



seit 1558

FRIEDRICH-SCHILLER UNIVERSITÄT JENA
BIOLOGISCH-PHARMAZEUTISCHE FAKULTÄT

**Expressionsanalyse des ephrin-/ Eph-Systems im frontalen Gehirn der Maus
während der embryonalen und postnatalen Entwicklung**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplom-Biologe Ronny Niehage
geboren am 29.07.1977 in Bad Salzungen

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Bolz

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie
Erbertstraße 1
07743 Jena

2. Gutachter: Prof. Dr. Siegrid Löwel

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie
Erbertstraße 1
07743 Jena

3. Gutachter: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Universität Karlsruhe (TH)
Zoologisches Institut I
Lehrstuhl für Zell- und Neurobiologie
Haid-und-Neu-Str. 9 (im Gebäude der BFEL)
D-76131 Karlsruhe

Tag der Prüfung: 15.10.2007

Tag der Verteidigung: 18.02.2008

*„.....heutzutage macht man richtige Neuroanatomie
generell mit Photoshop.....“*

- Prof. Dr. H. Wässle -
Jena, den 21.05.2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Organisation des zerebralen Kortex	2
1.2 Die Neurogenese und Entwicklung des zerebralen Kortex	2
1.2.1 Proliferation und Morphogenese	3
1.2.2 Neuronale Vorläuferzellen und ihre Schichtspezifität	4
1.2.3 Arealisierung des dorsalen Telencephalons	4
1.2.4 Tangentiale Migration der Vorläufer der GABAergen Interneurone	6
1.3 Die Organisation des Thalamus	7
1.4 Die Entwicklung des Thalamus	7
1.5 Die thalamokortikale Verdrahtung	8
1.5.1 Die zelluläre Guidance-Achse	9
1.5.2 Die molekulare Guidance (Chemoaffinitätshypothese)	10
1.6 Das Ephrin-/ Eph-System	12
1.6.1 Die Eph-Rezeptoren und ihre Liganden	12
1.6.2. Das Signaling des efn-/ Eph-Systems	13
1.6.3 Grundsätzlich Funktionen des Ephrin-/ Eph-System	13
2. Zielstellung	17
3. Material und Methoden	19
3.1. Materialien und Organismen	19
3.1.1. Chemikalien	19
3.1.2. Lösungen, Puffer und Medien	19
3.1.3. Nukleinsäuren, Polymerasen und Antikörper	22
3.1.4. Organismen	25
3.1.5. Geräte	26
3.2. Methoden	27
3.2.1 Präparation und Isolierung der Maushirne	27
3.2.2 Maßnahmen zur Reduktion von Ribonuklease (RNase)-Kontamination	28
3.2.3. Gewinnung und Reinigung von Nukleinsäuren	28
3.2.4 Enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren	30
3.2.5 Synthese von Nukleinsäuren	31
3.2.6 Qualitative und quantitative Analyse von Nukleinsäuren	32
3.2.7 Transformation von Bakterien zur Klonierung von rekombinanter Plasmid-DNA	33
3.2.8 Herstellen von Gewebeschnitte für histologische Arbeiten	35
3.2.9 <i>In-situ</i> -Hybridisierung zur Analyse von Expressionsmustern	36
3.2.10 Histochemische Untersuchungen	39
3.2.11 Dil-Tracing-Experimente	39
3.2.12 Bildverarbeitung	40
4. Ergebnisse	41
4.1 Allgemeine Tendenzen der Expressionsdynamik des Ephrin-/ Eph-Systems	41
4.2 Charakteristische Prozesse der pränatalen Entwicklung des cerebralen Kortex zeigen sich in den Expressionsmustern des Ephrin/ Eph-Systems	42
4.2.1 Die Histogenese des cerebralen Kortex lässt sich an Hand von Nissl-Färbungen verfolgen	45

4.2.2 Otx1 und Cux2 sind Marker für Abkömmlinge Ventrikulär- und Subventrikulärzone des sich entwickelten cerebralen Kortex und trennen die CP in infra- und supragranuläre Schichten	47
4.2.3 Die Gene <i>efnb1</i> , <i>efna3</i> und <i>EphB1</i> sind spezifisch in nur einer embryonalen Schicht des sich entwickelnden Kortex exprimiert	48
4.2.4 Radiale Migration verschiebt die Expression von Genen in die höheren Schichten des embryonalen Kortex	49
4.2.5 Überlagerung der Expressionsmuster enthüllt neue Substrukturen des embryonalen Kortex.....	51
4.2.6 Die Zone der Überschneidung der Expression von <i>EphA4</i> und <i>EphA3</i> entsprechen dem Migrationsweg der GABAergen Interneurone.....	53
4.2.7 Die Gene der Rezeptoren <i>EphA4</i> , <i>EphA5</i> und <i>EphA7</i> sowie des Liganden <i>efna2</i> zeigen ein ausgeprägt gradiertes Expressionsmuster	54
4.2.8 Am Embryonaltag E 18 ist eine starke Zunahme an Komplexität der CP zu verzeichnen.....	55
4.3 Die postnatale Entwicklung des Kortex ist von einer schicht- und arealspezifischen Expression der Gene des Ephrin-/ Eph-Systems gekennzeichnet	58
4.3.1 Das Ephrin- /Eph-System zeigt bereits in der frühen postnatalen Entwicklung des Kortex in den analysierten Arealen schichtspezifische Expression der Gene.....	58
4.3.2 Die schicht- und arealspezifischen Expressionen mancher Gene des Ephrin/ Eph-Systems setzen sich bis in die juvenilen Stadien fort	61
4.4 Der embryonale Thalamus.....	63
4.4.1 Der embryonale Thalamus ist Nissl-anatomisch eine undifferenzierte „pronukleäre Zellmasse“.....	63
4.4.2 Marker-Gene bilden einen kernspezifischen „molekularen Code“ im differenzierten postnatalen Thalamus	64
4.4.3 Die Kartierbarkeit des embryonalen Thalamus mit Hilfe der Expressionsmuster der Markergene <i>Gbx2</i> , <i>Lhx2</i> , <i>Ngn2</i> und <i>Cad6</i>	66
4.4.4 Die Expression der Markergene enthüllt am Tag E14 ein genspezifisches Streifenmuster	67
4.4.5 Die Expressionsmuster der Gene <i>Gbx2</i> , <i>Lhx2</i> und <i>Ngn2</i> zeigen am Embryonaltag 16 einen in kernspezifische Felder untergliederten Thalamus.....	71
4.4.6 Die Expression von <i>Cad6</i> beginnt, nachdem die thalamischen Neurone ihren kernspezifischen Platz eingenommen haben	72
4.4.7 Die Kartierung des embryonalen Thalamus am Tag E16	73
4.4.8 Die <i>antisense</i> -Sonden für das ephrin-/ Eph-System zergliedern im hohen Maße den embryonalen Thalamus am Tag E14	74
4.4.9 Der vTh ist ein Ein- und Ausgang für projizierende Axone	78
4.4.10 Der dorsale Thalamus am Tag E16.....	81
4.5 Der postnatale Thalamus.....	83
4.5.1 6 Tage nach der Geburt der Maus sind im Thalamus kernspezifische Expressionsmuster der Gene des ephrin-/ Eph-Systems zu beobachten.....	83
4.5.2 Einige Gene des Efn- / Eph-Systems bleiben bis in die späten juvenilen Stadien hochreguliert.....	85
4.6 Das ventrale Telencephalon	86
4.6.1 Das Neuroepithel der ganglionischen Eminenzen wird in den Alterstadien E14 und E16 durch die <i>antisense</i> -Sonden der Gene des ephrin-/ Eph-System differenziell markiert.....	87
4.6.2 Die <i>antisense</i> -Sonden für die Gene des ephrin-/ Eph-System markieren im ventralen Telencephalon verschiedene schichtenartige Zonen	90
4.6.3 Die Ausdehnung des sich entwickelnden Striatums führt zu einer Vermischung der Unterschichten innerhalb der SVZ.....	94

5. Diskussion	97
5.1 Technische und experimentelle Aspekte	98
5.1.1 <i>In-situ</i> -Hybridisierung mit antisense-RNA-Sonden an Kryostatschnitten	98
5.1.2 Darstellung von überlagerten Expressionsmustern in Falschfarben.....	99
5.2 Grundlegende Ideen für die Interpretation der Expressionsmuster.....	101
5.2.1 Typisierung der Expressionsmuster	101
5.2.2 Die Besonderheiten des efn-/ Eph-Systems.....	103
5.3 Prozesse der Differenzierung des Neokortex	104
5.3.1 Die Expressionsmuster der Gene des efn-/ Eph-Systems im embryonalen Kortex sind hochkomplex und verändern sich entsprechend der entwicklungsbiologischen Prozesse	105
5.3.2 Der Ligand efnb1 zeigt sich als möglicher Aktivator für die neuronale Proliferation	106
5.3.3 EphA3 und efnb2 können die Differenzierung der Projektionsneuronen und deren zukünftige schichtspezifische Lage beeinflussen	106
5.3.4 Die Expressionsmuster der Rezeptoren EphA3 und EphA4 enthüllen eine neue Substruktur der SVZ.....	107
5.3.5 Schichtspezifische Verteilung der untersuchten Gentranskripte in der CP.....	108
5.3.6 Arealspezifische Verteilung der untersuchten Gentranskripte in der CP	109
5.3.7 Tangentiale Migration der GABAerge Interneuronen	110
5.4 Die Differenzierung des embryonalen Thalamus.....	115
5.4.1 Der embryonale dorsale Thalamus ist an E14 grob in drei vertikale Zonen untergliedert	116
5.4.2 Die Übergangszone ist funktionell nur schwer zu charakterisieren	117
5.4.3 Die Gene des efn-/ Eph-Systems sind im embryonalen Thalamus in globalen Gradienten exprimiert	119
5.4.4 Der Ligand efna5 und der Rezeptor EphA7 sind potentielle Interaktionspartner und Differenzierungsfaktoren	119
5.5 Prozesse der thalamokortikalen Verknüpfung	122
5.5.1 Der ventrale Thalamus ist für die TCAs der erste Entscheidungspunkt	123
5.5.2 Die Expression verschiedener Gene des ephrin-/ Eph-Systems im vTC suggeriert eine Beteiligung an der Axonlenkung.....	124
5.5.3 Der EphA-Code in der embryonalen Kortexanlage ist potentiell geeignet die TCAs an die korrekten Positionen der CP zu lenken	125
5.6 Die Bedeutung der Expressionen der Gene des ephrin-/ Eph-Systems Altersstadium P6 ...	125
5.6.1 Die Bedeutung der Expressionen der Gene des ephrin-/ Eph-Systems Altersstadium P6 bei der postnatalen kortikalen Verschaltung.....	125
5.6.2 Die postnatalen Expressionsmuster der Gene des ephrin-/ Eph-Systems zeigen Assoziationen zu den Brodmannarealen.....	128
5.7 Die Bedeutung der Expressionen der Gene des ephrin-/ Eph-Systems im Alterstadium P28	128
6. Zusammenfassung	131
7. Literaturverzeichnis.....	133
8. Anhang	i
8.1 Abkürzungen	i
8.2 Eidesstattliche Erklärung	iii
8.3 Danksagung	iv
8.4 Lebenslauf.....	v
8.5 Eigene Publikationen.....	vi

1. Einleitung

Das menschliche Verhalten in seiner gesamten Ausprägung beruht auf der „Verrechnungen“ der Exzitationen und Inhibitionen der Nervenzellen eines hochkomplexen, leistungsstarken und energieraubenden Organs, dem Gehirn. Das menschliche Gehirn besteht aus zirka 1000 Milliarden Nervenzellen (10^{12} Neurone), wobei jedes einzelne Neuron zwischen eintausend und zehntausend Kontakte (Synapsen) zu anderen Neuronen knüpft. Bei diesen neuronalen Verknüpfungen spielt der Faktor „Zufall“ eine eher untergeordnete Rolle. Die spezifische Verschaltung dieser Neurone über spezialisierte Zellfortsätze führt zur Etablierung verschiedener, neuronaler Netzwerke, die ebenfalls befähigt sind, untereinander zu kommunizieren. Die Gesamtlänge der dafür „verlegten“ Nervenfasern wird auf über 500.000 km geschätzt.

Das Gehirn kann in viele funktionelle Einheiten untergliedert werden. So durchzieht zum Beispiel die *Formatio reticularis* den gesamten Hirnstamm. In ihr sind vor allem lebensnotwendige Zentren wie das Atem- oder Kreislaufzentrum lokalisiert. Das Kleinhirn (*Cerebellum*) stellt mit seinen afferenten Moos- und Kletterfasern sowie den efferenten Purkinje-Zellen die höchste Kontrollinstanz für die Koordination und Feinabstimmung von Bewegungsabläufen dar. Der im Zwischenhirn (*Diencephalon*) befindliche Thalamus besteht aus einer Vielzahl von Kernen, die im Wesentlichen alle in die Großhirnrinde (Kortex) projizieren. Er ist somit eine Relaisstation für nahezu alle sensorischen Projektionen ins Telencephalon. Das Höchstmaß an Spezialisierung und Komplexität findet man in den einzelnen Arealen der Großhirnrinde, die eingehende (Sinnes-) Informationen verarbeitet und verknüpft, und auf Effektorsysteme weiterleitet. Sie erzeugt kognitive Prozesse wie Denken, Lernen, Erinnern und generiert motorischen Output.

Bereits zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts unterschieden Neuroanatomen wie Korbinian Brodmann oder Oskar und Cecile Vogt diskrete Areale der menschlichen Großhirnrinde aufgrund von Zellstrukturen und deren Anordnung in verschiedenen Schichten (Brodmann, 1909; Vogt and Vogt, 1919). Anhand dieser zytoarchitektonischen Charakteristika beschrieb Brodmann 52 verschiedene Felder, verteilt über die gesamte Oberfläche der Großhirnrinde, die heute als Brodmannareale bezeichnet werden.

Die Aufgabe, die sich bis heute stellt, ist zu verstehen, wie die Großhirnareale und ihre neuronalen Netzwerke generiert und verschaltet werden. Trotz großer Fortschritte im Bereich der Entwicklungs- und Molekularbiologie und der Identifizierung verschiedener, an den Prozessen der Musterbildung beteiligten Molekülfamilien, bleibt das Verständnis eher skizzenhaft. Allerdings besteht ein gewisser Konsens darüber, dass ein komplexes regulatorisches System notwendig ist, welches die Zellen in die Lage versetzt, verschiedene Gene und Gengruppen in Abhängigkeit extrinsischer oder zellautonomer Faktoren zu aktivieren und somit verschiedene, divergierende Differenzierungsprogramme zu induzieren.

1.1 Die Organisation des zerebralen Kortex

Der zerebrale Kortex ist aus einer Vielzahl verschiedener Neuronen-Typen aufgebaut, die in zwei Hauptklassen gegliedert werden. Das sind zum einen die mit weitreichenden Axonen ausgestatteten Projektionsneurone, auch Pyramidenzellen genannt, und zum anderen die lokal projizierenden Interneurone oder Nicht-Pyramidenzellen. Über die Verknüpfungen ihrer Zellfortsätze werden diese Neurone zu Nervennetzen verknüpft, was vor allem in der Zytoarchitektur der Großhirnrinde deutlich wird. Der zerebrale Kortex ist keine homogene Struktur. Er ist radial in 3 bis 6 horizontale Schichten (dreischichtig = Allokokortex / Paleo- und Archikortex; sechsschichtig = Isokortex / Neokortex) gegliedert. Diese Schichtung kommt durch die verschiedenen großen Zelltypen und die Packungsdichte in den einzelnen Schichten zustande. Bezüglich der kortikalen Konnektivität zeigen die Schichten ebenfalls große Unterschiede. Die Neurone der oberen Schichten (Schichten 2/3) bilden hauptsächlich kortikokortikale Verbindungen und senden Axonkollaterale in die Schicht 2/3 und in Schicht 5. Die Pyramidenzellen der tieferen Schichten (Schicht 5 und 6) projizieren dagegen in extrakortikale Regionen. Die Schicht 4 gilt als Haupteingangsschicht für die thalamokortikalen Projektionen. Die Rückprojektion in den Thalamus erfolgt hauptsächlich durch die Pyramidenzellen der Schicht 6. Über Axonkollaterale projizieren diese Zellen wieder Zurück in Schicht 4 (Gilbert and Wiesel, 1979; Bolz et al., 1989; Katz and Callaway, 1992).

Tangential ist der Kortex wie erwähnt in verschiedene Großhirnareale organisiert. Sie sind scharf von einander abgegrenzt und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer histologischen Organisation, der molekularen Ausstattung, ihrer Konnektivität mit anderen kortikalen sowie subkortikalen Hirnregionen und natürlich hinsichtlich ihrer Funktion. So befassen sich die rostralen Bereiche des Kortex mit motorischen und kognitiven Belangen und die kaudalen Bereiche prozessieren die sensorischen (visuellen, auditorischen, somatosensorischen) Eingangssignale. Die funktionellen Unterschiede dieser Areale sind vor allem durch die differentielle Verdrahtung mit dem Thalamus realisiert. Reziproke Verbindungen zwischen einzelnen thalamischen Kernen und kortikalen Areale bilden die Grundlage für die kortikale Informationsverarbeitung.

1.2 Die Neurogenese und Entwicklung des zerebralen Kortex

Während der Embryonalentwicklung entstehen aus einer einzigen Zelle - der befruchteten Eizelle - die unterschiedlichen Zelltypen des gesamten adulten Organismus. Allein im Zentralnervensystem des Säugers sind dies schätzungsweise mehrere Hundert (Stevens, 1998). Die zelluläre Diversifikation wird durch den Ablauf von Differenzierungsprogrammen erreicht, wobei totipotente Vorläuferzellen differenzierende Zellteilungen vollführen, durch die mehr und mehr eine Gewebespezifität erreicht wird. Extrinsische Positionsinformationen regionalisieren das Gewebe und induzieren im Zellverband ortsspezifische Reifungsprozesse. In diesen regional spezifizierten Zellen laufen dann weitere extrinsische und zellautonom gesteuerte Differenzierungsprozesse ab. So führen diese Prozesse im Gehirn nach der Bildung des Neuralrohres und der Abschnürung der 5 Hirnbläschen zu weiteren Untergliederungen in diverse Segmente, die im Rhombencephalon als Rhombomere und im Prosencephalon als Prosomere bezeichnet werden.

Hierbei spielen vor allem die Festlegung der Achsen „anterior-posterior“ sowie „dorsal-ventral“ und die daraus resultierende differenzielle Aktivierung der Homöobox-Gene eine wesentliche Rolle. Dies führt dazu, dass jedes Rhombomer z.B. Motorneurone hervorbringt, welche rhombomerspezifisch die Gesichtsmuskulatur innervieren. So beherbergen z.B. die Rhombomere 2 und 3 die Vorläuferzellen des Trigeminalnerves, das Rhombomer 4 bildet die Motorneurone des *Nervus facialis*.

Die Prosomere 1-3 des aus dem Prosencephalon hervorgehenden Diencephalon bilden entsprechend dem Prosomer-Modell von Puelles und Rubenstein den Thalamus. Entlang der anterior-posterior-Achse des Neuralrohrs schließt sich rostral zunächst das rostrale Diencephalon an, was den Hypothalamus bildet, und danach das Telencephalon, welches sich dorsal in das Pallium (dorsales Telencephalon, dTC) und ventral in das Subpallium (ventrales Telencephalon, vTC) untergliedert (Puelles and Rubenstein, 2003).

1.2.1 Proliferation und Morphogenese

Die Entwicklung des Kortex beginnt mit der Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen in dem den Ventrikel säumenden Neuroepithel. Aufgrund der ventrikulären Lage und des Vorkommens einer weiteren, dem Ventrikel nicht anliegenden, proliferativen Zone, der Subventrikularzone (SVZ), wird das Neuroepithel auch Ventrikulärzone (VZ) genannt. Sie besteht aus dicht gepackten, säulenartig angeordneten Zellen. Mit einem ventrikelwärts gerichteten (apikalen) Fortsatz sind die Zellen an der Oberfläche des Ventrikels verankert und mit einem zur Hirnoberfläche hin gerichteten (basalen) Fortsatz spannen die Zellen radial die gesamte Schichtdicke der kortikalen Anlage auf. Aufgrund ihrer radialen Ausrichtung werden diese Zellen „radiale Gliazellen“ genannt. Sie sind, wie man heute weiß, die neuronalen und glialen Vorläuferzellen (Progenitoren) (Hartfuss et al., 2001; Noctor et al., 2001). Das postmitotische Neuron wandert anschließend radial in Richtung der Hirnoberfläche. Die Fortsätze der radialen Gliazellen dienen dabei als Leitgerüst, mit denen die migrierenden Neurone eng verbunden bleiben (Rakic, 1972).

Die ersten Zellen, die die VZ am Embryonaltag 11 (E11-E12) verlassen, siedeln sich an der Oberfläche der Kortexanlage an und bilden die Präplatte (PP). Diese wird durch die nachfolgenden radial migrierenden Zellen, welche sich in die PP einschieben und die kompakte „kortikale Platte“ bilden, in die Marginalzone (MZ) und die Subplatte (SP) geteilt. Die MZ enthält „Cajal-Retzius Zellen“, welche durch die Bildung des Protein Reelin für die korrekte Ausbildung der CP entscheidend sind (Rice and Curran, 2001). Die MZ wird im reifen Kortex die zellarme Schicht I. Die SP-Zellen sind die ersten Zellen, die mit dem dorsalen Thalamus transiente Verknüpfungen ausbilden und somit als Pionierfasern ihren Beitrag bei der „thalamokortikalen Verdrahtung“ leisten.

Die Ausbildung der CP, welche die embryonale Anlage des mehrschichtigen zerebralen Kortex darstellt, geschieht nach dem „inside-out Prinzip“. Dabei werden die tiefen Schichten 6 und 5 vor den Schichten 4 und 2/3 ausgebildet. Früh geborene Neurone siedeln sich in der CP in den tieferen Schichten und die später geborenen Neurone passieren die bereits positionierten Zellen und besiedeln die superfiziellen Schichten. Zwischen der proliferativen Zone und SP bildet sich die Intermediärzone (IMZ). Hier verlaufen die

Fasern, die die Kortexareale mit dem Thalamus und anderen kortikalen und subkortikalen Projektionsgebieten verbinden. Sie wird später zur „weißen Substanz“.

Die Histogenese des dTC verläuft dabei nicht synchron ab. Neben dem radialen Entwicklungsgradienten (Inside-out) der CP gibt es noch zwei weitere sogenannte neurogenetische Entwicklungsgradienten. Zum einen ist das ein transversaler Gradient, wobei sich das ventrolaterale dTC vor dem mediodorsalen entwickelt. Zum anderen gibt es einen longitudinalen Gradienten, nachdem sich das Telencephalon vom anterioren Pol her entwickelt und reift (Bayer and Altman, 1991).

1.2.2 Neuronale Vorläuferzellen und ihre Schichtspezifität

Der VZ und SVZ des dTC entstammen hauptsächlich die glutamatergen Projektionsneurone. Diese machen im ausgereiften sechsschichtigen Kortex etwa 80% aller Neurone aus. Die Vorläuferzellen der VZ durchlaufen mehrere Zellzyklen (nicht-neurogene, symmetrische Teilung) und entlassen entweder zwei Neurone (neurogene symmetrische Teilung) oder ein Neuron und eine weitere Vorläuferzelle (neurogene asymmetrische Teilung). Der Zellkern wandert während des Zellzyklus innerhalb der Zelle durch die VZ von apikal nach basal und wieder zurück (interkinetische Migration). Die Teilung findet apikal, nahe dem Ventrikel statt. Dabei bringt die VZ vor allem die Zellen für die infragranulären Schichten 5 und 6 hervor. Einige Vorläuferzellen lösen jedoch den Kontakt zum Ventrikel und migrieren für die finale mitotische Teilung in die SVZ (Haubensak et al., 2004; Noctor et al., 2004). Diese Neurone sind für die supragranulären Schichten 2-4 bestimmt. Gemäß dem radialen neurogenetischen Entwicklungsgradienten ist die Schichtspezifität der Neurone also abhängig vom Geburtszeitpunkt (McConnell, 1995; Polleux et al., 1997a). Des Weiteren besitzen die Neurone einen molekularen Phänotyp, der sie schichttypisch markiert (Hevner et al., 2003b). Die Transkriptionsfaktoren Otx1 und Cux2 zum Beispiel werden spezifisch in der infragranulären Schichten 5 und 6 (Otx1) bzw. in den supragranulären Schichten (Cux2) exprimiert. In der embryonalen Kortexanlage ist die zukünftige Schichtspezifität am Phänotyp der Vorläuferzellen bereits zu erkennen. So exprimieren die Zellen der VZ Otx1 und die Zellen der SVZ Cux2 (Frantz et al., 1994; Tarabykin et al., 2001; Hevner et al., 2003b; Nieto et al., 2004; Zimmer et al., 2004).

1.2.3 Arealisierung des dorsalen Telencephalons

Die CP der embryonalen Kortexanlage ist gegenüber dem reifen Kortex eine homogene erscheinende, sehr dicht gepackte Zellschicht. Die typischen Charakteristika des reifen Kortex sind in den frühen embryonalen Stadien noch nicht zu erkennen bzw. vorhanden. Allerdings werden bereits bei der Geburt im Kortex Oberflächenmoleküle wie z.B. die Cadherine (Cad) differenziell exprimiert, die den Kortex in frontale, parietale und okzipitale Bereiche gliedern (Suzuki et al., 1997). Die Suche nach einer Erklärung für die Herausbildung der differenzierten Kortexmerkmale während der Morphogenese des zerebralen Kortex motiviert die Wissenschaftler seit langer Zeit und brachte zwei grundlegende wie gegensätzliche Theorien über die Entstehung eines arealisierten Kortex hervor (Rakic, 1988; O'Leary, 1989).

Die „Protomap-Hypothese“ (Rakic, 1988) besagt, dass eine Arealisierung bereits zu einem sehr frühen embryonalen Stadium auf der Ebene der proliferativen Zone stattfindet (Dehay et al., 1993; Polleux et al., 1997a; Polleux et al., 1997b). Danach durchlaufen die Vorläuferzellen eines spezifischen Areals ein entsprechendes Differenzierungsprogramm, das die Neurone schon früh, Kortex-intrinsisch in der VZ, arealspezifisch determiniert. Durch die radiale Migration entlang der Fortsätze radialer Gliazellen transferieren die Neurone die arealischen Merkmale des Neuroepithels in die sich entwickelnde CP. Aus *In-vitro* Versuchen ist bekannt, dass verschiedene Regionen des embryonalen Kortex (E10,5 – E12,5), die in Kultur wachsen, molekulare regionsspezifische Marker ohne Einfluss extrinsischer Faktoren ausgebildet haben (Ferri and Levitt, 1993; Gitton et al., 1999; Vyas et al., 2003). Weitere Unterstützung für die Protomap wurden bei Untersuchungen des Kortex von Knock-out Mäusen für die Transkriptionsfaktoren Mash1 und Gbx2 gefunden. Trotz des völligen Fehlens der thalamokortikalen Projektionen in diesen Mäusen zeigen die Kortex ein normales molekulares Regionalisierungsmuster (Miyashita-Lin et al., 1999; Nakagawa et al., 1999).

Im Gegensatz dazu besagt die „Protokortex-Hypothese“ (O'Leary, 1989), dass die Ausbildung der arealischen Merkmale eines undifferenzierten embryonalen Kortex als Folge der informationsspezifischen Verdrahtung des Kortex und des Thalamus sowie anderer Projektionsziele zu sehen ist. Das Neuroepithel hat bei dieser Hypothese keinerlei arealspezifische Information. Diese wird ausschließlich extrinsisch durch afferente, kortikale Fasern in der sich differenzierenden CP generiert. Ein Transplantationsversuch, bei dem zu einem Zeitpunkt vor Ankunft der thalamischen Fasern der visuelle Kortex (V1) entnommen und heterotypisch in eine parietale Region des Kortex, welche den primären somatosensorischen Kortex (S1) bilden wird, verpflanzt wurde, zeigt, dass das Kortextransplantat gemäß dem Zielort der Transplantate von thalamischen Fasern des „Ventrobasalkomplexes“ innerviert wird und die für den S1-Kortex typische „barrel Struktur“ ausbildet (Schlaggar and O'Leary, 1991). Ein weiteres beeindruckendes Experiment ist die nach chirurgischer Manipulation erfolgte Umleitung der visuellen Projektionen aus dem lateralen Genikulatum zum S1 (anstatt V1), wobei der neu verdrahtete S1 sowohl zytoarchitektonische als auch funktionelle Eigenschaften des V1 entwickelt hat (Schneider, 1973; Frost and Schneider, 1979; Sur et al., 1988).

Aus heutiger Sicht entspricht die Arealisierung wohl eher einer Kombination aus Protomap- und Protokortex-Hypothese, bei der sehr früh durch intrinsische Faktoren eine Regionalisierung des Kortex erfolgt, und es nach der Etablierung thalamokortikaler sowie kortikokortikaler Verbindungen durch den Einfluss der nun vorhandenen extrinsischen Faktoren zu einer Schärfung der Areal-Karte kommt.

Die frühe Regionalisierung des Kortex wird durch das Zusammenspiel zweier Molekülklassen eingeleitet, die direkt auf die Vorläuferzellen wirken. Zum einen entlassen drei das dTC säumende Strukturen sezernierte Liganden, die durch die proliferative Zone der Kortexanlage diffundieren. Das ist am anterioren Pol die „kommissurale Platte“, die schon vor Embryonaltag 10 (E10) Faktoren der Fgf-Familie (fibroblast growth factor; Fgf 3, 8, 17 und 18) produziert (Bachler and Neubuser, 2001). Fgf8 breitet sich von rostral nach caudal über die Kortexanlage aus und ist an der Etablierung der anterior-posterior Achse (A-T) beteiligt in dem es direkt die Expression des Transkriptionsfaktors Emx2 reguliert, der dem Fgf8-Gradienten folgend über die Kortexanlage exprimiert wird. Manipulationen an der Expression beider Faktoren führen zu

Verschiebungen der finalen Areal-Karte (Bishop et al., 2000; Fukuchi-Shimogori and Grove, 2001; Bishop et al., 2002; Garel et al., 2003). *Emx2* fungiert dabei als ein Gegenspieler von *Pax6*, dass vom kaudalen Pol her in einem abfallenden Gradienten exprimiert wird. Auch Manipulationen an *Pax6* haben direkten Einfluss auf die Regionalisierung des Kortex (Bishop et al., 2000; Bishop et al., 2002; Muzio et al., 2002; Muzio and Mallamaci, 2003). Weiter sezernierte Liganden, die in der Art von *Fgf8* die proliferativen Zonen der Kortexanlage beeinflussen, sind Moleküle der Wnt-Familie aus dem „kortikalen Hem“ sowie Egf-artige Faktoren (*Tgfa*, *Nrg1*, *Nrg3*) aus dem „kortikalen Antihem“ [zur Übersicht in (Mallamaci and Stoykova, 2006)]. Eine entscheidende Frage bleibt allerdings offen. Es ist weiterhin unklar, wie die exprimierten Gradienten dieser Faktoren zu einer molekularen Karte führen, die die abrupten Arealgrenzen respektiert.

1.2.4 Tangentiale Migration der Vorläufer der GABAergen Interneurone

Im zerebralen Kortex repräsentieren die GABAergen Interneurone etwa 20% aller Neuronen und spielen durch ihre inhibitorische Funktion eine entscheidende Rolle bei der Verarbeitung der neuronalen Aktivität (Krimer and Goldman-Rakic, 2001; McBain and Fisahn, 2001). Insgesamt stellen sie eine sehr heterogene Population von Zellen dar, die sich nur schwer klassifizieren lässt. Sie werden morphologisch, neurochemisch sowie elektrophysiologisch in verschiedene Subpopulationen unterteilt. Eine große Zahl verschiedener Studien an Nagern konnte zeigen, dass im Gegensatz zum Menschen, bei dem wenigstens ein Teil der Interneurone in der SVZ des Palliums entstehen (Letinic et al., 2002), der Hauptanteil der GABAergen Interneurone dem Subpallium entstammt und auf verschiedenen migratorischen Strömen tangential in den Kortex einwandert (Anderson et al., 1997a; Tamamaki et al., 1997; Lavdas et al., 1999; Anderson et al., 2001). Transplantationsversuche *in-vitro* (Lavdas et al., 1999; Sussel et al., 1999; Anderson et al., 2001) sowie *in-vivo* (Wichterle et al., 2001; Valcanis and Tan, 2003) zeigten, dass die mediale ganglionische Eminenz (mGE) den größten Teil der Interneurone hervorbringt. Neuere Studien zeigen, dass auch die kaudale ganglionische Eminenz (cGE) Interneurone liefert (Anderson et al., 2001; Nery et al., 2002). Die laterale ganglionische Eminenz (IGE) gilt dagegen hauptsächlich als Ursprungsort für die Neurone des Striatums (Marin et al., 2000), allerdings zeigen verschiedene Studien, dass auch die IGE Interneurone für den Kortex hervorbringt (de Carlos et al., 1996; Anderson et al., 1997a).

All diese Regionen exprimieren die Transkriptionsfaktoren *Dlx1/2* und *Mash1*, welche die Differenzierung der Interneurone steuern und den GABAergen Phänotyp bewirken (Anderson et al., 1997b; Fode et al., 2000). Fraglich ist dabei, ob es sich um eine Art „Prototyp“ des GABAergen Phänotypes handelt, der sich im Verlauf der Kortexreifung durch neurotrophe Faktoren und neuronale Aktivität zu den zuvor beschriebenen verschiedenartigen Interneuronen differenziert (Marty et al., 1997) oder ob die GABAergen Vorläuferzellen bereits für verschiedene Phänotypen determiniert sind. *In-vitro* wurde gezeigt, dass der Phänotyp von Interneuronen in der Entwicklung schon früh festgelegt wird und abhängig von dem Zeitpunkt und dem Ort ist, an dem die Zellen ihre letzte mitotische Teilung erfahren hat (Xu et al., 2004; Xu et al., 2005). Die GE muss demnach noch weitere Faktoren exprimieren, die eine phänotypische Unterscheidung der GABAergen Vorläuferzellen erlauben. Einer dieser Faktoren ist mit großer Sicherheit das Homöobox-Gen

Nkx2.1, dessen Expression auf die im vTC ventromedial gelegene anteriore endopedunkuläre Area (AEP) und die mGE beschränkt ist und bei dessen Verlust die Zahl GABAerger Interneurone im Kortex um ca. 50% reduziert ist (Sussel et al., 1999). Die Suche nach weiteren Faktoren zielt beispielsweise auf Zelloberflächenmoleküle ab, die geeignet wären, einzelne Subregionen mit verschiedenen Vorläuferzellen innerhalb der GE auszuweisen.

1.3 Die Organisation des Thalamus

Nahezu alle sensorischen Projektionen aus der Peripherie ziehen über den Thalamus in die Großhirnrinde. Der Thalamus ist in eine große Zahl von Kerngebieten gegliedert, die sich anhand ihrer Form, ihrer Lage sowie der Zelldichte und der im Kern enthaltenen Zelltypen morphologisch unterscheiden. Die einzelnen Kerne sind spezifisch mit den verschiedenen Arealen des Kortex verbunden und somit Bestandteile definierter Projektionsbahnen und Nervenetze. Aufgrund ihrer Verdrahtung mit dem Kortex unterscheidet man die Kerne in spezifische Thalamuskern, die im Kortex auf ein oder wenige Areale projizieren und eine starke Rückprojektion dieser Areale erhalten, und unspezifische Kerne, die auf einen großen Bereich der Großhirnrinde projizieren. Zu den spezifischen Kernen, die auch Relais- und Assoziationskerne genannt werden, gehören die Kerne des sensorischen und motorischen Systems, zu den unspezifischen die *intralaminaren* Kerne und der VM Kern.

1.4 Die Entwicklung des Thalamus

Die Entwicklung des Thalamus vollzieht sich in vier Schritten: (i) die Spezifizierung des Neuroepithels, (ii) die Neurogenese der kernspezifischen Zellen, (iii) die Migration der Neurone aus der proliferativen Zone in die Mantelzone und (iv) die Differenzierung des pronukleären Gewebes in die spezifischen Kerne.

Der Thalamus ist ein Bestandteil des Diencephalons und entwickelt sich aus dem dorsalen Teil des Neuroepithels, welches den dritten Ventrikel umgibt (Alarplatte). Die Vorläuferzellen bringen die Zellen für die drei Hauptregionen des Thalamus hervor, den Epithalamus mit der Habenula, den dorsalen Thalamus, dem die meisten spezifischen und unspezifischen Kerne angehören, und den ventralen Thalamus, mit dem Retikularkern und dem ventralen Genikulatum. Durch die Gliederung der neuralen Anlage in die Prosomere erlangen die Vorläuferzellen ihre Bestimmung. Der dorsale sowie ventrale Thalamus geht aus Anteilen der Prosomere 2 und 3 (p2 und p3) hervor (Puelles and Rubenstein, 2003). Sie werden durch die *Zona limitans intrathalamica* (Zli) voneinander getrennt. Die Zli fungiert als musterbildendes Zentrum, ähnlich wie die weiter posterior liegende Mittelhirn –Hintergrenze, das durch die Expression der Faktoren sonic hedgehog (shh), Fgf8 und Bmp4 den zukünftigen Thalamus mit Positionsinformationen ausstattet (Crossley et al., 2001) und die regionalspezifische Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren im Neuroepithel reguliert (Miyashita-Lin et al., 1999; Fode et al., 2000; Nakagawa and O'Leary, 2001; Jones and Rubenstein, 2004). So entwickelt die Mehrheit der Vorläuferzellen des dorsalen Thalamus durch die Aktivierung der Gene Ngn1/2 wie im Pallium einen glutamatergen Phänotyp und die Vorläuferzelle des ventralen Thalamus durch die

Anwesenheit von Dlx1/2-Transkripten einen GABAergen (Fode et al., 2000; Stuhmer et al., 2002b; Stuhmer et al., 2002a; Hayes et al., 2003).

Altman und Bayer postulieren durch die Beobachtungen in ihren „birth dating“-Experimenten separierte Proliferationseinheiten im Neuroepithel, die sie *Lobules* nennen, und die ausschließlich die Neurone für einzelne thalamische Kerne bilden. Diese Einheiten sind bereits zu Beginn der Proliferationsphase (E14; Ratte) als Epithelein- und -ausstülpung (Inversion, Eversion) entlang der anteriorposterior-Achse des Neuralrohrs zu erkennen. So entstehen aus dem am weitesten rostral gelegenen „anterioren *Lobule*“ die Kerne des anterioren Kernkomplexes, der Paraventrikularkern sowie der Paratenialkern (Altman and Bayer, 1988c).

Die Proliferation der thalamischen Vorläuferzellen beginnt bei der Ratte bei E13 (E11; Maus). In einem Zeitraum von E13 bis E15 entstehen als erstes die Neurone des Retikularkerns (Altman and Bayer, 1988c, 1988b). Die Zellen des Paratenialkern (E15-E18) und Paraventrikularkern (E16-E18) werden zuletzt gebildet (Altman and Bayer, 1988c, 1988a). Allgemein lässt sich sagen, dass die Neurone der caudalen Kerne zeitlich vor den Neuronen der anterioren, und die Zellen der medialen Kernen nach denen der ventralen Kernen geboren werden. Somit existieren wie im Telencephalon neurogenetische Gradienten, die allerdings nicht in die gleiche Richtung verlaufen.

Nach der finalen Mitose migrieren die Neurone innerhalb von zwei bis drei Tagen aus der proliferativen Zone in die Mantelzone (MZ) und nehmen dort ihren vorbestimmten Platz ein. Dabei entsteht ein morphologisch undifferenzierter, „pronukleärer“ Thalamus. Die morphologische Differenzierung der postnatal gut unterscheidbaren Kerne vollzieht sich durch die Bildung von Neuropil und teilweise aktivitätsabhängig. Hierfür entsenden und empfangen die thalamischen Neurone kernspezifisch lange Axone, die sie mit den Arealen des Kortex bidirektional verbinden. Für die Verdrahtung des Kortex mit dem Thalamus existieren demnach bereits im frühen embryonalen Thalamus entsprechende Positionsinformationen intrinsischer Natur. Einige Arbeiten zeigen, dass auf molekularer Ebene der pronukleäre Thalamus bereits kernspezifisch differenziert ist. So ist die Expression der Transkriptionsfaktor-Rezeptorgene *RORalpha* und *RORbeta* auf die spezifischen sensorischen Thalamuskern beschränkt (Nakagawa and O'Leary, 2003). Verschiedene LIM-Homöobox-Gene stellen durch überlappende Expression einen molekularen Code für distinkte thalamische Kompartimente dar (Nakagawa and O'Leary, 2001). Ein Vergleich kernspezifischer Expressionsmuster verschiedener regulatorischer Gene bei Maus und Affe zeigten eine kombinatorische Expression für einzelne thalamische Kerne, wobei die Kombination dieser Gene evolutiv konserviert scheint (Jones and Rubenstein, 2004). Die frühe differenzielle Expression solcher Faktoren geht vermutlich mit der Ausbildung eines entsprechend differenziellen Lenkungsapparates einher.

1.5 Die thalamokortikale Verdrahtung

Jeder thalamische Kern entsendet Axone in den Neokortex, die dort kernspezifisch in den entsprechenden kortikalen Arealen terminieren. Diese Projektionen des Thalamus in den Kortex verlaufen in einer topografischen Weise. Die lateralen thalamischen Kerne projizieren im Kortex nach caudal und die medialen

Kerne nach rostral, die anterioren nach medial und die posterioren nach lateral (Caviness and Frost, 1980; Crandall and Caviness, 1984; Seibt et al., 2003; Garel and Rubenstein, 2004). Die Nachbarschaftsrelationen der Kerne werden von den auswachsenden Fasern beibehalten und auf die Großhirnrinde übertragen. Selbst die interne Ordnung der Fasern einzelner sensorischer Thalamuskern, wie die des LGN, projizieren innerhalb eines kortikalen Areals in der Weise, wie sie den Thalamus verlassen. Somit entsteht im Kortex eine topologische Projektionskarte des Thalamus.

Die thalamokortikalen Axone (TCA) wachsen ventral aus dem Thalamus heraus, vollziehen eine 90° Wendung und überschreiten die Diencephalon-Telencephalon-Grenze. Dies geschieht bei der Maus etwa an Tag E13,5. Anschließend passieren die TCA's das ventrale Telencephalon bis zu Pallium-Subpallium-Grenze am Ende der IGE und warten dort bis etwa E14,5 auf die ankommenden kortikofugalen Axone, die die Rückprojektionen in den Thalamus darstellen. Hierfür fächern die zuvor faszikulierten thalamischen Fasern auf und interagieren mit den afferenten kortikalen Faserbündeln, die ebenfalls fächerförmig ausgebildet sind. Nach Tag E14,5 sind die TCA's in starkem Ausmaß in der kortikalen IMZ zu finden, in der sie sich nach dorsal verlängern bis sie ihre finale arealspezifische Position unterhalb der CP gefunden haben (Price et al., 2006). Nach einer erneuten Richtungsänderung um 90° wachsen die Axone im Anschluss radial in die CP ein. Bei Frettchen, Katze und Primaten ist bekannt, dass die Axone vor dem Einwachsen in die CP für eine längere Zeit in der SP verharren, was allgemein als „Warteperiode“ bezeichnet wird (Rakic, 1977; Ghosh and Shatz, 1992). Über die Existenz einer solchen Warteperiode bei Nagern wird diskutiert, da sie zumindest sehr kurz sein muss, denn schon am Tag E15 können bei Mäusen die ersten Axonendigungen thalamischer Neurone in der CP beobachtet werden (Catalano et al., 1991, , 1996; Auladell et al., 2000). Die Mehrheit der thalamischen Axone allerdings dringt etwa an E18 in die CP ein (Molnar et al., 1998b).

1.5.1 Die zelluläre Guidance-Achse

Die topografischen Relationen der thalamokortikalen Projektionen werden bereits von den auswachsenden Axonen auf dem Weg in den Neokortex respektiert. So wachsen die den ventralen Kortex ansteuernde Axone in der IMZ bzw. SP oberflächlicher als die der Axone, die in die dorsalen Regionen des Kortex ziehen. „Tracing-Experimente“ mit fluoreszierenden lipophilen Farbstoffen wie Dil identifizierten ein zelluläres „Gerüst“ entlang des thalamokortikalen und kortikofugalen Projektionsweges, das für die Entwicklung dieser Ordnung eine maßgebliche Rolle spielen könnte (Adams et al., 1997). Dazu zählen die Zellen der SP, welche die ersten Zellen des Kortex sind, die in den Thalamus projizieren (McConnell et al., 1989; Blakemore and Molnar, 1990; De Carlos and O'Leary, 1992), und die sowohl Synapsen mit den aufsteigenden thalamokortikalen Axonen ausbilden, als auch mit den Zellen, der sich differenzierenden CP (Ghosh and Shatz, 1992; Catalano et al., 1996). Ablationen der Subplate-Zellen führen durch eine Fehllenkung der afferenten Axone zu Fehlern der Topographie im Kortex (Ghosh et al., 1990). Des Weiteren sind in einem frühen Stadium der thalamokortikalen Verdrahtung entlang der internen Kapsel (IC) im vTC Neurone lokalisiert („Kanalzellen“), die lange Axone entweder in den Thalamus oder auch in den Kortex senden. Diese dienen vermutlich als Pionierfasern und leiten nachfolgende Faserbündel in die entsprechenden Regionen

von Kortex und Thalamus (Metin and Godement, 1996; Deng and Elberger, 2003). Ein drittes Glied der Guidance-Achse liegt im Diencephalon. Der thalamische Retikularkern (Rt) sendet im adulten Tier sowie beim Menschen zu jedem thalamischen Kern eine Projektion und erhält von diesen durch Axonkollaterale thalamokortikale Fasern eine Rückprojektion. Afferenzen erhält der Rt ebenfalls durch Axonkollaterale von den thalamischen Projektionen des Kortex. Eine Projektion des Rt in den Kortex existiert im Adultus nicht. Embryonal ist der Rt gegenüber dem dTh sehr groß und besitzt einen transienten Unterkern, den Periretikularkern (PRt). Er liegt lateral neben dem Rt und medial zum Pallidum und somit auf dem direkten Weg der TCAs (Clemence and Mitrofanis, 1992). Der Rt und PRt entsenden embryonal Axone in den Thalamus. Somit könnten die nachfolgenden kortikothalamischen Fasern entlang der frühen (peri-) retikulären Afferenzen den Weg in den Thalamus finden ebenso wie die TCAs den Weg aus dem Thalamus heraus in das vTC (Mitrofanis and Baker, 1993; Mitrofanis and Guillery, 1993).

1.5.2 Die molekulare Guidance (Chemoaffinitätshypothese)

Das stereotype Verhalten der Axone vom initialen Auswachsen bis hin zur Etablierung der Synapsen in der Zielregion wird vor allem durch die Expression von spezifischen „Lenkungsmolekülen“ entlang des entsprechenden Weges der Axone beeinflusst. Dabei reagieren die Axone mit ihrem Wachstumskegel an der Spitze des auswachsenden Fortsatzes auf die molekulare Umgebung, in der sie sich befinden. Der Wachstumskegel ist ein spezielles sensorisches und motorisches Zellkompartiment mit Ausstülpungen, den Filopodien und Lamellipodien. Sie sind hochgradig beweglich und mit einem modulierbaren Set von Oberflächenmolekülen besetzt, um mit der extrazellulären Matrix und dem passierten Gewebe differenziell interagieren zu können, wenn sie sich den Weg durch das Gewebe bahnen. Durch den Besatz mit den entsprechenden Liganden und/oder Rezeptoren der verschiedenen Familien der Lenkungsmoleküle können die Axone selektiv auf die molekularen Signale reagieren. Für eine differenzielle Lenkung sollten sich verschiedene Subtypen von Neuriten in eben dieser Ausstattung an Molekülen unterscheiden.

Die verschiedenen Lenkungsmoleküle können sowohl membranständig als auch in sezernierter Weise vorkommen. Die Reaktion des Wachstumskegels kann attraktiv bzw. permissiv sein, und er bewegt sich auf die Quelle des Signals zu bzw. er hält die Richtung bei. Oder aber die Reaktion ist repulsiv bzw. inhibierend. Bei einer inhibierenden Reaktion wird die Beweglichkeit des Axons vermindert und es kommt zu einem Stillstand. Bei einer repulsiven Antwort hingegen kommt es zu einem Kollaps des Wachstumskegels, wobei er zurückgezogen wird. Die erneute Ausbildung geht mit einer Richtungsänderung des Wachstumskegels und mit einer Umlenkung des Axons einher.

Für die Ausbildung der thalamokortikalen Verknüpfung bedeutet dies, dass die auswachsenden Axone aus dem Thalamus sich für den Weg durch das vTC entscheiden und dabei im Bereich des ventral gelegenen Hypothalamus und dem medial gelegenen Septum auf repulsive Signale treffen, die die TCAs lateral ins vTC ablenken. Ein Mix aus repulsiven und attraktiven Signalen kanalisiert vermutlich die Fasern im vTC innerhalb der internen Kapsel. Die Axone steigen anschließend in das Pallium auf und passieren die IMZ. In der IMZ bzw. SP finden die ankommenden TCAs wahrscheinlich entsprechend dem in der Kortexanlage

vorliegenden Mix an Lenkungsmolekülen die entsprechende Position unterhalb der CP. Ein erneuter Richtungswechsel des Wachstumskegel lässt die kortikalen Efferenzen letztendlich in die CP einwachsen.

Vier große Molekülfamilien wurden bisher identifiziert, deren Liganden und Rezeptoren das Verhalten von auswachsenden Axonen beeinflussen können. Die größte Familie ist die der *Semaphorine*. Sie umfasst 20 Mitglieder von sezernierten und membrangebundenen Liganden, denen eine an ihrem N-Terminus konservierte, ca. 420 Aminosäuren enthaltende Semadomäne gemein ist. Die Semaphorine werden ihrer Struktur nach in acht Klassen unterteilt. Die Klassen 1 und 2 kommen bei Invertebraten vor, die Klassen 3 bis 7 bei Vertebraten, Klasse V Semaphorine werden von Viren codiert (Raper, 2000; Grunwald and Klein, 2002). Als Rezeptoren stehen den Semaphorinen vier Klassen der Plexine (PlexA1-4, PlexB1-3, PlexC1 und PlexD1) zur Verfügung. Die Liganden können sie direkt binden und eine Signaltransduktion initiieren. Die sezernierte Semaphorine der Klasse 3 binden einen zweiten Rezeptortyp die Neuropiline (Nrp1 und Nrp2), die allerdings für die Initialisierung der Signaltransduktion ein Plexin zusätzlich als Corezeptor benötigen.

Verschiedene *in-vitro* Versuche zeigen, dass die Wechselwirkung zwischen den Semaphorinen und ihren Rezeptoren sowohl attraktive als auch repulsive Effekte zur Folge haben kann (Raper, 2000). So führt die Expression von Sema 3a in der kortikalen VZ zu einer repulsiven Umlenkung der auswachsenden kortikofugalen Axone (Bagnard et al., 1998). Sema3c hingegen hat auf das Auswachsen von Axonen aus kortikalen Explantaten eine anziehende Wirkung (Bagnard et al., 2000).

Die zweite eher kleine Familie ist die der *Netrine*. Sie spielen vor allem bei der Axonlenkung an der Mittellinie des ZNS eine Rolle (Stein and Tessier-Lavigne, 2001). Die Netrine sind ausschließlich sezernierte Liganden und haben sowohl attraktive als auch repulsive Wirkung (Serafini et al., 1994; Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995). Die Diffusion des Liganden ist durch die Bindungsmöglichkeiten an negativ geladene Moleküle wie Proteoglykane in der Umgebung limitiert. Die attraktive Wirkung der Netrine wird über die Rezeptorfamilie DCC (*deleted in colorectal carcinoma*) vermittelt. Dazu gehören Frazzled in *Drosophila*, UNC40 in *C. elegans* und DCC sowie Neogenin der *Vertebraten* (Yu and Bargmann, 2001). In *in-vitro* Versuchen wurde gezeigt, dass durch die Bildung von Rezeptormultimeren von DCC eine Attraktion sowie eine Stimulation des Axonwachstums erreicht wird (Giger and Kolodkin, 2001). Die repulsive Wirkung wird durch die zusätzliche Beteiligung von Rezeptoren der UNC 5-Familie vermittelt. Bei den *Vertebraten* existieren die zu UNC-5 von *C. elegans* und *Drosophila* Homologen UNC5H1-3. Die Repulsion wird dabei über die Bildung von heteromeren Rezeptorkomplexen erreicht (Hong et al., 1999; Seeger and Beattie, 1999).

Ein weiteres Lenkungssystem ist das *Slit/Robo*-System. Die Expression von Slit entlang der Mittellinie verhindert das Rückkreuzen der kommissuralen Axone (Zou et al., 2000), die durch Netrin an die Mittellinie gebracht werden. Bei den Vertebraten existieren drei *slit*-Gene (*slit1-3*). Ihre ausschließlich repulsive Wirkung erreichen sie durch Bindung der Robo-Rezeptoren (roundabout). Nach dem Überqueren der Mittellinie wird die Expression der Robo-Rezeptoren in den kommissuralen Axonen heraufreguliert. Dies führt zum einen dazu, dass die Mittellinie durch die Expression von Slit repulsiv wird, und zum anderen, dass durch eine Interaktion von Robo mit dem DCC-Rezeptor von Netrin die attraktive Wirkung der Mittellinie verringert wird (Kidd et al., 1999; Zou et al., 2000; Stein and Tessier-Lavigne, 2001).

Die vierte Familie sind die Moleküle des ephrin-/ Eph-Systems. Sie stehen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Die Expressionsmuster der einzelnen Mitglieder sollen ausführlich untersucht werden.

1.6 Das Ephrin-/ Eph-System

Die Moleküle des Ephrin-/ Eph-Systems sind membranständige Liganden und Rezeptoren, die während der gesamten neuronalen Entwicklung in einer hochdynamischen und regionspezifischen Weise im Gehirn exprimiert werden (Liebl et al., 2003; Yun et al., 2003; Niehage et al., 2005). Als Signal- und Lenkungsmoleküle ist das System durch die Induktion von attraktiven sowie repulsiven Wechselwirkungen zwischen den Zellen an der korrekten Ausbildung von verschiedenen Nervennetzen des Gehirns beteiligt, mit besonderem Einfluss auf die Zellwanderung, die axonale Lenkung sowie die axonale Verzweigung (Flanagan and Vanderhaeghen, 1998; Drescher and Knoell, 2001; Wilkinson, 2001; Mann et al., 2002b; Santiago and Erickson, 2002; Uziel et al., 2006).

1.6.1 Die Eph-Rezeptoren und ihre Liganden

Die Eph-Rezeptoren besitzen eine intrazelluläre Kinase Domäne und gehören zur Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK). Sie stellen mit bisher 14 identifizierten Mitgliedern die größte Unterfamilie der RTKs. Die extrazelluläre Domäne der Eph-Rezeptoren besteht aus einer konservierten N-terminalen globulären Domäne, die aus 180 Aminosäuren besteht und die Bindung mit den Liganden bewirkt (Labrador et al., 1997). Anschließend folgt eine Cystein-reiche Domäne und zwei Fibronectin Typ III Domänen, die einerseits bei der Dimerisierung der Rezeptormoleküle (Lackmann et al., 1998) und andererseits bei Interaktion mit verschiedenen anderen Proteinen wie zum Beispiel dem NMDA-Rezeptor (Dalva et al., 2000) beteiligt sein können. Die Rezeptormoleküle wurden erstmals aus einer Erythropoetin-produzierenden hepatozellulären Karzinoma-Zelllinie isoliert, die der Molekülfamilie ihren Namen gibt (Hirai et al., 1987).

Entsprechend ihrer Sequenzhomologie sowie der Ligandenaffinität werden Eph-Rezeptoren in zwei Klassen unterteilt. Die Klasse der EphA-Rezeptoren bindet vornehmlich die A-Liganden (ephrinA; efna). Diese Liganden sind über einen GPI-Anker (Glykosylphosphatidylinositol) mit der Zellmembran verbunden. Im Gegensatz dazu besitzen die B-Liganden, die vorzugsweise von der Klasse der B-Rezeptoren gebunden wird, eine transmembranale Domäne. Bindungsstudien haben gezeigt, dass, mit Ausnahmen von EphA1 und efna1, alle A-Rezeptoren alle A-Liganden und alle B-Rezeptoren alle B-Liganden binden können. Dies tun sie allerdings mit unterschiedlichen Affinitäten. So bindet efna5 mit einer deutlich niedrigeren Bindungskonstante an EphA3 als an EphA4 oder EphA5 (Monschau et al., 1997). Auch weiß man heute besser, dass eine strikte Klassentrennung nicht existiert. Der Rezeptor EphA4 kann ebenfalls Liganden der Klasse B binden, der Ligand efna5 zeigt eine Affinität zu EphB2. Für die Liganden und Rezeptoren des efn-/ Eph-Systems ergibt sich somit eine enorme Zahl an Kombinationen von Bindungsmöglichkeiten, wodurch dem System eine große Bedeutung bei der neuronalen Entwicklung zugesprochen wird. Es gilt den vermutlich kombinatorischen „ephrin-/ Eph-code“ zu entschlüsseln.

1.6.2. Das Signaling des efn-/ Eph-Systems

Eine weitere Besonderheit neben den Bindungsverhältnissen zwischen Liganden und Rezeptoren ist die Richtung, in die die Signalweiterleitung erfolgt. Im efn-/ Eph-System kann sie prinzipiell sowohl in Richtung der rezeptortragenden Zelle („forward signaling“) als auch in Richtung der ligandentragenden Zelle („reverse signaling“) erfolgen. Das „reverse signaling“ wurde zunächst nur für die B-Liganden beschrieben, die durch ihre transmembranale Domäne dazu in der Lage sind. Für die A-Liganden existieren Hinweise, nach denen sich die Liganden der Hilfe von Corezeptoren bedienen, um eine Signaltransduktion ins Zellinnere zu gewährleisten (Henkemeyer et al., 1996; Holland et al., 1996; Bruckner et al., 1997; Anderson, 1998; Mellitzer et al., 1999).

Die Aktivierung und die damit verbundene Signaltransduktion erfordert die Bildung eines Rezeptor-Liganden-Komplexes, wobei eine Aktivierung nur dann stattfindet, wenn der Ligand mindestens als Dimer vorliegt. Ein Ligandenmonomer allein ist nicht in der Lage, eine Signaltransduktion zu initialisieren (Davis et al., 1994). Die Bindung der Ligandendimere führt zu einer Rezeptordimerisierung und zur Rezeptor-Autophosphorylierung, wodurch die intrazelluläre Kinaseaktivität einsetzt und die Signalkaskade mit der Phosphorylierung des nachgeschalteten Moleküls beginnt. Der Liganden-Rezeptor-Komplex kann sich, durch das Zusammentreten von weiteren Liganden-Rezeptor-Paaren zu verschiedenen großen Multimeren vergrößern und so zu quantitativ differentiellen Antworten führen (Stein et al., 1998). Der minimale Aktivierungskomplex besteht aus zwei Liganden sowie zwei Rezeptoren (Lackmann et al., 1997). Die Ablauf der intrazellulären Signalkaskade zielt auf das Actin-Zytoskelett, welches destabilisiert oder stabilisiert wird (Ellis et al., 1996; Holland et al., 1997; Meima et al., 1997; Zisch et al., 1998). Darauf hin kann die Zelle mit dem Kollaps des Wachstumskegel oder dem Einstellen der Zellmigration reagieren oder aber mit Fortsetzung ihrer Bewegung (Gao et al., 1996; Meima et al., 1997; Davenport et al., 1998; Gao et al., 1998; Zimmer et al., 2007).

1.6.3 Grundsätzlich Funktionen des Ephrin-/ Eph-System

Für das ephrin-/ Eph-System sind bereits in der Literatur viele Beteiligungen an fundamentalen Prozessen der Entwicklung des Nervensystems beschrieben. Dabei liegen die Schwerpunkte vor allem in der embryonalen Entwicklung, der postnatalen Reifung des Gehirns aber auch in der plastischen Remodellierung der synaptischen Verbindungen.

Die Etablierung von Grenzen im Rhombencephalon

Die Segmentierung des Hinterhirns ist ein entscheidender Schritt für die Differenzierung der verschiedenen Neurone des Rhombencephalons in einem zuvor homogen Neuroepithel. Die einzelnen Segmente, die Rhombomere genannt werden, sind deutlich als sieben Wölbung des Neuroepithels zu erkennen (r1 bis r7). An der Rhombomerbildung ist u.a. eine große Zahl verschiedener Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Hox-Gene beteiligt. Deren Expressionsmuster ist anfangs noch diffus, doch lassen sie schon die Gliederung der Segmente erkennen. In folgenden Schritten kommt es zur Schärfung von Expressionsgrenzen der in den

Rhombomeren exprimierten Genen und zur Bildung von scharfen Segmentgrenzen und somit zu Neuronenpopulationen mit segmentspezifischen Phänotypen (zum Überblick Cooke and Moens, 2002).

Diese Ausbildung der Segmentgrenzen sind durch zwei Prozesse gesteuert. Das ist zum einen das Aussortieren unterschiedlicher Neuronentypen an den Grenzen und zum anderen eine dynamische Regulation und Änderung der Expression von segmentspezifischen Faktoren der Neurone innerhalb der einzelnen Rhombomere.

Expressionsanalysen des Ephrin-/ Eph-Systems im Rhombencephalon machen einen Zusammenhang an den Prozessen der Segmentierung deutlich. Einige Rezeptoren und Liganden beider Klassen sind in den verschiedenen Rhombomeren exprimiert und halten dabei die Segmentgrenzen strikt ein. Vor allem die Expression von EphA4 und *efnb2*, die in alternierenden Rhombomeren der Maus und des *Xenopus* sogar Spezies-übergreifend exprimiert sind (EphA4 in r3 und r5, *efnb2* in r2, r4 und r6) (Hirai et al., 1987; Gilardi-Hebenstreit et al., 1992; Nieto et al., 1992; Theil et al., 1998), lassen diesen Schluss zu. Die Expression von dominant-negativem EphA4 in *Xenopus* und Zebrafisch führt zu ektopisch exprimierten r3- und r5-Markern in den angrenzenden Rhombomeren (r2, r4 und r6) (Xu et al., 1995). Cell-sorting-Experimente, in denen die Zellen der Rhombomere trunkierte und full-length Formen von EphA4 und *efnb2* überexprimieren, zeigen, dass beim Aussortieren der Zellen von aneinander grenzenden Segmenten das bidirektionale Signaling die maßgebliche Rolle spielt (Mellitzer et al., 1999; Xu et al., 1999).

Die topografische Projektion des retinotektalen Systems

Die Übertragung der Nachbarschaftsbeziehung durch axonale Projektionen von einem Ursprungsgebiet auf ein Zielgebiet ist im Gehirn ein häufig realisiertes Prinzip. Hierbei spricht man von einer topographischen Projektion. Das Modellsystem für topographische Projektionen ist das retinotektale System, an dessen Ausbildung das ephrin-/ Eph-System maßgeblich beteiligt ist. Die Axone der retinalen Ganglienzellen (RGC) projizieren unter Erhaltung ihrer räumlichen Beziehungen ins Tectum. Die Axone der RGCs entwickeln entlang der anteriorposterior-, sowie der dorsoventral-Achse eine topographische Karte der Retina auf dem Tectum. Dabei zielen die Axone der nasalen Neurone in die posterioren Bereiche des Tectums, die Axone temporaler Neurone hingegen steuern die anterioren Abschnitte an. Die anterior-posteriore Achse von Retina und Tectum wird dabei durch mehrere verschiedene A-Liganden und A-Rezeptoren des ephrin-/ EphA-Systems in gegenläufigen Gradienten markiert. Diese Gradienten sorgen dafür, wie weit z.B. ein temporales Axon entsprechend seines Gehaltes an z.B. EphA3 entlang der anterior-posterior-Achse in das Tectum einwächst (Drescher et al., 1995; Drescher et al., 1997).

Untersuchungen bei Maus und *Xenopus* (Mann et al., 2002a) legen nahe, dass die Ausbildung der dorsoventral-Achse durch *efnb*-/ EphB-Gradienten realisiert wird. EphB-Rezeptoren werden in der Retina in einem Gradienten exprimiert, dessen Konzentration bei der Maus von dorsal nach ventral zunimmt. EphrinB wird in einem steigenden Gradienten entlang der lateral-medial Achse des Superior Culliculus gebildet. Ventrale Axone, die auf Ziele hoher *efnb*-Konzentrationen projizieren, exprimieren ebenfalls hohe

Konzentrationen an EphB-Rezeptoren, was im Widerspruch zu der den Ephrinen vornehmlich zugeschriebenen repulsiven Wirkung steht und für eine attraktive Wirkung spricht.

Plastische Remodellierung der synaptischen Verbindungen

Für die Funktionalität des Gehirns etablieren die Neurone unzählige Synapsen zu anderen Neuronen. Für exzitatorische Synapsen bilden nachgeschalteten Zellen kleine dornenähnliche Strukturen auf der Oberfläche ihrer Dendriten aus, die Spines genannt werden (zur Übersicht Bonhoeffer and Yuste, 2002). Morphologische Änderungen der Spines stehen mit der synaptischen Plastizität in Zusammenhang. Während der Entwicklung bilden sich die Spines aus langen, dünnen dendritische Filopodien, die sich zu kurzen, gedrungenen und pilzförmigen Dornen umbilden. Diese morphologischen Veränderungen sind reversibel und werden durch lokale Signale und neurale Aktivität reguliert (Hering and Sheng, 2001).

Auch hierbei spielen die Moleküle des ephrin-/ Eph-Systems eine Rolle. Eine Arbeit von Murai und Kollegen (Murai et al., 2003) zeigt z.B., dass die Eph-Rezeptoren an der Regulierung der Spine-Morphogenese von hippocampalen Neuronen beteiligt sind. Nach Stimulation mit efna3-FC zeigen die dendritischen Spines der Neurone in Slice-Kulturen eine deutliche Verkürzung. Dieser Effekt konnte nicht beobachtet werden, wenn die hippocampalen Slice-Kulturen von EphA4-Knockout Mäusen gewonnen wurden. Hier waren die Spines länger und von eher irregulärer Gestalt. Die Expression von efna3 konnte dabei auf den Astrozyten lokalisiert werden. Dies zeigt, dass sogar die neuronalen Gliazellen in die Prozesse der Plastizität involviert sind und somit mehr als nur trophische Funktionen, wie früher gedacht, ausüben.

2. Zielstellung

Die hochkomplexe Verdrahtung des Gehirns mit seinen Milliarden von Zellen und Zellkontakten wird durch eine vergleichsweise geringe Zahl an Gen-Familien von Lenkungsmolekülen realisiert, die allerdings in komplexen Kombination das Verhalten der Neuronen und Neuriten während der embryonalen Entwicklung steuern.

Die Gene des ephrin-/ Eph-Systems stellen eine Familie dieser Lenkungsmoleküle dar, deren Funktionen bei den Prozessen der Entwicklung des Nervensystems in einer Vielzahl von *In-vitro* und *In-vivo* Experimenten untersucht und nachgewiesen wurde. Allerdings zeigt sich, dass das Ausschalten einzelner Gene des ephrin-/ Eph-Systems oft zu keinen entscheidenden Veränderungen in der Entwicklung des Gehirns führt. So ist anzunehmen, dass die verschiedenen Mitglieder in einem komplexen Zusammenspiel von mehreren Liganden und Rezeptoren während der Entwicklung des Gehirns wirken.

