

Die Bedeutung der Ephrine und Eph-Rezeptoren für die
Entwicklung des somatosensorischen Systems in der Maus und
die Auswirkungen des funktionellen Knockouts von Ephrin A5 auf
die Genexpression

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 Dipl. Biol. Christiane Peuckert
geboren am 6. Januar 1975 in Bützow

Jena, 14. September 2006

Gutachter: Prof. J. Bolz, Jena
Prof. L. Olsson, Jena
Prof. U. Müller, Heidelberg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 28. Februar 2007

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Organisation des Kortex	1
1.2	Die Entwicklung des Kortex	2
1.3	Das Modell : Der somatosensorische Kortex	5
1.4	Axonlenkung und Axonlenkungsmoleküle	6
1.5	Die Ephrine und ihre Rezeptoren	9
1.6	Signaltransduktion im Eph-Ephrin-System	11
1.7	Die Bedeutung der Ephrine und Eph-Rezeptoren in der Entwicklung neuronaler Netzwerke	13
1.8	Die Bedeutung der Ephrine und Eph-Rezeptoren im somatosensorischen Kortex	16
1.9	Knockout von Ephrinen und Eph-Rezeptoren	18
1.10	Zielstellung der Arbeit	20
2.	Materialien und Methoden	21
2.1	Materialien	21
2.1.1	Chemikalien	21
2.1.2	Puffer, Lösungen	22
2.1.3	Antikörper	23
2.1.4	Nukleinsäuren	24
2.1.5	Enzyme	26
2.2	Organismen	26
2.3	Methoden	27
2.3.1	Biologische Methoden	27
2.4	Molekularbiologische Methoden	29
2.4.1	Isolierung von RNA	29
2.4.2	Isolierung von Plasmid-DNA	31
2.4.3	Qualitative und quantitative Analyse von Nukleinsäuren	31
2.4.4	Reverse Transkription	31
2.4.5	Polymerase-Kettenreaktion-PCR	32
2.4.6	Aufreinigung von Nukleinsäuren	32
2.4.7	Quantitative Real-Time-PCR	33
2.4.8	Klonierung von Genfragmenten in TOPO [®] -pCR-4-Vektor und Transformation in OneShot [®] Top10 Chemically Competent <i>E.coli</i>	33
2.4.9	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
2.4.10.	<i>In vitro</i> - Transkription und Herstellung von DIG-markierten RNA-Sonden	34
2.4.11.	Agarose-Gelelektrophorese	35

2.4.12	<i>In situ</i> -Hybridisierung an Kryostatschnitten	35
2.4.13	Western Blot	37
2.4.14	Herstellung von cDNA und Biotin- markierter cRNA	38
2.4.15	Hybridisierung, Waschen und Scannen von GeneChips	39
2.5	Histologische Methoden	39
2.5.1	Immunhistochemie	39
2.6	Statistische Auswertung der Microarray- Daten und Generierung von Datensätzen.	41
2.7	Statistische Auswertung	43
2.8	Grauwerteanalyse	43
2.9	Primerauswahl	43
3.	Ergebnisse	44
3.1	Die Expression von allen bekannten Ephrinen und Eph- Rezeptoren im somatosensorischen System von <i>Mus musculus</i> in embryonalen und frühen postnatalen Entwicklungsstadien	44
3.1.1	Die Expression von Ephrinen und Eph- Rezeptoren im somatosensorischen Kortex bzw. im parietalen embryonalen Kortex	44
3.1.1.1	Die Expression von Ephrin A5 im somatosensorischen Kortex bei P6	48
3.1.2	Die Expression von Ephrinen und Eph- Rezeptoren in ausgewählten thalamischen Kernen bzw. im embryonalen dorsalen Thalamus	49
3.1.3	Die Expression von Ephrinen und Eph- Rezeptoren im embryonalen subkortikalen Telencephalon und in den Ganglionischen Eminenzen	53
3.2	Genexpressionsanalyse im somatosensorischen Kortex bei Ephrin A5- knockout- und Wildtypmäusen	55
3.2.1	Globale Parameter	55
3.2.2	Bewertung der Aussagekraft der Vergleiche zwischen Wildtyp und EphrinA5-knockout und der Vergleiche zwischen biologischen Replika	57
3.2.3	Auswahlstrategien zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene	59
3.2.4	1.4% der untersuchten Gene sind im Ephrin A5-knockout- Kortex differentiell exprimiert	60
3.2.5	Analyse der Genfamilie der Ephrine und Eph-Rezeptoren	61
3.2.6	Auswahl von Kandidatengen	65
3.2.7	Sondendesign und Lokalisierung der mRNA-Expression im Kortex mittels nicht radioaktiver <i>In situ</i> - Hybridisierung an 6 Tage alten Mäusen	70
3.2.8	Charakterisierung der Calretinin- exprimierenden Neurone	72
3.2.9	Western Blot-Analyse	75
3.2.10	Retrogrades Tracing	76

4.	Diskussion	78
4.1	Ephrine und Eph-Rezeptoren sind entwicklungs-, schicht- und kernspezifisch im somatosensorischen System exprimiert	79
4.1.1	Entwicklungsspezifische Expressionsdynamik im somatosensorischen Kortex	79
4.1.2	Schichtspezifische Expression	80
4.1.3	Ein Abgleich mit der Literatur	82
4.1.4	Entwicklungsspezifische Expressionsdynamik im dorsalen Thalamus	83
4.1.5	Kernspezifische Expression im dorsalen Thalamus	85
4.1.6	Ein Abgleich mit der Literatur	85
4.1.7	Die Expression von Ephrinen und Eph-Rezeptoren in den Ganglionischen Eminenzen	87
4.1.8	Thalamokortikale Projektionswege	88
4.1.9	Der „Ephrinkode“	90
4.2	Die Auswirkungen des funktionellen Knockouts von Ephrin A5 auf die Genexpression im somatosensorischen Kortex	91
4.2.1	Ephrin A2, EphA5 und EphB6 sind im Ephrin A5-KO heraufreguliert	93
4.2.2	Zwei Komponenten aus der Integrin-vermittelten Signaltransduktion sind im Ephrin A5-knockout differentiell exprimiert	96
4.2.3	ETV1 ist im Ephrin A5-KO heraufreguliert- ein Zeichen für verzögerte Reifung?	98
4.2.4	Die Deregulation von Calretinin im Ephrin A5-KO und transiente Expression in Pyramidenzellen des S1-Kortex deutet auf einen Zusammenhang zwischen funktioneller Reifung der Pyramidenzellen und dem Kalziumhaushalt hin	99
4.3	Zusammenfassung	101
5	Anhang	I
5.1	Abkürzungsverzeichnis	I
5.2	Tabellen	III
5.3	Programm für die Quantitative RT-PCR	XVII
6.	Literaturverzeichnis	XVIII
	Eidesstattliche Erklärung	XXXI
	Danksagung	XXXII
	Lebenslauf	XXXIII
	Veröffentlichungen	XXXIV

1. Einleitung

Die Entwicklung multizellulärerer Organismen ist durch räumlich und zeitlich koordiniert ablaufende Mechanismen wie Zellteilung, Zelldifferenzierung, Zellmigration sowie Ausbildung und gerichtete Eliminierung von Zellen bzw. von Zellfortsätzen gekennzeichnet. Derartige Vorgänge sind insbesondere auch während der Morphogenese des Gehirns von Bedeutung. Das reife Gehirn des Menschen besteht aus über 100 Milliarden, das der Ratte aus ca. 200 Millionen Neuronen (Müller und Reinhardt, 1991, Herculano-Houzel und Lent 2005). Die einzelnen Nervenzellen stehen durch 10000-80000 Synapsen pro Neuron miteinander in Verbindung und bilden ein präzises Netzwerk (Müller und Reinhardt, 1991). Die Verknüpfungen werden über Zellfortsätze, die Dendriten und Axone, hergestellt. Bereits in embryonalen Stadien senden die Neurone ihre Axone aus, um die Projektionsziele zu kontaktieren. Postnatal werden diese ausgebildeten Verknüpfungen verfeinert und durch aktivitätsabhängige Prozesse modifiziert. Für die Etablierung neuronaler Konnektivität ist ein regulatorisches System erforderlich, dem die Zell-Zellkommunikation und Kommunikation zwischen den Zellen mit ihrer Umgebung zugrunde liegt. Die Axone verfügen z.B. über eine Reihe membranständiger Rezeptoren, die als Liganden sogenannte Axonlenkungsmoleküle erkennen. Die Axonlenkungsmoleküle wirken als extrazelluläre Stimuli, die eine intrazelluläre Signaltransduktion zur Folge haben, was eine spezifische Zellantwort hervorruft. Ein besonderer Aspekt in der Entwicklung des Gehirns besteht darin, dass zum Zeitpunkt des Auswachsens von beispielsweise thalamokortikalen Axonen, ihre Zielzellen im Kortex zum großen Teil noch gar nicht gebildet wurden (Lopez-Bendito und Molnar 2003, Kageyama und Robertson 1993, Lund und Mustari, 1977).

1.1 Die Organisation des Kortex

Anatomisch ist der Kortex von Säugetieren in Abschnitte eingeteilt, die nach den Schädelknochen, unter denen sie sich befinden, benannt sind: der Frontallappen (befindet sich unter dem Os frontale), der Scheitel- oder Parietallappen (befindet sich unter dem Os parietale), der Temporallappen (befindet sich unter dem Os temporale) und der Hinterhaupts- oder Occipitallappen (befindet sich unter dem Os occipitale) (Bertolini et al., 1995). Weiterhin lassen sich im Kortex Regionen mit distinkten Funktionen unterscheiden. Es gibt Regionen, die hauptsächlich für die Verarbeitung sensorischer Information verantwortlich sind und Regionen, die mit der Aussendung und Übertragung motorischer Befehle assoziiert sind. Diese Regionen wiederum sind innerhalb einer spezifischen Modalität hierarchisch in Areale unterteilt, die bestimmte Aufgaben in der Informationsverarbeitung haben. Sie werden als primäre, sekundäre oder tertiäre sensorische bzw. motorische Areale bezeichnet. Man unterscheidet z.B. den primären motorischen, somatosensorischen, visuellen und auditorischen Kortex. Jedes primäre sensorische Areal sendet Information an ein benachbartes Areal höherer Ordnung (sekundäres sensorisches Areal), von dem aus die Information zu einem tertiären oder multimodalen Assoziationsareal geleitet wird, wo die Koordination von mehreren sensorischen Modalitäten erfolgt (Kandel et al., 2000, Felleman und Van Essen, 1991). Horizontal ist der Kortex aus unterschiedlichen

Zellschichten aufgebaut, die sich von der Pia mater zur Weißen Substanz erstrecken. Es gibt zwar über den gesamten Kortex Abweichungen in der Anzahl und in Details der funktionellen Organisation, aber generell besteht der Kortex aus 6 Schichten:

- Schicht 1, die sich unterhalb der Pia mater befindet, sehr wenige Zellen enthält und daher auch als *molecular layer* bezeichnet wird.
- Schicht 2, die hauptsächlich kleinere granuläre Zellen enthält, daher als *external granule cell layer* bezeichnet wird.
- Schicht 3, in der sich verschiedenen Zelltypen befinden, darunter viele Pyramidenzellen, diese Schicht heißt auch *external pyramidal layer*.
- Schicht 4, die, wie die Schicht 4 granuläre Zellen enthält und als *internal granule cell layer* bezeichnet wird.
- Schicht 5 mit Pyramidenzellen, die *internal pyramidal cell layer* genannt wird.
- Schicht 6 mit heterogener Zusammensetzung von Neuronen, die daher als polymorphe Schicht oder *multiform layer* bezeichnet wird (Kandel et al., 2000).

Zusätzlich zu der laminaren Organisation weisen viele kortikale Areale eine vertikale Organisation in Modulen auf. Die Module bestehen aus Mikrokolumnen, die anatomisch und funktionell voneinander abgrenzbar sind und durch die Gliafaserausbreitung und den Dendriten- und Neuritenverlauf von Pyramidenzellen zustandekommen. Jede Mikrokolumne enthält Afferenzen:

- aus spezifischen Relaiskernen des Thalamus in der Schicht 4
- aus dem Thalamus in der Schicht 1
- aus anderen Kortexregionen in der Schicht 3

und Efferenzen:

- zu subkortikalen Regionen aus der Schicht 5
- zum Thalamus aus der Schicht 6
- zu anderen kortikalen Arealen aus der Schicht 3.

und gilt als die grundlegende Organisationseinheit im Kortex (Jones EG., 2000, Buldyrev et al., 2000, Mountcastle 1957 und 1997, Bertolini et al., 1995).

1.2 Die Entwicklung des Kortex

In der proliferativen Zone entlang der Ventrikel werden früh embryonal die Neurone des Kortex gebildet. Vom Neuroepithel in der Ventrikulärzone des dorsalen Telencephalons migrieren die postmitotischen Neurone entlang radiärer Gliafasern, bis sie ihre Zielposition innerhalb der kortikalen Platte erreicht haben. Dort lösen sie sich von den Gliafasern. Die Schichtung des Kortex vollzieht sich entlang eines neurogenetischen Gradienten von innen nach außen; zeitlich früher entstandene Neurone bilden tiefere Schichten des Kortex, die oberen Schichten bestehen aus später gebildeten Neuronen (Angevine und Sidman, 1961, Rakic 1974, Luskin und Shatz, 1985, Molnar et al., 2006). Die ersten postmitotischen Neurone bilden die Präplatte, welche Cajal-Retzius-Zellen, GABA-erge Neurone und

Pionierneurone enthält (Rickmann und Wolff 1981, Meyer et al. 2000). Die Präplatte wird durch anschließend entstandene Zellen, welche die kortikale Platte (CP) bilden, in die Marginalzone (MZ-die spätere Schicht 1) und in die Subplate aufgespalten (Marin-Padilla 1971, 1972, 1978, Smart und Mc Sherry 1982, Luskin und Shatz, 1985). Unterhalb der Subplate ist die intermediäre Zone erkennbar, die auch als *inner fibre layer* bezeichnet wird (Molnar et al., 2006). Für *Rodentia* wurde kürzlich beschrieben, dass sich ab dem 14. Embryonaltag die Entstehung der supragranulären Schichten in der Subventrikularzone (SVZ) vollzieht (Tarabykin et al., 2001, Guillemot et al., 2006). Die Abbildung 1 gibt einen Überblick über den Verlauf der embryonalen Entwicklung des Kortex.

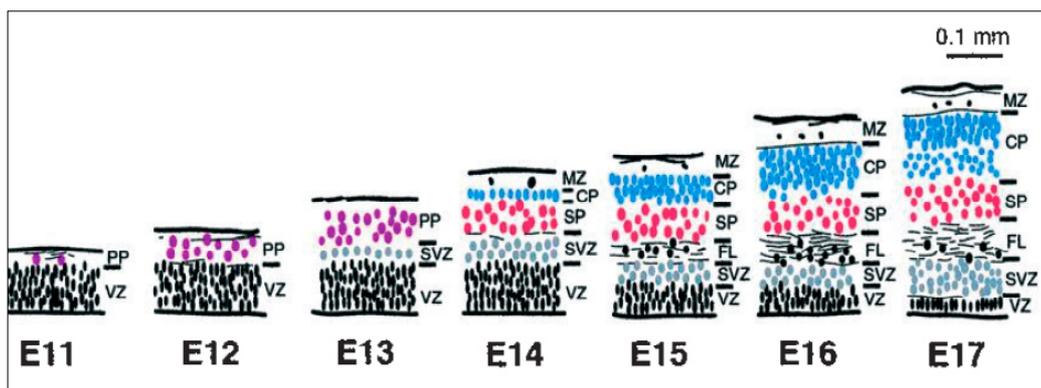


Abb.1: Vergleich des histologischen Aufbaus des cerebralen Kortex während der Embryonalentwicklung am Beispiel der Maus: Schematische Darstellung der Zellschichten zu den angegebenen Entwicklungsstadien E11-E17. CP- kortikale Platte, E-Embryonaltag, FL- fibre layer auch Intermediärzone (IZ), MZ- Marginalzone, PP- Präplatte, SP- Subplate, SVZ- Subventrikularzone, VZ- Ventrikularzone. (aus Molnar et al., 2006).

Tangentiale Migration von kortikalen Interneuronen

Nicht alle Neurone des Kortex entstehen in der kortikalen VZ. Die GABA-ergen Interneurone z.B. haben ihren Ursprung in den Anlagen der Basalganglien, den ganglionischen Eminenzen im ventralen Telencephalon (Übersicht in Marin und Rubenstein, 2001 und 2003). Zwischen E11,5 und E17 werden in der proliferativen Zone der lateralen und medialen ganglionischen Eminenz (LGE/MGE) Neurone generiert, die tangential zum Kortex, aber auch zum olfaktorischen Bulbus und zum Striatum migrieren. Die Interneurone, die zum Kortex wandern, stammen früh embryonal aus der MGE und vom anterioren entopedunculären Areal (AEP), zwischen E13 und E14 aus der LGE und MGE und ab E15 aus der LGE. Auch die Migrationsroute ändert sich; zwischen E11,5 und E13 migrieren die Vorläufer der Interneurone superficial und im Kortex in der MZ; zwischen E13 und E14 wandern die meisten Neurone tief im Gewebe durch das sich entwickelnde Striatum und im Kortex in der IZ und SVZ, einige Neurone wandern aber auch wie die frühen Neurone superficial. Später generierte Neurone migrieren entlang der „tiefen Route“ (Marin und Rubenstein 2001, Nadarajah et al., 2003). Haben die Zellen ihre Zielregion erreicht, ändert sich die Wanderungsrichtung, zunächst erfolgt eine ventrikelorientierte Migration und nach einer „Orientierungspause“ migrieren die Zellen radiär in die kortikale Platte (Nadarajah et al., 2002).

Die Ausbildung thalamokortikaler und kortikothalamischer Projektionen

Zwischen dem 10. und 13. Embryonaltag (E10-E13) entstehen im Thalamus die Zellen, die den ventrobasalen Komplex bilden (Angevine, 1970). Noch während ihrer Differenzierung wachsen die Axone in Richtung Kortex aus. Dabei müssen die thalamischen Axone ihren Weg durch eine dreidimensionale Umgebung finden. Sie müssen zunächst ventral durch den Präthalamus, wachsen, an der Grenze zwischen Di- und Telencephalon ihre Richtung nach lateral ändern, durch das ventrale Telencephalon bis zur Grenze zwischen Pallium und Subpallium wachsen, wo die Axone nach einer erneuten Richtungsänderung nach dorsal in den Kortex einwachsen (Price et al., 2006, Uziel et al., 2006). Zum Zeitpunkt E12 sind durch Injektion von DiI in den dorsalen Thalamus retrograd angefärbte Axone in der Capsula interna sichtbar, einen Tag später haben sie den Kortex erreicht. An E14 waren die thalamischen Axone in die Subplate eingewachsen (Auladell et al., 2000). Das Projektionsziel der Neurone aus dem Thalamus sind Sternzellen der kortikalen Schicht 4. Diese Zellen entstehen zwischen E13 und E16 (Caviness, 1982; Polleux et al., 1997).

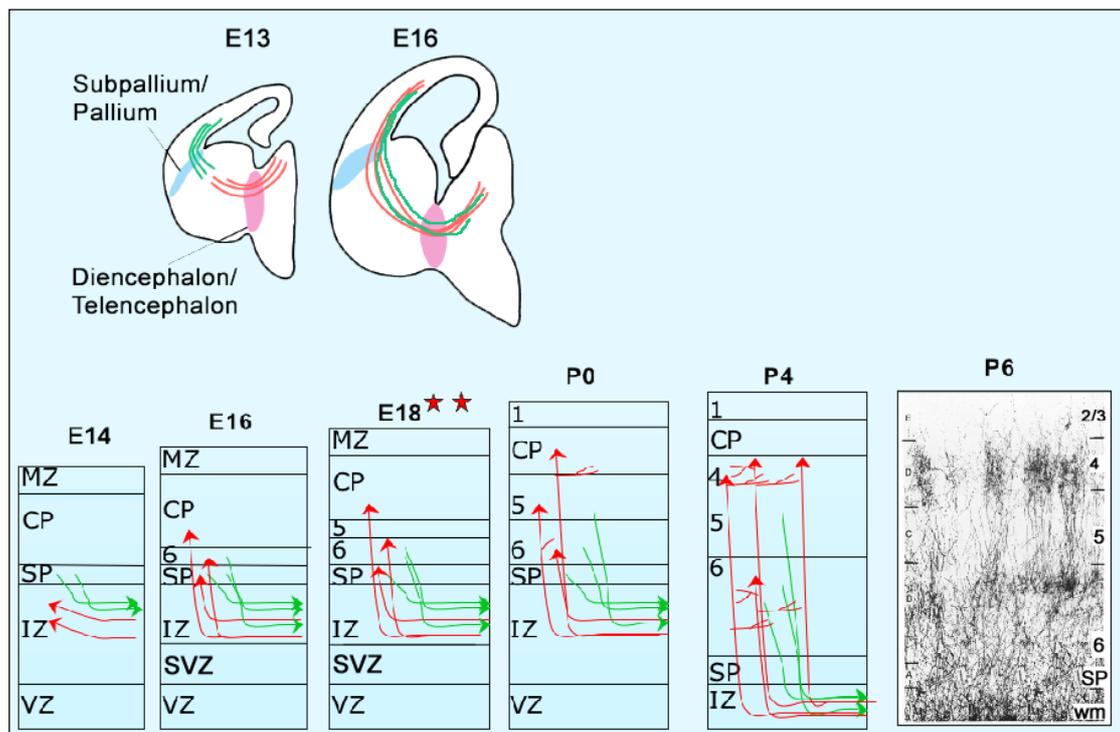


Abb.2: Schematische Darstellung der Entwicklung thalamokortikaler (rot) und kortikothalamischer (grün) Projektionen. Oben: Die Projektionsbahnen der auswachsenden Axone an E13 bzw. E16. Unten: Detaillierte Darstellung der Entwicklung der Projektionen zum und vom Thalamus im Kortex von E14 bis P4 sowie die Darstellung retrograd angefärbter thalamokortikaler Projektionen im somatosensorischen Kortex bei P6 durch Injektionen von Farbstoff in den ventrobasalen Komplex des Thalamus (entnommen aus Agmon et al., 1993). ★- Innervation des Kortex durch postsynaptische Aktivität nach thalamischer Reizung nachgewiesen; CP- kortikale Platte, E-Embryonaltag, IZ- Intermediärzone, MZ- Marginalzone, SP- Subplate, SVZ- Subventrikularzone, VZ- Ventrikularzone, wm- weiße Substanz.(modifiziert nach Lopez-Bendito und Molnar 2003 und Price et al., 2006).

In Primaten ist die zeitliche Differenz zwischen dem Erreichen des Kortex von thalamischen Axonen und dem Entstehen ihrer Zielzellen noch größer (Rakic, 1977). Die Axone akkumulieren in der Subplate, bis die Zellen der zukünftigen Schicht 4 aus der Ventrikularzone in die CP migriert sind. Dieser Zeitraum wird als Warteperiode bezeichnet (Rakic, 1977, Shatz und Luskin, 1986). Bei

Rodentia ist es umstritten, ob auch hier eine Warteperiode existiert (Catalano et al., 1991, 1996; Molnar et al., 1998a, b; Deng und Elberger, 2003, Uziel et al., 2006). Im weiteren Verlauf der Entwicklung wachsen die thalamokortikalen Axone des ventrobasalen Komplexes in die laterale CP ein. An E18 sind nach Reizung des Thalamus im Kortex postsynaptische Aktivitäten nachweisbar (Molnar 2003), und am Tag der Geburt (P0- Postnataltag 0) erreichen die Axone die sich noch differenzierenden Neurone der Schicht 4 (Senft und Woolsey, 1991, Agmon et al., 1993, Rebsam et al., 2002). Innerhalb der ersten postnatalen Woche verzweigen sich die Axone in den Schichten 4 und 6 zunehmend tangential bis P2 und bis P5 erfolgt eine Präzisierung der Verzweigungen auf ein barrelartiges Muster (Rebsam et al., 2002).

Zeitgleich zu den thalamokortikalen Projektionen entwickeln sich auch die Projektionen aus dem Kortex in den Thalamus. Die ersten Neurone, die Projektionen in Richtung Thalamus senden, sind die Zellen der Subplate. Kurz darauf folgen die Axone der Zellen aus der CP (McConnell et al., 1989; De Carlos und O'Leary, 1992; Auladell et al., 2000). Die Projektionsbahnen sind in etwa die gleichen, wie für die thalamokortikalen axonalen Verzweigungen beschrieben. Um E12 sind in der Intermediärzone kortikale Axone erkennbar, die nach lateral, parallel zur Pia, auswachsen. Die Grenze zwischen Pallium und Subpallium wird zwischen E13 und E14 überschritten, die ersten Axone erreichen an E14 die Capsula interna. Einen Tag später, an E15 erreichen die Axone des Kortex den Thalamus (Metin and Godement, 1996; Auladell et al., 2000). In der Abbildung 2 sind die Vorgänge bei der Entwicklung der beschriebenen Projektionen schematisch dargestellt.

1.3 Das Modell : Der somatosensorische Kortex

Das somatosensorische System von *Rodentia* eignet sich besonders gut als Modell, an dem die Entwicklung von Projektionen untersucht werden kann. Die Tasthaare der Schnauze nehmen einen großen Anteil in der somatotopen Repräsentation ein. Sie sind in einem aus 5 Reihen bestehenden stereotypen Muster angeordnet. An den Haarfollikeln befinden sich Nervenendigungen trigeminaler sensorischer Neurone, welche Informationen über Bewegung der Tasthaare aufnehmen und weiterleiten. Die Axone dieser Neurone projizieren in den Hirnstamm, wo sie in Clustern, die als Barreletts bezeichnet werden, enden. Die Barreletts spiegeln die Anordnung der Tasthaare wieder. Über alle Ebenen der Informationsleitung, den dorsalen Thalamus und den somatosensorischen Kortex, wird diese somatotope Projektion aufrechterhalten. Im ventrobasalen Komplex (VB) des dorsalen Thalamus sind die Axonendigungen in Barreloiden angeordnet, im primären somatosensorischen Kortex (S1) terminieren die thalamische Axone in der Schicht 4, wo sie von kortikalen Zellen umgeben sind, diese Strukturen heißen Barrels (Woolsey und Van der Loos, 1970; Welker und Van der Loos, 1986).

Die Neurone des S1-Kortex projizieren reziprok in den Thalamus, zum sekundären somatosensorischen Kortex (S2), zum Motorkortex, zum kontralateralen somatosensorischen Kortex, und zu subkortikalen Arealen (Striatum und Pons) (Akers and Killackey, 1978; Carvell and Simons,

1987; Welker et al., 1988; Deschenes et al., 1998). Die Abbildung 4 gibt einen schematischen Überblick über die Projektionen vom und zum S1-Kortex.

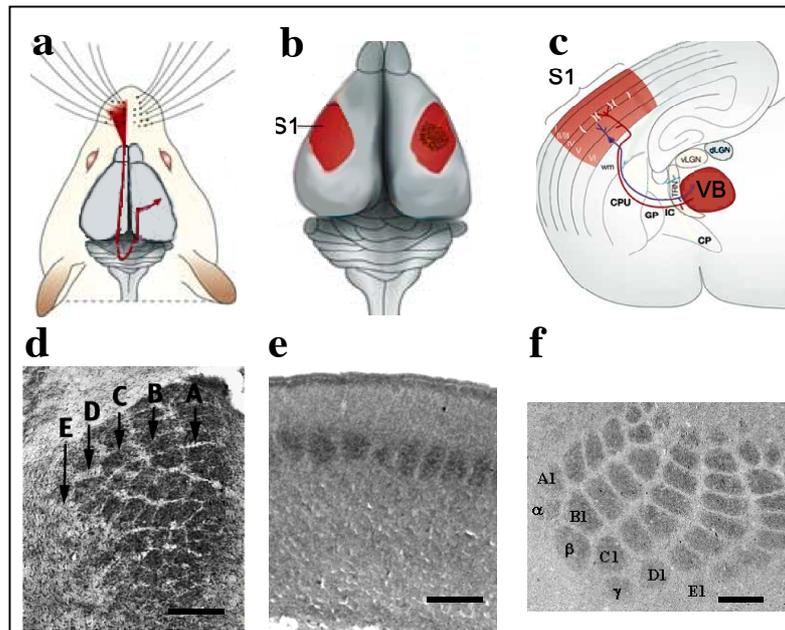


Abb.3: Schematische Darstellung der Projektion der Tasthaare im somatosensorischen System der *Rodentia*: (a) Die Projektionen verlaufen von den Tasthaaren über Hirnstamm und Thalamus zum Kortex, (b) der primäre somatosensorische Kortex enthält das *barrelfield* und befindet sich im parietalen Kortex, (c) die Axone des ventrobasalen Komplexes (VB) projizieren in die Schicht 4 des S1-Kortex, (d) Thalamische Barreloide in der Cytochromoxidasefärbung (CO) eines Sagittalschnittes (Ratte P7), (e) Barrels im S1-Kortex; CO-Färbung eines coronalen Schnittes, (f) Barrels im S1-Kortex; CO-Färbung eines tangentialen Schnittes (e und f Maus P6), A-E- Reihen der Barrels bzw. Barreloide, Maßstab 200µm. (modifiziert nach Lopez-Bendito und Molnar 2003, Abb.(d) aus Haidarliu und Ahissar 2001, (e) und (f) aus Bolz et al., 2004).

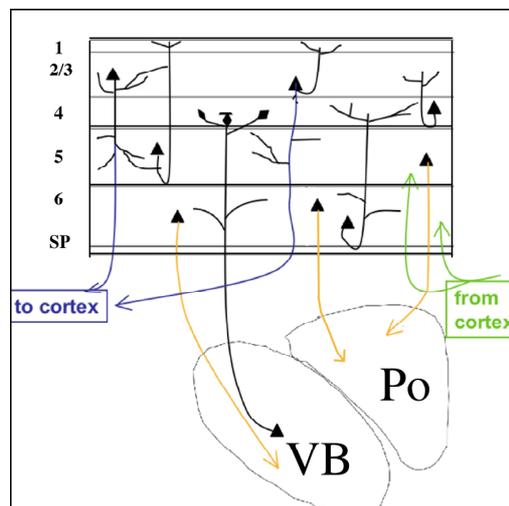


Abb.4: Das neuronale Netzwerk des S1-Kortex. Schematische Darstellung der thalamischen und intrakortikalen Projektionen (schwarz), der Projektionen zu höheren kortikalen Arealen (blau), der Projektionen zum Thalamus (orange) und der Eingänge von anderen kortikalen Arealen (grün). 1-6- Schichten des Kortex, SP-Subplate, VB-ventrobasaler Komplex, Po- posteriorer Nukleus.

1.4 Axonlenkung und Axonlenkungsmoleküle

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Entwicklung des Kortex, insbesondere die Ausbildung axonaler Projektionen, erläutert. Wie aber ist es möglich, dass ein Axon sein Projektionsziel, das weit

entfernt vom Zellkörper liegt, findet? Der Prozeß der Axonlenkung ist ein Spezialfall der Migration, es ist jedoch nur ein Teil der Zelle motil (Zimmer, 2003). Die auswachsenden Axone sind Zellfortsätze, an deren Spitze sich eine spezialisierte Struktur, der Wachstumskegel (*growth cone*) befindet (Uziel et al., 2006, Bolz et al., 2004). Der Wachstumskegel lässt sich in drei Regionen einteilen: Filopodien, Lamellopodien und eine zentrale Einheit (*central core*) (Kandel et al., 2000). Membranständige Rezeptoren, die sich am Wachstumskegel befinden, erkennen Signale, die als Axonlenkungsmoleküle fungieren und attraktiv oder repulsiv auf das Auswachsen des Axons wirken. Die Lenkungsmoleküle können zur extrazellulären Matrix gehören, membrangebunden sein und von anderen Zellen exprimiert werden (die Wirkung wird dann als Kontaktadhäsion bzw. Kontaktrepulsion bezeichnet) oder sezerniert werden (man spricht dann von Chemoattraktion bzw. Chemorepulsion) (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996). Auf dem Weg zu seinem endgültigen Zielgebiet passiert ein Axon mehrere intermediäre Ziele, an denen sich die Wirkung der Lenkungsmoleküle ändern kann. In Abhängigkeit vom Rezeptorrepertoire und den aktivierten Wegen der Signaltransduktion können viele Axonlenkungsmoleküle sowohl attraktiv als auch repulsiv wirken. Diese Vorgänge bewirken, dass die Dynamik des Mikrotubuli- und Aktinzytoskeletts verändert wird. Neben Mikrotubuli im Schaft enthält ein Wachstumskegel filamentäres Aktin, das in Filopodien parallel angeordnet ist und in Lamellopodien ungerichtet angeordnet ist (Lewis und Bridgman, 1992). Beim Wachstum kommt es zur Verlängerung dynamischer Mikrotubulibündel entlang der Aktinfilamente in den distalen Pol des Neuriten (Tanaka und Sabry, 1995, Schaefer et al., 2002). Ein grundlegender Mechanismus, über den Lenkungsmoleküle das Wachstum des Axons beeinflussen können, ist die Regulation der Aktinpolymerisierung bzw. -depolymerisierung in Filopodien (O'Connor et al., 1990). Die Aktinfilamente sind in den Filopodien mit ihren schnell wachsenden Enden nach distal orientiert, die Dynamik kommt einerseits durch Polymerisation von Aktin an der Spitze des Filopodiums, andererseits durch Depolymerisation und Rücktransport von Filamenten zustande (Lin et al., 1995, Übersicht in Lewis 2002). Bevor ein Wachstumskegel seine Richtung ändert, wachsen zunächst die Filopodien asymmetrisch aus (Zheng et al., 1996, Isbister und O'Connor, 2000). In Abbildung 5 sind die beschriebenen Vorgänge am Wachstumskegel illustriert.

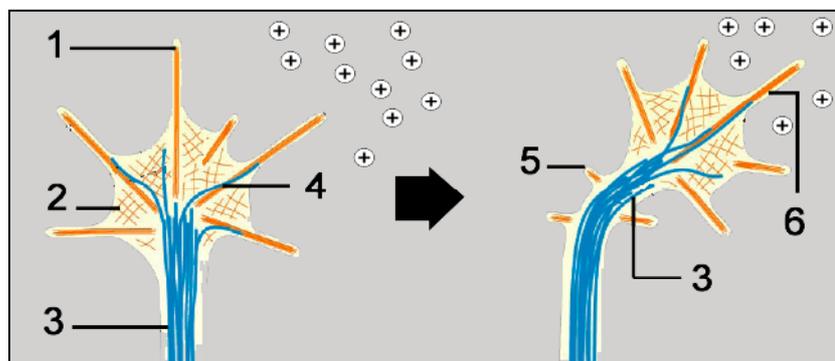


Abb.5: Ein mögliches Modell zur Illustration der Vorgänge bei der Richtungsänderung eines Axons zu einem attraktivem Signal hin (modifiziert nach Dickson, 2002). 1- Filopodium mit F-Aktinfilamenten, parallel angeordnet, 2- Lamellopodium mit ungerichteten Aktinfilamenten, 3- stabile Mikrotubuli im Schaft, 4- dynamische Mikrotubuli erstrecken sich entlang Aktinfilamenten in ein Filopodium, 5- Filopodienrückbildung, 6- Verlängerung der Filopodien.

Die Faktoren, welche das Auswachsen von Axonen beeinflussen, können nach ihrer Wirkung klassifiziert werden: man unterscheidet Faktoren, die attraktiv oder adhäsiv wirken, Faktoren, die repulsiv wirken und Faktoren mit einer Lenkungsfunktion (die Wirkung kann sowohl attraktiv als auch repulsiv sein). In der Abbildung 6 sind die bekannten Faktoren aufgeführt.

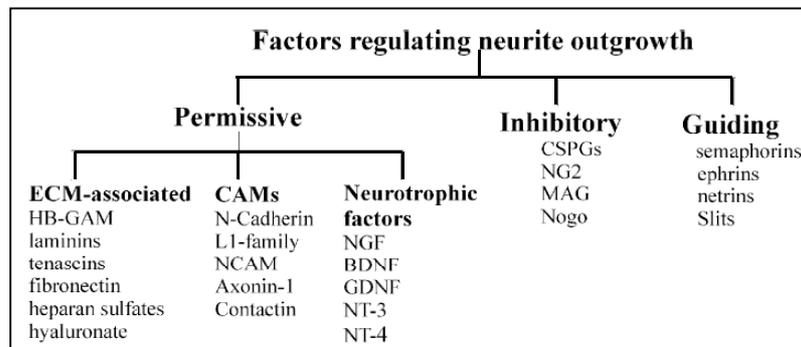


Abb.6: Klassifizierung der Faktoren, die auf das Auswachsen von Axonen wirken. (nach Kiryushku et al., 2004). ECM-extrazelluläre Matrix, CAM- Zelladhäsionsmoleküle, NCAM- Neuronales Zelladhäsionsmolekül, NGF- *Nerve growth factor*, BDNF- *Brain derived neurotrophic factor*, GDNF- *Gliacell derived neurotrophic factor*, NT3,4- Neurotrophin3,4, CSPG- Chondrotinsulfatproteoglykan, NG2- Neuron-Glia-Antigen 2, MAG- *Myelin-associated Glycoprotein*.

Axonlenkungsmoleküle können sezerniert werden, wie Netrine, Slit und Semaphorine der Klasse 3, sie können membranständig sein, wie die Semaphorine der Klassen 4-7 oder die Ephrine (Tamagnone und Comoglio, 2004, Dickson 2002). Die Abbildung 7 gibt einen Überblick über die in Vertebraten bekannten Axonlenkungsmoleküle und ihre Rezeptoren.

Netrine wirken attraktiv auf das Wachstum von Kommissurneuronen zur ventralen Mittellinie in verschiedenen Spezies (Kennedy et al., 1994, Übersicht in Dickson 2002, Hinck 2004). Repulsive Wirkungen sind ebenfalls beschrieben (Winberg et al., 1998, Keleman und Dickson 2001). Die Modalität der Netrin-vermittelten Signale hängt von den Rezeptoren ab. Unc-5-Rezeptoren vermitteln ausschließlich repulsive Signale, DCC-Rezeptoren können attraktive aber auch repulsive Signale, wenn sie zusammen mit Unc-5-Rezeptoren in einem Rezeptorkomplex agieren, vermitteln (Dickson 2002).

Slits sind große sezernierte Moleküle, die über die *roundabout* (Robo)-Rezeptorfamilie wirken. An der Mittellinie verhindern Slitproteine, dass Kommissuraxone zurückkreuzen und am Chiasma opticum, verhindern sie, dass ipsilaterale Axone nach kontralateral wachsen (Battye et al., 1999, Kidd et al., 1999).

In Vertebraten sind 5 Klassen der *Semaphorine* bekannt, Klasse 3-7; Semaphorine der Klassen 1 und 2 kommen in Invertebraten vor (Raper 2000). Semaphorine werden von multimeren Rezeptorkomplexen gebunden. Viele, wenn nicht gar alle Komplexe enthalten Plexine, Transmembranproteine, die in 4 Gruppen (A-D) unterteilt werden. Die Rezeptorkomplexe der Klasse 3-Semaphorine beinhalten zudem Neuropiline, die direkt sowohl an Plexine als auch an Semaphorine binden. Weitere Bestandteile der Rezeptorkomplexe sind für Sema 3A das neuronale Zelladhäsionsmolekül L1 und für Sema 4D die Rezeptortyrosinkinase Met (in der Abbildung 7 nicht gezeigt) (Castellani et al., 2000,

Giordano et al., 2002). Die Wirkung der Semaphorine auf Axone kann attraktiv und repulsiv sein (Wong et al., 1999, Raper 2000, Cheng et al., 2001).

Die *Ephrine* sind membranständige Liganden, die von Eph-Rezeptoren erkannt werden. Im folgenden Abschnitt werden die Ephrine und ihre Rezeptoren näher beschrieben.

Der Vollständigkeit halber sei noch erwähnt, dass auch *Morphogene* beim Navigationsprozeß von Axonen eine Rolle spielen. So sind einige Fibroblast Growth Faktoren (Fgf8, Fgf2) in die Ausbildung retinotektaler und trochlearer Projektionen eingebunden (Brittis et al., 1996a und b, Walz et al., 1997, Irving und Mason, 2000, Irving et al., 2002). Die Projektion von Kommissurneuronen im Rückenmark und von retinalen Ganglienzellen ist durch BMPs (*Bone Morphogenic Proteins*) und Shh (*Sonic hedgehog*) reguliert (Augsburger et al., 1999, Trousse et al., 2001, Charron et al., 2003, Butler und Dodd, 2003, Liu et al., 2005). Und die durch Wnt-Proteine induzierte Signaltransduktion ist für die anteriore Projektion von Kommissurneuronen im Rückenmark verantwortlich (Lyuksyutova et al., 2003, Lu et al., 2004, Nelson und Nusse, 2004). Zudem wurde kürzlich beschrieben, dass Wnt3 im Tectum opticum im Huhn und im superioren Colliculus in der Maus in einem abfallenden Gradienten von medial nach lateral exprimiert ist und auf die retinotpe Projektion in dieser Ebene wirkt (Schmitt et al., 2006).

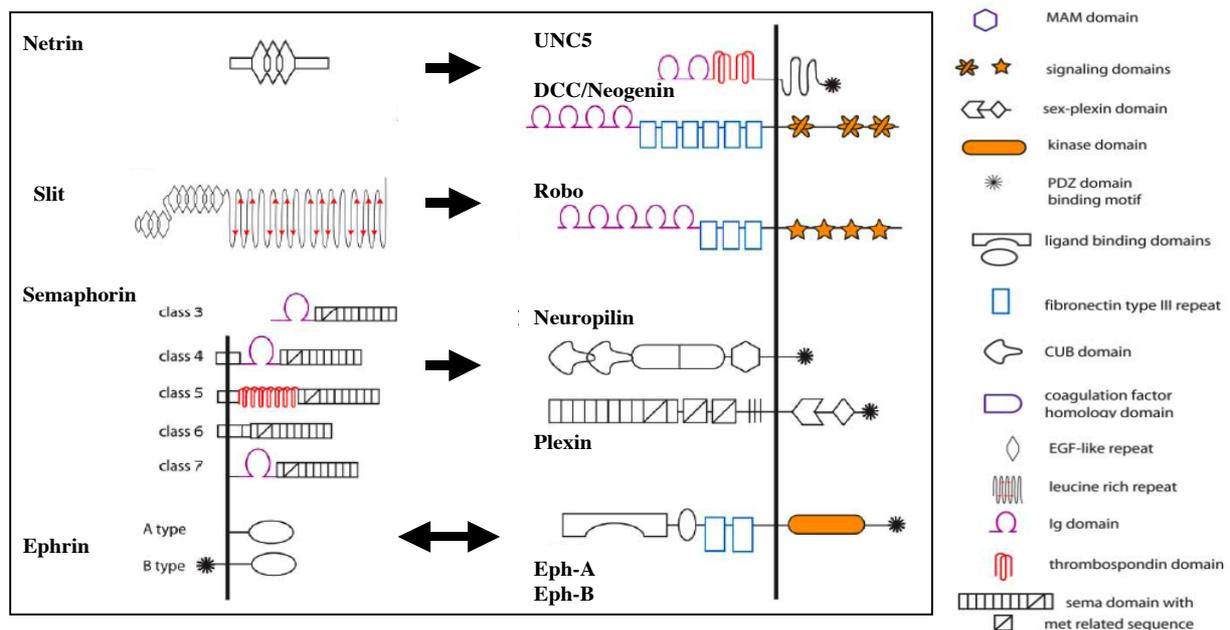


Abb.7: Axonlenkungsmoleküle der Vertebraten und ihre Rezeptoren (nach Hinck 2004)

Links: Schematische Darstellung der Liganden, die entweder sezerniert werden können, und dann chemoattraktiv oder chemorepulsiv wirken, oder die membranständig sein können und Kontaktrepulsion oder Kontaktattraktion vermitteln. Rechts daneben jeweils dazugehörige Rezeptoren; die Pfeile zeigen die Richtung der Signaltransduktion, die bei den Ephrinen auch durch an Rezeptor gebundene Liganden induziert werden kann.

1.5 Die Ephrine und ihre Rezeptoren

Seit der erstmaligen Beschreibung eines Eph-Tyrosinkinase-Rezeptors (*Erythropoietin-Producing Hepatocellular*) durch Hirai et al. (1987) in einer menschlichen Karzinomzelllinie, wurden in

Vertebraten inzwischen 15 Eph-Rezeptoren und 9 Ephrin-Liganden (*Eph-Interacting protein*) identifiziert (Martinez und Soriano, 2005). Die Rezeptoren und Liganden sind aufgrund von Bindungs- Struktur- und Sequenzeigenschaften in A- und B-Klassen unterteilt, wobei die Sequenzhomologien zwischen den Rezeptoren und Liganden einer Gruppe sehr hoch sind (Gale et al., 1996). Die Liganden der Klasse A sind über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Membran verankert und interagieren hauptsächlich mit Eph A-Rezeptoren. Die B-Klasse-Liganden sind durch eine Transmembrandomäne charakterisiert und werden durch B-Rezeptoren erkannt. Liganden einer Klasse können mit allen Rezeptoren derselben Klasse interagieren. Zudem wurden Ausnahmen beschrieben, in denen es zur klassenübergreifenden Bindung kam: z.B. bindet EphB2 den A-Liganden Ephrin A5 und EphA4 kann Ephrin B2 bzw.B3 binden. Die Abbildung 8a gibt einen Überblick über die bisher bekannten Eph-Rezeptoren und Ephrine sowie ihre Klassifizierung und Bindungspräferenzen (Himanen et al., 2004, Übersicht in Kullander und Klein 2002, Klein, 2004, Pasquale 2005, Martinez und Soriano, 2005).

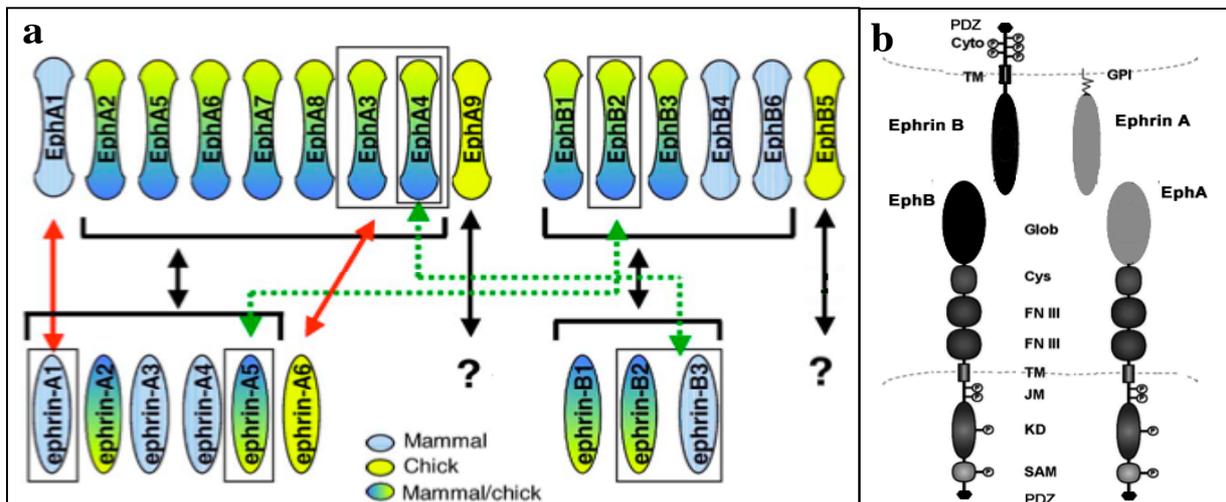


Abb.8: Struktur und Klassifikation der Eph-Rezeptoren und Ephrine der Vertebraten. (a) Innerhalb jeder Klasse binden die Rezeptoren an jeden Liganden (schwarze Pfeile), es existieren aber auch Rezeptoren mit besonders hoher Affinität zu bestimmten Liganden (rote Pfeile), zwei Ausnahmen, EphB2 und EphA4 können auch Liganden der jeweils anderen Klasse binden (grüne Pfeile), für die kürzlich beschriebenen Rezeptoren EphA9 und EphB5 sind noch keine Liganden identifiziert. (b) Die Struktur der Eph-Rezeptoren und der Ephrine; Rezeptoren: Glob- globuläre Ligandenbindedomäne, Cys- cysteinreiche Region, FNIII- Fibronectin-III-motiv, TM- Transmembrandomäne, JM- Juxtamembrandomäne, KD- Tyrosinkinasedomäne, SAM- steriles \square -Motiv, PDZ- *postsynaptic density domain*, P- Tyrosinphosphorylierungstellen; Liganden: N-terminale Ephrin (A oder B) Domäne, GPI- Glykosylphosphatidylinositol-Anker, TM- Transmembrandomäne, cyto- zytoplasmatische Domäne, PDZ- *postsynaptic density domain*, P- Tyrosinphosphorylierungstellen (modifiziert nach Martinez und Soriano, 2005 und Zimmer, 2003).

Strukturell sind sich die transmembranen Eph-Rezeptoren sehr ähnlich; an die N-terminale globuläre ligandenspezifische Domäne schließen sich eine cysteinreiche Region und zwei Fibronectin-III-motive an. Es folgt eine die Membran durchspannende Transmembranregion, gefolgt von einer Juxtamembranregion, einer Tyrosinkinasedomäne, einem sterilen \square -Motiv und schließlich am C-Terminus eine PDZ-Bindedomäne (Torres et al., 1998, Martinez und Soriano 2005). Alle Ephrin-Liganden besitzen am N-Terminus alle eine homologe Rezeptorbindedomäne, die von der Membran

durch eine ca. 40 Aminosäuren enthaltene Region getrennt ist. Die A-Liganden sind über einen GPI-Anker mit der Membran verbunden, die B-Liganden besitzen dagegen eine Transmembranregion und eine kurze, ca. 80 Aminosäuren lange cytoplasmatische Domäne, die am C-Terminus eine PDZ-Bindedomäne enthält (Song et al., 2002, Torres et al., 1998).

1.6 Signaltransduktion im Eph-Ephrin-System

Die Eph-Rezeptor-Tyrosinkinasen regulieren Vorgänge wie Zell-Zell-Adhäsion, Migration und Repulsion. Demnach konvergieren die durch Eph/ Ephrin- Interaktion induzierten Signalkaskaden auf Zytoskelett und Adhäsion beeinflussende Reaktionen. Die Aktivierung erfolgt über einen 2-Schritt-Mechanismus. Zunächst erfolgt eine monovalente Interaktion zwischen einem Ephrin und einem Eph-Rezeptormolekül, die im nanomolaren Bereich liegen kann (Himanen et al., 2003) und in einem Heterodimer resultiert. Niedrig-affine homophile Bindung zwischen Rezeptoren bzw. Liganden werden durch bestimmte Regionen begünstigt, die sich bei den Ephrinen in ihrer extrazellulären Domäne befinden, bei den Eph-Rezeptoren in ihrer globulären Domäne, cysteinreicher Region und in der SAM-Domäne. Eph-Ephrin-Dimere lagern sich zu Heterotetrameren zusammen. Hierdurch werden infolge von Konformationsänderungen, die sich an der globulären Domäne der Rezeptoren vollziehen, die intrazellulären Domänen der Rezeptor-Liganden-Komplexe angenähert, es erfolgt eine Transautophosphorylierung an den Aktivierungsstellen der Kinasedomäne, in deren Folge eine sterische Veränderungen die volle Aktivität der Kinase bewirkt (Übersicht in Pasquale 2005). Die Heterotetramere können sich weiter zu Multimeren bzw. Clustern formieren, die über die Region des initialen Zell-Zell-Kontaktes hinausgehen (Himanen et al., 2001). Es wird vermutet, dass die Signalstärke und –Modalität vom Grad der Clusterung abhängt (Pasquale 2005).

Die Aktivierung eines Eph-Rezeptors resultiert in Interaktionen mit Adaptormolekülen, welche die Signale ins Zellinnere weiterleiten, z.B. die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, die *Src-homology*-Domänen SH2 und SH3 enthalten, oder Ephexin, was die GTPasen Rho, Rac und Cdc42 aktivieren bzw. inhibieren kann (Zisch et al., 1998, Wahl et al., 2000, Shamah et al., 2001). Am Ende der Signalkette wird die Aktinpolymerisierung bzw. –Depolymerisierung beeinflusst. Dies kann im Wachstum des Zellfortsatzes bzw. im Kollaps des axonalen Wachstumskegels resultieren. Aktivierte Ligand-Rezeptor-Komplexe können auch auf die Substratadhäsion wirken. Das geschieht unter anderem durch Wechselwirkung mit der GTPase R-Ras, mit der *Focal-Adhesion-Kinase* FAK, oder mit dem Adaptorprotein Nck, wobei jeweils die Integrin-vermittelte Adhäsion verstärkt (durch Nck) oder reduziert (durch R-Ras und Dephosphorylierung von FAK) wird (Zou et al., 1999, Becker et al., 2000, Miao et al., 2000, Gu und Park, 2003).

Reverse Signaling , Cis-Interaktionen und Crosstalk

Eine Ligand-Rezeptor-Interaktion kann im Eph/Ephrin-System nicht nur über den Eph-Rezeptor (*Forward Signaling*), sondern auch auf der Seite der Ephrin- exprimierenden Zelle über aktivierte

Liganden eine Signaltransduktion bewirken, was als *Reverse Signaling* bezeichnet wird (Murai und Pasquale 2003). Durch Brambilla et al. wurde 1995 erstmals beschrieben, dass die zytoplasmatische Region von Ephrin B1 die Transformation von NIH-3T3-Zellen, die mit EphB- Chimeren transfiziert waren, regulieren kann. Nach der Rezeptorbindung erfolgt durch Src-Tyrosinkinasen eine Phosphorylierung an 3 konservierten Tyrosinstellen der zytoplasmatischen Domäne von Ephrin B-Liganden (Holland et al., 1996, Kalo et al., 2001, Palmer et al., 2002). Durch das Adaptorprotein Grb4 beispielsweise kann die Signalvermittlung zu Prozessen, die die Reorganisation des Aktinzytoskeletts bewirken, erfolgen. Aber auch die PDZ-Domäne der B-Liganden wurde als eine Region identifiziert, die nach Rezeptorbindung des Liganden auf die Migration und Adhäsion von Zellen wirkt. Dies geschieht z.B. über ein GTPase-aktivierendes Protein, RGS3 (Lu et al., 2001). Die biologische Bedeutung des *Reverse Signaling* für die Axonlenkung wurde durch Henkemeyer et al. 1996 anhand von Mausmutanten für den EphB2-Rezeptor nachgewiesen. EphB2 wird ventral von Mittellinie nahe der anterioren Kommissur exprimiert, während Ephrin B-Liganden von den Kommissur neuronen im lateralen Kortex exprimiert werden. Im Wildtyp verhindert die Interaktion von EphB2 mit Ephrin-B-Liganden ein Einwachsen der Axone des temporalen Kortex in ventrale Regionen des anterioren Vorderhirns, wie es in Nullmutanten für EphB2 beobachtet wurde. Wenn jedoch nur die C-terminale Region und die Kinasedomäne des EphB2- Rezeptors entfernt wurden, war dieser Defekt nicht zu beobachten. Hieraus lässt sich schließen, dass die Interaktion der Liganden auf den Axonen mit der extrazellulären Domäne des EphB2 Rezeptors für die Lenkung der Axone verantwortlich war (Orioli et al., 1996, Henkemeyer et al., 1996). Cowan et al. konnten 2004 zeigen, dass Mäuse mit einer Deletion der zytoplasmatischen Domäne von Ephrin B2 einen vergleichbaren Phänotyp wie die EphB2- Nullmutanten an der anterioren Kommissur aufweisen, was belegt, dass die intrazelluläre Region für die korrekte Lenkung der Kommissuraxone erforderlich ist.

Die Ephrin A- Liganden, die im Gegensatz zu den B-Liganden keine zytoplasmatische Region besitzen, können ebenfalls ein *Reverse Signaling* bewirken. Die GPI-verankerten Ephrin A- Liganden kommen in cholesterolreichen Membrandomänen, den Lipidrafts, vor. Hier können sie sich zu Proteinkomplexen zusammenlagern, die intrazelluläre Signale transduzieren. So wurde von Davy et al. 1999 nachgewiesen, dass durch EphA-Fusionsproteine geclusterte EphrinA-Moleküle eine Rekrutierung der Src-Kinase Fyn in die Lipidrafts induzieren. Als Folge war eine erhöhte Zell-Substrat-Adhäsion beobachtet worden (Davy et al., 1999, Huai und Drescher 2001). Die biologische Relevanz des *Reverse Signaling* für die Axonlenkung wurde von Knoll et al. 2001 an vomeronasalen Axonen im Streifenassay belegt. Vomeronasale Axone, die große Mengen Ephrin A exprimieren, projizieren *in vivo* in Regionen mit einer hohen Expression von EphA6. Bietet man diesen Axonen *in vitro* Membranstreifen, die alternierend EphA6 bzw. ein Kontrollprotein enthalten, an, wachsen sie bevorzugt auf den EphA6- Streifen.

Vor kurzem wurde eine weitere Möglichkeit der Interaktion innerhalb des Ephrin/Eph-Systems beschrieben. Viele Zellen, insbesondere die Ganglienzellen der Retina koexprimieren Ephrine und

Eph-Rezeptoren. Carvalho et al. (2006) konnten in retinalen Ganglienzellen eine cis-Interaktion von Ephrin A5 mit EphA3 über FRET nachweisen. Für die Cis-Interaktion ist die FNIII-Domäne des EphA3-Rezeptors erforderlich und es ist notwendig, dass beide Partner membrangebunden sind. Die Bildung von Cis-Komplexen verhindert eine Phosphorylierung des EphA3-Rezeptors und daraus folgt eine Desensibilisierung der betroffenen Zelle auf A-Ephrine in trans (Carvalho et al., 2006).

Die Eph- Proteine können mit vielen anderen Zelloberflächenproteinen interagieren (Murai und Pasquale, 2003). EphB2 und EphB3 sind z.B. mit Ryk, einer Orphan-Rezeptor-Tyrosinkinase assoziiert und alle drei Proteine können über ihre C-Termini das eine PDZ-Domäne enthaltende Protein AF6 binden (Katso et al., 1999). Ryk- KO- Mäuse haben einen ähnlichen Phänotyp wie EphB2-EphB3- Doppel KO- Mäuse; einen gespaltenen Gaumen, was eine mögliche Zusammenwirkung der drei Proteine bei der Gaumenbildung belegt (Halford et al., 2000). In diesem Falle wäre durch Ryk eine Verbindung zu morphogen-induzierten Prozessen der Axonlenkung aufgedeckt worden. Ryk ist ein Rezeptor für Wnt3 und im Tectum opticum und superioren Colliculus graduell von ventral nach dorsal exprimiert (Yoshikawa et al., 2003, Schmitt et al., 2006). Schmitt et al. (2006). haben kürzlich beschrieben, dass die Interaktion von Wnt3 mit Ryk an der topografischen Projektion retinaler Ganglienzellen beteiligt ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass EphB-Rezeptoren direkt mit NMDA-Rezeptoren an Synapsen verknüpft sind. EphB- Rezeptoren, die durch Ephrin B aktiviert wurden, haben eine Clusterung von NMDA-Rezeptoren bewirkt (Dalva et al., 2000). Takasu et al. (2002) haben beschrieben, dass aktiviertes EphB2 die Src-Kinase-vermittelte Phosphorylierung der NMDA-Rezeptoren erhöht. Als Folge nahm der durch Glutamat induzierte Kalziuminflux durch NMDA-Rezeptoren zu. Hier könnte eine Bedeutung der Eph-Rezeptoren für frühe Vorgänge in der Synaptogenese und in der Modifizierung physiologischer Eigenschaften von Synapsen liegen (Murai und Pasquale, 2003).

