

SONDERDRUCK

aus

3 | 2023

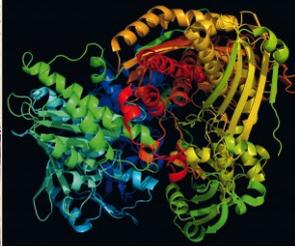
VBio

Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland



MIKROBIOLOGIE

Geschichte
der Bierhefe



BIOCHEMIE

Kein Leben
ohne Molybdän!



**MOLEKULARE
ZOOLOGIE**

Multitasking in
Epithelmuskelzellen

BIOLOGIE

IN UNSERER ZEIT



**Evolution
des Neokortex**

Die Evolution des Neokortex

Wie menschengespezifische Gene den Primaten-Neokortex vergrößerten

MICHAEL HEIDE | WIELAND B. HUTTNER



Abb.: www.pixabay.com.

Einblicke in die humane Neokortex-Evolution: Vermutlich bereitete eine partielle Genduplikation in Kombination mit einer Punktmutation den Weg für den großen und gefalteten menschlichen Neokortex. Dieses Gen, ARHGAP11B, kann ein Primatengehirn vergrößern und dessen Faltung induzieren (Abbildung 1). Die Identifizierung und Charakterisierung dieses Gens und ein Überblick über andere menschengespezifische Gene mit einer möglichen Rolle in der Neokortex-Expansion werden in diesem Artikel beschrieben.

Die mit einem grünen Pfeil markierten Begriffe werden im Glossar auf Seite 249 erklärt.

Der Neokortex ist eine faszinierende Gehirnstruktur – nicht nur weil er Sitz unserer außerordentlichen kognitiven Fähigkeiten ist, sondern auch wegen seiner sehr interessanten evolutionären Geschichte. Die neuronalen Bausteine des Neokortex sind Neurone und Gliazellen, die hauptsächlich von kortikalen Stamm- und Vorläuferzellen in den Keimzonen des sich entwickelnden Neokortex gebildet werden. Bei diesen Keimzonen lassen sich bei allen Säugetieren eine Ventrikularzone (VZ) und eine Subventrikularzone (SVZ) unterscheiden (Abbildung 2) [1, 2]. Entsprechend werden die Stamm- und Vorläuferzellen nach ihrer Position in den Keimzonen in apikale und basale Vorläuferzellen eingeteilt. Die Zellkörper apikaler Vorläuferzellen befinden sich in der apikal gelegenen VZ, wohingegen die Zellkörper basaler Vorläuferzellen in der basal zur VZ liegenden SVZ verortet sind (Abbildung 2). Des Weiteren weisen diese Vorläuferzellen wesentliche Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation zum Zeitpunkt ihrer Zellteilung auf. Während sich die apikalen Vorläuferzellen in der VZ typischerweise nur direkt an der Oberfläche des Ventrikels (apikal) teilen, können sich basale Vorläuferzellen überall innerhalb der SVZ teilen. Somit ist die Anzahl der sich teilenden apikalen Vorläuferzellen durch die Größe der Ventrikeloberfläche begrenzt. Die Anzahl sich teilender basaler Vorläuferzellen ist hingegen lediglich durch die radiale Dicke der SVZ begrenzt. Hinzu kommt, dass – je nach Spezies – die SVZ im sich entwickelnden Neokortex viel dicker sein kann als die VZ. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die SVZ und basale Vorläuferzellen eine entscheidende Rolle in der Neokortex-Expansion einnehmen. Dementsprechend ist die SVZ in Säugetierspezies mit einem großen und gefalteten Neokortex und insbesondere in Primaten – allen voran im Menschen – expandiert und kann morphologisch in eine innere und eine äußere SVZ eingeteilt werden (Abbildung 2) [1, 2].

Darüber hinaus lassen sich Unterschiede in der Zusammensetzung der unterschiedlichen Vorläuferzelltypen zwischen Säugetierspezies mit einem kleinen und ungefalteten Neokortex und Säugetierspezies mit einem großen und gefalteten Neokortex wie z. B. Primaten feststel-

len. Während in der VZ bei beiden Klassen von Säugetieren die apikalen Vorläuferzellen hauptsächlich apikale radiale Gliazellen sind, existieren in der Zusammensetzung der basalen Vorläuferzellen in der SVZ erhebliche Unterschiede: In Säugetierspezies mit einem kleinen und ungefalteten Neokortex setzen sich die basalen Vorläuferzellen hauptsächlich aus basalen intermediären Vorläuferzellen und sehr wenigen basalen radialen Gliazellen zusammen. Im Gegensatz dazu ist der Anteil an basalen radialen Gliazellen bei Säugetieren mit einem großen und gefalteten Neokortex, insbesondere bei Primaten, wesentlich größer (Abbildung 2) [1, 2]. Man geht daher davon aus, dass die basalen radialen Gliazellen vermutlich einen entscheidenden Beitrag zur Neokortex-Expansion leisten. Die unterschiedlichen Vorläuferzellen bzw. deren Aktivität und Verhalten bilden die primäre Grundlage für die Expansion des Neokortex.

Die Aktivität und das Verhalten der Vorläuferzellen werden von Genen kontrolliert, die in diesen Zellen exprimiert sind. Somit ist die Information, die in der DNA kodiert ist, entscheidend für die Größe und Faltung des Neokortex, und evolutionäre Veränderungen dieser Information liegen der Expansion des menschlichen Neokortex zugrunde. Diese Veränderungen reichen vom Austausch einzelner Nukleotide bis hin zur Generierung neuer Gene. In den letzten Jahren zeigte sich, dass insbesondere neue Gene, die in der humanen Linie nach ihrer Abspaltung von der Linie, die zu Schimpanse und Bonobo führte, entstanden sind, vermutlich einen entscheidenden Beitrag zur Expansion des humanen Neokortex leisteten. Dies sind sogenannte menschenpezifische Gene.