Um herauszufinden welche Gene des ephrin-/ Eph-Systems während der Entwicklung des thalamokortikalen Systems der Maus des Stammes C57BL/6 eine Rolle spielen, soll eine umfassende Expressionsanalyse von allen Mitgliedern des ephrin-/ Eph-Systems mittels *In-situ*-Hybridisierung durchgeführt werden. Hiefür wurden konsekutive, koronale Kryostatschnitte des Gehirns angefertigt und mit den jeweiligen Ribosonden unter hochstringenten Bedingungen hybridisiert. Um die gesamte Entwicklung des thalamokortikalen Systems in einzelne entwicklungsbiologische Prozesse aufzuschlüsseln, wurden die Expressionsmuster des Kortex, des Thalamus und des ventralen Telencephalon in den embryonalen Stadien E14, E16 und E18, sowie im Kortex und im Thalamus zusätzlich in den postnatalen Stadien P6 und P28 analysiert. Die verschiedenen Hirnbereiche beeinflussen sich während der Entwicklung durch zahlreiche Wechselwirkungen gegenseitig. So liefert das ventrale Telencephalon den Großteil der GABAergen Interneuronen für den Kortex. Der Thalamus sendet zahlreiche Axone in den Kortex und beeinflusst dadurch ebenso die Kortexentwicklung wie das ventrale Telencephalon. Das thalamokortikale System stellt in der Entwicklung wie auch in der Funktion eine Einheit dar, und soll auch in diesem Sinne untersucht werden. Die gewählten Altersstadien stellen die Zeitpunkte der wichtigsten Etappen in der Entwicklung des thalamokortikalen Systems dar. Sie schließen die entwicklungsbiologischen Prozesse wie neuronale Proliferation (E14 und E16), radiale und laterale Migration (E14 und E16), thalamokortikale sowie kortikothalamische Projektionen (E14, E16 und E18) ein. In den postnatalen Stadien vollziehen sich vor allen die Inter- und Intralaminaren Verknüpfungen (P6), sowie die synaptische Remodellierung zur Schärfung der arealspezifischen Verknüpfungen (P6 und 28).

Der Bezug der Expressionsmuster der Gene des ephrin-/ Eph-Systems zu den entscheidenden entwicklungsbiologischen Prozessen stellt den Mittelpunkt der Fragestellung dieser Arbeit.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien und Organismen

3.1.1. Chemikalien

Die meisten der verwendeten Grob- und Feinchemikalien stammen von der SIGMA-ALDRICH Firmengruppe (<http://www.sigma-aldrich.com>) oder von MERCK (<http://www.merck.de>) und waren von analytischer Reinheit. Wurden Chemikalien anderer Firmen benutzt, ist dies an entsprechender Stelle vermerkt.

H₂O steht im weiteren Verlauf für deionisiertes Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage (Elga).

3.1.2. Lösungen, Puffer und Medien

Als Lösungsmittel wurde in allen Fällen H₂O verwendet. Die pH-Werte beziehen sich auf Raumtemperatur. Die Prozentangaben sind, sofern nicht anders angegeben, als Masse pro Volumen (m / V) –Angaben zu verstehen.

10 x Ladepuffer	Bromphenolblau	0,25 %
	Glycerin	40 % v/v
20 x SSC	NaCl	3 M
	Trinatriumcitrat	0,3 M
	pH 7; eingestellt mit HCl	
Kresylviolett-Lösung	Kresylviolett	2g
	Natriumacetat	2,2g
	Essigsäure, konzentriert	4ml
	H ₂ O auffüllen auf 400ml	
50 x Denhardts Reagens	BSA	10 mg/ml
	Ficoll (MW=400kD)	10 mg/ml
	Polyvinylpyrrolidon (MW=10kD)	10 mg/ml
		50 % v/v
Hybridisierungspuffer	Formamid	5 x
	SSC	

In-situ-Hybridisierungslösung für Kryostatschnitte

Formamid	50 % v/v
SSC	5 x
Denhardt's Reagens	5 x
<i>Torula</i> -Hefe RNA	0,4 mg/ml
tRNA aus <i>S.cervisiae</i>	0,1 mg/ml

Die *Torula*-Hefe RNA wurde zuvor durch Proteolyse von RNase-Kontaminationen gereinigt (25 mg/ ml *Torula*-Hefe RNA Typ VI [SIGMA] in 10 mM Tris-HCl pH = 7,5; 5 mM EDTA; 0,5%SDS in Gegenwart von 50 µg / ml Proteinase K [EC 3.4.21.14, ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS, <http://www.biochem.roche.com>] über Nacht bei 55 °C inkubiert, danach zweimal mit Phenol und einmal mit Chloroform extrahiert; Ethanol-fällung; Aufnahme in TE-Puffer pH = 7,5).

In-situ-Hybridisierungslösung für Whole mount Präparate

Formamid	50 % v/v
SSC	5 x
<i>Torula</i> -Hefe RNA	0,2mg/ml
Tween-20	0,1%
SDS	0,2%
EDTA	5mM

LB/Amp bzw. LB/Tet

Ampicillin bzw. Tetracyclin	50 µg/ml
im respektiven LB-Medium;	
Zusatz nach Abkühlen auf ≤ 50 °C	

LB-Agarplatten

Bakterienagar	15 g/l
in LB-Medium; autoklaviert	
und in Polystyrol-Petrischalen	
(8 cm Durchmesser) gegossen.	

LB-Medium

Pepton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
1M NaOH	1 ml/l
autoklaviert	

MaBS

Maleinsäure	0,1 M
NaCl	0,15 M
pH 7,5; eingestellt mit NaOH	

MOPS-Puffer	3 -Morpholinopropansulfonsäure	20 mM
	Natriumacetat	5 mM
	EDTA	1 mM
	pH 7,0; eingestellt mit NaOH	
PBS	NaCl	8 g/l
	KCl	0,2 g/l
	Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	1,15 g/l
	KH ₂ PO ₄	1,15 g/l
	pH 7,4; eingestellt mit HCl oder NaOH	
Reaktionspuffer	Tris	0,1 M
	NaCl	0,1 M
	MgCl ₂	5 mM
	pH 9,5; eingestellt mit HCl	
RNase A-Lösung	RNase A	10 mg/ml
	frei von DNase Aktivität	
	durch 20-minütiges Kochen	
SOC-Medium	Pepton	20 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	0,5 g/l
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	1 M NaOH	1 ml/l
	Nach autoklavieren Zusatz von Glukose	3,6 g/l
Stet-Puffer	Saccharose	8 %
	Tris (FLUKA)	50 mM
	EDTA	50 mM
	Triton X-100	0,1 % v/v
	pH 8; eingestellt mit HCl	

TAE-Puffer	Tris	40 mM
	Essigsäure	20 mM
	EDTA	1 mM
TBE-Puffer	Tris	90 mM
	Borsäure	90 mM
	EDTA	1 mM
TE-Puffer	Tris/HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	pH 8	

3.1.3.Nukleinsäuren, Polymerasen und Antikörper

a. Primer

1) Hexanukleotidprimer

Als Primer für die RNA-abhängige cDNA-Synthese wurden sogenannte Random-Primer (INVITROGEN, <http://www.invitrogen.com>) verwendet. Sie bestehen aus hexameren Oligodesoxyribonukleotiden zufälliger Sequenzabfolge.

2) Genspezifische Primer

Alle für die genspezifische Amplifikation aus cDNA verwendeten Primer wurden von MWG-BIOTECH (www.mwg-biotech.com) synthetisiert. Die Primer sind für die Klonierung in einen Vektor mit einem Linker versehen, welcher eine Restriktionsschnittstelle enthält. Das gelieferte Lyophilisat wurde für den Gebrauch in sterilem Wasser zu einer Endkonzentration von 100 pmol/μl gelöst. In Tabelle 3-1 sind die Primersequenzen in 5' → 3' Richtung angegeben, wobei der genspezifische, komplementäre Bereich in großen und der Linker-Teil in kleinen Buchstaben geschrieben ist.

b. DNA-Längenstandard

Als Längenstandard für die Agarosegelelektrophorese wurde die 1 kb Plus DNA-Leiter (INVITROGEN) verwendet. Die darin enthaltenen Fragmentgrößen in bp sind: 12000, 11000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1650, 1000, 850, 650, 500, 400, 300, 200 und 100. Für die in der Arbeit verwendete Zusammensetzung des Standards entfallen acht Prozent der Gesamtmasse auf die Fragmentgröße von 1650bp.

Tabelle 3-1: Position und Eigenschaften der verwendeten Primer. Die Acc# (Accession number) ist die Zugangsnummer für die Referenzsequenz des jeweiligen Gens in der NCBI Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Die Primersequenz ist in 5' → 3' Richtung angegeben. Die in Kleinbuchstaben dargestellte Nukleotidsequenzen sind keine zur Referenzsequenz komplementäre Bereiche. Sie enthalten die für die Klonierung nötigen Restriktionsschnittstellen (Unterstreichung). Die Position gibt den amplifizierten Abschnitt der Referenzsequenz an und gibt die Fragmentgröße wieder, wobei Position1 das Adenin des Startcodons ist

Gen	Acc#		Primersequenz	Position
Gbx2	NM_010462	for	aagagctcGCACCCTCACCACCAGATCCC	231 - 744
		rev	taggtaccCCGGTTCTTGCCTGTGGACGTG	
Lhx2	NM_010710	for	gtggagctcGTGGACAAGACGTCAGATGC	997 - 1516
		rev	gctgggtaccTACGGAAGCTCTCAGCCAAC	
Lhx6	NM_008500	for	tgggtaccAAGGTAGAGCCTCCCATGTACG	248 - 714
		rev	tggagctcGCCCTCTTGAAGTTCTCGATC	
Ngn2	NM_009718	for	gccgagctcAACTCCACGTCCCCATACAG	661 - 1339
		rev	gccggtaccTACAGGTGAAATCCCACAGC	
Efna5	NM_010109	for	agggtaccGCTACGCCGTCTACTGGAAC	106 - 637
		rev	aaccgctgGACGGGAGGAGACTGTGCTA	
Otx1	NM_011023	for	ttccgctgCAGTACGCTCTCGCTCTCA	1328 - 1955
		rev	ccaggtaccAACCACCATCGTTTGAGGAAG	
Cux2	NM_007804	for	gcagagctcCGGCGTTCCTGAGTGTAT	74 - 865
		rev	tcaggtaccGTTTCTCTATGGCCTCGGACT	

c. Vektoren

Die für die verwendeten RNA-Sonden kodierenden DNA-Sequenzen sind in den Vektor pBluescript I KS (STRATAGENE, <http://www.stratagene.com>) inseriert. Dieser Vektor ist ein 2961 bp langes, von dem Plasmid pUC19 abgeleitetes Phagemid. Für den hier vorliegenden Verwendungszweck sind seine wichtigsten Eigenschaften: 1. der ColE1 Replikationsursprung für eine unabhängige Replikation des Plasmids in *E. coli* mit hoher Kopienzahl; 2. das β -Laktamase-Gen für die Ampicillin-Resistenz für die Selektion transformierter Bakterien; 3. die Multiple Cloning Site (MCS) mit 21 einmaligen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen; 4. Insertion der MCS in ein C-terminal deletiertes Fragment des β -Galaktosidase-Gens (das vorhandene Gen ergibt also das α -Fragment) für die Blau / Weiß-Selektion auf Rekombinanten durch α -Komplementation in Wirtsbakterien, in denen die Expression des im Vektor deletierten ω -Fragmentes induziert werden kann; 5. Die Promotoren für die T3- und T7-RNA-Polymerase, die die MCS flankieren.

d. Rekombinante Plasmide

Die Genfragmente für die Moleküle des gesamten ephrin / Eph – Systems (mit Ausnahme von EphrinA5) zur Herstellung von *in-situ*-Sonden wurden zuvor im Rahmen einer Diplomarbeit in Vektoren kloniert (Merz, 2003). Hierfür wurde aus Hirnen von Mausembryonen (C57BL/6J) mRNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit genspezifischen Primern entsprechende Fragmente amplifiziert. Die rekombinanten Plasmide wurden anschließend in *E. coli* (siehe 3.1.4.b) transformiert. Die Strategie für die Auswahl der genspezifischen Fragmente jedes einzelnen Moleküls sollte die eindeutige Identifizierung der entsprechenden Transkripte in einer *In-situ*-Analyse garantieren. Hier

für kam bei den Eph - Rezeptoren ausschließlich der extrazelluläre Sequenzbereich in Frage, wohingegen bei den Ephrinen in der gesamten Sequenz genügend divergente Bereiche auffindbar waren.

Tabelle 3-2: Charakterisierung der verwendeten Plasmide mit den Insertionen der Genfragmente des ephrin-/ Eph-Systems sowie Cadherin 6 und Cadherin 8¹ (verändert nach (Merz, 2003))

	Länge des Inserts [bp] ¹	Insertbereich	5' Klonierungsseite	3' Klonierungsseite	Linearisierung für antisense-Transkription	sense-Insertionsrichtung	GC – Gehalt in %
Efna1	491	58 – 549	KpnI	SacI	KpnI	T3 → T7	52,5
Efna2	1016	162 – 1178	KpnI	SacI	KpnI	T3 → T7	59,1
Efna3	866	290 – 1156	Apal	SacI	Apal	T3 → T7	56,0
Efna4	544	154 – 698	SacII	KpnI	SacII	T7 → T3	58,0
Efna5	531	106 - 637	KpnI	SacII	KpnI	T3 → T7	50,0
Efnb1	820	802 – 1622	KpnI	SacI	KpnI	T3 → T7	55,8
Efnb2	1206	755 – 1961	KpnI	SacI	KpnI	T3 → T7	58,1
Efnb3	818	137 – 955	SacI	KpnI	SacI	T7 → T3	62,4
EphA1	907	264 – 1171	SacII	KpnI	SacII	T7 → T3	56,6
EphA2	889	684 – 1573	KpnI	SacI	KpnI	T3 → T7	60,0
EphA3	996	257 – 1253	KpnI	SacI	KpnI	T3 → T7	49,31
EphA4	686	75 – 761	SacI	KpnI	SacI	T7 → T3	51,4
EphA5	742	903 – 1645	KpnI	SacI	KpnI	T3 → T7	46,7
EphA6	1249	227 – 1476	KpnI	SacI	KpnI	T3 → T7	45,5
EphA7	324	2368 – 2692	KpnI	SacI	KpnI	T3 → T7	48,4
EphA8	838	1120 – 1958	SacII	KpnI	SacII	T7 → T3	60,0
EphB1	871	609 – 1480	SacI	KpnI	SacI	T7 → T3	55,3
EphB2	885	1133 – 2018	SacII	KpnI	SacII	T7 → T3	55,2
EphB3	975	2473 – 3448	SacII	KpnI	SacII	T7 → T3	57,9
EphB4	956	2639 – 3595	KpnI	SacI	KpnI	T3 → T7	54,5
EphB6	1014	366 – 1380	KpnI	SacI	KpnI	T3 → T7	61,56
Cad6	1028	200-1228	BamH1	BamH1	SmaI	T7 → T3	51,3
Cad8	1586	-229-1347	BamH1	BamH1	SmaI	T7 → T3	45,0
Gbx2	514	231 - 744	SacI	KpnI	SacI	T7 → T3	62,0
Lhx2	519	997 - 1516	SacI	KpnI	SacI	T7 → T3	49,0
Lhx6	466	248 - 714	KpnI	SacI	KpnI	T3 → T7	57,0
Ngn2	686	661 - 1147	SacI	KpnI	SacI	T7 → T3	52,0
Cux2	791	74 - 865	SacI	KpnI	SacI	T7 → T3	60,0
Otx1	627	1328 - 1955	SacII	KpnI	SacII	T7 → T3	48,0

Des Weiteren wurde beim Design der Sondentemplates darauf geachtet, die Sensitivität der einzelnen *In-situ*-Sonden in etwa gleich zu gestalten, um eine Abschätzung der Intensitäten der Expressionsmuster im

¹ Die verwendeten Sonden von Cad6 und Cad8 wurden freundlicherweise Prof. Dr. Dr. Redies zu Verfügung gestellt. Der verwendete Vektor ist hier pBluescript II SK im Gegensatz zu allen anderen, für die pBluescript I KS verwendet wurde.

Vergleich zu ermöglichen. Um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen, wurde eine Template-Länge von 490 – 1250 bp gewählt. Die Genfragmente wurden durch Kombinationen der Restriktionsenzyme KpnI, SacI, SacII und ApaI in die MCS des Vektors inseriert und sind somit mit den RNA-Polymerasen T7 und T3, deren Promotoren die MCS flankieren, transkribierbar. In der Tabelle 3-2 ist eine Charakterisierung der verwendeten Plasmide dargestellt.

e. Enzyme

T4 DNA-Polymerase	FERMENTAS (www.fermentas.de)
HotStart Tag-DNA-Polymerase	GENAXXON BIOSCIENCE (www.genaxxon.com)
RevertAID™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase	FERMENTAS
T3 RNA-Polymerase	FERMENTAS
T7 RNA-Polymerase	STRATAGENE (www.stratagene.com)
Restriktionsendonukleasen: SacI, SacII, KpnI, EcoRI	FERMENTAS
Shrimp Alkaline Phosphatase	FERMENTAS
T4 DNA-Ligase	FERMENTAS
DNase I (RNase-Free DNase Set)	(www.qiagen.com)

f. Antikörper

Schaf-anti-Digoxigenin (F _{ab})- alkalische Phosphatase (AP)	ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS (www.biochem.roche.com)
---	--

3.1.4. Organismen

a. Versuchstiere

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich an Gewebematerial von Mäusen des Stammes C57BL/6J aus eigener Zucht vorgenommen. Die Tiere wurden in klimatisierten Räumen bei einem regelmäßigen Hell – Dunkelrhythmus (12h/ 12h) gehalten. Die Verpaarung der Mäuse erfolgte über Nacht. Hierfür wurde am Abend der Mausbock dem Weibchen zugegeben und am darauffolgenden Tag wieder entnommen. Für altersspezifische Arbeiten wurde der Tag nach der Fertilisation als E1 (Embryonaltag 1) und der Tag der Geburt als P0 (Postnataltag 0) bezeichnet. Für die Untersuchungen wurden die Altersstadien E14, E16, E18, P0, P2, P4, P6 und P28 verwendet.

b. Wirtsbakterien

Die Genfragmente enthaltenden Plasmide wurden in *E. coli* transformiert und Glycerinstocks angelegt. Verwendet wurde der *E. coli*-Stamm XLBlue MRF' (STRATAGENE; Genotyp: $\Delta(\text{mcrA})183$, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$, endA1 , supE44 , thi-1 , recA , gyrA96 , relA1 , lac , λ^- , [F' , proAB , $\text{lacI}^q\Delta\text{M15}$, $\text{tn10}(\text{Tet}^r)$]). Die im vorliegenden Zusammenhang wichtigen Eigenschaften dieses Genotyps sind: 1. Inaktivierung des EcoK-Restriktionssystems, das eingeschleuste Fremd-DNA zerstören würde (hsdSMR); 2. Rekombinationsdefizienz zur Vermeidung der Insertion der eingeschleusten DNA in die chromosomale DNA des Wirtes (recA); 3. Inaktivierung einer DNA-spezifischen Endonuklease zur Erhöhung der Ausbeute bei der Plasmidpräparation (endA1); 4. N-terminal deletiertes β -Galaktosidase-Gen (ergibt ω -Fragment) für die Blau / Weiß- Selektion auf Rekombinante mit α -komplementierenden Vektoren ($\text{lacZ}\Delta\text{M15}$); 5. Effizienterer lac -Repressor zur Vermeidung der ungewollten Expression potentiell toxischer Fusionsproteine von α -komplementierenden Vektoren (lacI^q); 6. Tetracyclin-Resistenz [$\text{tn10}(\text{Tet}^r)$] auf dem F' -Episom.

3.1.5. Geräte

Angegeben sind nur Geräte, deren Charakterisierung für die Beschreibung der durchgeführten Experimente von Belang ist oder Geräte, die nicht handelsüblich sind.

Gerät	Modell	Hersteller
Wasser-Aufbereitungsanlage	Purelab maxima	Elga
Binokular	Leica Stereozoom S4E	Leica Microsystems
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert S100	Zeiss
Digitalkamera	Canon Powershot G5	Canon
Elektrophorese	PowerPac _{Basic}	BioRad
Elektroporations-impuls-generator	Elektroporator 2510	Eppendorf
Elektroporations-küvetten	Model 620	BTX
Gel-Dokumentations-system	BioDocAnalyze Video	Biometra
Objekträger-Streckertisch	OTS 40	Medite Medizintechnik
Hybridisierungsöfen	HB-1000 Hybridizer HI S25	UVP Grant BOEKEL
Photobearbeitungssoftware	Adobe® Photoshop 6.0.1 ImageJ 1.33u	Adobe National Institute of Health
Kryostat	Modell CM 3050-1-1-1	LEICA
Vibrating Microtom	Vibroslice 550752/M	TSE-Systems
Thermocycler	T3 Thermocycler	Biometra
UV-Transilluminator	UV Transilluminator TI2	Biometra
Zentrifugen	miniSpin® Hereaus®Megafuge® 1.0 R DNA ₁₁₀ Speed Vac®	Eppendorf Kendro ThermaSavant

3.2. Methoden

3.2.1 Präparation und Isolierung der Maushirne

a) Präparation eines embryonalen Hirns:

Die trächtige Maus wurde intraperitoneal mit 1 ml 7%igem Choralhydrat in PBS narkotisiert. Anschließend wurde der Bauch mit einer chirurgischen Pinzette und einer Schere geöffnet, der gesamte Uterus mit den Embryonen entnommen und in einer Petrischale in PBS auf Eis gelagert. Unter dem Binokular wurden anschließend mit Pinzette und einer feinen Schere die einzelnen Embryonen aus dem Uterus und der Fruchtblase herauspräpariert und dekapitiert. Die Schädelkapsel konnte durch die noch weichen, knorpeligen Schädelplatten mit zwei Pinzetten geöffnet und das Hirn entnommen werden.

Für eine anschließende Nukleinsäurepräparation wurde das Gewebe direkt weiterverarbeitet. Waren die Hirne für das Herstellen von Kryostatschnitten gedacht, wurden sie im Anschluss an die Präparation in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Für die Altersstadien E14 und E16 wurden ganze Köpfe eingefroren. Bis zur Verwendung wurden die tiefgefrorenen Hirne bei -80°C gelagert. Für Whole-mount-Untersuchungen und Tracing-Experimente mit Dil (1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat) wurden die embryonalen Hirne mit 4%igem PFA in PBS über Nacht in der Kälte immersionsfixiert. Die für Whole-mount-Untersuchungen vorgesehenen Hirne wurden aus dem Fixativ in einer Methanolreihe (25%, 50%, 75%, 100%, 100% in PBS für je 5 Minuten) entwässert und in 100% Methanol bei -20°C gelagert.

b) Präparation von jungen postnatalen und adulten Hirnen:

Die jungen postnatalen Mäuse (bis P10) wurden mit einer großen Schere dekapitiert. Bei älteren Tieren erfolgte vor der Dekapitation eine Narkose mit 7%igem Choralhydrat (siehe oben). Unter dem Binokular wurden die Haut bzw. das Fell über der Schädelkapsel mit Pinzette und Schere abpräpariert. Um die Schädelkapsel zu öffnen, schiebt man einen Schenkel der Schere durch das Hinterhauptsloch vorsichtig nach vorne und führt anschließend in horizontaler Ebene einen Schnitt auf beiden Seiten des Schädels. Auf beiden Seiten wurde nun das Jochbein durchtrennt sowie die Frontalschädelplatte entlang der Sutura nasofrontalis. Die Schädelkapsel konnte vorsichtig geteilt werden, wobei das Hirn in der oberen Schädelhälfte verbleibt. Das Hirn ist jetzt von ventral sichtbar. Störende Gewebestücke und Knochenspangen wurden beseitigt. Mit einer Pinzette konnte der Schädelknochen über dem *Bulbus olfactorius* gefasst und mit einer Schere mitsagittal (entlang der mittleren Schädelnaht) ein kleiner Schnitt geführt werden. Danach wurden mit Hilfe einer zweiten Pinzette beide Schädelplatten auseinander gezogen. Dabei löste sich eine Knochenplatte komplett ab. Mit einem stumpfen Spatel konnte nun das Hirn vollständig aus der Kapsel entnommen werden.

Für das Herstellen von Kryostatschnitten wurden die Hirne in mit Trockeneis gekühltem Isopentan (ca. -40°C) tiefgefroren und ebenfalls bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.2 Maßnahmen zur Reduktion von Ribonuklease (RNase)-Kontamination

Für alle Arbeiten mit RNA wurden möglichst RNase-freie Bedingungen geschaffen, um Degradationen durch Ribonukleasen zu verhindern. Hierfür wurden in den Experimenten verwendete Glas- und Metallgeräte 3h bei 180 °C erhitzt, oder Einweggeräte benutzt. Benötigte Chemikalien wurden für Arbeiten mit RNA gesondert bereitgestellt und RNase-frei gehalten. Lösungen, die keine starken Nukleophile, enthalten und autoklavierbar sind, wurden mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt (d.h. bis zur Auflösung des Esters gerührt und autoklaviert). Nicht mit DEPC behandelbare Lösungen wurden unter RNase-freien Bedingungen mit DEPC behandeltem Wasser (H_2O^{DT} = mit DEPC behandeltes Wasser) angesetzt (zB. 1M Tris^{DW} = 1M Tris mit H_2O^{DT}). Geräte aus Kunststoff, die nicht gebacken werden konnten, wurden weitgehend von RNasen befreit, indem sie als erstes gründlich mit Spülmittel und danach mit Ethanol gewaschen wurden. Anschließend kamen sie für 10 min in 3 %iges Wasserstoffperoxid in H_2O^{DT} . Abschließend wurde die Geräte mit H_2O^{DT} gründlich abgespült. Bei allen RNase-freien Arbeiten wurden Handschuhe getragen.

3.2.3. Gewinnung und Reinigung von Nukleinsäuren

a. Präparation und Isolierung totaler RNA aus Gewebestücken

Für die Isolierung von totaler RNA wurden frisch präparierte E14 Maushirne in Stücke zerteilt und in 1ml TRIzol[®] (INVITROGEN) mit einem 2ml Potter- Homogenisator homogenisiert. Das im TRIzol[®] enthaltenen chaotrope Salz Guanidinisothiocyanat denaturiert dabei sehr effektiv Proteine einschließlich freiwerdender RNasen. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und Durchmischung kommt es zur Phasentrennung. Die RNA des homogenisierten Gewebes tritt in die wässrige Phase über, die Proteine und die DNA verbleibt in der organischen Phenolphase und sammeln sich beim Zentrifugieren in der Interphase. Zur Unterstützung der Phasentrennung kamen Zentrifugenröhrchen mit „PhaseLockGel™ heavy“ (EPPENDORF) zum Einsatz. Dieses Silikongel schiebt sich beim Zentrifugieren (20min, 15000g, 12°C) zwischen die organische und wässrige Phase und vereinfacht somit die vollständige Abnahme und Überführung der wässrigen Phase in ein neues Eppendorfcup. Die weitere Aufreinigung der totalen RNA erfolgte durch eine Säulenchromatographie mit dem „RNeasy Kit mini“ (QIAGEN). Hierfür wurde der abgenommenen Phase 312µl Ethanol zugegeben und die Lösung wurde anschließend auf die Silicagel-Säule gegeben, an welche die RNA unter Hochsalzbedingungen bindet und bei der Zentrifugation (15sec, 8000g, 4°C) zurückgehalten wird. Die Säule wird mit 700µl des im „Kit“ befindlichen Puffers RW1 gewaschen und zentrifugiert (15sec, 8000g, 4°C). Um eventuelle Kontaminationen von genomischer DNA zu beseitigen, wurde die Probe auf der Säule mit Desoxyribonuklease I aus dem „RNase-Free DNase Set“ (QIAGEN) entsprechend dem beiliegenden Protokoll behandelt. Anschließend wurde die Säule in drei Schritten mit 350µl RW1-Puffer, 500µl RPE-Puffer und 500µl 70%igen Ethanol gewaschen und jeweils zentrifugiert (15sec, 8000g, 4°C). Im Anschluss wurde die Säule für 3min bei 15000g trocken zentrifugiert. Um die Probe unter Niedrigsalzbedingungen zu eluieren, wurden 30µl H_2O^{DT} zugegeben, eine Minute inkubiert und zwei Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert

(8000g). Die Konzentration und Reinheit der Proben wurde am UV-Spektrometer bestimmt, die Qualität der RNA wurde auf einem denaturierenden Formaldehyd-Gel kontrolliert (siehe 3.2.6).

Lagerung von RNA:

Die RNA wird bei -80°C gelagert. Um Veränderungen der Pufferzusammensetzung beim Phasenübergang möglichst gering zu halten wurde die RNA in flüssigem Stickstoff eingefroren. Auch beim Auftauen für den Gebrauch erfolgte die Temperaturänderung möglichst schnell.

b. Isolierung von polyadenylierter-RNA

Mit lediglich zwei bis fünf Prozent ist der Anteil von mRNA an der gesamten RNA in einer Zelle relativ gering. Der überwiegende Teil besteht aus ribosomaler RNA, transfer-RNA und anderen kleinen RNA-Molekülen mit hoher Kopienzahl. Mit wenigen, für den Verwendungszweck in dieser Arbeit vernachlässigbaren Ausnahmen, sind alle mRNA-Moleküle am 3'-Ende polyadenyliert. Die Aufreinigung von mRNA aus der gesamten RNA beruht daher auf einer Bindung von polyadenylierter RNA an Oligo-dT-Nukleotide. Der verwendete Oligotex® mRNA Kit (QIAGEN) beinhaltet eine Suspension kleiner Polystyrol-Latexkügelchen mit angehängten Oligo-dT-Nukleotiden, die der RNA-Lösung zugegeben werden. Unter hohen Salzkonzentrationen hybridisiert polyadenylierte RNA an die Oligo-dT-Nukleotide, wobei gemäß des Herstellerprotokolls verfahren wurde. Nach den anschließenden Filtrations- und Waschschritten, werden unter Bedingungen mit niedriger Ionenstärke und hoher Temperatur die poly-(dT-A)-Hybride destabilisiert und die zurückgehaltenen Moleküle eluiert. Konzentration und Reinheit werden mittels UV-Spektroskopie bestimmt (siehe 3.2.6).

c. Isolierung von Plasmid-DNA aus der Flüssigkultur ("Miniprep")

Als Erstes wurden die in 5ml-Über-Nacht-Kulturen gewaschenen Bakterien geerntet. Hierfür wurde die Flüssigkultur schrittweise in 2ml Eppendorf-Cups überführt und bei 6000g 2 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Die Isolierung des Plasmides aus dem Bakterien-Pellet erfolgte mit dem QIAprep-Spin-Miniprep-Kit (QIAGEN). Das System beruht auf der Methode der Plasmidpräparation durch alkalische Lyse (Birnboim, 1979). Dabei werden die Bakterien unter Einwirkung von NaOH und SDS aufgeschlossen. Die meisten Proteine und die DNA werden denaturiert. Die kürzer-strängige Plasmid-DNA renaturiert schnell nach der anschließenden Neutralisation wieder, wobei nur die chromosomale DNA und die Proteine ausfallen. Die in Lösung bleibende Plasmid-DNA wird durch eine Säulenchromatographie an einer Silicagelsäule unter Hoch-Salz-Bedingungen gebunden und somit vom Überstand getrennt und anschließend unter Niedrig-Salz-Bedingungen wieder aus der Säule heraus gewaschen und in 50 μl TE-Puffer aufgenommen. Diese Methode sorgt für relativ große Ausbeuten (ca. 20 μg pro 5 ml-Übernacht-Kultur) bei einem hohen Reinheitsgrad. Die Konzentration und Reinheit der Proben wurde am UV-Spektrometer bestimmt, die Qualität der Plasmid-DNA wurde auf einem Agarosegel kontrolliert (siehe 3.2.6).

d. Aufreinigung von amplifizierten Nukleinsäure mit dem „PCR-Purification-Kit“

Für die Aufreinigung von DNA zwischen 100 bp und 10 kb kann das „QIAquick PCR Purification Kit“ von QIAGEN genutzt werden. Insbesondere die durch PCR (Polymerase-Kettenreaktion) amplifizierte DNA wurde mit dieser Methode gereinigt. Die Nukleinsäure bindet unter hohen Salzkonzentrationen an die Säule und kann durch Wasser eluiert werden. Die Konzentration und Reinheit der Proben wurde am UV-Spektrometer bestimmt, die Qualität der DNA wurde auf einem Agarosegel kontrolliert (siehe 3.2.6).

e. Isolierung von Nukleinsäure durch Ethanolfällung

DNA und RNA können aus salzhaltigen Lösungen (0,3 M Natriumacetat für DNA, 0,4 M Lithiumchlorid für RNA) durch Zugabe des 2-fachen Volumens für DNA bzw. des 2,5-fachen für RNA eiskalten, absoluten Ethanols quantitativ gefällt werden. Die Präzipitation erfolgt ≥ 30 min bei -20 °C. Nach dem Pelletieren (15000 g, 15 min bei 4 °C) wird das Präzipitat mit dem gleichen Volumen 70 %-igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und letztlich in H_2O oder TE-Puffer (für RNA H_2O^{DT} oder TE^{DW} -Puffer) aufgenommen. Schneller kann in der SpeedVac-Zentrifuge getrocknet werden. Die Konzentration und Reinheit der Proben wurde am UV-Spektrometer bestimmt, die Qualität wurde auf einem Agarosegel kontrolliert (siehe 3.2.6).

3.2.4 Enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren

a. Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Um DNA restriktionsendonukleolytisch zu schneiden, wurden generell 10 Units Enzym pro Mikrogramm DNA und Stunde eingesetzt. Anhand dieser Regel für einen zehnfachen Überverdau wurde entsprechend Restriktionsenzym für unterschiedliche Mengen DNA und variable Inkubationszeiten gewählt. Alle verwendeten Enzyme wurden im mitgelieferten Puffersystem bei 37 °C, sowie die DNA unter einer Konzentration von 100 ng/ μ l eingesetzt.

b. Erzeugung stumpfer Enden

$3'$ -Überhänge wirken sich störend auf *in vitro*-Transkriptionen durch T3- und T7-Polymerasen aus. Zu ihrer Entfernung werden pro Mikrogramm DNA 3 units T4-DNA-Polymerase, Nukleotide zu einer Endkonzentration von 100 μ M je Nukleotid und falls nötig Puffer zugegeben. Im RE-Puffersystem besitzt die Polymerase ausreichend hohe Aktivität. Enden mit $5'$ -Überhängen werden durch die $5' \rightarrow 3'$ -Polymeraseaktivität der verwendeten Polymerase aufgefüllt, $3'$ -überhängende Nukleotide durch die $3' \rightarrow 5'$ -Exonukleaseaktivität abgebaut. Nach 20 Minuten bei 11 °C wird die Reaktion durch 10-minütiges Erhitzen auf 70 °C gestoppt.

c. Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung der Vektor-DNA verhindert deren Religation ohne ein zusätzlich inseriertes Fragment. Unter Verwendung des mitgelieferten SAP-Puffers, oder im RE-Puffersystem wird pro Picomol freier Phosphatenden ein Unit Phosphatase eingesetzt. Nach einer Reaktionsdauer von 30 Minuten bei 37 °C wird das Enzym 15 Minuten bei 65 °C vollständig inaktiviert.

d. Ligation

Die Ligationen erfolgten mit 2,5 ng dephosphorylierter Vektor-DNA pro Mikroliter Ligationsansatz. Die für eine erfolgreiche Ligation in einem 3- bis 5-fachen Molekülüberschuss einzusetzende Menge an Insert errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} = 3 \text{ bis } 5 \cdot \text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \cdot \text{Länge}_{\text{Insert}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

Neben dem ATP-haltigen Ligasepuffer in einfacher Konzentration wurde für einen 20 µl Ligationsansatz 6 Units Enzym eingesetzt und mindestens 3 Stunden bei 11 °C, oder über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Eine Inaktivierung der Ligase ist nicht notwendig; sie reduziert in der Regel die Transformationseffizienz. Die ligierte DNA wurde direkt für eine Elektroporation von *E.coli* verwendet.

3.2.5 Synthese von Nukleinsäuren

a. Gewinnung von cDNA durch reverse Transkription (RT-PCR)

Für die Synthese von *complementary* DNA (cDNA) wurde isolierte polyadenylierte-RNA revers transkribiert. Dazu wurden 50-200ng Poly-A⁺-RNA (zu einer Endkonzentration von ≤ 20ng/µl) mit 200ng Hexanukleotid-Primer versetzt. Zur Reduktion von Sekundärstrukturen wurde der Probenansatz für 10 Minuten bei 70°C denaturiert und auf Eis abgeschreckt. Im Anschluss wurden der entsprechende Puffer in einfacher Konzentration (1x), die Desoxyribonukleotide zu einer Konzentration von 1mM pro Nukleotid, 20 Units Ribonuklease Inhibitor und eine dem gewählten Reaktionsvolumen entsprechende Menge an H₂O^{DT} (Endvolumen 30µl) hinzu gegeben und zum Anlagern der Primer für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Reaktionsansatz wurde des Weiteren 200 Units reverse Transkriptase hinzugefügt und für 60 Minuten auf 42°C inkubiert. Die cDNA-Synthese wurde durch 15 minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt. Das Produkt kann ohne Aufreinigung für die PCR verwendet werden.

b. Amplifikation von genspezifischen Sequenzen durch PCR

Für die Amplifikation der Genabschnitte der in dieser Arbeit verwendeten Transkriptionsfaktoren wurden in 50µl Reaktionsvolumen pro Ansatz 20ng synthetisierte cDNA, 20pmol genspezifische Primer (siehe Tab. 3-1), Q-Solution (QIAGEN), der der Polymerase entsprechende Reaktionspuffer in einfacher Konzentration, 0,2mM je Desoxyribonukleotid, 1,5mM Magnesiumchlorid und 2,5 Units Hotstart Taq-Polymerase (GENAXXON) eingesetzt. In einem ersten Schritt wurde für das Hot-Start-Verfahren die Taq-Polymerase

durch zweiminütiges Erhitzen auf 95°C aktiviert. In jedem anschließenden Zyklus wurde der Ansatz für eine Minute bei 94°C denaturiert. Für die Primer-Hybridisierung (Annealing) in den ersten drei Zyklen wurde die Temperatur 2-3°C unter die jeweilige Schmelztemperatur des verwendeten Primerpaares ohne Linkersequenz (siehe Tab. 3-1) für 45 Sekunden gesenkt. Bei 72°C erfolgt nun die Verlängerung (Elongation) der Primer für eine Minute (plus eine Sekunde pro Zyklus) durch die aktivierte thermostabile DNA-Polymerase. Die Genabschnitte wurden so erst einmal für drei PCR-Zyklen vermehrt. In den folgenden 27 Zyklen wurde für die Primer-Hybridisierung die Schmelztemperatur des Primerpaares mit der Linkersequenz gewählt.

c. Herstellung der Digoxigenin-markierten Sonden durch *In-vitro*-Transkription

Die Herstellung der Hybridisierungssonde (*antisense*-RNA) erfolgt durch *In-vitro*-Transkription von einem DNA-Template mittels einer Bakteriophagen-RNA-Polymerase (T3 bzw. T7; siehe Tab. 3-2). Hierfür wurde 50 ng/µl der linearisierten Plasmid-DNA (Linearisierung durch Restriktionsverdau, Tab.3-2) in einem 20 µl-Ansatz mit einer Ribonukleotid-Markierungsmischung (Endkonzentration: je 0,4mM; Dig-RNA-Labeling-Mix, ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS, <http://biochem.roche.com>), mit 0,5 Units/µl RNasin (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS), einem RNase-Inhibitor aus humaner Placenta, und mit 2 Units/µl T3- bzw. T7-Phagen-RNA-Polymerase vermischt und 2h bei 37 °C transkribiert. Während der Reaktion werden durchschnittlich alle 20 bis 25 Basen ein Digoxigenin-markiertes-Uridintriphosphat (Dig-11-UTP) eingebaut. Die Reaktion wurde durch den Zusatz von 2,5µl 0,2M EDTA^{DT} (pH = 8,0) zu einer Endkonzentration von 20mM beendet. Die entstandene Digoxigenin-markierten RNA-Sonde wurden anschließend durch Ethanolfällung gereinigt und in 20µl TE^{DT}-Puffer aufgenommen.

3.2.6 Qualitative und quantitative Analyse von Nukleinsäuren

Alle präparierten und synthetisierten Nukleinsäuren wurden mit Hilfe der UV-Spektrometrie und der Gel-Elektrophorese auf ihre Qualität und Quantität überprüft.

a. UV-Spektrometrie

Mit dem Spektralfotometer wurden die Extinktionen bei 260 und 280 nm gemessen und folgende Beziehungen verwendet:

DNA- Doppelstrang:	1 OD ₂₆₀ entspricht 50 µg / ml
RNA:	1 OD ₂₆₀ entspricht 40 µg / ml
Für reine Nukleinsäuren gilt:	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ = 1,8 bis 2,0

b. Agarose-Gelelektrophorese mit TBE- bzw. TAE-Gelen

Für die Gelelektrophorese wurden 1%ige Agarose-Gele in horizontalen Gelkammern eingesetzt. Für die Analyse von DNA wurde das Agarose-Gel mit TBE-Puffer für DNA-Proben hergestellt, und für die Analyse RNA-Sonde mit TAE-Puffer. Diese Puffer waren auch die verwendeten Laufpuffer mit denen das Gel gefahren wurde. Als Referenz wurde eine 1kb-DNA-Leiter aufgetragen, wobei die 1650bp-Bande bei einem Auftrag von 10µl eine Konzentration von 100ng hat. Die RNA-Proben wurden in Gegenwart von 50% Formamid 3 min bei 100 °C denaturiert. Alle Proben wurden vor dem Auftragen mit einem entsprechenden Volumen des 10x Ladepuffers (0,25% Bromphenolblau in 40%igem Glycerin, d.h. 1/10 verdünnt) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Feldstärke von 4-6 V/cm durchgeführt. Für die Dokumentation wurde das Gel unter Wippen in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5µg/ml in Laufpuffer) 15 min gefärbt und 15min in H₂O entfärbt. Anschließend wurde das Gel in einem Gel-Dokumentationssystem unter UV-Beleuchtung bei 254 nm fotografiert.

c. Denaturierendes Formaldehydgel

Wegen der Ausbildung von Sekundärstrukturen der RNA wurde, um die Qualität der RNA-Proben zu überprüfen, denaturierende Formaldehydgele unter RNase-freien Bedingungen verwendet. Das Gel war 1%ig und wurde mit 0,55% Formaldehyd und einfach konzentriertem MOPS-Puffer gefertigt. Auch der Laufpuffer war 1x MOPS mit 0,55% Formaldehyd. Für den Auftrag wurden 5-10µg totale RNA in 50% Formamid, einfach konzentriertem MOPS-Puffer und 1,85% Formaldehyd aufgenommen und bei 99°C denaturiert und auf Eis abgeschreckt. Das Formaldehyd in Gel und Puffer verhindert die Renaturierung der RNA während der Elektrophorese und garantiert die Auftrennung der RNA entsprechend ihrer Anzahl an Basen. Als Längenstandard wurde ebenfalls die 1 kb Plus DNA Leiter verwendet, welche aber nur einen Anhaltspunkt zur Längenbestimmung darstellt, da das Laufverhalten der doppelsträngigen DNA anders ist als das von einzelsträngiger RNA. Die Feldstärke betrug 4-6 V/cm. Um im Anschluss an die Elektrophorese die RNA mit Ethidiumbromid effektiv zu färben, wurde das Gel zuvor mit 1M Ammoniumacetatlösung für eine Stunde gewaschen.

3.2.7 Transformation von Bakterien zur Klonierung von rekombinanter Plasmid-DNA

a. Präparation elektrokompetenter Bakterien

Eine Übernacht-Kultur von E.coli in LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Tetracyclin, (die hier verwendeten Bakterien besitzen Tetracyclin-Resistenz, siehe 3.1.4.b), wird in 250 ml des gleichen Mediums gegeben und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,5 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Zellen eine halbe Stunde auf Eis abgekühlt und auf Zentrifugenröhrchen verteilt. Es ist jetzt streng darauf zu achten, eine erneute Erwärmung zu vermeiden. Die Bakteriensuspension wurde abzentrifugiert (5 min, 4 °C, 5000 g) und die Pellets in 50 ml eiskaltem, bidestillierten und sterilem H₂O resuspendiert und gewaschen. Der Waschvorgang wurde noch einmal mit 25 ml eiskaltem, bidestillierten und sterilem H₂O

durchgeführt und die Pellets wieder miteinander vereinigt. Letztendlich wurde das erhaltene Pellet einmal mit 10ml eiskaltem, sterilem 10 %-igem Glycerin gewaschen und anschließend in einem Milliliter 10 %-igem Glycerin resuspendiert. Die erhaltene Bakteriensuspension wird in 50 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert. Zuvor wurde mit einer Probe eine Elektroporation mit 1ng *supercoiled* Plasmid durchgeführt und so die Kompetenz der Zellen, in gebildeten Kolonien pro Mikrogramm Plasmid, getestet. Dabei wurde eine Kompetenz der präparierten Zellen von 10^8 bis 10^9 erreicht.

b Elektroporation der Bakterien

Für die Elektrotransformation wird 1 ng DNA des Ligationsansatzes zu 50 µl, auf Eis aufgetauten oder frisch präparierten, elektrokompetente Bakterien (siehe 3.1.4.b) gegeben. Die Mischung wird in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (Plattenabstand 2 mm) überführt und bei folgenden bei einer Spannung von $U = 2,5$ kV, das entspricht einer Feldstärke von $E = 12,5$ kV/cm, elektroporiert. Unter diesen Bedingungen wird die Zellmembran kurzfristig permeabilisiert und die DNA kann in die Zelle eindringen. Nach der Pulsapplikation wird sofort 37 °C warmes SOC-Medium zugegeben und die Suspension für 30 min bei 37°C inkubiert, wobei die erfolgreich transformierten Bakterien, die mit dem Plasmid eingebrachte Antibiotikaresistenz ausbilden. Schließlich werden die Bakterien in geeigneten Verdünnungen unter sterilen Bedingungen mit einem Drigalskyspatel und einer rotierenden Plattform auf LB/Amp-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Einzelne Klone konnten nun gepickt und zu Weiterverarbeitung in 5ml LB/Amp-Flüssigmedium in Kulturröhrchen über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert werden.

c. Identifizierung positiver Klone

Restriktionsverdau

Aus den Übernackturen wurden die Plasmide wie unter 3.2.3.c isoliert und durch Restriktionsverdau (3.2.4a) mit verschiedenen Kombination von Restriktionsenzymen inkubiert. Die verdaute Plasmid-DNA wurde auf einem 1%igen TBE-Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Die entstehenden Fragmentgrößen ergeben auf dem Gel ein charakteristisches Bandenmuster und weisen die Plasmide und somit den Erfolg der Ligation eindeutig aus.

Kolonie-PCR

Eine andere Möglichkeit die Bakterien auf die Identität ihrer Plasmide zu kontrollieren, ist die Amplifikation des mutmaßlichen Inserts mit den genspezifischen Primern durch PCR. Hierfür wurde den einzelnen Kolonien Material entnommen und in 30µl TE-Puffer für 5 Minuten gekocht. Die Bakterienzellbestandteile wurden abzentrifugiert. Aus dem das Plasmid enthaltenden Überstand wurden 2µl für einen 25µ PCR-Ansatz mit den vermeintlichen Primerpaaren genutzt (siehe Tab. 3-1). Das PCR-Fragment wurde anschließend auf einem 1%igen TBE-Agarosegel analysiert.

Sequenzierung

Alle Plasmide wurden zur Kontrolle sequenziert. Hierfür wurden je 1 µg getrocknete Plasmid-DNA der Firma MWG-BIOTECH (www.mwg-biotech.com) zu geschickt.

d. Kultivierung von *E. coli* zur Gewinnung rekombinanter Plasmid-DNA

Die charakterisierten Kolonien wurden von der LB/Agarplatte gepickt, zu einem 5ml LB/ Amp-Medium zugegeben und über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Für das Anlegen einer Dauerkultur wurden der sich gerade in der stationären Phase befindlichen Flüssigkultur 870 µl entnommen, 130 µl steriles, 100iges Glycerin zugegeben und gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Dauerkulturen wurden –80°C gelagert.

e. Reaktivierung von Bakterien und Glycerinkulturen

Die mit den Plasmiden transformierten Bakterien lagen tiefgefroren bei –80 °C in Glycerin-Dauerkulturen vor. Für die Reaktivierung wurden die tiefgefrorenen Bakterien durch Abkratzen mit der sterilen Pipettenspitze in Kulturröhrchen mit 5 ml LB/Amp-Flüssigmedium überführt und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.8 Herstellen von Gewebeschnitte für histologische Arbeiten

a. Anfertigen von koronalen Kryostatschnitten

Die Kryostatschnitte wurden von unfixierten tiefgefrorenen (fresh frozen) Maushirnen der verschiedenen Altersstadien hergestellt (siehe 3.2.1). Die Hirne wurden dafür mit Tissue-Tek[®] (SAKURA) auf den Objektisch aufgefroren, ausgerichtet und koronal geschnitten. Die Schnittdicke war immer 20µm. Die Arbeitstemperatur des Kryostataten variierte in Abhängigkeit der Altersstadien. E14 und E16 wurden bei –14°C Objekttemperatur (OT) und –16°C Kammertemperatur (KT), E18 bei –12°C OT und –14°C KT und alle postnatalen Stadien bei –10°C OT und –12°C KT geschnitten. Es wurden jeweils vollständige Schnittserien von anterior nach posterior in alternierender Weise auf mehreren Objektträgern gesammelt. Die Anzahl der alternierenden, „parallelen“ Serie war ebenfalls abhängig vom Alter bzw. der Größe des Maushirns. E14-Hirne erlaubten drei Serien (die Schnitte wurden alternierend auf drei Objektträgern gesammelt), wohingegen ein P6-Hirn fünf Serien erlaubte. Die einzelnen Schnitte wurden durch Antauen auf Superfrost-Plus[®] Objektträger (MENZEL-GLÄSER) aufgelegt. Im Anschluss wurden Gewebeschnitte für die *In-Situ*-Hybridisierung für mindestens 2h bei 54 °C auf einem Objektträger-Streckertisch gebacken (für immunhistochemische Analysen bei 37°C). Die Lagerung der Schnittserien erfolgte bis zum Gebrauch bei –80°C.

b. Anfertigen von Vibratomschnitten

Für das Anfertigen der Vibratomschnitten wurden die fixierten Maushirne in 4%iger Low Melt Agarose eingebettet. Nach Erstarren wurde die Agarose so beschnitten, dass das Aufblocken auf den Vibratomobjektstisch die gewünschten Schnitt-Orientierungen (koronal und sagittal) erlaubten. Die Schnittdicke war 100µm. Die Schnitte wurden in PBS gesammelt und anschließend auf einen Superfrost-Plus® Objektträger aufgezogen.

3.2.9 In-situ-Hybridisierung zur Analyse von Expressionsmustern

Die hier vorliegende Arbeit untersuchte die Expressionsmuster der Mitglieder des ephrin- /Eph-Systems im Vorderhirn der Maus, sowie die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren und Cadherin6 und Cadherin8 im dorsalen Thalamus während der Embryogenese. Der Translation dieser Proteine dient die mRNA als Matrize. Sie wird in den entsprechenden Zellen des Gewebes aus der DNA transkribiert. Mit Hilfe von Digoxigenin-markierten Nukleotidsequenzen, die den Sequenzen der zu untersuchenden genspezifischen mRNA komplementär sind, ist es möglich diese Zellen auf Gewebedünnschnitten zu adressieren (Emson, 1993)

a. In-situ-Hybridisierung an Kryostatschnitten

Silanisierung der Deckgläser

Nukleinsäuren binden gut an Silikate. Um zu verhindern, dass die Sonden an den Deckgläsern unspezifisch binden, werden sie silanisiert. Hierfür wurden RNase-freie Deckgläser (22mm x 50mm) 5s in Repelsilan (2% Dimethyldichlorsilan in 1,1,1-Trichlorethan, GE HEALTHCARE) getaucht, danach 5s in Aceton und abschließend für 5s in absolutem Ethanol gewaschen.

Experimenteller Ablauf

Die tiefgefrorenen Objektträger wurden bei 54°C auf der Wärmeplatte aufgetaut und noch einmal für 30 Minuten getrocknet. Nach dem Abkühlen der Objektträger auf RT, wurden die daran gebundenen Schnitte in frisch angesetztem 4% PFA (4g PFA in 100ml PBS^{DT}, 5 Tropfen 5M NaOH^{DW} zugeben, bei 60 °C lösen, mit 2 Tropfen konzentrierter HCl neutralisieren, pH-Wert RNase-frei auf 7,2-7,4 einstellen) fixiert. Für die Permeabilisierung der Schnitte wurden die Objektträger 10 Minuten in 0,2M HCl^{DW} inkubiert, was die Zellmembranen destabilisiert. Die anschließende Acetylierung erfolgt für 10 Minuten in 0,1M Triethanolamin*HCl^{DW} pH=8, dem 5mM Acetanhydrid zu gegeben wurde. Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils für 10 Minuten mit PBS^{DT} gründlich gewaschen.

Die Hybridisierung der Gewebedünnschnitte mit der jeweiligen Sonde erfolgte über Nacht im Hybridisierungssofen. Die Hybridisierungsbedingungen konnten über den Hybridisierungspuffer und die Offentemperatur bezüglich der ermittelten Hybridisierungstemperatur (T_m) exakt eingesellt werden.

T_m berechnet sich wie folgt:

$$T_m = 79,8 + 18,5 \log C_{mc} + 58,54 GC + 11,8 GC^2 - 820 / L - 0,35 c_{\%} FA.$$

Für die Verwendung der Dig-markierten Sonden auf Gewebeschnitten Schnitten wurde für T_m eine Korrektur von 25°C vorgenommen ($T_m^{Dig} = T_m - 25^\circ C$). Die genutzten Ofentemperaturen (T_o) lagen etwa 2-5°C unter den ermittelten Temperaturen. Somit ließen die verwendeten Stringenz-Bedingungen eine Sequenzabweichung zwischen Sonde und Zielsequenz von weniger als 10% zu. Der Hybridisierungslösung (siehe 3.1.2) wurden 3ng/ μ l Sonde zugegeben, 3 Minuten bei 99°C denaturiert, auf Eis abgeschreckt und anschließend 50x Denhardts Reagenz zu einer Endkonzentration von 5x zugegeben. Die Sonde wurde in einem Volumen von 145 μ l auf den Objektträger gegeben und mit einem silanisierten Deckglas abgedeckt. Die Inkubation erfolgte in einer „feuchten Kammer“ über Hybridisierungspuffer (siehe 3.1.2., *In-situ*-Hybridisierungslösung für Kryostatschnitte) Am darauffolgenden Tag erfolgte das „stringente Waschen“ in drei Schritten. Nach dem Abspülen der Deckgläser in einer 5xSSC-Lösung wurden die Objektträger als erstes in 50% Formamid/2xSSC-Lösung für 30 Minuten bei T_o im Wasserbad gewaschen, danach für 60 Minuten in einer 0,2xSSC-Lösung ebenfalls bei T_o und abschließend für 15 Minuten in einer 0,2xSSC-Lösung bei Raumtemperatur (RT).

Für das Detektieren des Hybridisierungssignals wurden die Gewebeschnitte, nach Umpuffern in MaBS, für eine Stunde bei RT in einem Blockierungspuffer mit 2% Blocking Reagenz (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS) zum Blockieren von unspezifischen Bindungen und daran anschließend mit einem anti-Digoxigenin (F_{ab})-alkalische Phosphatase-Konjugat (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS) gelöst im selben Puffer (1:750, 145 μ l auf OT und mit Parafilm™ abdecken) für 30 Minuten in einer feuchten Kammer über Reaktionspuffer inkubiert. Schließlich wurden die Objektträger dreimal für jeweils 10 Minuten in MaBS gewaschen und letztlich in Reaktionspuffer mit 1mM Tetramisol Hydrochlorid (SIGMA) zur Inhibition endogener alkalischer Phosphatasen umgepuffert. Der Nachweis der Dig-markierten RNA/RNA-Hybride erfolgte letztendlich colorimetrisch durch den Umsatz der Substrate 5-Bromo-4-chloro-3-indolyolphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliniumblau (NBT). Sie werden in Reaktionspuffer gelöst (jeweils 0,4mM) und auf die Objektträger gegeben. Die Inkubation erfolgte bei RT in einer feuchten Kammer über Reaktionspuffer im Dunkeln. Je nach Farbentwicklung wurde die Reaktion bis zu 48 Stunden nach Start durch Waschen in PBS gestoppt. Die Gewebeschnitte wurden in Mowiol (0,1g/ml in 25% Glycerin, 0,1M Tris-HCl pH 8,5; HOECHST) eingebettet und mit einer Digital-Kamera und einem Stereomikroskop fotografiert.

b. *In-situ*-Hybridisierung an Whole-mount-Präparaten des embryonalen Hirns

Um einen Gesamteindruck von der Expression einiger Mitglieder des ephrin/Eph-Systems vor allem im Kortex zu bekommen, wurden *In-Situ*-Hybridisierungen am ungeschnittenen Hirn durchgeführt. Hierfür wurden die in 100% Methanol gelagerten Hirne zur Weiterverarbeitung die Methanolreihe (100%, 75%, 50%, 25%, PBS^{DT}) hinunter geführt. Die in diesen Versuchen eingesetzten Puffer und Lösungen waren die Gleichen wie in 3.2.9.a, jedoch wurden sie zu 0,1% mit Tween-20 (SIGMA) versetzt. Bis zu Prähybridisierung wurde ausschließlich auf Eis gearbeitet. Um eine optimale Durchmischung der Lösungen zu gewährleisten, wurden

alle Inkubationen unter Schütteln vollzogen. Als erstes wurden die Hirne dreimal für je 5 Minuten in PBS_{TW} (mit Tween 20) gewaschen. Dann für 60 Minuten zum Bleichen in 6% H₂O₂ in PBS_{TW} inkubiert und wieder dreimal je 5 Minuten in PBS_{TW} gewaschen. Anschließend wurde ein Proteinase K-Verdau (10µg/ml) für 15 Minuten bei 37°C durchgeführt. Durch den Zusatz von Glycin zu einer Endkonzentration von 2mg/ml und mehrfaches Waschen und Spülen mit PBS_W konnte der Verdau gestoppt werden. Das anverdaute Gehirn inkubierte danach für 15 Minuten zur Refixierung in 4%iger PFA / 0,2%iger Glutaraldehyd / PBS_{TW}-Lösung. Vor der Prähybridisierung wurden die Hirne erneut mehrfach in PBS_{TW} gespült und gewaschen. Für die folgende Hybridisierung wurden die Hirne zuerst in 50% Hybridisierungslösung in PBS_{TW} und dann in 100% Hybridisierungslösung (siehe 3.2.1, *In-situ*-Hybridisierungslösung für Whole mount Präparate) für jeweils 5 Minuten prähybridisiert. Anschließend wurde mit frischer Hybridisierungslösung (900µl pro Hirn) 3 Stunden bei 65°C im Hybridisierungsofen weiter prähybridisiert. Die Sonde wurde der Hybridisierungslösung zugegeben (200ng/100µl), für 5 Minuten bei 95°C denaturiert auf Eis abgeschreckt und den Hirnen zugesetzt (100µl pro Hirn). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht im Hybridisierungsofen bei 70°C unter Wippen. Am nächste Tag wurden die Hirne mit mit 1% SDS versetztem Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 5x SSC) bei 70°C unter wippen gewaschen. Der Hybridisierungspuffer wurde in mehreren Schritten mit 2x SSC/1%SDS verdünnt und schließlich ganz ersetzt (Verdünnung:100% Hybridisierungspuffer 75/25, 50/ 50, 25/75, 100% 2x SSC/1% SDS; Inkubation für je 10 Minuten). Anschließend wurde mit 2x SSC/1% SDS für 30 Minuten bei 70°C und 15 Minuten bei RT inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit MaBS/0,1% Tween-20 (MaBS_{TW}) für 10 Minuten bei RT wurde umgepuffert und die Hirne konnten mit einer Blockierungslösung (1% BSA, 2% Blocking Reagenz, MaBS_{TW}) für 60 Minuten behandelt werden. Das anti-Digoxigenin (F_{ab})-AP-Konjugat wurde in dieser Blockierungslösung verdünnt (1:5000), den Hirnen zugegeben und über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die überschüssigen, ungebundenen Antikörper durch waschen mit der Blockierungslösung (erst mit 100% dann mit 50% verdünnt in MaBS_{TW}; waschen für je 10 Minuten) entfernt. Anschließend wurde insgesamt für 90 Minuten mit MaBS_{TW} gewaschen unter mehrmaligen Wechsel des MaBS_{TW}. Für die Nachweiseaktion mit dem Substrat (siehe 3.2.9.a) wurden die Hirne durch dreimaliges waschen in Reaktionspuffer/0,1%Tween-20 für jeweils 10 Minuten umgepuffert. Im letzten Waschschrift wurde dem Reaktionspuffer Tetramisol Hydrochlorid zugesetzt. Das Farbsubstrat (0,4mM BCIP, 0,4mM NTP; siehe 3.2.9.a) wurde zugegeben und bis zum Umsatz im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Waschen in PBS_{TW} gestoppt. Die Hirne wurden in 4% PFA bei 4°C gelagert. Die Fotodokumentation erfolgte einer Digital-Kamera und einem Binokular.

Tabelle 3-3: Ermittelte Hybridisierungstemperaturen für die verwendeten Sonden. $T_m^{(Dig)} = T_m - 20^\circ\text{C}$

Sonde	$T_m^{(Dig)}$ in $^\circ\text{C}$	Sonde	$T_m^{(Dig)}$ in $^\circ\text{C}$	Sonde	$T_m^{(Dig)}$ in $^\circ\text{C}$
Efna1	69,6	EphA2	75,8	EphB3	74,3
Efna2	75,2	EphA3	68,2	EphB4	71,8
Efna3	72,8	EphA4	69,3	EphB6	77,0
Efna4	73,7	EphA5	66,1	Gbx 2	76,5
Efna5	67,6	EphA6	65,7	Lhx 2	67,2
Efnb1	72,6	EphA7	65,8	Lhx 6	72,7
Efnb2	74,6	EphA8	75,7	Ngn 2	69,7
Efnb3	77,4	EphB1	72,3	Cad 6	69,0
EphA1	73,3	EphB2	72,2	Cad 8	70,0

3.2.10 Histochemische Untersuchungen

Nissl-Färbung

Die Nissl-Färbung färbt Bestandteile des rauen endoplasmatischen Reticulums (ER) der Zelle und zeigt somit die Zellsomata. Da Nervenzellen besonders viel raues ER besitzen, kann die Nissl-Färbung im Nervengewebe als Neuronenfärbung zur Übersicht genutzt werden. Hierfür wurden die getrockneten Gewebeschnitte für 30 Minuten in 95% Ethanol und 5% Essigsäure fixiert. Anschließend wurden sie in H_2O kurz gespült und in Kresylviolett-Lösung gebadet. Hierbei wurde das Gewebe stark überfärbt. In den darauffolgenden Schritten wurden die Schnitte unter Sichtkontrolle wieder entfärbt. Zu erst wurde in Wasser kurz gespült. In 50% und 70% Ethanol wurde die Färbung differenziert. Schließlich wurde für jeweils 2 Minuten in 95%, 100%, 100% Ethanol zum Dehydrieren die Ethanolreihe zu Ende gebracht. Zum Abschluss wurden die Schnitte für 2 Minuten in Xylol überführt, mit Mountex (MEDITE) überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt.

3.2.11 Dil-Tracing-Experimente

Die Verdrahtung des Gehirns zeigt ein hoch komplexes aber spezifisches. Neurone, die mit ihrem Zellkörper in bestimmten Hirnareal sitzen, senden ihre Neuriten über kurze bis weite Strecken selektiv in andere Areale, um synaptische Verknüpfungen zu etablieren. Durch neuronales Tracing können diese Arealverknüpfungen dargestellt werden. Man unterscheidet zwischen retrogradem und anterogradem Tracing. Der fluoreszierende lipophile Farbstoff Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate) kann als retrograder und anterograder Tracer eingesetzt werden. Hierfür muss der Farbstoff an einer gewünschten Stelle im Hirn appliziert werden.

a. mit Kristallen

Um die Verknüpfung des Kortex mit dem Thalamus zu zeigen, wurde ein Dil-Kristall ca. 0,5 mm³ tief mit einer Nadel in das entsprechende Areal gedrückt. Dafür wurde zuvor ein kleiner Schnitt in der Kortexoberfläche geführt. Der Farbstoff dringt in die benachbarte Zellen ein, und diffundiert in den Zellmembranen über die gesamte Zelle hinweg und lässt so die Gestalt der Zellen deutlich werden. Für die Zeit der Diffusion wurden die Hirne in 4%igen PFA/ PBS bei 37°C im Inkubator gelagert und abschließend mit dem Vibratom geschnitten (siehe 3.2.8.b). Die Detektion der markierten Zellen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop.

b. mit Glasnadeln

Um die Farbapplikation lokaler gestalten zu können, wurden Glasstäbchen (d=1mm) mit einem Micropipetten-Puller zu Nadeln ausgezogen und deren Spitze mit dem Farbstoff lackiert. Hierfür wurden einige Dil-Kristalle auf dem Heizblock zur Schmelze (55°C) gebracht. Die Spitzen der Nadeln wurden sodann durch die heiße Schmelze gezogen und wieder abgekühlt. Für den Gebrauch wurden die Spitzen dieser lackierten Nadeln abgebrochen und in die entsprechenden Hirnareale gestochen. Nach einer halbstündigen Inkubation bei 37°C wurden die Nadel wieder entfernt. Die Hirne verblieben anschließend bis zur vollständigen Farbdiffusion im Inkubator.

Abschließend wurden die Hirne mit dem Vibratom geschnitten (siehe 3.2.8.b). Die Detektion der markierten Zellen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop.

3.2.12 Bildverarbeitung

Alle Arbeiten an den digitalen Fotos wurden mit der Software Adobe® Photoshop 6.0.1 und der Bildanalyse Software ImageJ 1.33u. (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) durchgeführt. Die Optimierung der einzelnen Fotos wurde ausschließlich durch eine durchgeführte Tonwertkorrektur erreicht. Für die Überlagerungen von verschiedenen Expressionsmustern wurden nur direkt aufeinander folgende Schnitte verwendet. Um die Färbemuster der verschiedener Sonden zu vergleichen wurden deren Signale anschließend in einem Bild vereinigt, in dem die Strukturen der jeweiligen Schnitte genau auf einander abgestimmt und den einzelnen Kanälen des EGB-Farbsystem zugewiesen wurden. Dabei wurden nur Bilder von Schnitten verwendet die direkt aufeinander folgten und morphologisch einwandfrei waren. So sind die hierfür genutzten Schnitte, bei einer Schnittdicke von 20 µm, maximal 40 bis 60µm auseinander. Die Bilder werden invertiert und den Kanälen rot, grün und blau zugewiesen. Überlappungen der Färbemuster äußern sich dabei in Mischfarben der jeweiligen Kanälen.

4. Ergebnisse

Diese Arbeit untersucht die Expressionen der Gene des Ephrin-/ Eph-Systems im Vorderhirn der Maus des Stammes C57BL/6 während der Kortikogenese. Zu diesem Zweck wurden *in-situ*-Hybridisierungen an koronalen Gefrierschnitten des Gehirns der Maus mit *Digoxigenin*-markierten *antisense*-RNA - Sonden durchgeführt. Die Expressionsmuster der einzelnen Gene wurden in verschiedenen Altersstadien [Embryonaltag (E)14, E16, E18, Postnataltag (P)6 und P28] und in spezifischen Regionen des Mäusegehirns studiert und systematisch miteinander verglichen. Im Besonderen wurde auf die Verteilungen im cerebralen Kortex und im Thalamus geachtet. Durch die Verdrahtung der beiden Regionen sind deren Entwicklungen untrennbar miteinander gekoppelt. Für die thalamokortikale, wie auch kortikothalamische Verdrahtung stellt das ventrale Telencephalon, das auch als Subpallium bezeichnet wird, einen wichtigen „Korridor“ dar. Des Weiteren sind die ganglionischen Eminenzen des ventralen Telencephalons der Bildungsort der GABAergen Interneurone, die durch tangentielle Migration in den cerebralen Kortex einwandern. Aus diesen Gründen soll das Subpallium ebenfalls untersucht werden. Bei der Identifizierung der genexprimierenden Gewebestrukturen dienen Nissl-Färbungen an jeweils unmittelbar angrenzenden Schnitten zum Abgleich mit den bekannten Zytoarchitekturatlanten der Maus (Paxinos and Franklin, 2001) und Ratte (Altman and Bayer, 1995).