1.7 Die Bedeutung der Ephrine und Eph-Rezeptoren in der Entwicklung neuronaler Netzwerke

Die Wirkung der Ephrine und ihrer Rezeptoren auf die Axonlenkung wurde ursprünglich durch Kokultorexperimente und *in vitro* Streifenassays aufgedeckt (Winslow et al., 1995, Drescher et al., 1995). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass Signalübertragung durch Ephrine und Eph-Rezeptoren an Axonlenkung in unterschiedlichen sensorischen Systemen und auch an weiteren Prozessen während der Entwicklung, wie z.B. Migration und Synaptogenese, beteiligt ist (Übersicht in Flanagan und Vanderhaeghen 1998, Frisen 1999, Klein 2001, Kullander und Klein 2002, Palmer und Klein 2003, Pasquale 2005).

Axonlenkung an der Mittellinie

Ephrine der B-Klasse werden am Chiasma opticum im visuellen System des Frosches exprimiert und wirken repulsiv auf ipsilateral projizierende retinale Axone, die EphB-Rezeptoren exprimieren. Retinale Axone, die keine EphB-Rezeptoren exprimieren, kreuzen nach kontralateral (Nakagawa et al., 2000). Auch an der Ausbildung des Corpus Callosum sind Ephrine beteiligt, wie von Orioli et al.

(1996), Henkemeyer et al. (1996) und Kullander et al. (2001) nachgewiesen wurde. Die Axone der anterioren Kommissur exprimieren Ephrin B2 und Ephrin B3 und wachsen an Arealen, die EphA4 (das Striatum) und EphB2 (der Hypothalamus) exprimieren, vorbei. Durch die repulsive Wirkung der beiden Rezeptoren werden die Kommissuraxone auf ihrem Weg zur kontralateralen Hemisphäre geleitet. Anhand von Knockout-Experimenten wurde nachgewiesen, dass die Kinasedomäne der Rezeptoren für diese Aktivität nicht erforderlich ist, wodurch gleichzeitig Hinweise auf eine Signalübertragung durch den Liganden gewonnen wurden (für EphB2 im Detail unter 8. erläutert)(Orioli et al., 1996, Henkemeyer et al., 1996, Kullander et al., 2001b). Die Wegfindung der Axone des kortikospinalen Traktes (CST) wird ebenfalls durch Ephrine ermöglicht. Ephrin B3 wird von den Zellen der Mittellinie im Rückenmark exprimiert, EphA4 von den Projektionsneuronen des Motorkortex. Die Axone des CST wachsen vom Motorkortex bis zum Übergang von Medulla zum Rückenmark. Dort kreuzen sie nach kontralateral, wachsen weiter nach caudal und kontaktieren ihre Zielzellen, die Motorneurone. Ephrin B3 an der Mittellinie verhindert das Zurückkreuzen der Axone, wie es in homozygoten Knockout-Mäusen für EphA4 beobachtet wurde (Kullander et al., 2001a). In ähnlicher Weise wirkt Ephrin B3 auf lokale Vernetzungen von Kommissuraxonen excitatorischer Neurone des für die Lokomotion wichtigen zentralen Rhythmusgenerators. Diese Neurone exprimieren EphA4 und werden durch EphrinB3 gehindert, zur kontralateralen Seite des Rückenmarks zu projizieren. Die Eliminierung von EphA4 und Ephrin B3 hat zur Folge, dass neben aberranten Projektionen der Kommissuraxone der Rhythmusgenerator gestört ist; es treten synchrone Erregungen auf, recht-links-alternierende Erregungen fehlen, was in einem kaninchenartigen Lokomotionsmuster der betroffenen KO-Mäuse resultiert.

Migration von Neuronen

Während der Embryonalentwicklung migrieren die Neuralleistenzellen in zwei zeitlich versetzten Strömen aus dem dorsalen Neuralrohr, um das periphere Nervensystem, das kraniofaciale Skelett und die Pigmentzellen zu bilden. Die früh auswandernden Zellen nehmen einen ventrolateralen Weg und ihre Verteilung ist auf anteriore Regionen der Somiten beschränkt. Ephrin B1 im Huhn und Ephrin B2 in der Maus sind im posterioren Teil der Somiten exprimiert, was EphB2 exprimierende Neuralleistenzellen daran hindert, in diese Regionen einzudringen (Krull et al., 1997, Wang und Anderson, 1997). Die später auswandernden Zellen migrieren dorsolateral und werden zu Melanoblasten. Diese Zellen exprimieren EphB-Rezeptoren und werden durch Ephrine, die zeitlich vor ihrer Migration im dorsolateralen Migrationsweg detektiert wurden, daran gehindert, vorzeitig auf diesem Weg auszuwandern (Santiago und Erickson 2002).

Im Cerebellum korreliert die Expression von Ephrin B1 und EphB2 in Körnerzellen mit dem Beginn der Migration dieser Zellen in das Cerebellum (Karam et al., 2000). Die Hypothese, dass Ephrin B1 und EphB2 über einen *Reverse Signaling* –Mechanismus die Migration der Körnerzellen beeinflussen, wurde durch Applikation von EphB2-Fc in *In vitro*-Assays unterstützt (Lu et al., 2001). Weiterhin konnte 2004 von Davy und Kollegen gezeigt werden, dass Ephrin B1 auch über *Reverse Signaling* die

Migration von Neuralleistenzellen beeinflussen kann. Ephrin B1- knockout-Mäuse wiesen eine Reihe von Defekten auf, unter anderem in Geweben, die von Neuralleistenzellen abstammen. Dies führte zu perinataler Letalität der Tiere. Durch konditionellen Knockout von Ephrin B1 in allen Neuralleistenzellen wurde ein Phänotyp mit offenem Palatinum erzeugt, ähnlich wie in EphB2 und EphB3-knockout-Mäusen.

Dendritische Spinemorphogenese und synaptische Plastizität

Spines sind kleine Fortsätze an Dendriten über die excitatorische Signale empfangen werden, die funktionelle Einheit von dendritischen Spines und signalübertragender Axonendigung wird als Synapse bezeichnet. Spines können in Größe und Form variieren und zeigen im Laufe der Embryonalentwicklung eine besonders hohe Dynamik in der Morphologie, was mit synaptischer Plastizität korreliert (Lippmann und Dunaevsky, 2005). In Triple-knockout-Mäusen die weder EphB1, EphB2 noch EphB3 exprimierten, konnten keine reifen Spines detektiert werden. Diese Mäuse wiesen lediglich Filopodienfortsätze auf, die auf abnorme Synapsenbildung hinweisen (Henkemeyer et al., 2003). Zuvor wurde durch Ethell et al. (2001) im *In vitro*-Assay nachgewiesen, dass eine Blockierung von EphB2 ebenfalls verhindert, dass Spines ausgebildet werden. Die Stimulation von hippocampalen Neuronen mit Ephrin B1 (Penzes et al., 2003) und Ephrin B2 (Irie und Yamaguchi, 2004) bewirkte hingegen eine Ausbildung von Spines. Auch A-Ephrine sind an der Spinebildung beteiligt. Im adulten Hippocampus ist Ephrin A3 auf den Fortsätzen von Astrozyten nahe den Synapsen exprimiert. Die Applikation von Ephrin A3-Fc führte zu einer Verkürzung der dendritischen Spines in kultivierten Hippocampuschnitten adulter Tiere. Es wird vermutet, dass die Interaktion von Ephrin A3 mit EphA4 auf die Stabilisierung der Spinemorphologie bzw. der Synapsen wirkt, da in EphA4-knockout-Mäusen dieser Effekt nicht beobachtet wurde (Murai et al., 2003).

Aktivitätsabhängige synaptische Plastizität ist oft an NMDA-Rezeptoren gebunden, die den Kalziuminflux auf der postsynaptischen Seite excitatorischer Synapsen regulieren (Palmer und Klein 2003). Ausgehend von der Beobachtung, dass EphB2-knockout-Mäuse eine reduzierte Langzeitpotenzierung (bis zum vollständigen Verlust) im Hippocampus aufweisen (Grunwald et al., 2001, Henderson et al., 2001), konnte eine Vernetzung von EphB2 mit NMDA-Rezeptoren über posttranslationale Modifikation nachgewiesen werden: EphB2 kann Src-Kinasen an die postsynaptische Membran rekrutieren, die NMDA-Rezeptoren phosphorylieren. Als Folge erhöht sich der Kalziuminflux (siehe auch 1.8.) (Takasu et al., 2002). Der gleiche Effekt (erhöhter Kalziuminflux auf der postsynaptischen Seite) wurde durch Stimulation mit Ephrin B1 erzielt (Grunwald et al., 2001, Takasu et al., 2002). Auch die synaptische Plastizität, die durch Nicht-NMDA-Rezeptoren induziert wird, kann über EphB2 reguliert werden. So war die Langzeitpotenzierung von Moosfasern nach Inhibierung der EphB2-PDZ-Interaktion reduziert (Contractor et al., 2002).

Topografische Projektion

Viele axonale Verbindungen im Gehirn, insbesondere die in sensorischen Systemen sind topografisch organisiert, das heißt, die Relationen benachbarter Repräsentationen bleiben über die

Projektionsebenen erhalten. Im visuellen System z.B. projizieren die Ganglienzellen der Retina zum Mittelhirn (in das Tectum opticum bei *Aves* bzw. zum superioren Colliculus-SC- in *Mammalia*), wo die räumliche Organisation der Retina wiedergespiegelt wird. Unter 4. wurde die topografische Organisation des somatosensorischen Kortex der *Rodentia* detailliert beschrieben. Die retinotop Projektion orientiert sich entlang der anterior-posterioren und der medial-lateralen Achse. A-Ephrine und -Eph-Rezeptoren sind in der Retina und im Tectum/SC opticum in entgegentlaufenden Gradienten exprimiert (von temporal nach nasal in der Retina, von anterior nach posterior im Tectum/SC). Temporale retinale Ganglienzellen, die EphA3-Rezeptoren in hoher Dichte exprimieren, projizieren zu anterioren Arealen des Tectums/SC, wo die repulsiv wirkenden Liganden Ephrin A2 und Ephrin A5 in geringer Menge exprimiert werden. Und umgekehrt, Nasale Ganglienzellen exprimieren weniger EphA3-Rezeptoren, diese können weiter in das Tectum/SC nach posterior einwachsen, wo die Konzentration von Ephrin A2 und A5 höher ist. B-Ephrine und Eph-Rezeptoren regulieren die Projektion entlang der dorsal-ventral-Achse. EphB-Rezeptoren (EphB2 und EphB3) sind in einem Gradienten von ventral>dorsal auf der Retina exprimiert, B-Ephrine (Ephrin B1 und B2) dagegen sind in einem Gradienten von medial>lateral im Tectum/SC exprimiert (Hindges et al. 2002). Ventrale retinale Axone mit einer hohen Expression von EphB projizieren zum medialen Tectum/SC, wo ebenfalls eine hohe Expression von B-Ephrinen vorliegt (Übersicht in O'Leary und Wilkinson, 1999, Klein 2001, Palmer und Klein 2003, Pasquale 2005). Die tatsächliche Situation ist um einiges komplizierter als die oben beschriebene, A-Ephrine können nicht nur repulsiv wirken, sondern von der Attraktion bis zur Inhibition alle Effekte hervorrufen. Das ist von der Konzentration der Ephrine im Tectum/SC und von der Position der Ganglienzelle auf der Retina abhängig (Hansen et al., 2004). So kann man den Ort der Projektion als eine Position definieren, an dem die repulsiven und attraktiven Wirkungen sich gegenseitig aufheben (Flanagan 2006).

Ein weiteres Beispiel ist das vomeronasale System, wo die Neurone des Vomeronasalorgans, die viel Ephrin A5 exprimieren, zu Regionen des akzessorischen olfaktorischen Bulbus mit hoher EphA6-Expression projizieren (Knoll et al., 2001).

1.8 Die Bedeutung der Ephrine und Eph-Rezeptoren im somatosensorischen Kortex

Am Modellsystem des somatosensorischen Kortex wurde nachgewiesen, dass Ephrine und Eph-Rezeptoren an der topografischen Projektion, an der Segregation funktionell unterschiedlicher Areale des Kortex und an der Ausbildung schichtspezifischer intrakortikaler und thalamokortikaler Verzweigungen beteiligt sind (Übersicht in Bolz et al., 2004, Klein 2004, Garel und Rubenstein 2004, Rash und Grove 2006, Uziel et al., 2006).

Die Segregation thalamischer Axone, die in kortikale Areale unterschiedlicher sensorischer Modalität projizieren, erfolgt bereits in embryonalen Stadien. Im dorsalen Thalamus sind EphA-Rezeptoren, wie EphA3, EphA4 und EphA7, in einem abnehmenden Gradienten von rostromedial nach caudolateral exprimiert. Während der Entwicklung wachsen die thalamokortikalen Axone auf dem Weg zum

Kortex durch das ventrale Telencephalon (vT), wo Ephrin A5 in einem gegenläufigen Gradienten exprimiert ist. Dufour et al. (2003) konnten zeigen, dass das vT als intermediäres Ziel für Axone des dorsalen Thalamus fungiert. Hier werden durch einen von Ephrin A5 vermittelten repulsiven Mechanismus die Axone, die den Motorkortex innervieren, durch das rostrale vT, die Axone, die den somatosensorischen Kortex innervieren durch eine caudal gelegene Region des vT und Axone des lateralen Kortex (DLG) durch das caudale vT zum occipitalen Kortex geleitet. Das heißt, die Axone haben bereits eine regionspezifische Orientierung, wenn sie den Kortex erreichen (Abb.9).

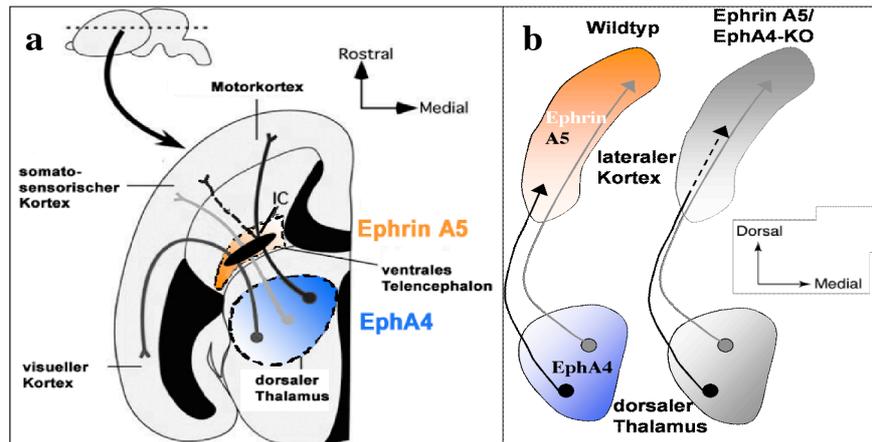


Abb.9: Ephrine und Eph-Rezeptoren beeinflussen die Segregation thalamischer Neurone unterschiedlicher sensorischer Systeme und die topografische Projektion innerhalb des somatosensorischen Kortex. Horizontalschnitt (a) und Koronalschnitt (b) durch ein embryonales Gehirn, schematisierte Darstellung der thalamischen Projektionen zum Kortex. (a) Die topografische Organisation erfolgt im ventralen Telencephalon (vT), das Ephrin A5 (orange) in einem abnehmenden Gradienten von caudal nach rostral exprimiert. EphA4 (blau) ist im dorsalen Thalamus in einem gegenläufigen Gradienten exprimiert. Axone mit viel EphA4 wachsen durch Regionen im vT, das wenig Ephrin A5 enthält. In Mutanten für EphA4 und Ephrin A5 projizieren diese Axone fehlerhaft zum somatosensorischen Kortex statt zum Motorkortex (gestrichelte Linie). (b) Die Expression von EphA4 im Thalamus und seinem repulsiven Liganden, Ephrin A5, folgt einem Gradienten von medial nach lateral. Mediale Axone mit viel EphA4 projizieren zur lateralen Region mit wenig Ephrin A5. Im EphA4/Ephrin A5-KO wachsen diese Axone weiter nach medial in den Kortex (gestrichelte Linie). IC-Capsula interna (modifiziert nach Marin, 2003 und Klein, 2004).

Ein weiteres Beispiel für die Differenzierung kortikaler Regionen ist die Projektion limbischer thalamischer Axone, die den Rezeptor EphA5 enthalten, und von Ephrin A5 im somatosensorischen Kortex am Einwachsen gehindert werden. Ein repulsiver Effekt von Ephrin A5 auf diese Neurone wurde im *In vitro*-Streifenassay nachgewiesen (Gao et al., 1998, Mann et al., 2002). In Ephrin A5-knockout-Mäusen projiziert eine Subpopulation von Axonen aus dem limbischen Thalamus in den somatosensorischen Kortex (Uziel et al., 2002). Die Bedeutung der Interaktion von Ephrin A5 und EphA7 für die Festlegung kortikaler Domänen während der Entwicklung ist vor kurzem von Miller et al. (2006) vorgeschlagen worden. Die anterioren und posterioren Areale des Kortex, welche die bereits beschriebene Ephrin A5-exprimierende Region begrenzen, sind durch die Expression von EphA7 gekennzeichnet. In KO-Tieren für EphA7 und Ephrin A5 wurde eine Reduktion des somatosensorischen Kortex in seiner räumlichen Ausdehnung beobachtet.

Auch innerhalb eines kortikalen Areals sind durch Ephrine vermittelte Signalmechanismen notwendig, um eine korrekte topografische Projektion thalamischer Axone zu ermöglichen. Ephrin A5 ist im

embryonalen lateralen Kortex und EphA4 im VB in einem Gradienten von dorsomedial nach ventrolateral exprimiert (Vanderhaeghen et al., 2000). Regionen des lateralen Kortex, die viel Ephrin A5 enthalten, werden von Neuronen innerviert, die wenig EphA4 exprimieren. In Mutanten für Ephrin A5 und EphA4 projizieren mediale thalamische Axone fehlerhaft in weiter medial gelegene kortikale Areale (Dufour et al., 2003) (Abb.9). Die medial projizierenden Axone sind jedoch nicht betroffen, demnach wird eine Kompensation durch andere Ephrine bzw. Eph-Rezeptoren vermutet (Klein 2004).

Von Castellani et al. (1998) wurde mithilfe von *In vitro*-Streifenassays nachgewiesen, dass Ephrin A5 auf die intrakortikale Verzweigung von Axonen in unterschiedlicher Weise wirken kann. Zum einen verzweigen sich Axone von Neuronen aus der Schicht 6 in den Ephrin A5-positiven Schichten 6 und 4, zum andern verhindert Ephrin A5 in diesen Schichten die Verzweigung von Neuronen aus den Schichten 2/3. Diese Neuronen bilden Verzweigungen in den Schichten 2/3 und 5, wo der Rezeptor EphA5 exprimiert ist. Durch Mann et al. (2002) wurde eine Wirkung von Ephrin A5 zusätzlich auf die Verzweigung thalamischer Axone in Schicht 4 beschrieben. *In vitro*-Versuche zeigten, dass Ephrin A5 eine Verzweigung thalamischer Axone fördert. Dass Ephrin A5 dafür verantwortlich ist, wird durch die Beobachtung, dass Ephrin A5-KO-Mäuse reduzierte thalamische Verzweigungen in der Schicht 4 aufweisen, unterstützt (Mühlfriedel et al., 1999) (Abb.10).

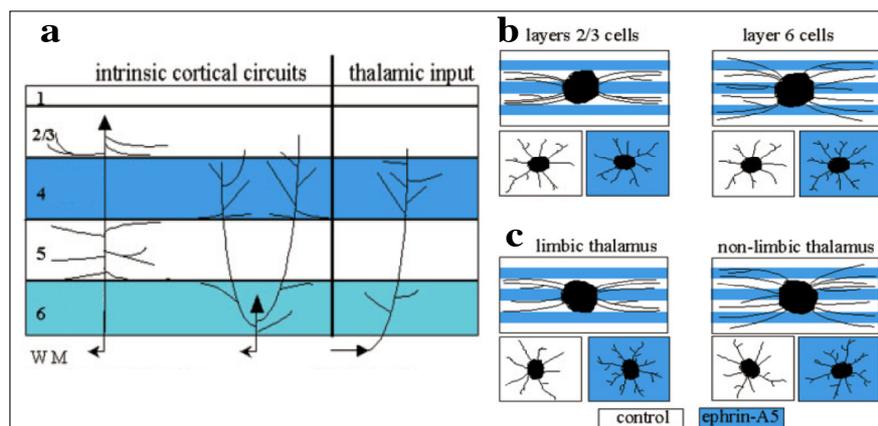


Abb.10: Ephrin A5 wirkt im somatosensorischen Kortex auf die intrakortikale Verzweigung der Neurone aus Schicht 2/3 repulsiv und attraktiv auf die Verzweigung thalamischer Eingänge in den Schichten 4 und 6. **(a)** Schematische Darstellung der intrinsischen kortikalen Projektionen und der thalamischen Projektionen, die durch Ephrin A5 (blau) in den Schichten 4 und 6 beeinflusst werden. **(b), (c)** *In vitro*-Assays mit Ephrin A5-Substrat (blau) und Kontrollsubstrat (weiß), **(b)** Ephrin A5 hat eine repulsive Wirkung auf Schicht 2/3-Neurone, nicht auf Schicht 6-Neurone, hier wirkt es positiv auf die Ausbildung von Verzweigungen. **(c)** Auf Axone des limbischen Thalamus ist die Wirkung von Ephrin A5 repulsiv, nicht jedoch auf Axone des dorsalen Thalamus. Zudem fördert Ephrin A5 die axonale Verzweigung (aus Bolz et al., 2004).

Aus den bisher veröffentlichten Daten wurde in den Tabellen 23 und 24 im Anhang eine Zusammenstellung über die Lokalisierung der Expression von Ephrinen und Eph-Rezeptoren im somatosensorischen System während der Entwicklung und deren Interpretation erarbeitet.

1.9 Knockout von Ephrinen und Eph-Rezeptoren

Die funktionelle Bedeutung vieler Ephrine und Eph-Rezeptoren ist neben *In vitro*-Assays auch durch Defekte in Mäusen, in denen eines oder mehrere dieser Gene ausgeschaltet wurden, aufgedeckt

worden. Beispiele hierfür sind die topografische Projektion im visuellen, vomeronasalen und somatosensorischen System, die Axonlenkung an der Mittellinie und die Projektionen im kortikospinalen Trakt. Auffällig war jedoch, dass die Ausschaltung eines einzigen Gens häufig nur subtile Veränderungen oder nur partielle Penetranz hervorrief (Cang et al., 2005). Für einen signifikanten Effekt waren Doppel- oder sogar Mehrfach-Knockouts erforderlich. So zeigten z.B. Einzel-Knockouts für Ephrin A2, Ephrin A3 bzw. Ephrin A5 lediglich moderate Effekte auf die veränderten Projektionen im visuellen System, die durch kombinierte Mutationen von Ephrin A2/A5 bzw. Ephrin A2/A3/A5 stärker ausgeprägt waren (Feldheim et al., 2000, Pfeiffenberger et al., 2005, Cang et al., 2005). Ebenfalls im visuellen System wurde eine hohe Fehlerrate bei der Projektion dorsaler retinaler Ganglienzellen zum Austrittspunkt des Sehnerves durch kombinierte Mutation von EphB2 und EphB3 hervorgerufen, aber nicht durch Eliminierung eines der beiden Gene allein (Birgbauer et al., 2000). EphB2 und EphB3 wurden zudem in Zusammenhang mit der Ausbildung des Corpus callosum bzw. der anterioren Kommissur untersucht, EphB2-KO-Mäuse haben eine eingeschränkte Ausbildung des Corpus callosum, EphB3-KO-Mäuse zeigen Axonlenkungsdefekte zur anterioren Kommissur. In Doppel-KO-Mäusen sind diese beiden Defekte stärker ausgeprägt und es erscheinen weitere Defizite in der Axonlenkung und -Faszikulierung im Diencephalon sowie ein offenes Palatinum (Orioli et al., 1996). In Ephrin A5- KO-Mäusen war die Projektion thalamokortikaler Axone in den somatosensorischen Kortex intakt, die Arborisationen in der Zielschicht 4 aber waren reduziert (Mühlfriedel et al., 2000) und nur eine Subpopulation limbischer Axone projizierte ektopisch in den S1-Kortex (Uziel et al., 2002). Weiterhin war die räumliche Ausdehnung einiger Barrels im somatosensorischen Kortex geringfügig verändert, Anzahl und Anordnung blieben unbeeinflusst (Prakash et al., 2000, Vanderhaeghen et al., 2000). Dagegen war das *Barrelfield* in Ephrin A5/EphA7-KO-Mäusen signifikant verkleinert (Miller et al., 2006). Dufour et al. (2003) konnten zeigen, dass in Ephrin A5/EphA4-KO-Mäusen die Axone des ventrolateralen Nukleus im Thalamus, die normalerweise den Motorkortex innervieren, mit 100% Penetranz in den somatosensorischen Kortex projizieren. Ähnliche abnorme Projektionen wurden in EphA7-, EphA4- und EphrinA5- Einzelmutanten beobachtet, jedoch mit niedrigerer Penetranz (EphA7-KO: 50%, EphA4-KO: 12% und Ephrin A5-KO: 33%). Als eine Erklärung für diese Beobachtungen wurde häufig die Redundanz koexprimierter Ephrin- und Eph-Rezeptorgene vorgeschlagen, die eine hohe Bindungspromiskuität innerhalb einer Gruppe aufweisen (Dufour et al., 2003, Klein 2004, Cang et al., 2005). Auch die Kompensation durch andere Moleküle, die auf die Axonlenkung wirken, kann eine mögliche Ursache sein. Pfeiffenberger et al. (2005), die Projektionen von der Retina zum Genikulatum in EphrinA2/A3/A5/-KO-Mäusen untersucht haben, schlugen ein Modell vor, in dem aktivitätsinduzierte Prozesse und verschiedene Axonlenkungsmoleküle parallel wirken. Bisher existieren jedoch keine Untersuchungen, die kompensierenden Mechanismen aufdecken könnten.

1.10 Zielstellung der Arbeit

Am Modell des somatosensorischen Kortex wurde für einige Ephrine und Eph-Rezeptoren eine Funktion bei der topografischen Projektion thalamokortikaler Axone und bei der schichtspezifischen Projektion intrakortikaler und thalamokortikaler axonaler Verzweigungen beschrieben. Bisher wurde die Expression im somatosensorischen System nur für einige Ephrine und Eph-Rezeptoren untersucht (aufgelistet im Anhang, Tab.23 und 24). Diese Daten sind lückenhaft, es wurde größtenteils die Expression der A-Klasse-Ephrine überprüft, jedoch sind nicht in jedem Fall die für die Entwicklung des somatosensorischen Systems wichtigen embryonalen und postnatalen Entwicklungsstadien untersucht worden. Von den Liganden und Rezeptoren der B-Klasse wurden nur Ephrin B2, Ephrin B3 und EphB1 untersucht, Ephrin B2 und EphB1 in adulten Primaten, Ephrin B3 in postnatalen Stadien der Maus.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit sollte die Expression der A- und B-Ephrine und ihrer Rezeptoren im somatosensorischen System während der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung umfassend und systematisch untersucht werden. Die Expressionsmuster sollten darüber hinaus genutzt werden, um die Funktion der Liganden und Rezeptoren bei Prozessen, welche die embryonale und frühe postnatale Entwicklung des Gehirns betreffen, besser zu charakterisieren. Bei den erwähnten Entwicklungsvorgängen handelt es sich unter anderem um die Projektion thalamischer Neurone in den Kortex bzw. kortikaler Neurone in den Thalamus, die Migration GABA-erger Interneurone in den Kortex oder um die Ausbildung der intrakortikalen axonalen Verzweigungen. Die Liste der bisher als wichtig für die Entwicklung beschriebenen Ephrine und Eph-Rezeptoren sollte eventuell ergänzt und durch eine funktionelle Interpretation der Expressionsmuster die Rolle der Ephrine und Eph-Rezeptoren für die Entwicklung des somatosensorischen Systems so weit wie möglich detaillierter beurteilt werden. Wie in der Einleitung beschrieben, kommt es in Tieren mit Einzel-KO für Liganden und Rezeptoren des Ephrin/Eph-Systems zu eher geringen phänotypischen Veränderungen. Verstärkte Änderungen wurden erst in Doppel- oder Mehrfach-KOs beobachtet. Um die Auswirkung eines Einzel-KOs der A-Ephrine besser beurteilen zu können, sollten in einem zweiten Teil der Arbeit die Auswirkungen des funktionellen Knockouts von Ephrin A5 auf die Genexpression im somatosensorischen Kortex untersucht werden. Über den Liganden Ephrin A5 ist bekannt, dass er bei der intra- und interarealen topografischen Projektion thalamischer Neurone und bei der interlaminaren Verzweigung kortikaler Neurone eine Rolle spielt. Hierzu sollte das Genexpressionsprofil von Wildtyp-Mäusen mit dem der Ephrin A5-KO-Mäuse mithilfe von Genexpressions-Microarrays verglichen werden. Neben typischen Veränderungen sollte vor allem nach möglichen Kompensationsmechanismen gesucht werden. Zur Überprüfung der Microarray-Daten sollten diese für ausgewählte, differentiell exprimierte Gene mit einer weiteren Methode, wie der quantitativen RealTime-PCR, bestätigt werden. Um die Funktionen besser erfassen zu können, sollte desweiteren festgestellt werden, in welchen Arealen und Zellen diese Gene im Kortex exprimiert werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Geräte

Mastercycler gradient	Eppendorf
LightCycler Instrument	Roche Applied Biosciences
Hybridisierungssofen GSL 7601	
Inkubator (Brutschrank)	WTB Binder
Schüttelinkubator Thermoshake	Schütt Labortechnik
Kühlzentrifuge (Centrifuge 5804R)	Eppendorf
Konfokales Laser Scanning Mikroskop (LSM 510)	Zeiss
Blotting Apparatur Fastblot B43	Whatman Biometra
Peristaltikpumpe PumpP-1	Pharmacia Biotech
Kryostat CM 1900	Leica
Inverses Mikroskop Axiovert S100	Zeiss
CCD- Kamera Spot VisitronSystems	Diagnostic Instruments Inc.
Stereomikroskop	Zeiss
Geldokumentationssystem (UV-Transiluminator, CCD-Kamera)	MWG Biotech
Monitor und Drucker- GelPrint 1000i	Sony
Vibratom- Vibrating Microtome	TSE Systems
Mc ILWAN Tissue Shopper	Mickle Laboratory Engineering Co LTD
Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur mit Stromversorgungsgerät(Electrophoresis Power Supply PS 305)	Roth bzw. Sunrise™ (Life Technologies)
Vertikale Elektrophorese-Apparatur EI 9001-X Cell II™ Mini-Cell	Life Technologies
Photometer UV 1601	Novex
Pipetten (alle Größen von 0,1-1000µl)	Shimadzu
X-Ray Cassette	Gilson
	rego/ Germany

2.1.1 Chemikalien

Sofern es nicht anders vermerkt ist, wurden sämtliche Chemikalien von der Firma Roth (www.carl-roth.de) oder von der Firma Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com) bezogen.

Destilliertes Wasser (aq.dest) ist durch eine Wasseraufbereitungsanlage (Millipore) gewonnen worden.

Nukleasefreies Wasser der Firma MBI-Fermentas (www.fermentas.com) wurde zum Lösen von cRNA-Sonden und linearisierten Plasmiden nach der Fällung bzw. zum Ansetzen von Reverser Transkription, *In vitro*-Transkription und PCR-Reaktionen, sowie zum Herstellen von Verdünnungsreihen der Kontrollfragmente für die qRT-PCR, verwendet.

2.1.2 Puffer, Lösungen

Die angegebenen pH-Werte von Puffern und Lösungen beziehen sich auf Raumtemperatur (RT) als Lösungsmittel wurde, sofern nicht anders aufgeführt, aq.dest. verwendet.

Aq.dest. ^{DT} - DEPC- behandeltes Wasser:	DEPC (Diethylpyrocarbonat) wurde zu 0,1% (v/v) zu aq.dest. gegeben und unter Rühren suspendiert und anschließend autoklaviert.
PBS	137mM NaCl 2,7mM KCl 4,3mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 1.4mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,5
TEN	0,01M Tris 0,5 M NaCl 1mM EDTA
TAE- Puffer	40mM Tris 20mM Essigsäure 1mM EDTA
TBE- Puffer	90mM Tris 90mM Borsäure 1mM EDTA
Reaktionspuffer	0.1M Tris 0,1M NaCl 5mM MgCl ₂ ; pH 9,5 einstellen mit HCl
MABS	0,1M Maleinsäure 0,15M NaCl; pH7,5 einstellen mit NaOH
LB-Medium	1% (w/v) Pepton (Invitrogen) 0,5% (w/v) Hefeextrakt (Gibco) 1% (w/v) NaCl pH 7,0 einstellen mit NaOH; autoklavieren
LB-Agar	LB-Medium mit 15g/l Bakterienagar (DIFCO) Autoklavieren, auf ca. 55°C abkühlen und in Petrischalen (d=10cm) gießen
LB/Ampicillin bzw. LB/Carbamizol	nach Abkühlen auf 50°C in LB- Medium bzw. LB-Agar 50µg/ml Ampicillin bzw. Carbamizol zugeben
TE- Puffer	10mM Tris 1mM EDTA; pH 8,0 einstellen mit HCl
Torula-Hefe RNA	25mg/ml Torula-Hefe RNA Typ VI wurden in

	10mM Tris*HCl (pH 7,5), 5mM EDTA, 0,5% SDS (w/v) mit 50µg/ml Proteinase K über Nacht bei 55°C von RNase-Kontamination proteolytisch befreit, nach zweimaliger Chloroform-Phenol-Extraktion mit Ethanol gefällt und in TE (pH 7,5) aufgenommen.
20xSSC	3M NaCl
Phosphatpuffer (0,1M)	0,3M Trinatriumcitrat; pH 7,0 einstellen mit HCl 0,1M Na ₂ HPO ₄ in 1l aq.dest 0,1M NaH ₂ PO ₄ in 1l aq.dest beide Lösungen bis zum Erreichen des gewünschten pH-Wertes mischen (pH 7,4)
Trispuffer (0,02M)	0,02M Tris-HCl in 1l aq.dest 0,02M Tris-OH in 1l aq.dest beide Lösungen bis zum Erreichen des gewünschten pH-Wertes mischen (pH 7,4)
Trispuffer/Tween	0,01M Trispuffer 0,9% (w/v) NaCl 0,05% Tween (w/v); pH 7,4
Homogenisierungspuffer	0,32M Sucrose 5mM EDTA 5mM Tris; pH 7,5 kurz vor Gebrauch zugeben: 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid Aprotinin, Pepstatin A, Leupeptin, 2,3-Dehydro-Neuroaminsäure je 1/1000 1mM Na ₃ VO ₄ (pH 10) (aus 100mM Stammlösung)
Stammlösung Na ₃ VO ₄ (100mM)	460mg Na ₃ VO ₄ auf 25ml aq.dest., pH 10 mit NaOH

2.1.3 Antikörper

Primärantikörper

Mouse-anti-Calretinin 3B6	Swant
Rabbit-anti-Calretinin	Sigma-Aldrich
Sheep-Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragment	Roche Applied Science

Sekundärantikörper

Rabbit-anti-mouse-Cy3	Jackson Immuno Research (über Dianova- www.dianova.de)
Goat-anti-mouse-IgG- Peroxidase konjugiert	Jackson Immuno Research

Goat-anti-rabbit-IgG- Peroxidase konjugiert	Jackson Immuno Research
Goat-anti-rabbit-IgG-biotinyliert	Vector Laboratories
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories

2.1.4 Nukleinsäuren

Nukleotide

dATP	jeweils 100mM als Natriumsalz in wässriger Lösung (Sigma-Aldrich)
dTTP	
dCTP	
dGTP	
DIG-RNA-labeling-Mix (10-fach konzentriert)	Roche Applied Science

DNA-Größenmarker

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus	MBI Fermentas
Der Marker enthält DNA-Fragmente folgender Größen (in bp): 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100.	
1kb Plus DNA Ladder™	Invitrogen™
Der Marker enthält DNA-Fragmente folgender Größen (in bp): 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1650, 1000, 850, 650, 500, 400, 300, 200, 100.	

Primer

Alle Primer bis auf die Primer *EphrinA5-for* und *Ephrin A5-rev*, welche von der Firma Jena Bioscience (www.jenabioscience.com) synthetisiert wurden, sind bei MWG-Biotech (www.mwg-biotech.com) zur Synthese in Auftrag gegeben worden. Die entsprechenden Sequenzen sind in Tabelle 3 einzusehen.

Rekombinante Plasmide

Die als Templates für die *In vitro*- Transkription von RNA-Sonden verwendeten rekombinanten Plasmide wurden von Katharina Merz hergestellt. Ausgehend von cDNA wurden Fragmente aus den Genen aller bekannten Ephrine und Eph-Rezeptoren durch PCR amplifiziert und in pBlueskript KS (Stratagene) in die KpnI- Erkennungsstelle (bei Ephrin A3 ApaI) auf der Seite des T3-Promotors bzw. in die SacI- Erkennungsstelle auf der Seite des T7- Promotors, kloniert. Die Auswahl der Sequenzbereiche erfolgte hinsichtlich minimaler Kreuzhybridisierung aufgrund von Sequenzähnlichkeiten innerhalb der Rezeptoren bzw. Liganden, Vermeidung GC-reicher Abschnitte und optimaler Größe der RNA-Sonde um einen direkten Vergleich auch zwischen den Sonden zu ermöglichen. Die Sequenzen, Längen der Fragmente und Insertionsrichtung sind der Arbeit von Katharina Merz (2003) zu entnehmen.

Das Konstrukt für die *In vitro*- Transkription der Ephrin A5-Sonde wurde durch Klonieren von 700bp aus der Sequenz der humanen Ephrin A5-mRNA (Gao et al., 1998) (freundlicherweise durch Renping

Zhao zur Verfügung gestellt) bzw. der murinen Ephrin A5-mRNA (647bp) (Feldheim et al., 1998) in den Vektor pBlueskript KS hergestellt (freundlicherweise durch John G. Flanagan zur Verfügung gestellt). Die sense- Insertionsrichtung für human war T3 \square T7 (Linearisierung für die antisense *In vitro*-Transkription mit XhoI); für murin T7 \square T3 (Linearisierung für die antisense *In vitro*-Transkription mit SalI).

Tab.3: Die Sequenzen und Schmelztemperaturen* der verwendeten forward (for)- und reverse (rev)-Primer

¹ die Sequenzen wurden aus Zarbalis: „Molekulare und funktionale Analyse des Ephrin A5-Gens der Maus“ entnommen

² die Primer wurden freundlicherweise von Dr. Joachim Clement (Klinik für Innere Medizin II) zu Verfügung gestellt

Für die cDNA-Synthese wurden Oligo (dT)₁₈ VN Primer (MWG- Biotech) verwendet.

*) Die Schmelztemperaturen der Primer sind wie folgt berechnet worden:

$$T_m = 100.5 + (41 * (yG+zC)/(wA+xT+yG+zC)) - (820/(wA+xT+yG+zC)) + 16.6 * \log_{10}([Na^+])$$

Gen	for 5'-3'	Tm (°C)	rev 5'-3'	Tm(°C)
Ephrin A2	ctataccgtggaggtgagcatc	64	aaaagggggtgaagagtgg	58
Ephrin A5 ¹	atgttgacagtgagatgttgac	63	gctataatgtcaaaagcatcgcc	61
EphA5	ctcaggtgaccttgagtgag	63	ctgccacatatggacacagg	60
EphA6	tctgaatagcctgcaaacga	53	cgtctctgaagatgccacac	54
EphA7	ggatgcgatacttgctgat	58	tcgtggtgtagacagcttcg	60
EphB1	cgaaccaaccagaacaact	58	atcaacctccccaaaatc	56
EphB3	cccaccaggaagcagagag	63	atgacagcaccagggtagg	60
EphB4	tgaggtgctgcttgaatg	56	tcaggaaacgaactgctg	58
EphB6	cacacatccgcttcacttct	61	aagctgcgctctttgacatt	56
Ank3	gttcctacatggccaagtctgtt	65	aggcaaagctctggcgtctgctg	69
\square actin ²	agccatgtacgtagccatcc	60	ctctcagctgtggtggtgaa	60
Calretinin	tccaggagtacaccagaccata	65	tgaccaacgcaggcacia	60
CD47	aaactgtggtcatcccttgc	58	ggctgatccttggctcagtg	60
ChL1	tccgggcatgagaacaacac	60	tgaacaggagagccaggtagatg	65
Etv1	ttcagaactcgggtctgctt	58	tgagctgtggttgagatgc	58
Gas5	tctcacagccagttctgtgg	60	ggtgaccatgcgtaatacc	60
Pak3	tacttgctggtgctcttt	58	cccacatagtgtctcttt	58
Pax6	ttgaacctgggacaacacac	58	cgaagacacactctaccttttagc	64
Pbx3	ttagaggaaggcagtgctg	61	gctgtgtttgattggtgggatg	64

Vektor

Die im Rahmen dieser Arbeit klonierten DNA-Fragmente sind in den 3954bp großen Vektor pCR \square 4-TOPO \square von Invitrogen ungerichtet inseriert worden. Dieser Vektor ist speziell für die Klonierung von PCR-Produkten geeignet. Die Taq-DNA-Polymerase hat eine Template- unabhängige terminale Transfereaktivität, wodurch am 3'-Ende des PCR-Produktes ein Desoxyadenosin angefügt wird. Der Vektor, welcher linearisiert eingesetzt wird, enthält 3'-überhängende Desoxythymidine, wodurch die Ligation mit dem Vektor begünstigt wird. Die Ligation wird durch ist die Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus ermöglicht, die kovalent an beide Enden des linearisierten Vektors gebunden ist. Die Topoisomerase I bindet an doppelsträngige DNA und löst die Phosphodiesterbindung hinter 5'-CCCTT in einem Strang (Shuman, 1991). Infolge dessen wird ein Tyrosinrest (Tyr-274) der

Topoisomerase I phosphoryliert, was eine kovalente Bindung an die DNA zur Folge hat. Diese Bindung kann durch freie 5'-Hydroxylgruppen des ursprünglich abgetrennten Stranges oder aber des zu klonierenden PCR-Produktes gelöst werden, die beiden DNA-Stränge werden verbunden, die Topoisomerase I wird freigesetzt. Der Vektor enthält das lethale *E.coli*-Gen *ccdB* das mit dem C-Terminus des LacZ \square -Fragment fusioniert ist. Die Ligation eines PCR-Fragmentes unterbricht die Expression des LacZ \square -*ccdB*-Konstruktes, wodurch nach Transformation in *E.coli*TOP10 nur solche Bakterien überleben, die den rekombinanten Vektor enthalten (Bernard und Couturier, 1992; Bernard et al., 1994; Bernard et al., 1993). Der Vektor enthält unter anderem eine T3- und eine T7-Bindestelle sowie eine M13-forward- und M13-reverse-Bindestelle. Die komplette Sequenz des pCR \square 4-TOPO \square - Vektors kann unter www.invitrogen.com heruntergeladen werden.

2.1.5 Enzyme

RnaseA (70U/mg)	Sigma-Aldrich
ProteinaseK (30U/mg)	Sigma-Aldrich
HotStar Taq-DNA-Polymerase (5 U/ \square l)	Qiagen
T4-DNA-Polymerase (5 U/ \square l)	MBI-Fermentas
Transkriptor Reverse Transkriptase (20U/ \square l)	Roche Applied Science
RevertAid TM H Minus M-MuIV	
Reverse Transkriptase (200U/ \square l)	MBI Fermentas
T7-RNA-Polymerase (20U/ \square l)	MBI Fermentas
T3-RNA-Polymerase (20 U/ \square l)	MBI Fermentas
RNase Inhibitor (40 U/ \square l)	MBI Fermentas
Anti-Rnase (RNase Inhibitor) (20U/ \square l)	Ambion
Restriktionsendonukleasen	
KpnI (10 U/ \square l)	MBI Fermentas
SalI (20 U/ \square l)	NEB BioLabs
SacII (10 U/ \square l)	MBI Fermentas
EcoRI (10 U/ \square l)	NEB BioLabs
NotI (10 U/ \square l)	NEB BioLabs
SpeI (10 U/ \square l)	NEB BioLabs
XhoI (20 U/ \square l)	NEB BioLabs
ApaI (10 U/ \square l)	MBI Fermentas

2.2 Organismen

Bakterien

Als Wirtsbakterien für die Amplifizierung der in pBlueskript KS klonierten Ephrin- und Eph-Rezeptor-Genfragmente (einschließlich Ephrin A5) dienen Bakterien vom Stamm *E.coli* XL1BlueMRF (Stratagene).

Die in pCR⁴-TOPO⁴ klonierten Fragmente von Calretinin, CD47, Etv1 und Pak3 wurden in OneShot⁴ Top10 ChemicallyCompetent *E.coli* (Invitrogen) transformiert und amplifiziert.

Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten EphrinA5- knockout-Mäuse wurden von Konstaninos Zarbali hergestellt („Molekulare und funktionelle Analyse des Ephrin A5-Gens der Maus“, 2000, Dissertation eingereicht in der TU München). Der genetischer Hintergrund waren Mäuse vom Stamm C54BL6, daher wurden diese Mäuse als Wildtyp-Mäuse verwendet.

2.3 Methoden

2.3.1 Biologische Methoden

Zucht und Haltung der Mäuse

Die Tierhaltung erfolgte in eigener Zucht nach den Kriterien der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz e.V. Die Mäuse wurden in einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12h / 12h in Standard-Laborkäfigen gehalten. Als Futter diente Standardfutter, frisches Wasser stand nach belieben zur Verfügung. Die Verpaarung erfolgte über Nacht und der auf die Paarungsnacht folgende Tag wurde als E1 (Embryonaltag 1), die anschließenden Tage als E2-E21, bezeichnet. Die Verpaarung für postnatale Tiere erfolgt über vier aufeinander folgende Tage, der Tag der Geburt wurde mit P0 bezeichnet, darauf folgende Tage mit P1-Pn.

Präparation von Gehirnen bzw. von somatosensorischem Kortex

Postnatale Tiere wurden durch Dekaptierung getötet, embryonale Tiere wurden per Sectio aus dem Muttertier, welches durch subkutane Injektion von Chloralhydrat (7% (w/v) in PBS) getötet wurde, entnommen. Nach Entfernung der Schädeldecke wurde das Gehirn mit einem abgerundeten Spatel aus dem Cranium entnommen und

- a) sofort in Isopentan bei -40°C eingefroren, wenn das Gewebe durch *In situ*-Hybridisierung untersucht werden sollte;
- b) der somatosensorische Kortex mithilfe von zurechtgeschnittenen Rasierklingen im Klingenthaler unter dem Stereomikroskop herauspräpariert. Bevor das Kortexstück in TRIzol⁴ zur Homogenisierung überführt wurde, sind die weiße Substanz und die Pia restlos entfernt worden.

Für die Präparation der Schicht 4 des Kortex wurde der somatosensorische Kortex wie in b) präpariert, und die Gewebestücke wurden mit einem Tissue-Shopper in 200 μm dicke Scheiben geschnitten, diese dann in kaltes HBSS (Gibco)/ 0,065 % (v/v) Glukose überführt und mit einer zurechtgeschnittenen Rasierklinge im Klingenthaler wurde unter dem Stereomikroskop die Schicht 4, lichtmikroskopisch erkennbar an den Barrels, die dichter und damit weißer erscheinen als das umgebende Gewebe, herausgetrennt (Abb.11). Die Gewebestücke der Schicht 4 wurden in kaltem HBSS/ 0,065 % (v/v)

Glukose gesammelt und schließlich, nach Entfernen von HBSS/ 0,065 % (v/v) Glukose und Waschen in PBS, in TRIzol[®] homogenisiert.

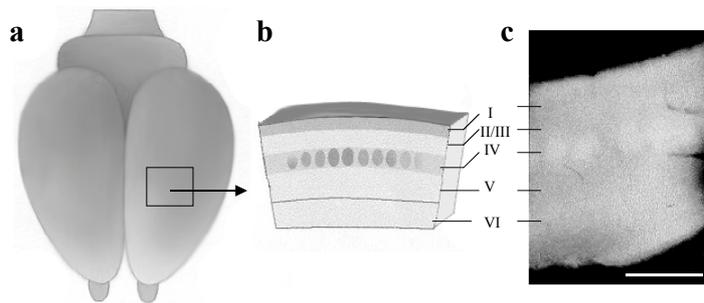


Abb.11: Die Präparation des somatosensorischen Kortex; (a) Aufsicht auf ein Gehirn, Schema (b) Ausschnitt aus dem Kortex im Bereich des somatosensorischen Kortex, Schema (c) coronaler Schnitt durch den somatosensorischen Kortex; Römische Ziffern I-VI: die Schichten des Kortex; Maßstab 500 μ m (modifiziert nach Mühlfriedel, 1999).

Fixierung von Gehirngewebe

Als Fixativ wurde 4%iges Paraformaldehyd (PFA) in PBS (pH 7,4) verwendet. Die Tiere wurden durch subkutane Injektion von 0,7% (w/v) Chloralhydrat zunächst tief anästhesiert. Nach Eröffnung des Brustkorbes und Freilegung des Herzens wurde das rechte Atrium geöffnet, aus dem das Blut entweichen konnte, während über den linken Ventrikel durch eine Injektionskanüle aus einer Peristaltikpumpe kontinuierlich PBS (mit 500U/ml Heparin) in den Kreislauf gepumpt wurde. Nachdem kein Blutaustritt mehr beobachtet wurde, erfolgte über einen Zwei-Wege-Hahn die Umstellung der Zufuhr auf 4%iges PFA/PBS. Die Perfusion mit dem Fixativ wurde über ca. 10 min bzw. bis zur Nackensteifheit des Tieres fortgesetzt. Anschließend wurde das Gehirn präpariert und über Nacht bei 4°C in 4% PFA/PBS nachfixiert. Je nach Weiterverarbeitung wurde das Gehirn entweder in 10%-iger Sucroselösung (w/v in PBS) über Nacht kryoprotectiert und anschließend bei -40°C in Isopentan eingefroren oder bei 37°C in 4%-ige LowMelt-Agarose (w/v in PBS) eingebettet. Die eingefrorenen perfundierten Gehirne wurden am Kryostaten geschnitten, die in LowMelt-Agarose eingebetteten Gehirne wurden mit dem Vibratom geschnitten.

In vivo-Injektion von lipophilem Dialkylaminosteryl- Derivat (DiA)

Durch Hypothermie tief anästhesierten 4-5 Tage alten Mäusen wurde ca. 500nl eines DiA (Molecular Probes)- DMF (Sigma-Aldrich) -Gemisches (2,5mg/ml) in a) den somatosensorischen Kortex (einseitig), b) den dorsalen Thalamus (einseitig) und c) in das Rückenmark im Bereich der Halswirbelsäule *in vivo* injiziert. Für die Injektion wurden über einer Flamme dünn ausgezogene Glaskapillaren verwendet, deren Spitzen vor Gebrauch mit einer Pinzette abgebrochen wurden und die über einen Schlauch mit einer Injektionsspritze verbunden waren, über welche die Injektion gesteuert wurde. Die Injektion erfolgte unter dem Stereomikroskop. Die Haut wurde mit einer Rasierklinge und der Schädel mit einer Injektionskanüle geöffnet (dabei wurde darauf geachtet, dass die Verletzungen minimal gehalten werden). Nach einer Erholungszeit von ca. 15 min wurden die injizierten Mäuse zum Muttertier zurück in den Käfig gesetzt. Am Postnataltag 6 bzw. 7 wurden die injizierten Tiere perfundiert. Die im Anschluß an die Nachfixierung in 4% PFA/PBS (w/v) (über Nacht bei 4°C) in

LowMelt-Agarose eingebetteten Gehirne wurden am Vibratom geschnitten (80 μ m dick). Es folgte eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Calretinin wie in 2.5.1 beschrieben.

Kultivierung von Wirtsbakterien

Die transfizierten OneShot[®] Top10 *E.coli* Bakterien wurden auf LB- Carbamizol-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze in 5ml LB- Carbamizol- Flüssigmedium überimpft und zur Plasmidisolierung über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Von den erfolgreich transfizierten Bakterien wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden 850 μ l einer Flüssigkultur, die gerade die stationäre Phase erreicht hat, mit 150 μ l sterilem Glycerin (87% -w/v) vorsichtig vermischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Zum Amplifizieren *E.coli* XL1BlueMRF, die rekombinanten pBlueskript KS-Vektoren enthielten, ist ein Eisstück von der Oberfläche der jeweiligen Glycerindauerkultur mit einer sterilen Pipettenspitzen abgekratzt worden und direkt in 5 ml LB- Ampicillin- Flüssigmedium überimpft worden. Die Plasmidisolierung erfolgte nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von RNA

Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Gehirngewebe erfolgte mit TRIzol[®] -Reagenz (Invitrogen) nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Alle Arbeitsschritte bis zur Fällung der RNA wurden unter dem Abzug vorgenommen. Das Gewebe wurde mit einem Dounce- Homogenisator in 1ml TRIzol[®] -Reagenz je 100mg Gewebe sorgfältig homogenisiert. TRIzol[®] -Reagenz enthält Phenol sowie Guanidiniumisothiocyanat, wodurch Proteine schnell und effektiv denaturiert werden und die RNA vor Degradation geschützt ist. Nach dem Entfernen von unlöslichem Material (Zellmembranen, Polysaccharide und DNA mit hohem Molekulargewicht) durch Zentrifugieren bei 12000xg (4°C) wurde der klare Überstand mit einer Glaspipette in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde durch Inkubation bei RT für 5min die vollständige Dissoziierung von Nukleoproteinkomplexen ermöglicht, bevor 200 μ l je eingesetztem ml TRIzol[®] -Reagenz zugegeben und das sicher verschlossene Eppendorfgefäß 15 s sachte per Hand geschüttelt wurde. Nach einer Inkubation von 2-3min bei RT wurde mit 12000xg bei 4°C für 15 min zentrifugiert. Hierbei ist eine Phasentrennung in eine untere, organische Phenol-Chloroformphase, eine Interphase und eine obere, farblose wässrige Phase erfolgt. Die wässrige Phase enthält die RNA und wird vorsichtig mit einer Glaspipette abgesaugt und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Mit 0,5ml Isopropylalkohol je ml TRIzol[®] -Reagenz wird die RNA für 10 min bei RT gefällt und anschließend durch Zentrifugieren bei 12000xg bei 4°C für 10 min präzipitiert. Die RNA ist als ein gelartiges Pellet am Boden des Gefäßes zu erkennen. Schließlich wird nach Verwerfen des Überstandes 1ml 75% Ethanol zugegeben, kurz

gemischt und bei maximal 7500xg und 4°C für 5min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die RNA luftgetrocknet. Die RNA wird in nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Es ist hier möglich, eine bessere Lösung der RNA durch Inkubieren bei 55°C für 10 min zu erzielen. In einer Agarosegelelektrophorese wird die RNA auf ihre Intaktheit geprüft. Nur Proben, die folgende Kriterien erfüllten, wurden für die darauf folgende Poly-A+RNA- Isolierung verwendet: (1) Die Banden der 18S- und 28S-rRNA sind als distinkte Banden, die nicht nach unten zu kleineren Fragmentgrößen hin verschmieren, erkennbar. (2) Die Intensität der 28S-rRNA-Bande sollte in etwa doppelt so hoch sein wie für die 18S-rRNA. Die Bestimmung Quantität und Determinierung von Protein- und Phenolkontamination erfolgte mittels UV- Spektrometrie. Die RNA wurde nach sofortigem Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

Isolierung von Poly-(A)⁺-RNA

Aus der Gesamt-RNA wurde polyadenylierte (Poly-(A)⁺)-RNA unter Verwendung des Oligotex[®] Poly-(A)⁺-RNA Purification kits der Firma Qiagen isoliert. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Isolierung von Poly-(A)⁺- RNA beruht auf Hybridisierung des Poly-A-Endes der mRNAs an dC₁₀T₃₀ – Oligonukleotiden, welche kovalent an Polystyren-Latexpartikel in der Oligotex Suspension gebunden sind. Die Hybridisierung verläuft unter Bedingungen mit hoher Ionenkonzentration in einer Säule, welche die Latexpartikel zurückhält. Nicht hybridisierte RNAs, wie rRNA und tRNA, können ausgewaschen werden. Die Ablösung der Poly-(A)⁺- RNA von den Oligo-dT-Latexpartikeln erfolgt unter Bedingungen mit niedrigem Salzgehalt, es wird in RNase freiem Wasser eluiert. Die Intaktheit der Poly-(A)⁺- RNA wurde gelelektrophoretisch bestimmt, für intakte und reine Poly-A+RNA sprach, wenn sich nach gelelektrophoretischer Auftrennung keine rRNA-Banden mehr erkennen ließen und der Poly-A+RNA-„Schmier“ gleichmäßig über die Laufspur verteilte. Die Determinierung von Konzentration und Reinheit erfolgte UV- spektrometrisch. Alle Reagenzien, Reaktionsgefäße und Säulen wurden im Produkt mitgeliefert.

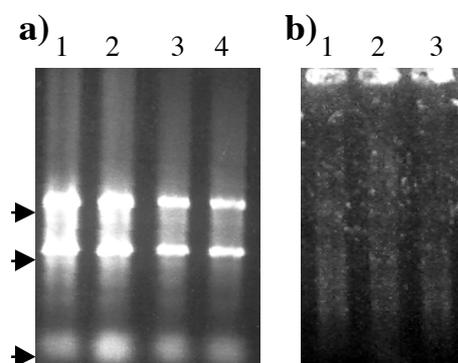


Abb.12: Beispiele für gelelektrophoretische Auftrennung

- (a) von intakter gesamt-RNA (Spur 1-4). (Die Pfeile markieren jeweils die Banden der 28S-, 18S-rRNA und der t-RNA)und
 (b) von mRNA (Spur 1-3).

Maßnahmen zur Vermeidung von RNase- Kontamination

Alle Arbeiten mit RNA wurden unter Bedingungen ausgeführt, die eine Kontamination mit RNAsen vermeiden sollten. Es wurden Handschuhe getragen, die regelmäßig erneuert wurden, besonders nach

Berühren von „kontaminierten“ Gegenständen wie z.B. Türgriffen, Wasserhähnen etc.. Für die Herstellung von Lösungen und Puffern wurde DEPC- behandeltes Wasser verwendet (bei Lösungen, die starke Nukleophile enthielten), bzw. diese wurden unter Zugabe von 1ml DEPC je Liter Lösung RNase- unter Rühren RNase-frei gemacht und anschließend autoklaviert. Sämtliche Glas- und Metallgeräte wurden vor Gebrauch bei 180°C für 3h gebacken. Geräte aus Plastik wurden mindestens 30 min in 3% H₂O₂ inkubiert und anschließend mit DEPC -behandeltem Wasser gespült. War dies nicht möglich (z.B. bei Pipetten), wurden die Geräte vor Gebrauch durch mehrmaliges Abwischen mit RNase-Zap[®] (Ambion) vorübergehend dekontaminiert. Für die Arbeiten mit RNA stand ein separater Pipettensatz zur Verfügung. Es wurden zudem sterile Einweg-Geräte verwendet.

2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung rekombinanter Plasmide erfolgte aus einer Über-Nacht-Flüssigkultur der entsprechenden Wirtsbakterien. Es wurde der Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben genutzt (www.qiagen.com). Das Protokoll beruht auf dem Prinzip der „alkalischen Lyse“ der Bakterien, mit anschließender Fällung von genomischer DNA und Proteinen durch Neutralisierung des NaOH und SDS enthaltenden Lysepuffers mit Kaliumacetat, gefolgt von Bindung der Plasmid- DNA an einen Anionenaustauscher unter niedrigen Ionenkonzentrationen und bei niedrigem pH-Wert. RNA und verbliebene Proteine können mit Lösungen mittleren Ionenkonzentration ausgewaschen werden. Die Plasmid- DNA wird unter Bedingungen mit hoher Ionenkonzentration eluiert, mit Isopropanol gefällt und 70%-igem Ethanol gewaschen. Im Anschluß an eine Lufttrocknung der pelletierten Plasmid- DNA wird diese in TE-Puffer aufgenommen. Alle für die Plasmidisolierung notwendigen Lösungen, Säulen und Reaktionsgefäße waren im Kit enthalten. Die Konzentration und die Reinheit der Plasmid- DNA wurden durch UV-Spektroskopie bestimmt.