Suche nach einem menschenpezifischen Gen mit einer Rolle in der Neokortex-Expansion

Wie findet man ein Gen, das menschenpezifisch ist und zusätzlich noch eine Rolle in der menschlichen Neokortex-Expansion hat? Wie in der Einleitung erwähnt, sollte ein solches Gen in Vorläuferzellen exprimiert sein. Ferner sollte ein solches Gen, falls es eine Rolle in der Vermehrung von Zellen spielt, nicht oder nur sehr schwach in Neuronen exprimiert sein, da diese im Gegensatz zu Vorläuferzellen nicht mehr proliferieren. Um solche Gene zu identifizieren, hat eine frühere Doktorandin in unserem Labor, Marta Florio, mithilfe von *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) verschiedene Populationen von Vorläuferzellen bzw. Neurone des sich entwickelnden murinen (aus Mäusen stammenden) und humanen Neokortex isoliert [3]. Anschließend wurden die Transkriptome dieser Zellpopulationen miteinander verglichen, um Gene zu identifizieren, die spezifisch in Vorläuferzellen exprimiert sind. Dazu wurde zunächst nach Genen gesucht, die stärker in Vorläuferzellen als in Neuronen exprimiert sind. Von diesen wurden dann jene Gene entfernt, die auch in den Vorläuferzellen bzw. in den Keimzonen des embryonalen Mausneokortex exprimiert sind. In einem nächsten Schritt wurden Gene entfernt, die in einer früheren Studie

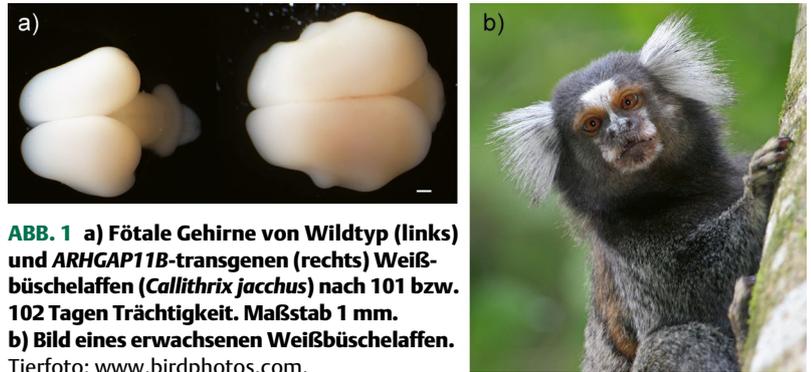


ABB. 1 a) Fötale Gehirne von Wildtyp (links) und *ARHGAP11B*-transgenen (rechts) Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) nach 101 bzw. 102 Tagen Trächtigkeit. Maßstab 1 mm. b) Bild eines erwachsenen Weißbüschelaffen. Tierfoto: www.birdphotos.com.

[4] eine Expression in der kortikalen Platte des Menschen zeigten. Schließlich wurden noch alle jene Gene entfernt, die ein Ortholog im Mausgenom besitzen. Diese sequentiellen Schritte reduzierten die Anzahl an Kandidatengen von ursprünglich rund 400 auf 56. Eines dieser Gene zeigte ein Expressionsmuster, das außerordentlich spezifisch für Vorläuferzellen war: *ARHGAP11B* [3]. Weitere Analysen zeigten, dass dieses Gen nicht nur der Maus fehlt, sondern dass es menschenpezifisch ist. Diese Eigenschaft von *ARHGAP11B* war erstmals von der Arbeitsgruppe von Evan Eichler beschrieben worden, die 2010 gezeigt hatte, dass *ARHGAP11B* durch eine segmentale Duplikation eines Teils des ubiquitären Gens *ARHGAP11A* entstanden war [5] (Abbildung 3).

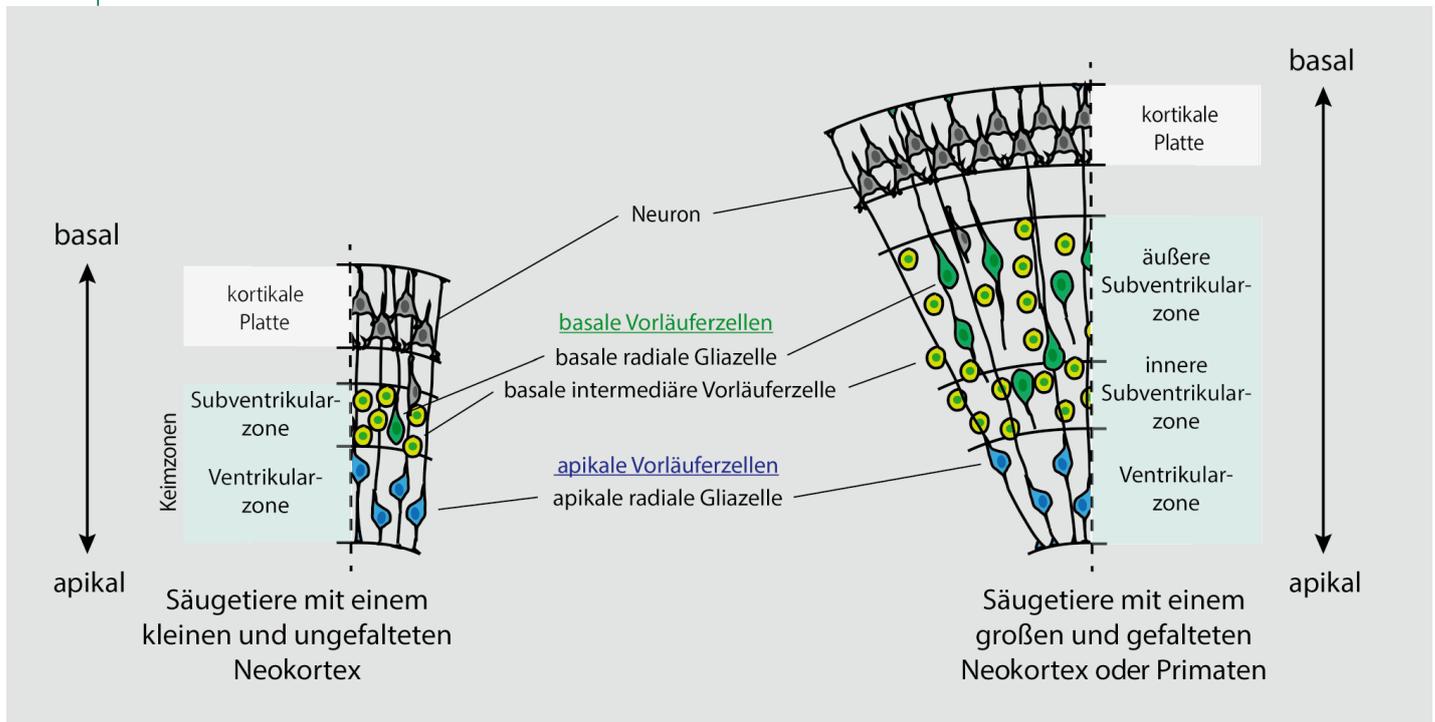
Wirkung von *ARHGAP11B* in Embryonen von Maus und Frettchen