4.1 Allgemeine Tendenzen der Expressionsdynamik des Ephrin-/ Eph-Systems

Die Ontogenese des Gehirns ist ein sehr komplexer Prozess, der verschiedene Entwicklungsvorgänge wie Induktion, Proliferation, Determination, Migration, axonale Zielfindung, Dendritogenese, Synaptogenese und plastische Remodellierung umfasst. Dies äußert sich in strikten zeitlichen sowie räumlichen Regulationen der daran beteiligten Gene.

Nach ihrer zeitlichen Expressions-Dynamik können die untersuchten Gene in folgende Kategorien eingeteilt werden.

1. *Konstante Expression*: Ein Beispiel für diese Kategorie wäre die Expression von Gbx2 im Thalamus. Der Transkriptionsfaktor markiert in allen Altersstadien weitgehend die gleichen Strukturen. Aus der Familie der Ephrine sowie der Familie der Eph-Rezeptoren kann dies jedoch für kein Mitglied geltend gemacht werden. EphA4 zeigt zwar zu jeder Zeit und in jeder untersuchten Region eine Expression, jedoch variiert diese oft in der Intensität des Signals

2. *Abnehmende Expression*: Hier ordnen sich eine Vielzahl der untersuchten Gene ein. Vor allem die Liganden efna1, efna2, efna3 und efna4 sind im juvenilen Stadium P28 nicht mehr zu detektieren, aber auch der in den embryonalen Stadien stark exprimierte Rezeptor EphA3 ist in den untersuchten postnatalen

Stadien nicht zu finden. Sehr früh wird ebenfalls der Ligand *efnb1* ausgeschaltet. Er ist ausschließlich in den Ventrikulärzonen um die lateralen Ventrikel lokalisiert. Mit dem Verschwinden dieser Zonen verschwindet auch die Expression von *efnb1*. Bei P28 sind nur

3. *Zunehmende Expression*: Dies gilt für die Expression des Rezeptors EphA8 im Neokortex. Nach embryonal schwachem Signal, wird seine Expression postnatal in Schicht 4 massiv verstärkt. Allerdings ist EphA8 im Kortex bei P28 nicht mehr detektierbar. Im Thalamus aber bleibt die EphA8-Expression von E16 an bis einschließlich P28 erhalten (Abb.4-19 G-I und 4-21 I-L).

4. *Variable Expression*: Die Expression der Gene dieser Gruppe zeigt keinen globale Trend, sondern ist regional und zeitlich sehr variabel. Im embryonalen Gewebe verändern sich die Expressionen der verschiedenen Gene als Folge des Auftauchens und Verschwindens von transienten Gewebestrukturen. So erscheint das Signal von EphB1 im Kortex, welches bei E14 nur lateral ausgeprägt ist, bei E16 in der gesamten kortikalen Platte (CP), wohingegen es im ausdifferenzierten Kortex hauptsächlich in den unteren Schichten 5 und 6 vorkommt. Andererseits ändern sich die Expressionsmuster auch unabhängig von solchen transienten Strukturen oder Zellbewegungen. So wird zum Beispiel der Rezeptor EphA5 am E18 im Thalamus in VB exprimiert (Barchmann, 2005), aber weder bei E14 oder E16, noch im postnatalen differenzierten Thalamus ist VB positiv für EphA5-mRNA.

5. *Fehlende Expression*: Einige Sonden zeigen auf den Schnitten ein schlechtes Signal – Rausch – Verhältnis, sodass ein eventuelles Signal nicht vom Hintergrund unterschieden werden kann. Hierzu gehören zum Beispiel EphA2, EphB4 oder *efna4*. Ein völliges Fehlen der Expression kann nicht ausgeschlossen aber auch nicht bestätigt werden.

Die Tatsache, dass die meisten Mitglieder des ephrin-/ Eph-Systems in die Kategorie *variable Expression* und keines in die Kategorie *konstante Expression* fällt, zeigt eine hoch dynamische Regulation. Die Gene des ephrin-/ Eph-Systems sind keine einfachen Identitätsmarker, die Neurone als spezifische Zell-Linie ausweisen, sondern werden je nach Entwicklungsprozess hoch oder runter reguliert und beeinflussen entsprechend das Verhalten der Neurone. *Abnehmende* und *zunehmende* Expressionen machen deutlich, dass die Mitglieder des ephrin-/ Eph-System sowohl bei der Embryonalentwicklung als auch in der Phase der Plastizität eine Rolle spielen.

4.2 Charakteristische Prozesse der pränatalen Entwicklung des cerebralen Kortex zeigen sich in den Expressionsmustern des Ephrin/ Eph-Systems

Die Entwicklung des Kortex beginnt mit der Evagination der beiden künftigen Großhirnhemisphären aus dem vorderen Hirnbläschen des Neuralrohres (Bayer and Altman, 1991). Die stete Zunahme der Zellzahl durch eine andauernde Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen in der Ventrikulärzone (VZ) und später der Subventrikulärzone (SVZ), führt zu einer raschen Verdickung des sich differenzierenden Kortex. Die postmitotischen Neurone wandern radial aus den Proliferationszonen aus, siedeln an der Oberfläche an und bilden zunächst die Präplatte (PP), welche durch später einwandernde Neurone in die Marginalzone (MZ, spätere Schicht 1) und Subplatte (SP) aufgespaltet wird. Diese Zellen bilden die „kortikale Platte“ (CP). Aus

dieser dicht gepackten Zellplatte entwickeln sich die zukünftigen kortikalen Schichten, wobei als erstes die infragranulären Schichten 6 und 5 und darauf folgend die supragranulären Schichten 4 und 3/2 entstehen. Zwischen der SVZ und der SP bildet sich die Intermediärzone (IMZ) heraus, innerhalb der die Axone verlaufen. Dabei ziehen die thalamokortikalen Axone entlang oder/ und innerhalb der SP und die kortikothalamischen oberhalb der SVZ. In der Literatur wird somit manchmal von einer „oberen und unteren IMZ“ gesprochen (Bayer and Altman, 1991)(vergleiche 4.2.1) .

Die Expressionen der Gene des ephrin-/ Eph-Systems lassen sich in der Kortexanlage diesen wohl bekannten Schichten zuweisen. Die Tabelle 4-1 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Expression der Gene in den Altersstadien E14, E16 und E18. In der Tabelle ist festgestellt, ob eine Expression in einer bestimmten Schicht vorhanden ist. Die Expressionsstärken sind dabei in drei Graustufen dargestellt. Ein helles Grau bedeutet eine schwache Expression und ein dunkles Grau eine starke Expression. Ist in einer Schicht für ein Gen keine Expression verzeichnet, ist dies mit einem weißen Kästchen dargestellt. In einigen Fällen ist das Signal nicht homogen in den kortikalen Schichten verteilt, sondern in einem Gradienten, was durch ein „G“ ausgewiesen ist. Da in den Experimenten nur koronale Schnitte verwendet wurden, konnten nur Gradienten innerhalb dieser Ebene, das heißt entlang der mediodorsal- sowie ventrolateral-Achse registriert werden.

Betrachtet man die Expression der Gene in einer bestimmten Region über die verschiedenen Entwicklungsstadien hinweg, vermittelt dies einen Eindruck über die Dynamik der entwicklungsbiologischen Prozesse im embryonalen Kortex. Die Differenzierung des Gewebes korreliert mit den veränderten Expressionsmustern der Gene und erlaubt eventuell Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Prozesse.

Tabelle 4-1: Expressionen der verschiedenen Gene des ephrin- /Eph-Systems im embryonalen Kortex. Die drei Graustufen entsprechen dem in dieser Schicht vorherrschendem Expressionslevel. □ schwach, ▒ mittel, ■ stark, □ nicht exprimiert, □ nicht analysiert; Das „G“ deutet einen Gradienten

Gene	E18						E16						E14					
	lateral			medial			lateral			medial			lateral			medial		
	SP	MZ	CP	IMZ	SVZ	VZ	SP	MZ	CP	IMZ	SVZ	VZ	SP	MZ	CP	IMZ	SVZ	VZ
efna1
efna2
efna3
efna4
efna5
efnb1
efnb2
efnb3
EphA1
EphA2
EphA3
EphA4
EphA5
EphA6
EphA7
EphA8
EphB1
EphB2
EphB3
EphB4
EphB6

1 Der Gradient ist ventral stark und dorsal schwach.
 2 Der Gradient ist an der unteren Kannte der CP dorsal stark und ventral schwach und an der oberen Kannte ventral stark und dorsal schwach.
 3 Der Gradient ist entlang der IMZ medial stark und lateral schwach.
 4 Hier handelt es sich um einen arealspezifischen Doppelgradienten der jeweils nach dorsal und ventral abfällt.

4.2.1 Die Histogenese des cerebralen Kortex lässt sich an Hand von Nissl-Färbungen verfolgen

Die Abb.4-1 zeigt die Histogenese des embryonalen Kortex an Hand von Nissl-Färbungen. In den mit Kresylviolett gefärbten Koronalschnitten des Gehirns der Maus lässt sich die zunehmende Schichtung der Kortexanlage in den Altersstadien E14 bis E18 verfolgen. An E14 (Abb.4-1 A) ist die VZ (Ventrikulärzone) die prominenteste Schicht. Sie liegt dem Ventrikel direkt an. Die VZ hat an diesem Tag durch starke proliferative Prozesse das größte Ausmaß und beginnt ab E15 wieder zu schrumpfen. Am Tag E13 entsteht eine zweite zusätzliche proliferative Zone, die SVZ (Subventrikularzone). Sie ist von der VZ in der Nissl-Färbung nur schwer zu unterscheiden, da die Zellen ebenfalls dicht gepackt sind. In ihr befinden sich Vorläuferzellen, welche die finale mitotische Teilung losgelöst vom Ventrikel vollziehen, aber auch postmitotische Neurone, welche die CP besiedeln werden. Über der SVZ bildet sich die Intermediärzone (IMZ), die vor allem Axone enthält und sich orientierende migrierende Zellen, die aus den proliferativen Schichten auswandern. Die oberflächliche Schicht des Kortex an E14 bildet die CP, die durch Ansiedelung von radial migrierenden Zellen entsteht und die zuvor angelegte Präplatte (PP) in die Subplatte (SP) und Maginalzone (MZ) teilt. Die PP ist in den dorsomedialen Regionen der Kortexanlage noch vorhanden. In den darauf folgenden Tagen E15 (Abb.4-1 B), E16 (Abb.4-1 C), und E18 (Abb.4-1 D) wachsen vor allem die IMZ und die CP weiter an und nehmen somit den größten Teil des embryonalen Kortex ein. Die SVZ nimmt ebenfalls an Ausmaß zu. Am Tag E16 hat sie die größte Dicke erreicht und schrumpft danach wie die VZ zusammen. Die Grenze zwischen VZ, SVZ und IMZ sind in der Nissl-Färbung schwer auszumachen. Für die Unterscheidung der Zonen wurden die Expressionsmuster der Transkriptionsfaktoren *Otx1* für die VZ (Hevner et al., 2003b) und *Cux2* für die SVZ (Zimmer et al., 2004) verwendet (siehe 4.2.2.). Im Verlauf der späten embryonalen Entwicklung des Kortex (nach E16) unterteilt sich die IMZ in eine „untere IMZ“ und eine „obere IMZ“ (Abb.4-1 D). In der „Unteren“ verlaufen die kortikofugalen Axone und sie enthält horizontal orientierte migrierende Zellen, die eine längere Zeit in der Zone verweilen. Die „obere IMZ“ enthält im Gegensatz zur „unteren“ ausschließlich vertikal orientierte Zellen, die entlang der radialen Gliazellen in die CP einwandern. Des Weiteren passieren diese Zone einwachsende thalamokortikale Axone.

In den Nissl-Färbungen der Abb.4-1 fällt auf, dass vor allem in den früheren Stadien E14 und E15 die Entwicklung der IMZ sowie auch der CP in den ventrolateralen Regionen des Kortex weiter vorangeschritten ist als in den dorsomedialen Regionen. Dies spiegelt einen allgemeinen „transversalen Differenzierungs-Gradienten“ wider. Die Bildung neuer Strukturen beginnt im Bereich der Pallium-Subpallium-Grenze und setzt sich in dorsomediale Richtung fort. So erscheint z.B. die CP (Abb.4-2 A und B) aber auch die SVZ keilförmig (Abb.4-2 C, F und I). Grundsätzlich sind zwei weitere Entwicklungsgradienten zu beobachten. Das ist ein „longitudinaler Gradient“ in anterior (früh) posterior (spät) Richtung, der anhand koronaler Schnitte nicht beobachtet werden kann und ein „radialer Gradient“ von innen nach außen (Bayer and Altman, 1991). Der radiale Gradient bezieht sich auf die Schichtenbildung des Kortex, wobei die unteren Schichten 6 und 5 zuerst entstehen und die oberen 4 und 2/3 später. Anfangs siedeln sich die ankommenden Neurone entsprechend ihres Geburtstagszeitpunkt in der CP an und anschließend decondensieren die Neurone durch die Bildung

von Neuropil in entsprechender Reihenfolge und setzen sich somit in erkennbar getrennten Schichten ab (Abb.4-1 E und F). Die Reifungsprozesse des Kortex vollziehen sich bis in die frühen postnatalen Stadien hinein, wobei bereits am Tag 6 für den primären somatosensorischen Kortex alle 6 Schichten zu erkennen sind (Abb.4-1 G). Am Tag P28 sind alle Schichten noch etwas deutlicher zu erkennen (Abb.4-1H).

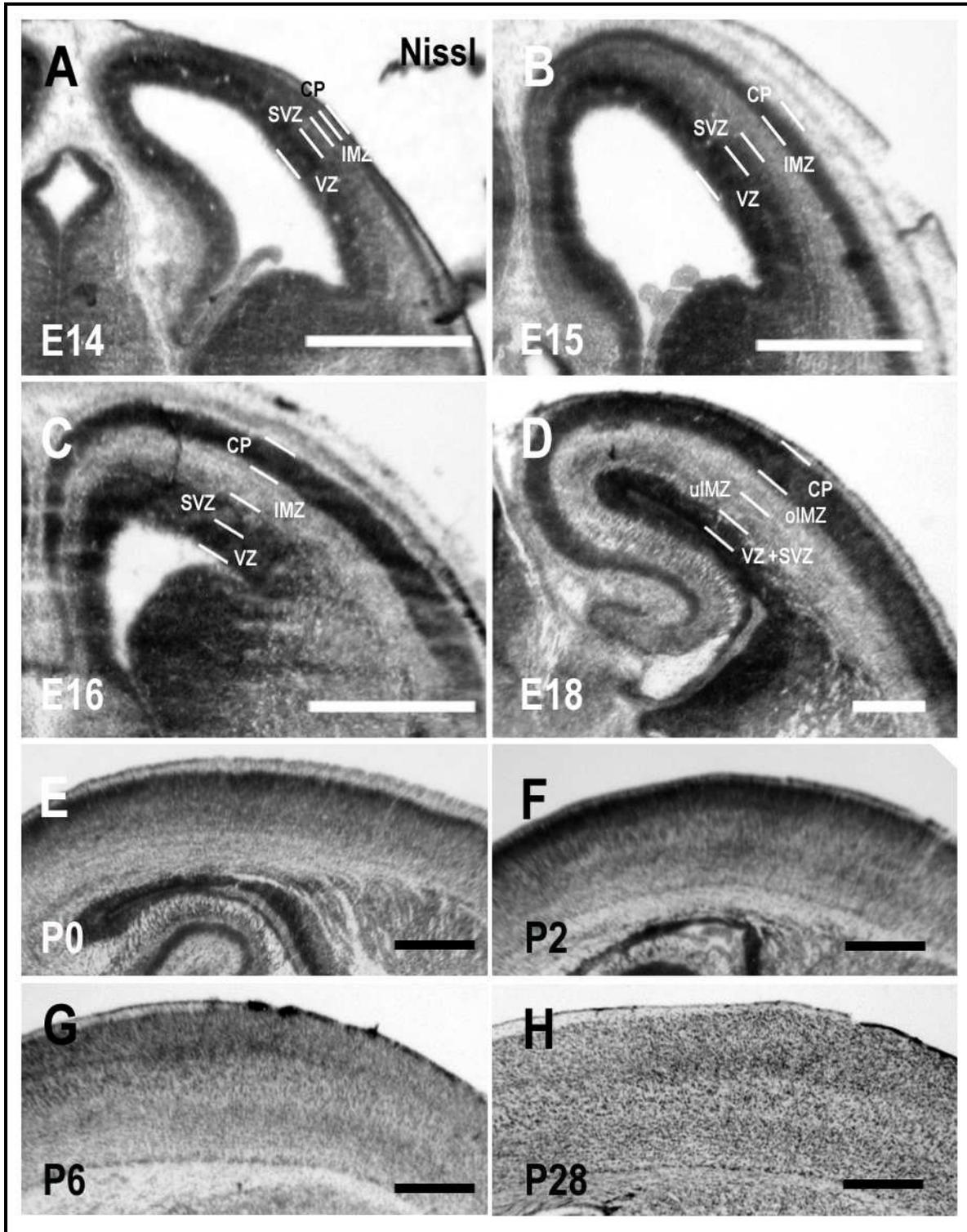


Abb.4-1: Nissl-Färbungen von Koronalschnitten der linken Telencephalon-Hemisphäre. In den Altersstadien E14 (A), E15 (B), E16 (C), E18 (D), P0 (E), P2 (F), P6 (G) und P28 (H); Einteilung in die anatomischen Zonen des embryonalen Kortex VZ, SVZ, IMZ (uIMZ, oIMZ) und CP; postnatal sechsschichtiger Neokortex mit den Schichten 2/3, 4, 5 und 6 (A-D) medial ist links, dorsal oben; E-H dorsal ist links, lateral oben; Maßstab ist jeweils 500 µm.

4.2.2 Otx1 und Cux2 sind Marker für Abkömmlinge Ventrikulär- und Subventrikulärzone des sich entwickelten cerebralen Kortex und trennen die CP in infra- und supragranuläre Schichten

Da die VZ und die SVZ an Hand von Nissl-Färbung schwer zu differenzieren sind, wurden die Expressionsmuster von Otx1 und Cux2 als Marker für diese Zonen verwendet. Der Transkriptionsfaktor Otx1 gilt als Marker für die Neurone der Schichten 5 und 6 (Frantz et al., 1994; Hevner et al., 2003a) und Cux2 als Marker für die Schichten 2, 3 und 4 (Gray et al., 2004; Nieto et al., 2004; Zimmer et al., 2004). Wie in Abb.4-2 zu sehen, zeigt die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren während der kortikalen Entwicklung an E14 noch eine Exklusivität in der VZ für Otx1 (Abb.4-2 B), sowie in der SVZ für Cux2 (Abb.4-2 C). Es ist deutlich zu erkennen, dass VZ und SVZ zusammen zu diesem Entwicklungszeitpunkt den größten Anteil an der Gesamtkortexanlage haben. Mit fortschreitender Entwicklung ist in den höheren Schichten des sich herausbildenden Kortex ebenfalls Signal zu erkennen. In der IMZ ist ein schwaches, diffuses Signal lokalisiert, wohingegen es in der CP wieder stärker und akkumulierter erscheint (Abb.4-2 E, F, H und I). Die Bilder J, K und L in der Abb.4-2 sind Überlagerungen des Otx1- und Cux2-Expressionssignals der jeweiligen Altersstadien. Es ist deutlich zu erkennen, dass das rot dargestellte Cux2- Signal dem grün dargestellten Otx1- Signal direkt anliegt (Abb.4-2 J-K). Auch in den älteren Stadien, sowie in der CP, bleiben das rote und grüne Signal voneinander getrennt. Hierbei ist das Otx1-Signal in der CP eher im unteren Bereich und das Cux2-Signal eher oberflächlich zu finden (Abb.4-2 K und L).

Es zeigt sich, dass im Verlauf der Entwicklung des embryonalen Kortex die Signale von Otx1 und Cux2 durch migratorische Prozesse in die Schichten der CP eingetragen werden. So ist die Vermutung, dass die Moleküle mit den radial migrierenden Zellen assoziiert sind, naheliegend. Die Cux2- und Otx1-Markierungen stellen somit beispielhaft Zellen auf ihrem radial migratorischen Weg dar, Otx1 von der VZ bis in die infragranulären Schichten, Cux2 von SVZ in die supragranulären Schichten. Nebenbei ist zu bemerken, dass dieses Expressionsmuster nicht notwendigerweise bedeutet, dass infragranuläre Zellen der VZ und supragranuläre Zellen der SVZ entstammen, da der Expressionsbeginn der beiden Transkriptionsfaktoren nicht zwingend mit der letzten Mitose assoziiert ist. Zeitrafferaufnahmen (Noctor et al., 2004) zeigen jedoch, dass zumindest die supragranulären Neurone tatsächlich erst in der SVZ postmitotisch werden, ihr also entstammen.

Im vorliegenden Zusammenhang dienen die Expressionsmuster von Otx1 und Cux2 drei Zwecken. 1.) der Abgrenzung von VZ und SVZ, 2.) der Abgrenzung infra- und supragranulären Schichten und 3.) als Beispiel für Markierungsmuster von Genen, die von Beginn bis Ende der radialen Migration exprimiert werden. Zur Abgrenzung der SVZ und IMZ ist Cux2 nicht geeignet, da diese Grenze über die Auftrittshäufigkeit von abventrikulär auftretenden Mitosen definiert wird, die Cux2-Expression aber nicht mit der Mitosephase der SVZ-Zellen assoziiert ist, sondern weit in postmitotische Stadien hinein reicht.

Auf den Bildern A,D und G in Abb.4-2 sind Nissl-Färbungen des cerebralen Kortex dargestellt. Sie zeigen den Entwicklungsstand des embryonalen Kortex in den Altersstadien E14, E15 und E16.

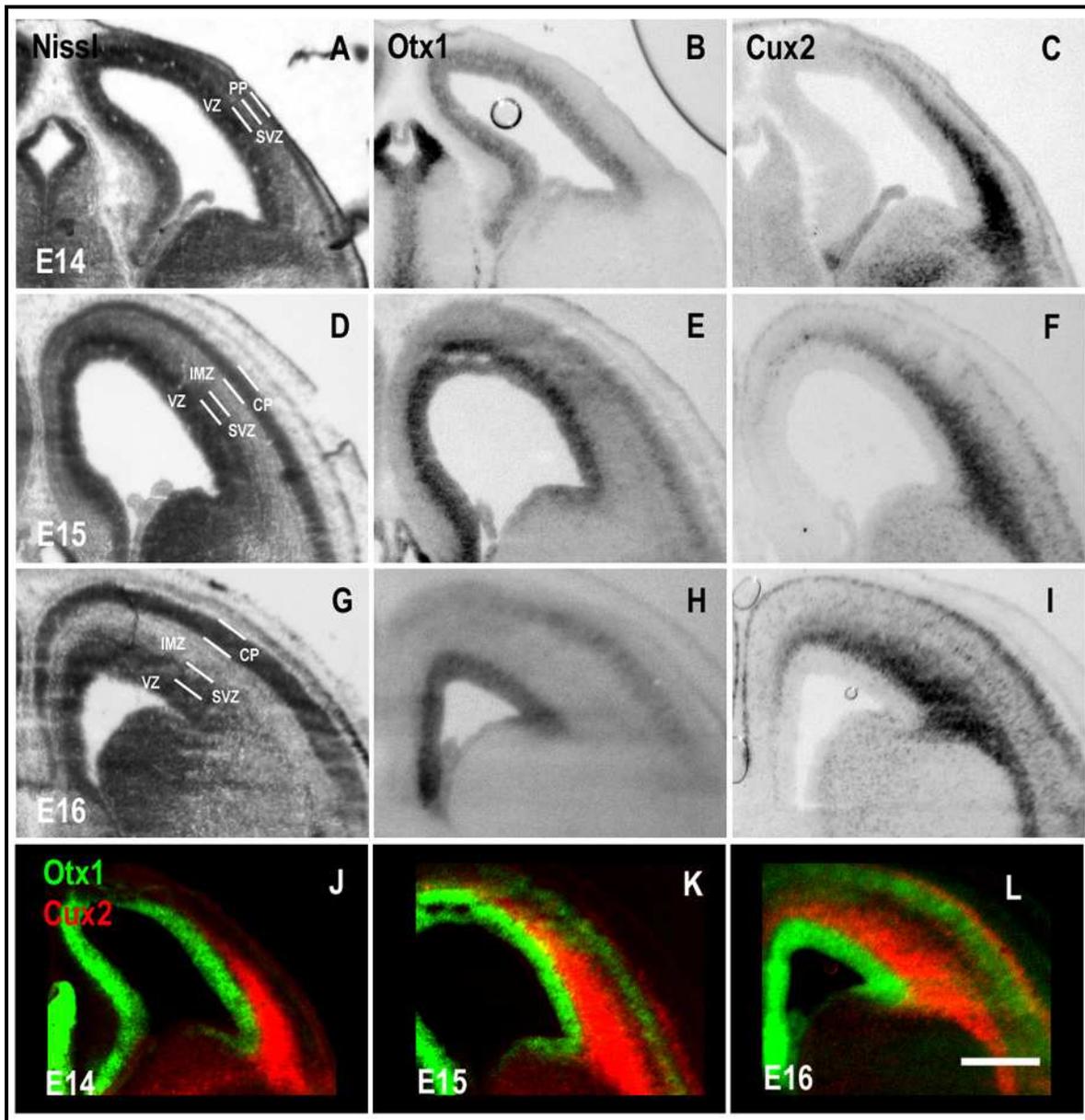


Abb.4-2: Koronalschnitte der linken Telencephalon-Hemisphäre in den Altersstadien E14 (A-C), E15 (D-F) und E16 (G-I); Die Nisslfärbungen in A, D und G geben einen Überblick der einzelnen Schichten im sich entwickelnden cerebralen Kortex. B, C, E, F, H und I zeigen *in-situ*-Hybridisierungen mit den *Digoxigenin*-markierten *antisense*-RNA-Sonden für Otx1 (B, E, H) und Cux2 (G, H, I). J, K, L zeigen die Überlagerungen des Otx1- und Cux2-Signals von konsekutiven Schnitten der jeweiligen Altersstadien in einer Falschfarben-Darstellung. VZ Ventrikulärzone, SVZ Subventrikulärzone, IMZ Intermediärzone, PP Präplatte, CP kortikale Platte; medial ist auf den Bildern links, dorsal oben. Maßstab ist 300µm.

4.2.3 Die Gene *efnb1*, *efna3* und *EphB1* sind spezifisch in nur einer embryonalen Schicht des sich entwickelnden Kortex exprimiert

Von besonderem Interesse sind Expressionsmuster von Genen, die trotz der hohen Dynamik über die Kortex-Entwicklung hin stationär bleiben. Ein solches Muster weist darauf hin, dass die entsprechenden Gene nur in einer zeitlich eng definierten Phase der Differenzierung benötigt werden. Das Gen *efnb1* ist in den embryonalen Stadien E14 und E16 ausschließlich in der VZ des Neokortex lokalisiert (siehe Abb.4-3 A und D). Da *efnb1* außerhalb der VZ des Kortex nicht vorkommt, kann es sehr gut als Marker dienen. Eine

Trennung der VZ und SVZ ist somit auch mittels dieses Gens möglich. *Efna3* und *EphB1* sind an E14 in der PP exprimiert. In den darauffolgenden Tagen E16 und E18 (nicht gezeigt) breitet sich das Signal in der CP weiter aus, wobei die Expression von *EphB1* auf den unteren Bereich der CP beschränkt bleibt (Abb.4-3: B und E *efna3* und C und F *EphB1*, sowie Abb.4-5 K). Dies wird schon am Tag E16 deutlich, vergleicht man die Dimension der Markierung der CP von *efna3* und *EphB1*, die eine dünnere Schicht markiert (Abb.4-3 E und F). Die Tatsache, dass sich beide Expressionen nur in den Differenzierungs- aber nicht in den Vorläuferschichten befinden, lässt den Schluss zu, dass einwandernde Zellen erst nach Erreichen der CP beginnen, diese Gene zu exprimieren. Die Funktion der entsprechenden Proteine wird demnach im Kortex ausschließlich in der CP benötigt.

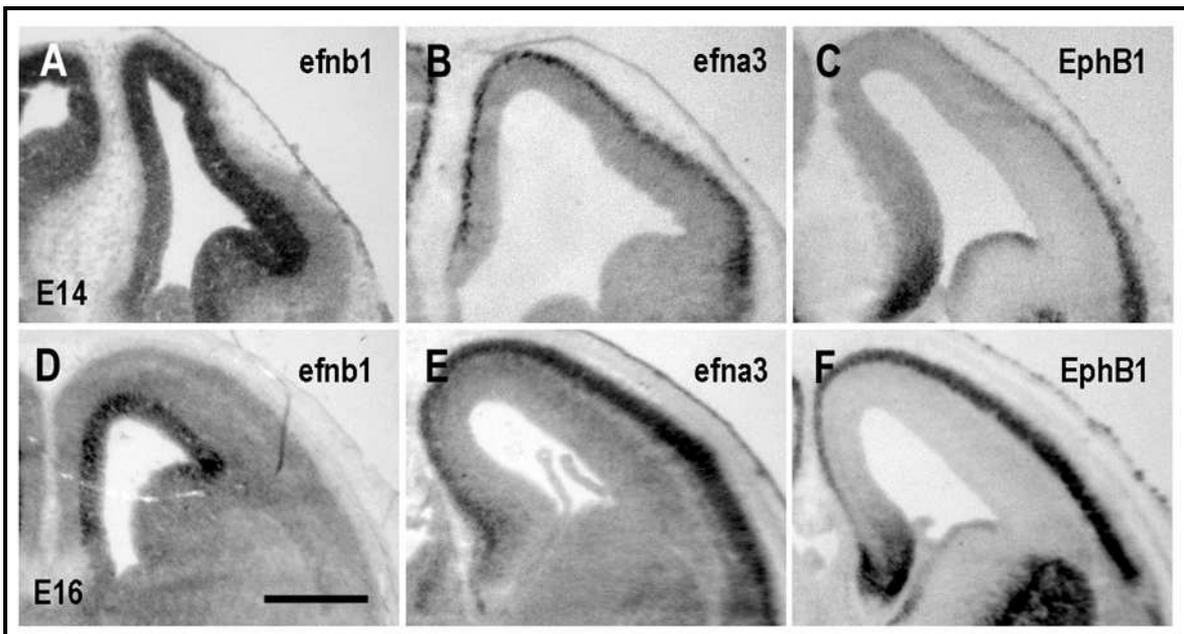


Abb.4-3: Koronalschnitte der linken Telencephalon-Hemisphäre in den Altersstadien E14 (A-C) und E16 (D-F); Die Bilder zeigen *In-situ*-Hybridisierungen mit den Sonden für *efnb1* (A, D), *efna3* (B, E), *EphB1* (C, F); Die Markierungen der Sonden sind jeweils in einer spezifischen Schicht lokalisiert. *Efnb1* in der VZ, *efna3* und *EphB1* in der CP; Bei E14 befindet sich die Expression von *efna3*(B) und *EphB1*(C) jeweils in der PP (siehe im Vergleich Abb.4-2 A). Medial links, dorsal oben, Maßstab ist 500 μ m.

4.2.4 Radiale Migration verschiebt die Expression von Genen in die höheren Schichten des embryonalen Kortex

Die Bilder A bis I in Abb.4-4 zeigen die Expressionsmuster der Gene *efnb2*, *EphA3* und *EphA4* in den Altersstadien E14, E16 und E18. Die Muster von *efnb2* und vor allem *EphA3* sind ähnlich dem Muster von *Cux2* (siehe Abb.4-2) und demnach auch so zu deuten. Am Tag E14 sieht man eine starke Expression von *EphA3* in der SVZ und der Zone darüber. Die VZ ist völlig frei von Signal. Über die kommenden Tage breitet sich das Signal weiter aus. Es überzieht die IMZ, durchsetzt die CP und akkumuliert an deren Oberfläche. Ebenfalls ist das Signal im sogenannten „lateralen migratorischen Strom“ (lms) zu finden, in dem sich Zellen bewegen, die tangential aus der kortikalen SVZ auswandern, um den ventrolateralen Teil des Kortex zu besiedeln (Abb.4-4 E), (Bayer and Altman, 1991). Der Beginn der Besiedelung der CP startet nahe der Pallium-Subpallium-Grenze und setzt sich in dorsaler Richtung fort, was einem „transversalen

Differenzierungs-Gradienten entspricht“. Die radial migrierenden Zellen sind in der IMZ und CP als diffus verstreute Färbungen zu erkennen (siehe Abb.4-4 E, weiße Pfeilspitze). Das Signal wird also aus der SVZ in die CP hineingetragen und ist dort an E18 in den pia-nahen supragranulären Schichten zu finden (Abb.4-4 D-F). EphA3 ist somit ein Marker für die radial migrierenden Neuronen, die wie die Cux2-positiven-Zellen in der SVZ geboren werden und für die supragranulären Schichten bestimmt sind.

Die Expression von EphA3 zeigt bei E16 sowie bei E18 eine Auffälligkeit im Vergleich zur Cux2-Färbung. Tangential nimmt von, dorsal kommend, das Signal der EphA3-Sonde im Bereich der SVZ, oberhalb der Pallium-Subpallium-Grenze sprunghaft ab und setzt sich in der IMZ fort. Diese nichtgradierte Expressionsgrenze findet man in gleicher Weise in der CP wieder, wobei zwei Areale entstehen in denen einmal EphA3 exprimiert ist (ventral) und einmal nicht (dorsal; siehe Abb.4-4 E und F; schwarze Pfeile). Die Areal-Spezifität in der CP ist somit bemerkenswerter Weise scheinbar schon auf dem Level proliferativen SVZ repräsentiert.

Die Expression des Gens *efnb2* ist der Expression von EphA3 ähnlich, es taucht an E18 ebenfalls wie EphA3 in der supragranulären Schicht der CP auf. Auch zeigt es an den Tagen E14 und E16 eine starke Expression in der SVZ und im Ims. Aber es lässt in Richtung VZ eine Lücke (siehe Abb.4-4 A und B weiße Pfeile). Die Zuordnung in die Zonen SVZ und IMZ ist oft nicht ganz einfach, da die Markierungen verschiedener Gene über die Zonengrenzen hinaus reichen können. In Abb.4-5 J ist durch Falschfarben-Überlagerungen der Expressionsmuster der Gene EphA3 (rot), EphA5 (grün) und EphB1 (blau) am Tag E14 die Einteilung der Kortex-Anlage in die embryonalen Schichten VZ, SVZ, IMZ und CP verdeutlicht. Hier ist die VZ frei von Signal, die SVZ ist rot durch die Expression von EphA3, die IMZ ist gelb, eine Mischung aus dem Rot von EphA3 und dem grün dargestellten Signal von EphA5. Die CP ist durch die Expression von EphB1 blau (vergleiche auch Abb.4-2 A).

Der Rezeptor EphA4 (Abb.4-4 G-I) ist hauptsächlich in der VZ und der SVZ exprimiert. Er ist somit im Grossteil der Kortex-Anlage bei E14 zu finden (Abb.4-4 G). Am Beispiel der Expression von EphA4 in der VZ und SVZ ist ein Rückgang dieser Zonen über die Zeit von E16 und E18 gut nach zu verfolgen. Sie schrumpfen auf ein Minimum zusammen, wobei nur ein schmaler Streifen direkt um den Ventrikel bleibt. In der CP von E16 (Abb.4-4 H) und E18 (Abb.4-4 I) sind ebenfalls schwache Färbungen zu finden. Bei E16 verläuft die Markierung in einem Gradienten von dorsal hoch nach ventral niedrig an der unteren, an die IMZ grenzende Kante der CP, wohingegen bei E18 eine zusätzliche Markierung an der oberen, die MZ grenzende Kante zu finden ist. Die untere Markierung nimmt dabei deutlich ab. Sie ist nur noch in dem ganz dorsalen Bereich des Kortex stärker als an der Oberkante der CP. Im Bezug auf das *Otx1*-Expressionsmuster könnte daraus resultieren, dass EphA4-positive Zellen aus der VZ sowie SVZ in Richtung CP auswandern und dabei das Signal von EphA4 mit transportieren.

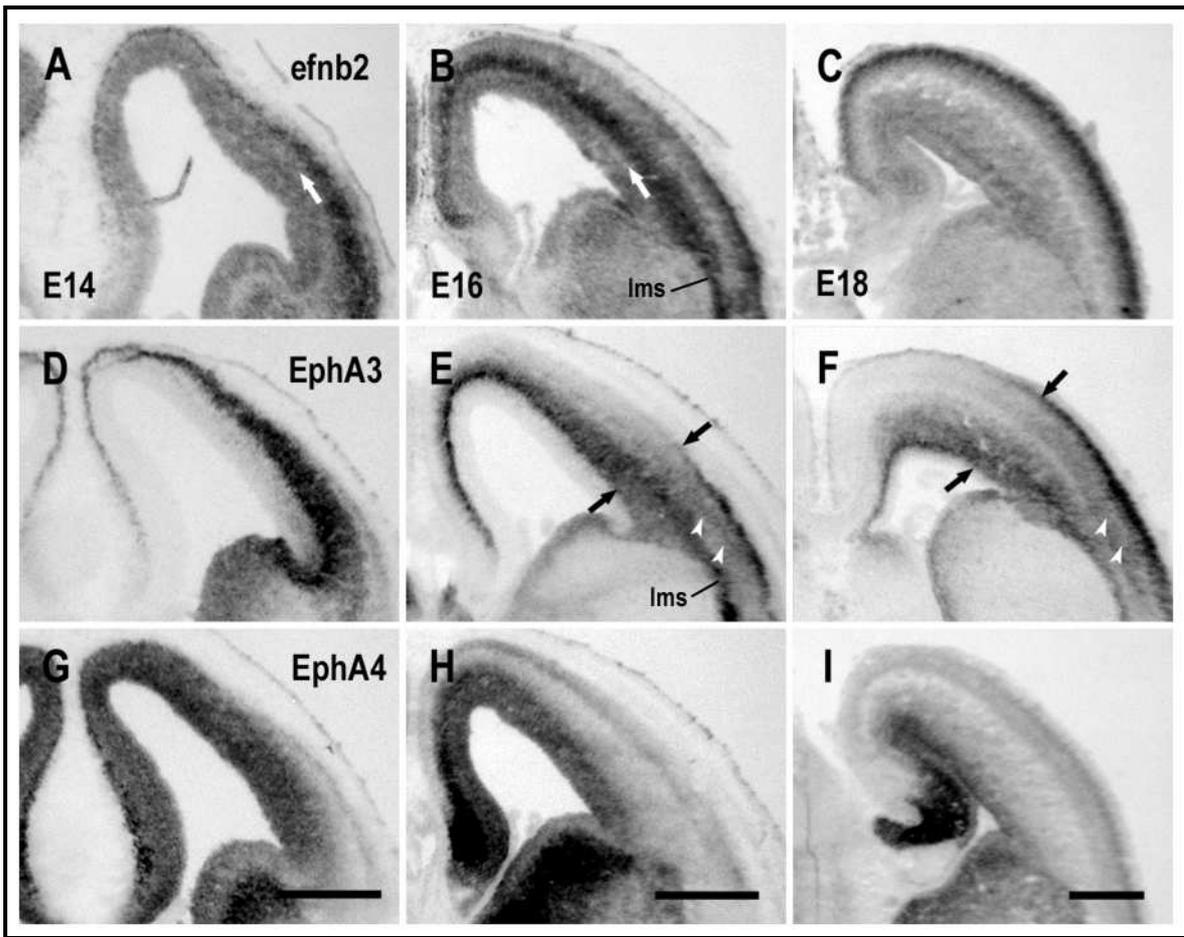


Abb.4-4: Koronalschnitte der linken Telencephalon-Hemisphäre in den Altersstadien E14 (A, D, G), E16 (B, E, H) und E18 (C, F, I); Die Bilder zeigen *in-situ*-Hybridisierung mit den Sonden *efnb2* (A-C), EphA3 (D-F), EphA4 (G-I). Die weißen Pfeile in A und B zeigen einen schmalen Streifen fehlender Expression direkt über der VZ. Die schwarzen Pfeile in E und F zeigen eine tangentielle Expressionsgrenze in der SVZ sowie in der CP. Die weißen Pfeilspitzen in Bild E zeigen eine diffuse Färbung von wandernde Zellen durch die CP und IMZ. lms „lateral migratory stream“; medial ist auf den Bildern links, dorsal oben. Maßstab ist jeweils 500 µm.

4.2.5 Überlagerung der Expressionsmuster enthüllt neue Substrukturen des embryonalen Kortex

In Abb.4-5 ist durch Überlagerungen der Expressionsmuster der Gene EphA3, EphA4, EphA5 und EphB1 in den Altersstadien E14 (Abb.4-5 G und J) und E16 (Abb.4-5 H, I und K) die Schichtung des embryonalen Kortex dargestellt (vergleiche auch die Nissl-Färbungen in Abb.4-1 A bis D). Es zeigt sich, dass eine Einteilung der Expressionen der Gene in die in der Nissl-Färbung sichtbaren anatomischen Schichten möglich ist. Andererseits werden zusätzliche Substrukturen sichtbar. Am Tag E14 sieht man in Bild G der Abb.4-5, dass die Expressionszone von EphA5 (grün), das stark in der SVZ und IMZ zu finden ist (Abb.4-5 B), der Expression von EphA4 (rot) in der VZ und SVZ direkt aufliegt. Im Bereich der SVZ kommt es zu einer leichten Farbmischung von rot und grün. In Verbindung mit der Tatsache, dass die Färbemuster in Abb.4-5 J von EphA3 (rot) und EphA5 (grün) in der SVZ nicht vollständig überschneiden und eine Expressionsgrenze auszeichnen, zeigt, dass die SVZ in eine „obere“ SVZ (oSVZ) und „untere“ SVZ (uSVZ) aufgeteilt werden kann. EphA5 ist an E14 demnach nur in der oSVZ exprimiert. Zur Kortexoberfläche schließt sich an die

EphA5-Färbung in der IMZ die CP an, die hier durch die blaue Markierung der EphB1-Expression repräsentiert ist. Eine Abgrenzung der VZ und der gesamten SVZ bekommt man durch die Expression von EphA3, die in der SVZ vorhanden ist und eine scharfe Grenze zu VZ bildet, welche frei von EphA3 ist (Abb.4-4 E und Abb.4-5 J).

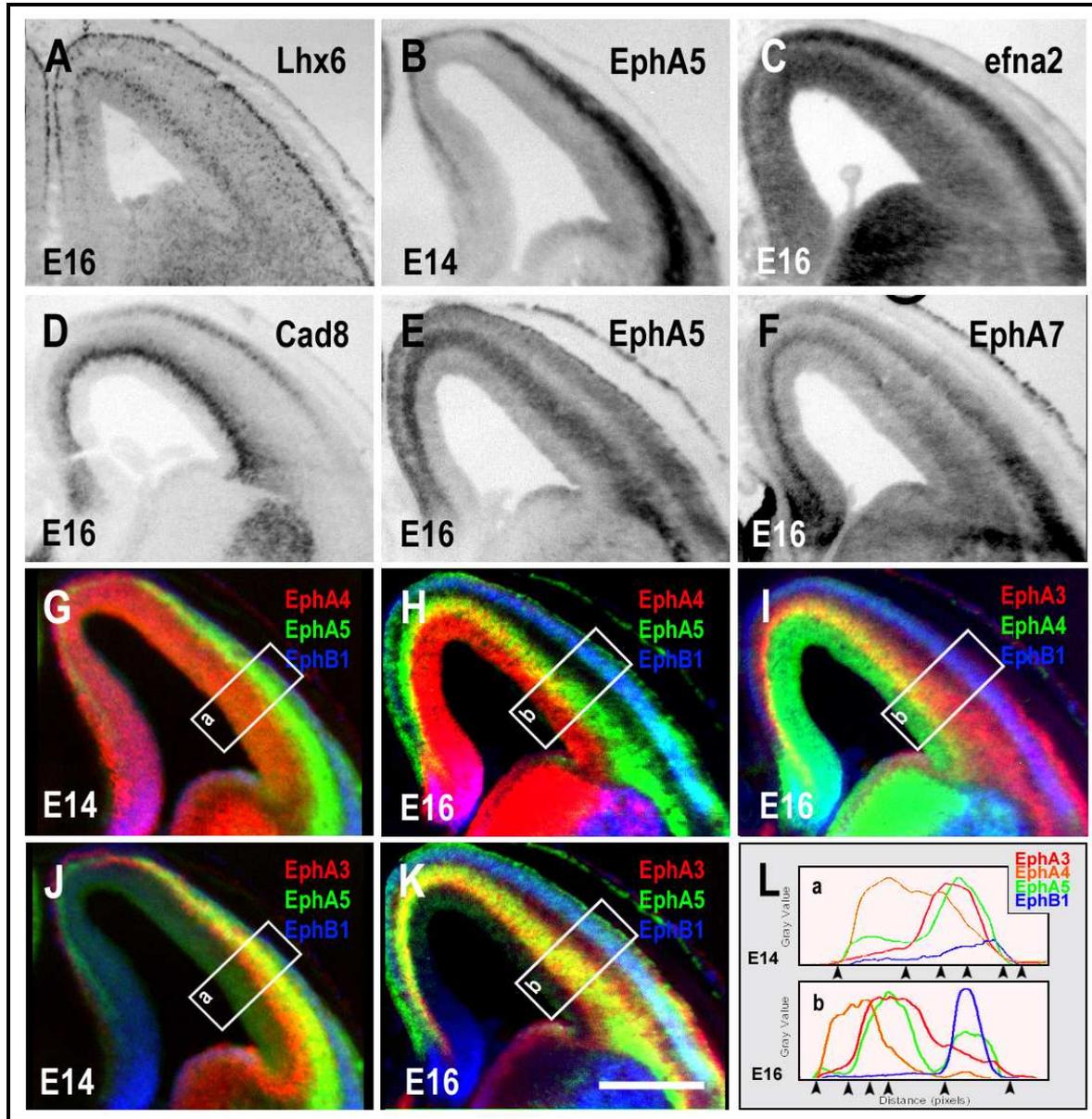


Abb.4-5: Koronalschnitte der linken Telencephalon-Hemisphäre in den Altersstadien E14 (B, G, J), E16 (A, C-F, H, I, K); *In-situ*-Hybridisierung mit den Sonden Lhx6 (A), Cad8 (D), EphA5 (B, E), efna2 (C) und EphA7 (F). Die Bilder G bis K sind Falschfarbendarstellungen² von Überlagerungen der Expressionsmuster von EphA4, EphA5 und EphB1 (G, H) und EphA3, EphA5 und EphB1 (J, K), sowie EphA3, EphA4 und EphB1 (I). Bild L zeigt im Intensitätsplot die Verteilung der Signalstärken der verschiedenen Sonden aus den eingezeichneten Bereichen in den Bildern G und J für E14 (a) und H, K und I für E16 (b). Die Pfeilspitzen zeigen die Grenzen der einzelnen Schichten der Kortex-Anlage von links nach rechts VZ, uSVZ, oSVZ, IMZ und CP. In A-K ist medial links und dorsal oben. Maßstab 500 µm.

² Die Falschfarbendarstellung der Expressionsmuster im RGB-Farbsystem erlaubt die gleichzeitige Darstellung von drei Färbemustern. Da in Abb.4-5 G-K allerdings vier Muster verglichen werden, ist eine strikte Farbzweisung, wobei jedem Muster eine Farbe zugewiesen ist, nicht möglich. Hier ist besonders auf die Beschriftung zu achten, um Verwechslungen auszuschließen.

Am Tag E16 ist eine starke Änderung in den Dimensionen der Schichten aber auch eine Verschiebung der Expressionsmuster zueinander zu verzeichnen. Für die VZ ist eine drastische Schrumpfung festzustellen. Dies wird an Hand der EphA4 Markierung deutlich, die in Abb.4-5 H (rot) massiv an Ausdehnung verliert. Auch kommt es an E16 zu einer deutlichen Überschneidung der Expressionsmuster von EphA4 und EphA5, wie in Abb.4-5 H als gelber Streifen zu sehen ist. EphA5 hat sich am Tag E16 in seinem Expressionsumfang in die untere SVZ ausgedehnt, wie die Überlagerung mit EphA3 (rot; Abb.4-5 K) zeigt. Dies wird durch die graphische Darstellung der Verteilungen der Expressionen der Gene über die radiale Ausdehnung des Kortex in Bild L-b der Abb.4-5 nochmals verdeutlicht. Es wurden die Intensitäten der Signale der Sonden im Bereich der eingezeichneten Sichtfenster in den Bildern G bis K (a für E14 und b für E16) gemessen und in einem Diagramm dargestellt. Die Teilung in die verschiedenen Schichten ist auch hier zu erkennen Abb.4-5 L, Pfeilspitzen zeigen die Zonengrenzen, links VZ; rechts CP). Die Expression von EphA4 ist hier in orange dargestellt und zeigt bei E14 etwa die doppelte Ausdehnung als bei E16. Es überschneidet sich mit den Expressionen von EphA3 (rot) sowie EphA5 (grün), wobei sich bei E14 (Abb.4-5 L-a) die uSVZ, oSVZ und die IMZ abzeichnen.

Im Vergleich mit den hier verwendeten Markern für die VZ, wie Otx1 (Abb.4-2 B,E,H) und efnb1 (Abb.4-3 A,D) zeigt sich, dass die Expression von EphA4 (Abb.4-4 G,H) über die Dimension der VZ hinaus- und in die SVZ hineinreicht. Dabei kommt es zur Überschneidung mit EphA3 (Abb.4-4 D,E), das in der SVZ exprimiert ist. Diese Überschneidungszone ist in der Überlagerung als gelber Streifen gut sichtbar (Abb.4-5 I). Auch die graphischen Darstellungen der Expressionen über den Kortex hinweg in Abb.4-5 L-a und L-b zeigten diese Überschneidung von EphA3 und EphA4. Im Vergleich mit den Marker Cux2 für die SVZ (Abb.4-2 C,F,I) zeigt sich, dass diese Überschneidungszone in SVZ zu finden ist, aber in ihrer Breite, nicht die gesamte SVZ beschreibt. Somit ist die SVZ in zwei Schichten unterteilt. Cad8 bestätigt diese Teilung. Wie in Abb.4-5 B zu sehen, ist die SVZ über die gesamte Breite durch die Cad8-Sonde durch zwei unterschiedliche Signalstärken markiert. Das schwächere Signal reicht bis an die IMZ heran und das starke Signal bleibt auf die Überschneidungszone von EphA3 und EphA4 (Abb.4-5 I) beschränkt.

4.2.6 Die Zone der Überschneidung der Expression von EphA4 und EphA3 entsprechen dem Migrationsweg der GABAergen Interneurone

Das Bild A der Abb.4-5 zeigt das Expressionsmuster des Gens Lhx6. Das Lim-Homöobox-Gen markiert Vorläuferzellen von Interneuronen, die aus dem Subpallium stammen und den Transmitter GABA exprimieren werden. Im Pallium konzentriert sich das Signal der Lhx6-Sonde in einer oberflächlichen und in einer tieferen Schicht. Die oberflächliche Schicht ist die MZ, in der vor allem frühgeborene Interneurone tangential migrieren. Die tiefer gelegene Schicht ist der Migrationsweg von spätgeborenen Interneuronen. Sie entspricht der Überlappungszone von EphA3 und EphA4.

Tabelle 4-2: Differentielle Expression der verschiedenen Gene in den verschiedenen Subzonen der embryonalen Kortex-Anlage. Die Expression der Gene ist hier in zwei Abstufungen dargestellt: ■ stark, ■ mittel, □ schwach, □ nicht exprimiert, G bedeutet einen Gradienten.

Gene	E14				E16			
	VZ	uSVZ	oSVZ	IMZ	VZ	uSVZ	oSVZ	IMZ
EphA3		■	■	■		■	■	■
EphA4	■	■	■	■		G	■	■
EphA5	■		■	■	■	■	■	■
EphA7	■		■	■			G	■
efnb2	■	■	■	■	■	■	■	■
Lhx6		■				■		■
Cad8		■	■			■	■	

4.2.7 Die Gene der Rezeptoren EphA4, EphA5 und EphA7 sowie des Liganden efna2 zeigen ein ausgeprägt gradiertes Expressionsmuster

Gradierte Verteilungen von Lenkungsmolekülen in Zonen, wie der IMZ, der SP oder der CP, könnte für die Zielfindung von Axonen aus dem Thalamus von großer Wichtigkeit sein. Doch nicht jeder Expressions-Gradient, der in der embryonalen Kortex-Anlage zu finden ist, ist von Bedeutung. Auf Grund neurogenetischer und Differenzierungs-Gradienten im Gewebe (Bayer and Altman, 1991) entstehen ebenfalls Gradienten in der Expression der Gene. Gradienten, die also auf den koronalen Schnitten von ventral nach dorsal und dementsprechend entlang des transversalen Entwicklungsgradient verlaufen, müssen nicht zwingend mit dem Prozess der axonalen Zielfindung assoziiert sein.

Die beiden Rezeptoren EphA5 und EphA7 zeigen am Tag E16 in der CP eine gradierte Verteilung. EphA5 (Abb.4-5 E) ist medial, wie lateral in den ventralen Bereichen stärker exprimiert als in den dorsalen. EphA7 (Abb.4-5 F) hingegen beschreibt einen Gradienten in der CP von lateral (hoch) nach medial (niedrig). Die Verteilung der Transkripte von EphA4 (Abb.4-4 H) in der CP ist gegensätzlich der Verteilung der EphA5-Transkripte. EphA4 ist dorsal hoch exprimiert und ventral niedrig. Der Abfall des Gradienten erfolgt lateral sowie auch medial. Das Zusammenspiel dieser Rezeptoren könnte in der embryonalen CP zu einer Karte führen, auf der Koordinaten in einem „EphA – Code“ festgelegt sein könnten. Dies gilt hier zumindest in transversaler Orientierung. Die Liganden efna2 (Abb.4-5 C) und efna3 (Abb.4-3 E) sind in der CP homogen verteilt und ergänzen das System. Allerdings ist efna2 in der VZ und SVZ in einem dorsal hoch und ventral (medial sowie lateral) niedrig Gradienten exprimiert (Abb.4-5 C).

Der Rezeptor EphA7 (Abb.4-5 F) zeigt am Tag E16 in der unteren IMZ ebenfalls eine gradierte Verteilung. Der Rezeptor zeigt dabei medial eine stärkere Expression als lateral. Der Gradient in der IMZ ist demnach dem Gradienten in der CP entgegengerichtet. Auch EphA5 (Abb.4-5 E) ist in der IMZ exprimiert

allerdings von medial nach lateral in annähernd gleicher Stärke. Somit sind in der IMZ auch potentielle Positions- und Richtungsinformationen für passierende Axone enthalten.

4.2.8 Am Embryonaltag E 18 ist eine starke Zunahme an Komplexität der CP zu verzeichnen

Am Embryonaltag 18 ist die kortikale Neurogenese nahezu beendet (Price and Willshaw, 2000). Beinahe alle Neurone für den zukünftigen Kortex sind geboren und wandern zur ihrem Bestimmungsort in der CP oder sind dort bereits angekommen. Die Nissl-Färbung in Abb.4-6 A zeigt eine deutlich verkleinerte VZ und SVZ, sowie einen breiten, intermediären Streifen unterhalb der weiter angewachsenen CP. Somit kann die Invasion der CP durch die thalamokortikalen Axone (TCA) und die Differenzierung der kortikalen Areale weiter voranschreiten. Dies wird an Hand der Expressionsmuster der untersuchten Gene deutlich.

Die Färbemuster der in der Abb.4-6 dargestellten *in-situ*-Hybridisierungen mit den Sonden für das Ephrin- / Eph- Systems zeigen im Allgemeinen einen starken Rückgang der Expressionen in den Schichten unterhalb der CP des embryonalen Kortex (Abb.4-6 B-Q). Lediglich die Hybridisierung mit den Sonden für *efnb2* und *EphA5* bringen noch eine deutliche Markierung an der Grenze von SVZ und IMZ hervor (Abb.4-6 C, K und L), der Rezeptor *EphA3* ist in der SVZ und der unteren IMZ wesentlich schwächer als an E16 exprimiert (Abb.4-6 E und F; Abb.4-4 D-F). Das Färbemuster von *EphA4* zeigt die stark reduzierte VZ und SVZ.

Im Gegensatz zum Rückgang der Expressionen in den unteren Schichten, ist in der CP eine Zunahme, sowohl in der Anzahl der exprimierten Gene, als auch in der Komplexität der Expressionsmuster zu beobachten. Die Expressionen verdeutlichen eine mehrschichtige CP, sowie eine arealspezifische Verteilung der untersuchten Gentranskripte.

Die beiden Rezeptoren *EphB1* (Abb.4-6 G) und *EphB2* (Abb.4-6 H) verteilen sich in der CP auf die unteren, infragranulären (*EphB1*), sowie auf die oberen, supragranulären Schichten (*EphB2*). Der Ligand *efnb2* zeigt Expression ebenfalls in der supragranulären Schicht (Abb.4-6 C). *EfnA5* wird innerhalb der CP in einer medialen Schicht exprimiert. Das Muster des Liganden beschreibt dabei auf seiner zu *Pia mater* weisenden Seite eine scharfe Grenze. Seine nach innen gerichtete Abgrenzung erscheint im Gegensatz dazu eher fließend, aber trotzdem deutlich (Abb.4-6 B). Die Überlagerungen der Signale sind in Falschfarben in den Bildern I und J der Abb.4-6 gezeigt. Bild I zeigt die Zweiteilung in eine rote supragranuläre (*EphB2*) und eine grüne infragranuläre Schicht (*EphB1*) in der Ausdehnung der CP, die als Nissl-Färbung in blau dargestellt ist (rot und grün enthält durch das Signal der CP Blautöne). Bild J zeigt eine blaue, von *efna5* verursachte intermediäre Schicht, die zwischen der grünen, unteren (*EphB1*) und der roten, *efnb2*-markierten supragranulären Schicht liegt. *EfnA5* zeigt dabei eine leichte Überlappung mit *EphB1*.

Die Sonde für den Rezeptor *EphA4* bringt lediglich ein schwaches Signal in der CP hervor, es lässt sich allerdings eine Schichtung der CP erkennen. Im Neokortex ist deutlich die oberflächliche, supragranuläre Schicht markiert, gradiert von lateral nach medial sowie etwas schwächer die Unterseite der CP. Im Bereich

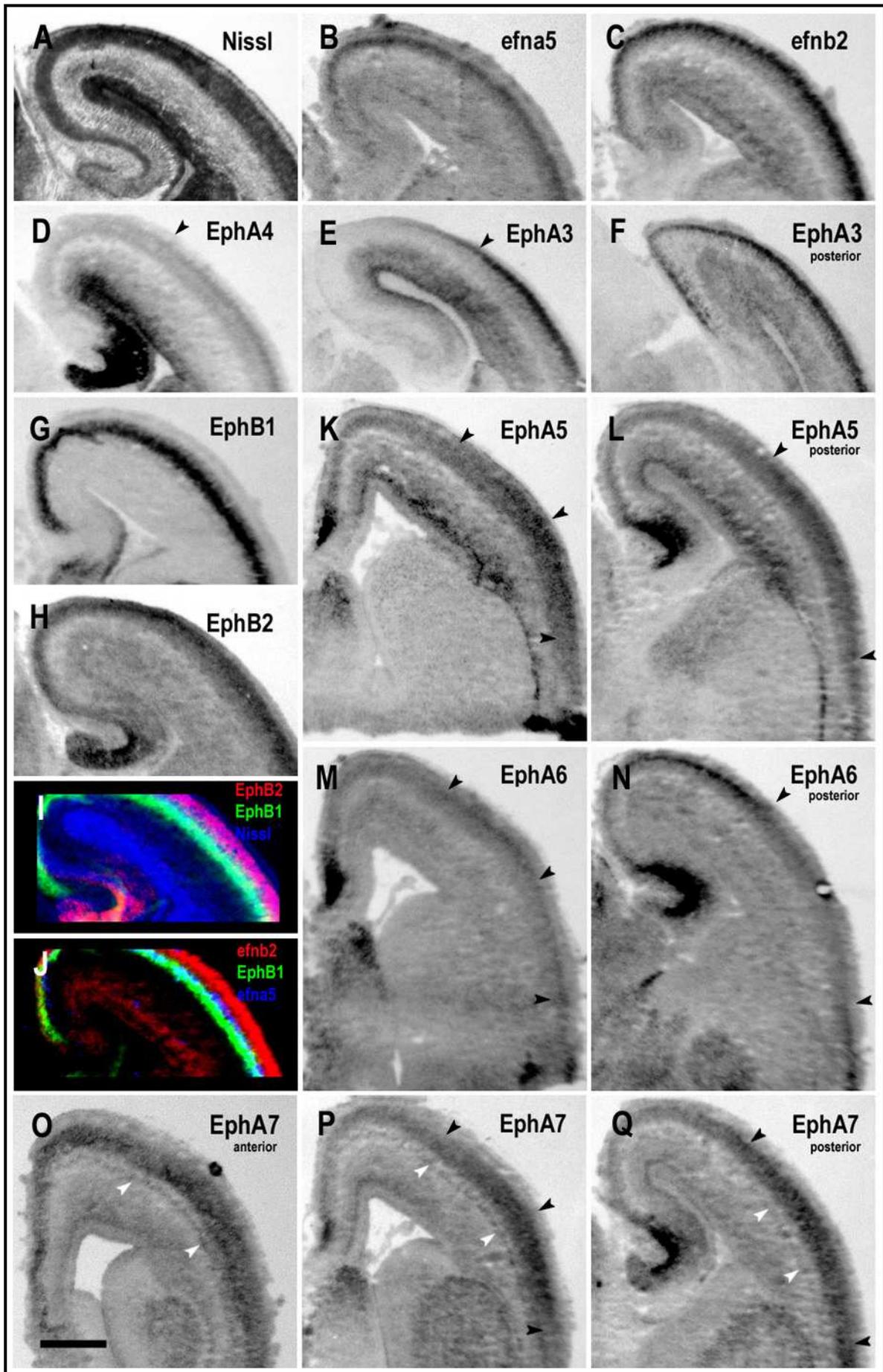
des cingulären Kortex ist dagegen ausschließlich die untere Kante der CP gefärbt. Das Signal geht in Form eines Gradienten in den Neokortex über (Abb.4-6 D).

Der Rezeptor EphA3 ist wie EphA4 in der supragranulären Schicht der CP exprimiert und auch speziell im Neokortex. In den dorsalen Regionen des cingulären Kortex wird kein Signal detektiert. Die fehlende Expression von EphA3 ist allerdings ausschließlich auf diesen limbischen Teil des Kortex beschränkt. In den dorsalen, occipitalen Regionen des Neokortex, die dem visuellen Kortex entsprechen, liefert die EphA3- Sonde über die gesamte anterior-posterio-Achse hinweg ein Signal (Abb.4-6 E und F).

Die Rezeptoren EphA5, EphA6 und EphA7 zeigen wie EphA3 und EphA4 in dorsoventraler Richtung eine arealspezifische Verteilung sowie zusätzlich in anterior-posteriorer Richtung. Hierbei werden EphA5 und EphA7 in der CP in Form eines Gradienten exprimiert. Die EphA5- Expression ist im Bereich der Pallium- Subpallium- Grenze hoch und verringert sich in dorsale sowie ventrale Richtung. Der Bereich, in dem EphA5 stark exprimiert ist, ist anterior ausgedehnter als posterior, so dass der dorsoventrale Gradient im posterioren Bereich steiler wird (Abb.4-6 K und L). EphA7 wird im Gegensatz zu EphA5 in den frontalen Bereichen im gesamten Kortex exprimiert. Dazu gehören die lateralen isokortikalen Regionen, sowie auch die mediale Allokortex. Die Markierung der EphA6-Sonde in den anterioren Bereich ist nur sehr schwach. In einem mittleren Abschnitt des Kortex beschränkt sich das Signal von EphA7 auf einen Bereich in der Nähe der Pallium- Subpallium- Grenze, ähnlich wie bei EphA5. Auch hier läuft das Signal in dorsaler und ventraler Richtung in einem Doppelgradienten aus. In den posterioren Kortexregionen ist das Signal wieder im gesamten Neokortex zu finden. Der cinguläre Kortex ist schwach markiert, bzw. der Gradient läuft hier sehr steil aus. Der Rezeptor EphA7 wird im Gegensatz zu EphA5, der weitestgehend in der gesamten radialen Ausdehnung der CP lokalisiert ist, in den unteren Schichten der CP exprimiert und zusätzlich in den Zellen der SP (Abb.4-6 O, P und Q; die weißen Pfeilspitzen zeigen die SP).

EphA6 wird in einem moderaten Level in einer mittleren Schicht der CP, in etwa wie efna5, exprimiert. In den posterioren kortikalen Bereichen kommt ein starkes Signal dorsal im cingulären Kortex, sowie ventral im Insularkortex hinzu. Diese Färbung des Gewebes bleibt bis in die occipitalsten Regionen erhalten (Abb.4-6 M und N).

Abb.4-6: *in-situ*-Hybridisierung mit den anti-sense-RNA-Sonden für efnb2, efna5, EphB1, EphB2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6 und EphA7 an koronalen Gefrierschnitten des Telencephalon bei E18. (A) Die Nissl-Färbung zeigt eine deutlich Schrumpfung der inneren, proliferativen Schichten. Die Gene EphA3 (E), EphA4(D), EphA6(M), EphB1(G), EphB2 (H), efna5 (B)und efnb2 (C) zeigen eine deutliche Schichtung der CP. Die Falschfarbendarstellungen in den Bildern I und J zeigen die komplementäre Schichtung der Gene EphB1, EphB2, efna5 und efnb2 innerhalb der CP. Die Rezeptoren EphA3 (E, F), EphA4 (D), EphA5 (K, L), EphA6 (M, N), EphA7 (O, P, Q) zeigen eine arealspezifische Expression im Ctx siehe schwarze Pfeilspitzen. Die weißen Pfeilspitzen O bis Q zeigen die SP. Medial ist links, dorsal oben. Maßstab 500 µm.



4.3 Die postnatale Entwicklung des Kortex ist von einer schicht- und arealspezifischen Expression der Gene des Ephrin-/ Eph-Systems gekennzeichnet

Nachdem schon am Embryonaltag E18 eine Mehrschichtigkeit sowie Arealpezifität der CP zu erkennen ist (siehe Abb.4-6 I und J), setzt sich die Reifung des Neokortex in den postnatalen Stadien weiter fort. Durch die spezifische Verdrahtungen der kortikalen Neuronen mit Neuronen des selben Areals in andere Schichten, mit Neuronen anderer kortikaler Areale oder subkortikalen Strukturen etablieren sich neuronale Schaltkreise und ein, auch in der Nissl-Färbung sichtbarer, sechsschichtiger Aufbau des Neokortex. Der Screen des Ephrin-/ Eph-Systems in den juvenilen Altersstadien P6 und P28 zeigt dabei areal- sowie schichtspezifische Expressionen der Gene. Die Expressionsmuster der verschiedenen Gene sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst. In dieser Arbeit wurde dabei der sechsschichtige primäre somatosensorische Kortex (S1; Isokortex; Abb.4-1 G,H) und im Vergleich die allokortikalen Areale PrL (Prelimbic cortex) und IL (Infralimbic cortex) untersucht (Abb.4-8 E,F). S1 ist auf dem Kortex lateral lokalisiert, wohingegen die Areale PrL und IL mediofrontal auf dem Kortex liegen. Entsprechend gibt es in der Verdrahtung mit dem Thalamus deutliche Unterschiede. S1 ist hauptsächlich mit dem ventrobasalen Kernkomplex VB und dem posterioren Kern (Po) verknüpft und PrL und IL (Zusammengefasst als PFC, *prefrontal cortex*) zeigt Verknüpfungen mit den medialen Kerne wie MD, PT, PV, CM und RE (McKenna and Vertes, 2004; Vertes, 2004). Für die verschiedenen Regionen konnten im Bezug auf die schichtspezifischen Expressionen der Gene Unterschiede festgestellt werden. In der Schicht 1 wurden nie eine Expression der hier analysierten Gene gefunden.

