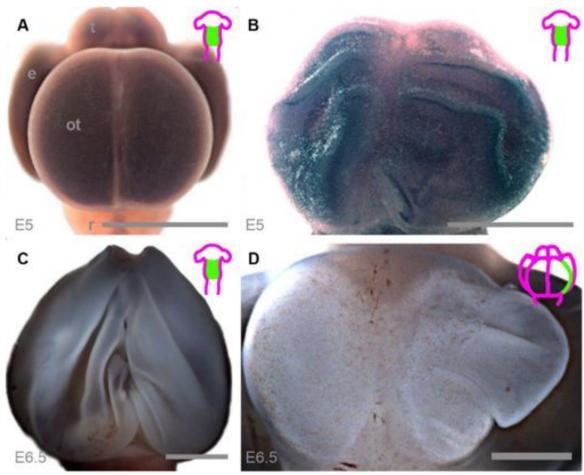


Einleitung

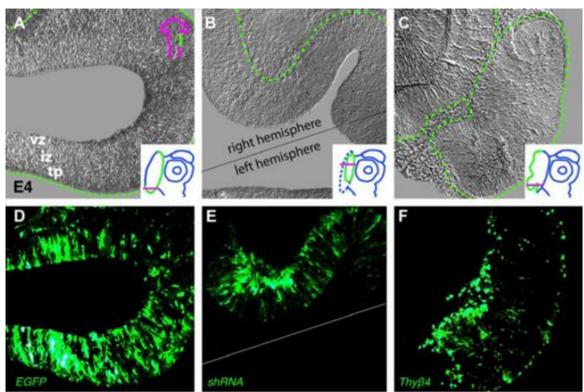
Thymosin $\beta 4$ (T $\beta 4$) ist ein kleines, stark konserviertes Polypeptid, das in fast allen Säugerzellen exprimiert wird und viele verschiedene intra- und extrazelluläre Funktionen ausübt. Über die Regulierung des Verhältnisses zwischen filamentärem und globulärem Aktin steigert T $\beta 4$ Zellbewegung und -migration. Darüber hinaus spielt es bei Wundheilungsprozessen und der Regenerierung von Geweben eine bedeutende Rolle, indem es u.a. das Zellüberleben unterstützt und Stammzellen zur Proliferation anregt. Wegen dieser Eigenschaften ist T $\beta 4$ auch für die Tumorforschung von Interesse. Seine Auswirkungen auf die Entwicklung des zentralen Nervensystems wurden aber bisher kaum erforscht.

Zielsetzung

Das Ziel unserer Studie ist es, die physiologische Expression von T $\beta 4$ im optischen Tektum des Huhns zu untersuchen und die Rolle der Fehlexpression von T $\beta 4$ zu analysieren. Mittels der in-situ Hybridisierung kann man die Expression von T $\beta 4$ in den frühen Entwicklungsstadien des Hühnerembryos gut darstellen. Um die Frage seiner Relevanz auf die Entwicklung des optischen Tektums zu beantworten, werden Überexpressions- und Knockdownplasmide in das Gehirn von 2 Tage alten Hühnerembryonen elektroporiert und nach 2 weiteren Tagen Brütung fixiert. Mithilfe von immunhistochemischen Färbungen und der konfokalen Lasermikroskopie können so die Effekte einer Über- bzw. Unterexpression von T $\beta 4$ untersucht werden. Es werden sowohl neuronale (DCX, Tuj1), gliale (GFAP) und radialgliale (Vimentin 3B4) Marker eingesetzt.