Welche Rolle spielt *ARHGAP11B* in der Entwicklung des Neokortex? Erste funktionelle Studien erfolgten in der Maus, und es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *ARHGAP11B* in Mausembryonen durch *in utero*-► Elektroporation bzw. die durch Mikroinjektion induzierte Expression von *ARHGAP11B* in einzelnen apikalen Vorläuferzellen zu einer Vergrößerung des basalen Vorläuferzellpools führte. Darüber hinaus resultierte die Elektroporation von *ARHGAP11B* in der Hälfte aller elek-

IN KÜRZE

- *ARHGAP11B* ist ein **menschenpezifisches Gen**, das bevorzugt in kortikalen Vorläuferzellen exprimiert ist.
- *ARHGAP11B* kann die **relevanten Vorläuferzellen** in Maus- und Frettchenembryonen **vermehrten**.
- *ARHGAP11B* kann den Primatenneokortex vergrößern und dessen **Faltung induzieren**.
- *ARHGAP11B* befindet sich in Mitochondrien und **verstärkt die Glutaminolyse**.
- *ARHGAP11B*-transgene Mäuse zeigen eine **erhöhte Flexibilität des Gedächtnisses** und sind **weniger ängstlich**.
- *ARHGAP11B* wird in **menschlichen Hirnorganoiden** benötigt, um die große Anzahl an basalen radialen Gliazellen zu erhalten.
- Andere menschenpezifische Gene, wie z.B. *NOTCH2NL*, könnten einen **ähnlichen Effekt auf die Neokortex-Expansion** haben wie *ARHGAP11B*.

ABB. 2 | ZYTOARCHITEKTUR DES SICH ENTWICKELNDEN NEOKORTEX



Schematische Darstellung zweier Schnitte durch die sich entwickelnde neokorticale Wand eines Säugtiers mit einem kleinen und ungefalteten Neokortex (links), und eines Säugtiers mit einem großen und gefalteten Neokortex oder eines Primaten (rechts).

proporierten Mausembryonen sogar in einer Faltung des normalerweise ungefalteten Mausneokortex [3]. Allerdings ist bei diesen Befunden zu berücksichtigen, dass sich die Maus – wie in der Einleitung beschrieben – in der neokortikalen Entwicklung in Bezug auf Morphologie und Vorläuferzellpopulation sehr vom Menschen unterscheidet. Somit stellte sich die Frage, welche Effekte *ARHGAP11B* in einem Modellorganismus haben würde, dessen neokorticale Entwicklung in vielen Aspekten der des Menschen ähnelt. Ein solcher Modellorganismus ist das Frettchen, dessen SVZ – wie beim Menschen und im Gegensatz zu der Maus – eine innere und äußere SVZ aufweist, und die einen wesentlich größeren Pool an basalen radialen Gliazellen als die Maus besitzt. Tatsächlich zeigte die Überexpression von *ARHGAP11B* in Frettchenembryonen durch *in utero*-Elektroporation, dass *ARHGAP11B* die basalen radialen Gliazellen, also die relevanten Vorläuferzellen, vermehrt und zu einer verstärkten Produktion von Neuronen der äußeren kortikalen Schichten (den sogenannten *upper layer neurons*) führt [6]. Zusammenfassend legten diese Daten nahe, dass *ARHGAP11B* durch Vergrößerung des relevanten Vorläuferzellpools tatsächlich eine Schlüsselrolle in der humanen Neokortex-Expansion gespielt haben könnte. Allerdings waren zwei Schlüsselfragen noch unbeantwortet:

1. Kann *ARHGAP11B* tatsächlich ein Primatengehirn vergrößern und möglicherweise sogar dessen Faltung induzieren?

2. Kann *ARHGAP11B* dies erreichen, wenn es – im Gegensatz zu der Überexpression in Maus- und Frettchenembryonen – auf annähernd physiologischem Niveau exprimiert wird?

ARHGAP11B kann ein Primatengehirn vergrößern und dessen Faltung induzieren

Um diese beiden Fragen zu beantworten, wurde ein geeignetes Primatenmodell benötigt, das zum einen genetisch verändert werden kann und zum anderen die entsprechende Neokortex-Morphologie besitzt. Der Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*) stellte ein ideales Modell dafür dar, da er zum einen ein für Primaten relativ kleines, fast ungefaltetes Gehirn besitzt, und zum anderen bereits erfolgreich genetisch verändert wurde [7]. Die Zusammenarbeit mit diesen japanischen Kollegen ermöglichte die Nutzung dieser Technologie. Um eine Expression von *ARHGAP11B* in den Weißbüschelaffen zu erreichen, die in etwa der Expression im fötalen humanen Neokortex entspricht, haben wir ein ► lentivirales Konstrukt erstellt, das die proteinkodierende Sequenz von *ARHGAP11B* zusammen mit einem 2,7 kb großen DNA-Fragment beinhaltet, das die Sequenz des *ARHGAP11B*-Promoters enthält. Dieses Konstrukt wurde in Lentiviruspartikel gepackt. Nach Injektion der Viruspartikel in Weißbüschelaffen-Eizellen, integrierte sich das *ARHGAP11B*-Gen zusammen mit seiner regulatorischen DNA-Sequenz in das Genom der Affen. Die Eizellen wurden in Ammentiere transferiert