4.3.1 Das Ephrin- /Eph-System zeigt bereits in der frühen postnatalen Entwicklung des Kortex in den analysierten Arealen schichtspezifische Expression der Gene

Nachdem nun alle Zellen des Kortex geboren und zu ihrem Bestimmungsort migriert sind, kommt es zur massiven Invasion der thalamokortikalen Axone in den Kortex und zur Verdrahtung mit den kortikalen Neuronen. Der S1-Kortex zeigt eine markante Inputstruktur in Schicht 4, das sogenannten „Barrelfield“. Hier terminieren die aus dem VB-Komplex stammenden Afferenzen. Das Barrelfield repräsentiert das Vibrissenfeld aus der Schnauzenregion der Maus, welches über die Trigeminalkerne des Hirnstammes und den VB-Kern des Thalamus in den Kortex projiziert wird. Die Differenzierung des Barrelfields ereignet sich postnatal bis P8.

Sechs Tage nach der Geburt (P6) werden im Gehirn der Maus noch 14 Gene des efn- /Eph-Systems exprimiert. Das heißt im Vergleich zu den embryonalen Stadien sind nun die Transkripte von lediglich zwei Genen durch eine *in-situ*-Hybridisierung nicht mehr detektierbar. Der Rezeptor EphA3 und der Ligand efnb1 werden ausschließlich embryonal exprimiert. Die restlichen Gene zeigen eine schicht- und arealspezifische Expression im Kortex. Besonders dramatisch ist die Spezifität des Rezeptors EphA8. Im S1 Kortex markiert die Sonde von EphA8 ausschließlich die Schicht 4 (Abb.4-7 C). So ist es also nicht verwunderlich, dass EphA8 im PFC, in dem die Schicht 4 nicht existiert auch nicht exprimiert wird.

Tabelle 4-3: Expressionen der verschiedenen Gene Ephrin-/ Eph-Systems im postnatalen Kortex. Die drei Graustufen entsprechen dem in dieser Schicht vorherrschendem Expressionslevel. □ schwach, ▒ mittel, ■ stark, □ nicht exprimiert, das „G“ deutet einen Gradienten an, Z vereinzelt Zellen, ? unsichere Expression

Gene	P28												P6																	
	S1					PrL				IL			S1						PrL			IL								
	VI	V	IV	III/III	I	VI	V	III/III	I	VI	V	III/III	I	ISP	VI	V	IV	III/III	I	mSP	VI	V	III/III	I	VI	V	III/III	I		
efna1																														
efna2																														
efna3																														
efna4																														
efna5																	Z													
efnb1																														
efnb2																														
efnb3																														
EphA1																														
EphA2																														
EphA3																														
EphA4																														
EphA5																														
EphA6																														
EphA7																														
EphA8																														
EphB1																														
EphB2																														
EphB3																														
EphB4																														
EphB6																														

Die Rezeptoren EphA5 und EphA6 sind an P6 im S1-Kortex und in den Regionen des PFC exprimiert (Abb.4-7 B,F und Abb.4-8 K,O). Die Sonden markieren Neurone aus der Schicht 2/3 sowie der Schicht 5 im Barreldfeld und lassen die Schicht 4 frei. Auch im PrL und IL zeigen sie die gleiche Expression, wobei im Fall von EphA5 der Markierungsgrad der Schicht 2/3 von dorsal nach ventral abnimmt. Somit ist die

Expression von EphA5 im PrL stärker als im IL. Im Gegensatz zu EphA5 und EphA6 zeigt der Rezeptor EphB1 (Abb.4-7 D) in Schicht 2/3 keine Expression, sondern in Schicht 4, 5 und 6. Auch im mPFC ist keine Expression in Schicht 2/3, dafür aber deutlich in Schicht 5 und 6 (Abb.4-7 G). Der Ligand *efna2* ist schwach exprimiert, zeigt dabei aber ebenfalls regionale Unterschiede. Im S1-Kortex ist der Ligand in der Schicht 4 lokalisiert und im PFC in der Schicht 2/3. Verallgemeinert könnte man sagen, dass *efna2* somit im Kortex in den supragranulären Schichten exprimiert wird. *EfnA5* ist ebenfalls arealspezifisch auf dem Kortex verteilt. Der Ligand ist im PFC nicht zu detektieren und ist im S1-Kortex in den Schichten 4 und 6 sowie in einzelnen Neuronen der Schicht 5 exprimiert. Eine ebenfalls sehr areal- und schichtspezifische Expression zeigt der Ligand *efnb3*. Er ist an P6 wie auch an P28 ein Marker für den PFC wo er in allen Schichten exprimiert ist. Im S1-Kortex ist die Expression dagegen eher schwach und diffus (Abb.4-8 Q,R,U und V).

Festzuhalten ist: An P6 existieren ausgeprägt regionale Unterschiede in den Expressionen der Gene des Ephrin-/ Eph-Systems. Es gibt Marker für den PFC wie *efnb3*, Marker für den Neokortex wie EphA8, der die stärkste Expression in S1 hat. EphA8 ist dabei auf die Schicht 4 beschränkt (Abb.4-7 C). Außerdem zeigen *efna5* (4 und 6; Abb.4-7 A) und EphA6 (2/3 und 5; Abb.4-8 K) im S1-Kortex Expressionen in Schichten, die jeweils untereinander Verknüpfungen ausbilden. Des weiteren werden die Gene EphA5, EphA8, EphB1 und *efna2* bis zum juvenilen Stadium P28 abgeschaltet, oder zumindest soweit herunterreguliert, das sie mit den entsprechenden *antisense*-Sonden nicht mehr detektiert werden können (siehe Tabelle 4-2).

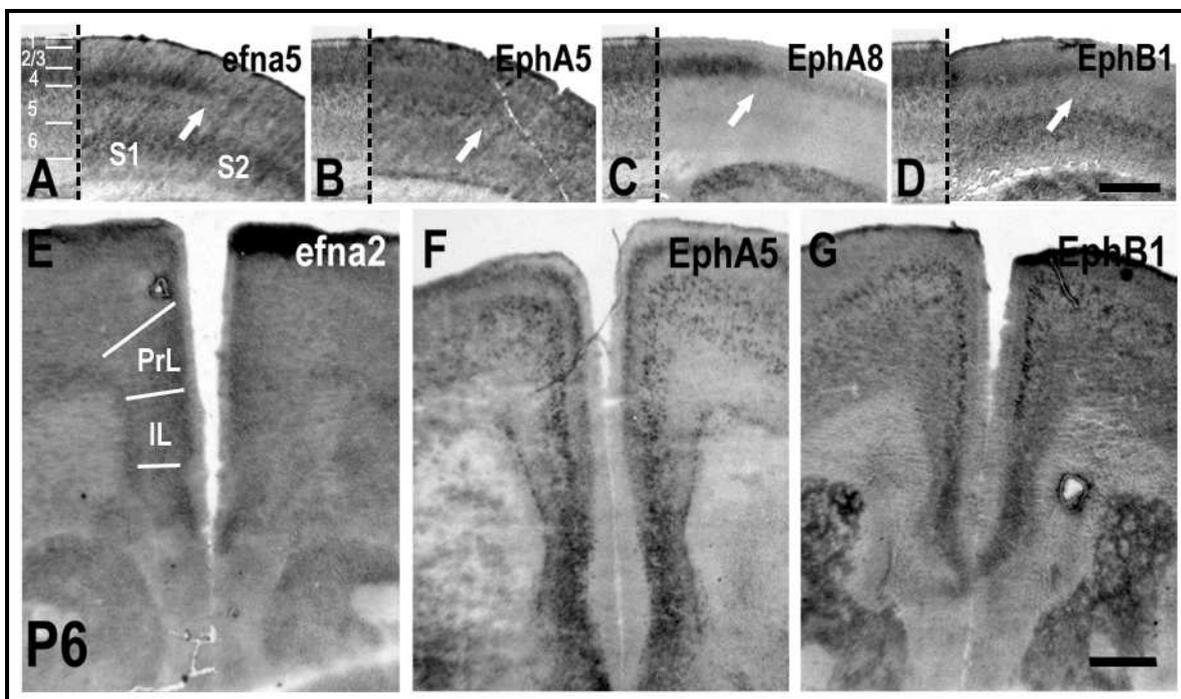


Abb.4-7: *In-situ*-Hybridisierung mit den *antisense*-RNA-Sonden für *efna2*, *efna5*, EphB1 an koronalen Gefrierschnitten des Maushirns bei P6. Die Bilder A-D zeigen den S1-Kortex, links der gestrichelten Linie ist die Schichtung des Kortex durch eine Nissl-Färbung gezeigt. Der weiße Pfeil beschreibt die Arealgrenze zu S2. Die Bilder E-G zeigen den PFC in Bild E ist die Grenzen der Areale PrL und IL eingezeichnet. In A-D ist medial links und dorsal oben. E-G zeigen den medialen Bereich des anterioren Kortex. Dorsal ist oben. Maßstab 500µm.

4.3.2 Die schicht- und arealspezifischen Expressionen mancher Gene des Ephrin-/Eph-Systems setzen sich bis in die juvenilen Stadien fort

Für Entwicklungsgene, zu denen die Gene des ephrin-/Eph-Systems gehören, ist zu erwarten, dass sie im Laufe der Entwicklung wieder abgeschaltet werden. Zu einem großen Teil ist dies auch der Fall. Nur noch 8 der 21 Gene könne an P28 mit den Ribo-Sonden noch detektiert werden. Aber es ist auch zu beobachten, dass die Expression einiger Gene erhalten bleibt und in einem Fall ist sogar noch eine entscheidende Musteränderung festzustellen.

Die Rezeptoren EphA4 (Abb. 4-8 C,D,G und H) und EphA6 (Abb.4-8 K,L,O und P) bleiben in ihrem Expressionsmuster in den Stadien P6 und P28 nahezu unverändert. Sie sind im S1-Kortex in den Schichten 2/3, 4 und 5 (EphA4) und 2/3 und 5 (EphA6) exprimiert (Abb.4-8 C,D und K,L). Im PFC werden beide Gene hauptsächlich in den oberen Schichten exprimiert (Abb.4-8 G,H und O,P). Sie zeigen hier eine gradierte Expression, wobei EphA4 dorsal stärker als ventral ist. Für EphA6 ist der Gradient entgegengesetzt. So zeigt PrL ein hohes Level an EphA4-Transkripten und ein niedriges Level an EphA6, wohin gegen IL ein hohes Level an EphA6 und ein niedrigeres Level an EphA4 hat. Die Expression von EphA6 in Schicht 5 geht bei P28 im PFC etwas zurück (Abb.4-8 P).

Die Stärke der Expression des Liganden efnb2 geht zu Gunsten einer breiteren Verteilung etwas zurück. Ist efnb2 am Tag P6 in der Schicht 2/3 im S1- Kortex, sowie im PFC stark exprimiert, ist es bei P28 nur noch schwach, dafür aber in allen Schichten des S1-Kortex, sowie den Schicht 2/3 und 5 im PFC (Abb.4-8 I,J,M und N).

Die Gene efnb3 (Abb.4-8 Q,R,U und V) und EphB6 (Abb.4-8 S,T,W und X) bleiben ebenfalls bis in die späten juvenilen Phasen aktiv, ändern aber dramatisch das Expressionsmuster. Die Sonde von EphB6 detektiert Transkripte bei P6 in allen Schichten des S1-Kortex und des PFC, am stärksten in den Schichten 2/3 und 4. Am Tag P28 ist die Expression von EphB6 im S1 Kortex in den unteren Schichten, vor allem in Schicht 6 wesentlich höher (Abb.4-8 T). Dies gilt auch für den PFC (Abb.4-8 X). Allerdings gibt es einen Unterschied zwischen PrL und IL. Die Expression von EphB6 ist sowohl an P6 als auch an P28 in den Schichten 2/3 und 5 des PrL stärker als in IL (Abb.4-8 W und X). Für das Gen efnb3 wird bei P6 und P28, wie auch in den embryonalen Stadien medial eine deutlich höhere Expression als lateral registriert. So ist die Expression im PFC deutlich stärker als in S1. Im S1 Kortex ist die Expression zwar schwach aber dennoch in allen Schichten, bis auf Schicht 4, vorhanden. An P28 findet man durch die efnb3-Sonde markierte Zellen, die wie Pfeffer und Salz im gesamten Kortex verteilt sind. Besonders viele und wesentlich dichter angeordnete Zellen findet man in der weißen Substanz und anderen Faserstrukturen (Abb.4-8 Fenster in R). Dies ist also ein bei P28 neu auftretendes Signal der efnb3-Sonde, oder es war unter dem anderen Signal versteckt. Die Expression von efnb3 ist im lateralen Neokortex am Tag P28 nicht mehr schichtspezifisch (Abb.4-8 R).

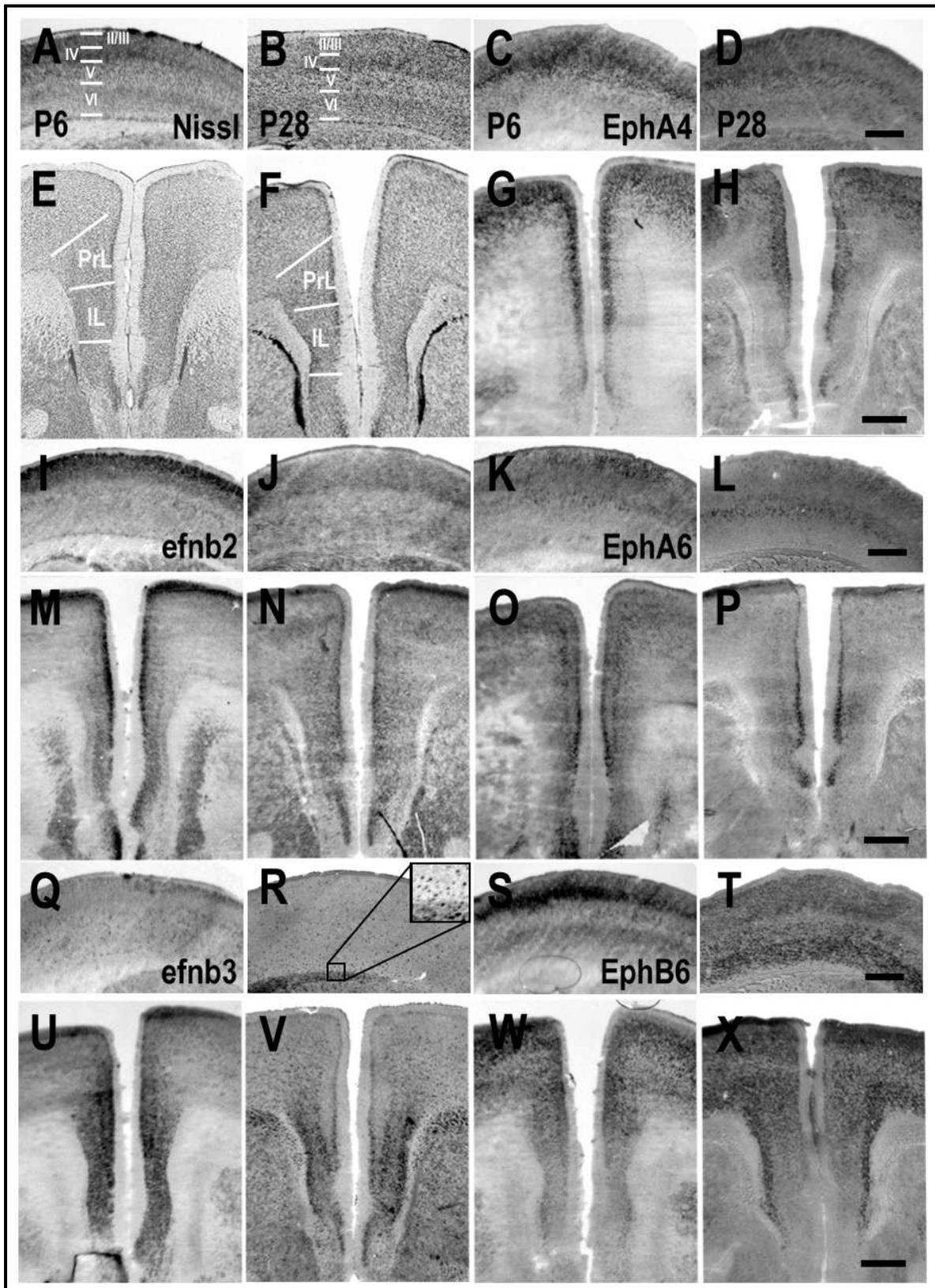


Abb.4-8: *In-situ*-Hybridisierung mit den *antisense*-RNA-Sonden für *efnb2* (I,J,M,N), *efnb3* (Q,R,U,V), EphA4 (C,D,G,H) EphA6 (K,L,O,P), und EphB6 (S,T,W,V) an koronalen Gefrierschnitten des Maushirns bei P6 und P28 (das Alter bezieht sich jeweils auf die gesamte Kolumne). Die Abbildungen zeigen den S1-Kortex (A-D, I-L, Q-T; dorsal ist links, lateral oben) und den PFC (E-H, M-P, U-X; dorsal ist oben). In den Nissl-Färbungen (A,B,E,F) sind die Schichtungen des Kortex eingezeichnet (A und B) und die Areale des PrL und IL des PFC (E und F). Maßstab 500 μ m (gilt für jeweilige Reihe).

4.4 Der embryonale Thalamus

Der anatomische Aufbau des dorsalen Thalamus in eine Vielzahl von distinkten Kerngebieten, ist eng mit den Assoziationen des Thalamus zu den verschiedenen Arealen des Kortex verbunden. So werden z.B. die Projektionen verschiedener Sinnessysteme über festgelegte Kerne des Thalamus getrennt in die verschiedenen sensorischen Kortices übertragen. Die einzelnen thalamischen Kerne sind somit Bestandteile von Verarbeitungseinheiten, die sich über ihre Projektionen zur Großhirnrinde definieren. An der Etablierung dieser Projektionen sind vermutlich eine Vielzahl verschiedener Signalmoleküle beteiligt, wobei das ephrin-/Eph-System eine Rolle spielt.

4.4.1 Der embryonale Thalamus ist Nissl-anatomisch eine undifferenzierte „pronukleäre Zellmasse“

In den jungen postnatalen Stadien sind die ausdifferenzierten Kerngebiete schon gut zu erkennen. So lässt sich, wie in Abb.4-9 D zu sehen, ein koronal geschnittener Thalamus mit Hilfe entsprechender Atlanten (Paxinos and Franklin, 2001) und einer geeigneten Färbemethode, wie z.B. der Nissl-Färbung gut kartieren. In den frühen embryonalen Stadien (Abb.4-9 A-C) ist dies nicht der Fall. Hier findet man mit Nissl-Färbungen nur eine mehr oder weniger homogene „pronukleäre Zellmasse“ vor, welche allerdings schon am Tag E16 (Abb.4-9: B) den Großteil der thalamischen Neurone für die zukünftigen Kerngebiete enthält (Altman and Bayer, 1979, , 1988c, 1988a, 1988b, , 1989a, 1989c, 1989b). Die Neurogenese beginnt bereits am Embryonaltag E11 im dorsalen Neuroepithel des dritten Ventrikels mit den Zellen für das mediale Geniculatum und dem Retikularkern. Die letzten Zellen des Paratenialkern und des Paraventrikularkerns werden an E16 geboren. Der posteriore Thalamus wird also früher entwickelt als der anteriore, genau wie die dorsalen Kerne gegenüber den ventralen. Insofern findet man im sich entwickelnden Thalamus, wie im embryonalen Kortex einen neurogenetischen Entwicklungsgradienten. Die postmitotischen Zellen migrieren dann innerhalb von drei Tagen radial nach außen in die Mantelzone und siedeln sich an ihrer finalen Position an. Somit befinden sich die meisten Neurone des Thalamus am Tag E18 (Abb.4-9 C) am finalen Ort ihres zukünftigen Kerngebietes. Die weitere Differenzierung der Kerne geht einher mit der internen Verdrahtung des Thalamus und der Verdrahtung mit dem Kortex, wobei durch die Ausbildung des Neuropils die thalamischen Kerne sichtbar werden.

Am Tag E14 haben bereits thalamokortikale Axone (TCA) die interne Kapsel (IC) im ventralen Telencephalon (vTC) erreicht (Molnar et al., 1998a; Auladell et al., 2000). Auch dort befindliche „guidepost cells“ projizieren in den undifferenzierten Thalamus (Metin and Godement, 1996; Deng and Elberger, 2003). Für die ein- und auslaufenden Axone sind entsprechende

kernspezifische Lenkungssignale für die Wegfindung zu erwarten und sollten deswegen schon in der morphologisch undifferenzierten „pronukleären Zellmasse“ exprimiert sein.

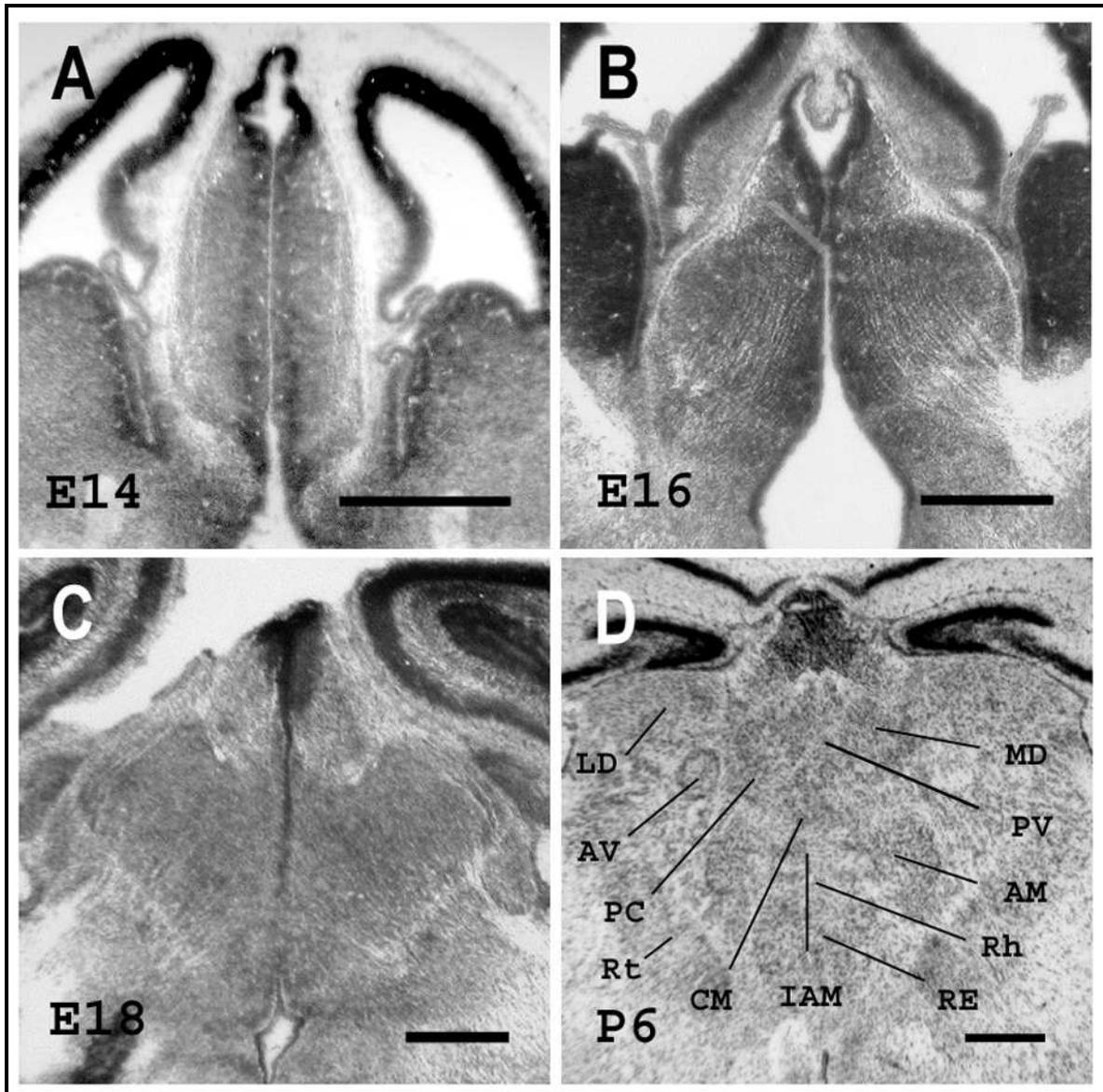


Abb.4-9: Nissl-Färbungen des dorsalen Thalamus an Koronalschnitten des Gehirns der Maus in den Altersstadien E14 (A), E16 (B), E18 (C) und P6; D zeigt die differenzierten Kerngebiete des Thalamus; dorsal ist oben; Maßstab 500 µm. Für die Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.

4.4.2 Marker-Gene bilden einen kernspezifischen „molekularen Code“ im differenzierten postnatalen Thalamus

Der Geburtsort im Neuroepithel (epithelialer Patch) beherbergt die Vorläuferzellen für einzelne zukünftige thalamische Kerne (Altman and Bayer, 1988c). Gene, die früh in den Abkömmlingen dieser Zellen exprimiert werden und diese Expression bis in die späten Stadien des ausdifferenzierten Thalamus beibehalten, können als kernspezifische molekulare Marker und somit zur Parzellierung des anatomisch undifferenzierten Thalamus dienen (Nakagawa and O'Leary, 2001; Jones and Rubenstein, 2004). Insbesondere Kombinationen

aus verschiedenen solcher Markergene können die zukünftigen Kerne des reifen Thalamus schon in den embryonalen Stadien ausweisen und die pronukleäre Zellmasse kartieren.

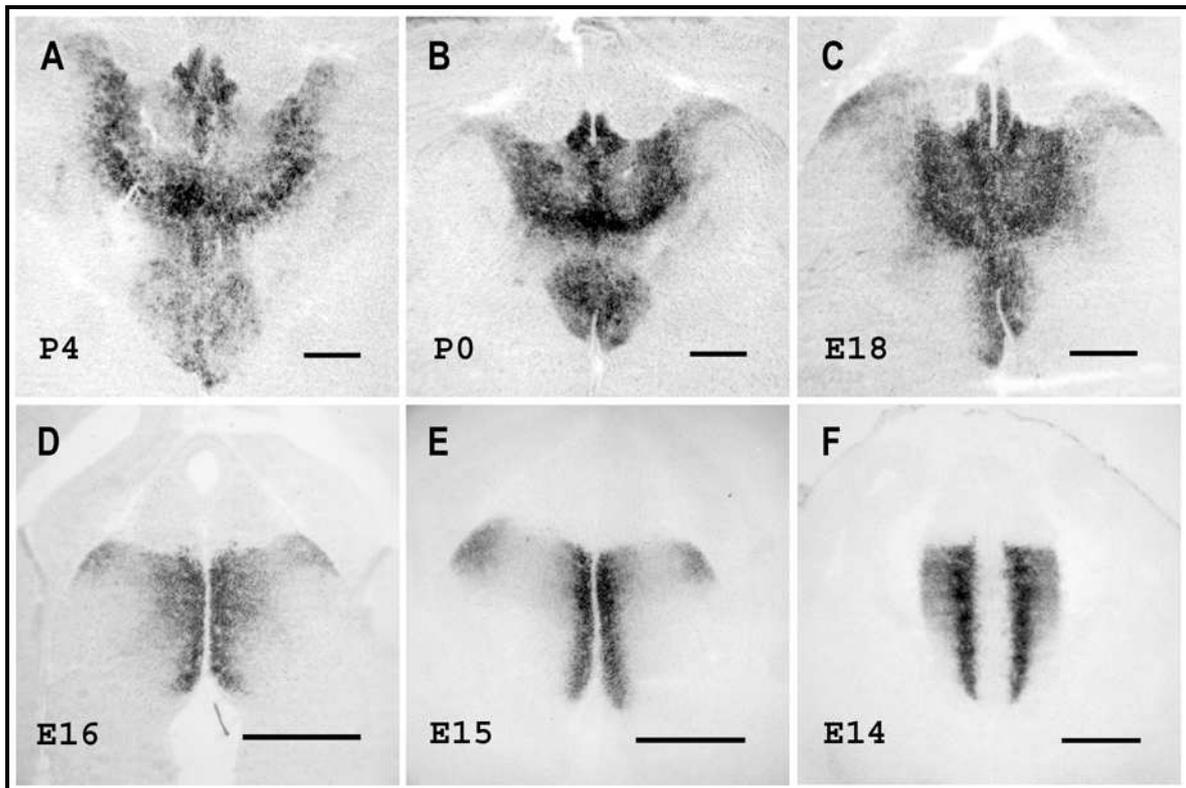


Abb.4-10: *In-situ*-Hybridisierungen an Koronalschnitten des Gehirns der Maus mit der *antisense*-Sonde für Gbx2; Gezeigt ist der dorsale Thalamus in den Stadien P4 (A), P0 (B), E18 (C), E16 (D), E15 (E) und E14 (F). Dorsal ist oben. Maßstab 500 µm.

Zu diesem Zweck wurden *antisense*-Sonden der Gene Gbx2, Ngn2, Lhx2, Cadherin 6 und 8 hergestellt und die Expression im dorsalen Thalamus analysiert. Als erstes wurden die Expressionsmuster in verschiedenen Entwicklungsstufen betrachtet. In Abb.4-10 ist die Expression von Gbx2 in den Altersstadien P4 (A), P0 (B), E18 (C), E16 (D), E15 (E) und E14 (F) gezeigt. Hier wird deutlich, dass das Färbemuster der Sonde von P4 bis einschließlich E16 konsistent ist und somit große Veränderungen in der Expression des Gens auszuschließen sind. Die Stadien E15 und auch E14 zeigen schon die Tendenz und lassen das finale Muster erahnen. Allerdings sind bis E18 in den dorsolateralen Bereichen des Thalamus flügelartige Färbungen zu sehen (Abb.4-10 C), die bei P0 (Abb.4-10 B) noch schwach und an P4 (Abb.4-10 A) nicht mehr zu finden sind, was darauf hinweist, dass die Expression von Gbx2 nicht in allen Kernen konstant ist. Auch ist die thalamische Neurogenese noch nicht abgeschlossen, so dass noch weitere Zellen hinzukommen und die migratorischen Prozesse dieser Zellen das Expressionsmuster verändern. Die Neuronen der verschiedenen Kerne sind somit noch miteinander vermischt. Eine absolute Unterscheidung der verschiedenen thalamischen Kerne ist demzufolge noch nicht möglich.

Die Expressionsmuster der ausgewählten Gene wurden für die postnatalen Stadien mit Hilfe der Nissl-Färbung (vergleiche Abb.4-9 D) auf die Kernspezifität hin ausgewertet und die Daten in Tabelle 4-4

aufgelistet. Für die verschiedenen Kerne des Thalamus existiert somit ein Code aus unterschiedlichen Marker-Genen, der sich auf die embryonalen Stadien übertragen lassen sollte.

Tabelle 4-4: Expression von Markergenen in den verschiedenen thalamischen Kernen im differenzierten postnatalen Thalamus. Die Expression der Gene ist hier in zwei Abstufungen dargestellt. □ schwach ■ mittel □ nicht exprimiert, * bedeutet eine sehr schwache Färbung, die nicht zweifelsfrei bestätigt werden kann. G indiziert einen Gradienten

	AD	AV	AM	LD	IAD	IAM	PV	PT	MDm	MDC	MDI	CM	CL	PC	Re	vRe	Rh	VA	VL	VM	VB	PF	LP	Po	dLG	vLG	Rt
Gbx2	*	*				■	■		■		■	■	■	■	■				*			■					
Lhx2					■	■	■					■	■	■	■							■	*				*
Ngn2	■		*	*		*	*			*		*	*	*	*		*				G						*
Cad6	■	■	■															*	*		■		*				
Cad8			■	■								G			■						G	■	■	■			■

4.4.3 Die Kartierbarkeit des embryonalen Thalamus mit Hilfe der Expressionsmuster der Markergene Gbx2, Lhx2, Ngn2 und Cad6

In allen Fällen wurden zuerst die Expressionsmuster in verschiedenen postnatalen Stadien (P0 bis P6) untersucht, wobei sie durch den Vergleich mit den entsprechenden Nissl-gefärbten Schnitten den Kernen des Thalamus eindeutig zugeordnet werden konnten. Dabei fiel auf, dass Kerne oder Kernkomplexe, die aus mehreren Unterkernen bestehen, nicht homogen gefärbt sein müssen. So ist der Mediodorsalkern, der aus einem lateralen, zentralen und medialen Teil besteht, durch die Gbx2-Sonde heterogen markiert (siehe Tabelle 4-4). Die Analyse der Expressionsmuster über die Zeit hinweg zeigt, dass die Muster zumindest für die Gene Gbx2 und Lhx2 relativ konsistent sind, und somit die Expression dieser Gene wenig variabel ist. Änderungen der Expression treten hauptsächlich in der Expressionsstärke einzelner Gen auf. Dies ist vor allem bei Cad8 der Fall. Es wird postnatal in VB schwach exprimiert (Daten nicht gezeigt). Bei E16 würden man nun für VB nach einer schwachen Färbung für Cad8 suchen. Tatsächlich wird aber embryonal Cad8 stark in VB exprimiert. Für andere Kerne konnten ähnliche Veränderung des Expressionsmuster von Cad8 nicht ausgeschlossen werden. Für die Kartierung des Thalamus muss darauf geachtet werden.

Auch Ngn2 zeigt signifikante Veränderungen in der Stärke der Expression. In Abb.4-11 A-D ist die Ngn2-Expression in den Altersstadien E14 (A), E15 (B) und E16 (D) dargestellt. Die Pfeilspitzen deuten auf die Expressionsgrenze und zeigen bei E16 posterior eine schwach auslaufende Grenze (C), wohingegen die Grenze bei E14(A) weiter hinten liegt und scharf ist. Im Gegensatz dazu sind die Expressionsmuster von Gbx2 (D-F) und Lhx2 (G-I) qualitativ konstant. Der Transkriptionsfaktor Ngn2 hat sich deshalb im Gegensatz zu Gbx2 und Lhx2 als nur teilweise brauchbar erwiesen.

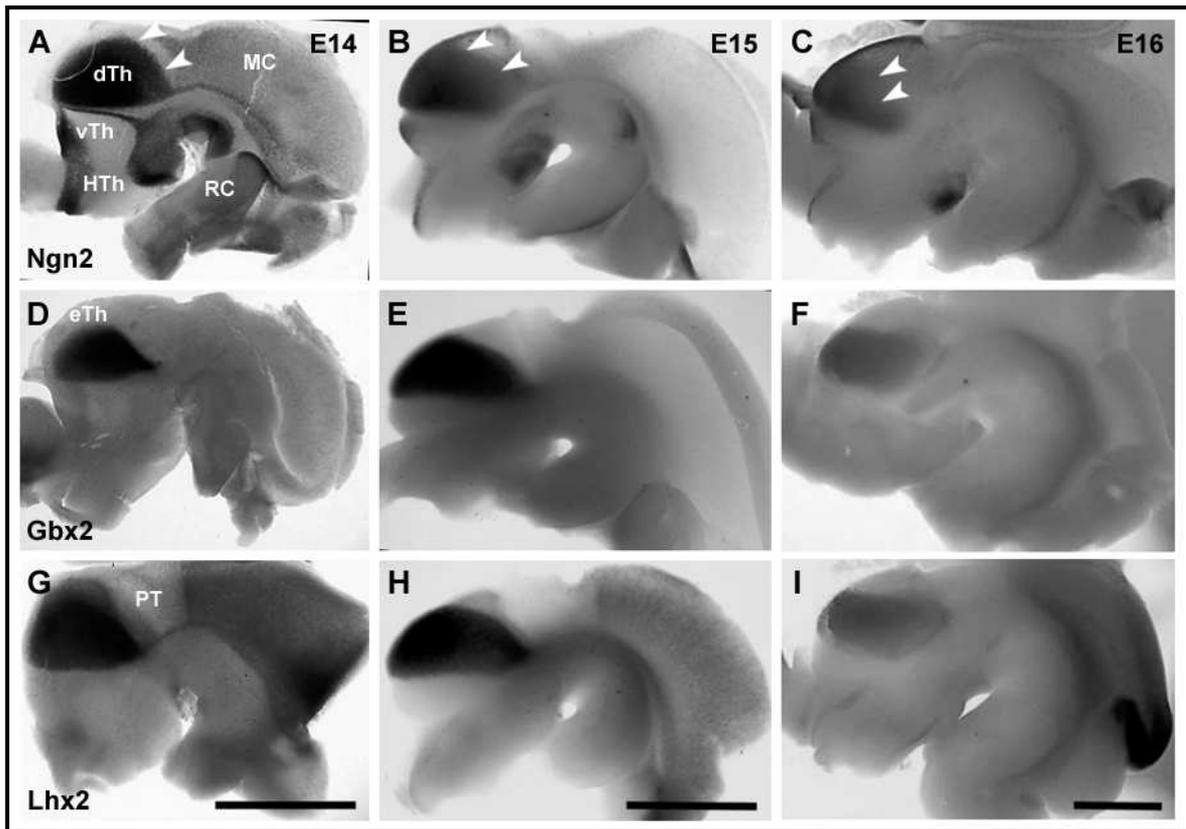


Abb.4-11: Whole mount *in-situ*-Hybridisierung vom Hirnstamm mit Sonden für Ngn2 (A-C), Gbx2 (D-F) und Lhx2 (G-I) in den Altersstadien E14 (A,D,G), E15 (B,E,H) und E16 (C,F,I). Die weißen Pfeilspitzen zeigen die Expressionsgrenze von Ngn2 im dTh. dTh dorsaler Thalamus, eTh Epithalamus, vTh ventraler Thalamus, HTh Hypothalamus, PT Prätectum, MC Mesencephalaon, RC Rhombencephalon; Aufsicht ist von medial, anterior ist links und dorsal ist oben. Der Maßstab beträgt 1mm. Die Whole mount *In-situ*-Hybridisierungen wurden freundlicherweise von Liane Dahm zur Verfügung gestellt.

Letztendlich wurden für die Kartierung des embryonalen Thalamus die Expressionen der Gene Gbx2, Lhx2, Ngn2 und Cad6 einbezogen. Die Kartierung erfolgte über den postnatalen Expressionscode (siehe Tabelle 4-4) der verschiedenen thalamischen Kernen dieser Gene. Dabei wurden nach gründlicher Analyse auch die sehr schwachen Färbemuster von Ngn2 genutzt. Ein weiteres Hilfsmittel war die relative Lage der einzelnen Kerne im differenzierten Thalamus, was die finale Karte für den Embryonaltag 16 (siehe 4.4.7) dann plausibel erscheinen lies. Für den Embryonaltag 14 war eine Kernzuordnung nicht möglich.

4.4.4 Die Expression der Markergene enthält am Tag E14 ein genspezifisches Streifenmuster

Am Embryonaltag 14 erzeugen die *antisense*-Sonden der Transkriptionsfaktoren ein streifenartiges Färbemuster. Die Abb.4-12 zeigt die Expressionsmuster von Gbx2 (A-C), Lhx2 (D-F) und Ngn2 (G-H) des Thalamus in drei Ebenen von anterior nach posterior. Dabei ist der Bereich des Neuroepithels durch die Sonden Gbx2 und Lhx2 ungefärbt, wohingegen Ngn2 ein starkes Signal erzeugt (Abb.4-12, siehe Raute). Die nach lateral folgende Zone exprimiert im anterioren Bereich alle drei Transkriptionsfaktoren (Abb.4-12 A,D,G,

siehe Sternchen). Im mittleren und posterioren Teilen des Thalamus exprimiert die mit einem Sternchen ausgezeichnete Zone nur Gbx2 und Lhx2. Das Expressionsmuster von Ngn2 hat an dieser Stelle eine Lücke.

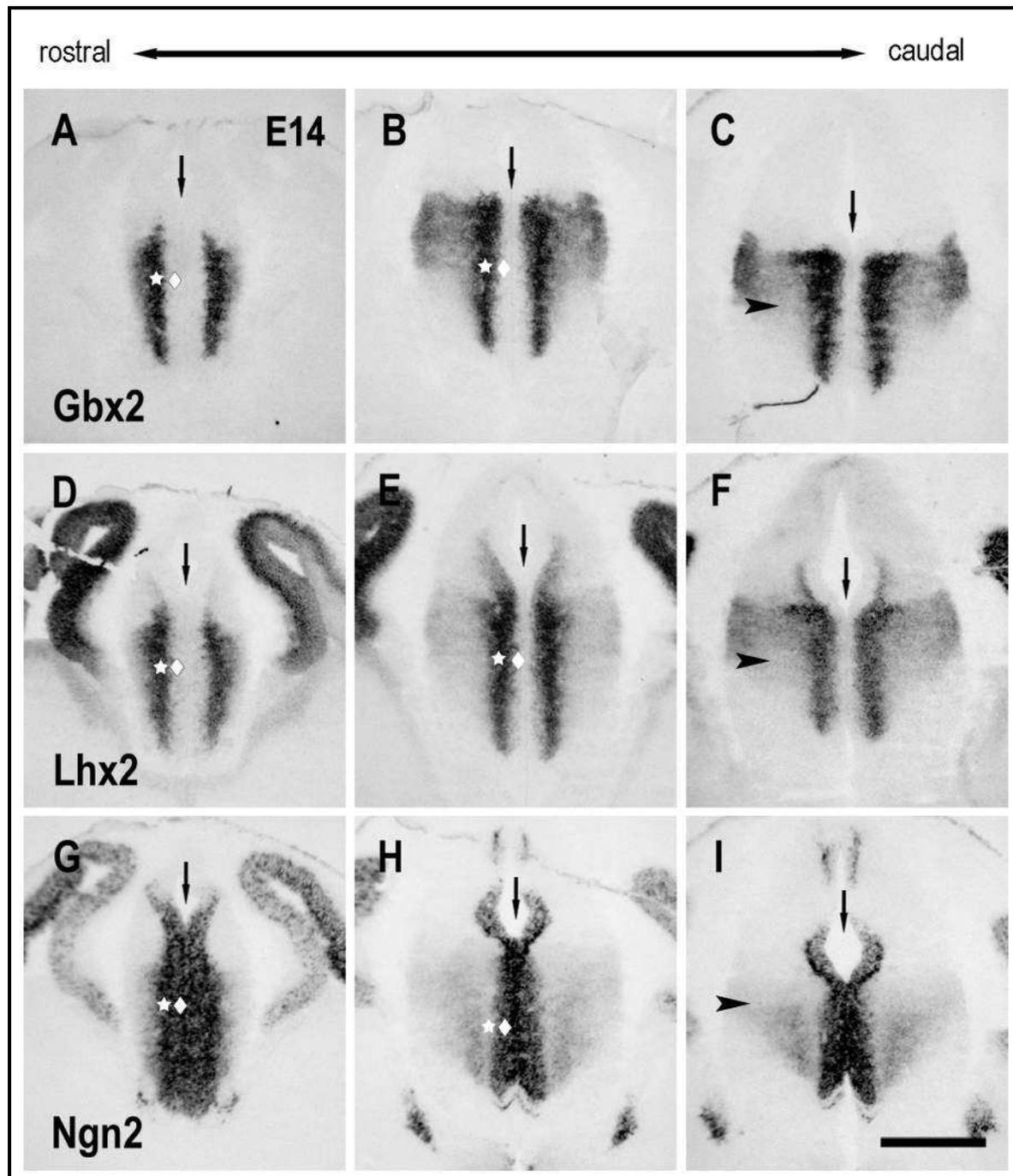


Abb.4-12: *In-situ*-Hybridisierungen an Koronalschnitten des Gehirns der Maus mit den *antisense*-Sonden für Gbx2 (A,B,C); Lhx2 (D,E,F) und Ngn2 (G,H,I). Gezeigt ist der dorsale Thalamus am Embryonaltag 14. Die Pfeile geben die Mittellinie an (Ventrikel). Die Expressionsmuster sind streifenartig, die Rauten und Sternchen zeigen die Streifen. Die Pfeilspitze zeigt die horizontale Expressionsgrenze der drei Transkriptionsfaktoren. Dorsal ist oben. Maßstab 500 μ m.

In einer breiten Zone, die sich nach außen anschließt, sind die drei Gene sehr inhomogen exprimiert. Gbx2 und Lhx2 sind in der dorsalen Region lokalisiert. Sie unterscheiden sich beide allerdings in der Intensität. So ist Gbx2 in den ganz lateralen Bereichen stärker exprimiert als Lhx2. Die Ngn2-Sonde färbt im Gegensatz zu den anderen den ventralen Bereich des dTH (Abb.4-12 C,F,I, siehe Pfeilspitze). Somit existiert in der äußeren

Zone eine dorsoventrale Untergliederung. Durch die Überlagerungen der Expressionsmuster der Gene *Gbx2*, *Lhx2* und *Ngn2* (Abb.4-13 A-C) ist eine genauere Analyse der Muster möglich. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich die Streifen in subtilerer Weise darstellen und in weitere feinuntergliederte Streifen aufteilen. Von medial nach lateral zeigen sich sehr schmale Streifen in den Farben blau, türkis, weiß, gelb und rot. Anschließend folgt die breite äußere Zone, die sich ebenfalls in verschiedene Farbfelder untergliedert.

In Abb.4-13 sind in den Bildern A' bis C' die Intensitätsverläufe der Färbemuster der drei *antisense*-Sonden (*Gbx2* in rot, *Lhx2* in grün und *Ngn2* in blau) in horizontaler Ausrichtung gezeigt. Die Graphen zeigen die Intensitätsverläufe in den Positionen 1 (dorsal) und 2 (ventral) in den jeweiligen Schnittebenen von anterior nach posterior. In A'1 und 2 liegen die Maxima von *Gbx2* und *Lhx2* übereinander (Abb.4-13, große Pfeile) und schneiden sich mit den Graphen von *Ngn2*. Dieser Graph hat mehrere Peaks. Einerseits direkt links und rechts neben der Mittellinie (Abb.4-13 gestrichelte Linie) und andererseits medial neben den Maxima von *Gbx2* und *Lhx2* (Abb.4-13 kleine Pfeile). Vergleicht man die Graphen in anterior-posteriorer Richtung, verschieben sich die Maxima von *Gbx2* und *Lhx2* auf die Mittellinie zu, und zwar in dem Maße, wie die Ausbreitung von *Ngn2* um die Mittellinie abnimmt (In Abb.4-13 B' und C' sind die Pfeile aus A' übertragen, um die Schrumpfung der inneren Zone zu zeigen). Demzufolge schrumpft die innere Zone sukzessive (vergleiche auch E16 Abb.4-14). Dies passiert in den dorsalen Bereichen stärker als in den ventralen (vergleiche Abb.4-13 B',C'1 und 2). Auch ist zu beobachten, dass die Maxima von *Gbx2* und *Lhx2* an Breite in den dorsalen Bereichen zunehmen (vergleiche Abb.4-13 B'1 und 2).

Durch die Überlagerungen der Expressionsmuster der Gene *Gbx2*, *Lhx2* und *Ngn2* lässt sich der unreife Thalamus am Embryonaltag 14 in drei vertikal orientierte Zonen untergliedern. Die Bilder A'' und B'' der Abb.4-13 zeigen die, aus den Färbemuster resultierenden Skizzen der jeweiligen Schnittebenen. Im Bild D der Abb.4-13 ist eine idealisierte Zeichnung des embryonalen Thalamus am Tag 14 mit den verschiedenen Zonen gezeigt. Es existiert eine, dem Ventrikel anliegende VZ, ein von anterior nach posterior schrumpfende SVZ, eine Übergangszone, welche die Maxima der Gene *Gbx2* und *Lhx2* enthält, und eine äußere Mantelzone (MZ). Die MZ in horizontaler Orientierung in mindestens zwei Felder unterteilt (Abb.4-12 C,F und I; Pfeilspitzen). Hier liegen vermutlich die differenzierenden Felder der zukünftigen thalamischen Kerne. Durch die Vermischung der Zellen die noch migrieren und für verschiedene Kerne bestimmt sind, ist eine genauere Untergliederung nicht möglich.

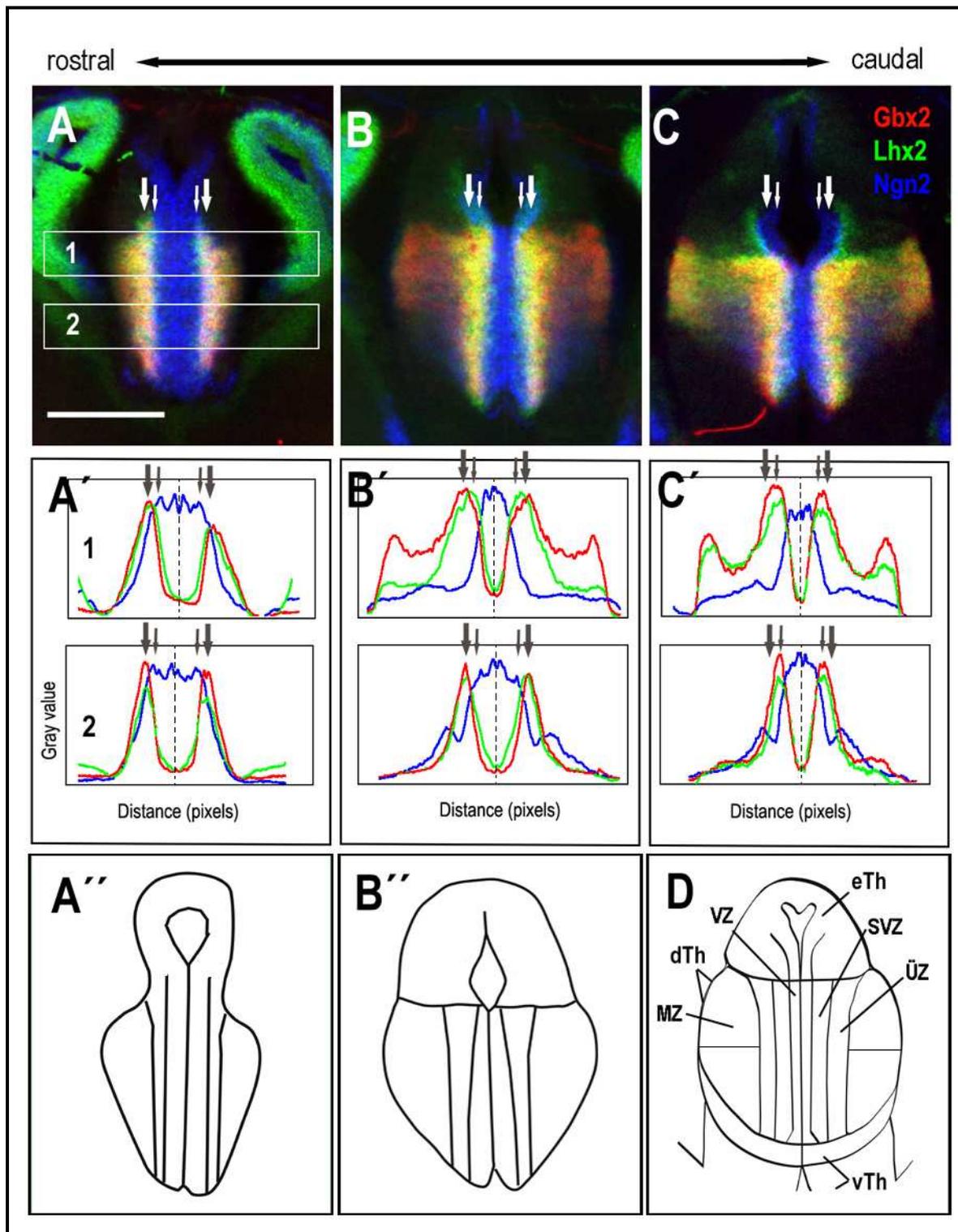


Abb.4-13: A bis C zeigen Überlagerung der Expressionsmuster der Gene Gbx2 (rot), Lhx2 (grün) und Ngn2 (blau) am Embryonaltag 14 in Falschfarbendarstellung. A' bis C' sind Intensitätsplots der Signale in den in A gezeigten Bereichen 1 (dorsal) und 2 (ventral). A'' und B'' zeigen die aus den überlagerten Muster resultierenden Zonen des Thalamus der entsprechenden Ebene. Die Pfeile geben als Referenzpunkt die Lage der Maxima von Gbx2 und Lhx2 (großer Pfeil) und des lateralen der beiden medialen Ngn2-Maxima (kleiner Pfeil) im rostralen Schnitt an. D zeigt die idealisierte Skizze des Thalamus am Embryonaltag 14. Dorsal ist oben. Maßstab 500 μ m.

4.4.5 Die Expressionsmuster der Gene Gbx2, Lhx2 und Ngn2 zeigen am Embryonaltag 16 einen in kernspezifische Felder untergliederten Thalamus

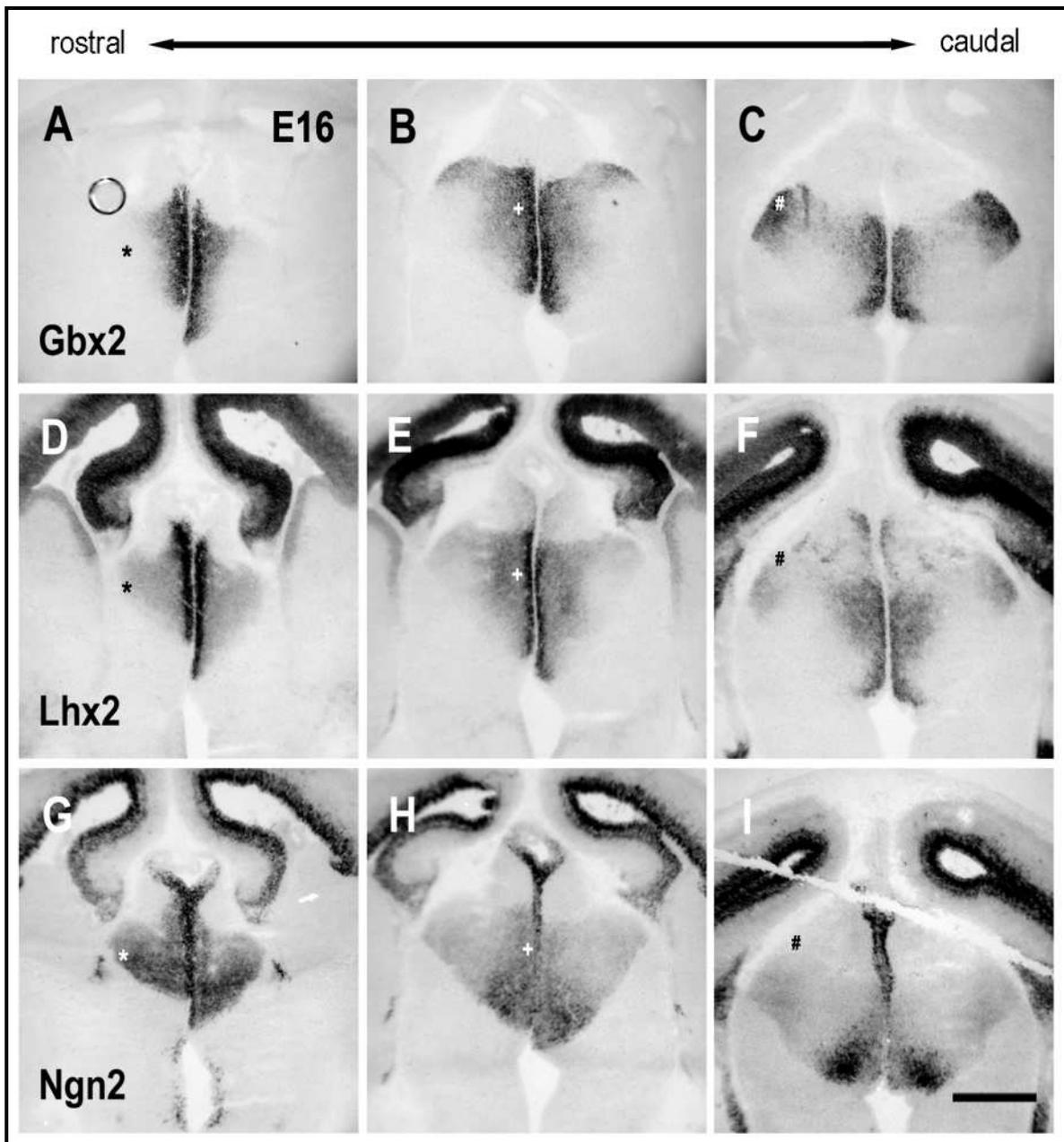


Abb.4-14: *In-situ*-Hybridisierungen an Koronalschnitten des Gehirns der Maus mit den *antisense*-Sonden für Gbx2 (A,B,C); Lhx2 (D,E,F) und Ngn2 (G,H,I). Gezeigt ist der dorsale Thalamus am Embryonaltag 16. Die Zeichen + (A,D,G), * (B,E,H) und # (C,F,I) geben Felder des Thalamus an, die durch die drei Sonden unterschiedlich markiert werden. Sie entsprechen den Kernen AV (*), MD (+) und LP (#). Maßstab 500 μ m.

Am Tag E16 ändern sich die Expressionsmuster der Gene Gbx2, Lhx2 und Ngn2 natürlich mit der Vergrößerung des Thalamus. Die Färbemuster der Sonden ähneln den Mustern in den postnatalen Stadien nicht im Detail, aber die Tendenz ist deutlich zu erkennen. Der Thalamus liegt noch getrennt in eine rechte und linke Hälfte vor, so dass die medialen Kerne wie PV, CM, Rh und Re noch paarig und weiter auseinander liegend vorkommen. Die Schrumpfung der inneren proliferativen Zone ist vollständig, was mit der

ausklingenden Neurogenese der thalamischen Neurone einhergehen sollte. Damit sind die Streifen von Gbx2 und Lhx2, die an E14 die Übergangszone bilden, jetzt weiter medial gelegen (Abb.4-14 A-F). Sie lassen zum Ventrikel hin einen sehr schmalen Streifen frei, der, wie auch an E14, Ngn2 exprimiert (Abb.4-14 G-I). Wie sich ebenfalls an E14 andeutete, breitet sich das Signal der Gbx2- und Lhx2-Sonden vornehmlich in den dorsalen Bereichen des Thalamus aus und das Signal von Ngn2 ventral. Beim Vergleich der Expressionsmuster sind, wie in Abb.4-14 (siehe * in A, D, G; + in B, E, H und # in C, F, I) gezeigt, separierte und verschieden markierte Felder festzustellen. Die beispielhaft gezeigten Felder entsprechen den thalamischen Kernen AV (*), MD (+) und LP (#). Beim Vergleich von Gbx2 und Lhx2, die ansonsten sehr ähnliche Muster haben, treten vor allem anterior Unterschiede auf. Die Übergänge der einzelnen Felder sind in den anterioren Regionen noch fließend, wohingegen in den posterioren Bereichen die Färbemuster schon differenzierter erscheinen.

4.4.6 Die Expression von Cad6 beginnt, nachdem die thalamischen Neurone ihren kernspezifischen Platz eingenommen haben

Betrachtet man die Expression von Cad6 im Thalamus über die Zeit (hier E14, E15 und E16; siehe Abb.4-15), stellt man fest, dass die durch die *antisense*-Sonde entstehende Signalstärke mit der Entwicklung des Thalamus zunimmt. So ist die Expression im anterioren Thalamus bei E14 (Abb.4-15 A) schwach, bei E15 (Abb.4-15 D) mittel und bei E16 (Abb.4-15 G) stark. Auch innerhalb einer Altersstufe ist diese Änderung der Expression zu beobachten. Am Embryonaltag 14 ist in den anterioren Bereichen sowie in den mittleren Abschnitt des Thalamus kaum eine Expression zu finden. In der posterioren Schnittebene allerdings schon. Ähnliches ist auch am Tag E15 zu beobachten. Von anterior nach posterior nimmt die Signalstärke zu. Dagegen ist am Tag E16 die maximale Intensität der Expression in allen Schnitteben annähernd gleich. Der posteriore Thalamus ist, wie erwähnt, weiter entwickelt als der anteriore.

Auffällig ist bei der Analyse der Expressionsmuster von Cad6, dass im Gegensatz zu den Mustern von Gbx2, Lhx2 und Ngn2, die Cad6-Sonde im wesentlichen Gebiete in der MZ also in den differenzierenden Regionen markiert. In den proliferativen Zonen sowie in der ÜZ ist kaum eine Expression von Cad6 zu finden (vergleiche E14, Abb.4-15). Bei E15 und E16 muss allerdings bemerkt werden, dass ganz medial, dem Ventrikel direkt anliegend, eine Expression von Cad6 zu verzeichnen ist. Es scheint, dass die Zellen des Thalamus mit der Expression von Cad6 erst beginnen, nachdem sie ihre Position in der differenzierenden Zone der MZ gefunden und eingenommen haben. Die Expression des Gens Cad6 wurde ebenfalls für die Kartierung des embryonalen Thalamus verwendet, vor allem wegen der Expression in den anterioren Kernen (siehe Tab.4-4).

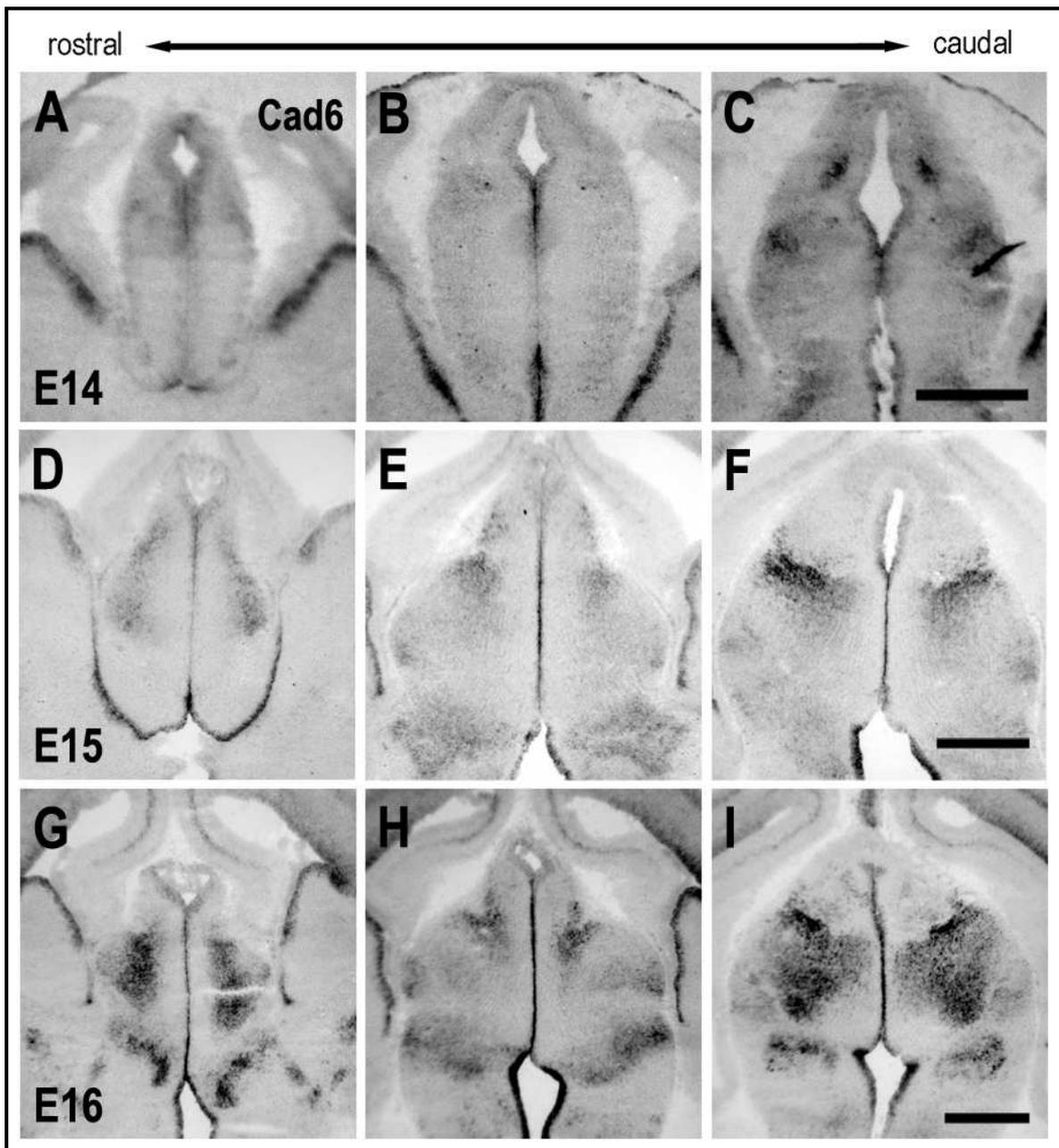


Abb.4-15: *In-situ*-Hybridisierungen an Koronalschnitten des Gehirns der Maus mit der *antisense*-Sonde für Cad6. Gezeigt ist der dorsale Thalamus in den Altersstadien E14 (A-C), E15 (D-F) und E16 (G-I). Dorsal ist oben. Maßstab 500 μ m.

4.4.7 Die Kartierung des embryonalen Thalamus am Tag E16

Die Überlagerung der Expressionsmuster der drei Transkriptionsfaktoren in Abb.4-16 A bis C führt demzufolge zu verschiedenen Farbfeldern, die somit eine differenzielle Untergliederung des embryonalen Thalamus in konkrete Kerngebiete erlauben. Die unterschiedlichen Farben der Felder entsprechen dem Code, der sich aus der Expression von Gbx2, Lhx2 und Ngn2 ergibt. Unter Zuhilfenahme der Cad6-Expressionsmuster und durch Vergleich mit den Expressionen der Gene in den postnatalen Stadien, die in Tabelle 4-4 aufgeführt sind, lassen sich Schlüsse auf die spezifische Lage der zukünftigen thalamischen Kerne ziehen. Die Zeichnungen in den Abbildungen A' bis C' der Abb.4-16 sind entsprechend diesem

kernspezifischen „Transkriptionsfaktor - Expressionscode“ genaue Kartierungen der thalamischen Kerne in den verschiedenen Schnittebenen von rostral nach caudal am Embryonaltag 16. Mit Hilfe dieser Karten lassen sich nun die kernspezifischen Expressionen der Gene des ephrin-/ Eph-Systems am Tag E16 ermitteln.

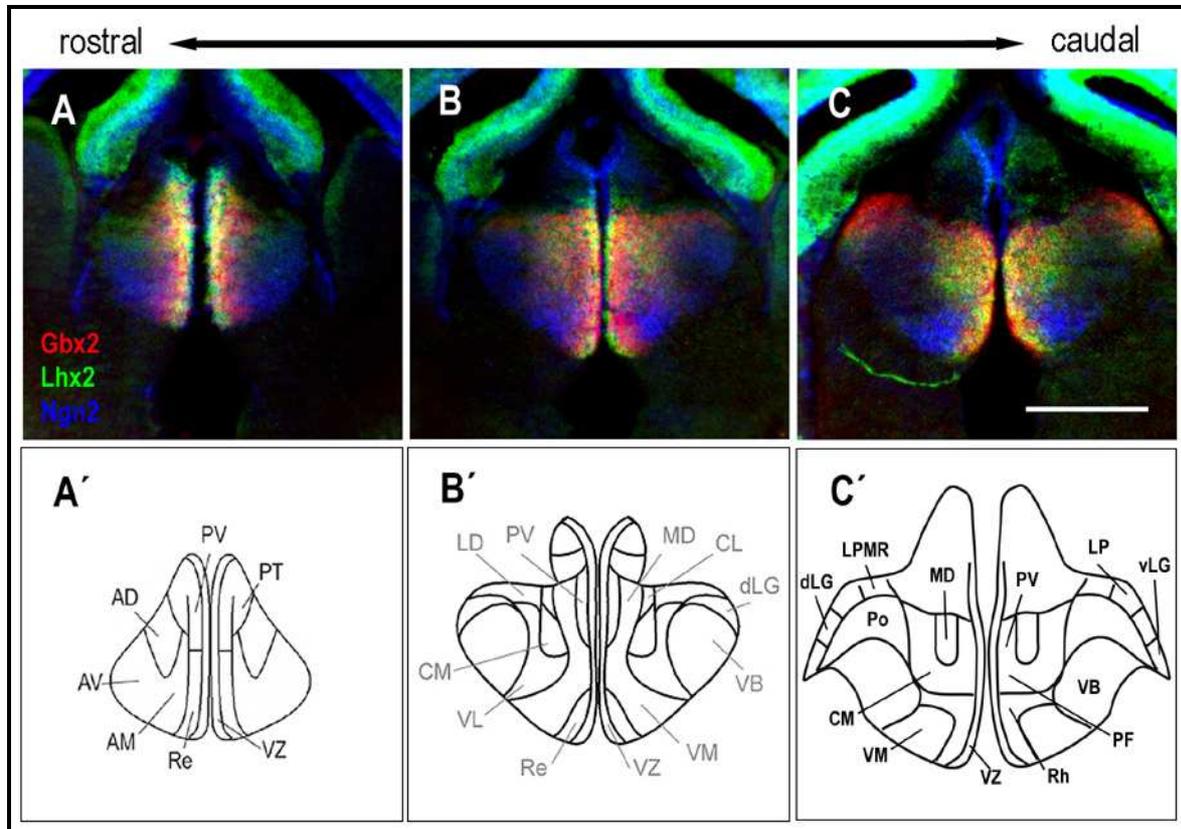


Abb.4-16: A bis C zeigen in Falschfarbendarstellung die Expressionsmuster der Gene Gbx2 (rot), Lhx2 (grün) und Ngn2 (blau) im dTh am Embryonaltag 16. A' bis C' zeigen die Lage der, aus den überlagerten Mustern resultierenden Kerne des Thalamus in den entsprechenden Ebene. Dorsal ist oben. Maßstab 500 µm.