2.4.3 Qualitative und quantitative Analyse von Nukleinsäuren

Das Absorptionsverhalten von Nukleinsäuren bei 260nm bzw. das Absorptionsverhalten von Proteinen bei 280 nm wurde für die Determinierung des Gehaltes an dsDNA bzw. ssRNA und Proteinkontamination verwendet. Dabei wurde ein Aliquot der jeweiligen Lösung in nukleasefreiem Wasser verdünnt und die optische Dichte (OD) bei 260nm bzw. 280nm photometrisch bestimmt. Das Verhältnis OD_{260nm}/OD_{280nm} wurde ermittelt, um die Proteinkontamination einschätzen zu können. Proben mit einem OD_{260nm}/OD_{280nm} -Verhältnis von >1,8 wurden als rein angesehen. Für die Berechnung der Konzentration von dsDNA bzw. ssRNA galt :

$$\text{dsDNA : } OD_{260nm}1 = 50\text{ng}/\square$$
$$\text{ssRNA: } OD_{260nm}1 = 40\text{ng}/\square.$$

2.4.4 Reverse Transkription

Das Endvolumen für alle Reaktionen betrug jeweils 20 \square l. Für die cDNA-Synthese aus poly(A)+-RNA durch Reverse Transkription wurden jeweils 500ng poly(A)+-RNA mit 100pmol/ \square l Oligo (dT)₁₈VN

Primer bei 65°C für 10min erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren. Danach wurde sofort auf Eis inkubiert und 4 μ l des mitgelieferten Transkriptionspuffers (5-fach-konzentriert), 20U Anti-RNase (RNase Inhibitor von Ambion), dNTP-Mix zu einer Endkonzentration von 1mM und nukleasefreies Wasser zugegeben. Die Anlagerung der Primer erfolgte 5min bei 37°C. Danach wurden 200U RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase zugefügt. Die Reaktion wurde für 60min bei 42°C durchgeführt und anschließend durch Hitzedenaturierung 10min bei 70°C abgestoppt. Alle Proben, die für die quantitative RealTimePCR vorgesehen waren, wurden mit 10U der Transkriptor Reversen Transkriptase von Roche Applied Science für 30 min bei 55°C revers transkribiert. Die Reaktion wurde 5min bei 85°C abgestoppt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion-PCR

Für die Amplifizierung von Genfragmenten aus cDNA wurden in einem Endvolumen von 50 μ l folgende Komponenten zusammengefügt:

- 5 μ l 10-fach konzentrierter PCR-Puffer (mitgeliefert)
- dNTP-Mix zu einer Endkonzentration von 200 μ M
- 200pmol des forward Primers
- 200pmol des reverse Primers
- nukleasefreies Wasser
- 2,5 U HotStarTaq DNA Polymerase
- cDNA (nicht mehr als 5% des Endvolumens)

Im Mastercycler wurde nach 15 min Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase bei 95°C folgendes Programm durchgeführt:

- Denaturierung bei 95°C für 30s
- Primerhybridisierung bei 2-5°C unter der Schmelztemperatur der Primer für 45s
- Elongation bei 72°C für 60s

Diese Schritte wurden in 28-32 Zyklen wiederholt, danach schloss sich eine finale Elongation für 10 min bei 72°C an. Nach Ablauf des Programms wurden die Proben bei 4°C gekühlt. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden in der Agarose-Gelelektrophorese überprüft und mit dem Qiaquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen aufgereinigt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels UV-Spektrometrie.

2.4.6 Aufreinigung von Nukelinsäuren

Die Aufreinigung PCR-Produkten und von linearisierten Plasmiden erfolgte mit dem Qiaquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen nach den Instruktionen des mitgelieferten Protokolls. Die Aufreinigung wird durch Bindung der DNA an eine Silikatgelmembran, die in den mitgelieferten Säulen enthalten ist, ermöglicht. Dabei ist die Bindung abhängig vom pH-Wert und von der Ionenkonzentration. Unter hohen Ionenkonzentrationen und bei einem pH-Wert \leq 7,5 bindet die

DNA an die Silikatgelmembran, Proteine, Nukleotide und andere Salze können ausgewaschen werden. Mit TE (pH 8,0) wird die DNA eluiert. Alle notwendigen Lösungen, Säulen und Reaktionsgefäße wurden mit dem Produkt mitgeliefert.

2.4.7 Quantitative Real-Time-PCR

Die Quantitative Real-Time-PCR wurde in einem LightCycler[®] Instrument von Roche Applied Science durchgeführt. Zum Ansetzen der Reaktionen wurde der *LightCycler[®] Fast Start DNA Master^{Plus} SYBR-Green I-ready-to-use-reaction-mix* (Roche Applied Science) nach den Herstellerangaben verwendet. Die benötigte Anzahl von LightCycler[®] Kapillaren wurde zu Beginn in vorgekühlte Zentrifugenadaptoren platziert. Pro Reaktion wurden 1 μ l cDNA, 100 pmol von den forward und reverse Primern, 4 μ l 5x LightCycler PCR Mastermix und nukleasefreies Wasser zu einem Endvolumen von 20 μ l zusammengefügt und in die LightCycler[®] Kapillaren überführt. Für jede Bestimmung wurden ein Leerwert, der Wasser (PCR-grade water- im Kit enthalten) anstelle von cDNA enthielt sowie Kontrollfragmente die das zu quantifizierende PCR-Produkt in bekannter Konzentration enthielten (in Verdünnungen 1/1000, 1/100, 1/10) mit amplifiziert. Alle Reaktionen wurden in zudem Doppelbestimmung durchgeführt. Die Quantifizierung der KO- bzw. WT- Proben erfolgte nach Normalisierung auf β -Aktin, welches zuvor für alle Proben quantifiziert wurde.

Es wurde das im Anhang aufgelistete Protokoll standardmäßig verwendet, wobei die Target-Temperaturen in Segment 2/Programm ampl_sg (Amplifikation) an die jeweiligen Primer und die Dauer der Elongation im Segment 3/Programm ampl_sg- (Hold Time) an die Produktlänge angepasst wurde. Im Anschluß wurden die PCR-Produkte durch kurzes „kopfüber“ Zentrifugieren der Kapillaren in ein Eppendorfgefäß überführt und im Agarosegel analysiert.

2.4.8 Klonierung von Genfragmenten in TOPO[®]-pCR-4-Vektor und Transformation in OneShot[®] Top10 Chemically Competent *E.coli*

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurde der TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing der Firma Invitrogen verwendet. Für die Durchführung wurden die Instruktionen des Herstellers befolgt. Die Eigenschaften des Vektors pCR[®]4-TOPO[®] wurden bereits in Abschnitt 1.5 detailliert beschrieben. Die PCR-Fragmente mussten mit der Taq-DNA-Polymerase hergestellt worden sein und durften in der Agarose- Gelelektrophorese nur eine diskrete Bande zeigen, dann konnten sie ohne Aufbereitung direkt aus dem PCR-Ansatz verwendet werden. Dies war für alle in dieser Arbeit klonierten PCR-Produkte der Fall. Eine Klonierungsreaktion enthielt 4 μ l PCR-Ansatz, 1 μ l „Salzlösung“ (1,2M NaCl; 0,06M MgCl₂) und 1 μ l pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor. Nach vorsichtigem Vermischen wurde 5 min bei RT inkubiert und anschließend bis zur Transformation auf Eis gelagert. 2 μ l der Klonierungsreaktion wurden zu einem Ansatz von OneShot[®] Top10 Chemically Competent *E.coli* zugegeben und vorsichtig vermischt. Nach einer Inkubation von 5-30 min bei RT wurde bei 42°C im Wasserbad für 30 s inkubiert und die Reaktionsgefäße anschließend sofort auf Eis gestellt. Dann wurden 250 μ l auf RT

gebrachtes SOC- Medium zugefügt, die Reaktionsgefäße gut verschlossen und horizontal bei 37°C für 1h geschüttelt (200rpm). Die Reaktionsansätze wurden je zu 50µl auf einer vorgewärmten LB-Carbamazol- Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.4.9 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Linearisierung von Plasmiden wurden 5U/µg DNA der entsprechenden Restriktionsendonukleasen im mitgelieferten Puffer eingesetzt. Bei Enzymen der Firma MBI-Fermentas war, sofern notwendig, BSA bereits im Puffer enthalten, bei den Enzymen von NEB-Biolabs musste BSA gegebenenfalls aus der mitgelieferten 100-fach konzentrierten Lösung zugesetzt werden. Die Reaktion verlief bei 37°C für 2h, was einem 10-fachen Überverdau entsprach. Es wurde darauf geachtet, dass die DNA-Konzentration im Reaktionsansatz 50ng/µl nicht überstieg. Der Erfolg des Restriktionsverdau wurde gelelektrophoretisch an einem Aliquot überprüft. Anschließend wurden freie 3'- und 5'-Enden mit der T4-DNA-Polymerase geglättet.

Erzeugen „glatter“ Enden nach der Linearisierung des Vektors

Freie 3'-Enden, die durch den Restriktionsverdau entstanden sind, und der T3- bzw. T7-RNA-Polymerase fälschlicherweise als Promotoren dienen könnten, wurden durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der T4-DNA-Polymerase entfernt. Auch überhängende 5'-Enden wurden durch die 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität des Enzymes eliminiert. Das Enzym wurde direkt im Anschluß an den Restriktionsverdau zu 3U je µg DNA zugegeben. Desweiteren wurden dem Ansatz die vier dNTPs zu einer Endkonzentration von je 100µM hinzugefügt. Die Reaktion erfolgte bei 12°C für 20min und wurde durch 10-minütiges Inkubieren bei 75°C gestoppt.

2.4.10 *In vitro*- Transkription und Herstellung von DIG-markierten RNA-Sonden

Je 1µg von der jeweiligen linearisierten, durch Proteinase K- Verdau von RNase- Kontamination befreiter und aufgereinigter Vektor- DNA wurde pro *In vitro*- Transkription eingesetzt. Gegebenenfalls wurden zuvor nach dem Restriktionsverdau entstandene freie 3'-Enden entfernt (siehe 2.2.12.). Jede Reaktion enthielt des weiteren 40U T3- bzw. T7-RNA-Polymerase, den mitgelieferten RNA-Polymerase-Puffer (4µl bei 5-fach konzentriertem Puffer), 20U RNase- Inhibitor, 2µl von 10-fach konzentriertem DIG-RNA-labeling-Mix (enthält Ribonukleotide und DIG- markiertes UTP) und nukleasefreies Wasser in einem Endvolumen von 20µl. Die *In vitro*- Transkription erfolgte bei 37°C für 2h. Durch Zugabe von EDTA (pH 8,0) zu einer Endkonzentration von 0,02M wurde die Reaktion gestoppt. Es folgte eine Ethanol-fällung unter Hinzufügen von Lithiumchlorid zu einer Endkonzentration von 0,8M und dem 2,5- fachen des Volumens an eiskaltem (-20°C) absoluten Ethanol. Die Präzipitation der cRNA fand bei -20°C über Nacht statt. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 12000xg und 4°C wurde mit eiskaltem 70%-igem RNase- freiem Ethanol gewaschen und das Pellet anschließend luftgetrocknet und in nukleasefreiem Wasser aufgenommen.

Die Konzentration und Reinheit der DIG- markierten cRNA wurden UV- spektrometrisch bestimmt. Zudem wurde die DIG- markierte RNA- Sonde in einer Agarose- Gelelektrophorese auf Intaktheit und ungefähre Größe hin überprüft (durch das Einfügen von DIG- markiertem UTP kommt es zu einem Gelshift- die Sonden laufen je nach Markierungseffizienz ca. 100bp über der eigentlichen Größe).

Hydrolyse von DIG-markierten RNA-Sonden

Der Nachweis der Expression von Ephrin A5 in 6 Tage alten Mäusen wurde durch *In situ*-Hybridisierung mit hydrolysierten antisense- Sonden (bzw. sense- Sonden als Negativkontrolle) vorgenommen. Die ursprünglich >600 Nukleotide große Sonde ist durch alkalische Hydrolyse auf 200 Nukleotide große Bruchstücke hydrolysiert worden. Hierzu wurde das Volumen der gelösten Sonde auf 50 μ l mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt, 30 μ l 200mM Na₂CO₃ und 20 μ l NaHCO₃ zugefügt und bei 60°C für 32,5 min inkubiert. Diese Reaktionszeit ergibt sich aus folgender Berechnung:

$$t = (L_0 - L_f) / (K * L_0 * L_f),$$

wobei L_0 für die Ausgangsgröße der Sonde (in kb), L_f für die Endgröße der Sonde (in kb) steht und K die Hydrolysierungsrate, in diesem Falle 0,11 kb/min bezeichnet („Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual“. 2nd Edition, Boehringer Mannheim).

Anschließend wurde mit 5 μ l 10% (v/v) Essigsäure neutralisiert und mit 11 μ l 3M Na-Acetat (pH 6,0), 1 μ l tRNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (10mg/ml) als Carrier, 1,2 μ l MgCl₂ (1M) und 300 μ l eiskaltem absolutem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die Präzipitation, Konzentrationsbestimmung und Kontrolle im Agarosegel erfolgten wie oben nach der *In vitro*-Transkription beschrieben.

2.4.11 Agarose- Gelelektrophorese

Gelelektrophoretische Analyse von DNA bzw. RNA wurde in einem horizontalen Agarosegel mit einer Konzentration von 0,8-1,5% (w/v) vorgenommen. Gelöst wurde die Agarose in TBE- bzw. TAE- Puffer durch Erhitzen bis zum Sieden in der Mikrowelle. Nach Abkühlung auf etwa 50°C wurde 50ng/ml Ethidiumbromid (EtBr) zugegeben, vermischt, und das Agarosegel in die Gelkammer gegossen, wo es erstarrte. Die Auftrennung der Proben erfolgte in entsprechendem Puffer bei 3-5 V/cm. Vor dem Laden wurden die Proben mit entsprechendem Volumen von 6-fach konzentriertem Ladepuffer (0,09%Bromphenolblau, 0,09% Xylencyanol FF, 60% Glyzerin in 60mM EDTA) (MBI Fermentas) vermischt. Eine Spur wurde mit 5 μ l GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus oder 1kb Plus DNA Ladder™ beladen. Die Dokumentation erfolgte mit einem Geldokumentationssystem durch UV-Transillumination und Detektion des interkalierten EtBr.

2.4.12 *In situ*-Hybridisierung an Kryostatschnitten

Frisch präparierte und unfixierte Gehirne (bei E14 ganze Köpfe der Embryonen) wurden in Isopentan bei -40°C eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Am Kryostaten wurden vom somatosensorischen Kortex und vom weiter dorsal gelegenen Bereich des dorsalen Thalamus bzw. bei

embryonalen Gehirnen vom gesamten Gehirn coronale Schnitte (20 μ m dick) angefertigt. Diese wurden alternierend auf Superfrost-Plus Objektträger (Menzel-Gläser) für die *In situ*-Hybridisierung, bzw. auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (Menzel- Gläser) für die Cytochromoxidase- oder Nissl-Färbung aufgebracht. Die Kryostatschnitte für die *In situ*-Hybridisierung wurden 2h bei 56°C getrocknet. Die Fixierung erfolgte für 10 min in 4%PFA/PBS (pH7,4) bei RT. Nach anschließender Permeabilisierung durch Behandlung mit 0,2M HCl für 10 min bei RT und 5-minütigem Proteinase K-Verdau (1 μ g/ml in 0,1M Tris pH 8,0) bei 37°C wurden die Schnitte für 3 min refixiert (bei embryonalem Gewebe wurde auf eine Proteinase K-Verdau verzichtet). Es folgte eine Acetylierung für 10 min bei RT mit 25mM Acetanhydrid in 0.1M Triethanolamin (pH 8,0). Zwischen den jeweiligen Schritten wurde 5min in PBS gespült. Für die Hybridisierung wurde eine Feuchte Kammer mit 5xSSC und 50% Formamid verwendet. Die Objektträger wurden horizontal auf Metallschienen gelegt, die Schnitte wurden mit Hybridisierungslösung, die auf 70°C gebracht wurde, überschichtet und mit silanisierten Deckgläschen* bedeckt. Die Hybridisierungslösung enthielt 5xSSC, 50% (V/V) Formamid, 5x Denhard's Reagenz, 0,4 mg/ml Torula-Hefe RNA, 0,1mg/ml tRNA aus *Saccharomyces cerevisiae* sowie die entsprechende DIG-markierte RNA-Sonde zu einer Endkonzentration von 3ng/ μ l. Vor dem Auftragen wurde die DIG-markierte RNA-Sonde 3min bei 100°C hitzedenaturiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht im Hybridisierungssofen bei Hybridisierungstemperatur, die 10-15°C unter der Schmelztemperatur für die entsprechenden RNA-RNA Hybride liegt. Am Folgetag wurde zunächst bei Hybridisierungstemperatur in 50% (V/V) Formamid und 2xSSC für 30 min, dann in 0,2xSSC für 60min und schließlich bei RT für 15 min in 0,2xSSC stringent gewaschen. Die unspezifisch hybridisierte Sonde wurde durch einen 10-15 minütigen RNase A- Verdau bei 37°C (20 μ g/ml in TEN), sowie 3x 10 minütiger Inkubation in TEN bei 37°C entfernt. Anschließend wurde 5°C unter der Hybridisierungstemperatur in 50% (V/V) Formamid und 2xSSC für 15 min, dann in 0,2xSSC für 15min und schließlich bei RT für 15 min in 0,2xSSC inkubiert. Vor der Antikörperinkubation wurde zur Detektion der hybridisierten Sonde 5min bei RT in MABS umgepuffert und mindestens 2h in 2% (w/V) Blockingreagenz/MABS präinkubiert. Die Detektion erfolgte mit gegen DIG gerichtete FAB-Fragmente aus dem Schaf, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert waren, 1:1500 verdünnt in MABS in einer Feuchten Kammer über Reaktionspuffer (pH 9,5) bei 4°C über Nacht. Nach 3x 10-minütigem Spülen bei RT in MABS wurden endogene Phosphatasen in 1mM Levamisol enthaltendem Reaktionspuffer für 10 min bei RT inhibiert und schließlich die Substratlösung für die Farbreaktion aufgetragen. Die Farblösung war ein Gemisch aus 0,4 mM NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid- Roche Applied Science) und 0,4 mM BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat-4-Toluidinsalz- Roche Applied Science) in Reaktionspuffer. Zur Farbreaktion wurde bei RT im Dunkeln inkubiert und die Reaktion wurde nach 4 – 48h durch Spülen in PBS unterbrochen. Die Objektträger wurden schließlich in Mowiol (0,1g/ml Mowiol-Hoechst-; 25% w/V Glycerin in 0,1 Tris*HCl pH 8,5) eingedeckelt.

Die Dokumentation erfolgte mit einer CCD- Kamera, die an einen PC angeschlossen war. Für die Bildbearbeitung wurde AdobePhotoshopCS verwendet. Bei jeder *In situ* Hybridisierung wurde ein Objektträger mit einer DIG- markierten RNA- sense- Sonde hybridisiert, um unspezifische Bindungen zu detektieren.

* für 3h bei 180°C gebackene Deckgläschen wurden unter dem Abzug in PlusOne Repel-Silane ES (Amersham Biosciences) geschwenkt, anschließend in Aceton und danach in 96% Ethanol gespült und zum Trocknen aufgestellt.

2.4.13 Western Blot

Membranpräparation

Mikrodissektierte somatosensorische Kortices wurden in 5-facher Menge kaltem Homogenisationspuffer homogenisiert, anschließend bei 2000x g und 4°C 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und erneut bei 20000x g und 4°C 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zum Pellet 10 μ l 4-fach konzentrierter NuPAGE LDS Sample Puffer (Invitrogen), 4 μ l 10-fach konzentriertes NuPAGE Reducing Agent (Invitrogen) und aq.dest. zu einem Envolumen von 40 μ l zugegeben.

SDS-Gelelektrophorese

Der Laufpuffer wurde durch Verdünnen von 50 ml 20x NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen) zu 950 ml aq.dest. hergestellt. Ein 10%-iges NuPAGE Novex Bis-Tris Gel (Invitrogen) wurde in die vertikale MiniCell Elektrophoresekammer montiert. Zu 200ml Running Buffer wurden 500 μ l NuPAGE Antioxidant gegeben und in die obere Kammer der Apparatur gefüllt. Die untere Kammer wird mit ca. 600ml 1x NuPAGE MOPS SDS Running Buffer befüllt. Nach Denaturierung bei 70°C für 10 min wurden die Proben mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen überführt. Pro Lauf wurde ein biotynlierter Proteinmarker von Amersham Biosciences (ECL protein molecular weight markers) im Endvolumen 20 μ l (entält 5 μ l NuPAGE LDS Sample Puffer und 2 μ l NuPAGE Reducing Agent) mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 200V für 50 min.

Blot

Zum Transfer wurde eine Fastblot B43-Apparatur von Whatman/Biometra verwendet. Die Nitrocellulose Membran wurde in Blotting- Puffer (25mM Tris, 192 mM Glyzin, 20% (v/v) Methanol, 0,02%SDS (w/v), pH 8,3) 10min bei 4°C aquilibriert, währenddessen wurde in Blotting- Puffer getränktes 3MM-Papier (Whatman) in 2 Lagen auf die Anode gelegt. Darüber wurde die Nitrocellulose-Membran gelegt, anschließend das Gel und dieses mit 2 Lagen in Blotting- Puffer getränktem 3MM-Papier bedeckt. Nach dem Schließen der Katode wurde bei konstanter Stromstärke (270mA) und laufender Wasserkühlung 25 min geblottet.

Antikörperinkubation

Nach dem Abbau der Blotting- Apparatur wurde die Nitrocellulosemembran in 0,01M Trispuffer gespült, 5min in Ponceau S (2% w/v Ponceau S in 3% v/v Trichloressigsäure) inkubiert und

anschließend mit aq.dest gewaschen, so dass die Banden gut sichtbar waren. Nach der elektronischen Fotodokumentation der Ponceau-Färbung wurde die Nitrocellulose-Membran in 0,01M Trispuffer/ Tween und 0,3% BSA über Nacht bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verringern. Die Antikörperinkubation erfolgte für 3h in 0,01M Trispuffer/ Tween bei einer Verdünnung von 1/2000 (mouse-anti-Calretinin 6B3 von Swant) bei RT. Daran schlossen sich 4 Waschschritte in 0,01M Trispuffer/ Tween für 10 min bei RT an. Der Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper (goat-anti-mouse- IgG- POD bzw. goat-anti-rabbit- IgG- POD) wurde 1/40000 in 0,01M Trispuffer/ Tween und 0,3% BSA für 1h bei RT appliziert. Gleichzeitig wurde ein zuvor abgetrennter Streifen, der die Spur des Proteinmarkers enthielt, 55min in ABC-Reagenz inkubiert.

Entwicklung

Nach dem Waschen in 0,01M Trispuffer/ Tween und danach in 0,01M Trispuffer wurde in ECL™ Western Blotting Analysis System (Amersham Biosciences) für 1min inkubiert, die Nitrocellulose-Membran in Plastikfolie gelegt und in einer X-Ray-Kassette auf einem Hyperfilm™ (Amersham) exponiert. Die Entwicklung wurde nach unterschiedlichen Expositionszeiten vorgenommen. Es wurden D19-Entwickler und Fixierer von Kodak verwendet. Die Lösungen wurden entsprechend den Herstellerangaben angesetzt. Der Film wurde in Entwickler, anschließend in 1%-iger Essigsäure (v/v), danach in Fixierer inkubiert und schließlich in Leitungswasser gewaschen.

Zur Dokumentation wurde der getrocknete Hyperfilm gescannt und die Bilder mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ quantitativ ausgewertet.

2.4.14 Herstellung von cDNA und Biotin- markierter cRNA für die Microarray- Analyse

Die Herstellung von cDNA, biotinylierter cRNA sowie sämtliche GeneChip- Prozessierungen von der Hybridisierung bis zum Scannen wurde an der IZKF-Core-Unit „DNA- Technologien“ der Universität Leipzig unter der Leitung von PD Dr. Knut Krohn vorgenommen. Die poly-A+RNA wurde zuvor am Agilent 2100 Bioanalyzer mit einem RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technologies) auf ihre Qualität geprüft. Die Synthese von T7-ss-cDNA und anschließend von ds-cDNA erfolgte nach den Vorgaben des „Affymetrix GeneChip Expression Analysis Technical Manual“. Hierbei wurde zunächst durch Reverse Transkription der poly-A+RNA unter Verwendung von Oligo dT-T7-Primern ss-cDNA hergestellt, die Bindestellen für die T7-Phagen-RNA-Polymerase hat. Anschließend wurde die ss-cDNA durch DNA-Polymerase zu ds-cDNA komplementiert. Die biotinylierte cRNA wurde unter Verwendung des Enzo- BioArray™HighYield™RNA Transkript Labeling Kit (Affymetrix) nach dem Herstellerprotokoll synthetisiert. Das Prinzip beruht auf Incorporation von biotinylierten Ribonukleotiden (Bio-UTP und Bio-CTP) in die ss-cRNA während der *In vitro*-Transkription durch eine T7-RNA-Polymerase. Bevor die biotinylierte cRNA für die Hybridisierung auf dem GeneChip verwendet werden konnte, wurde sie nach dem durch das „Affymetrix GeneChip Expression Analysis Technical Manual“ empfohlene Protokoll fragmentiert.

2.4.15 Hybridisierung, Waschen und Scannen von GeneChips

Alle Schritte sind nach den Vorgaben des „Affymetrix GeneChip Expression Analysis Technical Manual“ erfolgt. Zu jeder Hybridisierungsprobe wurde ein Mix aus vier biotinylierten und fragmentierten antisense- Kontroll- RNAs zugesetzt (GeneChip[®]Eukaryotic Hybridization Control Kit von Affymetrix) mit (bioB 1,5pM, bioC 5pM, bioD 25pM und cre 100pM). Die GeneChips enthalten Sonden für diese Kontroll- RNAs, die zur Überprüfung der Hybridisierungseffizienz dienen. Die Hybridisierung erfolgte auf Affymetrix GeneChips MG_U74A und wurde im GeneChip[®]Hybridization Oven 640 bei 45°C über Nacht vorgenommen. Die Wasch- und Färbeschritte wurden in der Affymetrix GeneChip[®]Fluidics Station 400 durchgeführt. Das Auslesen der GeneChip[®]s erfolgte mit einem AgilentGeneArray Scanner (Agilent Technologies).

2.5 Histologische Methoden

Alle Inkubationsschritte erfolgten, sofern nicht anderweitig vermerkt, bei RT.

Nissl-Färbung

Nach dem Fixieren in 95% Ethanol/ 5% Eisessig für 20 min wurden die Kryostatschnitte in aq.dest gespült und in 0,1% essigraurer wässriger Kresylviolettlösung 10 min gefärbt. Die Objekte wurden danach über eine aufsteigende Alkoholreihe (1x 5min 50%-, 1x 5min 70%-, 1x 5min 95%- und 2x 5 min 100%-iger Ethanol) in Xylol überführt. Die Einbettung wurde mit DePeX (Serva) vorgenommen.

Cytochromoxidase- Färbung

Die Kryostatschnitte wurden nach dem Trocknen (ca. 2 h) 10 min in 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert und für 10 min in 0,1M Phosphatpuffer, anschließend in 0,02M Tris- Puffer gespült, gefolgt von 10 min Inkubation in Kobaltchloridlösung (0,046M $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10% Sucrose (w/v) in 0,02M Tris- Puffer), denen sich folgende Wasch- und Spülschritte anschlossen: 2x 10 min in Tris- Puffer und 4x 5min in Waschpuffer (0,1M Phosphatpuffer mit 10% (w/v) Sucrose). Die Farbreaktion erfolgte unter Schütteln bei 37°C in Cytochromoxidaselösung (20mg DAB, 9mg Katalase, 14mg CytochromC, 1,2g Sucrose in 40ml 0,1M Phosphatpuffer) und dauerte bis zu 4h. Danach wurde 2x 10min in Phosphatpuffer gewaschen und die Schnitte mit Mowiol eingedeckelt.

2.5.1. Immunhistochemie

Unfixierte Kryostatschnitte wurden 2h luftgetrocknet und dann 10min in 4% PFA/PBS fixiert und 3x 3min in PBS gespült. Der Primärantikörper wurde 1/1000 in 0,03% Triton/ 10% Normalserum der Species, aus welcher der Sekundäre Antikörper gewonnen wurde in PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C in der Feuchten Kammer über PBS inkubiert. Nach 3x Spülen für 10 min wurde der sekundäre Antikörper aufgetragen (1/500 in der bereits für die Verdünnung des Primärantikörpers verwendeten Lösung) und 1h in der Feuchten Kammer über PBS stehen gelassen. Es schlossen sich weitere 3 Spülschritte in PBS an (je 10 min), im letzten Schritt wurde zur Gegenfärbung 1µg/ml DAPI

(Molecular Probes) zugefügt. Die Objektträger wurden in Mowiol (mit 2% Thimerosal, und 100 µg/ml n-Propylgallat) eingedeckelt.

Vibratomschnitte von fixierten Gehirnen (ca. 80 µm dick) wurden in PBS aufgenommen, endogene Peroxidasen wurden in 0,3% H₂O₂/PBS 10min geblockt und anschließend wurde 3x in PBS 10 min gespült. Der primäre Antikörper wurde 1/1000 in 10% Normalserum aus der Spezies, welche zur Gewinnung des Sekundärantikörpers diente und 0,03% Triton/PBS verdünnt aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Schnitte wurden 3x in PBS gespült. Es folgt die Inkubation mit dem in Sekundärantikörper 1/200 (in 0,03% Triton/PBS und 10% Normalserum) für 1h. Anschließend wurde 3x in PBS gespült und der Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories) nach Herstellerangaben aufgetragen. Danach wurde 3x in PBS gespült und die DAB-Lösung (3% (w/v) DAB, 0,01% H₂O₂ (v/v) in PBS) appliziert. Nach Abschluß der Farbreaktion wurden die Objektträger in PBS gespült und in Glycerin eingedeckelt. Zur Prüfung der Spezifität der Primärantikörper und zum Ausschluß falsch positiver Markierungen wurde je ein Objektträger zur Kontrolle ohne Primärantikörperinkubation mitgeführt.

Die Detektion von DAB-Färbungen wurde mit einer an ein Mikroskop angeschlossene CCD- Kamera vorgenommen. Fluoreszenzfärbungen wurden entweder mit einem Fluoreszenzmikroskop bei Anregung durch eine Quecksilberlampe oder mit einem CLSM bei Anregung mit einem Helium-Neon-Laser (543nm) bzw. einem Argon-Ionen-Laser (488nm) aufgenommen. Die spezifische Anregung von verwendeten Fluorophoren und die Detektion der Fluoreszenz wurden durch folgende Filterkombinationen im Filterschieber des Axiovert- Mikroskops realisiert:

UV-Anregung:	Blau-Anregung:	Grün-Anregung:
SP 365nm	BP 450-490nm	BP 530-545nm
FT 395nm	LP 510nm	LP 570nm
BP 420nm	BP 515-565nm	BP 610-675nm

bzw. durch folgende Filterkombination am CLSM:

Anregung mit 543nm (HeNe- Laser): Strahlteiler 700nm/ KP 543nm und BP 565-615nm

Anregung mit 488nm (Argonionen- Laser): KP 488nm und BP 500-550nm

Die verwendeten Fluorophore sind in Tabelle 4 dargestellt:

Tab.4: Für die Immunfluoreszenzfärbungen verwendete Fluorophore und die Absorptions-(λ_{exc}) bzw. Emissionsmaxima (λ_{em}) in nm.

Fluorophor	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)
Cy3	550	570
DiA (gebunden in Phospholipid-Bilayer)	460	580
DAPI (gebunden in ds-DNA)	358	461

2.6 Statistische Auswertung der Microarray- Daten und Generierung von Datensätzen

Für die Auswertung der GeneChip- Daten wurde die Software Microarray Suite 5.0 (MAS 5.0) verwendet. Nach dem Scannen wurden von den Bildern, den *.dat.- Files mit MAS 5.0 die Signalintensitäten berechnet und *.cel- Files generiert. Anschließend wurden für jede Sonde *Detection calls*, *Detection p-values* und Hintergrund- korrigierte Signalwerte berechnet und in einem *.chip- File zusammengefasst.

Globale Parameter

Zunächst wurden für jedes Experiment globale Parameter, wie der Anteil der *present (P)- calls*, *marginal (M)- calls* oder *absent (A)- calls*, und die *utm2* (upper trimmed mean 2%) der mittleren Signalintensitäten (entspricht dem Mittelwert aller Signalintensitäten innerhalb der 2. und 98. Perzentile) bestimmt. Zudem wurden folgende Kontrollen verwendet: die 3'/5' Ratios der Signalwerte für GAPDH und β -Aktin als Ausdruck für die Integrität der RNA sowie die Signalwerte der externen Kontrollgene, für die cRNAs als Mix (GeneChip[®]Eukaryotic Hybridization Control Kit von Affymetrix) vor der Hybridisierung zugegeben wurden, die bei korrektem Verlauf von Hybridisierung, Waschen und Farbreaktion als *present* detektiert und aufsteigende Signalwerte aufweisen sollten. Die globale Verteilung der Signalintensitäten in den vier Experimenten wurde im Rang-Intensitäts-Plot bewertet. Hierzu wurden die Signalwerte eines jeden Experiments der Größe nach geordnet, dem größten Wert wird der Rang 1 zugeordnet, dem niedrigsten der Rang 12488 (auf jedem GeneChip waren 12488 Sonden repräsentiert). Wenn diese globalen Parameter für die vier Experimente vergleichbar sind, und auch die internen und externen Kontrollen belegen, dass die Experimente in glaubhaften Daten resultieren, können die Datensätze miteinander verglichen werden.

Analysen der Vergleiche

Aus den vier Experimenten (WT1, WT2, KO1, KO2) resultierten 4 Vergleiche. Diese Vergleiche wurden unterschiedlichen Analysen unterzogen. Zuvor ist anzumerken, dass die Veränderung der Expression in \log_2 -ratios für KO/WT angegeben wurde. Das bedeutet, ein Gen mit einem \log_2 -ratio von 1 ist im KO 2-fach höher exprimiert als im WT (für ein \log_2 -ratio von -1 gilt umgekehrt, das Gen ist im KO um den Faktor 2 herunterreguliert).

- 1.) Mithilfe von MAS 5.0 wurden die Experimente paarweise verglichen. Die Vergleiche resultierten in je einem *change call* für jedes Gen in jedem Vergleich: *increase*, *decrease*, *marginal increase* bzw. *marginal decrease* oder *no change*, wobei der Schwellenwert für einen *decrease call* bei einem change p-value von 0,0025, der Schwellenwert für einen *increase call* bei einem change p-value von 0,9975 lag. Ein Gen, welches in 3 von 4 Vergleichen mit einem *change call* in die selbe Richtung bewertet wurde und das mindestens einen P-call in den vier Experimenten erhalten hatte wurde als differentiell exprimiert angesehen.
- 2.) Nachdem die Signalwerte der vier Datensätze nach der Methode der Quantil- Normalisierung (Bolstad et al. 2003) normalisiert worden sind, wurden sie nach Microsoft-Excel exportiert

und anhand ihrer \log_2 -ratios für die vier Vergleiche geordnet. Von der Analyse wurden die Gene ausgeschlossen, deren Variation innerhalb der biologischen Replika größer als das Doppelte der KO/WT- Unterschiede war und die nicht mindestens einen *P-call* in vier Experimenten erhalten hatten. Als Schwellenwert für die Signalintensität wurde 50 festgelegt. Anschließend wurde ein Bewertungssystem entwickelt, welches erlaubte, diejenigen Gene aus den Datensätzen zu filtern, die entweder stark (mindestens 2-fach oder 100%) oder gering aber konsistent (mindestens 50%) verändert waren. Die Gene wurden entsprechend ihren \log_2 -ratios mit Punkten versehen: Jeder Vergleich mit einem \log_2 -ratio von ≥ 1 bzw. -1 wurde mit 2 Punkten bewertet, Vergleiche mit \log_2 -ratios von $\geq 0,585$ bzw. $-0,585$ (was einer Zunahme bzw. Abnahme von 50% entspricht), wurden mit je einem Punkt bewertet. Alle Gene, die in der Summe mindestens 4 Punkte erhielten, wurden als differentiell exprimiert betrachtet.

- 3.) Alle auf dem GeneChip repräsentierten Ephrin- und Eph- Rezeptor- Gene wurden mithilfe der Affymetrix Analyse Webseite aus den Datensätzen isoliert und separat nach ihren \log_2 -ratios für die einzelnen Vergleiche untersucht.

Visualisierung

Die Signalwerte der als verändert exprimiert bewerteten Gene wurden mithilfe der Software Genesis (Sturn 2002) visualisiert. Hierzu wurde die Funktion *Hierarchical Clustering* unter Verwendung der Euklidischen Distanz benutzt, wobei gleichzeitig die Experimente ihrer Ähnlichkeit nach als auch die einzelnen Gene nach gleichem „Verhalten“ (die Höhe der Signalwerte und ihre Veränderung) über die Experimente geordnet und in einem Verwandtschaftsbaum dargestellt wurden.

Biologische Bedeutung

Mithilfe des Gene Ontology (GO) Standards (Ashburner, Ball et al. 2000) und des über die Affymetrix-Webseite verfügbaren GO Mining Tools (www.affymetrix.com) wurden den differentiell exprimierten Genen Terme zugeordnet, die deren biologische Funktion (die Beteiligung an biologischen Prozessen) und die betroffene Zellkomponente beschreiben. Der Anteil der jeweiligen Terme, der gesamt auf dem GeneChip repräsentiert ist, wurde zu dem Anteil der unter den differentiell exprimierten Genen vorkommenden Termen in Bezug gesetzt. Mithilfe des um eine Korrektur nach Yates für geringe Häufigkeiten erweiterten Chi-square- Testes, wurde bestimmt, mit welcher Wahrscheinlichkeit es sich bei der Verteilung der GO-Terme um eine zufällige handelte.

Heterotypische und Homotypische Vergleiche

Um den biologischen Wahrheitsgehalt der Analysen einschätzen zu können, wurden zu den KO/WT –Vergleichen (heterotypisch) auch die biologischen Replika (homotypisch) mit MAS 5.0 untersucht. Es galten identische Parameter wie in der Analyse der heterotypischen Vergleiche.

Auswahl der Kandidatengene

Die Auswahl der Kandidatengene erfolgte nach intensivem Literaturstudium mithilfe der Literaturdatenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) über die als differentiell exprimiert bestimmten Gene.

2.7 Statistische Auswertung

Die Angabe der Untersuchungsergebnisse erfolgte, sofern nicht anders angegeben, in Mittelwerten und Standardabweichung um den Mittelwert (MW, SDM). Für die Bewertung der Signifikanz wurde der ungepaarte zweiseitige t-Test nach Student verwendet. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

2.8 Grauwertanalyse

Von den zu untersuchenden Objekten (*In situ*-Hybridisierungen bzw. Westernblots) wurden skalierbare Schwarz/weiß Aufnahmen im tif.- Format erstellt. Mit dem Bildanalyseprogramm ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) wurde die Quantitative Grauwerteanalyse vorgenommen. Die Banden der Western Blots wurden mit der Funktion GelAnalyzer untersucht. In den Abbildungen der *In situ*-Hybridisierungen sind mit dem Werkzeug Plot Profile die Grauwerte entlang einer vorgegebenen Strecke determiniert worden. Die Grauwertreihen wurden in Microsoft Excel exportiert, wo mittlere Plotprofile über die gemessene Strecke ermittelt wurden.

Mit der Software Osiris 4.19 (<http://www.sim.hcuge.ch/osiris>) wurden invertierte Schwarz/weiß Aufnahmen der *In situ*-Hybridisierungen in farbkodierte Intensitätsabbildungen umgewandelt. Dabei wurde für Abbildungen von WT und KO jeweils dieselbe Skalierung verwendet.

2.9 Primerauswahl

Die Auswahl der Genbereiche lehnte sich an die Sequenzen, welche für die Sonden auf dem GeneChip verwendet wurden, an und sollten nach Möglichkeit mehrere Exons übergreifen. Die Sequenzen der Sonden sind über die NetAffx- Seite der Affymetrix- Homepage (<http://www.affymetrix.com>) zugänglich. Durch Abgleichen mit der entsprechenden mRNA- Sequenz aus der NCBI- Datenbank im Basic Local Alignment Tool (BLAST) wurde die Zielsequenz innerhalb der mRNA festgestellt. Dieser Bereich wurde in das Programm Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) geladen, mit dem die Primersuche erfolgte. Die Voreinstellungen wurden größtenteils beibehalten, es wurde darauf geachtet, dass die Primer eine Länge von 20-25 Nukleotiden hatten, einen GC-Gehalt zwischen 40 % und 60% und dass das Produkt eine Länge von 600 Nukleotiden nicht überstieg. Die mit Primer3 ausgewählten Sequenzen wurden mit dem Programm NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>) auf ihre Qualität überprüft. Die Primer sollten sehr ähnliche Schmelztemperaturen haben, keine stabilen Sekundärstrukturen bilden und keine kompatiblen Sequenzen untereinander und gegenüber sich selbst aufweisen. Mit einem erneuten Abgleich in der NCBI- Datenbank wurde sichergestellt, dass durch die gewählten Primer nur das gewünschte Produkt amplifiziert wird.

3. Ergebnisse

3.1 Die Expression von allen bekannten Ephrinen und Eph- Rezeptoren im somatosensorischen System von *Mus musculus* in embryonalen und frühen postnatalen Entwicklungsstadien

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Expression aller bekannten Ephrine (Ephrin A1-A5 und Ephrin B1-B3) und Eph- Rezeptoren (EphA1-A8 und EphB1-B6) im somatosensorischen System während der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung kartiert. Durch zeitliche und räumliche Erfassung des Expressionsmusters sollten für die Entwicklung des somatosensorischen Systems, wie unter anderem für die Etablierung der thalamokortikalen, der kortikothalamischen und der intrakortikalen axonalen Projektion potentiell wichtige Ephrine und Eph-Rezeptoren identifiziert werden. Über einzelne ausgewählte Liganden und Rezeptoren sind bereits Expressionsmuster im somatosensorischen Kortex veröffentlicht worden, jedoch fehlt es an einer Übersichtsarbeit, welche die gesamte Familie der Ephrine und Eph- Rezeptoren vergleichend betrachtet (Tab.23 und 24). Um eine solche Übersicht über die Expression zu geben, wurden *In situ*-Hybridisierungen mit DIG-markierten antisense- RNA-Sonden an Kryostatschnitten von Wildtyp-Mäusen (C57BL6) von folgenden Entwicklungsstadien angefertigt: E14, E18, P0, P6.

3.1.1 Die Expression von Ephrinen und Eph- Rezeptoren im somatosensorischen Kortex bzw. im parietalen embryonalen Kortex

Die Tabelle 5 zeigt die zusammengefassten Expressionsdaten für Ephrine und ihrer Rezeptoren im somatosensorischen Kortex. Bis auf Ephrin A1, EphA1 und EphA2 waren mRNAs für alle untersuchten Gene im somatosensorischen Kortex nachweisbar. Das heißt, 7 Liganden und 11 Rezeptoren der Ephrin/ Eph- Rezeptor- Genfamilie waren während der Entwicklung im Modellsystem exprimiert. Dabei lassen sich unterschiedliche Expressionsmodi erkennen. Einige Rezeptoren und Liganden waren über alle Entwicklungsstufen hinweg gleich bleibend und auch schichtübergreifend über 2- 6 Kortexschichten exprimiert. Desweiteren war eine schichtspezifische Expression einiger Ephrin- bzw. Eph- Gene nachweisbar, die sich in frühen Entwicklungsstadien andeutete und bei P6, wo alle Schichten ausgebildet und erkennbar sind, manifestierte. Hieraus könnte eine Hypothese über Funktion dieser Gene bei der Etablierung von intra- und interkortikalen Verschaltungen abgeleitet werden. Auch sehr interessant sind jene Ephrine und Eph- Rezeptoren, deren transiente Expression eine Beteiligung an entwicklungsbedingten Prozessen impliziert.

Als interessante Kandidaten sind die transient exprimierten EphA3, EphA8 und Ephrin A4, Ephrin B1 und Ephrin A5 zu nennen. Die Expression von EphA3 in der kortikalen Platte war früh embryonal sehr stark, nahm bis zum Tag der Geburt ab und war bei P6 gänzlich verschwunden. Ephrin A4 und Ephrin B1 waren bis E18 im Neuroepithel und der kortikalen Platte (Abb.14) nachweisbar. EphA8 und

Ephrin A5 dagegen waren erst ab dem 18. Embryonaltag, einem Alter, bei dem erstmals Aktivitäten, die auf synaptischen Input aus dem Thalamus beruhen und die durch funktionelles Imaging nachgewiesen werden konnten (Molnar et al., 2003), exprimiert und blieben bis P6 nachweisbar (Abb.15). Dabei manifestierte sich die Expression von EphA8 und Ephrin A5 bei P6 als hochschichtspezifisch, wie auch die von EphA5, EphA6 und EphB1 (Abb.16). EphA5 wurde in den Schichten 2/3, 5 und in der Subplate exprimiert, EphA6 in den Schichten 2/3 und 5, und EphA8 war ausschließlich in Schicht 4 exprimiert. EphB1 konnte in Schicht 4 und 6 und EphB3 in den Schichten 2/3 und 4 nachgewiesen werden. Auf die Expression von Ephrin A5 im Kortex wird im folgenden Absatz näher eingegangen.

Tab.5: Die Expression von Ephrinen (efna- 1-5, efnb-1-3) und Eph-Rezeptoren (EphA-1-8 und EphB-1-6) im somatosensorischen Kortex, bzw. im parietalen embryonalen Kortex bei E14, E18, P0 und P6. Schichtbezogene Darstellung. Die Expressionsintensitäten sind farbkodiert dargestellt: blau- nicht detektierbar, gelb- detektierbar, rot- auffällig starkes Signal. LCtx- lateraler Kortex, NE- Neuroepithel (=Ventrikularzone), SVZ- Subventrikularzone, IZ- Intermediärzone, CP- kortikale Platte, römische Ziffern I-VI- Schichten des Kortex, SP- Subplate, S1- primärer somatosensorischer Kortex.

	E14				E18					P0					P6						
	ICtx NE	ICtx SVZ	ICtx IZ	ICtx CP	ICtx NE	ICtx SVZ	ICtx IZ	ICtx LVI	ICtx CP	SP	S1 LI	CP	S1 LV	S1 LVI	SP	S1 LI	S1 LII/III	S1 LIV	S1 LV	S1 LVI	SP
efna-1																					
efna-2																					
efna-3																					
efna-4																					
efna-5																					
efnb-1																					
efnb-2																					
efnb-3																					
EphA-1																					
EphA-2																					
EphA-3																					
EphA-4																					
EphA-5																					
EphA-6																					
EphA-7																					
EphA-8																					
EphB-1																					
EphB-2																					
EphB-3																					
EphB-4																					
EphB-6																					

Von den Rezeptoren waren EphA4, EphB2, EphB4 und EphB6 zu allen Zeitpunkten und schichtübergreifend exprimiert, wobei Intensitätsunterschiede zwischen den Kortexschichten 2/3, 4, 6 mit hoher Signalstärke und der Schicht 5 mit geringerer Signalstärke für EphB2 und EphB6 beobachtet wurden. Auch die Liganden Ephrin A2, Ephrin A3 und Ephrin B2 zeigten zeit- und schichtübergreifende Expression (Tab.5). Ephrin A2- mRNA war in den oberen Schichten 2/3 und 4, Ephrin A3 -mRNA in den Schichten 2/3 bis 6 und Ephrin B2- mRNA in den Schichten 2/3 bis 5 nachweisbar.

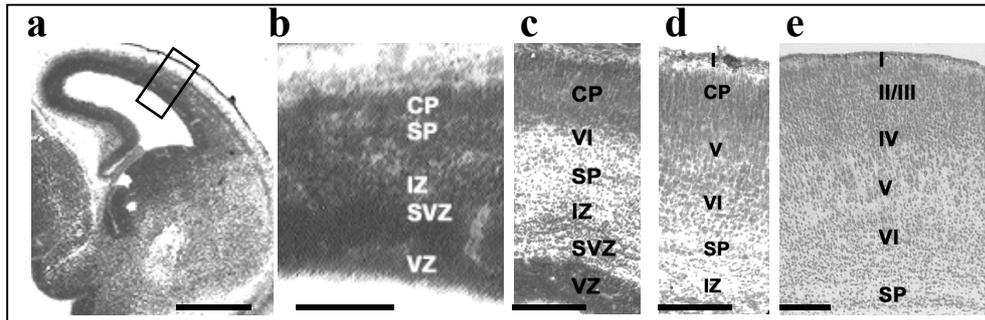


Abb.13: Nissl-Färbungen von Coronalschnitten im Bereich des somatosensorischen Kortex an den Entwicklungszeitpunkten (a) und (b) E14, (c) E18, (d) P1, (e) P6. Die jeweils dargestellten Ausschnitte entsprechen den für die *In situ*-Hybridisierung gezeigten Bereichen. Das in (a) markierte Areal ist in (b) vergrößert dargestellt. Römische Ziffern I, II/III, IV, V, VI- Schichten des Cortex; CP- kortikale Platte; VZ- Ventrikularzone; SVZ- Subventrikularzone; IZ- Intermediärzone; SP- Subplate. Maßstab (a) 300µm, (b) 50µm, (c) und (d) 100µm, (e) 200µm.

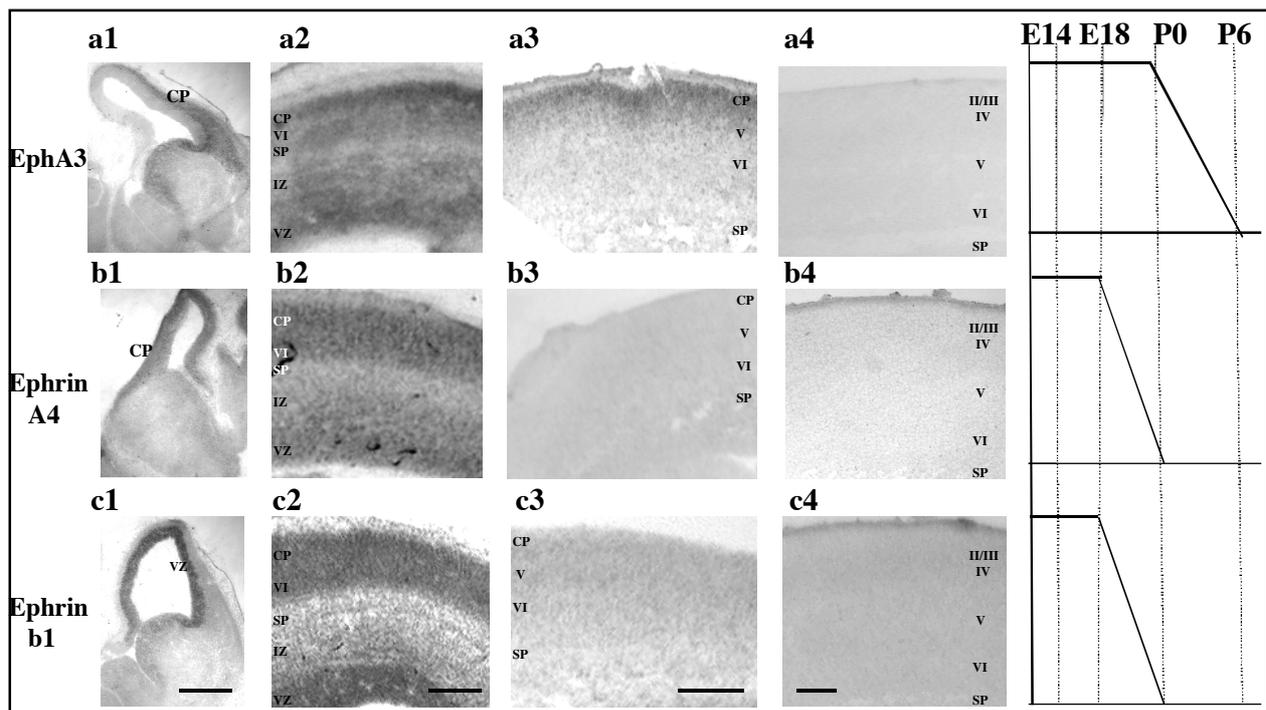


Abb.14: Transiente, „frühe“ Expression von EphA3 (a1-a4), Ephrin A4 (b1-b4) und Ephrin B1 (c1-c4) im somatosensorischen Kortex. *In situ*-Hybridisierung an coronalen Kryostatschnitten bei E14 (a-c1), E18 (a-c2), P0 (a-c3) und P6 (a-c4), rechts schematische Darstellungen des Expressionsverlaufes zum Zeitpunkt E14, E18, P0 bzw. P6 entsprechend den Abbildungen in der Reihe links daneben. VZ- Ventrikularzone, CP- kortikale Platte, IZ- Intermediärzone, römische Ziffern II-VI-Schichten des Cortex, SP- Subplate. Maßstab (a1-b1) 300µm, (a2-b2) 100µm, (a3-b3) 100µm, (a4-b4) 200µm.

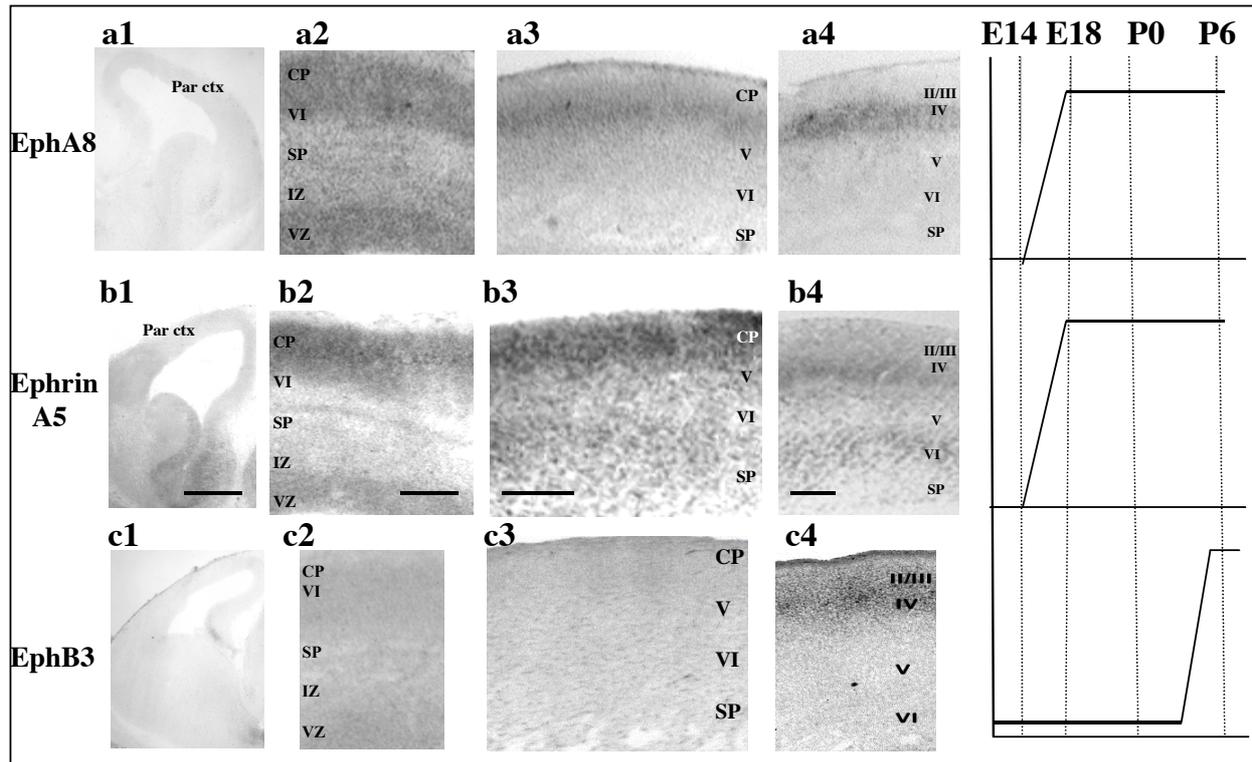


Abb.15: „Späte“ Expression von EphA8 (a1-a4), Ephrin A5 (b1-b4) und EphB3 (c1-c4) im somatosensorischen Kortex. *In situ*-Hybridisierung an coronalen Kryostatschnitten bei E14 (a-c1), E18 (a-c2), P0 (a-c3) und P6 (a-c4), rechts schematische Darstellungen des Expressionsverlaufes von E14 über E18, P0 bis P6 entsprechend den Abbildungen in der Reihe links daneben. Par ctx- parietaler Kortex, VZ- Ventrikularzone, CP- kortikale Platte, IZ- Intermediärzone, römische Ziffern II-VI-Schichten des Kortex, SP- Subplate. Maßstab (a-c1) 300 μ m, (a-c2) 100 μ m, (a-c3) 100 μ m, (a-c4) 200 μ m.

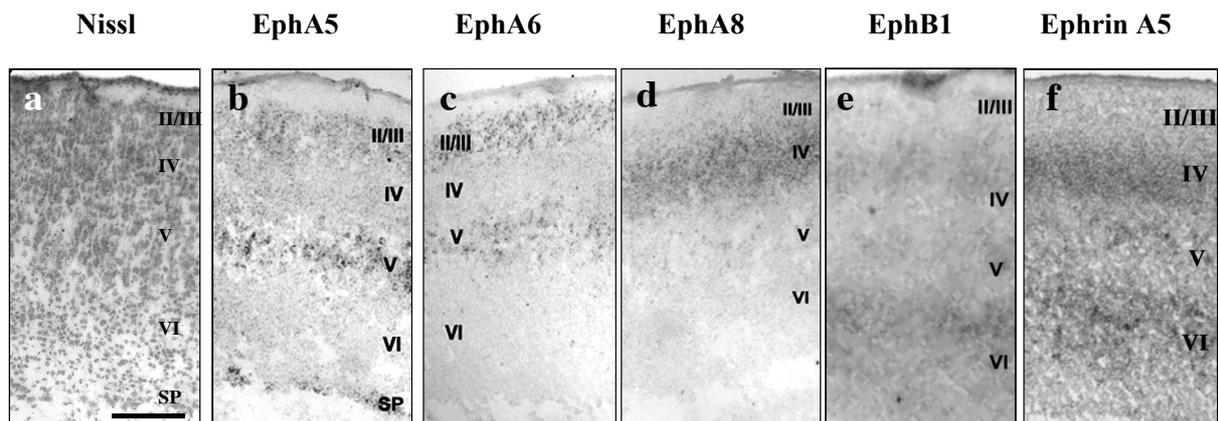


Abb.16: Schichtspezifische Expression von EphA5 in den Schichten 2/3, 5 und in der Subplate (b), EphA6 in den Schichten 2/3 und 5 (c), EphA8 in der Schicht 4 (d), EphB1 in den Schichten 4 und 6 (e) sowie Ephrin A5 in den Schichten 4 und 6 im S1 Kortex (f). *In situ*-Hybridisierung an coronalen Kryostatschnitten bei P6. (a) Nissl-Färbung; Beschriftungen der Kortexschichten 2- 6: II/III, IV, V, VI und SP (Subplate); Maßstab 200 μ m.