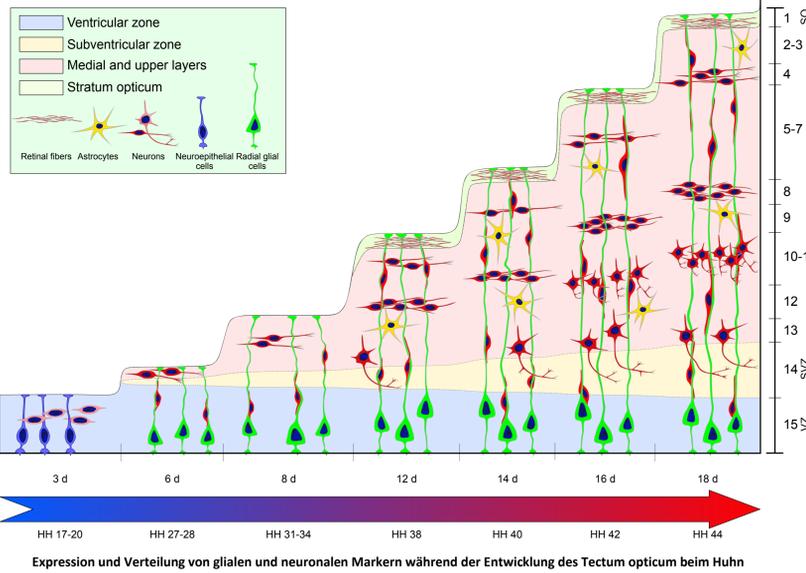
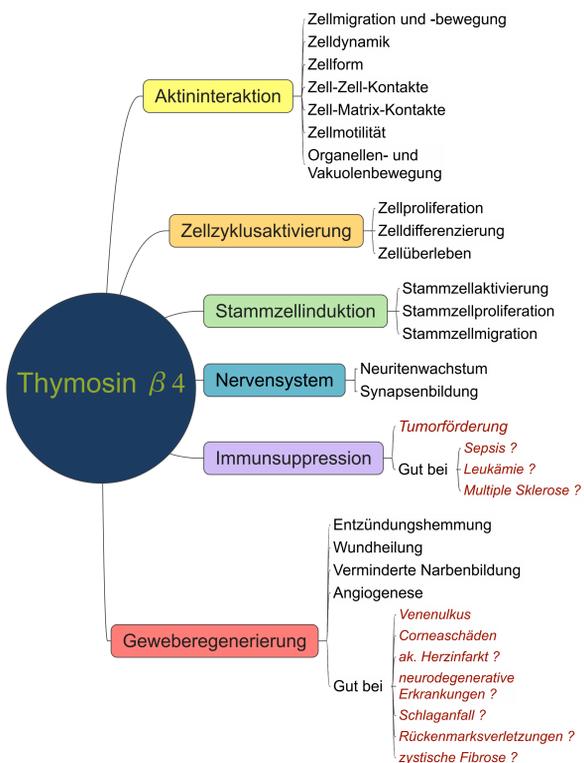
Die retrovirale T $\beta 4$ -Überexpression führt zu einer Vergrößerung und Faltung des OT
Dorsaler Blick auf optische Tektum nach in-situ Hybridisierung (A, B) und nativ (C, D). In der Zeichnung ist der injizierte Bereich grün markiert.
A, B: E5, 72 Stunden Inkubation nach intraluminärer Injektion (A: leeres RCAS als Kontrolle; B: RCAS-T $\beta 4$ für Überexpression)
C, D: E6,5; 4,5 Tage Inkubation nach der Injektion von RCAS-T $\beta 4$
E: E6,5; 72 Stunden Inkubation nach rechtsseitiger Injektion von RCAS-T $\beta 4$. Nur die injizierte Seite ist vergrößert und gefaltet.
e: Auge; t: Telencephalon; ot: optisches Tektum; r: Rhombencephalon.
Maßstab: 1000 μ m.