4.4.8 Die antisense-Sonden für das ephrin-/ Eph-System zergliedern im hohen Maße den embryonalen Thalamus am Tag E14

Die Färbemuster der *antisense*-Sonden für die verschiedenen Gene des ephrin-/ Eph-Systems zeigen eine deutlich differenziert regulierte Expression dieser Gene in den analysierten Altersstadien. Die Expressionen sind in der Tabelle 4-5 aufgelistet. Die Analyse der Expressionsmuster basierte dabei auf der vorgenommenen Kartierungen des Thalamus auf Grund der Expressionen der Gene Gbx2, Lhx2, Ngn2 und Cad6 in den Altersstadien E14 und E16 (siehe E14 Abb.4-13 sowie E16 Abb.4-16). Am Embryonaltag E14 zeigt sich, wie zuvor schon beobachtet (siehe 4.4.4), ein auffälliges streifenartiges Muster der Markierungen durch die verschiedenen *antisense*-Sonden. In Abb.4-17 sind die Expressionen der Gene des ephrin-/ Eph-Systems dargestellt. So werden die Liganden *efnb2* (A) und *efna5* (B) sowie der Rezeptoren EphA6 (G) in der ÜZ exprimiert. Hierbei ist die Expression von EphA6 in einem von dorsal nach ventral abnehmenden Gradienten realisiert. Somit ist die Übergangszone auf zellulärer Ebene nicht homogen strukturiert. Die Rezeptoren EphB1 (C) und EphB2 (D) sind im innersten Streifen, der VZ, lokalisiert. Dabei markiert die

Die MZ exprimiert hauptsächlich die Rezeptoren EphA3, EphA4 und EphB2. Die Expression von EphA3 (Abb.4-17 E) wird dabei als Gradient sichtbar, der ventral eine hohe Signalstärke aufweist und dorsal eine niedrigere. EphA4 (Abb.4-17 F) verläuft in einem etwas flacheren Gradienten dem EphA3-Gradienten entgegen. EphB2 (Abb.4-17 D) zeigt auch in der MZ ein streifiges Expressionsmuster, was darauf hinweist, dass in den früheren embryonalen Altersstadien auch die Zellen in der MZ in vertikalen Streifen angeordnet sind.

Eine Eigenart weist der Rezeptor EphA7 auf. Wie zuvor beschrieben wird EphA7, wie in Abb.4-17 H zu sehen, zu einer frühen Zeit in der VZ und SVZ des Thalamus exprimiert. Die MZ ist dabei frei von Signal. Zu einem späteren Zeitpunkt, von nur einem halben Tag, ist von dem Signal in der proliferativen Zone, wie in Abb.4-17 I zu sehen, nur noch wenig in der VZ zu finden. Statt dessen ist jetzt der ventrale Bereich der MZ von der Sonde markiert (Abb.4-17 H und I, die Sternchen zeigen die Expression von EphA7). In diesem Fall wird also eine kurze Aufenthaltszeit der EphA7 exprimierenden Zellen im medialen Streifen und eine schnelle radiale Migration in die MZ nahegelegt.

Die Überlagerungen der Expressionsmuster der Gene von EphA3, EphA4, EphB1 und efna5 in den Bildern J und K der Abb.4-17 zeigen, wie distinkt die einzelnen Expressionen sind und den verschiedenen Zonen zugeordnet werden können. So verläuft die Expression von EphA3 (rot) direkt bis an die ÜZ, in der efna5 exprimiert wird (Abb.4-17 J). Die Expression von efna5 (blau in Abb.4-17 J) in der ÜZ füllt genau den Zwischenraum zwischen der Expression von EphA4 (grün) in der SVZ und der MZ (Abb.4-17 K; ÜZ ist die leere Stelle zw. der grünen SVZ und gelben MZ). Ganz medial ist in Abb.4-17 K die Expression von EphB1 in blau gezeigt, die eine scharfe Grenze zu SVZ (grün) bildet. Die Skizze in Abb.4-13 D wurde in Abb. 4-17 L durch die weitere Zergliederung der VZ durch die Gene des ephrin-/ Eph-Systems ergänzt.

Abb.4-17: *In-situ*-Hybridisierungen an Koronalschnitten des Gehirns der Maus mit den *antisense*-Sonden für efnb2 (A), efna5 (B), EphB1 (C), EphB2 (D), EphA3 (E), EphA4 (F), EphA6 (G) und EphA7 (H,I). Gezeigt ist der dorsale Thalamus im Altersstadium E14. J und K zeigen die Überlagerungen der Expressionsmuster der Gene EphA3, EphA4, EphB1 und efna5. L zeigt eine idealisierte Skizze des dorsalen Thalamus. Die Pfeilspitzen in C, D und I zeigen die horizontale Expressionsgrenzen in der VZ (C,D) und MZ (I). Die Sternchen in H und I zeigen die unterschiedliche Expression von EphA7 an E14 (H) und E14,5 (I). Dorsal ist oben. Maßstab 500 µm.

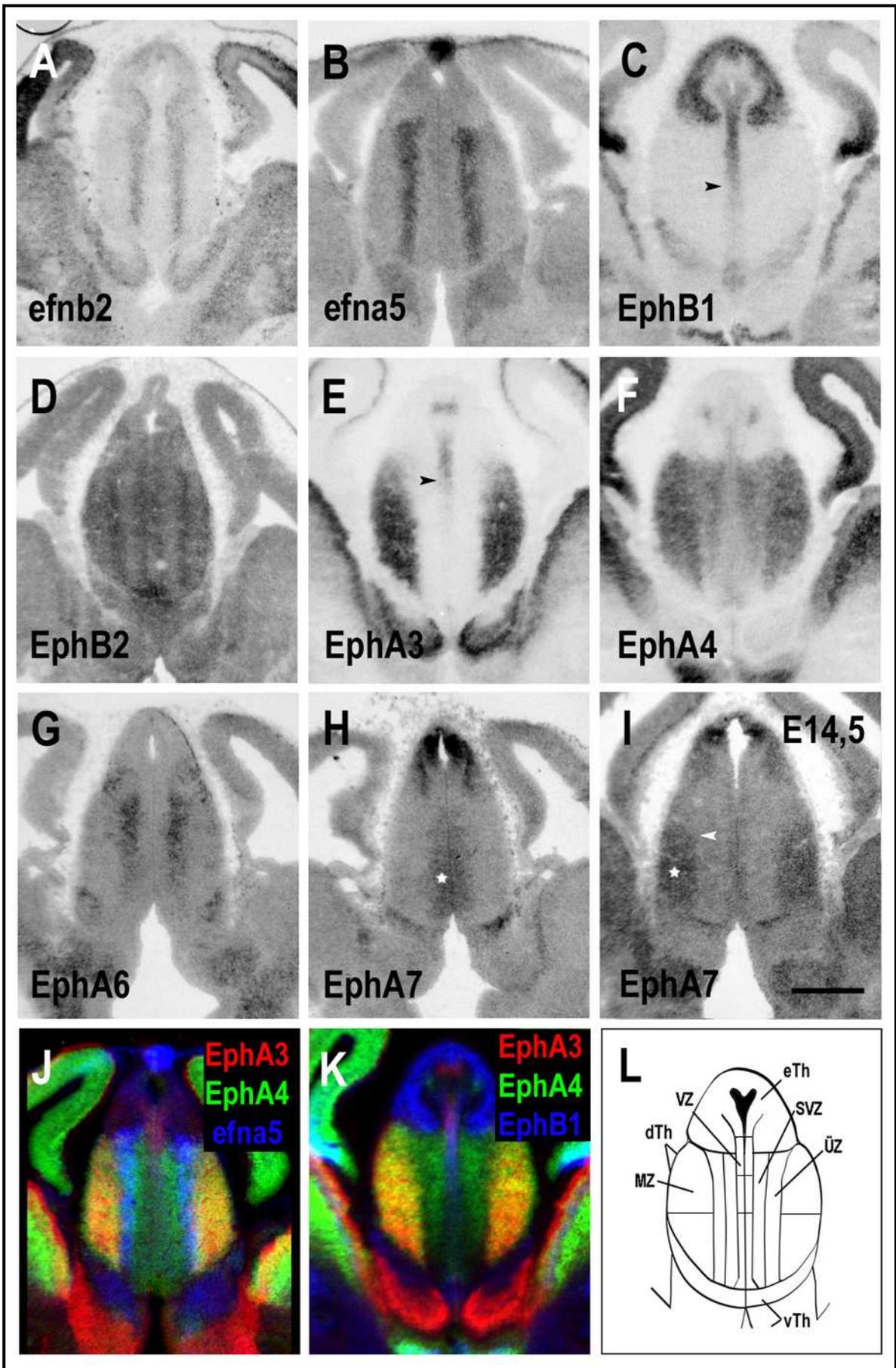


Abb.4-17:

4.4.9 Der vTh ist ein Ein- und Ausgang für projizierende Axone

Der ventrale Thalamus (vTh) ist die Ein- und Ausgangsstruktur für die Axone, die den Thalamus verlassen oder erreichen. Hier ändern die Axone ihre Richtung um etwa 90° (Abb.4-18 O, TCA) um den Weg zu den richtigen Zielgebieten fortsetzen zu können. Der vTh besteht aus den drei Kernen Rt, vLG und Zi, wobei vor allem der Rt eine wichtige Rolle bei der Verdrahtung des Thalamus spielt (Mitrofanis and Baker, 1993). Der Kern ist die erste Struktur, die Axone in den Thalamus sendet, und er ist die erste Station, die von den TCA auf dem Weg zum Kortex passiert werden muss. Somit stellt er für die Axone einen Entscheidungspunkt dar, der durch die Präsentation von differentiellen Faktoren das zielgerichtete Wachstum der Axone beeinflussen kann.

Einige Gene des efn- / Eph-Systems werden im vTh exprimiert und können daher auf das Wachstum der Axone Einfluss nehmen. In Abb.4-18 sind die Expressionsmuster dargestellt. So wird der Rezeptor EphA3 in der ThE und in hypothalamischen Kernen exprimiert (Abb.4-18 A,B Sternchen). Dies sind Strukturen, die von den TCA gemieden werden. Ein möglicher Durchgang in das vTC wird dabei freigelassen (Abb.4-18 B schwarzer Punkt). Die ThE sowie die hypothalamischen Elemente werden ebenfalls durch die EphA5-Sonde markiert (Abb.4-18 D,E Sternchen). Zusätzlich ist EphA5 auch in der Zi zu finden und zwar in einem medialen Abschnitt (Abb.4-18 D bis F Pfeilspitzen). Im Gegensatz dazu reicht die Expression von EphA7 in der Zi komplett von medial nach lateral (Abb.4-18 I Pfeilspitzen). Dies ist in der Überlagerung in Abb.4-18 L der beiden Rezeptoren deutlich zu erkennen (vergleiche EphA5 in grün und EphA7 in blau). Einen ausschließlich lateralen Anteil der Zi, sowie das ebenfalls lateral gelegene dLG markiert hier die EphA6 Sonde (Abb.4-18 C Pfeil, L EphA6 in rot). EphA6 ist auch in den angrenzenden hypothalamischen Kernen exprimiert. Der Rezeptor EphB1 ist in Rt zu finden und ist somit in einer Struktur lokalisiert, die von den TCA passiert wird (Abb.4-18 G,H Raute). In der Überlagerung mit den Rezeptoren EphA3 und EphA5 (Abb.4-18 J,K EphA3 in rot, EphA5 in grün und EphB1 in blau) wird deutlich, dass die Expression von EphB1 von der Expression von EphA3 deutlich separiert ist. EphB1 ist dabei innerhalb des Kanals lokalisiert, der völlig frei von EphA3 ist. Dabei wird dieser Kanal allerdings nicht vollständig von EphB1 ausgefüllt, vielmehr teilt er diesen in zwei Hälften (Abb.4-18 H schwarzer und weißer Punkt, K EphB1 in blau).

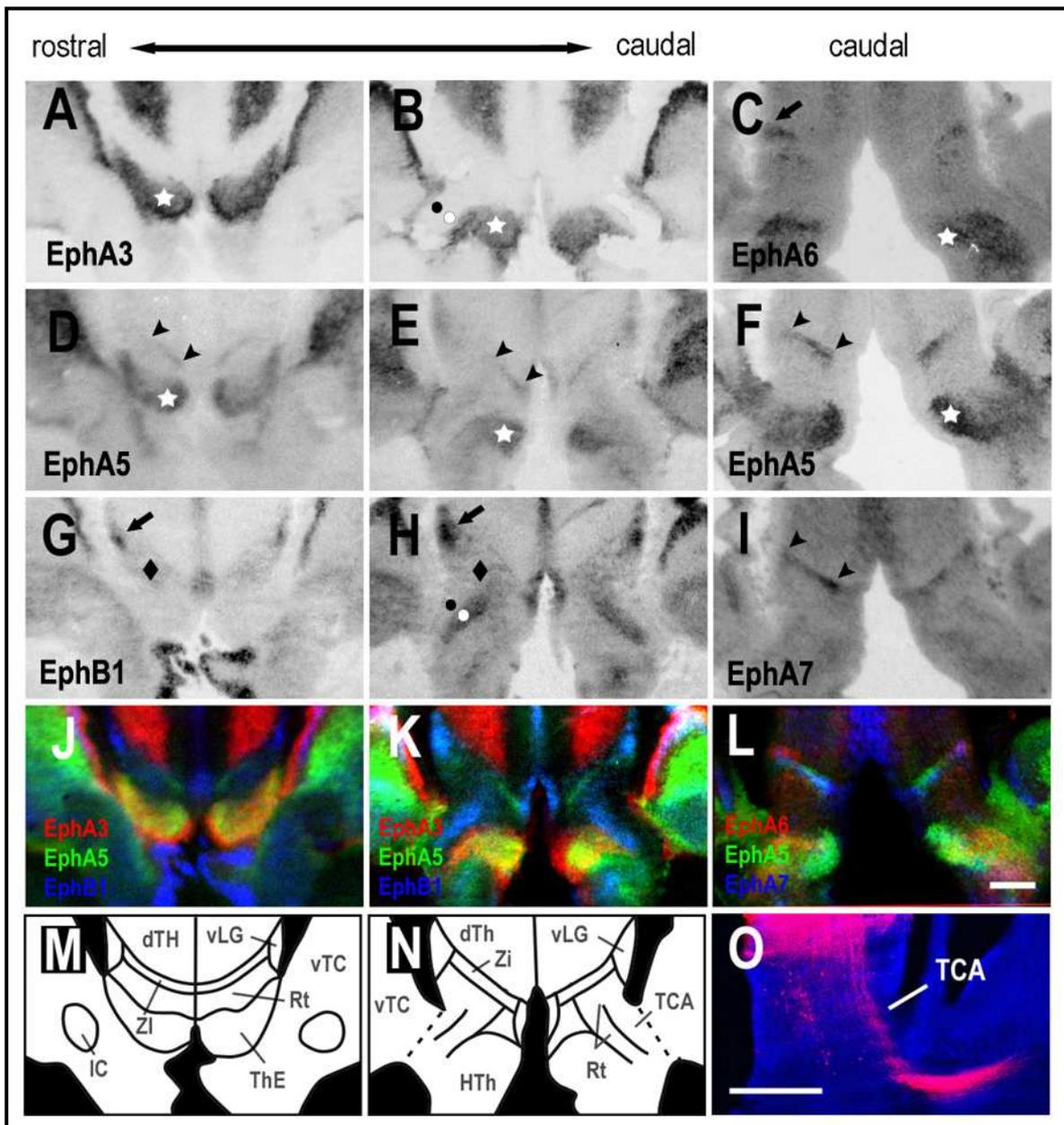
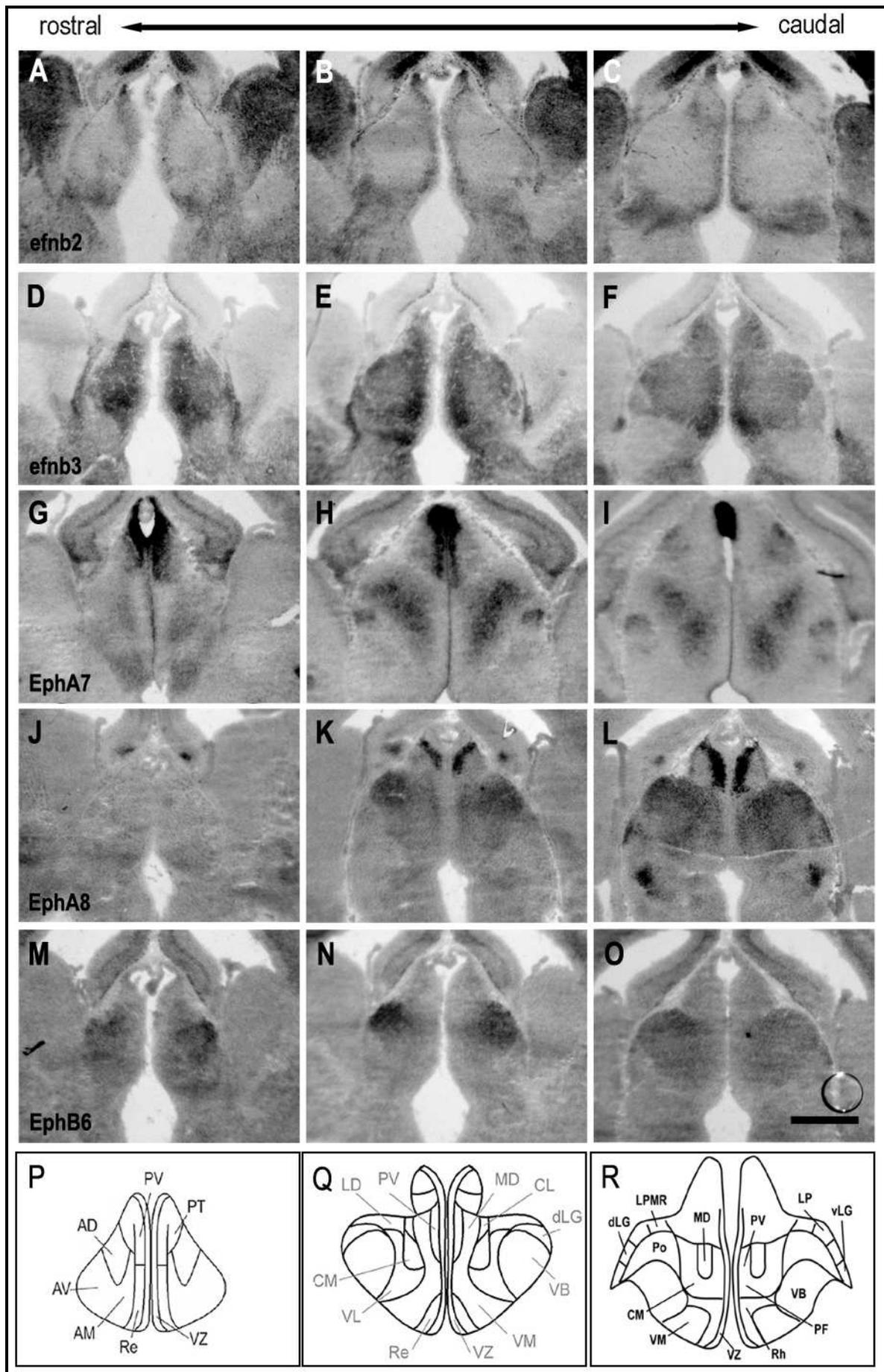


Abb.4-18: *In-situ*-Hybridisierungen an Koronalschnitten des Gehirns der Maus mit den *antisense*-Sonden für EphA3 (A,B), EphA5 (D-F), EphB1 (G,H), EphA6 (C) und EphA7 (I). C,F und I sind caudale Schnitte von einem zweiten Gehirn. Gezeigt ist der ventrale Thalamus im Altersstadium E14. J bis L zeigen die Überlagerungen der Expressionsmuster der Gene EphA3, EphA5 und EphB1 (J,K) und EphA5, EphA6 und EphA7 (L). M und N sind Skizzen des vTh resultierend aus den Expressionsmustern. O zeigt anterograd Dil markierte TCA. Die Injektionsstelle des Dil liegt im dTh. Sternchen in A bis F zeigen die Expression in der ThE und den hypothalamischen Kernen. Die Raute in G und H zeigen die Expression in Rt. Die beiden Punkte in B zeigen einen Kanal für projizierende Axone, die Punkte in N zeigen eine Zweiteilung dieses Kanals. Der Pfeil in C und G-I zeigt die Expression des dLG und die Pfeilspitzen in D bis F und I zeigen die Dimension der Expressionen der Zi. Dorsal ist oben. Maßstab 500 µm.

Abb.4-19 *In-situ*-Hybridisierungen an Koronalschnitten des Gehirns der Maus mit den *antisense*-Sonden für efnb2 (A-C), efnb3 (D-F), EphA7 (G-I), EphA8 (J-L), EphB6 (M-O) und Konstruierte Karte der thalamischen Kerne (P-R). Gezeigt ist der dorsale Thalamus im Altersstadium E16 von rostral nach caudal. Dorsal ist oben. Maßstab 500 µm.



4.4.10 Der dorsale Thalamus am Tag E16

Am Tag E16 sind im Thalamus fast alle Gene des efn- / Eph-Systems exprimiert. Nur der Ligand efnb1 und der Rezeptor EphB3 sind durch die *antisense*-Sonden nicht detektierbar. Mit Hilfe der skizzierten Karten (Abb.4-16 A' bis C') für die Kerne des embryonalen Thalamus lassen sich die Expressionen der Gene für die verschiedenen Kernen spezifizieren. Sie sind in Tabelle 4-5 aufgelistet.

Hierbei weisen die Färbemuster der *antisense*-Sonden durchaus auf kern-spezifische Gene im Thalamus hin, allerdings sind die Ausmaße der Felder der verschiedenen Expressionsbereiche weit größer, als man das für einzelne Kerne erwarten würde. Die Expression erstreckt sich meist über mehrere zusammenhängende Kerne oder Kerngruppen. So zieht sich die Expression von efnb2, wie in Abb.4-19 A bis C zusehen, entlang der Mittellinienkerne PV, IMD, Rh und Re, und ist in den lateralen Bereichen bis auf Rt gar nicht zu finden. Im Gegensatz dazu ist die Expression von efnb3 im Thalamus eher ubiquitär, allerdings sind die Expressionen im Bereich der Mittellinienkerne viel stärker als andersorts (Abb.4-19 D-F). Die EphA8-Sonde erzeugt an E16 in den rostralen Kerngruppen kein Signal, dafür aber in intermediären und caudalen Kernen und Kerngruppen wie LD, MD, VB und Po (Abb.4-19 J-L; vergleiche P6 Abb.4-22 I und J, hier zeigt findet eine Änderung der Expression statt). Im Gegensatz zu EphA8 wird EphB6 (Abb.4-19 M-O) im rostralen Bereich des Thalamus stärker exprimiert und in den caudalen Bereichen schwächer, allerdings wird EphB6 genau wie EphA8 nicht in den Mittellinienkernen exprimiert und zeigt damit einen starken Unterschied zu den Expressionen von efnb2 und efnb3 (Abb.4-19 A-F). Der Rezeptor EphA7 ist von anterior nach posterior jeweils global in den intermediären Bereichen des Thalamus exprimiert. Ganz posterior teilt sich das Expressionsmuster auf der linken und rechten Hälfte des Thalamus in jeweils zwei Felder auf (Abb.4-19 G-I).

Die Expressionsmuster der Rezeptoren EphA3 (Abb.4-20 D-F) und EphA4 (Abb.4-20 G-I) füllen am Tag E16 den Großteil des Thalamus. Sie liegen jeweils mittig in den beiden Thalamushälften und breiten sich beinahe konzentrisch aus. Sie ähneln einander sehr, zeigen aber Unterschiede darin, wie weit sie sich ausdehnen. So reicht die Expression von EphA4 schwach bis in die Regionen der Mittellinienkerne, die von der EphA3-Sonde nicht markiert werden.

Ein sehr subtiles Expressionsmuster zeigt der Ligand efna5 im dTh (Abb.4-20 A-C). Er ist im Gegensatz zu den Rezeptoren EphA3 und EphA4 stark auf weniger ausgedehnte Regionen begrenzt und beschreibt vor allem im Bereich des VB und dem dLG und vLG einen Gradienten. In den Abschnitten des Thalamus in denen EphA3 und EphA4 besonders stark exprimiert sind (AD, AV, AM, PC, CL und CM) ist efna5 nicht lokalisiert. Es lässt sich feststellen, dass der gesamte dTh am Embryonaltag 16 von dem ephrin-/ Eph-System markiert wird. Wie auch schon zuvor bei der Analyse der Transkriptionsfaktoren und Cad6 (siehe 4.4.5 und 4.4.6) lässt sich der Thalamus damit in verschiedenste Abschnitte zergliedern. Die verschiedenen Kerne exprimieren also verschiedenen Kombinationen von Genen des ephrin-/ Eph-Systems. Überlagert man die Expressionsmuster von EphA3, EphA4 und efna5 (Abb.4-20 J-L) sieht man, dass einerseits der gesamte Thalamus markiert ist und andererseits durch die Überlagerung der Farben verschiedene Farbfelder entstehen, die Kern und Kerngruppen des dTh repräsentieren.

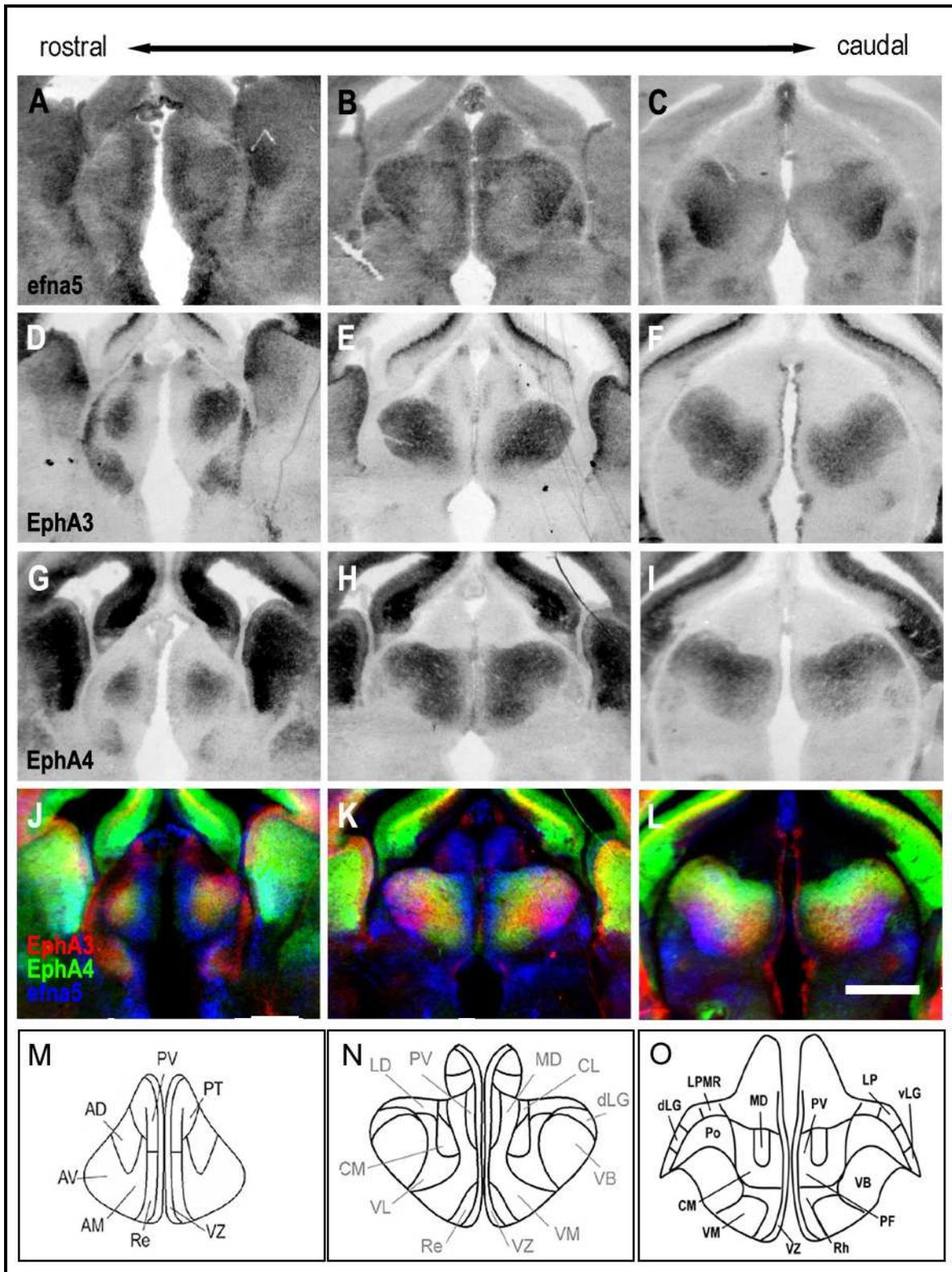


Abb.4-20: *In-situ*-Hybridisierungen an Koronalschnitten des Gehirns der Maus mit den *antisense*-Sonden für *efna5* (A-C), EphA3 (D-F) und EphA4 (G-I). Gezeigt ist der dorsale Thalamus im Altersstadium E16 von rostral nach caudal. J bis L zeigen die Überlagerungen der Expressionsmuster der Gene EphA3, EphA5 und *efna5*. Dorsal ist oben. Maßstab 500 μ m.

4.5 Der postnatale Thalamus

In den juvenilen, postnatalen Stadien P6 und P28 ist die Entwicklung des Hirns noch nicht abgeschlossen. Es kommt vor allem in der frühen postnatalen Zeit zu weiteren Verdrahtungsprozessen, wie intra- und interlaminare Verdrahtung im Kortex und intranukleäre Verdrahtung im Thalamus an P6. Im Kortex kommt es zu einer massiven Invasion der thalamokortikalen Fasern, die in den verschiedenen kortikalen Arealen u.U. kernspezifisch in unterschiedlichen Schichten terminieren können. Auch die Rückprojektionen der kortikofugalen Fasern in den Thalamus sowie die intrathalamische Verdrahtung werden weiter ausgebaut. An P28 führen Prozesse der Plastizität zur Schärfung der etablierten Verknüpfungen und dadurch zu einem morphologisch differenzierten Thalamus (siehe Abb.4-9 D, sowie Abb.4-21 A und B). Somit ist die Zuweisung der Expressionsmuster zu den identifizierten Kernen in postnatalen entsprechend einfacher als in den embryonalen Stadien. In Tabelle 4-6 ist eine Liste wichtiger thalamischer Kerne aufgeführt, für die die Expressionen der verschiedenen Gene des ephrin-/ Eph-Systems in den Stadien P6 und P28 geprüft wurde.

4.5.1 6 Tage nach der Geburt der Maus sind im Thalamus kernspezifische Expressionsmuster der Gene des ephrin-/ Eph-Systems zu beobachten

Wie in Tabelle 4-6 zu sehen, sind 6 Tage nach der Geburt noch viele Gene des efn- / Eph-Systems im Thalamus aktiv. Im Gegensatz zu den embryonalen Stadien E14 und E16 (siehe vorne) sind die Expressionen nun distinkter und auch auf einzelne Kerne beschränkt. In Abb.4-21 ist eine Auswahl von Expressionsmustern gezeigt, die bemerkenswerte Besonderheiten aufweisen. So wird *efna5* (Abb.4-21 C und D) differenziell in verschiedenen Kernen exprimiert. Allerdings ist das durch die Sonde erzeugte Färbemuster, wie zum Beispiel in LD, dem Genikulatum (in der Tabelle 4-6 nicht aufgelistet) oder auch in VB (siehe auch Abb.4-21 O) immer ein Gradient, der, soweit in den Koronalschnitten zu beurteilen, im Falle von VB und dem LGd ventral hoch und dorsal niedrig ist. Der Rezeptor EphA5 (Abb.4-21 I und J) ist vor allem, ähnlich dem Rezeptor EphB6 (Abb.4-22 M, N), in den Kernen entlang der Mittellinie lokalisiert, mit Ausnahme des MD. MD exprimiert dafür exklusiv den Liganden *efnb2* (Abb.4-21 E) sowie den Rezeptor EphA7 (Abb.4-21 L). Auch der Ligand *efnb3* zeigt eine Expression in MD, aber auch in weiteren Mittellinienkernen (Abb.4-21 G). EphA7 ist wie *efna5* in einigen Kernen in einer gradierten Form exprimiert, und zwar in einer *efna5* entgegengesetzten Orientierung. In Abb.4-21 O und R ist dies für VB gezeigt. EphA7 ist in einem Gradienten von dorsal hoch nach ventral niedrig. Ähnliches zeichnet sich auch für das Genikulatum und VA ab (Abb.4-21 C,D und L,M; Pfeilspitzen).

Die Bilder N bis R der Abb.4-21 zeigen eine Vergrößerung des thalamischen Kernkomplexes VB. Er besteht aus den beiden Kernen VPM und VPL und ist die Relay-Station des somatosensorischen Systems. Hier werden die taktilen Informationen aus der Peripherie topographisch korrekt in den somatosensorischen Kortex weitergeleitet. Die Bilder zeigen, wie differenziell die Expressionen der jeweiligen Gene innerhalb dieses Komplexes sein können. Die Nissl-Färbung zeigt, dass sich der Kernkomplex vom Rest des Thalamus deutlich abhebt (Abb.4-21 B), aber Inhomogenitäten innerhalb des Komplexes lassen sich schwerer

feststellen (Abb.4-21 N). Dennoch treten diese auf, wie die Expressionen der Gene des Ephrin-/ Eph-Systems zeigen. So beschreibt die efnb3-Sonde die Grenzen des gesamten VB, da sie die Kerne rundherum markiert und VB selbst frei lässt (Abb.4-21 Q). Der Rezeptor EphA7 sowie der Ligand efna5 sind, wie schon beschrieben, innerhalb von VB in entgegengesetzten Gradienten exprimiert und differenzieren den Kern entlang der dorsal-ventral-Achse (Abb.4-21 O und R).

Tabelle 4-6: Expression der Gene des ephrin-/ Eph-Systems in den verschiedenen thalamischen Kernen im differenzierten postnatalen Thalamus bei P6 und P28. Die Expression der Gene ist hier in zwei Abstufungen dargestellt. □ schwach ■ mittel ■ stark □ nicht exprimiert, * bedeutet ein sehr schwache Färbung, die nicht zweifelsfrei bestätigt werden kann. Für Abkürzungen siehe Anhang, Abkürzungsverzeichnis.

	P6													P28												
	AD	AV	AM	PV	PT	MD	IMD	CM	CL	PC	Rh	Re	VB	AD	AV	AM	PV	PT	MD	IMD	CM	CL	PC	Rh	Re	VB
efna1																										
efna2																										
efna3				?		?																				
efna4																										
efna5		G											G													
efnb1																										
efnb2																										
efnb3																										
EphA1																										
EphA2																										
EphA3																										
EphA4																										
EphA5																										
EphA6																										
EphA7		G	G										G													
EphA8		G	G																							
EphB1	?	?	?																							
EphB2																										
EphB3																										
EphB4																										
EphB6																										

Ein ganz spezielles Färbemuster bringt die Sonde für den Liganden efnb2 hervor. Sie markiert innerhalb des VB das Feld der sogenannten „Barreloids“ (Abb.4-21 N und P, eingekreistes Feld). Hier befinden sich Neurone, die in das „Barrelfield“, einen Teil des primären somatosensorischen Kortex (S1),

projizieren und dort ein Terminationsmuster erzeugen, welches der Vibrissenverteilung an der Schnauze der Maus entspricht. Wie in (Abb.4-21 P) zu sehen, bringt die Sonde ein Muster von mehreren verschieden großen Patches hervor. Diese entsprechen einzelnen „Barreloids“. Es handelt sich hierbei um die Endigungen des trigeminalen Nervs, der aus der Peripherie in den Thalamus projiziert. Somit sind die „Barreloids“ ebenfalls Abbildungen der Vibrissen der Schnauze.

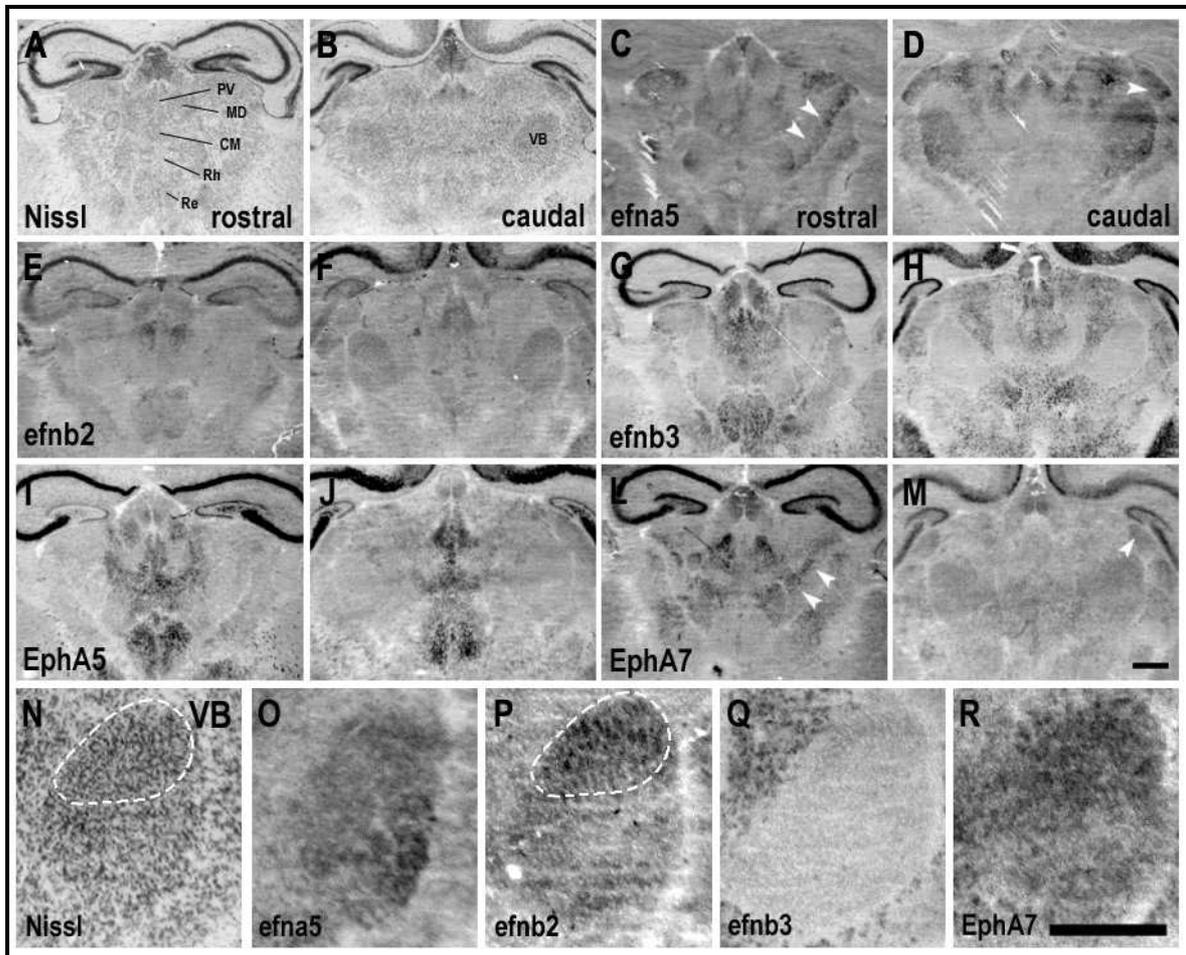


Abb.4-21: *In-situ*-Hybridisierungen an Koronalschnitten des Gehirns der Maus mit den *antisense*-Sonden für *efna5* (C,D), *efnb2* (E,F), *efnb3* (G,H), *EphA5* (I,J) und *EphA7* (L,M). Gezeigt ist der dorsale Thalamus im Altersstadium P6. A und B zeigen zur Übersicht Nissl-Färbungen in den entsprechenden Schnittebenen (rostral und caudal, dorsal ist jeweils oben). Die Bilder N bis R sind Vergrößerungen des Kerns VB, der Nissl-Färbung (N) und der Expressionsmuster der Sonden *efna5* (O), *efnb2* (P), *efnb3* (Q) sowie *EphA7* (R). Die Pfeilspitzen in C,D und L,M weisen auf Expressionsmuster in VA (C,L) und LGd (D,M) in Form eines Gradienten. Die mit der gestrichelten Linie eingekreiste Region in N und P zeigen das Feld der *Barreloids* in VB. Medial ist links und dorsal oben. Maßstab 500 μ m.

4.5.2 Einige Gene des Efn- / Eph-Systems bleiben bis in die späten juvenilen Stadien hochreguliert

In Abb.4-22 ist zu sehen, dass die Gene *EphA4* (A-D), *EphA6* (E-H), *EphA8* (I-L) und *EphB6* (M-P) am Tag P28 im Thalamus weiterhin exprimiert werden. Dabei verändern sich die Expressionsmuster gegenüber denen vom Tag P6 kaum. Sie sind die letzten Gene des *efn-* / *Eph*-Systems, deren Expression im Thalamus am Tag P28 durch *In-situ*-Hybridisierung noch nachweisbar ist.

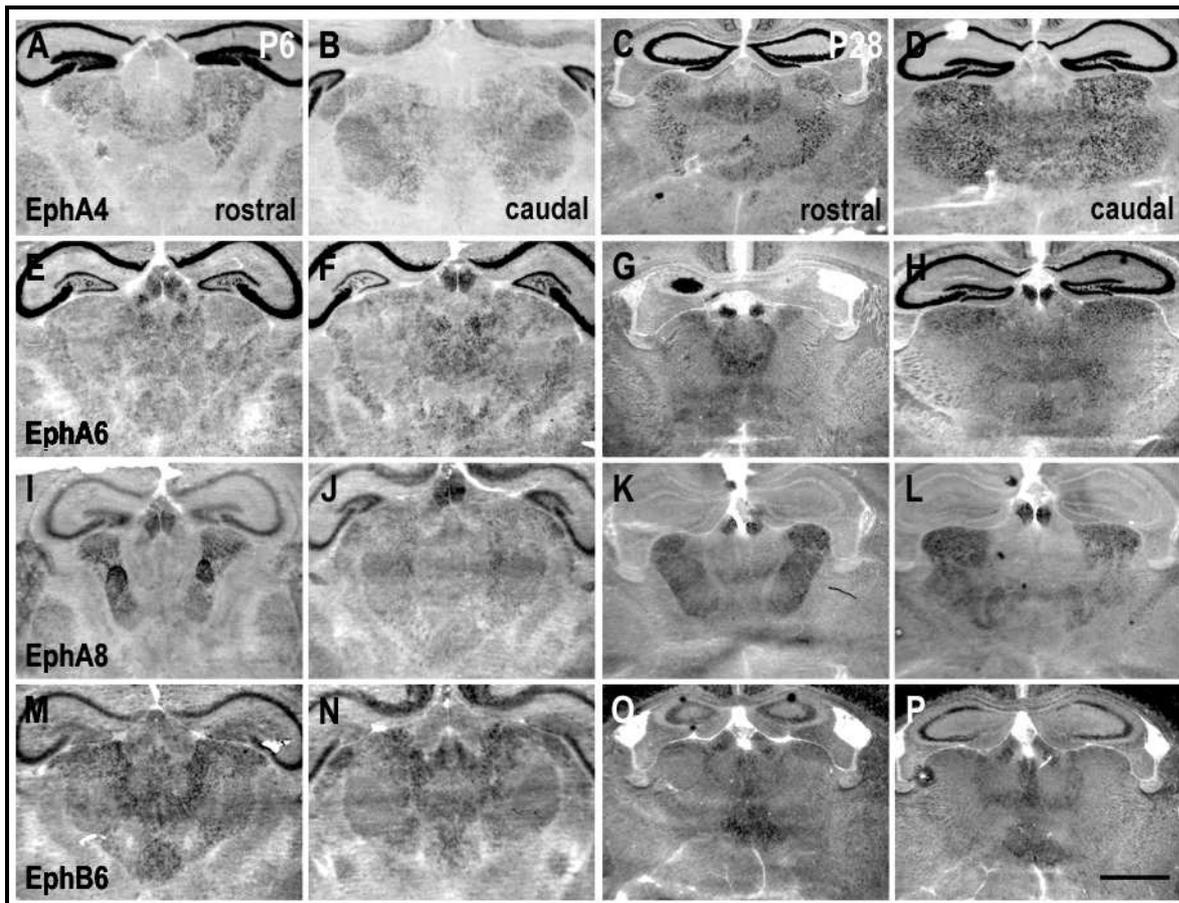


Abb.4-22: *In-situ*-Hybridisierungen an Koronalschnitten des Gehirns der Maus mit den *antisense*-Sonden für EphA4 (A-D) und EphA6 (E-H), EphA8 (I-L) und EphB6 (M-P). Gezeigt ist der dorsale Thalamus in den Altersstadien P6 (Spalte 1 und 2) und P28 (Spalte 3 und 4). Dorsal ist oben. Maßstab 1 mm.

4.6 Das ventrale Telencephalon

Das ventrale Telencephalon (vTC) ist bei der Maus der Geburtsort des Großteils der kortikalen GABAergen Interneurone (Wonders and Anderson, 2005). Sie werden in den proliferativen Zonen der drei „ganglionischen Eminenzen“ (mGE, IGE, und cGE) geboren und migrieren durch das Subpallium hindurch und tangential in den Kortex. Die Abb.4-23 zeigt Nissl-Färbungen von Koronalschnitten des Gehirns der Maus von anterior nach posterior in den Alterstadien E14 (Abb.4-23 A-C) und E16 (Abb.4-23 D-F). Die Eminenzen ragen als Ausstülpungen in die Seitenventrikel herein. Die proliferative Zone besteht aus dem ventrikulären Neuroepithel, sie wird wie im Kortex ebenfalls VZ genannt, und der darauf folgenden SVZ, die ebenfalls mitotische Zellen enthält. Diese Zonen lassen sich durch die hohe Zelldichte gut von der nach außen anschließenden Mantelzone (MZ) unterscheiden, die durch die voranschreitende Differenzierung des Striatums und Pallidums eine geringere Zelldichte besitzt. Eine Trennung der VZ und SVZ ist anhand der Nissl-Färbung nicht möglich. An E16 beginnen die mGE und IGE miteinander zu verschmelzen und lassen sich somit in der Nissl-Färbung nur noch schwer unterscheiden (Abb.4-23 E).

Neben dem Geburtsort der GABAergen Interneurone stellt das vTC für Projektionsfasern, die entweder zum Kortex projizieren oder aus dem Kortex stammen, eine Korridor-Struktur dar und beherbergt

somit eine Vielzahl von Faserbündeln. Die nahezu zellfreie Interne Kapsel (IC) beinhaltet schon am Embryonaltag E14 thalamokortikale Axone, die an der Pallium/ Subpallium Grenze (PSPB) in einer Warteperiode verharren bis die kortikothalamischen Axone ebenfalls die IC passieren. Am Tag E16 nimmt die IC einen prominenteren Bereich des vTC ein. Die stetig weiterschreitende Verdrahtung des Kortex mit dem Thalamus führt zur Vergrößerung des Fasergeflechts innerhalb des vTC und dem „streifenartigen“ Muster des Striatums (Abb.4-23 F).

Für die Migration der Interneurone sowie das Wachstum der verschiedenen passierenden Axone stellt das ephrin-/ Eph- System ein potentielles Lenkungssystem da. In Tabelle 4-7 sind die Expressionen der Gene im vTC aufgelistet.

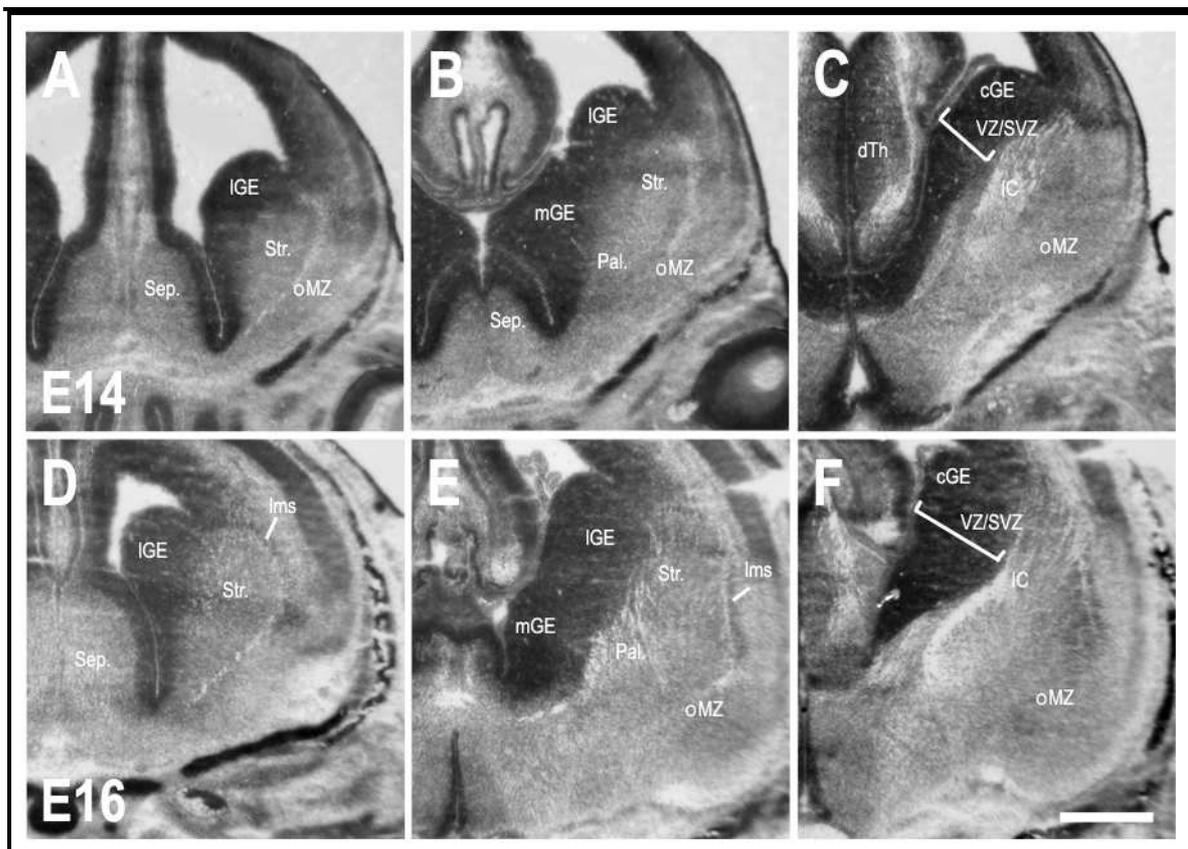


Abb.4-23. Nissl-Färbungen an Koronalschnitten des Gehirns der Maus in den Alterstadien E14 (A bis C) und E16 (D bis F). Die Bilder zeigen das linke ventrale Telencephalon mit Einteilung der „ganglionischen Eminenzen“ von anterior (links) noch posterior (rechts) in die mediale (mGE), laterale (IGE) und caudale ganglionische Eminenz (cGE) sowie die Lage von Pallidum (Pal), Striatum (Str) und interner Kapsel (IC). Die Abkürzung oMZ heißt äußere Mantelzone. Medial ist auf den Bildern links, dorsal oben. Maßstab 500 μ m.

4.6.1 Das Neuroepithel der ganglionischen Eminenzen wird in den Alterstadien E14 und E16 durch die antisense-Sonden der Gene des ephrin-/ Eph-System differenziell markiert

Die große physiologische sowie morphologische Heterogenität der kortikalen Interneurone wirft die Frage nach der Entstehung der Diversität auf. Eine Möglichkeit wäre, dass die Differenzierung der Neurone selbst in

Abhängigkeit zur Lokalisation ihrer Vorläuferzellen steht. So generieren die ganglionischen Eminenzen in der Tat in verschiedenen räumlichen Kompartimenten, sowie in einer zeitlichen Abfolge verschiedene Subtypen von Vorläuferzellen, welche wiederum Interneurone hervorbringen, die sich in Phänotyp, Elektrophysiologie und Zielort unterscheiden (Parnavelas et al., 2002; Xu et al., 2003; Monyer and Markram, 2004; Wonders and Anderson, 2005).

Tabelle 4-7: Expressionen der verschiedenen Gene des ephrin-/ Eph-Systems in den ganglionischen Eminenzen. Die drei Graustufen entsprechen dem Expressionslevel. □ schwach, ▒ mittel, ■ stark, □ nicht exprimiert. Das „G“ deutet einen Gradienten an, * unvollständige Expression.

	E14									E16										
	AEP	mGE			IGE			cGE			AEP	mGE			IGE			cGE		
		VZ	SVZ	Pallidum	VZ	SVZ	Striatum	VZ	SVZ	MZ		VZ	SVZ	Pallidum	VZ	SVZ	Striatum	VZ	SVZ	MZ
efna1																				
efna2																				
efna3																				
efna4																				
efna5		G			G												*			
efnb1		G			G															
efnb2						*														
efnb3																				
EphA1																				
EphA2																				
EphA3		G			G															
EphA4																				
EphA5					G															
EphA6																				
EphA7																				
EphA8																				
EphB1		G			G															
EphB2		G	G		G															
EphB3																				
EphB4																				
EphB6																				

In den Bildern O (E14) und P (E16) der Abb.4-24 sind *In-situ*-Hybridisierungen mit der Sonde für Lhx6 gezeigt. Lhx6 gilt als Marker für die Gesamtheit der postmitotischen Zellen, die in der mGE geboren werden (Lavdas et al., 1999). Ein großer Teil wandert als GABAerge Interneurone in den Kortex ein. Das Signal ist am stärksten in der SVZ und schwächer in den differenzierenden Feldern des vTC. Am Tag E16 zeichnet sich das Pallidum (Abb.4-24 P, weißer Stern), das aus Zellen der mGE hervorgeht, jedoch deutlich ab. Die oberste Schicht der CP ist ebenfalls durch die Lhx6-Sonde markiert (Abb.4-24 P, schwarzer Pfeil).

Ansonsten ist das Signal in der Mantelzone an E14 und E16 diffus verteilt. Das Expressionsmuster von Lhx6 zeigt also die Migrationswege der postmitotischen Zellen der mGE im vTC, lässt aber keine Schlüsse auf deren Vorläuferzellen in der VZ zu.

Die Expressionsmuster der verschiedenen Gene des ephrin-/ Eph- Systems zeigen im Bereich der proliferativen Zonen der ganglionischen Eminenzen jedoch interessante Differenzialitäten. So werden einige Gene in Form von Gradienten von ventromedial niedrig nach dorsolateral hoch exprimiert, wie im Fall von *efnb1* am Tag E14 (Abb.4-24 A, *efnb1* kann an E16 im vTC durch die entsprechende Sonde nicht mehr detektiert werden; Abb.4-24 B) oder bei EphA3 an E14 und E16 (Abb.4-24 C und D). Bei EphA3 zeigt die am weitesten ventromedial gelegene AEP (anteriore endopedunkuläre Area) keine Expression. Erst innerhalb der mGE beginnt das Signal, wobei die Intensität bis zu Pallium-Subpallium Grenze steil ansteigt. Das Signal breitet sich in abnehmender Intensität in die SVZ des vTC aus (siehe auch Abb.4-25 Q bis S). EphA5 beschreibt in der VZ des vTC ebenfalls einen von medial nach lateral ansteigenden Gradienten, der allerdings erst in der IGE beginnt. In Abb.4-24 K und L (vergleiche auch Abb.4-25 I bis K) wird dies durch die schwarzen Pfeilspitzen gezeigt.

Einen von ventromedial nach dorsolateral abfallenden Gradienten zeigt EphB1 in Abb.4-24 M und N. Es wird am stärksten in der VZ im Bereich der AEP exprimiert und fällt nach lateral leicht ab. An der Grenze zum sich entwickelnden Neokortex endet die Expression von EphB1 abrupt.

Die Gene *efnb2*, *efna5* und EphA4 präsentieren in der VZ des vTC zwar eine nichtgradierte, aber trotzdem inhomogene Expression. Der Ligand *efnb2* wird stark in den Regionen des AEP und der IGE exprimiert (Abb.4-24 E und F, schwarze Pfeilspitzen). In der IGE ist auch in der SVZ ein Signal zu erkennen, wobei sich zwischen der VZ und der SVZ ähnlich wie im Kortex (Abb.4-4 A und B, weiße Pfeile) ein Streifen befindet, der kein Signal aufweist (Abb.4-24 E und F, Sternchen). Das Gen *efna5* wird wie *efnb2* im Bereich des AEP exprimiert, allerdings nicht in der VZ (Abb.4-24 I und J, schwarze Pfeilspitze), sondern eher in der SVZ oder Mantelzone (MZ). Im Bereich der IGE ist das Signal allerdings in der VZ zu finden. Die mediale Grenze der Expression liegt dabei auf der Seite der mGE im Bereich der Fissur, die die mGE von der IGE trennt (Abb.4-24 I weiße Pfeilspitzen). An E16 geht die Expression von *efna5* in der VZ zurück und ist nur noch sehr medial zu finden (Abb.4-24 J, schwarze Pfeilspitze). Der Rezeptor EphA4 wird im vTC am stärksten in der SVZ exprimiert und nur leicht in der VZ. Allerdings detektiert die *antisense*-Sonde am Tag E14 im Bereich der Fissur zwischen mGE und IGE wie auch im Fall von *efna5* (Abb.4-24 I) ein hohes Level des Genproduktes (Abb.4-24 G, weiße Pfeilspitzen). An E16 ist diese regional begrenzte EphA4-Expression der VZ nicht mehr zu beobachten (Abb.4-24 H).

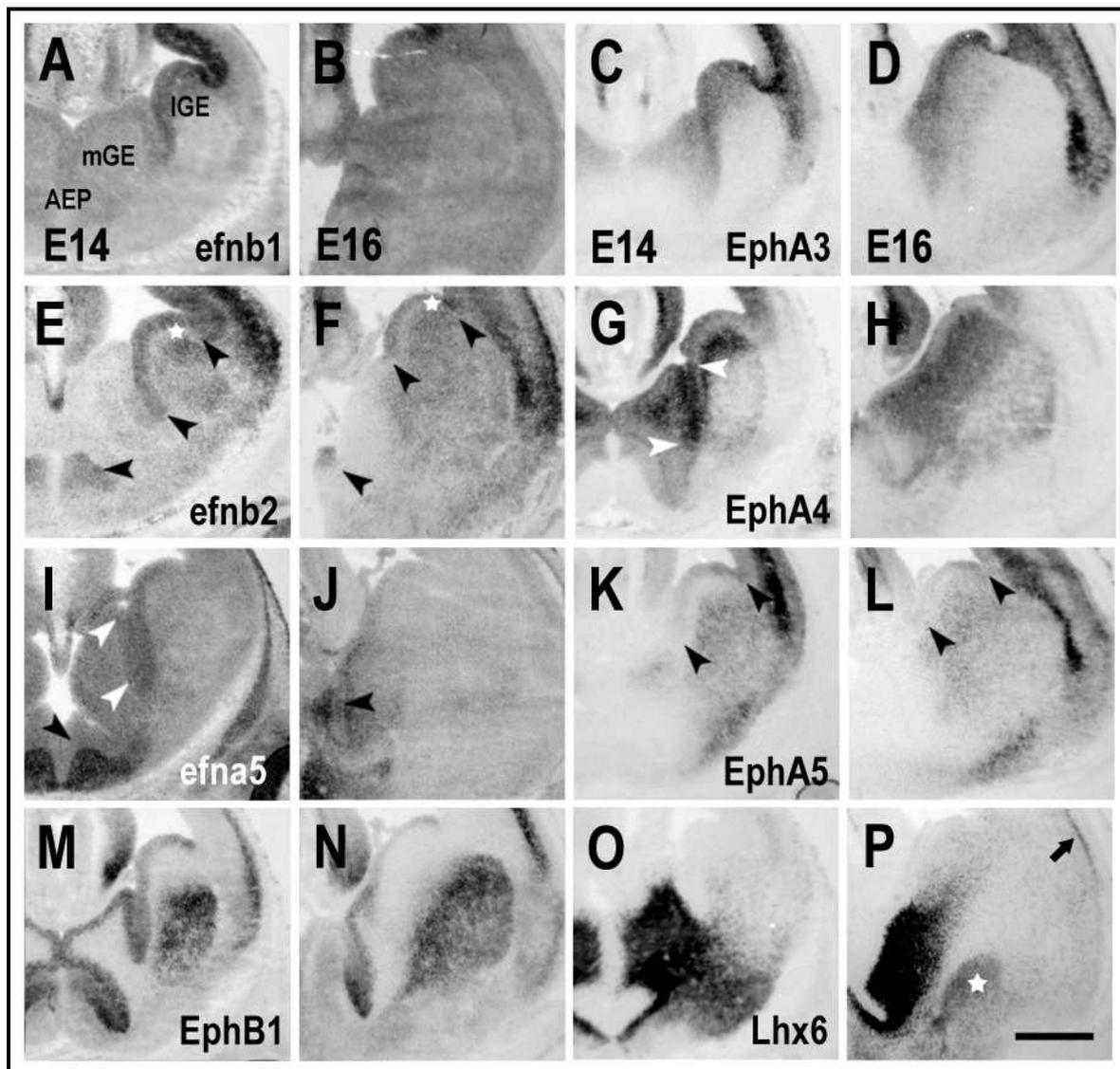


Abb.4-24: *In-situ*-Hybridisierungen an Koronalschnitten des Gehirns der Maus mit den Sonden für *efnb1* (A,B), *EphA3* (C,D), *efnb2* (E,F), *EphA4* (G,H), *efna5* (I,J), *EphA5* (K,L), *EphB1* (M,N) und *Lhx6* (O,P). Gezeigt ist das ventrale Telencephalon (vTC) mit der AEP, mGE und IGE in den Stadien E14 (Kolumne A und C) und E16 (Kolumne B und D). Medial ist links, dorsal oben. Maßstab 500 μ m.

4.6.2 Die antisense-Sonden für die Gene des ephrin-/ Eph-System markieren im ventralen Telencephalon verschiedene schichtenartige Zonen

Betrachtet man das vTC am Embryonaltag 14, stellt man fest, dass das gesamte Subpallium die Gene des ephrin-/ Eph-System exprimiert. Abb.4-25 zeigt die Expressionen des Liganden *efnb3* (A,B,C) sowie der Rezeptoren *EphB1* (E-G), *EphA5* (I-K), *EphA4* (M-O) und *EphA3* (Q-S). Die Überlagerungen der verschiedenen Expressionsmuster (Abb.4-25 D,H,L,P) zeigt eine schichtartige Verteilung der Gentranskripte innerhalb des vTC, ähnlich der Verteilungen im embryonalen Kortex. Die zwei Diagramme in Bild U der Abb.4-25 zeigen die Intensitätsverteilung der Signale der Gene *EphB1* (blau), *EphA5* (gelb), *EphA4* (grün), *EphA3* (rot) in den gezeigten Ausschnitten (farbige Rechtecke) in einem anterioren (Abb.4-25 E,I,M,Q) und einem posterioren (Abb.4-25 G,K,O,S) Abschnitt. Die Pfeilspitzen in der Abb. 4-25 U zeigen die Grenzen der

Subschichten an. Es gibt eine äußere Mantelzone (oMZ), die sich später in den anterioren Bereichen zum Rhinencephalon entwickelt, eine mittlere Zone, in der sich hauptsächlich das Striatum und das Pallidum befinden und eine innerer Abschnitt der proliferativen Zone, die durch die untersuchten Gene in weitere Subschichten geteilt werden. So wird EphB1 in der VZ sowie dem Striatum exprimiert (Abb.4-25 E-G). Von dort setzt sich die Expression von EphB1 nach medial in einem schmalen Streifen fort. Er liegt dem Pallidum medial auf und stellt die Grenze zur SVZ dar. Die SVZ selbst exprimiert die Gene EphA3, EphA4, EphA5 (Abb.4-25), sowie efn2. Efn2 wird über die gesamte SVZ homogen exprimiert (bei E14 nicht gezeigt, für E16 siehe Abb.4-26 A,B).

Die anderen Gene sind in der Reihenfolge EphA3, EphA4 und EphA5 von innen (ventrikulär) nach außen (oMZ) in verschiedenen Subschichten exprimiert. Daher sind zwischen VZ und MZ drei Subschichten der SVZ auszumachen: von der VZ zur MZ existiert eine iSVZ (innere), mSVZ (mittlere) und oSVZ (äußere bzw. outer; Abb.4-25 V, W). EphA3 erstreckt sich dabei in einem leicht abfallenden Gradienten von der VZ bis in oSVZ und schließt an der Grenze zur MZ ab. Im Bereich der Pallium-Subpallium-Grenze verstärkt sich das Signal, zeigt eine scharfe Grenze und zieht in die SVZ des Neokortex hinüber (Abb.4-25 Q-S). Das Signal von EphA4 beginnt ebenfalls in der VZ, ist hier allerdings schwach, und ist am stärksten in der mSVZ zu finden. In den anterioren Bereichen erstreckt sich das Signal bis an das sich differenzierende Striatum heran, wohingegen in den posterioren Regionen zwischen dem starken EphA4-Signal und dem Striatum ein schwächer EphA4-gefärbter Streifen gelegen ist, die oSVZ (Abb.4-25 M-O). Die Überlagerung der Färbemuster von EphA3 und EphA4 zeigt, ähnlich wie im embryonalen Kortex, einen Überlappungsbereich in der iSVZ (Abb. 4-25 D,H,L). Diese Subschicht der SVZ wird zB. von dem Liganden efn2, der sowohl in VZ als auch in der SVZ der IGE exprimiert ist, freigelassen (Abb. 4-24 E, F Sternchen). Die Expression des Rezeptors EphA5 erstreckt sich im Gegensatz zu EphA3 von der MZ bis die mSVZ. In den anterioren Regionen überspannt das Signal dabei das Striatum vollständig. Nach posterior hin nimmt die Signalintensität der EphA5-Sonde innerhalb der SVZ zu, und zwar in der schwach, EphA4-gefärbten oSVZ. Dies ist in Abb.4-25 U deutlich zu sehen, der Peak von EphA5 (gelb) schiebt sich im posterioren Abschnitt zwischen das Signal von EphB1 (blau) und EphA4 (grün) (Abb.4-25). Die Überlagerungen der beiden Signale verdeutlichen dies ebenfalls. In Abb.4-25 P (Schnitte aus einem posterioren Bereich) sind die Expressionsmuster von EphA5 (rot), EphA4 (grün) und EphB1 (blau) überlagert. Dabei ergeben sich die verschiedenen spezifischen Streifen. Die VZ ist blau gefärbt und EphB1-positiv. Der breite obere Bereich der SVZ ist grün und demnach EphA4-positiv. In Richtung MZ folgt ein roter EphA5-positiver Streifen. Hierbei gibt es eine schmale Zone in der das EphA4- und EphA5- Signal direkt überlagert sind, was sich in einem gelben Streifen äußert. Weiter nach außen schließt sich wieder ein blauer EphB1-positiver Streifen an, der allerdings nicht mehr zur SVZ gehört. Die sich aus den Überlagerungen ergebenden Zonen sind in den Bildern V (anterior) und W (posterior) der Abb.4-25 skizziert.