und die Schwangerschaft überprüft. Nach ca. 101 Tagen wurden die Weißbüschelaffenfüten per Kaiserschnitt zur Analyse entnommen, da zu diesem Zeitpunkt noch alle relevanten Vorläuferzellpopulationen des Neokortex vorhanden sind, aber auch bereits Neurone der oberen kortikalen Schichten produziert werden [8]. Dies war also ein idealer Zeitpunkt für unsere geplanten Analysen. Des Weiteren war es eine ethische Grundvoraussetzung für uns, diese Experimente ausschließlich auf fötale Stadien zu beschränken, die transgenen Affen nicht zur Welt kommen zu lassen, und keine transgene Linie zu erstellen.

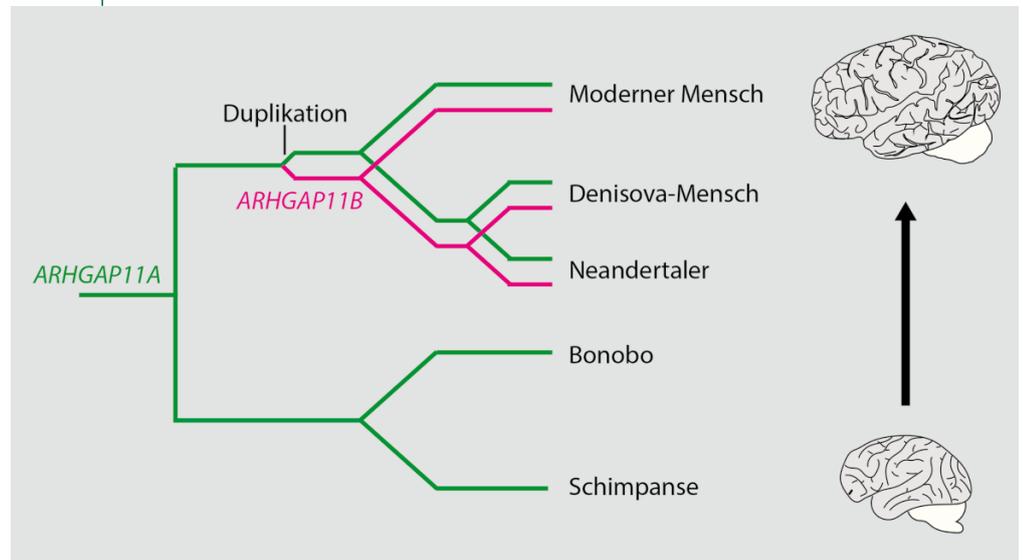
Interessanterweise zeigte sich, dass die auf annähernd physiologischem Niveau liegende Expression von *ARHGAP11B* ausreicht, um das fötale Weißbüschelaffengehirn zu vergrößern und dessen Faltung zu induzieren (Abbildung 1). Des Weiteren konnten wir zeigen, dass dies durch eine erhöhte Produktion von spezifisch jenen Neuronen begleitet wird, welche die äußeren Schichten des Neokortex bilden. Dies wiederum hängt höchstwahrscheinlich mit dem vergrößerten Pool an basalen Vorläuferzellen – insbesondere an basalen radialen Gliazellen – zusammen [3]. Wir konnten also zeigen, dass eine Expression von *ARHGAP11B* auf annähernd physiologischem Niveau ausreichend ist, um ein Primatengehirn zu vergrößern und dessen Faltung zu induzieren. Dies führt zu der Frage, wie *ARHGAP11B* dies in den relevanten Vorläuferzellen erreicht.

ARHGAP11B agiert in Mitochondrien und verstärkt die Glutaminolyse

Eine Möglichkeit, die Funktion von *ARHGAP11B* in der Zelle besser zu verstehen, besteht darin, es mit seinem ► Paralog, *ARHGAP11A*, zu vergleichen (Abbildung 4). Unsere Arbeitsgruppe konnte dabei zeigen, dass in *ARHGAP11B* im Vergleich zu *ARHGAP11A* mehrere Nukleotidsubstitutionen existieren. Eine dieser Substitutionen führt zu einer entscheidenden Veränderung in der Funktion von *ARHGAP11B*: Eine Punktmutation (C→G) führt zu einer neuen Spleißdonorsequenz. Dies resultiert in einer Verkürzung von Exon 5 in *ARHGAP11B* im Vergleich zu *ARHGAP11A* und zu einer Verschiebung des Leserasters (Abbildung 4) [9]. Diese Mutation hatte letztendlich drei Effekte auf das ARHGAP11B-Protein im Vergleich zu ARHGAP11A:

1. ARHGAP11B verlor die RhoGAP-Aktivität, die das ARHGAP11A-Protein ausübt.

ABB. 3 | ENTSTEHUNG DES ARHGAP11B-GENS



Links: phylogenetischer Baum, der die Entstehung des ARHGAP11B-Gens (magenta) durch Duplikation eines Teils des ARHGAP11A-Gens (grün) zeigt. Diese Duplikation erfolgte nach Abspaltung der Linie, die zum Menschen (moderner Mensch, Denisova-Mensch und Neandertaler) führt, von der Linie, die zum Bonobo und Schimpansen führt. Rechts: Zeichnung eines menschlichen Gehirns (oben) und eines Schimpansen-Gehirns (unten).