3.1.1.1 Die Expression von Ephrin A5 im somatosensorischen Kortex an P6

Da im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die molekularen Auswirkungen des funktionellen Knockouts von Ephrin A5 untersucht wurden, sollte zuvor näher auf die Expression dieses Liganden im somatosensorischen Kortex bei der auch für die Microarray-Analyse verwendeten Altersstufe P6 eingegangen werden. Die Expression von Ephrin A5 in der Schicht 4 stellte sich in der *In situ*-Hybridisierung als ungefähr so stark dar, wie gelegentlich auftretende, zelldichtebedingte unspezifische Färbung. Um auszuschließen, dass es sich hierbei lediglich um Hintergrundfärbung aufgrund höherer Zelldichte in Schicht 4 im Vergleich zu Schicht 5 handeln könnte, wurde eine reverse Transkription mit anschließender PCR unter Verwendung spezifischer Primer für Ephrin A5 durchgeführt (zum Vergleich Abb. 17a-d mit Nissl-Färbung von einem Coronalchnitt bei P6, sense-Kontrollhybridisierung und *In situ*-Hybridisierung für Ephrin A5 an E18.). Die verwendete gesamt-RNA wurde, wie im Kapitel *Materialien und Methoden* beschrieben, aus mikrodisssektierten Kortexschichten 4 isoliert. Die Erkennungssequenzen der Primer befanden sich in Exon 1 (forward Primer) und in Exon 5 (reverse Primer). Die erwartete Größe des zu amplifizierenden Produktes beträgt 687 bp, bzw. 606 bp für die Isoform 2, in der das Exon 4 mit einer Größe von 81bp durch alternatives Spleißen entfernt wurde. Anhand der Banden bei 687 bp und 606 bp konnte Ephrin A5-mRNA beider Isoformen eindeutig nachgewiesen werden (Abb.17e). Zudem war die Intensität des Hybridisierungssignals unter Verwendung derselben Sonde bei E18 wesentlich höher, wodurch eine schwache Färbung aufgrund geringer Markierungseffizienz der Sonde ausgeschlossen werden kann. Neben Coronalchnitten wurden auch Tangentialschnitte des Kortex mit antisense-RNA-Sonden für Ephrin A5 hybridisiert. Hier wurden, wie auch für die Coronalchnitte, alternierend Schnitte für Cytochromoxidase und *In situ*-Hybridisierung aufgelegt. Das Hybridisierungsmuster für Ephrin A5 in Schicht 4 widerspiegelte das mittels Cytochromoxidase dargestellten Barrelmuster (Abb.18).

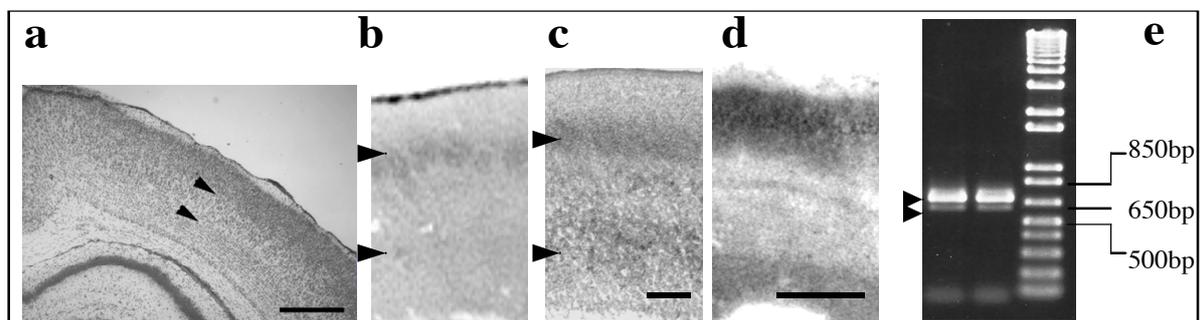


Abb.17: (a) Nissl-Färbung an einem coronalen Kryostatschnitt bei P6; die beiden Pfeilspitzen markieren Schichtbereiche mit hoher Zelldichte; (b) *In situ*-Hybridisierung mit sense-RNA-Sonde; Ausschnitt aus dem S1-Kortex bei P6; die Pfeilspitzen markieren Schicht 4 und 6. (c) wie (b) aber antisense-RNA-Sonde für Ephrin A5; (d) *In situ*-Hybridisierung mit antisense-RNA-Sonde für Ephrin A5; Ausschnitt aus dem S1-Kortex bei E18. (e) RT-PCR von gesamt-RNA aus zwei unabhängigen Schichtpräparationen für die Schicht 4 des somatosensorischen Kortex (Spur 1 (links) und 2; Spur 3 (rechts) enthält einen DNA-Längenstandard) mit spezifischen Primern für Ephrin A5. Die amplifizierten Produkte haben eine Größe von 687bp und 606bp. Maßstab (a)500µm (b) und (c), (d) 100µm.

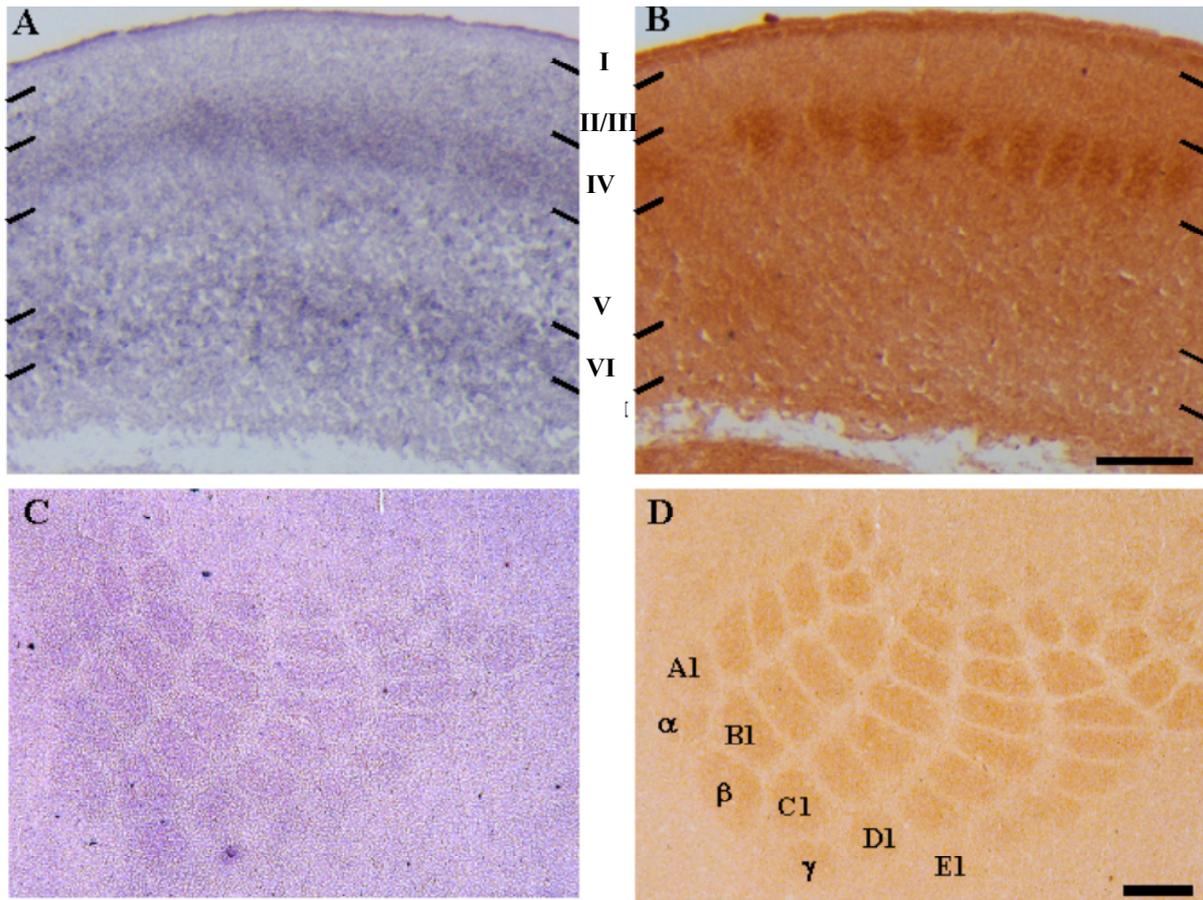


Abb. 18: Die Expression von Ephrin A5 im somatosensorischen Kortex: **A,C:** *In situ*-Hybridisierung, **B, D:** Cytochromoxidasefärbung, Coronalschnitte: **A** und **B**; Tangentialschnitte: **C** und **D**; die ersten Barrels der 5 Reihen A-E und die zusätzlichen Barrels a-g sind in **D** beschriftet, Römische Ziffern I- VI – die Schichten des Kortex 1-6; Maßstab 200 μ m.

3.1.2 Die Expression von Ephrinen und Eph- Rezeptoren in ausgewählten thalamischen Kernen bzw. im embryonalen dorsalen Thalamus

Die Untersuchung der embryonalen und frühen postnatalen Expression der Ephrine und Eph-Rezeptoren in den thalamischen Kernen des somatosensorischen Systems, im ventrobasalen Komplex (VB) und der Gruppe der posterioren Kerne (Po), wurde durch eine zusätzliche Kartierung der Expression im dorsalen und ventralen lateralen Genikulatum (DLG und VLG) ergänzt. Hierdurch sollten die thalamischen Kerne, des somatosensorischen Systems von anderen Systemen, in diesem Falle vom visuellen System abgegrenzt werden. Im embryonalen Stadium E14 wird der dorsale Thalamus mit den sich differenzierenden Regionen noch nicht eindeutig zuzuordnender Kerne und des VB sowie das thalamische Neuroepithel analysiert (Tab.6).

Wie für den Kortex so konnten auch im Thalamus ähnliche Expressionsmodi bestimmter Ephrine und Eph- Rezeptoren festgestellt werden. Es gab z.B. Ephrin- und Eph-Rezeptor- Gene, die gleich bleibend über alle Entwicklungsstadien kernübergreifend exprimiert waren, 5 Gene hingegen konnten generell nicht als exprimiert detektiert werden. Hierzu zählen die Liganden Ephrin A1 und Ephrin B1

und die Rezeptoren EphA1, EphA2 und EphB3. Es gab Rezeptoren und Liganden, die nur bei E14 exprimiert waren, bzw. deren Expression von E14 bis P0 in frühen Stadien nachweisbar war. Ab P0 und genauer noch bei P6 konnte eine kernspezifische Expression für einige Eph- bzw. Ephrin- Gene festgestellt werden. Ergänzend zu jenen Charakteristika der Expression, die bereits für den Kortex beschrieben wurden, fiel für Ephrin A5 und EphA5 eine graduelle Expression im dorsalen Thalamus auf. Im folgenden werden die oben aufgeführten Expressionsmodi anhand von Beispielen näher beschrieben:

Transient im embryonalen dorsalen Thalamus wurden eine ganze Reihe Rezeptoren und zwei Liganden exprimiert (Abb.21): An E14 waren Ephrin A4 und EphB1 im Neuroepithel und Ephrin B2 im noch undifferenzierten dorsalen Thalamus exprimiert. Diese Gene waren zu späteren Zeitpunkten nicht mehr im Thalamus nachweisbar. EphA3 und EphB2 konnten von E14 bis P0 in den untersuchten Regionen detektiert werden, EphA5 war erst ab E18 exprimiert wobei die Expression im VB und im VLG/DLG einem Gradienten von ventrolateral (hohe Signalintensität) nach mediodorsal (niedrige Signalintensität) folgte (Abb.21b2). Analog zur graduellen Expression von EphA5 bei E18 verlief die Expression von Ephrin A5 von hoher Signalstärke ventrolateral zu niedriger Signalstärke nach mediodorsal im VB und Po. Für EphA8 konnte wie im Kortex auch im Thalamus ab E18 eine bis P6 anhaltende, kernspezifische Expression beobachtet werden. Dabei war EphA8 im Po und im DLG/VLG, bis P0 auch im VB nachzuweisen.

Dagegen waren Ephrin A2 und A3 sowie EphB4 eher unspezifisch (d.h., im Thalamus kernübergreifend) über den gesamten untersuchten Zeitraum exprimiert. Bei P0 und deutlicher bei P6 wurden kernspezifische Hybridisierungssignale beobachtet: Alle Liganden und Rezeptoren, die als „kernspezifisch“ identifiziert wurden (Ephrin A5, Ephrin B3, EphA4, A6, A7, A8 und EphB6), hatten eines gemeinsam- sie zeigten alle ein Hybridisierungssignal im Po und unterschieden sich in den Kombinationen der Markierungen von VB und vom DLG und VLG. Ephrin A5, EphA4 und EphA7 waren im VB exprimiert, das DLG wies die Expression von EphA4, EphA8 und Ephrin A5 auf, das VLG war durch die Expression von EphA8 und Ephrin A5 charakterisiert (Abb.20).

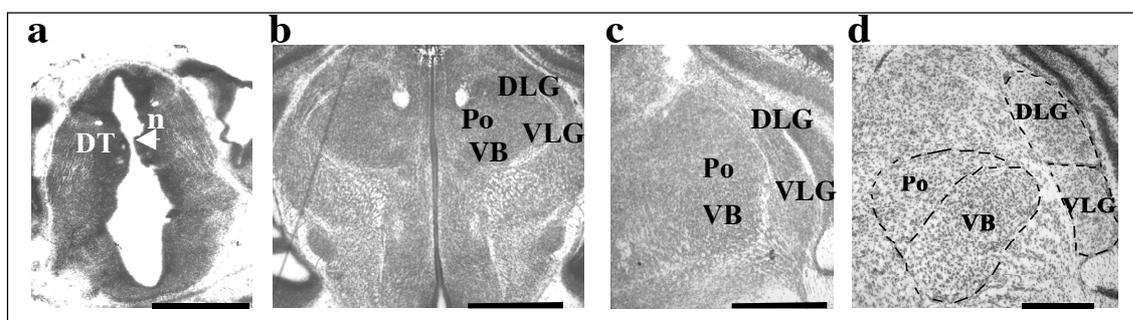


Abb.19: Nissl-Färbungen von Coronalschnitten im Bereich des dorsalen Thalamus zu den Entwicklungsstadien (a) E14, (b) E18, (c) P1, (d) P6. Die jeweils dargestellten Ausschnitte entsprechen denen in Abb.19 und 20 für die *In situ*-Hybridisierung gezeigten Bereichen. VB- ventrobasaler Komplex, Po posteriorer Nukleus, DLG/VLG- dorsales/ventrales laterales Genikulatum, DT- dorsaler Thalamus, n- Neuroepithel; Maßstab 300µm.

Tab.6: Die Expression von Ephrinen (efna- 1-5, efnb- 1-3) und Eph-Rezeptoren (EphA-1-8 und EphB-1-6) in ausgewählten thalamischen Kernen, bzw. im dorsalen embryonalen Thalamus bei E14, E18, P0 und P6. Kern- bzw. arealbezogene Darstellung. Die Expressionsintensitäten sind farbkodiert dargestellt: blau- nicht detektierbar, gelb- detektierbar, rot- auffällig starkes Signal; G- Gradient; Schraffur- nicht der gesamte Kern ist markiert. DTh- dorsaler Thalamus, diff field- sich differenzierendes Feld, VB diff r- sich differenzierende Region des ventrobasalen Komplexes, Th ne- Neuroepithel des Thalamus, VPL/VPM- ventroposterolateraler bzw. ventroposteromedialer Teil des ventrobasalen Komplexes, Po- posteriore thalamische Kerne, DLG/VLG- dorsales/ ventrales laterales Genikulatum.

	E14			E18				P0				P6			
	d Th diff field	VB diff r	Th ne	VPL/VPM	Po	DLG	VLG	VPL/VPM	Po	DLG	VLG	VPL/VPM	Po	DLG	VLG
efna-1	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
efna-2	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
efna-3	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
efna-4	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
efna-5	red	red	blue	G	blue	G	G	blue	blue	blue	blue	G	blue	G	G
efnb-1	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
efnb-2	red	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
efnb-3	red	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
EphA-1	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
EphA-2	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
EphA-3	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
EphA-4	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
EphA-5	blue	blue	blue	G	blue	G	G	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
EphA-6	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
EphA-7	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
EphA-8	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
EphB-1	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
EphB-2	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
EphB-3	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
EphB-4	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue
EphB-6	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue

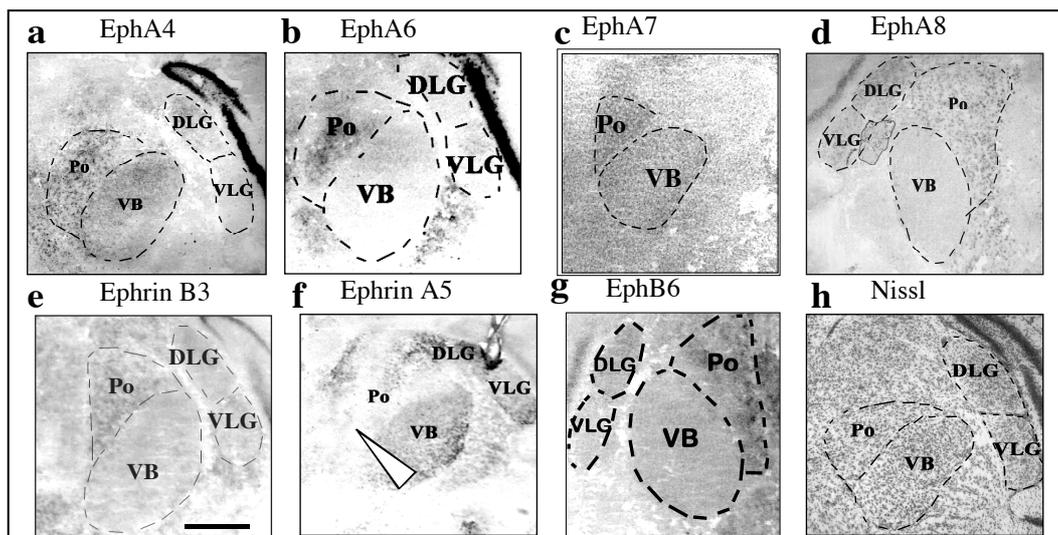


Abb.20: Kernspezifische Expression von Ephrinen und Eph- Rezeptoren im dorsalen Thalamus. *In situ*-Hybridisierungen an Coronalen -P6 mit antisense-RNA- Sonden; Expression von (a) EphA4 in Po, VB und DLG, (b) EphA6 in Po (c) EphA7 in VB und Po (d) EphA8 in Po, DLG und VLG, (e) Ephrin B3 in Po, (f) Ephrin A5 in Po, VB, DLG und VLG; zu beachten in (f) Gradient der Expression von Ephrin A5 von ventrolateral > mediodorsal; (g) EphB6 in Po, (h) Nissl- Färbung; Po- posteriorer Nucleus; VB- ventrobasaler Komplex; DLG/ VLG- dorsales/ ventrales laterales Genikulatum; Maßstab 300 μ m.

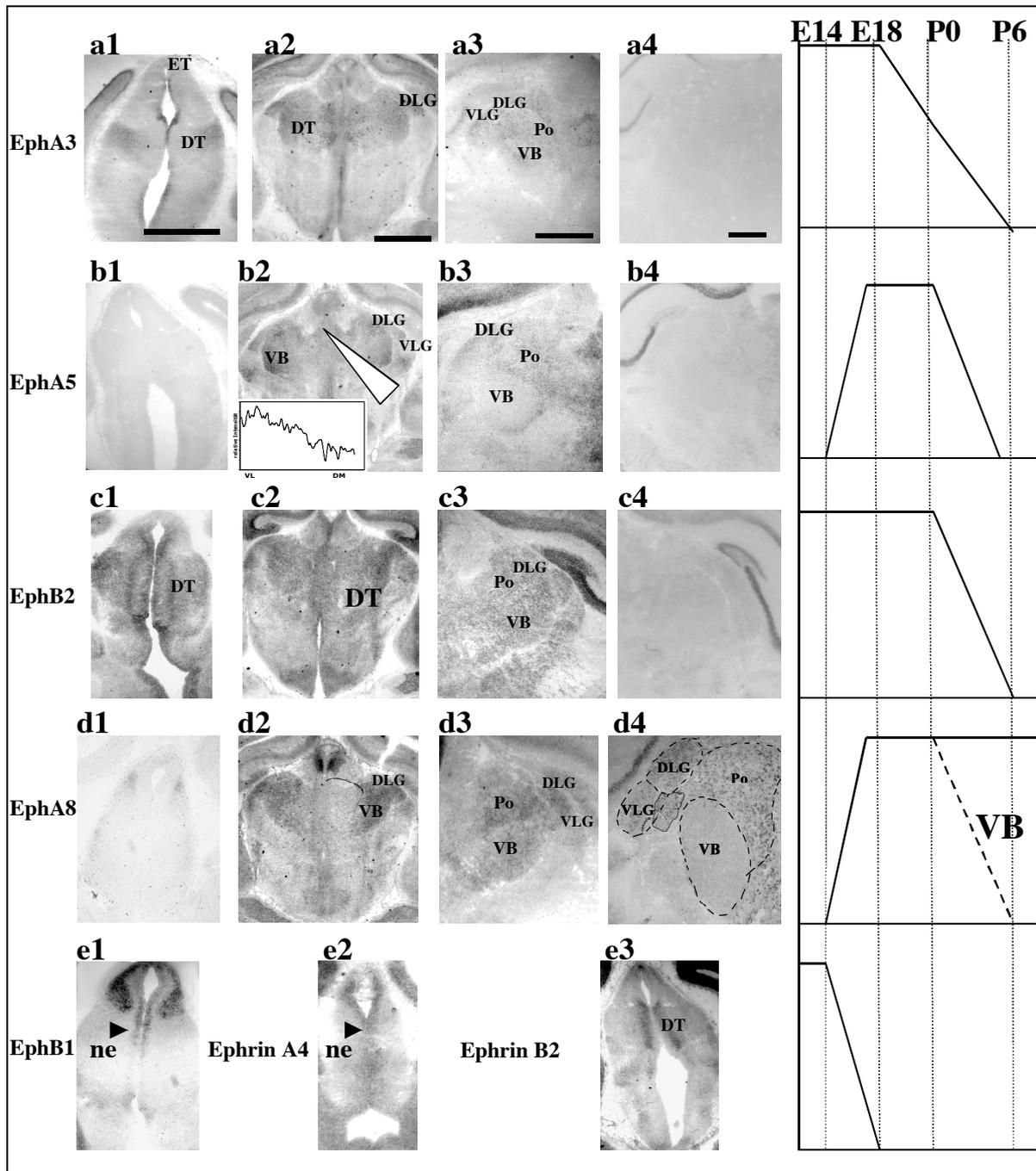


Abb.21: Transiente Expression von Ephrinen und Eph- Rezeptoren in ausgewählten thalamischen Kernen und im embryonalen dorsalen Thalamus. *In situ*-Hybridisierungen an Coronalschnitten für die Entwicklungsstadien E14 (**a1- d1** und **e1-3**), E18 (**a2- d2**), P0 (**a3- d3**) und P6 (**a4- d4**). „Frühe“ Expression von EphA3; (**b**) EphA5; (**c**) EphB2 und „späte“ Expression von (**d**) EphA8. Auf E14 zeitlich beschränkte Expression von EphB1 (**e1**); Ephrin A4 (**e2**) und Ephrin B2 (**e3**); zu beachten: in (**b2**) ein Gradient der EphA5-Expression in VB, VLG und DLG von ventrolateral/VL (hohe Signalstärke) nach mediodorsal/MD (niedrige Signalstärke), das Plotprofil zeigt den Verlauf der Signalintensität von VL nach MD für den VB; rechts daneben: jeweils schematische Darstellungen des Expressionsverlaufes zum Zeitpunkt E14, E18, P0 und P6 den Abbildungen in der Reihe links daneben entsprechend. VB- ventrobasaler Komplex, Po posteriorer Nukleus, DLG/VLG- dorsales/ventrales laterales Genikulatum, DT- dorsaler Thalamus, ET- Epithalamus, n- Neuroepithel; Maßstab 300 μ m.

3.1.3 Die Expression von Ephrinen und Eph- Rezeptoren im embryonalen subkortikalen Telencephalon und in den Ganglionischen Eminenzen

Die ganglionischen Eminenzen (GE) sind die Hauptquelle für Interneurone, die zwischen E12 und E16 gebildet werden und tangential zum Kortex, in das Striatum, zum Hippocampus, zum Bulbus olfactorius und zum anterioren präoptischen Areal migrieren (Pleasure ,2000 , Marin 2000 und Marin and Rubenstein, 2001).

Im Bereich der GE wurden um den 14. Embryonaltag Ephrine und Eph- Rezeptoren nachgewiesen, die in komplementären Gradienten in der Ventrikularzone der lateralen GE (LGE) und medialen GE (MGE) exprimiert waren. So folgte die Expression von Ephrin A5 und EphB1 einem Gradienten von medial (hohe Signalstärke) nach lateral (niedrige Signalstärke), die Expression von Ephrin B1, Ephrin B2 und EphA3 hingegen einem entgegengesetzten Gradienten von lateral (hohe Signalstärke) nach medial (niedrige Signalstärke). Plotprofile, die für die VZ von medial nach lateral erstellt wurden, und die Signalintensitäten als Grauwerte wiedergeben, belegen den graduellen Expressionsverlauf (Abb.22 unten). Desweiteren wurden Ephrin A2, Ephrin A4, EphA4 und EphB6 in der Ventrikular-(VZ) und Subventrikularzone (SVZ), EphB2 nur in der VZ von MLG und VLG exprimiert. Die Expression von EphA6 und EphB4 war auf die VZ der LGE beschränkt. Ephrin A1, A3, Ephrin B3, EphA1, A2, A7, A8 und EphB3 wurden im Bereich der GE nicht exprimiert (Tab.7)

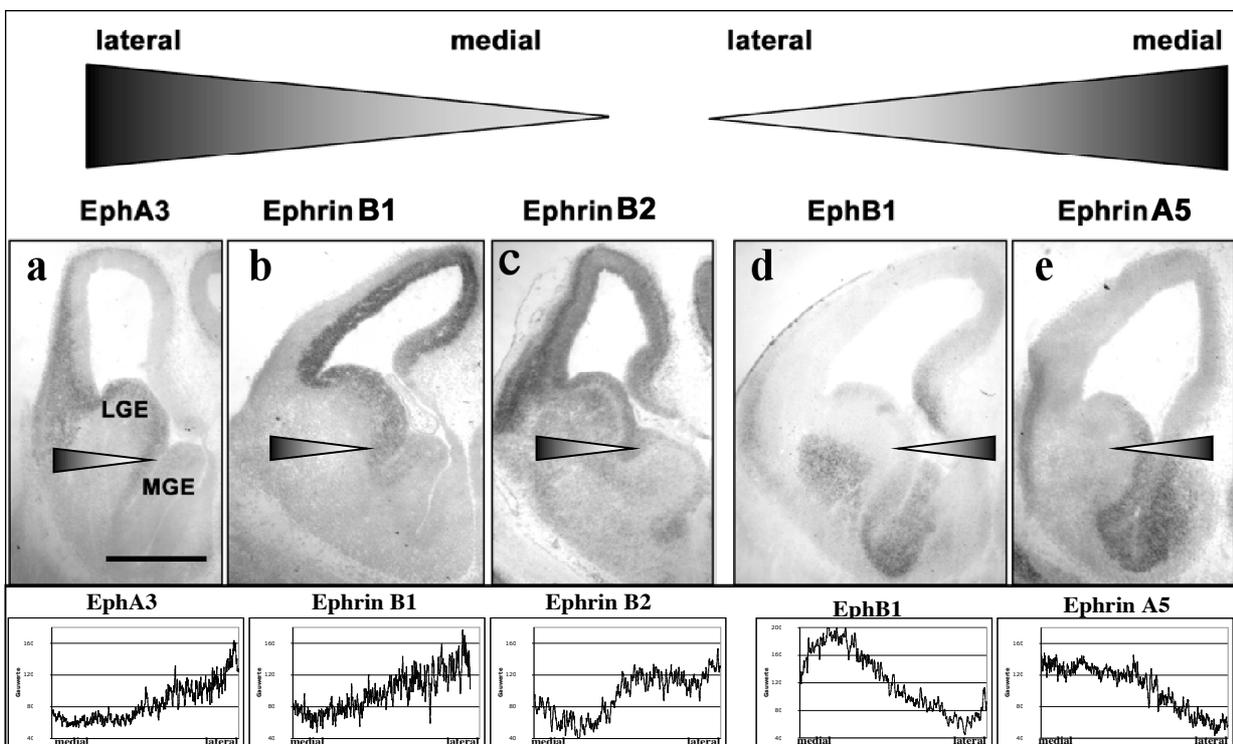


Abb.22: Graduelle Expression von (a) EphA3, (b) Ephrin B1, (c) Ephrin B2, (d) EphB1 und (e) Ephrin A5 in den ganglionischen Eminenzen. (a-c) Gradient von lateral (hohe Signalintensität) nach medial (niedrige Signalintensität) und (d, e) Gradient von medial (hohe Signalintensität) nach lateral (niedrige Signalintensität); Antisense- RNA- *in situ*- Hybridisierungen an Coronschnitten bei E14; darunter jeweils die Plotprofile mit Signalintensitäten als Grauwerte von medial nach lateral bestimmt; MGE/LGE- mediale/ laterale ganglionische Eminenz; Maßstab 300 μ m.

Tab.7: Die Expression von Ephrinen (efna-1-5, efnb-1-3) und Eph-Rezeptoren (EphA-1-8 und EphB-1-6) in den ganglionischen Eminenzen (GE) bei E14. Die Expressionsintensitäten sind farbkodiert dargestellt: blau- nicht detektierbar, gelb- detektierbar, rot- auffällig starkes Signal; G- Gradient; mGE/ IGE- mediale bzw. laterale GE, VZ- Ventrikularzone, SVZ- Subventrikularzone.

	mGE VZ	mGE SVZ	IGE VZ	IGE SVZ
efna-1	blau	blau	blau	blau
efna-2	gelb	blau	blau	blau
efna-3	blau	blau	blau	blau
efna-4	gelb	blau	blau	gelb
efna-5	gelb	blau	G	blau
efnb-1	gelb	blau	G	blau
efnb-2	G	blau	rot	gelb
efnb-3	blau	blau	blau	blau
EphA-1	blau	blau	blau	blau
EphA-2	blau	blau	blau	blau
EphA-3	G	blau	rot	blau
EphA-4	gelb	gelb	blau	gelb
EphA-5	blau	blau	blau	gelb
EphA-6	blau	blau	gelb	blau
EphA-7	blau	blau	blau	blau
EphA-8	blau	blau	blau	blau
EphB-1	rot	blau	G	blau
EphB-2	gelb	blau	gelb	blau
EphB-3	blau	blau	blau	blau
EphB-4	blau	blau	gelb	blau
EphB-6	gelb	gelb	blau	gelb

Bei E14 wurde ein weiteres, in Bezug auf die Bedeutung der Ephrine und Eph- Rezeptoren für die Ausbildung von thalamokortikalen und auch kortikothalamischen Projektionen, auffälliges Expressionsmuster beobachtet: Einige Liganden und Rezeptoren waren entlang der Regionen exprimiert, durch welche die thalamokortikalen bzw. kortikothalamischen Axone ihren Verlauf nehmen. Entweder markierten sie den Pfad, das Ziel- oder Herkunftsgebiet direkt oder sie waren in angrenzenden Regionen exprimiert, so dass der betreffende Projektionsweg ebenfalls abgegrenzt wurde. Die Abbildung 23 enthält eine Zusammenstellung der markantesten Expressionen, sowie vereinfachte, schematische Darstellungen der entsprechenden Regionen. Im dorsalen Thalamus waren Ephrin A5, EphA3 und EphB2 exprimiert. EphA3 markierte zudem die Grenze zwischen Pallium und Subpallium, an der sich eine Richtungsänderung der auswachsenden Axone ereignet. Auch im Kortex war EphA3 in der kortikalen Platte und der Intermediärzone exprimiert, EphB2 in der VZ und SVZ. Die projizierenden Axone wachsen durch die sich entwickelnden Basalganglien, das Striatum und den Globus pallidus, hindurch und bilden die interne Kapsel. Im Striatum wurde EphB1 exprimiert. Eph A5 markierte hingegen die SVZ der GE, basale, ventral vom Striatum gelegene Teile des Telencephalons und die kortikale Platte. Ebenfalls im basalen Telecephalon war Ephrin B3 sehr stark exprimiert, wobei Ephrin B3 auch in den sich entwickelnden Kernen des dorsalen Thalamus detektiert wurde, nicht jedoch im thalamischen Neuroepithel.

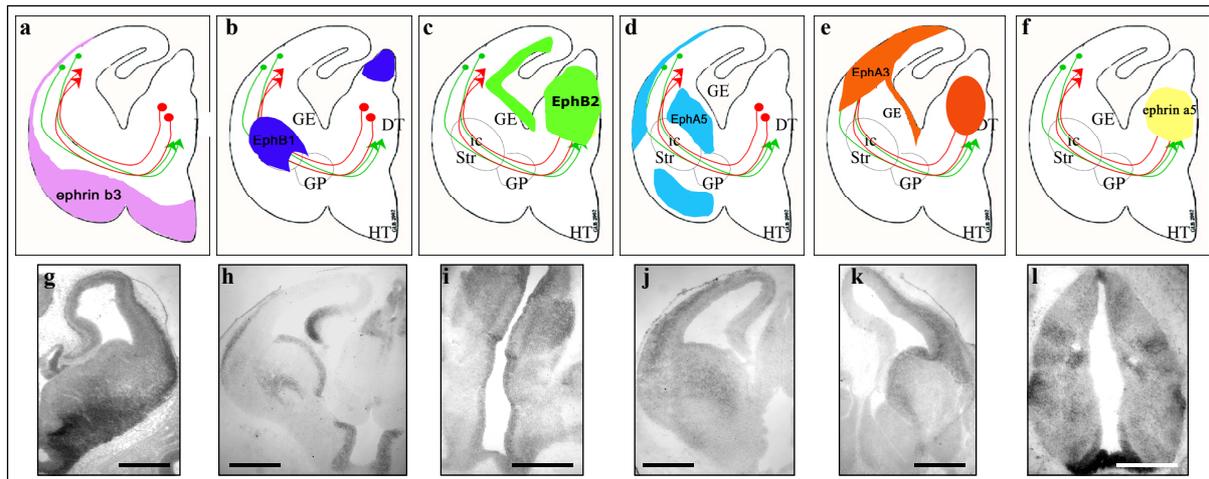


Abb.23: Die Expression von Ephrinen und Eph- Rezeptoren im Pallium und Subpallium bei E14. *In-situ*-Hybridisierungen mit antisense- RNA- Sonden an Coronalen Schnitten für (g) Ephrin B3, (h) EphB1, (i) EphB2, (j) EphA5, (k) EphA3 und (l) Ephrin A5; (a-f): zu (g-l) korrespondierende schematische Darstellungen der markierten Areale, GE- ganglionische Eminenz, GP- Globus Pallidus, Str- Striatum, ic- interne Kapsel, HT- Hypothalamus, zusätzlich schematisch dargestellt: kortikale Neurone und ihre Axone in grün und thalamische Neurone und ihre Axone in rot ; Maßstab 250 μ m.

3.2 Genexpressionsanalyse im somatosensorischen Kortex bei Ephrin A5- knockout- und Wildtypmäusen

3.2.1 Globale Parameter

Zum Beurteilen der Qualität und Vergleichbarkeit von unabhängigen Microarray- Experimenten dienen globale Parameter wie der Anteil der Gene, die mit MAS 5.0 als *present* (*P-call*) oder *marginal* (*M-call*) detektiert wurden, die mittlere Signalintensität zwischen der 2. und 98. Perzentile (im folgenden als *utm2*, *upper trimmed mean 2%*, bezeichnet) und die globale Verteilung der Signalintensitäten anhand eines Rang-Intensitäts-Plots (RIP).

Außerdem wurden als interne Kontrollen die 3'/5'-Ratios der *housekeeping*-Gene GAPDH und β -Aktin ermittelt. Die Werte für die 3'/5'-Ratios von GAPDH und β -Aktin gelten als Indikator für die Integrität der poly-A+-RNA und für die Effizienz der cDNA- Synthese sowie der *In vitro*-Transkription der cRNA. Laut Empfehlung von Affymetrix sollten die Werte der 3'/5'-Ratios 3 nicht übersteigen. Es wurden 3'/5'-Ratios für GAPDH von 0,93 bis 1,5 und für β -Aktin von 1,2 bis 2,35 ermittelt. Weiterhin geben die Signalintensitäten für vier dem Hybridisierungs- Mix zugefügten Transkripte, *bioB*, *bioC*, *bioD* und *cre*, Auskunft über den Ablauf der Hybridisierungsreaktion und der anschließenden Wasch- und Färbeschritte. Die Transkripte sind in aufsteigender Verdünnung eingesetzt, wobei *bioB* mit 1,5 pM an der Nachweisgrenze vieler Microarray- Experimente liegt und erfahrungsgemäß in nur 70% der Fälle als *present* detektiert wird. Die anderen Transkripte sollten alle als *present* detektiert sein und ihre Signalintensitäten von *bioC* über *bioD* bis *cre* ansteigen. Alle

Kontrolltranskripte, auch *bioB*, wurden in den vier Experimenten als *present* detektiert, die Signalwerte nahmen jeweils von *bioB* über *bioC*, *bioD* bis *cre* zu (Tab.8 und 9 im Anhang).

Die Abbildung 24 zeigt, dass die globalen Parameter für alle Hybridisierungen sehr ähnlich sind. In allen Experimenten wurde ca. die Hälfte der Transkripte als *present* detektiert, die mittleren Signalintensitäten waren übereinstimmend. Im Rang-Intensitäts-Plot zeigte sich, dass die Verteilung der Signalintensitäten nahezu identisch war. Die relative Abweichung der Rangintensitäten war sehr gering. Sie betrug lediglich für sehr hohe (>6000) und sehr niedrige Werte (<20) mehr als 10% (Abb.25a und b). Die Experimente unterliegen demnach keinen methodisch bedingten Abweichungen und sind als vergleichbar zu bewerten.

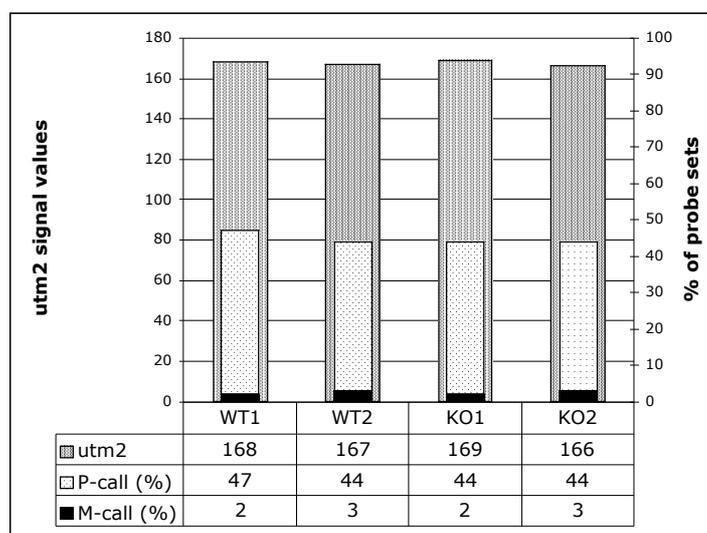


Abb.24: Globale Parameter für die Microarray- Experimente WT1, WT2, KO1, KO2. Die Signalintensitäten der utm2 sind auf der Primärachse, der Anteil der P- bzw. M- calls pro Experiment (in %) sind auf der Sekundärachse aufgetragen.

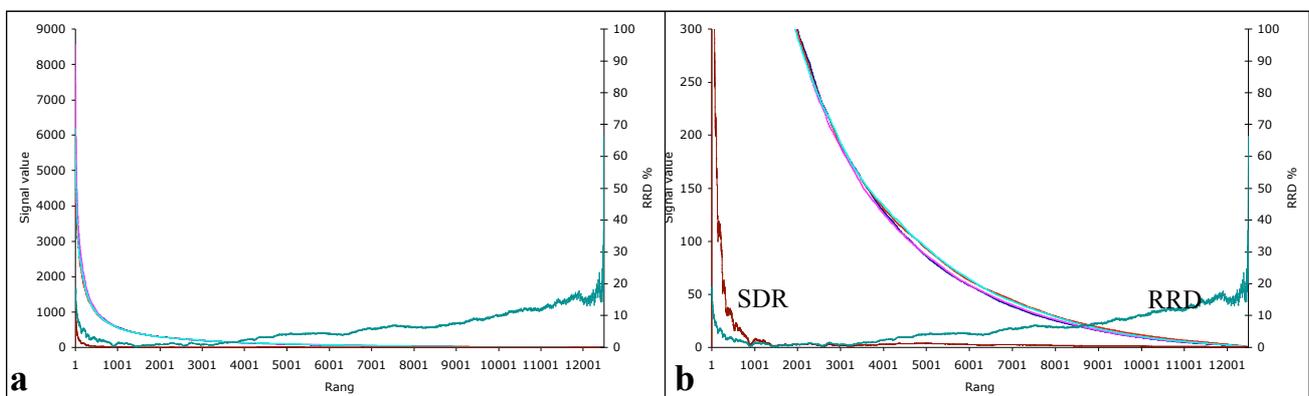


Abb.25: Rang-Intensitätsplot für die Signalwerte von vier Microarray-Experimenten WT1, WT2, KO1, KO2. **(b)** vergrößerte Darstellung von **(a)**, auf der die einzelnen Plots besser erkennbar sind. Zusätzlich dargestellt sind: SDR- Standardabweichung der Rangintensitäten und auf der Sekundärachse RRD- Relative Abweichung der Rangintensitäten (%).

3.2.2 Bewertung der Aussagekraft der Vergleiche zwischen Wildtyp und EphrinA5-Knockout und der Vergleiche zwischen biologischen Replika

Unter Verwendung von MAS 5.0 wurden zunächst die einzelnen Vergleiche für jedes KO- Experiment mit jedem WT- Experiment (heterotypischer Vergleich) analysiert. Im Einzelvergleich waren 5-6% der Transkripte sowohl in den KO/WT-Vergleichen als auch in den Replika-Vergleichen differentiell exprimiert (*change call*). Betrachtet man jedoch nur die konsistent veränderten Transkripte, sind in den homotypischen Vergleichen (Replika) nur noch 1,5% (187 *Probe sets*) in den heterotypischen Vergleichen jedoch 5,5% (696 *Probe sets*) verändert exprimiert. Hierfür wurden die Schnittmenge der veränderten Transkripte in den beiden Replika-Vergleichen bzw. die *Probe sets*, die in mindestens 2 von 4 KO/WT-Vergleichen verändert waren, ermittelt. Dies zeigt, dass in die Analyse unter anderem auch ein Anteil unspezifischer Probenvariationen und/oder technisch bedingte Variationen eingegangen sind. Technische Variationen können z.B. von unterschiedlichen Reagenzien und GeneChips unterschiedlicher Chargen, die in den zeitlich versetzt durchgeführten Experimenten eingesetzt wurden, herrühren.

Einen Eindruck über die Aussagekraft dieser Veränderungen erhält man, indem die betroffenen Gene funktionellen Gruppen zugeordnet werden und die Anzahl der veränderten Gene je Gruppe untersucht wird. Hierzu wurden GO-Annotationen für biologische Vorgänge für die veränderten Gene in den homotypischen und heterotypischen Vergleichen ermittelt. Zur Bestimmung und Analyse der GO-Terme wurde der *GO Export Tool* im *Netaffx Analysis Center* der Affymetrix- Homepage verwendet (<https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/selectGOExport.affx>). Mit dem Chi-square-Test (erweitert um Yates-Korrektur für geringe Häufigkeiten) wurden für die heterotypischen Vergleiche 16 signifikant überrepräsentierte GO-Annotationen ($p\text{-value} < 0,05$), die mindestens 10 Gene enthielten, bestimmt. In den homotypischen Vergleichen war unter Berücksichtigung derselben Kriterien nur eine einzige Gruppe mit der GO-Annotation *intracellular transport* signifikant betroffen. Diese Gengruppe ist auch in den KO/WT-Vergleichen signifikant überrepräsentiert und unterliegt wahrscheinlich besonders starken Schwankungen. In den signifikant überrepräsentierten Gruppen waren insgesamt 191 (37%) von 520 annotierten Transkripten der heterotypischen Vergleiche, aber nur 19 (12,6%) von 150 Transkripten mit Annotation der homotypischen Vergleiche enthalten. Unter den in heterotypischen Vergleichen signifikant betroffenen funktionellen Gruppen waren allein 4 mit für das Nervensystem wichtigen Funktionen vertreten: *nervous system development*, *neurophysiological process*, *neurogenesis* und *transmission of nerve impulse*. Weitere Gruppen waren *small GTPase-mediated signal transduction* und *cell-cell signaling*. In der Abbildung 26 sind zur Illustration die Verteilungen der *change p-values* anhand je eines Beispiels für eine überrepräsentierte und eine nicht betroffene Gruppe (*nervous system development* und *fatty acid metabolism*) in Gegenüberstellung zu allen exprimierten Genen dargestellt. Die *change p-values* geben die Signifikanz der Veränderung an, wobei die Signifikanz für einen *increase call* am höchsten ist, wenn der *change p-value* nahe 1 ist, für

einen *decrease call*, wenn der *change p-value* nahe 0 ist. In der Gruppe *nervous system development* war gegenüber allen exprimierten Genen der Anteil der Gene mit einem *change p-value* nahe 1 bzw. 0 deutlich größer. Die nicht betroffene Gruppe *fatty acid metabolism* enthielt dagegen keine Gene mit einem *change p-value*, der für einen *decrease call* bzw. *increase call* spricht.

Diese Auswertung zeigt, dass infolge des Ephrin A5-KOs sehr spezifische Veränderungen in der Expression von Genen, deren Funktion auch mit Vorgängen innerhalb des Nervensystems assoziiert ist, bewirkt wurden.

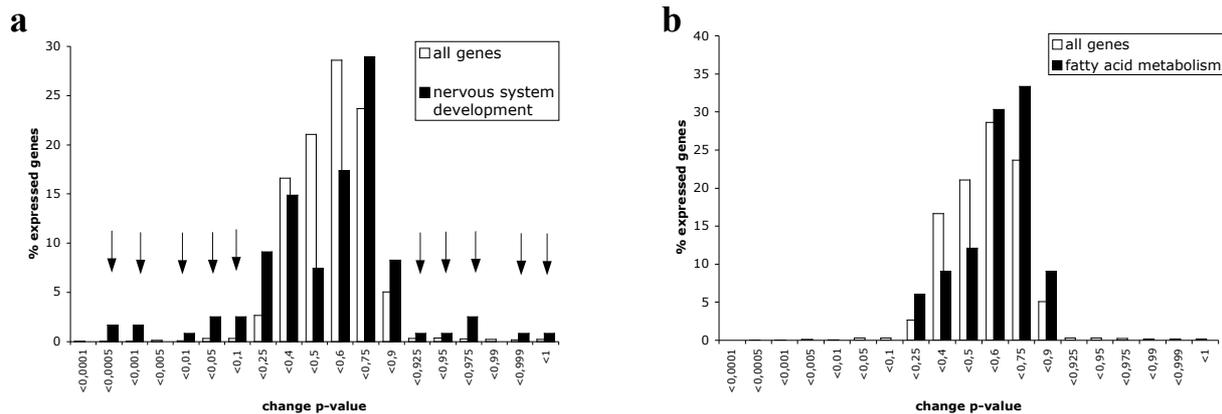


Abb.26: Verteilung der *change p-values* in KO/WT-Vergleichen für alle Gene und die Gene aus der funktionellen Gruppe (a) *nervous system development* und (b) *fatty acid metabolism*.

Tab.10: Signifikant überrepräsentierte GO-Annotationen in heterotypischen und homotypischen Vergleichen

GO-Terme mit $p < 0.05$	Gesamt Probe Sets auf MG_U74A	% der annotierten Gene	n regulierte Gene
Heterotypische Vergleiche (KO/WT)			
intracellular transport	599	8,8	46
nervous system development	447	7,9	41
neurophysiological process	301	5,6	29
small GTPase mediated signal transduction	238	5,4	28
vesicle-mediated transport	319	5,0	26
RNA processing	306	4,8	25
neurogenesis	249	4,6	24
locomotion	274	4,4	23
alcohol metabolism	258	4,2	22
cell-cell signaling	197	4,0	21
secretory pathway	148	3,8	20
homeostasis	182	3,5	18
nucleotide metabolism	158	3,5	18
transmission of nerve impulse	123	3,5	18
growth	175	3,3	17
energy derivation by oxidation of organic compounds	144	3,1	16
Homotypische Vergleiche (WT/WT, KO/KO)			
intracellular transport	557	12,7	19

3.2.3 Auswahlstrategien zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Bei der Auswertung von Microarray- Experimenten ist es wichtig, zu klären, welche Veränderungen in der Expression als biologisch relevant angesehen werden können. Das ist besonders von Bedeutung, wenn für die Experimente Gewebe verwendet wurde, das sehr viele verschiedene Zelltypen enthält. In der vorliegenden Arbeit wurde Gehirngewebe verwendet, welches zwar aus einer einzigen Kortexregion, dem primären somatosensorischen Kortex, stammt, somit zwei primäre neuronale Zelltypen- Pyramidenzellen und Interneurone- enthält, diese sind allerdings strukturell und funktionell extrem verschieden. Eine Veränderung, selbst wenn sie relativ stark ist, die aber nur eine bestimmte Subpopulation von Zellen betrifft, könnte möglicherweise nicht detektiert werden, da sie von den unveränderten Transkripten aus anderen Zellen überdeckt würde. Diese fehlerhaft als nicht verändert detektierten Transkripte werden dem entsprechend auch als *false negatives* bezeichnet. Und umgekehrt, zufällige Variationen von *low abundance* -Transkripten könnten als Veränderungen, somit als *false positives* angesehen werden. Um den Anteil an *false negatives* und *false positives* möglichst gering zu halten, wurden für die Auswertung zwei Strategien verfolgt:

- Zum einen wurden mithilfe von MAS 5.0. die Gene mit mindestens drei gleich orientierten *Change-calls* aus den vier Vergleichen ermittelt. Die Software MAS 5.0 verwendet zum Vergleichen im *Change algorithm* nicht die Signalwerte allein, die für jedes *probe set* aus 8x2 einzelnen Daten- 8 *perfect match (PM)* und entsprechenden 8 *mismatch (MM)* Sonden - errechnet werden, sondern vergleicht die einzelnen *PM* und *MM*- Wertepaare für KO und WT- Experimente und zusätzlich die Signalintensitäten der *PM* mit dem Hintergrund, um ein *change-p-value* für das *probe set* zu ermitteln (Detaillierte Beschreibung in: „GeneChip Expression Analysis- Data Analysis Fundamentals“ 2002-2004, <http://www.affymetrix.com>).
- Zum anderen wurden die Signalwerte, die aus den *Single Array Analysen* der vier Experimente resultierten, nach der Methode der Quantil- Normalisierung abgeglichen (Bolstad et al. 2003), anschließend in Microsoft- Excel exportiert und separat ausgewertet. Alle Gene, deren Variation innerhalb der biologischen Replika 2x größer als die KO/WT- Unterschiede war, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Weiterhin wurden nur solchen Gene ausgewertet, die mindestens einen *P-call* erhalten hatten und deren Signalwert mindestens 50 war. Anschließend wurde ein Bewertungsmodus angewandt, der erlaubt, die Gene herauszufiltern, deren Expression sich (a) in mindestens 2 von 4 Vergleichen um 100% (2-fache Veränderung) und mehr unterscheiden, oder (b) in allen 4 Vergleichen um 50- 100% (1,5- bis 2-fach) unterscheiden. Zur Vereinfachung wurden hierbei die Veränderungen in den jeweiligen Vergleichen mit Punkten versehen; eine mindestens 2-fache Veränderung der Expression erhielt 2 Punkte; eine 1,5 bis 2- fache Veränderung der Expression erhielt 1 Punkt. Es wurden nur jene Gene weiter analysiert, die mit mindestens 4 Punkten bewertet wurden.

Alle Gene, die entweder in der ersten, auf MAS 5.0 basierenden Analyse, oder in der zweiten, die Variabilität innerhalb der Replika und Konsistenz der Veränderungen berücksichtigende Analyse, identifiziert wurden, kamen als regulierte Gene infrage.

3.2.4 1.4% der untersuchten Gene sind im Ephrin A5-knockout- Kortex differentiell exprimiert

Unter Verwendung der oben erläuterten Algorithmen wurden aus der Gesamtzahl der veränderten Gene in den heterotypischen Vergleichen die in einer Gruppe (bezogen auf KO) statistisch höher bzw. geringer exprimierten Gene herausgefiltert. So wurden 172 regulierte Gene identifiziert, das entspricht 1,4 % der auf dem GeneChip repräsentierten Transkripte. 68 Gene waren im KO höher und 104 Gene waren im KO niedriger exprimiert als im WT. Diese Gene sind in den Tabellen 21 und 22 mit ihren *Probe-set-IDs*, *public GeneIDs*, Gennamen, Gensymbol nach der mittleren Veränderung (ausgedrückt in $\log_2(\text{KO}/\text{WT})$) und der zugehörigen Sdm (Standardabweichung um den Mittelwert) sortiert, aufgelistet. Weiterhin wurden die Daten der verändert exprimierten Gene einer hierarchischen Clusteranalyse unterzogen, deren Ergebnisse in den Abbildungen 48 und 49 im Anhang dargestellt sind. In dieser Analyse werden die Gene nach ihrer Ähnlichkeit, was das Verhalten in den Experimenten betrifft und auch die Experimente hinsichtlich der Expressionsdaten, hierarchisch geordnet. Die Signalwerte aus den einzelnen Experimenten (in Spalten) für die jeweiligen Gene (in Zeilen) sind farblich kodiert, rot bedeutet einen Wert über dem Median der Signalwerte des betreffenden Gens, grün wird für Werte, kleiner als der Median der Signalwerte des betreffenden Gens verwendet. Die jeweiligen WT- Replika- Experimente konnten eindeutig von den KO- Replika unterschieden werden, was am Verwandtschaftsbaum für die Experimente erkennbar ist (Abb.48). In der Abbildung 48 sind 2 Cluster erkennbar, Cluster II enthält die im KO herunterregulierten, Cluster III enthält die im KO heraufregulierten Gene. Die als Gruppe I zusammengefassten vier Gene konnten in keines der Cluster geordnet werden. In Abbildung 49 sind diese Gruppen einzeln mit den zugehörigen Gennamen (bzw. *probe set IDs*) dargestellt. Eine erneute Zuordnung der regulierten Gene zu funktionellen Gruppen wurde wie in 3.2.2 beschrieben, vorgenommen. Von den 172 Genen waren 130 Gene annotiert. 20 funktionelle Gruppen waren signifikant überrepräsentiert, davon beschrieben allein 10 GO-Terme Prozesse, die mit der Funktion des Nervensystems eng assoziiert sind. Am stärksten betroffen sind folgende funktionelle Gruppen: Organmorphogenese, Entwicklung des Nervensystems, neurophysiologische Prozesse, Differenzierung von Neuronen und Musterbildung (Tab.11).

Tab.11: Signifikant überrepräsentierte (p-value<0,05) GO-Annotationen für die im Ephrin A5-KO differenziell exprimierten Gene.

GO Term	Gesamt Probe Sets auf MG_U74	% der annotierten Gene	n regulierte Gene
organ morphogenesis	446	10,0	13
<i>nervous system development</i>	410	10,0	13
<i>neurophysiological process</i>	277	6,9	9
<i>neuron differentiation</i>	187	6,2	8
pattern specification	166	5,4	7
DNA replication	128	4,6	6
negative regulation of cell proliferation	85	4,6	6
angiogenesis	104	3,8	5
<i>synaptic transmission</i>	93	3,8	5
<i>brain development</i>	85	3,8	5
cell fate commitment	68	3,8	5
<i>axon guidance</i>	59	3,1	4
biogenic amine metabolism	42	3,1	4
response to oxidative stress	48	2,3	3
response to radiation	43	2,3	3
<i>regulation of neurogenesis</i>	39	2,3	3
<i>regulation of neurotransmitter levels</i>	39	2,3	3
<i>forebrain development</i>	39	2,3	3
negative regulation of protein kinase activity	36	2,3	3
<i>hindbrain development</i>	13	2,3	3

3.2.5 Analyse der Genfamilie der Ephrine und Eph-Rezeptoren

Von besonderem Interesse im Ephrin A5- knockout –Modell ist das Verhalten der Transkripte für die Eph- Rezeptor- und anderen Ephrin- Gene im untersuchten somatosensorischen Kortex. Auf dem für die Microarray- Analyse verwendeten GenChip MGU74A waren bis auf EphA1, EphB1 und EphB4 alle Gene der Eph/Ephrin- Genfamilie repräsentiert. Da keines der Eph/Ephrin- Gene in der aus der stringenten Analyse gewonnenen Liste der regulierten Gene vorkam, wurden die entsprechenden normalisierten Daten separat auf geringe aber konsistente Veränderungen hin analysiert. Aus der Abbildung 27, in der die mittleren log₂ratios und die jeweiligen Sdm (Standardabweichung um den Mittelwert) für alle KO/WT- Vergleiche aufgetragen sind, ist ersichtlich, dass vier der 10 Gene moderat aber konsistent im Ephrin A5- knockout heraufreguliert sind. Die Expression von Ephrin A2 und auch von EphA5 war um 50% erhöht. EphA7 zeigte eine Zunahme der Expression um 40% und EphB6 war um 36% höher exprimiert als im WT. In Tabelle 12 (Anhang) sind die Signalwerte, *Detection calls* und *Detection p-values* für alle auf dem GenChip vorhandenen Gene der Eph/Ephrin –Familie aufgeführt. Drei der Gene, Ephrin A5, EphA6 und EphB3, die in der *In-situ*- Hybridisierung als exprimiert beschrieben wurden, sind mit MAS 5.0 in den WT- Proben als *absent* detektiert worden.

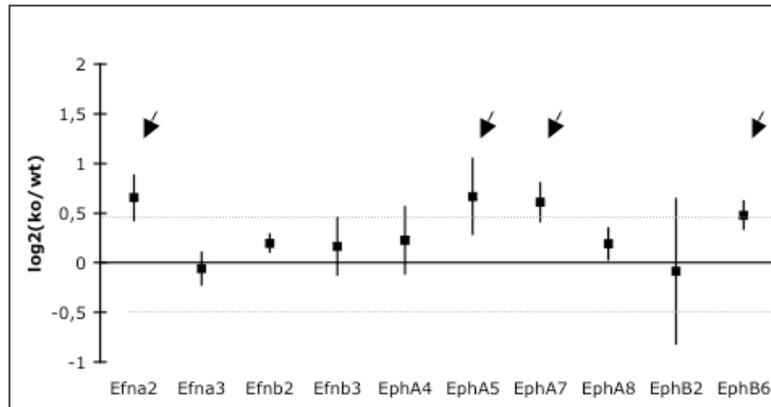


Abb.27: Mittlere \log_2 ratios (KO/WT) und Standardabweichungen um den Mittelwert für alle als *present* detektierten Ephrine und Eph-Rezeptoren. Efn- Gensymbol für Ephrin-Gene; Eph- Gensymbol für Eph-Rezeptor Gene.

Verifizierung mittels Quantitativer RealTime-PCR

Unter Verwendung von cDNA aus unabhängigen RNA-Präparationen wurden die Microarray-Ergebnisse für Ephrin A2, EphA5, EphA7 und EphB6 mit Quantitativer RealTime-PCR überprüft. Zusätzlich sind auch die Eph/Ephrin- Gene untersucht worden, die nicht auf dem GeneChip repräsentiert waren und in der *In-situ*-Hybridisierung detektiert wurden (EphB1 und EphB4). Außerdem wurden diejenigen Gene überprüft, die entgegen der *In-situ*-Hybridisierung mit MAS 5.0 als *absent* bestimmt wurden (EphA6 und EphB3). Die genspezifischen Primer für die Quantitative RealTime-PCR (qRT-PCR) wurden so gewählt, dass sie nach Möglichkeit nur ein einziges Produkt zuließen, dessen Länge 700bp idealerweise nicht überstieg (<https://www.roche-applied-science.com/pack-insert/3515869a.pdf>). Die Amplifizierung des korrekten Produktes wurde im Anschluß an die qRT-PCR durch Schmelzpunktbestimmung und durch Größenbestimmung mittels einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Es wurden weiterhin für jeden Vergleich cDNAs, die das gewünschte Produkt in einer Verdünnungsreihe enthielten (Kontrollfragmente) und ein Leerwert, in dem nukleasefreies Wasser statt cDNA verwendet wurde, eingesetzt. Als Standard für die Normierung wurde zuvor von allen Proben der Gehalt an β -Aktin bestimmt, der dann bei der Berechnung der KO/WT- ratios rechnerisch berücksichtigt wurde. In der Tabelle 13 sind für alle qRT-PCR-Experimente die Produktgrößen, die ermittelten Schmelztemperaturen der Produkte und Kontrollfragmente, die normierten mittleren KO/WT- ratios (ausgedrückt in \log_2 ratio (KO/WT)- um einen besseren Vergleich mit den Microarray- Daten zu ermöglichen) und die zugehörigen Sdm sowie die Anzahl (n) der Vergleiche aufgeführt.