Der Ligand efn3 (Abb.4-25 C und D) wird vor allem in der MZ exprimiert. Die Expression dehnt sich zwar weit bis ins Innere des vTC aus, allerdings ist das intensivste Signal immer in den ventralen Bereichen zu finden. Das Signal von efn3 erstreckt sich von den septalen Strukturen anterior bis zum

Amygdalakomplex posterior. Im übrigen markiert die efnb3-Sonde das embryonale Hirn der Maus von anterior nach posterior immer ventral, im Gegensatz zur efnb2- Sonde, welche dorsale Strukturen markiert.

Abb.4-25 T zeigt die Überlagerung von Lhx6 und EphB1. Lhx6 weist hierbei einen Bereich der SVZ aus, in dem Migration vom mGE abstammenden Neuronen stattfindet. Der Bereich umfasst die gesamte SVZ und überspannt somit alle Subschichten. Abb.4-25 X zeigt anterograd Dil-markierte TCA (rot) und deuten den Korridor an, in dem die Axone das vTC passieren. Dieser Kanal liegt unterhalb der SVZ (siehe auch IC in Abb.4-23 C und F) und ist somit ein zusätzlicher Kanal, der von dem der migrierenden Zellen separiert ist. vermutlich der streifenförmige Ausläufer des Striatums, medial des Pallidums

Tabelle 4-8: Expressionen wichtiger Gene des ephrin-/ Eph-Systems in den Subschichten des vTC. Die drei Graustufen entsprechen dem Expressionslevel.  schwach,  mittel,  stark,  nicht exprimiert, Das „G“ deutet einen Gradienten an.

Gene	VZ	iSVZ	mSVZ	oSVZ	Striatum
EphA3	G				
EphA4					
EphA5	G				
EphB1	G				
efnb2					
Lhx6					

Abb.4-25: *In-situ*-Hybridisierungen an Koronalschnitten des Gehirns der Maus mit den Sonden für efnb3 (A,B,C), EphB1 (E,F,G), EphA5 (I,J,K), EphA4 (M,N,O), EphA3 (Q,R,S). Gezeigt ist das linke ventrale Telencephalon im Altersstadium E14. Die Bilder D,H,L,P,T sind Falschfarbendarstellungen der Überlagerungen der Expressionsmuster von EphA3, EphA4, EphA5, EphB1 und Lhx6. V und W sind Skizzen der Schichtungen, die aus den Überlagerungen resultieren. V ist anterior und W posterior. U zeigt graphisch die Intensitätsverläufe der Signale aus den ausgezeichneten Ausschnitten. Die Farbcodierung der Graphen entspricht der Farbcodierung der gezeigten Ausschnitten. Bild X zeigt anterograd Dil-markierte TCA, die Injektionsstelle liegt im Thalamus, mit DAPI-Gegenfärbung, Medial ist links, dorsal oben. Maßstab 500 µm. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.

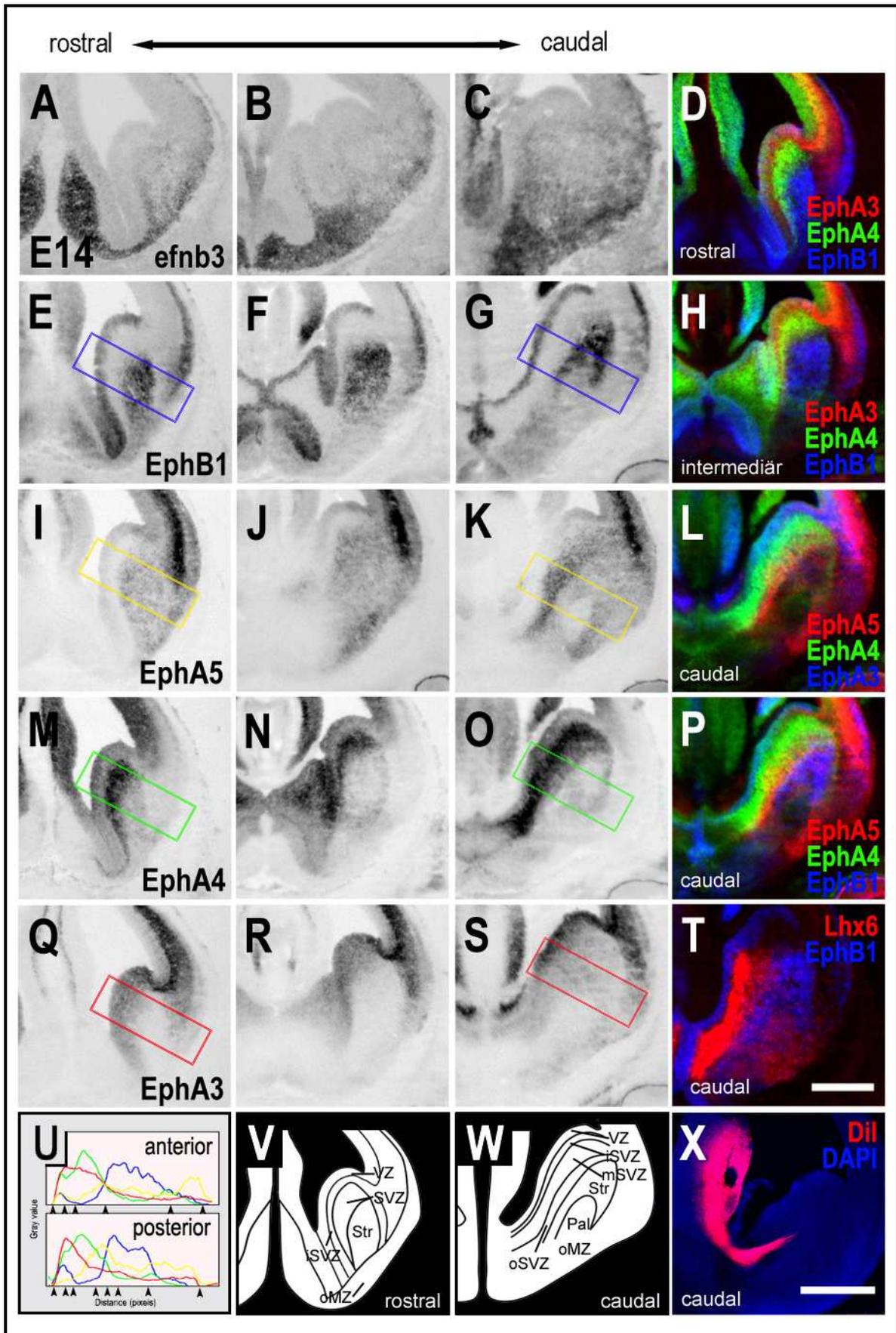


Abb.4-25:

4.6.3 Die Ausdehnung des sich entwickelnden Striatums führt zu einer Vermischung der Unterschichten innerhalb der SVZ

Die Situation im am Embryonaltag 16 ist ähnlich der dem Tag E14. Das vTC vergrößert sich zu Lasten der Ventrikel aus (Ventrikel schrumpfen, vergleiche Nissl-Färbung in Abb.4-23) und die Eminenzen verschmelzen. Die VZ schrumpft ebenfalls und aufgrund der zunehmenden Anzahl von Axonen breitet sich die IC immer weiter aus. Die schichtartige Verteilung der Gentranskripte im vTC bleibt dabei weitestgehend erhalten. Allerdings werden die Subschichten der SVZ durch das Ausdehnen der IC zusammen geschoben (vergleiche Abb.4-25 und 4-26). Wie die Abb.4-26 R zeigt, wird dadurch die SVZ, in der die Lhx6-positiven Interneuronen entlang migrieren, wesentlich schmaler. Das hat Einfluß auf die Expressionsmuster der Gene EphA4 und EphA5, welche die iSVZ und oSVZ am Tag E14 definieren. Wie in Abb.4-26 H zu sehen, geht die Expression von EphA4 bei E16 im posterioren Abschnitt etwas in Richtung des Ventrikel zurück. Hier bleibt eine etwas schwächere Expression übrig, die sich mit der EphA5 Expression überlagert (Abb.4-26 Q). Im medialen Bereich überlagert die Expression von EphA4 und EphA5 komplett, sodass die Zellen der zwei Schichten sich nun miteinander vermischen (Abb.4-25P).

Die Expressionen der Liganden efn2 und efn3 bleiben im vTC unverändert. Efn3 breitet sich lediglich mit dem Wachstum des Hirns in den differenzierenden Feldern des Subpalliums weiter aus. Der Rezeptor EphA8 wird jetzt am lateralen Rand des sich entwickelnden Striatums, direkt unterhalb des „lateralen migratorischen Strom“ (lms) detektiert (Abb.4-26 K und L). Die Expressionsstärke von EphA3 (Abb.4-26 E und F) ist am Tag E16 im vTC gegen über E14 (Abb.4-25 Q-S) geringer. Vor allem in der VZ der cGE ist ein deutlicher Rückgang der Signalstärke zu verzeichnen (vergleiche Abb.4-25 S und Abb.4-26 F).

Das Expressionsmuster von EphB1 zeigt am Tag E16 gegenüber E14 keine wesentlichen Unterschiede in der Signalstärke. Jedoch machen sich die morphologischen Veränderungen des vTC bemerkbar (Abb.4-26 M und N). Die Ausbreitung der IC sowie die Vergrößerung des Pallidums führen in den in diesen Bereichen zu Änderungen des Färbemusters. Das Pallidum zeichnet sich durch eine schwache Markierung ab. Der in Abb.4-25 P und T dargestellte blaue EphB1-positive Korridor zwischen Pallidum und oSVZ ist durch das Ausbreiten der IC am Tag E16 weitestgehend verschwunden.

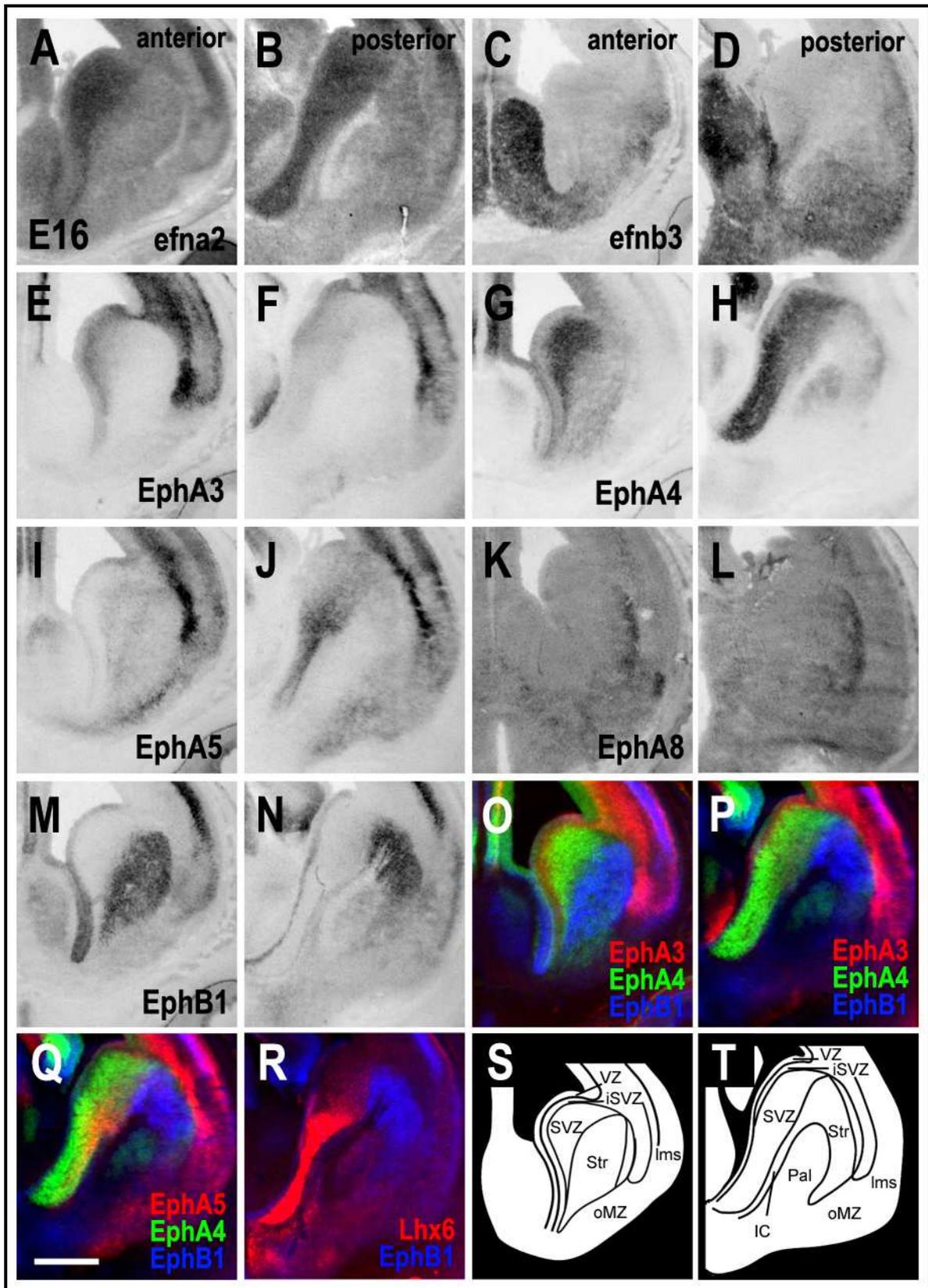


Abb.4-26: *In-situ*-Hybridisierungen an Koronalschnitten des Gehirns der Maus mit den Sonden für *efna2* (A,B), *efnb3* (C,D), *EphA3* (E,F), *EphA4* (G,H), *EphA5* (I,J), *EphA8* (K,L) und *EphB1* (M,N). Gezeigt ist das linke ventrale Telencephalon im Altersstadium E16. Die Bilder O bis R sind Falschfarbendarstellungen der Überlagerungen der Expressionsmuster von *EphA3*, *EphA4*, *EphA5*, *EphB1* und *Lhx6*. S und T sind Skizzen der Schichtungen, die aus den Überlagerungen resultieren. S ist anterior und T posterior. Medial ist links, dorsal oben. Maßstab 500 μ m. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.

5. Diskussion

In einem Kubikmillimeter der grauen Substanz der menschlichen Hirnrinde sind ca. 40.000 Neuronen enthalten. Jede Pyramidenzelle darunter bekommt von ca. 10.000 weiteren Neuronen elektrische Impulse über die dafür geschaffenen Kontakte, die Synapsen. Die zu kontaktierenden Neuronen liegen dabei nicht selten in anderen, weit entfernten Bereichen des Gehirns. So existieren weitverzweigte, hochkomplexe neuronale Netze im gesamten Hirn. Die Anzahl, der dafür etablierten Synapsen, wird auf 10^{14} bis 10^{15} geschätzt. Verbindungen die nahezu punktgenau und hochspezifisch ausgebildet werden. Es ist erstaunlich, dass dies mit Molekülen aus einem Bestand von gerade mal ca. 30.000 Genen verwirklicht werden kann. Unter diesen Genen sind zudem nur wenige Klassen, wie die Klassen der Semaphorine, Ephrine und Netrine, dafür bekannt, Genprodukte zu bilden, die in der Lage sind, Neuronen sowie ihre Fortsätze zu lenken und als Positionssignale fungieren zu können. In Anbetracht einer so geringen Gen-Zahl, ist es von Nöten, dass die Moleküle, um einen dreidimensionalen Raum aufzuspannen, in dem jeder Punkt definiert ist, einer gradierten Weise, also in unterschiedlichen Konzentrationen exprimiert werden (Sperry, 1963). Die Kodierungsvielfalt erhöht sich weiter, wenn die Moleküle in Kombination vorkommen. So kann zum Beispiel eine Zelle im Kortex über einen bestimmten „Molekül-code“ erkannt und angesteuert werden.

Um das Verständnis über die im Hirn ablaufenden entwicklungsbiologischen Prozesse zu erweitern, wäre es wichtig die Expressionsorte möglicherweise daran beteiligter Gene genauer zu kennen, um daraus Schlüsse über ihre mögliche Funktion ziehen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurden daher, durch Anwendung der *In-situ*-Hybridisierung, die Verteilungen der Gentranskripte des ephrin-/ Eph-Systems in dem sich entwickelnden Gehirn der Maus des Stammes C57BL/6 untersucht. Nur durch eine detailgenaue Analyse der dynamischen und hochkomplexen Expressionsmuster und den Vergleich dieser untereinander, gelingt es einen logischen Bezug zu den im Gehirn ablaufenden entwicklungsbiologischen Prozessen herauszuarbeiten. Dabei ergeben sich mögliche Interaktionspartner (Ligand und Rezeptor) und vor allem neue molekular spezifizierte Kompartimente, welche die bisher bekannten anatomischen Strukturen sinnvoll ergänzen und diese mit den neuesten Erkenntnissen der Entwicklungs- und Zellbiologie des Gehirns in Einklang bringen.

Die vielfältige Literatur, die über das ephrin-/ Eph-System in den Datenbanken zu finden ist, zeigt bislang nur unvollständige Untersuchungen der Expressionsmuster. Sie beziehen sich meist auf ein mögliches Paar von Interaktionspartnern in einem System, wie zum Beispiel dem somatosensorischen System (Gao et al., 1998; Dufour et al., 2003). Im Allgemeinen mangelt es entweder an der Vollständigkeit der Mitglieder der Genfamilie oder an den untersuchten Altersstadien (Mackaretschian et al., 1999). Für die Interpretation der Daten ist es von äußerster Wichtigkeit sämtliche mögliche Interaktionspartner zu kennen, sowie die für die jeweiligen entwicklungsbiologischen Prozessen relevanten Altersstadien zu betrachten. Es gilt die Expression zur richtigen Zeit am richtigen Ort zu beobachten. In dieser Arbeit wurden vollständiger

Weise alle Mitglieder der Klasse A sowie der Klasse B untersucht. Um eine zeitliche Charakterisierung der Expressionsmuster zu erreichen, wurden die embryonalen Altersstadien E14, E16, E18 sowie die postnatalen, juvenilen Stadien P6 und P28 analysiert. Dabei lag das Augenmerk auf der Entwicklung des cerebralen Kortex, des Thalamus sowie des ventralen Telencephalons, deren Genese und Differenzierung eng miteinander verwoben sind.

5.1 Technische und experimentelle Aspekte

5.1.1 *In-situ*-Hybridisierung mit antisense-RNA-Sonden an Kryostatschnitten

Für die *In-situ*-Hybridisierung wurden Dig-markierte *antisense*-RNA-Sonden verwendet, die in einer eigenständigen Arbeit hergestellt und in Bezug auf Spezifität und Sensitivität vollständig charakterisiert wurden (Merz, 2003). Es ist deshalb sicher, dass die Sonden keine Kreuzhybridisierungen eingehen. So zeigen z.B. die Sonden der Rezeptoren EphA3 und EphA6, die in der Klasse der A-Rezeptoren sehr nahe verwandt sind, in Abb.4-6 E (EphA3) und N (EphA6) innerhalb der CP ein komplementäres Muster, was ein deutliches Anzeichen dafür ist, dass die Sonden keine Transkripte des jeweiligen anderen Gens detektieren. Kreuzhybridisierungen mit anderen Genen können nicht ausgeschlossen werden, jedoch wurde deren Wahrscheinlichkeit bei Wahl der Sondensequenzen durch Blast-Untersuchungen gegen das Mausgenom reduziert.

Da jede Nukleotidsequenz, die als RNA-Sonde verwendet wird und ein nicht-kongruentes Expressionsmuster zu einer anderen genspezifischen Sequenz zeigt, für dieses Gen als nicht-spezifisch gelten muss, können die verschiedenen Sonden untereinander im Sinne einer unspezifischen Kontrolle verwendet werden. Aus diesem Grund wurde auf den Gebrauch von *sense*-RNA-Sonden, die als nicht-komplementäre Sequenzen für die getesteten Sonden „Nonsense-Sequenzen“ darstellen, verzichtet.

Die Sensitivität der Sonden ist abhängig von deren Länge und dem jeweiligen Markierungsgrad durch die eingebauten *Digoxigenin*-Moleküle. Bei der Synthese der Sonden wurde darauf geachtet, dass durch entsprechende Längen- und Sequenzwahl die Sonden eine ähnliche Sensitivität erreichen. Die entstandenen Sensitivitätsunterschiede der verschiedenen Sonden halten sich somit in Grenzen (Merz, 2003). Da bei der *In-situ*-Hybridisierung auf eine optimale Signaldetektion Wert gelegt wurde, sind die in dieser Arbeit gezeigten Intensitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Expressionsmustern trotzdem nur als Tendenzen zu betrachten, welche allerdings in zahlreichen Wiederholungen bestätigt werden konnten. Beispielsweise lässt sich feststellen, dass die Liganden der A-Ephrine gegenüber allen anderen Liganden und Rezeptoren schwächer exprimiert sind. Die Genprodukte von *efna1* und *efna4* konnten so nicht zweifelsfrei detektiert werden. Vermutlich liegt die Transkriptzahl unterhalb der Detektionsschwelle der Sonden. So ist es wohl auch im Alterstadium P28, wo die A-ephriene scheinbar nicht exprimiert sind. Allerdings werden die EphA-Rezeptoren exprimiert und aktiviert werden sollten.

Betrachtet man neuronales Gewebe, ist die Bemerkung, dass man durch die Hybridisierung mit RNA-Sonden nur mRNA und nicht das Protein als finale Genprodukt detektiert nicht trivial. Neuronen

zeichnen sich durch ihre Dendriten und Axone aus. Über diese Zellfortsätze kommunizieren die Nervenzellen mit unter Umständen weitentfernten Zielgebieten. Hierfür wird ein ganzes Arsenal an Proteinen zur Verfügung gestellt. Die für deren Translation benötigte mRNA wird allerdings im Zellkörper gebildet und zunächst dort lokalisiert. Somit liegen Einsatz- und Bildungsort weit auseinander, was für die Interpretation möglicher Funktion anhand von RNA-Expressionsmustern nicht ganz unerheblich ist. Kudo et al. vergleicht in einer Arbeit die Lokalisation der mRNA von EphA3 mit der Lokalisation des entsprechenden Proteins bei der Maus (Kudo et al., 2005). Die von ihm beschriebenen Expressionsmuster der EphA3-mRNA sind mit den hier gezeigten völlig identisch. Es gibt eine starke Expression im Thalamus sowie im Kortex in der SVZ, IMZ und CP (Abb.4-4 D-F; Abb.4-20 D-F). Auf Proteinebene allerdings ist im Thalamus kein Signal zu erkennen und im Kortex nur in der SVZ und IMZ. Zusätzlich zeigt die interne Kapsel (IC) im ventralen Telencephalon (vTC) ein EphA3-positives Signal. Der Rezeptor wird demnach auf den Axonen der thalamokortikalen sowie kortikofugalen Fasern benötigt und direkt nach der Translation dorthin transportiert. Da im Bereich der IC im vTC, wo die Axone sehr gebündelt vorkommen auf RNA-Ebene kein Signal der Sonden zu beobachten ist (Abb.4-26 E und F), ist zu vermuten, dass die Transkriptzahl dort zu gering ist, um durch die *In-situ*-Hybridisierung detektiert zu werden. Somit sollte auch für die anderen Sonden nicht angenommen werden, dass entlang der Axone ein spezifisches Sondersignal zu finden ist. Dies muss allerdings nicht zwingend für die axonalen Wachstumskegel und die Axonterminalien gelten, wo das Protein zum Einsatz kommt. Hier kann die Transkriptmenge durchaus ausreichend sein, um mit einer Ribo-Sonde detektiert zu werden. So konnte Mitte der 90iger Jahre durch die Lokalisation der mRNA von Geruchsrezeptoren in den Axonterminalien der olfaktorischen Sinneszellen wichtige Folgerungen über die Funktionsweise des Geruchssystems gezogen werden (Ressler et al., 1994; Vassar et al., 1994). In der IMZ der embryonalen Kortexanlage treten gehäuft Axonterminalien sowie Wachstumskegel auf, die dadurch ein Signal verursachen und vermutlich wie im Fall von EphA5 und EphA7 die IMZ genspezifisch markieren, wo zu wenig Zellen vorkommen, die ein so starkes Expressionssignal hervorrufen können (Abb:4-5 E,F).

Da in dieser Arbeit *In-situ*-Hybridisierungen an koronalen Schnittserien durchgeführt wurden, sind Gradienten nur in dieser Ebene direkt festzustellen. In anterior-posteriorer Richtung lassen sich Gradienten demzufolge nicht direkt darstellen. Über den Vergleich von mehreren aufeinander folgenden Schnittserien sind allerdings Rekonstruktionen möglich.

5.1.2 Darstellung von überlagerten Expressionsmustern in Falschfarben

Um die Färbemuster der verschiedenen RNA-Sonden besser analysieren und miteinander vergleichen zu können, wurden sie fotografisch dokumentiert. Eine Bildoptimierung wurde in herkömmlicher Weise erreicht, indem ausschließlich Grauwertkorrekturen vorgenommen wurden. Zum Vergleich verschiedener Sonden wurden deren Signale anschließend in einem Bild vereinigt, in dem die Strukturen der jeweiligen Schnitte genau auf einander ausgerichtet und den einzelnen Kanälen des RGB-Farbsystem zugewiesen wurden. Dabei wurden nur Bilder von Schnitten verwendet, die direkt aufeinander folgten und morphologisch einwandfrei waren. So sind die hierfür genutzten Schnitte, bei einer Schnittdicke von 20 µm, maximal 40 -

60µm auseinander, wodurch größere Struktur- sowie Größenänderung des Hirngewebes auszuschließen sind. Abb.5-1 verdeutlicht dies. Die Bilder A und B zeigen mit einer EphA3-Sonde hybridisierte, aufeinander folgende, 80µm auseinander liegende Schnitte. Die Signale der invertierten Bilder, die die Kanäle rot und grün belegen, erscheinen bei optimaler Überlagerung gelb. Wie in Bild C der Abb.5-1 zu erkennen ist, ist dies mit sehr kleinen Abweichungen sehr gut der Fall.

Dieses Verfahren des Vergleichs zweier Färbemuster beinhaltet zwei Probleme. Das erste Problem ist, dass auch minimale Größen- und Strukturänderungen sich bei der Überlagerung der Muster zu Verschiebungen führen und dies unter Umständen zu einer unvollständigen Farbüberlagerungen führt. Allerdings tritt dies bei sorgfältiger Auswahl nur in sehr geringen Dimensionen auf. Bei sehr feinen Strukturen, wie in Bild C der Abb.5-1 durch die Pfeilspitzen markiert, treten dann Probleme bei der Interpretation auf. Hier kann nicht schlüssig beurteilt werden, ob eine Überlagerung vorhanden ist oder nicht. In einem solchen Fall muss die Überlagerung mit anderen Schnitten reproduziert werden. Ein zweites Problem ist die Intensität. Werden Signale unterschiedlicher Intensität überlagert, führt dies zu einer Farbmischung, die nicht deutlich gelb ist. In Bild D der Abb.5-1 ist dies gezeigt. D3 und D4 zeigen die Überlagerungen von einem 100%igen Signal (D1) und einem Signal abgestufter Intensität (D2), die jeweils dem roten und grünen Kanal zugewiesen wurden (D3 hat D1 im roten Kanal, D4 hat D1 im grünen Kanal). Hierbei zeigt sich erstens, dass sich immer ein Farbumschlag ergibt, auch wenn ein Signal schwächer ist. So ergibt sich eine Orangefärbung bei einem schwachen grünen Signal, die sich durchaus detektieren lässt. Zweitens ist festzustellen, dass, vergleicht man D3 mit D4 in Abb.5-1, ein schwaches rotes Signal gegenüber einem starken grünen (D4) schwerer zu diskriminieren ist als andersherum (D3). Es ist somit ratsam Expressionsmuster schwacher Intensität im RGB-Bild dem grünen Kanal zuzuweisen. In D5 sind alle möglichen Farbabstufungen der Kombination rot und grün gezeigt, die sich bei verschiedenen Intensitätsunterschieden ergeben. D6 der Abb.5-1 zeigt Überlagerungen von homogenen Signalen in den Kanälen rot, grün und blau, dabei ergibt sich bei einer Überlagerung von gleichstarken Signalen ein reines Weiß.

Das erste Problem, das durch den Vergleich zweier Schnitte aufkommt, ließe sich durch eine Mehr-Farben-*in-situ*-Hybridisierung umgehen. Struktur- und Größenänderungen spielen keine Rolle. Allerdings ist das Problem der verschiedenen Signalintensitäten auch dabei von Belang. Außerdem ist eine Mehr-Farben-*in-situ*-Hybridisierung mit vergleichbarer Sensitivität zu der für diese Arbeit genutzte Methode (siehe 3.2.9) nur schwer zu verwirklichen.

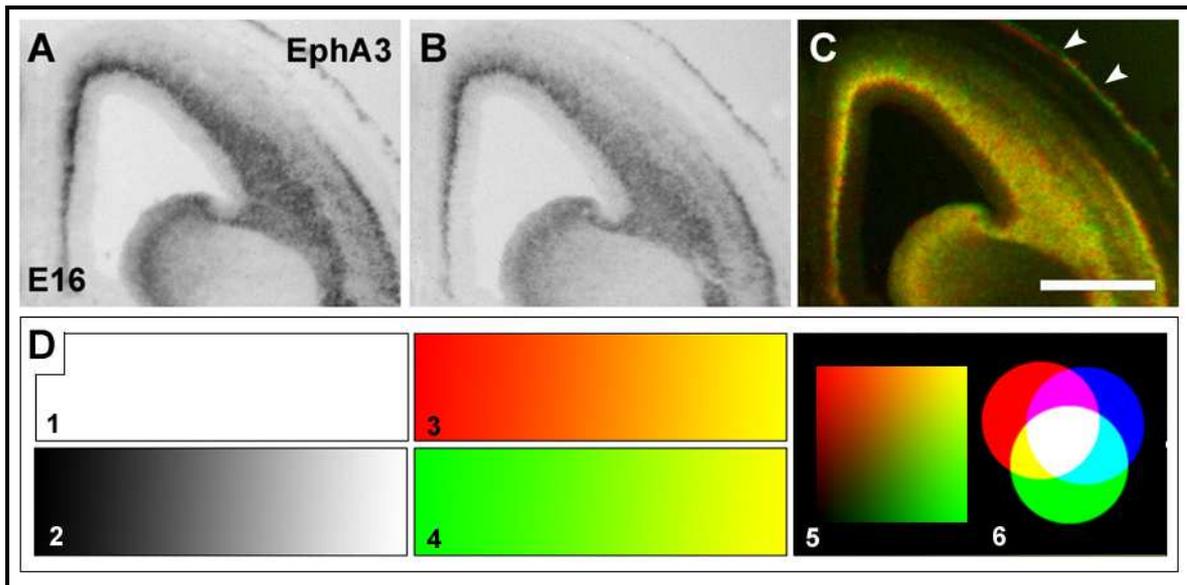


Abb.5-1: *In-situ*-Hybridisierung mit RNA-Sonden für EphA3 im Altersstadium E16. A und B sind konsekutive Schnitte und liegen 80 μm auseinander. C zeigt die Überlagerung der Signale der invertierten Bilder in A und B. A wurde dem roten und B dem grünen Kanal des RGB-Bildes zugeteilt. Die Pfeilspitzen zeigen Markierungen in der Kopfhaut, die nicht vollständig überlagern. In D sind mögliche Überlagerungen gezeigt. D1 zeigt ein homogenes Feld mit 100% Signalstärke, D2 zeigt abgestufte Intensitäten. D3 und D4 sind kombinierte Überlagerungen von D1 und D2 (D3 hat D1 im roten Kanal und D4 hat D1 im grünen Kanal). In D5 sind die Intensitätsabstufungen (D2) zueinander um 90° gedreht überlagert. Man erhält alle Farbabstufungen von rot und grün. D6 zeigt die Überlagerung von ungradierten Signalen in den Kanälen rot, grün und blau und die so entstehenden Mischfarben. Medial links, dorsal oben, Maßstab 500 μm

5.2 Grundlegende Ideen für die Interpretation der Expressionsmuster

Für die anstehende Interpretation der erhaltenen Expressionsmuster in den verschiedenen Altersstadien der Hirnentwicklung der Maus gilt es einige grundsätzliche Vorüberlegungen zu treffen, die helfen werden, die Vergleiche der Expressionsmuster für die Interpretation zu systematisieren und zu strukturieren.

5.2.1 Typisierung der Expressionsmuster

Ist eine zelluläre Auflösung des Signals durch eine In-Situ-Hybridisierung möglich?

Der finale Schritt bei der *In-situ*-Hybridisierung ist die Detektion der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden mit dem entsprechenden Antikörper. Die Visualisierung erfolgt colorimetrisch. Hierbei dient 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) als Substrat für die alkalische Phosphatase. Es wird zunächst zu einem Indoxyl dephosphoryliert und anschließend zu einem wasserunlöslichen Indigofarbstoff oxidiert. Als Oxidationsmittel dient Nitrotetrazoliumblau (NBT), das bei dieser Reaktion zu einem unlöslichen blauen Formazan reduziert wird und somit farbverstärkend wirkt.

Bei einer Detektion durch Ausfällen von schwerlöslichen Substanzen lagert sich das umgesetzte Substrat in unmittelbare Nähe der gebildeten RNA-Hybride ab. Bereits die ersten Umsätze wirken als Kristallisationskeime und triggern das weitere Ausfällen aus der Substratlösung. Bei sehr vereinzelt im Gewebe liegenden Zellen, die für die jeweilige Sonde positiv sind, wird diese Ablagerung auf den Bereich der

Zelle beschränkt sein. Ist allerdings der gesamte Gewebeverband oder eine Gruppen von dichtgepackten Zellen positiv für die gewählte Sonde, führt dies zu einer Ablagerung über die gesamte exprimierende Region. Das Signal einer einzelnen Zelle ist dann von dem Gesamtsignal nicht mehr zu trennen. Vereinzelt Zellen die negativ für das Transkript sind und dementsprechend nicht markiert sein sollten, werden ebenfalls von dem umfassenden Signal überlagert und können positiv erscheinen. So mit kann es vorkommen, dass in einer scheinbar homogen gefärbten Region sich auch Zellen befinden, die nicht das Transkript exprimieren.

Die Art des Signals, zellulär oder nicht zellulär, hilft somit bei der Interpretation des Expressionsmusters. Das Expressionsmuster von *efnb3* an P28 im Kortex, wie in Abb.4-8 R, zeigt zelluläre Markierungen, die über den gesamten Kortex scheinbar wahllos verstreut liegen. Außerdem treten die Markierungen in der weißen Substanz dichter auf (siehe Abb.4-8 R kleines Fenster). Das Muster deutet also auf eine Zellpopulation hin, die in geringerem Maße im Kortex vorkommen. Somit könnten die Markierungen der *efnb3*-Sonde von Oligodendrozyten stammen, die vor allem in der weißen Substanz die Myelinscheiden der Axone bilden.

Grundsätzlich gibt es residente und transportierte Expressionsmuster

Beim Betrachten der Expressionsmuster fällt auf, dass sich vor allem während der Embryonalentwicklung die Expressionsmuster mit der Morphogenese des Gewebes verändern. Dadurch, dass Neuronen im Gehirn grundsätzlich an anderen Orten gebildet werden, als sie später benötigt werden, kommt es im Verlauf der Entwicklung des Gehirns zu massiven Zellmigrationen. Zellen, die nun sehr früh, nämlich schon innerhalb der proliferativen Schichten bestimmte Faktoren exprimieren und diese bei der Zellmigration nicht wieder abschalten, transportieren diese Faktoren in ihre Zielgebiete. Ein Beispiel dafür sind die *EphA3*-exprimierenden Zellen (Abb.4-4). Der Rezeptor wird ausschließlich embryonal exprimiert und ist anfangs in SVZ der Kortexanlage zu finden. Im Verlauf der kortikalen Entwicklung taucht das Signal von *EphA3* zunehmend in der CP auf. Die Zellen beginnen demnach mit der Expression von *EphA3* in der SVZ und wandern anschließend in die CP. Einzelne diffuse Markierungen sind auch auf der Strecke zwischen SVZ und CP zu finden, was die Annahme von migrierenden Zellen bestärkt. Eine *transportierte* Expression ist also mit Zellbewegungen assoziiert. In Ausnahmefällen kann der Eindruck einer Musterbewegung durch die zeitliche Reihenfolge der Genaktivierung entstehen, wie vermutlich bei *EphA5* der als erstes in der oSVZ exprimiert ist und erst später in der uSVZ angeschaltet wird.

Im Gegensatz dazu gibt es auch *residente* Expressionsmuster. Trotz ständiger Strukturänderungen im Verlauf der Morphogenese des Gehirns bleiben solche Expressionsmuster konstant. Der Ligand *efnb1* (Abb.4-3 A und D) wird wie der Rezeptor *EphA3* ebenfalls ausschließlich embryonal exprimiert, ist dabei aber grundsätzlich auf die VZ beschränkt. Während der Neurogenese werden sekundlich tausende von Neuronen in der VZ geboren, wobei die VZ sich ausdehnt und wieder zusammenzieht bis sie schließlich ganz verschwindet (Bayer and Altman, 1991). Auf die Expression von *efnb1* in der VZ hat der zelluläre Turnover keinen Einfluss. Sie bleibt stets auf die VZ beschränkt. Offensichtlich wird *efnb1* sofort abgeschaltet, wenn die Zellen die VZ verlassen. Die VZ-Markierung geht also ständig auf neue Zellen zurück.

Ein anderer Typ eines residenten Expressionsmusters ist die Expression des Rezeptors EphB1 (Abb.4-3 C und F). Im embryonalen Kortex ist dieser ausschließlich in der CP exprimiert und zwar nur in den zukünftigen infragranulären Schichten (Abb.4-6 G). Die Expression dieses Faktors ist wie im Falle von *efnb1* ebenfalls fest mit einer Zone verbunden. Allerdings müssen die Zellen erst in diese Zone einwandern und ein regulierendes Signal lesen, um mit der Expression von EphB1 zu beginnen. Mit dieser an ihrem Zielort angekommenen Zelle bleibt EphB1 dann jedoch assoziiert. Später geborene supragranuläre Neuronen werden für dieses Signal unempfindlich sein und kein EphB1 exprimieren.

5.2.2 Die Besonderheiten des efn-/ Eph-Systems

Wie promisk ist das efn-/ Eph-System?

Ein Weg zu verstehen, wie das efn-/ Eph-System bei den verschiedenen entwicklungsbiologischen Prozessen involviert sein könnte, war herauszufinden, welcher Ligand mit welchem Rezeptor interagiert. Dabei zeigte sich Bemerkenswertes. Verschiedene Bindungs- und Affinitätsstudien belegen, dass bis auf wenige Ausnahmen jeder Ligand mit jedem Rezeptor zumindest innerhalb einer Klasse miteinander interagieren kann. Dies bedeutet, dass jeder A-Ligand an jeden A-Rezeptor und jeder B-Ligand an jeden B-Rezeptor binden kann (Gale et al., 1996). Für den Rezeptor EphA4 sowie den Liganden *efna5* sind sogar Interaktionspartner aus der jeweils anderen Klasse beschrieben (Flanagan and Vanderhaeghen, 1998; Himanen et al., 2004). Dadurch ergeben sich eine Fülle von Bindungsmöglichkeiten zwischen 8 Liganden und 13 Rezeptoren. Man spricht im allgemein von einer promiskuitiven Liganden-Rezeptor-Beziehung. Dies ist evolutiv nur schwer zu verstehen, denn es ist nicht plausibel, dass funktionell ähnliche oder gleiche Gene im Verlauf der Evolution nebeneinander bestehen bleiben. Oft haben solche Konstellationen zur Bildung von funktionslosen Pseudo-Genen geführt, die nicht zur Expression kommen (Xie et al., 2000).

Wie promisk ist das efn-/ Eph-System in Bezug auf eine biologische Relevanz wirklich? Bindungsstudien, in denen einzelne Paare von Liganden und Rezeptoren in Lösung zusammengebracht wurden, zeigen, dass die verschiedenen Liganden mit unterschiedlichen Affinitäten an verschiedene Rezeptoren binden (Übersicht in Flanagan and Vanderhaeghen, 1998; Blits-Huizinga et al., 2004), wobei auch Bindungen mit geringen Affinitäten zu Rezeptoraktivierungen führen (Brambilla et al., 1996). Fraglich ist, ob es auch *in-vivo* zu einer derartig promiskuitiven Rezeptoraktivierung kommen kann. Bereits vor einiger Zeit konnte von Janis und Kollegen gezeigt werden, dass die Bindung der A-Liganden an ihre Rezeptoren *in-vivo* selektiver ist, als die Bindungen in Lösung (Janis et al., 1999). Sie zeigen in einem Liganden-Bindungs-Assay, dass die Fusionsproteine *efna1-Fc* und *efna4-Fc* in einem Proteinlysat vornehmlich den Rezeptor EphA4 binden und *efna2-Fc*, *efna3-Fc* und *efna5-Fc* den Rezeptor EphA7 respektive. Die in jener Arbeit gezeigten Bindungsmuster der einzelnen Fusionsproteine im Striatum der postnatalen Ratte bestätigen die Ergebnisse des Liganden-Bindungsassays. Das Muster der Bindungen von *efna1-Fc* und *efna4-Fc* korreliert mit der Verteilung der mRNA von EphA4 ebenso wie die Muster der Bindungen von *efna2-Fc*, *efna3-Fc* und *efna5-Fc* mit der Transkriptverteilung von EphA7.

Die Expressionsmuster der hier untersuchten Gene des efn-/ Eph-Systems wirken kompliziert und hinterlassen den Eindruck eines stark regulierten System. Sie werden embryonal im gesamten Hirn der Maus exprimiert. Dabei bilden sie einerseits scharfe Grenzen zwischen verschiedenen Strukturen, wie im Fall der Rezeptoren EphA3, EphA4, EphA5 und EphB1, die am Tag E14 in der Kortexanlage sehr spezifisch die einzelnen Schichten markieren und separieren (Abb.4-5 G und J). Andererseits kommt es, wie im embryonalen Thalamus, zu stark überlappenden Expressionen. Die Rezeptoren EphA3 und EphA4 sind hier in sehr großem Umfang coexprimiert, zeigen aber sehr wohl vereinzelt Unterschiede in verschiedenen pränukeären Regionen des Thalamus. Die zusätzliche, sehr differenzielle Expression des Liganden efnA5 im Thalamus führt, auch in den Regionen, in denen EphA3 und EphA4 coexprimiert sind, zu einer weiteren Unterteilung des Thalamus (Abb.4-20). Die Art der Expressionsmuster macht ein einfaches promiskuitives System, in dem jeder Ligand mit jedem Rezeptor binden kann und zu einer Rezeptoraktivierung führt, sehr unwahrscheinlich. Vielmehr suggerieren die Expressionsmuster die Vermittlung eines kombinatorischen Signals. Die Aktivierung verschiedener Kombinationen von Eph-Rezeptoren könnte unterschiedliche biologische Funktionen vermitteln. Für die zelluläre Antwort wäre dann nur der „efn-/ Eph-Code“ relevant.

Es existiert keine klassische Ligand-Rezeptor-Definition!

Im klassischen Sinn bindet ein Ligand an einen Rezeptor, der entweder membranständig auf der Zelloberfläche präsentiert ist oder löslich im Zytosol der Zelle vorkommt. Die Liganden-Rezeptor-Interaktion führt über eine Signaltransduktion zur entsprechenden Reaktion der Rezeptor tragenden Zelle. Im Falle des efn-/ Eph-Systems ist dies etwas anders. Die hier bestehende Möglichkeit des „forward und reverse signaling“, bei der durch die Liganden-Rezeptor-Interaktion sowohl auf der Liganden-Seite als auch auf der Rezeptor-Seite eine Signaltransduktion ausgelöst werden kann, wirft die Frage auf: „Wer ist Ligand und wer ist Rezeptor?“ zumal es sich jeweils um membranständige Moleküle handelt. Die Signaltransduktion kann entweder in nur eine Richtung (unidirektional) oder gleichzeitig in beide Richtungen (bidirektional) induziert werden (Henkemeyer et al., 1996; Holland et al., 1996; Bruckner et al., 1997; Anderson, 1998; Mellitzer et al., 1999). Somit fungieren beide Interaktionspartner sowohl als Rezeptor als auch als Ligand. Für die Interpretation der Expressionsmuster ist das Wissen darüber von enormer Bedeutung, da auch die Liganden tragende Zelle selbst in der Lage ist, auf entsprechende Signale der Umgebung zu reagieren. Eine migrierende Zelle oder ein Wachstumskegel kann so durch die Expression eines Liganden oder eines Rezeptors des efn-/ Eph-Systems zu ihrer Zielregion navigieren.

5.3 Prozesse der Differenzierung des Neokortex

Anhand der spezifischen Expressionen der Mitglieder des ephrin-/ Eph-Systems soll die mögliche Beteiligung der Molekülfamilie an den wesentlichen entwicklungsbiologischen Prozessen eingeschätzt werden. Entscheidende Prozesse bei der Entwicklung des Neokortex sind die Vermehrung der neuronalen Vorläuferzellen in den proliferativen Zonen um den Ventrikel herum (VZ und SVZ) sowie der Neuronen selbst. Ebenfalls die Differenzierung und radiale Migration der Neuronen und die damit verbundene finale Platzierung

in den verschiedenen Schichten sowie Arealen des Kortex. Die aus dem Subpallium stammenden tangential migrierenden Interneuronen, die sich ebenfalls in spezifischer Weise in das neuronale Netzwerk integrieren, nehmen ebenso Einfluss auf die Kortexentwicklung, sowie natürlich die Verdrahtung, die aber später behandelt wird

5.3.1 Die Expressionsmuster der Gene des efn-/ Eph-Systems im embryonalen Kortex sind hochkomplex und verändern sich entsprechend der entwicklungsbiologischen Prozesse

Die Abb.5-2 zeigt die Expressionen des gesamten efn-/ Eph-Systems im embryonalen Kortex von E14 bis E18. Dabei sind deutliche Änderungen des Expressionsmusters zu verzeichnen. Es ändert sich zum einen bezüglich der Gewebestrukturen, in denen die Gene exprimiert werden und zum anderen bezüglich der Anzahl der exprimierten Gene selbst. So werden an E14 die Transkripte von 12 Genen, an E16 von 16 und an E18 von 9 Genen detektiert. Vergleicht man die Veränderungen über die Zeit in den einzelnen Strukturen, wird deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen den Expressionsmustern und den in den jeweiligen Altersstadien ablaufenden entwicklungsbiologischen Prozessen existiert. So steht am Tag E14 im Kortex die Proliferation der Vorläuferzellen, vor allem in der VZ, im Vordergrund. An E18 sind es dagegen nur noch 3 Gene in der VZ, da die neuronale Proliferation weitestgehend eingestellt ist. Am Tag E16 findet Proliferation in der VZ und im erhöhten Maße in SVZ statt (Bayer and Altman, 1991). Dazu kommt die Bildung der CP sowie das Generieren von topografischen Signalen für die Lenkung der durch die IMZ ziehenden afferenten und efferenten kortikalen Fasern. Die Komplexität der exprimierten Gene des efn-/ Eph-Systems ist durch die vielen parallel ablaufenden Prozesse im Kortex am Tag E16 stark erhöht. An E18 zeigt vor allem die CP ein kompliziertes Muster. Durch die fortschreitende Dekondensation der Neuronen in der CP und die Bildung der einzelnen kortikalen Schichten, sind die Transkripte der verschiedenen untersuchten Gene im Kortex in radialer Richtung spezifisch verteilt.

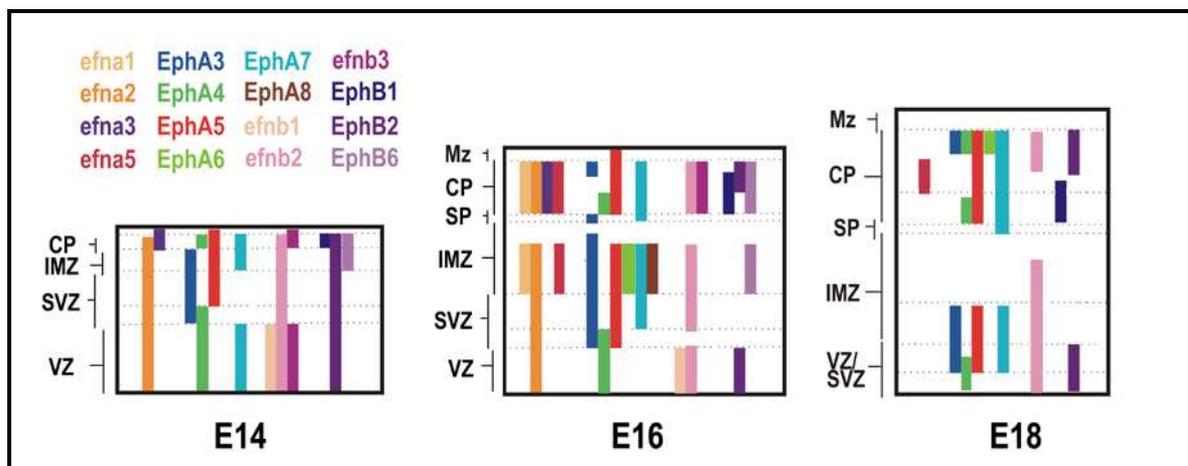


Abb.5-2: Das Schema zeigt die ausgeprägten Expressionen der Gene des efn-/ Eph-Systems in den Alterstadien E14, E16 und E18 in den Schichten des embryonalen Kortex. Die Schichtgrenzen sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Die farbigen Balken geben die Ausdehnung der Expression des jeweiligen Gens (Beschriftung in gleicher Farbe) über die Schichten der Kortex-Anlage wider. Auf die Expressionsstärke wurde in diesem Schema nicht eingegangen.

5.3.2 Der Ligand efnb1 zeigt sich als möglicher Aktivator für die neuronale Proliferation

Damit ein Gen Einfluss auf die Proliferation von Zellen nehmen kann ist es natürlich zwingend, dass das Gen auch in den entsprechenden Zonen zur richtigen Zeit exprimiert wird. Der resident exprimierte Ligand efnb1 ist ausschließlich in der VZ des Kortex zu finden. In keiner anderen hier untersuchten Struktur liefert die efnb1-Sonde ein weiteres Signal. Am Tag E14 gibt es ein efnb1-Signal um den gesamten lateralen Ventrikel herum, sodass der Ligand bei der Regulation der Proliferation von Projektionsneuronen des Palliums sowie der GABAergen Neuronen des Subpalliums beteiligt sein kann. Am Tag E16 wird efnb1 nur noch in der VZ des Palliums exprimiert (Abb.4-3 A,D). Postnatal ist efnb1 durch *In-situ*-Hybridisierung nicht mehr nachweisbar. Auch sensitivere Methoden wie PCR von cDNA aus der SVZ postnataler Tiere oder Immunoblots von Homogenisaten liefern keinen Nachweis von efnb1 (Conover et al., 2000; Stuckmann et al., 2001). In *in-vitro*-Versuchen konnte Miwa Aoki zeigen, dass nach Aktivierung von EphB-Rezeptoren durch efnb2-Fc Fusionsproteine die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen in Kortexkulturen ansteigt (Aoki et al., 2004). So ist es möglich, dass efnb1 den Rezeptor EphB2, der embryonal in der VZ, SVZ, IMZ und CP exprimiert ist, spezifisch in der VZ aktiviert und die Proliferation ankurbelt. Auch EphA4, der ebenfalls B-Liganden bindet und in der VZ und uSVZ exprimiert ist, könnte dafür in Frage kommen (siehe Tabelle 4-1; Abb.5-2).

Einen anderen Effekt, den efnb1 in der VZ bewirken könnte, wäre das Verhindern des Einwachsens von Axonen, die entweder auf dem Weg in die CP sind und dabei nicht in Richtung Ventrikel zielen dürfen oder aber von cortigofugalen Axonen, die aus der CP herauswachsen und in der IMZ um 90° abgelenkt werden müssen. Für diesen Fall wäre der Rezeptor EphB1 ein möglicher Interaktionspartner, der ausschließlich in der unteren Hälfte der CP exprimiert wird und somit auf den in den Thalamus ziehenden Projektionsneuron lokalisiert sein könnte (Abb.4-3 C,F; Abb.4-6 G). Ein solcher repulsiver Effekt wurde für das B-System in *in-vitro*-Versuchen mit retinalen Ganglienzellen des Frosches beschrieben. Dabei löste die Interaktion von Ligand und Rezeptor in beide Richtung (forward und back signaling) einen Kollaps des Axonwachstumskegels aus (Mann et al., 2003). Der Ligand efnb1 könnte dabei in der VZ mit den Radialgliazellen assoziiert sein.

5.3.3 EphA3 und efnb2 können die Differenzierung der Projektionsneuronen und deren zukünftige schichtspezifische Lage beeinflussen

Nach der finalen mitotischen Teilung der neuronalen Vorläuferzellen entstehen unreife Neuronen, deren Schicksal allerdings schon weitestgehend festgelegt ist. Entsprechend ihres „Geburstages“, der Zeitpunkt der neurogenen mitotischen Teilung, migrieren die Neuronen radial nach außen, bilden die CP und platzieren sich spezifisch in den tiefen, infragranulären (V-VI) oder oberen, supragranulären (II-IV) Schichten (McConnell, 1995; Haubensak et al., 2004; Noctor et al., 2004). Die in dieser Arbeit genutzten RNA-Sonden für Otx1 und Cux2 zeigen früh- und spätgeborene Neuronen. Otx1 gilt als Marker-Gen für frühgeborene

Projektionsneuronen und wird bei E14 bis E16 in der VZ exprimiert (Abb.4-2 B,E,H). In der CP sowie später im ausdifferenzierten Kortex ist es dann in den infragranulären Schichten zu finden (Tarabykin et al., 2001). Cux2, im adulten Kortex in den Schichten II-IV exprimiert (Zimmer et al., 2004), ist an E14 bis 16 in der SVZ zu finden (Abb.4-2 C,F,I) und ist ein Marker für spätgeborene Neuronen. Dabei sind die durch diese Marker gekennzeichneten Neuronpopulationen streng voneinander getrennt, was durch eine scharfe Grenze verdeutlicht wird (Abb.4-4 J-L).

Gene des efn-/ Eph-System, die in ähnlicher Weise wie Otx1 und Cux2 exprimiert werden, kommen somit prinzipiell in Frage eine Rolle bei der Schicksalsfestlegung der supra- und infragranulären Neuronen zu spielen und bei der radialen Migration eine lenkende Wirkung zu haben. Die Rezeptoren EphA3 und der Ligand efnb2 passen hierbei in das Konzept. EphA3 und efnb2 zeigen bei E14, E16 und E18 ein Expressionsmuster, das dem von Cux2 sehr ähnlich ist. Sie sind beide in der SVZ exprimiert und in der CP nur in der oberen, supragranulären Schicht. Der Rezeptor EphA3 zeigt dabei allerdings eine arealspezifische Verteilung, wobei er nur auf den neokortikalen Teil der CP beschränkt ist (vergleiche Abb.4-2 C,I und 4-4 A-F). Die IMZ und der untere Teil der CP sind mit EphA3-positiven Zellen durchsetzt (Abb.4-4 E,F weiße Pfeilspitze), Zellen die im Begriff sind, die finale Position in den supragranulären Schichten des Kortex einzunehmen. Eine Expression der Gene des ephrin-/ Eph-Systems, die der Expression von Otx1 entspricht gibt es allerdings nicht.

5.3.4 Die Expressionsmuster der Rezeptoren EphA3 und EphA4 enthüllen eine neue Substruktur der SVZ

Die Expression von EphA4 in der VZ der Kortexanlage reicht bis in die SVZ hinein und überlappt in einem schmalen Streifen mit der Expression von EphA3 in einem unteren, der VZ direkt angrenzenden Bereich (Abb.4-5I). Diese diskrete Zone lässt sich auch durch andere Moleküle, wie hier gezeigt durch Cad8 und Lhx6, markieren. Eine distinkte Expression der Liganden Sema3e und Sema4b sowie der Rezeptoren Nrp2 und PlxB2 in dieser Zone zeigt (Bürger, 2007). Dabei handelt es sich um eine neue, bislang in der Literatur nicht beschriebene Subschicht der embryonalen Kortexanlage, die hier als uSVZ bezeichnet wird. Welche Bedeutung könnte diese Zone haben.

S.A. Bayer und J. Altman beschreiben in ihren Arbeiten zu den radioaktiven *birthdating*-Experimenten am Telencephalon der Ratte verschiedene Bänder in der SVZ und IMZ der Kortexanlage, die sie als „wave front“ migrierender Zellen bezeichnen. Es handelt sich dabei um postmitotische, schichtspezifische Neuronen, die aus der proliferativen Zone auswandern und in den Zonen dieser Bänder für eine kurze Periode verharren. So kommt es zur Akkumulation der Zellen und zum Sichtbarwerden der Bänder. Es gibt ein „first superior band“ (sb1) mit Zellen für die Schicht 6 in der oberen IMZ, ein „second superior band“ (sb2) mit Zellen der Schicht 5 und ein „first inferior band“ (ib1) in einem unteren Teil der SVZ, der VZ direkt angrenzend. Dieses Band enthält erst die Zellen für die Schicht 4 und später in der Entwicklung auch die Zellen für die Schicht 2/3 (Bayer and Altman, 1991). Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass das EphA4-Signal an E18 auch in einem oberen Anteil der CP auftaucht (Abb.4-4 I). Altman und Bayer zeigen,

dass Zellen unterschiedlicher Schichtspezifität sich bereits auf dem Weg in die CP separieren um eventuell Schichtinformationen zu realisieren. So werden z.B. Zellen für die Schicht 6 und Schicht 5 in überlappenden Zeitintervallen geboren, trennen sich aber in der LMZ in zwei separierte Zonen (sb1 und sb2) auf und interagieren mit differenziellen „Wegweisern“. Die Zellen der Schicht 4 und 2/3 warten in einer Zone die EphA3- und EphA4-positiv ist und durch weitere Moleküle spezifiziert werden kann (Bürger, 2007). Der Ligand efnb2 ist in der embryonalen Kortexanlage in VZ und oSVZ exprimiert und lässt die uSVZ frei (Abb.4-4 B, weißer Pfeil). Im postnatalen Stadium P6 ist efnb2 stark in der supragranulären Schicht 2/3 exprimiert und nur schwach in Schicht 4 (Abb.4-8 I), was bereits in den embryonalen Stadien E16 und E18 zu erkennen ist. Demnach wäre es möglich, dass es sich bei der uSVZ um Vorläuferzellen für die Schicht 4 handelt.

Aoki gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass die Rezeptoren EphA4 und EphA3 eine Rolle bei der Differenzierung der Projektionsneuronen in den proliferativen Zonen des Kortex spielen. Er zeigt in *in-vitro*-Versuchen, dass durch die Aktivierung der EphA-Rezeptoren durch ephrin-Fc-Fusionsprotein die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen eingestellt und die Bildung von Neuronen angeregt wird (Aoki et al., 2004). Eine zeitlich geordnete Aktivierung der verschiedene Vorläuferzellen der VZ und SVZ führt somit zu Neuronen für die verschiedenen Schichten, die anschließend mit der radialen Migration in Richtung CP beginnen.

5.3.5 Schichtspezifische Verteilung der untersuchten Gentranskripte in der CP

Neben EphA3 und EphA4 zeigen noch weitere Gene des efn-/ Eph-Systems eine schichtspezifische Expression in der CP des embryonalen Kortex. Deutlich wird dies vor allem am Tag E18 (Abb.4-6 B,C,G,H-J; Abb.5-2). Der Rezeptor EphB1 ist, wie unter 5.2.2 schon erwähnt, in der unteren, infragranulären Hälfte der CP exprimiert. Da EphB1 embryonal nur in der CP zu finden ist, wird das Gen erst nach Ankunft der Zellen in der CP angeschaltet. Im postnatalen Stadium P6 ist es immer noch in der infragranulären Schichten 5 und 6. Später. Bei P28 kann die EphB1-Sonde keine Transkripte mehr detektieren. Dies untermauert die in 5.2.2 aufgestellte Behauptung, dass EphB1 an der „Verdrahtung“ des Kortex mit dem Thalamus beteiligt ist, kortikothalamische Verknüpfungen die sich bis in die postnatalen Alterstadien hinzieht (Molnar et al., 1998a; Auladell et al., 2000).

Der Rezeptor EphB2 und der Ligand efnb2 hingegen sind in der oberen supragranulären Hälfte der CP zu finden. Deren Expression ist deutlich von der EphB1 Expression getrennt (Abb.4-6 I,J). Der Rezeptor EphB2 wird postnatal im cerebralen Kortex durch die *In-situ-Hybridisierung* nicht mehr detektiert. Die Expression des Liganden efnb2 allerdings bleibt bis zu Tag P28 erhalten, dabei medial stärker als lateral und in Schicht 2/3 stärker als in Schicht 4 bzw. 5.

Interessanterweise ist an E18 eine durch efna5 gekennzeichnete Zwischenschicht in der CP erkennbar (Abb.4-6 B,J). Efna5 taucht in diesem Stadium zum erstmals in dem sich entwickelnden Kortex auf. Es könnten Zellen der Schicht 4 sein, die sich somit deutlich von den anderen Schichten absetzen. Allerdings wird efna5 in der uSVZ, wo die Vorläuferzellen für die Schicht 4 lokalisiert sein sollten, nicht vorhanden, und wird demnach wie EphB1 erst nach der Einnahme der finalen Position angeschaltet. An P6 wird efna5 ebenfalls in Schicht 4 exprimiert. In Die Schicht 4 des Neokortex stellt die Hauptzielschicht der ankommenden

thalamischen Axone dar. Arbeiten aus dem Labor von J. Bolz, zeigen, dass der Ligand *efna5* sich hier positiv auf die Ausbildung von Verzweigungen der thalamischen Fasern auswirkt (Mann et al., 2002b). Die Zellen der Zielschicht werden größtenteils um E16 geboren und migrieren anschließend radial in Richtung CP (Polleux et al., 1997a). Das Einwachsen der die IMZ passierenden thalamischen Axone in die CP beginnt ebenfalls in diesem Zeitraum. Zeitlich gesehen können so die TCAs gemeinsam mit ihren Zielzellen die CP besiedeln. Eine Warteperiode der ankommenden TCAs, wie das bei Katzen und Affen zu beobachten ist, in der die Axone in der SP bis zu mehreren Wochen warten, bevor sie in ihre Zielschicht einwachsen können (Rakic, 1977; Ghosh and Shatz, 1992), wäre somit bei den Mäusen gar nicht nötig und wurde so auch nicht eindeutig beobachtet (Auladell et al., 2000). Es erscheint nach Lage der Literaturhinweise plausibel, dass es sich bei der intermediären *efna5*-positiven Zone tatsächlich um die Zellen der Schicht 4 handelt.

5.3.6 Areal spezifische Verteilung der untersuchten Gentranskripte in der CP

Die CP zeigt im Bezug auf das *efn-/ Eph*-System eine schichtspezifische Verteilung der Gentranskripte, sodass sowohl migrierende Zellen als auch einwachsende Axone, beispielsweise des Thalamus, die entsprechende Zielschicht identifizieren und ansteuern können. Wie aber sieht es mit der tangentialen Regionalisierung der embryonalen Kortexanlage aus? Gibt es in der Kortexanlage Gen-Expressionsgrenzen, die die zukünftigen Areale markieren?

Der Rezeptor *EphA3* zeigt eine solche regionalisierte Expression in der CP bei E16 sowie bei E18 (Abb.4-4 D-F) und wird ausschließlich in den lateralen Bereichen der CP exprimiert. Die Annahme, dass dieses Expressionsmuster aus dem Entwicklungsgradienten, der sich von ventrolateral nach mediodorsal zieht, resultiert, kann durch den direkten Vergleich mit der Expression des Liganden *efnb2* verworfen werden. *Efnb2* wird an E16 ebenfalls nur im lateralen Teil der CP exprimiert, ist aber bei E18 in der gesamten CP zu transversalen Entwicklungsgradienten im Kortex (Bayer and Altman, 1991). *EphA3* ist im Gegensatz dazu auch an E18 nicht in der medialen CP zu finden. Somit zeichnet *EphA3* im embryonalen Kortex eine scharfe molekulare Grenze im supragranulären Anteil der CP zwischen dem lateralen Neokortex und dem dorsomedialen limbischen Bereich der Kortexanlage. Interessanterweise ist diese Grenze bereits in der SVZ zu erkennen (Abb.4-4 E und F; schwarzer Pfeil). Die Expression ist in der unteren Zone der SVZ stärker als im Rest der SVZ. Sowohl bei E16 als auch bei E18 gibt es eine sprunghafte Verschiebung dieser starken Expression. Die Grenze der Expressionsänderung entspricht der Grenze in der CP. Dies lässt vermuten, dass in der gesamten SVZ *EphA3*-positive Vorläuferzellen existieren, wobei aber nur in den lateralen Bereichen der embryonalen Kortexanlage *EphA3*-positive, postmitotische Neuronen entstehen und in die CP migrieren. Dies ist ein erstmaliger starker Hinweis auf die Existenz einer regionalisierten proliferativen Zone im Sinne einer Protomap (Rakic, 1988). In der VZ der embryonalen Kortexanlage ist eine solche scharfe Grenze durch die Expressionsmuster der Genen des *efn-/ Eph*-Systems nicht auszumachen. Allerdings existiert ein von *EphA5* exprimierter Gradient in der VZ, der an E14 ventral stark und dorsal schwach ist (nicht gezeigt) und beginnt ab E16 langsam zu verschwinden. Bisher sind in der Literatur keine Gene bekannt, die die VZ der embryonalen Kortexanlage im Sinne der Protomap in spezifische Areale markieren. Zum Beispiel gelten die

Transkriptionsfaktoren Emx2 und Pax6 als Faktoren, die an der frühen Arealisierung der Kortexanlage beteiligt sind (Bishop et al., 2000). Sie werden ähnlich wie EphA5 in Form von entgegengesetzten Gradienten in anteriorposteriorer Richtung in der VZ des embryonalen Kortex exprimiert. Die jeweiligen Knockout Mäuse zeigen deutliche Veränderungen in den Mustern von kortikal regionspezifisch exprimierten Genen wie Cad6 und Cad8 oder EphA7 und efn5 (Bishop et al., 2000; Bishop et al., 2002).

Weitere regionalisierte Expressionsmuster der Kortexanlage zeigen die Rezeptoren EphA5, EphA6 und EphA7 (Abb.4-6 K-Q). Allerdings stellt sich die Regionalisierung erst ab dem Stadium E18 deutlich ein. Der Großteil der thalamischen Axone ist vor E18 bereits im Kortex angekommen und zumindest arealspezifisch positioniert. Da die Zellen der Schicht 4 schon in der CP ihren Platz eingenommen haben (Polleux et al., 1997a), sollte selbst das Einwachsen der TCAs in die CP bereits begonnen haben. Somit sind die Signale dieser Rezeptoren innerhalb der CP nicht dazu geeignet z.B. thalamische Axone arealspezifisch in den Kortex zu lenken. Allerdings sind die Signale vorhanden bevor die vollständige Differenzierung der Areale beginnt und die Zytoarchitektur des Kortex ausgebildet wird. Das wiederum spricht für eine Beteiligung des efn-/ Eph-Systems an der intrakortikalen Verdrahtung der Neuronen. Die Zellen der verschiedenen Schichten beginnen untereinander Kontakte auszubilden. In Verbindung mit neuronaler Aktivität kann die selektive Expression der untersuchten Gene die Bildung der Arealgrenzen regulieren. Ähnliches konnte durch Hubermann und Kollegen bei der Verdrahtung der Retina mit dem Genikulatum beim Frettchen beobachtet werden. Sowohl die Aktivität der Neuronen, als auch die differenzielle Expression von efn5 im laterale Genikulatum (LGM) ist nötig, um die Trennung der ipsi- und kontralateralen Axonendigungen im mehrschichtigen LGM zu realisieren (Huberman et al., 2005). Die arealspezifische Expressionen der Rezeptoren EphA3, EphA5, EphA6 und EphA7 zeigen am Tag E18 noch nicht die Grenzen der Brodmannareale. Sie werden eher in kortikalen Feldern exprimiert, die sich eventuell später weiter Differenzieren und zu den Brodmannarealen werden.