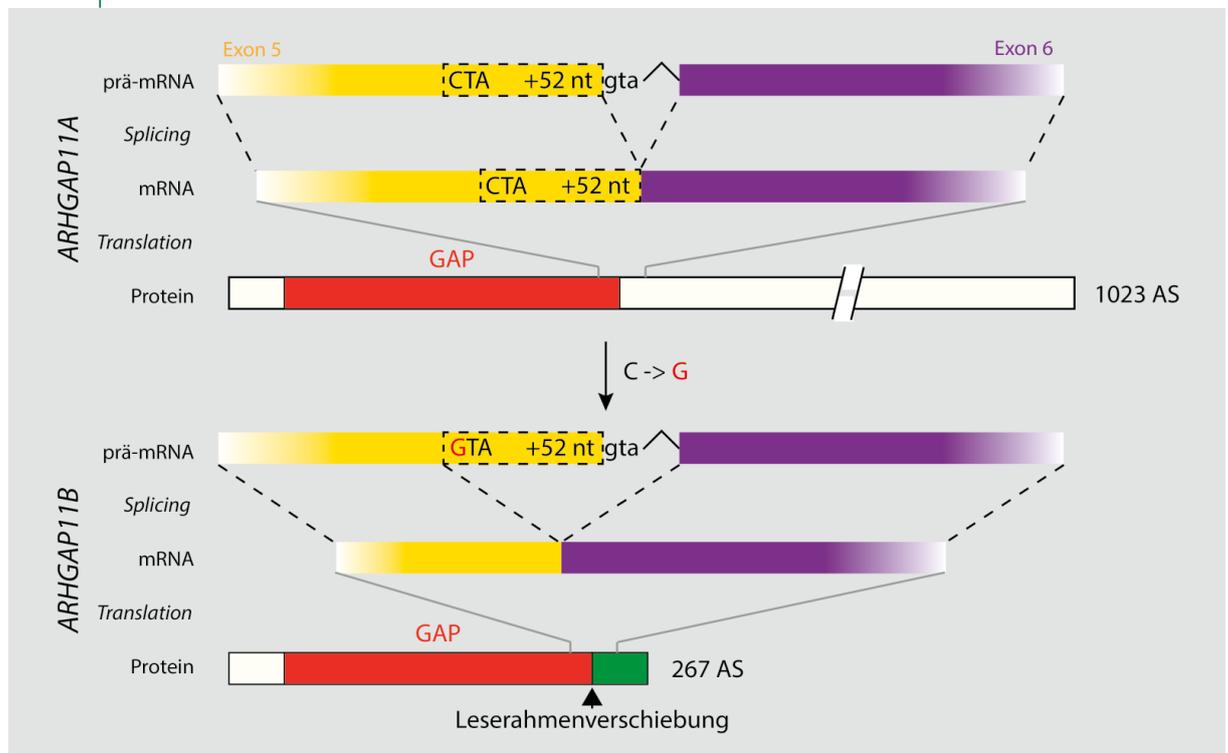
2. ARHGAP11B verlor ein Kernlokalisierungssignal, das in ARHGAP11A vorhanden ist und zu dessen Lokalisation im Zellkern führt.
3. Dieser Verlust des Kernlokalisierungssignals erlaubte wiederum einer N-terminal gelegenen Mitochondrien-Importsequenz, die sowohl in ARHGAP11A als auch ARHGAP11B vorliegt, ihre Funktion auszuüben. ARHGAP11B ist somit in Mitochondrien lokalisiert [10].

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit von Takashi Namba in unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Kollegen an der Semmelweis-Universität in Budapest gezeigt werden, dass ARHGAP11B in den Mitochondrien die *mitochondrial permeability transition pore* inhibiert, indem es mit deren Regulator, dem Adenin-Nukleotid-Translokator, interagiert. Dies verstärkt die ► Glutaminolyse in basalen Vorläuferzellen und führt vermutlich zu deren Vermehrung [10]. Interessanterweise ist die Glutaminolyse ein Stoffwechselweg, der insbesondere in sich häufig teilenden Zellen wie z. B. Tumorzellen aktiv ist [11].

Verbessert ARHGAP11B kognitive Leistungen?

All diese Befunde führen zu der Frage, ob die Vergrößerung des Neokortex und die erhöhte Produktion von Neuronen der äußeren kortikalen Schichten durch *ARHGAP11B* zu einer Verbesserung kognitiver Leistungen führt. Um diese Frage zu beantworten, wurde in einer Studie von Lei Xing in unserer Arbeitsgruppe, die in Zusammenarbeit mit Mihail Sarov von der *Genome Engineering Facility* unseres MPIs durchgeführt wurde, in der

ABB. 4 | ENTSTEHUNG DES MODERNEN ARHGAP11B-PROTEINS DURCH EINE PUNKTMUTATION



Schematische Darstellung der Region zwischen Exon 5 und Exon 6 der prä-mRNA, der mRNA und des Proteins von *ARHGAP11A* (oben) und *ARHGAP11B* (unten). Gelb: Exon 5, violett: Exon 6, rot: GAP-Domäne, grün: neue menschen-spezifische Proteinsequenz (47 Aminosäuren) innerhalb von *ARHGAP11B*.

Maus mithilfe von CRISPR/Cas9 ein Allel von *Arbgap11a* in ein Maus-*ARHGAP11B*-Gen umgewandelt. Dabei wurden die 55 Nukleotide, die im menschlichen Gen während des Spleißens aus der *ARHGAP11B*-mRNA entfernt werden, durch die 141 Nukleotide ersetzt, die für die 47 Aminosäuren der C-terminalen menschen-spezifischen Sequenz kodieren, gefolgt von einem translationalen Stoppcodon (siehe Abbildung 4 zum Vergleich) [12]. In diesen Mäusen konnte von Lei Xing gezeigt werden, dass die Vergrößerung des Neokortex und die erhöhte Anzahl an Neuronen, wie sie in fötalen und embryonalen Stadien der Maus und anderer Modellorganismen unter dem Einfluss von *ARHGAP11B* beobachtet wurden, bis zur Adoleszenz erhalten bleiben. Des Weiteren zeigten Verhaltenstests an diesen Mäusen, die in Zusammenarbeit mit Kollegen vom *Czech Centre for Phenogenomics* durchgeführt wurden, dass *ARHGAP11B*-transgene Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen weniger ängstlich sind und eine größere Flexibilität des Gedächtnisses aufweisen [12]. Dies weist tatsächlich auf eine verbesserte kognitive Leistung durch *ARHGAP11B* hin.