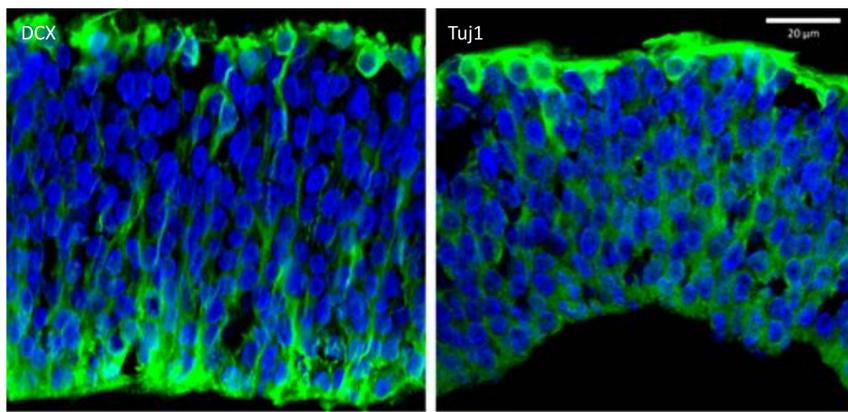
Die T $\beta 4$ -Expression reguliert das Wachstum des OT
E4, optische Tektum 48 Stunden nach einseitiger Elektroporation von EGFP-exprimierenden Vektorplasmiden in E2-Hühnerembryonen. Kontrolle (li.), Knockdown (Mitte), Überexpression (re.)
Horizontale Schnitte wie bei A, B und C mit rotem Strich gezeigt.

li.: EGFP-Leerplasmid führt zu keiner makroskopischen Veränderung.
Mitte: Herunterregulierung von T $\beta 4$, Hemmung des Wachstums der manipulierten Hemisphäre und Verschiebung der mittleren Achse.
Re.: T $\beta 4$ -Überexpression führt zum Wachstum einer Protuberanz, die ihre epitheliale Struktur zum Teil verloren hat.
vz: ventrikuläre Zone; iz: intermediäre Zone; tp: tectale Platte. Grüne gestrichelte Linie in A-C: basale neuroepitheliale Grenze.
Maßstab: 100 μ m.

Wirsching et al. (J Comp Neurol, in press)

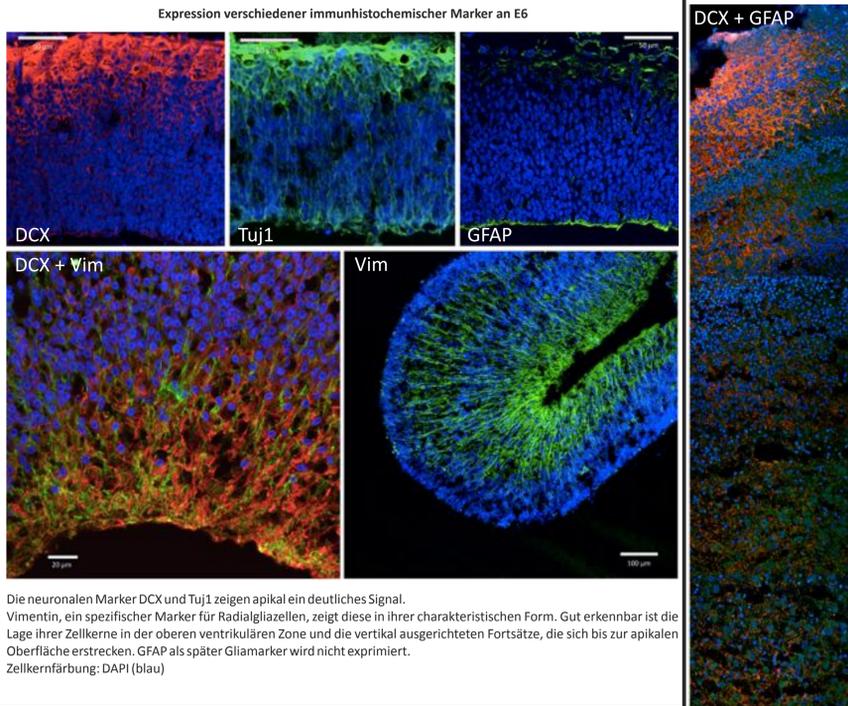


Expression und Verteilung von glialen und neuronalen Markern während der Entwicklung des Tectum opticum beim Huhn



