.2: Die Organisation von MT am *cis*-Golgi-Komplex.

AKAP450 wird über GM130 am *cis*-Golgi-Komplex gehalten. Über die Rekrutierung von γ -TuRC über CDK5RAP2 und MMG kontrolliert es die MT-Nukleation. Auch CAMSAP2 ist an AKAP450 und MMG gebunden und hält somit das Minusende der MT am Golgi-Komplex. CLASP1/2 agieren am Plusende der MT und stabilisieren CAMSAP2 an den MT⁵⁸.

1.2 Neuronaler Phänotyp

1.2.1 Der Cortex cerebri und die Entwicklung einer Mikrozephalie

Der Cortex cerebri gehört zu der Substantia grisea des Zentralnervensystems (ZNS). Während sich in der Substantia alba nur die Nervenfasern befinden, enthält die Substantia grisea die Perikaryen, welche Informationen verarbeiten, die mit Bewegung, Lernen, Sprechen und den Sinneswahrnehmungen assoziiert sind⁶³. In Abbildung 1.3 ist die funktionelle Organisation im Cortex im Vergleich zwischen Mensch und Maus dargestellt. Beide Spezies besitzen ein motorisches, ein primär somatosensorisches, ein auditorisches und ein visuelles Areal im Cortex⁶⁴. Die Anordnung der verschiedenen funktionellen Bereiche verhält sich ähnlich und ist für Experimente, welche Rückschlüsse auf die menschlichen Strukturen im Gehirn geben sollen, anwendbar⁶⁵.

Eine Mikrozephalie beschreibt eine vergleichsweise geringe Größe des Kopfes. Die Größe des Kopfes wird unter anderem durch den Wachstumsdruck von innen während der Entwicklung bestimmt und lässt damit indirekte Rückschlüsse auf die Entwicklung des Gehirns zu⁶⁶. Eine Mikrozephalie kann in eine primäre und eine sekundäre Form unterschieden werden. Die primäre Mikrozephalie wird schon im Mutterleib ausgebildet und schreitet nach der Geburt nicht weiter fort⁶⁶. Bei den Neugeborenen mit einer primären Mikrozephalie erreicht der Kopfumfang nur die 3. Perzentile⁶⁶. Im Gegensatz dazu haben Patienten mit dem Cohen-Syndrom eine sekundäre Mikrozephalie⁶⁷. Es handelt sich bei dieser Form um eine postnatale Mikrozephalie, welche erst mit zunehmendem Alter fortschreitet. Bei Neugeborenen mit dem Cohen-Syndrom liegen Unterschiede des Kopfumfanges bei der Geburt um 0,7 Standardabweichungen (SD) gegenüber dem Durchschnitt vor. Dies entspricht Kopfumfängen zwischen 50. Perzentile (= 0 SD) und 3. Perzentile (= ~-2 SD). Dieser kann sich im Erwachsenenalter aber noch auf bis 4,4 SD reduzieren, was Kopfumfängen unterhalb der 3. Perzentile entspricht. Einhergehend mit dem geringeren Kopfumfang wurde bei Patienten mit Cohen-Syndrom auch ein entsprechend verkleinertes Gehirn festgestellt. Durch MRT-Untersuchungen konnten keine makroskopischen Veränderungen der charakteristischen Gehirnstruktur festgestellt werden⁶⁷. Die sich postnatal entwickelnde Mikrozephalie bei Patienten mit Cohen-Syndrom geht einher mit einer mentalen Retardierung⁶⁷.

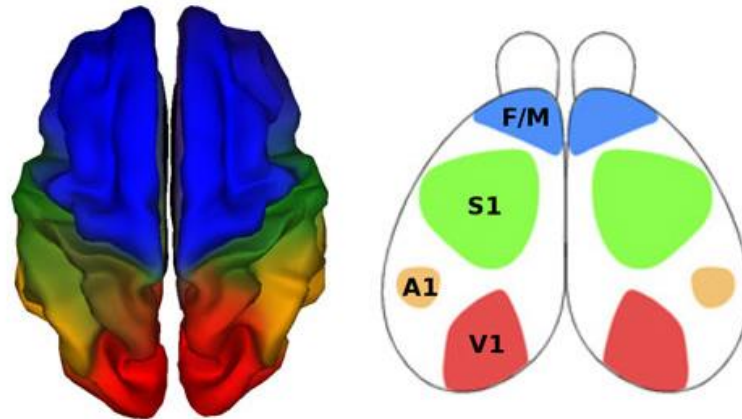


Abbildung 1.3: Vergleich von Mausgehirn (rechts) und Menschgehirn (links) hinsichtlich Anatomie und der Bereiche für die Wahrnehmung.

Dargestellt ist der frontale/motorische Cortex (F/M, blau), der primär somatosensorische Cortex (S1, grün) und der auditorische Cortex (A1, gelb). Im visuellen (V1, rot) Cortex der Area striata (primäre Sehrinde) treffen die Afferenzen des Nervus opticus aus dem Corpus geniculatum laterale ein⁶³. Die funktionelle Organisation des Cortex gestaltet sich bei Maus und Mensch ähnlich^{64,65}.

1.2.2 Einfluss von *COH1* auf das Corpus callosum

Das Corpus Callosum (CC) stellt die Verbindung der beiden Cortex-Hemisphären dar. Es besteht aus ca. 200 Millionen Axonen, welche zum größten Teil Kommissurenfasern sind, die die linke und rechte Cortex-Hälfte miteinander verknüpfen. Bei der Maus ist bekannt, dass vor allem Neurone aus den kortikalen Schichten II und III, aber auch einige aus Schicht V und VI diese Kommissur bilden⁶⁸. Während eine Hypoplasie des CC häufig mit genetisch bedingter mentaler Retardierung assoziiert wird⁶⁹, sind für einen vergrößerten CC noch keine klinischen Zusammenhänge bekannt. Bei Analysen der Mikrozephalie bei Cohen-Syndrom-Patienten wurde festgestellt, dass das CC normal groß bzw. im Vergleich zu der reduzierten Größe des Gehirns sogar vergrößert erscheint (siehe Abbildung 1.4)⁶⁷.

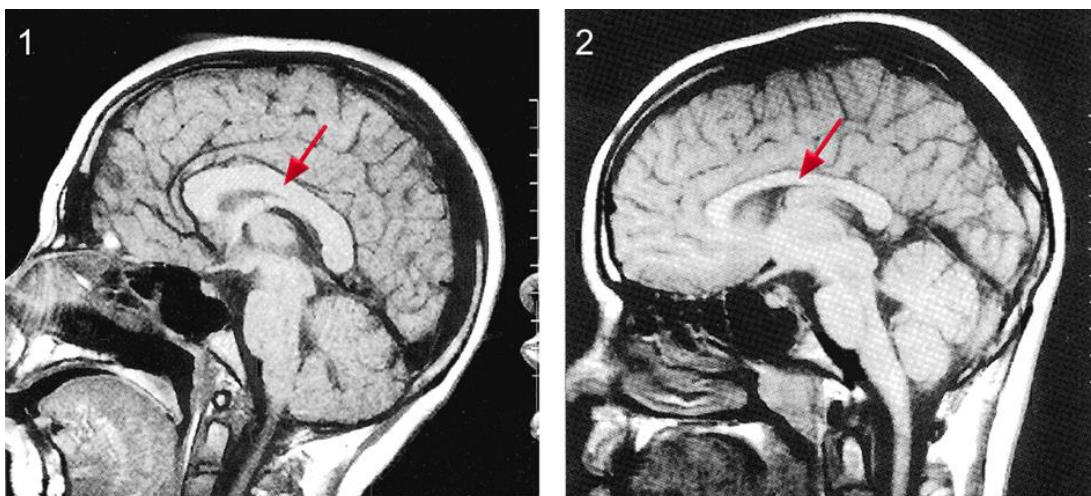


Abbildung 1.4: Vergleich des Corpus callosum.

Sagittale Ansicht einer MRT-Aufnahme eines 15 Jahre alten gesunden Mädchens (2) und eines Mädchens mit Cohen-Syndrom (1), welches ein vergrößertes CC aufweist⁶⁷.

1.2.3 Assoziation von Veränderungen des Golgi-Komplexes mit neuronalen genetischen Erkrankungen

Der Golgi-Komplex ist ein wichtiger Bestandteil der Zelle. Er modifiziert Proteine und Lipide und koordiniert diese zu ihren Zielkompartimenten. An der Funktion und Morphologie sind sehr viele Proteine beteiligt. Sobald ein Protein fehlerhaft vorliegt, gerät dieses Konstrukt schnell außer Kontrolle. Für viele neurologische Erkrankungen, die auf das Fehlen eines Proteins zurückzuführen sind (monogene Erbkrankheiten), wurden Fragmentierungen des Golgi-Komplexes, Glykosylierungsdefekte oder ein fehlerhaftes *trafficking* beobachtet. Im folgenden Abschnitt werden einige Golgi-assoziierte Erkrankungen dargestellt.

Eine Mutation im *BCAP31*-Gen, welche X-chromosomal vererbt wird, führt bei den betroffenen Patienten zu einer mentalen Retardierung, zu Schallempfindungsschwerhörigkeit und zu einer Veränderung in der Substantia alba. Bei Untersuchungen von Patienten-Fibroblasten wurden eine veränderte ER-Struktur und eine Fehlorganisation des Golgi-Komplexes festgestellt⁷⁰. Eine weitere Mutation, welche unter anderem eine sekundäre Mikrozephalie, mentale Retardierung und Epilepsie mit sich bringt, liegt im *ARGEF2*-Gen⁷¹. Auf Zellebene ist *ARGEF2* dafür verantwortlich, Vesikel am Golgi-Komplex und Endosomen zu bilden. Auf neuronaler Ebene beeinflusst es die Migration von Neuronen der oberen Schichten (*upper layer*)⁷². Ebenfalls mit einer postnatalen Mikrozephalie und mentaler Retardierung verbunden ist die Mutation in *TRAPPC9*, welche autosomal-rezessiv vererbt wird. *TRAPPC9* wird in postmitotischen Neuronen des Cortex cerebri exprimiert und führt bei einem *knock down* zu einem reduzierten Auswachsen von Neuriten⁷³. Die Mutation des *GOLGA2*-Gens, welches das Golgi-assoziierte Strukturprotein GM130 codiert, führt zu einer neuromuskulären Störung. Außerdem wurde bei diesen Patienten eine fortschreitende Mikrozephalie diagnostiziert⁷⁴. Eine weitere Golgi-assoziierte Erkrankung ist das Dyggve-Melchior-Clausen-Syndrom (DMC, MIM #223800). Es wird durch das Fehlen des Proteins Dymeclin verursacht. Dymeclin ist ein am Golgi-Komplex befindliches Protein, welches an der Transportfunktion zwischen ER und Golgi-Komplex beteiligt ist. Bei den Betroffenen wurde eine postnatale Mikrozephalie festgestellt, aber im Vergleich zu Patienten mit Cohen-Syndrom haben diese ein vergleichsweise dünneres CC⁷⁵. Auch bei der Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit ist der retrograde Transport zwischen Golgi-Komplex und ER betroffen. Die Ursache dafür liegt in einer Mutation von *PLP1* (*proteolipid protein 1*), die zu einem fehlgefalteten Protein führt, welches am ER akkumuliert. Dieser ER-Stress und der fehlerbehaftete retrograde Transport

führen letztendlich zu einer Fragmentierung des Golgi-Komplexes. Bei den Erkrankten äußert sich diese Fehlfunktion in einer verminderten Myelinsynthese, welche zu einer Entwicklungsstörung und einer Lähmung der Muskulatur führt⁷⁶. Das *Ras and Rab interactor 2* (RIN2)-Protein ist gleich in zwei verschiedenen Syndromen involviert. Dies ist durch zwei unabhängige *frameshift*-Mutationen möglich. Bei dem RIN2-Syndrom ist das ER und die Golgi-Zisternen geweitet und bei dem MACS (*macrocephaly, alopecia, cutis laxa and scoliosis*)-Syndrom akkumulieren Vakuolen am Golgi-Komplex. Beides wird durch eine verringerte mRNA-Expression von *RIN2* verursacht. Dies löst bei den Patienten mit MACS-Syndrom unter anderem eine Makrozephalie und Ichthyosis (Fischschuppenkrankheit) aus. Bei Patienten mit dem RIN2-Syndrom führt es zu einer veränderten Morphologie von Kollagenfibrillen in der Haut^{77,78}.

1.2.4 Auswirkungen eines Verlusts von *COH1* auf Neurone *in vitro*

Wie bereits erwähnt, wurde gezeigt, dass *Cohl* in den meisten Regionen des ZNS exprimiert wird. Eine hohe Expression wurde dabei in den inneren granulären Schichten und den Purkinje-Zellen des Kleinhirns gefunden. Auch im Neocortex wurde für alle Schichten, außer der Schicht I, eine *Cohl*-Expression festgestellt³. Auf zellulärer Ebene wurde gezeigt, dass primäre hippocampale Neurone aus der Ratte (E18) nach einem *Cohl knock down* während der Phase der axonalen Spezifikation (DIV2 - 4) einen um bis zu 40 % reduzierten längsten Neuriten aufweisen. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass in *Cohl knock down*-Neuronen die Position des Golgi-Komplexes signifikant häufiger nicht zum längsten Neuriten ausgerichtet ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Verlust von *COH1* einen Einfluss auf die Zellpolarität hat¹⁶. Aus weiteren Experimenten an nicht-neuronalen Zellen ist bekannt, dass *COH1* einen Einfluss auf intrazelluläre Transportvorgänge hat³⁸. Zusammenfassend kann hier von einer weitreichenden Rolle von *COH1* während der Neurogenese ausgegangen werden.

1.3 Die Rolle des Golgi-Komplexes und der Mikrotubuli in der neuronalen Entwicklung

1.3.1 Die Neurogenese im Cortex cerebri

Die Grundlage für die Bildung des komplexen Netzwerkes der Gehirnstrukturen bildet ein einschichtiges Neuroepithel. Dieses kleidet den Ventrikel am Cortex cerebri (Cortex) aus, welcher in der Maus an Embryonaltag (E) 9 mit Schließung des Neuralrohres geformt wird. Die darin enthaltenen neuronalen Stammzellen, auch Neuroepithelzellen (NE), vermehren

sich solange durch symmetrische Zellteilung, bis sie sich in verschiedene Klassen differenzieren. Aus diesen neuronalen Vorläuferzellen (*progenitors*) werden zwischen E9 und E10 die radialen Gliazellen (RG) gebildet. Sie bilden zusammen die ventrikuläre Zone (VZ)⁷⁹. Die RG teilen sich asymmetrisch, das heißt, dass sie eine identische Tochterzelle und eine nicht-RG-Tochterzelle formen. Die nicht-RG-Tochterzellen können Neurone (10-20 %) oder *intermediate progenitor cells* (IPC) sein⁸⁰. Von der VZ aus spannt ein Teil der RG einen Fortsatz durch den gesamten Cortex hin zur Pia mater. Nachkommende Vorläuferzellen nutzen diese Fortsätze wie eine Leiter, um sich daran bis zu ihrem Bestimmungsort entlang zu hangeln. Ab E10,5 entsteht aus früh geborenen Neuronen die kortikale Vorplatte (*preplate*)⁸¹. Daraus entwickeln sich durch eine Zweiteilung die Neurone der Unterplatte (*subplate*, SP), welche ab E11,5 gebildet werden, und die Neurone der Marginalzone (MZ), welche der späteren Schicht I entsprechen. Später geborene Neurone wandern zwischen Unterplatte und Marginalzone und bilden die Kortikalplatte (CP, *cortical plate*). Die CP ist nochmal in sechs verschiedene Schichten eingeteilt. Hier werden über ein sogenanntes *inside first-outside last*-Prinzip zuerst die unteren Schichten VI und V gebildet und später folgen die oberen Schichten IV, III und II⁸². An E13,5 wird eine weitere Schicht unterhalb der SP gebildet. Es handelt sich hierbei um die subventrikuläre Zone (SVZ), welche aus den IPC und äußeren radialen Gliazellen (*outer radial glia*, oRG) besteht. Die oRG unterscheiden sich von den RG, indem sie nur eine Anbindung an die basale Membran des Cortex aufweisen. RG spannen sich dagegen wie ein Gerüst zwischen die apikale und basale Membran⁸³. Es wird vermutet, dass die Neurone für die oberen Schichten aus der SVZ herausgebildet werden⁸⁴. Die Neurone der Schichten II-VI haben auch Projektionen zu verschiedenen Bereichen im Gehirn und damit unterschiedliche Funktionen. Im Großen und Ganzen wird zwischen kortikofugalen und kortikokortikalen Projektionsneuronen unterschieden. Die kortikofugalen Neurone (Schicht V und VI) haben ihren Ursprung im Cortex, aber sie projizieren von diesem hin zu subkortikalen und spinalen Kerngebieten. Von den Schichten II bis IV ist bekannt, dass die sich dort befindlichen Neurone über das Corpus callosum (CC) hin zur anderen Hemisphäre projizieren (*callosal projection neurons*, CPN) oder in derselben Hemisphäre Verbindungen mit anderen Neuronen aufbauen⁸⁵. Beginnend mit E12,5 bis hin zu E16,5 (aber mit dem Maximum an E15,5) werden die typischen kleineren, dichtgepackten Körnerzellen für Schicht II und die großen Pyramidenzellen für Schicht III gebildet. In Schicht IV befinden sich die größeren bedornten Sternzellen und kleinere Pyramidenzellen, welche um E14,5 gebildet werden. Die Neurone aus dieser Schicht werden auch granuläre Neurone (GN) genannt. Sie erhalten Informationen

aus dem Thalamus und projizieren nur intrakortikal. Die Hör-, Seh- und sensible Rinde ist in dieser Schicht ausgeprägt. Das Besondere an Schicht IV ist, dass sie sich nur im sensorischen Bereich des Cortex (granulärer Cortex) befindet und im motorischen Bereich nicht mehr ausgebildet wird⁸⁶. Die Schicht V mit den großen Pyramidenzellen ist vor allem im motorischen Bereich des Cortex ausgebildet (agranulärer Cortex) und im sensorischen Bereich nicht zu sehen. Die Neurone in Schicht V verfügen neben einer intrakortikalen Projektion zum CC auch eine Projektion zum Rückenmark über den kortikalen Spinaltrakt (*subcerebral projection neurons*, SCPN). Sie werden an E13,5 gebildet^{63,68,87}. Die anschließende Schicht VI besteht aus kleinen Pyramidenzellen und Nicht-Pyramidenzellen. Über die Nuclei im ZNS projizieren sie zum Thalamus (*corticothalamic projection neurons*, CThPN). Die Neurone dieser Schicht werden an E12,5 gebildet⁸⁷. Die Schichten werden also bis auf Schicht I, welche schon ab E11,5 vorhanden ist, von innen - beginnend mit Schicht VI - nach außen und abschließend mit Schicht II gebildet (*inside first - outside last*)⁸². Die Schicht I ist von entscheidender Bedeutung für die Neurogenese, weshalb diese schon vor allen anderen Schichten gebildet wird. Die darin befindlichen Cajal-Retzius-Zellen (CR) enthalten das Signalmolekül Reelin. Reelin ist für die radial migrierenden Neurone ein Stoppsignal und der Grund, warum sie beim Durchwandern der CP ihre charakteristische Position erreichen⁸⁸. Der zeitliche Ablauf für die Bildung der verschiedenen Neuronen ist in Abbildung 1.5 dargestellt. Auch die Migration dieser Neurone kann sich unterscheiden. Die bekanntesten Neurone für die radiale, *inside first-outside last*-Migration sind die Projektionsneurone. Sie bilden lange interkortikale oder subkortikale Verknüpfungen (Axone) und besitzen Glutamat-Rezeptoren, welche charakteristisch für exzitatorische Neurone sind. Im Gegensatz dazu gibt es noch die tangential und die zufällige Migration. Diese Migrationsarten kommen häufig bei sogenannten GABAergen Neuronen - auch als inhibitorische Interneurone bekannt - vor. Diese besitzen einen Rezeptor für den Neurotransmitter GABA (*gamma-aminobutyric acid*). Jedoch wurde auch für GABAergene Neurone eine radiale Migration nachgewiesen. Sie haben, anders als Projektionsneurone, nur kurze Ausläufer und interagieren eher in derselben kortikalen Hemisphäre. Bisher ist aber noch unklar, wann und warum diese Neurone ihre Migrationsrichtung ändern^{89,90}. Eine wichtige Rolle bei der radialen Migration spielt jedoch das Zytoskelett (Kapitel 1.3.3). Ab E17 wird in der kortikalen Entwicklung der Maus begonnen, die *midline* des CC mit Axonen der Schichten II/III (80 %), V (20 %) und VI (wenige) zu überqueren^{91,92}. Außerdem bilden sich nun aus den RG die Astrozyten, welche über Verbindungen zu Blutgefäßen verfügen und somit die Neurone ernähren⁶³.

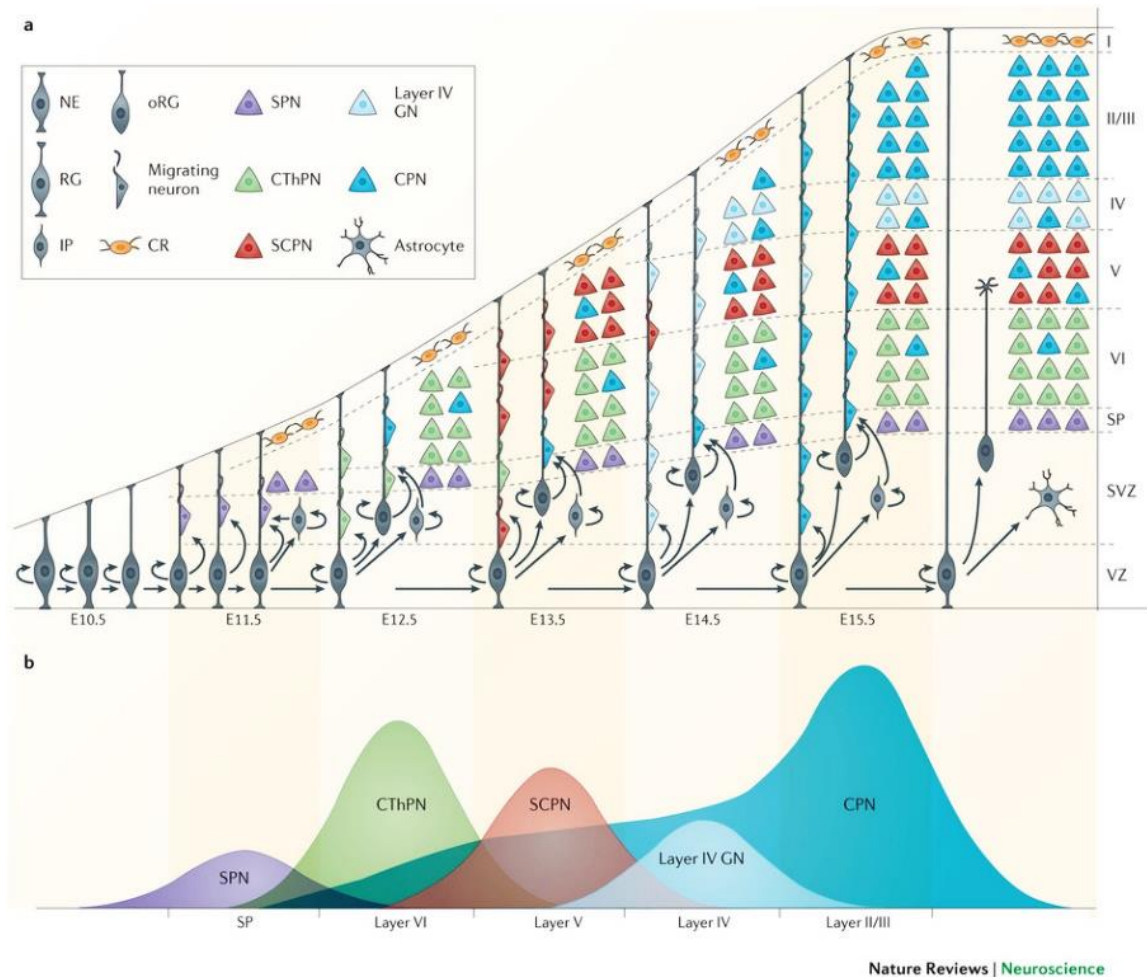


Abbildung 1.5: Zeitlicher Ablauf der Neurogenese

Die Abbildung zeigt die Entstehung der kortexalen Schichten von Embryonaltag 10,5 bis 17,5.

A) An E10,5 sind die ersten Neuroepithelialzellen (NE) vorhanden, aus denen sich die radialen Gliazellen (RG) ab E11,5 entwickeln. Aus den RG bilden sich die Cajal-Retzius Zellen (CR) der Schicht I, die intermediären Vorläuferzellen (IP) und die äußeren Radialzellen (oRG). Diese Zellen sind alles Neurone der *subplate* (SPN). Ab E17 bilden sich aus den RG auch die Astrozyten zwischen den Neuronen aus. B) Neurone, die ab E12,5 gebildet werden, gehören zur Schicht VI und sind *corticothalamic projection neurons* (CThPN). Gleichzeitig fängt hier die Bildung der *callosal projection neurons* (CPN) an, welche ihren Peak an E15,5 erreichen und die Neurone der Schicht II und III bilden. Die *subcerebral projection neurons* (SCPN) werden ab E13,5 für die Schicht V gebildet und in Schicht IV befinden sich die granulären Neurone (GN), welche ab E14,5 gebildet werden⁸⁷.

Rolle von *Ctip2* und *Cux1* während der Entwicklung des Cortex cerebri

Nachdem aus den RG und den IPC Neurone entstehen, machen sich diese auf den Weg in Richtung der Basalmembran. Durch radiale Migration gelangen sie nach dem *inside first - outside last*-Prinzip in ihre vorherbestimmte Schicht und bilden die CP. Für das Auffinden der richtigen Schicht sind extrinsische Faktoren, wie z.B. Reelin, aber auch intrinsische Faktoren notwendig. Als intrinsische Faktoren wurden Proteine entdeckt, welche nach Deletion zu einer fehlgeleitenden Migration der Neurone oder sogar zu Letalität geführt

haben⁹³. Einige wichtige Proteine, welche für den *cell fate* verantwortlich sind, werden im Folgenden beschrieben.

Für die Markierung der Pyramidenzellen aus den oberen Schichten (II-IV) ist *cut-like homeobox 1* (Cux1) bekannt^{93,94}. Interessanterweise wurde auf mRNA-Ebene in Mausgehirnen von E14- und E16-Tieren auch ein Signal in den Vorläuferzellen der SVZ, aber nicht in der VZ gefunden. Dabei gab es für die unteren Schichten keine Signale⁹⁴. Das spricht wieder dafür, dass die Neurone der oberen Schichten aus der SVZ heraus gebildet werden⁹⁵. Zusammen mit Cux2 ist Cux1 dafür verantwortlich, dass Reelin produziert wird und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Neurogenese⁹⁶. Außerdem spielen die Cux-Proteine eine Rolle beim *branching* (Verzweigung) von Dendriten, bei der Morphologie von *spines* (Dornen) und der Ausbildung von Synapsen⁹³. Ein weiteres wichtiges schichtspezifisches Protein ist der Transkriptionsfaktor *COUP_TF-interacting protein 2* (Ctip2, auch bekannt als Bcl11b). Er kommt in den Pyramidenzellen der Schicht V vor und kontrolliert deren Differenzierung. Eine Deletion von *Ctip2* hat keine Auswirkungen auf die Bildung der Schicht V, jedoch wurde das Auswachsen der Axone der subzerebralen Projektionsneurone (SCPN) derart verändert, dass diese nicht mehr das Rückenmark erreichen, wie es sonst bei Kontrolltieren der Fall war⁹⁷.

1.3.2 Polarisierung des Golgi-Komplexes in Neuronen

Der Golgi-Komplex ist ein wichtiger Initiator für die Polarisierung von Neuronen. Er sammelt sich neben dem Zentrosom und den Endosomen im Zytoplasma an der Position der Membran an, wo das spätere Axon ausgebildet wird^{98,99}. Hier werden durch einen der Hauptregulatoren des Golgi-Komplex (ARF1) viele Proteine, welche für das Auswachsen des Axons zuständig sind (Rho, Rac1, Cdc42), rekrutiert¹⁰⁰. Versuche mit Brefeldin A (BFA, Lacton-Antibiotikum), welches wichtige Proteine von der Golgi-Membran löst, die Golgi-Struktur auflöst und den vesikulären Transport inhibiert, zeigten, dass Neurone ohne funktionellen Golgi-Komplex nicht mehr in der Lage sind, das Axon auszubilden oder vorhandene Axone zu verlängern¹⁰¹. Ebenso entscheidend ist der Golgi-Komplex für die Entwicklung und den Erhalt der Dendriten. So wurde während der Entwicklung von Neuronen beobachtet, dass der Golgi-Komplex im Zytoplasma rotiert, bis er sich in Richtung der apikalen Dendriten orientiert¹⁰². In der späteren Entwicklungsphase von Neuronen, d.h. nachdem die Dendriten eine größere Komplexität erreicht haben, bilden sich in diesen kleine Ausläufer des Golgi-Komplexes. Bei näherer Betrachtung kann an diesen Ausläufern ein komplexes Transportsystem aus ER, Ribosomen und weiteren notwendigen Bestandteilen

für eine Proteinsekretion erkannt werden¹⁰³. Werden die Golgi-Dynamiken gestoppt, kommt es zu verkürzten Dendriten. Bei der Zerstörung der Golgi-Ausläufer führt dies sogar zu einer Rückbildung der Dendriten^{102,104}. Zusammenfassend ist der Golgi-Komplex essentiell für die Initiierung der Axon- und Dendriten-Ausbildung und deren Erhalt. Das nächste Kapitel zeigt auf, dass dies nicht der einzige Faktor für eine erfolgreiche Polarisierung von Neuronen ist.

1.3.3 Die Funktion des Zytoskeletts in Neuronen

Differenzierung von Neuronen

Neurone durchlaufen bis zur Ausdifferenzierung fünf verschiedene Phasen während ihrer Entwicklung¹⁰⁵. In Phase 1 haben die späteren Neurone einen Zellkörper mit fächerartig angeordneten Aktinfilamenten, die Lamellipodien, die zur Fortbewegung nützlich sind. Erste kleine Fortsätze bilden sich dann in Phase 2. Anatomisch sind hier noch keine Unterschiede erkennbar, jedoch sammeln sich in einem der Fortsätze schon vermehrt stabile MT an¹⁰⁶. Die Formation des Axons und damit die Polarisierung des Neurons beginnt mit Phase 3. Hier wird mit der Positionierung des Zentrosoms und des Golgi-Komplexes in Richtung des längsten Neuriten begonnen. Insbesondere aus den zentrosomalen MTOC bilden sich MT und der Neurit wird durch weiteres Auswachsen das spätere Axon. Axone können in Säugetieren wenige μm , jedoch auch bis zu 1 m lang werden und den kompletten Körper durchziehen. Dabei ist es wichtig, dass die MT ein stabiles Gerüst vom Zellkörper bis zur Synapse bilden, um die Weiterleitung verschiedenster Proteine (Neurotransmitter) und elektrischer Signale an postsynaptische Neurone zu gewährleisten. Um das Auswachsen eines Axons zu initiieren, müssen zunächst das Aktin-Zytoskelett und das MT-Netzwerk ihre Konformation ändern¹⁰⁷. Die wichtigsten Signalmoleküle, welche den Prozess an einer Seite der Zellmembran der Lamellipodien (Phase 1) einleiten, sind Rho-GTPasen und dessen Gegenspieler Rac1 und Cdc42. Dabei übernehmen die Rho-GTPasen eine inhibierende Rolle. Sie können dafür verantwortlich sein, dass die kleinen Fortsätze aus Phase 2, welche nicht das initiale Axon werden, wieder zurückgebildet werden¹⁰⁸. Rac1 und Cdc42 befinden sich vermehrt an der Position des späteren Axons und sind für dessen Auswachsen in Phase 3 verantwortlich¹⁰⁹. In Phase 4 wachsen auch die verbliebenen Neurite der Phase 2 langsam weiter und bilden Dendriten aus. Diese verzweigen sich nach ca. sieben Tagen (bei der Maus) und bilden an ihren Fortsätzen sogenannte Dornen (*spines*). Mit der Verlängerung des Axons werden gleichzeitig die ersten elektrischen Aktivitäten und synaptische Kontakte gebildet (Phase 5)^{105,107}.

Initiierung des Axons

Nachdem sich die Signalmoleküle positioniert haben, muss sich nun das Zytoskelett neu formatieren, um ein Axon ausbilden zu können. Der Wachstumskegel (*growth cone*, Wachstumszone am Axonterminal) eines Axons hat eine Kernregion mit vielen Membranorganellen und MT sowie einen peripheren Bereich, welcher aus Aktin-reichen Lamellipodien besteht. Am auswachsenden Ende der Lamellipodien trägt die Polymerisierung von Aktin dazu bei, dass das Axon gebildet wird¹¹⁰. Hier sind verschiedene Proteine wie Arp2/3, mDia oder Proteine der WASP-Familie notwendig, um neue Aktinfilamente zu bilden und diese als Schutz vor Depolymerisierung miteinander zu verknüpfen¹¹¹⁻¹¹³. Es ist jedoch nicht klar, ob Aktin der alleinige Auslöser für die Initiierung des Axons ist. Auch den MT wird eine bedeutende Rolle vor allem für die Verlängerung des Axons zugesprochen. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass es ohne das MT-Netzwerk im Wachstumskegel nicht zu einer Verlängerung des Axons kommt. Außerdem spielt die Stabilisierung von MT eine große Rolle. In Neuriten der Phase 2 und dem längsten Neuriten in Phase 3 wurden mehr stabile MT nachgewiesen als in den anderen Neuriten. In Experimenten mit Nocodazol konnte gezeigt werden, dass MT in den Wachstumskegeln von Neuriten schneller abgebaut werden als im Axon^{99,106,114}. Der Gegenspieler von Nocodazol ist Taxol. Es stabilisiert MT¹¹⁵. Bei der Behandlung mit hohen Dosen Taxol wurde festgestellt, dass die Dynamik von MT im Wachstumskegel völlig eingestellt wurde und dass das Axon nicht weiter auswachsen konnte^{106,116}. Letztendlich ist die Polarität der Neurone und das Auswachsen der Axone ein komplexes Zusammenspiel zwischen Aktinfilamenten und dem MT-Netzwerk und wird durch unterschiedliche Proteine beeinflusst.

1.4 Zielstellung

Der Verlust von *COH1* führt zu einer Fragmentierung des Golgi-Komplexes. Dies kann unter anderem durch eine veränderte Dynamik des MT-Netzwerkes verursacht werden. Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, den Einfluss von *COH1* auf die Dynamik des MT-Netzwerkes zu prüfen. Eine mögliche molekulare Verbindung zwischen *COH1* und dem MT-Netzwerk soll mittels eines Protein-Interaktion-*screens* analysiert werden.

Aktuell gibt es kein geeignetes Tiermodell um die neurologische Entwicklung nach Verlust von *COH1 in vivo* zu untersuchen. Um einen ersten molekularen und zellbiologischen Einblick in die Gehirnentwicklung nach *COH1*-Verlust zu bekommen, soll in dieser Arbeit ein partieller *Coh1 knock down* durch *in utero*-Elektroporation erreicht werden. Dafür ist als Vorarbeit die Etablierung einer shRNA zur Verringerung der *Coh1*-mRNA und eines

mausspezifischen Coh1-Antikörpers notwendig. Nach erfolgtem *in utero Coh1 knock down* werden die Gehirne mittels histologischer und zellbiologischer Techniken charakterisiert. Damit sollen neue Hinweise auf mögliche Defekte der Migration und Anordnung von Neuronen in den Cortex-Schichten gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Tabelle 1: Primäre Antikörper

(WB: Verdünnung im Western Blot, IF: Verdünnung in der Immunfluoreszenz)

Antigen	Isotyp	Katalognr.	Lieferant	WB	IF
6x HIS	chicken	HIS-IP-1010	Aves Biolabs	1 zu 500	
β -Aktin	mouse	A5441	Sigma Aldrich	1 zu 1000	
acTubulin	mouse	T6793	Sigma Aldrich	1 zu 1000	1 zu 2000
C-COH1 (C-Terminus)	guinea pig	selbst generiert	Pineda	1 zu 100	1 zu 100
COH1	rabbit	selbst generiert	#442-1, Seifert	1 zu 100	1 zu 100
Ctip2	rat	ab18465	Abcam		1 zu 300
Cux1	rabbit	ab54583	Abcam		1 zu 200
Flag	mouse	F3165	Sigma Aldrich	1 zu 500	1 zu 500
GFP	mouse	11814460001	Roche	1 zu 1000	1 zu 1000
GFP	chicken	GFP-1020	Aves Biolabs	1 zu 1000	1 zu 2000
Giantin	rabbit	PRB-114C	Covance		1 zu 500
GM130	mouse	610822	BD Bioscience		1 zu 500
HA	rabbit	H6908	Sigma Aldrich	1 zu 500	
HA	mouse	H9658	Sigma Aldrich	1 zu 500	
I-COH1 (intern)	rabbit	selbst generiert	Pineda	1 zu 100	1 zu 100
myc	mouse	ET-MY100	Aves Biolabs	1 zu 1000	1 zu 2000
N-COH1 (N-Terminus)	rabbit	selbst generiert	Pineda	1 zu 100	1 zu 100
Rab6	mouse	selbst generiert	A. Barnekow	1 zu 500	1 zu 500
α -Tubulin	rat	sc-53029	Santa Cruz	1 zu 1000	1 zu 2000
α -Tubulin	mouse	T6074	Sigma Aldrich	1 zu 1000	1 zu 2000
β -Tubulin	mouse	E7	DSHB	1 zu 1000	1 zu 2000

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper

(WB: Verdünnung im Western Blot, IF: Verdünnung in der Immunfluoreszenz)

Antigen	Katalognr.	Lieferant	WB	IF
Alexa Fluor® 405 AffiniPure donkey anti-mouse IgG (H+L)	715-475-150	Jackson ImmunoResearch		1 zu 250
Alexa Fluor® 405 AffiniPure donkey anti-rabbit IgG (H+L)	711-475-152	Jackson ImmunoResearch		1 zu 250
Alexa Fluor®647 AffiniPure donkey anti-rat IgG (H+L)	712-605-153	Jackson ImmunoResearch		1 zu 250
Cy TM 2 AffiniPure donkey anti-chicken IgG (H+L)	730-225-155	Jackson ImmunoResearch		1 zu 250
Cy TM 2 AffiniPure donkey anti-mouse IgG (H+L)	715-225-150	Jackson ImmunoResearch		1 zu 250

Cy ^{TM3} AffiniPure donkey anti-guinea pig IgG (H+L)	706-165-148	Jackson ImmunoResearch	1 zu 250
Cy ^{TM3} AffiniPure donkey anti-mouse IgG (H+L)	715-165-150	Jackson ImmunoResearch	1 zu 250
Cy ^{TM3} AffiniPure donkey anti-rabbit IgG (H+L)	711-165-152	Jackson ImmunoResearch	1 zu 250
polyclonal rabbit α -guinea pig HRP	P0141	Dako	1 zu 2000
polyclonal goat α -mouse HRP	P0447	Dako	1 zu 2000
polyclonal swine α -rabbit HRP	P0399	Dako	1 zu 2000

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)	Merck
Agarose	Sigma Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
B27	Sigma Aldrich
Bacto Agar	BD
Benzylalkohol	Roth
Benzylbenzonat	Roth
Bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS3)	Thermo Scientific
Boehringer Block	Roth
Borax	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	Roth
BSA	Roth
Buprenorphin	Sigma Aldrich
Chloroform	Merck
cOmplete TM Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
Denhardt's Solution	Roth
Dimethylsulfoxid	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Dnase	Qiagen
Eselserum	Sigma Aldrich
EDTA / Ethylendiamin-tetraessigsäure p.A.	Sigma Aldrich
Eisessig	Merck
Entellan®	Merck
Essigsäure	AppliChem
Ethanol	Merck
FastGreen	Merck
Fluoromount	Serva
GelRed TM	Roth
Glycerin	Roth
Hefeextrakt	Fluka
Hefe-RNA	Roth

Heparin	Roth
Hepes	Roth
Isofluran	Abbot GmbH & Co. KG
Isopropanol	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Ketamin	Pharmacia & Upjohn
KOH 3 mol/l Lösung	Merck
Magermilchpulver	Roth
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	Merck
Methanol	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natriumthiosulfat x 5 H ₂ O	Roth
NBT/ BCIP	Sigma Aldrich
Nocodazol	Roth
Paraformaldehyd	Merck
Poly-D-Lysin	Sigma Aldrich
Ponceau S	Sigma Aldrich
Rotiphorese	Roth
Saccharose	Roth
Salmon Sperm DNA	Roth
Salpetersäure	AppliChem
Salzsäure 37 %	Merck
SDS / Natriumlaurylsulfat	Roth
Sheepserum	Sigma Aldrich
Silbernitrat	Merck
Temed	Sigma Aldrich
Tissue Tek®O.C.T.	Fisher Scientific
Triethanolamin	Merck
Tris(Hydroxymethyl)aminomethane (Tris HCl)	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris Base)	Merck
Triton X-100	Serva
Trizol peqGOLD TriFast 30-2020	PeqLab
Trypanblau	AppliChem
Trypsin	Serva Electrophoresis
Trypton	BD Biosciences
Tween 20	Merck
β-Mercapthoethanol	Sigma Aldrich

Tabelle 4: Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitslösung	Hersteller
Ampicilin	10 mg/ml	1 zu 1000 (100 µg/ml)	Sigma Aldrich
Kanamycin	10 mg/ml	1 zu 1000	Sigma Aldrich
Penicillin-Streptomycin	10 mg/ml (S), 10000 U (P)	1 zu 100	PAN Biotech

Tabelle 5: Enzyme mit dazugehörigen Puffern

Enzyme/Puffer	Verwendung	Firma
BamHI FD	Restriktionsverdau	Thermo Scientific
Bioscript	cDNA-Synthese	Bioline GmbH
Calf Intestine Phosphatase (CIAP)	Dephosphorylierung	Sigma Aldrich GmbH
DpnI FD	Methylierungsverdau	Thermo Scientific
EcoRI FD	Restriktionsverdau	Thermo Scientific
T4 Ligase	Klonierung	Biolabs
T4 Ligase Puffer	Klonierung	Biolabs
Fast Digest (FD) Puffer	Restriktionsverdau	Thermo Scientific
NotI FD	Restriktionsverdau	Thermo Scientific
HindIII FD	Restriktionsverdau	Thermo Scientific
BglII	Restriktionsverdau	Thermo Scientific

2.1.3 Kits

Tabelle 6: Kits

Materialien	Hersteller
Micro Amp Fast Optical 96-Well Reaction Plate (0,1 ml)	Life technologies
Micro Amp™ Optical Adhesive Film	Life technologies
Invisorb®Spin Plasmid Mini Two	Stratec Molecular
Invisorb®Spin DNA Extraction Kit	Stratec Molecular
NucleoBond® Plasmid Purification Kit	Macherey-Nagel

2.1.4 Medien

Tabelle 7: Für die Zelllinien verwendete Medien

Medien	Zusammensetzung
Hek293-Zellen	Minimum Essentiell Medium (Sigma Aldrich), 5 % FKS, 1 % L-Glutamin
HeLa-Zellen	DMEM (PAN), 5 % FKS
N2A-Zellen	DMEM, 10 % FKS, 1 % Pen/Strep (Biochrom)
Neurone	Neurobasal Medium (Gibco), 25 µM β-Mercaptoethanol, 1x Glutamax (Gibco), 1x B27, 1x Pen/Strep
Plating-Medium	DMEM, 10 % FKS, 1 % Pen/Strep (Biochrom)

Tabelle 8: Medien für Bakterienkulturen

Medien	Zusammensetzung
LB-Agar	1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1,5 % (w/v) Agar
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt

2.1.5 Plasmide und siRNAs

Tabelle 9: Bereits vorhandene Plasmide und siRNAs

Plasmid	Resistenz	Hersteller
pGEX-6P-1	Ampicillin	GE Healthcare
pCMV-myc_hCOH1_1-3997	Ampicillin	Wenke Seifert
pEGFP-C(1-3)	Kanamycin	Clontech
pEGFPC3_hCOH1_1-3997	Kanamycin	Wenke Seifert
pHISC3-COH1_1-3997	Ampicillin	Wenke Seifert
pcDNA3.1/V5-His_hCOH1_1-3997	Ampicillin	Wenke Seifert
pFLAG_hCOH1_1-2347	Ampicillin	Wenke Seifert
pFLAG_hCOH1_2307-3997	Ampicillin	Wenke Seifert
pcDNA3.1_V5/HIS_Ank	Ampicillin	Wenke Seifert
EB3-tdTomato	Kanamycin	Addgene
pSUPER.retro.neo+GFP	Ampicillin	Oligoengine
pSUPER.retro.neo+GFP_luciferase	Ampicillin	Oligoengine
Silencer™ Pre-Designed siRNA, Katalog-Nr. AM16708, siRNA ID 25721 (siCOH1)		Ambion®, Thermo Scientific
Silencer™ Negative Control No. 2 siRNA, Katalog-Nr. AM4637, (siScramble)		Ambion®, Thermo Scientific

2.1.6 Geräte und Software

Tabelle 10: Geräte

Gerät/Bezeichnung	Funktion	Hersteller
Axiocam 512 Digitalkamera	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	Carl Zeiss AG
Brutschrank Zellkultur (Binder Inkubator Serie CB150)	Inkubator für Zellen	Binder GmbH
DMRB Lichtmikroskop	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	Leica Microsystems GmbH
Elektrophoresegerät Bio-Rad Power Pac 200	DNA-Gelelektrophorese	Bio-Rad Laboratories GmbH
Elektrophoresegerät Pharmacia EPS 600 (SDS-Gel)	Protein-Gelelektrophorese	Pharmacia Biotech GmbH
Filmentwickler Curix 60	Western Blot Analyse	Agfa-Gevaert N.V.
Geldokumentationseinheit AlphaImager® EC	DNA-Gelelektrophorese-Aufnahme	Biozym Scientific GmbH
Heizblock Thermomixer compact	Beheizung von Reaktionsgefäßen	Eppendorf AG
Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5 Exciter	Konfokalmikroskopie	Carl Zeiss MicroImaging GmbH
Kryostat Leica CM 3050S (Kryomikrotom)	Kryoschnitte	Leica Mikrosysteme GmbH

NanoPhotometer	Messung DNA/RNA/OD	Implen GmbH
PCR-Cycler PTC-220 DNA Engine Dyad™ Peltier Thermal Cycler	PCR	MJ Research Inc.
pH-Meter Knick 766 Calimatic	pH-Wert Bestimmung	Knick
Real-time Cycler 7500 Fast	qPCR	Applied Biosystems
SDS-Gelgießvorrichtung	Gießen von SDS-Gelen	Bio-Rad Laboratories GmbH
Semi-dry Blotter Transblot® SD	<i>Immunoblotting</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH
Sp8 Konfokalmikroskop	Konfokalmikroskopie	Leica Microsystems
steriler Arbeitsplatz Zellkultur Hera Safe HS 12/2	Arbeiten mit Zellen in Kultur	Heraeus Holding GmbH Hettich Laborapparate AG
Tischzentrifuge Mikro 200R	Zentrifugation	
Ultraschall (SONOPULS GM70; MS72)	Beschallung	Bandelin electronic
Waage BP210S	Abwiegen	Sartorius
Zeiss Spinning Disc System CXU-S1	<i>live cell</i> -Aufnahmen	Carl Zeiss MicroImaging GmbH
Zentrifuge Labofuge 400R	Zentrifugation	Heraeus Holding GmbH

Tabelle 11: Software

Bezeichnung	Funktion	Bezugsquelle
AxioVision lite	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	Carl Zeiss GmbH
Chromas 2.01	Auswertung von Sequenzierungen	Technelysium Pty Ltd
GraphPad Prism 5	Statistische Analyse	Charité
ImageJ mit Fiji <i>plug-in</i>	Bildanalyse der Mikroskopier- & <i>immunoblot</i> -Ergebnisse	https://fiji.sc/
Leica Application Suite X	Konfokalmikroskopie	Leica Microsystems
NCBI, BLAST	Auswertung von Sequenzierungen	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Sequence Detection Systems SDS 2.1	Auswertung von qPCR	Applied Biosystems
UNICORN 5.2	Steuerung Gelchromatographie	GE Healthcare, Freiburg
Zen Version 8	Konfokalmikroskopie	Carl Zeiss MicroImaging GmbH

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Quantitative Analyse mittels *real time*-PCR

RNA-Isolation mit Trizol

Zur Messung der Transkriptionseffizienz war es nötig die RNA aus HeLa-Zellen zu extrahieren. Die Zellen wurden mit einer Konfluenz von 50 % ausgesät, bei 70 % transfiziert und nach drei Tagen geerntet. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die transfizierten HeLa-Zellen in 500 µl Trizol aufgenommen. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurden 100 µl Chloroform hinzugefügt, das Reaktionsgefäß sechsmal invertiert und wiederum 3 min bei RT inkubiert. Ein folgender Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13000x g trennte die verschiedenen Phasen in eine Proteinphase (in Chloroform), eine DNA-Phase (fest, weiß) und eine wässrige Phase, die die RNA enthielt. Die wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Durch die Zugabe von 250 µl Isopropanol wurde die RNA gefällt. Dazu wurde das Gemisch für 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei 13000x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet zweimal mit 500 µl 75 %-igem Ethanol und einmal mit 250 µl 100 %-igem Ethanol gewaschen (7500x g, 5 min, 4 °C). Nach Trocknung des Pellets wurde dieses in RNase-freies Wasser aufgenommen (je nach Pelletgröße in 11-50 µl) und bei 55-60 °C inkubiert. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C eingefroren.

cDNA-Synthese

Die cDNA wurde durch die *reverse transcriptase*-Reaktion hergestellt. Als cDNA-Matrize wurde 1 µg RNA für einen 20 µl Ansatz eingesetzt. Im ersten Schritt wurden die Sekundärstrukturen der RNA bei 95 °C denaturiert. Dem Ansatz wurden 0,4 µl eines *random*-Hexamerprimers (50 µM, Invitrogen, USA) hinzugefügt und bis zu einem Volumen von 12 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 70 °C inkubiert, um eine Anlagerung der Primer zu ermöglichen. Da die *reverse transcriptase* nicht thermostabil ist, wurde der Reaktionsansatz für 3 min gekühlt (4 °C). In dieser Zeit wurde dem Reaktionsansatz 4 µl Puffer (5x M-MLV *reverse transcriptase reaction buffer*, Promega, USA), 0,25 µl RNase Inhibitor (40 U/µl RiboLock RNase Inhibitor, ThermoScientific), 1 µl dNTPs (10 mM), 2,5 µl RNase-freies H₂O und 1 µl *reverse transcriptase* (M-MLV *reverse transcriptase*, Promega, USA) hinzugegeben. Die Reaktion startete nach der Abkühlzeit mit einer Inkubation für 5 min bei 25 °C, gefolgt von einem 2-

stündigen Schritt bei 42 °C und weiteren 10 min bei 70 °C. Die cDNA wurde anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

Real time-PCR

Die *real time-PCR* kommt zum Einsatz, wenn die Expression von Transkripten quantitativ ermittelt werden soll. Für die Reaktion wurden je 1 µl einer 5 µM-Primerverdünnung (*forward* und *reverse* Primer, siehe Tabelle 12), 10 µl einer 1:50 Verdünnung der cDNA und 2 µl des 5x HOT FIRE Pol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne) eingesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Nuklease-freiem H₂O auf eine Gesamtmenge von 20 µl aufgefüllt.

Tabelle 12: Primer für die *real time-PCR*

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
hCOH1_qPCR_ex58F	TCTCACTGGATGAGGAGCAC	BioTeZ
hCOH1_qPCR_ex58/59R	ATACCAGCAATTGCACCAAG	BioTeZ
GAPDH_F	TGCACCACCAACTGCTTAGC	BioTeZ
GAPDH_R	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	BioTeZ

Sowohl für die Proben als auch für eine Negativkontrolle mit Nuklease-freiem Wasser wurde eine Dreifachbestimmung angesetzt. Die Emissionssignale wurden mit dem 7500 Fast *real time-PCR* System (Applied Biosystems) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der SDS2.1 Software (Applied Biosystems) nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode¹¹⁷. Für die Kontrolle der Spezifikation der PCR-Produkte wurden im Anschluss die Schmelzkurven aufgenommen und ausgewertet (Tabelle 13).

Tabelle 13: Programm für eine *real time-PCR*

Temperatur	Zeit	Zyklus
50°C	2 min	1x
95°C	10 min	1x
95°C	15 s	40x
60°C	1 min	
95°C	15 s	
60°C	1 min	1x
95°C	15 s	

2.2.2 Klonierung

Amplifizierung und Ligation

a) Überexpressionskonstrukte

Die Amplifizierung dieser Konstrukte erfolgte mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Konstrukt-spezifischen Primerpaaren (siehe Tabelle 15, in rot ist die *Cohl*-Teilsequenz dargestellt). Die Konstrukte wurden mit folgendem 50 µl Ansatz amplifiziert:

- 2,5 µl *forward* Primer (10 µM, Invitrogen)
- 2,5 µl *reverse* Primer (10 µM, Invitrogen)
- 1,5 µl DMSO
- 2 µl dNTP-Mix (10 mM, Invitrogen)
- 2 µl MgCl₂ (50 mM, Invitek)
- 1 µl 5 U/µl *Taq* DNA Polymerase (Invitek)
- 2,5 µl 10x NH₄-Reaktionspuffer (Invitek)
- 5 µl 5x Phusion® HF-Puffer (Thermo Scientific)
- 0,5 µl Phusion® Polymerase (Thermo Scientific)
- 1 µl *template*-cDNA
- 29,5 µl HPLC-H₂O

Die PCR erfolgte mit dem PTC-220 DNA Engine Dyad™ Peltier Thermal Cycler (MJ Research Inc.). Die Schritte zwei bis vier des PCR-Programms (siehe Tabelle 14) wurden mit 40 Zyklen wiederholt, bevor die PCR mit dem finalen Elongationsschritt (Schritt 5) endete.

Tabelle 14: Endpunkt-PCR-Profil

Schritt	Temperatur in °C	Zeit
1. Denaturierung	95	5 min
2. Denaturierung	95	30 sec
3. Annealing	61-55	45 sec
4. Elongation	72	1-2 min
5. Elongation	72	10 min
6. Kühlen	4	∞

Zur Aufreinigung des PCR-Produkts kam der Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Strattec Molecular) zur Anwendung. Die Angaben des Herstellers sind dabei eingehalten wurden. Die DNA wurde mit 30 µl HPLC-H₂O (70 °C) eluiert und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Ligation mit dem Expressionsvektor wurde die T4 DNA Ligase (400 U/µl, New England Biolabs) verwendet. Der Ansatz hatte ein Volumen von 10 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

- 1 µl 10x T4-Ligase-Puffer
- 1 µl T4 DNA-Ligase

- 7 µl Vektor-DNA: *insert*-DNA-Gemisch (Verhältnis 1:3)
- 1 µl HPLC-H₂O

Die Ligationsreaktion wurde über Nacht bei 16 °C durchgeführt. Anschließend folgte eine 10-minütige Hitzeinaktivierung bei 65 °C und die Transformation von *E. coli* XL1 mit dem ligierten Vektor (siehe 2.2.2, *Transformation*).

Tabelle 15: klonierte Konstrukte für die Überexpression

Plasmid	PCR-Produkt/Ausgangsvektor	Sequenz/ Literatur
pCAG-IRES-EGFP_hCOH1_1-3997	pCMV-myc_hCOH1_1-3997 Sall (fwd), NotI (rev)	Seifert et. al, 2009
pGEX-6P1_mCoh1_1-100aa (NM_177151.3)	mCoh1_Nterm_ORF1-Sall (fwd) mCoh1_N100_NotI (rev)	AGAGCTCGTGCAGCTTATGCTGGAGTCGTACGTAACCTCCAAT ATATATGCGGCCGCATGGTCATCCTGTATTCCATC
pGEX-6P1_mCoh1_I2309-2409 (NM_177151.3)	mCoh1_I100_SallF mCoh1_I100_NotIR	AGAGCTCGTGCAGCTTATGATGTTGTGGAGATATCCAGAAC ATATATGCGGCCGCATTTTGATTGTTGTTTGGACGATTC
pGEX-6P1_mCoh1_C3893-3993 (NM_177151.3)	mCoh1_C100_SallF mCoh1_Cterm_NotIR	AGAGCTCGTGCAGCTTCAAAACAACCTACTCACTGTG ATATATGCGGCCGCTCAGGAGAAGCCTTTCCTCAGGGCTT

b) shRNA Vektoren

Die für einen effizienten *knock down* von *Coh1* am besten geeigneten 19-Nukleotid-Sequenzen wurden mit Hilfe des pSUPER RNAi Systems von Oligoengine durch Eingabe der kompletten murinen *Coh1*-Sequenz generiert. In der folgenden Tabelle 16 sind die kompletten Sequenzen für das Design eines *hairpin-loops* inklusive *BglIII*- und *HindIII*-Schnittstellen dargestellt. Die *sense*-Sequenz (5'-3' Richtung) des gewünschten Abschnittes des Zielgens ist grün dargestellt und die *antisense*-Sequenz rot (3'-5' Richtung). Als Kontrollkonstrukt diente eine shRNA gegen *luciferase* (zur Verfügung gestellt von I. Bormuth). Die Prozessierung der shRNA ist in Abbildung 2.1 ersichtlich.

Tabelle 16: klonierte shRNA-Konstrukte

Bezeichnung	Primer	Sequenz
pSUPER.retro.neo+gfp_Coh1_sh5847 (shRNA #1)	BglIII (top) HindIII (bottom)	GATCCCCGGAAGTATCCATCTTTGATGCTTCAAGAGAGCATCAAAGATGGATACTTCCTTTTTA AGCTTAAAAGGAAGTATCCATCTTTGATGCTCTCTTGAAGCATCAAAGATGGATACTTCCGGG
pSUPER.retro.neo+gfp_Coh1_sh7143 (shRNA #2)	BglIII (top) HindIII (bottom)	GATCCCCGCCAGATATCAACCTTGTAATCAAGAGAGTGTAACAAGTTGATATCTGGCTTTTTTA AGCTTAAAAGCCAGATATCAACCTTGTAATCAAGAGAGTGTAACAAGTTGATATCTGGCGGG
pSUPER.retro.neo+gfp_Coh1_sh25721 (shRNA #3)	BglIII (top) HindIII (bottom)	GATCCCCGGAAGTAAATCAACCTTCAAGAGAGAAATGGTAATTTCACTTCTTTTTTA AGCTTAAAAGGAAGTAAATCAACCTTCAAGAGAGAAATGGTAATTTCACTTCTTTTTTA
pSUPER.retro.neo+gfp_Coh1_sh4639 (shRNA #4)	BglIII (top) HindIII (bottom)	GATCCCCGCAGCAAAGGAGACACAATGTTCAAGAGACATTTGTTCTTCTTTGCTGCTTTTTTA AGCTTAAAAGCAGCAAAGGAGACACAATGTTCTTTGAAACATTTGTTCTTCTTTGCTGCTTTTTTA
pSUPER.retro.neo+gfp_Coh1_sh9127 (shRNA #5)	BglIII (top) HindIII (bottom)	GATCCCCGCATTTGTTGATGCTGAAATCTTCAAGAGAGATTTCAGCATCAACAATGCTTTTTTA AGCTTAAAAGCATTTGTTGATGCTGAAATCTCTTTGAAATTTCAGCATCAACAATGCTGGG

Die *small hairpin* RNAs (shRNA) gegen *Coh1* wurden in den pSUPER.retro.neo+GFP Vektor (Oligoengine) kloniert. Hierfür wurden zunächst die Oligos in Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 3 mg/ml gelöst und daraus je Oligo (*forward* + *reverse*) 1 µl zusammen mit 100 mM NaCl in 50 mM HEPES (Gibco) bei pH 7.4 eine *annealing*-Reaktion angesetzt. Die Reaktion wurde für 4 min bei 90 °C gestartet, wurde weitere 10 min

bei 70 °C inkubiert und zum Schluss langsam auf 10 °C abgekühlt. Die fertigen Oligodimere sind sofort für die Ligationsreaktion einsatzbereit. Für den pSUPER.retro.neo+GFP-Vektor musste vor der Ligation zunächst 1 µg für 2-3 h mit den Restriktionsenzymen *HindIII* (Thermo-Scientific) und *BglIII* (Thermo-Scientific) in 1x FastDigest-Puffer (Thermo-Scientific) bei 37 °C linearisiert werden. Bevor der Vektor für die Ligation eingesetzt werden konnte, wurden die Restriktionsenzyme noch für 20 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

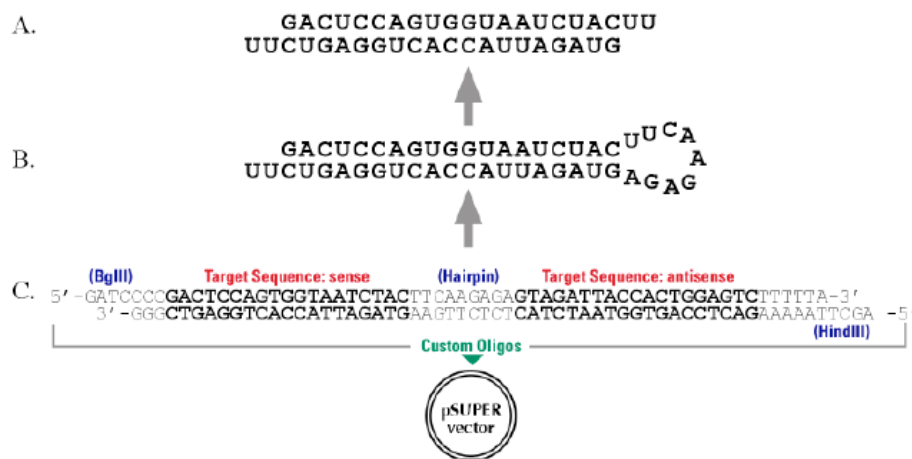


Abbildung 2.1: Klonierung von shRNA in den pSUPER.retro.neo+GFP.

Dargestellt ist die Transkription der 60-Nukleotidoligo (C) in *small hairpin*-RNA (B) und Prozessierung in funktionelle shRNA (A). Abbildung nach Herstellerangaben (Oligoengine).

Die Ligation setzte sich wie folgt zusammen:

- 2 µl Oligodimer (*insert*)
- 1 µl 10x T4 DNA Ligase-Puffer (New England Biolabs)
- 1 µl pSUPER.retro.neo+GFP-Vektor
- 5,5 µl Nuklease-freies Wasser
- 0,5 µl T4-DANN-Ligase (400 U/µl, New England Biolabs)

Die Ligation inkubierte über Nacht bei 16 °C. Als Negativkontrolle lief eine Reaktion ohne *insert* mit. Bevor die Transformation in Bakterien erfolgen konnte, wurde eine Restriktion mit 1 µl *BglIII* für 30 min bei 37 °C durchgeführt, um das Hintergrundlevel zu reduzieren. Da die *BglIII* Schnittstelle durch die Insertion zerstört wurde, wurden nur Vektoren geschnitten, welche kein *insert* enthielten und somit nicht von Interesse waren. Die Transformation und Präparation des ligierten Vektors in *E. coli* XL1 erfolgte wie unten beschrieben (siehe Transformation und Vektorpräparation). Mit Hilfe eines Testverdaus mit den Restriktionsenzymen *HindIII* (Thermo-Scientific) und *EcoRI* (Thermo-Scientific) konnte der Einbau der shRNA-Sequenz in pSUPER.retro.neo+GFP kontrolliert werden. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 15 µl H₂O
- 2 µl 10x FastDigest-Puffer (Thermo-Scientific)
- 0,5 µl *HindIII*
- 0,5 µl *EcoRI*
- 2 µl Vektor

Nach 1,5 h wurde das Reaktionsgemisch mit 6x Ladepuffer (0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 33 % (v/v) 150 mM Tris, 60 % (v/v) Glycerol, pH 7,6) versetzt, auf ein 2 %-iges Agarose-Gel in 1x TAE-Puffer (0,1 M Tris-Base, 0,28 % (v/v) Eisessig, 0,5 % (v/v) 0,5 M EDTA, pH 8,0) geladen und für 30 min bei 100 V in einer Gelelektrophoresekammer (PerfectBlue™ Gel System Mini L) laufen gelassen. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Durch den nukleinsäurefärbenden Stoff GelRed™ wurden die DNA-Fragmente im AlphaImager® EC (Biozym) unter UV-Licht sichtbar gemacht. Anhand des Größenstandards GeneRuler™ DNA Ladder Mix (1 kb, Sigma-Aldrich) konnten die geschnittenen Fragmente zugeordnet werden. Für den Verdau sollten jeweils zwei Banden für einen positiven Klon mit ~6 kb (pSUPER.retro.neo+GFP Vektor-*backbone*) und 281 bp (*shRNA-insert*) bzw. für einen negativen Klon mit ~6kb (pSUPER.retro.neo+GFP Vektor-*backbone*) und 1 kb (negative Re-Ligation) im Agarosegel zu sehen sein.

Transformation

Der *E. coli*-Stamm XL1 wurde mit bereits aufgereinigtem Expressionsvektor oder einem Expressionsvektor einer Ligationsreaktion transformiert, um den Vektor vermehren und anschließend isolieren zu können. Die Transformation beruht auf einem Hitzeschock der chemisch-kompetenten *E. coli* XL1, der die Aufnahme von Vektoren zulässt. Zur Transformation von 100 µl auf Eis aufgetauten, chemisch-kompetenten *E. coli* XL1 wurden entweder 10 µl Ligationsansatz oder ein Vektor zur Retransformation hinzugegeben. Eine 20-minütige Inkubation auf Eis sollte in der Folge eine Anlagerung des Vektors an die Bakterienoberfläche bewirken. Die eigentliche Transformation der *E. coli* XL1 mit der DNA erfolgte durch Hitzeschock bei 42 °C für 45 s. Danach wurden die transformierten *E. coli* XL1 nochmals für 2 min auf Eis gestellt und danach in 400 µl LB-Medium aufgenommen. Während einer einstündigen Inkubation bei 37 °C kommt es zur Expression des aufgenommenen Resistenzgens. Anschließend konnte die Suspension auf Antibiotikahaltige LB-Agar-Platten ausgestrichen werden.

Kolonie-PCR

Um zu testen, ob das *insert* erfolgreich in den Vektor kloniert wurde, musste eine Kolonie-PCR durchgeführt werden. Dafür wurde die LB-Agar-Platte mit den transformierten

Bakterien (siehe Transformation) auf Kolonien untersucht. Dies erfolgte durch picken einer Kolonie mit einer Pipettenspitze und kurzes resuspendieren in einem PCR-Reaktionsgefäß. Anschließend wurde die Pipettenspitze nochmals auf eine frische LB-Agar-Platte ausgestrichen, um die gepickte Kolonie nachzuziehen. Die Kolonie-PCR erfolgte mit Vektor-spezifischen Standardprimern (siehe Tabelle 17). Diese binden vor und nach der Schnittstelle, in welche das *insert* hineinkloniert wurde.

Tabelle 17: Sequenzen der Standardprimer

Bezeichnung	Vektor	Sequenz 5' - 3'
pGEX 5'	pGEX-6P-1	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pGEX 3'	pGEX-6P-2	CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGG
CMV-F	pEGFP-N1	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
EGFP-N	pEGFP-N1	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG

Ist die Kolonie positiv, wurde eine Bande mit der Größe des *insert* auf dem Agarose-Gel erhalten. Das Reaktionsgemisch für die *touch down*-PCR (siehe Tabelle 18) setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 0,75 µl *forward* Primer (10 µM, Invitrogen)
- 0,75 µl *reverse* Primer (10 µM, Invitrogen)
- 0,75 µl DMSO
- 0,15 µl dNTP-Mix (10 mM, Invitrogen)
- 0,15 µl 5 U/µl Taq DNA Polymerase (Invitrogen)
- 1,5 µl 10x NH₄-Reaktionspuffer (Invitrogen)
- 15 µl nukleasefreies H₂O

Tabelle 18: Programm einer *touch down*-PCR

Temperatur	Zeit	Zyklus
95 °C	5 min	1x
95 °C	30 s	
6 °C	45 s	3x
72 °C	1 min	
95 °C	30 s	
59 °C	45 s	3x
72 °C	1 min	
95 °C	30 s	
57 °C	45 s	3x
72 °C	1 min	
95 °C	30 s	
55 °C	45 s	33x
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	1x
4 °C	∞	

Vektorpräparation

Für die analytische Beurteilung von Vektoren nach erfolgter Klonierung fand für die Isolation von Vektor-DNA aus den *E. coli* XL1 der Invisord® Spin Vektor Mini Two-Kit Verwendung. Hierfür wurde zunächst in 2 ml antibiotika-haltigem LB-Medium eine Übernachtskultur des jeweiligen Klons bei 37 °C und 225 rpm herangezogen. Die Vektor-DNA wurde nach Herstellerangaben präpariert und mittels 100 µl HPLC-H₂O von der Säule eluiert. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mittels UV-Absorptionsbestimmung am NanoPhotometer (Implen). Nach dem Nachweis der korrekten Insertion des Zielfragments mittels Kontrollverdau und Sequenzierung (SMB Service in Molecular Biology GmbH, Berlin) folgte eine präparative Vektorpräparation mit Hilfe des NucleoBond® Xtra Midi EF Kits (Machery-Nagel) nach Herstellerangaben. So wurden Endotoxin-freie Plasmide für die Transfektion in Säugerzellen generiert. Am Ende der Plasmidisolation wurde das DNA-Pellet in 250 µl Endotoxin-freiem H₂O über Nacht im Kühlschrank gelöst, die Konzentration am NanoPhotometer (Implen) bestimmt und anschließend bei -20 °C gelagert.

2.3 Zellkultur und Transfektion

2.3.1 Kultivierung von Säugerzellen

Adhärenente Zellen wachsen als zusammenhängende, einschichtige Zelllage unter Anheftung an eine inerte Oberfläche. Sie zeigen dichteabhängige Proliferationshemmung (Kontaktinhibition). Weitere Zellvermehrung ist nur dann möglich, wenn „passagiert“ wird. Passagieren ist in regelmäßigen Abständen (3-4 Tage) notwendig, damit die Zellen in einem teilungsfähigen Zustand bleiben und nicht durch die ausgeschiedenen Stoffwechselprodukte sowie durch Mangel an Nährstoffen sterben.

Alle Säugerzellen wurden bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 % im Inkubator (Binder Inkubator Serie CB150, Binder GmbH) in ihrem jeweiligen Medium kultiviert (siehe Tabelle 7). Die Passagierung erfolgte durch Ablösung der Zellen von ihrer Unterlage mit Hilfe eines Waschschrattes mit 1x PBS (ohne Mg²⁺/Ca²⁺) zur Entfernung zweiwertiger Kationen, welche zellbindende Membranproteine stabilisieren. Anschließend folgte eine Inkubation für 3-5 min bei 37 °C mit einer 0,05 % Trypsin-Lösung (Gibco) zur Spaltung von Arginin und Lysin in Kombination mit EDTA. Die Ablösung erfolgte durch Zugabe von entsprechendem Zellkulturmedium und mehrfachem auf und ab pipettieren. Nachdem die Zellen bei einer niedrigen Drehzahl von 500x g abzentrifugiert wurden, konnten diese in

1 ml Medium resuspendiert und mit einer 1:10 Verdünnung mit Trypanblau für die Neubauer-Zählkammer vorbereitet werden. Auf die Zählkammer wurden 10 µl pipettiert und vier verschiedene Quadranten ausgezählt. Die mit Hilfe der Neubauer-Formel berechnete Menge an Zellsuspension wurde in einer Kulturflasche zusammen mit frischem Medium ausgesät.

2.3.2 Lipid-basierte Transfektion

Die immunzytochemische Analyse von COH1 basierte auf Untersuchungen mit der Zelllinie HeLa. Zellen dieser Linie (ca. 25.000) wurden auf 12 mm Deckgläschen in einer 24-Well-Platte (Falcon) mit DMEM, 5 % FCS, 1 % Glutamin ausgesät. Für die Untersuchungen mittels proteinbiochemischer Methoden (*immunoblotting* und Aktivitätsassays) wurden Hek293-Zellen verwendet, welche in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro 10 cm-Zellkulturschale (Falcon) eingesät wurden. Für Transfektionen erfolgte eine Kultivierung bis zu einer Konfluenz der Zellen von 50-75 %. Die Transfektion der Zellen beruht auf der Bildung von Lipid-DNA-Komplexen zwischen dem Reagenz jetPEI (Polyplus) und dem Vektor. Zur Transfektion von Zellen in einer 24-Well-Platte wurden 1 µg Vektor-DNA mit 2 µl jetPEI auf je 50 µl OptiMemI® (Invitrogen) gegeben, für 10 s gevortext und zusammen 20 min bei RT inkubiert. Das Zellmedium wurde durch 400 µl DMEM-Medium ohne Antibiotikum ersetzt und anschließend mit 100 µl des Lipid-DNA-Komplexes versetzt. Für die Transfektion von Zellen in einer 10 cm-Zellkulturschale wurden 10 µg DNA und 20 µl jetPEI eingesetzt. Für eine effiziente Transfektion wurden die Zellen für 48 h bei 37 °C inkubiert.

2.3.3 RNA-Interferenz (RNAi)

Für die RNAi wurden 10 µl einer 2 µM siRNA- (*small interfering RNA*, siehe Tabelle 9) Lösung in DEPC-H₂O mit 90 µl OptiMEM gemischt. Nach Zugabe von 2 µl INTERferin (Polyplus) wurde der Ansatz 15 s gevortext. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurde das Medium von den Zellen entfernt und der Ansatz mit den siRNA-INTERferin-Komplexen tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 5 min bei RT inkubiert, anschließend mit DMEM (5 % FCS, 1 % Glutamin) ohne Antibiotika versetzt und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Eine zweite Transfektion nach dem oben beschriebenen Vorgehen mit siRNA-INTERferin-Komplexen erfolgte min. 8 h bis max. 24 h nach der ersten Transfektion. 72 h nach der ersten Transfektion konnten die Zellen für weitere Versuche geerntet werden. In dieser Arbeit werden die Zellen, welche mit einer Kontroll-

eingefroren. Das Wiederauftauen erfolgte, indem diese 10-30 min bei 4 °C geschwenkt wurden. Zur Abtrennung der Kerne und Zelltrümmer wurde die Suspension für 15 min bei 4 °C mit 16000x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend für weitere Verfahren (2.4.1-2.4.2) verwendet. Vom Überstand wurden für spätere Analysen 75 µl mit 25 µl SDS-Puffer versetzt und bei -20 °C als Referenz aufbewahrt.

Immunpräzipitations (IP)-Puffer: TBS (0,075 M Tris Base, 0,44 M Tris HCl, 1,5 M NaCl, pH 7.4)
0,5 % (v/v) Tween®20
1x *complete protease inhibitor* (1 Tablette/50 ml)

Immunpräzipitation mit GFP-trap®

Bei der IP mit GFP-trap® (ChromoTek) wurden Agarose-beads, welche mit dem *single domain*-Antikörper anti-GFP V_HH konjugiert sind, verwendet. Von diesen wurden 10 µl pro IP zuvor dreimal mit IP-Puffer gewaschen und anschließend mit der in 2.4.1 gewonnenen Zellsuspension versetzt. Der Komplex wurde für 3 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Anschließend folgte eine 5 x 5 min Waschung mit Waschpuffer (0,1 % NP-40). Zum Schluss wurden die gereinigten Agarose-beads mit 25 µl SDS-Puffer versetzt und mit HPLC-H₂O auf 100 µl aufgefüllt.

Immunpräzipitation mit HIS-beads

Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (Dynabeads® His-tag-Isolation & Pulldown, Life Technologies). Verwendet wurden die unter Punkt 2.4.1 gewonnenen Zellsuspensionen.

2.4.2 SDS-PAGE und *immunoblotting*

Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Konzentration der Proteinmenge im Zelllysate zu bestimmen, wurde das Micro BCA™ Protein Assay Kit verwendet. Das Protokoll wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Es ist bekannt, dass sich die Proteinkonzentration proportional zur Absorption bei 560 nm verhält¹¹⁸. Die Extinktion bei 560 nm wurde mit Hilfe des Plattenreader Asys Expert 96 (Beckman Coulter®) gemessen und die Proteinmenge an Hand einer Eichkurve, welche auf Basis einer Standardreihe mit Bovinem Serum Albumin (BSA) erhoben wurde, bestimmt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

Zur Analyse der Verteilung des jeweiligen Zielproteins nach Molekulargewicht wurden die Zellysate mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese¹¹⁹ untersucht. Je Probe wurden 0,25 Vol. des Laemmli-Puffers (4 x) hinzugefügt und für 20 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit einer konstanten Spannung von 100 V unter Verwendung von Elektrophorese-Puffer in einem 4-12 %-igem Polyacrylamid-Gradientengel (siehe Tabelle 19 und 20).

Laemmli-Puffer: 252 mM Tris/HCl
 40 % (v/v) Glycerin
 8 % (w/v) SDS
 0,04 % (w/v) Bromphenolblau
 20 % (v/v) β -Mercaptoethanol
 pH 6,8

Elektrophorese-Puffer: 0.1 % (w/v) SDS
 25 mM Tris
 192 mM Glycin
 pH 8,3

Zur Identifikation der Proteingröße dienten der HiMark™ Pre-Stained Protein Standard (ThermoFisher) und der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad Laboratories GmbH) als Größenstandard.

Tabelle 19: Trenngel

Ansatz für zwei 1 mm dicke SDS-PAGE-Gele des Mini-Protean Tetra Cell Systems (BioRad).

	Obere Gelphase (4 %)	Untere Gelphase (12 %)
4x Trenngelpuffer	2 ml	2 ml
30 % Acrylamid	1 ml	3,2 ml
ddH₂O	5 ml	2,8 ml
10 % APS	60 μ l	60 μ l
TEMED	8 μ l	8 μ l

Tabelle 20: Sammelgel

Ansatz für zwei 1 mm dicke SDS-PAGE-Gele des Mini-Protean Tetra Cell Systems (BioRad).

Zwei Gele (4,5 %)	
4x Sammelgelpuffer	1 ml
30 % Acrylamid	0,6 ml
ddH₂O	2,4 ml
10 % APS	60 µl
TEMED	4 µl

4x Trenngelpuffer: 1.5 M Tris-BASE
0.4 % SDS
pH 8.8 (mit 1M HCl eingestellt)
auf 250 ml mit ddH₂O auffüllen

4x Sammelgelpuffer: 0.5 M Tris-BASE
0.4 % SDS
pH 6.8 (mit 1M HCl eingestellt)
auf 100 ml mit ddH₂O auffüllen

10x Bis-Tris Elektrophoresepuffer: 250 mM Tris-BASE
2 M Glycin
1 % SDS
auf 1 l mit ddH₂O
pH ~8.3-8.8
Aufbewahrung bei 4 °C

Coomassie-Färbung

Diese Methode wurde verwendet, um die für die Massenspektrometrie erforderlichen Proteinbanden aus dem Gel zu gewinnen, ohne starke Verunreinigungen durch verschiedene Chemikalien, wie zum Beispiel bei der Silberfärbung, zu verursachen. Bei dem verwendeten Gel handelte es sich um ein 1 mm 4-12 %-iges Polyacrylamid-Gradientengel (siehe Punkt 2.4.2, SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen). Nach der SDS-PAGE wurde das Gel wie folgt behandelt (siehe Tabelle 21):

Tabelle 21: Coomassie-Färbung

Schritt	Konzentration	Inkubationszeit
Fixierung und Färbung	40 % EtOH, 10 % Essigsäure, 50 % H ₂ O, Coomassie Brilliant Blue (Rotiphorese® Blau, Carl Roth GmbH + Co. KG)	bis Blaufärbung des Gels (RT)
Entfärbung	40 % EtOH, 10 % Essigsäure, 50 % H ₂ O	bis Hintergrund klar und Banden blau sind (ü.N. bei 4 °C)
Wässerung	Aqua dest.	1 min

Silberfärbung

Als Grundlage für die Silberfärbung diente das Protokoll von Heukeshoven und Dernick (1988, Tabelle 22). Damit ist es möglich sehr geringe Mengen an Protein (50-100 pg), welche mit einer Coomassie-Färbung nicht detektierbar sind, sichtbar zu machen. Als Gel wurde, wie bereits unter dem Punkt 2.4.2 (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen) beschrieben, ein 1 mm 4-10 %-iges Polyacrylamid-Gradientengel verwendet.

Tabelle 22: Silberfärbung

Schritt	Konzentration	Inkubationszeit
Fixierung	50 % EtOH, 10 % Essigsäure, 40 % H ₂ O	Min. 2 h/ ü.N.
Wässerung	30 % EtOH, 70 % H ₂ O	10 min 1x kurz wässern
Inkubation	0,02 % Na-Thiosulfat	1 min
Wässerung		2x 1 min
Silberfärbung	0,15 % Silbernitrat	60 min
Wässerung		einige Sekunden
Spülung	2,5 % Na-Carbonat	1 min
Entwicklung	2,5 % Na-Carbonat, 1:500 37 %-iges Formaldehyd	5 - 20 min
Stopp	0,05 M EDTA	mind. 10 min
Wässerung		mind. 5 min
Trocknung		1,5 - 2,5 h bei 80 °C

Immunoblotting

Nach Auftrennung der Proteine wurden diese im elektrischen Feld für eine weitere Identifikation mit Antikörpern auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Porablot NCP, Macherey-Nagel GmbH). Der Proteintransfer erfolgte mittels Elektro-*blotting* in einer *tank*-Blot Kammer (PeqLab). Dafür wurden zwei Filterpapiere, die Nitrozellulosemembran und das Gel mit Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol) getränkt und zwischen Kathode und Anode platziert. Der Blotvorgang erfolgte bei 35 V über Nacht. Die Membran wurde zum Nachweis des Transfers zunächst kurz mit Ponceau-Rot (0,5 % (w/v) Ponceau S, 1 % (v/v) Essigsäure) inkubiert und mit ddH₂O gewaschen. Nach erfolgreichem Proteintransfer wurde die Membran für 30 min bei RT mit einer Milchpulverlösung (0,1 % (v/v) NP40/ 1x TBS-Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver) geblockt, wobei nicht besetzte Bindungsstellen gesättigt wurden. Die Inkubation mit dem Primärantikörper, welcher in Milchpulverlösung verdünnt wurde, vermittelte die spezifische Markierung des Zielproteins und erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einer Rollapparatur. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBS-Puffer mit 1 % NP-40 für 5 min wurde die Membran mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugiertem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 1) versetzt und 2 h bei RT inkubiert. Im Anschluss

erfolgten nochmals drei Waschschr tte mit 1x TBS-Puffer mit 0,1 % (v/v) NP40 für jeweils 5 min.

1x TBS-Puffer:	50 mM Tris
	150 mM NaCl
	pH 7,6

Zur Detektion der immunmarkierten Proteine wurde die Membran für 5 min mit 500 μ l Luminolreagenz (AmershamTM ECLTM Western blotting detection reagents, Healthcare) inkubiert. Die Detektion erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms (FUJIFIL Super RX, Fujifilm Europe GmbH) in einer Dunkelkammer mit der Entwicklungs- und Fixierungslösung (G354, G150 Agfa-Gevaert N.V.) in der Tiscentwicklungsmaschine Curix 60 (Agfa-Gevaert N.V.). Die Belichtungszeit wurde an die jeweilige Stärke der Signale angepasst.

2.4.3 Massenspektrometrie

Als Grundlage für die massenspektrometrische Analyse der potentiellen COH1-Interaktionspartner diente ein Coomassie-Gel (wie unter Punkt 2.4.2, Coomassie-Färbung beschrieben). Hieraus wurden einzelne Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) zur Analyse in das Labor der AG Krause am FMP (Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in Berlin) geschickt.

2.4.4 Expression und Affinitätschromatographie von GST-Fusionsproteinen

Die entsprechenden Konstrukte pGEX-6P1_mCoh1_1-100aa, pGEX-6P1_mCoh1_I2309-2409 und pGEX-6P1_mCoh1_C3893-3993 (siehe Tabelle 13) wurden in den Ausgangsvektor pGEX-6P1 (siehe Tabelle 9) kloniert, durch eine Retransformation (beschrieben unter 2.2.2, Transformation) in den *Rosetta*-Bakterien (*E. coli*) vervielf tigt und auf LB-Agar-Platten mit 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert. Am nächsten Tag konnte eine Kolonie mit einer Pipettenspitze gepickt, auf eine neue LB-Agar-Platte zur Klon-Erhaltung ausgestrichen und die Pipettenspitze mit den restlichen Bakterien in 500 ml LB-Medium, welches mit 100 μ g/ml Ampicillin versetzt wurde, gegeben werden. Die Bakteriensuspension wurde anschließend 4-5 h bei 37 $^{\circ}$ C und 225 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 wachsen gelassen. Nach Erreichen der gewünschten OD₆₀₀ wurde zunächst ein Aliquot (30 μ l) der Bakteriensuspension für weitere Analysen mit Laemmli-Puffer (10 μ l) versetzt. Darauf folgte die Induktion mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) mit einer finalen Konzentration von 0,5 mM. Die Inkubation bei 225 rpm und RT dauerte etwa

4-5 h an. Auch nach diesem Schritt wurde ein Aliquot für weitere Analysen abgenommen und mit Laemmli-Puffer versetzt.

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min bei RT pelletiert, in 3 ml RIPA-Puffer gelöst und mittels fünf Zyklen und einem Maximum an Ultraschall (SONOPULS GM70, MS72) behandelt.

1x RIPA-Puffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)
 150 mM NaCl
 1 mM Na₂EDTA
 1 % Triton X-100
 1 % Sodium Deoxycholate
 2,5 mM Sodium Pyrophosphate
 1x Complete mit EDTA (Roche)

Die Bakteriensuspension wurde daraufhin schockgefroren (Flüssigstickstoff) und wieder aufgetaut. Anschließend wurde jede 3 ml Bakteriensuspension mit 15 mg Lysozym (5 mg/ml), 0,1 (v/v) % Triton X-100 und 100 Units DNaseI versetzt. Über Nacht wurde dieser Ansatz bei 4 °C unter Rotation inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension dreimal a 15 Zyklen mit dem Maximum an Ultraschall behandelt und anschließend 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der gewonnene Überstand konnte nach Abnahme eines weiteren Aliquots für spätere Analysen auf die zuvor mit 1x RIPA-Puffer gewaschene GST-*beads*-Säule (GE Healthcare Life Sciences) überführt werden. Dort inkubierten die Lysate rotierend über Nacht bei 4 °C. Es folgte ein viermaliges Waschen der GST-*beads* mit 1x TBS und die Lagerung bei 4 °C in 1x TBS mit 0,02 % NaN₃ bis zur weiteren Verwendung der Säulen. Auch hiervon wurde ein Aliquot für folgende Analysen abgenommen. Bevor die Seren mit den zu gewinnenden Antikörpern auf die Säulen überführt wurden, erfolgte eine Überprüfung der zuvor gesammelten Aliquots der einzelnen Bindungsschritte mittels SDS-Gelelektrophorese und Silbergel-Färbung (siehe Punkt 2.4.2).

2.4.5 Crosslinking

Um bei der Antikörperaufreinigung zu verhindern, dass das gewonnene Protein aus den Bakterienlysaten von den GST-*beads* gewaschen wird, werden diese zuvor gekoppelt. Dafür wurden die *beads* zweimal mit *conjugation*-Puffer gewaschen und anschließend 30 min bei RT mit BS³-Puffer inkubiert. Abgeschlossen wurde das *crosslinking* mit *quenching*-Puffer für 15 min bei RT. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit PBST.

BS³ *conjugation*-Puffer: 20 mM Natrium Phosphate
0.15M NaCl
pH 7-9

BS³ *quenching*-Puffer: 1M Tris HCl
pH 7,5

2.4.6 Aufreinigung der Antikörperseren (GST-*pull down*)

Von den Antikörperseren wurden 4 ml zusammen mit 4 ml 1x TBS auf die Säule mit den jeweiligen GST-Fusionsprotein gekoppelten *Agarose-beads* gegeben. Diese wurden über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Am nächsten Tag wurden die *beads* dreimal mit 1x TBS und zweimal mit 0,1x TBS gewaschen. Anschließend folgte die Elution mit 0,1 M Glycin (pH 2,0) mit zehn 250 µl Fraktionen. Jede Fraktion wurde zur Wiederherstellung eines physiologischen pH-Wertes von 7.0 mit 25 µl 2 M Tris-HCl (pH 8.5) versetzt. Von jeder Fraktion wurde 1 µl auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen, luftgetrocknet und mittels 5 % Magermilchpulver und 1 % Tween®20 in 1x TBS blockiert. Zum Schluss wurde die Membran mit Ponceau-Lösung gefärbt und solange mit H₂O gewaschen, bis sich die Punkte von der Membran abgehoben hatten. Die besten Fraktionen wurden gesammelt, mit einer finalen Konzentration von 0.02 % NaN₃ versetzt und bei 4 °C gelagert.