Welchen Effekt hat *ARHGAP11B* auf Hirnorganoiden von Hominiden?

Trotz all dieser Studien an *ARHGAP11B* blieben jedoch zwei entscheidende Fragen unbeantwortet:

1. Welchen Effekt würde *ARHGAP11B* auf das sich entwickelnde Gehirn unseres nächsten lebenden Verwandten, des Schimpansen, haben?
2. Was würde im sich entwickelnden Gehirn des Menschen passieren, wenn *ARHGAP11B* blockiert oder entfernt werden würde?

Um diese Fragen zu beantworten, machten wir uns die Kultivierung von Hirnorganoiden [13, 14] zu Nutze. Diese dreidimensionalen, gewebeähnlichen Zellaggregate werden aus pluripotenten Stammzellen durch eine Reihe von spezifischen Kultivierungsschritten gebildet [13, 14] und können einige Merkmale des fötalen Gehirns (beispielsweise die Zytoarchitektur) für einen bestimmten Entwicklungszeitraum recht adäquat nachbilden [15, 16]. Zur Beantwortung der ersten Frage verwendeten wir zur Verfügung stehende sogenannte induzierte pluripotente Stammzellen von einem Schimpansen, generierten Schimpansen-Hirnorganoiden und exprimierten *ARHGAP11B* in diesen nach Elektroporation des Gens [17]. Dabei zeigte sich, ähnlich wie in den Tierexperimenten zuvor auch in Schimpansen-Organoiden ein Anstieg an basalen Vorläuferzellen, insbesondere an basalen radialen Gliazellen. Durch eine längere Kultivierung der elektroporierten Organoiden konnte auch eine Vermehrung jener Neurone festgestellt werden, die *in vivo* die äußeren Schichten des Neokortex bilden würden [17]. Somit kann *ARHGAP11B* auch in Hirnorganoiden unseres nächsten

lebenden Verwandten zwei wichtige Voraussetzungen für die Expansion des Neokortex, wie sie in der Evolution des Menschen erfolgte, schaffen.

Um die zweite Frage zu beantworten, verwendeten wir zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze. Im ersten Ansatz nutzten wir die Elektroporation von Hirnorganoiden mit einer verkürzten Version von *ARHGAP11A* (*ARHGAP11A220*), für welche gezeigt worden war, dass sie die Funktion von *ARHGAP11B* in Mitochondrien blockiert [10]. Die Elektroporation von *ARHGAP11A220* in Hirnorganoiden des Menschen, generiert aus induzierten pluripotenten Stammzellen des Menschen, führte zu einer Verringerung der Anzahl an basalen Vorläuferzellen, die auf das Niveau von Schimpansen-Organoiden sank [17]. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Julia Ladewig vom Hector Institut für Translationale Hirnforschung (HITBR) in Mannheim wurde in einem zweiten Ansatz aufgrund der fast identischen DNA-Sequenzen von *ARHGAP11A* (erstes Viertel der kodierenden Sequenz) und *ARHGAP11B* zunächst ein *ARHGAP11A*-plus-*ARHGAP11B* Doppel-*Knockout* in induzierten pluripotenten Stammzellen des Menschen generiert. Anschließend wurden aus diesen Stammzellen Hirnorganoiden differenziert. Um nun den jeweiligen Beitrag dieser Gene zu einem möglichen Phänotyp zu identifizieren, wurden in den Organoiden per Elektroporation entweder nur *ARHGAP11A*, nur *ARHGAP11B* oder sowohl *ARHGAP11A* als auch *ARHGAP11B* eingebracht und exprimiert. Dabei zeigte sich, dass das Fehlen von *ARHGAP11B* zu einer Verringerung der basalen radialen Gliazellen führte [17]. Somit scheint *ARHGAP11B* für die große Anzahl an basalen radialen Gliazellen in Hirnorganoiden des Menschen notwendig zu sein.

Erforschung weiterer menschenpezifischer Gene der humanen Neokortex-Expansion

Die Frage stellt sich natürlich, ob neben *ARHGAP11B* weitere menschenpezifische Gene existieren, die einen Beitrag zu der evolutionären Neokortex-Expansion des Menschen leisteten. In der Tat gibt es drei relativ zeitgleich erschienene unabhängige Studien, die unterschiedliche Ansätze verfolgten, um solche Gene zu identifizieren [18–20]. Dies ist zum einen unsere eigene Studie, in welcher wir fünf publizierte und methodisch unterschiedliche Transkriptomdatensätze von fötalem menschlichem Neokortex reanalysiert haben. Dabei haben wir diese Datensätze nach proteinkodierenden Genen durchsucht, die entweder bevorzugt in den Keimzonen im Vergleich zu den restlichen Zonen des sich entwickelnden Neokortex exprimiert sind, oder die bevorzugt in Vorläuferzellen im Vergleich zu Neuronen exprimiert sind. Diese Gene wurden dann auf ihr Vorhandensein in Primaten und Säugetieren, die nicht zu den Primaten gehören, überprüft. Dies führte zu der Identifizierung von 50 primatenspezifischen Genen, von welchen 15 sogar menschenpezifisch sind [18]. Zu letzteren Genen gehört auch *ARHGAP11B*.

In einer Studie der Vanderhaegen-Gruppe wurden Transkriptomdaten von fötalem menschlichem Neokortex der Schwangerschaftswochen 7 bis 21 generiert. Die Analyse dieser Daten konzentrierte sich dabei auf Genfamilien, die spezifisch in der Menschenaffenlinie dupliziert wurden. Die Autoren identifizierten dabei 24 duplizierte Genfamilien bestehend aus 68 Genen, von welchen 35 menschenpezifisch sind [19]. Eine dritte Studie, durchgeführt von der Eichler-Gruppe, konzentrierte sich auf die Expression von menschenpezifischen Genen in fötalem und adultem menschlichem Gehirn. Die Schwierigkeit hierbei ist – aufgrund der hohen Homologie von duplizierten Genen – zwischen anzeastralem Gen und menschenpezifischem Gen zu unterscheiden. Um dies zu erreichen, wurden unter Einsatz der gesamten mRNAs des Gehirns durch sogenannte reverse Transkription die proteinkodierenden DNA-Moleküle der Mitglieder jener Genfamilien, die menschenpezifische Gene enthalten, mithilfe von spezifischen Sonden angereichert und anschließend mithilfe der *long-read* Sequenzieretechnik sequenziert. Dies erlaubte es dann, menschenpezifische Gene aufgrund von Nukleotidsubstitutionen von anzeastralen Genen zu unterscheiden. So wurden 29 menschenpezifische Gene identifiziert, die im Gehirn exprimiert sind [20]. Bemerkenswerterweise gibt es zwischen diesen drei Studien deutliche Überlappungen in den identifizierten Genen (siehe [21]).

Funktionelle Analysen dieser menschenpezifischen Gene, die eine Rolle in Vorläuferzellen haben könnten, beschränkten sich bisher hauptsächlich auf eine Genfamilie, die u. a. die drei menschenpezifische Gene, *NOTCH2NLA*, *-B* und *-C*, enthält. Dabei konnte von der Vanderhaegen-Gruppe, der Haussler-Gruppe und unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass diese Gene eine Rolle in der Neokortex-Expansion haben könnten [18, 19, 22]. *NOTCH2NLA* vermehrt basale Vorläuferzellen [18], während *NOTCH2NLB* hauptsächlich apikale Vorläuferzellen vermehrt [19]. Des Weiteren konnte in Hirnorganoiden gezeigt werden, dass der Verlust von *NOTCH2NL*-Genen (spezifisch: einem homozygoten Verlust von *NOTCH2NLA* und *-B* und einem heterozygoten Verlust von *NOTCH2NLC*)

GLOSSAR

Elektroporation: Methode, in der durch einen kurzen elektrischen Puls die Zellmembran vorübergehend für DNA durchlässig wird.

Glutaminolyse: Stoffwechselweg von Glutamin über Glutamat zu α -Ketoglutarat, der anabolen Metabolismus fördert.

lentivirales Konstrukt: ringförmige DNA (Plasmid), die die Produktion von Lentiviren ermöglicht, welche eine gewünschte DNA-Sequenz (z. B. Gen) in das Genom der Zielzelle(n) integrieren.

Paralog: Gen, das durch eine Duplikation innerhalb eines gegebenen Genoms entstanden ist.

im Vergleich zu humanen Kontrollhirnorganoiden zu kleineren Organoiden führt, die vermutlich eine verfrühte neuronale Differenzierung aufweisen [22].

Zusammenfassung

In den letzten Jahren zeigte sich, dass menschen-spezifische Gene einen entscheidenden Beitrag zu der evolutionären Neokortex-Expansion des Menschen leisteten. Eines dieser Gene ist ARHGAP11B. ARHGAP11B ist spezifisch in den Vorläuferzellen des Neokortex exprimiert. Durch die Verwendung unterschiedlicher Modellorganismen konnte gezeigt werden, dass dieses Gen nicht nur die Anzahl der relevanten Vorläuferzellen, sondern auch die Anzahl der Neurone der äußeren kortikalen Schichten vergrößern kann. ARHGAP11B erreicht dies, indem es innerhalb der Mitochondrien agiert und ähnlich wie in Tumorzellen die Glutaminolyse verstärkt. Schließlich konnte gezeigt werden, dass diese Effekte von ARHGAP11B ein Primatengehirn vergrößern und dessen Faltung induzieren können. An einem Mausmodell konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass diese Vergrößerung zu verbesserten kognitiven Leistungen führt. ARHGAP11B ist somit höchstwahrscheinlich ein entscheidender Faktor der evolutionären Neokortex-Expansion des Menschen. Im Einklang damit ist der in menschlichen Hirnorganoiden erhobene Befund, dass ARHGAP11B essentiell für die große Anzahl an basalen Vorläuferzellen ist, die den sich entwickelnden menschlichen Neokortex auszeichnen. Insofern dürfte die Analyse weiterer menschen-spezifischer Gene unser Verständnis der humanen Neokortex-Evolution weiter verbessern.

Summary

How human-specific genes have expanded the primate neocortex

In recent years, human-specific genes have been shown to be key contributors to the expansion of the human neocortex in the course of evolution. One of these genes is ARHGAP11B. ARHGAP11B is specifically expressed in progenitor cells of the neocortex. By using different model organisms, it has been possible to show that the product of this gene can increase not only the number of the relevant progenitor cells but also the number of upper-layer neurons. ARHGAP11B achieves this by acting within mitochondria and enhancing glutaminolysis, similar to what happens in cancer cells. In the end, it has been possible to show that these effects of ARHGAP11B can enlarge the primate brain and induce its folding. Furthermore, it could be demonstrated on a mouse model that this enlargement leads to improved cognitive performance. Thus, ARHGAP11B is most likely an essential factor for the evolutionary expansion of the human neocortex. Consistent with this is the finding in human brain organoids that ARHGAP11B is essential for the high number of basal progenitors which is characteristic of the developing human neocortex. Accordingly, the analysis of additional human-specific genes probably further improves our understanding of human neocortex evolution.