5.3.7 Tangentiale Migration der GABAerge Interneuronen

GABAerge Subpopulationen

Die sehr heterogene Gruppe von GABAergen Interneuronen die dem ventralen Telencephalon (vTC) entstammen, wird zwischen E12 bis hin zur Geburt des Tieres in der proliferativen Zone des Subpalliums geboren und erreicht den Kortex durch tangentielle Migration (de Carlos et al., 1996; Anderson et al., 1997a; Tamamaki et al., 1997; Lavdas et al., 1999; Sussel et al., 1999; Wichterle et al., 2001; Marin et al., 2003). Dabei bringen die mGE, IGE und cGE sowie das AEP verschiedene Populationen an Neuronen hervor, die sich z.B. in ihrem Phänotyp in Bezug auf die Moleküle Parvalbumin (Pv), Somatostatin (Sst), Calbindin (Cb) und Calretinin (Cr) und ihrem zukünftigen Bestimmungsort unterscheiden (Anderson et al., 1999; Marin et al., 2000; Anderson et al., 2002; Nery et al., 2002; Wonders and Anderson, 2006).

Xu et al. konnte durch die Kultivierung von dissoziierten mGE-Vorläuferzellen zeigen, dass die Zellen in Kultur reifen und einen entsprechenden Phänotyp z.B. Pv ausbilden (Xu et al., 2004). Der GABAerge

Subtyp der Interneuronen ist somit geburtsortspezifisch. Dies legt ein differenziertes Neuroepithel nahe, in dem die Vorläuferzellen schon unterschiedliche Spezifitäten aufweisen. Bisher bekannte Transkriptionsfaktoren wie *Dlx1/Dlx2*, *Nkx2.1* oder *Gsh2*, die für den GABAergen Phänotyp der Neuronen entscheidend sind, markieren die VZ und SVZ des Subpalliums entweder homogen oder in Form eines Gradienten (siehe Abb.5-3). Somit gibt es bisher keine Möglichkeit innerhalb der proliferativen Zonen der Eminenzen separierte Abschnitte zu identifizieren, die verschiedene Phänotypen der GABAergen Neuronen hervorbringen könnte.

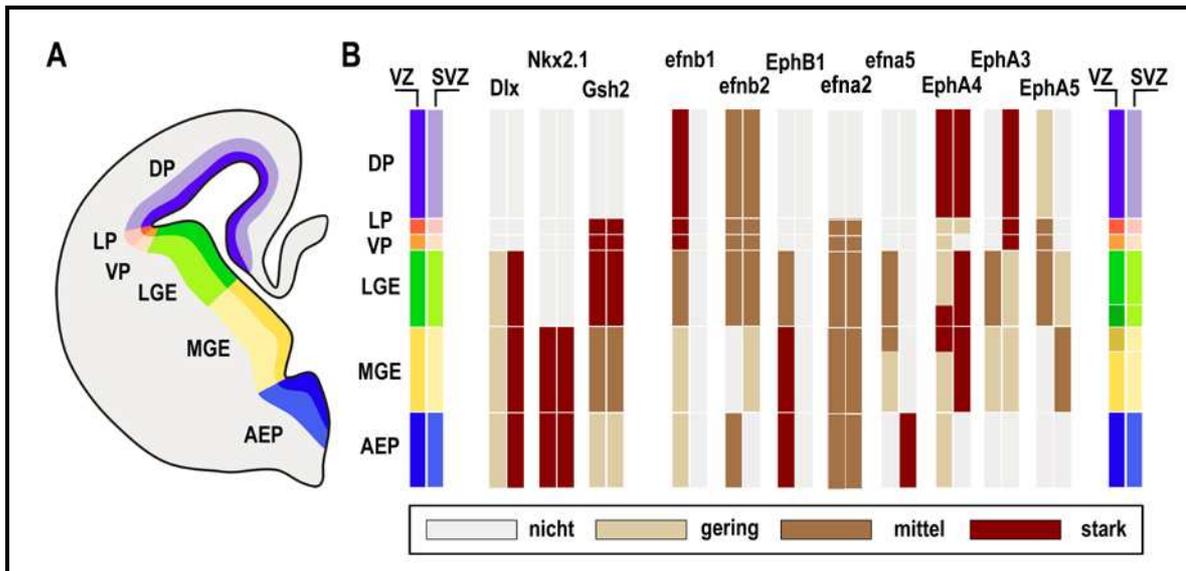


Abb.5-3: Schematische Darstellung der VZ und SVZ im Telencephalon am Embryonaltag 14. A) zeigt die verschiedenen Abschnitte der proliferativen Zonen um den lateralen Ventrikel herum. Von medial nach lateral entlassen AEP, MGE und LGE Neuronen mit GABAergen Phänotyp und VP, LP und DP glutamaterge Neuronen. B) zeigt die regionale Verteilung der Gene in der VZ und SVZ des Subpalliums von medial nach lateral. Die Gene des *efn-/ Eph*-Systems weisen zusätzliche molekulare Grenzen in den bestehenden anatomischen Regionen auf, und sind Indizien für verschiedene spezifische Vorläuferzellen von Interneuronen. Verändert nach (Marin and Rubenstein, 2001).

Diese Arbeit zeigt, dass Transkripte verschiedener Gene des *efn-/ Eph*-Systems entlang der VZ und SVZ des Subpallium differenziell in verschiedenen Regionen lokalisiert sind und die proliferative Zonen somit in distinkte Bereiche untergliedert ist (Vergleiche Abb.4-24). Wie im Schema der Abb.5-3 dargestellt ist, existiert z.B. an der Grenze zwischen mGE und IGE ein Bereich in der die VZ Vorläuferzellen beinhaltet, die *EphA4* exprimieren (vergleiche Abb.4-24 G). Diese Zone könnte folglich eine Subpopulation von Interneuronen-Vorläuferzellen darstellen. Eine mögliche Funktion der differenziellen Expression von *EphA4* könnte sein, dass diese Subpopulationen für die Migration in den Kortex einen spezifischen „Lenkungsapparat“ benutzen, der sich von den Neuronen der Umgebung unterscheidet. Dies könnte den Zellen ermöglichen gezielt bestimmte Schichten im Kortex anzusteuern (Abb.5-3). Dass *EphA4* von migrierenden Interneuronen exprimiert wird, konnte in *in-vitro*-Versuchen gezeigt werden. Hierfür wurde die mGE aus einem GFP-markierten Donor-Gehirn homotypisch in entsprechende Akzeptor-Gehirnschnitte einer Wildtypmaus verpflanzt und für 48h kultiviert. Durch *In-situ*-Hybridisierung an den kultivierten Schnitten konnte anschließend gezeigt werden, dass eine Teilmenge der aus der Donor-mGE migrierenden Zellen, *EphA4*-positiv sind (Zimmer, 2006). In ähnlicher Weise könnte dieser Sachverhalt auch für die IGE und cGE sowie

den entsprechenden Molekülen (Abb.5-3) getestet werden. Die Idee, dass verschiedene Subtypen von GABAergen Interneuronen verschiedene Lenkungsapparate ausbilden, um den Weg in den Kortex und die entsprechenden Schichten zu finden, wird durch eine Arbeit von Rymar und Satikot (Rymar and Sadikot, 2007) erhärtet. Diese Birthdating-Studie bei Ratten, in der die Verteilung sowohl von Pv-positiven als auch von Cr-positiven Interneuronen in den kortikalen Schichten untersucht wurden, ergab für beide Subtypen zwei unterschiedliche neurogenetische Gradienten. Die Pv-positiven Neuronen sind wie die Projektionsneuronen in einem Inside-out Muster im Kortex verteilt, wobei die Zellen innerhalb einer Schicht zur gleichen Zeit geboren wurden. Die Interneuronen sind innerhalb einer Schicht bezüglich ihres Geburtszeitpunktes isochron zu den pallial geborenen Projektionsneuronen. Die Cr-positiven Zellen dagegen zeigen bezüglich ihres Geburtszeitpunktes im Kortex ein Outside-in Muster und sind in den Schichten heterochron zu den Projektionsneuronen der gleichen Schicht. Somit scheint es, dass Pv- und Cr-positive Interneuronen beim Einströmen in die kortikalen Schichten auf dort vorhandene Positionssignale verschieden reagieren, möglicherweise, weil sie verschiedene Lenkungsrezeptoren exprimieren.

Migrationswege im Subpallium

Die Gene des efn-/ Eph-Systems zeigen im Subpallium Expressionen, die das vTC in mehrere untereinander gelegene Korridore einteilen. In Abb.5-4 sind Expressionen von verschiedenen Genen, die im wesentlichen diese Korridore in Kombination zeigen, schematisch dargestellt (vergleiche Abb.4-26). Der Transkriptionsfaktor Lhx6 markiert GABAerge Interneuronen, die aus der mGE stammen und durch das vTC in den Kortex wandern. Dabei migrieren sie innerhalb des Subpalliums auf zwei Hauptwegen. Eine Gruppe von vermutlich zeitlich früher und räumlich medialer geborenen Neuronen nimmt den oberflächlichen Weg durch die Mantelzone und eine zweite Gruppe wandert durch die SVZ des vTC, von der VZ und dem sich entwickelnden Striatum flankiert. Diese Neuronenpopulation stellt eine Mischung aus weiteren Subpopulationen dar, die eventuell durch verschiedene Lenkungssysteme in den Kortex geleitet werden. Nuria Flames und Kollegen (Flames et al., 2004) beschreiben eine Subpopulation von Interneuronen, die den Rezeptor ErbB4 tragen und durch zwei Isoformen des Liganden Neuregulin-1 (Nrg1) in der Kortex gelenkt werden. Diese migrierenden Neuronen sind lediglich eine Teilmenge der Lhx6-positiven Neuronen und bewegen sich durch einen separierten Korridor innerhalb der SVZ.

Abb.5-4 zeigt durch die Überlagerungen von EphA3, EphA4 und EphA5 in der SVZ drei getrennte Korridore, die durch die Expression von EphB1 in der VZ und in der Striatumanlage scharf begrenzt sind. Die in Abb.5-3 gezeigten molekulare Heterogenität der Proliferationszone des Subpalliums und die Differenzialität dieser Korridore legt die Vermutung nahe, dass früh determinierte Neuronen, die an verschiedenen Orten gebildet werden, durch separierte Kanäle und somit voneinander getrennt durch das vTC wandern könnten. Sie nutzen dabei verschiedene Lenkungssysteme wie das Nrg1/ErbB4-System (Flames et al., 2004) oder die hier gezeigte Möglichkeit der Lenkung durch das efn-/ Eph-System.

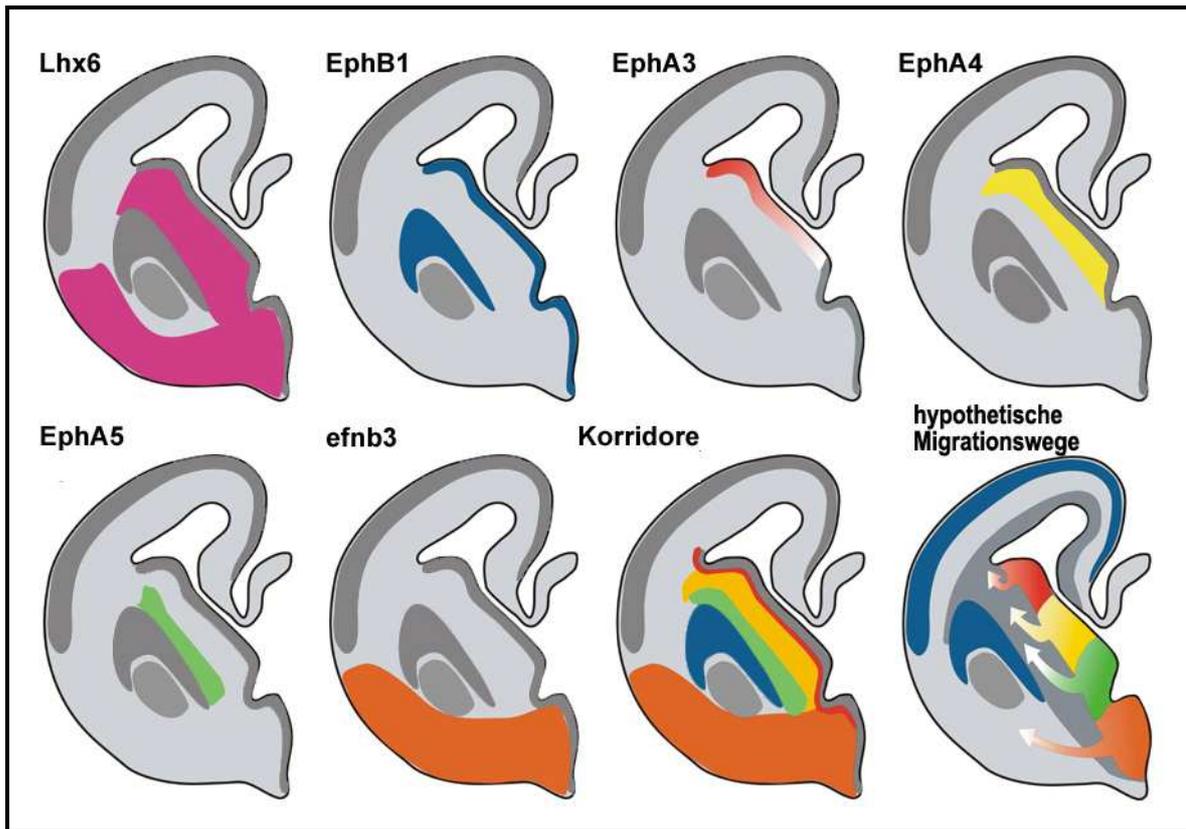


Abb.5-4: Schematische Darstellung des vTC am Embryonaltag 14. Expression der Gene Lhx6, EphB1, EphA3, EphA4, EphA5 und efnb3 im vTC. Lhx6 beschreibt die Migrationswege der aus der mGE stammenden Interneurone durch das vTC. EphA4, EphA5 und efnb3 könnten Teilmengen der Lhx6-positiven Interneurone markieren, die durch separierte Korridore migrieren. EphA3 markiert ein Korridor der mit dem Korridor von EphA4 überlappt, und könnte eine zusätzliche Population von Interneurone sein, die wie die Interneurone der cGE nicht Lhx6-positiv sind.

Migrationswege im Kortex

Nach der Überschreitung der Pallium-Subpallium-Grenze migrieren die GABAergen Interneurone auf zwei Haupttrouten in den Kortex. Frühgeborene Neuronen wandern tangential in die Marginalzone (MZ) und tauchen dann radial in die CP ab, wohingegen spätgeborene Neuronen durch eine tiefer gelegene Zone migrieren, welche in der Literatur oft als Grenze zwischen SVZ und IMZ bezeichnet wird (Anderson et al., 2001; Metin et al., 2006; Tiveron et al., 2006).

Diese Arbeit zeigt, dass das nicht ganz richtig ist. Das Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors Lhx6, der als Marker für GABAerge Interneurone der mGE gilt (Lavdas et al., 1999), zeigt die Routen der Lhx6-positiven Interneurone in der Kortexanlage (Abb.4-5 A). Es ist ein oberflächliches Signal in der MZ und ein tiefergelegenes im Bereich der SVZ zu beobachten. Der Vergleich der Expressionsmuster mit denen der Gene Cad8, EphA3 und EphA4 zeigt, dass es sich um einen, der VZ direkt anliegenden, unteren Bereich der SVZ handelt (Abb.4-5 D und I). In diesem Bereich überlappt die Expression der Rezeptoren EphA3 und EphA4. Dort verharren die Zellen der zukünftigen Schicht 4 für eine kurze Zeit. Dies ist in Birthdating-Experimenten als Band (ib1) sichtbar (Bayer and Altman, 1991). Somit können Projektionsneuronen und GABAerge Interneurone, die jeweils für die supragranulären Schichten (Schicht 4 und 2/3) bestimmt sind, in dieser Zone direkt miteinander interagieren. Sie könnten dort z.B. die selben schichtspezifischen Signale

lesen und eventuell miteinander radial in die CP einwandern. Im Gegensatz dazu tauchen die frühgeborenen Interneuronen aus der MZ ab und treffen vor Ort auf die ebenfalls frühgeborenen Projektionsneuronen der Schichten 5 und 6.

Eine aktuelle Arbeit von Liodis et al. zeigt (Liodis et al., 2007), dass bei Verlust des Transkriptionsfaktors Lhx6 die Motilität der aus der mGE ausmigrierenden Interneuronen-Vorläuferzellen eingeschränkt ist. Diese migrieren gegenüber den Neuronen aus den Wildtypmäusen langsamer und kommen somit verspätet im Kortex an. Dies führt dazu, dass Pv-positive Interneuronen, welche die größte Gruppe der Lhx6 exprimierenden Interneuronen sind, in den kortikalen Schichten der Lhx6-knockout Mutante fehlerhaft verteilt werden. Durch das verspätete Eintreffen der Neuronen in den Kortex könnten somit zeitlich regulierte Positionssignale nicht gelesen werden, was in einer solchen Fehllokalisierung der Interneuronen resultieren könnte. Im Gegensatz dazu sind Cr-positive Interneuronen, welche Lhx6 nicht exprimieren, nicht betroffen und zeigen eine normale Verteilung im Kortex der Mutante.

Das Homöobox-Gen Pax6 wird als musterbildendes Gen in der VZ des Palliums exprimiert und spielt bei der Morphogenese des cerebralen Kortex eine maßgebliche Rolle (Muzio and Mallamaci, 2003). Die Expression ist innerhalb der VZ auf die radialen Gliazellen beschränkt und ist hier an der Steuerung der Proliferation dieser neuronalen Vorläuferzellen beteiligt. Bei Abwesenheit des Gens zeigen die Vorläuferzellen Defekte in ihrem Zellzyklus sowie ihrem molekularen Phänotyp (Gotz et al., 1998; Warren et al., 1999; Estivill-Torres et al., 2002). Verschiedene Experimente mit Pax6-small-eye Ratten und Mäusen (bei der *small eye* Mutante handelt es sich um eine natürliche Mutation, bei der das Protein funktionslos ist) zeigen Migrationsdefekte von supragranulären kortikalen Zellen (Caric et al., 1997; Fukuda et al., 2000). Expressionsanalysen von verschiedenen schichtspezifischen Markergenen an Pax6-knockout Mäusen zeigen ebenfalls Defekte in den supragranulären kortikalen Schichten, wohingegen die infragranulären Schichten keine Defizite vorweisen (Tarabykin et al., 2001; Nieto et al., 2004; Zimmer et al., 2004).

Die Migration der Vorläufer der GABAergen Interneuronen durch die Kortexanlage ist in der Pax6-knockout Maus ebenfalls gestört. Der Migrationsweg der spätgeborenen Lhx6-positiven Interneuronen in der unteren SVZ ist nicht mehr vorhanden. Die migrierenden Zellen scheinen dabei nicht verloren gegangen, sondern nutzen wie die frühgeborenen Interneuronen ebenso die Route durch die MZ (Tiveron et al., 2006). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Überlappungszone von EphA4 und EphA3 in der unteren SVZ die Ausbildung der supragranulären Schichten durch eine Interaktion der Vorläufer supragranulärer Projektionsneuronen sowie der GABAergen Interneurone steuert. Um darüber fundierte Aussagen treffen zu können, und eine direkte Beteiligung von EphA3 und EphA4 oder etwa weiterer in dieser Zone exprimierter Lenkungsmoleküle wie Sema3e, Sema4b, Nrp2 und PlxB2 (Bürger, 2007) zu zeigen, wäre eine Untersuchung der unteren SVZ in der Pax6-knockout Maus auf ihre Expressionsmuster von großer Wichtigkeit.

Bisher gibt die Literatur keinerlei Aufschluss über die Lenkung und Kanalisierung der migrierenden Interneurone innerhalb des sich entwickelnden cerebralen Kortex. Das Schema der Abb.5-5 stellt die molekularen Gegebenheiten im embryonalen Kortex und der ganglionischen Eminenz zusammenfassend dar und beschreibt einen möglichen Mechanismus, wie EphA4-positive Interneurone aus der GE den Weg in einen EphA3/EphA4-positiven Kanal finden könnten. Hierbei stellt efn2 ein repulsives Signal dar, das die

EphA4-positiven Interneuronen aus der SVZ der GE austreibt und in einen Kanal, in dem das kortikal exprimierte *efna2* durch das kortikal exprimierte EphA3 und EphA4 maskiert ist, gelenkt werden.

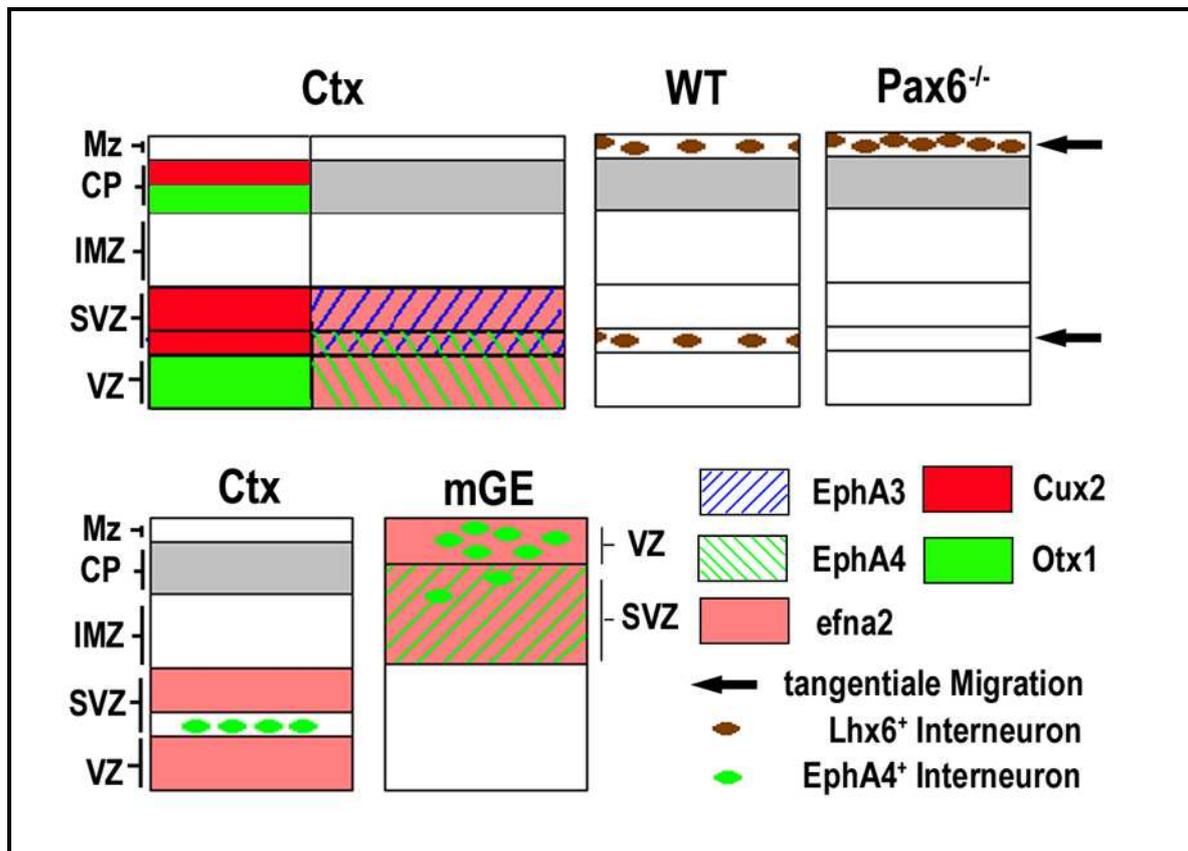


Abb.5-5: Das Schema zeigt in der oberen Hälfte die Expression von Otx1, Cux2, EphA3, EphA4 und *efna2* in der VZ und SVZ des embryonalen Kortex. Es zeigt die Migrationswege der Lhx6⁺-Interneurone in der Wildtypmaus sowie in der Pax6^{-/-} Maus (Tiveron et al., 2006). Das Schema zeigt die Expression von *efna2* in der VZ und SVZ und von EphA4 in der SVZ der mGE. In der VZ der mGE werden EphA4⁺-Interneurone geboren (Abb.4-24 G; Zimmer, 2006), die in die Überlappungszone von EphA3 und EphA4 im Neokortex einwandern können.

5.4 Die Differenzierung des embryonalen Thalamus

Im Gegensatz zu dem in Schichten aufgebauten Neokortex zeichnet sich der differenzierte Thalamus durch einen nukleären Aufbau aus. Die Entwicklung und Differenzierung vollzieht sich in mehreren nacheinander ablaufenden Prozessen. Wie bei der Entwicklung des Neokortex sorgen musterbildende Moleküle (sonic hedgehog, Fgf8, Bmp4 u.s.w) für die Bildung von separierten Domänen auf dem Neuroepithel, welche die Vorläuferzellen für die drei Anteile des Thalamus hervorbringen (Rubenstein et al., 1998; Crossley et al., 2001; Puelles and Rubenstein, 2003). Dazu gehören der Epithalamus (ETh), der dorsale Thalamus (dTh) und der ventrale Thalamus (vTh). Sie unterscheiden sich durch die Expression verschiedener regionsspezifischer Transkriptionsfaktoren. So exprimiert der dTh vornehmlich Ngn2 und Gbx2 (vorliegende Arbeit; Bulfone et al., 1993; Fode et al., 2000; Nakagawa and O'Leary, 2001; Jones and Rubenstein, 2004), wohingegen der vTh Dlx1 und Dlx2 exprimiert (Bulfone et al., 1993; Andrews et al., 2003; Jones and Rubenstein, 2004).

Die Neurogenese des Thalamus beginnt am Embryonaltag 11 und die Zellen der ersten Kerne (Rt und vLG) haben bereits am Tag E15 ihre endgültige Position gefunden. Die postmitotischen Neuronen migrieren

radial aus dem Neuroepithel in die Mantelzone (MZ), wo sie ihre finale kernspezifische Position einnehmen. Am Tag E16 sind zumindest die meisten Neuronen der sich spät bildenden Kerne geboren. Hierzu gehören vor allem die medial gelegenen Kerne, wie der Paraventricularkern (PV), Mediodorsalkern (MD) und Paratenialkern (PT) (Altman and Bayer, 1988c, 1988a, 1988b, , 1989a, 1989c, 1989b). Durch die voranschreitende Verdrahtung der thalamischen Kerne mit verschiedenen kortikalen Arealen kommt es im Thalamus zu verstärkter Bildung von Neuropil und die bisher morphologisch undifferenzierte pronukleäre Zellmasse differenziert in die verschiedenen thalamischen Kerne aus.

Mit Hilfe der Transkriptionsfaktoren Gbx2, Lhx2 und Ngn2 sowie des Oberflächenmoleküls Cad6 konnte für den embryonalen Thalamus am Tag E16 eine Karte erstellt werden, in der die thalamischen Kerne verzeichnet sind. Somit konnten die Expressionsmuster der Gene des ephrin-/ Eph-Systems den verschiedenen Kernen des Thalamus zugewiesen werden. Für den Tag E14 war das nicht möglich.

5.4.1 Der embryonale dorsale Thalamus ist an E14 grob in drei vertikale Zonen untergliedert

Der Aufbau des embryonalen Thalamus am Tag E14 unterscheidet sich deutlich von dem weiter differenzierten Thalamus der folgenden untersuchten Entwicklungsstadien (E16, E18, P0), die dem voll ausdifferenzierten Thalamus an P6 und P28 (Abb.4-9) mehr und mehr ähneln. Vor allem die Expressionsmuster der hier untersuchten Gene beschreiben eine deutliche Veränderung im Aufbau des Thalamus zwischen den Alterstadien E14 und E15. Dabei vollzieht sich ein Gestaltwechsel des Thalamus von einem anfangs in Streifen gegliedertes Gewebe, wobei Zellen gleichen molekularen Phänotyps in mehreren vertikalen Streifen im Thalamus angeordnet sind, in eine spätere nukleär gegliederte Struktur. Die Untersuchungen des embryonalen Thalamus am Tag E14 deuten auf eine Untergliederung des dTh in drei grobe, vertikal orientierte Zonen hin. Zum einen ist das eine innere proliferative Zone, daran anschließend eine Übergangszone (ÜZ), in der diverse Differenzierungsprogramme ablaufen könnten, und eine äußere Mantelzone, in der die Zelle sich kernspezifisch ansiedeln und Axone für die Verdrahtung mit dem Kortex aussenden und empfangen.

Die innere proliferative Zone erscheint an E14 relativ breit und vertikal zweigeteilt. Der Vergleich der Expressionsmuster der Rezeptoren EphA3 und EphA4 zeigt dies deutlich (Abb.4-17 J-L). Die Untersuchungen der Expressionsmuster von Gbx2, Lhx2 und Ngn2 am Tag E14 (Abb.4-13) machen deutlich, dass diese innere Zone, wie man es von einer proliferativen Zone erwarten würde, sukzessive verschwindet. Dies ist daran zu erkennen, dass die vertikalen Streifen in den Expressionsmustern von Gbx2 und Lhx, die die ÜZ markieren, über die Zeit sich immer weiter nach medial verlagern, bis sie dem Ventrikel direkt anliegen. Weitere Expressionsmuster von EphA3, EphA7 und EphB1 (Abb.4-17 C,E und H) zeigen, dass die VZ in der dorsal-ventralen Achse nicht homogen ist. Wie in den GE des vTC (Abb.4-24) sind auch im Thalamus bereits Vorläuferzellen der VZ mit verschiedenen Eph-Rezeptoren ausgestattet, die eventuell das Migrationsverhalten beim Auswandern unterschiedlich beeinflussen.

Es ist zu bemerken, dass mit den Expressionsmustern der Gene des ephrin-/ Eph-Systems sowohl im vTC als auch im dTh die VZ in spezifische Regionen oder Areal eingeteilt werden kann, was auf verschiedene neuronale Vorläuferzellen bereits innerhalb der VZ hindeutet. Somit könnte es sein, dass beispielsweise im Thalamus die Neuronen der VZ längst eine Kernspezifität angenommen haben. Dies steht im deutlichen Gegensatz zum Kortex, in dem lediglich Expressionen in Form von Gradienten (EphA5) zu finden sind und daher eine frühe Arealspezifität der Vorläuferzellen der Pyramidenzellen nicht zwangsläufig angenommen werden kann.

5.4.2 Die Übergangszone ist funktionell nur schwer zu charakterisieren

Die Bedeutung der Übergangszone ist nur schwer zu beurteilen, da bisher nur wenige Vorstellungen über die Entwicklung des Thalamus existieren. Die meisten Arbeiten dabei sind von Altman, J. und Bayer, S.A. (Altman and Bayer, 1979, , 1988c, 1988a, 1988b, , 1989a, 1989c, 1989b) aus den späten 80iger Jahren, die in ihren „birthdating“ Experimenten den Zeitpunkt und Ort der Geburt, sowie die Migrationswege der Neuronen verschiedener thalamischer Kerne untersuchten. Sie definierten dabei verschiedene Proliferationseinheiten innerhalb des Neuroepithels, die sie „Lobules“ nannten und die Zellen für die verschiedenen thalamischen Kerne hervorbringen. Sie bestimmen den Zeitraum der thalamischen Neurogenese bei der Ratte auf die Tage E14 bis E18 (entspricht bei der Maus etwa E12 bis E16), wobei die Zellen der lateralen Kerne vor denen der medialen Kerne geboren werden. Für die Migration aus der proliferativen Zone heraus, die vor allem radial in die sich differenzierende Mantelzone hinein verläuft, benötigen die Neuronen etwa 2-3 Tage. Der wohl wichtigste Punkt ihrer Arbeiten ist, dass sie zeigen, dass die Kernspezifität und der Geburtszeitpunkt zusammenhängen. Eine Substruktur, wie die beschriebene ÜZ, konnten sie in ihren Arbeiten nicht bestimmen. Auch anderen Arbeiten, die Expressionsmuster verschiedener Gene im Thalamus untersuchten, machen bisher keine Aussagen über eine solche Zone im dTh (Nakagawa and O'Leary, 2003; Jones and Rubenstein, 2004).

Die ÜZ trennt die MZ von der proliferativen Zone und scheint eine Art Entwicklungsbarriere zu sein. Sie wird an E14 durch die vertikal ausgerichtete, streifenartige Expression der verschiedenen untersuchten Gene. Allerdings zeigt sich, dass dieser Streifen für die verschiedenen Gene unterschiedlich breit ist. Auch die horizontale Lage des vertikal orientierten Streifens scheint je nach Gen mehr oder weniger weit nach lateral oder medial verschoben, sodass bei der Überlagerung der Streifenmuster von mehreren Genen subtile Substreifen entstehen. Doch worum handelt es sich bei diesen Substreifen? Eine Vermutung wäre, dass es sich bei den verschiedenen Streifen der Übergangszone um verschiedene Zellpopulationen handelt, die zu unterschiedlichen Zeiten geboren und daher unterschiedlich weit nach lateral gewandert sind. Somit könnten die Substreifen Zellen verschiedener Kernspezifitäten beinhalten, was durch einen differenten molekularen Phänotyp sichtbar werden könnte. Fraglich ist dabei warum die Streifen der ÜZ so robust erscheinen und zeitlich lange fortbestehen, wenn es sich nur um die „Lauffront“ von verschiedenen Zellpopulationen handelt. Als Erklärung gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen könnten spät geborene Neuronen schon ihre finale Position innerhalb der ÜZ gefunden haben. Dabei könnte es sich um Zellen der Kerne MDI und CL handeln,

die eine ähnlich Ephrin-code wie die ÜZ haben (siehe Tabelle 4-4 und 4-5). Die Zellen für MDI und CL hätten die Migration dann beendet und beginnen mit der Ausbildung von Neuropil. Dies könnte auch für Zellen von noch medialer gelegenen Kernen gelten, wie für die Zellen der Kerne MDc und MDm, die allerdings in der SVZ zu finden sein sollten. Das würde bedeuten, dass diese nach ihrer Geburt gar nicht anfangen zu wandern, sondern sich schon an der finalen Position befinden und gleich mit der Verdrahtung beginnen.

Zum anderen könnten die Neuronen ähnlich wie in der IMZ des Kortex (Bayer and Altman, 1991) für eine gewisse Zeit in der ÜZ ausharren, um weiter auszudifferenzieren. Es wäre möglich, dass die Neuronen innerhalb der ÜZ verschiedene Differenzierungsprozesse durchlaufen, ehe sie in die Mantelzone einwandern. Ein starker Hinweis, dass wohl beide Möglichkeiten richtig sind, kommt von Untersuchungen der Gbx2-Knockout Maus (Wassarman et al., 1997). Bei dieser Maus sind die Projektionen aus dem Thalamus in den Kortex völlig gestört. Dil-Tracing Studien zeigen, dass bis auf vereinzelte Ausnahmen keine TCAs in den Kortex projizieren (Miyashita-Lin et al., 1999). Der Knockout des Gens Gbx2 in dieser Mutante wurde durch die Deletion der Homöobox erreicht (Wassarman et al., 1997). Dabei bleibt ein nichttranslatierter 5' Bereich des Gens intakt, dessen Transkripte von einer geeigneten Ribo-Sonde detektiert werden können. Die Expressionsmuster zeigen, dass in der MZ kein Gbx2 exprimiert wird. In den medialen Bereichen des embryonalen Thalamus, in der ÜZ³, ist die Expression dieser nichttranslatierten 5' Sequenz allerdings wie die intakte mRNA im Wildtyp zu finden. Dies könnte darauf hindeuten, dass durch Gbx2 in zwei verschiedenen Prozessen eine Rolle spielt. Zum einen befähigt es alle Neuronen des Thalamus nach dem Auswandern aus der ÜZ Axone zu generieren, die dann aber erst in der MZ gebildet werden. Tracing-Experimente mit Dil (Abb.4-18 O) und immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern für Marker wie Calretinin und Serotonin für TCAs an der Gbx2-Mutante zeigen, dass keine funktionellen TCAs in dieser Mutante existieren (Miyashita-Lin et al., 1999), was eine Beteiligung des Gens Gbx2 an der Axogenese bestärkt. Eine andere Funktion von Gbx2 ist eine kernspezifische Funktion für eine Subpopulation von Neuronen. Die Entsprechende Expression ist offensichtlich funktionellen Gbx2 selbst abhängig und fehlt deshalb in der Knock-out Maus innerhalb der MZ.

Der Expression der verschiedenen Mitglieder des ephrin-/ Eph-Systems (siehe Tabelle 4-5) in der ÜZ könnten somit ebenfalls verschiedene Bedeutungen beigemessen werden. Zum einen könnten sie kernspezifisch sein, zum anderen könnten sie verschiedene Funktionen in der ÜZ haben, z.B. die Neuronen aus der ÜZ in die MZ treiben. Als repulsives Signal, z.B. efn5, könnten sie dafür sorgen, dass die in der MZ generierten Axone nicht in Richtung Ventrikel wachsen, und wie oben beschrieben, könnten bereits innerhalb der ÜZ Zellen der medialen thalamischen Kernen lokalisiert sein, von denen z.B. viele Gbx2 und Lhx2 exprimieren.

³ Miyashita-Lin EM, Hevner R, Wassarman KM, Martinez S, Rubenstein JL (1999) Early neocortical regionalization in the absence of thalamic innervation. *Science* 285:906-909. benennen den medialen Streifen von Gbx2 im embryonalen Thalamus mit SVZ. Auf Grund des Faktums, dass sich nur das medialer liegende paraventriculäre Gewebe im Laufe der Entwicklung reduziert und demnach VZ und SVZ sein sollte, stimme ich dem nicht zu und bevorzuge den Gebrauch der ÜZ.

Neurone, die bereits in der VZ des Thalamus spezifiziert sind, wie z.B. die EphA7-positiven Zellen in der ventralen VZ des dTh, haben nur sehr kurze Aufenthaltszeiten in der ÜZ und wandern schnell in die MZ ein (Abb.4-17 H und I)

5.4.3 Die Gene des efn-/ Eph-Systems sind im embryonalen Thalamus in globalen Gradienten exprimiert

Anhand der erstellten Karte für den embryonalen Thalamus am Tag E16 lassen sich nun die Expressionsmuster der Gene des efn-/ Eph-System den verschiedenen thalamischen Kernen zuordnen. Einige Gene scheinen dabei embryonal auf einzelne Kerne oder Kerngruppen beschränkt zu sein. Die Rezeptoren EphA8 und EphB6, zum Beispiel, sind in nur wenigen Kernen vorhanden. EphA8 ist vor allem posterior in den Kernen VB, LP und Po exprimiert. EphB6 zeigt eine stärkere Expression eher in den anterioren Kernen AD, AV und LD aber auch im posterior gelegenen Kern LP, sodass man nicht sagen kann, dass diese Rezeptoren den Thalamus in einen anterioren und einen posterioren Bereich teilen.

Im Gegensatz zu diesen Genen werden die Rezeptoren EphA3 und EphA4 in einem dorso-ventral orientierten Gradienten über den gesamten embryonalen dorsalen Thalamus exprimiert. Nach der Hypothese von Vanderhaeghen und Kollegen werden die TCAs bereits vor Erreichen der Kortex-Anlage entsprechend eines Faktors im vTC in ihrer anterior-posterior-Achse aufgefächert (Dufour et al., 2003; Vanderhaeghen and Polleux, 2004). Allerdings könnten die Faktoren, die die TCAs in der Ausbreitung der anterior-posterior-Achse beeinflussen bereits im dTh zu finden sein. Da die Thalamische Karte um 90° verdreht auf dem Kortex abgebildet ist, befindet sich die kortikale anterior-posterior Achse im Thalamus ebenfalls um 90° verdreht in dorsoventraler sowie mediolateraler Orientierung (Adams et al., 1997), und ist somit auf den koronalen Gefrierschnitten des Gehirns der Maus detektierbar. Daher sind die beiden gradiert exprimierten Rezeptoren EphA3 und Eph4 für die Lenkung der TCAs gute Kandidaten. Für EphA3, dass im dTh ventral stark und dorsal schwächer exprimiert ist, wurde gezeigt, dass das Protein von EphA3 in die Axone verlagert ist (Kudo et al., 2005), und somit vermutlich für die axonale Zielfindung verwendet wird. Außerdem markiert EphA3 im embryonalen Kortex die supragranulären Schichten des Neokortex, was dazu führen könnte, dass limbische thalamische Fasern ausgeschlossen (repulsive Wirkung) und nichtlimbische Fasern eingeschlossen (attraktive Wirkung) werden. EphA4 ist in der MZ des dTh in einem dem EphA3-Gradienten entgegengesetzten Gradienten exprimiert und könnte in gleicher Weise und in Verbindung mit EphA3 die Projektionen der TCAs beeinflussen.

5.4.4 Der Ligand efna5 und der Rezeptor EphA7 sind potentielle Interaktionspartner und Differenzierungsfaktoren

Der Ligand efna5 zeigt am Tag E16 bereits ein kernspezifisches Muster, wobei die Expression besonders im Bereich von VB stark und gradiert ist (Abb.4-20 A-C). Auch in den verschiedenen Kernen des Genikulatums vLG und dLG ist efna5 in der gleichen Weise gradiert exprimiert (Abb.4-20 C). Ob die Expression von efna5

auf die jeweiligen Kerne beschränkt ist, oder ob sie über die Kerngrenzen hinaus reicht, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, zumal die Expression in einem Gradienten ausläuft. Der Gradient verläuft dabei stets von lateroventral stark nach mediodorsal schwach. Dieses Expressionsmuster ist am Embryonaltag 16 zu detektieren und besteht bis Postnataltag 6 fort (Abb.4-21 C,D). Im postnatalen Thalamus kann die Expression von *efna5* mit großer Sicherheit den einzelnen Kernen zugeschrieben werden.

Mit der Expression des Rezeptors EphA7 verhält es sich ähnlich. Er wird am Tag P6 wie der Ligand *efna5* ebenfalls in den spezifischen sensorischen Thalamuskernen VB, vLG und dLG in Form eines Gradienten exprimiert (Abb.4-21 L, M). Allerdings verläuft der EphA7-Gradient dem *efna5*-Gradienten entgegengesetzt, von dorsomedial stark nach lateroventral schwach, sodass sie stets in einem komplementären Muster erscheinen (Abb.4-21 C,D,L,M,O,R und Abb.5-6 D). Im embryonalen Thalamus ist die Situation scheinbar eine andere. EphA7 wird hier in den Nachbarkernen der *efna5*-markierten Thalamuskern exprimiert und zwar ebenfalls in Form eines, dem *efna5*-Gradienten gegenläufigen, Gradienten. So ergibt sich im embryonalen dTh ebenfalls eine komplementäre Expression des Liganden *efna5* und des Rezeptors EphA7 (Abb.5-7 A,B).

Die Expressionsmuster von *efna5* (Abb.4-20 A-C, Abb.5-6 A,B und D) und EphA7 (Abb.4-19 G-I, Abb.5-6 A,B und D) legen die Vermutung nahe, dass sie als Interaktionspartner bei der Differenzierung und der Verknüpfung des Thalamus mit dem Kortex fungieren. Die Veränderung der Expressionsmuster, die von einer zunächst globalen Expression zu einer kernspezifischen Expression wechseln, sprechen dafür, dass die Differenzierung des Thalamus in mehreren aufeinander folgenden Schritten geschieht, wobei die Expressionen der beteiligten Gene entsprechend angepasst werden. Verfolgt man das Expressionsmuster des Rezeptors EphA7 im dTh von anterior nach posterior (Abb.4-19 G-I) wird die Differenzierung des globalen Gradienten (anterior) in ein regionsspezifischeres Expressionsmuster (posterior) deutlich. Experimente *in-vitro* sowie *in-vivo* zeigen, dass die Bindung des Liganden *efna5* an den „full-length“ Rezeptor EphA7 eine repulsive Wirkung zu Folge hat (Holmberg et al., 2000). Holmberg und Kollegen zeigen, dass in Zellkulturen *efna5* exprimierende Zellen den Kontakt zu EphA7 (FL-Form) exprimierenden Zellen meiden (Holmberg et al., 2000). Dies könnte bei der Differenzierung des embryonalen Thalamus von großer Bedeutung sein. Die Expressionsmuster von *efna5* und EphA7 erwecken den Eindruck, dass die Gene dafür sorgen könnten, dass Zellen verschiedener Kerne sich bei ihrer finalen Positionierung voneinander separieren. Der embryonale Thalamus wird somit am Tag E16 in differente *efna5*-positive und EphA7-positive Kompartimente gegliedert.

⁴ Der Rezeptor EphA7 wird in zwei Formen exprimiert, eine full-length-form (FL), die das gesamte Protein ausmacht und eine truncated-form (TR), die keine Thyrosin-Kinase-Domäne besitzt. Beide Formen werden im Gehirn der Maus in überlappenden, distinkten Mustern exprimiert Maisonpierre PC, Barrezueta NX, Yancopoulos GD (1993) Ehk-1 and Ehk-2: two novel members of the Eph receptor-like tyrosine kinase family with distinctive structures and neuronal expression. *Oncogene* 8:3277-3288, Ciossek T, Millauer B, Ullrich A (1995) Identification of alternatively spliced mRNAs encoding variants of MDK1, a novel receptor tyrosine kinase expressed in the murine nervous system. *Oncogene* 10:97-108, Ciossek T, Ullrich A, West E, Rogers JH (1999) Segregation of the receptor EphA7 from its tyrosine kinase-negative isoform on neurons in adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 74:231-236.. Die Aktivierung der TR-Form hat eine adhesive Wirkung zur Folge Holmberg J, Clarke DL, Frisen J (2000) Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* 408:203-206.. Die in dieser Arbeit verwendete Sonde detektiert FL-Form sowie die TR-Form Merz K (2003) Etablierung einer Bibliothek von Nukleinsäuresonden für axonale enkungsmoleküle der Ephrin/Eph-Familie der Maus. Jena..

Gleichzeitig könnten diese Markierungen der Kompartimente genutzt werden, um die thalamokortikalen Axone in den Kortex zu navigieren: Anteriore Regionen des Thalamus im Kortex nach medial, posteriore nach ventral und laterale und mediale Regionen entsprechend nach caudal und rostral (Caviness and Frost, 1980; Crandall and Caviness, 1984; Adams et al., 1997; Seibt et al., 2003; Garel and Rubenstein, 2004). Nach der Ausbildung einer globalen Karte könnte auf dem Kortex zunächst eine kompartimentspezifische Karte entstehen und erst später in der Entwicklung, nach weiteren Differenzierungsprozessen eine kern- und arealspezifische Karte des Thalamus. Untersuchungen von Miller und Kollegen an Knockout Mäusen der Gene *efna5* und *EphA7* unterstützen diese Annahme in zweierlei Hinsicht (Miller et al., 2006). Zum einen zeigt die *EphA7*-KO Maus sowohl eine Reduktion der Größe, als auch eine Verschiebung des S1- Areal auf dem Kortex nach posterior. Die Verschiebung des Areals geht einher mit einer weiter nach posterior ausgedehnten *efna5*-Expression im Kortex der Maus. Das posterior befindliche repulsive Signal von *EphA7* fehlt und somit können sich zunächst die *efna5* exprimierenden kortikalen Neuronen weiter nach posterior ausbreiten und danach die ankommenden TCAs ebenfalls in den posterioren Kortex hinein projizieren. Die Tatsache dass die *efna5*-KO Maus ähnliche Veränderung wie der Knockout von *EphA7* hervorbringt und der Doppelknockout den Effekt verstärkt (Miller et al., 2006), unterstützt, dass der Ligand *efna5* und der Rezeptor *EphA7* als Interaktionspartner bei diesen Prozessen fungieren und dadurch die Positionierung des Areals auf der Kortexoberfläche beeinflusst wird.

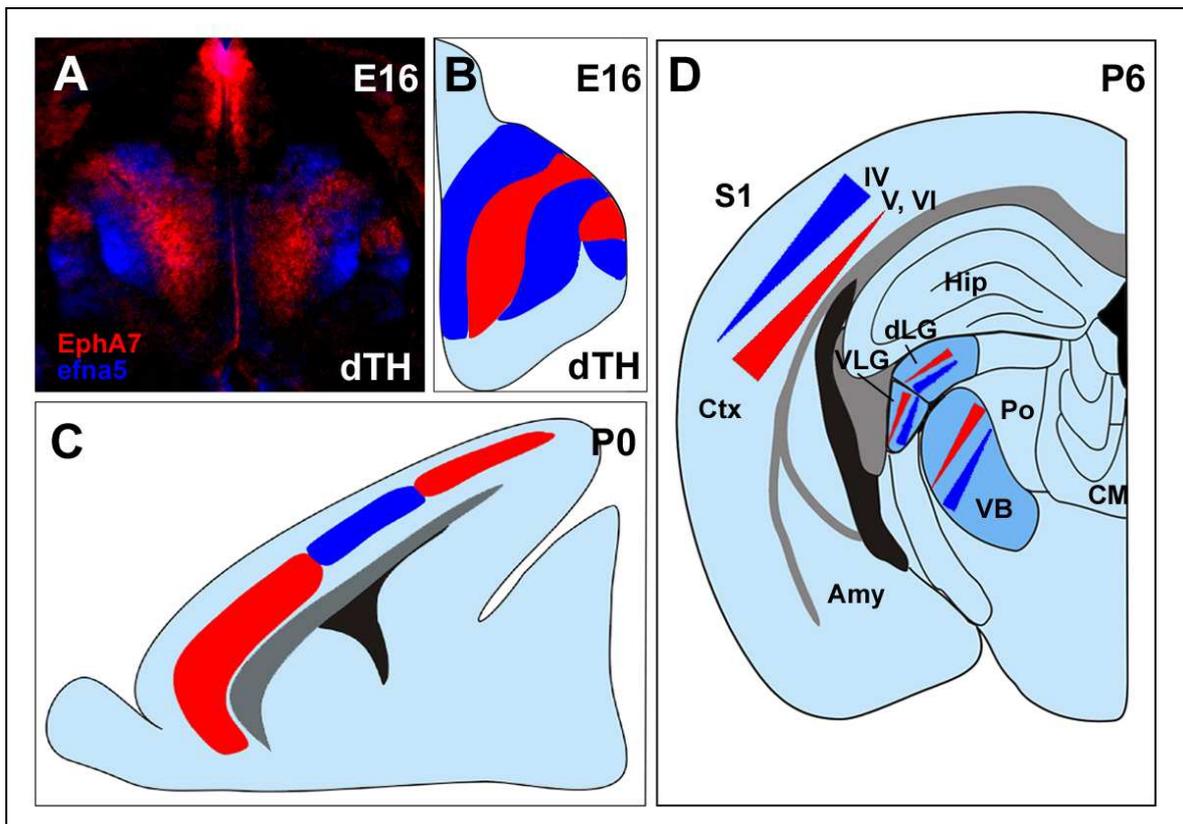


Abb.5-6: Schematische Darstellung der Expression der Gene *EphA7* und *efna5* im dTh sowie im Ctx. A zeigt die Überlagerung der Expressionsmuster von *EphA7* (rot) und *efna5* (blau) von konsekutiven, koronalen Schnitten des posterioren dTh im Altersstadium E16. B und C zeigen schematisch die Expression im dTh bei E16(B) und im sagittal dargestellten Ctx (C) am Tag P0 (Yun et al., 2003). D zeigt die gradierte Expression von *EphA7* (roter Pfeil) und *efna5* (blauer Pfeil) sowohl im S1-Kortex als auch im Thalamus in den Kernen VLG, DLG und VB am Tag P6 (diese Arbeit und (Torii and Levitt, 2005).

Einen Hinweis auf eine Rolle bei der intra-nukleären topografischen Differenzierung liefert eine Arbeit von Masaaki Torii und Pat Levitt, in der kortikothalamische Axone (CTAs) aus den sensorischen kortikalen Areale durch Elektroporation von Expressionsplasmiden den Rezeptor EphA7 überexprimieren oder durch EphA7-siRNA die Translation von EphA7 verringert ist (Torii and Levitt, 2005). Die Projektionen in die entsprechenden sensorischen thalamischen Kerne ist innerhalb dieser Kerne deutlich gestört. Bei Überexpression von EphA7 in den CTAs projizieren die S1-Neuronen innerhalb des VB an die dorsomediale Grenze zu Po, ein Bereich, der geringe Menge efna5 exprimiert. Im Gegensatz dazu projizieren die Fasern der S1-Neuronen an die ventrale Grenze des VB, wo efna5 in großer Menge exprimiert ist.

Auch die Daten der Untersuchungen an KO-Mäusen für efna5 sprechen für eine Beteiligung an der Intra-arealen Topographie. Einzelne Barrels innerhalb des Barrel-Fields des S1-Kortex zeigen systematische Veränderungen in der Größe. Die im Barrel-Field medial gelegenen Barrels sind in ihrer Größe verringert, wohingegen die lateral gelegenen Barrels eine Vergrößerung zeigen, was auf eine verringerte bzw. vermehrte afferente Projektion innerhalb des Barrel-Fields deuten könnte (Vanderhaeghen et al., 2000). Somit scheint der Rezeptor EphA7 und der Ligand efna5 an der intra-nukleären topografischen Projektion der kortikothalamischen Fasern eine entscheidende Rolle zu spielen. Das Schema der Abb.5-6 fasst die Expressionsmuster von efna5 und EphA7 zusammen und stellt die funktionellen Zusammenhänge dar.

5.5 Prozesse der thalamokortikalen Verknüpfung

Während der Entwicklung des Kortex etablieren die verschiedenen kortikalen Areale Faserverbindungen mit dem Thalamus sowie weiteren subkortikalen Regionen des Gehirns. Gleichzeitig etablieren die thalamischen Kerne spezifische Verbindungen mit dem Kortex. Für die Verdrahtungen werden Signalmoleküle benötigt, die sowohl den Weg als auch das Projektionsziel markieren. Für die topografische Richtungslenkung sind generierte Signal-Gradienten zu erwarten. Dabei könnten, bei regionalspezifischer Signalexpression, permissive Signale im Zielgebiet entsprechenden Axonen den Eintritt in alle Regionen ermöglichen, oder repulsive Signale die Axone ausgrenzen. Bereits zum Zeitpunkt des Auswachsens der Axone sollten z.B. die thalamischen Neuronen einen kernspezifischen Lenkungsapparat exprimieren, mit dem die Erkennung des vermeintlichen kortikalen Zielgebiets möglich ist. Der Prozess der Verdrahtung der afferenten und efferenten thalamischen Axone mit dem Kortex kann in mehrere Zwischenschritte untergliedert werden. Die TCAs wachsen vom Zellsoma in der thalamischen MZ i. nach ventral in Richtung vTh, ii. machen sie eine Drehung um 90°, verlassen den Thalamus und formen iii. im vTC die interne Kapsel (IC). Anschließend wachsen die TCAs in die kortikale IMZ iv und positionieren sich entsprechend der Kernspezifität unterhalb der CP und v. machen die TCAs wiederum ein 90° Drehung in Richtung Kortexoberfläche und innervieren schichtspezifisch die entsprechenden zukünftigen kortikalen Areale. Dies gilt in umgekehrter Weise für die CTAs.

Das Zusammenspiel verschiedener Liganden und Rezeptoren aus den verschiedenen Familien der Lenkungsmoleküle navigiert die Axone von ihrem Ursprungsort zu den entsprechenden Zielgebieten. So werden z.B. im Kortex die kortikofugalen Axone durch Sema3C, ein dort attraktives Signal, in die IMZ

gezogen und durch Sema3A, ein repulsives Signal in der VZ abgelenkt, sodass sie die proliferative Zone nicht penetrieren können (Bagnard et al., 1998).

Die vorliegende Arbeit zeigt anhand der Expressionsmuster in den Altersstadien E14 und E16 eine mögliche Beteiligung des ephrin-/ Eph-Systems an der Ausbildung der Verbindungen zwischen spezifischen kortikalen Arealen und den entsprechenden thalamischen Kernen.

5.5.1 Der ventrale Thalamus ist für die TCAs der erste Entscheidungspunkt

Die TCAs wachsen in ventraler Richtung aus dem dTh in Richtung des vTh. Dabei könnten die in der ÜZ exprimierte Liganden und Rezeptoren des ephrin-/ Eph-Systems (efna5, efnb2 und EphA6; Abb.4-17 A,B,G) als repulsives Signal fungieren und dafür Sorge tragen, dass die Axone tatsächlich ventral und in Richtung Ventrikel wachsen. Der vTh selbst zeigt komplizierte Färbemuster für die Rezeptoren EphA5, EphA6 und EphA7 (Abb.4-18 C,F,I und L) in der Zona Incerta (Zi), die durch diese Gene zweigeteilt wird. Dabei erscheint vor allem das Muster von EphA5 interessant. Die Expression im vTh liegt direkt unterhalb der ÜZ, aus der scheinbar keine TCAs entlassen werden. Somit könnte es sich auch bei EphA5 in der Zi des vTh um eine für TCAs nicht zu passierende Barriere handeln.

Der Rezeptor EphB1 (Abb.4-18 H) zeigt diese Teilung ebenfalls im darunter liegenden Retikularkern. EphB1 beschreibt einen medialgelegenen Kanal (Abb.4-18 K) im direkten Anschluss an einen Bereich den die TCAs nutzen, um die Mantelzone (MZ) des dTh zu verlassen (Abb.4-18 O). Somit sind die TCAs beim Austritt aus dem Thalamus auf einen distinkten Kanal im vTh beschränkt. Geht man davon aus, dass zu einem so frühen Zeitpunkt wie E14 in der MZ sich Zellen von spezifisch projizierenden Kernen, wie dem VB und dem lateralen Genikulatum befinden, könnte man annehmen, dass der zweite EphB1 markierte Kanal für die efferenten Axone der später geborenen und medial gelegenen unspezifisch projizierenden Kerne ist. Deren Zellen sind zu diesem Zeitpunkt vermutlich in der ÜZ und SVZ/VZ lokalisiert. Auch als Kanal für die kortikothalamisch projizierenden Fasern wäre denkbar.

Die Ablenkung der TCAs im vTh um 90° ist ein entscheidender Schritt bei der Wegfindung der TCAs aus dem Thalamus in den Kortex. Hier spielt der Hypothalamus, der von den TCAs gemieden wird, eine Rolle. Kokulturen von Thalamus-Explantaten und Explantaten aus dem Hypothalamus zeigen ein verstärktes Wachstum der Axone in den Thalamus-Explantaten auf der hypothalamusabgewandten Seite (Braisted et al., 1999). Dies zeigt, dass im Hypothalamus diffusible, für die TCAs repulsive Signale exprimiert werden, die eine Ablenkung der aus dem Thalamus auswachsenden Axone bewirken. Durch Kontaktrepulsion könnten die Rezeptoren EphA3 und EphA5, die im Hypothalamus an der Grenze zum Thalamus exprimiert werden (Abb.4-18 B, F und K), diesen Effekt unterstützen.

5.5.2 Die Expression verschiedener Gene des ephrin-/ Eph-Systems im vTC suggeriert eine Beteiligung an der Axonlenkung

Das vTC ist augenscheinlich nur eine Durchgangsstruktur für die TCAs und CTAs, doch für die Axonlenkung der Fasern sowohl aus dem Thalamus als auch aus dem Kortex von entscheidender Wichtigkeit. Dil-Tracing Experimente zeigen innerhalb des vTC in und um den Projektionsweg der TC/CT-Faserbündel eine Vielzahl von Zellen, deren Axone das vTC passieren (Metin and Godement, 1996; Braisted et al., 1999; Deng and Elberger, 2003). Sie senden lange Zellfortsätze in den Thalamus wie auch in den Kortex, die als Pionierfasern fungieren und das Passieren der TCAs und der kortikofugalen Axone ermöglichen könnten. G. López-Bendito beschreibt Zellen, die aus der IGE nach medial in die SVZ der mGE migrieren und das Eintreten der TCAs aus dem vTh in das vTC erst ermöglichen (Lopez-Bendito et al., 2006). Sie bringt somit die ganglionische Eminenz in den Zusammenhang der Axonlenkung, da sie ein Zellgerüst für die Penetration des vTC durch die TCAs zur Verfügung stellen. Untersuchungen an Knockout Mäusen für *Dlx1/2*, *ebf1* und *Mash1*, bei denen die ganglionische Eminenz starke Veränderungen aufweisen, zeigen eine hochgradige Störung der Projektionsfasern, die das vTC passieren (Tuttle et al., 1999; Garel et al., 2002). Somit gibt es nicht nur einen Bedarf an Lenkungsmolekülen für die Axone, die das vTC durchwachsen, sondern auch eine zusätzlichen für die Gerüstzellen entlang der Projektionsbahnen.

Die Expressionsmuster der im vTC exprimierten Gene des ephrin-/ Eph-Systems sind sehr komplex, wobei die Überlagerungen der Färbemuster einen Aufbau des vTC in mehreren Schichten suggerieren. Diese molekular unterschiedlichen Schichten könnten ein differenzielles Substrat für unterschiedlich projizierende Axone anbieten und somit verschiedene Korridore, die durch verschiedene Lenkungsmoleküle markiert werden. Fasern, die vom Thalamus in den Kortex und umgekehrt auswachsen, werden so bereits innerhalb des vTC getrennt gehalten. Auch die Migrationswege für Interneuronen der GE könnten räumlich von den Projektionsbahnen von Axonen separiert sein (siehe Migrationswege im Subpallium). Der von López-Bendito und Kollegen gezeigte separierte Korridor für die TCAs existiert (Lopez-Bendito et al., 2006) wird von Neuronen gebildet, die aus der IGE stammen und ist, wie diese Arbeit zeigt, durch den Rezeptor EphB1 markiert (Abb.4-15 G,P und T) und von den Kanälen, die die migrierenden Zellen aus der mGE (*Lhx6*-positiv) durch das vTC nutzen, getrennt (Abb.4-25 G,P und T; siehe Migrationswege im Subpallium).

Arbeiten aus dem Labor P. Vanderhaeghen zeigen *in-vitro* (Dufour et al., 2003; Vanderhaeghen and Polleux, 2004), dass das vTC für die Sortierung der TCAs in anteriorposteriorer Richtung verantwortlich ist. Den Genen des efn-/ Eph-Systems wird auch hier eine Rolle angedacht. Sie beschreiben auf horizontalen Hirnschnitten einen Gradienten von *efna5* im sich entwickelnden Striatum, der anterior schwach und posterior stark ist. Auf den koronalen Hirnschnitten ist die Expression von *efna5* in der posterioren striatalen Anlage ebenfalls zu sehen (Daten nicht gezeigt), allerdings ist der Einfluss dieser *efna5* exprimierenden Region auf die frühen, das vTC passierende TCAs nicht nachzuvollziehen. Dil-Tracing-Experimente zeigen auf koronalen Hirnschnitten, dass die TCAs das vTC passieren ohne die *efna5* exprimierende Region zu tangieren. Sie verlaufen alle entlang der Grenze der SVZ im vTC und somit dorsal über die *efna5*-positive Region hinweg.

5.5.3 Der EphA-Code in der embryonalen Kortexanlage ist potentiell geeignet die TCAs an die korrekten Positionen der CP zu lenken

Die ersten TCAs erreichen bei der Maus das dorsale Telencephalon (dTC) an E14 und beginnen mit den Zellen der SP Kontakte auszubilden, um später die CP zu penetrieren. Am Tag der Geburt (E20) bilden die Axonterminalien in den Schichten 5 und 6 dichte Fasergeflechte aus (Auladell et al., 2000). Bei diesem Prozess ist es für die TCAs erforderlich die richtige arealspezifische Position unterhalb der CP zu finden, um in korrekter Weise mit der Invasion in die CP starten zu können. Signale dafür sollten in der IMZ, SP und in der unteren CP zu suchen sein. Hierbei sind in Form von Gradienten exprimierte Faktoren von besonderem Interesse, da so mit wenigen Molekülen die Koordinaten des gesamten Kortex definiert werden können (Sperry, 1963).

Unter den untersuchten Genen des ephrin-/ Eph-Systems sind diesbezüglich die Rezeptoren EphA4, EphA5 und EphA7 die interessanten Kandidaten-Gene. Sie werden am Tag E16 in der CP, die zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich Zellen der späteren infragranulären Schichten 6 und 5 enthält, in deutlichen und zueinander entgegengesetzten Gradienten exprimiert. Vor allem EphA7 zeigt an E16 eine Expression in der CP, der SP und in der IMZ. Strukturen, die für die Wegfindung der Axone relevant sind. Die Liganden efnA5 und efnA3, die im Thalamus differenziell exprimiert sind, könnten auf den TCAs als Interaktionspartner für die Rezeptoren fungieren.

Hinzu kommt weiter die Expression von EphA3. In der CP markiert er zwar die Zellen der zukünftigen supragranulären Schichten und kann daher nicht direkt von den TCAs als Signal gelesen werden. Allerdings ist EphA3 bei E16 auch in der SP zu finden. Der Rezeptor EphA3 ist dabei sowohl in der SP als auch in der CP nur auf den Bereich des Neokortex beschränkt und trennt diesen von den limbischen Regionen des Kortex ab (Abb.4-4 E und F). Dass das ephrin-/ Eph-System an der Trennung von limbischen und neokortikalen Projektionen beteiligt ist, konnte durch Tracing-Studien mit Dil an der efnA5 Knockout-Maus gezeigt werden. Eine Arbeit von D. Uziel und Kollegen zeigt (Uziel et al., 2002), dass bei Verlust von efnA5 limbische, thalamische Neuronen des laterodorsalen Nukleus (LD) zusätzliche Verknüpfungen mit dem neokortikalen S1-Areal aufrechterhalten. Der Ligand efnA5 könnte in diesem Fall im Zusammenwirken mit dem ausschließlich im Neokortex exprimierten Rezeptor EphA3 durch repulsive Wechselwirkung die Trennung von limbisch und neokortikal projizierenden Axonen im Kortex realisieren.

5.6 Die Bedeutung der Expressionen der Gene des ephrin-/ Eph-Systems Altersstadium P6

5.6.1 Die Bedeutung der Expressionen der Gene des ephrin-/ Eph-Systems Altersstadium P6 bei der postnatalen kortikalen Verschaltung

Die Entwicklung des Gehirns ist bei der Geburt der Maus längst nicht abgeschlossen. Für den S1-Bereich des Kortex erstreckt sich die Reifung bis nach der ersten postnatalen Woche. Die Struktur des Barrel-fields, des

terminalen Projektionsareals des thalamischen Kerns VB, zeichnet sich im Kortex ab. Die reziproken Verknüpfungen mit dem VB sind etabliert, was sich in den schichtspezifischen Projektionen der Neuronen darstellt. Die Hauptziel-Schicht der primären somatosensorischen TCAs ist dabei im S1-Areal die Schicht 4. Die direkte Rückprojektion in den VB erfolgt durch Projektionsneuronen der Schicht 6. Tiefer projizierende Pyramidenzellen der Schicht 5 senden ebenfalls Axonkollaterale in den Thalamus, allerdings nicht in VB sondern in den thalamischen Kern Po (Woolsey and Van der Loos, 1970; Welker and Van der Loos, 1986; Rebsam et al., 2002), der als somatosensorischer Kern höherer Ordnung anzusehen ist. Verschaltungen innerhalb des Kortex werden hauptsächlich postnatal etabliert. Zum einen sind das Projektionen in andere Areale, wie den sekundären somatosensorischen Kortex (S2), den Motorkortex oder auch in den S1 der kontralateralen Hemisphäre (Akers and Killackey, 1978; Carvell and Simons, 1987; Welker et al., 1988). Zum anderen werden die einzelnen Schichten innerhalb des S1 ebenfalls miteinander verschaltet. Wie in Abb.5-7 A gezeigt, senden Neuronen der Schicht 2/3 Axonkollaterale in die Schicht 2/3 und 5, aber nicht in Schicht 4 und 6 und Pyramidenzellen der Schicht 6 projizieren über Axonkollaterale zurück in Schicht 4 und nicht in Schicht 2/3 und 5 (Gilbert and Wiesel, 1979; Bolz et al., 1989; Katz and Callaway, 1992).