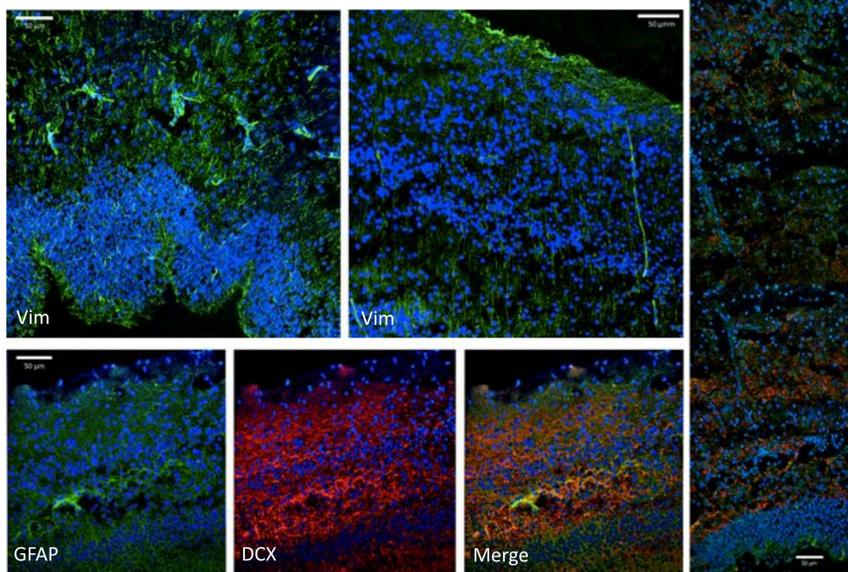
Frühe Expression der neuronalen Marker DCX und Tuj1 an E4

Darstellung der Perikarya an der apikalen Oberfläche und der Fortsätze (vertikal und tangential) der Nervenzellen durch DCX und Tuj1. Zellkernfärbung: DAPI



Expression verschiedener immunhistochemischer Marker an E6

Die neuronalen Marker DCX und Tuj1 zeigen apikal ein deutliches Signal. Vimentin, ein spezifischer Marker für Radialgliazellen, zeigt diese in ihrer charakteristischen Form. Gut erkennbar ist die Lage ihrer Zellkerne in der oberen ventrikulären Zone und die vertikal ausgerichteten Fortsätze, die sich bis zur apikalen Oberfläche erstrecken. GFAP als späterer Glialmarker wird nicht exprimiert. Zellkernfärbung: DAPI (blau)



Expression verschiedener immunhistochemischer Marker an E13

Ab E13 lassen sich Radialgliazellen sowohl mit Vimentin als auch mit GFAP anfärben. Das Signal ist vor allem ventrikulär ausgeprägt, und auf der ganzen Höhe des optischen Tektums sind die Fortsätze der Radialgliazellen zu sehen. Apikal erkennt man die ersten ausdifferenzierten Astrozyten. Die neuronalen Marker DCX und Tuj1 werden weiterhin exprimiert, am stärksten in den oberen Schichten. Die typische Form der Neuronen mit ihren Ausläufern ist gut erkennbar.
Re.: Die komplexe Schichtung des Tectum opticum ist bereits nach 13 Tagen Entwicklung angelegt.
Zellkernfärbung: DAPI (blau)

Ergebnisse und Zusammenfassung

Eine durch Elektroporation induzierte Überexpression von Thymosin $\beta 4$ im Tectum opticum des Hühnerembryos führt zu einer deutlichen Proliferation des Gewebes.

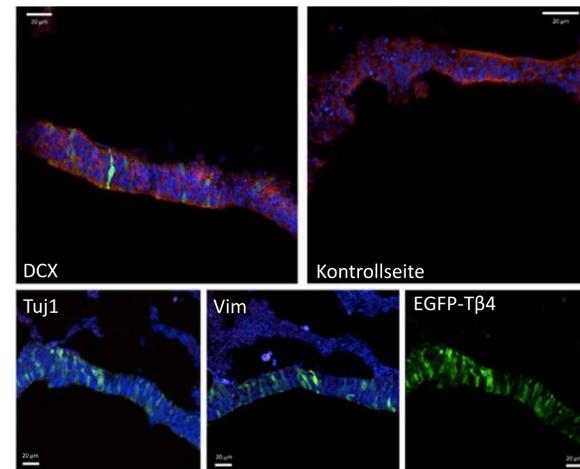
Die retrovirale Überexpression von Thymosin $\beta 4$ verursacht eine starke Zellvermehrung, die zu einer ausgeprägten Auffaltung des Tectum opticum führt, die an Sulci und Gyri erinnert. Bereits einen Tag nach der Elektroporation sieht man eine Größenzunahme der elektroporierten Hemisphäre.

Mittels der Proteine Doublecortin (DCX), β III-Tubulin (Klon Tuj1), Vimentin und GFAP werden unabhängig vom Entwicklungsstadium die Zellen der neuronalen und der glialen Linie unterschieden. Dabei ist DCX nach drei Tagen detektierbar und zeigt viele frühe Neurone, während Tuj1 einen Tag später erstmals exprimiert wird und Fortsätze sichtbar werden. Am 6. Tag wird auch der erste gliale Marker Vimentin (Radialgliazellen) sichtbar. GFAP hingegen markiert Radialgliazellen, die ihren Reifungsprozess zu den Astrozyten bereits begonnen haben. Diese Zellen sind im Hühnerembryo ab dem zwölften Tag zu beobachten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Thymosin $\beta 4$ positiv auf die Proliferation der Zellen im Tectum opticum wirkt, und darüber hinaus unentbehrlich für die Entwicklung ist.

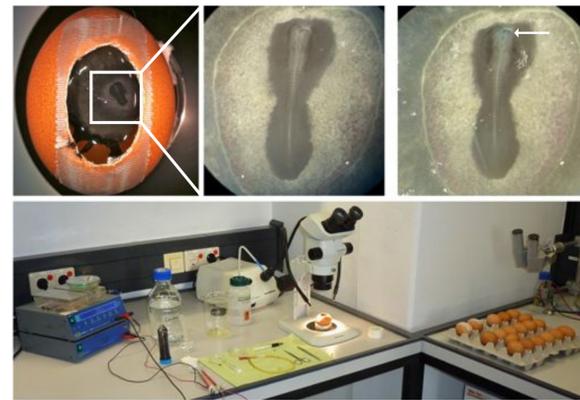
Expression der verwendeten immunhistochemischen Marker

	3d	4d	6d	13d
DCX (Doublecortin)	+	+	+	+
Tuj1 (β III-Tubulin)	-	+	+	+
Vimentin	-	-	+	+
GFAP	-	-	-	+



Immunhistochemischer Vergleich der elektroporierten und nicht elektroporierten Mesencephalonhälfen einen Tag nach der Elektroporation

Mesencephalon vom Hühnerembryo, Elektroporation bei E2 und Fixation bei E3
Oben li.: Elektroporierte Seite; viele Zellen exprimieren EGFP-T $\beta 4$ (grün). Der Großteil der anderen Zellen exprimiert DCX (rot). Insgesamt erkennen wir 5 Zellschichten.
Oben re.: Kontrollseite; es ist kein EGFP-Signal detektierbar, DCX wird schwächer exprimiert. Es sind 2 Zellschichten angelegt.
Unten: Elektroporierte Seite; es sind viele EGFP-T $\beta 4$ positive Zellen sichtbar (grün). Tuj1 (neuronal) und Vimentin [(radial)glial] werden noch nicht exprimiert. Re.: nur EGFP-T $\beta 4$.
Zellkernfärbung: DAPI (blau)



Material und Methoden

In-ovo Elektroporation

Hühnererier werden ca. 48 Stunden lang bebrütet, bis die Embryos sich im Stadium HH 11 bis 13 befinden. Für die Elektroporation werden die Eier auf die Seite gelegt, so dass der Embryo auf dem Eigelb schwimmt. Mit einer sterilen 2 mL Spritze wird von der stumpfen Seite des Ei aus ca. 1,5 mL Albumin entnommen. Danach wird ein 2 cm langes ovales Fenster aus der oberen Hälfte der Schale geschnitten. Der Embryo ist so frei zugänglich. Zwischen Keimscheibe und Dotter wird 10%ige schwarze Tinte gespritzt, um den Kontrast zu erhöhen.

Unter einem Dissektionsmikroskop (Olympus) reißt man mit einer Kapillare vorsichtig die Vitellinmembran auf. Die Kapillare mit dem Plasmid wird kaudal der Hirnbläschen in das Neuralrohr des Embryos flach eingeführt und bis zum rechten Rand des 3. Hirnbläschens vorgeschoben. Das Plasmid wird eingeblasen, während die Kapillare entlang der rechten Hirnbläschen herausgezogen wird. Mit einer Plastik Transferpipette werden 1-2 mL Ringer-Lösung auf den Embryo getropft. Die Anode wird rechts, die Kathode links des Kopfereiches des Embryos gehalten, und dann wird die Elektroporation mit einem Electro Square Porator™ FCM 830 (BTX Inc.) durchgeführt (5 Pulse von 20 ms und 27 mV, 200 ms). Anschließend wird das Arbeitsfenster mit Durapore™ tape verschlossen und die Embryos werden 48 Stunden weiterbebrütet.

Plasmide und Retroviren

Das T $\beta 4$ -Überexpressionsplasmid besteht aus der T $\beta 4$ -kodierenden DNA-Sequenz, die mit einer für EGFP kodierenden Sequenz gekoppelt ist. Die Herunterregulierung wird über eine mit EGFP gekoppelte shRNA (von Dr. F. Dai für die AG Brand-Saberi entwickelt) erreicht. Kurz vor der Elektroporation werden die Plasmide mit Fast Green Pulver vermischt. Die Retroviren und Plasmide stammen von vorherigen Arbeiten der AG Brand-Saberi, näheres dazu in Wirsching et al. (J Comp Neurol, in press)

Kryoschnitte

Die Embryos werden über Nacht in 4%igem PFA fixiert, und danach zeitnah in Cryogluce (SLEE) eingebettet und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Köpfe werden bei -20° C mit einem Cryostat Jung CM 3000 (Leica) 20 μ m dick geschnitten.

Immunhistochemie

Die Schnitte werden 10 Minuten lang mit 1% Triton X-100 permeabilisiert. Als neuronaler Marker werden anti-DCX (Doublecortin aus Kaninchen) und anti- β III-Tubulin, clone Tuj1 (aus Maus, R&D Systems) benutzt. Anti-Vimentin 3B4 (aus Maus, Progen) wird als Marker für Radialgliazellen eingesetzt. Anti-Mouse-TRITC und FITC, anti-Rabbit-TRITC und FITC (alle vier Sigma-Aldrich) werden als sekundäre Antikörper verwendet und DAPI (Hoechst) als Zellkernfärbung. Die immunhistochemischen Färbungen werden an einem konfokalen Laserscanningmikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss) analysiert.

Danksagung

Die Autoren möchten sich bei A. Ludwig, B. Menzel, und H.-T. Nguyen für die technische Assistenz bedanken, ebenso wie bei A. Conrad und A. Lenz für ihre organisatorische Unterstützung. Ein besonderer Dank geht an Gabriela Morosan-Puopolo für ihre Unterstützung und Beratung zur Elektroporation.