2.5 Tierexperimentelle Arbeiten

Zur Durchführung der Tierversuche an der Charité-Universitätsmedizin Berlin lagen die Genehmigungen der lokalen Behörden durch die Projektleiter Dr. Ingo Bormuth und Dr. Wenke Seifert vor.

2.5.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Mäuse des Stammes NMRI verwendet. Die Muttertiere wurden verpaart und nachdem sie *geplugged* waren, wurden die Embryonaltage gezählt. An E12,5 und E13,5 wurden die tragenden Muttertiere für die *in utero*-Elektroporation vorbereitet (siehe Punkt 2.5.3).

2.5.2 Zu injizierende Konstrukte

Für die Elektroporation wurden die unter Punkt 2.2.2 generierten shRNA-Konstrukte verwendet. Als Negativkontrolle diente eine shRNA, welche für das Reportergen *luciferase* codiert. Für den *Coh1 knock down* wurde die shRNA #1 verwendet. Beide wurden Endotoxin-frei mit einer Konzentration von 1 µg/µl aufgereinigt. Vor der Injektion wurden die Konstrukte mit dem Farbstoff FastGreen (10x) versetzt, um die richtige Lokalisation

nach der Injektion im Ventrikel sichtbar zu machen. In dieser Arbeit werden Zellen, welche mit der shRNA gegen *luciferase* behandelt wurden, als Kontrollzellen bezeichnet. Mit dem *Coh1 knock down* werden Zellen beschrieben, welche mit der shRNA gegen *Coh1* transfiziert wurden.

2.5.3 *In utero*-Elektroporation

Im Folgenden wird die Methode der *in utero*-Elektroporation nach Saito *et al.* beschrieben¹²⁰. Das tragende Muttertier wurde zunächst mit Isofluran betäubt. Zum Schutz vor Auskühlung wurde das Tier auf eine beheizbare Unterlage gelegt. Die Augen wurden mit einer Augensalbe vor dem Austrocknen geschützt. Der Bauchbereich wurde anschließend großzügig mit Jodlösung desinfiziert. Bevor die Elektroporation begann, wurde dem Tier noch zur Vermeidung von Schmerzen Buprenorphin (0,1 mg/kg) subkutan injiziert. Sobald das Tier keine Reflexe mehr zeigte, konnte die Bauchhaut und das darunterliegende Peritoneum des Tieres durch einen vertikalen Schnitt geöffnet werden (vom Bauchnabel bis zum Schambein). Der Uterus mit den darin enthaltenen Embryonen konnte dann vorsichtig aus der Bauchhöhle gehoben und für die Elektroporation ausgebreitet werden. Es war wichtig, vorher den Bauchraum und den Uterus in regelmäßigen Abständen mit einer vorgewärmten physiologischen Kochsalzlösung (mit 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin) zu benetzen, um vor unerwünschten Infektionen zu schützen. Des Weiteren schützte die Benetzung vor Austrocknung und sorgte für eine optimale elektrische Leitung beim Anlegen der Anode und Kathode. Mit Hilfe einer zuvor mit dem Konstrukt-Farbstoff-Gemisch beladenen Glasinjektionsnadel wurden ca. 2 µl DNA-Lösung in das Ventrikel-System des embryonalen Gehirns durch die Uteruswand hindurch injiziert. Nach erfolgreicher Injektion sind zwei erdnussförmige Färbungen am Cortex des Embryos erkennbar. Anschließend wurde mit Hilfe von zwei Goldelektroden und einer Gleichspannung von 30-40 V die negativ geladene DNA in den Bereich aufgenommen, wo die positiv geladene Anode anlag. Den Embryonen wurden der Reihe nach das Konstrukt injiziert und elektroporiert. Die Benetzung mit Kochsalzlösung wurde zwischenzeitlich wiederholt. Nach spätestens 25 min wurde der Uterus wieder zurück in den Bauchraum verlagert und das Peritoneum mit einer chirurgischen Naht (4-5 Stiche) verschlossen. Die Versorgung der äußeren Bauchhaut erfolgte mit chirurgischen Klammern. Nach dem Erwachen des Tieres wurde dieses zurück in den Käfig gesetzt und drei Tage mit Schmerzmitteln (25 µg/ml Tramadol, 12 µg/ml Buscopan), welche im Trinkwasser gelöst

wurden, behandelt. Nach der Operation erfolgte eine engmaschige Beobachtung des elektroporierten Tieres bis zur Entnahme der Embryos.

2.5.4 Anlegen einer Primärzellkultur aus kortikalen Neuronen

Vorbehandlung und Beschichtung von Deckgläsern

Die benötigten Deckgläser wurden in einem großen Glasbehälter zweimal 10 min mit genügend MilliQ-H₂O gewaschen. Anschließend wurden diese unter einem Abzug mit 67 %-iger Salpetersäure bedeckt und für 1 h inkubiert. Die Salpetersäure wurde durch eine Verdünnung mit mindestens 5 l Wasser verworfen und die Deckgläser viermal mit MilliQ-H₂O gewaschen. Es folgte ein zweiter Waschgang mit zweimal 100 %-igem EtOH. Danach wurden die Deckgläser getrocknet und in eine Glaspetrischale überführt, um sie darin für 4 h bei 200 °C zu backen. Nach dem Backen wurde die Schale mit Aluminiumfolie verschlossen und nur unter einem sterilen Zellkulturabzug wieder geöffnet.

Vor der Aussaat der Neurone wurden die Deckgläser noch mit 0,1 mg/ml Poly-D-Lysin für mindestens 5 min bei 37 °C beschichtet. Anschließend wurden die Deckgläser dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und bis zur Aussaat in sterilem Wasser bei 4 °C stehengelassen.

Präparation der Zellen

Für die Präparation des Cortex wurden die Embryonen am E16,5 einer tragenden C57BL6/J-Maus benutzt. Das Muttertier wurde zunächst mit 10 ml/kg Ketamin und 5 ml/kg Xylazin intraperitoneal betäubt. Sobald die Maus keine Reflexe mehr zeigte, wurde sie mit einem Genickbruch getötet und auf einer Präparationsunterlage fixiert. Das Fell der Bauchhaut wurde großzügig mit einer Jodlösung sterilisiert. Anschließend wurde die Bauchhaut sowie das darunterliegende Peritoneum mit einem vertikalen Schnitt vom Schambein bis zum Bauchnabel geöffnet. Der Uterusschlauch wurde vorsichtig aus der Bauchhöhle gehoben. Mit einem kleinen Schnitt wurden dieser und die Embryonen umhüllende Fruchtblase geöffnet. Die Nabelschnur der Embryonen konnte nun getrennt werden. Um einen schnellen Zerfall des Gewebes zu verhindern, wurden die Embryonen in eisgekühltem 1x Dulbecco's PBS (Gibco) mit 1 % P/S zwischengelagert. Innerhalb von 2 h wurde allen Embryonen das Gehirn entfernt und der Cortex präpariert, welcher ebenfalls in eiskaltem 1x Dulbecco's HBSS (++, Gibco) mit P/S aufbewahrt wurde. Sobald alle Cortices in ein Reaktionsgefäß je Embryo isoliert wurden, konnten diese einmal mit 1 ml HBSS (--, Gibco) gewaschen und anschließend in eine vorgewärmte Trypsinlösung überführt werden. Diese bestand aus HBSS (--) mit 500 µl Trypsin und DNase (10 mg/ml). Die Cortices wurden 20 min bei 37 °C

inkubiert und einmal zwischenzeitlich invertiert. Es folgten die vorsichtige Abnahme des Überstands und ein zweimaliger Waschschrift mit 500 μ l *plating*-Medium (siehe Tabelle 7). Die Zellen wurden nun in 500 μ l *plating*-Medium resuspendiert (20x mit einer blauen Pipettenspitze und 10x mit einer gelben Pipettenspitze). Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Zellsuspension für 5 min bei 800 rpm und 4 °C. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet erneut in 500 μ l *plating*-Medium resuspendiert und auf 5 ml aufgefüllt. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau wurde die 1:10 verdünnte Zellsuspension wie folgt berechnet:

Zellzahl/ ml = Verdünnungsfaktor x Kammerfaktor (10^4) x Durchschnitt der vier Quadranten

Für eine 24-Well-Platte mit beschichteten Deckgläschen (Punkt 2.6.4) wurden 2×10^5 Zellen und eine 10 cm-Zellkulturschale mit 2×10^6 Zellen mit *plating*-Medium ausgesät. Nach 3 h erfolgte der Austausch des Mediums mit Neurobasal-Medium *complete* (siehe Tabelle 7). Die Kultivierung fand bei 37 °C und 5 % CO₂ statt.

2.5.5 *Tracking* des Mikrotubuli-Plusendes

Um eine Echtzeitanalyse zu ermöglichen, wurden kortikale Neurone in 35 mm Platten mit einem Glasboden (Greiner Bio one) mit einer Dichte von 4×10^5 Zellen ausgesät. Die Transfektion wurde an Tag eins nach der Aussaat mit 2 μ g shRNA und 1 μ g EB3-tdTomato (Addgene) durchgeführt. Die *live*-Aufnahmen der Neurone erfolgte zwischen Tag drei und fünf mit einem Zeiss Spinning Disc System CXU-S1. Die Aufnahmen wurden mit einer Geschwindigkeit von einem *frame* pro Sekunde erstellt. Die Punkte, welche länger als zehn Sekunden zu sehen waren, wurden aufgenommen und mit dem MJTrack *plug-in* von Fiji gemessen.

2.6 Organentnahme und Gewebepräparation

2.6.1 Gewebeaufbereitung

Von den elektroporierten Mäusen wurde die Schädeldecke vorsichtig mit einer Augenschere aufgeschnitten und zurückgeklappt, um das Gehirn herausheben zu können. Das Gehirn wurde zur Fixierung über Nacht bei 4 °C in eine 4 %-ige PFA-PBS Lösung gelegt. Um Gefrierartefakte zu vermeiden war eine Einbettung mit Hilfe von Sucrosegradienten nötig. Dafür wurde das Gehirn nach der Fixierung mit PBS gewaschen und am ersten Tag in eine 5 %-ige, am zweiten Tag in eine 15 %-ige und am dritten Tag in eine 30 %-ige Zucker-1x PBS-Lösung überführt. In der 30 %-igen Zuckerlösung konnte das Gewebe bei 4 °C bis zur

Verwendung gelagert werden. Für das Schneiden am Kryostat wurde das Gehirn in der Mitte des Cortex medial geschnitten und in OCT eingebettet. Somit wurde der Motorkortex schnell mittels koronaler Schnitte erreicht.

2.6.2 Anfertigung von Kryostat-Schnitten

Immunhistochemische Analysen erfordern die Anfertigung von 20 µm dicken Gefrierschnitten mit Hilfe eines Kryostaten (Gefriermikrotom Leica CM 3050S). Die Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger (R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik) aufgebracht, luftgetrocknet und bei -80 °C gelagert.

2.6.3 *In situ*-Hybridisierung

Für die *in situ*-Hybridisierung wurden 20 µm-Kryoschnitte aus der Lagerung bei -80 °C oder frisch angefertigte Gefrierschnitte verwendet. Diese wurden zunächst 1 h in einer Vakuumkammer getrocknet. Alle verwendeten Küvetten und Lösungen (siehe Tabelle 23) mussten frei von RNasen sein. Zuerst wurden die Schnitte mit 4 % PFA/ 1x PBS-DEPC für 15 min bei RT fixiert. Das PFA wurde für die Postfixierung mit Glutaraldehyd erneut verwendet. Die Schnitte wurden anschließend zweimal für 5 min mit 1x PBS gewaschen. Es folgte eine 2,5-minütige Inkubation mit 37 °C vorgewärmten 1x Proteinase K-Puffer (20x Puffer, Proteinase K 10 mg/ml). Zwei weitere Waschvorgänge, einmal mit 0,2 % Glycin in 1x PBS-DEPC für 5 min und einmal mit 1x PBS für 5 min folgten, bevor mit 4 % PFA und 0,2 % Glutaraldehyd in 1x PBS die Postfixierung für 20 min bei RT durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für 5 min bei RT mit 1x PBS gewaschen. Im nächsten Schritt musste darauf geachtet werden, dass die Schnitte nicht austrockneten. Es wurden zügig 150 µl Hybmix für die Prehybridisierung auf die Schnitte geträufelt und diese mit Parafilm abgedeckt. Dieser Mix inkubierte für 2 h bei 65 °C in einer mit 50 % Formaldehyd/ 5x SSC befeuchteten Kammer. In der Zwischenzeit wurden die Sonden für 5 min bei 90 °C erhitzt und 3 min auf Eis gestellt. Pro Objektträger wurden 150 µl Hybmix mit 300 ng der Sonde verwendet und über Nacht bei 68 °C inkubiert. Am nächsten Tag mussten die Überreste der Sonde mit den folgenden Waschschrritten entfernt werden (die jeweiligen Puffer wurden auf ihre vorgesehenen Temperaturen vorgewärmt):

2x SSC pH 7,0	5 min, RT
RNase (20µg/ml) in RNase-Puffer	30 min, 37 °C
2x SSC pH4,5	5 min, RT
2x SSC pH 7,0/ 50 % Formamid	30min, 65 °C
2x SSC pH 7,0/ 50 % Formamid	30min, 65 °C
2x SSC pH 7,0/ 50 % Formamid	30 min, 65 °C

KTBT	10 min, RT
KTBT	10 min, RT

Anschließend wurde wieder eine feuchte Kammer mit KTBT-Puffer vorbereitet, in der die Schnitte für 2 h mit dem *blocking*-Reagenz (20 % Schafserum in KTBT) bei RT inkubieren konnten. Darauf folgte die Behandlung mit dem Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase-Antikörper (Roche), welcher 1 zu 5000 in dem *blocking*-Reagenz eingesetzt wurde. Hierfür wurden 160 µl pro Objektträger aufgetragen und über Nacht bei 4 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Entfernung der Antikörperlösung durch die folgenden Waschschrte:

KTBT	5 min, RT
KTBT	5 min, RT
KTBT	30 min, RT
KTBT	30 min, RT
KTBT	30 min, RT
NT(M)T	5 min, RT
NT(M)T	10 min, RT

Als letzter Schritt folgte die Färbung mit NT(M)T/NBT-BCIP (1:50). Hier wurden 150 µl pro Objektträger eingesetzt und solange bei RT inkubiert, bis eine Färbung bei den Schnitten zu erkennen war. Um die Färbung zu stoppen wurden die Objektträger in KTBT-Puffer gestellt und dort bis zur Fixierung bei 4 °C aufbewahrt. Die Schnitte wurden wie folgt fixiert:

4 % PFA	30 min, RT
EtOH 30 %	3 min, RT
EtOH 50 %	3 min, RT
EtOH 70 %	3 min, RT
EtOH 90 %	3 min, RT
EtOH 100 %	3 min, RT
Isopropanol	3 min, RT
Xylol-Isopropanol	5 min, RT
Xylol	5 min, RT
<i>Clearing Solution</i>	10 min, RT

Die fixierten Schnitte wurden anschließend mit Entellan® und einem Deckglas eingedeckt und über Nacht unter dem Abzug bei RT getrocknet.

Tabelle 23: Puffer für die *in situ*-Hybridisierung

Buffer	Zusammensetzung
Hybmix (20 ml)	50 % Formamid, 5 ml 20x SSC pH 7,0, 1 % Boehringer Block, 4,36 ml DEPC-H ₂ O, 5 mM EDTA, 0,1 % Tween, 0,1 % CHAPS, 0,1 mg/ml Heparin, 100 µg/ml Hefe-RNA, 50 µg/ml Salmon Sperm DNA, 1x Denhardt's Solution
KTBT	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 % Triton X-100
NT(M)T	100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, (50 mM MgCl ₂), 0,05 % Tween-20
PBS-DEPC	0,1 % DEPC, 1x PBS
PBST	1x PBS, 0,1 % Triton
Proteinase K-Puffer	30 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,5 % SDS
PFA/PBS-DEPC	1x PBS-DEPC, 4 % PFA
RNase-Puffer (150 ml)	15 ml 5 M NaCl, 1,5 ml 1 M Tris pH 7,5
20x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na ₃ -citrat, pH 7,0
10x PBS	0,2 M NaH ₂ PO ₄ , 1,5 M NaCl, pH 7,4
<i>Clearing Solution</i>	Benzylalkohol, Benzylbenzonat, 1:2

2.6.4 Immunhistochemie

Die 20 µm dicken Kryoschnitte wurden mit Hilfe von 0,1 % Triton X-100 und 1 % BSA in PBS für 10 min bei RT permeabilisiert. Der erste Antikörper inkubierte über Nacht bei 4 °C in einer Lösung aus 0,05 % Triton X-100 und 1 % BSA in PBS. Die verwendeten Antikörper sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Der zweite Antikörper (siehe Tabelle 2) und DAPI (0,01 mg/ml) wurde für 2 h bei RT in einem abgedunkelten Gefäß angewendet. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Schnitte mit ImmunoMount (Thermo Scientific) und einem Deckglas abgedeckt und über Nacht bei 4 °C getrocknet. Die Aufnahmen wurden mit dem 20x-Objektiv eines TCS SP8 Mikroskops von Leica durchgeführt.

2.7 Statistik

Eine statistische Bewertung diente dem Vergleich zwischen Kontrolle, *Cohl knock down*, *Cohl*-Überexpression und *rescue*. Aus den Proben von voneinander unabhängigen Experimenten wurde ein Mittelwert gebildet und die Standardabweichung der Grundgesamtheit berechnet.

Für eine Bewertung der Unterschiede kam der t-Test zur Anwendung (Microsoft Office Excel). Der Test wurde auf eine zweiseitige Verteilung mit zwei Stichproben gleicher Varianz durchgeführt. Hierbei werden die Mittelwerte zweier Gruppen einer normalverteilten Grundgesamtheit verglichen. Außerdem wurde von einer gleichen Varianz der miteinander zu vergleichenden Stichproben ausgegangen.

Bei mehr als zwei Stichproben wurde eine *one way*-ANOVA-Varianzanalyse mit Hilfe von Prism Graph Pad berechnet. In Kombination mit der *one way*-ANOVA-Varianzanalyse wurde gleichzeitig der Tukey's Multiple Comparison-Test durchgeführt, um einzelne Mittelwerte miteinander zu vergleichen. P-Werte von kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant (*), Werte mit $p < 0,01$ als statistisch sehr signifikant (**) und Werte mit $p < 0,001$ als statistisch hoch signifikant (***) bezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines humanen und murinen COH1-Antikörpers

3.1.1 Etablierung der COH1-Antikörper für das *immunoblotting*

Für Coh1 können bisher keine funktionellen Antikörper käuflich erworben werden. Daher war es für die Arbeiten mit murinen Zellen und Gewebeschnitten notwendig einen COH1-Antikörper gegen das murine Protein zu etablieren. Für die Gewinnung von Coh1-spezifischen Antikörpern wurden spezifische Teilfragmente (N-Coh1_aa1-100, I-Coh1_aa2309-2409 und C-Coh1_aa3893-3993) als Fusionsprotein mit GST hergestellt und in verschiedenen Spezies (Kaninchen und Meerschwein) immunisiert (Pineda-Antikörper-Service). Für die Aufreinigung der gewonnenen Antikörperseren (Pineda-Antikörper-Service) wurden zunächst die GST-Säulen mit den erneut hergestellten rekombinanten GST-Coh1-Fusionsproteinen gekoppelt und im Anschluss mit den Seren inkubiert und aufgereinigt. Nach der Aufreinigung erfolgte eine Zusammenführung der Fraktionen mit den stärksten Signalen, welche mittels *dot blot* ermittelt wurden. Um die Antikörper auf ihre Spezifität zu testen, wurden Bakterien-Lysate mit den verschiedenen GST-Coh1-Fusionsproteinen sowie GST-Protein mittels SDS-PAGE getrennt und während des *immunoblottings* auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zum Nachweis wurden die aufgereinigten Coh1-Antikörperlösungen benutzt. Es galt, für die einzelnen Antikörper ausschließlich eine korrespondierende Bande auf der Höhe des jeweiligen immunisierten GST-Coh1-Fusionsproteins als auch GST nachzuweisen. Die entsprechenden Größen für die Banden ergaben sich aus der Aminosäuresequenz der Coh1-Teilfragmente (N-COH1: 11,5 kDa, I-COH1: 11,71 kDa, C-COH1: 11,37 kDa), einer *spacer*-Sequenz (GPLGSPEFPGR in pGEX-6P1, 1,23 kDa) und dem fusionierten GST-Protein (26 kDa). Das *immunoblotting* ließ erkennen, dass alle drei aufgereinigten Antikörper unspezifische Banden, GST und das entsprechende GST-Coh1-Fusionsprotein detektiert haben (Abbildung 3.1).

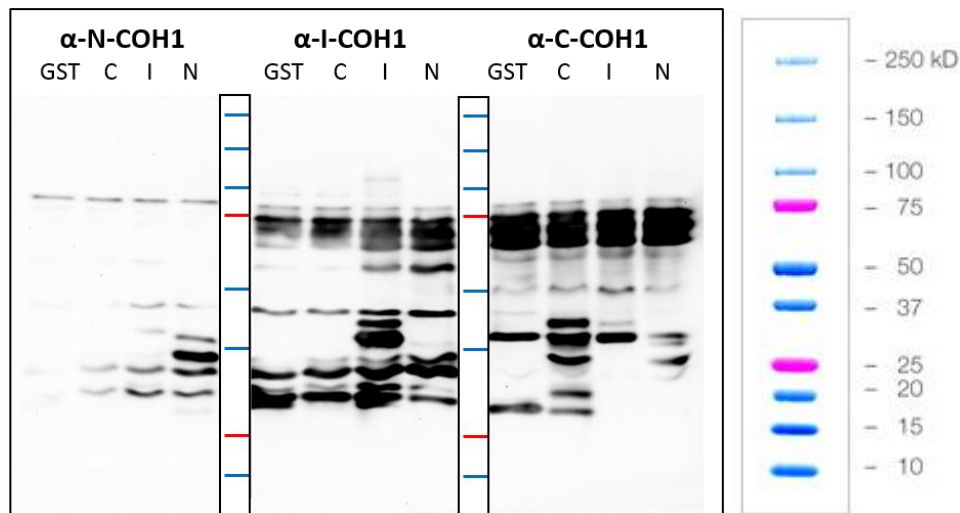


Abbildung 3.1: Spezifitätstest der murinen COH1-Antikörper auf einzelne *Coh1*-Fragmente

Die aus den Antikörperseren durch einen GST-pull down gewonnenen Antikörper-Fractionen wurden mit den jeweiligen *Coh1*-Teilfragment-Lysaten getestet. Der N-terminale (Bahn 1-4) und der interne COH1-Antikörper (Bahn 6-12) konnten jeweils die spezifische 38 kDa Bande des jeweiligen Konstruktes nachweisen. Die 10 und 15 kDa Bande, welche normalerweise bei dem Proteinstandard (Abbildung rechts) erkennbar sind, liefen bei der Gelelektrophorese heraus. Es wurde als Proteinmarker der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bahn 5 und 13) verwendet.

Um eine Spezifität und Sensitivität der aufgereinigten Antikörper für das humane COH1-Protein zu testen, wurden zusätzlich Hek293-Zellen mit einem geeigneten *full length*-Konstrukt für *COH1* transfiziert.

In einem ersten Test wurde nach Transfektion von Hek293-Zellen mit pHISC3-COH1 (N-terminaler *HIS-tag*: *HIS-COH1*) und pcDNA3.1_V5/*HIS_hCOH1* (C-terminaler *HIS-tag*: *COH1-V5-HIS*) eine *HIS-tag*-Immunpräzipitation durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten sowohl nicht-transfizierte Hek293-Zellen als auch Hek293-Zellen, welche mit pcDNA3.1_V5/*HIS_Ank* (*ANK-V5-HIS*) transfiziert wurden. Nach der Probenaufarbeitung und Auftrennung mittels SDS-PAGE wurde die Blot-Membran mit dem Hase-anti-I-COH1-Antikörper inkubiert. Zur Evaluation wurde anschließend mit einem entsprechenden *tag*-Antikörper (Huhn-anti-6x *HIS*) einer anderen Spezies reinkubiert. Das *immunoblotting* mit dem I-COH1-AK ergab für beide Negativkontrollen im Input (I) ein schwaches Signal auf der Höhe des intrinsischen COH1-Proteins (460 kDa, Abbildung 3.2). Dagegen konnte bei den Negativkontrollen in der *HIS-tag*-Immunpräzipitation (IP) kein Signal bei 460 kDa detektiert werden. Die Überexpressionen von N- als auch C-terminalem *HIS*-markierten COH1 zeigten sowohl im Input als auch in der *HIS-tag*-Immunpräzipitation ein deutliches Signal bei 460 kDa mit dem I-COH1-AK. Dieses Signal nahm in Abhängigkeit zur transfizierten Menge (6 bzw. 9 µg je 10 cm-Zellkulturschale) zu (Abbildung 3.2). Im gleichen Verhältnis wurden die Signale bei 460 kDa mit dem 6x *HIS*-AK detektiert. Die

Negativkontrollen zeigten hier bei 460 kDa kein Signal. Für ANK-V5-HIS wurde ein Signal bei ca. 55 kDa mit dem 6x HIS-AK erwartet. Bei dem *immunoblotting* wurde für alle Proben ein Signal bei 55 kDa beobachtet, welches im Vergleich zum Input bei den HIS-tag-Immunpräzipitationen verstärkt war. Da sich auf dieser Höhe auch das typische Bandenmuster der *heavy chain* (55 kDa) von IgG-Antikörpern befindet, detektierte diese hier sehr wahrscheinlich der sekundäre anti-Maus-IgG-HRP-AK.

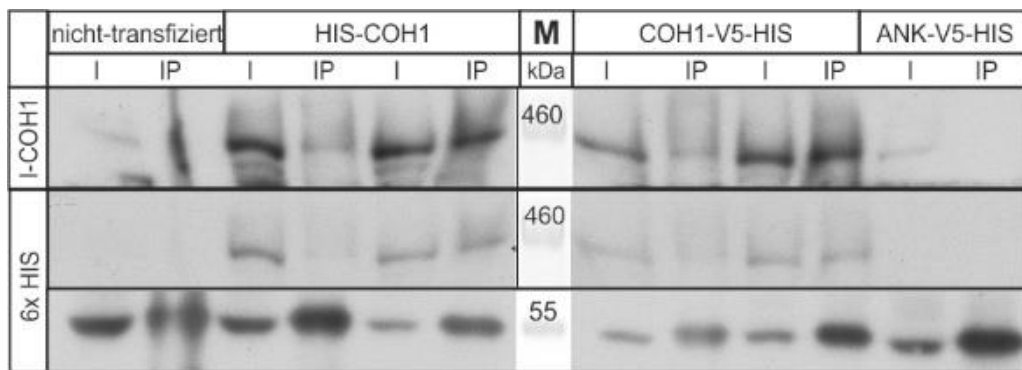


Abbildung 3.2: Test des I-COH1-Antikörpers auf verschiedene HIS-markierte COH1-Konstrukte

Für den Test wurden jeweils 6 µg (Bahn 3-4, Bahn 8-9) bzw. 9 µg (Bahn 5-6, Bahn 10-11) an Plasmid-DNA (pHISC3_hCOH1, HIS-COH1 (linke Seite) oder pcDNA3.1_V5/HIS_hCOH1, COH1-V5-HIS (rechte Seite)) in 10 cm-Schalen mit Hek293-Zellen transfiziert. Sowohl der I-COH1-AK als auch der 6x HIS-AK zeigten bei der COH1-spezifischen Größe von 460 kDa ein deutliches Signal, welches mit der Menge an eingesetztem Plasmid für die jeweilige IP (IP) korreliert. Für die IPs mit den Negativkontrollen (nicht-transfiziert in Bahn 1-2; transfiziert mit pcDNA3.1_V5/HIS_Ank bzw. ANK-V5-HIS in Bahn 12-13) wurde kein Signal detektiert. Im Input (I) wurden spezifische COH1-Signale mit dem I-COH1-AK bei allen Proben detektiert und mit dem 6x HIS-AK ausschließlich in den Proben mit transfizierten HIS-markiertem COH1. Es wurde als Proteinstandard der HiMark™ Pre-Stained Standard verwendet (Bahn 7).

Ein weiterer Test auf die Sensitivität und Spezifität des anti-I-COH1-AK wurde mit der GFP-trap-Immunpräzipitation durchgeführt. Hierfür wurden Hek293-Zellen mit unterschiedlichen Mengen (3, 6 und 9 µg je 10 cm-Zellkulturschale) an pEGFPC3_hCOH1 transfiziert. Als Negativkontrolle diente der Leervektor pEGFPC3. Nach erfolgter Probenaufarbeitung, GFP-trap-Immunpräzipitation, SDS-PAGE und *immunoblotting* mit dem Hase anti-I-COH1-AK konnte eine spezifische Bande für GFP-COH1 bei ~480 kDa (450 kDa + 26 kDa) nachgewiesen werden (Abbildung 3.3). Entsprechend der eingesetzten Plasmidmenge und der zu erwartenden Zunahme an COH1 stieg die Intensität des Signals sowohl im Input (I) als auch in der GFP-trap-Immunpräzipitation (IP). In der Negativkontrolle konnte bei 480 kDa kein Signal detektiert werden. Die Re-Inkubation mit einem Huhn anti-GFP-Antikörper bestätigte die Spezifität des Hase anti-I-COH1-AK für das humane COH1-Protein. Für die Negativkontrolle wurde nur die zu erwartende Bande des exprimierten GFPs (bei ca. 30 kDa) nachgewiesen (Abbildung 3.3).

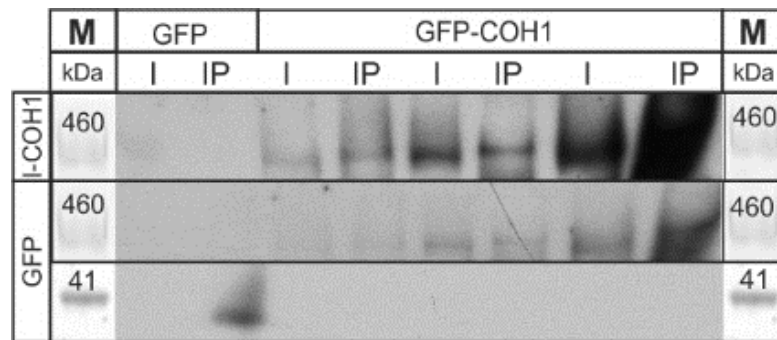


Abbildung 3.3: Test des I-COH1-Antikörpers auf verschiedene Mengen eines GFP-markierten COH1-Konstruktes

Für den Test wurden jeweils 3 μg (Bahn 2-5), 6 μg (Bahn 6-7) und 9 μg (Bahn 8-9) an Plasmid-DNA für eine Überexpression von pEGFPC3_hCOH1 (GFP-COH1) und 3 μg für eine Negativkontrolle (pEGFPC3, GFP) in Hek293-Zellen transfiziert. Beide AK zeigten bei der COH1-spezifischen Größe von 480 kDa ein gutes Signal, welches mit der Menge an eingesetztem Plasmid für die IPs (IP) zunahm. Für die IP mit der Negativkontrolle GFP wurde kein Signal für den I-COH1-AK detektiert. Der GFP-AK zeigte bei der Negativkontrolle ein Signal für GFP auf Höhe von ca. 30 kDa. Im Input (I) wurden ebenfalls spezifische COH1-Signale detektiert, was für eine gute Ausgangskonzentration an COH1-Protein im Überstand spricht. Es wurde als Proteinstandard der HiMark™ Pre-Stained Standard verwendet (Bahn 1 und 10).

3.1.2 Etablierung der COH1-Antikörper für die Immunzytochemie

Die Antikörper wurden nach der proteinbiochemischen Analyse auch auf ihre Spezifität in der immunzytochemischen Analyse getestet. Hierfür wurden zur Expression von Flag-tag-markierten Teilstücken von humanem COH1 verschiedene Konstrukte (pFLAG_hCOH1_1-2347, pFLAG_hCOH1_2307-3997) in HeLa-Zellen transfiziert. Die Flag-Markierung diente der gleichzeitigen Ko-Lokalisation mit den COH1-AK. Damit konnte bei Überlagerung der Signale von einer spezifischen Bindung der COH1-AK ausgegangen werden. Das COH1_1-2347-Flag-Fragment wurde von dem N-terminalen und dem internen COH1-AK, das COH1_2307-3997-Flag-Fragment von dem C-terminalen COH1-AK erkannt (purpur, Abbildung 3.4). Im Überlagerungsbild (*merge*) wurde die Ko-Lokalisation mit dem Flag-spezifischen AK (grün) in weiß angezeigt. Für alle drei Konstrukte zeigte sich eine Überlagerung der Signale (Abbildung 3.4). Das bedeutet, dass alle drei Antikörper spezifisch an die COH1-Flag-Fusionsproteine gebunden haben.

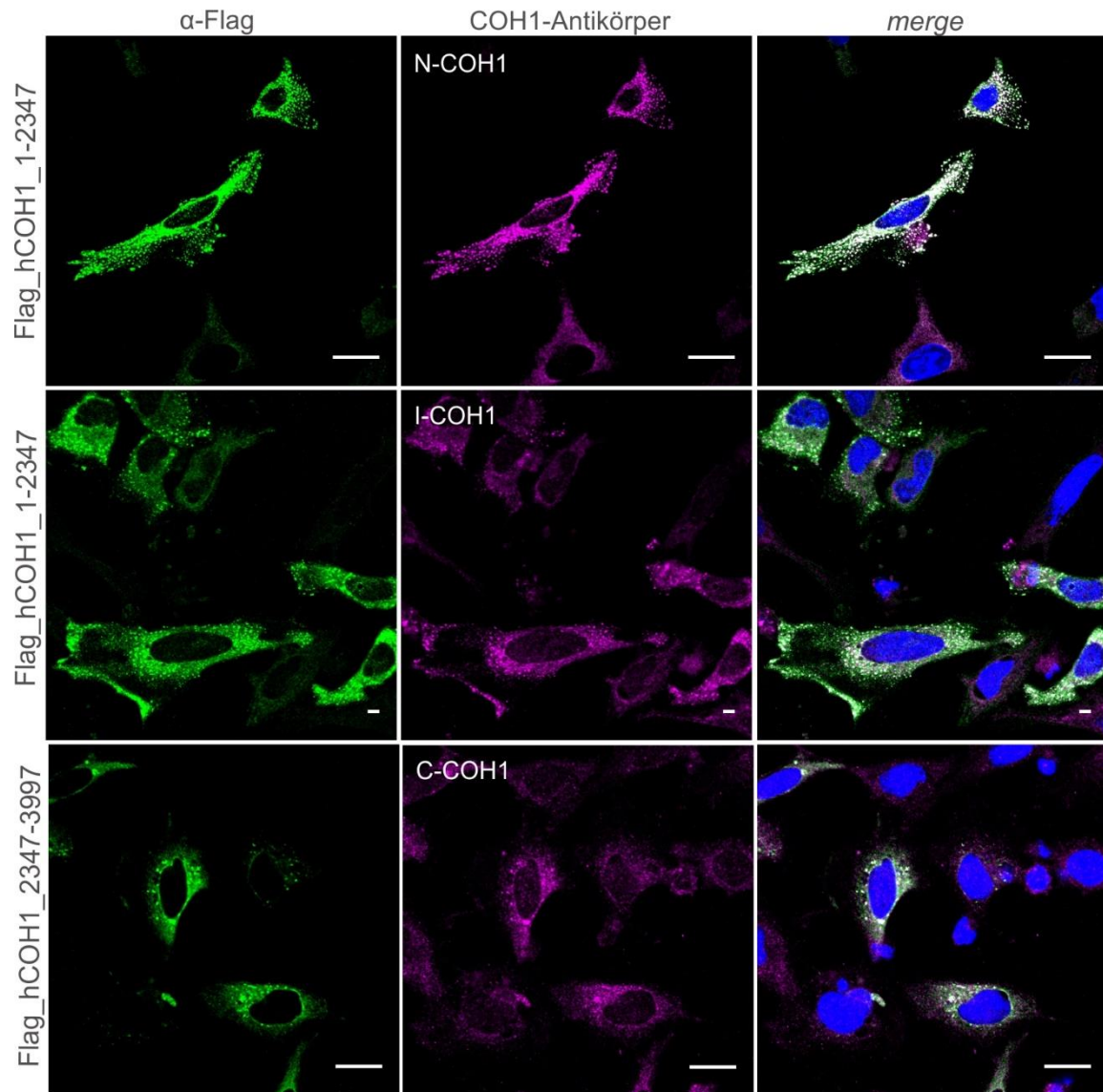


Abbildung 3.4: Spezifitätstest in HeLa-Zellen mit COH1-Teilfragmenten

Die HeLa-Zellen wurden mit zwei verschiedenen Flag-markierten COH1-Teilfragmenten transfiziert. Der N- und I-COH1-AK sollte spezifisch an das COH1_1-2347-Flag-Fragment und der C-COH1-AK spezifisch an das COH1_2347-3997-Flag-Fragment binden. Sowohl für grün, welches das Signal des Flag-AK darstellt, als auch für purpur, welches das COH1-AK-Signal darstellt, konnte im Überlagerungsbild (*merge*) eine Ko-Lokalisation an Hand der Überlagerung von grünen und purpurnen Signalen (im Bild als weiß zu sehen) gezeigt werden. Aufgenommen wurden die Bilder mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5 Exciter (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Der Maßstabsbalken beträgt 20 μm .

3.1.3 Spezifitätstest des I-COH1-Antikörpers nach *Coh1 knock down* in kortikalen Neuronen

Um falschpositive Signale des I-COH1-AK am Golgi-Komplex auszuschließen, erfolgte ein weiterer Test auf Neurone mit einem *Coh1 knock down*. Der *Coh1 knock down* konnte mit Hilfe der etablierten shRNA (unter Punkt 3.3.1 beschrieben) in Neuronen durchgeführt werden. Die shRNA-Konstrukte enthalten alle eine GFP-Markierung, welche eine Identifizierung der transfizierten Zellen ermöglichte. Zur Analyse wurden Neurone aus den Cortices von Mausembryonen mit dem Embryonalstadium 16,5 präpariert und an DIV 1 transfiziert. An DIV 3 wurden die Neurone fixiert und die Immunfärbung mit GFP, I-COH1, DAPI und dem Golgi-assoziiertem Marker GM130 durchgeführt. Die Ergebnisse sollten darüber Aufschluss geben, ob sich die *Coh1*-Signale nach dem *knock down* am Golgi-Komplex verringern. Die immunzytochemische Färbung zeigte, dass der I-COH1-AK in der Kontrolle an das native Golgi-assoziierte *Coh1* band und für die Überexpression das stärkste Signal aufwies. Bei dem *Coh1 knock down* konnte für den I-COH1-AK kein Signal mehr am Golgi-Komplex detektiert werden (Abbildung 3.5).

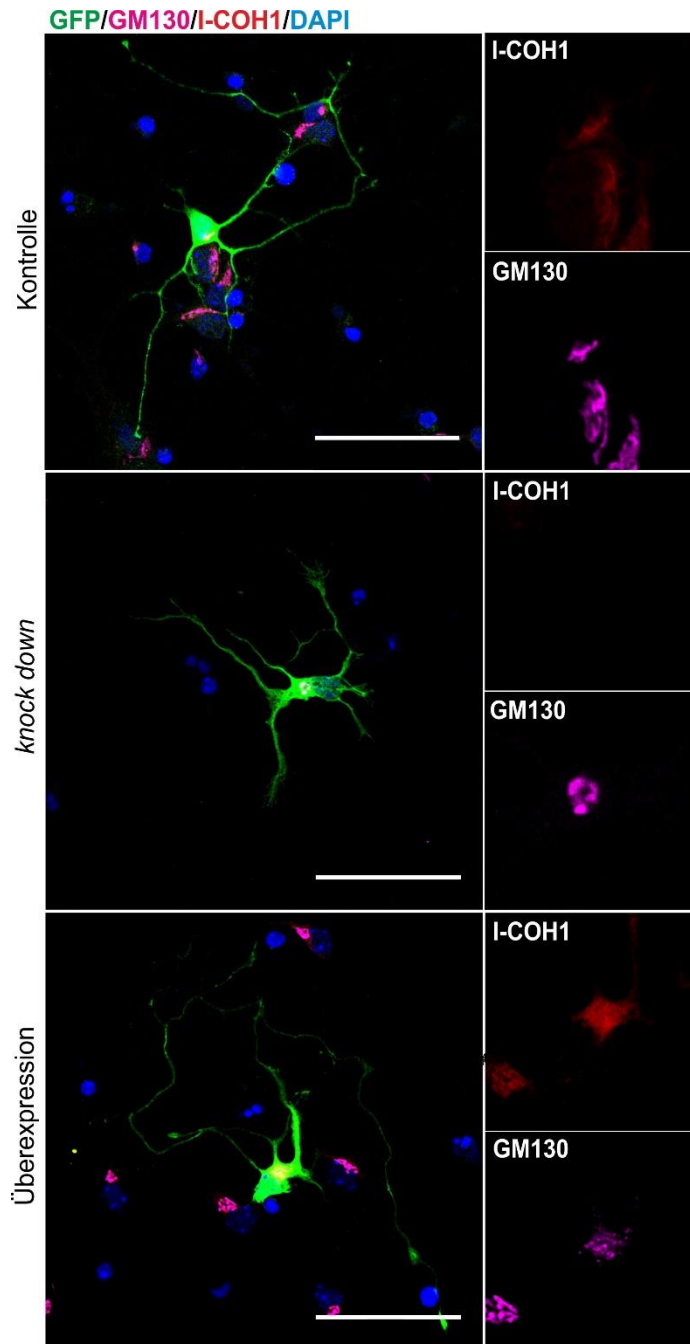


Abbildung 3.5: Spezifität des I-COH1-Antikörpers in kortikalen Neuronen

Für das Experiment wurden kortikale Neurone aus der Maus an DIV 1 mit einem Kontroll shRNA-Konstrukt (shRNA *luciferase*), einem *Coh1* knock down shRNA-Konstrukt (shRNA #1) oder einem *Coh1*-Überexpressionskonstrukt (pCAG_Ires-hCOH1-GFP) transfiziert. Die Fixierung der Zellen erfolgte an DIV 3. Die Immunfärbung wurde mit GFP (grün), I-COH1 (rot), GM130 (purpur) und DAPI (blau) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit dem TCS SP8 LSM von Leica gemacht. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

3.2 Der *knock down* von *Coh1* beeinflusst den Golgi-Komplex und das Zytoskelett

3.2.1 Der *Coh1 knock down* fragmentiert den Golgi-Komplex

Der Verlust von COH1 führt zur Fragmentierung des Golgi-Komplexes¹¹. Für die Experimente wurden HeLa-Zellen verwendet und mit einer *COH1*-spezifischen siRNA sowie einer Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 72 h erfolgte die Fixierung der Zellen und die Färbung mit einem COH1-spezifischen AK (COH1 #442), dem Golgi-Marker GM130 und dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI, welcher in die DNA im Kern interkaliert. Der Golgi-Komplex (rot) lag dabei in den Kontrollzellen kompakt vor und das Signal für COH1 (grün) ko-lokalisierte mit dem Golgi-Komplex. Dagegen wiesen die Zellen mit dem *COH1 knock down* einen stark fragmentierten Golgi-Komplex auf und für COH1 wurde kein Signal mehr detektiert (Abbildung 3.6).

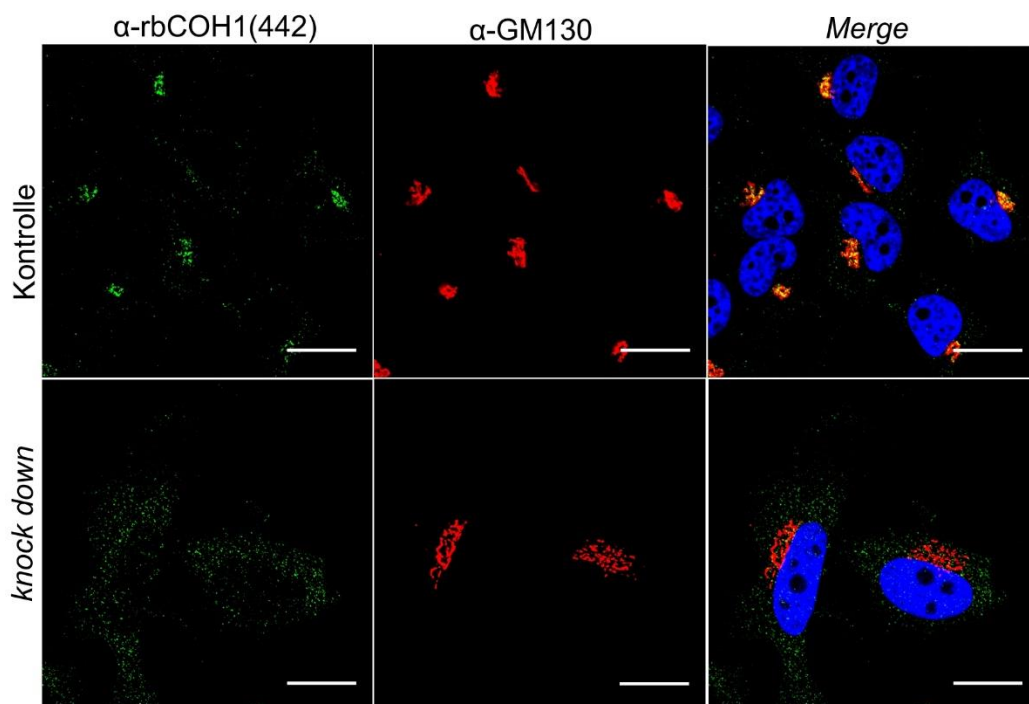


Abbildung 3.6: Fragmentierung des Golgi-Komplexes nach *Coh1 knock down*

Die transfizierten HeLa-Zellen wurden drei Tage mit den siRNAs (Kontrolle: siScramble, *knock down*: si*COH1* #25721) inkubiert und anschließend fixiert. Grün wurde das Signal für den COH1-AK (#442), rot das Signal für GM130 und blau die DAPI-Färbung dargestellt. Nach erfolgreichem *COH1 knock down* konnte eine Fragmentierung des Golgi-Komplexes (rot) nachgewiesen werden. Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5 Exciter (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) durchgeführt. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

3.2.2 Der *COH1* knock down verändert β -Tubulin-Stränge

Da nicht bekannt ist, warum der Golgi-Komplex nach dem Verlust von COH1 fragmentiert vorliegt, wurden HeLa-Zellen auf ihr Zytoskelett untersucht. Denkbar wäre, dass durch eine Veränderung des Zytoskeletts, welches als ein intrazelluläres Gerüst fungiert und damit formgebend für die Zelle ist¹²¹, auch der Golgi-Komplex beeinflusst wird. Hierfür wurden die HeLa-Zellen mit siRNA behandelt, um das *COH1*-Expressionslevel herunter zu regulieren. Im Überlagerungsbild (*merge*) konnte mit dem golgispezifischen Marker Giantin (rot) gezeigt werden, dass für die Kontrollzellen ein intakter Golgi-Komplex vorlag, jedoch die *COH1* knock down-Zellen die typische Fragmentierung aufwiesen (Abbildung 3.7). Um die Tubulinstränge des Zytoskeletts besonders gut erkennen zu können, wurde das Signal für β -Tubulin (grün) invertiert und schwarz/weiß dargestellt. Dabei ließen die Kontrollzellen ein Netz aus vielen durcheinander gezogenen Tubulinsträngen erkennen. Die Zellen mit dem *COH1* knock down wiesen dagegen besonders geordnete und stärker gebündelte Stränge auf (Abbildung 3.7). Diese Zusammenlagerung der β -Tubuline könnte auf einen Verlust von Golgi-assoziierten MT oder eine vermehrte Stabilisierung des Zytoskeletts hinweisen¹²².

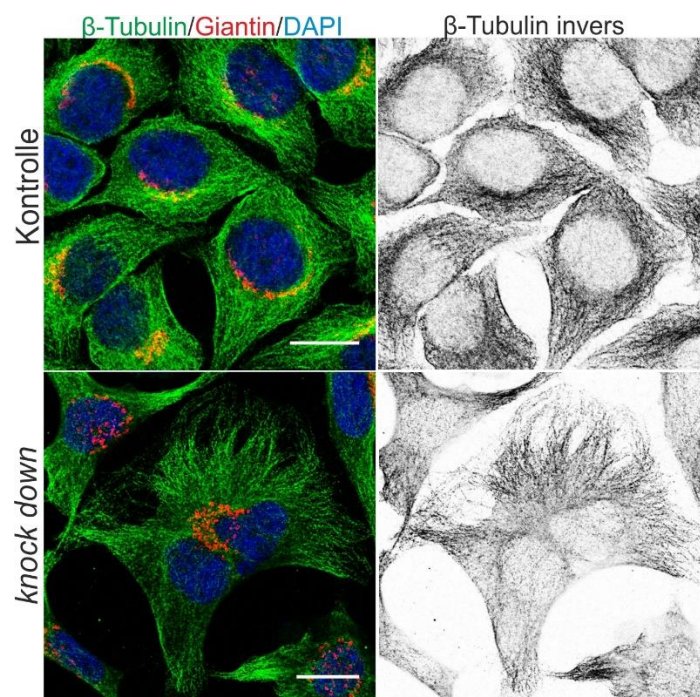


Abbildung 3.7: Veränderte Tubulin-Strukturen nach *COH1* knock down in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden an Tag 1 nach Aussaat mit *scramble*-siRNA für eine Kontrolle (*siScramble*) und mit einer *COH1* knock down-spezifischen siRNA (*siCOH1* #25721) transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen β -Tubulin (grün) und Giantin (rot) gefärbt. Die *Coh1* knock down-Zellen wiesen neben der typischen Golgi-Fragmentierung gebündelte Tubulinstränge auf. Die Bilder wurden mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5 Exciter (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

3.2.3 Der *COH1 knock down* stabilisiert Tubulin

Der gebündelte Phänotyp des β -Tubulins nach dem *COH1 knock down* (Abbildung 3.7) lässt vermuten, dass es sich hierbei um weniger dynamisches Tubulin handelt. Die Dynamik von MT wird insbesondere durch posttranslationale Modifikationen wie z.B. Acetylierung, Detyronisierung oder Glutamylierung beeinflusst, welche zu einer vermehrten Stabilisierung der MT führen⁴⁹. Da HeLa-Zellen in ihrem normalen Zustand (Interphase) kaum stabilisiertes Tubulin besitzen oder sich dieses nur im Zellzentrum befindet¹²³, eignen sich diese besonders gut für nachfolgend beschriebenes Experiment. Hierfür wurde die gleiche siRNA-Behandlung wie unter Punkt 3.2.2 angewandt, um das Expressionslevel von *COH1* herunter zu regulieren. Anstatt eines Antikörpers gegen β -Tubulin wurde ein Antikörper für acetyliertes Tubulin (acTub) verwendet. Um das acetylierte Tubulin besser erkennen zu können, wurde das grüne Signal invertiert und in schwarz/weiß dargestellt. Die immunzytochemische Färbung der HeLa-Zellen zeigte für die Kontrollzellen eine sehr schwache Färbung mit dem acetylierten Tubulin. Dagegen wiesen die Zellen mit dem *COH1 knock down* vermehrt acetylierte Tubulinstränge auf, welche über den kompletten Zellkörper verteilt waren (Abbildung 3.8 A). Dieser Fakt wurde proteinchemisch quantifiziert. Dafür wurden Zellextrakte der HeLa-Zellen verwendet, welche ebenfalls 72 h mit der *COH1*-spezifischen siRNA behandelt wurden. Das *immunoblotting* sollte Aufschluss über die Mengen an acetyliertem Tubulin und β -Tubulin - im Vergleich zum Haushaltsgen β -Aktin - geben (Abbildung 3.8 B). Quantitativ wurde für acetyliertes Tubulin ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Kontroll- und *COH1 knock down*-Zellen festgestellt (Abbildung 3.8 C). Dabei ließen die Zellen hinsichtlich der β -Tubulin-Menge keinen Unterschied erkennen. Es handelte sich hierbei also um die gleichen Mengen an Tubulin, jedoch lag in den *COH1 knock down*-Zellen ein größerer Teil davon acetyliert vor. Dies deutet darauf hin, dass unter *COH1 knock down* die Zellen vermehrt acetyliertes Tubulin bilden und dass das Zytoskelett somit stabilisiert vorliegt.

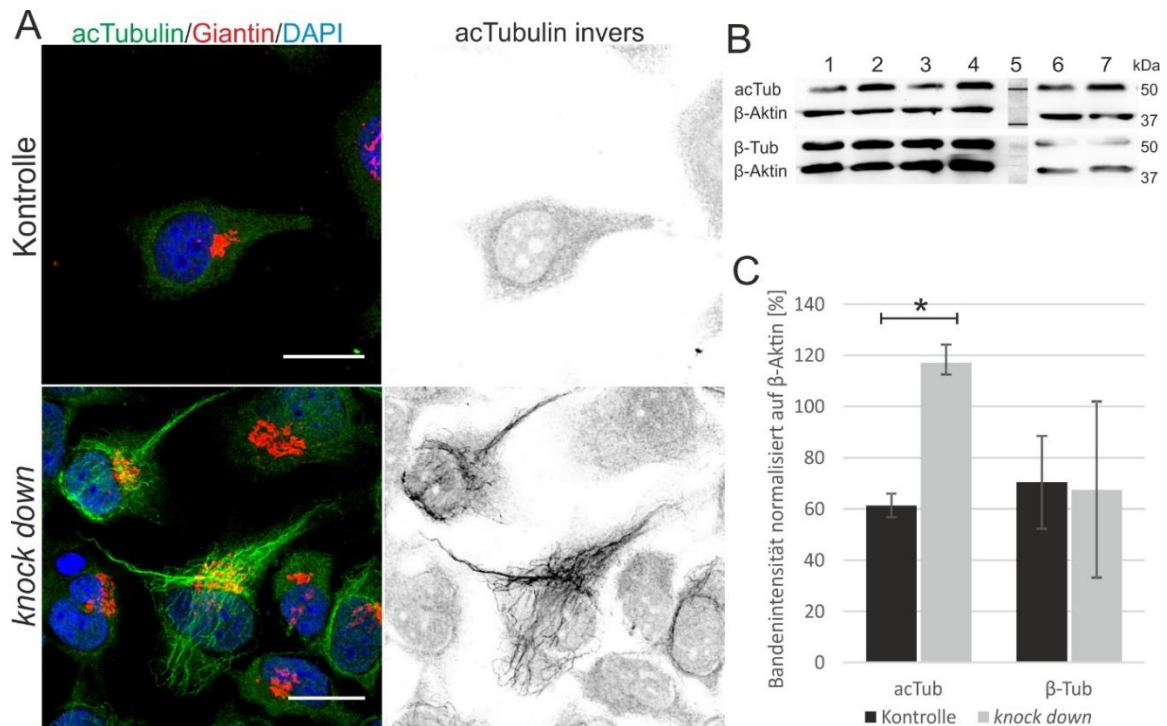


Abbildung 3.8: HeLa-Zellen mit *COH1* knock down bilden vermehrt acetyliertes Tubulin

A) Es wurden HeLa-Zellen verwendet, welche an Tag 1 entweder mit Kontroll-siRNA (siScramble) oder mit *COH1*-spezifischer siRNA (#25721) transfiziert wurden. Nach 72 h wurden die Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (grün, acTubulin) und Giantin (rot) gefärbt. Blau dargestellt ist der DNA-interkalierende Farbstoff DAPI zu sehen. Die Bilder wurden mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5 Exciter (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m. B) Verwendet wurden Zelllysate aus drei unabhängigen Experimenten (die Banden 1-2, 3-4 und 6-7 sind jeweils ein Experiment), welche - wie unter A beschrieben - transfiziert wurden. Die Banden 1, 3 und 6 zeigen hier Signale für Kontrollzellen, die Banden 2, 4 und 7 zeigen die Signale für *COH1* knock down-Zellen. Das Zelllysate wurde mittels SDS-PAGE und immunoblot-Analyse proteinchemisch auf acetyliertes und β -Tubulin untersucht. Für β -Tubulin und das Haushaltsgen β -Aktin wurde hierbei ein gleichbleibendes Signal in den jeweiligen Experimenten detektiert. Das Signal für acTub wurde für die *COH1* knock down-Zellen, verglichen mit den Kontrollzellen, in allen drei Experimenten deutlich schwächer. Als Proteinmarker wurde der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bahn 5) verwendet. C) Quantitative Analyse von drei unabhängigen Experimenten. Nach *COH1* knock down kam es zu einem signifikanten Unterschied (* = $p < 0,05$) für das acetylierte Tubulin im Vergleich zu den Kontrollzellen. β -Tubulin zeigte dagegen keinen signifikanten Unterschied. Die Messung der Bandensignale erfolgte mit Fiji. Die Berechnung der Mittelwerte, der SD und des t-Test wurde mit Microsoft Office Excel durchgeführt. Werte für acTub: Kontrolle 61,41 % \pm 4,6; *COH1* knock down 117,14 % \pm 7,1; Werte für β -Tub: Kontrolle 70,4 % \pm 18,2; *COH1* knock down 67,49 % \pm 34,59 (n=3).

3.3 Der Coh1-Phänotyp in kortikalen neuronalen Primärzellen

3.3.1 Etablierung von shRNA für die Transfektion in Säugetierzellen

Der Fokus dieser Arbeit liegt vor allem auf der Funktion von Coh1 während der Neurogenese von kortikalen Neuronen der Maus. Deshalb dienen für die folgenden Experimente primäre kortikale Neurone von Mausembryonen als Modell. Da bisher nur etablierte siRNA gegen humanes *COH1* verwendet wurde, musste zunächst ein Konstrukt

kloniert werden, welches sich gegen murines *Coh1* richtet und eine hohe Effizienz in *in vivo*-Versuchen, wie z.B. bei der *in utero*-Elektroporation, aufweist. Hier eignete sich besonders die Herstellung von *small hairpin* RNA-kodierenden Plasmiden (shRNA). Der *hairpin* ermöglicht ein dauerhaftes und effizienteres *gene silencing*. Dagegen wirkt die normale doppelstrangbasierte siRNA nur transient in der Zelle^{124,125}. Die Klonierung wurde mit dem Vektor pSUPER.retro.neo+GFP durchgeführt (beschrieben unter Punkt 2.2.2). Dieser Vektor eignete sich besonders gut, da er über einen H1-Promotor verfügt, welcher im Mausgehirn *in vivo* sehr gut funktioniert¹²⁶. Des Weiteren ist es von Vorteil, dass der Vektor zytosolisches GFP exprimiert, welches die Unterscheidung von nicht-transfizierten zu shRNA-Konstrukt-transfizierten Zellen ermöglicht. Es wurden insgesamt fünf shRNAs gegen murines *Coh1* kloniert, wovon eine auch auf die humane Sequenz von *COH1* passt (shRNA #3) und der bekannten Sequenz der siRNA #25721 entspricht. Anschließend wurden diese mit Hilfe von qPCR, *immunoblotting* und Immunzytochemie auf ihre Effizienz getestet.

Real time quantitative-PCR

Die klonierten shRNA-Konstrukte erkennen die murine *Coh1*-mRNA. Aus diesem Grund wurden für die Analysen der Expressionslevel murine N2A-Zellen verwendet. Diese wurden 24 h nach Aussaat mit dem *Coh1 knock down*-Expressionsvektor shRNA #1 bis #5, einem Kontroll-shRNA-Expressionsvektor, welcher gegen *luciferase* exprimiert, oder dem Überexpressionskonstrukt pCMV5_mCoh1 transfiziert. Nach 72 h wurde aus den Zellen mit Hilfe der Trizol-Methode RNA extrahiert und für die *real time quantitative-PCR* eingesetzt. Der Nachweis des Expressionslevels von murinem *Coh1* erfolgte durch Normalisierung auf das Haushaltsgen *Gapdh* (Abbildung 3.9). Die Ansätze mit der Kontroll-shRNA wurden als Vergleichswert herangezogen (als 1 gesetzt). Für die Überexpression von *Coh1* wurde ein sehr starker Anstieg der mRNA-Expression von *Coh1* gemessen. Bei allen fünf getesteten shRNAs gegen *Coh1* konnte ein signifikanter Abfall im mRNA-Expressionslevel von *Coh1* im Vergleich zu der Kontroll-shRNA beobachtet werden ($p < 0,05$, Abbildung 3.9). Die höchste *knock down*-Effizienz zeigten hierbei die shRNA #1 und #2. Dieser Versuch zeigte, dass die Klonierung von *Coh1*-spezifischen shRNAs erfolgreich war und *Coh1* mittels dieser shRNAs mit einer hohen Effizienz auf ein Restniveau von ca. 30 % herunter reguliert wurde. Für die folgenden Versuche mit Mauszellen wurde die shRNA #1, welche die geringste Standardabweichung aufwies, verwendet. Für Versuche an humanen Zellen wurde die shRNA #3 verwendet.

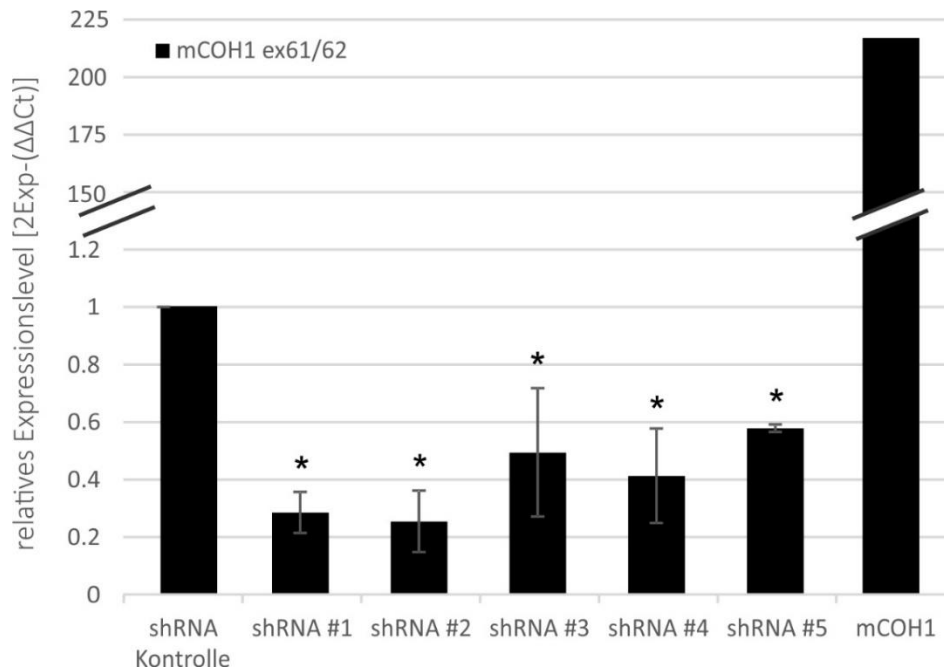


Abbildung 3.9: Effizienztest der klonierten shRNAs auf Expressionsebene mittels *real time-PCR*

Die Abbildung zeigt die Expressionslevel von *Coh1* in N2A-Zellen nach der Transfektion mit fünf verschiedenen *Coh1*-spezifischen shRNAs (shRNA #1-#5), einem *Coh1*-Überexpression-Konstrukt (mCOH1) und einem Kontrollkonstrukt. Als Kontrolle diente eine shRNA gegen *luciferase*, pCMV5_mCoh1 wurde für die Überexpression von *Coh1* verwendet und die zuvor klonierten shRNAs gegen *Coh1* (#1 bis #5) sollten einen *knock down* hervorrufen. Die N2A-Zellen wurden nach 72 h geerntet und die RNA mittels der Trizol-Methode aufgereinigt. Als Primer wurde der mCoh1_ex61/62 verwendet. Die Kontrolle diente als Ausgangswert (= 1) für die Berechnung der *knock down*- und Überexpressionswerte. Für alle fünf *Coh1 knock down*-Konstrukte konnte im Vergleich zu der Kontroll-shRNA ein signifikanter Abfall des Expressionslevel von *Coh1* nachgewiesen werden. Auch bei der Überexpression von *Coh1* ist ein deutlicher Anstieg von mCoh1_ex61/62 zu erkennen. Gemessen wurde mit dem *real time* Cyler 7500 (Fast Applied Biosystems). Die erhaltenen Werte wurden mit Microsoft Office Excel berechnet und der t-Test durchgeführt. Die Werte für das relative Expressionslevel von *Coh1* wurden auf das Haushaltsgen *Gapdh* und die erhaltenen Werte anschließend auf die Kontroll-Werte normalisiert. Es wurde die komparativen ddCT-Methode angewandt. Werte für mCOH1_ex61/62: shRNA #1 = 0,286 ± 0,07; #2 = 0,254 ± 0,1; #3 = 0,495 ± 0,22; #4 = 0,41 ± 0,16; #5 = 0,58 ± 0,01; mCOH1 = 219,18. (* p<0,05, n=3).

Test von shRNA auf COH1 knock down in HeLa-Zellen

Die Wirksamkeit der shRNA konnte erfolgreich auf mRNA-Expressionsebene getestet werden. Im nächsten Experiment erfolgte die Untersuchung der bekannten phänotypischen Veränderungen in der Zelle, welche mit einem *COH1 knock down* einhergehen^{11,16}. Zum einen sollte die Fragmentierung des Golgi-Komplexes nach der Behandlung mit *COH1*-spezifischer shRNA zu sehen sein und zum anderen ist es von Interesse, ob der *Coh1 knock down* auch in kortikalen Neuronen der Maus für ein verkürztes längstes Neurit und eine abweichende Golgi-Orientierung verantwortlich ist. Dafür wurden zunächst HeLa-Zellen mit dem shRNA #3-Konstrukt transfiziert, welches die humane *COH1*-mRNA erkennt.

Nach 72 h wurden die Zellen fixiert und mit dem Golgi-assoziiertem Marker GM130 und dem etabliertem anti-I-COH1-AK gefärbt. Für die Kontrollzellen konnte ein kompaktes perinukleäres Signal für den anti-GM130-AK detektiert werden. Das Signal Ko-lokalisierte mit dem anti-I-COH1-AK, welcher intrinsisches COH1 am Golgi-Komplex detektiert. Dagegen lag in den Zellen mit dem *COH1 knock down* der Golgi-Komplex stark fragmentiert vor (grün, GM130) und die Zellen zeigten keine Färbung mehr für COH1 (rot, I-COH1, Abbildung 3.10). Somit wurde gezeigt, dass die klonierten shRNAs auf Expressions- und Translationsebene einen effizienten *COH1 knock down* aufgewiesen haben. Darüber hinaus wurde die bereits in der Literatur bekannte Fragmentierung des Golgi-Komplexes nach COH1-Verlust verifiziert¹¹.

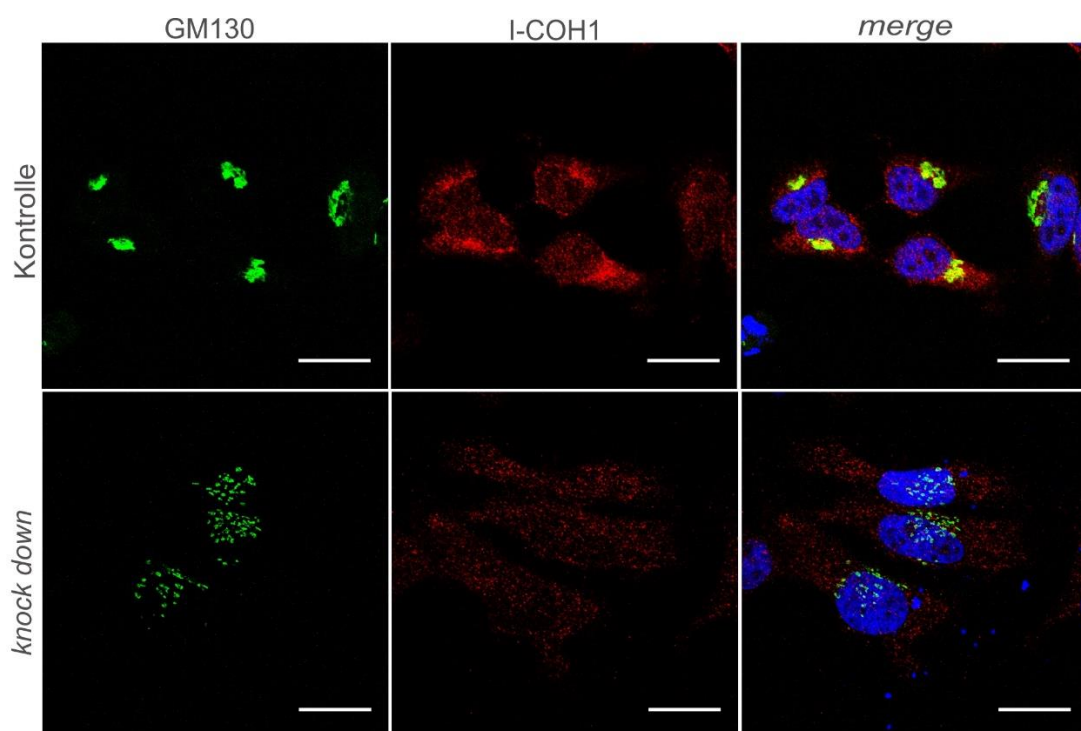


Abbildung 3.10: Phänotypische Veränderungen in HeLa-Zellen nach *Coh1* knock down mittels shRNA

Es wurden HeLa-Zellen an Tag 1 nach Aussaat mit shRNA für *COH1* und *luciferase* transfiziert. Die Zellen wurden mit einem GM130-AK (grün), dem I-COH1-AK (rot) und DAPI (blau) gefärbt. Nach dem *COH1 knock down* lag der Golgi-Komplex (GM130) fragmentiert vor und der I-COH1-AK zeigte kein Signal mehr. Die Bilder wurden mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5 Exciter (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

3.3.2 Phänotyp in kortikalen Primärzellen

Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass *Coh1* mit zunehmender Embryonalentwicklung vermehrt im Gehirn der Maus exprimiert wird (siehe Abbildung 3.11, modifiziert nach Seifert, W. „*Expression analysis and functional characterization of COH1*“ (2010, Dissertation)). Bei der Maus beginnt die kortikale Entwicklung nach Anlegen der Marginalzone mit dem

Einwandern neuronaler Zellen zwischen Embryonaltag 10 und 11⁸¹. Das Expressionsmuster von *Coh1* erlaubt einen ersten Rückschluss für eine mögliche Rolle von *Coh1* während der Entwicklung des Gehirns. An primären Neuronen des Hippocampus der Ratte wurde gezeigt, dass ein Verlust von *Coh1* nach *knock down* mit siRNA zu einem veränderten Phänotyp führte. So konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass der längste Neurit nach *Coh1 knock down* verkürzt ausgebildet wurde und der Golgi-Komplex nicht immer in Richtung des Axonhügels orientiert war¹⁶. Diese initialen Analysen lassen vermuten, dass *Coh1* bereits während der Neurogenese eine Rolle spielt. Darüber soll das nächste Kapitel Aufschluss geben.

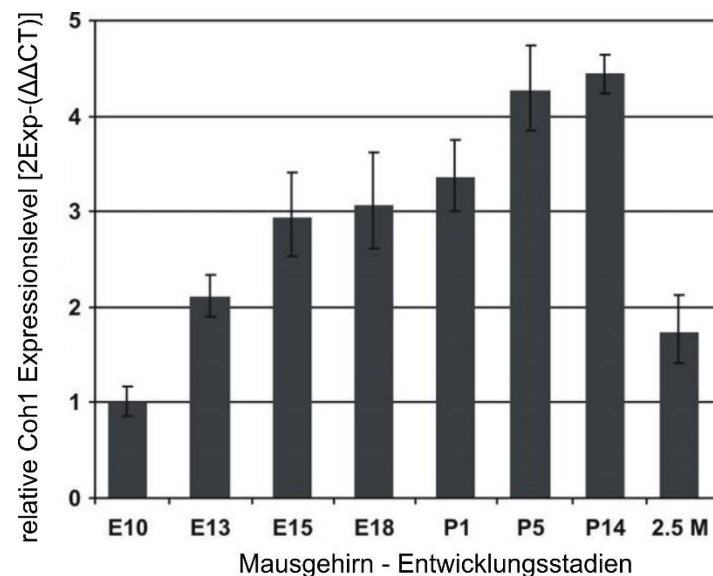


Abbildung 3.11: Expressionsanalyse von *Coh1* in verschiedenen Embryonalstadien der Maus
Für die Expressionsanalyse wurden die Gehirne von Wildtypmäusen der verschiedenen Stadien (E - Embryonaltag, P - Postnataler Tag) entnommen und aus dem Homogenat RNA für die *real time quantitative*-PCR vorbereitet. Die zur Analyse eingesetzten Primer waren die m*Coh1*_ex31/32. Die CT-Werte wurden, verglichen mit dem Embryonalstadium 10 (=1), um das x-fache gesteigert und auf *Gapdh* normalisiert. Es wurde die komparative ddCT-Methode angewandt (n=3). Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Office Excel. Modifiziert nach Seifert, W. „*Expression analysis and functional characterization of COH1*“ (2010, Dissertation).

Axonlänge

Für kortikale Neurone spielt die Axonlänge besonders für die Projektion zwischen den beiden Hemisphären oder zu subzerebralen Strukturen eine große Rolle⁶³. Um einen Einfluss von *Coh1* auf die Entwicklung von Neuronen zu untersuchen, wurde zunächst die Neuritogenese von kortikalen Neuronen betrachtet. Dafür wurden Neurone von Mausembryonen an E16,5 präpariert und an DIV 1 mit shRNA transfiziert. An DIV 3 erfolgte die Fixierung mit vorgewärmten PFA. Dies sollte verhindern, dass sich die MT durch thermische Einflüsse verkürzen. Für Neurone mit dem *Coh1 knock down* (rechtes Bild,

Abbildung 3.12 A) wurde ein kürzerer längster Neurit ausgebildet als für die Kontrollgruppe (linkes Bild, Abbildung 3.12 A). Unterschiede bezüglich der Anzahl an gebildeten Neuriten wurden jedoch nicht beobachtet. Die Daten der quantitativen Analyse der Längenvermessung des jeweils längsten Neuriten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten ergaben zwischen der Kontrollgruppe und der *Coh1 knock down*-Gruppe einen hoch signifikanten Unterschied bezüglich des längsten Neuriten ($p < 0,001$, Abbildung 3.12 B). Außerdem wurde sowohl der Einfluss einer Überexpression von humanem *COH1* (Transfektion mit pCAG_IRES_EGFP_hCOH1_1-3997) als auch der Erfolg eines sogenannten *rescues* (Wiederherstellung) mit *Coh1 knock down* und gleichzeitiger Überexpression von humanem *COH1* untersucht. Nach Überexpression von *Coh1* konnte kein signifikanter Unterschied in der Axonlänge im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 3.12 B). Im Vergleich zum *Coh1 knock down* ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) für die *Coh1*-Überexpression (Abbildung 3.12 B). Der Vergleich zwischen *Coh1 knock down*-Gruppe und *rescue*-Gruppe ergab einen hoch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Neurite nach *Coh1 knock down* einen um durchschnittlich 50 % verkürzten längsten Neurit im Vergleich zu den Kontrollneuronen haben. Bei der Überexpression von humanem *COH1* konnten vergleichbar lange Neurite wie unter Kontrollbedingungen beobachtet werden. Somit konnte in Kombination mit einem *Coh1 knock down* das Auswachsverhalten des längsten Neuriten erfolgreich wiederhergestellt werden.

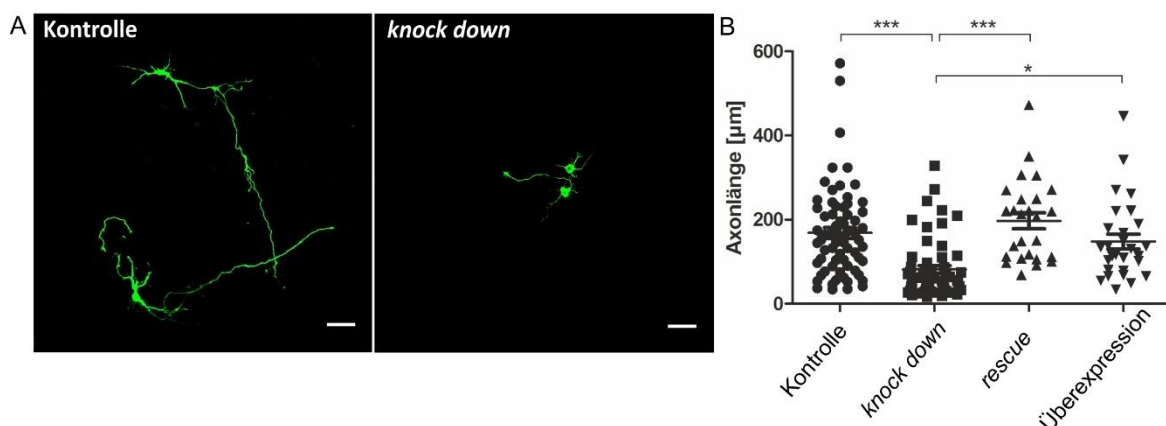


Abbildung 3.12: Einfluss von *Coh1 knock down* auf die Axonlänge in kortikalen Neuronen

A) Die Neurone wurden auf beschichteten Deckgläschen ausgesät und an DIV 1 mit shRNA-Konstrukten transfiziert. An DIV 3 wurden die Neurone fixiert und mit GFP nachgefärbt. Es wurde darauf geachtet, dass alle Neurone mit ihrem kompletten Axon aufgenommen wurden, sodass dieses mit Hilfe von Fiji ausgemessen werden konnte. Die Bilder wurden mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5 Exciter (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm . B) Die erhaltenen Werte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten wurden in Prism Graph Pad mit einer *one way*-ANOVA-Varianzanalyse und dem Tukey's Multiple

Comparison-Test ausgewertet und zu einem Whisker-Plot zusammengestellt ($n > 50$; * = $p > 0,05$; *** = $p > 0,001$). Durchschnittliche Werte und SD (in μm) für Kontrolle: $168,63 \mu\text{m} \pm 104,52$; *Coh1 knock down*: $81,64 \mu\text{m} \pm 68,61$; *rescue*: $197,27 \mu\text{m} \pm 94,86$; Überexpression: $148,12 \mu\text{m} \pm 92,29$ (berechnet mit Microsoft Office Excel).

Golgi-Orientierung

Sowohl für die Ausbildung des längsten Neuriten (dem späteren Axon) als auch für die Migrationsrichtung eines Neurons ist die Orientierung des Golgi-Komplexes entscheidend. Dieser ordnet sich auf der Seite des Zellkörpers an, wo später das Axon ausgebildet wird¹²⁷. Für die Experimente wurden die kortikalen Neurone an DIV1 transfiziert und an DIV 3 fixiert. Der Golgi-Komplex wurde mit einer Färbung von GM130 (rot) dargestellt (Abbildung 3.13 A). Für die Auswertung wurden die Zellkörper in vier Quadranten eingeteilt (Abbildung 3.13 B). Die Neurone mit dem Kontrollkonstrukt zeigten zu 93,3 %, dass sich der Golgi-Komplex in Orientierung zum längsten Neurit befindet. Im Vergleich zu den Neuronen mit dem *Coh1 knock down* gab es dabei signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Abbildung 3.13 C). Hier lag die Orientierung des Golgi-Komplexes zum längsten Neurit nur noch bei 68,2 %. Im *rescue*-Versuch konnte nach shRNA-vermittelten *Coh1 knock down* mit Hilfe der Überexpression von humanem *COH1* (Transfektion mit pCAG_IRES_EGFP_hCOH1_1-3997) der Phänotyp der Kontrollneurone wiederhergestellt werden. Hier lag die Orientierung des Golgi-Komplexes zum längstem Neuriten bei 85,5 % und ergab im Vergleich zu den *Coh1 knock down*-Neuronen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, Abbildung 3.13 C).

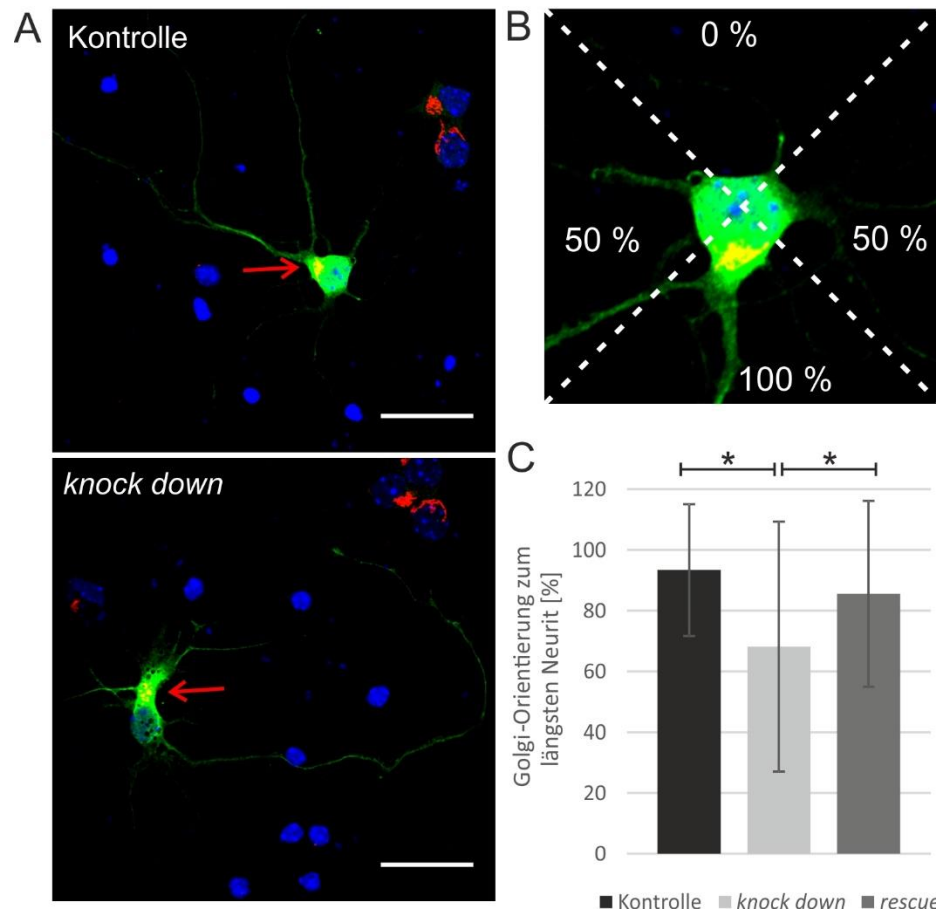


Abbildung 3.13: Einfluss des *knock down* von *Coh1* auf die Golgi-Orientierung in kortikalen Neuronen

A) Die Neurone wurden auf beschichteten Deckgläschen ausgesät und an DIV 1 mit den shRNA-Konstrukten transfiziert. An DIV 3 wurden die Neurone fixiert und mit GFP (grün), GM130 (rot) und DAPI (blau) gefärbt. Die Bilder wurden mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5 Exciter (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm . B) Zur Bestimmung der Golgi-Orientierung wurden die Neurone in vier Quadranten eingeteilt. Als Quadrant 1 wurde die Seite des Zellkörpers mit dem längsten Neurit gewählt. Lag der Golgi-Komplex in diesem Bereich, ging das Neuron mit 100 % in die Auswertung ein. Der Quadrant gegenüber (3. Quadrant) entspricht dem Bereich, der am entferntesten vom längsten Neurit ist und wurde mit 0 % berechnet. Lag der Golgi-Komplex zwischen diesen Bereichen (also Quadrant 2 und 4), erfolgte die Berechnung mit 50 %. C) Die erhaltenen Werte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten wurden in Microsoft Office Excel mit dem t-Test ausgewertet. Kontrolle: 93,33 % \pm 21,7; *Coh1 knock down*: 68,2 % \pm 41,1; *rescue*: 85,5 % \pm 30,6. (n=30, * = p>0,05)

3.4 Einfluss von COH1 auf die Mikrotubuli

3.4.1 Einfluss von Nocodazol-Behandlung auf Mikrotubuli in HeLa-Zellen mit *COH1 knock down*

Einfluss auf stabilisierte Mikrotubuli

Wie bereits gezeigt, bilden HeLa-Zellen mit einem *COH1 knock down* mehr stabilisiertes Tubulin aus, welches mit einem Marker für acetyliertes Tubulin nachgewiesen wurde (siehe Punkt 3.2.3). Ein gängiges Experiment zum Nachweis stabilisierter MT ist die Behandlung

mit Nocodazol. Nocodazol bindet an dynamische MT, welche aus α - und β -Tubulin-Untereinheiten bestehen, und blockiert den Anbau neuer Untereinheiten. Durch die ständige Depolymerisierung des Tubulins bewirkt es letztendlich den Abbau der MT¹²⁸. Sind die MT jedoch durch posttranslationale Modifikationen wie Acetylierungen stabilisiert, bleibt Nocodazol wirkungslos¹²⁹. Für das Experiment wurden HeLa-Zellen verwendet, welche eine Stunde mit 5 μ M Nocodazol behandelt wurden. Diese wurden anschließend fixiert und für acetyliertes Tubulin, den Golgi-assoziierten Marker Giantin und DAPI gefärbt. Für eine bessere Veranschaulichung der Tubulin-Netzwerke wurden die Signale für acetyliertes Tubulin (grün, Abbildung 3.14) invertiert und in schwarz/weiß dargestellt. Die Kontrollzellen zeigten nur kurze MT-Strukturen im Zellzentrum. Dagegen ließen die Zellen mit *COH1 knock down*, welche auch durch einen fragmentierten Golgi-Komplex erkennbar waren (rot, Giantin), vermehrt stabilisierte MT-Stränge (acetyliertes Tubulin) erkennen, welche sich über die komplette Zelle erstreckten (Abbildung 3.14).

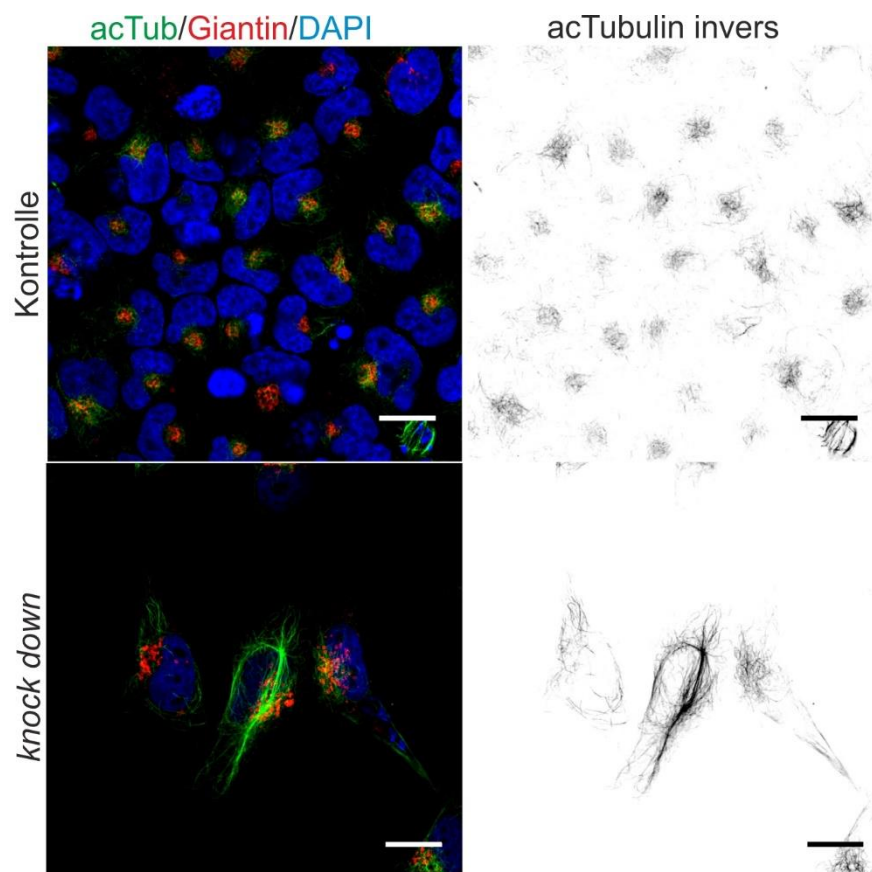


Abbildung 3.14: Auswirkungen von Nocodazol-Behandlung auf stabilisiertes Tubulin in HeLa-Zellen

Dargestellt sind HeLa-Zellen, welche mit einer Kontroll-siRNA (si*Scramble*) und einer *Coh1*-spezifischen siRNA (si*COH1* #25721) transfiziert wurden. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen 1 h mit 5 μ M Nocodazol bei 37 °C behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit dem Golgi-Marker Giantin (rot) und dem Marker für acetyliertes Tubulin (grün, invers) gefärbt. Blau (DAPI) stellt den Zellkern dar. Es ist zu erkennen, dass die *COH1 knock down*-Zellen auch nach

Behandlung mit Nocodazol weiterhin stabilisierte MT haben. Dagegen weisen die Kontrollzellen keine stabilisierten Tubulinstränge auf. Die Bilder wurden mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5 Exciter (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) aufgenommen. Der Maßstabsbalken beträgt 20 μm .

Einfluss auf die Ausbildung des MTOC

Da die HeLa-Zellen unter *COH1 knock down* neben einer Fragmentierung des Golgi-Komplexes auch eine veränderte Anordnung von Tubulin und ein vermehrtes Auftreten von stabilisiertem Tubulin aufgewiesen haben (siehe Abb. 3.8), war es ebenfalls von Interesse, die Organisation von MT - insbesondere an den Mikrotubuli-Organisations-Zentren (*microtubule organization center*, MTOC) - näher zu untersuchen. Diese MTOC können sowohl am Zentrosom als auch auf der Golgi-Komplex-Membran organisiert sein^{50,51}. Für die Analyse wurde die Depolymerisierung der MT-Stränge bei Abkühlung auf 4 °C und die Polymerisierung der MT-Stränge bei Erwärmung auf mindestens 20 °C genutzt. Die Abkühlung auf 4 °C verursacht gleichzeitig eine Fragmentierung des Golgi-Komplexes. Es wurden HeLa-Zellen verwendet, welche mit einer Kontroll-siRNA (siScramble) und einer *COH1*-spezifischen siRNA (si*COH1*, #25721) transfiziert wurden. An Tag 4 nach der Transfektion wurden die Zellen 1 h bei 4 °C inkubiert, um eine Depolymerisierung der MT zu ermöglichen. Anschließend wurden diese auf RT erwärmt und die Zellen je Versuchsgruppe nach 0, 1, 2, 5 und 10 min fixiert, um das Stadium der Polymerisierung verfolgen zu können. Die Fixierung erfolgte mit -20 °C-kaltem Methanol. Gefärbt wurden die Zellen mit dem anti-AKAP450-AK, welcher MTOC sowohl an der Golgi-Komplex-Membran als auch am Zentrosom detektiert, sowie mit einem anti- α -Tubulin-AK, welcher durch Färbung der α -Tubulin-Untereinheiten die beginnende Polymerisierung der Tubulin-Untereinheiten darstellen sollte. Die Färbung von AKAP450 und α -Tubulin wurde für eine bessere Darstellung invertiert und in schwarz/weiß abgebildet. AKAP450 ließ zu allen drei Zeitpunkten (0, 1 und 2 min) viele kleine Punkte, welche die MTOC am Golgi-Komplex darstellen, und einen größeren Punkt, welcher das MTOC am Zentrosom darstellt, erkennen. Nach kurzer Zeit akkumulierten die vielen kleinen Punkte, da sich neben der Polymerisierung der MT auch der Golgi-Komplex wieder zusammensetzt. Zum Zeitpunkt null konnte an diesen Punkten für die Kontrollzellen kaum eine Ausbildung von α -Tubulin erkannt werden, während sich nach 1 min bei RT schon deutlich mehr α -Tubulin-Herde über die Zelle verteilten. Nach 2 min war ein Netz von MT zu erkennen (Abbildung 3.15 A). Die späteren Zeitpunkte wurden nicht mit abgebildet, da das MT-Netzwerk bereits nach 2 min fast vollständig ausgebildet war. Für die HeLa-Zellen, welche einen *COH1 knock down* haben, waren auch hier für AKAP450 die kleinen und ein großer Punkt erkennbar. Jedoch

akkumulierten die kleinen Punkte nach 1 min nicht wie in den Kontrollzellen, da die Zusammenlagerung des Golgi-Komplexes durch den *COH1 knock down* verhindert wurde. Für α -Tubulin waren für die *COH1 knock down*-Zellen bereits zum Zeitpunkt null deutliche sternenförmige Strukturen auszumachen. Diese befanden sich aber lediglich an dem MTOC des Zentrosoms. Auch nach 1 min waren nur MT-Strukturen zu erkennen, welche von einem Punkt der Zelle ausgingen (Abbildung 3.15 B). Dagegen schienen die MT in den Kontrollzellen viele Ansatzpunkte zu haben, wodurch ein verzweigtes Netzwerk an MT entstand (Abbildung 3.15 A). Die *COH1 knock down*-Zellen zeigten fast ausschließlich unverzweigte gebündelte MT, von denen sich so viele nach 2 min aus dem zentrosomalen MTOC gebildet hatten, dass die Signale für α -Tubulin bei gleichbleibender Laserintensität schon leicht übersättigt waren (Abbildung 3.15 B). Die Zeitpunkte 5 min und 10 min wurden nicht abgebildet, da nach dieser Zeit die Zellen ihren Ursprungszustand von vor der 4 °C-Behandlung wieder eingenommen hatten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die MT von *COH1 knock down*-Zellen nur von dem einen zentrosomalen MTOC auswachsen.

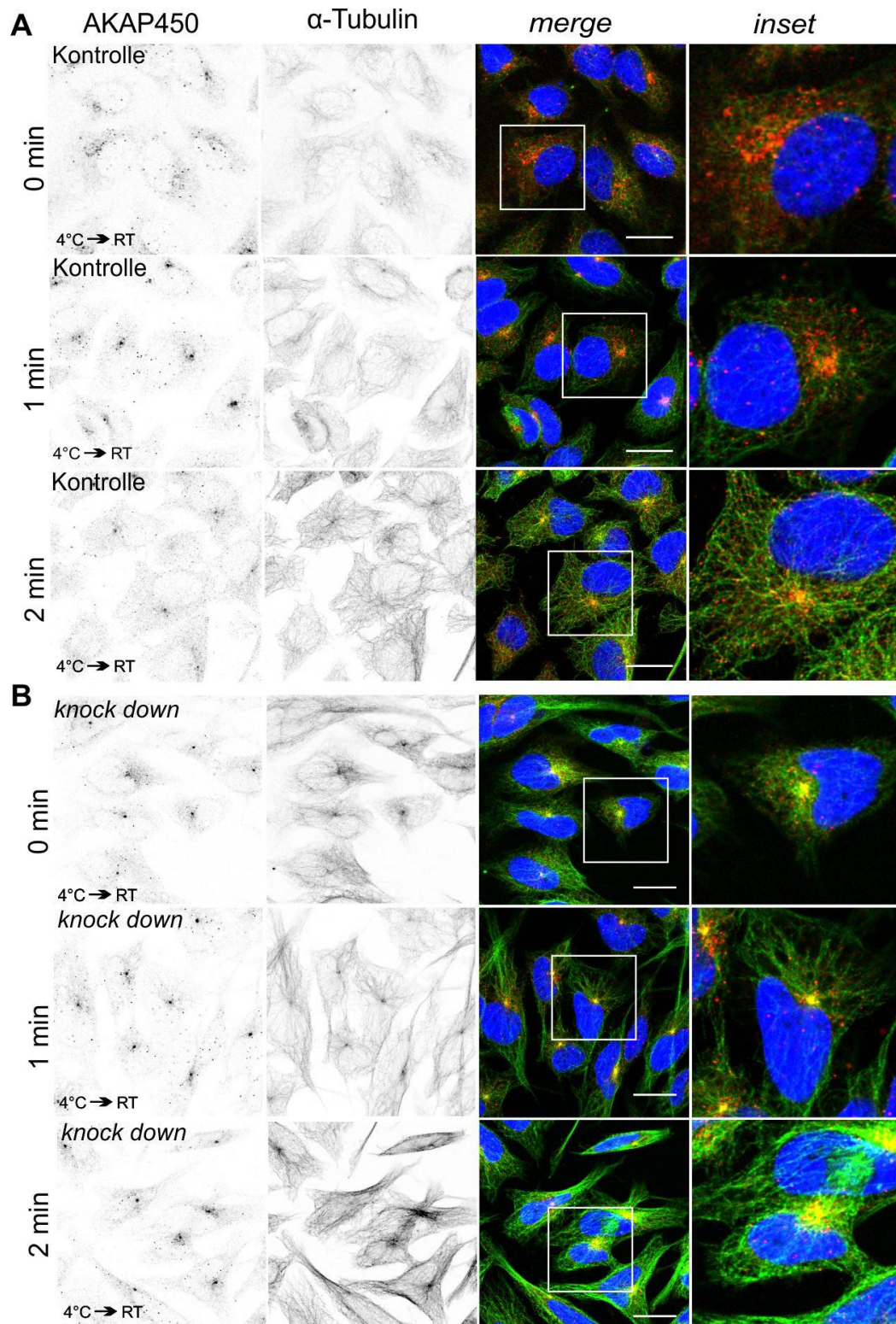


Abbildung 3.15: Ausbildung von MTOC nach *COH1* knock down in HeLa-Zellen

Die Abbildung zeigt mit siRNA transfizierte HeLa-Zellen. Die Kontrollzellen (A, siScramble) und *COH1* knock down-Zellen (B, si*COH1* #25721) wurden nach Inkubation bei 4 °C zu den dargestellten Zeitpunkten fixiert und mit AKAP450 (im *merge* rot) und α -Tubulin (im *merge* grün) gefärbt. Blau stellt die Zellkerne dar (DAPI). Zum Zeitpunkt null wurde für die Kontrollzellen noch keine Ausbildung von α -Tubulin beobachtet, wohingegen die *COH1* knock down-Zellen bereits am Zentrosom eine sternenförmige Struktur ausgebildet hatten. Bei 1 min wurde für beide Versuchsgruppen α -Tubulin erkannt. In der Kontrolle bildeten sich über die gesamte Zelle verteilt

kleine Herde mit α -Tubulin. Bei den *COH1 knock down*-Zellen blieb es bei der Ausbildung eines α -Tubulin-Herdes um das Zentrosomen herum. Nach 2 min wurde für beide Versuchsgruppen schon sehr viel α -Tubulin gebildet. In der Kontrolle war ein geflochtenes Netz aus MT durch viele verschiedene MTOC entstanden, wohingegen sich in den *COH1 knock down*-Zellen alle Tubulinstränge von einem MTOC heraus gebildet hatten. Die Bilder wurden mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5 Exciter (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) aufgenommen. Der Maßstabsbalken beträgt 20 μ m.

3.4.2 Zytoskelett in Neuronen

Nocodazol-Behandlung

Die Arbeit hat bisher gezeigt, dass unter *COH1 knock down* in HeLa-Zellen vermehrt stabile MT gebildet wurden. Ebenfalls wurde gezeigt, dass auch unter Nocodazol-Behandlung die stabilisierten Tubuline nicht abgebaut wurden. Da in Neuronen vermehrt stabilisierte MT ausgebildet sind, wurde hier das Nocodazol-Experiment wiederholt und die Behandlungsdauer auf acht Stunden verlängert, um den Grad der Stabilisierung über einen längeren Zeitraum beobachten zu können. Dafür wurden die aus der Maus isolierten kortikalen Neurone an DIV 1 mit shRNA-Konstrukten für *luciferase* (Kontrolle) und *Coh1* (shRNA #1, *knock down*) transfiziert. Zusätzlich wurde auch eine Versuchsreihe begonnen, in der der Wildtyp-Phänotyp nach dem *Coh1 knock down* wieder hergestellt werden sollte (*rescue*). Dafür wurden die shRNA für *Coh1* und das Überexpressionskonstrukt pCAG_IRES_EGFP_hCOH1 zusammen transfiziert. An DIV 3 wurden die Neurone mit 5 μ M Nocodazol für 2, 4, 6 und 8 h inkubiert. Die shRNA-vermittelte GFP-Expression ließ alle Neurite eines Neurons erkennen, sodass für die Analyse nur der längste Neurit betrachtet wurde. Für eine bessere Darstellung wurde das GFP-Signal invertiert und schwarz/weiß dargestellt (Abbildung 3.16 A, GFP). Auch die Färbung mit acetyliertem Tubulin wurde invertiert und in schwarz/weiß dargestellt (Abbildung 3.16 A, acTubulin). Die Signalausbreitung von acetyliertem Tubulin im längsten Neurit wurde je Zeitpunkt mit dem GFP-Signal verglichen. Nach 2 h Behandlung mit Nocodazol wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen *Coh1 knock down* und Kontrolle gefunden (Abbildung 3.16 B). Für beide Gruppen stimmte der Gehalt an acetyliertem Tubulin mit ca. 80 % mit dem GFP-Gehalt im längsten Neurit überein. Erst nach 4 h Nocodazol-Behandlung wurde erkennbar, dass die Menge an acetyliertem Tubulin für die Neurone der Kontrolle und des *rescue* mit hoch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) zu den *Coh1 knock down*-Neuronen abnahm. Für die *Coh1 knock down*-Neurone blieb die Verteilung von GFP und acetyliertem Tubulin im längsten Neurit gleich. Auch nach 6 h und 8 h wurde keine Abnahme des acetylierten Tubulin-Gehalts im längsten Neurit von *Coh1 knock down*-Neuronen festgestellt. Jedoch

konnte in den Kontrollneuronen und den Neuronen mit dem *rescue* für diese Zeitpunkte eine weitere Abnahme des acetylierten Tubulin-Gehaltes beobachtet werden. Der Unterschied zu den *Coh1 knock down*-Neuronen war für beide Gruppen an beiden Zeitpunkten hoch signifikant ($p < 0,001$, Abbildung 3.16 B). Nach 8 h Nocodazol-Behandlung wiesen die Kontroll- und *rescue*-Neurone eine Reduktion des acetyliertem Tubulin-Gehaltes um 40 % auf, wohingegen die *Coh1 knock down*-Neurone einen konstanten Gehalt um ca. 90 % zeigten. Diese Daten deuten darauf hin, dass auch in den kortikalen Neuronen nach einem *knock down* von *Coh1* hyperstabilisierte MT gebildet wurden.

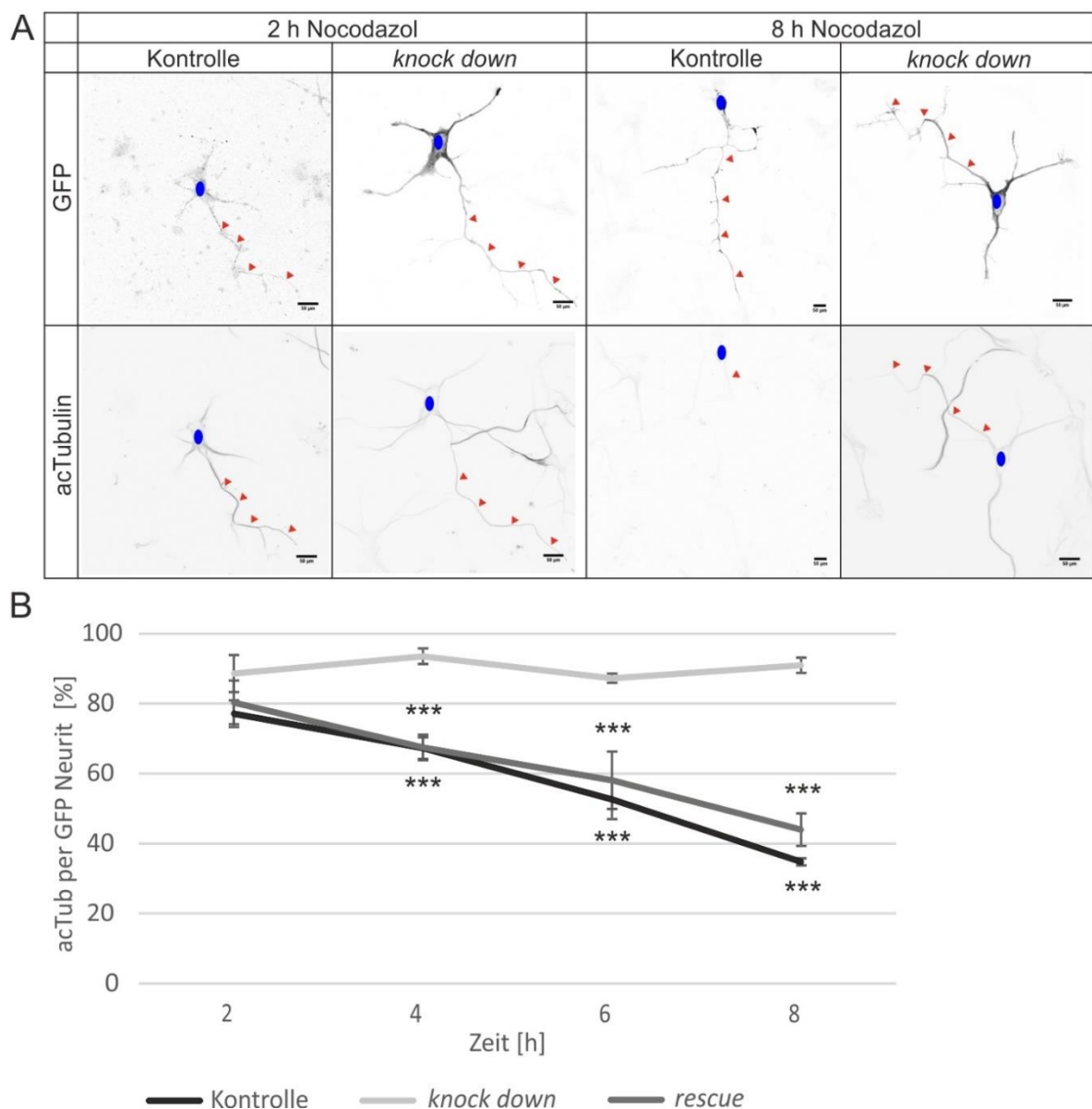


Abbildung 3.16: Die Wirkung von Nocodazol in kortikalen Neuronen

Die kortikalen Neurone wurden von Mausembryonen an E16,5 isoliert und auf mit Poly-D-Lysin-beschichteten Deckgläschen ausgesät. An DIV 1 wurden diese mit einem Kontrollkonstrukt (shRNA *luciferase*), einem *Coh1 knock down*-Konstrukt (shRNA #1) und einer Kombination von *Coh1 knock down* und einer Überexpression von humanem *COH1* (Transfektion mit

pCAG_IRES_EGFP_hCOH1) für den *rescue*-Versuch transfiziert. An DIV 3 wurden die Neurone mit 5 μ M Nocodazol versetzt und nach 2, 4, 6 und 8 h fixiert. Alle Neurone wurden mit acetyliertem Tubulin (acTub) und GFP gefärbt. A) Für eine bessere Darstellung wurden die Farben für GFP und acTub invertiert und schwarz/weiß dargestellt. Der Zellkern des jeweiligen Neurons wurde in blau markiert. Die roten Dreiecke weisen auf den längsten Neuriten hin, der für die Berechnung einbezogen wurde. Die 2 h Nocodazol-Behandlung zeigte noch keinen Unterschied in der Menge an acetyliertem Tubulin zwischen den Versuchsgruppen. Nach 8 h Nocodazol-Behandlung konnte für die GFP-gefärbten Neurite der Kontrollneuronen kaum noch acetyliertes Tubulin gesichtet werden. Dagegen blieben die GFP-gefärbten Neurite der *Coh1 knock down*-Neurone weiterhin mit acetyliertem Tubulin gefärbt. Die Bilder wurden mit dem TCS SP8 Laser Scanning Mikroskop aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m. B) Sowohl für die Kontroll- als auch für die *rescue*-Gruppe konnte über die Behandlungsdauer immer weniger intaktes acetyliertes Tubulin und nach 8 h eine Reduktion um ca. 40 % festgestellt werden. Die *Coh1 knock down*-Neurone zeigten über die komplette Behandlungsdauer eine gleichbleibende Menge an acetyliertem Tubulin. Sowohl für die Kontrollgruppe als auch für den *rescue* sind die Unterschiede verglichen zum *Coh1 knock down* für die Zeitpunkte 4 h, 6 h und 8 h hoch signifikant (***) = $p < 0,001$). Die Längenmessung der längsten Neurite mit GFP und acTub erfolgte mit Fiji. Für alle Werte wurden pro Zeitpunkt ein Mittelwert gebildet sowie die SD und der t-Test mit Microsoft Office Excel berechnet. Kontrolle: 2 h 77,1 % \pm 3,8; 4 h 67,2 % \pm 3,1; 6 h 52,6 % \pm 5,6; 8 h 34,8 % \pm 1; *Coh1 knock down*: 2 h 88,6 % \pm 5,3; 4 h 93,5 % \pm 2,2; 6 h 87,3 % \pm 1,4; 8 h 90,9 % \pm 2,2; *rescue*: 2 h 80,3 % \pm 6,2; 4 h 67,4 % \pm 3,6; 6 h 56,1 % \pm 8,2; 8 h 43,9 % \pm 4,6. (n>30, aus drei unabhängigen Experimenten)

Dynamik in Neuronen

Nachdem festgestellt wurde, dass die MT hyperstabilisiert sind und der längste Neurit verkürzt vorliegt, war es von Interesse, ob auch die Auswachsrate der Mikrotubuli (*velocity*) nach einem *Coh1 knock down* gestört ist. Das *capping*-Protein EB3 eignet sich besonders gut, um das Auswachsen von MT zu beobachten. Es befindet sich am Plusende der auswachsenden MT⁵⁹ und ist in der Echtzeitaufnahme als wandernder Punkt zu sehen, welcher im Folgenden als *comet* bezeichnet wird. Für das folgende Experiment wurde ein Konstrukt für ein Fusionsprotein von EB3 mit fluoreszierenden tdTomato zusammen mit den shRNA-Konstrukten gegen *luciferase* oder *Coh1* in primäre kortikale Neurone transfiziert. Außerdem wurde eine Versuchsreihe mit der Ko-Überexpression von *Coh1*-spezifischer shRNA (shRNA #1) und pCAG_IRES_EGFP_hCOH1 für einen *rescue* gestartet. An DIV 3 bis DIV 5 wurden die Neurone im *live cell imaging*-Verfahren mit Hilfe eines *Spinning Disc Laserscanning* Mikroskops mit einer Geschwindigkeit von einem Bild pro Sekunde aufgenommen. Die Verfolgung des *comet* wurde für die statistische Analyse mit dem MJTrack Programm von Fiji ausgewertet. Für die Berechnung wurden nur *comets* einbezogen, die länger als 10 s zu sehen waren. Für die Kontrollneurone wurde eine kontinuierliche Fortbewegung des *comet* festgestellt, wohingegen der *comet* für die *Coh1 knock down*-Neurone sich nur sehr langsam fortbewegte oder teilweise in seiner Bewegung stagnierte (Abbildung 3.17 A). Für die *Coh1 knock down*-Neurone wurde ein hoch signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrollneuronen bezüglich der *velocity* von

EB3 gemessen ($p < 0,001$, Abbildung 3.17 B). In der Versuchsreihe mit den *rescue*-Neuronen konnte der Phänotyp der Kontrolle wiederhergestellt werden. Sie wiesen einen hoch signifikanten Unterschied zu den *Coh1 knock down*-Neuronen auf ($p < 0,001$, Abbildung 3.17 B).

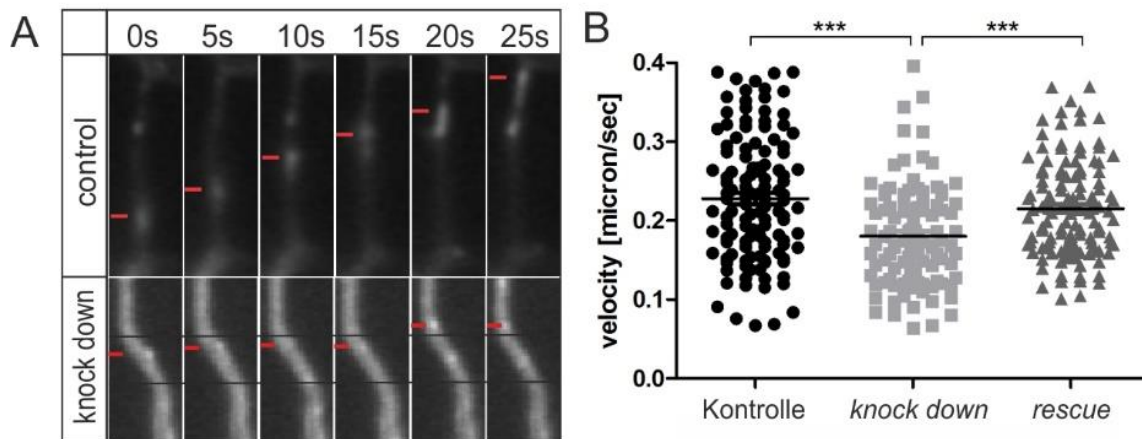


Abbildung 3.17: *Coh1* beeinflusst die *velocity* von Mikrotubuli in kortikalen Neuronen

A) Aufnahme der Fortbewegung der EB3 *comets* von kortikalen Neuronen an DIV 3 bis 5. Die Kontrolle zeigte eine kontinuierliche Fortbewegung über die Zeit, während die EB3 *comets* in den *Coh1 knock down*-Neuronen nur stockend vorankamen. Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Spinning Disc System CXU-S1 Mikroskop gemacht. B) Es wurde die Auswertung von über 130 gemessenen *comets* aus drei voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt. Sowohl die Kontrollgruppe als auch die des *rescues* unterscheiden sich hoch signifikant von der *velocity* der *Coh1 knock down*-Neurone. Ein Pixel stellt die durchschnittliche *velocity* eines *comets* dar. Die Auswertung erfolgte in Prism Graph Pad mit einer *one way*-ANOVA-Varianzanalyse und dem Tukey's Multiple Comparison-Test ($n > 130$, *** = $p < 0,001$). Mit Microsoft Office Excel wurden folgende Mittelwerte und SD berechnet: Kontrolle 201,22 $\mu\text{m/s} \pm 61,1$; *Coh1 knock down* 172,95 $\mu\text{m/s} \pm 54,1$; *rescue* 202,35 $\mu\text{m/s} \pm 69,8$.

3.5 Etablierung der *in utero*-Elektroporation mit shRNA

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die hergestellten shRNAs gegen *Coh1* sowohl in humanen HeLa-Zellen (shRNA #3) und in murinen N2A-Zellen (shRNA #1, #2, #3) als auch in *in vitro*-Kulturen von kortikalen Neuronen der Maus einen signifikanten *knock down* von *Coh1* erzielen. In *in vitro*-Kulturen von kortikalen Neuronen der Maus wurde nach *knock down* von *Coh1* (shRNA #3) ein verkürztes längstes Neurit und eine abweichende Orientierung des Golgi-Komplexes beobachtet. Darüber hinaus wurde *in vitro* in kortikalen Neuronenkulturen nach *Coh1 knock down* eine Hyperstabilisierung der MT und eine reduzierte EB3-Dynamik am Plusende der MT im Vergleich zu Kontrolltransfizierten Neuronen beobachtet.

Aufgrund des Fehlens eines geeigneten Tiermodells für das Cohen-Syndrom wurde für initiale *in vivo*-Analysen die *in utero*-Elektroporation von shRNA etabliert. Für die Versuchsreihe wurden zwei verschiedene Zeitpunkte für die Elektroporation gewählt.

Während der Entwicklung des Cortex werden zuerst die Neuronen der inneren Schicht gebildet und erst danach die Neuronen der äußeren Schichten⁹⁰. Daher wurden Mäuse am Embryonaltag 12,5 (E12,5) elektroporiert, um die Neuronen der inneren Schichten zu erreichen. Eine Elektroporation der Neuronen der äußeren Schichten des Cortex wurde an Embryonaltag 13,5 (E13,5) erzielt. Die Ausbildung der kortikalen Schichtung ist perinatal beendet¹³⁰. Für die Analyse der *in vivo*-Migration wurde die Entnahme und Fixierung an E17,5 vorgenommen.

3.5.1 Funktionstest der shRNA durch *in situ*-Hybridisierung

Zunächst wurden die *in utero* elektroporierten Mausgehirne auf die Effizienz des shRNA-vermittelten *knock down* von *Coh1* untersucht. Durch die gleichzeitige Expression von GFP im shRNA-Vektor wurde der elektroporierte Gewebeanteil vor der Fixierung im Fluoreszenzmikroskop lokalisiert. Für die Expressionsanalyse mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung und Darstellung des elektroporierten Gewebeanteils mittels Immunfluoreszenz wurden jeweils Kryo-Folgeschnitte angefertigt. Für die *in utero*-Elektroporation wurde die shRNA #1 verwendet. Zur besseren Erkennbarkeit der Verteilung von Zellen erfolgte die Lokalisierung der Kerne mit DAPI (blau). Der Vergleich der elektroporierten Gehirnhälfte (shRNA #1) mit der nicht elektroporierten Gehirnhälfte (Kontrollseite) ließ auf eine ähnliche Verteilung und Anzahl von Zellkernen schließen (Abbildung 3.18 A, blau). Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung wurde in der mit der *Coh1*-spezifischer shRNA elektroporierten Gehirnhälfte eine geringere Signalintensität trotz gleichbleibender Zellzahl im Vergleich zur nicht elektroporierten Gehirnhälfte (Kontrollseite) gefunden (Abbildung 3.18 A, oben). Damit kam es zu einer deutlichen Reduktion des Expressionslevels von *Coh1* durch die *in utero*-Elektroporation von shRNA #1. Der kortikale Gewebereich mit der reduzierten Expression an *Coh1* entspricht gleichzeitig dem Gewebereich, in welchem das zytosolisch vorliegende GFP-Signal in Neuronen detektierbar war (Abb. 3.18 B).

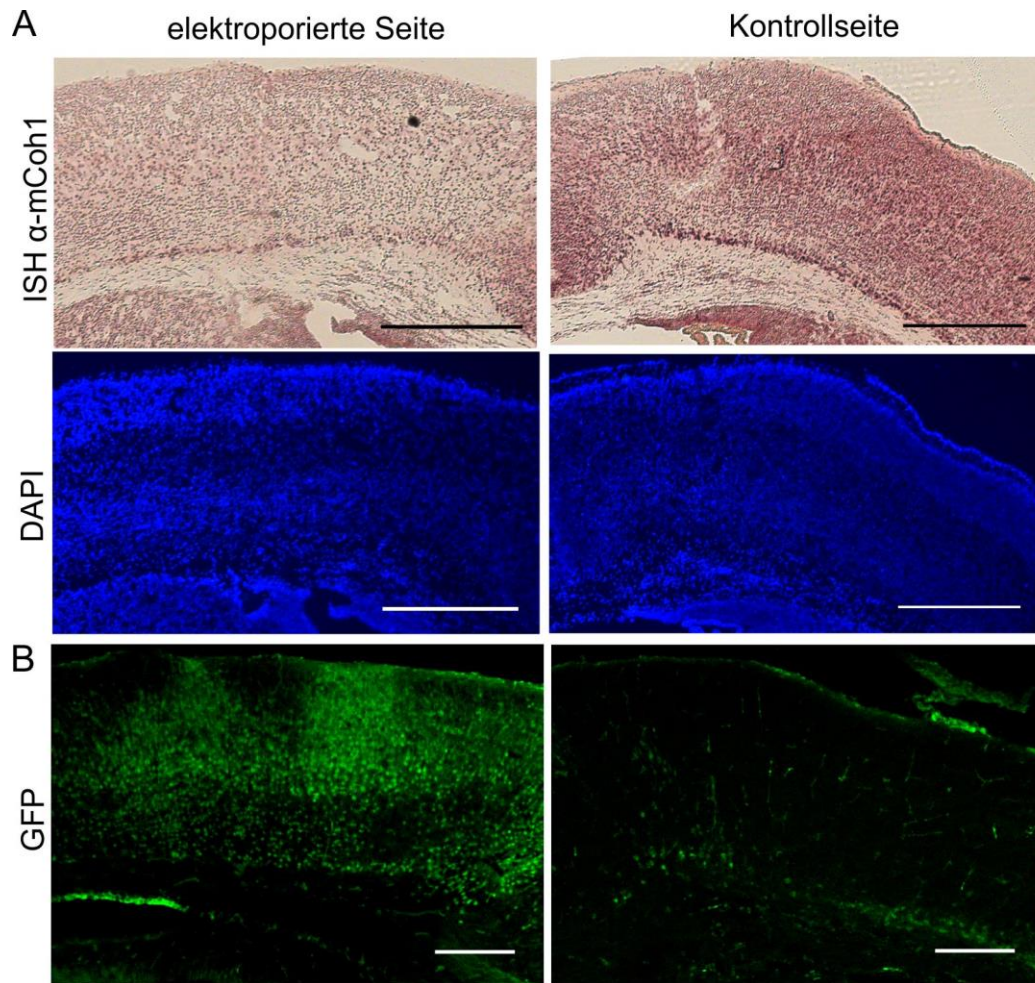


Abbildung 3.18: Analyse der Effizienz von *Coh1*-spezifischer shRNA in *in utero*-elektroporierten Cortices der Maus.

A) *In situ* Hybridisierung eines koronalen Kryoschnittes mit einer *Coh1*-spezifischen Sonde (oben). Die Kerne wurden zur besseren Vergleichbarkeit an demselben Kryoschnitt mit DAPI lokalisiert (unten, blau). Verglichen zu der Kontrollseite zeigte die elektroporierte Seite ein deutlich reduziertes Signal in der *in situ*-Hybridisierung bei gleichbleibender Anzahl an Zellkernen (blau). Die Aufnahmen wurden mit dem fluoreszenzfähigen DMRB Lichtmikroskop von Leica gemacht. Der Maßstabsbalken entspricht 400 μm . B) Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden Kryofolgeschnitte angefertigt. Für den Nachweis des GFP-Signals wurde die Eigenfluoreszenz mit einem anti-GFP-AK verstärkt. Die mit *Coh1*-spezifischer shRNA elektroporierte Gehirnhälfte (links) zeigte deutliche zytosolische GFP-Signale (grün) in den Neuronen. Dagegen waren in der nicht elektroporierten Gehirnhälfte (rechts) keine spezifischen Signale detektierbar. Die Aufnahmen wurden mit einem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5 Exciter (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) gemacht. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm .

3.6 Migrationsstudien

3.6.1 Migrationsverhalten *Coh1*-defizienter kortikaler Neurone nach *in utero*-Elektroporation von shRNA

Coh1 beeinflusst das Auswachsen des längsten Neuriten in hippocampalen Neuronen der Ratte¹⁶. Darüber hinaus ist auch eine veränderte Orientierung des Golgi-Komplexes bekannt¹¹. Für die radiale Migration von kortikalen Neuronen ist die Polarisierung der Zelle entscheidend⁸⁵. So richtet sich neben dem Zentrosomen auch der Golgi-Komplex in Richtung des Axons aus, welches den Migrationsprozess anführt¹³¹. Aufgrund dessen wurde der Einfluss eines Verlustes von *Coh1* auf die Migration von kortikalen Neuronen *in vivo* näher untersucht. Für die bessere Vergleichbarkeit wurden die Konstrukte für den *Coh1 knock down* (shRNA #1) und die Kontrolle (shRNA *luciferase*) exakt zum selben Zeitpunkt elektroporiert. Dafür wurden die zwei Kompartimente des Uteruskörpers, welche durch ein medianes Septum getrennt sind, genutzt. Die Embryonen, welche mit den beiden Konstrukten elektroporiert wurden, stammen somit aus einem Wurf. Zunächst sollte die Verteilung von *Coh1 knock down*-Neuronen und Kontrollneuronen in den Schichten des Cortex verglichen werden. Dafür wurden Aufnahmen der elektroporierten Cortex-Hemisphären gemacht und die Cortices in ihrer Breite, welche von der Pia mater bis zur SVZ definiert wurde, gemessen, um diese anschließend in zehn gleich große Bereiche aufteilen zu können. Dabei stellt der Bereich eins den äußersten und der Bereich zehn den innersten Teil des Cortex dar (Abbildung 3.19 A, rechte Seite). Diese Aufteilung ermöglichte eine Quantifizierung der Neurone bezüglich ihrer Verteilung innerhalb der Cortex-Schichten. Im Folgenden wurden die durch die Elektroporation transfizierten Neurone als GFP-markierte Neurone bezeichnet. Durch die Verwendung der shRNA-Konstrukte während der Elektroporation wiesen alle betroffenen Neurone eine GFP-Expression auf. Um eventuellen Verlust oder Abschwächung des GFP-Signals entgegen zu wirken, wurden die Schnitte nochmals mit einem GFP-AK nachgefärbt. Zunächst wurde die Verteilung für an E12,5 elektroporierten Tiere ausgewertet. Die Übersichtsaufnahmen beider zu vergleichender Gruppen deuten auf eine vermehrte Ansammlung der GFP-markierten Neurone in den unteren Cortex-Bereichen (Abbildung 3.19 A). Nach der Quantifizierung der einzelnen Bereiche von sieben verschiedenen *Coh1 knock down*-Gehirnen und zehn verschiedenen Kontrollgehirnen aus insgesamt vier verschiedenen Würfen wurden in den oberen Cortex-Bereichen eins bis fünf keine Unterschiede bezüglich der Verteilung der GFP-markierten Neurone festgestellt. Bei Betrachtung der Bereiche sechs bis zehn war zu

erkennen, dass sich die meisten *Coh1 knock down*-Neurone eher im Bereich sechs und sieben befanden. Das Maximum im sechsten Bereich unterschied sich signifikant von den Kontrollneuronen ($p < 0,05$). Dagegen befanden sich die meisten Kontrollneurone der unteren Bereiche bei sieben und acht mit einem Maximum im achten Bereich. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die *Coh1 knock down*-Neurone weiter außen in Richtung der oberen Schichten im Cortex ansammeln als die Kontrollneurone.

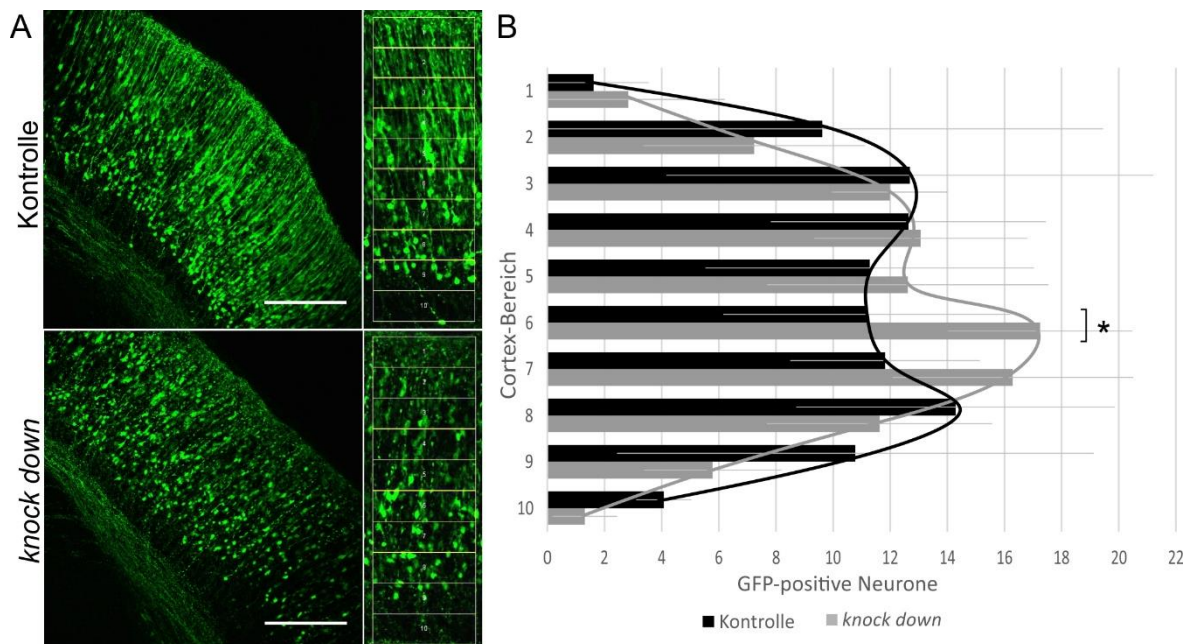


Abbildung 3.19: Migration der Neurone nach *in utero*-Elektroporation an E12,5

A) Die an E12,5 mit dem Kontrollkonstrukt (shRNA *luciferase*) und dem *Coh1 knock down*-Konstrukt (shRNA #1) elektroporierten Mausehirne wurden an E17,5 entnommen, fixiert und eingebettet. Für die Färbung wurden Kryoschnitte angefertigt und mit einem anti-GFP-AK nachgefärbt. Die zehn gleich großen Bereiche wurden mit Fiji erstellt und die darin enthaltenen Zellen mit dem CellCounter *plug-in* gezählt. Aufgenommen wurden die Bilder mit dem TCS SP8 Laser Scanning Mikroskop. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm . B) Dargestellt wurde die Anzahl GFP-markierter Neurone je Cortex-Bereich. Die Mittelwerte, die SD und der t-Test wurden mit Microsoft Office Excel berechnet. n (Kontrolle) = 10, n (*Coh1 knock down*) = 7. (* = $p < 0,05$)

Das gleiche experimentelle Setup wurde für die Darstellung von Neuronen genutzt, welche an E13,5 elektroporiert wurden. Quantitativ wurden elf Kontrollgehirne und 15 *Coh1 knock down*-Gehirne von insgesamt fünf verschiedenen Würfen ausgewertet. Die Übersichtsaufnahmen lassen auch hier auf eine Verschiebung der *Coh1 knock down*-Neurone in Richtung der oberen Cortex-Schichten vermuten (Abbildung 3.20 A). Die anschließende Quantifizierung ergab eine Verteilung der meisten Kontrollneurone in den Bereichen drei und vier, mit einem Maximum im dritten Bereich. Dagegen sammelten sich die meisten Neurone mit dem *Coh1 knock down* in den Bereichen zwei und drei an, mit einem Maximum im zweiten Bereich (Abbildung 3.20 B). Die erhöhte Anzahl an *Coh1*

knock down-Neuronen im zweiten Bereich unterschied sich sehr signifikant von den Kontrollneuronen ($p < 0,01$). Im ersten Bereich wurde ein hoch signifikanter Unterschied festgestellt ($p < 0,001$). Wie auch schon die Ergebnisse zur Verteilung der Neuronen im Cortex von einer Elektroporation bei E12,5 (Abbildung 3.19) zeigten, deuten auch diese Ergebnisse darauf hin, dass sich die *Coh1 knock down*-Neurone weiter außen in Richtung der oberen Schichten im Cortex ansammeln als die Kontrollneurone.

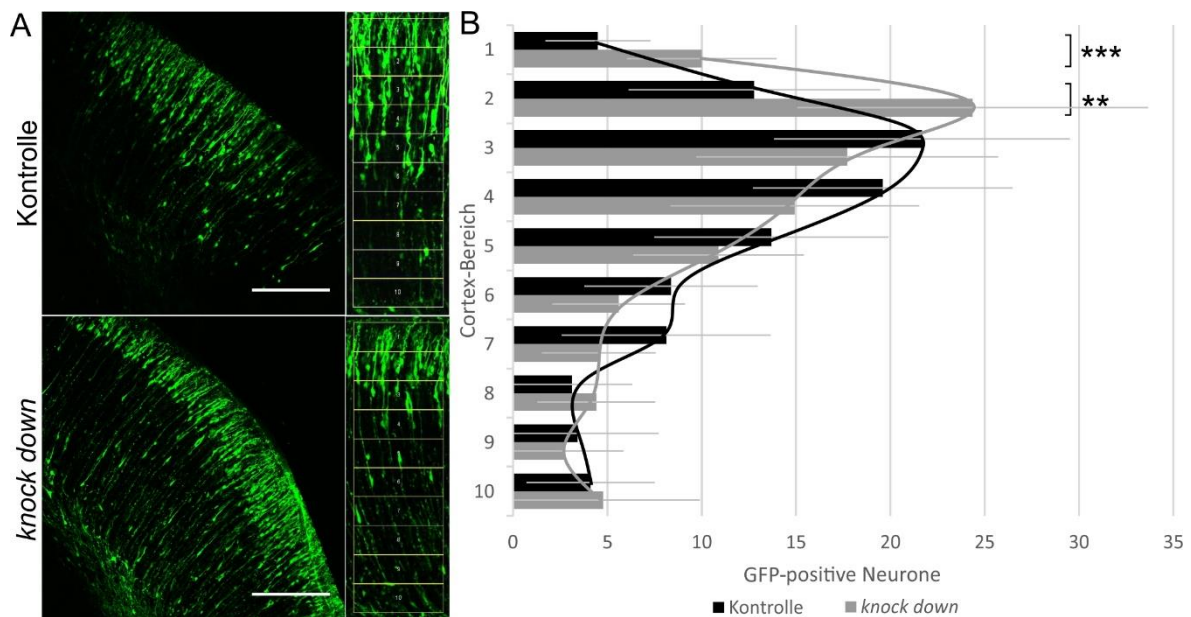


Abbildung 3.20: Migration der Neurone nach *in utero*-Elektroporation an E13,5

A) Die an E13,5 mit dem Kontrollkonstrukt (shRNA *luciferase*) und dem *Coh1 knock down*-Konstrukt (shRNA #1) elektroporierten Mausgehirne wurden an E17,5 entnommen, fixiert und eingebettet. Für die Färbung wurden Krysoschnitte angefertigt und mit einem anti-GFP-AK nachgefärbt. Aufgenommen wurden die Bilder mit dem TCS SP8 Laser Scanning Mikroskop. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm . Die zehn gleich großen Bereiche wurden mit Fiji erstellt und die darin enthaltenen Zellen mit dem CellCounter *plug-in* gezählt. B) Dargestellt wurde die Anzahl GFP-markierter Neurone je Cortex-Bereich. Die Mittelwerte, die SD und der t-Test wurden mit Microsoft Office Excel berechnet. n (Kontrolle) = 11, n (*Coh1 knock down*) = 15. (***) = $p < 0,001$; (**) = $p < 0,01$)

3.6.2 Einfluss auf die Anordnung der schichtspezifischen Marker *Cux1* und *Ctip2* nach einem *Coh1 knock down*

Bei der Verteilung der GFP-markierten Neurone wurde für die Elektroporation an E12,5 und E13,5 festgestellt, dass sich die meisten Neurone mit einem *Coh1 knock down* um bis zu zwei Bereiche weiter im äußeren Teil des Cortex ansammeln als die Kontrollneuronen (siehe 3.6.1). Um herauszufinden, ob die Anordnung der Schichten durch den *Coh1 knock down* verändert wurde, erfolgten weitere Immunfärbungen mit den Markern *Cux1* und *Ctip2*. *Cux1* markiert die Neurone der oberen kortikalen Schichten II und III. *Ctip2* dagegen markiert die Neurone der unteren kortikalen Schicht V. Durch die Färbung mit den schichtspezifischen

Markern konnte eine Definition der Cortex-Bereiche hinsichtlich ihrer Schicht-Zugehörigkeit erfolgen (Abbildung 3.21). Dafür wurde ein Ausschnitt einer mit dem Kontrollkonstrukt elektroporierten Cortex-Hemisphäre dargestellt, um die Einteilung der Schichten exemplarisch zu zeigen. Da alle Schnitte für die Analyse nur aus dem Motorkortex angefertigt wurden, kann die Schicht IV vernachlässigt werden, da sich diese hauptsächlich im visuellen und auditorischen Cortex befindet¹³². Der oberste erste Bereich stellt die Schicht I dar, auch bekannt als die Marginalzone (MZ). Er zeichnet sich durch das Fehlen von Pyramidenzellen aus. Der nachfolgende Bereich zwei und drei zeigt in der Abbildung die rot gefärbten Zellen als Cux1 positive Zellen. Diese markieren die Schichten II und III, welche sich auch durch kleine Körnchen-artige Pyramidenzellen auszeichnen. Die Schicht V mit ihren großen Pyramidenzellen ist in den Bereichen vier bis sechs markiert. Hier sind auch die durch Ctip2-markierten Zellen in blau zu erkennen. In den Bereichen sieben bis zehn schließt sich die Schicht VI mit vielen kleinen Pyramidenzellen oder andersartigen Zellen an. Mit der typischen Abgrenzung zur SVZ endet die Eingrenzung der Bereiche für den Cortex⁶³.

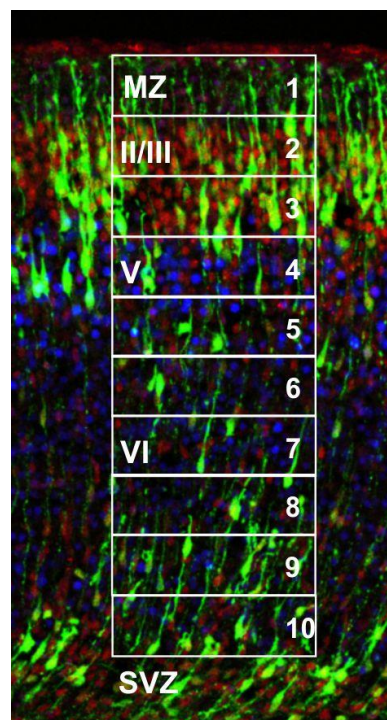


Abbildung 3.21: Zuordnung der Schichten zu den Aufteilungen des Cortex in zehn gleichgroße Bereiche

Dargestellt ist ein koronaler Schnitt einer Cortex-Hemisphäre, welche mit der shRNA gegen *luciferase* elektroporiert wurde. In grün sind die GFP-nachgefärbten Zellen zu sehen. Rot stellt die Cux1-positiven und blau die Ctip2-positiven Zellen dar. Hierbei wurde lediglich ein Kontrollgehirn dargestellt, um die normale Schichtung im Cortex sehen. Die Zahlen 1 bis 10 stellen die Bereiche dar, in welche der Cortex nach Abmessung seiner Breite eingeteilt wurde. MZ ist die Marginalzone oder auch bekannt als Schicht I. Die römischen Ziffern II bis VI stellen die bekannten Schichten des

Cortex dar. SVZ steht für die Subventrikularzone. Das Bild wurde mit einem TCS SP8 Laser Scanning Mikroskop aufgenommen.

Für die Auszählung wurden dieselben Einteilungen des Cortex verwendet wie für die Verteilung von GFP-markierten Neuronen unter Punkt 3.6.1. Für die Quantifizierung wurden die Schnitte, welche schon zur Auswertung der GFP-Verteilung dienten, gleichzeitig mit Cux1 und Ctip2 gefärbt. Zunächst wurde ein exemplarischer Schnitt eines Kontrollgehirns und eines Gehirns mit *Coh1 knock down* von an E12,5 elektroporierten Tieren betrachtet (Abbildung 3.22 A). Grün wurden die GFP-markierten Neurone dargestellt, welche durch Elektroporation an E12,5 vor allem die Schicht VI erreichen sollten. Da hier jedoch Vorläuferzellen elektroporiert wurden, lässt es sich nicht ausschließen, dass später teilweise noch Neurone der oberen Schichten gebildet werden⁸⁷. Rot wurde die Färbung für Cux1, welches die oberen Schichten II und III markiert und purpur wurde die Färbung für Ctip2, welches die Schicht V markiert, dargestellt. Beide Marker wiesen keine atypischen Veränderungen der Schichtung auf (Abbildung 3.22 A). Für die Quantifizierung von zehn Kontroll- und sieben *Coh1 knock down*-Cortices von insgesamt vier Würfeln wurden die GFP-markierten Neurone je Bereich auf eine Ko-Lokalisation mit Cux1 (Abbildung 3.22 B) oder Ctip2 (Abbildung 3.22 C) untersucht. Die Anordnung der Cux1-positiven Neurone ergab keine Unterschiede zwischen den *Coh1 knock down*-Gehirnen und den Kontrollgehirnen. Sowohl bei der Kontrolle als auch bei denen mit dem *Coh1 knock down*, waren die meisten GFP-markierten Neurone in den oberen Bereichen des Cortex positiv für Cux1. Einige Cux1-positive Neurone befanden sich für beide Versuchsgruppen noch in den unteren Bereichen des Cortex, welche aber bei Betrachtung der Gesamtzahl an GFP-markierten Neuronen (Abbildung 3.19 B) in diesen Bereichen sehr gering waren. Auch für die Ctip2-Verteilung gab es keine Abweichungen. Sowohl in den Kontroll- als auch in den *Coh1 knock down*-Cortices platzierten sich die meisten positiven Ctip2-Neurone in den unteren Bereichen, welche zum Teil auch der Ctip2-charakteristischen Schicht V entsprachen. Auch hier waren die Zahlen der Ctip2-positiven Neuronen, bei Betrachtung der Gesamtzahl an GFP-markierten Neuronen (Abbildung 3.19 B), in den oberen Bereichen sehr gering und traten für beide Versuchsgruppen gleichmäßig auf.

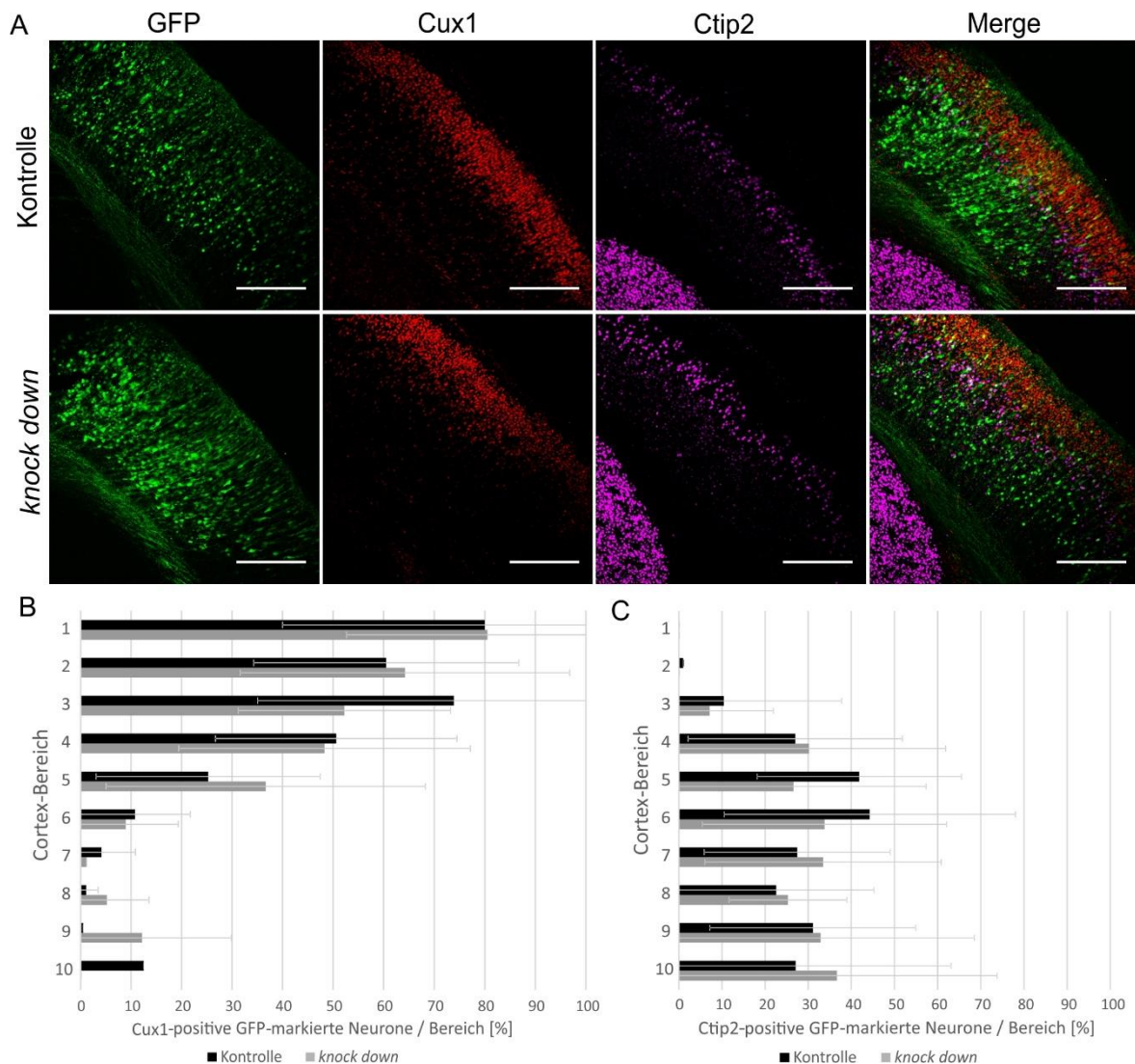


Abbildung 3.22: Verteilung von Cux1- und Ctip2-markierten GFP-positiven Neuronen nach in utero-Elektroporation an E12,5

A) Die Tiere wurden an E12,5 mit dem Kontrollkonstrukt (shRNA *luciferase*) und dem *Coh1 knock down*-Konstrukt (shRNA #1) elektroporiert und an E17,5 fixiert. Nach der Einbettung wurden Kryoschnitte angefertigt und für GFP (grün), Cux1 (rot) und Ctip2 (purpur) gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem TCS SP8 Laser Scanning Mikroskop gemacht. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μ m. B) Das Balkendiagramm stellt die Auszählung aller Cux1-gefärbten GFP-positiven Neurone dar. Die Auszählung erfolgte mit dem CellCounter *plug-in* in Fiji. Es wurde der prozentuale Anteil Cux1-markierter Neurone von der Anzahl GFP-markierter Neurone je Bereich und je Tier berechnet. Daraus wurden der Mittelwert, die SD und der t-Test mit Hilfe von Microsoft Office Excel berechnet. C) Das Balkendiagramm stellt die Auszählung aller Cux1-gefärbten GFP-positiven Neurone dar. Die Auszählung erfolgte mit dem CellCounter *plug-in* in Fiji. Es wurde der prozentuale Anteil Ctip2-markierter Neurone von der Anzahl GFP-markierter Neurone je Bereich und je Tier berechnet. Daraus wurden der Mittelwert, die SD und der t-Test mit Hilfe von Microsoft Office Excel berechnet. n (Kontrolle) = 10, n (*Coh1 knock down*) = 7.

Bei den Experimenten mit den Tieren, welche an E13,5 elektroporiert wurden, ist ein genereller Anstieg an Cux1-positiven Neuronen und eine Reduktion an Ctip2-positiven Neuronen zu erwarten. Das liegt daran, dass mit dem späteren Elektroporationszeitpunkt mehr Neurone elektroporiert wurden, welche bereits für die Bildung der oberen Schichten

markiert waren⁸⁷. Die immunhistochemische Färbung des exemplarischen Schnittes eines Kontroll- und eines *Coh1 knock down*-Gehirns mit GFP (grün), Cux1 (rot) und Ctip2 (purpurn) ergab hinsichtlich der schichtspezifischen Marker keine veränderte Anordnung der Schichten (Abbildung 3.23 A). Die Quantifizierung der Cux1-positiven Neurone, verglichen mit der Anzahl GFP-markierter Neurone für jeden Bereich, ergab für beide Versuchsgruppen die meisten Cux1-Markierungen in den höheren Cortex-Bereichen (siehe Abbildung 3.23 B). Die meisten *Coh1 knock down*-Neurone befanden sich im zweiten und dritten Bereich. Die Kontrollneurone dagegen befanden sich im dritten und vierten Bereich. Beide Versuchsgruppen zeigten ein Maximum im dritten Bereich, jedoch wurden keine signifikanten Unterschiede in den Cortex-Bereichen festgestellt. Auch für Ctip2 waren keine atypischen Muster zu erkennen. Die Auswertung (Abbildung 3.23 C) ergab, dass sich die GFP-positiven Neurone, welche Ctip2 markiert sind, sowohl in den Kontroll- als auch in den *Coh1 knock down*-Cortices in den vorherbestimmten Bereichen angeordnet haben. Insgesamt ist die Anzahl an Ctip2-positiven GFP-markierten Neurone für E13,5 sehr gering, ausgehend von der Gesamtzahl der GFP-positiven Zellen (Abbildung 3.20 B).

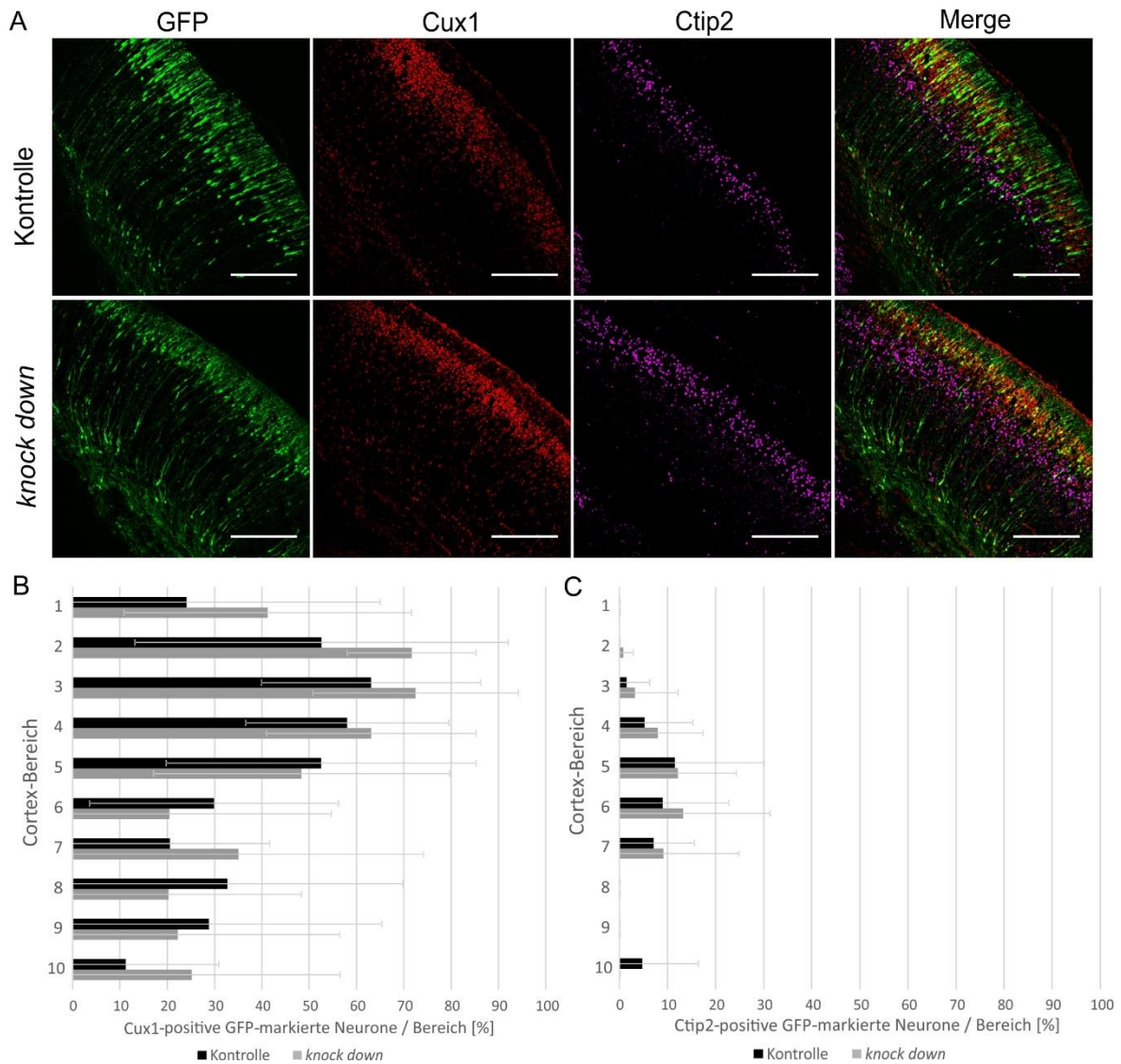


Abbildung 3.23: Verteilung von Cux1- und Ctip2-markierten GFP-positiven Neuronen nach *in utero*-Elektroporation an E13,5

A) Die Tiere wurden an E13,5 mit dem Kontrollkonstrukt (shRNA *luciferase*) und dem *Coh1 knock down*-Konstrukt (shRNA #1) elektroporiert und an E17,5 fixiert. Nach der Einbettung wurden Kryoschnitte angefertigt und mit GFP (grün), Cux1 (rot) und Ctip2 (purpurn) gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem TCS SP8 Laser Scanning Mikroskop gemacht. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm . B) Das Balkendiagramm stellt die Auszählung aller Cux1-gefärbten GFP-positiven Neurone dar. Die Auszählung erfolgte mit dem CellCounter *plug-in* in Fiji. Es wurde der prozentuale Anteil Cux1-markierter Neurone von der Anzahl GFP-markierter Neurone je Bereich und je Tier berechnet. Daraus wurden der Mittelwert, die SD und der t-Test mit Hilfe von Microsoft Office Excel berechnet. C) Das Balkendiagramm stellt die Auszählung aller Cux1-gefärbten GFP-positiven Neurone dar. Die Auszählung erfolgte mit dem CellCounter *plug-in* in Fiji. Es wurde der prozentuale Anteil Ctip2-markierter Neurone von der Anzahl GFP-markierter Neurone je Bereich und je Tier berechnet. Daraus wurden der Mittelwert, die SD und der t-Test mit Hilfe von Microsoft Office Excel berechnet. n (Kontrolle) = 11, n (*Coh1 knock down*) = 15.

3.6.3 Einfluss eines *Coh1 knock downs* auf die schichtspezifische Markierung in Neuronen

Die bisherigen Experimente zeigten einen signifikanten bis hoch signifikanten Unterschied bezüglich der Verteilung GFP-markierter Neurone in einigen Cortex-Bereichen bei der Elektroporation an E12,5 und E13,5 (Abbildung 3.19 B und 3.20 B). Die Cortex-Schichtung nach Elektroporation an E12,5 und E13,5 blieb jedoch erhalten (Abbildung 3.22 und 3.23). Es war nun von Interesse, ob mit der erhöhten Anzahl an GFP-markierten Neuronen von *Coh1 knock down*-Cortices von E12,5 in dem Bereich sechs auch vermehrt Ctip2-Markierungen zu finden sind. Oder ob für die an E13,5 elektroporierten *Coh1 knock down*-Cortices die erhöhten Zahlen an GFP-markierten Neuronen in den Bereichen eins und zwei eine erhöhte Ko-Lokalisation mit Cux1 mit sich bringen. Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die Cux1- und Ctip2-Verteilung - verglichen mit der Gesamtzahl an GFP-markierten Neuronen aller Bereiche - verhält. Bisher wurde diese Verteilung nur je Bereich untersucht. Die Quantifizierung ergab hier weder für die Ctip2-Verteilungen bei E12,5 (B) und E13,5 (D), noch für die Cux1-Verteilung bei E12,5 (A) einen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und *Coh1 knock down*-Neuronen (Abbildung 3.24). Bei der Verteilung der Cux1-positiven GFP-markierten Neurone von E13,5 elektroporierten Cortices wurde jedoch ein Unterschied festgestellt. Die meisten Cux1-positiven Kontrollneurone ordneten sich in den Bereichen zwei bis sechs an, wohingegen sich die meisten Cux1-positiven *Coh1 knock down*-Neurone in den Bereichen eins bis fünf befanden (Abbildung 3.24 C). Die maximale Anzahl an Cux1-positiven Neuronen lag bei 13 % für die Kontrollgruppe im dritten Bereich und bei 17 % für die *Coh1 knock down*-Gruppe im zweiten Bereich. Damit wurde das Maximum um einen Cortex-Bereich nach außen verschoben. Die erhöhte Anzahl der Cux1-positiven *Coh1 knock down*-Neurone ist in den Bereichen eins und zwei sehr signifikant ($p < 0,01$, Abbildung 3.24 C). Dagegen haben die Kontrollneuronen im sechsten Cortex-Bereich eine höhere Anzahl an Cux1-positiven Markierungen. Auch dieser Unterschied ist signifikant ($p < 0,05$, Abbildung 3.24 C). Insgesamt lag die Zahl der Cux1-Markierungen für die *Coh1 knock down*-Neurone aus allen Bereichen bei 54,64 %. Für die Kontrollneurone lag diese Gesamtzahl nur bei 46,76 %. Für den Zeitpunkt E12,5 wurden hinsichtlich der Cux1-Gesamtzahl keine großen Differenzen zwischen den Versuchsgruppen festgestellt (Kontrolle: 25,35 %, *Coh1 knock down*: 27,38 %). Auch für die zwei Zeitpunkte der Ctip2-Markierung wurden keine abweichenden Differenzen der Gesamtzahl an Ctip2-

positiven GFP-markierten Neuronen festgestellt (E12,5 - Kontrolle: 23,69 %, *Coh1 knock down*: 22,23 %; E13,5 - Kontrolle: 3,45 %, *Coh1 knock down*: 4,64 %).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die an E12,5 und E13,5 elektroporierten *Coh1 knock down*-Neurone in höhere Schichten migrieren als die Kontrollneurone, gleichzeitig jedoch ihre Markierung für die vorbestimmten Schichten (*cell fate*) beibehalten.

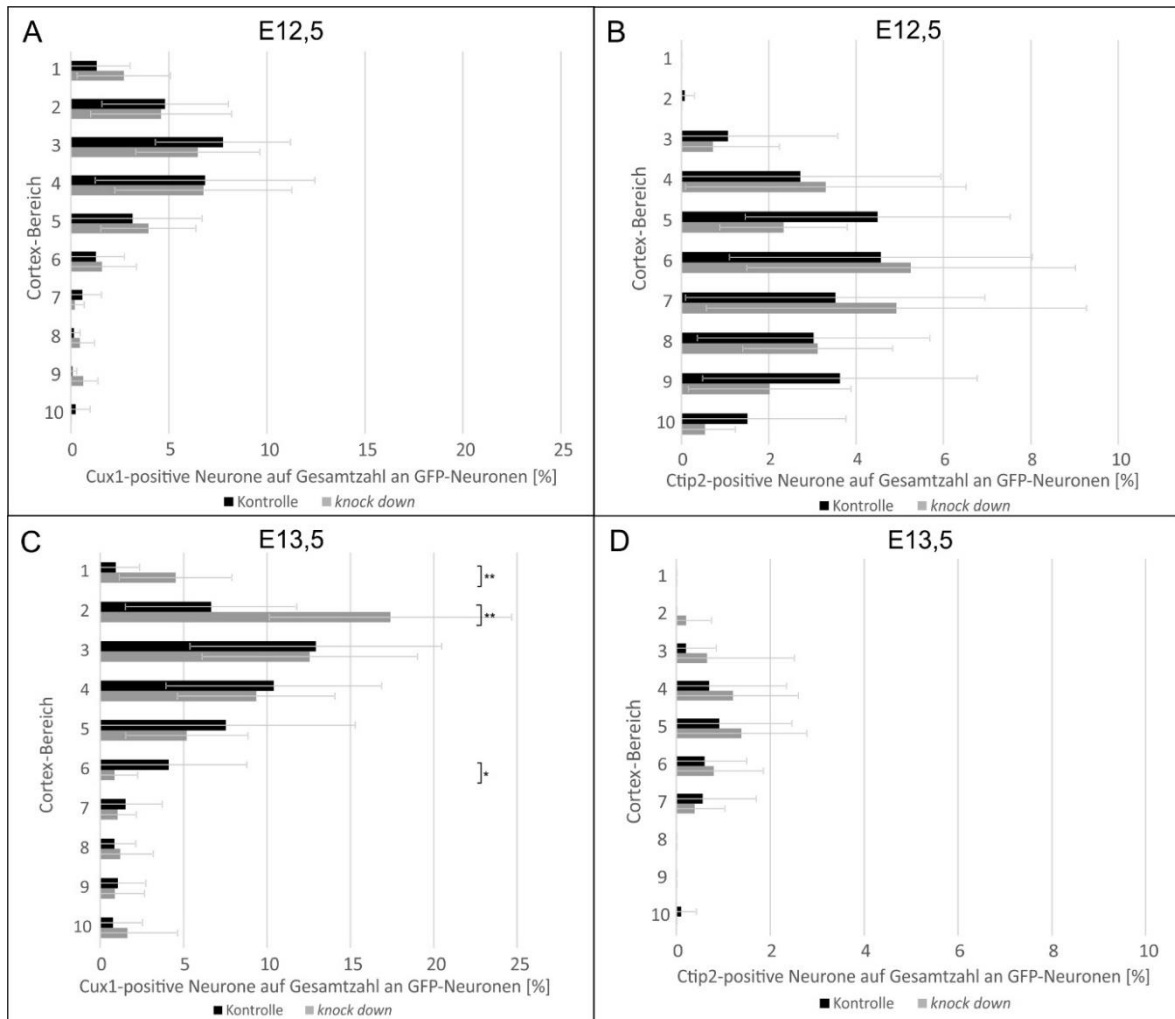


Abbildung 3.24: schichtspezifische Markierung nach *Coh1 knock down* bei Betrachtung der Gesamtzahl an GFP-markierten Neuronen

A-D) Die Balkendiagramme stellen die Auszählung aller Cux1-positiven GFP-markierten Neurone an E12,5 (A) und E13,5 (C) und aller Ctip1-positiven GFP-markierten Neurone an E12,5 (B) und E13,5 (D) dar. Die Auszählung erfolgte mit dem CellCounter *plug-in* in Fiji. Es wurde der prozentuale Anteil Cux1-/Ctip2-markierter Neurone von der Gesamtzahl an GFP-markierten Neuronen je Tier berechnet. Daraus wurden der Mittelwert, die SD und der t-Test mit Hilfe von Microsoft Office Excel berechnet. n (Kontrolle) = 11, n (*Coh1 knock down*) = 15. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

3.7 Axonales Wachstum in der Cortex-Entwicklung unter *Coh1 knock down*

3.7.1 Projektion der Axone zum Corpus callosum nach *Coh1 knock down*

Da die Cohen-Syndrom-Patienten ein normal großes bzw. verglichen zu ihrer Mikrozephalie vergrößertes CC haben⁶⁷, wurde auch bei den elektroporierten Tieren nach Veränderungen des CC geschaut. Untersucht wurde die Projektion der Axone einer Hemisphäre über das CC hin zur anderen Hemisphäre. Dafür wurden koronale Schnitte, welche das CC aufwiesen, zur Analyse mit einem anti-GFP-AK nachgefärbt und die Kerne mittels DAPI sichtbar gemacht. Die Elektroporationen an E12,5 ließen eine Projektion der Axone von der elektroporierten Region zum CC erkennen (Abbildung 3.25 A). Für die quantitative Analyse wurde die GFP-Intensität der gesamten elektroporierten Region und die an der *midline* des CC gemessenen GFP-Intensität gegenübergestellt. Die Prozentangaben sagen aus, wieviel GFP-Signal und damit wie viele Axone der elektroporierten Neuronen an der *midline* des CC ankommen. Es wurden insgesamt vier *Coh1 knock down*-Tiere und fünf Kontrolltiere ausgewertet. Pro Tier war die Auswertung des CC über mehrere Schnitte möglich. Die Quantifizierung ergab, dass für die Projektion zum CC zwischen den Kontrollneuronen und den *Coh1 knock down*-Neuronen keine signifikanten Unterschiede bestanden (Abbildung 3.25 B).

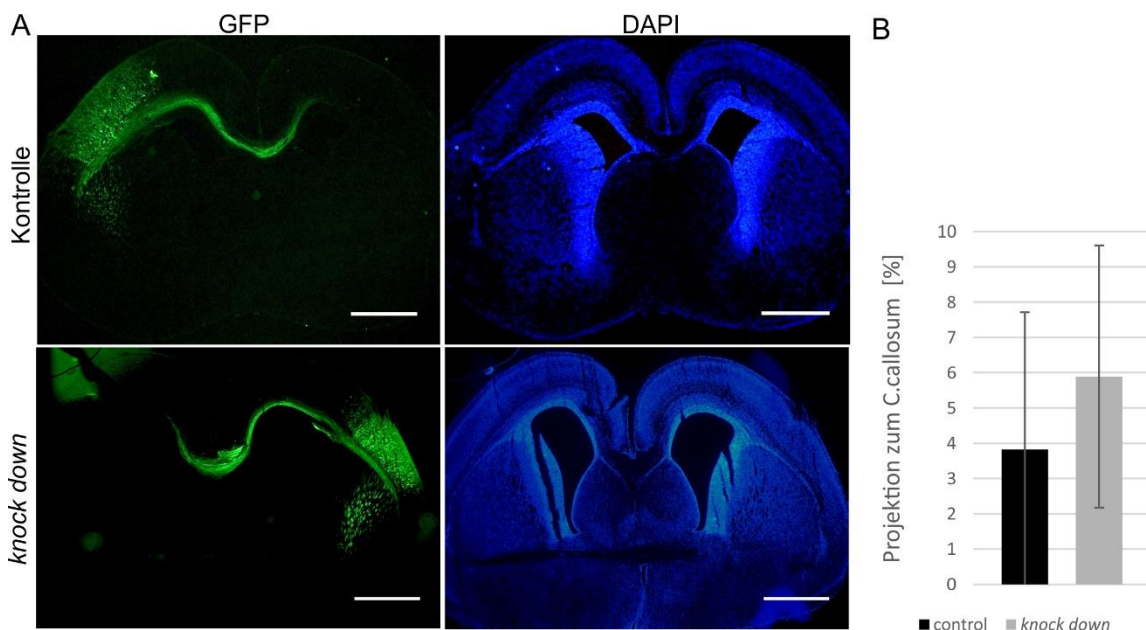


Abbildung 3.25: Projektion der GFP-markierten Axone zum Corpus callosum von E12,5-elektroporierten Tieren

A) Es wurden Tiere an E12,5 mit dem Kontroll (shRNA *luciferase*)- und dem *Coh1 knock down* (shRNA #1)-Konstrukt elektroporiert und an E17,5 fixiert. Nach der Einbettung wurden Kryoschnitte angefertigt und mit GFP und DAPI nachgefärbt. Beide Schnitte zeigten eine Projektion der Axone aus der elektroporierten Region hin zum CC. Die Aufnahmen wurden mit dem

fluoreszenzfähigem DMRB Lichtmikroskop von Leica gemacht. Der Maßstabsbalken entspricht 500 μm . B) Für die Auswertung wurden zehn Schnitte aus fünf verschiedenen Kontrolltieren und neun Schnitte aus vier verschiedenen *Coh1 knock down*-Tieren verwendet. Für alle wurden die GFP-Intensität der elektroporierten Region und die GFP-Intensität an der *midline* des CC miteinander verglichen. Als Programm wurde Fiji benutzt und die erhaltenen Daten in Microsoft Office Excel ausgewertet. Es wurden der Mittelwert und die SD berechnet. Kontrolle 3,82 % \pm 3,88; *Coh1 knock down* 5,89 % \pm 3,72. n (Kontrolle) = 5, n (*Coh1 knock down*) = 4.

Auch für an E13,5 elektroporierter Tiere wurden exemplarische Schnitte zweier vergleichbarer elektroporierter Regionen gegenübergestellt. Für beide Elektroporationen waren Axone erkennbar, die zum CC projizieren. Für die *Coh1 knock down*-Tiere wurde eine weniger starke Intensität an der *midline* wie bei den Kontrolltieren beobachtet (Abbildung 3.26 A). In die Auswertung wurden mehrere Schnitte pro Tier einbezogen. Die Quantifizierung von vier verschiedenen *Coh1 knock down*-Tieren und sechs Kontrolltieren ergab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Projektion zum CC (Abbildung 3.26 B).

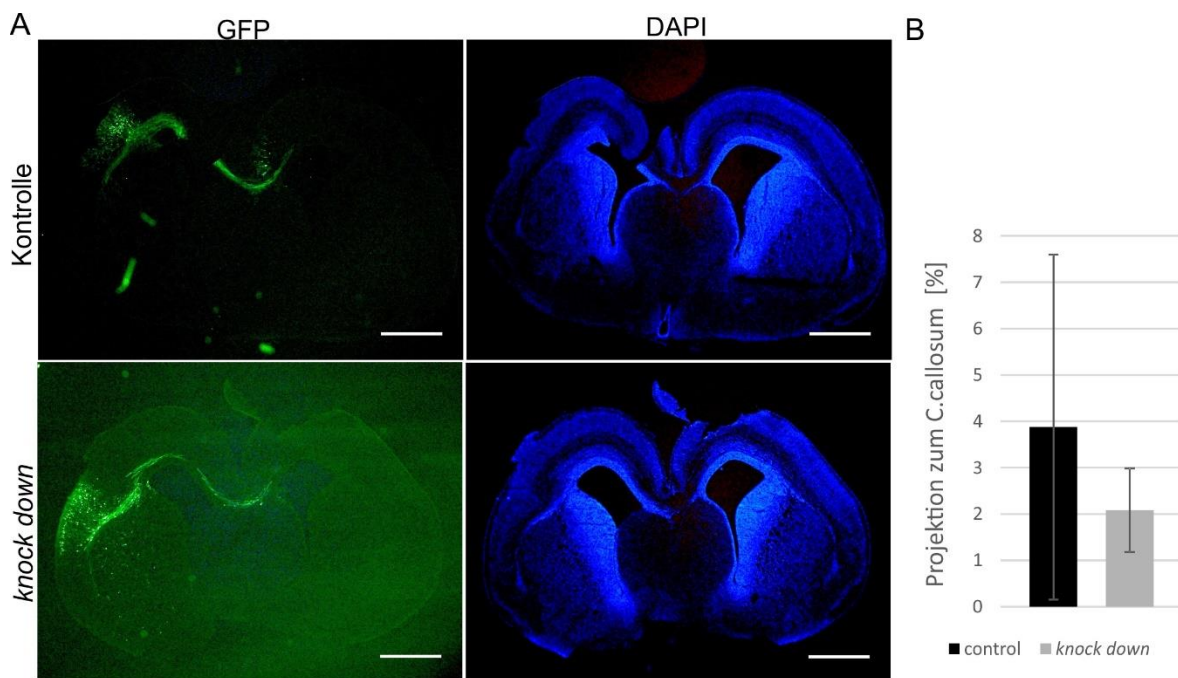


Abbildung 3.26: Projektion der GFP-markierten Axone zum Corpus callosum von E13,5-elektroporierten Tieren

A) Es wurden Tiere an E13,5 mit dem Kontroll- (shRNA *luciferase*) und dem *Coh1 knock down* (shRNA #1) Konstrukt elektroporiert und an E17,5 fixiert. Nach der Einbettung wurden Kryoschnitte angefertigt und mit GFP und DAPI nachgefärbt. Beide Schnitte zeigten eine Projektion der Axone aus der elektroporierten Region hin zum CC. Die Aufnahmen wurden mit dem fluoreszenzfähigem DMRB Lichtmikroskop von Leica gemacht. Der Maßstabsbalken entspricht 500 μm . B) Für die Auswertung wurden zehn Schnitte aus sechs verschiedenen Kontrolltieren und zehn Schnitte aus vier verschiedenen *Coh1 knock down*-Tieren verwendet. Für alle wurde die GFP-Intensität der elektroporierten Region und die GFP-Intensität an der *midline* des CC miteinander verglichen. Als Programm wurde Fiji benutzt und die erhaltenen Daten in Microsoft Office Excel ausgewertet. Es wurden der Mittelwert und die SD berechnet. Kontrolle 3,88 % \pm 3,7; *Coh1 knock down* 2,08 % \pm 0,9. n (Kontrolle) = 6, n (*Coh1 knock down*) = 4.

3.7.2 Der *Coh1 knock down* beeinflusst die Breite des Corpus callosums

Abschließend erfolgte die Betrachtung der Breite des CC an der *midline*. Dafür wurden die äußeren und inneren GFP-markierten Axone am CC zur Auswertung herangezogen, um zu sehen, wie weit sich der CC ausbreitet. Im Ergebnis wurden für die Elektroporationszeitpunkte E12,5 und E13,5 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und *Coh1 knock down*-Cortices festgestellt (Abbildung 3.27). Es ließ sich lediglich eine leichte Tendenz für ein breiteres CC für die *Coh1 knock down*-Tiere erkennen. Die an E12,5 elektroporierten *Coh1 knock down*-Tiere zeigten ein um durchschnittlich 20 μm breiteres CC als die Kontrolltiere. Auch bei den *Coh1 knock down*-Tieren, welche an E13,5 elektroporiert wurden, zeigte sich ein um etwa 10 μm breiteres CC im Vergleich zur Kontrolle.

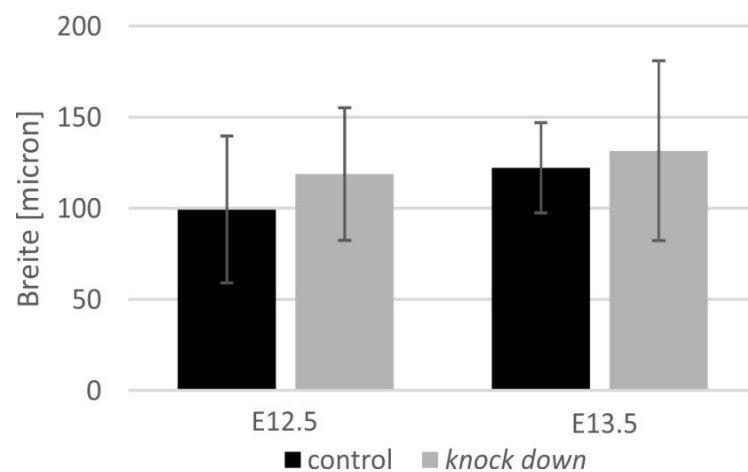


Abbildung 3.27: Quantifizierung der Dicke des Corpus callosum nach *Coh1 knock down*

Es wurden Tiere an E12,5 und E13,5 mit dem Kontroll- und dem *Coh1 knock down*-Konstrukt elektroporiert und an E17,5 fixiert. Nach der Einbettung wurden Kryoschnitte angefertigt und mit GFP und DAPI nachgefärbt. In der Auswertung wurden für E12,5 vier *knock down* Tiere und fünf Kontrolltiere und für E13,5 vier *knock down* Tiere und sechs Kontrolltiere berücksichtigt. Die Messung erfolgte mit dem Programm Fiji und von den erhaltenen Daten wurde in Microsoft Office Excel der Mittelwert und die SD berechnet. Werte für E12,5: Kontrolle 99,224 $\mu\text{m} \pm 40,33$; *Coh1 knock down* 118,69 $\mu\text{m} \pm 36,32$. Werte für E13,5: Kontrolle 122,25 $\mu\text{m} \pm 24,71$; *Coh1 knock down* 131,44 $\mu\text{m} \pm 49,3$. (E12,5: n (Kontrolle) = 5, n (*Coh1 knock down*) = 4; E13,5: n (Kontrolle) = 6, n (*Coh1 knock down*) = 4.)

4 Diskussion

Das Hauptaugenmerk des Cohen-Syndroms, welches durch Mutationen im Gen *COH1* hervorgerufen wird, ist die sich postnatal entwickelnde Mikrozephalie und nicht progrediente mentale Retardierung der Patienten. Die Betrachtung von MRT-Aufnahmen von Patienten mit Cohen-Syndrom zeigte neben der Mikrozephalie keine weitere bedeutsame makroskopische Veränderung. Lediglich das normal große bzw. im Verhältnis zur Mikrozephalie vergrößerte CC ist auffällig⁶⁷. Expressionsanalysen wiesen *Coh1* in postnatalen Neuronen der kortikalen Schichten II bis VI nach³. Das spricht für eine zentrale Rolle von *COH1* während der späten kortikalen Entwicklung. Das Gen codiert ein 3997 Aminosäuren langes Protein (~450 kDa), welches keine Homologien zu anderen Säugetieren aufweist. Bei Vergleichen mit der Hefe wurde herausgefunden, dass COH1 eins der vier VPS13-Proteine ist². Bisher konnte - wie bereits bei der Hefe - RAB6 als Interaktionspartner für COH1 identifiziert werden¹⁶. Grundlegend kann festgestellt werden, dass bei einem Fehlen von *COH1* der Golgi-Komplex fragmentiert ist. Da die intrazelluläre Funktion von COH1 bislang nicht näher beschrieben wurde, bleibt die genaue Ursache hierfür ungeklärt. Es wird vermutet, dass COH1 die Rolle eines Strukturproteins übernimmt und den Golgi-Komplex zusammenhält¹¹. In der vorliegenden Arbeit wurde die zellbiologische Funktion von COH1 mit besonderem Fokus auf die neuronale Entwicklung näher untersucht. Darüber hinaus wurde in einem abschließenden Versuch mittels Ko-Immunpräzipitation und Massenspektrometrie versucht, das molekulare Netzwerk von *COH1* zu entschlüsseln.

Nach Funktionsverlust von COH1 konnte bislang eine Fragmentierung des Golgi-Komplexes beobachtet werden¹¹. Ob jedoch die Fragmentierung, ähnlich der der GRASP55/65-Proteine²¹, direkt auf den Verlust von *COH1* zurückzuführen oder eine indirekte Folge weiterer Faktoren ist, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. So wird die Struktur des Golgi-Komplexes auch durch ein Zusammenspiel mit dem Zytoskelett beeinflusst. COH1 ist ein zytosolisches, peripheres Membranprotein¹¹. Aufgrund seiner Größe (~450 kDa) ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass COH1 verschiedene Proteine, welche für verschiedene intrazelluläre Vorgänge benötigt werden, wie z.B. auswachsende MT oder Faktoren für Fission und Fusion von Vesikeln, an die Golgi-Membran rekrutiert. Um die intrazelluläre Funktion von COH1 näher zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zunächst die Auswirkungen eines *COH1 knock downs* auf die tubulären Strukturen in der Zelle untersucht. Anschließend sollte die Rolle von *Coh1* für die kortikale Entwicklung

betrachtet werden. Hierfür wurden sowohl *in vitro*-Experimente mit primären Neuronen aus dem Cortex der Maus als auch ein *in vivo*-Modell etabliert. Mittels der *in vitro*-Experimente sollten die Golgi-Fragmentierung, das Auswachsen des längsten Neuriten, die Orientierung des Golgi-Komplexes und der Einfluss auf das Zytoskelett nach Verlust von *Coh1* auf kortikalen Neuronen untersucht werden. Als *in vivo*-Modell wurde die *in utero*-Elektroporation von *Coh1*-spezifischer shRNA etabliert. Dies war notwendig, da bis dato kein geeignetes Tiermodell (*knock out*) für das Cohen-Syndrom existiert. Mittels der *in utero*-Elektroporation von *Coh1*-spezifischer shRNA sollten die Migration der *knock down*-Neurone zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten und der Einfluss auf die Projektion zum CC untersucht werden. Zum Schluss erfolgte die Interpretation der phänotypischen Veränderungen mit molekularen Zusammenhängen. Hierfür werden potentielle Interaktionspartner von COH1, welche mit einer initialen massenspektrometrischen Analyse identifiziert wurden, auf ihren möglichen Einfluss auf die dargestellten Ergebnisse diskutiert.

4.1 Methodische Etablierungsarbeiten

Neben der Etablierung der Methoden im Allgemeinen war es insbesondere notwendig einen murinen *Coh1*-AK sowie *Coh1*-spezifische shRNAs zu etablieren.

4.1.1 Etablierung eines murinen COH1-AK

Da ein Großteil dieser Arbeit auf Zellen aus der Maus basiert, wurde ein Antikörper gegen das murine *Coh1* etabliert. Für die Arbeiten mit humanen Hek293- und HeLa-Zellen wurde der bereits etablierte COH1-AK von Seifert *et al.* verwendet⁷. Für einen murinen *Coh1*-AK wurden drei verschiedene Epitope aus dem *Coh1*-Protein an ein N-terminales GST fusioniert. Dabei handelte es sich um je ein Epitop am N-Terminus (N-COH1), im internen Teil (I-COH1) und am C-Terminus (C-COH1) des murinen *Coh1*. Aufgrund von 100 %-iger Sequenzhomologie war für den N-COH1-AK zu erwarten, dass er sowohl das humane COH1 als auch das murine *Coh1* erkennt. Da der N-Terminus aber für alle vier Varianten des VPS13-Proteins hoch konserviert ist⁶ und somit neben VPS13B auch VPS13A, VPS13C und VPS13D erkennen könnte, wurde für weitere Etablierungsarbeiten der COH1-AK gegen den internen Teil von *Coh1* verwendet. Dabei stellte sich heraus, dass der I-COH1-AK in der *immunoblot*-Analyse bei ~450 kDa eine spezifische Bindung und in der Immunfluoreszenz ein deutliches perinukleäres Signal zeigte. Es konnte festgestellt werden, dass der I-COH1-AK trotz geringer Sequenzunterschiede sowohl das humane COH1 als

auch das murine *Coh1* identifizieren konnte. Für die immunhistochemische Färbung auf murinen Gewebeschnitten konnte der I-COH1-AK bislang nicht etabliert werden. Die Ursache dafür kann an zu niedriger Sensitivität oder an fehlender methodischer Variabilität des AK liegen und bedarf weiterer Etablierungsarbeit. Der I-COH1-AK wurde in dieser Arbeit ausschließlich für die Detektion von *Coh1* in *in vitro*-Zellkulturen genutzt. Für Testung und Identifizierung von Zellen mit erfolgreichen *knock down* von *Coh1* nach shRNA-Behandlung wurden zusätzliche Methoden wie quantitative *real time*-PCR, *in situ*-Hybridisierung und Ko-Expression von GFP verwendet.

4.1.2 Etablierung einer funktionellen shRNA gegen *Coh1*

Bisher wurde der *knock down* von humanen *in vitro*-Kulturen mit verschiedenen *COH1*-spezifischen siRNAs durchgeführt. Es hatte sich besonders die siRNA #25721 (Position 147-165 bp) bewährt. Obwohl für diese siRNA eine Sequenzhomologie für das murine *Coh1* besteht und der *knock down* auch dafür etabliert werden konnte, ist die Benutzung von siRNA mit einigen Nachteilen behaftet. So kommt es nach Transfektion von siRNA schnell zu einer Ausdünnung und damit zu einem raschen Verlust des *knock down*. Darüber hinaus ist es nicht möglich, die damit transfizierten Zellen ohne Detektion mit einem geeigneten AK eindeutig zu identifizieren. Um beide Nachteile zu umgehen, wurde ein sogenanntes *small hairpin*-RNA-Konstrukt kloniert. Die Transfektion von Plasmiden hat die Vorteile, dass der erzielte *knock down* über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden kann und sich nur durch Zellteilung ausdünn. Außerdem kann bei der Bildung der shRNA die Expression von GFP zur Markierung gekoppelt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das pSUPER.retro.neo+GFP-Plasmid von Oligoengine als Grundgerüst für die Bildung der shRNA gewählt. Dieses erzielt einen dauerhaften *knock down* in teilungsunfähigen Neuronen, eine hohe Transkriptionsrate in der Maus durch einen H1-Promotor und eine gleichzeitige Expression von GFP durch einen PGK-Promotor, welche die Zelle als eindeutig transfiziert markiert. Es wurden fünf verschiedene shRNA-Sequenzen gewählt und auf ihre Effizienz hin getestet. Dabei ergab sich für alle shRNAs ein *knock down* von *Coh1*. Aufgrund der geringsten Varianz und einer Reduktion der *Coh1*-Expression auf 30 % Restniveau wurde für alle folgenden Experimente mit murinen Zellen oder Geweben die shRNA #1 gewählt. Für den im Vergleich zur siRNA stabileren *knock down* von *COH1* wurde aufgrund ihrer Sequenzhomologie für weitere Experimente in humanen Zellkulturen die shRNA #3 gewählt, welche der siRNA #25721 entspricht.

4.2 Einfluss von *COH1 knock down* auf zelluläre Strukturen und Funktionen

4.2.1 Der Einfluss von *COH1* auf die Ausbildung stabiler Mikrotubuli

Wie diese Arbeit nochmals gezeigt hat, liegt der Golgi-Komplex bei fehlendem *COH1* fragmentiert vor. Daher wurde *COH1* als Strukturprotein deklariert, welches daran beteiligt ist, den Golgi-Komplex aufrechtzuerhalten¹¹. Natürlich vorkommende Fragmentierungen des Golgi-Komplexes gibt es beispielsweise bei der Mitose oder der Apoptose¹³³. Außerdem kann der Golgi-Komplex durch medikamentöse Behandlung mit Nocodazol¹³⁴ oder Brefeldin-A¹³⁵ und bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel bei der Alzheimer-Erkrankung¹³⁶, fragmentieren. Auch durch Modifikationen am Zytoskelett kann es zu einer Veränderung des Golgi-Komplexes kommen. So wird dieser zum Beispiel durch eine Depolymerisierung des Aktins kompakter¹³⁷, wohingegen es durch eine Depolymerisierung der MT zu einer Fragmentierung kommt¹³⁸. Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob der *COH1 knock down* ausschließlich eine Fragmentierung des Golgi-Komplexes auslöst oder ob gleichzeitig eine Veränderung des Zytoskeletts vorliegt. Bei Färbungen mit dem MT-Marker β -Tubulin in HeLa-Zellen mit *COH knock down* wurde mit dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass die Anordnung der Tubulinstränge verändert war. In Zellen ohne *knock down* lagen die MT in einem verzweigten Netzwerk vor. In Zellen mit *Coh1 knock down* gingen diese dagegen sternförmig von der Zellmitte (Zentrosomen) aus und liefen gebündelt zur Zellmembran hin. In der Literatur ist beschrieben, dass eine Golgi-Fragmentierung, wie z.B. durch Behandlung mit Nocodazol, mit MT-Depolymerisierung assoziiert ist²³. Der subzelluläre Phänotyp nach *COH1 knock down* deutet dagegen eher auf eine verstärkte Polymerisierung der MT hin. Posttranslationale Modifizierungen an Tubulinen können zu einer Stabilisierung der polymerisierten MT führen. So werden MT am Spindelapparat während der Mitose stabilisiert, indem ihre α -Untereinheit detyrosiniert wird⁴⁷. Bei Neuronen sind die α -Tubuline der MT im längsten Neuriten acetyliert, was ebenfalls zu einer Stabilisierung führt, welche für die Ausbildung des Axons nötig ist⁴⁸. Mit dieser Arbeit in den *COH1 knock down*-Zellen vermehrt acetyliertes Tubulin gefunden, was für eine gesteigerte Stabilisierung der MT spricht. Ist es also möglich, dass nicht nur eine Depolymerisierung von MT zu einer Golgi-Fragmentierung führt, sondern auch eine Hyperstabilisierung? Auf eine mögliche Hyperstabilisierung des MT-Netzwerkes durch einen *COH1 knock down* wird im Kapitel 4.3 eingegangen. Es wurde bereits gezeigt, dass stabiles Tubulin weniger dynamisch ist¹³⁹. Das könnte ein Indiz dafür sein, warum der Golgi-Komplex fragmentiert vorliegt. Durch die fehlende Dynamik werden die Golgi-Strukturen

auseinandergezogen und kommen nicht mehr in ihre ursprüngliche Formatierung zurück. Die eigentliche Ursache dafür kann aber noch nicht bestimmt werden. Es kann genauso möglich sein, dass sich das Zytoskelett aufgrund eines fragmentierten Golgi-Komplexes stabilisiert, um diesen noch zu einem kleinen funktionellen Teil zusammenhalten zu können.

4.2.2 Der Einfluss von *COH1* auf die Mikrotubuli-Nukleation

Ein weiterer interessanter Fakt ist, dass MT, welche an Golgi-assoziierten MTOC auswachsen, schneller acetyliert werden⁵¹. Darauf basierend wurde in dieser Arbeit das Auswachsen von MT an den MTOC in *COH1 knock down*-HeLa-Zellen untersucht. Interessanterweise wurden bei den *COH1 knock down*-Zellen keine Golgi-assoziierten MTOC beobachtet. Auch bei Zellen mit einer partiellen Deletion von *AKAP450* am Golgi-Komplex wurden ausschließlich zentrosomale MTOC beobachtet. Hier lag im Gegensatz zu *COH1* der Golgi-Komplex kompakter vor und es wurden weniger stabilisierte MT gebildet^{57,58}. Dies lässt eine Rolle von *COH1* für die Organisation der MT am Golgi-Komplex, insbesondere bei der Rekrutierung des γ -TuRC, der Nukleation, der Polymerisation oder der Regulation der Stabilisierung vermuten. Da bei einem *COH1 knock down* - im Gegensatz zu *AKAP450 knock down* - der Golgi-Komplex fragmentiert vorliegt und die MT vermehrt stabilisiert sind, ist eher von einer nicht-analogen Funktion auszugehen. Bei den zu dieser Arbeit durchgeführten Experimenten war zu beobachten, dass sich die MT generell in den *COH1 knock down*-Zellen nach einer Stunde bei 4 °C aufgrund ihrer vermehrten Stabilisierung weniger stark zurückgebildet haben wie bei den Kontrollzellen. Nach Erwärmen der Zellen auf RT für zwei Minuten blieben die bestehenden wie auch die neu ausgewachsenen α -Tubulin-positiven Strukturen ausschließlich zentrosomal. Bei den Kontrollzellen bildeten dagegen ebenso zentrosomal-auswachsende wie auch viele azentrosomal-auswachsende MT aus. Das Zentrosom wurde also in den *COH1 knock down*-Zellen durch die Behandlung mit 4 °C nicht beeinflusst. Bei den Kontrollzellen war nach Färbung von *AKAP450* sowohl das intensiv gefärbte Zentrosom als auch der schwächer markierte Golgi-Komplex erkennbar. Bei den *COH1 knock down*-Zellen war ausschließlich das Zentrosom markiert. Zusammenfassend konnte für den Verlust von *COH1* eine Hyperstabilisierung der vermutlich zentrosomalen MT und ein Verlust von Golgi-assoziierten MT gefunden werden. In der Literatur wurde bislang kein direkter Zusammenhang zwischen diesen beiden Aspekten beschrieben. Ein Verlust der Golgi-assoziierten MT-Nukleation wurde aber bei der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) gefunden. ALS kann durch Mutation unterschiedlichster Gene verursacht werden. Alle

Mutationen führen zu einer Fragmentierung des Golgi-Komplexes wie bei dem Verlust nach *COH1*¹⁴⁰. Für defekte MT oder einen defekten MT-abhängigen Transport sind beispielweise Mutationen in *SOD1*, *Dynein/Dynaktin* oder *BICD2* verantwortlich. Dynein/ Dynaktin und *BICD2* vermitteln den Vesikel-Transport über RAB6 entlang der MT¹⁴¹. Eine Deletion führt zu unstabilen MT mit weniger acetyliertem Tubulin. Außerdem wird *Stathin 1*, welches Golgi-assoziierte MT depolymerisiert, sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene hochreguliert¹⁴²⁻¹⁴⁴. Eine Mutation im *tubulin-binding cofactor E (TBCE)*-Gen zeigt neben der Golgi-Fragmentierung ebenfalls einen Verlust der Golgi-assoziierten MT-Nukleation, eine gehemmte MT-Polymerisierung und eine verminderte Vesikel-Fusion am Golgi-Komplex¹⁴⁵. Es ist jedoch nicht bekannt, ob dieser Verlust der Golgi-assoziierten MT-Nukleation nach Deletion von *TBCE* zu einer vermehrten Stabilisierung der zentrosomalen MT führt, wie es in dieser Arbeit für den Verlust von *COH1* beobachtet wurde. Für *COH1* ist die Hyperstabilisierung der zentrosomalen MT vermutlich eine Folge des Verlustes der Golgi-assoziierten MT und trägt zur Aufrechterhaltung MT-assoziiierter intrazellulärer Vorgänge bei.

4.3 Die Rolle von *Coh1* in kortikalen Neuronen

4.3.1 Der *Coh1 knock down* verzögert das Auswachsen des längsten Neuriten

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle von *Coh1* in primären kortikalen Neuronen der Maus. Die Transfektion der Neurone erfolgte so früh wie möglich, um den *Coh1 knock down* noch im zweiten Entwicklungsstadium (DIV 1-2) vor der Initiierung des Axons (DIV 2-4) zu induzieren¹⁴⁶. Dabei zeigten die *Coh1 knock down*-Neuronen einen durchschnittlich um die Hälfte reduzierten längsten Neurit im Vergleich zu den Kontrollneuronen. Auch für hippocampale Neurone aus der Ratte konnte bereits gezeigt werden, dass der *knock down* von *Coh1* in einem verkürzten längsten Neurit resultiert¹⁶. Außerdem wurde herausgefunden, dass *Coh1* die Orientierung des Golgi-Komplexes beeinflusst. Dieser befindet sich normalerweise in Richtung zum auswachsenden Axon. Nach *Coh1 knock down* wurde der Golgi-Komplex jedoch zu 25 % weniger oft am längsten Neurit gefunden. In einer anderen Arbeit konnte dieser Fakt schon für hippocampale Neurone der Ratte beschrieben werden¹⁶. Für beide beobachteten Veränderungen in *Coh1 knock down*-Neuronen konnte der ursprüngliche Zustand mit einem *rescue*-Versuch durch eine Überexpression eines humanen *COH1*-Konstruktes wiederhergestellt werden. Dies bestätigte, dass es sich bei dem *knock down* nicht um unspezifische Effekte handelt und

spricht für eine hohe Spezifität der shRNA gegen *Coh1* in kortikalen Neuronen. Da der Golgi-Komplex ein wichtiges Instrument für die Polarisierung von Neuronen ist¹²⁷, kann es möglich sein, dass die Fehlorientierung des Golgi-Komplexes in *Coh1 knock down*-Neuronen den Prozess der Axon-Initiierung verzögert und die Neurone daher einen verkürzten längsten Neurit aufweisen. Ein weiterer Hinweis, warum der längste Neurit in *Coh1 knock down*-Neuronen reduziert ist, könnte die vermehrte Stabilisierung von MT liefern. Diese Hyperstabilisierung konnte mit dieser Arbeit bereits für HeLa-Zellen immunzytochemisch sowie proteinbiochemisch bestätigt werden. In anderen Arbeiten mit Neuronen wurde gezeigt, dass sowohl die induzierte Hyperstabilisierung mit Taxol als auch die Depolymerisierung mit Nocodazol zu einem verringerten Auswachsen der MT führt^{147,148}. In dieser Arbeit wurde nach *COH1 knock down* auch ein Verlust der Golgi-assoziierten MTOC beobachtet. Es ist noch nicht ganz klar, inwieweit die zentrosomalen und nicht-zentrosomalen MT für die Axon-Initiierung eine Rolle spielen. Es wurde jedoch gezeigt, dass eine Entfernung des Zentrosoms, welches in jungen Neuronen auch als MTOC agiert, keinen Effekt auf das Axonwachstum hat^{149,150}. Das spricht dafür, dass nicht-zentrosomale MT an der Axon-Initiierung beteiligt sein könnten, weshalb auch nach einem *Coh1 knock down* der längste Neurit verkürzt vorliegt.

4.3.2 Der *Coh1 knock down* führt zu einer Hyperstabilisierung von Mikrotubuli

Da besonders die Axone von Neuronen aus stabilisierten MT bestehen⁴⁸, wurde in dieser Arbeit ein Experiment angewendet, welches den Grad der Stabilisierung nach *Coh1 knock down* verdeutlichen soll. Die Behandlung mit Nocodazol führt zur Depolymerisierung der Tubulin-Untereinheiten und somit zum Abbau der nicht stabilisierten MT¹⁰⁶. Die ersten signifikanten Unterschiede wurden nach 4 h festgestellt. Hier wurden die längsten Neurite von Kontrollneuronen durchschnittlich nur noch mit einem 67 %-igen Anteil an acetyliertem Tubulin vorgefunden. Dagegen zeigten die Neurone mit einem *Coh1 knock down* einen 93 %-igen Anteil an acetyliertem Tubulin. Diese Beobachtungen setzten sich bis zu einem Zeitpunkt von 8 h fort. Nach 8 h liegt der Anteil von acetyliertem Tubulin bei den Kontrollneuronen sogar nur noch bei 35 %. Das bedeutet, dass der *Coh1 knock down* auch in Neuronen eine verstärkte Stabilisierung von MT bewirkt. Die Spezifität der *Coh1*-spezifischen shRNA konnte durch einen *rescue*-Versuch bestätigt werden. Die Neurone mit dem *rescue* zeigten wie die Kontrollneurone über 8 h Behandlung mit Nocodazol eine stetige Abnahme des acetylierten Tubulin-Gehalts in den längsten Neuriten. Die Hyperstabilisierung von MT könnte dazu führen, dass diese auch weniger dynamisch sind,

was wiederum in den *Coh1 knock down*-Neuronen zu einem reduzierten längsten Neurit führt¹⁴⁷.

4.3.3 Der *Coh1 knock down* reduziert die Mikrotubuli-Dynamiken

Um die MT-Dynamiken in den auswachsenden Neuriten zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit die EB3 *velocity* gemessen. EB3 ist ein *capping*-Protein, welches am oberen Aufbau der Tubulineinheiten beteiligt ist und markiert somit das auswachsende Ende eines MT. Dabei wurde eine signifikante Reduktion der Dynamik von EB3 *comets* in *Coh1 knock down*-Neuronen festgestellt. Auch für diesen Versuch konnte nach gleichzeitiger Überexpression und *knock down* von *Coh1* die ursprüngliche EB3 *velocity* wiederhergestellt werden. Es wurde bereits beschrieben, dass der Stabilisierungsgrad von MT mit der *velocity* einhergeht. So führte die Hyperstabilisierung von MT mittels Taxol in *Xenopus leavis* zu einer reduzierten EB3 *velocity*¹³⁹. Es wurde außerdem in Muskelzellen beobachtet, dass *vice versa* der EB3 *knock down* zu einer bis zu 70 % reduzierten Depolymerisierung von MT führt⁶¹. Bei der Behandlung mit hohen Dosen Taxol wurde festgestellt, dass die Dynamik der MT im Wachstumskegel völlig eingestellt wurde und sowohl das Axon als auch die Neurite nicht weiter auswachsen konnten^{106,116,148}. Außerdem konnte unter hyperstabilisierten Bedingungen gezeigt werden, dass die Durchmesser des Axons und des Wachstumskegels vergrößert sind und dass das Auswachsen des längsten Neurit reduziert ist^{151,152}. Die Hyperstabilisierung, welche nach dem Verlust von *Coh1* beobachtet wurde, könnte also der Auslöser sowohl für einen verkürzten längsten Neuriten als auch für die reduzierte EB3 *velocity* sein. Ein weiterer Zusammenhang zu einer gestörten *velocity* von EB3 kann hier über Myomegalin 8 (MMG 8) gezogen werden. MMG8 bindet über das Bindemotiv SxIP an EB1/EB3 und zeigt nach dessen Deletion in RPE1-Zellen eine Ablösung von EB1 vom Golgi-Komplex sowie ein gestörtes *trafficking*. Interessanterweise zeigt die Deletion von *MMG8*, wie auch nach dem *knock down* von *COH1*, einen Verlust der Golgi-assoziierten MT-Nukleation⁶².

MT-Dynamiken sind besonders bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson oder ALS verändert^{153,154}. Durch eine Hyperstabilisierung von MT kommt es zu einer Degeneration der Axone, da der axonale Transport gestört ist¹⁵⁵. Besonders in den sich zu entwickelnden Neuronen sind die dynamischen MT unerlässlich für eine reibungslose Signalübertragung. Sind die MT hyperstabilisiert, wird das Auswachsen und Verzweigen von Neuronen gehemmt¹⁵⁶. Dies hat auch zur Folge, dass der anterograde und retrograde Transport durch die MT-assoziierten Motorproteine Kinesin und Dynein gestört ist¹⁵⁷. Diese

Proteine sind wichtig, um die zellulären Funktionen durch die Weiterleitung von Organellen, Proteinen und mRNA zu gewährleisten. Da das Axon sehr lang ist, kommt es vor allem bei Mutationen in Kinesin, Dynein oder Tubulinen zuallererst zu peripheren Neuropathien^{155,158,159}. Daraus schlussfolgernd kann angenommen werden, dass sich die Länge des Axons bei einem *Coh1 knock down* nur in den ersten Tagen unterscheidet, da die Patienten mit Cohen-Syndrom keine schwerwiegenden neurologischen Schäden aufweisen. Es könnte sich also nur um eine Verzögerung der kortikalen Entwicklung handeln.

4.4 *Coh1 knock down* in der *in utero*-Elektroporation

4.4.1 Etablierung der shRNA

Für die Arbeiten mit primären kortikalen Neuronen der Maus konnte die Funktionalität der shRNA #1 bereits gezeigt werden. Nach dem *Coh1 knock down* kam es zu signifikanten Unterschieden hinsichtlich der Länge des längsten Neuriten, der Golgi-Orientierung, der Hyperstabilisierung von MT und der EB3 *velocity*. Mit einem *rescue* konnten diese phänotypischen Veränderungen nicht mehr festgestellt werden. Das zeigt, dass die Veränderungen des shRNA-vermittelten *Coh1 knock down* spezifisch für *Coh1* waren, da eine *Coh1*-Überexpression zu einer Wiederherstellung des Kontroll-Phänotyps führte. Um zu überprüfen, ob die hergestellte shRNA für *Coh1* (shRNA #1) auch in der *in utero*-Elektroporation funktioniert, musste zunächst eine *in situ*-Hybridisierung erfolgen. Die hierfür erforderlichen *Coh1*-spezifischen Sonden wurden bereits etabliert. Bei der elektroporierten Seite, welche dank des shRNA-Konstrukts gleichzeitig GFP exprimierte, wurde im Vergleich zur nicht elektroporierten Seite eine Reduktion des Signals der *Coh1*-Sonde beobachtet. Dabei blieb die Intensität und Verteilung des Signals für die Färbung von Zellkernen auf beiden Seiten gleich. Die shRNA führte also erfolgreich zu einem spezifischen *knock down* von *Coh1*.

4.4.2 *Coh1 knock down* hat einen minimalen Einfluss auf die Migration

Um Differenzen während der Migrationsphase sehen zu können, wurden Embryonen an Tag E12,5 und E13,5 elektroporiert. Dafür wurden die Muttertiere nur an einem Tag verpaart, um den gewünschten Embryonaltag zu erhalten. Hier muss jedoch mit einer Varianz von ein bis zwei Tagen gerechnet werden, da der Ovulationszyklus der Maus drei Tage beträgt. Jedoch sind die Embryonen aufgrund ihrer Körpergestalt im Uterus gut einem bestimmten Embryonaltag zuordenbar.

Neurone können über verschiedene Wege an ihren Zielort gelangen. Die drei am häufigsten vertretenen Migrationstypen während der kortikalen Entwicklung sind die radiale Gliageführte Migration¹⁶⁰, die tangentielle Migration von GABAergen Interneuronen¹⁶¹ und die somale Translokation⁹⁰. Besonders die Mutation von daran beteiligten Genen oder die Benutzung von Anästhetika, Anti-Epileptika oder Alkohol beeinflussen die regulierenden Rezeptoren¹⁶². Das führt oft zu Migrationsdefekten, welche sich letztendlich in neurologischen Störungen äußern. In dieser Arbeit wurde nur die radiale Migration innerhalb der Kortikalplatte betrachtet. Nach dem *inside first - outside last*-Prinzip für die kortikale Neurogenese wird die Schicht VI mit einer Elektroporation an E12,5 und die Schicht V mit einer Elektroporation an E13,5 erreicht⁸². Vereinzelt werden auch Neurone der Schicht II/III bereits ab E12 gebildet, ihr Maximum haben diese aber bei E15,5⁸⁷. Mit der Elektroporation erhalten die Vorläuferzellen das shRNA-Expressionsplasmid. Da sich dieses durch Zellteilung ausdünnert, befindet sich das Plasmid hauptsächlich in den Neuronen, die zum Elektroporationszeitpunkt aus den Vorläuferzellen entstehen. Es ist jedoch möglich, dass das Plasmid solange in der Vorläuferzelle verweilt, bis sich daraus wieder Neurone einer späteren Schicht bilden. Somit kommt es trotz einer Elektroporation zu Zeitpunkten, die die unteren Schichten V und VI betreffen, zu vereinzelt shRNA-exprimierenden Neuronen der oberen Schichten II und III. Über den Motorkortex ist bekannt, dass er keine charakteristischen Neurone der Schicht IV enthält, da sich diese eher in der sensorischen und auditorischen Sehrinde ausbildet^{86,132}. Die Bildung der Schicht IV wurde in dieser Arbeit nicht diskutiert, da nur koronale Schnitte des Motorkortex gemacht wurden. Alle Mausgehirne wurden an E17,5 entnommen und fixiert. In diesem Stadium der Neurogenese werden fast nur noch Astrozyten gebildet. Um die Geburt herum (E18,5 bei NMRI-Mäusen) ist die embryonale Neurogenese dann komplett abgeschlossen¹⁶³.

In dieser Arbeit wurde zunächst die Verteilung von Neuronen in elektroporierten Cortices untersucht, welche aufgrund des shRNA-Konstruktes eine GFP-Markierung trugen. Bei der quantitativen Analyse von an E12,5 elektroporierten Tieren ergab sich eine breite Verteilung der GFP-markierten Neurone. Die prägnanteste Schicht, welche an E12,5 gebildet wird, ist die Schicht VI. Auch die Auswertung in dieser Arbeit ergab eine maximale Neuronen-Anzahl in den unteren Bereichen, welche der Schicht VI entsprachen. Da die Bildung von Neuronen der oberen Schichten bereits ab E12 beginnt⁸⁷ oder das shRNA-Plasmid in den Vorläuferzellen verweilt, lassen sich die hier gezählten GFP-markierten Neurone der oberen Cortex-Bereiche erklären. Für den sechsten Bereich ergab sich ein signifikanter Unterschied bei maximaler Anzahl an *Coh1 knock down*-Neuronen. Die meisten Kontrollneuronen

befanden sich zu diesem Zeitpunkt noch im achten Bereich. Diese verschobene Verteilung der GFP-markierten Neurone zwischen den Gruppen wird im Folgenden noch hinsichtlich der Anordnung der Schichten I bis VI und der Markierung der Neurone für ihre vorherbestimmten Schichten (*cell fate*) diskutiert.

Es wurde weiterhin festgestellt, dass sich die Verschiebung der meisten GFP-markierten Neurone je Bereich auch für an E13,5 elektroporierten Tieren fortsetzt. Hier wurden an E17,5 die meisten Kontrollneurone im Bereich drei festgestellt. Die meisten *Coh1 knock down*-Neurone sammelten sich im zweiten Bereich an, in dem der Unterschied zu den Kontrollneuronen sehr signifikant war. Auch im ersten Bereich, welcher der Marginalzone entspricht und eigentlich kaum Zellen aufweisen sollte, wurde eine signifikant erhöhte Anzahl an *Coh1 knock down*-Neuronen gefunden.

Mit der Verteilung von schichtspezifischen Markern Cux1 und Ctip2 sollte geklärt werden, ob diese Verschiebung der *Coh1 knock down*-Neurone in die äußeren Bereiche des Cortex mit einer veränderten Anordnung der Schichtung einhergeht. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Lediglich bei E13,5-elektroporierten Tieren zeichnete sich eine Tendenz von Cux1-positiven GFP-markierten Neuronen ab, welche vermehrt in den ersten zwei Bereichen gefunden wurden. Da jedoch für den *Coh1 knock down* auch eine erhöhte Gesamtzahl an Cux1-positiven GFP-markierten Neuronen für die oberen Bereiche erhalten wurde, sind hier weitere Analysen notwendig.

Diese Experimente zeigten, dass die Anordnung der Schichten für den *Coh1 knock down* normal verläuft. Das wirft jedoch die Frage auf, ob die erhöhte Anzahl an *Coh1 knock down*-Neuronen in den oberen Cortex-Bereichen einem gestörten *cell fate* geschuldet ist oder ob die Neurone durch andere Faktoren in ihrer Migration verändert wurden. Dafür wurde die Verteilung von Cux1- und Ctip2-positiven GFP-markierten Neuronen hinsichtlich der Gesamtzahl an GFP-markierten Neuronen in allen zehn Cortex-Bereichen betrachtet. Hier ergaben sich für die Cux1-positiven GFP-markierten Neuronen vom Zeitpunkt E13,5 signifikante Unterschiede. Insgesamt hat sich der Peak für Cux1-positive *Coh1 knock down*-Neuronen um einen Bereich nach außen verschoben. Außerdem ließ diese Quantifizierung erkennen, dass die *Coh1 knock down*-Neuronen mehr Cux1-Markierungen aufweisen als die Kontrollneuronen. Es lässt sich also schlussfolgern, dass die gesteigerte Anzahl an GFP-markierten Neuronen in den oberen Schichten nach *Coh1 knock down* auch mit einer gesteigerten Anzahl an Cux1-Markierungen einhergeht. Das heißt, dass die Neuronen mit dem *knock down* für *Coh1* nicht ihre schichtspezifische Markierung verloren haben. Trotzdem schienen die Neuronen mit dem *knock down* innerhalb von fünf Tagen *in vivo*

(E13,5 bis E17,5) eine weitere Strecke zurückgelegt zu haben als die Kontrollneuronen. Das lässt die Vermutung aufkommen, dass *Cohl* weitere Faktoren für die Migration dieser Neuronen beeinflusst.

Es scheint also, dass der *Cohl knock down* entweder eine schnellere Migration der Neuronen hervorruft, oder dass er vielleicht dazu führt, dass kein Stoppsignal ausgelöst oder erkannt wird, weshalb die Neuronen über die zu erwartende Schicht hinaus wandern. Das wichtigste Stoppsignal während der kortikalen Neurogenese ist Reelin. Von der sogenannten *reeler*-Maus, welche eine Deletion in zwei *reeler*-Allelen hat, ist bekannt, dass unter anderem die Neuronen während der Neurogenese nicht ihren richtigen Zielort finden¹⁶⁴. Das hat zur Folge, dass sowohl die Anordnung der Schichten im Cortex cerebri und im Cerebellum als auch andere Regionen eine fehlerhafte Schichtung aufweisen¹⁶⁵. Wenn *Cohl* für den Reelin-Signalweg eine entscheidende Rolle spielt, dann könnten die *Cohl knock down*-Neurone nicht mehr in der Lage sein, Reelin als Stoppsignal zu erkennen. Dieser Fall wurde schon für das *very low density lipoprotein receptor (Vldlr)*-Gen beschrieben. Dessen Protein Vldlr bildet zusammen mit ApoER2 einen Transmembran-Rezeptor für Reelin, welcher für die Migration von Neuronen während der Entwicklung des Cortex cerebri und des Cerebellums verantwortlich ist¹⁶⁶. *Downstream* von diesem Reelin-Signalweg ist des Weiteren das Adapterprotein Dab-1, dessen Deletion einen ähnlichen Phänotyp hervorruft¹⁶⁷. Da in dieser Arbeit für *Cohl* auch ein Einfluss auf das MT-Netzwerk beschrieben wurde, könnte auch hier die Ursache für eine veränderte Migration liegen. So werden zum Beispiel TUBB2B und TUBA3, welche Proteine der α - und β -Untereinheiten der Tubuline sind, eine essentielle Rolle bei der neuronalen Migration zugeschrieben. Mutationen dieser Gene wurden bei Patienten mit einer Lissenzephalie gefunden, welche auf Migrationsdefekte in vielen Teilen des Gehirns zurückzuführen sind. Anders als bei einem *Cohl knock down* sind hier die Neuronen nicht mehr in der Lage, Tubulin-Heterodimere zu bilden^{168,169}. Ein weiterer wichtiger Komplex, der bei der Migration eine Rolle spielt, ist der MT-basierte Dynein-Motor-Komplex. Bei diesem ist DISC1 ein wichtiger Bestandteil, dessen Mutation zu einer gestörten neuronalen Migration und zu einem verkürzten Auswachsen des Axons führt¹⁷⁰. Für kortikale Neuronen mit einem *Cohl knock down* wurde eine reduzierte EB3 *velocity* gemessen. Diese gestörte MT-Dynamik kann auch zu Fehlern bei der Signalweiterleitung führen. Es wurde bereits beschrieben, dass der axonale Transport durch hyperstabile MT gestört sein kann¹⁵⁵. Im Zusammenhang mit Beobachtungen der Migration von *Cohl knock down*-Neuronen könnte das auch bedeuten, dass hier ein Signal nicht richtig aufgenommen oder verzögert weitergeleitet wurde. Im Beispiel von Reelin würden die *Cohl knock down*-

Neuronen das Stoppsignal im Vergleich zu den Kontrollneuronen verzögert aufnehmen und verzögert zum Stehen kommen. Es kann aber auch sein, dass die *Coh1 knock down*-Neuronen solange weiter wandern, bis das Stoppsignal im Verarbeitungszentrum ankommt, während die Kontrollneurone das Stoppsignal bereits umgesetzt und sich in der jeweiligen Schicht angesammelt haben. Es scheint so, als ob die *Coh1 knock down*-Neuronen in der gleichen Zeit wie die Kontrollneuronen eine weitere Strecke zurückgelegt haben. Das muss aber nicht heißen, dass die Migration schneller vonstattenging, sondern lediglich verzögert gestoppt wurde.

Die Methode der *in utero*-Elektroporation lässt hier aber keine weiterreichenden Diskussionen zu. Zunächst wurden die Cortices erst im letzten Drittel der Schwangerschaft elektroporiert, wodurch frühe Entwicklungsprozesse ungehindert von einem *Coh1 knock down* ablaufen konnten. Des Weiteren sind nur die elektroporierten Neuronen von einem *Coh1 knock down* betroffen. Die anderen Neuronen entwickeln sich normal im Gehirn weiter. Auch die Umgebung in der sich die elektroporierten Neuronen befinden, ist nicht durch eine *Coh1 knock down* beeinflusst. So werden zum Beispiel extrinsische Signale, welche für die Migration nötig sind, normal gebildet. Lediglich die Aufnahme und Weiterleitung innerhalb der elektroporierten Neuronen könnte beeinflusst worden sein.

Wo genau *Coh1* eingreift ist jedoch unklar. Sowohl die veränderte Migration als auch die Hyperstabilisierung der MT mit verringerter EB3-Dynamik geben einen ersten Hinweis auf eine Ursache für die mentale Retardierung der Cohen-Syndrom-Patienten. Für eine weiterführende Diskussion ist es jedoch notwendig, *COH1* mit Hilfe von Interaktionsstudien in weitere molekulare Mechanismen einzuordnen. Als Ausblick für diese Arbeit wurde eine initiale massenspektrometrische Analyse einer Ko-Immunpräzipitation von GFP-COH1 gemacht, welche im Kapitel 4.5 angeschnitten wird und die ersten richtungsweisenden potentiellen Interaktionspartner von COH1 diskutieren soll.

4.4.3 *Coh1* hat keinen Einfluss auf das Corpus callosum

Es ist bekannt, dass die meisten Neuronen aus den Schichten II und III heraus zum CC projizieren⁹². Um die Projektion bei den Untersuchungen zu dieser Arbeit messen zu können, wurden die Intensitäten der GFP-Signale der elektroporierten Cortex-Region und der GFP-Signale an der *midline* des CC verglichen. Bei E13,5-elektroporierten Tieren wurde festgestellt, dass sich die meisten *Coh1 knock down*-Neurone im zweiten Cortex-Bereich und die Kontrollneuronen im dritten Cortex-Bereich befinden. Beide Bereiche entsprechen zwar den Schichten II und III, es könnte aber dennoch sein, dass die *Coh1 knock down*-

Neuronen bereits zu weit gewandert sind, um eine genauso starke Projektion zur *midline* des CC hervorrufen zu können. Bei den Tieren, die an E12,5 elektroporiert wurden, wanderten die meisten Kontrollneuronen in den achten Cortex-Bereich. Wohingegen die *Coh1 knock down*-Neuronen am häufigsten im sechsten Cortex-Bereich zu finden waren. Der Bereich acht entspricht in dieser Arbeit der Schicht VI, der Bereich sechs gehört jedoch schon zur Schicht V. Von dieser ist bekannt, dass deren Neurone zu 20 % an der Projektion zum CC beteiligt sind. Dagegen findet in der Schicht VI kaum eine Projektion zur *midline* statt⁹². Neben der fortgeschrittenen Migration von *Coh1 knock down*-Neuronen in die Kortikalplatte unterscheiden sich diese auch signifikant bezüglich ihrer Gesamtzahl von den Kontrollneuronen in Schicht V. Das könnte die Tendenz zu der stärkeren Projektion zur *midline* erklären. Darüber hinaus wurde auch die Dicke des CC vermessen, welche sich nicht verändert hatte. Mit Entnahme der Gehirne an E17,5 ist eine Aussage schwierig, da die spätere Entwicklung des Gehirns nicht betrachtet werden kann. Somit ergibt sich kein Rückschluss auf das normal große bzw. im Vergleich zur postnatalen Mikrozephalie vergrößerte CC von Cohen-Syndrom-Patienten. Für weitere anatomische Unterschiede zum gesunden Menschen sind keine Studien bekannt.

4.5 COH1-massenspektrometrische Analyse

Eine massenspektrometrische Analyse nach Ko-Immunpräzipitation wurde durchgeführt, um eine bessere Vorstellung davon zubekommen, in welche molekularen Mechanismen COH1 greift. In die engere Auswahl der erhaltenen Ergebnisse kamen nur die Proteine, welche in drei Ansätzen unter den besten 20 % waren und nach Herausrechnung der Hintergrundsignale (anhand einer Negativkontrolle) bestehen blieben. Im Nachfolgenden werden ein paar dieser Proteine in Zusammenhang mit ihrer Funktion und COH1 diskutiert. Ein interessantes Protein, welches auch schon als Interaktionspartner von RAB6A identifiziert wurde, ist KIF1C¹⁷¹. KIF1C gehört zur Familie der Kinesine, welche MT-assoziierte Motoren sind, um Vesikel retrograd vom Golgi-Komplex zum ER zu transportieren¹⁷². Liegt ein *knock down* von *KIF1C* vor, ist der Golgi-Komplex wie bei einem *COH1 knock down* fragmentiert^{171,173}. KIF1C ist außerdem in den Vesikel-Transport in Neuronen involviert¹⁷⁴. Es wurde des Weiteren in Podosomen gezeigt, dass KIF1C unter acetyliertem Tubulin weniger aktiv vorliegt und 50 % der KIF1C-Vesikel in das Zellinnere laufen und nicht wie normalerweise üblich in die Peripherie¹⁷⁵. Dieser Fakt ist besonders interessant für Zellen mit einem *Coh1 knock down*. Auch hier könnte durch die

Hyperstabilisierung und der reduzierten Dynamik der MT ein gestörter Vesikel-Transport vorliegen.

Des Weiteren wurden in der massenspektrometrischen Analyse viele Golgi-assoziierte Proteine identifiziert. Darunter sind zum Beispiel COG6, GOLGA2 und SEC22B. Aber auch Proteine, die mit dem Zytoskelett assoziiert sind, wurden gefunden. Darunter fallen zum Beispiel DCTN1 und MYH10. Auch die Interaktion mit CDC42 ist hier interessant. CDC42 ist über die Aktivierung des PAK-Signalweges für das Auswachsen von MT¹⁷⁶ verantwortlich und beeinflusst außerdem das Auswachsen der Neuriten und der Wachstumskegel¹⁷⁷. Die Abbildung 4.1 soll einen kurzen Überblick über die potentiellen Interaktionspartner verschaffen, welche mit der massenspektrometrischen Analyse erhalten wurden. Dabei wurde COH1 in den Kontrollzellen als bereits identifiziertes Golgi-assoziiertes Protein am Golgi-Komplex dargestellt. Der bereits beschriebene Interaktionspartner RAB6 ist ebenfalls am Golgi-Komplex assoziiert¹⁶. Die neu identifizierten Proteine wurden ihrer Funktion nach den jeweiligen Zellkompartimenten zugeordnet. Dies lässt auf eine kompartimentübergreifende Funktion von COH1 schließen, welches neben Funktionen am Golgi-Komplex auch in Prozesse an MT, Aktinfilamenten und Endosomen involviert sein könnte.

Neben diesen potentiellen Interaktionspartnern von COH1, welche COH1 eher in einen Pathomechanismus einordnen sollen, wurden auch schon Gene entdeckt (siehe Kapitel 1.2.3 Assoziation von Golgi-Pathologien mit neuronalen genetischen Erkrankungen), deren Mutation ähnliche Symptome wie im Cohen-Syndrom bei den Erkrankten auslöst. Oft sind diese Mutationen in einem Gen, welches eine wichtige Rolle für die Stabilität oder den Transport des Golgi-Netzwerkes spielt. Diese könnten somit Aufschluss über eine mögliche Wirkungsweise von COH1 geben⁷⁰⁻⁷⁸. Es wird aber noch ein langer Weg bleiben, bis eine Verbindung von den molekularen Mechanismen um COH1 zu den klinischen Symptomen der Cohen-Syndrom-Patienten hergestellt werden kann.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Das COH1-Protein ist für die Funktion und die strukturelle Aufrechterhaltung des Golgi-Komplexes essentiell¹⁶. Es ist bisher jedoch unklar, welche zellbiologischen Mechanismen zur Fragmentierung des Golgi-Komplexes nach Verlust von *COH1* führen. Neben Golgi-intrinsischen Faktoren wie z.B. den GRASP55/65-Proteinen, welche direkt an der Aufrechterhaltung der *cis-trans*-Orientierung der Golgi-Zisternen beteiligt sind^{178,179}, können auch Golgi-extrinsische Faktoren wie das Zytoskelett einen Einfluss auf den

Strukturerhalt haben^{122,180,181}. Erste Studien zum Zytoskelett zeigten ein verändertes Aktin- und MT-Netzwerk (Seifert, W. „*Expression analysis and functional characterization of COH1*“ (2010, Dissertation)) nach Verlust von *COH1*. Auf dieser Grundlage wurde in dieser Arbeit die Rolle von *Coh1* für das MT-Netzwerk bei der neuronalen Entwicklung des Cortex cerebri näher charakterisiert.

Nach *COH1 knock down* in HeLa-Zellen erhöhte sich die Menge an acetyliertem α -Tubulin. Daneben zeigte sich in HeLa-Zellen nach *COH1 knock down*, dass nach Depolymerisierung mit Nocodazol die Wiederherstellung (*regrowth*) der MT vermehrt radial von zentrosomalen MTOC und kaum von Golgi-organisierten MTOC stattfand. Dieser Verlust an Golgi-assoziierten MT legt nahe, dass COH1 an der Rekrutierung, Stabilisierung oder an der Qualitätskontrolle der Golgi-assoziierten MT beteiligt ist. Die bereits bekannte Interaktion von COH1 mit RAB6¹⁶ und eine wahrscheinliche Interaktion von COH1 mit KIF1C (nicht publiziert) unterstreichen die potentielle Rolle von COH1 als Strukturprotein im Zusammenspiel von Golgi-Organisation und Golgi-assoziierten MT. Das Minuspolgerichtete MT-assoziierte Motorprotein KIF1C interagiert mit RAB6 und ist für die Integrität des Golgi-Komplexes verantwortlich^{171,173}. Weitere Interaktionsstudien und der gegenseitige Einfluss auf subzelluläre Prozesse nach Ko-Überexpression bzw. *knock down* der einzelnen Interaktionspartner sind notwendig, um den molekularen Mechanismus von *COH1* in diesem Zusammenhang näher beschreiben zu können.

Diese Ergebnisse sind wichtig für die Entwicklung der Neuronen und des Cortex cerebri. Unabhängig von der ubiquitären Expression von *COH1*⁷ zeigt sich die phänotypische Ausprägung beim Cohen-Syndrom hauptsächlich in neuronalen Geweben (postnatale Mikrozephalie, mentale Retardierung und progressive Retinopathie) und lässt somit eine bedeutende Rolle von *COH1* für die neuronale Entwicklung vermuten. Die Funktion von COH1 während der neuronalen Gehirnentwicklung ist unbekannt. Daher wurde in dieser Arbeit der *knock down* mittels *Coh1*-spezifischer shRNA sowohl in *in vitro*-Kulturen von primären kortikalen Neuronen als auch durch *in utero*-Elektroporation von Mäusen etabliert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der längste Neurit bei kortikalen Neuronen der Maus unter einem *Coh1 knock down* ähnlich den hippocampalen Neuronen der Ratte¹⁶ *in vitro* verkürzt vorliegt. Außerdem ist der Golgi-Komplex in kortikalen Neuronen der Maus nicht in Richtung des Wachstumskegels orientiert. In den kortikalen Neuronen mit *Coh1 knock down* konnte die Hyperstabilisierung der MT bestätigt werden. Nach acht Stunden Nocodazol-Behandlung wurde keine Destabilisierung der MT, gemessen an acetyliertem α -Tubulin, im Vergleich zu Kontrollneuronen erreicht. Darüber hinaus wiesen die kortikalen

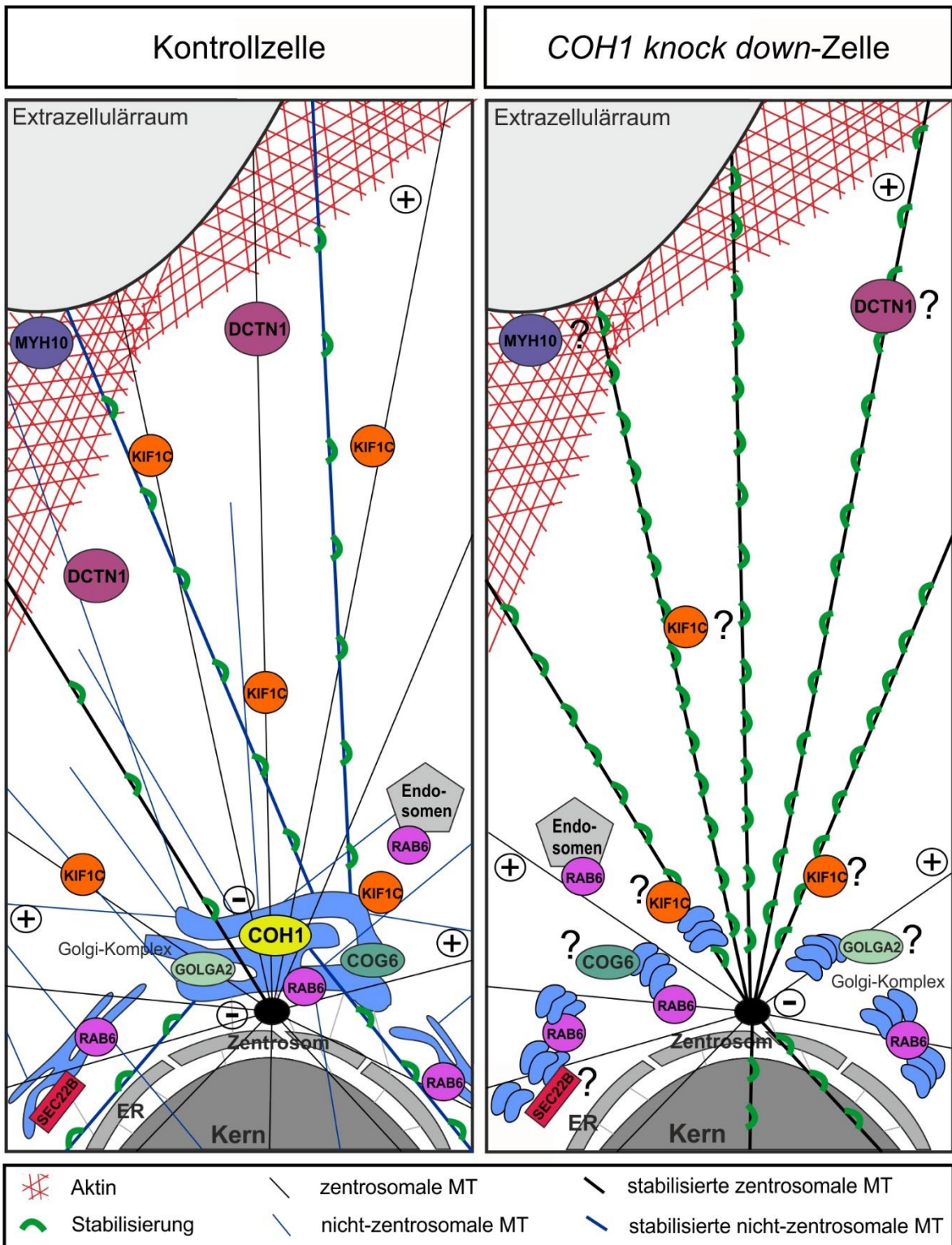
Neurone in *live cell*-Experimenten nach *Coh1 knock down* eine geringere *velocity* des *capping*-Proteins EB3 am MT-Plusende auf. Diese Beobachtung verdeutlicht indirekt eine geringere MT-Auswachsrate in murinen Neuronen nach *Coh1 knock down*.

Der Verlust von COH1 am Golgi-Komplex erzeugt eine Hyperstabilisierung von vermutlich zentrosomalen MT, einen Verlust von asymmetrischen, nicht-zentrosomalen Golgi-assoziierten MT und eine geringere Dynamik von MT (siehe Abbildung 4.1). Insbesondere differenzierte Epithelzellen sowie Neuronen besitzen vermehrt asymmetrische, nicht-zentrosomale MT an apikalen Seiten sowie in den axonalen und dendritischen Ausläufern. Dabei dient das asymmetrische, nicht-zentrosomale MT-Netzwerk unter anderem dem post-Golgi-Komplex-Transport und trägt somit zur Polarisierung der Zelle bei^{149,150,182}. Während der Zellmigration orientiert sich auch der Golgi-Komplex in die Migrationsrichtung (*leading edge*). Kommt es jedoch zu einem Verlust von nicht-zentrosomalen, Golgi-assoziierten MT wie nach *AKAP450 knock down* in RPE1-Zellen, ist die polarisierte Migration gestört⁵⁷.

Der Golgi-Komplex dient sowohl als Schnittstelle für die Organisation des Zytoskeletts als auch für den anterograden und retrograden Membrantransport. Somit ist der Verlust von COH1 am Golgi-Komplex, die verminderte Golgi-Orientierung in Richtung längster Neurit und der Verlust von asymmetrischen, Golgi-assoziierten MT gleichermaßen für das verzögerte Auswachsen des längsten Neuriten verantwortlich. Inwieweit ein geordneter Transport von Strukturproteinen, Signalmolekülen und Rezeptoren von und zur *leading edge* nach Funktionsverlust von COH1 stattfindet, bedarf weiterer Untersuchungen. Die Hypothese, dass *Coh1 knock down*-Neurone eine veränderte Polarisierung aufweisen, kann neben einem verzögerten Auswachsen des Axons eine veränderte Migration in Richtung MZ zur Folge haben. Damit einhergehend wurde nach *in utero*-Elektroporation von *Coh1*-spezifischer shRNA eine veränderte Migration der *Coh1 knock down*-Neurone im Cortex cerebri beobachtet. Diese legten trotz unverändertem *cell fate* eine weitere Strecke zurück und sammelten sich weiter außen im Cortex an. Eine Erklärung für das Überwandern der Zielschicht im Cortex cerebri kann derzeit nicht gegeben werden. Es sollte bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden, dass in der *in utero*-Elektroporation nur einzelne Neuronen mit einem *Coh1 knock down* erzeugt werden, welche sich in ein normales physiologisches Milieu eingliedern. Die schneller erscheinende Migration kann durch einen verzögerten retrograden Transport von Signalmolekülen, die als Stoppsignal fungieren, erfolgen. Somit kann es zu einem verzögerten Migrationsstopp der Neuronen in der kortikalen Zielschicht kommen. Inwieweit eine gerichtete Migration tatsächlich stattfindet, bedarf weiterer experimenteller Ansätze. Der molekulare Mechanismus für das veränderte

Migrationsverhalten sollte darüber hinaus durch eine systematische Analyse der initialen Massenspektrometrie nach COH1-spezifischer GFP-trap-Ko-Immünpräzipitation (siehe Abbildung 4.1 und Kapitel 4.5) erarbeitet werden. Die Untersuchung der Entwicklung des Cortex cerebri in einem *Coh1 knock out*-Modell wird dabei zum besseren Verständnis des Pathomechanismus des Cohen-Syndroms beitragen.

Abbildung 4.1: Auswirkungen eines *COH1 knock down* auf verschiedene Zellkompartimente
Im Vergleich zu einer Kontrollzelle bewirkt der *COH1 knock down* eine Fragmentierung des Golgi-Komplexes in Mini-Stapel (blau). Darüber hinaus findet eine vermehrte Stabilisierung der MT statt (grün). In den *COH1 knock down*-Zellen sind nur noch radial angeordnete, gebündelte MT zu erkennen, welche vom MTOC am Zentrosomen (schwarz) auslaufen. Die am Golgi-Komplex auswachsenden MT sind nur noch in den Kontrollzellen vorhanden, wodurch es zu einem stärker verzweigten MT-Netzwerk kommt. Das auswachsende Plusende der MT wurde mit einem (+) versehen. Das Minusende der MT befindet sich am Golgi-Komplex bzw. am Zentrosom (-). Die dargestellten Proteine wurden durch eine massenspektrometrische Analyse erhalten. In den Zellen ohne COH1 (gelb) muss weiterhin untersucht werden, wie sich die potentiellen Interaktionspartner (mit ? versehen) nach *COH1 knock down* in der Zelle verhalten. Neben dem bereits identifizierten Bindungspartner RAB6 wird hier eine Verbindung von COH1 zu weiteren Golgi-assoziierten Proteinen (Sec22B, COG6, GOLGA2) und zu Zytoskelett-assoziierten Proteinen (KIF1C, MYH10, DCTN1) gezogen (Abbildung auf der nächsten Seite).



5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Cohen MM Jr, H. B. A new syndrome with hypotonia, obesity, mental deficiency, and facial, oral, ocular and limb anomalies. *J Pediatr* **83**:, 280–284 (1973).
2. Kolehmainen, J. *et al.* Cohen Syndrome Is Caused by Mutations in a Novel Gene, COH1, Encoding a Transmembrane Protein with a Presumed Role in Vesicle-Mediated Sorting and Intracellular Protein Transport. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 1359–1369 (2003).
3. Mochida, G. H. *et al.* Broader geographical spectrum of Cohen syndrome due to COH1 mutations. *J. Med. Genet.* **41**, e87 (2004).
4. Tahvanainen, E. *et al.* Cohen syndrome gene assigned to the long arm of chromosome 8 by linkage analysis. *Nat. Genet.* **7**, 201 (1994).
5. Kolehmainen, J. *et al.* Refined mapping of the Cohen syndrome gene by linkage disequilibrium. *Eur J Hum Genet* **5**, 206–13 (1997).
6. Velayos-Baeza, A., Vettori, A., Copley, R. R., Dobson-Stone, C. & Monaco, A. P. Analysis of the human VPS13 gene family. *Genomics* **84**, 536–549 (2004).
7. Seifert, W. *et al.* Expanded mutational spectrum in Cohen syndrome, tissue expression, and transcript variants of COH1. *Hum Mutat* **30**, E404-20 (2009).
8. Balikova, I. *et al.* Deletions in the VPS13B (COH1) gene as a cause of Cohen syndrome. *Hum Mutat* **30**, E845-54 (2009).
9. Feuk, L., Carson, A. R. & Scherer, S. W. Structural variation in the human genome. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 85–97 (2006).
10. Gueneau, L. *et al.* Congenital neutropenia with retinopathy, a new phenotype without intellectual deficiency or obesity secondary to VPS13B mutations. *Am. J. Med. Genet. A.* **164A**, 522–527 (2014).
11. Seifert, W. *et al.* Cohen syndrome-associated protein, COH1, is a novel, giant Golgi matrix protein required for Golgi integrity. *J. Biol. Chem.* **286**, 37665–37675 (2011).
12. Brickner, J. H. & Fuller, R. S. SOI1 encodes a novel, conserved protein that promotes TGN-endosomal cycling of Kex2p and other membrane proteins by modulating the function of two TGN localization signals. *J. Cell Biol.* **139**, 23–36 (1997).
13. Redding, K., Brickner, J. H., Marschall, L. G., Nichols, J. W. & Fuller, R. S. Allele-specific suppression of a defective trans-Golgi network (TGN) localization signal in Kex2p identifies three genes involved in localization of TGN transmembrane proteins. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6208–6217 (1996).
14. Kilmartin, J. V. Sfi1p has conserved centrin-binding sites and an essential function in budding yeast spindle pole body duplication. *J. Cell Biol.* **162**, 1211–1221 (2003).
15. Meriin, A. B. *et al.* Aggregation of expanded polyglutamine domain in yeast leads to defects in endocytosis. *Mol Cell Biol* **23**, 7554–65 (2003).
16. Seifert, W. *et al.* Cohen syndrome-associated protein COH1 physically and functionally interacts with the small GTPase RAB6 at the Golgi complex and directs neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **290**, 3349–3358 (2015).
17. Siniosoglou, S., Peak-Chew, S. Y. & Pelham, H. R. Ric1p and Rgp1p form a complex that catalyses nucleotide exchange on Ypt6p. *EMBO J.* **19**, 4885–4894 (2000).

18. Golgi, Camillo. SULLA SOSTANZA GRIGIA DEL CERVELLO. (1873). Available at: <http://ppp.unipv.it/camillogolgi/pdf/Sullasostanza%20grigia.pdf>. (Accessed: 4th February 2018)
19. Dunphy, W. G. & Rothman, J. E. Compartmental organization of the Golgi stack. *Cell* **42**, 13–21 (1985).
20. Truschel, S. T., Zhang, M., Bachert, C., Macbeth, M. R. & Linstedt, A. D. Allosteric Regulation of GRASP Protein-dependent Golgi Membrane Tethering by Mitotic Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **287**, 19870–19875 (2012).
21. Feinstein, T. N. & Linstedt, A. D. GRASP55 Regulates Golgi Ribbon Formation. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2696–2707 (2008).
22. Munro, S. The Golgin Coiled-Coil Proteins of the Golgi Apparatus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
23. Trucco, A. *et al.* Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1071–1081 (2004).
24. Schekman, R. & Mellman, I. Does COPI go both ways? *Cell* **90**, 197–200 (1997).
25. Stanley, P. Golgi Glycosylation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
26. Elsner, M., Hashimoto, H. & Nilsson, T. Cisternal maturation and vesicle transport: join the band wagon! (Review). *Mol. Membr. Biol.* **20**, 221–229 (2003).
27. Orci, L., Glick, B. S. & Rothman, J. E. A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell* **46**, 171–184 (1986).
28. Simpson, F. *et al.* A novel adaptor-related protein complex. *J. Cell Biol.* **133**, 749–760 (1996).
29. Cowles, C. R., Odorizzi, G., Payne, G. S. & Emr, S. D. The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. *Cell* **91**, 109–118 (1997).
30. Weber, T. *et al.* SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759–772 (1998).
31. Bonfanti, L. *et al.* Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell* **95**, 993–1003 (1998).
32. Lavieu, G., Zheng, H. & Rothman, J. E. Stapled Golgi cisternae remain in place as cargo passes through the stack. *eLife* **2**, e00558 (2013).
33. Nakamura, N. *et al.* Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J. Cell Biol.* **131**, 1715–1726 (1995).
34. Sönnichsen, B. *et al.* A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J. Cell Biol.* **140**, 1013–1021 (1998).
35. Nakamura, N. Emerging new roles of GM130, a cis-Golgi matrix protein, in higher order cell functions. *J. Pharmacol. Sci.* **112**, 255–264 (2010).
36. Puthenveedu, M. A., Bachert, C., Puri, S., Lanni, F. & Linstedt, A. D. GM130 and GRASP65-dependent lateral cisternal fusion allows uniform Golgi-enzyme distribution. *Nat. Cell Biol.* **8**, 238–248 (2006).

37. Sengupta, D., Truschel, S., Bachert, C. & Linstedt, A. D. Organelle tethering by a homotypic PDZ interaction underlies formation of the Golgi membrane network. *J. Cell Biol.* **186**, 41–55 (2009).
38. Duplomb, L. *et al.* Cohen syndrome is associated with major glycosylation defects. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 2391–2399 (2014).
39. Pollack, R., Osborn, M. & Weber, K. Patterns of organization of actin and myosin in normal and transformed cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 994–998 (1975).
40. Korn, E. D., Bowers, B., Batzri, S., Simmons, S. R. & Victoria, E. J. Endocytosis and exocytosis: role of microfilaments and involvement of phospholipids in membrane fusion. *J. Supramol. Struct.* **2**, 517–528 (1974).
41. Hartsock, A. & Nelson, W. J. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1778**, 660–669 (2008).
42. Schroeder, T. E. Actin in dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 1688–1692 (1973).
43. Ridley, A. J. *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704–1709 (2003).
44. Cooper, G. M. Intermediate Filaments. (2000).
45. Cooper, G. M. Microtubules. (2000).
46. Horio, T. *et al.* The fission yeast gamma-tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. *J. Cell Sci.* **99 (Pt 4)**, 693–700 (1991).
47. Gundersen, G. G. & Bulinski, J. C. Distribution of tyrosinated and nontyrosinated alpha-tubulin during mitosis. *J. Cell Biol.* **102**, 1118–1126 (1986).
48. Hammond, J. W. *et al.* Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons. *Mol. Biol. Cell* **21**, 572–583 (2010).
49. Wloga, D. & Gaertig, J. Post-translational modifications of microtubules. *J. Cell Sci.* **123**, 3447–3455 (2010).
50. Joshi, H. C. Microtubule organizing centers and γ -tubulin. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 55–62 (1994).
51. Chabin-Brion, K. *et al.* The Golgi Complex Is a Microtubule-organizing Organelle. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2047–2060 (2001).
52. Paz, J. & Lüders, J. Microtubule-Organizing Centers: Towards a Minimal Parts List. *Trends Cell Biol.* **28**, 176–187 (2018).
53. Oegema, K. *et al.* Characterization of two related Drosophila gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *J. Cell Biol.* **144**, 721–733 (1999).
54. Rios, R. M. The centrosome–Golgi apparatus nexus. *Phil Trans R Soc B* **369**, 20130462 (2014).
55. Efimov, A. *et al.* Asymmetric CLASP-dependent nucleation of non-centrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev. Cell* **12**, 917–930 (2007).

56. Ori-McKenney, K. M., Jan, L. Y. & Jan, Y.-N. Golgi outposts shape dendrite morphology by functioning as sites of acentrosomal microtubule nucleation in neurons. *Neuron* **76**, 921–930 (2012).
57. Rivero, S., Cardenas, J., Bornens, M. & Rios, R. M. Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J.* **28**, 1016–1028 (2009).
58. Wu, J. *et al.* Molecular Pathway of Microtubule Organization at the Golgi Apparatus. *Dev. Cell* **39**, 44–60 (2016).
59. Maurer, S. P., Fourniol, F. J., Bohner, G., Moores, C. A. & Surrey, T. EBs recognize a nucleotide-dependent structural cap at growing microtubule ends. *Cell* **149**, 371–382 (2012).
60. Yang, C. *et al.* EB1 and EB3 regulate microtubule minus end organization and Golgi morphology. *J. Cell Biol.* **216**, 3179–3198 (2017).
61. Straube, A. & Merdes, A. EB3 Regulates Microtubule Dynamics at the Cell Cortex and Is Required for Myoblast Elongation and Fusion. *Curr. Biol.* **17**, 1318–1325 (2007).
62. Wang, Z., Zhang, C. & Qi, R. Z. A newly identified myomegalin isoform functions in Golgi microtubule organization and ER–Golgi transport. *J. Cell Sci.* **127**, 4904–4917 (2014).
63. Trepel, M. *Neuroanatomie Struktur und Funktion.* (Urban & Fischer, 2012).
64. Chen, C.-H. *et al.* Genetic Influences on Cortical Regionalization in the Human Brain. *Neuron* **72**, 537–544 (2011).
65. O’Leary, D. D. M., Chou, S.-J. & Sahara, S. Area patterning of the mammalian cortex. *Neuron* **56**, 252–269 (2007).
66. Gilmore, E. C. & Walsh, C. A. Genetic Causes of Microcephaly and Lessons for Neuronal Development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2**, 461–478 (2013).
67. Kivitie-Kallio, S., Autti, T., Salonen, O. & Norio, R. MRI of the brain in the Cohen syndrome: a relatively large corpus callosum in patients with mental retardation and microcephaly. *Neuropediatrics* **29**, 298–301 (1998).
68. Fame, R. M., MacDonald, J. L., Dunwoodie, S. L., Takahashi, E. & Macklis, J. D. Cited2 Regulates Neocortical Layer II/III Generation and Somatosensory Callosal Projection Neuron Development and Connectivity. *J. Neurosci.* **36**, 6403–6419 (2016).
69. Egaas, B., Courchesne, E. & Saitoh, O. Reduced size of corpus callosum in autism. *Arch. Neurol.* **52**, 794–801 (1995).
70. Cacciagli, P. *et al.* Mutations in BCAP31 cause a severe X-linked phenotype with deafness, dystonia, and central hypomyelination and disorganize the Golgi apparatus. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 579–586 (2013).
71. de Wit, M. C. Y., de Coo, I. F. M., Halley, D. J. J., Lequin, M. H. & Mancini, G. M. S. Movement disorder and neuronal migration disorder due to ARFGEF2 mutation. *Neurogenetics* **10**, 333–336 (2009).
72. Ferland, R. J. *et al.* Disruption of neural progenitors along the ventricular and subventricular zones in periventricular heterotopia. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 497–516 (2009).

73. Mochida, G. H. *et al.* A truncating mutation of TRAPPC9 is associated with autosomal-recessive intellectual disability and postnatal microcephaly. *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 897–902 (2009).
74. Shamseldin, H. E., Bennett, A. H., Alfadhel, M., Gupta, V. & Alkuraya, F. S. GOLGA2, encoding a master regulator of golgi apparatus, is mutated in a patient with a neuromuscular disorder. *Hum. Genet.* **135**, 245–251 (2016).
75. Dupuis, N. *et al.* Dymeclin deficiency causes postnatal microcephaly, hypomyelination and reticulum-to-Golgi trafficking defects in mice and humans. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 2771–2783 (2015).
76. Numata, Y. *et al.* Depletion of Molecular Chaperones from the Endoplasmic Reticulum and Fragmentation of the Golgi Apparatus Associated with Pathogenesis in Pelizaeus-Merzbacher Disease. *J. Biol. Chem.* **288**, 7451–7466 (2013).
77. Basel-Vanagaite, L. *et al.* RIN2 deficiency results in macrocephaly, alopecia, cutis laxa, and scoliosis: MACS syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 254–263 (2009).
78. Syx, D. *et al.* The RIN2 syndrome: a new autosomal recessive connective tissue disorder caused by deficiency of Ras and Rab interactor 2 (RIN2). *Hum. Genet.* **128**, 79–88 (2010).
79. Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W. & Huttner, W. B. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3196–3201 (2004).
80. Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L. & Kriegstein, A. R. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* **7**, 136–144 (2004).
81. Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R. L. & Macklis, J. D. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 427–37 (2007).
82. Jun, J. B. A. & Sidman, R. L. Autoradiographic Study of Cell Migration during Histogenesis of Cerebral Cortex in the Mouse. *Nature* **192**, 766 (1961).
83. Pinto, L. & Götz, M. Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS. *Prog. Neurobiol.* **83**, 2–23 (2007).
84. Tarabykin, V., Stoykova, A., Usman, N. & Gruss, P. Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression. *Dev. Camb. Engl.* **128**, 1983–1993 (2001).
85. Franco, S. J. & Müller, U. Shaping Our Minds: Stem and Progenitor Cell Diversity in the Mammalian Neocortex. *Neuron* **77**, 19–34 (2013).
86. Barbas, H. & García-Cabezas, M. Á. Motor cortex layer 4: less is more. *Trends Neurosci.* **38**, 259–261 (2015).
87. Greig, L. C., Woodworth, M. B., Galazo, M. J., Padmanabhan, H. & Macklis, J. D. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 755–769 (2013).
88. Bielle, F. *et al.* Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat. Neurosci.* **8**, 1002–1012 (2005).
89. Luhmann, H. J., Fukuda, A. & Kilb, W. Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, (2015).

90. Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R. O. L. & Parnavelas, J. G. Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex: Observations Based on Real-time Imaging. *Cereb. Cortex* **13**, 607–611 (2003).
91. Silver, J., Lorenz, S. E., Wahlsten, D. & Coughlin, J. Axonal guidance during development of the great cerebral commissures: Descriptive and experimental studies, in vivo, on the role of preformed glial pathways. *J. Comp. Neurol.* **210**, 10–29 (1982).
92. Fame, R. M., MacDonald, J. L. & Macklis, J. D. Development, specification, and diversity of callosal projection neurons. *Trends Neurosci.* **34**, 41–50 (2011).
93. Cubelos, B. *et al.* Cux1 and Cux2 regulate dendritic branching, spine morphology and synapses of the upper layer neurons of the cortex. *Neuron* **66**, 523–535 (2010).
94. Nieto, M. *et al.* Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* **479**, 168–180 (2004).
95. Srinivasan, K. *et al.* A network of genetic repression and derepression specifies projection fates in the developing neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 19071–19078 (2012).
96. Cubelos, B. *et al.* Cux-1 and Cux-2 control the development of Reelin expressing cortical interneurons. *Dev. Neurobiol.* **68**, 917–925 (2008).
97. Arlotta, P. *et al.* Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* **45**, 207–221 (2005).
98. Ueda, M., Gräf, R., MacWilliams, H. K., Schliwa, M. & Euteneuer, U. Centrosome positioning and directionality of cell movements. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 9674–9678 (1997).
99. de Anda, F. C. *et al.* Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature* **436**, 704–708 (2005).
100. Fucini, R. V., Chen, J.-L., Sharma, C., Kessels, M. M. & Stamnes, M. Golgi vesicle proteins are linked to the assembly of an actin complex defined by mAbp1. *Mol. Biol. Cell* **13**, 621–631 (2002).
101. Jareb, M. & Banker, G. Inhibition of axonal growth by brefeldin A in hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **17**, 8955–8963 (1997).
102. Horton, A. C. *et al.* Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis. *Neuron* **48**, 757–771 (2005).
103. Bramham, C. R. & Wells, D. G. Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 776–789 (2007).
104. Ye, B., Zhang, Y. W., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. The secretory pathway and neuron polarization. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **26**, 10631–10632 (2006).
105. Dotti, C. G., Sullivan, C. A. & Banker, G. A. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **8**, 1454–1468 (1988).
106. Witte, H., Neukirchen, D. & Bradke, F. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J. Cell Biol.* **180**, 619–632 (2008).
107. da Silva, J. S. & Dotti, C. G. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat Rev Neurosci* **3**, 694–704 (2002).

108. Yamaguchi, Y., Katoh, H., Yasui, H., Mori, K. & Negishi, M. RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 18977–18983 (2001).
109. Aoki, K., Nakamura, T. & Matsuda, M. Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 713–719 (2004).
110. Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J. Cell Biol.* **107**, 1505–1516 (1988).
111. Borisy, G. G. & Svitkina, T. M. Actin machinery: pushing the envelope. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 104–112 (2000).
112. Watanabe, N. *et al.* p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* **16**, 3044–3056 (1997).
113. Machesky, L. M. *et al.* Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3739–3744 (1999).
114. Wittmann, T. & Waterman-Storer, C. M. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J. Cell Sci.* **114**, 3795–3803 (2001).
115. Schiff, P. B., Fant, J. & Horwitz, S. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **277**, 665–667 (1979).
116. Dehmelt, L., Smart, F. M., Ozer, R. S. & Halpain, S. The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 9479–9490 (2003).
117. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* **25**, 402–408 (2001).
118. Smith, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85 (1985).
119. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 (1970).
120. Saito, T. In vivo electroporation in the embryonic mouse central nervous system. *Nat. Protoc.* **1**, 1552–1558 (2006).
121. Fletcher, D. A. & Mullins, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**, 485–492 (2010).
122. Wehland, J., Henkart, M., Klausner, R. & Sandoval, I. V. Role of microtubules in the distribution of the Golgi apparatus: effect of taxol and microinjected anti-alpha-tubulin antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 4286–4290 (1983).
123. Piperno, G., LeDizet, M. & Chang, X. J. Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J. Cell Biol.* **104**, 289–302 (1987).
124. Yu, J.-Y., DeRuiter, S. L. & Turner, D. L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 6047–6052 (2002).
125. Rao, D. D., Vorhies, J. S., Senzer, N. & Nemunaitis, J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 746–759 (2009).

126. Mäkinen, P. I. *et al.* Stable RNA interference: comparison of U6 and H1 promoters in endothelial cells and in mouse brain. *J. Gene Med.* **8**, 433–441 (2006).
127. Hatanaka, Y., Zhu, Y., Torigoe, M., Kita, Y. & Murakami, F. From migration to settlement: the pathways, migration modes and dynamics of neurons in the developing brain. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **92**, 1–19 (2016).
128. Vasquez, R. J., Howell, B., Yvon, A. M., Wadsworth, P. & Cassimeris, L. Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell* **8**, 973–985 (1997).
129. Kalebic, N. *et al.* α TAT1 is the major α -tubulin acetyltransferase in mice. *Nat. Commun.* **4**, 1962–1962 (2013).
130. Caviness, V. S. Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain Res.* **256**, 293–302 (1982).
131. Bellion, A., Baudoin, J.-P., Alvarez, C., Bornens, M. & Métin, C. Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 5691–5699 (2005).
132. Shipp, S. The importance of being agranular: a comparative account of visual and motor cortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **360**, 797–814 (2005).
133. Wang, Y. & Seemann, J. Golgi Biogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
134. Lavieu, G. *et al.* The Golgi ribbon structure facilitates anterograde transport of large cargoes. *Mol. Biol. Cell* **25**, 3028–3036 (2014).
135. Siddhanta, A., Radulescu, A., Stankewich, M. C., Morrow, J. S. & Shields, D. Fragmentation of the Golgi Apparatus A ROLE FOR β III SPECTRIN AND SYNTHESIS OF PHOSPHATIDYLINOSITOL 4,5-BISPHOSPHATE. *J. Biol. Chem.* **278**, 1957–1965 (2003).
136. Joshi, G., Bekier, M. E. & Wang, Y. Golgi fragmentation in Alzheimer’s disease. *Front. Neurosci.* **9**, (2015).
137. Valderrama, F. *et al.* Actin microfilaments are essential for the cytological positioning and morphology of the Golgi complex. *Eur. J. Cell Biol.* **76**, 9–17 (1998).
138. Thyberg, J. & Moskalewski, S. Role of Microtubules in the Organization of the Golgi Complex. *Exp. Cell Res.* **246**, 263–279 (1999).
139. Marx, A. *et al.* Xenopus cytoplasmic linker-associated protein 1 (XCLASP1) promotes axon elongation and advance of pioneer microtubules. *Mol. Biol. Cell* **24**, 1544–58 (2013).
140. Gonatas, N. K. *et al.* Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Pathol.* **140**, 731–737 (1992).
141. Jaarsma, D. & Hoogenraad, C. C. Cytoplasmic dynein and its regulatory proteins in Golgi pathology in nervous system disorders. *Front. Neurosci.* **9**, 397 (2015).
142. Ferraiuolo, L. *et al.* Microarray analysis of the cellular pathways involved in the adaptation to and progression of motor neuron injury in the SOD1 G93A mouse model of familial ALS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **27**, 9201–9219 (2007).

143. Strey, C. W. *et al.* Dysregulation of stathmin, a microtubule-destabilizing protein, and up-regulation of Hsp25, Hsp27, and the antioxidant peroxiredoxin 6 in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Pathol.* **165**, 1701–1718 (2004).
144. Soo, K. Y. *et al.* Rab1-dependent ER-Golgi transport dysfunction is a common pathogenic mechanism in SOD1, TDP-43 and FUS-associated ALS. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **130**, 679–697 (2015).
145. Bellouze, S. *et al.* Golgi fragmentation in pmn mice is due to a defective ARF1/TBCE cross-talk that coordinates COPI vesicle formation and tubulin polymerization. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 5961–5975 (2014).
146. Polleux, F. & Snider, W. Initiating and growing an axon. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a001925 (2010).
147. Dent, E. W. & Kalil, K. Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **21**, 9757–9769 (2001).
148. Letourneau, P. C. & Ressler, A. H. Inhibition of neurite initiation and growth by taxol. *J. Cell Biol.* **98**, 1355–1362 (1984).
149. Nishita, M., Satake, T., Minami, Y. & Suzuki, A. Regulatory mechanisms and cellular functions of non-centrosomal microtubules. *J. Biochem. (Tokyo)* **162**, 1–10 (2017).
150. Stiess, M. *et al.* Axon Extension Occurs Independently of Centrosomal Microtubule Nucleation. *Science* **327**, 704–707 (2010).
151. Letourneau, P. C., Shattuck, T. A. & Ressler, A. H. Branching of sensory and sympathetic neurites in vitro is inhibited by treatment with taxol. *J. Neurosci.* **6**, 1912–1917 (1986).
152. Chuckowree, J. A. & Vickers, J. C. Cytoskeletal and morphological alterations underlying axonal sprouting after localized transection of cortical neuron axons in vitro. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 3715–3725 (2003).
153. Cartelli, D. *et al.* Microtubule dysfunction precedes transport impairment and mitochondria damage in MPP⁺-induced neurodegeneration. *J. Neurochem.* **115**, 247–258 (2010).
154. Fanara, P. *et al.* Stabilization of hyperdynamic microtubules is neuroprotective in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **282**, 23465–23472 (2007).
155. Weedon, M. N. *et al.* Exome Sequencing Identifies a DYNC1H1 Mutation in a Large Pedigree with Dominant Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 308–312 (2011).
156. Dubey, J., Ratnakaran, N. & Koushika, S. P. Neurodegeneration and microtubule dynamics: death by a thousand cuts. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 343–343 (2015).
157. Theiss, C. & Meller, K. Taxol impairs anterograde axonal transport of microinjected horseradish peroxidase in dorsal root ganglia neurons in vitro. *Cell Tissue Res.* **299**, 213–224 (2000).
158. Zhao, C. *et al.* Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2A Caused by Mutation in a Microtubule Motor KIF1B β . *Cell* **105**, 587–597 (2001).
159. Nicolini, G., Monfrini, M. & Scuteri, A. Axonal Transport Impairment in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Toxics* **3**, 322–341 (2015).

160. Rakic, P. Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res.* **33**, 471–476 (1971).
161. de Carlos, J. A., López-Mascaraque, L. & Valverde, F. Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **16**, 6146–6156 (1996).
162. Guerrini, R., Dobyns, W. B. & Barkovich, A. J. Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. *Trends Neurosci.* **31**, 154–162 (2008).
163. al, Q. X., et. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11086984>. (Accessed: 7th February 2018)
164. D’Arcangelo, G. *et al.* A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* **374**, 719–723 (1995).
165. Goffinet, A. M. The reeler gene: a clue to brain development and evolution. *Int. J. Dev. Biol.* **36**, 101–107 (1992).
166. Trommsdorff, M. *et al.* Reeler/Disabled-like Disruption of Neuronal Migration in Knockout Mice Lacking the VLDL Receptor and ApoE Receptor 2. *Cell* **97**, 689–701 (1999).
167. Howell, B. W., Hawkes, R., Soriano, P. & Cooper, J. A. Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* **389**, 733–737 (1997).
168. Jaglin, X. H. *et al.* Mutations in the β -tubulin gene *TUBB2B* result in asymmetrical polymicrogyria. *Nat. Genet.* **41**, 746 (2009).
169. Keays, D. A. *et al.* Mutations in α -Tubulin Cause Abnormal Neuronal Migration in Mice and Lissencephaly in Humans. *Cell* **128**, 45–57 (2007).
170. Kamiya, A. *et al.* A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1167–1178 (2005).
171. Lee, P. L., Ohlson, M. B. & Pfeffer, S. R. The Rab6-regulated KIF1C kinesin motor domain contributes to Golgi organization. *Elife* **4**, (2015).
172. Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y. & Niwa, S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 682–696 (2009).
173. She, Z.-Y., Pan, M.-Y., Tan, F.-Q. & Yang, W.-X. Minus end-directed kinesin-14 KIF1C regulates the positioning and architecture of the Golgi apparatus. *Oncotarget* **8**, 36469–36483 (2017).
174. Schlager, M. A. *et al.* Pericentrosomal targeting of Rab6 secretory vesicles by Bicaudal-D-related protein 1 (BICDR-1) regulates neuritogenesis. *EMBO J.* **29**, 1637–1651 (2010).
175. Theisen, U., Straube, E. & Straube, A. Directional Persistence of Migrating Cells Requires Kif1C-Mediated Stabilization of Trailing Adhesions. *Dev. Cell* **23**, 1153–1166 (2012).
176. Govek, E.-E., Newey, S. E. & Aelst, L. V. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* **19**, 1–49 (2005).

177. Brown, M. D., Cornejo, B. J., Kuhn, T. B. & Bamburg, J. R. Cdc42 stimulates neurite outgrowth and formation of growth cone filopodia and lamellipodia. *J. Neurobiol.* **43**, 352–364 (2000).
178. Barr, F. A., Puype, M., Vandekerckhove, J. & Warren, G. GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae. *Cell* **91**, 253–262 (1997).
179. Shorter, J. *et al.* GRASP55, a second mammalian GRASP protein involved in the stacking of Golgi cisternae in a cell-free system. *EMBO J.* **18**, 4949–4960 (1999).
180. Lázaro-Diéíguez, F. *et al.* Actin filaments are involved in the maintenance of Golgi cisternae morphology and intra-Golgi pH. *Cell Motil. Cytoskeleton* **63**, 778–791 (2006).
181. Sandoval, I. V., Bonifacino, J. S., Klausner, R. D., Henkart, M. & Wehland, J. Role of microtubules in the organization and localization of the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **99**, 113s–118s (1984).
182. Keating, T. J. & Borisy, G. G. Centrosomal and non-centrosomal microtubules. *Biol. Cell* **91**, 321–329 (1999).

6 Publikationstätigkeit

Wissenschaftliche Artikel

- **Lommatzsch S**, Kühnisch J, Bachmann S, Bormuth I, Tarabykin V, Seifert W. Cohen syndrome-associated protein Coh1 impairs Golgi-associated microtubule dynamics. 2018 (in preparation)
- Rancan F, Asadian-Birjand M, Dogan S, Graf C, Cuellar L, **Lommatzsch S**, Blume-Peytavi U, Calderón M, Vogt A. Effects of thermoresponsivity and softness on skin penetration and cellular uptake of polyglycerol-based nanogels. *J Control Release*. 2016 Apr 28; 228:159-69. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.02.047.
Impact factor: 7,705
- Seifert W, Kühnisch J, Maritzen T, **Lommatzsch S**, Hennies HC, Bachmann S, Horn D, Haucke V. Cohen syndrome-associated protein COH1 physically and functionally interacts with the small GTPase RAB6 at the Golgi complex and directs neurite outgrowth. *J Biol Chem*. 2015 Feb 6; 290(6):3349-58. doi: 10.1074/jbc.M114.608174.
Impact factor: 4,573
- Erler S, **Lommatzsch S**, Lattorff HM. Comparative analysis of detection limits and specificity of molecular diagnostic markers for three pathogens (Microsporidia, *Nosema* spp.) in the key pollinators *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Parasitol Res*. 2012 Apr; 110(4):1403-10. doi: 10.1007/s00436-011-2640-9.
Impact factor: 2,852

Poster

- **Stefanie Lommatzsch**, Jirko Kühnisch, Tanja Maritzen, Sebastian Bachmann, Denise Horn, Volker Haucke, Victor Tarabykin, Wenke Seifert. Golgi-associated Cohen syndrome protein Coh1 regulates neurite outgrowth *in vitro*. 13th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society 2017, Göttingen.
- **Stefanie Lommatzsch**, Jirko Kühnisch, Tanja Maritzen, Sebastian Bachmann, Denise Horn, Volker Haucke, Wenke Seifert. The small GTPase RAB6 regulates localization of the Cohen syndrome-associated protein COH1 to the Golgi complex. FEBS 2015, Berlin.
- Wenke Seifert, Jirko Kühnisch, Tanja Maritzen, **Stefanie Lommatzsch**, Malte Zorn, Malte Hofmeyer, Sebastian Bachmann, Denise Horn, Volker Haucke, Hans Christian Hennies. Interaction of the Cohen Syndrome-associated protein Coh1 with Rab6 and Ric1/Rgp1 emphasizes its role for Golgi function. GFH 2014, Italien.
- Wenke Seifert, Jirko Kühnisch, Tanja Maritzen, **Stefanie Lommatzsch**, Malte Zorn, Sebastian Bachmann, Denise Horn, Volker Haucke, Hans Christian Hennies. The Cohen syndrome-associated protein COH1 is a novel, giant Golgi matrix protein required for Golgi integrity. Golgi Symposia 2013, Österreich.

7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Stefanie Lommatzsch, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Literatur angefertigt habe. Alle Ausführungen, welche wörtlich oder sinngemäß anderen Schriften entnommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Die vorliegende Arbeit war in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer anderen Studien- oder Prüfungsleistung.

Berlin, den 08.03.2018

8 Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. W. Seifert für die Bereitstellung meines Dissertationsthemas, die Betreuung im Labor und die Hilfe bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit bedanken.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. S. Bachmann für die Möglichkeit, diese Arbeit im Institut für Vegetative Anatomie anzufertigen. Ein Teil dieser Arbeit wurde auch in der AG Cortical Development angefertigt, weshalb ich mich bei Prof. Dr. V. Tarabykin für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken möchte. Ich bedanke mich für eine angenehme Zusammenarbeit, aufschlussreiche Diskussionen sowie die freundliche Atmosphäre in beiden Arbeitsgruppen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. I. Bormuth für die Diskussionen und die Vermittlung wertvoller methodischer Ansätze. Für die technische Unterstützung im Labor möchte ich mich außerdem bei Julia Shpak bedanken. Für die Tipps im Umgang mit ImageJ möchte ich Robert Labes danken.

Im Rahmen der Vergabe des Promotionsabschlusstipendiums möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung für eine Förderungsdauer von einem Jahr bei der Nachwuchsförderung der Charité-Universitätsmedizin Berlin bedanken.

Im Rahmen meiner Zugehörigkeit zur Freien Universität Berlin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Wahl für die Übernahme meiner Betreuung herzlich bedanken.

Außerdem danke ich meinen Eltern und meinen Großeltern, welche mich besonders bei dem Gelingen meiner Arbeit unterstützt haben und mir in schweren Zeiten Mut gemacht haben.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Freunden, die stets ein offenes Ohr hatten und mich bei Rückschlägen an meine Stärken erinnert haben. Besonders möchte ich Anna Neugebauer und Pina Knauff erwähnen, welche von Kollegen zu Freunden wurden und immer mit dem richtigen Rat an meiner Seite standen.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.