Schlagworte

Neokortex-Entwicklung, Neokortex-Evolution, menschen-spezifische Gene, *ARHGAP11B*

Literatur

- [1] J. H. Lui et al. (2011). Development and evolution of the human neocortex. *Cell* 146, 18–36.
- [2] M. Florio, W. B. Huttner (2014). Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development* 141, 2182–2194.
- [3] M. Florio et al. (2015). Human-specific gene *ARHGAP11B* promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion. *Science* 347, 1465–1470.
- [4] S. A. Fietz et al. (2012). Transcriptomes of germinal zones of human and mouse fetal neocortex suggest a role of extracellular matrix in progenitor self-renewal. *Proc National Acad Sci* 109, 11836–11841.
- [5] P. H. Sudmant et al. (2010). Diversity of human copy number variation and multicopy genes. *Science* 330, 641–646.
- [6] N. Kalebic et al. (2018). Human-specific *ARHGAP11B* induces hallmarks of neocortical expansion in developing ferret neocortex. *Elife*, 7, e41241.
- [7] E. Sasaki et al. (2009). Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature* 459, 523–527.
- [8] M. Heide et al. (2020). Human-specific *ARHGAP11B* increases size and folding of primate neocortex in the fetal marmoset. *Science* 369, 546–550.
- [9] M. Florio et al. (2016). A single splice site mutation in human-specific *ARHGAP11B* causes basal progenitor amplification. *Sci Adv* 2, e1601941.
- [10] T. Namba et al. (2020). Human-specific *ARHGAP11B* acts in mitochondria to expand neocortical progenitors by glutaminolysis. *Neuron* 105, 867–881.e9.
- [11] L. Yang et al. (2016). Glutaminolysis: A hallmark of cancer metabolism. *Annu Rev Biomed Eng* 19, 1–32.
- [12] L. Xing et al. (2021). Expression of human specific *ARHGAP11B* in mice leads to neocortex expansion and increased memory flexibility. *EMBO J* 40, e107093.
- [13] T. Kadoshima et al. (2013). Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc National Acad Sci* 110, 20284–20289.
- [14] M. A. Lancaster et al. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373–379.
- [15] M. Heide et al. (2018). Brain organoids as models to study human neocortex development and evolution. *Curr Opin Cell Biol* 55, 8–16.
- [16] J. Fischer et al. (2019). Genetic modification of brain organoids. *Front Cell Neurosci* 13, 558.
- [17] J. Fischer et al. (2022). Human specific *ARHGAP11B* ensures human-like basal progenitor levels in hominid cerebral organoids. *EMBO Rep* 23, e54728.
- [18] M. Florio et al. (2018). Evolution and cell-type specificity of human-specific genes preferentially expressed in progenitors of fetal neocortex. *Elife* 7, e32332.
- [19] I. K. Suzuki et al. (2018). Human-specific NOTCH2NL genes expand cortical neurogenesis through Delta/Notch regulation. *Cell* 173, 1370–1384.e16.
- [20] M. L. Dougherty et al. (2018). Transcriptional fates of human-specific segmental duplications in brain. *Genome Res* 28, 1566–1576.
- [21] M. Heide, W. B. Huttner (2021). Human-specific genes, cortical progenitor cells, and microcephaly. *Cells* 10, 1209.
- [22] I. T. Fiddes et al. (2018). Human-specific NOTCH2NL genes affect Notch signaling and cortical neurogenesis. *Cell* 173, 1356–1369.e22.

Verfasst von:

Michael Heide studierte von 2005 bis 2010 Biologie an der Universität Tübingen. 2014 promovierte er am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Heidelberg. Von 2015 bis 2021 war er Postdoktorand am Max-Planck-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden, in der Arbeitsgruppe von Wieland Huttner. Seit 2022 ist er Nachwuchsgruppenleiter am Deutschen Primatenzentrum, Göttingen.



Wieland B. Huttner studierte von 1969 bis 1975 Medizin in Hamburg/Oxford. 1976 promovierte er in Physiologischer Chemie an der Universität Hamburg. Von 1976 bis 1977 war er Postdoktorand am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen, und von 1977 bis 1980 an der Yale University, USA, im Labor des späteren Nobelpreisträgers Paul Greengard. Von 1981 bis 1985 war er Nachwuchsgruppenleiter am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Martinsried, und von

1985 bis 1990 Gruppenleiter am EMBL Heidelberg. Von 1991 bis 2000 war er Professor und Direktor des Instituts für Neurobiologie, Universität Heidelberg. 1998 wurde er einer der Gründungsdirektoren des Max-Planck-Instituts für molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden und ist seitdem dort Forschungsgruppenleiter.

Korrespondenz

Dr. Michael Heide
Deutsches Primatenzentrum GmbH
Kellnerweg 4
37077 Göttingen
Email: mheide@dpz.eu

Prof. Dr. Wieland B. Huttner
Max Planck Institut für molekulare Zellbiologie
und Genetik
Pfothenhauerstr. 108
01307 Dresden
Email: huttner@mpi-cbg.de



Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin In Deutschland

Berufsfelder Biologie – hier gibt es den Überblick

Der VBIO hat achtzig spannende Porträts von Biowissenschaftlerinnen und Biowissenschaftlern im Beruf zusammengestellt. Berufsfeldübersichten, Kontaktadressen, Tipps und Internet-Links ergänzen die „Perspektiven“.

Perspektiven – Berufsbilder von und für Biologen und Biowissenschaftler

- Herausgegeben vom VBIO
- 10. überarbeitete Auflage, DIN A5, 256 Seiten, ISBN 978-3-9810923-3-2
- 14,00 Euro (inkl. Versand), 12,00 Euro (VBIO-Mitglieder),
- Direktbestellung über info@vbio.de



www.vbio.de

PERSPEKTIVEN BERUFSFELD BIOLOGIE





Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**GEMEINSAM
FÜR DIE**

BIEWISSENSCHAFTEN

Gute Gründe, dem VBIO beizutreten:

- Werden Sie Teil des größten Netzwerks von Biowissenschaftlern in Deutschland
- Unterstützen Sie uns, die Interessen der Biowissenschaften zu vertreten
- Nutzen Sie Vorteile im Beruf
- Bleiben Sie auf dem Laufenden – mit dem VBIO-Newsletter und dem Verbandsjournal „Biologie in unserer Zeit“
- Treten Sie ein für die Zukunft der Biologie



www.vbio.de

Jetzt beitreten!