Tab.13: Ergebnisse der qRT-PCR für die aufgeführten Ephrin- und Eph- Rezeptor-Gene mit unabhängigen cDNAs von mikrodisssektierten somatosensorischen Kortices aus WT und Ephrin A5-KO-Mäusen. T_m- Schmelztemperaturen der Kontrollfragmente und für die Produkte (T_m det.); Anzahl der Peaks in der Schmelztemperaturkurve; Länge der Produkte (bp), mittlere log₂-ratios für alle KO/WT-Vergleiche mit zugehörigen Sdm und Anzahl der Vergleiche (n)

	T _m Kontrollfragment (°C)	T _m det.(°C)	Anzahl T _m - peaks	Länge Produkt (bp)	log ₂ (KO/WT)	Sdm log ₂ (KO/WT)	n
Ephrin A2	93	93	1	236	2,53	0,31	6
EphA5	84	84	1	131	1,21	0,43	4
EphA6	83	83	1	161	0,22	0,19	6
EphA7	85	85	1	147	-0,27	1,02	4
EphB1	88	88	1	276	-0,44	0,42	4
EphB3	89	89	1	118	0,35	0,4	6
EphB4	89	89	1	245	-0,51	0,8	6
EphB6	91	91	1	277	0,8	0,68	6

Für Ephrin A2, EphA5 und EphB6 konnte die höhere Expression im Ephrin A5-KO bestätigt werden. Die in Abb.29 gezeigten Schmelztemperaturkurven haben jeweils ein einziges Maximum, was belegt, dass Kontrollfragmente und amplifizierte PCR-Produkte identisch waren. Die Quantifizierungskurven lassen erkennen, dass jeweils die Fluoreszenzintensität der KO- Proben früher anstieg als die der WT-Proben, was bedeutet, dass die KO- Proben mehr cDNA- Kopien für die entsprechenden Gene enthielten. Die Zunahme der Expression von Ephrin A2 war mit einer ca. 5- fachen Erhöhung wesentlich auffälliger als mittels Microarray- Analyse vorhergesagt. Für EphA5 konnte eine 2,3- fache Steigerung der Expression festgestellt werden, was die Microarray- Daten widerspiegelt und EphB6 war 1,7- fach heraufreguliert, jedoch mit einer breiteren Streuung (Abb.28)

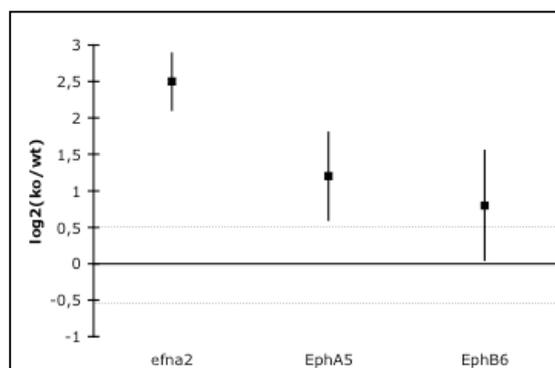


Abb.28: Quantitative RealTime-PCR für Ephrin A2, EphA5 und EphB6, dargestellt als log₂-ratios für KO/WT-Proben (mit Sdm) und auf β -Aktin normalisiert. Efn- Gensymbol für Ephrin; Eph- Gensymbol für Eph-Rezeptor

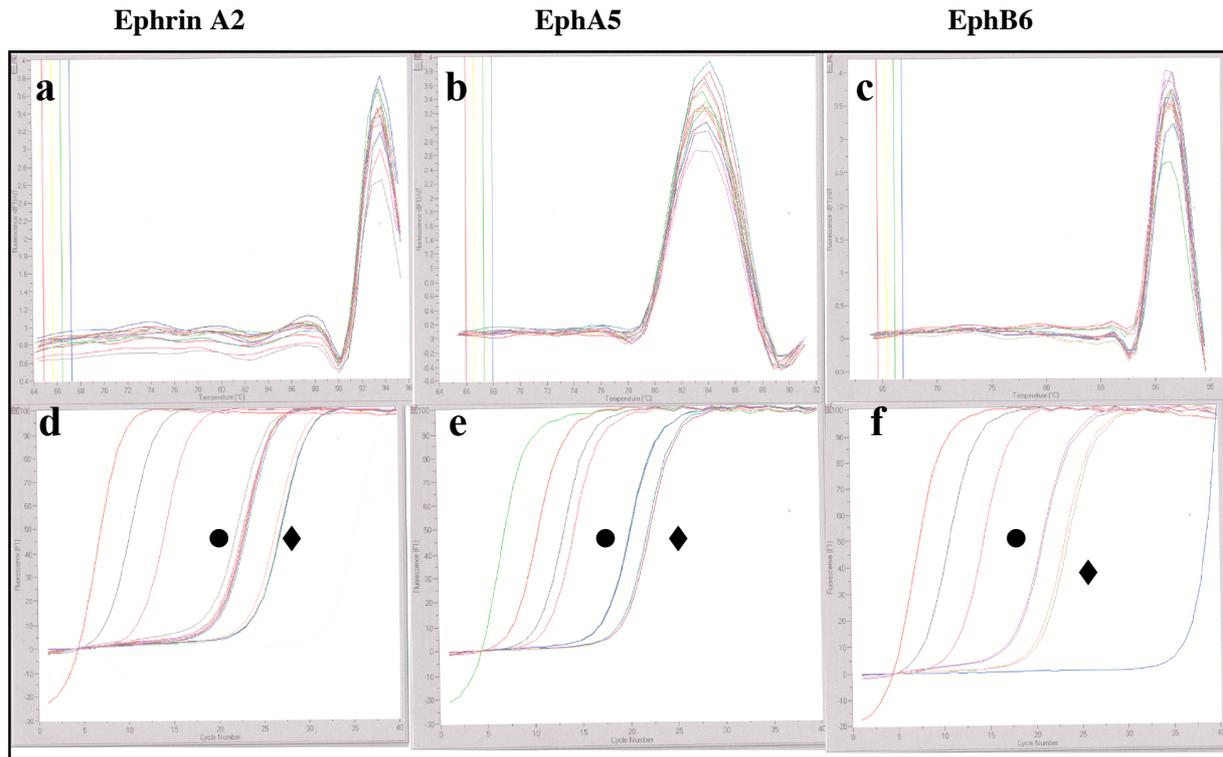


Abb.29: Quantitative RealTime-PCR für Ephrin A2 (a, d), EphA5 (b, e), EphB6 (c, f) mit cDNAs aus WT (◆) und Ephrin A5-KO- (●) S1-Kortex. (a-c): Schmelztemperaturkurven für die PCR-Produkte; Abszisse- T (°C), Ordinate- d(F)/d(T) und (d-f): Quantifizierungskurven in der Reihenfolge: Standard cDNA in Verdünnung 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} und 5^{-3} (in e), KO- cDNA- Proben, WT- cDNA- Proben und Leerwert (in f): Abszisse- Zyklenanzahl, Ordinate- Fluoreszenzintensität.

Semiquantitative *In situ*-Hybridisierung

Die Daten aus der Microarray- Analyse und der qRT-PCR belegen zwar eine erhöhte Expression von Ephrin A2, EphA5 und EphB6 im somatosensorischen Kortex der Ephrin A5- KO-Tiere, geben jedoch keinen Hinweis, ob die Erhöhung generell in allen Schichten, in denen das jeweilige Gen exprimiert wird, erfolgt, oder ob es eine schichtspezifische Regulation der Expression gibt. Um diese Frage zu klären, wurden *In-situ*-Hybridisierungen mit antisense-RNA-Sonden an coronalen Kryostatschnitten von je 4-5 WT- und KO- Gehirnen durchgeführt. Die Kryostatschnitte aus der Region des S1-Kortex von WT und KO- Gehirnen wurden alternierend auf ein und denselben Objektträger aufgebracht, was identische experimentelle Behandlung der Gewebe ermöglichte (identische Hybridisierungs- und Substratlösungen sowie sämtliche Reaktionsbedingungen). Anschließend wurden von den Schnitten skalierbare Schwarz-Weiß-Fotografien angefertigt. Plotprofile über die gesamte Dicke des Kortex mit einer senkrechten Orientierung zur Pia geben den Verlauf der Expressionsintensitäten in der entsprechenden Kortexschicht wieder. Dabei war jedem Pixel auf der Strecke von der Kortexoberfläche zur Weißen Substanz ein Grauwert zugeordnet. Die schließlich für jede verwendete Sonde, alle angefertigten Kryostatschnitte, beide Hemisphären und den jeweiligen Genotyp berechneten mittleren Plotprofile stellen die Expressionsintensitäten, ausgedrückt in Grauwerten, dar.

Stellt man die mittleren Plotprofile einer Sonde für WT- und KO- Gehirne in einem Diagramm dar, erhält man Auskunft über die Verteilung der Signalintensitäten in den jeweiligen Schichten im WT- bzw. KO- Kortex. Die Abbildung 30b zeigt, dass die Expression von EphB6 im S1- Kortex von Ephrin A5- KO- Mäusen generell erhöht war. EphB6 ist in den oberen Schichten 1- 4 und in der Schicht 6 stark und in der Schicht 5 etwas schwächer exprimiert. EphA5 dagegen war nur in der Schicht 5 und in der Subplate stärker im KO- Kortex exprimiert als im WT. Die Stärke des Hybridisierungssignals für EphA5 in der Schicht 2/3 unterschied sich zwischen WT und KO nicht (Abb.30d). Auch die Expression von Ephrin A2 war schichtspezifisch reguliert. Eine erhöhte Signalintensität war in den Schichten 2/3 und in der Subplate zu verzeichnen. Hierbei ist zu bemerken, dass die Expression von Ephrin A2 im WT auf die oberen Schichten 1- 4 begrenzt war, eine Expression in der Subplate jedoch nicht vorkam (Abb.30f). Zur besseren Visualisierung wurden die Schwarz-Weiß-Abbildungen in Osiris unter Verwendung gleicher Skalierungen zu farbkodierten Intensitätsabbildungen umgewandelt. Rot repräsentiert hohe Signalintensitäten, blau bzw. violett niedrige. Die Gegenüberstellungen von korrespondierenden farbkodierten Intensitätsdarstellungen für die einzelnen Gene unterstreichen die Ergebnisse der Plotprofilvergleiche (Abb. 30a, c und e).

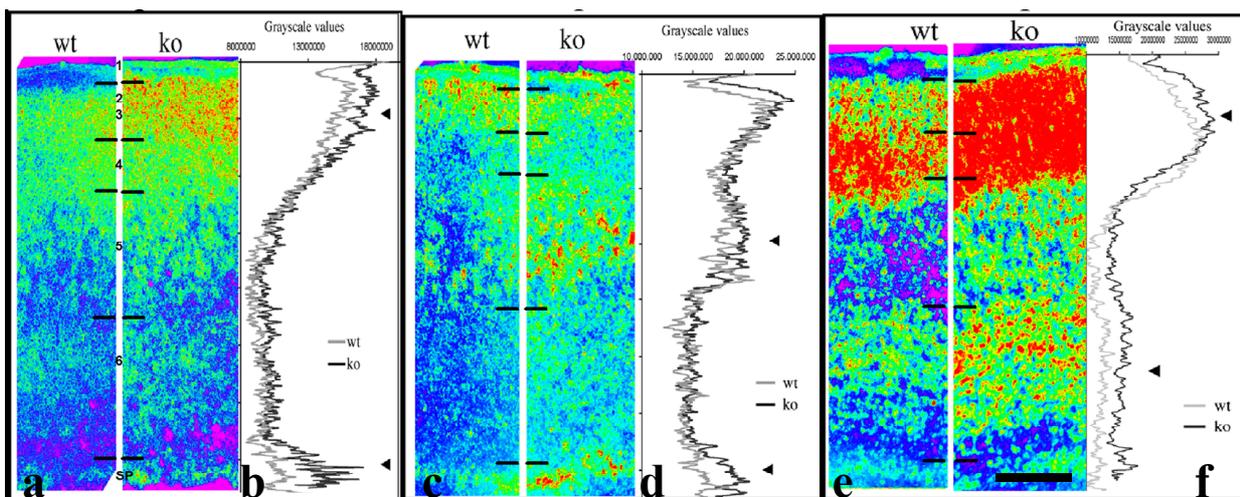


Abb.30: Die Expression von Ephrin A2 (a), EphA5 (b) und EphB6 (c) im somatosensorischen Kortex von WT- und Ephrin A5-KO- Mäusen. Semiquantitative *In-situ*-Hybridisierung an coronalen Kryostatschnitten mit antisense-RNA-Sonden. (b), (d) und (f) zeigen die jeweils dazugehörigen mittleren Intensitätsplotprofile für alle WT- und KO-Profile (n=72-90). Ziffern in (a) bezeichnen die Schichten des Kortex; SP- Subplate. Maßstab 200µm. Skalierung der Pixelintensitäten: niedrig  hoch

3.2.6 Auswahl von Kandidatengenen

Die Auswahl der Gene aus den in den Tabellen und aufgelisteten Genen, die mit weiteren Methoden wie z.B. der qRT-PCR untersucht wurden, erfolgte hinsichtlich Zugehörigkeit zu funktionellen Gruppen, die innerhalb der regulierten Gene signifikant überrepräsentiert waren. Die in der Literatur beschriebene Funktion oder funktionelle Verkettung aber auch die Expressionsstärke, Höhe der

Veränderung und zur Veränderung passende Detektion wurden dabei berücksichtigt. Eine Gruppe der regulierten Gene war beispielsweise mit der Differenzierung von Neuronen assoziiert. Die entsprechenden Gene sind in Tabelle 14 aufgelistet. Etv1, Pax6, Chl1 waren weiteren GO- Termen gemeinsam zugeordnet: Neuronenentwicklung/ Axogenese/ Axonlenkung/ Zellmigration. Nach Literaturrecherche wurden aus den regulierten Genen Etv1, Pax6, Pbx3, CD47, Pak3, L1, Ankyrin 3, Calretinin und Gas5 aufgrund ihrer beschriebenen Funktionen ausgewählt. Von diesen ausgewählten Genen (in der Abb. 49 mit einem Stern gekennzeichnet) kodieren drei für Transkriptionsfaktoren: Pbx3 und Pax6 waren im KO 2-fach herunterreguliert, Etv1 war ungefähr 2-fach heraufreguliert. Diese Gene sind funktionell mit der Entwicklung des Nervensystems assoziiert und wurden im embryonalen Telencephalon nachgewiesen (Di Giacomo et al., 2006, Toresson et al., 2000, Pinson et al., 2005, Nomura et al., 2006, Yoneshima et al., 2006, Hippenmeyer et al., 2005).

Zwei weitere Gene, Pak3 und CD47, sind in die Integrin- vermittelte Signaltransduktion involviert. Beide waren im Ephrin A5-KO höher als im Wildtyp exprimiert. CD47 wird auch als Integrin-Assoziiertes-Protein (IAP) bezeichnet und ist an Integrin- vermittelter Adhäsion beteiligt. Pak3 kodiert für eine Signalkomponente, die sich funktionell stromabwärts von aktivierten Integrinkomplexen (die CD47 enthalten), befindet (Webb et al., 2003). CD47 und Pak3 sind zudem an der Ausbildung neuronaler Fortsätze beteiligt (Miyashita et al., 2004, Chang et al., 1999, Zhang et al., 2005).

Weiterhin waren zwei funktionell ebenfalls eng zusammenhängende Gene –Ankyrin3 (auch als Ankyrin G bezeichnet) und L1 (*close homolog of L1- ChL1*)- heraufreguliert. Während der Entwicklung ist L1 essentiell für das Wachstum und die Lenkung von Neuronen (Hortsch, 2000, Cohen et al., 1998 und Castellani et al., 2000). Ankyrine binden L1-Zelladhäsionsmoleküle, rekrutieren sie zum Axoninitialsegment (Davis et al., 1996, Benett und Baines 2001) und sind an der L1-vermittelten Initiation des Growth Cones beteiligt (Nishimura et al. 2003).

Die Expression von Calretinin war im Ephrin A5-KO 2,5-fach herabgesetzt. Die unterschiedlichen GABA-ergen Neurone unterscheiden sich in ihrem Spektrum an koexprimierten Kalzium- bindenden Proteinen wie Calbindin, Parvalbumin und Calretinin, weshalb diese oft als Marker zur Unterscheidung von Subpopulationen GABA-erger Interneurone dienen (Gonchar und Burkhalter, 1997, 1999, 2003; Gonchar et al. 2001; Kubota und Kawaguchi, 1997). Die Hauptquelle der GABA-ergen Interneurone sind die ganglionischen Eminenzen des embryonalen Telencephalons. Von hier migrieren diese Neurone von E11-E16 unter anderem zum Kortex. Im Abschnitt 3.1.3 wurde beschrieben, dass Ephrin A5 in der Ventrikularzone der ganglionischen Eminenzen bei E14 exprimiert ist. Die Expression folgt einem von medial nach lateral gerichteten Gradienten. Es liegt die Vermutung nahe, dass Ephrin A5 eine Rolle bei der Migration oder Differenzierung dieser Neurone spielen könnte, wenn bei P6, einem Alter in dem die Neurone ihr Ziel, den Kortex, erreicht haben, Calretinin ebendort herabgesetzt ist.

Gas5 ist ein so genanntes Multi-Small-Nucleolar-RNA (snoRNA)-Host Gen, das nicht translatiert wird und als ein Tumorsuppressorgen beschrieben wurde (Coccia et al., 1992, Jin et al., 2002, Smith und Steitz 1998). In Schwannschen Zellen kann durch Axone die Expression von Gas3, einem eng

verwandten Gen, induziert werden (Spreyer et al. 1991). Die Expression von Gas5 war zweifach herabgesetzt.

Tab.14: Regulierte Gene mit GO- Annotationen für Differenzierung von Neuronen. Dargestellt sind die probe set IDs, Gennamen- und -symbole, die mittleren log₂ratios und Standardabweichungen vom Mittelwert für alle KO/WT-Vergleiche sowie die Anzahl der P-calls in den 4 Experimenten.

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	mean log ₂ ratio (KO/WT)	sdm	P-calls
94200_at	gastrulation brain homeobox 2	Gbx2	-2,9	1,5	1
104169_at	zinc finger protein of the cerebellum 1	Zic1	-2,6	0,6	3
92271_at	paired box gene 6	Pax6	-1,1	0,5	3
102259_at	3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide	Ywhag	-0,9	0,4	3
95471_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	Cdkn1c	-0,9	0,4	4
103088_at	cell adhesion molecule with homology to L1CAM	Chl1	0,9	0,5	4
92927_at	ets variant gene 1	Etv1	1,0	0,3	4
93378_at	homeo box C8	Hoxc8	1,0	0,4	1

QRT-PCR für die Kandidatengene

Für die qRT-PCR wurden cDNAs aus unabhängigen RNA-Präparationen verwendet. Die Experimente wurden unter identischen Bedingungen ausgeführt. Für einen besseren Vergleich mit den Microarray-Ergebnissen sind die Quantifizierungen für die jeweiligen Transkripte auf die KO- Proben bezogen und in log₂(KO/WT) ausgedrückt. In der Tabelle 15 sind die ermittelten Schmelztemperaturen für die Kontrollfragmente und Produkte, die Produktgrößen (in bp), die normierten mittleren log₂-ratios für alle KO/WT-Vergleiche, die zugehörige Sdm, die Anzahl der durchgeführten qRT-PCR- Vergleiche (n) und die log₂-ratios für alle KO/WT- Vergleiche aus den Microarray- Experimenten dargestellt. Für vier der 9 untersuchten Gene konnte eine veränderte Expression im Ephrin A5-KO-Kortex, wie sie mit der Microarray- Analyse vorhergesagt wurde, bestätigt werden. Eine Zunahme der Expression um den Faktor 2 wurde für Pak3, CD47 und Etv1 festgestellt. Die Expression von Calretinin verringerte sich um den Faktor 2-3. Allgemein fiel auf, dass die Reproduzierbarkeit sehr hoch war, was in der grafischen Darstellung der qRT-PCR- (ausgefüllte Quadrate) und Microarray- Daten (nicht ausgefüllte Rhomben) in Abbildung 31 zu erkennen ist. Die Resultate der qRT-PCR für die Gene Ankyrin3, Pax6, Pbx3 und Gas5 wiesen allerdings abweichende in der Expressionen von den Microarray- Daten auf. Für zwei Gene, L1 und Ankyrin 3 war eine sehr hohe Varianz dafür verantwortlich, Pax6, Pbx3 und Gas5 zeigten eine den Microarray-Daten entgegengesetzte Tendenz der Expression.

Tab.15: Ergebnisse der qRT-PCR für ausgewählte Gene, die in der Microarray-Analyse eine veränderte Expression im Ephrin A5- KO- Kortex aufwiesen. Tm- Schmelztemperaturen der Kontrollfragmente und für die Produkte (Tm det.); Anzahl der Peaks in der Schmelztemperaturkurve; Länge der Produkte (bp), mittlere log₂-ratios für alle KO/WT- Vergleiche mit zugehörigen Sdm; Anzahl der Vergleiche (n) und log₂-ratios für die KO/WT- Vergleiche aus der Microarray- Analyse.

	Tm Kontrollfragment (°C)	Tm det.(°C)	Anzahl Tm-peaks	Länge Produkt (bp)	log ₂ (KO/WT)	sdm log ₂ (KO/WT)	N	log ₂ (KO/WT) microarray
ank3	88	88	1	437	-0,25	0,85	4	0,6
pax6	80	80	1	147	1,21	0,43	4	-1
Chl1	87	87	2	320	0,9	2,25	4	0,9
pak3	86	86	1	242	1,04	0,52	5	0,96
CD47	85	85	1	316	0,91	0,53	4	0,86
pbx3	89	89	1	370	0,8	0,2	4	-1
gas5	87	87	1	233	1,28	1,12	3	-0,95
etv1	87	87	1	182	1	0,79	5	0,95
Cr	90	90	1	544	-1,34	0,7	6	-1,5

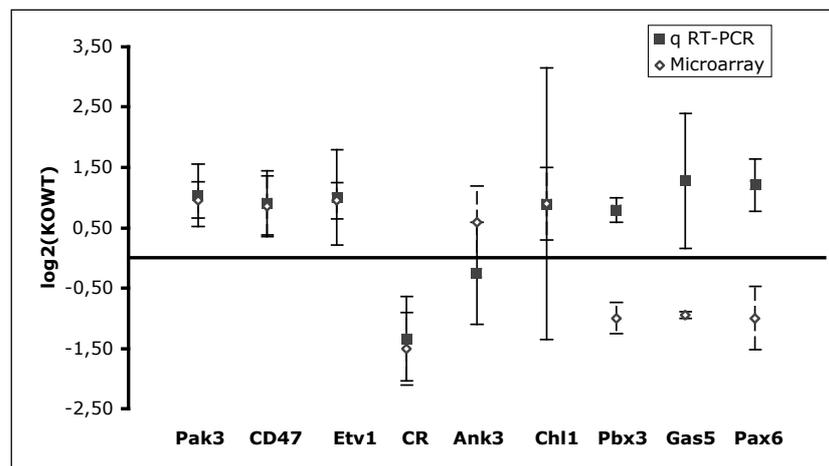


Abb.31: Differentielle Expression von ausgewählten Transkripten, ermittelt durch Microarray- Analyse bzw. quantitative RealTime-PCR. Es sind die Mittelwerte von log₂(KO/WT) und die zugehörigen Standardabweichungen um den Mittelwert (Sdm) angegeben.

Aus den Quantifizierungskurven für Pak3, CD47, Etv1 in Abbildung 32 ist ersichtlich, dass die Zunahme der Fluoreszenzintensität für die KO- Proben mindestens zwei Zyklen früher die lineare Phase erreicht als für WT- Proben. Das bedeutet, in den KO- Proben befand sich mehr cDNA für das entsprechende Transkript. Für die Quantifizierungskurven von Calretinin verhält es sich genau umgekehrt, hier erreicht der Fluoreszenzanstieg der WT- Proben früher die lineare Phase als bei den KO- Proben. Demnach ist in den KO- Proben weniger transkribierte cDNA für Calretinin vorhanden. Die Schmelztemperaturkurven in allen Experimenten weisen für jedes Gen nur ein Maximum auf. Das bedeutet, die amplifizierten Produkte stimmen mit den Kontrollfragmenten überein.

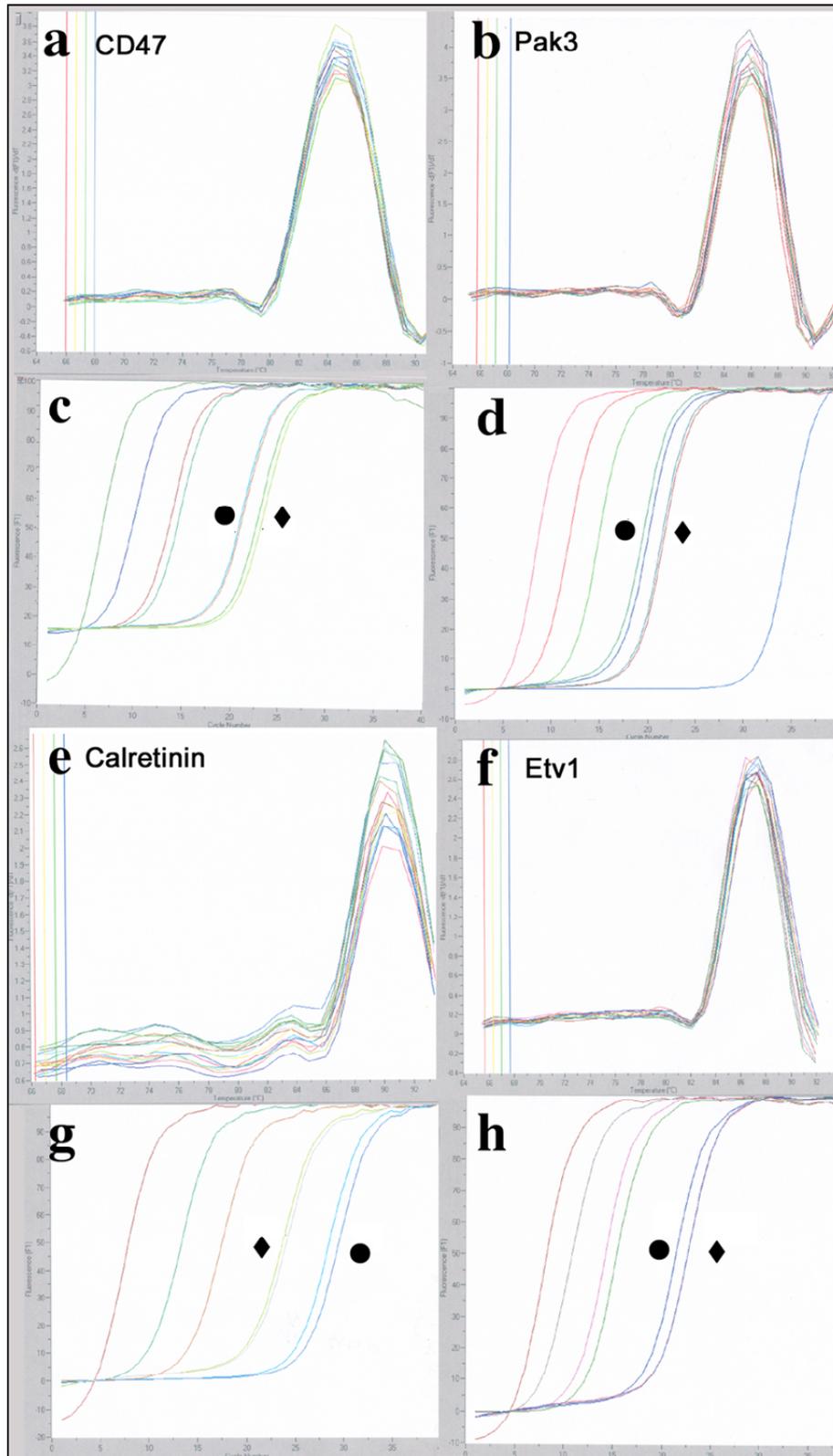


Abb.32: Quantitative RealTime-PCR für CD47 (a, c), Pak3 (b, d), Calretinin (e, g), Etv1 (f, h) mit cDNAs aus WT (◆) und Ephrin A5-KO- (●) S1-Kortex. (a, b, e, f): Schmelztemperaturkurven für die PCR-Produkte; Abszisse- T (°C), Ordinate- d(F)/d(T) und (c, d, g, h): Quantifizierungskurven in der Reihenfolge Standard cDNA in Verdünnung 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} und 5^{-3} (in c und h), KO-cDNA- Proben, WT-cDNA- Proben und Leerwert (in d): Abszisse- Zyklanzahl, Ordinate- Fluoreszenzintensität.

3.2.7 Sondendesign und Lokalisierung der mRNA-Expression im Kortex mittels nicht radioaktiver *In situ*-Hybridisierung an 6 Tage alten Mäusen

Für die Klonierung von spezifischen Sequenzfragmenten aus den kodierenden Regionen der Gene für CD47, Pak3, Etv1 und Calretinin wurde die jeweilige cDNA durch reverse Transkription aus gesamt-RNA mit genspezifischen Primern (Tab.1) hergestellt. Um eine spezifische Hybridisierung der hieraus herzustellenden antisense-RNA-Sonden zu überprüfen, wurde ein Sequenzvergleich in BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) durchgeführt, dabei sind keine zusätzlichen Sequenzähnlichkeiten, die zu unspezifischer Hybridisierung der Sonden führen können, ermittelt worden. Die aufgereinigten cDNA-Fragmente wurden in den TOPO⁺-PCR⁻4-Vektor (Invitrogen) kloniert, in *E.coli* (OneShotTOP10 von Invitrogen) transfiziert und amplifiziert. Der TOPO-PCR-4-Vektor enthält an beiden flankierenden Seiten der TOPO⁺-Cloning⁺ site Bindesequenzen für die Restriktionsendonuklease EcoR1. Diese wurde im Anschluß an die Amplifikation für einen Testverdau der isolierten Vektoren verwendet. Die resultierenden Fragmentgrößen sind: 182bp für Etv1, 242bp für Pak3, 316bp für CD47 und 544bp für Calretinin (Die tatsächlichen Größen der Fragmente sind ca. 10bp länger, diese befinden sich beidseitig zwischen Insert und EcoR1-Bindestelle.) (Abb.33). Weiterhin wurden die Konstrukte sequenziert (MWG), um die korrekte Ligation abzusichern und die Orientierung des Inserts festzustellen. Im Anhang sind die Alignments der jeweiligen Sequenzierergebnisse mit den Referenz-Sequenzen dargestellt. Sämtliche Überprüfungen belegten eine erfolgreiche Klonierung der gewünschten Genfragmente. Es waren folgende Sequenzbereiche durch die Fragmente abgedeckt (vom Startpunkt der kodierenden Sequenz an): Etv1 488-670; Pak3 1546-1787; CD47 237-553 und Calretinin 525-1069. Die so hergestellten Konstrukte wurden für die *In vitro*-Transkription von antisense- und sense-RNA-Sonden eingesetzt.

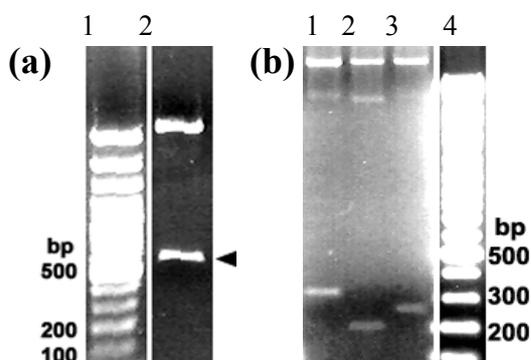


Abb.33: Gelelektrophoretische Auftrennung der mit EcoR1 geschnittenen Konstrukte, die Inserts mit Genfragmenten aus (a) Calretinin, (b) CD47, Etv1 und Pak3 (in dieser Reihenfolge) enthielten. Erwartete Fragmentgrößen: (a) 544bp, (b) 316bp, 182bp und 242bp. Die Spur 1 bzw. 4 enthält einen DNA-Längenstandard; einige Fragmentgrößen sind nebenstehend in bp angegeben. Die oberen Banden in Spur (a)1 und (b)1-3 enthalten die linearisierten Vektoren, in (b) 1 und 2 ist jeweils darunter noch eine Bande, die den restlichen ungeschnittenen Vektor enthält, zu erkennen.

Bei der *In-situ*-Hybridisierung zeigten alle Gene eine starke Expression im somatosensorischen Kortex bei P6 (Abb.34). Pak3 und CD47 waren in hohem Maße schichtübergreifend exprimiert. Während CD47 bis auf die obere Schicht 5 in allen Schichten der untersuchten Region exprimiert war, konnte Pak3- mRNA in den oberen Schichten 1-4 und in der Schicht 5 nachgewiesen werden. Schicht 6 exprimierte ebenfalls Pak3, jedoch in geringerem Maße. Die Expression von Etv1 war dagegen schichtspezifischer. Etv1 war ausschließlich in der Schicht 5 exprimiert. Ebenfalls eine schichtspezifische Expression wurde für Calretinin nachgewiesen. Zellen der oberen Schicht 5 zeigten eine starke Expression. Diese war für die Neurone aus der Schicht 5 auf den somatosensorischen Kortex beschränkt, was Sagittalschnitte belegten. Weiterhin war Calretinin in horizontal orientierten Zellen der Schicht 1 exprimiert (hierbei handelt es sich vermutlich um Cajal-Retzius-Zellen) und in einzelnen Zellen der Schicht 2/3.

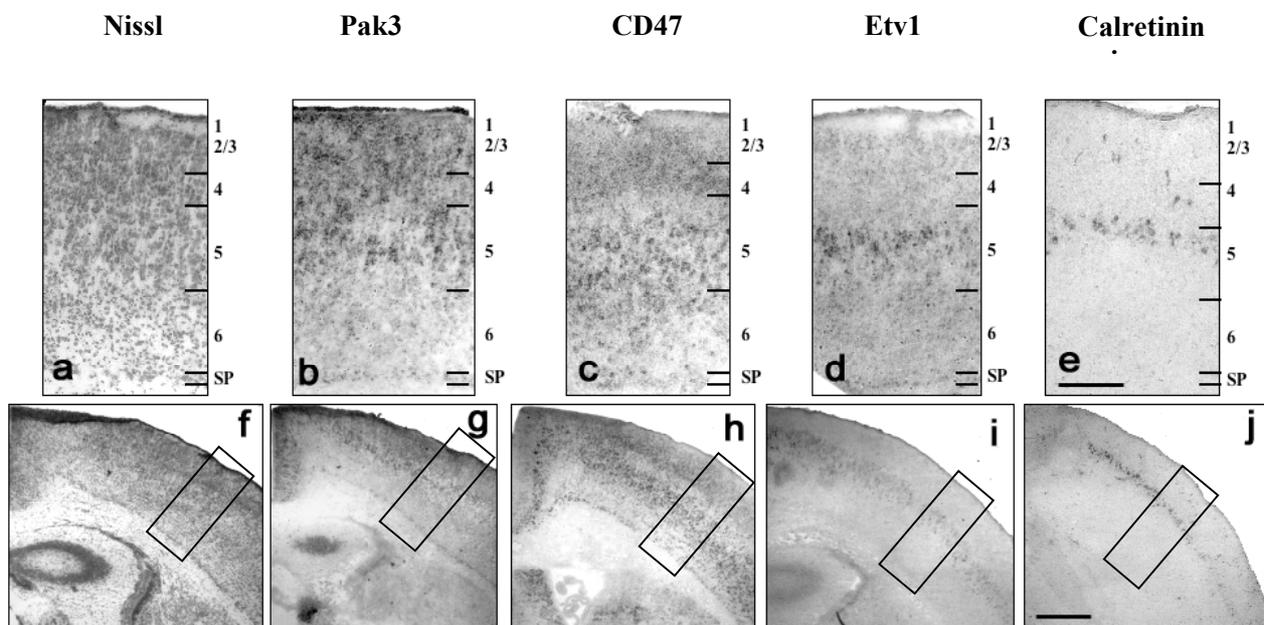


Abb.34: Die Expression von Pak3 (**b, g**), CD47 (**c, h**), Etv1 (**d, i**) und Calretinin (**e, j**) im somatosensorischen Kortex bei P6. *In-situ*-Hybridisierungen an coronalen Kryostatschnitten mit DIG-markierten antisense-RNA-Sonden. (**a, f**) korrespondierende Nissl-Färbungen; (**a-e**): Vergrößerungen der in (**f-j**) markierten Areale. Maßstab (a-e) 200 μ m und (f-j) 500 μ m.

Das Expressionsmuster für alle diese Gene änderte sich im Ephrin-A5-knockout-Gewebe nicht, was *In-situ*-Hybridisierungen an coronalen Gehirnschnitten von Ephrin-A5- KO- Tieren zeigten (Abb.35).

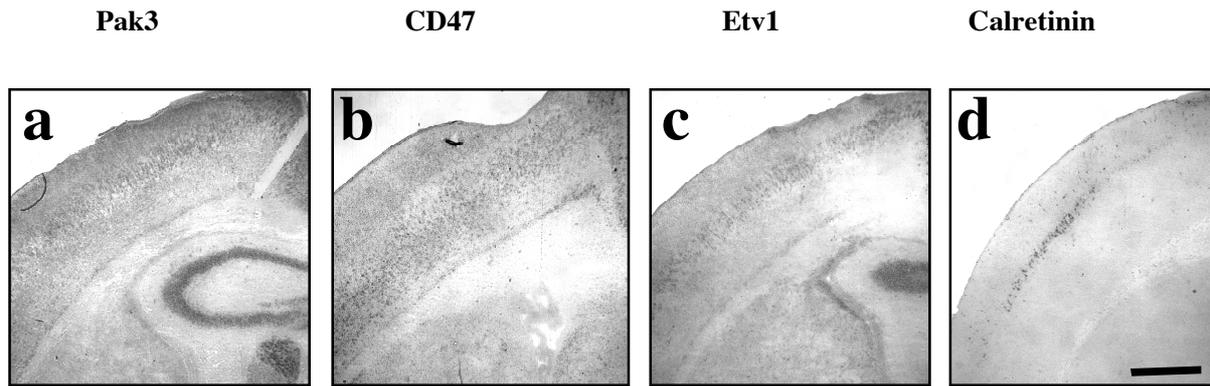
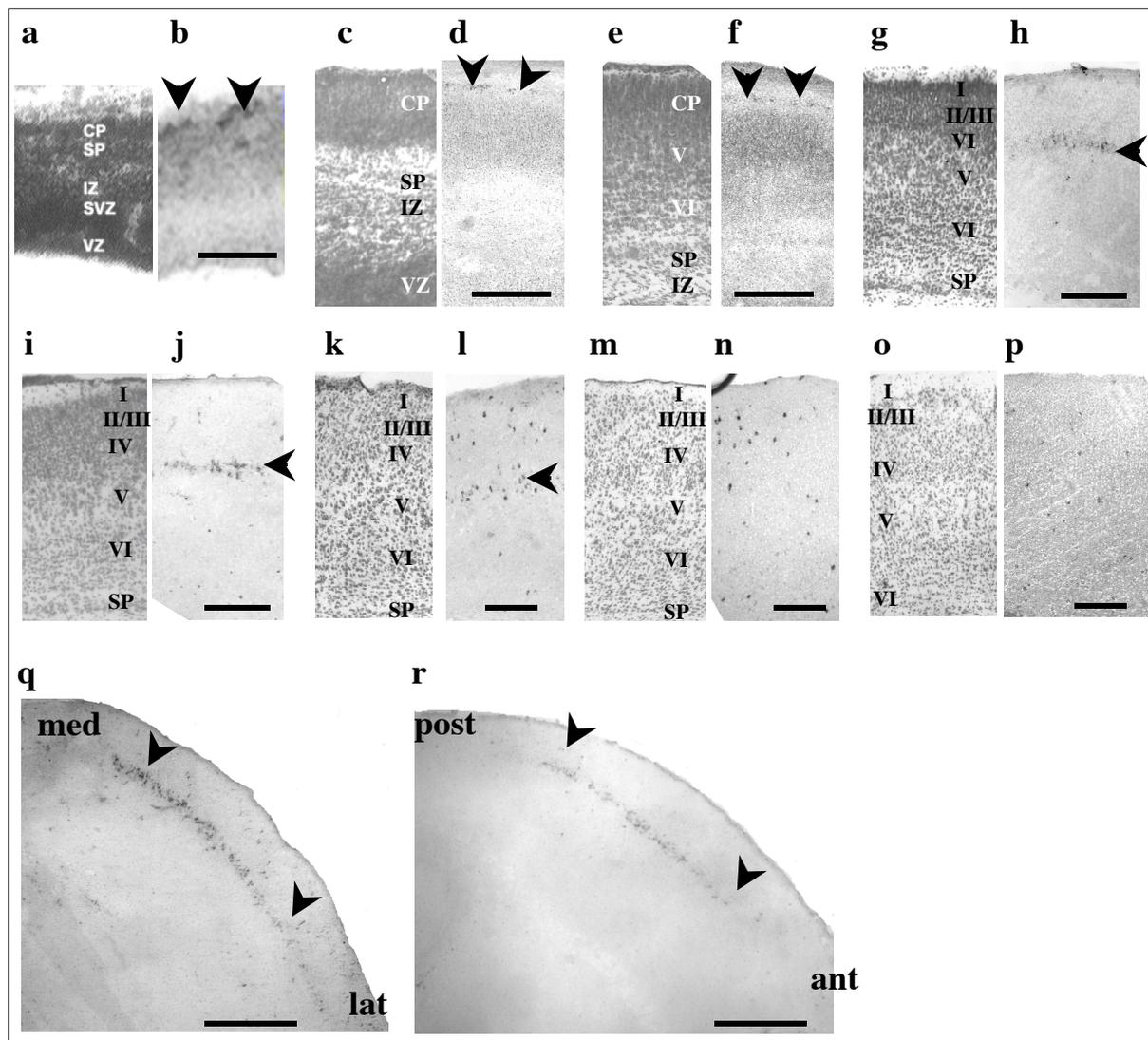


Abb.35: Die Expression von Pak3 (a), CD47 (b), Etv1(c) und Calretinin (d) im somatosensorischen Kortex bei Ephrin A5-KO-Mäusen. *In situ*-Hybridisierungen an coronalen Kryostatschnitten mit DIG- markierten antisense-RNA- Sonden. Die Lokalisation der Expression unterscheidet sich nicht von der bei WT-Mäusen. Maßstab 500µm.

3.2.8 Charakterisierung der Calretinin- exprimierenden Neurone

Calretinin (Cr) wird häufig als ein Marker für Subpopulationen GABA-erger Interneurone verwendet. In keiner dieser Studien wurde bisher eine Expression in Pyramidenzellen beschrieben. Die starke Expression in Pyramidenzellen der Schicht 5 war daher überraschend. Wie aus den Gegenüberstellungen von *In situ*-Hybridisierungen an coronalen und sagittalen Kryostatschnitten bei P6 hervorgeht, ist die Expression von Cr in diesen Zellen auf den somatosensorischen Kortex begrenzt. Da die meisten Studien zur Lokalisation von Cr jedoch nicht mit so jungen Tieren (<1 Woche alt) durchgeführt worden sind, folgte eine zeitliche Analyse der Expression von Cr im parietalen Kortex an coronalen Kryostatschnitten der Alterstufen E14, E18, P0, P4, P6, P12, P18 und adult. Hierbei stellte sich heraus, dass Cr transient von P4 bis P12 in Pyramidenzellen des somatosensorischen Kortex exprimiert wird. Von E14 bis P0 ist Cr hauptsächlich in horizontal orientierten Zellen der Schicht 1 nachzuweisen. Ab P6 exprimierten Zellen der Schichten 2/3 Cr. Ab P12 sind auch in den Schichten 4 und 6 Zellen, die Cr- mRNA enthalten, nachgewiesen wurden. Der Anteil nimmt bis P18 zu, es ist jedoch keine Expression mehr in Pyramidenzellen der Schicht 5 zu erkennen. Im adulten Kortex sind vereinzelt Zellen in allen Schichten markiert (Abb.36).

Abb.36: Die Expression von Calretinin (Cr) im parietalen embryonalen bzw. im somatosensorischen Kortex von WT-Mäusen. *In situ*-Hybridisierungen an coronalen (bis auf (r): sagittal) Kryostatschnitten der Alterstufen E14 (a), E18 (c), P0 (e), P4 (g), P6 (i, q, r), P12 (k), P18 (m) und adult (o) mit antisense-RNA-Sonden ; (b, d, f, h, j, l, n, p) : zu (a, c, e, g, i, k, m, o) korrespondierende Nissl- Färbungen; die Pfeile markieren in (a, c, e) Cr-exprimierende, horizontal orientierte Zellen in Schicht 1, in (g, i, k, q,r) Cr- exprimierende Zellen in Schicht 5; Römische Ziffern I-VI- die Schichten des Kortex; CP- kortikale Platte; IZ- Intermediärzone; SVZ- Subventrikularzone; VZ- Ventrikularzone; SP- Subplatte; med- medial; lat- lateral; post- posterior; ant- anterior; Maßstab (a,b) 50µm; (c-f) 100µm; (g,h) 150µm, (i-l) 200µm; (m,n) 250µm; (o,p) 400µm; (q,r) 500µm.



Immunhistochemie

Zur Bestätigung der Expressionsdaten aus der *In-situ*-Hybridisierung, aber auch um die Expression auf Proteinebene zu untersuchen und die Morphologie der Cr-positiven Zellen besser beschreiben zu können, wurden Immunfärbungen von Ephrin A5-KO- und WT Gehirnen angefertigt. Dabei wurden die Zellen der oberen Kortexschicht 5 ebenfalls angefärbt. Die Detailaufnahmen zeigen deutlich die pyramidenartige Form und häufig einen apikalen Fortsatz (den apikalen Dendriten), was die Vermutung, es handelte sich um Pyramidenzellen, unterstützt. Charakteristisch für die markierten Zellen war, dass sie sich genau an der Grenze zur Schicht 4 befanden und ihre apikalen Dendriten in die Interkolumnen der Barrels in der Schicht 4 hineinragten. Größtenteils handelte es sich bei den markierten Zellen um eine Zellreihe, bestehend aus benachbarten und versetzt angeordneten Zellen (siehe hierzu Abb.38). Auch in der Schicht 1 und in den Schichten 2/3 und 4 wurden Zellen markiert. Die Zellen in der Schicht 1 waren wie in der *In-situ*-Hybridisierung beschrieben, horizontal orientiert. Diese Zellen ließen sich am besten durch eine DAB-Immunfärbung darstellen (Abb.37). Die Zellen in Schicht 2/3 waren kleiner als die markierten Zellen in Schicht 5 und hatten vereinzelt einen apikalen

Fortsatz (Abb.37). In Schicht 4 wurden vereinzelt kleinere, vertikal orientierte Zellen von langgestreckter Form markiert, die einen basalen und einen apikalen Fortsatz hatten. Ihre Morphologie ähnelt migrierenden Zellen (Abb.38c).

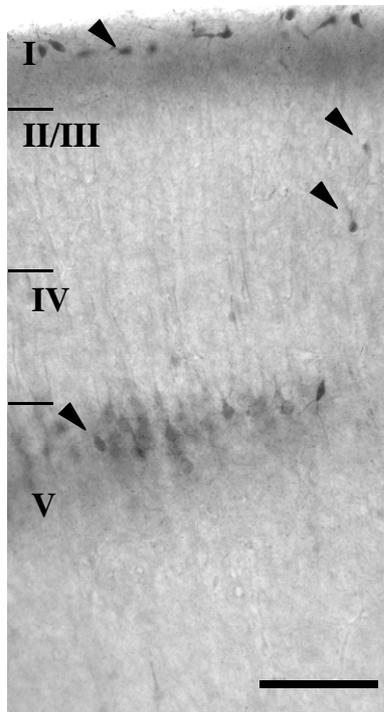


Abb.37: Nachweis von Calretinin (Cr) im somatosensorischen Kortex der Maus bei P6. Gezeigt ist ein Ausschnitt vom Kortex. DAB-Immunfärbung unter Verwendung von polyklonalem anti-Cr-Antikörper aus dem Kaninchen als Primärantikörper an einem coronalen Vibratonschnitt. Die Pfeile markieren hauptsächlich horizontal orientierte Cr-positive Zellen in Schicht 1, zwei Cr-positive Zellen in Schicht 2/3 und eine Zellreihe von immungefärbten Zellen in der oberen Schicht 5. Römische Ziffern bezeichnen die Schichten des Kortex (1-5), Maßstab 100 μ m.

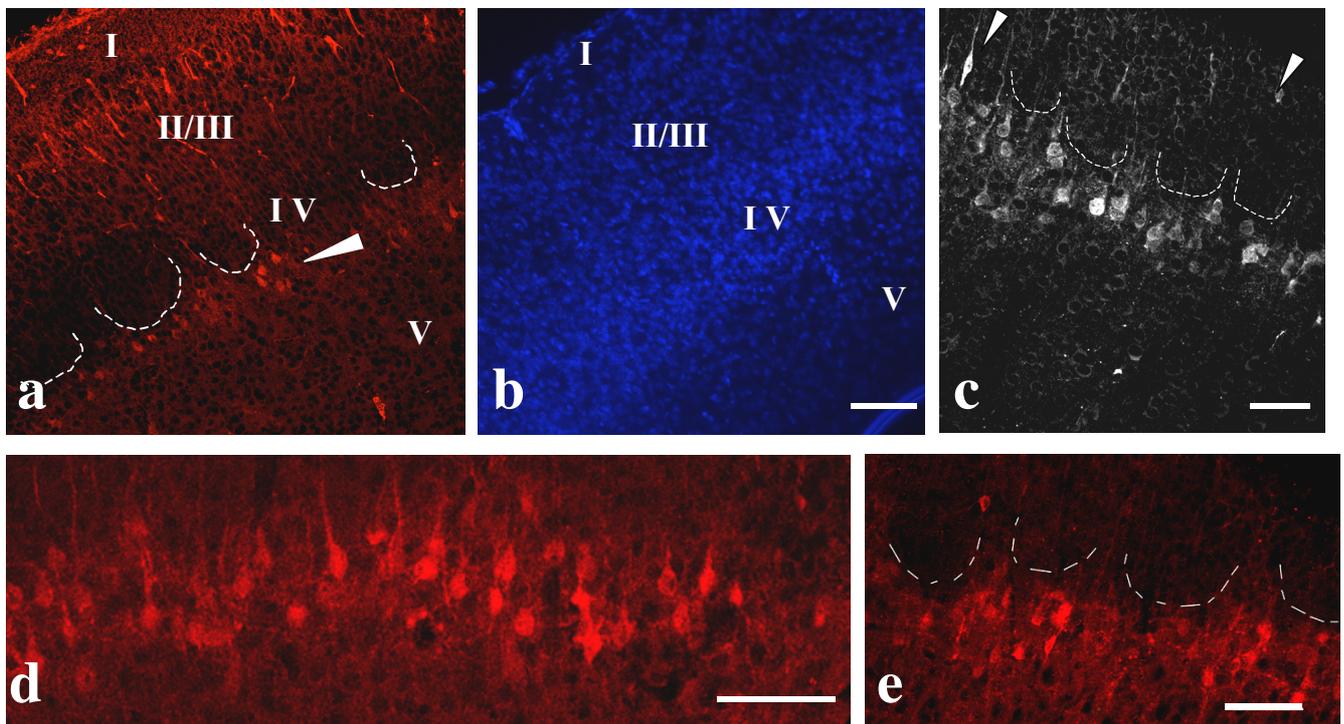


Abb.38: Nachweis von Calretinin (Cr) im somatosensorischen Kortex der Maus bei P6. Fluoreszenz-Immunfärbung unter Verwendung von monoklonalem anti-Cr-Antikörper als Primärantikörper und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper an coronalen Vibratonschnitten. Konfokale Fluoreszenzaufnahmen mit (a),(b) 20-facher Vergrößerung, (c),(d) 40-facher Vergrößerung, (b) Dapi-Färbung: die Pfeile markieren in (a) Cr-positive Zellen in Schicht 5, in (c) Cr-positive Zellen in Schicht 4, in (a),(c) und (e) sind die Begrenzungen der Barrels der angrenzenden Schicht 4 durch weiße unterbrochene Linien angedeutet. Römische Ziffern bezeichnen die Schichten des Kortex (1-5), Maßstab (a),(b) 100 μ m, (c)-(e) 50 μ m.

Das Markierungsmuster zwischen WT und KO- Tieren unterschied sich nicht. Auch die Anzahl der markierten Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und Ephrin-A5-KO (Abb.39). Es wurden für beide Genotypen (WT bzw. KO) je 4 coronale Vibratomschnitte von 4 Gehirnen untersucht.

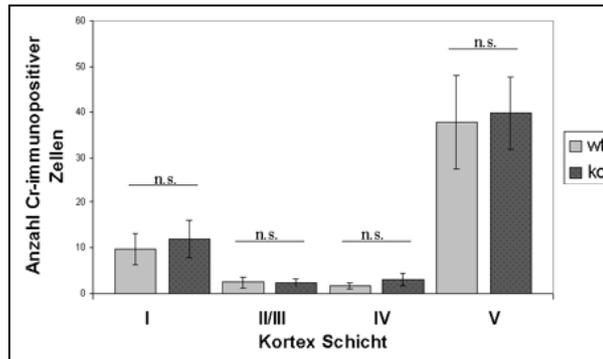


Abb.39: Anzahl der immunopositiver Zellen für Calretinin im somatosensorischen Kortex von WT und Ephrin A5-KO-Mäusen bei P6 in den Schichten I-V (in Schicht VI wurde Calretinin weder in WT noch KO- Tieren zum Zeitpunkt P6 nachgewiesen werden). n.s.- nicht signifikant.

3.2.9 Western Blot-Analyse

Die Ergebnisse von Immunoblots bestätigen die Vermutung, dass die Zellen der Ephrin A5- knockout –Tiere im somatosensorischen Kortex weniger Cr produzieren. Es wurde jeweils lysiertes Material aus mikrodisektierten somatosensorischen Kortices von WT- und KO- Tieren untersucht (n=8 für WT bzw. 11 für KO). In der Abb.40 ist auf dem Western- Blot erkennbar, dass die Intensität der Bande der KO- Probe schwächer als die der WT- Proben ist (d.h., sie enthält weniger Cr). Zur Quantifizierung wurden Schwarz-Weiß-Fotografien erstellt und die Intensitäten in Grauwerten kodiert ausgewertet. Für die statistische Auswertung wurden die Intensitäten der einzelnen Banden auf den Gesamtproteingehalt normalisiert, der aus einer vor der Antikörperinkubation angefertigten Ponceau-Färbung bestimmt wurde. Der auf diese Weise bestimmte Gehalt an Cr war in den KO- Proben um ca. 40-50% geringer als in den WT- Proben, was die Microarray- und qRT-PCR-Analysen unterstützt (siehe hierzu Abb. 40).

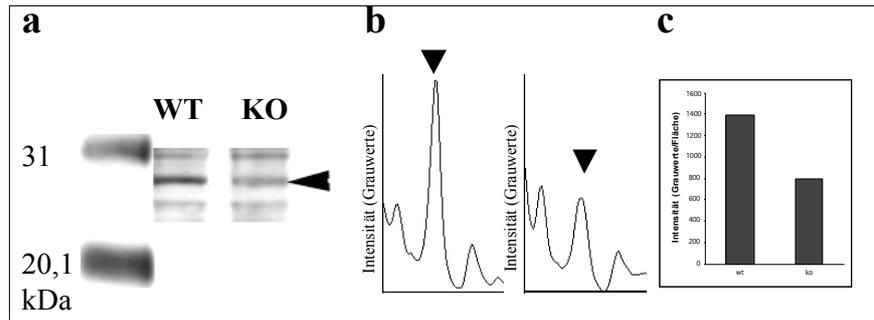


Abb.40: Western Blot von lysiertem Material aus mikrodissektierten somatosensorischen Kortexen von WT- (n=8) und Ephrin A5-KO-Mäusen (n=11) mit einem monoklonalen anti- Calretinin (Cr) -Antikörper. **(a)** Die Spuren enthalten Protein- Größenmarker, WT und KO-Proben, die durch den Pfeil markierte Bande entspricht dem 29kDa großen Cr; **(b)** Plotprofile für die in (a) dargestellten WT- und KO -Spuren; dargestellt in Grauwerten je Pixel, die Peaks für die Cr- Banden sind markiert; **(c)** Quantifizierung der Cr-Banden der WT- und KO- Proben nach Normalisierung auf den Gesamtproteingehalt, dargestellt in Intensität je Fläche, die KO- Probe zeigt einen Rückgang auf 55% der Intensität der WT- Probe.

3.2.10 Retrogrades Tracing

Zur weiteren Charakterisierung der transient Cr exprimierenden Pyramidenzellen im somatosensorischen Kortex wurde retrogrades Tracing *in vivo* in Kombination mit Immunhistochemie angewandt. Ziel war es, die Projektionsgebiete der Cr-positiven Neurone der Schicht 5a zu identifizieren. Lipophile Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. DiA (Dialkylaminosteryl), werden, nachdem sie in eine Region im Gehirn injiziert wurden, *in vivo* durch aktiven vesikulären Transport zum Zellkörper und in fixiertem Gewebe durch laterale Diffusion in der Membran entlang des Axons, transportiert (Honig und Hume 1986, Godement et al., 1987, Kuffler 1990). Auf diese Weise lassen sich die in das injizierte Areal projizierenden Neurone retrograd anfärben. Hierzu wurden an je 3 durch Hypothermie betäubten Tieren DiA- Injektionen in mögliche Projektionsgebiete der Cr-positiven Neurone vorgenommen. Die Injektionen erfolgten am 4. Postnataltag. An P6 wurden die Gehirne präpariert, in Low-Melt-Agarose eingebettet und an Vibratomschnitten wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit monoklonalen anti-Cr-Antikörpern und Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern angefertigt.

Um die kortikothalamischen Projektionsneurone anzufärben, wurde DiA in den dorsalen Thalamus injiziert. An P6 waren ca. 20% der Cr-positiven Zellen auch durch DiA angefärbt. Das bedeutet, eine Subpopulation Cr-positiven Projektionsneurone der Schicht 5a projiziert in den dorsalen Thalamus (Abb.42).

Die kontralateralen kortikalen Projektionen wurden durch Injektion in den somatosensorischen Kortex angefärbt. Es konnten keine Doppelmarkierungen für Cy3/DiA im kontralateralen Kortex gefunden werden (Abb.41b und c). Injektionen in den spinalen Trakt der Halswirbelsäule sollten die Neurone markieren, die zum Rückenmark projizieren. Die DiA-markierten Neurone befanden sich hauptsächlich in der tieferen Schicht 5, es wurde keine Kolo-kalisation von Cy3 und DiA beobachtet.

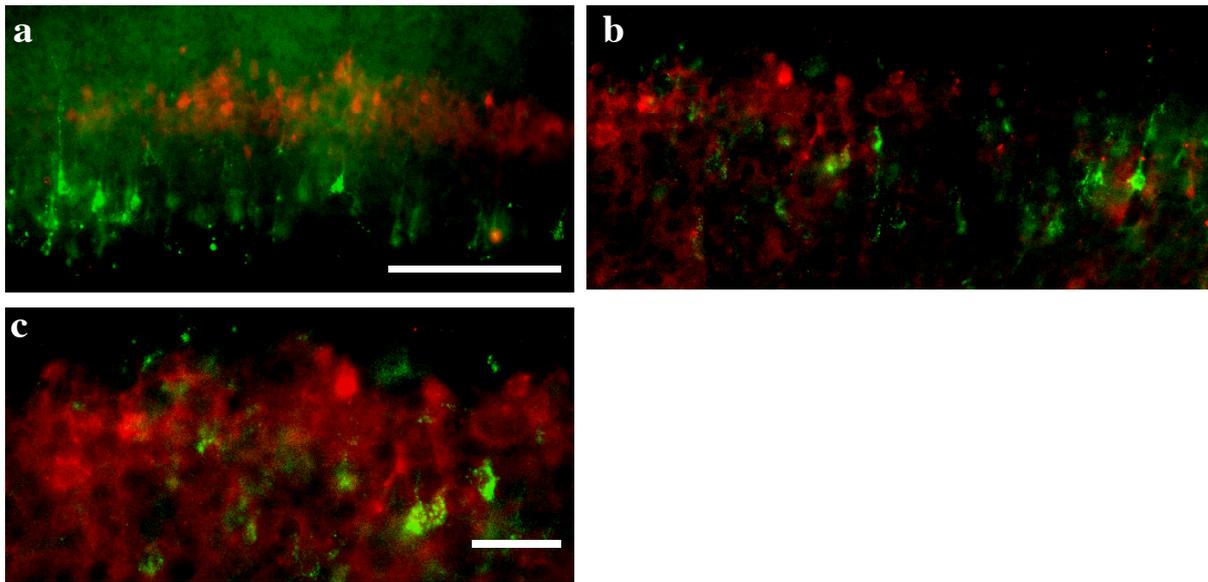


Abb.41: Retrograd angefärbte (DiA- grün) (a) kortikospinale Projektionsneurone bzw. (b) und (c) kortikokortikale Projektionsneurone in Schicht 5 und Calretinin -immunopositive Neurone (Cy3-rot) in der Schicht 5 sind nicht identisch. Maßstab (a), (b) 100 μ m, (c) 50 μ m.

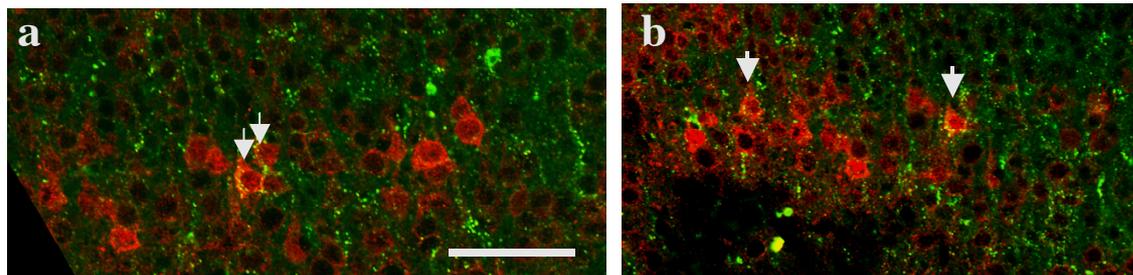


Abb.42: (a) und (b) Retrograd angefärbte (DiA- grün) thalamokortikale Projektionsneurone und Calretinin -immunopositive Neurone (Cy3-rot) in der Schicht 5 zeigen teilweise Übereinstimmungen, erkennbar an der Kolokalisation (siehe Pfeile) von grüner (DiA) und roter (Cy3) Markierung. Maßstab 50 μ m.

4. Diskussion

Die Eph-Rezeptoren und ihre Liganden, die Ephrine, sind an wesentlichen Prozessen während der Ausbildung des neuronalen Netzwerkes im Gehirn beteiligt. Im thalamokortikalen System ermöglichen sie ein interareales *Mapping* der Axone auf dem Niveau des ventralen Telencephalons, regulieren aber auch die Topografie der thalamischen Projektionen innerhalb eines Areals (Dufour et al., 2003, Vanderhaeghen et al., 2000). Funktionell unterschiedliche thalamische Eingänge können über die Expression von beispielsweise Ephrin A5 im S1-Kortex segregiert werden (Uziel et al., 2002). Dieser Effekt beruht auf der unterschiedlichen Wirkung von Ephrin A5 auf Axone des limbischen Thalamus (hier wirkt der Ligand repulsiv) und auf Axone des somatosensorischen Thalamus (diese Axone werden dagegen nicht am Einwachsen gehindert) (Gao et al., 1998, Mann et al., 2002). Innerhalb eines kortikalen Areals wiederum sind die Eph-Rezeptoren und Ephrine an der auf attraktiven und repulsiven Mechanismen beruhenden schichtspezifischen Projektion thalamischer Eingänge sowie intrakortikaler Schaltkreise beteiligt (Castellani et al., 1998, Mann et al., 2002). Bisher wurden allerdings wenige Vertreter dieser Genfamilie auf ihre Expression in ausgewählten Entwicklungsstadien und auf ihre Funktion hin untersucht. Ein direkter Vergleich der bekannten Expressionsmuster war aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Techniken (radioaktive bzw. nicht-radioaktive Markierung von Sonden), verschiedener Inzuchtstämme und fehlender Information über Kreuzhybridisierungen der Sonden innerhalb der Genfamilie bzw. über die Markierungseffizienz der antisense-RNA-Sonden, schwierig. Zudem können im Ephrin/Eph-System auch aktivierte Liganden über *Reverse Signaling* eine Signaltransduktion bewirken (Murai und Pasquale 2003). Folglich reicht es nicht aus, nur die Expression und Funktion von Rezeptoren am Herkunftsort bzw. die Liganden am Projektionsziel von thalamischen oder kortikalen Neuronen im Sinne des *Forward Signaling* zu betrachten. Es ist also unerlässlich, bei der Untersuchung der Funktion dieser Genprodukte auf einen vollständigen Überblick über alle Mitglieder der Ephrin/Eph- Genfamilie im gewählten Modell zurückgreifen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Ephrine und Eph-Rezeptoren von E14 bis P6 am Modell des somatosensorischen Systems von C57/BL6-Mäusen mit Sonden bekannter Markierungseffizienz und getesteter Kreuzhybridisierungen untersucht. Im Verlauf der Entwicklung waren im somatosensorischen System 7 Ephrin- Liganden und 11 Eph-Rezeptoren exprimiert; darunter 4 A-Ephrine und 6 EphA-Rezeptoren sowie alle B-Ephrine und EphB-Rezeptoren. Für einige Liganden und Rezeptoren war die mRNA sowohl im Thalamus als auch im somatosensorischen Kortex entweder transient oder erst zu späteren Entwicklungsstadien nachweisbar. Zusammenfassend ergibt sich aus dem Expressionsspektrum ein „Ephrinkode“ für den dorsalen Thalamus und den parietalen Kortex, bestehend aus frühen, späten und kontinuierlich exprimierten Ephrinen und Eph-Rezeptoren.

Obwohl die Funktion der Ephrine und ihrer Rezeptoren für die Ausbildung der neuronalen Konnektivität essentiell ist, sind die Auswirkungen des Knockouts eines einzigen Gens dieser Familie im Vergleich zu Doppel- oder Mehrfach-KOs oftmals subtil. In dieser Arbeit wurden weiterhin die Konsequenzen des funktionellen Knockouts von Ephrin A5 auf die Genexpression am Modell des somatosensorischen Systems untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass der Ephrin A5- KO eine differentielle Expression von Gengruppen, die funktionell unter anderem mit der Entwicklung des Nervensystems assoziiert sind, hervorruft. Innerhalb des Ephrin/Eph-Rezeptor-Systems waren drei Gene- Ephrin A2, EphA5 und EphB6 heraufreguliert. Die differentielle Expression von Ephrin A2 und EphA5 erfolgte schichtspezifisch und könnte das Fehlen des Liganden Ephrin A5 kompensieren. EphB6 war generell höher exprimiert, was ebenfalls eine Kompensation des Ephrin A5-KO bewirken könnte. Die Expressionsanalyse gab zudem Hinweise, dass eine Wechselwirkung zwischen Integrin-vermittelter Signaltransduktion und Ephrin/Eph-Rezeptor- induzierten Signalwegen existiert. Weiterhin deuten die differentielle Expression von Etv1 und Calretinin (Cr) auf Veränderungen im funktionellen Reifungsprozess des kortikalen Netzwerkes hin. In der vorgelegten Arbeit wird in diesem Zusammenhang erstmalig beschrieben, dass Cr während der Ausbildung der neuronalen Verknüpfungen transient von Projektionsneuronen in der Schicht 5a des S1-Kortex exprimiert wird.

4.1 Ephrine und Eph-Rezeptoren sind entwicklungs-, schicht- und kernspezifisch im somatosensorischen System exprimiert

4.1.1 Entwicklungsspezifische Expressionsdynamik im somatosensorischen Kortex

Das komplette Expressionsscreening über verschiedene Entwicklungsstadien verdeutlichte, dass Ephrine und Eph-Rezeptoren nicht generell im somatosensorischen Kortex exprimiert sind, sondern ihre Expression entwicklungsabhängig reguliert wird (Abb.13 und 14). Die betroffenen Gene sind entweder nur zu embryonalen Zeitpunkten exprimiert oder werden erst später, wenn bereits eine Innervation des Kortex vorhanden ist, nachweisbar.

Ephrin B1 ist an E14 in der VZ, der proliferativen Zone des Kortex, exprimiert. Bis E18 erstreckt sich die Expression über die VZ und SVZ, auch die kortikale Platte enthält an E18 Ephrin B1-mRNA (siehe Tab. 5). Stuckmann et al. (2001) beschrieben ebenfalls eine transiente Expression des Proteins Ephrin B1 in der VZ von E12,5 an und schlagen eine Funktion bei der Neurogenese und bei der radialen Migration neu entstandener Neurone vor.

In der lateralen kortikalen Platte ist EphA3 von E14 bis einschließlich P0 nachgewiesen worden, an E14 auch in der IZ. Kudo et al. (2005) berichteten ebenfalls von einer Abnahme der EphA3-Expression von embryonalen zu postnatalen Stadien. Die Autoren konnten EphA3-mRNA früh embryonal in der VZ und tiefen kortikalen Platte nachweisen, später nur noch in der kortikalen Platte, das Protein dagegen nur in der IZ. Kudo et al. schlagen vor, dass EphA3 von kortikofugal und

thalamokortikal projizierenden Neuronen exprimiert und das Protein in die Axone transportiert wird (Kudo et al., 2005, Auladell et al., 2000). Die zeitliche Koinzidenz vom EphA3- mRNA bzw. - Proteinnachweis und dem Verlauf der Entwicklung neuronaler Projektionen im Gehirn lassen den Rückschluß zu, dass dieser Rezeptor in Prozesse des Auswachsens und der Verzweigung von Axonen involviert sein könnte. Ephrin A4 ist dagegen schon an E14 in allen Schichten des Kortex nachweisbar, an E18 nur noch in der VZ und der kortikalen Platte (CP). Von Aoki et al. wurde (2004) beschrieben, dass aktivierte EphA3- und EphA4-Rezeptoren die Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen bewirken. Diese Rezeptoren sind in der embryonalen VZ bzw. CP mit Ephrin A4 koexprimiert, was bedeutet, dass eine Aktivierung der Rezeptoren durch Ephrin A4 möglicherweise an der neuronalen Differenzierung beteiligt ist.

Den Genen, die früh in der Entwicklung exprimiert werden und die demnach bei der Zelldifferenzierung und initialen axonalen *Targeting* im Zielgebiet eine Rolle spielen könnten, stehen Gene gegenüber, die erst später, ab E18, wenn bereits die erste Innervation des Kortex erfolgt ist (Molnar et al., 2003) oder an P6 die axonalen Verzweigungen nahezu komplett ausgebildet sind (Agmon et al., 1995), exprimiert werden. So waren Ephrin A5 und EphA8 erst ab E18 im parietalen Kortex in der VZ, CP, in der Subplate, bzw. nur in der CP exprimiert. Zeitgleich waren komplementär im VB Ephrin A2, A3, und A5 sowie EphA3, A4, A5 und EphA8 exprimiert, was eine Vielzahl an möglichen Interaktionen innerhalb der A-Klasse während der Ausbildung der kortikalen Schichten und schichtspezifischen Projektionen impliziert. EphA8 und Ephrin A5 sind am 6. Postnataltag schichtspezifisch in S4 bzw. S4 und S6 exprimiert. Die Bedeutung von Ephrin A5 für die Etablierung intrakortikaler und thalamokortikaler axonaler Verzweigungen im somatosensorischen Kortex wurde bereits in 1.8 erläutert und wird durch das hier dargestellte Expressionsmuster bestätigt. EphA8 könnte in der S4 durch *Reverse Signaling* ebenfalls auf die Verzweigung von Axonen des Thalamus, die Ephrine exprimieren, wirken.

4.1.2 Schichtspezifische Expression

Nahezu alle exprimierten Rezeptoren und eine Reihe Liganden sind an P6 schichtspezifisch detektiert worden (Tab.5 und Abb.16). In jeder Kortexschicht findet man ein Rezeptor- und Ligandenspektrum, das für diese Schicht charakteristisch ist (Tab.16). Ein einziges Gen, der Rezeptor EphA8, war ausschließlich in der Schicht 4 exprimiert und könnte als Schicht 4- Marker dienen. Für Ephrin A5 und EphA5 wurde bereits eine Beteiligung an der schichtspezifischen Projektion intralaminarer und thalamokortikaler Schaltkreise von Castellani et al. (1998) und Mann et al. (2002) belegt. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit die spezifische Expression bestimmter Gene in Schichten lokalisiert werden, die funktionelle Korrelationen aufwiesen: Die Schichten (S) 4 und 6, die Informationen aus

dem Thalamus erhalten, bzw. modulatorische Informationen zu Relaiskernen erster Ordnung¹ (hier der VB) und zum Retikulariskern im Thalamus senden (vgl. Abb.4 der Einleitung und Shermann und Guillery, 2001), waren durch Ephrin A5, EphB1 und EphA8 gekennzeichnet. Solche Schichten, wie S2/3 und S5, die zu höheren Verarbeitungsebenen im Kortex und zu Relaiskernen höherer Ordnung¹ im Thalamus projizieren (hier der Po), waren durch die Expression von EphA5 und EphA6 gekennzeichnet. Desweiteren war die Expression für einen Teil der schichtspezifisch exprimierten Gene bereits zum Zeitpunkt P0 in den entsprechenden Regionen des Kortex vorhanden, für andere wurde sie an P6 erstmalig festgestellt. Zur ersten Gruppe gehören EphA5, EphA8 und EphB6. Bereits am Tag der Geburt waren die entsprechenden Schichten markiert, bzw. die CP, in der die sich noch differenzierenden Neurone der S2/3 und S4 befanden. Ephrin A5-, EphA6- und EphB1-mRNA war an P0 nur in einem Teil der Schichten exprimiert, in denen diese mRNAs später an P6 exprimiert waren. Beispielsweise war Ephrin A5 an P0 in der CP exprimiert, was mit der späteren Expression in S4 korreliert. Die Expression in S6 erschien erst an P6. EphB3 jedoch war vor P6 gar nicht im Kortex nachweisbar. Auch der umgekehrte Fall, dass eine Expression in einer bestimmten Schicht von P0 zu P6 verschwindet, wurde beobachtet. So war Ephrin A2 an E18 und auch an P0 in der Subplate exprimiert, was an P6 nicht mehr nachzuweisen war. Die Expression von Ephrin B3 in der CP an P0 findet an P6 keine entsprechende Fortführung in oberen Schichten, wohingegen der Ligand an P0 und P6 in tieferen Schichten 5 und 6 exprimiert war.

Insgesamt ist erkennbar, dass die Expression von Ephrinen und ihren Rezeptoren nicht nur generellentwicklungsspezifisch ist, sondern auch innerhalb einer Schicht und damit einer Subpopulation von Neuronen zeitlich reguliert ist. Dies kann mit Vorgängen während der Entwicklung, wie z.B. mit der Ausbildung oder dem Eingang funktioneller Projektionen, wie der thalamischen Innervation der CP an E18, korrelieren (Molnar et al., 2000). Es wäre möglich, dass die Expression von Ephrin A5 und EphA8 in der lateralen CP ab E18 oder die Abnahme der EphA3-Expression hier von Bedeutung sind. Die postnatale Regression transienter Verbindungen der Subplate (SP), beispielsweise zur S4 und zum Thalamus, könnte mit dem Abnehmen der Ephrin A2-Expression in der SP einhergehen (Herrmann et al., 1994; Kanold 2003 und 2004).

Tab.16: Das schichtspezifische Expressionsspektrum von Ephrinen und Eph-Rezeptoren im somatosensorischen Kortex an P6.

Schicht	A-Liganden	B-Liganden	A-Rezeptoren	B-Rezeptoren
2/3	A2, A3	B2	A4, A5, A6	B2, B3, B4, B6
4	A2, A3, A5	B2	A4, A8	B1, B2, B3, B4, B6
5	A3	B2, B3	A4, A5, A6	B2, B4, B6
6	A3, A5	B3	-	B1, B2, B4, B6
SP	A3	-	A5	B2, B4

¹ Charakteristisch für Relaiskerne erster Ordnung ist, dass ihre kortikalen Afferenzen von Schicht 6-Neuronen herrühren, wohingegen die kortikalen Afferenzen der Kerne höherer Ordnung aus den Schichten 5 und 6 kommen. Auch die Efferenzen der beschriebenen Relaiskerne unterscheiden sich; die Kerne erster Ordnung projizieren in primäre kortikale Areale, die höherer Ordnung entsprechend in kortikale Areale höherer Verarbeitungsebenen (Shermann und Guillery, 2001).

4.1.3 Ein Abgleich mit der Literatur

Ein großer Teil der Daten aus der Literatur konnte reproduziert werden. So deckte sich das zeitliche Auftreten der Expression von Ephrin A2, A5, EphA3, A4, A5 und von EphA6 in dieser Arbeit mit dem aus der Literatur bekannten Expressionsverlauf (Tab.17). Auch Ephrin A1, EphA1 und EphA2 konnten in Übereinstimmung mit Yun et al. (2003) über die untersuchten Stadien nicht im somatosensorischen Kortex nachgewiesen werden. Wenn abweichende Beobachtungen getroffen wurden, gingen hauptsächlich auf Sensitivitätsunterschiede oder auf Verwendung unterschiedlicher Altersstadien, Techniken und/oder Inzuchtstämme zurück. So wurde Ephrin A3-mRNA von E14 bis P6, Ephrin A4-mRNA von E14-E18 und EphA8-mRNA von E18 bis P6 nachgewiesen (Tab.5). Yun et al. konnten die Expression dieser Gene nicht nachweisen. Von Yun et al. wurden perfundierte Gehirne und radioaktiv markierte Sonden verwendet. Die abweichenden Ergebnisse könnten auf der unterschiedlichen Sensitivität von radioaktiv markierter und DIG-markierter Sonde und als Folge auf Problemen bei der Signal-Hintergrund-Unterscheidung beruhen. EphA7-mRNA konnte von E14 bis E18 zunächst in der VZ/SVZ später in der kortikalen Platte und in der Subplate nachgewiesen werden. In postnatalen Stadien war EphA7 nicht mehr durch *In situ*-Hybridisierung nachweisbar, konnte allerdings in der Microarray-Analyse als *present* detektiert werden. Auch in der Literatur existieren widersprüchliche Daten zur Expression von EphA7. Von Miller et al. (2006) und Rash und Grove (2006), die vorschlagen, EphA7 sei an der Kompartimentierung des Kortex in Zusammenwirken mit Ephrin A5 beteiligt, wurde EphA7 hauptsächlich in Regionen, die den somatosensorischen Kortex nach anterior und posterior begrenzen, nachgewiesen, nicht aber im S1 selbst. Von Torii et al. (2005) dagegen wurde EphA7-mRNA am 4. Postnataltag in den Kortexschichten 2/3, 5 und 6 gefunden. Derartige Widersprüche könnten wie bereits erwähnt, auf unterschiedliche Techniken (DIG-Markierung bzw. radioaktive Sondenmarkierung) und/ oder auf den Inzuchtstamm der verwendeten Mäuse zurückzuführen sein. Torii et al. untersuchten Mäuse vom Stamm CD-1, in der vorliegenden Arbeit und von Miller et al. (2006) wurden dagegen C57-BL6-Mäuse verwendet. Beim Vergleich verschiedener Inzuchtstämme oder gar Spezies (Ratte und Maus) ist besondere Vorsicht geboten, da eine Microarray-Studie über die Expressionsprofile unterschiedlicher Gehirnstrukturen bei verschiedenen murinen Inzuchtstämmen belegt, dass sich zwei verschiedene Inzuchtstämme in ein und demselben Areal stärker unterscheiden als zwei verschiedene Areale eines Stammes (Sandberg et al., 2000). Es ist aber auch denkbar, dass die Expression von EphA7 im Verlauf der Entwicklung abnimmt und die Menge der mRNA an P6 mit *In situ*-Hybridisierung nur noch schwer zu detektieren ist. Zur Klärung könnten *In situ*-Hybridisierungen von P1-P5-Gehirnen beitragen.

Takemoto et al. (2002) konnten Ephrin B3 im somatosensorischen Kortex der Ratte von P0 bis P7 nicht nachweisen, in der vorliegenden Arbeit wurde dieser Ligand von E14 bis P6 detektiert, hierfür könnten speziesspezifische Unterschiede im Ephrin/Eph-Rezeptor-System verantwortlich sein. Wie weiterhin aus der Tabelle 17 erkennbar ist, differierte in einigen Fällen die Lokalisation der

Expression, besonders für die Stadien E14-P0. Die übereinstimmenden Daten innerhalb eines Stadiums betreffen meistens die Regionen mit den stärksten Signalen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Abweichungen durch Unterschiede in der Sensitivität zustande gekommen sein könnten (vgl. Tab.5 und Tab. 16). Die Literaturdaten für die postnatale Expression von EphA4, EphA6 und EphA7 beziehen sich nicht auf P6, sondern auf P2 (EphA4, A6) und P4 (EphA7, s.o.) und stellen demnach keine Diskrepanz zu den Daten der vorgelegten Arbeit dar.

Tab.17: Vergleichende Übersicht über die aus der Literatur bekannten Expressionsmuster der Ephrine und Eph-Rezeptoren im somatosensorischen Kortex von E14 bis P6 in der Maus mit den Daten dieser Arbeit (in Anlehnung an die Tabelle im Anhang; Abkürzungen siehe Tab.5 im Ergebnissteil). Blau-nicht exprimiert, Gelb-exprimiert, Weiß-keine Daten vorhanden, R-Daten von der Ratte; abweichende Altersstufen (sofern keine P6-Daten verfügbar waren) sind im betreffenden Feld eingetragen, von den Daten der Literatur abweichende Expressionsbefunde aus dieser Arbeit sind durch ein Kästchen mit Stern in der entsprechenden Farbe kenntlich gemacht.

	E14				E18				P0				P6									
	I Ctx NE	I Ctx SVZ	I Ctx IZ	I Ctx CP	I Ctx NE	I Ctx SVZ	I Ctx IZ	ICtx LVI	I Ctx CP	SP	S1 LI	S1 CP	S1 LV	S1 LVI	SP	S1 LI	S1 LII/III	S1 LIV	S1 LV	S1 LVI	S1 SP	
efna-1																						
efna-2							*			*	*	*	*	*	*							
efna-3				*	*	*		*	R	R		*	*	*	*							
efna-4	*	*	*	*	*	*			*													
efna-5					*	*		*		*		*	*	*				*	*	*	*	*
efnb-1																						
efnb-2																						
efnb-3											R	R	*	R	*	R	*	R	*	R	*	R
EphA-1																						
EphA-2																						
EphA-3		*	*	*	*	*	*	*	*													
EphA-4	*	*	*	*	R	R		*	R													
EphA-5		*	*	*	*	*						*	*	*	*							
EphA-6											*	*	*	*			P2	*	*	*	*	*
EphA-7																	P4*	*	*	*	*	*
EphA-8					*	*		*	*		*	*	*	*								
EphB-1																						
EphB-2																						
EphB-3																						
EphB-4																						
EphB-6																						

4.1.4 Entwicklungsspezifische Expressionsdynamik im dorsalen Thalamus

Im Thalamus waren ebenso wie im Kortex einige Rezeptoren und Liganden durch eine transiente bzw. späte Expression gekennzeichnet. Dabei wiesen Ephrin A4, EphA3 und EphA8 einen ähnlichen Zeitverlauf wie im somatosensorischen Kortex auf. Zum Zeitpunkt E14 waren Ephrin A4 und EphB1 ausschließlich im Neuroepithel des dorsalen Thalamus und Ephrin B2 im medialen Teil des dorsalen Thalamus exprimiert. An E18, wo keine wesentliche Proliferation im Neuroepithel mehr statt findet,

sind diese Gene nicht mehr nachweisbar gewesen. Ephrin A4 könnte, wie schon für den Kortex vorgeschlagen, den koexprimierten Rezeptor EphA3 (Tab.6) aktivieren und die Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen im Neuroepithel des Thalamus bewirken. EphB1, EphB2 und Ephrin B2 sind alternierend von medial nach lateral im dorsalen Thalamus exprimiert (Abb. 43). Im Neuroepithel wurden die beiden Rezeptoren EphB1 und EphB2 exprimiert, lateral davon Ephrin B2, gefolgt von einer EphB2-exprimierenden Region. Eine ähnlich alternierende Expression von Ephrin B2 und den Rezeptoren EphB1 und EphA4 ist für Segmente des Rhombencephalons, die Neuralleiste und das Mesoderm auf Höhe der Branchialbögen, zu einem Zeitpunkt, an dem Neuralleistenzellen zu den Branchialbögen migrieren, festgestellt worden (Smith et al., 1997). Die Autoren konnten durch Überexpression des Liganden bzw. durch Mutationen der Rezeptoren nachweisen, dass die Interaktionen von Ephrin B2 mit den Rezeptoren die gerichtete Migration von Zellen der Neuralleiste zum 2. und 3. Branchialbogen ermöglichen. Im Thalamus könnten Ephrin B2, EphB1 und EphB2 ähnlich wirken und die migrierenden Neurone vom Neuroepithel zu ihren Zielkernen leiten, bzw. verhindern, dass eine Vermischung von Neuronen unterschiedlicher Zielkerne stattfindet.

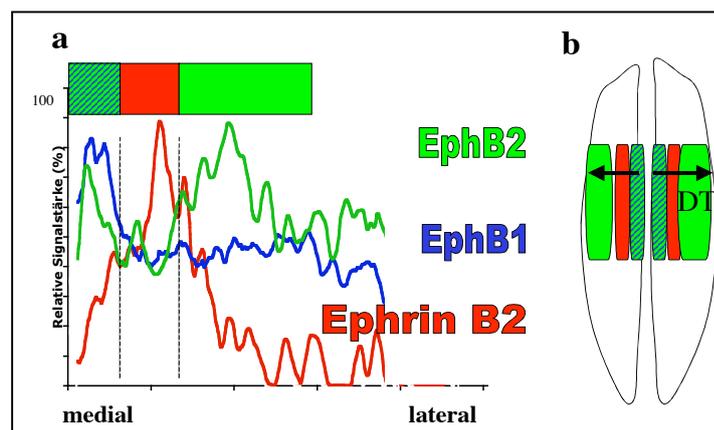


Abb.43: Alternierende Expression von EphB1, EphB2 und Ephrin B2 im dorsalen Thalamus an E14. **(a)** Relative Signalintensität von medial (Neuroepithel-NE) nach lateral. **(b)** Skizze des Thalamus bei E14; EphB1 und EphB2 sind im NE exprimiert, gefolgt von Ephrin B2 und EphB2.

Zu jedem untersuchten Entwicklungszeitpunkt zeichneten sich der VB und Po durch eine spezifische Kombination von Eph-Rezeptoren aus. EphA3 und EphB2 konnten von E14 bis P0 im dorsalen Thalamus bzw. im Po und VB nachgewiesen werden. EphA5 und EphA8 waren von E18 bis P0 im VB und Po exprimiert, EphA8 blieb bis P6 im Po als „spätes Gen“ nachweisbar. Möglicherweise könnte diese entwicklungs- und kernspezifische Expression ein Hinweis auf eine Beteiligung der Ephrine und Eph-Rezeptoren bei der Verschaltung thalamischer Kerne sein. Beispielsweise unterscheiden sich VB und Po durch ihre Sensitivität auf kortikale Innervationen. Diamond et al. (1992) haben festgestellt, dass eine Inaktivierung im somatosensorischen Kortex die Reaktionsfähigkeit des VB auf sensorische Stimuli nicht beeinflusste, die des Po dagegen verlorengingen. Die unterschiedlich exprimierten Liganden und Rezeptoren im VB und Po könnten ein Korrelat für die Vernetzung dieser Kerne darstellen. Durch das wechselnde Rezeptorspektrum

könnte auch eine Modifikation der Zellreaktion auf Liganden, wie Ephrin A2, A3 oder Ephrin A5, die im Kortex in unterschiedlichen Schichten exprimiert sind, erreicht werden.

4.1.5 Kernspezifische Expression im dorsalen Thalamus

Am 6. Postnataltag sind durch ihre spezifische Expression thalamische Relaiskerne erster Ordnung (wie der VB) von denen höherer Ordnung (wie der Po) im somatosensorischen System zu unterscheiden (Abb.19 und Tab. 6). Ephrin A5 und EphA7 waren im VB exprimiert. Der Po enthielt dagegen Ephrin B3, EphA6, EphA7, EphA8, EphB6 und in dorsalen Arealen Ephrin A5. Weiterhin konnten Relaiskerne erster Ordnung des somatosensorischen Systems von denen des visuellen Systems unterschieden werden. Im VLG und im DLG war EphA8 exprimiert, was an P6 nicht im VB nachgewiesen werden konnte, dagegen wurde EphA7 nicht im VLG/DLG detektiert. Die spezifische Expression von Ephrinen und Eph-Rezeptoren in verschiedenen sensorischen Systemen und unterschiedlichen Verarbeitungsebenen lässt vermuten, dass diese Moleküle an der Ausbildung der neuronalen Vernetzung beteiligt sein könnten. Ähnlich wie für die Schichten des somatosensorischen Kortex findet man im Thalamus ein Rezeptor- und Ligandenspektrum für die verschiedenen Kerne des somatosensorischen und visuellen Systems.

Tab.18: Das kernspezifische Expressionsspektrum von Ephrinen und Eph-Rezeptoren im dorsalen Thalamus an P6.

Kern	A-Liganden	B-Liganden	A-Rezeptoren	B-Rezeptoren
VB	A2, A3, A5	-	A4, A7	B4
Po	A2, A3, A5 (dorsal)	B3	A4, A6, A7, A8	B4, B6
DLG	A2, A3, A5	-	A4, A8	B4
VLG	A2, A3, A5	-	A8	B4

4.1.6 Ein Abgleich mit der Literatur

Der zeitliche Verlauf der Expression von Ephrinen und Eph-Rezeptoren im dorsalen Thalamus deckt sich weitestgehend mit den Daten aus der Literatur (Tab.19). Auch die über den Zeitraum E12-E16 als abnehmend beschriebene Expression von EphA3 im dorsalen Thalamus (Kudo et al. 2005) konnte in der vorliegenden Studie reproduziert und bis P6 erweitert werden. In mehreren Studien wurden im Thalamus Expressionsgradienten von Eph-Rezeptoren und Liganden beschrieben, die z.T. komplementär zu entsprechenden Gradienten im Kortex bzw. im ventralen Telencephalon verliefen (Vanderhaeghen et al., 2000, Dufour et al., 2003, Torii et al., 2005, Miller et al., 2006). Bei der Interpretation der zu- oder abnehmenden Intensität eines *In situ*-Hybridisierungssignals als Gradienten muss man berücksichtigen, dass mehrere experimentelle Parameter, wie die Schnittdicke, die Verteilung der Hybridisierungs- Antikörper- und Substratlösungen und ganz entscheidend die Expositionszeit und die Zugänglichkeit der mRNA im Gewebe das Ergebnis beeinflusst haben

4.1.7 Die Expression von Ephrinen und Eph-Rezeptoren in den Ganglionischen Eminenzen

Um den 14. Embryonaltag entstehen in der LGE Interneurone, die auf dem *Rostral Migratory Stream* (RMS) zum Bulbus olfactorius wandern. In der MGE dagegen entstehen hauptsächlich Interneurone, die durch tiefer gelegene Regionen entlang des sich entwickelnden Striatum zur Subplate bzw. unteren Intermediärzone des Kortex migrieren, einige wandern aber auch durch superficiale Regionen in die Marginalzone. Eine Subpopulation von MGE-Neuronen migriert zum Striatum (Übersicht in Marin und Rubenstein, 2001). Kürzlich haben Lopez-Bendito et al. (2006) eine Zellpopulation beschrieben, die der LGE entstammt und zwischen E11.5 und E13 in einen ventral an die SVZ der MGE angrenzenden Korridor migrieren, wo sie für das Einwachsen thalamokortikaler Axone essentiell sind.

Die Ephrine und Eph-Rezeptoren haben bis auf Ephrin A2, A4 und EphB6 (mit Expression sowohl in VZ als auch in SVZ von MGE und LGE) ein mosaikartiges Expressionsmuster in der SVZ und VZ, aber auch im ventralen Telencephalon. Zudem existieren komplementäre Gradienten von Liganden und Rezeptoren beider Klassen in der VZ (Tab.7 und Abb.22, 44). In der VZ der Ganglionischen Eminenzen (GE) sind EphB1, EphB2 und Ephrin B2 exprimiert, aber auch Ephrin B1 (Tab.7). Die B-Liganden waren zudem in einem Gradienten von lateral>medial exprimiert, EphB1 hatte einen entsprechend komplementären Expressionsverlauf (Abb.22). Durch Conover et. el. (2000) konnte in adulten Mäusen nachgewiesen werden, dass Ephrin B2 und EphB2 an der Regulation von der Proliferation neuronaler Stammzellen und der Migration von Neuroblasten zum RMS beteiligt sind. Eine ektopische Zugabe von Ephrin B2 bzw. EphB2 in den lateralen Ventrikel hatte eine erhöhte Proliferation in der SVZ zur Folge, zudem war die Migration von Neuroblasten gestört (Conover et al., 2000). Ähnlich könnten die in der LGE stärker exprimierten Liganden Ephrin B1 und B2 auf die Proliferation der dortigen neuronalen Stammzellen und auf die Migration der Neuroblasten wirken. Gleichzeitig könnte durch den gegenläufigen Gradienten von B-Ephrinen, EphB1 bzw. aus der A-Klasse EphA3 und Ephrin A5 in der VZ die Migrationsrichtung der Neurone zu jeweils unterschiedlichen Zielgebieten, wie zum Kortex bzw. zum Striatum oder zum olfaktorischen Bulbus und zur Korridorregion ventral der MGE, vorgegeben werden.

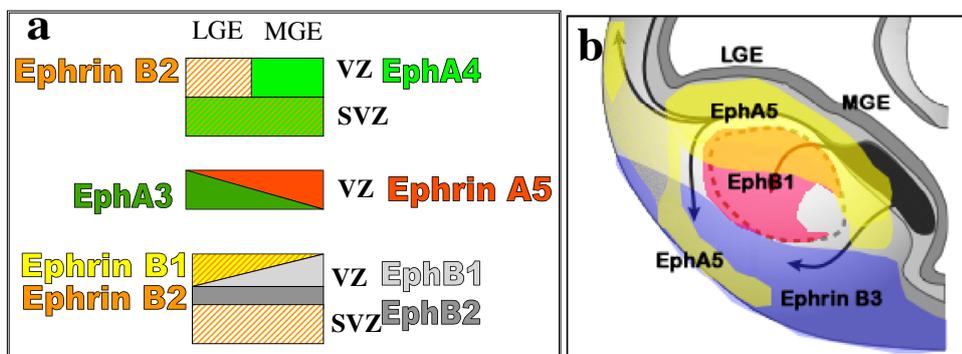


Abb.44: (a) Schematische Darstellung der Expressionsmuster in potentiellen Rezeptor-Liganden-Interaktionspartner in der VZ und SVZ der Ganglionischen Eminenzen bei E14 (b) Schematische Darstellung der Expressionsmuster von EphA5, EphB1 und Ephrin B3 im ventralen Telencephalon bei E14. Zusätzlich sind die Migrationsrichtungen der Neurone aus der MGE bei E14 angegeben.

In der Abbildung 44b ist illustriert, dass EphA5 in der SVZ von MGE und LGE, im entstehenden äußeren Striatum und in basalen Arealen des Telencephalons exprimiert ist, nicht jedoch im zentralen Striatum und Globus pallidus. Hier besteht einerseits die Möglichkeit, dass dieser Rezeptor von den migrierenden Neuronen exprimiert wird, da die entsprechenden Hybridisierungssignale auf den Migrationswegen lagen und einzelne Zellen erkennbar waren, andererseits könnte EphA5 auch von nicht migrierenden Zellen auf dem Migrationsweg exprimiert werden und über *Reverse Signaling* auf die A-Ephrine exprimierenden Neurone aus den GE wirken. EphB1 dagegen ist im zentralen Striatum exprimiert, wo es repulsiv auf Interneurone aus der MGE, die durch tiefe Regionen zum Kortex wandern, wirken könnte.

4.1.8 Thalamokortikale Projektionswege

An E14 sind die ersten Axone aus dem Thalamus im lateralen Kortex detektiert worden (Auladell et al., 2000). Ein Großteil befindet sich noch im ventralen Telencephalon (vT) wie in der Abbildung 45 zu erkennen ist, die Calretinin-positive thalamische Axone darstellt. Calretinin wird als Marker für frühe thalamische Neurone und Axone verwendet (Frassoni et al., 1998, Mattar et al., 2004). In diesem Entwicklungsstadium werden im dorsalen Thalamus bis auf EphA1, A2 und A7 alle A-Rezeptoren, Ephrin A2, A3 und A5, Ephrin B2 und B3 sowie EphB2, B4 und EphB6 exprimiert. Die Abbildung 44b illustriert das Expressionsmuster von EphA5, EphB1 und Ephrin B3 im vT. Diese Gene zeigten in der betreffenden Region die markantesten Hybridisierungssignale. Ephrin B3 wird im basalen Telencephalon exprimiert, ein Areal, das von thalamischen Axonen gemieden wird. EphA5 ist nicht im zentralen Striatum auf Höhe der internen Kapsel exprimiert, jedoch in angrenzenden Arealen. Da die thalamischen Axone sowohl Liganden als auch Rezeptoren beider Klassen exprimierten, könnten Ephrin B3 und EphA5 (über *Reverse Signaling*) durch Repulsion den Projektionsweg eingrenzen. Takemoto et al. (2002) z.B. haben einen repulsiven Effekt von Ephrin B3 auf EphA4 exprimierende Axone des somatosensorischen Thalamus in *In vitro*-Versuchen beschrieben. EphB1 ist dagegen im zentralen Striatum exprimiert, hier könnte eine attraktive Wirkung hervorgerufen werden.

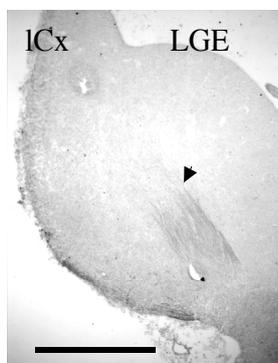


Abb.45: Cr-positive thalamische Axone im ventralen Telencephalon (E14); Immunhistochemie mit polyklonalem anti-Cr-Antikörper und DAB-Färbung. Lcx-lateraler Kortex, LGE-laterale ganglionische Eminenz, Maßstab 300µm.

Von Metin und Godement (1996), die neuroanatomische Tracing-Studien und *In vitro*-Experimente an Hamsterembryonen durchführten, ist beschrieben worden, dass die Projektionsaxone aus dem Thalamus und aus dem Kortex die Mantelzone und die SVZ der GE als intermediäres Projektionsziel

nutzen. Zudem wurden zwischen E11,5 und E13,5 transiente Projektionen aus der SVZ der GE zum Kortex und zum Thalamus beobachtet. McManus et al. (2004) haben nachgewiesen, dass eine Subpopulation von GABA-ergen Neuronen thalamokortikale Axone als Substrat während ihrer Migration in die IZ des Kortex nutzen. Dabei ändert sich die Affinität; früh embryonal adhären die Neurone auf TAG-1-positiven Axonen, später, ab E 14,5 auf Neurofilament-positiven Axonen. Speziell für die Projektionen vom Thalamus von Bedeutung ist ein erst kürzlich beschriebener Mechanismus, demzufolge zwischen E11,5 und E13,5 vom LGE Zellen in die Korridorzone im Mantel der MGE wandern und bewirken, dass diese Region „durchlässig“ für die thalamischen Axone wird (Lopez-Bendito et al., 2006). Durch diese Arbeiten wird deutlich, dass die Prozesse der tangentialen Migration und der Projektion von thalamischen Axonen in den Kortex eng miteinander in Verbindung stehen. Demnach könnten die im vT exprimierte Ephrine und Eph-Rezeptoren ebenso für beide Vorgänge genutzt werden, bzw. von Bedeutung sein. Die komplementäre Expression einiger Eph/Ephrin-Gene in der VZ/SVZ der GE, im vT, im Thalamus, bzw. im Kortex unterstützt diese Annahme.

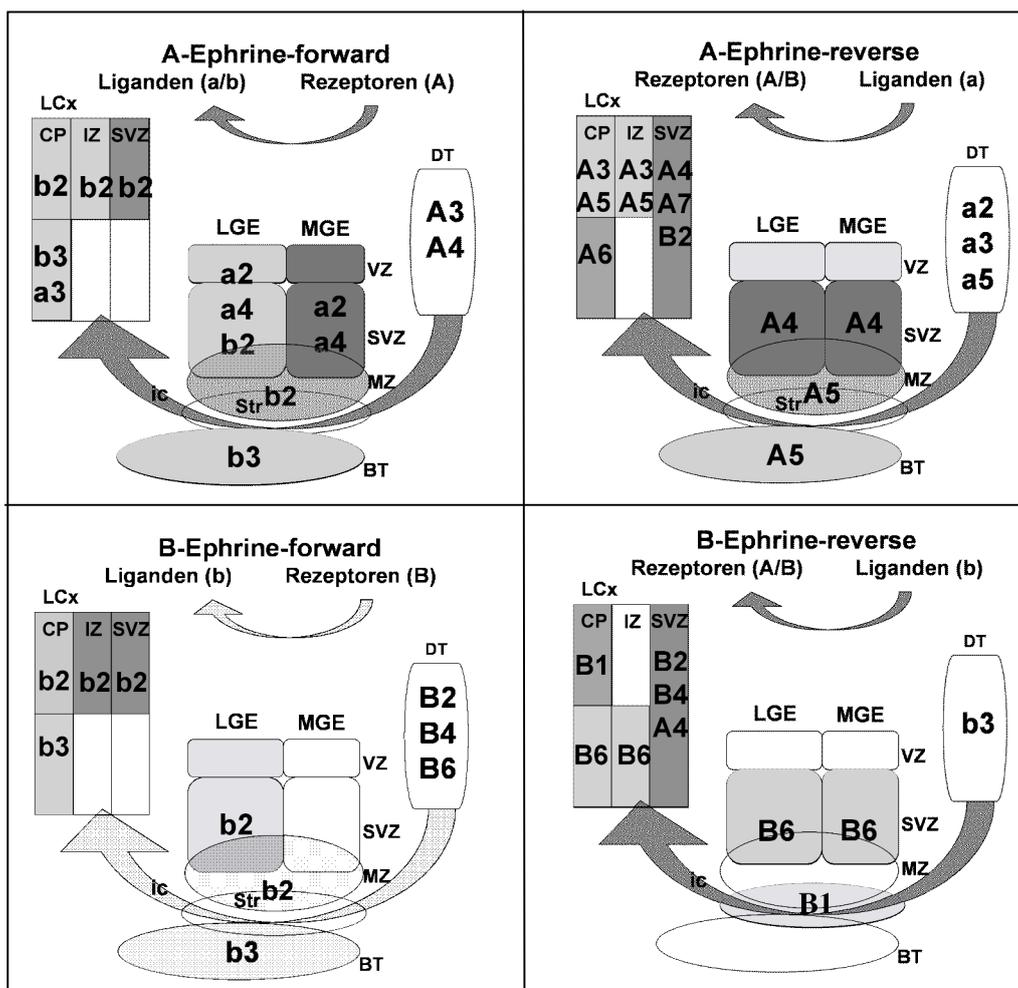


Abb.46: Übersicht über die möglichen Interaktionspartner während der thalamokortikalen Projektion; zusammengestellt aus den Expressionsdaten für Ephrine und Eph-Rezeptoren bei E14 (Tab.5, 6, 7), jeweils dargestellt für *Forward* und *Reverse Signaling*. DT- dorsaler Thalamus, MGE/LGE- mediale/laterale Ganglionische Eminenz, Str-Striatum, iC- interne Kapsel, BT- basales Telencephalon, LCx-lateraler Kortex, CP-kortikale Platte, IZ-Intermediärzone, SVZ/VZ-Subventrikular-/Ventrikularzone. Im Kortex sind die Gene ihrer Expression in CP/IZ oder SVZ dargestellt.

In der Abbildung 46 sind die möglichen Interaktionspartner nach A- und B-Klassen sowie nach *Forward* und *Reverse Signaling* geordnet, schematisch dargestellt. Aus dieser Übersicht geht hervor, wie vielfältig die Wirkungen und Interaktionen allein innerhalb des Ephrin/Eph-Rezeptor-Systems bei der Ausbildung thalamokortikaler Projektionen sein können. Beispielsweise könnten die von Neuronen des dorsalen Thalamus exprimierte A-Rezeptoren EphA3 und EphA4 während der Ausbildung der Projektion zum Kortex zunächst in der Subventrikularzone bzw. der Mantelzone der ganglionischen Eminenzen Ephrin A2, Ephrin A4 oder auch Ephrin B2 und im basalen Telencephalon Ephrin B3 erkennen und so den Projektionsweg zum Kortex finden. Im lateralen Kortex wiederum könnten die unterschiedlich in der CP, IZ bzw. SVZ exprimierte Liganden Ephrin B2, Ephrin B3 oder Ephrin A3 ein Einwachsen der Axone über EphA3 oder EphA4 vermitteln. Zwischen E14 und E18 erreichen die thalamischen Axone den Kortex (Molnar et al., 2003). Über diesen Zeitraum waren auch die Expressionsunterschiede von Ephrin B2 und Ephrin A3 im lateralen Kortex vorhanden.

4.1.9 Der „Ephrinkode“

Yun et al. (2003) schlugen für die Eph-Rezeptor-Gene der A-Klasse und für die Interaktion mit dem Liganden Ephrin A5 vor, dass bestimmte Kombinationen der EphA-Rezeptoren die Identität einer Zelle im Kortex spezifizieren. Dieses Modell kann anhand der hier präsentierten Daten erweitert und detaillierter ausgeführt werden. Sowohl im dorsalen Thalamus als auch im parietalen Kortex existieren jeweils ein „frühes“ und ein „spätes“ individuelles Ephrin/Eph-Rezeptor-Genspektrum (Tab.20) mit teilweisen Überschneidungen von kontinuierlich exprimierten Genen. Gemeinsam in Kortex und Thalamus sind EphA3 und Ephrin A4 in frühen Stadien, EphA8 in späteren Stadien nachweisbar gewesen.

Funktionell könnten die früh exprimierte Ephrine und Eph-Rezeptoren an der Neurogenese (wie z.B. die Ephrin B1 und B2 im Neuroepithel von Thalamus und Kortex), an der Migration von Neuroblasten oder an der initialen axonalen Verzweigung (wie EphA3 und komplementäre A-Ephrine im Kortex und Thalamus) beteiligt sein. Die später exprimierte Gene könnten eine Feinmodulation der Verzweigungen innerhalb eines Areals bewirken (die schichtspezifischen Gene im Kortex und die kernspezifischen Gene im Thalamus an P6) und an der Ausbildung von dendritischen Spines und Synaptogenese (z.B. die B-Ephrine und B-Rezeptoren im Kortex an P6) beteiligt sein. Entsprechend des Reifestatus könnte sich auch die Funktion ein und desselben Rezeptors oder Liganden ändern. So könnten B-Ephrine in proliferativen Zonen zunächst embryonal die Neurogenese und Differenzierung beeinflussen, später, im postnatalen Gehirn wie von mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesen, die Spinemorphogenese und synaptische Plastizität regulieren (Ethell et al., 2001, Henkemeyer et al., 2003, Penzes et al., 2003, Irie und Yamaguchi 2004). Cis-Interaktionen wie z.B. *Silencing* von koexprimierten Interaktionspartnern wie EphA3 und Ephrin A5 im Kortex an E18 und P0 bzw. im Thalamus von E14-P0 oder Transphosphorylierung eines kinaseinaktiven Rezeptors wie EphB6 durch

einen ligandenaktivierten koexprimierten Rezeptor wie EphB1 im Kortex an P6, könnten ebenfalls einen Einfluss auf die Zellreaktion haben und das Interaktionsspektrum erheblich erweitern (Carvalho et al., 2006, Freywald et al., 2001). Durch die zeitlich begrenzte Expression eines Rezeptors (beispielsweise EphA3 von E14 bis P0 im Kortex) könnten zudem koexprimierte Liganden (wie Ephrin A2 oder A3) transient inaktiviert werden und erst nach Einstellen der Expression für andere Rezeptoren zur Verfügung stehen.

Anhand des detaillierten Expressionsmusters können Anhaltspunkte für mögliche Interaktionen im Ephrin/Eph-Rezeptor-System und für die Involvierung von Kandidatengenem bei Entwicklungsprozessen, wie der Differenzierung von Neuronen, der neuronalen Migration oder Ausbildung neuronaler Schaltkreise getroffen werden. Die vorliegende Arbeit liefert somit die Basis für funktionelle *In vitro*-Assays, mit denen die Wirkung dieser Gene untersucht werden kann.

Tabelle 20 : „Ephrinkode“; Übersicht über die Eph-Rezeptoren und Ephrine, die im somatosensorischen Kortex und dorsalen Thalamus exprimiert sind; nach frühen und späten Genen geordnet

Liganden-Rezeptor-Spektrum bestehend aus	Kortex	Thalamus
--Frühe Gene-- E14-P0 und --kontinuierlich exprimierte Gene--	<i>EphA3</i> <i>Ephrin A4</i> <i>Ephrin B1</i>	<i>EphA3 EphA5</i> <i>Ephrin A4</i> <i>Ephrin B2</i> <i>EphB1 EphB2</i>
	EphA4, A5, A6 Ephrin A2, A3 Ephrin B2, B3 EphB2, B4, B6	EphA4, A6, A7 Ephrin A2, A3, A5 Ephrin B3 EphB4, B6
--Späte Gene- Ab E18/ P6 und --kontinuierlich exprimierte Gene--	<i>EphA8</i> <i>Ephrin A5</i> <i>EphB3</i>	<i>EphA8</i>
	EphA4, A5, A6 Ephrin A2, A3 Ephrin B2, B3 EphB2, B4, B6	EphA4, A6, A7 Ephrin A2, A3, A5 Ephrin B3 EphB4, B6

4.2 Die Auswirkungen des funktionellen Knockouts von Ephrin A5 auf die Genexpression im somatosensorischen Kortex

Meißtens wurden für die im Vergleich zu Doppel- oder Mehrfach- KOs eher subtilen Auswirkungen des Knockouts von einzelnen Ephrinen oder Eph-Rezeptoren redundante, koexprimierte Ephrine und Eph-Rezeptoren verantwortlich gemacht. Über das Ausmaß kompensatorischer Mechanismen ist jedoch bisher nichts bekannt. Um die molekularen Grundlagen von eventuellen Kompensationen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Genexpressionsprofile von Ephrin A5-KO- und

WT-Mäusen am Modell des somatosensorischen Kortex analysiert. Die Untersuchung basiert auf 2 Hybridisierungen (KO vs. WT) und je einer biologischen Wiederholung (KO1, KO2, WT1, WT2). Es wurden jeweils RNA-Pools verwendet, wodurch mögliche interindividuelle Unterschiede und Inkonsistenzen in der Gewebepräparation minimiert werden sollten. Viele Analysen mit Genexpressions-Microarrays verzichteten auf das Durchführen von Replika. In dieser Arbeit konnte durch das Anfertigen von Replika eine Minimierung der Fehlerrate erzielt werden. Dennoch war es aufgrund der geringen Anzahl an Wiederholungen und damit an analysierbaren Vergleichen schwierig, eine statistische Signifikanz der Veränderungen in der Expression zu determinieren; für eine ANOVA oder einen t-Test war die Anzahl der Vergleiche nicht ausreichend (Mirnics und Pevsner 2004). Nach einer Normalisierung (Bolstad et al., 2003) wurden daher die Kreuzvergleiche KO2/WT1 und KO1/WT2 hinzugezogen.

In einzelnen KO/WT- und Replika-Vergleichen hatten etwa gleich viele Transkripte einen *change call* erhalten, konsistent waren davon 696 Gene in heterotypischen Vergleichen verändert, in den beiden Replika aber nur 187 Gene. Vom Hersteller der GeneChips wird eine *false change* Rate von maximal 1% für technische Replika angegeben (Manufacturing quality control and validation studies of GeneChip arrays. www.affymetrics.com). Das sind allein schon 124 Transkripte. Daher ist die Reproduzierbarkeit zwischen den Replika als sehr hoch zu bewerten. Über die tatsächliche *false change*-Rate in diesen Experimenten kann jedoch keine Aussage getroffen werden, da keine technischen Replika angefertigt wurden.

Die Zuordnung der Gene zu funktionellen Gruppen ergab, dass unter Berücksichtigung der in 3.2.2 erläuterten Bedingungen in den Replika lediglich eine Gruppe (mit der GO-Annotation *intracellular transport*) signifikant betroffen war. Diese Gruppe war ebenfalls unter den veränderten Genen der KO/WT-Vergleiche signifikant überrepräsentiert und unterliegt demnach besonders starken unspezifischen Schwankungen. Die in den KO/WT-Vergleichen differentiell exprimierten Gene wurden 16 funktionellen Gruppen zugeordnet, darunter waren allein vier mit für das Nervensystem wichtigen Funktionen wie *nervous system development*, *neurophysiological process*, *neurogenesis* und *transmission of nerve impulse*. Hier wird deutlich, dass im Ephrin A5-KO ganz spezifisch biologische Prozesse, die eng mit der Entwicklung und Funktion des Nervensystems in Verbindung stehen, betroffen sind.

Ein ähnliches Phänomen wurde in Genexpressionsvergleichen am präfrontalen Kortex aus post mortem-Gehirnen schizophrener Patienten versus Kontrollpersonen beschrieben (Mirnics et al, 2000). Die Schizophrenie als eine multifaktoriell und multigenetisch bedingte Erkrankung mit einer bisher nicht eindeutig geklärten Ätiologie ist keineswegs mit einem Knockout-Modell vergleichbar. Jedoch sind die anatomischen und biochemischen Veränderungen im Gehirn schizophrener Patienten ebenfalls moderat, selten wurden stärkere als 2-fache Veränderungen beobachtet (Collinge und Curtis, 1991, Woo et al., 1998, Glantz und Lewis, 2000, Volk et al., 2000). In der Auswertung der Microarrays untersuchten Mirnics et al. funktionelle Gengruppen, von denen in den Patienten am

stärksten die Gruppe *presynaptic secretory machinery* (mit der präsynaptischen Sekretion assoziierte Gene) signifikant verändert war.

Unter Einbeziehung der in 3.2.3 erläuterten stringenten Parameter wurden 172 Gene (1,4% der untersuchten Transkripte) im somatosensorischen Kortex von Ephrin A5-KO-Mäusen als differentiell exprimiert identifiziert. 51 Gene waren mindestens 2-fach herauf- bzw. herunterreguliert, 9 Gene waren mindestens 4-fach reguliert (Tab.21, 22). Von den 13 ausgewählten differentiell exprimierten Transkripten konnten 7 Gene, also mehr als 50%, in unabhängigen Experimenten bestätigt werden. Hier wird deutlich, dass zum einen der in der vorgelegten Arbeit entwickelte Analysemodus mit einer Trefferquote von >50% die differentiell exprimierten Gene in einem komplexen Gewebe, wie dem Kortex, detektieren kann, zum anderen, dass eine Validierung von Microarray-Daten mit unabhängigen Proben unerlässlich ist (Mirnics und Pevsner 2004). Dennoch wurden nicht alle veränderten Gene identifiziert. Ein Teil der Gene wurde aufgrund ihrer geringen Signalstärke nicht in die weitere Analyse einbezogen, ein anderer Teil wurde aufgrund des geringen *fold changes* (<1,5) ausgeschlossen. Sandberg et al. (2000) haben gezeigt, dass die molekulare Diversität im Gehirn hauptsächlich durch *low-abundance* und zelltyp-spezifische Genexpression zustande kommt, die oftmals durch die vielen verschiedenen Zelltypen „verdünnt“ wird (Übersicht in Luo und Geschwind 2001). Daher finden sich die betreffenden Transkripte oftmals, wenn sie differentiell exprimiert sind, in den *false negatives* wieder. Unter niedriger stringenten Analysebedingungen konnten drei Gene aus der Familie der Ephrine und ihrer Rezeptoren als differentiell exprimiert identifiziert werden. Diese Gene zählten folglich im eher stringenten Analysemodus zu den *false negatives*. Es wäre, angesichts der größtenteils moderaten Veränderungen, denkbar, die untere Grenze für den *fold change* herabzusetzen, um so interessante Gene, die bisher als *false negatives* verloren gingen, zu identifizieren.

4.2.1 Differentielle Expression im Ephrin-Eph-Rezeptorsystem

In einer separaten Analyse der Microarraydaten auf die Genfamilie der Ephrine und ihrer Rezeptoren hin wurde nach Herabsetzen der Stringenz (bezüglich des *fold changes*) festgestellt, dass vier Gene dieser Familie im KO differentiell exprimiert waren. Drei davon konnten in der qRT-PCR bestätigt werden: Ephrin A2, EphA5 und EphB6. Das entspricht 20% der zum untersuchten Stadium exprimierten Ephrin/Eph-Rezeptor-Gene (3 von 15 Genen). Allerdings konnten Ephrin A5, EphA6 und EphB3, die im WT durch *In situ*-Hybridisierung nachgewiesen wurden, in den GeneChip Arrays nicht als *present* detektiert werden. Von Funatsu et al. (2004) ist bereits beschrieben worden, dass Ephrin A5 im Kortex von Mäusen mit dem gleichen GeneChip nicht nachgewiesen werden konnte. Hierfür könnten eine geringe Kopienanzahl und/oder Kreuzhybridisierungen der cRNAs mit *Mismatch-probes* verantwortlich sein.

Die qRT-PCR ergab, dass für Ephrin A2 die mRNA-Menge im Ephrin A5-KO ca. 5-fach erhöht war, für EphA5 ca. 2,3-fach und für EphB6 ca. 1,7-fach höher als im WT war. Diese Zunahme der Expression betraf im Falle Ephrin A2 und EphA5 nicht den S1- Kortex generell, sondern trat, wie in der semiquantitativen *In situ*-Hybridisierung erkennbar war (Abb.30), schichtspezifisch auf. Für eine Interpretation und Abschätzung einer möglichen Funktion dieser regulierten Gene im Ephrin A5-KO muss man sich zunächst die neuronalen Netzwerke des Modellsystems, in welche die betroffenen Schichten involviert sind, verdeutlichen.

Die Subplate weist im Ephrin A5-KO eine erhöhte Expression von Ephrin A2 und EphA5 auf. Während der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung existieren Verbindungen von Subplateneuronen mit Regionen, die normalerweise durch die Expression von Ephrin A5 gekennzeichnet sind: die Neurone der Subplate senden Pionierprojektionen zum Thalamus und erhalten ebenso synaptische Eingänge von einwachsenden thalamischen Axonen (McConell et al., 1989, Herrmann et al., 1994). Die Subplateneurone projizieren aber auch zur frühen kortikalen Platte und innervieren die Schicht 4 noch bevor thalamische Axone sie erreichen (Friauf et al., 1990). Und umgekehrt, Neurone aus der Schicht 4 projizieren während der Ausbildung von lokalen kortikalen Verzweigungen transient zur Subplate (Callaway et al., 1992, Hanganu et al., 2002). Fehlt nun ein Ligand im Zielgebiet der Subplateneurone, könnte die Sensitivität durch eine vermehrte Expression des beteiligten Rezeptors EphA5 erhöht werden. Da aber auch ein über *Reverse Signaling* wirksamer Mechanismus in Frage kommt (Murai and Pasquale 2003, Holmberg et al., 2005), könnte die verstärkte Expression von Ephrin A2 ebenso eine Kompensation erreichen. In diesem Falle würde Ephrin A2 durch EphA-Rezeptoren, die im Thalamus oder in der kortikalen Schicht 4 exprimiert werden, aktiviert.

Weiterhin war der Rezeptor EphA5 in der **Schicht 5** des Ephrin A5-KO heraufreguliert. Eine Subpopulation von Pyramidenzellen der Schicht 5 projiziert zu Relaiszellen des dorsalen posterioren Nukleus im Thalamus (Veinante et al., 2000), wo im WT Ephrin A5 exprimiert wird. Ähnlich wie in den Neuronen der Subplate könnte ein direkter kompensatorischer Effekt der Zunahme der EphA5-mRNA zugrunde liegen.

Die Zellen der **Schichten 2/3** exprimierten Ephrin A2-mRNA in erhöhtem Maße. Diese Zellen erhalten ihre Eingänge aus der Schicht 4 und vom Thalamus (Shepherd und Svoboda 2005) und haben axonale Verzweigungen in den Schichten 4 und 5 (Larsen et al., 2006)- in jedem Falle ist eine im WT Ephrin A5 exprimierende Region entweder Projektionsziel oder Herkunftsort der synaptischen Eingänge. Hier könnten indirekte Effekte für die Heraufregulation von Ephrin A2 verantwortlich sein, wie etwa die veränderte Innervation durch thalamische Axone infolge geringerer axonaler Verzweigung (Mühlfriedel et al. 2000), oder auch Veränderungen in den Zielschichten 4 und 5, wie z.B. im Ephrin A5-KO die vermehrte Ausbildung und dendritischen Fortsätzen in S4-Sternzellen (A.Güllmar, unpublizierte Daten).

Der Rezeptor EphB6 war im Gegensatz zu Ephrin A2 und EphA5 nicht schichtspezifisch sondern generell höher exprimiert als im WT. EphB6 ist ein kinasedefizienter Rezeptor (Gurniak und Berg 1996), der jedoch im Komplex mit aktivierten B-Rezeptoren transphosphoryliert werden kann (Freywald et al., 2002). EphB2, ein Rezeptor, der auch den Liganden Ephrin A5 bindet (Himanen et al., 2004), ist ähnlich EphB6 mit stärkeren Signalen in den Schichten 2/3, 4 und 6 und schwächerem Signal in der Schicht 5 exprimiert (Tab.5). Hier wäre es möglich, dass im KO eine Transphosphorylierung durch Ephrin A5-aktivierte EphB2-Rezeptoren nicht mehr stattfindet und die Heraufregulation von EphB6 demnach ebenfalls einen kompensatorischen Charakter hätte. Weiterhin wäre es denkbar, dass ein *Silencing* von koexprimierten Liganden durch laterale Interaktionen wie von Yin et al. (2004) für A-Rezeptoren und Liganden beschrieben, vorkommt und im Ephrin A5 -KO durch die erhöhte EphB6-Konzentration aufgehoben bzw. abgeschwächt werden könnte. Pasquale schlug 2005 ein Modell für die Wirkung kinasedefizienter Eph-Rezeptoren vor, in dem die Richtung der Signaltransduktion zum *Reverse Signaling* durch aktivierte Liganden verschoben wird- dieser Effekt wäre im Ephrin A5-KO verstärkt. Die beiden letztgenannten theoretisch möglichen Wirkungen der erhöhten Expression von EphB6 hätten eher einen modifizierenden Charakter.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist erkennbar, dass durch die Regulation der Expression im Ephrin/Eph-Rezeptor-System eine Kompensation und Modulation erreicht werden könnte. Kompensatorische Effekte und molekulare Adaptationen sind bereits für andere Rezeptor-Liganden-Systeme beschrieben worden. Im Hippocampus von Somatostatin (Sst) -KO-Mäusen sind beispielsweise der Sst-Rezeptor 2 und Cortistatin 14 (ein Ligand, der mit ähnlicher Affinität wie Sst an die Sst-Rezeptoren bindet) heraufreguliert (Cammalleri et al., 2006). Hier wird eine direkte Kompensation des fehlenden Sst erzielt. Ein weiteres Beispiel ist die erhöhte Expression des NeuropeptidY-Rezeptor2 (YR2) im Gehirn von YR1-KO-Mäusen, die auch dafür verantwortlich ist, dass der Phänotyp der YR1-KO-Mäuse nicht mit der pharmakologischen Funktion des Rezeptors übereinstimmt (Wittmann et al., 2005). Als drittes Beispiel sei die differentielle Regulation von Dopamin-Rezeptoren erwähnt. Der D2-Rezeptor ist in den Basalganglien von D1- und D3-Rezeptor-KO-Mäusen heraufreguliert (Short et al., 2006). Dagegen sind in Mäusen, denen der Dopamin-Transporter fehlt und die aufgrund dessen eine erhöhte Konzentration von Dopamin aufweisen, die D1- und D2-Rezeptoren herunterreguliert (Fauchey et al., 2000).

Neben Hinweisen auf Kompensationsmechanismen zeigt diese Arbeit auch, dass die Expression der Ephrine und ihrer Rezeptoren plastisch ist und eine von der kortikalen Schicht unabhängige Regulation existieren muss. Die Hypothese über die Plastizität in der Expression wurde durch Yun et al. (2003) aufgestellt, die nachwies, dass die Lokalisation von Ephrin A5-mRNA im Kortex aus einer *in vitro* Kultur gegenüber der Situation *in vivo* verändert war. Die Autoren vermuteten, eine Abhängigkeit der Expression dieses Liganden von thalamischen und/oder interkortikalen Eingängen. Das hieße, dass sich eine fehlende oder veränderte synaptische Aktivität auf die Expression von Ephrinen auswirken kann.

Ob die differentielle Expression von Ephrin A2, EphA5 und EphB6 tatsächlich aufgrund eines Kompensationsmechanismus auftritt oder ob sie indirekt durch veränderte synaptische Aktivität und Innervation bewirkt wird, könnte in einem Ansatz, indem die Expression von Ephrin A5 zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung durch *In vivo*-Injektion von antisense RNA inhibiert wird, untersucht werden.

4.2.2 Zwei Komponenten aus der Integrin –vermittelten Signaltransduktion sind im Ephrin A5-knockout differentiell exprimiert

Zwei Schlüsselkomponenten der Integrin-vermittelten Signaltransduktionswege- das auch als Integrin-assoziiertes Protein (IAP) bekannte CD47 und Pak3 (p21-aktivierte Kinase 3)- waren im Ephrin A5-KO 2-fach heraufreguliert. Beide Moleküle waren im Kortex in allen Schichten exprimiert, die stärkste Expression von Pak3 war hauptsächlich in S1-S5 zu finden, die von CD47 in allen Schichten jedoch in der oberen S5 weniger stark. Die Lokalisation der Expression war in WT- und KO-Kortex identisch (Abb.35). Wie könnte ein funktioneller Knockout im Ephrin/Eph-Rezeptorsystem die Expression von Molekülen beeinflussen, die an Integrin-vermittelter Adhäsion beteiligt sind? Eine Möglichkeit wäre, dass ein *Crosstalk* zwischen diesen beiden Systemen bestehen könnte, eine andere, dass die höhere Expression dieser beiden Komponenten ein sekundärer Effekt sein könnte, der aus dem veränderten Verhalten der Zellen im Kortex der Ephrin A5-KO-Mäuse resultiert. Integrin und CD47 kommen in supramolekularen Komplexen vor, die in *Lipidrafts* lokalisiert sind (Rebres et al., 2001), wo auch Ephrine und Eph-Rezeptoren exprimiert werden, demnach wäre ein *Crosstalk* möglich. Als ein *Downstream*-Effektor aktivierter Integrinkomplexe, die CD47 enthalten (Webb et al., 2003), ist Pak3, wie auch die Ephrine, mit *Postsynaptic Density* –Proteinen (PSD) assoziiert und wurde an Synapsen und in Axonen, insbesondere in *Growth cones*, nachgewiesen (Zhang et al., 2005, Zhao und Manser 2005, Hing et al., 1999). Es sind auch Interaktionen zwischen Ephrinen bzw. Eph-Rezeptoren, der Modulation der Integrinaktivität und Zelladhäsion beobachtet worden (Prévost et al., 2005, Miao et al., 2004, Zou et al., 1999). Pasquale et al. (2005) beobachteten zudem, dass aktivierte EphA-Rezeptoren eine Inhibition der GTPase Rac und damit verbunden eine Suppression von Pak bewirkte, infolgedessen vermindert zelluläre Fortsätze ausgebildet wurden. Aktivierte Eph-Rezeptoren bewirken außerdem eine Phosphorylierung von Ephexin (*Eph-interacting exchange factor*), einem Guaninnukleotid-Austauschfaktor für Rho-GTPasen, was wiederum eine Inaktivierung von Pak verbunden mit *Growth cone*-Kollaps oder Repulsion zur Folge hat (Sahin et al. 2005, Schmucker und Zipursky 2001). Bereits 1999 haben Bagrodia und Cerione ein Modell vorgeschlagen, nachdem Pak-Proteine *downstream* in Signalkaskaden, die durch aktivierte Rezeptortyrosinkinasen (zu denen auch die Eph-Rezeptoren gehören), durch Integrinkomplexe und durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren induziert werden, wirksam sind.

Wie könnte nun im untersuchten Modell die Vernetzung zwischen Ephrin/Eph-Rezeptor-vermittelten und Integrin-induzierten Signalkaskaden erfolgen? Die Möglichkeiten, die sich unter Einbeziehung

der regulierten Gene CD47 und Pak3 ergeben könnten, sind in der Abbildung 47 schematisch aufgezeigt.

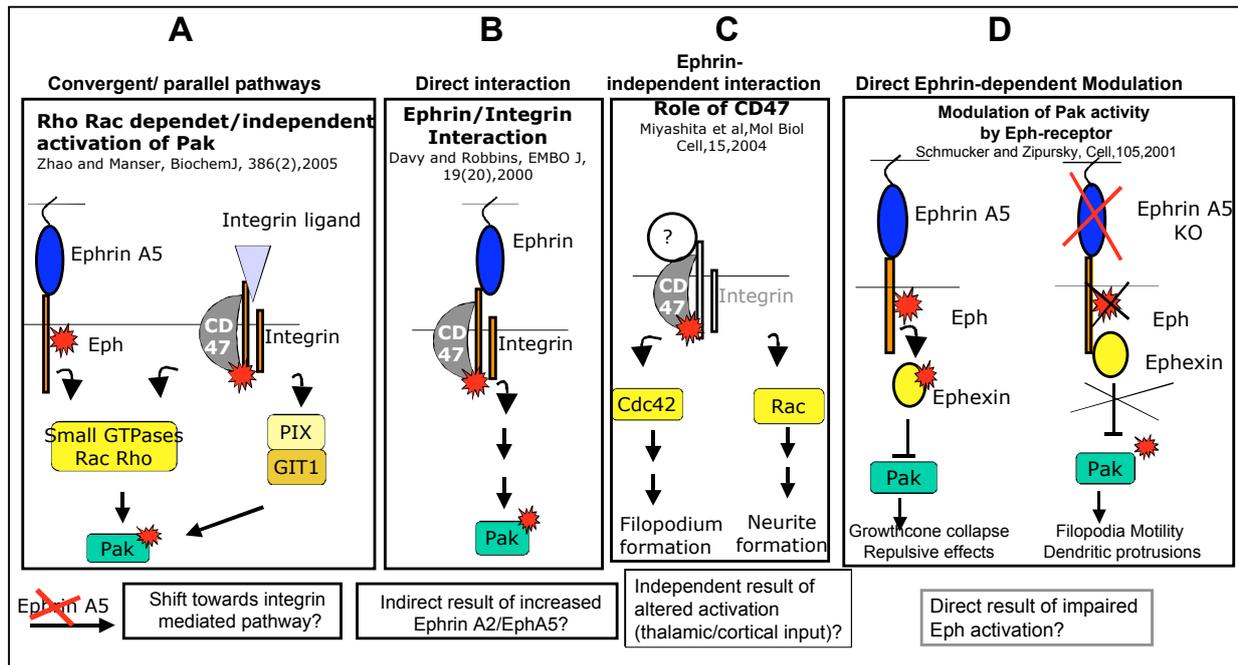


Abb.47: Schematische Darstellung der Interaktionen von CD 47 und Pak3 im Modellsystem des Ephrin A5-KO-Kortex; weitere Erläuterungen im Text, Abschnitt 4.2.2

(A) Die Aktivierung von Pak3 über die GTPasen Rac und Rho kann in im konvergierenden Mechanismus sowohl durch aktivierte Eph-Rezeptoren als auch durch aktivierte Integrin-Komplexe erfolgen. In einem zum Ephrin/Eph-System parallelen Signaltransduktionsweg allerdings kann eine Pak3-Aktivierung auch unabhängig von Rac/Rho erfolgen, nämlich über PIX/GIT-Komplexe, welche durch Integrin/CD47 aktiviert werden (Zhao und Manser 2005). In diesem Fall könnte eine erhöhte Expression von Pak3 (und CD47) eine Verschiebung des Signaltransduktionsweges zur Integrin-vermittelten Signalkaskade widerspiegeln. (B) Davy und Robins (2000) haben vorgeschlagen, dass Integrinkomplexe auch direkt durch Interaktion mit Ephrin A5 aktiviert werden können. Eine höhere Pak3- und CD47-Expression könnte in diesem Fall Ausdruck verstärkter Integrinaktivierung durch im Ephrin A5-KO vermehrt exprimiertes Ephrin A2 sein. (C) In CD47-überexprimierenden Neuroblastomazellen wurde eine unabhängig von aktivierten Integrin- und Eph-Rezeptor-induzierten Signalwegen Beeinflussung von Zellfortsätzen beschrieben (Miyashita et al., 2004). Die *downstream* Aktivierung von Cdc42 bewirkt die Ausbildung von Filopodien, die *downstream* Aktivierung von Rac verstärkt die Ausbildung von Neuriten. Nachdem die Sternzellen der S4 im somatosensorischen Kortex von ca. einer Woche alten Ephrin A5-KO-Mäusen vermehrt dendritische Filopodien aufwiesen als WT-Tiere (A. Güllmar, unveröffentlichte Daten), könnte sich dieses Verhalten in der Zunahme der Expression von CD47 widerspiegeln. (D) Über Ephexin ist eine direkte Verknüpfung der Eph-Rezeptortyrosinkinasen mit GTPasen der Rho-Familie und mit Pak3 gegeben (Shamah et al., 2001). Aktivierte Eph-Rezeptoren aktivieren wiederum das konstitutiv an den C-Terminus der Kinasedomäne

von Eph-Rezeptoren gebundene Ephexin, wodurch eine Inaktivierung von Pak, verbunden mit *Growth cone*-Kollaps oder repulsiven Effekten, erfolgt (Übersicht in Schmucker und Zipursky 2001). Im Ephrin A5-KO könnte sich eine verminderte Eph-Rezeptor-Aktivierung (aufgrund des fehlenden Liganden Ephrin A5) in einer verringerten Ephexin-induzierten Inaktivierung von Pak auswirken.

In jedem Fall belegen die Daten der vorgelegten Arbeit, dass eine Verknüpfung des Ephrin/Eph-Rezeptor-Systems mit anderen, die Adhäsion und Zellmotilität beeinflussenden Systemen, wie der Integrin-vermittelten Signaltransduktion, existiert. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die zelluläre Lokalisation von Pak3 und den Aktivierungsstatus von Pak3 und CD47 im Ephrin A5-KO-Modell zu untersuchen. Die Beteiligung von Integrinen an Zelladhäsion im Sinne einer juxtakrinen Rezeptoraktivierung, die durch Ephrin B1 und EphB1 vermittelt wird, wurde von Huynh-Do et al. (1999) *in vitro* anhand von Zellkulturen nachgewiesen. Für die A-Ephrine ist eine solche Verkettung bisher nicht beschrieben worden, die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit deuten aber auf die Möglichkeit einer solchen Wechselbeziehung hin.

4.3 ETV1 ist im Ephrin A5-KO heraufreguliert- ein Zeichen für verzögerte Reifung?

Der Transkriptionsfaktor Etv1 (*ETS-variant 1*) war im Ephrin A5-KO 2-fach höher exprimiert als im WT. Etv1 (auch als ER81 bekannt) gehört zur Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren. In Übereinstimmung mit Hevner et al. (2003) und Yoneshima et al. (2006) wurde die Expression von Etv1 durch *In situ*-Hybridisierung in der kortikalen Schicht 5 festgestellt (Abb.34). Die Lokalisation der Etv1-expression veränderte sich im Ephrin A5-KO nicht (Abb.35). Wenn auch bisher nicht bekannt ist, welche Gene durch Etv1 reguliert werden, gibt es doch Hinweise aus Knockout-Studien, dass Etv1 essentiell für die Ausbildung funktioneller motorsensorischer Schaltkreise im Rückenmark ist (Hippenmeyer et al., 2005). In Etv1-KO-Tieren konnten propriozeptive Afferenzen vom Typ 1a keine synaptischen Kontakte mit spinalen Motorneuronen aufbauen und auch die Projektion zum ventralen Rückenmark war gestört (Arber et al., 2000). Kürzlich sind von Yoneshima et al. (2006) die Projektionsziele der Etv1-positiven Pyramidenzellen der S5 im somatosensorischen Kortex charakterisiert worden. Demnach projiziert etwa ein Drittel dieser Zellen zum kontralateralen somatosensorischen Kortex, der Hauptanteil projiziert jedoch zu subkortikalen Zielen, wie dem Thalamus und dem superioren Colliculus. Yoneshima et al. schlugen vor, dass Etv1 die Ausbildung der Projektion von der S5 im Kortex zum superioren Colliculus reguliert. Es wäre möglich, dass im Ephrin A5-KO Veränderungen dieser Projektionen auftreten könnten. Da dieser Prozess in einem definierten Zeitfenster während der frühen Entwicklung vonstatten geht, und die Expression von Etv1 innerhalb der ersten zwei postnatalen Wochen stark abnimmt (Yoneshima et al., 2006), könnte die höhere Expression im Ephrin A5-KO zudem auf einer Verzögerung in der Entwicklung der genannten Projektionen beruhen. Eine Zeitstudie der Expression von Etv1 in Ephrin A5-KO-Tieren könnte hier Aufschluss geben. Weiterhin könnten durch Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) und

anschließender PCR und Sequenzierung der Amplikons, einer in letzter Zeit etablierten Methode zur Detektion von chromatinassoziierten Proteinen (Ren und Dynlacht, 2004), die Zielgene von Etv1 untersucht werden. Auch eine Kombination von CHIP und Microarray-Analyse der zuvor crossgelinkten DNA-Fragmente könnte die durch Etv1 regulierten Gene genomweit untersuchen (Shannon und Roa, 2002).

4.4 Die Deregulation von Calretinin im Ephrin A5-KO und transiente Expression in Pyramidenzellen des S1-Kortex deuten auf einen Zusammenhang zwischen funktioneller Reifung der Pyramidenzellen und dem Kalziumhaushalt hin

Die Expression von Calretinin (CR), einem zur Gruppe der EF-Hand-Proteine gehörenden Ca-Bindeprotein (Schwaller et al., 2002), war im Ephrin A5-KO 2-3-fach herabgesetzt. Die spezifische Expression von CR und anderen Ca-bindenden Proteinen (Parvalbumin, Calbindin, Calmodulin) charakterisiert unterschiedliche Subpopulationen GABA-erger Interneurone im visuellen und frontalen Kortex (Gonchar und Burkhalter 1997, Kubota et al., 1994). Die Hauptquelle der GABA-ergen Interneurone sind die ganglionischen Eminenzen (GE) im ventralen Telencephalon (Tamamaki et al., 1997, Lavdas et al., 1999, Nery et al., 2002, Marin und Rubenstein 2001). Durch *In situ*-Hybridisierung, immunhistologische Untersuchungen und Western Blot- Analysen wurde nachgewiesen, dass die Lokalisation und die Anzahl der CR-exprimierenden Neurone sich zwischen WT und KO nicht unterscheiden, die Zellen jedoch weniger mRNA und weniger CR-Protein exprimieren. Die Mehrzahl der CR-positiven Zellen wurden als Projektionsneurone der Schicht 5a identifiziert (3.2.8). Demnach ist eine mögliche Erklärung auszuschließen, dass durch das Fehlen von Ephrin A5 in der VZ der GE (Abb.21) in embryonalen Stadien die tangentielle Migration GABA-erger Interneurone beeinflusst wurde. Mithilfe von retrogradem *Tracing* konnten ca. 20% der CR-exprimierenden Neurone als kortikothalamische Projektionsneurone identifiziert werden (Abb.42). Die restlichen CR-positiven Neurone waren weder durch Injektion in den kontralateralen S1-Kortex, in das Rückenmark im Bereich der Halswirbel oder in den dorsalen Thalamus markiert. Zeitlich wurde die Expression von CR in den Pyramidenzellen der Schicht 5a von P4 bis P12 beobachtet und war auf den somatosensorischen Kortex beschränkt (Abb.36). Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig eine für den somatosensorischen Kortex spezifische transiente Expression von CR in Pyramidenzellen. Daraus ergibt sich die Frage nach der Funktion von CR in diesen Zellen während der Entwicklung.

CR ist ein Ca^{2+} -Puffer, der aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften in der Lage, den Ca^{2+} -peak herabzusetzen, während die präsynaptischen Ca^{2+} -Kanäle noch geöffnet sind und die Freisetzung von Ca^{2+} zu erhöhen, nachdem die Ca^{2+} -Kanäle wieder geschlossen wurden (Edmonds et al., 2000, Wu et al., 1996, Roberts, 1994). Entsprechend haben Edmonds et al. (2000) CR als einen schnellen und mobilen Ca^{2+} -Puffer charakterisiert. Ein Zusammenhang zwischen dem Kalziumhaushalt und der Spinemorphologie wurde mehrfach in der Literatur erwähnt. Korkotian und Segal (1999) beschrieben

z.B., dass eine Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} in kultivierten Neuronen des Hippocampus eine schnelle Zunahme der Größe schon vorhandener Spines sowie eine Spineneubildung induzierte. In KO-Mäusen, denen Calbindin (CB), ebenfalls ein Ca^{2+} -bindendes Protein fehlt, waren Länge und Volumen von Spines der Purkinjezellen größer als in WT-Mäusen (Vecellio et al., 2000). In unserer Arbeitsgruppe wurde passend zu den erwähnten Beobachtungen festgestellt, dass im Ephrin A5-KO die Anzahl von dendritischen Fortsätzen von Sternzellen der Schicht 4 transient erhöht war (A.Güllmar, unpublizierte Daten). Aufgrund der beschriebenen Rolle von CR im Ca^{2+} -Haushalt sowie der Koinzidenz von zeitlichem Verlauf der Expression und der Reifung von funktionalen neuronalen Verknüpfungen, ist eine besondere Funktion dieses Proteins bei neuronalen Reifungsprozessen anzunehmen. Unterstützt wird diese Vermutung durch die von Frassoni et al. (1998) veröffentlichte Beobachtung, dass auch im Thalamus eine transiente Expression von CR, die von embryonalen bis zu frühen postnatalen Stadien andauert, existiert. Auch in menschlichen Adenokarzinomzellen wurde eine Veränderung der CR-Expression in Abhängigkeit von der Differenzierung durch Cargnello et al. (1996) beschrieben. Die verminderte Expression von CR in Ephrin A5-KO-Mäusen könnte eine eingeschränkte Fähigkeit (oder Notwendigkeit- wenn z.B. eine bestimmte Innervation nicht erfolgt) zur Modulation des Ca^{2+} -Haushaltes der Zellen widerspiegeln. Ob es Unterschiede im Ca^{2+} -Haushalt der Pyramidenzellen im KO zum WT gibt, könnte durch Kalziumimaging festgestellt werden. Auch durch Deprivation der thalamischen Eingänge und anschließende Untersuchung der CR-Expression könnte man Aufschluss über eine Beteiligung von CR an der funktionellen Reifung des neuronalen Netzwerkes erhalten.

4.5 Zusammenfassung

Die Eph-Rezeptoren und ihre membranständigen Liganden, die Ephrine, vermitteln durch Zell-Zell-Adhäsion bzw. –Repulsion die Lenkung von auswachsenden Axonen und migrierenden Zellen. Am Beispiel des thalamokortikalen Systems der *Rodentia* wurde beschrieben, dass einige Ephrine und Eph-Rezeptoren ein interareales *Mapping* der Axone auf dem Niveau des ventralen Telencephalons aber auch die Topografie der thalamischen Projektionen innerhalb eines kortikalen Areals ermöglichen, wo sie wiederum an der Ausbildung schichtspezifischer Projektion thalamischer Eingänge und kortikaler Schaltkreise beteiligt sind.

Diese Arbeit liefert am Modell des somatosensorischen Systems erstmals ein umfassendes und vergleichendes Expressionsscreening aller Ephrine und Eph-Rezeptoren an den für die Entwicklung wichtigen embryonalen und postnatalen Entwicklungsstadien mit Sonden bekannter Markierungseffizienz und getesteter Kreuzhybridisierungen. Hierdurch konnte das bestehende Wissen über die für die neuronale Entwicklung wichtigen Gene aus der Familie der Ephrine und Eph-Rezeptoren und mögliche Interaktionspartner, auch hinsichtlich des *Reverse Signaling*, erweitert werden. Insgesamt waren im Verlauf der Entwicklung im somatosensorischen System 7 Ephrin-Liganden und 11 Eph-Rezeptoren exprimiert; darunter 4 A-Ephrine und 6 EphA-Rezeptoren sowie alle B-Ephrine und EphB-Rezeptoren. Auffällig war, dass sowohl im Thalamus als auch im somatosensorischen Kortex die mRNA einiger Liganden und Rezeptoren entweder transient oder erst zu späteren Entwicklungsstadien nachweisbar war. Aus dem Expressionsspektrum kann ein „Ephrinkode“ für den dorsalen Thalamus und den parietalen Kortex, bestehend aus frühen, späten und kontinuierlich exprimierten Ephrinen und Eph-Rezeptoren, abgeleitet werden. Darüber hinaus waren der Projektionsweg thalamokortikaler Axone und die Ganglionischen Eminenzen, die intermediäres Projektionsziel für die Axone des Thalamus und zugleich Herkunftsort inhibitorischer Interneurone des Kortex sind, durch einzelne Ephrine und Eph-Rezeptoren gekennzeichnet. Am 6.Postnataltag, wo die Schichtung des Kortex nahezu komplett ist und die Projektion individueller Kerne des Thalamus zu den kortikalen Arealen vollzogen ist, zeichneten sich einzelne kortikale Schichten und thalamische Kerne durch ein spezifisches Expressionsmuster von Ephrinen und Eph-Rezeptoren aus. Auf der Grundlage des in dieser Arbeit vorgestellten Expressionskataloges im somatosensorischen System können *In vitro*-Assays entwickelt werden, um die funktionelle Bedeutung der Kandidatengene in der neuronalen Entwicklung zu untersuchen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Konsequenzen des funktionellen Knockouts von Ephrin A5 auf die Genexpression von ca. 12400 Transkripten am Modell des somatosensorischen Systems mithilfe von Affymetrix-GeneChips[□] untersucht. Die stringente Analyse der Expressionsarray-Daten zeigte, dass mindestens 1,4% der untersuchten Transkripte differentiell exprimiert wurden. Die meisten (130 Gene) konnten funktionellen Gruppen zugeordnet werden. Viele dieser Gengruppen stehen eng im Zusammenhang mit der Entwicklung und Funktion des Nervensystems. Für die Genfamilie der Ephrine und ihrer Rezeptoren wurden verschiedene mögliche

Kompensationsmechanismen aufgedeckt. Innerhalb des Ephrin/Eph-Rezeptor-Systems waren allein drei Gene heraufreguliert (Ephrin A2, EphA5 und EphB6). Die differentielle Expression von Ephrin A2 und EphA5 erfolgte schichtspezifisch und könnte einen adaptiven Mechanismus für das Fehlen des Liganden Ephrin A5 darstellen. EphB6 war generell höher exprimiert, was über die Modulation der Signaltransduktion ebenfalls eine Kompensation des Ephrin A5-KO bewirken könnte. Die Expressionsanalyse gab zudem Hinweise, dass eine Wechselwirkung zwischen Integrin-vermittelter Signaltransduktion und Ephrin/Eph-Rezeptor-induzierten Signalwegen existiert. Die differentielle Expression des Transkriptionsfaktors Etv1 und des Kalziumbindeproteins Calretinin (Cr) deuten auf Veränderungen im funktionellen Reifungsprozess des kortikalen Netzwerkes hin. In der vorgelegten Arbeit wird in diesem Zusammenhang erstmalig beschrieben, dass Cr während der Ausbildung der neuronalen Verknüpfungen transient von Projektionsneuronen in der Schicht 5a des S1-Kortex exprimiert wird. Demnach könnte Cr eine spezifische Funktion im neuronalen Reifungsprozess haben. Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit, dass der Knockout eines einzigen entwicklungsrelevanten Gens eine verhältnismäßig große Deregulation der Genexpression bewirkt. Diese Regulation erfolgt nicht generell, sondern betrifft spezifische Gengruppen. Bei der Interpretation der phänotypischen Auswirkungen eines solchen Knockouts auf die Entwicklung des Gehirns sollten daher nicht nur das deletierte Gen an sich, sondern auch funktionell assoziierte Gene betrachtet werden. Somit könnten die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen auch genutzt werden, um ein Modellsystem für monogentisch bedingte Erkrankungen zu entwickeln.

5. Anhang

5.1 Abkürzungen

Es wurden die Symbole der chemischen Elemente und SI-Einheiten verwendet. Wenn nicht näher ausgeführt, wurden Gennamen und Symbole von der *NCBI GenBank* übernommen.

bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CP	kortikale Platte
cRNA	komplementäre RNA
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DiA	4-(4-(dihexadecylamino)styryl)- <i>N</i> -methylpyridiniumiodid
DIG	Digoxigenin
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat
DLG	dorsales laterales Genikulatum
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
ds	Doppelstrang
dT	dorsaler Thalamus
E (14)	Embryonaltag (14)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAPDH	Glyzeraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GE	ganglionische Eminenzen
GO	<i>Gene ontology</i>
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hanks' Balanced Salt solution
IZ	Intermediärzone
KO	Knockout
LCtx	lateraler Kortex
LGE	laterale GE
log ₂	dualer Logarithmus
MABS	Maleinsäure-gepufferte Saline
MGE	mediale GE
mRNA	Messenger RNA

NE	Neuroepithel
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
OD	optische Dichte
P (1)	Postnataltag (1)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
Po	posteriore thalamische Kerne
poly-A+-RNA	polyadenylierte RNA
qRT-PCR	quantitative RealTime-PCR
RIP	Rang-Intensitätsplot
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR nach reverser Transkription von RNA
S1	primärer somatosensorischer Kortex
SAM	sterile alpha motif
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SP	Subplate
ss	Einzelstrang
SSC	Natriumcitrat-gepufferte Kochsalzlösung
SVZ	Subventrikulärzone
T _m	Schmelztemperatur
tRNA	transfer RNA
U	unit (Enzymaktivität)
UV	ultraviolettes Licht
VB	ventrobasaler Komplex
VLG	ventrales laterales Genikulatum
VT	ventrales Telencephalon
v/v	volume per volume
VZ	Ventrikulärzone
WT	Wildtyp
w/v	weight per volume

5.2 Tabellen

Tab.8: Signalintensitäten, Detection calls und dazugehörige Detection- p-values der Kontrolltranskripte bioB, bioC, bioD und cre für die Microarray-Experimente WT1, WT2, KO1 und KO2.

probe set ID	AFFX-BioB-5_at	AFFX-BioB-M_at	AFFX-BioB-3_at	AFFX-BioC-5_at	AFFX-BioC-3_at	AFFX-BioDn-5_at	AFFX-BioDn-3_at	AFFX-CreX-5_at	AFFX-CreX-3_at
Signal WT1	142	270	162,7	436,5	431,9	410,2	1802,2	4249,5	5750,7
Detection WT1	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Det. P-value WT1	0,002867	0,000081	0,000225	0,000147	0,000052	0,00007	0,000081	0,000044	0,000044
Signal WT2	139,7	324,3	154,6	468,7	342,9	287,6	1761,9	2891,1	4069,2
Detection WT2	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Det. P-value WT2	0,005565	0,000127	0,00141	0,000127	0,00006	0,000095	0,000127	0,000044	0,000147
Signal KO1	192,2	425,1	232,3	612,3	604,2	602	2711,1	5618	7473
Detection KO1	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Det. P-value KO1	0,002867	0,000044	0,000169	0,000169	0,000044	0,00011	0,00006	0,000066	0,000044
Signal KO2	181,8	363,7	120	484,1	407,7	364,1	1603,9	2716,3	4152,8
Detection KO2	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Det. P-value KO2	0,006187	0,000297	0,00141	0,000297	0,000052	0,00011	0,000107	0,000044	0,000098

Tab.9: Signalintensitäten, Detection calls, dazugehörige Detection- p-values und 3'/5' ratios für die internen Kontrollen der housekeeping-Gene β -Aktin und GAPDH für die Microarray-Experimente WT1, WT2, KO1 und KO2.

probe set ID	AFFX-b-ActinMur/M1 2481_5_at	AFFX-b-ActinMur/M1 2481_M_at	AFFX-b-ActinMur/M 12481_3_at	3'/5'ratio	AFFX-GapdhMur/M 32599_5_at	AFFX-GapdhMur/M 32599_M_at	AFFX-GapdhMur/M 32599_3_at	3'/5'ratio
Signal WT1	2898,5	4587,6	5200,7	1,794	4638,1	4714,2	4297,9	0,927
Detection WT1	P	P	P		P	P	P	
Det. P-value WT1	0,000044	0,000044	0,000044		0,000044	0,000044	0,000044	
Signal WT2	4253,9	5367,5	4974,3	1,169	3934,8	3911,6	3920,7	0,996
Detection WT2	P	P	P		P	P	P	
Det. P-value WT2	0,000098	0,000066	0,000737		0,000044	0,000098	0,000044	
Signal KO1	2371,1	4145,1	5592,3	2,359	3251	4599,7	5019,9	1,544
Detection KO1	P	P	P		P	P	P	
Det. P-value KO1	0,000044	0,000044	0,000044		0,000044	0,000044	0,000044	
Signal KO2	2960,8	3908,5	4008,5	1,354	3866	4004,3	3736	0,966
Detection KO2	P	P	P		P	P	P	
Det. P-value KO2	0,000044	0,000066	0,000098		0,000044	0,000066	0,000098	

Tab.12: Signalwerte, Detection-calls und Detection-p- values für alle auf dem Affymetrix- GeneChip MGU74A repräsentierten Eph- und Ephrin Gene von den Experimenten WT1, WT2, KO1, KO2.

probe set ID	Gene Symbol	Signal WT1	Detection WT1	Det.p-value WT1	Signal WT2	Detection WT2	Det.p-value WT2	Signal KO1	Detection KO1	Det.p-value KO1	Signal KO2	Detection KO2	Det.p-value KO2
102869_at	Efna2	67,5	P	0,013092	88,1	P	0,008689	118	P	0,031336	119	P	0,019304
100289_at	Efna3	594,7	P	0,001602	468,6	P	0,003585	526,8	P	0,003585	465,6	P	0,000805
160857_at	Efnb2	287,1	P	0,000266	249,4	P	0,000388	287,6	P	0,000266	311,9	P	0,000219
94160_at	Efnb3	166,7	P	0,002617	248,1	P	0,00418	158,2	P	0,021866	189,6	P	0,009985
103692_at	Efnb3	551,8	P	0,000219	893,6	P	0,000388	616	P	0,000468	957,5	P	0,000388
104673_at	Epha4	92,9	P	0,001354	96	P	0,001892	85,7	P	0,009985	135,6	P	0,001354
161119_at	Epha5	81,9	P	0,000266	123	P	0,000959	177,8	P	0,000468	136,2	P	0,000468
92906_at	Epha7	83	P	0,001602	89,7	P	0,009985	128,8	P	0,003067	114,2	P	0,006532
102682_at	Epha8	167,7	P	0,002228	153,3	P	0,002617	160,3	P	0,003067	199	P	0,001892
98771_at	Ephb2	44,7	P	0,021866	73,1	P	0,014937	34,2	A	0,138765	80,9	P	0,019304
102871_at	Ephb6	514,9	P	0,001892	420,1	P	0,001141	671,9	P	0,001354	595,9	P	0,003585
103007_at	Efna1	11,8	A	0,732537	6,5	A	0,872355	7,4	A	0,849473	5,4	A	0,956032
103041_at	Efna4	5,6	A	0,837065	9	A	0,697453	10,1	A	0,765443	6,3	A	0,872355
99887_at	Efna5	2,5	A	0,824011	2,7	A	0,849473	13,2	A	0,67917	13,6	A	0,660442
98407_at	Efnb1	40,8	A	0,081337	96,7	A	0,089405	46,7	A	0,304618	81,6	A	0,234557
103980_at	Epha2	8,8	A	0,88284	12,3	A	0,849473	8,1	A	0,918663	16,9	A	0,910595
95298_at	Epha3	8,5	A	0,541184	22,9	A	0,302547	28,9	A	0,47938	34	A	0,660442
161866_at	Epha4	7,6	A	0,849473	6,6	A	0,67917	28,1	A	0,378184	5,2	A	0,715253
98376_at	Epha5	19,9	A	0,189687	8	A	0,561639	17,6	A	0,438361	8,3	A	0,561639
101122_at	Epha6	28,4	A	0,060419	29,1	A	0,35869	21,1	A	0,378184	44,4	A	0,302547
92905_at	Epha7	1,8	A	0,88284	2,3	A	0,781017	4,2	A	0,715253	2	A	0,849473
93469_at	Ephb3	13,3	A	0,418069	13,9	A	0,581931	31,3	A	0,418069	23,9	A	0,438361
162371_r_at	Ephb6	67,4	A	0,150527	125,3	A	0,098054	117,3	A	0,162935	120,5	A	0,107301

Tabelle 21: Im Ephrin A5-KO heraufregulierte Gene

Probe set ID	Representative Public ID/NCBI	Gene Title	Gene Symbol	mean log ₂ ratio	sdm
100496_at	U79523	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	Pam	2,12	2,05
161360_at	AV212241	ornithine decarboxylase antizyme	Oaz1	1,75	0,44
95466_at	AI837006	coactosin-like 1 (Dictyostelium)	Cot1	1,55	0,34
100062_at	X62154	minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae)	Mcm3	1,43	1,26
92922_at	U17291	transcription factor AP-2, alpha	Tcfap2a	1,30	0,53
97895_f_at	AW125218	histone aminotransferase 1	Hat1	1,24	1,22
96047_at	U63146	retinol binding protein 4, plasma	Rbp4	1,09	1,07
96106_at	AW049122	Ribonuclease H2, large subunit	Rnaseh2a	1,09	1,08
104418_at	AA796868	DNA segment, Chr 6, ERATO Doi 365, expressed	D6Erd365e	1,09	0,40
93378_at	X07439	homeo box C8	Hoxc8	1,05	0,36
94780_at	AI987985	zinc finger and BTB domain containing 20	Zbtb20	1,02	0,19
161021_at	U39738	p21 (CDKN1A)-activated kinase 3	Pak3	0,96	0,30
92927_at	L10426	ets variant gene 1	Etv1	0,95	0,31
95324_at	AF053471	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 2	Atp2b2	0,95	0,46
98332_at	U11860	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 9	Kcnj9	0,93	0,03
162260_at	AV341723	RIKEN cDNA 6330407G11 gene	6330407G11Rik	0,93	0,28
160083_at	M63335	Lipoprotein lipase	Lpl	0,92	0,17
92339_at	Y09972	TATA box binding protein (Tbp)-associated factor, RNA polymerase I, A	Taf1a	0,92	0,46
97788_at	U02880	keratin complex 1, acidic, gene 12	Krt1-12	0,92	0,59
103088_at	X94310	cell adhesion molecule with homology to LICAM	Ch1	0,90	0,50
99440_at	Y07686	nuclear factor I/B	Nfib	0,89	0,12
97458_at	AI845935	LOC433812	LOC433812	0,88	0,18
160190_at	U10355	synaptotagmin 4	Syt4	0,88	0,10
103611_at	AB012693	CD47 antigen (Rh-related antigen, integrin-associated signal transducer)	Cd47	0,86	0,46
161171_at	AV226788	dual specificity phosphatase 8	Dusp8	0,86	0,24
102849_at	D88159	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	Kcnj8	0,86	0,16
162176_r_at	AV008547	similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	LOC436040	0,85	0,99
161084_at	AI603944	zinc finger protein 612	Zfp612	0,85	0,37
95770_s_at	AF071179	formyl peptide receptor-like 1	Fpr1	0,82	0,77
95079_at	M57683	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	Pdgfra	0,82	0,37
92717_at	U28068	neurogenic differentiation 1	Neurod1	0,81	0,39
92893_at	D90173	---	---	0,81	0,62

104201_at	AA718649	placental specific protein 1	Plac1	0,81	0,34
92371_at	AI505355	histidine rich calcium binding protein	Hrc	0,80	0,65
99830_at	AI853573	kalirin, RhoGEF kinase	Kalrn	0,80	0,40
100885_at	AF013166	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2	Nek2	0,80	0,19
93614_at	AA600647	Ras-related GTP binding D	Rragd	0,78	0,01
100897_f_at	AF100956	---	---	0,77	0,48
160768_at	AI461837	hypothetical protein D030056L22	D030056L22	0,77	0,15
103757_at	AA755810	expressed sequence AA589481	AA589481	0,76	0,29
103752_r_at	AW227545	striatin, calmodulin binding protein	Strn	0,76	0,48
95608_at	AI851255	cathepsin B	Ctsb	0,76	0,55
93413_at	AF003000	telomeric repeat binding factor 2	Terf2	0,76	0,29
93516_at	M25825	Transcribed locus, strongly similar to NP_033368.1 t-complex testis expressed 1 [Mus musculus]	---	0,76	0,15
93669_f_at	AW107922	---	---	0,75	0,18
102812_i_at	AW210346	ubiquitin-activating enzyme E1-domain containing 1	Ube1dc1	0,74	0,19
93169_at	AW212708	---	---	0,73	0,50
102770_at	M26385	glycophorin A	Gypa	0,73	0,29
92703_at	AI325791	RIKEN cDNA 2310032M22 gene	MGI:1923998	0,72	0,47
98512_at	AF091234	Btg3 associated nuclear protein	Banp	0,71	0,07
93836_at	AF041054	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1, NIP3	Bnip3	0,69	0,40
104265_at	X70842	kinase insert domain protein receptor	Kdr	0,69	0,78
96092_at	M96827	Haptoglobin	Hp	0,67	0,68
94228_at	AW123788	exportin 1, CRM1 homolog (yeast)	Xpo1	0,67	0,44
93299_at	AF031087	mutS homolog 6 (E. coli)	Msh6	0,67	0,22
97548_at	AI155120	PRP39 pre-mRNA processing factor 39 homolog (yeast)	Prpf39	0,66	0,02
99597_at	AI841629	guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 2	Gnai2	0,65	0,22
160859_s_at	Y07685	nuclear factor I/B	Nfib	0,65	0,48
102942_at	AA683785	RIKEN cDNA 2810012G08 gene	2810012G08Rik	0,64	0,45
98525_f_at	AJ007909	erythroid differentiation regulator 1	MGI:2384747	0,63	1,03
104444_at	AA689927	RIKEN cDNA 9430098E02 gene	9430098E02Rik	0,62	0,60
102100_f_at	AI845835	---	---	0,61	0,52
98477_s_at	L40632	ankyrin 3, epithelial	Ank3	0,61	0,60
93667_at	AW120511	F-box and WD-40 domain protein 7, archipelago homolog (Drosophila)	Fbxw7	0,61	0,49
161287_f_at	AV025391	MYB binding protein (P160) 1a	Mybbp1a	0,59	0,45
97967_at	AA881438	plexin D1	Plxnd1	0,48	0,83
104136_at	AI840413	discs, large homolog-associated protein 4 (Drosophila)	Dlgap4	0,40	0,60
94464_at	AF029347	chloride channel 3	Clcn3	0,40	0,20

Tabelle 22: Im Ephrin A5-KO herunterregulierte Gene

Probe set ID	Representative Public ID/NCBI	Gene Title	Gene Symbol	mean log ₂ ratio	sdm
101887_at	AF045887	Angiotensinogen	Agt	-3,67	1,07
94200_at	Z48800	gastrulation brain homeobox 2	Gbx2	-2,93	1,53
104169_at	D32167	zinc finger protein of the cerebellum 1	Zic1	-2,6	0,64
95656_i_at	AW125164	DNA segment, Chr 13, Wayne State University 177, expressed	D13Wsu177e	-2,28	0,58
96156_at	AA874329	RIKEN cDNA 1110008H02 gene	1110008H02Rik	-2,25	0,97
95350_at	D00073	Transthyretin	Ttr	-2,2	2,15
99040_at	X66119	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	Slc6a4	-2,1	1,65
99042_s_at	U66918	short stature homeobox 2	Shox2	-2,01	0,28
103085_at	AB013095	Heme binding protein 1	Hebp1	-1,8	1,14
93701_at	AA982124	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5	Smarca5	-1,68	1,01
103066_at	L32973	thymidylate kinase family LPS-inducible member	Tyki	-1,68	0,27
99442_at	L34214	regulated endocrine-specific protein 18	Resp18	-1,6	0,44
95036_at	X73985	calbindin 2	Calb2	-1,54	0,61
104249_g_at	AW227650	signal sequence receptor, gamma	Ssr3	-1,44	0,81
100690_at	M69200	tyrosine hydroxylase	Th	-1,42	0,27
93483_at	J03023	hemopoietic cell kinase	Hck	-1,42	0,67
100569_at	M14044	annexin A2	Anxa2	-1,42	0,62
93615_at	AF020200	---	---	-1,27	0,11
92401_at	U27195	leukotriene C4 synthase	Ltc4s	-1,26	0,86
95939_i_at	AW047237	cDNA sequence BC052328	BC052328	-1,25	0,25
96696_at	AI837110	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins methyltransferase-like 2 (S. cerevisiae)	Hrmt112	-1,22	1,08
98521_at	AI847972	vesicle-associated membrane protein 3	Vamp3	-1,22	0,26
94305_at	U03419	procollagen, type I, alpha 1	Col1a1	-1,22	0,2
99032_at	AF009246	RAS, dexamethasone-induced 1	Rasd1	-1,19	0,79
98331_at	X52046	procollagen, type III, alpha 1	Col3a1	-1,18	0,48
97560_at	AF037437	Prosaposin	Psap	-1,15	0,82
160975_at	AI504338	---	---	-1,14	0,33
99501_at	AA882416	translocation protein 1	Tloc1	-1,08	0,17
93303_at	U64445	ubiquitin fusion degradation 1 like	Ufd1l	-1,08	0,89
95471_at	U22399	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	Cdkn1c	-1,08	0,63
92271_at	X63963	Paired box gene 6	Pax6	-1,07	0,52
98857_at	U29086	neurogenic differentiation 6	Neurod6	-1,07	0,42
99081_at	AF010254	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade G, member 1	Serping1	-1,07	0,43
101676_at	U13705	glutathione peroxidase 3	Gpx3	-1,06	0,27
102323_at	AJ002272	Huntingtin-associated protein 1	Hap1	-1,04	0,13
96580_at	AF020199	pre B-cell leukemia transcription factor 3	Pbx3	-1,02	0,26
97131_at	AW124615	serine/threonine kinase 11 interacting protein	Stk11ip	-1,01	0,07

100058_at	AW047776	RIKEN cDNA 2810453I06 gene	2810453I06Rik	-1,01	0,5
98530_at	AI849615	---	---	-1,01	0,14
97520_s_at	X83569	Neuronatin	Nnat	-1	0,59
93592_at	X82648	Apolipoprotein D	Apod	-0,99	0,37
102782_at	AI172819	RIO kinase 1 (yeast)	Riok1	-0,99	0,44
100372_at	X55272	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit gamma 1	Gabrg1	-0,98	0,56
92546_r_at	AB006361	prostaglandin D2 synthase (brain)	Ptgds	-0,98	0,19
94514_s_at	AI853439	archain 1	Arcn1	-0,97	0,34
96144_at	AJ001972	Inhibitor of DNA binding 4	Idb4	-0,96	0,38
98531_g_at	AI849615	Growth arrest specific 5	Gas5	-0,95	0,06
99876_at	U29056	Src-like adaptor	Sla	-0,93	0,78
104299_at	AI842472	zinc finger, DHHC domain containing 14	Zdhhc14	-0,93	0,46
95134_at	AW124483	Mid1 interacting protein 1 (gastrulation specific G12-like (zebrafish))	Mid1ip1	-0,92	0,3
160854_at	D76446	mitogen activated protein kinase kinase kinase 7	Map3k7	-0,92	0,27
100074_at	AW046723	transmembrane emp24 protein transport domain containing 9	Tmed9	-0,91	0,17
160264_s_at	AI836143	Purkinje cell protein 4-like 1	Pcp4l1	-0,91	0,82
99669_at	X15986	lectin, galactose binding, soluble 1	Lgals1	-0,91	0,28
99515_at	AW046293	Adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	Ap2b1	-0,91	0,36
160519_at	U26437	tissue inhibitor of metalloproteinase 3	Timp3	-0,9	0,58
103842_at	AJ007376	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	Ddx3y	-0,88	0,47
93972_at	AI837493	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2	Ndufs2	-0,88	0,07
94881_at	AW048937	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	Cdkn1a	-0,88	0,39
102259_at	AF058799	3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide	Ywhag	-0,87	0,36
160074_at	AF071068	Dopa decarboxylase	Ddc	-0,86	0,19
103536_at	AB017270	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2	Tmeff2	-0,86	0,29
102093_f_at	AI461979	splicing factor, arginine/serine-rich 4 (SRp75)	Sfrs4	-0,85	1,03
103269_f_at	AJ005350	zinc finger protein 125	Zfp125	-0,85	0,32
160732_at	AA726383	aminopeptidase-like 1	Npepl1	-0,84	0,15
98436_s_at	U54803	caspase 3, apoptosis related cysteine protease	Casp3	-0,84	0,22
92932_at	X61448	Cerebellin 1 precursor protein	Cbln1	-0,83	0,52
103294_at	U67188	regulator of G-protein signaling 5	Rgs5	-0,82	0,05
99056_at	AW046590	pterin 4 alpha carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha (TCF1) 1	Pcbd1	-0,82	0,58
92890_at	D29951	RIKEN cDNA C630002N23 gene	C630002N23Rik	-0,81	0,53
94708_at	U57345	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	Ptprn2	-0,78	0,21
92981_at	X68837	---	---	-0,78	0,63
98952_at	AW120971	DNA segment, Chr 8, ERATO Doi 325, expressed	D8Ert325e	-0,78	0,44

92614_at	M60523	Inhibitor of DNA binding 3	Idb3	-0,77	0,19
93088_at	X01838	beta-2 microglobulin	B2m	-0,75	0,19
96082_at	AI850644	mitochondrial ribosomal protein L30	Mrpl30	-0,74	0,5
95521_s_at	AB024005	zinc finger protein 68	Zfp68	-0,73	0,42
99608_at	U20611	Peroxiredoxin 2	Prdx2	-0,73	0,73
96634_at	AI850090	RIKEN cDNA 5730469M10 gene	5730469M10Rik	-0,72	0,3
160747_at	AI844739	regulator of G-protein signaling 3	Rgs3	-0,71	0,09
103035_at	U60020	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	Tap1	-0,71	0,51
103635_at	AI648925	---	---	-0,7	0,08
161441_f_at	AV350341	---	---	-0,68	0,39
98600_at	U41341	S100 calcium binding protein A11 (calizzarin)	S100a11	-0,68	0,73
160300_at	Z21858	trefoil factor 1	Tff1	-0,67	0,24
92346_at	X05640	neurofilament 3, medium	Nef3	-0,67	0,67
94622_at	U17252	glutamate receptor, metabotropic 8	Grm8	-0,67	0,22
95904_at	AI835760	RIKEN cDNA 6430543G08 gene	6430543G08Rik	-0,67	0,4
101741_at	AB003305	RIKEN cDNA 2810433D01 gene	2810433D01Rik	-0,66	0,4
103575_at	M55424	---	---	-0,65	0,63
94143_at	X02801	glial fibrillary acidic protein	Gfap	-0,65	0,56
160787_at	AW124900	RIKEN cDNA 1500010J02 gene	1500010J02Rik	-0,65	0,2
160561_at	M34094	Midkine	Mdk	-0,64	0,01
101590_at	AI747194	lysosomal membrane glycoprotein 2	Lamp2	-0,63	0,22
96603_at	AW123556	quiescin Q6	Qscn6	-0,63	0,47
102796_at	U64450	Nucleoplasmin 3	Npm3	-0,62	0,48
103100_at	AI788543	WW domain containing transcription regulator 1	Wwtr1	-0,59	0,27
95914_at	AA177382	RIKEN cDNA 6720461J16 gene	6720461J16Rik	-0,58	0,69
103460_at	AI849939	DNA-damage-inducible transcript 4	Ddit4	-0,57	0,57
93574_at	AF036164	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F, member 1	Serpinf1	-0,57	0,51
160682_at	AI851770	RIKEN cDNA 6430706D22 gene	6430706D22Rik	-0,55	1,05
104650_at	X56518	acetylcholinesterase	Ache	-0,55	0,85
160896_at	D13003	Reticulocalbin 1	Rcn1	-0,55	0,53
102726_at	D17584	tachykinin 1	Tac1	-0,55	0,56

Tabelle 23: Übersicht zu Expressionsdaten aus der Literatur für die Ephrine und Eph-Rezeptoren im somatosensorischen Kortex*

Gen	Alter/Entwicklungsstadium und Lokalisation	Funktion/Bedeutung	Referenz
Ephrin A1	Primaten E65-E95 NICHT nachweisbar		Donoghue und Rakic 1999
	NICHT nachweisbar E12-P2		Yun et al., 2003
Ephrin A2	Primaten E65-E80 NICHT nachweisbar, E95 CP Gradient posterior >anterior		Donoghue und Rakic 1999
	Diffus in allen Schichten von E12-P2		Yun et al., 2003
Ephrin A3	Primaten E65 CP, SP, E80, E95 CP medial>anterior>posterior		Donoghue und Rakic 1999
	Ratte E19 CP, SP		Mackarehtschian et al. 1999
	NICHT nachweisbar E12-P2		Yun et al., 2003
Ephrin A4	Primaten E65-E95 NICHT nachweisbar		Donoghue und Rakic 1999
	Ratte NICHT nachweisbar E19		Mackarehtschian et al. 1999
	NICHT nachweisbar E12-P2		Yun et al., 2003
Ephrin A5	E16-P3 in CP S1-spezifisch	Ephrin A5 verhindert in S1 das Einwachsen limbischer thalamischer Axone, die EphA5 exprimieren	Gao et al., 1998
	P7 in 4, 6	Ephrin A5 in Schicht 4 wirkt auf die intrakortikale Verzweigung von Schicht 6-Axonon fördernd und repulsiv auf die Verzweigung von Schicht 2/3-Axonon	Castellani et al., 1998
	Primaten E65-E95 CP, E95 posterior>medial>anterior	Region- und schichtspezifische Expression von A-Ephrinen und -Rezeptoren deutet auf frühe intrinsische Kompartimentierung des Kortex hin	Donoghue und Rakic 1999
	Ratte E11 VZ, Gradient von anterior >posterior bis E17, E13-15 VZ, ab E15-E19 CP Gradient von anterior >posterior	Ephrin A5 markiert distinkte kortikale Areale und wirkt auf die Projektion thalamischer Axone, die unterschiedliche EphA-Rezeptoren exprimieren	Mackarehtschian et al. 1999
	E18-P3 in CP (Maus) und E19-P3 in CP (Ratte) P1 in 6, P3 in 4, 6 und schwächer in 5, Gradient medial > lateral S1-spezifisch	Ephrin A5 wirkt auf Axone des dorsalen Thalamus, die EphA4 exprimieren, beeinflusst die intraareale Topografie (Distorsion und Expansion des Barreffeldes in Ephrin A5-KO-Tieren)	Vanderheaghen et al., 2000
	E18 in CP, P2 in 4, 6 ; je S1-spezifisch	Einzelne oder die Kombination von bestimmten Eph-Genen charakterisieren distinkte Zonen und anterior-posteriore Regionen des embryonalen Kortex	Yun et al., 2003
	P0 CP S1-spezifisch Gradient medial > lateral	Ephrin A5 im ventralen Telencephalon/ EphAs im Thalamus bewirken interareales Mapping thalamokortikaler Axone	Dufour et al., 2003
	P4 in 4; Gradient medial > lateral	Ephrin A5 und EphA7 regulieren die Topografie der kortikothalamischen Projektionen innerhalb eines thalamischen Nukleus (VB bzw. DLG)	Torii et al., 2005
	E15-E17 und P0 in CP, S1-spezifisch	EphA7 und Ephrin A5 sind an der Ausbildung funktionell unterschiedlicher kortikaler Areale beteiligt	Miller et al., 2006
	P0 CP Gradient anterior > posterior	Kompartimentierung des Kortex durch Interaktion mit EphA7, was von angrenzenden kortikalen Arealen exprimiert wird	Rash und Grove, 2006
	Ratte P0-P7 NICHT in S1, statt dessen im piriformen, entorhinalen Kortex	Interaktion mit EphA4 bei der Projektion thalamokortikaler Axone aus limbischen Nuklei	Takemoto et al., 2002
EphA1	Primaten E65-E95 NICHT nachweisbar		Donoghue und Rakic 1999
	NICHT nachweisbar E12-P2		Yun et al., 2003
EphA2	Primaten E65-E95 NICHT nachweisbar		Donoghue und Rakic 1999
	NICHT nachweisbar E12-P2		Yun et al., 2003

Tabelle 23, Fortsetzung

EphA3	Primaten E65-80 SVZ, IZ, CP, E95 NICHT nachweisbar (nur posterior)		Donoghue und Rakic 1999
	Ratte E17 VZ, CP, stark in SVZ, SP, E19/P0 CP, SP, SVZ		Mackarehshian et al. 1999
	NICHT nachweisbar E12, ab E14 in IZ, SVZ, P0 alle Schichten, P2 obere Schichten		Yun et al., 2003
	E12 CP, E13 IZ, E14 IZ, E15 SVZ, IZ, laterale CP E16 SVZ, IZ, laterale CP, E18 , P1 laterale CP, superficiell ab P3 nicht mehr nachweisbar	EphA3 ist an Ausbildung thalamokortikaler Projektion beteiligt	Kudo et al., 2005
EphA4	Primaten E65 SP, CP, E80 SVZ, IZ, CP, E95 in 4-6+SP, posterior>anterior=medial		Donoghue und Rakic 1999
	Ratte E17-P0 VZ, SVZ, CP (stark an P0)		Mackarehshian et al. 1999
	E12 alle Schichten, E14 CP, SVZ, VZ, P0 CP, P2 in 2/3, 4		Yun et al., 2003
EphA5	P7 in 2/3, 5 und SP	Ephrin A5 in Schichten 4 / 6 wirkt repulsiv auf Verzweigung von Neuronen der Schichten 2/3	Castellani et al., 1998
	Primaten E65 CP, E80 VZ, SVZ, IZ, SP, CP, MZ anterior=posterior>medial		Donoghue und Rakic 1999
	Ratte E17 VZ, SVZ, P0 SP, VZ, SVZ, wenig in CP		Mackarehshian et al. 1999
	Nicht nachweisbar E12, ab E14 IZ, SVZ, P0 CP, P2 alle Schichten +SP		Yun et al., 2003
	E16 CP, P6 2/3, 5	Ephrin A5 im VB und EphA5 in Neuronen der Schicht 5 wirken bei kortikothalamischer Projektion zu Nuklei höherer Ordnung	Uziel et al., 2006
EphA6	Primaten E65 CP, E80-E95 CP, SP		Donoghue und Rakic 1999
	Ab E17 in CP, P0 CP, P2 in 2/3, 4, SP		Yun et al., 2003
EphA7	Primaten E65 SP, CP, E80 SVZ, SP, CP, E95 NICHT nachweisbar; nur posterior		Donoghue und Rakic 1999
	Ab E12 wenig, P2 überall schwach, stärker in 4 und SP	die Regionen, die den S1 nach anterior und posterior begrenzen, exprimieren EphA7	Yun et al., 2003
	P4 in 2/3, 5, 6 Gradient lateral > medial	Ephrin A5 und EphA7 regulieren die Topografie der kortikothalamischen Projektionen innerhalb eines thalamischen Nukleus (VB bzw. DLG)	Torii et al., 2005
	E15 , P0 schwache Expression in S1, wird nach anterior und posterior durch starke Expression von EphA7	EphA7 und Ephrin A5 sind an der Ausbildung kortikaler Areale beteiligt, im EphA7-KO ist der S1-Kortex verkleinert und die Region im Kortex, die Ephrin A5 exprimiert, expandiert	Miller et al., 2006
	P0 NICHT in S1 aber in anterior und posterior angrenzendem Kortex	Kompartimentierung des Kortex durch Interaktion mit Ephrin A5, was im S1 exprimiert wird	Rash und Grove, 2006
EphA8	NICHT nachweisbar E12-P2		Yun et al., 2003
	P6 in 4		Uziel et al., 2006

*) Die Gradienten beziehen sich auf den gesamten Kortex. Die Beschreibungen wurden von den Referenzen übernommen. Da oftmals mehrere Gene untersucht wurden, ist die Erläuterung von Funktion bzw. Bedeutung des beschriebenen Expressionsmusters nur einmal je Referenz vorgenommen worden. Die Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis erklärt.

Tabelle 24: Übersicht zu Expressionsdaten aus der Literatur für die Ephrine und Eph-Rezeptoren in somatosensorischen thalamischen Kernen*

Gen	Alter/Entwicklungsstadium und Lokalisation	Funktion/Bedeutung	Referenz
EphrinA3	Ratte E19 dorsaler Thalamus		Mackarehtschian et al. 1999
EphrinA4	Ratte E19 NICHT nachweisbar		Mackarehtschian et al. 1999
EphrinA5	E15 dorsaler Thalamus, Gradient caudal > rostral		Dufour et al., 2003
	P4 in VB Gradient lateroventral > mediodorsal und dorsal in Pom		Torii et al., 2005
	P0 VB Gradient medial > anterior		Miller et al., 2006
EphrinB2	Adult Primaten dorsaler Thalamus	Involvierung der Ephrine und Eph-Rezeptoren in die drogeninduzierte Reorganisation im adulten Primatengehirn	Xiao et al., 2006
Ephrin B3	Ratte P0-P7 NICHT in VB, statt dessen im limbischen Thalamus		Takemoto et al., 2002
EphA3	Ratte E17-P0 dorsaler Thalamus		Mackarehtschian et al. 1999
	E15 dorsaler Thalamus Gradient mediorostral > caudolateral		Dufour et al., 2003
	E12, 13, 14, 15 dorsaler Thalamus, ab E16 schwächer im dorsalen Thalamus		Kudo et al., 2005
EphA4	Ratte E17-P0 dorsaler Thalamus		Mackarehtschian et al. 1999
	E18-P3 in VB Gradient medial > dorsal		Vanderhaeghen et al., 2000
	Ratte P7 VB		Takemoto et al., 2002
	P0 VB Gradient anterior > medial		Miller et al., 2006
	E15 dorsaler Thalamus Gradient mediorostral > caudolateral		Dufour et al., 2003
	Adult Primaten dorsaler Thalamus		Xiao et al., 2006
EphA5	E16 schwach in VB, P3 NICHT		Gao et al., 1998
	Ratte E17 nicht nachweisbar, E19 VB		Mackarehtschian et al. 1999
EphA7	E14 dorsaler Thalamus Gradient mediorostral > caudolateral		Dufour et al., 2003
	P0 VB Gradient anterior > medial		Miller et al., 2006
	P4 VB Gradient komplementär zu Ephrin A5		Torii et al., 2005
EphB1	NICHT nachweisbar in adulten Primaten dorsaler Thalamus		Xiao et al., 2006

*) Die Funktion bzw. Bedeutung der in der jeweiligen Referenz untersuchten Expression ist, sofern nicht angegeben, in der Tabelle 1 einzusehen, da meistens komplementär Kortex und Thalamus untersucht wurden. Die Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis erläutert. Bei Angaben zum Verlauf eines Gradienten wurde die Beschreibung aus der jeweiligen Referenz übernommen.

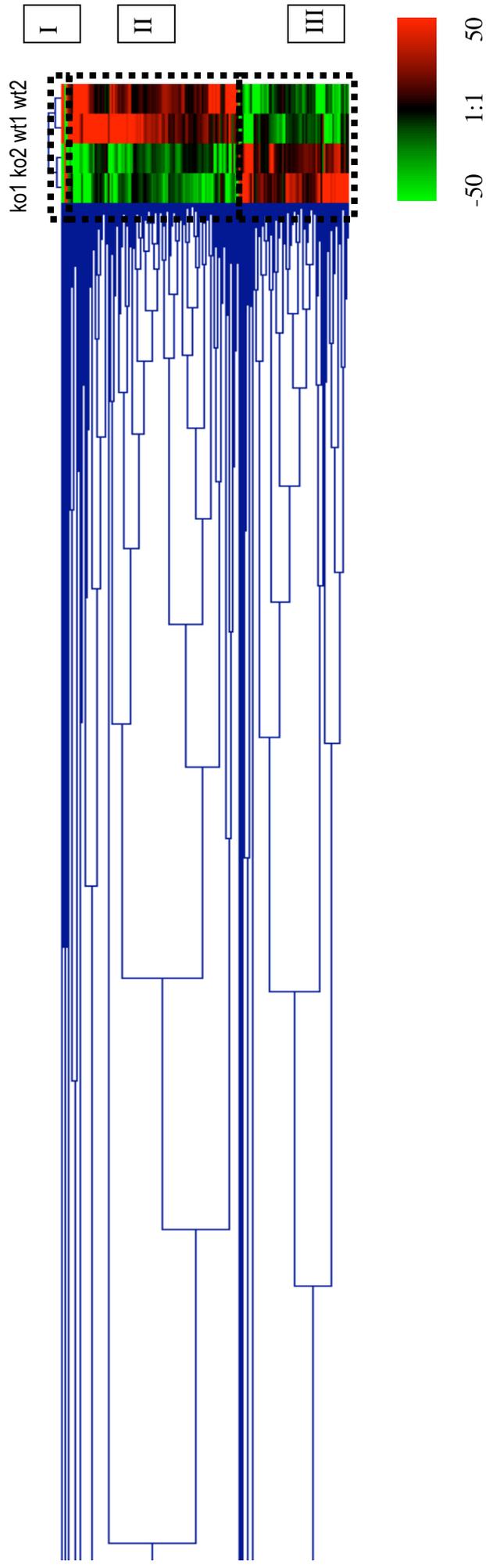


Abb.48: Hierarchische Clusteranalyse der im somatosensorischen Kortex von Ephrin A5-knockout-Mäusen differentiell exprimierten Gene. Kompakte Darstellung mit Verwandtschaftsbaum. Die Signalwerte sind farblich dargestellt: grün- 50 unterhalb des Medians; rot- 50 über dem Median. In Abb.49 sind die Gruppen I-III detailliert dargestellt.



Abb.49: Hierarchische Clusteranalyse der im somatosensorischen Kortex von Ephrin A5-knockout-Mäusen differentiell exprimierten Gene. Detaillierte Darstellung mit Gennamen (sofern bekannt, ansonsten wurden die ID-Nr. angegeben). Die Signalwerte sind farbkodiert dargestellt: grün- 50 unterhalb des Medians; rot- 50 über dem Median. Gruppe II enthält die im Ephrin A5-knockout herunter- Gruppe III enthält die im Ephrin A5-knockout heraufregulierten Gene. Die Gene der Gruppe I konnten in der Clusteranalyse nicht zu Gruppe II bzw. III geordnet werden. Die untersuchten Gene sind durch einen Stern kenntlich gemacht.

Alignment der Sequenz vom kloniertem Fragment aus dem CD47-Gen im TOPO[®]PCR4[®]-Vektor mit der mRNA-Referenz-Sequenz für CD47 (NM_010581)

Die Sequenzierung des Konstrukts erfolgte von der T3-RNA-Polymerase-Bindestelle aus

Strand=Plus/Minus

```

NM_010581 237  AAACGTGGTCATCCCTTGCATCGTCCGTAATGTGGAGGCGCAAAGCACCGAAGAAATGT 296
|||||
TOPO_CD47 323  AAACGTGGTCATCCCTTGCATCGTCCGTAATGTGGAGGCGCAAAGCACCGAAGAAATGT 264

NM_010581 297  TTGTGAAGTGAAGTTGAACAAATCGTATATTTTCATCTATGATGGAAATAAAAATAGCA 356
|||||
TOPO_CD47 263  TTGTGAAGTGAAGTTGAACAAATCGTATATTTTCATCTATGATGGAAATAAAAATAGCA 204

NM_010581 357  CTACTACAGATCAAACTTTACCAGTGCAAAAATCTCAGTCTCAGACTTAATCAATGGCA 416
|||||
TOPO_CD47 203  CTACTACAGATCAAACTTTACCAGTGCAAAAATCTCAGTCTCAGACTTAATCAATGGCA 144

NM_010581 417  TTGCCTCTTTGAAAATGGATAAGCGCGATGCCATGGTGGGAAACTTACACTTGC GAAGTGA 476
|||||
TOPO_CD47 143  TTGCCTCTTTGAAAATGGATAAGCGCGATGCCATGGTGGGAAACTTACACTTGC GAAGTGA 84

NM_010581 477  CAGAGTTATCCAGAGAAGGCAAAACAGTTATAGAGCTGAAAAACCGCACGGCCTTCAACA 536
|||||
TOPO_CD47 83  CAGAGTTATCCAGAGAAGGCAAAACAGTTATAGAGCTGAAAAACCGCACGGCCTTCAACA 24

NM_010581 537  CTGACCAAGGATCAGCC 553
|||||
TOPO_CD47 23  CTGACCAAGGATCAGCC 7

```

Alignment der Sequenz vom kloniertem Fragment aus dem Pak3-Gen im TOPO[®]PCR4[®]-Vektor mit der mRNA-Referenz-Sequenz für Pak3 (NM_0008778)

Die Sequenzierung des Konstrukts erfolgte von der T3-RNA-Polymerase-Bindestelle aus

Strand=Plus/Minus

```

NM_0008778 1546 TACTTGGCTGGTGGCTCTTTGACTGATGTGGTCACAGAAACCTGTATGGATGTAGGACAG 1605
|||||
Topo_Pak3 247 TACTTGGCTGGTGGCTCTTTGACTGATGTGGTCACAGAAACCTGTATGGATGAAGGACAG 188

NM_0008778 1606 ATAGCAGCTGTCTGTAGAGAGTGCCCTCAAGCCCTGGATTTCTTGCACTCAAACCAAGTG 1665
|||||
Topo_Pak3 187 ATAGCAGCTGTCTGTAGAGAGTGCCCTCAAGCCCTGGATTTCTTGCACTCAAACCAAGTG 128

NM_0008778 1666 ATCCACAGAGACATAAAGAGCGACAACATTCTCCTCGGGATGGATGGTTCTGTTAAACTG 1725
|||||
Topo_Pak3 127 ATCCACAGAGACATAAAGAGCGACAACATTCTCCTCGGGATGGATGGTTCTGTTAAACTG 68

NM_0008778 1726 ACTGATTTTGGGTTCTGTGCTCAAATCACTCCTGAGCAAAGTAAACGAAGCACTATGGTG 1785
|||||
Topo_Pak3 67 ACTGATTTTGGGTTCTGTGCTCAAATCACTCCTGAGCAAAGTAAACGAAGCACTATGGTG 8

NM_0008778 1786 G 1786
|
Topo_Pak3 7 G 7

```

5.3 Programm für die RealTime-PCR am LightCycler-Instrument (Roche Applied Science)

LightCycler-ID 427

LC Run Version 5.32

LCDA Version 3.5.28

Programm denat_sg

Type: Quantification

Cycles: 1

Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	2°Ctarget Temp (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
1	95	600	20	0	0	0	None

Programm ampl_sg

Type: Quantification

Cycles: 40

Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	2°Ctarget Temp (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
1	95	5	20	0	0	0	None
2	59 ¹	10	20	0	0	0	None
3	72	17	20	0	0	0	Single

Programm melt_sg

Type: Melting Curves

Cycles: 1

Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	2°Ctarget Temp (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	60	20	20	0	0	0	None
3	99	0	0,2	0	0	0	Continuous

Programm cool_sg

Type: Quantification

Cycles: 1

Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	2°Ctarget Temp (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
1	40	20	20	0	0	0	None

1) die Temperatur richtete sich nach den Schmelztemperaturen der Primer

2) die Dauer der Elongation richtete sich nach der Länge der PCR-Produkte

6. Literaturverzeichnis

- Agmon A, Yang LT, O'Dowd DK, Jones EG.** Organized growth of thalamocortical axons from the deep tier of terminations into layer IV of developing mouse barrel cortex. *J Neurosci.* 1993;13(12):5365-82.
- Agmon A, Yang LT, Jones EG, O'Dowd DK.** Topological precision in the thalamic projection to neonatal mouse barrel cortex. *J Neurosci.* 1995;15(1 Pt 2):549-61.
- Akers RM, Killackey HP.** Organization of corticocortical connections in parietal cortex of rat. *J Comp Neurol.* 1978;181:513-37.
- Angevine JB, Sidman RL.** Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature.* 1961;192:766-68.
- Angevine JB Jr.** Time of neuron origin in the diencephalon of the mouse: an autoradiographic study. *J Comp Neurol.* 1970;139:129-87.
- Aoki M, Yamashita T, Tohyama M.** EphA receptors direct the differentiation of mammalian neural precursor cells through a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2004;279(31):32643-50.
- Arber S, Ladle DR, Lin JH, Frank E, Jessell TM.** ETS gene *Er81* controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons. *Cell.* 2000;101(5):485-98.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G.** Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000;25(1):25-9.
- Augsburger A, Schuchardt A, Hoskins S, Dodd J, Butler S.** BMPs as mediators of roof plate repulsion of commissural neurons. *Neuron.* 1999;24(1):127-41.
- Auladell C, Perez-Sust P, Super H, Soriano E.** The early development of thalamocortical and corticothalamic projections in the mouse. *Anat Embryol (Berl).* 2000;201(3):169-79.
- Battye R, Stevens A, Jacobs JR.** Axon repulsion from the midline of the Drosophila CNS requires slit function. *Development.* 1999;126(11):2475-81.
- Becker E, Huynh-Do U, Holland S, Pawson T, Daniel TO, Skolnik TY.** Nck-interacting Ste20 kinase couples Eph receptors to c-Jun N-terminal kinase and integrin activation. *Mol Cell Biol.* 2000;20(5):1537-45.
- Bennett V, Baines AJ.** Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev.* 2001;81(3):1353-92. Review.
- Bernard P, Couturier M.** Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-Topoisomerase II complexes. *J Mol Biol.* 1992; 226: 735-745.
- Bernard P, Kezdy KE, Van Melder L, Steyaert J, Wyns L, Pato ML, Higgins PN, Couturier M.** The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J Mol Biol.* 1993;234(3):534-41.
- Bernard P, Gabant P, Bahassi EM, Couturier M.** Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene.* 1994 ;148(1):71-4.
- Bertolini R, Leutert G, Rother P, Scheuner G, Wendl D.** Systematische Anatomie des Menschen.5. vollständig neubearbeitete Auflage, 1995, Ullstein Mosby GmbH & CoKG Berlin/Wiesbaden
- Birgbauer E, Cowan CA, Sretavan DW, Henkemeyer M.** Kinase independent function of EphB receptors in retinal axon pathfinding to the optic disc from dorsal but not ventral retina. *Development.* 2000;127(6):1231-41.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP.** A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics.* 2003;19(2):185-93.
- Bolz J, Uziel D, Muhlfriedel S, Gullmar A, Peuckert C, Zarbalis K, Wurst W, Torii M, Levitt P.** Multiple roles of ephrins during the formation of thalamocortical projections: maps and more. *J Neurobiol.* 2004;59(1):82-94. Review.
- Brittis PA, Silver J, Walsh FS, Doherty P.** Fibroblast growth factor receptor function is required for the orderly projection of ganglion cell axons in the developing mammalian retina. *Mol Cell Neurosci.* 1996;8(2-3):120-8.
-

- Buldyrev SV, Cruz L, Gomez-Isla T, Gomez-Tortosa E, Havlin S, Le R, Stanley HE, Urbanc B, Hyman BT.** Description of microcolumnar ensembles in association cortex and their disruption in Alzheimer and Lewy body dementias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(10):5039-43.
- Butler SJ, Dodd J.** A role for BMP heterodimers in roof plate-mediated repulsion of commissural axons. *Neuron.* 2003;38(3):389-401.
- Callaway EM, Katz CL.** Development of axonal arbors of layer 4 spiny neurons in cat striate cortex. *J Neurosci.* 1992;12(2):570-82.
- Cammalleri M, Cervia D, Dal Monte M, Martini D, Langenegger D, Fehlmann D, Feuerbach D, Pavan B, Hoyer D, Bagnoli P.** Compensatory changes in the hippocampus of somatostatin knockout mice: upregulation of somatostatin receptor 2 and its function in the control of bursting activity and synaptic transmission. *Eur J Neurosci.* 2006;(23):2404-22.
- Cang J, Kaneko M, Yamada J, Woods G, Stryker MP, Feldheim DA.** Ephrin-as guide the formation of functional maps in the visual cortex. *Neuron.* 2005; 48(4):577-89.
- Cargnello R, Celio MR, Schwaller B, Gotzos V.** Change of calretinin expression in the human colon adenocarcinoma cell line HT29 after differentiation. *Biochem Biophys Acta.* 1996;1313(3):201-8.
- Carvalho RF, Beutler M, Marler KJ, Knoll B, Becker-Barroso E, Heintzmann R, Ng T, Drescher U.** Silencing of EphA3 through a cis interaction with ephrinA5. *Nat Neurosci.* 2006;9(3):322-30.
- Carvell GE, Simons DJ.** Thalamic and corticocortical connections of the 2nd somatic sensory area of the mouse. *J Comp Neurol.* 1987;265:409-427.
- Castellani V, Chedotal A, Schachner M, Faivre-Sarrahil C, Rougon G.** Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron.* 2000;27(2):237-49.
- Castellani V, Yue Y, Gao PP, Zhou R, Bolz J.** Dual action of a ligand for Eph receptor tyrosine kinases on specific populations of axons during the development of cortical circuits. *J Neurosci.* 1998;18(12):4663-72.
- Catalano SM, Robertson RT, Killackey HP.** Early ingrowth of thalamocortical afferents to the neocortex of the prenatal rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(8): 2999-3003.
- Caviness VS.** Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental-study based upon [H-3] thymidine autoradiography. *Brain Res.* 1982;256(3):293-302.
- Chang HP, Lindberg FP, Wang HL, Huang AM, Lee EH.** Impaired Memory Retention and Decreased Long-Term Potentiation in Integrin-Associated Protein-Deficient Mice. *LearnMem.* 1999;6(5):448-457.
- Charron F, Stein E, Jeong J, McMahon AP, Tessier-Lavigne M.** The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell.* 2003;113(1):11-23.
- Cheng HJ, Bagri A, Yaron A, Stein E, Pleasure SJ, Tessier-Lavigne M.** Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron.* 2001;32(2):249-63.
- Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
- Coccia EM, Cicala C, Charlesworth A, Ciccarelli C, Rossi GB, Philipson L, Sorrentino V.** Regulation and expression of a growth arrest-specific gene (gas5) during growth, differentiation, and development. *Mol Cell Biol.* 1992;12(8):3514-21.
- Cohen NR, Taylor JS, Scott LB, Guillery RW, Soriano P, Furley AJ.** Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr Biol.* 1998;8(1):26-33.
- Collinge J, Curtis D.** Decreased hippocampal expression of a glutamate receptor gene in schizophrenia. *Br J Psychiatry.* 1991;159:857-9.
- Conover JC, Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Gale NW, Yancopoulos GD, Alvarez-Buylla A.** Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci.* 2000;3(11):1091-7.
- Contractor A, Rogers C, Maron C, Henkemeyer M, Swanson GT, Heinemann SF.** Trans-synaptic Eph receptor-ephrin signaling in hippocampal mossy fiber LTP. *Science.* 2002;296(5574):1864-9.

- Cowan CA, Yokoyama N, Saxena A, Chumley MJ, Silvany RE, Baker LA, Srivastava D, Henkemeyer M.** Ephrin-B2 reverse signaling is required for axon pathfinding and cardiac valve formation but not early vascular development. *Dev Biol.* 2004;271(2):263-71.
- Dalva MB, Takasu MA, Lin MZ, Shamah SM, Hu L, Gale NW, Greenberg ME.** EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell.* 2000;103(6):945-56.
- Davis JQ, Lambert S, Bennett V.** Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *J Cell Biol.* 1996;135(5):1355-67.
- Davy A, Gale NW, Murray EW, Klinghoffer RA, Soriano P, Feuerstein C, Robbins SM.** Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev.* 1999;13(23):3125-35.
- Davy A, Aubin J, Soriano P.** Ephrin-B1 forward and reverse signaling are required during mouse development. *Genes Dev.* 2004;18(5):572-83.
- Davy A, Robbins SM.** Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner. *EMBO J.* 2000;19(20):5396-405.
- De Carlos JA, O'Leary DDM.** Growth and targeting of subplate axons and establishment of major cortical pathways. *J Neurosci.* 1992;12:1194-211.
- Deng JB, Elberger AJ.** Corticothalamic and thalamocortical pathfinding in the mouse: dependence on intermediate targets and guidance axis. *Anat Embryol.* 2003;207:177-92.
- Deschenes M, Veinante P, Zhang ZW.** The organization of corticothalamic projections: reciprocity versus parity. *Brain Res Rev.* 1998;28:286-308.
- Diamond ME, Armstrong-James M, Budway MJ, Ebner FF.** Somatic sensory responses in the rostral sector of the posterior group (POm) and in the ventral posterior medial nucleus (VPM) of the rat thalamus: dependence on the barrel field cortex. *J Comp Neurol.* 1992;319(1):66-84.
- Di Giacomo G, Koss M, Capellini TD, Brendolan A, Popperl H, Selleri L.** Spatio-temporal expression Pbx3 during mouse organogenesis. *Gene Expr Patterns.* 2006;6(7):747-57
- Dickson BJ.** Molecular mechanisms of axon guidance. *Science.* 2002;298(5600):1959-64.Review.
- Donoghue MJ, Rakic P.** Molecular evidence for the early specification of presumptive functional domains in the embryonic primate cerebral cortex. *J Neurosci.* 1999;19(14):5967-79.
- Dufour A, Seibt J, Passante L, Depaape V, Ciosek T, Frisen J, Kullander K, Flanagan JG, Polleux F, Vanderhaeghen P.** Area specificity and topography of thalamocortical projections are controlled by ephrin/Eph genes. *Neuron.* 2003;39(3):453-65.
- Edmonds B, Reyes R, Schwaller B, Roberts WM.** Calretinin modifies presynaptic calcium signaling in frog saccular hair cells. *Nat Neurosci.* 2000;3(8):786-90.
- Ethell IM, Irie F, Kalo MS, Couchman JR, Pasquale EB, Yamaguchi Y.** EphB/syndecan-2 signaling in dendritic spine morphogenesis. *Neuron.* 2001;31(6):1001-13.
- Fauchey V, Jaber M, Caron MG, Bloch B, LE Moine C.** Differential regulation of the dopamine D1 D2 and D3 receptor gene expression and changes in the phenotype of the striatal neurons in mice lacking the dopamine transporter. *Eur J Neurosci.* 2000;(12):19-26.
- Feldheim DA, Vanderhaeghen P, Hansen MJ, Frisen J, Lu Q, Barbacid M, Flanagan JG.** Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain. *Neuron.* 1998;21(6):1303-13.
- Feldheim DA, Kim YI, Bergemann D, Frisen J, Barbacid M, Flanagan JG.** Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron.* 2000;25(3):563-74.
- Felleman DJ, Van Essen DC.** Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cereb Cortex.* 1991;1(1):1-47.
- Flanagan JG.** Neural map specification by gradients. *Curr Opin Neurobiol.* 2006;16(1):59-66. Review.

- Flanagan JG, Vanderhaeghen P.** The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci.* 1998;21:309-45. Review.
- Fransen E, Lemmon V, Van Camp G, Vits L, Coucke P, Willems PJ.** CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1. *Eur J Hum Genet.* 1995;3(5):273-84.
- Frassoni C, Arcelli P, Selvaggio M, Spreafico R.** Calretinin immunoreactivity in the developing thalamus of the rat: a marker of early generated thalamic cells. *Neuroscience.* 1998;83(4):1203-14.
- Freywald A, Sharfe N, Roifman CM.** The kinase-null EphB6 receptor undergoes transphosphorylation in a complex with EphB1. *J Biol Chem.* 2002;277(6):3823-8.
- Friauf E, McConell SK, Shatz CJ.** Functional synaptic circuits in the subplate during fetal and early postnatal development of cat visual cortex. *J Neurosci.* 1990;10(8):2601-13.
- Frisen J, Holmberg J, Barbacid M.** Ephrins and their Eph receptors: multitasking directors of embryonic development. *EMBO J.* 1999;18(19):5159-65.
- Funatsu N, Inoue T, Nakamura S.** Gene expression analysis of the late embryonic mouse cerebral cortex using DNA microarray: identification of several region- and layer-specific genes. *Cereb Cortex.* 2004;14(9):1031-44.
- Gao PP, Yue Y, Zhang JH, Cerretti DP, Levitt P, Zhou R.** 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.* 1998;95(9):5329-34.
- Garel S, Rubenstein JL.** Intermediate targets in formation of topographic projections: inputs from the thalamocortical system. *Trends Neurosci.* 2004;27(9):533-9. Review.
- Giordano S, Corso S, Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D, Tamagnone L, Comoglio PM.** The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat Cell Biol.* 2002;4(9):720-4.
- Glantz LA, Lewis DA.** Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 2000;57(1):65-73.
- Godement P, Vanselow J, Thanos S, Bonhoeffer F.** A study in developing visual systems with a new method of staining neurons and their processes in fixed tissue. *Development.* 1987;101(4):697-713.
- Gonchar Y, Burkhalter A.** Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb Cortex.* 1997;7(4):347-58.
- Gonchar Y, Burkhalter A.** Connectivity of GABAergic calretinin-immunoreactive neurons in rat primary visual cortex. *Cereb Cortex.* 1999;9(7):683-96.
- Gonchar Y, Burkhalter A.** Distinct GABAergic targets of feedforward and feedback connections between lower and higher areas of rat visual cortex. *J Neurosci.* 2003;23(34):10904-12.
- Gonchar Y, Pang L, Malitschek B, Bettler B, Burkhalter A.** Subcellular localization of GABA(B) receptor subunits in rat visual cortex. *J Comp Neurol.* 2000;431(2):182-97.
- Grunwald IC, Korte M, Wolfer D, Wilkinson GA, Unsicker K, Lipp HP, Bonhoeffer T, Klein R.** Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity. *Neuron.* 2001;32(6):1027-40.
- Gu C, Park S.** The p110 gamma PI-3 kinase is required for EphA8-stimulated cell migration. *FEBS Lett.* 2003;540(1-3):65-70.
- Guillemot F, Molnar Z, Tarabykin V, Stoykova A.** Molecular mechanisms of cortical differentiation. *Eur J Neurosci.* 2006;23(4):857-68. Review.
- Gurniak CB, Berg LJ.** A new member of the Eph family of receptors that lacks protein tyrosine kinase activity. *Oncogene.* 1996;13(4):777-86.
- Haidarliu S, Ahissar E.** Size gradients of barreloids in the rat thalamus. *J Comp Neurol.* 2001;429(3):372-87.
- Halford MM, Armes J, Buchert M, Meskenaite V, Grail D, Hibbs ML, Wilks AF, Farlie PG, Newgreen DF, Hovens CM, Stacker SA.** Ryk-deficient mice exhibit craniofacial defects associated with perturbed Eph receptor crosstalk. *Nat Genet.* 2000;25(4):414-8.

- Hanganu IL, Kilb W, Luhmann HJ.** Functional synaptic projections onto subplate neurons in neonatal rat somatosensory cortex. *J Neurosci.* 2002;22(16):7165-76.
- Hansen MJ, Dallal GE, Flanagan JG.** Retinal axon response to ephrin-A5 shows a graded, concentration-dependent transition from growth promotion to inhibition. *Neuron.* 2004;42(5):717-30.
- Henderson JT, Georgiou J, Jia Z, Robertson J, Elowe S, Roder JC, Pawson T.** The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA-dependent synaptic function. *Neuron.* 2001;32(6):1041-56.
- Henkemeyer M, Orioli D, Henderson JT, Saxton TM, Roder J, Pawson T, Klein R.** Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell.* 1996;86(1):35-46.
- Henkemeyer M, Itkis OS, Ngo M, Hickmott PW, Ethell IM.** Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *J Cell Biol.* 2003;163(6):1313-26.
- Herculano-Houzel S, Lent R.** Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *J Neurosci.* 2005; 25(10):2518-21.
- Herrmann K, Antonini A, Shatz CJ.** Ultrastructural evidence for synaptic interactions between thalamocortical axons and subplate neurons. *Eur J Neurosci.* 1994;6(11):1729-42.
- Hevner RF, Daza RA, Rubenstein JL, Stunnenberg H, Olavarria JF, Englund C.** Beyond laminar fate: toward a molecular classification of cortical projection/pyramidal neurons. *Dev Neurosci.* 2003; 25(2-4): 139-51.
- Himanen JP, Rajashankar KR, Lackmann M, Cowan CA, Henkemeyer M, Nikolov DB.** Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature.* 2001;414(6866):933-8.
- Himanen JP, Nikolov DB.** Eph signaling: a structural view. *Trends Neurosci.* 2003;26(1):46-51. Review.
- Himanen JP, Chumley MJ, Lackmann M, Li C, Barton WA, Jeffrey PD, Vearing C, Geleick D, Feldheim DA, Boyd AW, Henkemeyer M, Nikolov DB.** Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci.* 2004; 7(5):501-09.
- Hinck L.** The versatile roles of "axon guidance" cues in tissue morphogenesis. *Dev Cell.* 2004;7(6):783-93.
- Hindges R, McLaughlin T, Genoud N, Henkemeyer M, O'Leary DD.** EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron.* 2002;35(3):475-87.
- Hing H, Xiao J, Harden N, Lim L, Zipursky SL.** Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in *Drosophila*. *Cell.* 1999;97(7):853-63.
- Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR, Arber S.** A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS Biol.* 2005;3(5):e159.
- Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, Takaku F.** A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science.* 1987;238 (4834):1717-20.
- Holland SJ, Gale NW, Mbamalu G, Yancopoulos GD, Henkemeyer M, Pawson T.** Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature.* 1996;383(6602):722-5.
- Holmberg J, Armulik A, Senti KA, Edorff K, Spaldig K, Momma S, Cassidy R, Flanagan JG, Frisen J.** Ephrin A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes Dev.* 2005.19(4):462-71.
- Honig MG, Hume RI.** Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J Cell Biol.* 1986; 103(1):171-87.
- Hortsch M.** Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? *Mol Cell Neurosci.* 2000;15(1):1-10. Review.
- Huai J, Drescher U.** An ephrin-A-dependent signaling pathway controls integrin function and is linked to the tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *J Biol Chem.* 2001;276(9):6689-94.
- Huynh-Do U, Stein E, Lane AA, Liu H, Cerretti DP, Daniel TO.** Surface densities of ephrin B1 determine EphB1-coupled activation of cell-attachment through $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins. *EMBO J.* 1999. 18(8):2165-73.
- Irie F, Yamaguchi Y.** EPHB receptor signaling in dendritic spine development. *Front Biosci.* 2004;(9):1365-73. Review.

-
- Irving C, Mason I.** Signalling by FGF8 from the isthmus patterns anterior hindbrain and establishes the anterior limit of Hox gene expression. *Development*. 2000;127(1):177-86.
- Irving C, Malhas A, Guthrie S, Mason I.** Establishing the trochlear motor axon trajectory: role of the isthmus organizer and Fgf8. *Development*. 2002;129(23):5389-98.
- Isbister CM, O'Connor TP.** Mechanisms of growth cone guidance and motility in the developing grasshopper embryo. *J Neurobiol*. 2000;44(2):271-80. Review.
- Ishii N, Wadsworth WG, Stern BD, Culotti JG, Hedgecock EM.** UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron*. 1992;9(5):873-81.
- Jin K, Mao XO, Eshoo MW, del Rio G, Rao R, Chen D, Simon RP, Greenberg DA.** cDNA microarray analysis of changes in gene expression induced by neuronal hypoxia in vitro. *Neurochem Res*. 2002;27(10):1105-12.
- Jones EG.** Microcolumns in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(10):5019-21. Review
- Kageyama G H, Robertson RT.** Development of gemiculocortical projections to visual cortex in rat: Evidence for early ingrowth and synaptogenesis. *J Comp Neurol*. 1993;335(1):123-148.
- Kalo MS, Yu HH, Pasquale EB.** In vivo tyrosine phosphorylation sites of activated ephrin-B1 and ephB2 from neural tissue. *J Biol Chem*. 2001;276(42):38940-8.
- Kandel RE, Schwartz JH, Jessell TM.** Principles of neural science. 4th edition 2000, McGraw-Hill Companies, USA
- Kanold PO, Kara P, Reid RC, Shatz CJ.** Role of subplate neurons in functional maturation of visual cortical columns. *Science*. 2003;301(5632):521-5.
- Kanold PO.** Transient microcircuits formed by subplate neurons and their role in functional development of thalamocortical connections. *Neuroreport*. 2004;15(14):2149-53. Review.
- Karam SD, Burrows RC, Logan C, Koblar S, Pasquale EB, Bothwell M.** Eph receptors and ephrins in the developing chick cerebellum: relationship to sagittal patterning and granule cell migration. *J Neurosci*. 2000;20(17):6488-500.
- Katso RM, Russell RB, Ganesan TS.** Functional analysis of H-Ryk, an atypical member of the receptor tyrosine kinase family. *Mol Cell Biol*. 1999;19(9):6427-40.
- Keleman K, Dickson BJ.** Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* Unc5 netrin receptor. *Neuron*. 2001;32(4):605-17.
- Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M.** Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell*. 1994;78(3):425-35.
- Kidd T, Bland KS, Goodman CS.** Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell*. 1999 ;96(6):785-94.
- Kiryushko D, Berezin V, Bock E.** Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1014:140-54. Review.
- Knoll B, Zarbalis K, Wurst W, Drescher U.** A role for the EphA family in the topographic targeting of vomeronasal axons. *Development*. 2001;128(6):895-906.
- Klein R.** Excitatory Eph receptors and adhesive ephrin ligands. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13(2):196-203. Review.
- Klein R.** Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(5):580-9. Review.
- Korkotian E, Segal M.** Release of calcium from stores alters the morphology of dendritic spines in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(21):12068-72.
- Krull CE, Lansford R, Gale NW, Collazo A, Marcelle C, Yancopoulos GD, Fraser SE, Bronner-Fraser M.** Interactions of Eph-related receptors and ligands confer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. *Curr Biol*. 1997;7(8):571-80.
- Kubota Y, Kawaguchi Y.** Two distinct subgroups of cholecystokinin-immunoreactive cortical interneurons. *Brain Res*. 1997;752(1-2):175-83.
- Kudo C, Ajioka I, Hirata Y, Nakajima K.** Expression profiles of EphA3 at both the RNA and protein level in the developing mammalian forebrain. *J Comp Neurol*. 2005;487(3):255-69.
-

- Kuffler DP.** Long-term survival and sprouting in culture by motoneurons isolated from the spinal cord of adult frogs. *J Comp Neurol.* 1990;302(4):729-38.
- Kullander K, Klein R.** Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(7):475-86.
- Kullander K, Croll SD, Zimmer M, Pan L, McClain J, Hughes V, Zabski S, DeChiara TM, Klein R, Yancopoulos GD, Gale NW.** Ephrin-B3 is the midline barrier that prevents corticospinal tract axons from recrossing, allowing for unilateral motor control. *Genes Dev.* 2001a;15(7):877-88.
- Kullander K, Mather NK, Diella F, Dottori M, Boyd AW, Klein R.** Kinase-dependent and kinase-independent functions of EphA4 receptors in major axon tract formation in vivo. *Neuron.* 2001b;29(1):73-84.
- Larsen DD, Callaway EM.** Development of layer-specific axonal arborizations in mouse primary somatosensory cortex. *J Comp Neurol.* 2006;494(3):398-414.
- Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG.** The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci.* 1999;19(18):7881-8.
- Lewis AK, Bridgman PC.** Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *J Cell Biol.* 1992;119(5):1219-43.
- Lin CH, Espreafico EM, Mooseker MS, Forscher P.** Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron.* 1996;16(4):769-82.
- Liu A, Niswander LA.** Signalling in development: Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(12):945-54.
- Lippman J, Dunaevsky A.** Dendritic spine morphogenesis and plasticity. *J Neurobiol.* 2005;64(1):47-57. Review.
- Lopez-Bendito G, Molnar Z.** Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(4):276-89. Review.
- Lopez-Bendito G, Cautinat A, Sanchez JA, Bielle F, Flames N, Garratt AN, Talmage DA, Role LW, Charnay P, Marin O, Garel S.** Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation. *Cell.* 2006;125(1):127-42.
- Lu Q, Sun EE, Klein RS, Flanagan JG.** Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell.* 2001;105(1):69-79.
- Lu W, Yamamoto V, Ortega B, Baltimore D.** Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell.* 2004;119(1):97-108.
- Lund RD, Mustari MJ.** Development of the geniculocortical pathway in rats. *J Comp Neurol.* 1977;173(2):289-306.
- Luo Z, Geschwind DH.** Microarray applications in neuroscience. *Neurobiol Dis.* 2001;8(2):183-93.
- Luskin MB, Shatz CJ.** Studies of the earliest generated cells of the cat's visual cortex: cogeneration of subplate and marginal zones. *J Neurosci.* 1985;5(4):1062-75.
- Lyuksyutova AI, Lu CC, Milanese N, King LA, Guo N, Wang Y, Nathans J, Tessier-Lavigne M, Zou Y.** Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science.* 2003;302(5652):1984-8.
- Mackarehtschian K, Lau CK, Caras I, McConnell SK.** Regional differences in the developing cerebral cortex revealed by ephrin-A5 expression. *Cereb Cortex.* 1999;9(6):601-10.
- Mann F, Peuckert C, Dehner F, Zhou R, Bolz J.** Ephrins regulate the formation of terminal axonal arbors during the development of thalamocortical projections. *Development.* 2002;129(16):3945-55.
- Marin O, Rubenstein JL.** A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(11):780-90. Review.
- Marin O, Rubenstein JL.** Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci.* 2003;26:441-83. Review
- Marin O, Anderson SA, Rubenstein JL.** Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J Neurosci.* 2000;20(16):6063-76.
- Marin-Padilla M.** Prenatal ontogenetic history of the principal neurons of the neocortex of the cat (*Felis domestica*). A Golgi study. II. Developmental differences and their significances. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 1972;136(2):125-42.
-

- Marin-Padilla M.** Early prenatal ontogenesis of the cerebral cortex (neocortex) of the cat (*Felis domestica*). A Golgi study. I. The primordial neocortical organization. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 1971;134(2):117-45.
- Marin-Padilla M.** Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat Embryol (Berl).* 1978;152(2):109-26.
- Martinez A, Soriano E.** Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;49(2):211-26. Review.
- Mattar P, Britz O, Johannes C, Nieto M, Ma L, Rebeyka A, Klenin N, Polleux F, Guillemot F, Schuurmans C.** A screen for downstream effectors of Neurogenin2 in the embryonic neocortex. *Dev Biol.* 2004;273(2):373-89.
- McManus MF, Nasrallah IM, Gopal PP, Baek WS, Golden JA.** Axon mediated interneuron migration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63(9):932-41
- McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ.** Subplate neurons pioneer the 1st axon pathway from the cerebral cortex. *Science.* 1989;245:978– 82.
- Merz K.** Etablierung einer Bibliothek von Nukleinsäuresonden für axonale Lenkungsmoleküle der Ephrin/Eph-Familie der Maus. 2003, Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena
- Metin C, Godement P.** The ganglionic eminence may be an intermediate target for corticofugal and thalamocortical axons. *J Neurosci.* 1996;16:3219–35.
- Meyer G, Schaaps JP, Moreau L, Goffinet AM.** Embryonic and early fetal development of the human neocortex. *J Neurosci.* 2000;20(5):1858-68.
- Miao H, Burnett E, Kinch M, Simon E, Wang B.** Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nat Cell Biol.* 2000;2(2):62-9.
- Miao H, Strebhardt K, Pasquale EB, Shen TL, Guan JL, Wang B.** Inhibition of integrin-mediated cell adhesion but not directional cell migration requires catalytic activity of EphB3 receptor tyrosine kinase. Role of Rho family small GTPases. *J Biol Chem.* 2005;280(2):923-32.
- Miyashita M, Ohnishi H, Okazawa H, Tomonaga H, Hayashi A, Fujimoto TT, Furuya N, Matozaki T.** Promotion of neurite and filopodium formation by CD47: roles of integrins, Rac, and Cdc42. *Mol Biol Cell.* 2004;15(8):3950-63.
- Miller K, Kolk SM, Donoghue MJ.** EphA7-ephrin-A5 signaling in mouse somatosensory cortex: developmental restriction of molecular domains and postnatal maintenance of functional compartments. *J Comp Neurol.* 2006;496(5):627-42.
- Mirnic K, Middleton FA, Marquez A, Lewis DA, Levitt P.** Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron.* 2000;28(1):53-67.
- Mirnic K, Pevsner J.** Progress in the use of microarray technology to study the neurobiology of disease. *Nat Neurosci.* 2004;7(5):434-9.
- Miyashita M, Ohnishi H, Okazawa H, Tomonaga H, Hayashi A, Fujimoto TT, Furuya N, Matozaki T.** Promotion of neurite and filopodium formation by CD47: roles of integrins, Rac, and Cdc42. *Mol Biol Cell.* 2004;15(8):3950-63.
- Molnar Z, Adams R, Goffinet AM, Blakemore C.** The role of the first postmitotic cortical cells in the development of thalamocortical innervation in the reeler mouse. *J Neurosci.* 1998a;18:5746–65.
- Molnar Z, Adams R, Blakemore C.** Mechanisms underlying the early establishment of thalamocortical connections in the rat. *J Neurosci.* 1998b;18:5723–45.
- Molnar Z, Higashi S, Lopez-Bendito G.** Choreography of early thalamocortical development. *Cereb Cortex.* 2003;13(6):661-9.
- Motegi S, Okazawa H, Ohnishi H, Sato R, Kaneko Y, Kobayashi H, Tomizawa K, Ito T, Honma N, Buhning HJ, Ishikawa O, Matozaki T.** Role of the CD47-SHPS-1 system in regulation of cell migration. *EMBO J.* 2003;22(11):2634-44.
- Mountcastle VB.** The columnar organization of the neocortex. *Brain.* 1997;120(Pt 4):701-22. Review.
- Mountcastle VB .** Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J Neurophysiol.* 1957;20(4):408-34.

- Muehlfriedel S, Uziel D, Zarbalis K, Aschoff AP, Wurst W, Bolz J.** Development of thalamocortical arbors in the barrel cortex of ephrin-A5 knockout mice. 2000.Program No. 217.21. Abstract/Itinerary Planner. New Orleans, LA: Society for Neuroscience.
- Murai KK, Pasquale EB.** Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J Cell Sci.* 2003;116:2823-32. Review.
- Murai KK, Nguyen LN, Irie F, Yamaguchi Y, Pasquale EB.** Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci.* 2003;6(2):153-60.
- Müller B, Reinhardt J.** Neural networks: an introduction. 1991, Springer-Verlag, Berlin
- Nelson WJ, Nusse R.** Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science.* 2004;303(5663):1483-7.
- Nery S, Fishell G, Corbin JG.** The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat Neurosci.* 2002;5(12):1279-87.
- Nishimura K, Yoshihara F, Tojima T, Ooashi N, Yoon W, Mikoshiba K, Bennett V, Kamiguchi H.** L1-dependent neuritogenesis involves ankyrinB that mediates L1-CAM coupling with retrograde actin flow. *J Cell Biol.* 2003;163(5):1077-88.
- Nomura T, Holmberg J, Frisen J, Osumi N.** Pax6-dependent boundary defines alignment of migrating olfactory cortex neurons via the repulsive activity of ephrin A5. *Development.* 2006;133(7):1335-45.
- O'Connor T, Duerr J, Bentley D.** Pioneer growth cone steering decisions mediated by single filopodial contacts in situ. *J. Neurosci.* 1990;10(12):3935-46.
- Orioli D, Henkemeyer M, Lemke G, Klein R, Pawson T.** Sek4 and Nuk receptors cooperate in guidance of commissural axons and in palate formation. *EMBO J.* 1996;15(22):6035-49.
- O'Leary DD, Wilkinson DG.** Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr Opin Neurobiol.* 1999;9(1):65-73.
- Osumi N.** The role of Pax6 in brain patterning. *Tohoku J. Exp Med.* 2001;193 (3): 163-74. Review.
- Palmer A, Zimmer M, Erdmann KS, Eulenburg V, Porthin A, Heumann R, Deutsch U, Klein R.** EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell.* 2002;9(4):725-37.
- Palmer A, Klein R.** Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function. *Genes Dev.* 2003;17(12):1429-50.
- Pasquale EB.** Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(6):462-75. Review.
- Penzes P, Beeser A, Chernoff J, Schiller MR, Eipper BA, Mains RE, Huganir RL.** Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron.* 2003; 37 (2):263-74.
- Pfeiffenberger C, Cutforth T, Woods G, Yamada J, Renteria RC, Copenhagen DR, Flanagan JG, Feldheim DA.** Ephrin-As and neural activity are required for eye-specific patterning during retinogeniculate mapping. *Nat Neurosci.* 2005;8(8):1022-7.
- Pinson J, Mason JO, Simpson TI, Price DJ.** Regulation of the Pax6:Pax6 (5a) mRNA ratio in the developing mammalian brain. *BMC DevBiol.* 2005; (19):5-13.
- Pleasure SJ, Anderson S, Hevner R, Bagri A, Marin O, Lowenstein DH, Rubenstein JL.** Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. *Neuron.* 2000;28(3):727-40.
- Polleux F, Dehay C, Kennedy H.** The timetable of laminar neurogenesis contributes to the specification of cortical areas in mouse isocortex. *J Comp Neurol.* 1997; 385:95-116.
- Prakash N, Vanderhaeghen P, Cohen-Cory S, Frisen J, Flanagan JG, Frostig RD.** Malformation of the functional organization of somatosensory cortex in adult ephrin-A5 knock-out mice revealed by in vivo functional imaging. *J Neurosci.* 2000;20(15):5841-7.
- Prevost N, Woulfe DS, Jiang H, Stalker TJ, Marchese P, Ruggeri ZM, Brass LF.** Eph kinases and ephrins support thrombus growth and stability by regulating integrin outside-in signaling in platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(28):9820-5.
-

- Rakic P.** Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science*. 1974;183(123):425-7.
- Rakic P.** Prenatal development of visual-system in rhesusmonkey. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1977;278:245.
- Raedler E, Raedler A.** Autoradiographic study of early neurogenesis in rat neocortex. *Anat Embryol (Berl)*. 1978;154(3):267-84.
- Raper JA.** Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol*. 2000;10(1):88-94. Review.
- Rash BG, Grove EA.** Area and layer patterning in the developing cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol*. 2006;16(1):25-34.
- Rebres RA, Green JM, Reinhold MI, Ticchioni M, Brown EJ.** Membrane raft association of CD47 is necessary for actin polymerization and protein kinase C theta translocation in its synergistic activation of T cells. *J Biol Chem*. 2001;276(10):7672-80.
- Rebsam A, Seif I, Gaspar P.** 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*. 2002;22(19):8541-52.
- Ren B, Dynlacht BD.** Use of chromatin immunoprecipitation in genome-wide analysis of mammalian transcription factors. *Methods Enzymol*. 2004;(376):304-15.
- Rickmann M, Wolff JR.** Differentiation of preplate neurons in the pallium of the rat. *Bibl Anat*. 1981;(19):142-6.
- Roberts WM.** Localization of calcium signals by a mobile calcium buffer in frog saccular hair cells. *J Neurosci*. 1994;14:3246-62.
- Sahin M, Greer PL, Lin MZ, Poucher H, Eberhart J, Schmidt S, Wright TM, Shamah SM, O'connell S, Cowan CW, Hu L, Goldberg JL, Debant A, Corfas G, Krull CE, Greenberg ME.** Eph-dependent tyrosine phosphorylation of ephexin1 modulates growth cone collapse. *Neuron*. 2005;46(2):191-204.
- Sandberg R, Yasuda R, Pankratz DG, Carter TA, Del Rio JA, Wodicka L, Mayford M, Lockhart DJ, Barlow C.** Regional and strain-specific gene expression mapping in the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(20):11038-43.
- Santiago A, Erickson CA.** Ephrin-B ligands play a dual role in the control of neural crest cell migration. *Development*. 2002;129(15):3621-32.
- Schaefer AW, Kabir N, Forscher P.** Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *J Cell Biol*. 2002;158(1):139-52.
- Schmitt AM, Shi J, Wolf AM, Chin-Chun L, King LA, Zou Y.** Wnt-Ryl signalling mediates medial-lateral retinectal topographic mapping. *Nature*. 2006;(439): 31-73.
- Schmucker D, Zipursky SL.** Signaling downstream of Eph receptors and ephrin ligands. *Cell*. 2001;105(6):701-4.
- Schwaller B, Meyer M, Schiffmann S.** 'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum*. 2002;1(4):241-58.
- Senft SL, Woolsey TA.** Growth of thalamic afferents into mouse barrel cortex. *Cereb Cortex*. 1991;1:308-35.
- Shamah SM, Lin MZ, Goldberg JL, Estrach S, Sahin M, Hu L, Bazalakova M, Neve RL, Corfas G, Debant A, Greenberg ME.** EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell*. 2001;105(2):233-44.
- Shannon MF, Roa S.** Of chips and ChIPs. *Science*. 2002;296: 666-9.
- Shatz CJ, Luskin MB.** The relationship between the geniculocortical afferents and their cortical target cells during development of the cat's primary visual cortex. *J Neurosci*. 1986;6(12):3655-68.
- Shepherd GM, Svoboda K.** Laminar and columnar organization of ascending excitatory projections to layer 2/3 pyramidal neurons in rat barrel cortex. *J Neurosci*. 2005;25(24): 5670-9.
- Shermann M, Guillery RW.** Exploring the thalamus. 2001. Academic Press. San Diego. USA.
- Short JL, Ledent C, Borrelli E, Drago J, Lawrence AJ.** Genetic interdependence of adenosine and dopamine receptors: evidence from receptor knockout mice. *Neuroscience*. 2006;(139):661-70.

- Shuman S.** Recombination mediated by Vaccinia Virus DNA Topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1991;(88): 10104-8.
- Simpson TI, Price DJ.** Pax6; a pleiotropic player in development. *Bioassays*. 2002;24(11):1041-51. Review.
- Smart IH, McSherry GM.** Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon. II. Histological changes during and subsequent to the period of isocortical neuron production. *J Anat.* 1982; 134(3):415-42.
- Smith CM, Steitz JA.** Classification of gas5 as a multi-small-nucleolar-RNA host gene and a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family reveals common features of snoRNA host genes. *Mol Cell Biol.* 1998;18(12):6897-909.
- Smith A, Robinson V, Patel K, Wilkinson DG.** The EphA4 and EphB1 receptor tyrosine kinases and ephrin-B2 ligand regulate targeted migration of branchial neural crest cells. *Curr Biol.* 1997;7(8):561-70.
- Song J, Vranken W, Xu P, Gingras R, Noyce RS, Yu Z, Shen SH, Ni F.** Solution structure and backbone dynamics of the functional cytoplasmic subdomain of human ephrin B2, a cell-surface ligand with bidirectional signaling properties. *Biochemistry.* 2002;41(36):10942-9.
- Spreyer P, Kuhn G, Hanemann CO, Gillen C, Schaal H, Kuhn R, Lemke G, Muller HW.** Axon-regulated expression of a Schwann cell transcript that is homologous to a 'growth arrest-specific' gene. *EMBO J.* 1991;10(12):3661-8.
- Stuckmann I, Weigmann A, Shevchenko A, Mann M, Huttner WB.** Ephrin B1 is expressed on neuroepithelial cells in correlation with neocortical neurogenesis. *J Neurosci.* 2001;21(8):2726-37.
- Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z.** Genesis: Cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics.* 2002. 18:207-8.
- Takasu MA, Dalva MB, Zigmond RE, Greenberg ME.** Modulation of NMDA receptor-dependent calcium influx and gene expression through EphB receptors. *Science.* 2002;295(5554):491-5.
- Takemoto M, Fukuda T, Sonoda R, Murakami F, Tanaka H, Yamamoto N.** Ephrin-B3-EphA4 interactions regulate the growth of specific thalamocortical axon populations in vitro. *Eur J Neurosci.* 2002;16(6):1168-72.
- Tanaka E, Sabry J.** Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell.* 1995;83(2):171-6. Review.
- Tamagnone L, Comoglio PM.** To move or not to move? *EMBO Rep.* 2004;5(4):356-61.
- Tamamaki N, Fujimori KE, Takauji R.** Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J Neurosci.* 1997;17(21):8313-23.
- Tarabykin V, Stoykova A, Usman N, Gruss P.** Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression. *Development.* 2001;128(11):1983-93.
- Toresson H, Parmar M, Campbell K.** Expression of Meis and Pbx genes and their protein products in the developing telencephalon: implications for regional differentiation. *Mech Dev.* 2000; 94(1-2): 183-7.
- Torii M, Levitt P.** Dissociation of corticothalamic and thalamocortical axon targeting by an EphA7-mediated mechanism. *Neuron.* 2005;48(4):563-75.
- Torres R, Firestein BL, Dong H, Staudinger J, Olson EN, Hagan RL, Bredt DS, Gale NW, Yancopoulos GD.** PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron.* 1998;21(6):1453-63.
- Trousse F, Marti E, Gruss P, Torres M, Bovolenta P.** Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development.* 2001;128(20):3927-36.
- Uziel D, Garcez P, Lent R, Peuckert C, Niehage R, Weth F, Bolz J.** Connecting thalamus and cortex: the role of ephrins. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2006;288(2):135-42. Review.
- Uziel D, Muhlfriedel S, Zarbalis K, Wurst W, Levitt P, Bolz J.** Miswiring of limbic thalamocortical projections in the absence of ephrin-A5. *J Neurosci.* 2002;22(21):9352-7.
- Vanderhaeghen P, Lu Q, Prakash N, Frisen J, Walsh CA, Frostig RD, Flanagan JG.** A mapping label required for normal scale of body representation in the cortex. *Nat Neurosci.* 2000;3(4):358-65.
- Vecellio M, Schwaller B, Meyer M, Hunziker W, Celio MR.** Alterations in Purkinje cell spines of calbindin D-28K and parvalbumin-knock-out mice. *Eur J Neurosci.* 200;12(3):945-54.

- Veinante P, Lavalley P, Deschenes M.** Corticothalamic projections from layer 5 of the vibrissal barrel cortex in the rat. *J Comp Neurol.* 2000;424(2):197-204.
- Volk DW, Austin MC, Pierri JN, Sampson AR, Lewis DA.** Decreased glutamic acid decarboxylase67 messenger RNA expression in a subset of prefrontal cortical gamma-aminobutyric acid neurons in subjects with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 2000;57(3):237-45.
- Wahl SH, Barth H, Ciossek T, Aktories K, Mueller BK.** Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *J Cell Biol.* 2000;149(2):263-70.
- Walz A, McFarlane S, Brickman YG, Nurcombe V, Bartlett PF, Holt CE.** Essential role of heparan sulfates in axon navigation and targeting in the developing visual system. *Development.* 1997;124(12):2421-30.
- Wang HU, Anderson DJ.** Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. *Neuron.* 1997;18(3):383-96
- Webb DJ, Brown CM, Horwitz AF.** Illuminating adhesion complexes in migrating cells: moving toward a bright future. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15(5):614-20. Review.
- Welker E, Van der Loos H.** 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.* 1986;6:3355-73.
- Welker E, Hoogland PV, Vanderloos H.** Organization of feedback and feedforward projections of the barrel cortex: a pha-I study in the mouse. *Exp Brain Res.* 1988;73:411-35.
- Winberg ML, Mitchell KJ, Goodman CS.** Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: complementary and combinatorial functions of netrins, semaphorins, and IgCAMs. *Cell.* 1998;93(4):581-91.
- Wittmann W, Loacker S, Kapeller I, Herzog H, Schwarzer C.** Y1-receptors regulate the expression of Y2-receptors in distinct mouse forebrain areas. *Neuroscience.* 2005;(136):241-50.
- Wong JT, Wong ST, O'Connor TP.** Ectopic semaphorin-1a functions as an attractive guidance cue for developing peripheral neurons. *Nat Neurosci.* 1999;2(9):798-803.
- Woo TU, Whitehead RE, Melchitzky DS, Lewis DA.** A subclass of prefrontal gamma-aminobutyric acid axon terminals are selectively altered in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(9):5341-6.
- Woolsey TA, Van der Loos H.** 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.* 1970;17:205-42.
- Wu YC, Tucker T, Fettiplace R.** A theoretical study of calcium microdomains in turtle hair cells. *BiophysJ.* 1996;71:2256-75.
- Xiao D, Miller GM, Jassen A, Westmoreland SV, Pauley D, Madras BK.** Ephrin/Eph receptor expression in brain of adult nonhuman primates: implications for neuroadaptation. *Brain Res.* 2006;1067(1):67-77.
- Yin Y, Yamashita Y, Noda H, Okafuji T, Go MJ, Tanaka H.** EphA receptor tyrosine kinases interact with co-expressed ephrin-A-ligands in cis. *Neurosci Res.* 2004;(48):285-96.
- Yoneshima H, Yamasaki S, Voelker CC, Molnar Z, Christophe E, Audinat E, Takemoto M, Nishiwaki M, Tsuji S, Fujita I, Yamamoto N.** ER81 is expressed in a subpopulation of layer 5 neurons in rodent and primate neocortices. *Neuroscience.* 2006; 137(2):401-12.
- Yoshikawa S, Mckinnon RD, Kokel M, Thomas JB.** Wnt-mediated axon guidance via the *Drosophila* derailed receptor. *Nature.* 2003.422:583-88.
-
- Yun ME, Johnson RR, Antic A, Donoghue MJ.** EphA family gene expression in the developing mouse neocortex: regional patterns reveal intrinsic programs and extrinsic influence. *J Comp Neurol.* 2003;456(3):203-16.
- Zarbalis K.** Molekulare und funktionale Analyse des Ephrin-A5-Gens der Maus.2000, Dissertation, Fakultät für Chemie der Technischen Universität München
- Zhang H, Webb DJ, Asmussen H, Niu S, Horwitz AF.** A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *J Neurosci.* 2005;25(13):3379-8.

-
- Zhao ZS, Manser E.** PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem J.* 2005;386(Pt 2):201-14. Review.
- Zheng JQ, Wan JJ, Poo MM.** Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient. *J Neurosci.* 1996;16(3):1140-9.
- Zimmer M.** Mechanisms of Eph/ephrin mediated cell-cell communication. 2003, Dissertation, Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Zisch AH, Kalo MS, Chong LD, Pasquale EB.** Complex formation between EphB2 and Src requires phosphorylation of tyrosine 611 in the EphB2 juxtamembrane region. *Oncogene.* 1998;16(20):2657-70.
- Zou JX, Wang B, Kalo MS, ZischAH, Pasquale EB, