

1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Informationen über das Differenzierungs- und Migrationsverhalten von Schwannzell-Vorläufern erhalten werden. ErbB3-defiziente Mäuse zeichnen sich aufgrund eines Differenzierungs- und Migrationsdefektes durch einen kompletten Verlust der Schwannzellen entlang der Axone aus und wurden daher als Basis für die hier durchgeführten Analysen ausgewählt, in deren Mittelpunkt die Identifizierung von Genen stand, die in den entsprechenden Differenzierungs- und Migrationsprozessen involviert sind.

Die Analyse der differentiellen Genexpression erfolgte unter Verwendung von dorsalen Spinalganglien von Wildtyp und ErbB3-defizienten Embryonen. Hierfür wurden DRG des Embryonaltages 12,5 isoliert und das Einsetzen der Auswanderung der Schwannzell-Vorläufer entlang der Axone durch *in vitro*-Explant-Kultur zeitlich definiert.

Aus diesen Kulturen wurde die gesamte RNA unter Verwendung unterschiedlicher Techniken amplifiziert, um ausreichende Mengen qualitativ hochwertiger RNA Populationen zu erhalten, die den jeweiligen transkriptionellen Status der DRG repräsentieren. Dabei wurden Varianten der PCR zur Anreicherung vollständiger Transkripte sowie *in vitro*-Transkriptionsverfahren genutzt. Anschließend wurde die so erhaltene DNA bzw. RNA der differentiellen Genanalyse unterworfen.

Mittels Subtraktiver Hybridisierung wurden vier unterschiedliche Gene identifiziert, von denen nur für eines differenzielle Expression bestätigt werden konnte. Die differenzielle Analyse mittels der „DNA-Micro-Array“-Technologie resultierte in der Identifizierung von nahezu 200 signifikant differenziell exprimierten Genen, von denen 25% der Organisation der extrazellulären Matrix zugerechnet werden können. Gene, die bekanntermaßen in den verwendeten System exprimiert sind, konnten hier die Validität der Ergebnisse bestätigen.

Sowohl im Rahmen der Subtraktiven Hybridisierung als auch der „DNA-Micro-Array“-Technologie wurde Periostin als das Gen, das eine signifikant höhere Expression in Wildtyp-DRG im Vergleich zu DRG von ErbB3-defizienten Embryonen aufzeigt, identifiziert. Da den Proteinen der extrazellulären Matrix während dieser Phase der Schwannzell-Entwicklung eine hohe Bedeutung zuzukommen scheint, wurde die Expression Periostins genauer charakterisiert und zunächst mittels Virtuellen Northern

Blots und der „Real-Time-PCR“ die differenzielle Expression Periostins bestätigt sowie das Ausmaß der Differenz quantifiziert.

Periostin ist ein Protein von 838 Aminosäuren mit einer typischen Signalsequenz und beinhaltet 4 Fasciclin I-artige Domänen. Bislang konnten 4 Isoformen, die sich C-terminal unterscheiden, identifiziert werden. Mittels durchgeführten 3'-RACE Analysen konnte die Expression zweier dieser Isoformen in den DRG detektiert werden. Periostin-Transkription konnte während der Embryonalentwicklung ab Tag 9 im sich bildenden Herzen sowie ab Tag 10 in den DRG, Knochen, der Lunge und der Leber nachgewiesen werden.

In Analysen der rekombinanten Expression in Säugerzellen konnten sowohl sekretiertes als auch intrazelluläres Protein identifiziert werden. Mittels generierter Domänenspezifischer Antikörper wurde die Expression Periostins auf Proteinebene in DRG-Kulturen sowie *in vivo* analysiert. Zur exakteren Charakterisierung der Periostin-Expression wurden zudem Sox10-heterozygote und homozygote Embryonen verwendet. Die Analyse von Proliferation und Apoptose in den DRG von Sox10-defizienten Embryonen zeigte, dass die Defekte hier nicht nur auf eine erhöhte Apoptoserate der Zellen, sondern auch auf reduzierte Proliferation zurückzuführen sind. Unter Verwendung der Markerproteine Islet1 und Sox10 konnte die Expression von Periostin in sowohl glialen und neuronalen wie Neuralleistenzellen der DRG belegt werden. Da die Periostin-Expression sowohl in ErbB3- als auch in Sox10-Mutanten nachgewiesen werden konnte, ist die Expression offensichtlich nicht direkt von Sox10 oder ErbB3 abhängig.

Proteinstruktur und Expression sowie bisherige biochemische Charakterisierungen von Periostin deuten darauf hin, dass Periostin eine bedeutende Rolle in der Migration und Differenzierung von Schwannzell-Vorläufern zukommen kann.

Summary

The aim of this study was to provide information about differentiation and migration of Schwann cells precursors. ErbB3 deficient mice are characterised by a defect in differentiation and migration and exhibit a complete loss of Schwann cells along the axons. Therefore dorsal root ganglia (DRG) from ErbB3 deficient and wild-type embryos were used as a system to identify genes that are involved in the process of migration and differentiation.

DRG were isolated at embryonic day 12.5 and cultured to temporally define the initiation of Schwann cell migration. Total-RNA was isolated and cDNA was amplified by a PCR-based method to generate full-length transcripts or by *in-vitro* transcription. Subsequently this amplified DNA and RNA were used for the identification of the differentially expressed genes.

Via subtractive hybridisation four genes were identified, and one of these four could be confirmed as being differentially expressed. The differential expression analysis using the DNA microarray technology revealed almost 200 significantly differentially expressed genes in which roughly 25 percent represented proteins of the extracellular matrix. These proteins are known to have a high impact on schwann-cell development at this stage. The validity of this experiment could be confirmed by identification of genes known as differentially expressed in this system.

In the subtractive hybridisation as well as in the DNA microarray Periostin was identified as the most significantly differentially expressed gene. It showed a higher expression in wildtyp DRG compared to DRG of ErbB3 deficient embryos. In light of these results, the expression pattern of Periostin was characterised. The differences in expression were confirmed by virtual northern blotting and quantified by real time PCR. Periostin, a 838 amino acid protein, is comprised by four fasciclin-like domains and a typical signal sequence. The four isoforms known to date differ in their C-terminal parts. 3'-RACE experiments provided evidence for the expression of two isoforms in the DRG. Periostin transcription could be detected during embryonic development ongoing from day 9 in the developing heart and at day 10 in the DRG, bones, lung and liver.

Secreted as well as cellular protein was obtained by recombinant expression in mammalian cells. After generation of domain-specific antibodies, the Periostin expression was analysed in DRG explant cultures and *in vivo*. To more precisely analyse the Periostin expression pattern, DRG of Sox 10 heterozygous and homozygous embryos were used. The analyses of proliferation and apoptosis in DRG of Sox 10 deficient embryos demonstrate that the defect of the DRG is not only caused by apoptotic processes but also by a reduced proliferation. By the use of the marker proteins Sox 10 and Islet 1 the expression of Periostin could be confirmed in glial, neuronal and neural crest cells. Periostin expression was also detectable in ErbB 3 and Sox 10 deficient mice. These result demonstrated that the Periostin expression is not directly dependent on Sox 10 or ErbB 3 expression. Protein structure and biochemical data suggest that Periostin might be implicated in the migration and differentiation of Schwann cell precursors.

2 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Gene identifiziert werden, die an der Differenzierung und Migration der peripheren Glia beteiligt sind. Hierzu wurde RNA von dorsalen Spinalganglien von Wildtyp und ErbB3-defizienten Embryonen, die sich durch den kompletten Verlust der Schwannzellen entlang der Axone der peripheren Nerven auszeichnen, mittels unterschiedlicher Techniken zur differentiellen Expressionsanalyse untersucht. Die Resultate dieser Analysen wurden vergleichend betrachtet und differentiell exprimierte Gene detaillierteren Analysen unterzogen.

2.1 Periphere Glia

2.1.1 Neuralleistenzellen

Periphere Gliazellen sind Neuralleistenderivate, die vom Neuroepithelium des dorsalen Randes des Neuralrohrs abstammen. Zur Ablösung vom Neuralrohr differenzieren die prä-migratorischen epithelähnlichen Zellen zunächst zu migrierenden mesenchymalen Zellen. Dabei wird die Induktion der Neuralleiste durch die „Bone Morphogenetic Proteins“ (BMP), im Speziellen durch BMP-4, reguliert (Liem *et al.*, 1995). Anschließend wandern die Zellen lateral und ventral, wobei sie verschiedenen Differenzierungssignalen ausgesetzt sind.

Bei Beginn der Zellwanderung sind die meisten Neuralleistenzellen noch multipotent und weisen entlang der rostro-kaudalen Achse das gleiche Differenzierungspotential auf (Bronner-Fraser und Fraser, 1988). Während der Wanderung sind jedoch selektive und instruktive Signalmechanismen für das Schicksal der Zellen verantwortlich. So konnte gezeigt werden, dass das Schicksal der Zellen in Abhängigkeit von der jeweiligen Umgebung beeinflusst werden kann (Le Douarin, 1993). Bei den meisten Neuralleistenzellen wird ihr Schicksal während der Migration oder kurz vor Erreichen der Zielgewebe definiert, wobei jedoch einige Zellen ihre Multipotenz beibehalten (Le