Die schichtspezifische Expression einzelner Gene des ephrin-/Eph-Systems im S1 sowie ebenfalls im medialen Präfrontal-Kortex (mPFC) der Maus (Abb.5-7 A) suggeriert eine funktionelle Beteiligung dieses Lenkungssystems an der Ausbildung der Verschaltungen. Auffallend dabei ist z.B. die Expression von EphA8, die spezifisch die thalamische Input-Schicht 4 des somatosensorischen Kortex markiert. Eine Funktion von EphA8 bei der Ausbildung der Barrels ist deshalb sehr nahe liegend. Auch die Expressionen von efnA5 in Schicht 4 und 6 und EphA6 in Schicht 2/3 und 5 lassen bezüglich der intra- und interlaminaren Verschaltungen funktionelle Zusammenhänge erwarten. Ebenso ist die Expression von EphA4 für die Verschaltung von VB und S1 anzusehen. EphA4 wird in VB und im Kortex in den Schichten 2/3, 4 und 5 exprimiert. In der Kombination mit efnA5 ist die Zielschicht 4 allerdings VB-spezifisch markiert (efnA5 und EphA4; Abb.5-7 D). Der Rezeptor EphB1 zeigt in den infragranulären Schichten 5 und 6 (nur schwache Färbung in Schicht 4) eine starke Expression und steht damit im Gegensatz zu der Expression von efnB2, das stark in der supragranulären Schicht 2/3 zu finden ist (ebenfalls nur schwach in Schicht 4). Dies ist schon in den embryonalen Stadien E16 und E18 zu beobachten und könnte darauf hindeuten, dass die fundamentale Separation von infra- und supragranulären Schichten durch das Zusammenwirken von EphB1 und efnB2 reguliert wird.

Im mPFC finden sich ebenfalls schichtspezifische Expressionen, die Schlüsse auf einen funktionellen Beitrag vor allem an der thalamokortikalen Verschaltung zulassen. Der mPFC besteht bei Nagern aus den Arealen prälimbischer Kortex (PrL) sowie infralimbischer Kortex (IL). Er gilt als homologe Region zum laterodorsalen PFC beim Menschen (Brodmann-Area 9 und 46) und ist wie jener durch seine Verknüpfungen mit MD definiert (Jones, 2002; Uylings et al., 2003). MD terminiert in PrL in Schicht 2/3 auf Pyramidenzellen, die nur in dieser Schicht Dendriten ausbilden und in Schicht 2/3 und 5 auf Pyramidenzellen der Schicht 5, welche dendritische Verzweigungen sowohl in Schicht 5 als auch in 2/3 besitzen. Die Pyramidenzellen der Schicht 5 projizieren dabei zurück in MD, wohingegen die Neuronen der Schicht 2/3 ihre Axone in den kontralateralen PrL senden (Kuroda et al., 1995).

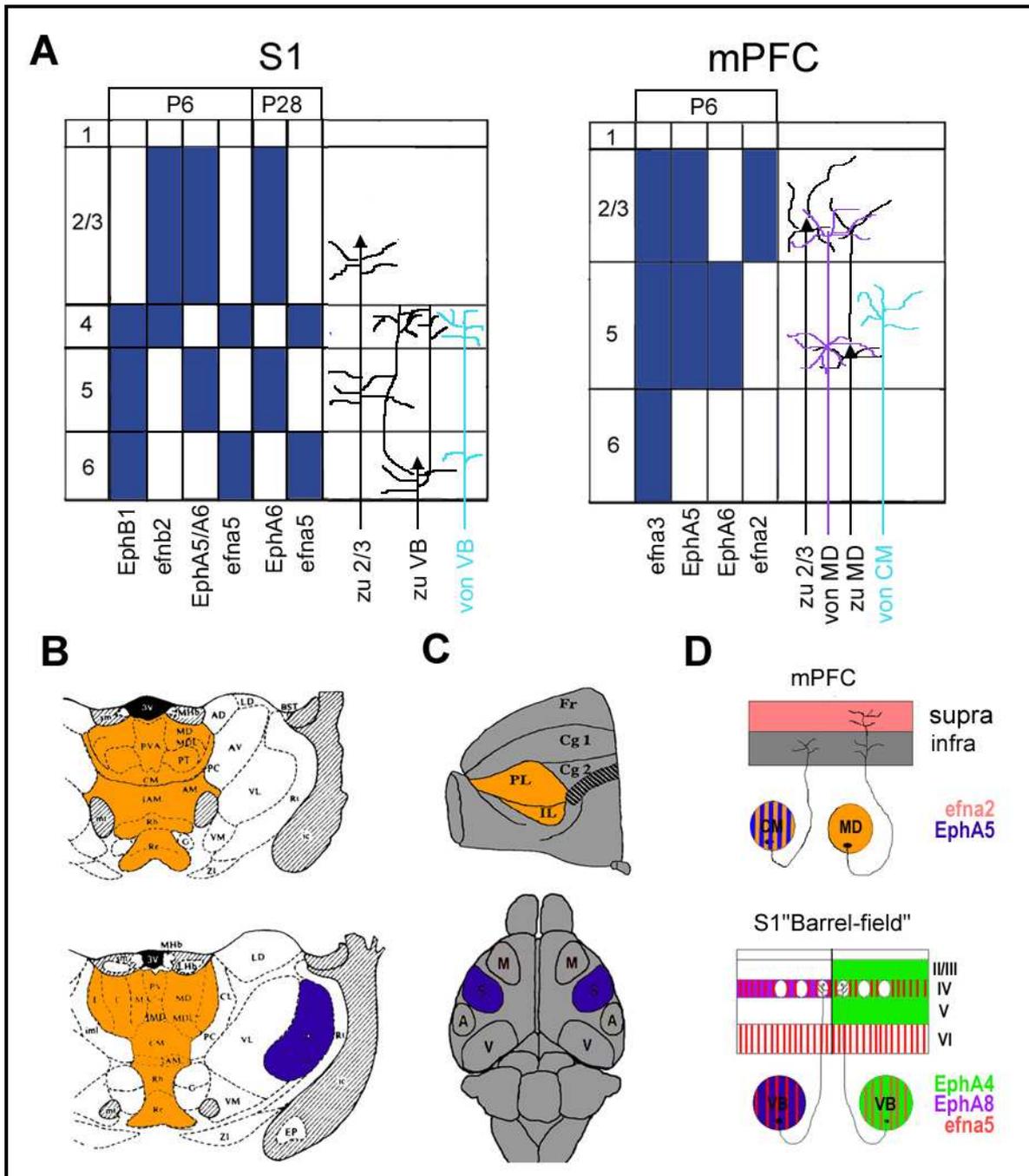


Abb.5-7: Schematische Darstellung der Expressionen wichtiger Gene des ephrin-/ Eph-Systems an P6 und P28 im S1 und an P6 im mPFC (A), sowie die Zusammenhänge der thalamokortikalen Verschaltungen von VB mit S1 und der medialen und intralaminaren thalamischen Kernen mit mPFC (B bis D), sowie die intra- und interlaminaren Verschaltungen in S1 und mPFC (A). A zeigt die Expression der verschiedenen Gene des ephrin-/Eph-Systems in den einzelnen Schichten des S1 und mPFC, sowie die Verschaltungsmuster verschiedener Pyramidenzellen und den thalamischen Input von VB. B zeigt eine koronale Ansicht von Thalamusskizzen mit den betrachteten projizierenden Kernen. C zeigt die entsprechenden Zielgebiete der thalamischen Kerne auf dem Kortex (die PrL- und IL-Ansicht ist von medial, anterior ist links, die S1-Ansicht ist von dorsal, anterior ist oben). D zeigt die Expression einzelner Gene des ephrin-/Eph-Systems in den thalamischen Kernen und im entsprechenden kortikalen Zielgebiet. Erklärung siehe Text.

Auch hier sind infra- und supragranuläre Schichten also fundamental unterschiedlich und möglicherweise durch EphB1 und efnb2 differenziert. Auch in die schichtspezifische Selektion der Axonterminalen von verschiedenen thalamischen Kernen könnte das ephrin-/ Eph-System involviert sein. So enden die Axone des Kerns CM im Gegensatz zu MD nur innerhalb der infragranulären Schicht 5. Die thalamischen

Projektionsneuronen von CM exprimieren den Rezeptor EphA5. Die Expression des Liganden efn2 in der supragranulären Schicht 2/3 könnte somit eine Repulsion der Axone hervorrufen. Die Neuronen von MD exprimieren dagegen kein EphA5 und könnten daher unempfindlich für das efn2-Signal sein und deshalb in die Schicht 2/3 einwachsen (Abb5-7 A und D).

5.6.2 Die postnatalen Expressionsmuster der Gene des ephrin-/ Eph-Systems zeigen Assoziationen zu den Brodmannarealen

Die arealspezifische Expression einzelner Gene des efn-/ Eph-Systems wird im postnatalen Stadium P6 noch deutlicher. Die Expressionen von EphA3, EphA5, EphA6 und EphA7 sind an E18 den Brodmannarealen nicht spezifisch zuzuweisen. An P6 hingegen ist in Bezug auf die kortikalen Areale eine differenziertere Expression verschiedener Gene zu erkennen. EphA3 und EphA5 zeigen keine arealspezifische Expression mehr, wobei die Expression von EphA3 verschwindet und EphA5 sich über den gesamten Kortex ausbreitet. EphA7 wird an P6 hauptsächlich im Cingulum exprimiert. EphA6 wird mit scharfen Grenzen zu S1 im Motorkortex exprimiert, genauso wie EphB1 in der Schicht 5 des Motorkortex. Im Gegensatz dazu zeigt EphA8 als Schicht 4-Marker die stärkste Expression in S1. Der Ligand efn3 ist hauptsächlich im medialen PFC exprimiert. Somit wird deutlich, dass die arealspezifische Expression der Gene des efn-/ Eph-Systems im Zeitraum von E18 nach P6 stark zunimmt und die Bedeutung dieser Expression wohl mehr mit der interarealen Projektion der Pyramidenzellen assoziiert ist als mit der thalamokortikalen Projektion beispielsweise. Dafür sprechen auch die veränderten Expressionsmuster von EphA5 und EphA7 an E18 und P6.

Auch das unterstützt die Annahme, dass den Genen des efn-/ Eph-Systems zu unterschiedlichen Zeiten verschiedene Bedeutungen beigemessen werden können.

5.7 Die Bedeutung der Expressionen der Gene des ephrin-/ Eph-Systems im Alterstadium P28

Die Fragestellung im Altersstadium P28 zielt in dieser Arbeit auf die plastischen Prozesse der Synapsen-Remodellierung. Die Literatur gibt einige Beispiele bei denen die Gene des efn-/ Eph-Systems *in-vitro* und *in-vivo* die Bildung und Stabilisierung der Synapsen im Hippocampus beeinflusst (Grunwald et al., 2001; Henderson et al., 2001; Henkemeyer et al., 2003; Murai et al., 2003; Grunwald et al., 2004; Murai and Pasquale, 2004). Dabei tritt vor allem das B-System in den Vordergrund, das durch die Aktivierung des Rezeptors EphB2 die Spine-Morphologie maßgeblich reguliert (Henderson et al., 2001; Henkemeyer et al., 2003). Grunwald und Kollegen zeigen (Grunwald et al., 2004), dass ebenfalls die B-Liganden möglicherweise in Verbindung mit dem Rezeptor EphA4 eine kritische Rolle bei der Stabilisierung der Synapsen für die Langzeit-Potenzierung spielen. Murai und Kollegen zeigen (Murai et al., 2003), dass auch das A-System in diese Prozesse involviert ist. Die Aktivierung des auf den Pyramidenzellen lokalisierten Rezeptors EphA4 durch den Liganden efn3, der auf Gliazellen lokalisiert ist, beeinflusst ebenfalls die Synapsenbildung wie der Rezeptor EphB2. Allerdings muss man deutlich sagen, dass die meisten Gene des efn-/ Eph-Systems

Kandidaten sind, die bei der Plastizität im Hippocampus eine Rolle spielen. Insgesamt wurden mit Hilfe der *In-situ*-Hybridisierung 14 Gene des efn-/ Eph-Systems in den verschiedenen Regionen des Hippocampus detektiert (Daten nicht gezeigt). Darunter sind 6 A-Rezeptoren, 4 B-Rezeptoren und jeweils zwei A- und B-Liganden. Erstaunlicherweise wird auch der Rezeptor EphA3 exprimiert, der in den anderen, genauer untersuchten Regionen nur embryonal detektiert wurde (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zum Hippocampus konnten im Kortex und im Thalamus nur noch wenige Gene des efn-/ Eph-Systems identifiziert werden: im Thalamus ein Ligand und 4 Rezeptoren und im Kortex 3 Liganden und 5 Rezeptoren. Der im Hippocampus so wichtige Rezeptor EphB2 konnte weder im Kortex noch im Thalamus detektiert werden. Gegenüber der Expression der einzelnen Gene an P6 scheint es, als sind die Expressionen der meisten Gene im Kortex und im Thalamus am abklingen. Allerdings deuten die Expressionsmuster der Rezeptoren EphA4 und EphB6 sowie des Liganden efnb2 auf eine neuerliche Genaktivierung im Kortex hin. EphA4 und efnb2 werden an P28 zusätzlich in Schicht 6 exprimiert und der Rezeptor EphB6 wird nun stark in den infragranulären Schichten 5 und 6 exprimiert, wohingegen er an P6 stärker in den supragranulären Schichten zu finden war. Dies zeigt, dass das efn-/ Eph-System an den plastischen Prozessen des Kortex beteiligt sein kann. Vor allem im mPFC, der in der 4. postnatalen Woche aufgrund plastischer Prozesse die größte Dicke erreicht (Van Eden and Uylings, 1985), sind starke Expressionen zu finden. Darunter sind die erwähnten Rezeptoren EphA4 und EphB6 sowie der Ligand efnb2. Dabei ist efnb2 im mPFC stärker als in S1 exprimiert, genau wie efnb3, welcher in S1 gar nicht exprimiert ist. Auch EphA6 zeigt in mPFC eine wesentlich stärkere Expression als in S1, was insgesamt mit der starken Volumenzunahme und die damit verbundenen erhöhten Plastizität des mPFC in der 4. postnatalen Woche übereinstimmen könnte.

Ein besonderer Fall an P28 ist die Expression von efnb3. In S1 und im mPFC ist efnb3 zwar in allen Schichten und in beiden Regionen exprimiert, doch gibt es einen gravierenden Unterschied: Die Expression von efnb3 ist im mPFC um ein Vielfaches höher als in S1. Dieser Unterschied in der Expression von efnb3 wird im Altersstadium P28 noch deutlicher, da die schichtspezifische Expression von efnb3 im Neokortex verschwindet und dann in vereinzelt Zellen in allen Schichten sowie in der weißen Substanz erscheint. Bei den vereinzelt efnb3-positiven Zellen könnte es sich, da sie massiv in der weißen Substanz auftreten, um Oligodendrozyten handeln, die die voranschreitende Myelinisierung im Zentralnervensystem realisieren. Bereits in den embryonalen Stadien E14 und E16 ist eine Expression in der anterioren endopedunkulären Area (AEP) und in der mGE des vTC zu finden, die unter anderen als Ursprungsort der Oligodendrozyten gelten (Kessar et al., 2006). Somit könnte schon während der Migration aus dem vTC in den Kortex efnb3 mit den Oligodendrozyten assoziiert sein.

6. Zusammenfassung

Während der Entwicklung des Gehirns vollziehen sich verschiedene, die Morphogenese beeinflussende Prozesse, die zur Ausbildung eines funktionsfähigen, verschalteten Gehirns führen. Die Expressionsanalyse des gesamten ephrin-/ Eph-Systems untersuchte mit Hilfe der *In-situ*-Hybridisierung an konsekutiven koronalen Kryostatschnitten des Vorderhirns der Maus die räumliche Verteilung der Gen-Transkripte in den Regionen Ctx, vTC und dTh. Hierbei wurden die Altersstadien E14, E16, E18, P6 und P28 ausgewählt, um durch den zeitlichen Verlauf der Genexpression einen Zusammenhang zu zeitlich eng begrenzten entwicklungsbiologischen Prozessen wie Proliferation, Migration und Axonlenkung herzustellen.

Die Arbeit zeigt durch die Expressionsmuster der verschiedenen untersuchten Gene, dass der frühe embryonale Thalamus (E14) in dorsoventral orientierte Streifen organisiert ist, wobei die Mantelzone die Region ist, in der die thalamischen Neurone ihre Differenzierung beendet und die finale Position kernspezifisch eingenommen haben. Diese streifenartige Organisation des dTh verändert sich bis E15 zu Gunsten eines pronukleären Thalamus, der durch die Expressionsmuster der untersuchten Transkriptionsfaktoren Gbx2, Lhx2 und Ngn2 sowie der Gene des ephrin-/ Eph-Systems in differenzielle Felder gegliedert und kernspezifisch kartiert werden kann.

Die Expressionsmuster der Gene des ephrin-/ Eph-Systems deuten in den proliferativen Zonen der ganglionischen Eminenz auf verschiedene Subpopulationen von Vorläuferzellen von GABAergen Interneuronen hin, die entlang der VZ in unterschiedlichen Bereichen lokalisiert sind. Das Überlappen verschiedener Expressionsmuster im vTC deutet differenzielle mediolateral orientierte Korridore an, die im Zusammenhang mit der Lenkung GABAerger Interneurone sowie der Lenkung der das vTC passierende TCAs und CTAs stehen.

Die Gene des ephrin-/ Eph-Systems zeigen eine differenzielle Expression in der embryonalen Kortexanlage. Es existieren Gene in der VZ, die daher eine Rolle bei der Proliferation der Neuronen spielen können. Eine Segmentierung im Sinne der Protomap konnte in der VZ nicht festgestellt werden. Allerdings zeigt dies die Expression von EphA3 in der SVZ. Eine Segmentierung der proliferativen Zone wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben und ist somit ein Novum. Des weiteren konnte eine Subschicht der SVZ identifiziert werden, die „untere SVZ“ genannt wurde und sich mit dem Migrationsweg der spät geborenen, Lhx6 exprimierenden, GABAergen Interneuronen in der Kortexanlage deckt. Globale Gradienten in der IMZ sowie CP deuten darauf hin, dass die Gene des ephrin-/ Eph-Systems die Lenkung der TCAs sowie CTAs beeinflussen können. Bereits in den embryonalen Stadien E16 und E18 ist eine areal- und schichtspezifische Expression der Gene des ephrin-/ Eph-Systems in der dicht gepackten CP zu erkennen, was zeigt, dass diesen Genen bei der Festlegung der Areal- und Schichtspezifität eine große Bedeutung beigemessen werden kann. Die Markierungen in verschiedenen Arealen in der CP an E18 geben allerdings nicht die

Grenzen der Brodmannareale wieder. Vielmehr ist es eine Einteilung der CP in grobe Felder, die erst später durch die Expression weiterer Gene differenziert werden.

Auch in den postnatalen Stadien werden die vermeintlichen „Entwicklungsgene“ des ephrin-/ Eph-Systems weiterhin exprimiert. Ein Großteil der Gene wird zwar abgeschaltet, doch vereinzelt kommt es an P28 zu Aktivierung von Genen in einzelnen Schichten des Kortex. Dies spricht für eine Beteiligung an der neuronalen Plastizität.

Die Arbeit legt nahe, dass die Gene des ephrin-/ Eph-Systems sowohl in den embryonalen als auch in den postnatalen Stadien an der Entwicklung und Reifung des Gehirns beteiligt sind. Die Veränderungen der Expressionsmuster einzelner Gene weisen darauf hin, dass dies selektiv für verschiedene Prozesse herauf und herunter reguliert werden, sodass die selben Gene zu unterschiedlichen Zeiten an unterschiedlichen Prozessen beteiligt sein können. Andere Gene wie *efnb1* scheinen durch die Beschränkung auf eine einzige Zone über die gesamte Entwicklung hinweg, exklusiv mit einem oder wenigen Prozessen assoziiert zu sein. Die Komplexität der einzelnen Expressionsmuster und die überlappende Expression verschiedener Rezeptoren und Liganden deutet an, dass sie die entwicklungsbiologischen Prozesse in Kombination miteinander steuern, sodass unter Umständen ein gegebener ephrin-/ Eph-Code die biologische Funktion erwirkt und nicht ein einzelnes Gen.

Diese Arbeit ermöglicht es, zukünftig sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* Experimente zu kreieren, in denen das ephrin-/ Eph-System spezifisch verändert werden kann, um die Funktionalität der einzelnen beteiligten Gene an den jeweiligen untersuchten Prozessen noch besser aufzuklären. Die Möglichkeit für einzelne entwicklungsbiologische Prozesse gezielt Kombinationen mehrerer, relevanter Gene des ephrin-/ Eph-Systems in der Maus auszuschalten, sollte neue fundierte Einblicke in die Entwicklungsbiologie des Gehirns bringen.

7. Literaturverzeichnis

- Adams NC, Lozsadi DA, Guillery RW (1997) Complexities in the thalamocortical and corticothalamic pathways. *Eur J Neurosci* 9:204-209.
- Akers RM, Killackey HP (1978) Organization of corticocortical connections in the parietal cortex of the rat. *J Comp Neurol* 181:513-537.
- Altman J, Bayer SA (1979) Development of the diencephalon in the rat. VI. Re-evaluation of the embryonic development of the thalamus on the basis of thymidine-radiographic datings. *J Comp Neurol* 188:501-524.
- Altman J, Bayer SA (1988a) Development of the rat thalamus: II. Time and site of origin and settling pattern of neurons derived from the anterior lobule of the thalamic neuroepithelium. *J Comp Neurol* 275:378-405.
- Altman J, Bayer SA (1988b) Development of the rat thalamus: III. Time and site of origin and settling pattern of neurons of the reticular nucleus. *J Comp Neurol* 275:406-428.
- Altman J, Bayer SA (1988c) Development of the rat thalamus: I. Mosaic organization of the thalamic neuroepithelium. *J Comp Neurol* 275:346-377.
- Altman J, Bayer SA (1989a) Development of the rat thalamus: IV. The intermediate lobule of the thalamic neuroepithelium, and the time and site of origin and settling pattern of neurons of the ventral nuclear complex. *J Comp Neurol* 284:534-566.
- Altman J, Bayer SA (1989b) Development of the rat thalamus: VI. The posterior lobule of the thalamic neuroepithelium and the time and site of origin and settling pattern of neurons of the lateral geniculate and lateral posterior nuclei. *J Comp Neurol* 284:581-601.
- Altman J, Bayer SA (1989c) Development of the rat thalamus: V. The posterior lobule of the thalamic neuroepithelium and the time and site of origin and settling pattern of neurons of the medial geniculate body. *J Comp Neurol* 284:567-580.
- Altman J, Bayer SA (1995) Atlas of prenatal rat brain development.
- Anderson RG (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67:199-225.
- Anderson S, Mione M, Yun K, Rubenstein JL (1999) Differential origins of neocortical projection and local circuit neurons: role of Dlx genes in neocortical interneuronogenesis. *Cereb Cortex* 9:646-654.
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997a) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* 278:474-476.

- Anderson SA, Marin O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128:353-363.
- Anderson SA, Kaznowski CE, Horn C, Rubenstein JL, McConnell SK (2002) Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons in vivo. *Cereb Cortex* 12:702-709.
- Anderson SA, Qiu M, Bulfone A, Eisenstat DD, Meneses J, Pedersen R, Rubenstein JL (1997b) Mutations of the homeobox genes *Dlx-1* and *Dlx-2* disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons. *Neuron* 19:27-37.
- Andrews GL, Yun K, Rubenstein JL, Mastick GS (2003) *Dlx* transcription factors regulate differentiation of dopaminergic neurons of the ventral thalamus. *Mol Cell Neurosci* 23:107-120.
- Aoki M, Yamashita T, Tohyama M (2004) EphA receptors direct the differentiation of mammalian neural precursor cells through a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 279:32643-32650.
- Auladell C, Perez-Sust P, Super H, Soriano E (2000) The early development of thalamocortical and corticothalamic projections in the mouse. *Anat Embryol (Berl)* 201:169-179.
- Bachler M, Neubuser A (2001) Expression of members of the *Fgf* family and their receptors during midfacial development. *Mech Dev* 100:313-316.
- Bagnard D, Lohrum M, Uziel D, Puschel AW, Bolz J (1998) Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* 125:5043-5053.
- Bagnard D, Thomasset N, Lohrum M, Puschel AW, Bolz J (2000) Spatial distributions of guidance molecules regulate chemorepulsion and chemoattraction of growth cones. *J Neurosci* 20:1030-1035.
- Barchmann S (2005) Untersuchung des Eph/Ephrin-Expressionsmuster im sich entwickelnden thalamocortikalen System. In: *Allgemeine Zoologie*. Jena: FSU Jena.
- Bayer SA, Altman J (1991) *Neocortical Development*. New York: Raven Press.
- Birnboim HC, Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* 7:1513-1522.
- Bishop KM, Goudreau G, O'Leary DD (2000) Regulation of area identity in the mammalian neocortex by *Emx2* and *Pax6*. *Science* 288:344-349.
- Bishop KM, Rubenstein JL, O'Leary DD (2002) Distinct actions of *Emx1*, *Emx2*, and *Pax6* in regulating the specification of areas in the developing neocortex. *J Neurosci* 22:7627-7638.
- Blakemore C, Molnar Z (1990) Factors involved in the establishment of specific interconnections between thalamus and cerebral cortex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55:491-504.
- Blits-Huizinga CT, Nelersa CM, Malhotra A, Liebl DJ (2004) Ephrins and their receptors: binding versus biology. *IUBMB Life* 56:257-265.

- Bolz J, Gilbert CD, Wiesel TN (1989) Pharmacological analysis of cortical circuitry. *Trends Neurosci* 12:292-296.
- Bonhoeffer T, Yuste R (2002) Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function. *Neuron* 35:1019-1027.
- Braisted JE, Tuttle R, O'Leary D D (1999) Thalamocortical axons are influenced by chemorepellent and chemoattractant activities localized to decision points along their path. *Dev Biol* 208:430-440.
- Brambilla R, Bruckner K, Orioli D, Bergemann AD, Flanagan JG, Klein R (1996) Similarities and differences in the way transmembrane-type ligands interact with the Elk subclass of Eph receptors. *Mol Cell Neurosci* 8:199-209.
- Brodmann K (1909) Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellbaues. JA Barth, Leipzig.
- Bruckner K, Pasquale EB, Klein R (1997) Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* 275:1640-1643.
- Bulfone A, Puelles L, Porteus MH, Frohman MA, Martin GR, Rubenstein JL (1993) Spatially restricted expression of Dlx-1, Dlx-2 (Tes-1), Gbx-2, and Wnt-3 in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and longitudinal segmental boundaries. *J Neurosci* 13:3155-3172.
- Bürger S (2007) Analyse der Expression der Verdrahtungsmoleküle der Semaphorin/Neuropilin/Plexin Familie während der corticalen Entwicklung der Maus. In: Biologisch Pharmazeutische Fakultät. Jena: FSU Jena.
- Caric D, Gooday D, Hill RE, McConnell SK, Price DJ (1997) Determination of the migratory capacity of embryonic cortical cells lacking the transcription factor Pax-6. *Development* 124:5087-5096.
- Carvell GE, Simons DJ (1987) Thalamic and corticocortical connections of the second somatic sensory area of the mouse. *J Comp Neurol* 265:409-427.
- Catalano SM, Robertson RT, Killackey HP (1991) Early ingrowth of thalamocortical afferents to the neocortex of the prenatal rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2999-3003.
- Catalano SM, Robertson RT, Killackey HP (1996) Individual axon morphology and thalamocortical topography in developing rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 367:36-53.
- Caviness VS, Jr., Frost DO (1980) Tangential organization of thalamic projections to the neocortex in the mouse. *J Comp Neurol* 194:335-367.
- Ciossek T, Millauer B, Ullrich A (1995) Identification of alternatively spliced mRNAs encoding variants of MDK1, a novel receptor tyrosine kinase expressed in the murine nervous system. *Oncogene* 10:97-108.
- Ciossek T, Ullrich A, West E, Rogers JH (1999) Segregation of the receptor EphA7 from its tyrosine kinase-negative isoform on neurons in adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 74:231-236.

- Clemence AE, Mitrofanis J (1992) Cytoarchitectonic heterogeneities in the thalamic reticular nucleus of cats and ferrets. *J Comp Neurol* 322:167-180.
- Colamarino SA, Tessier-Lavigne M (1995) The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* 81:621-629.
- Conover JC, Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Gale NW, Yancopoulos GD, Alvarez-Buylla A (2000) Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci* 3:1091-1097.
- Cooke JE, Moens CB (2002) Boundary formation in the hindbrain: Eph only it were simple. *Trends Neurosci* 25:260-267.
- Crandall JE, Caviness VS, Jr. (1984) Thalamocortical connections in newborn mice. *J Comp Neurol* 228:542-556.
- Crossley PH, Martinez S, Ohkubo Y, Rubenstein JL (2001) Coordinate expression of *Fgf8*, *Otx2*, *Bmp4*, and *Shh* in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* 108:183-206.
- Dalva MB, Takasu MA, Lin MZ, Shamah SM, Hu L, Gale NW, Greenberg ME (2000) EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103:945-956.
- Davenport RW, Thies E, Zhou R, Nelson PG (1998) Cellular localization of ephrin-A2, ephrin-A5, and other functional guidance cues underlies retinotopic development across species. *J Neurosci* 18:975-986.
- Davis S, Gale NW, Aldrich TH, Maisonpierre PC, Lhotak V, Pawson T, Goldfarb M, Yancopoulos GD (1994) Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* 266:816-819.
- De Carlos JA, O'Leary DD (1992) Growth and targeting of subplate axons and establishment of major cortical pathways. *J Neurosci* 12:1194-1211.
- de Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F (1996) Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16:6146-6156.
- Dehay C, Giroud P, Berland M, Smart I, Kennedy H (1993) Modulation of the cell cycle contributes to the parcellation of the primate visual cortex. *Nature* 366:464-466.
- Deng J, Elberger AJ (2003) Corticothalamic and thalamocortical pathfinding in the mouse: dependence on intermediate targets and guidance axis. *Anat Embryol (Berl)* 207:177-192.
- Drescher U, Knoell B (2001) Axon guidance processes in the retinotectal and vomeronasal projection are controlled by Eph receptor tyrosine kinases and ephrins. *Zoology (Jena)* 104:228-231.
- Drescher U, Bonhoeffer F, Muller BK (1997) The Eph family in retinal axon guidance. *Curr Opin Neurobiol* 7:75-80.

- Drescher U, Kremoser C, Handwerker C, Loschinger J, Noda M, Bonhoeffer F (1995) In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82:359-370.
- Dufour A, Seibt J, Passante L, Depaepe V, Ciossek T, Frisen J, Kullander K, Flanagan JG, Polleux F, Vanderhaeghen P (2003) Area specificity and topography of thalamocortical projections are controlled by ephrin/Eph genes. *Neuron* 39:453-465.
- Ellis C, Kasmi F, Ganju P, Walls E, Panayotou G, Reith AD (1996) A juxtamembrane autophosphorylation site in the Eph family receptor tyrosine kinase, Sek, mediates high affinity interaction with p59fyn. *Oncogene* 12:1727-1736.
- Emson PC (1993) In-situ hybridization as a methodological tool for the neuroscientist. *Trends Neurosci* 16:9-16.
- Estivill-Torres G, Pearson H, van Heyningen V, Price DJ, Rashbass P (2002) Pax6 is required to regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors. *Development* 129:455-466.
- Ferri RT, Levitt P (1993) Cerebral cortical progenitors are fated to produce region-specific neuronal populations. *Cereb Cortex* 3:187-198.
- Flames N, Long JE, Garratt AN, Fischer TM, Gassmann M, Birchmeier C, Lai C, Rubenstein JL, Marin O (2004) Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44:251-261.
- Flanagan JG, Vanderhaeghen P (1998) The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 21:309-345.
- Fode C, Ma Q, Casarosa S, Ang SL, Anderson DJ, Guillemot F (2000) A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev* 14:67-80.
- Frantz GD, Weimann JM, Levin ME, McConnell SK (1994) Otx1 and Otx2 define layers and regions in developing cerebral cortex and cerebellum. *J Neurosci* 14:5725-5740.
- Frost DO, Schneider GE (1979) Plasticity of retinofugal projections after partial lesions of the retina in newborn Syrian hamsters. *J Comp Neurol* 185:517-567.
- Fukuchi-Shimogori T, Grove EA (2001) Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8. *Science* 294:1071-1074.
- Fukuda T, Kawano H, Osumi N, Eto K, Kawamura K (2000) Histogenesis of the cerebral cortex in rat fetuses with a mutation in the Pax-6 gene. *Brain Res Dev Brain Res* 120:65-75.
- Gale NW, Holland SJ, Valenzuela DM, Flenniken A, Pan L, Ryan TE, Henkemeyer M, Strebhardt K, Hirai H, Wilkinson DG, Pawson T, Davis S, Yancopoulos GD (1996) Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* 17:9-19.

- Gao PP, Yue Y, Zhang JH, Cerretti DP, Levitt P, Zhou R (1998) Regulation of thalamic neurite outgrowth by the Eph ligand ephrin-A5: implications in the development of thalamocortical projections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5329-5334.
- Gao PP, Zhang JH, Yokoyama M, Racey B, Dreyfus CF, Black IB, Zhou R (1996) Regulation of topographic projection in the brain: Elf-1 in the hippocamposeptal system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11161-11166.
- Garel S, Rubenstein JL (2004) Intermediate targets in formation of topographic projections: inputs from the thalamocortical system. *Trends Neurosci* 27:533-539.
- Garel S, Huffman KJ, Rubenstein JL (2003) Molecular regionalization of the neocortex is disrupted in Fgf8 hypomorphic mutants. *Development* 130:1903-1914.
- Garel S, Yun K, Grosschedl R, Rubenstein JL (2002) The early topography of thalamocortical projections is shifted in Ebf1 and Dlx1/2 mutant mice. *Development* 129:5621-5634.
- Ghosh A, Shatz CJ (1992) Pathfinding and target selection by developing geniculocortical axons. *J Neurosci* 12:39-55.
- Ghosh A, Antonini A, McConnell SK, Shatz CJ (1990) Requirement for subplate neurons in the formation of thalamocortical connections. *Nature* 347:179-181.
- Giger RJ, Kolodkin AL (2001) Silencing the siren: guidance cue hierarchies at the CNS midline. *Cell* 105:1-4.
- Gilardi-Hebenstreit P, Nieto MA, Frain M, Mattei MG, Chestier A, Wilkinson DG, Charnay P (1992) An Eph-related receptor protein tyrosine kinase gene segmentally expressed in the developing mouse hindbrain. *Oncogene* 7:2499-2506.
- Gilbert CD, Wiesel TN (1979) Morphology and intracortical projections of functionally characterised neurones in the cat visual cortex. *Nature* 280:120-125.
- Gitton Y, Cohen-Tannoudji M, Wassef M (1999) Specification of somatosensory area identity in cortical explants. *J Neurosci* 19:4889-4898.
- Gotz M, Stoykova A, Gruss P (1998) Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* 21:1031-1044.
- Gray PA, Fu H, Luo P, Zhao Q, Yu J, Ferrari A, Tenzen T, Yuk DI, Tsung EF, Cai Z, Alberta JA, Cheng LP, Liu Y, Stenman JM, Valerius MT, Billings N, Kim HA, Greenberg ME, McMahon AP, Rowitch DH, Stiles CD, Ma Q (2004) Mouse brain organization revealed through direct genome-scale TF expression analysis. *Science* 306:2255-2257.
- Grunwald IC, Klein R (2002) Axon guidance: receptor complexes and signaling mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 12:250-259.
- Grunwald IC, Korte M, Wolfer D, Wilkinson GA, Unsicker K, Lipp HP, Bonhoeffer T, Klein R (2001) Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 32:1027-1040.

- Grunwald IC, Korte M, Adelmann G, Plueck A, Kullander K, Adams RH, Frotscher M, Bonhoeffer T, Klein R (2004) Hippocampal plasticity requires postsynaptic ephrinBs. *Nat Neurosci* 7:33-40.
- Hartfuss E, Galli R, Heins N, Gotz M (2001) Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol* 229:15-30.
- Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB (2004) 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.
- Hayes SG, Murray KD, Jones EG (2003) Two epochs in the development of gamma-aminobutyric acidergic neurons in the ferret thalamus. *J Comp Neurol* 463:45-65.
- Henderson JT, Georgiou J, Jia Z, Robertson J, Elowe S, Roder JC, Pawson T (2001) The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA-dependent synaptic function. *Neuron* 32:1041-1056.
- Henkemeyer M, Itkis OS, Ngo M, Hickmott PW, Ethell IM (2003) Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *J Cell Biol* 163:1313-1326.
- Henkemeyer M, Orioli D, Henderson JT, Saxton TM, Roder J, Pawson T, Klein R (1996) Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell* 86:35-46.
- Hering H, Sheng M (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* 2:880-888.
- Hevner RF, Neogi T, Englund C, Daza RA, Fink A (2003a) Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Brain Res Dev Brain Res* 141:39-53.
- Hevner RF, Daza RA, Rubenstein JL, Stunnenberg H, Olavarria JF, Englund C (2003b) Beyond laminar fate: toward a molecular classification of cortical projection/pyramidal neurons. *Dev Neurosci* 25:139-151.
- Himanen JP, Chumley MJ, Lackmann M, Li C, Barton WA, Jeffrey PD, Vearing C, Geleick D, Feldheim DA, Boyd AW, Henkemeyer M, Nikolov DB (2004) Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci* 7:501-509.
- Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, Takaku F (1987) A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* 238:1717-1720.
- Holland SJ, Gale NW, Mbamalu G, Yancopoulos GD, Henkemeyer M, Pawson T (1996) Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* 383:722-725.
- Holland SJ, Gale NW, Gish GD, Roth RA, Songyang Z, Cantley LC, Henkemeyer M, Yancopoulos GD, Pawson T (1997) Juxtamembrane tyrosine residues couple the Eph family receptor EphB2/Nuk to specific SH2 domain proteins in neuronal cells. *Embo J* 16:3877-3888.
- Holmberg J, Clarke DL, Frisen J (2000) Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* 408:203-206.
- Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E (1999) A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97:927-941.

- Huberman AD, Murray KD, Warland DK, Feldheim DA, Chapman B (2005) Ephrin-As mediate targeting of eye-specific projections to the lateral geniculate nucleus. *Nat Neurosci* 8:1013-1021.
- Janis LS, Cassidy RM, Kromer LF (1999) Ephrin-A binding and EphA receptor expression delineate the matrix compartment of the striatum. *J Neurosci* 19:4962-4971.
- Jones EG, Rubenstein JL (2004) Expression of regulatory genes during differentiation of thalamic nuclei in mouse and monkey. *J Comp Neurol* 477:55-80.
- Jones MW (2002) A comparative review of rodent prefrontal cortex and working memory. *Curr Mol Med* 2:639-647.
- Katz LC, Callaway EM (1992) Development of local circuits in mammalian visual cortex. *Annu Rev Neurosci* 15:31-56.
- Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD (2006) Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 9:173-179.
- Kidd T, Bland KS, Goodman CS (1999) Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96:785-794.
- Krimer LS, Goldman-Rakic PS (2001) Prefrontal microcircuits: membrane properties and excitatory input of local, medium, and wide arbor interneurons. *J Neurosci* 21:3788-3796.
- Kudo C, Ajioka I, Hirata Y, Nakajima K (2005) Expression profiles of EphA3 at both the RNA and protein level in the developing mammalian forebrain. *J Comp Neurol* 487:255-269.
- Kuroda M, Murakami K, Kishi K, Price JL (1995) Thalamocortical synapses between axons from the mediodorsal thalamic nucleus and pyramidal cells in the prelimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol* 356:143-151.
- Labrador JP, Brambilla R, Klein R (1997) The N-terminal globular domain of Eph receptors is sufficient for ligand binding and receptor signaling. *Embo J* 16:3889-3897.
- Lackmann M, Oates AC, Dottori M, Smith FM, Do C, Power M, Kravets L, Boyd AW (1998) Distinct subdomains of the EphA3 receptor mediate ligand binding and receptor dimerization. *J Biol Chem* 273:20228-20237.
- Lackmann M, Mann RJ, Kravets L, Smith FM, Bucci TA, Maxwell KF, Howlett GJ, Olsson JE, Vanden Bos T, Cerretti DP, Boyd AW (1997) Ligand for EPH-related kinase (LERK) 7 is the preferred high affinity ligand for the HEK receptor. *J Biol Chem* 272:16521-16530.
- Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 19:7881-7888.
- Letinic K, Zoncu R, Rakic P (2002) Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* 417:645-649.

- Liebl DJ, Morris CJ, Henkemeyer M, Parada LF (2003) mRNA expression of ephrins and Eph receptor tyrosine kinases in the neonatal and adult mouse central nervous system. *J Neurosci Res* 71:7-22.
- Liodis P, Denaxa M, Grigoriou M, Akufo-Addo C, Yanagawa Y, Pachnis V (2007) Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* 27:3078-3089.
- Lopez-Bendito G, Cautinat A, Sanchez JA, Bielle F, Flames N, Garratt AN, Talmage DA, Role LW, Charnay P, Marin O, Garel S (2006) Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation. *Cell* 125:127-142.
- Mackarehtschian K, Lau CK, Caras I, McConnell SK (1999) Regional differences in the developing cerebral cortex revealed by ephrin-A5 expression. *Cereb Cortex* 9:601-610.
- Maisonpierre PC, Barrezueta NX, Yancopoulos GD (1993) Ehk-1 and Ehk-2: two novel members of the Eph receptor-like tyrosine kinase family with distinctive structures and neuronal expression. *Oncogene* 8:3277-3288.
- Mallamaci A, Stoykova A (2006) Gene networks controlling early cerebral cortex arealization. *Eur J Neurosci* 23:847-856.
- Mann F, Ray S, Harris W, Holt C (2002a) Topographic mapping in dorsoventral axis of the *Xenopus* retinotectal system depends on signaling through ephrin-B ligands. *Neuron* 35:461-473.
- Mann F, Peuckert C, Dehner F, Zhou R, Bolz J (2002b) Ephrins regulate the formation of terminal axonal arbors during the development of thalamocortical projections. *Development* 129:3945-3955.
- Mann F, Miranda E, Weinl C, Harmer E, Holt CE (2003) B-type Eph receptors and ephrins induce growth cone collapse through distinct intracellular pathways. *J Neurobiol* 57:323-336.
- Marin O, Rubenstein JL (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2:780-790.
- Marin O, Anderson SA, Rubenstein JL (2000) Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J Neurosci* 20:6063-6076.
- Marin O, Plump AS, Flames N, Sanchez-Camacho C, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JL (2003) Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development* 130:1889-1901.
- Marty S, Berzaghi Mda P, Berninger B (1997) Neurotrophins and activity-dependent plasticity of cortical interneurons. *Trends Neurosci* 20:198-202.
- McBain CJ, Fisahn A (2001) Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci* 2:11-23.
- McConnell SK (1995) Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. *Neuron* 15:761-768.
- McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ (1989) Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science* 245:978-982.

- McKenna JT, Vertes RP (2004) Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *J Comp Neurol* 480:115-142.
- Meima L, Kljavin IJ, Moran P, Shih A, Winslow JW, Caras IW (1997) AL-1-induced growth cone collapse of rat cortical neurons is correlated with REK7 expression and rearrangement of the actin cytoskeleton. *Eur J Neurosci* 9:177-188.
- Mellitzer G, Xu Q, Wilkinson DG (1999) Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature* 400:77-81.
- Merz K (2003) Etablierung einer Bibliothek von Nukleinsäuresonden für axonale enkungsmoleküle der Ephrin/Eph-Familie der Maus. Jena.
- Metin C, Godement P (1996) The ganglionic eminence may be an intermediate target for corticofugal and thalamocortical axons. *J Neurosci* 16:3219-3235.
- Metin C, Baudoin JP, Rakic S, Parnavelas JG (2006) Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur J Neurosci* 23:894-900.
- Miller K, Kolk SM, Donoghue MJ (2006) EphA7-ephrin-A5 signaling in mouse somatosensory cortex: developmental restriction of molecular domains and postnatal maintenance of functional compartments. *J Comp Neurol* 496:627-642.
- Mitrofanis J, Guillery RW (1993) New views of the thalamic reticular nucleus in the adult and the developing brain. *Trends Neurosci* 16:240-245.
- Mitrofanis J, Baker GE (1993) Development of the thalamic reticular and perireticular nuclei in rats and their relationship to the course of growing corticofugal and corticopetal axons. *J Comp Neurol* 338:575-587.
- Miyashita-Lin EM, Hevner R, Wassarman KM, Martinez S, Rubenstein JL (1999) Early neocortical regionalization in the absence of thalamic innervation. *Science* 285:906-909.
- Molnar Z, Adams R, Blakemore C (1998a) Mechanisms underlying the early establishment of thalamocortical connections in the rat. *J Neurosci* 18:5723-5745.
- Molnar Z, Adams R, Goffinet AM, Blakemore C (1998b) The role of the first postmitotic cortical cells in the development of thalamocortical innervation in the reeler mouse. *J Neurosci* 18:5746-5765.
- Monschau B, Kremoser C, Ohta K, Tanaka H, Kaneko T, Yamada T, Handwerker C, Hornberger MR, Loschinger J, Pasquale EB, Siever DA, Verderame MF, Muller BK, Bonhoeffer F, Drescher U (1997) Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *Embo J* 16:1258-1267.
- Monyer H, Markram H (2004) Interneuron Diversity series: Molecular and genetic tools to study GABAergic interneuron diversity and function. *Trends Neurosci* 27:90-97.
- Murai KK, Pasquale EB (2004) Eph receptors, ephrins, and synaptic function. *Neuroscientist* 10:304-314.
- Murai KK, Nguyen LN, Irie F, Yamaguchi Y, Pasquale EB (2003) Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci* 6:153-160.

- Muzio L, Mallamaci A (2003) *Emx1, emx2 and pax6 in specification, regionalization and arealization of the cerebral cortex. Cereb Cortex 13:641-647.*
- Muzio L, DiBenedetto B, Stoykova A, Boncinelli E, Gruss P, Mallamaci A (2002) *Emx2 and Pax6 control regionalization of the pre-neuronogenic cortical primordium. Cereb Cortex 12:129-139.*
- Nakagawa Y, O'Leary DD (2001) *Combinatorial expression patterns of LIM-homeodomain and other regulatory genes parcellate developing thalamus. J Neurosci 21:2711-2725.*
- Nakagawa Y, O'Leary DD (2003) *Dynamic patterned expression of orphan nuclear receptor genes RORalpha and RORbeta in developing mouse forebrain. Dev Neurosci 25:234-244.*
- Nakagawa Y, Johnson JE, O'Leary DD (1999) *Graded and areal expression patterns of regulatory genes and cadherins in embryonic neocortex independent of thalamocortical input. J Neurosci 19:10877-10885.*
- Nery S, Fishell G, Corbin JG (2002) *The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. Nat Neurosci 5:1279-1287.*
- Niehage R, Peuckert C, Bolz J, Weth F (2005) *Developmental expression of Ephrin/Eph wiring molecules in mouse homologs of schizophrenia-related brain regions. In. Washington DC: SfN 35th Annual Meeting.*
- Nieto M, Monuki ES, Tang H, Imitola J, Haubst N, Khoury SJ, Cunningham J, Gotz M, Walsh CA (2004) *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.*
- Nieto MA, Gilardi-Hebenstreit P, Charnay P, Wilkinson DG (1992) *A receptor protein tyrosine kinase implicated in the segmental patterning of the hindbrain and mesoderm. Development 116:1137-1150.*
- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR (2004) *Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat Neurosci 7:136-144.*
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001) *Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature 409:714-720.*
- O'Leary DD (1989) *Do cortical areas emerge from a protocortex? Trends Neurosci 12:400-406.*
- Parnavelas JG, Alifragis P, Nadarajah B (2002) *The origin and migration of cortical neurons. Prog Brain Res 136:73-80.*
- Paxinos G, Franklin KPJ (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press.*
- Polleux F, Dehay C, Kennedy H (1997a) *The timetable of laminar neurogenesis contributes to the specification of cortical areas in mouse isocortex. J Comp Neurol 385:95-116.*
- Polleux F, Dehay C, Moraillon B, Kennedy H (1997b) *Regulation of neuroblast cell-cycle kinetics plays a crucial role in the generation of unique features of neocortical areas. J Neurosci 17:7763-7783.*

-
- Price DJ, Willshaw (2000) *Mechanisms of Cortical Development*. New York: Oxford University Press.
- Price DJ, Kennedy H, Dehay C, Zhou L, Mercier M, Jossin Y, Goffinet AM, Tissir F, Blakey D, Molnar Z (2006) The development of cortical connections. *Eur J Neurosci* 23:910-920.
- Puelles L, Rubenstein JL (2003) Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26:469-476.
- Rakic P (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 145:61-83.
- Rakic P (1977) Prenatal development of the visual system in rhesus monkey. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 278:245-260.
- Rakic P (1988) Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241:170-176.
- Raper JA (2000) Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 10:88-94.
- Rebsam A, Seif I, Gaspar P (2002) Refinement of thalamocortical arbors and emergence of barrel domains in the primary somatosensory cortex: a study of normal and monoamine oxidase a knock-out mice. *J Neurosci* 22:8541-8552.
- Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB (1994) Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 79:1245-1255.
- Rice DS, Curran T (2001) Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 24:1005-1039.
- Rubenstein JL, Shimamura K, Martinez S, Puelles L (1998) Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu Rev Neurosci* 21:445-477.
- Rymar VV, Sadikot AF (2007) Laminar fate of cortical GABAergic interneurons is dependent on both birthdate and phenotype. *J Comp Neurol* 501:369-380.
- Santiago A, Erickson CA (2002) Ephrin-B ligands play a dual role in the control of neural crest cell migration. *Development* 129:3621-3632.
- Schlaggar BL, O'Leary DD (1991) Potential of visual cortex to develop an array of functional units unique to somatosensory cortex. *Science* 252:1556-1560.
- Schneider GE (1973) Early lesions of superior colliculus: factors affecting the formation of abnormal retinal projections. *Brain Behav Evol* 8:73-109.
- Seeger MA, Beattie CE (1999) Attraction versus repulsion: modular receptors make the difference in axon guidance. *Cell* 97:821-824.

- Seibt J, Schuurmans C, Gradwohl G, Dehay C, Vanderhaeghen P, Guillemot F, Polleux F (2003) Neurogenin2 specifies the connectivity of thalamic neurons by controlling axon responsiveness to intermediate target cues. *Neuron* 39:439-452.
- Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78:409-424.
- Sperry RW (1963) Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Prog NAS* 50:703-710.
- Stein E, Tessier-Lavigne M (2001) Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* 291:1928-1938.
- Stein E, Huynh-Do U, Lane AA, Cerretti DP, Daniel TO (1998) Nck recruitment to Eph receptor, EphB1/ELK, couples ligand activation to c-Jun kinase. *J Biol Chem* 273:1303-1308.
- Stevens CF (1998) Neuronal diversity: too many cell types for comfort? *Curr Biol* 8:R708-710.
- Stuckmann I, Weigmann A, Shevchenko A, Mann M, Huttner WB (2001) Ephrin B1 is expressed on neuroepithelial cells in correlation with neocortical neurogenesis. *J Neurosci* 21:2726-2737.
- Stuhmer T, Puelles L, Ekker M, Rubenstein JL (2002a) Expression from a *Dlx* gene enhancer marks adult mouse cortical GABAergic neurons. *Cereb Cortex* 12:75-85.
- Stuhmer T, Anderson SA, Ekker M, Rubenstein JL (2002b) Ectopic expression of the *Dlx* genes induces glutamic acid decarboxylase and *Dlx* expression. *Development* 129:245-252.
- Sur M, Garraghty PE, Roe AW (1988) Experimentally induced visual projections into auditory thalamus and cortex. *Science* 242:1437-1441.
- Sussel L, Marin O, Kimura S, Rubenstein JL (1999) Loss of *Nkx2.1* homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126:3359-3370.
- Suzuki SC, Inoue T, Kimura Y, Tanaka T, Takeichi M (1997) Neuronal circuits are subdivided by differential expression of type-II classic cadherins in postnatal mouse brains. *Mol Cell Neurosci* 9:433-447.
- Tamamaki N, Fujimori KE, Takauji R (1997) Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J Neurosci* 17:8313-8323.
- Tarabykin V, Stoykova A, Usman N, Gruss P (2001) Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by *Svet1* gene expression. *Development* 128:1983-1993.
- Theil T, Frain M, Gilardi-Hebenstreit P, Flenniken A, Charnay P, Wilkinson DG (1998) Segmental expression of the EphA4 (Sek-1) receptor tyrosine kinase in the hindbrain is under direct transcriptional control of *Krox-20*. *Development* 125:443-452.
- Tiveron MC, Rossel M, Moepps B, Zhang YL, Seidenfaden R, Favor J, Konig N, Cremer H (2006) Molecular interaction between projection neuron precursors and invading interneurons via stromal-derived

- factor 1 (CXCL12)/CXCR4 signaling in the cortical subventricular zone/intermediate zone. *J Neurosci* 26:13273-13278.
- Torii M, Levitt P (2005) Dissociation of corticothalamic and thalamocortical axon targeting by an EphA7-mediated mechanism. *Neuron* 48:563-575.
- Tuttle R, Nakagawa Y, Johnson JE, O'Leary DD (1999) Defects in thalamocortical axon pathfinding correlate with altered cell domains in Mash-1-deficient mice. *Development* 126:1903-1916.
- Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B (2003) Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res* 146:3-17.
- Uziel D, Muhlriedel S, Zarbalis K, Wurst W, Levitt P, Bolz J (2002) Miswiring of limbic thalamocortical projections in the absence of ephrin-A5. *J Neurosci* 22:9352-9357.
- Uziel D, Garcez P, Lent R, Peuckert C, Niehage R, Weth F, Bolz J (2006) Connecting thalamus and cortex: The role of ephrins. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*.
- Valcanis H, Tan SS (2003) Layer specification of transplanted interneurons in developing mouse neocortex. *J Neurosci* 23:5113-5122.
- Van Eden CG, Uylings HB (1985) Postnatal volumetric development of the prefrontal cortex in the rat. *J Comp Neurol* 241:268-274.
- Vanderhaeghen P, Polleux F (2004) Developmental mechanisms patterning thalamocortical projections: intrinsic, extrinsic and in between. *Trends Neurosci* 27:384-391.
- Vanderhaeghen P, Lu Q, Prakash N, Frisen J, Walsh CA, Frostig RD, Flanagan JG (2000) A mapping label required for normal scale of body representation in the cortex. *Nat Neurosci* 3:358-365.
- Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nunez JM, Vosshall LB, Axel R (1994) Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79:981-991.
- Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32-58.
- Vogt O, Vogt C (1919) Ergebnisse unserer Hirnforschung. *J Psychol Neurol* 25:277-462.
- Vyas A, Saha B, Lai E, Tole S (2003) Paleocortex is specified in mice in which dorsal telencephalic patterning is severely disrupted. *J Comp Neurol* 466:545-553.
- Warren N, Caric D, Pratt T, Clausen JA, Asavaritikrai P, Mason JO, Hill RE, Price DJ (1999) The transcription factor, Pax6, is required for cell proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex. *Cereb Cortex* 9:627-635.
- Wassarman KM, Lewandoski M, Campbell K, Joyner AL, Rubenstein JL, Martinez S, Martin GR (1997) Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function. *Development* 124:2923-2934.

- Welker E, Van der Loos H (1986) Quantitative correlation between barrel-field size and the sensory innervation of the whiskerpad: a comparative study in six strains of mice bred for different patterns of mystacial vibrissae. *J Neurosci* 6:3355-3373.
- Welker E, Hoogland PV, Van der Loos H (1988) Organization of feedback and feedforward projections of the barrel cortex: a PHA-L study in the mouse. *Exp Brain Res* 73:411-435.
- Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A (2001) In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128:3759-3771.
- Wilkinson DG (2001) Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nat Rev Neurosci* 2:155-164.
- Wonders C, Anderson SA (2005) Cortical interneurons and their origins. *Neuroscientist* 11:199-205.
- Wonders CP, Anderson SA (2006) The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci*.
- Woolsey TA, Van der Loos H (1970) The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* 17:205-242.
- Xie SY, Feinstein P, Mombaerts P (2000) Characterization of a cluster comprising approximately 100 odorant receptor genes in mouse. *Mamm Genome* 11:1070-1078.
- Xu Q, de la Cruz E, Anderson SA (2003) Cortical interneuron fate determination: diverse sources for distinct subtypes? *Cereb Cortex* 13:670-676.
- Xu Q, Wonders CP, Anderson SA (2005) Sonic hedgehog maintains the identity of cortical interneuron progenitors in the ventral telencephalon. *Development* 132:4987-4998.
- Xu Q, Alldus G, Holder N, Wilkinson DG (1995) Expression of truncated Sek-1 receptor tyrosine kinase disrupts the segmental restriction of gene expression in the *Xenopus* and zebrafish hindbrain. *Development* 121:4005-4016.
- Xu Q, Mellitzer G, Robinson V, Wilkinson DG (1999) In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature* 399:267-271.
- Xu Q, Cobos I, De La Cruz E, Rubenstein JL, Anderson SA (2004) Origins of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* 24:2612-2622.
- Yu TW, Bargmann CI (2001) Dynamic regulation of axon guidance. *Nat Neurosci* 4 Suppl:1169-1176.
- Yun ME, Johnson RR, Antic A, Donoghue MJ (2003) EphA family gene expression in the developing mouse neocortex: regional patterns reveal intrinsic programs and extrinsic influence. *J Comp Neurol* 456:203-216.
- Zimmer C, Tiveron MC, Bodmer R, Cremer H (2004) Dynamics of Cux2 expression suggests that an early pool of SVZ precursors is fated to become upper cortical layer neurons. *Cereb Cortex* 14:1408-1420.

Zimmer G (2006) Die Rolle von ephrin-A5 bei der Aggregation und Migration kortikaler Neurone während der Entwicklung des Telencephalons. In. Jena: FSU Jena.

Zimmer G, Kastner B, Weth F, Bolz J (2007) Multiple effects of ephrin-A5 on cortical neurons are mediated by SRC family kinases. *J Neurosci* 27:5643-5653.

Zisch AH, Kalo MS, Chong LD, Pasquale EB (1998) Complex formation between EphB2 and Src requires phosphorylation of tyrosine 611 in the EphB2 juxtamembrane region. *Oncogene* 16:2657-2670.

Zou Y, Stoeckli E, Chen H, Tessier-Lavigne M (2000) Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. *Cell* 102:363-375.

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

Allgemeine Abkürzungen:

Amp	Ampicillin	MCS	Multiple Cloning Site
AP	alkalische Phosphatase	mRNA	messenger RNA
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat 4-Toluidinsalz	NBT	Nitroblautetrazoliniumchlorid
bp	Basenpaar	nt	Nukleotid
BSA	Rinderserumalbumin	NTP	Nukleosidtriphosphat
Cb	Calbindin	Oligo-dT	Oligodesoxythymidin
cDNA	komplementäre DNA	PBS	Phosphatgepufferte Saline
Cr	Calretinin	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
CTAB	N-Cetyl-N,N,N- trimethylammoniumbromid	PFA	Paraformaldehyd
DEPC	Diethylpyrocarbonat	Pv	Parvalbumin
DIG	Digoxigenin	RNase	Ribonuklease
DNase	Desoxyribonuklease	RT	Raumtemperatur
dNMP	Desoxynukleosidtriphosphat	RT-PCR	PCR nach reverser Transkription von RNA
DTT	Dithiotreitol	SDS	Sodiumdodecylsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SSC	Natriumcitratgepufferte Kochsalzlösung
efn	Ephrin (Ligand)	Sst	Somatostatin
Eph	Eph-Rezeptor-Tyrosin-Kinase	Tet	Tetrazyklin
kb	Kilobasenpaare	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
MaBS	Maleinsäure gepufferte Saline	tRNA	Transfer-RNA

Anatomische Nomenklatur:

AD	anterodorsaler thalamischer Nukleus	mPFC	medialer Präfrontalkortex
AEP	anteriore endopedunculäre Area	Mz	Marginalzone
AM	anteromedialer thalamischer Nukleus	MZ	Mantelzone
AV	anteroventraler thalamischer Nukleus	oMZ	äußere Mantelzone
CL	centrolateraler thalamischer Nukleus	oSVZ	obere Subventrikulärzone
cGE	caudale ganglionische Eminenz	Pal	Pallidum
CM	centromedialer thalamischer Nukleus	PC	paracentraler thalamischer Nukleus
CP	kortikale Platte	PF	parafaszikulär thalamischer Nukleus
CTA	kortikothalamische Axone	Po	posteriorer thalamischer Nukleus
Ctx	Kortex	Prl	Prälimbischer Kortex
dLG	dorsolaterales Genikulatum	PSPB	Pallium-Subpallium Grenze
dIPFC	dosolateraler Präfrontalkortex	PT	paratenial thalamischer Nukleus
DTB	Diencephalon-Telencephalon Grenze	PV	paraventrikulär thalamischer Nukleus
dTC	dorsales Telencephalon	RC	Rhombencephalon
dTh	dorsaler Thalamus	Re	Nukleus Reuniens
eTh	Epithalamus	Rh	Rhomboid-Nukleus
GE	ganglionische Eminenz	Rt	retikular thalamischer Nukleus
HTh	Hypothalamus	S1	primärer somatosensorischer Kortex
IAD	interanteriodorsal thalamischer Nukleus	S2	sekundärer somatosensorischer Kortex
IAM	interanteromedialer thalamischer Nukleus	Sept	Septum
IC	interne Kapsel	SP	Supplatte
IL	Infralimbischer Kortex	Str	Striatum
IMD	intermediodorsaler thalamischer Nukleus	SVZ	Subventrikulärzone
IMZ	Intermediärzone	TCA	thalamokortikale Axone
LD	laterodorsaler thalamischer Nukleus	ThE	Thalamische Eminenz
IGE	laterale ganglionische Eminenz	uSVZ	untere Subventrikulärzone
lms	lateraler migratorischer Strom	ÜZ	Übergangszone
MC	Mesencephalon	VB	ventrobasaler thalamischer Komplex
MD	mediodorsaler thalamischer Nukleus	vLG	ventrolaterales Genikulatum
MDc	mediodorsaler thalamischer Nukleus central	VM	ventromedialer thalamischer Nukleus
MDl	mediodorsaler thalamischer Nukleus lateral	vTC	ventrales Telencephalon
MDm	mediodorsaler thalamischer Nukleus medial	vTh	Ventraler Thalamus
mGE	mediale ganglionische Eminenz	VZ	Ventrikulärzone
dIPFC	dorsolateraler Präfrontalkortex	ZI	Zona Incerta

8.2 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Während der Arbeiten für die Promotion wurde weder die Hilfe eines Promotionsberaters beansprucht, noch haben Dritte unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen von mir für etwaige Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Arbeit stehen.

Diese Dissertation wurde weder als Prüfungsarbeit für eine staatlichen oder anderen wissenschaftliche Prüfungsnachweis, noch an einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena ist mir bekannt.

Ronny Niehage

8.3 Danksagung

Ein herzlichen Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Jürgen Bolz, der mir eine Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter in seinem Institut den Einstieg in die wissenschaftliche Arbeit ermöglichte. Die Nähe zu seiner Arbeitsgruppe verschaffte mir immer wieder eine Rückkopplung zu anderen Wissenschaftlern. Bei gemeinsamen Seminaren hatte ich die Möglichkeit mein Wissen zu vertiefen und mich über meine Arbeit auszutauschen, was meiner Arbeit stets neue Impulse gab. Ich bedanke mich bei ihm für die Übernahme des Erstgutachtens meiner Dissertation.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Franco Weth, in dessen Arbeitsgruppe „Nachwuchsgruppe Neurogenetik“ konnte ich diese Arbeit anfertigen. Seine außerordentliche Betreuung und Hilfestellung waren nicht nur wissenschaftlich geprägt und vermittelten mir auch außerhalb des Labors den Reiz der Wissenschaft. Sein enormes Wissen im Bereiche der Molekular- und Neurobiologie war mir stets zugänglich und prägte diese Arbeit. Auf einigen Reisen zu Meetings genoss ich seine Erfahrungen im Umfeld der Wissenschaft und seine Freundschaft.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Frau Prof. Dr. Siegrid Löwel für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die kurzzeitige Anstellung in Ihrer Arbeitsgruppe, zur finanziellen Überbrückung der letzten Phase meiner Doktorarbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Martin Bastmeyer für die Übernahme des externen Gutachtens und für eine Einführung im Umgang mit der Software Adobe Photoshop, die für die Auswertung meiner Arbeit eine Grundlage wurde.

Weiterhin möchte ich ein paar Menschen danken, die mir sehr wichtig sind. Tina Rüdiger und Geraldine Zimmer begleiteten mich schon während meines Studiums und sind mir gute Freunde geworden, ebenso wie Natja Haag, Philipp Kaiser und André Güllmer. Sie gaben mir Hilfe im Labor und die nötige Ablenkung außerhalb des Labors. Sie vergrößerten meinen Horizont in vielen Bereichen des Lebens.

Ich bedanke mich bei Susanne Bürger, Liane Dahm, Christoph Gebhardt, Bernd Schlupeck und Silke Schreiber für die stets gute Stimmung in der Arbeitsgruppe, was die Arbeit immer angenehm gestaltete.

Ein Dank an alle meine Freunde, die mich während der Zeit der Promotion begleitet haben und mir immer zur Seite standen. Sie brachten Abwechslung und bereicherten mein Leben mit ihren hochgeschätzten Persönlichkeiten.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei den Menschen, die mir in meinem bisherigen Leben am wichtigsten geworden sind, meinen Eltern und Großeltern, Juliane, meiner langjährigen Lebensgefährtin und ihre Eltern. Auf ihre Unterstützung konnte ich während der langen Zeit immer zählen. Sie gaben mir Kraft und Durchhaltevermögen. Sie haben den Erfolg dieser Arbeit mitgetragen.

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Ronny Niehage

geboren am 29.07.1977 in Bad Salzungen

Ausbildung

1988-1990	Feldatalschule Stadtlengsfeld
1990-1996	Johann Gottfried Seume Gymnasium, Vacha, Thüringen
1996	Allgemeine Hochschulreife
1997-2002	Biologiestudium (Diplom) an der Friedrich Schiller Universität Jena Biologisch-Pharmazeutische Fakultät
2002-2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie
ab 2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Nachwuchsgruppe Neurogenetik mit Promotion

Sonstiges:

1996-1997	Zivildienst im Klinikum Bad Salzungen
-----------	---------------------------------------

Ronny Niehage

8.5 Eigene Publikationen

Zeitschriftenartikel

D. Uziel, P. Carcez, R. Lent, C. Peuckert, R. Niehage, F. Weth und J. Bolz
Connecting Thalamus and Cortex: The Role of Ephrins, *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, **288A: 135-142**
2006

In Vorbereitung

R. Niehage, K. Merz, J. Bolz und F. Weth
Expression patterns of the ephrin /Eph system in the frontal mouse brain during the embryonic and postnatal development.

Kongress-Beiträge

R. Niehage; C.Peuckert; J. Bolz und F.Weth
Developmental expression of ephrin/Eph wiring molecules in mouse homologs of schizophrenia-related brain regions, Program No. **485.5**. 2005 Abstract/ Itinerary Planner. Woshington, DC: Society of Neuroscience; **SFN 35th annual Meeting** ,2005

R.Niehage, D.Vehre, K. Merz, N. Haag and F. Weth
Developmental expression of the ephrin/ Eph system in Schizophrenia-related regions of the mouse brain, Program No. **P197** 2004 Edinburgh; **ISDN 15th biennial Meeting**, 2004

R. Niehage and F. Weth
Lamination of Odorant Receptor Expression Along the Basal/ Apical Axis of the Zebrafish Olfactory Epithelium, Program No. 412 2003 Göttingen; **German Neuroscience 5th Meeting**, 2003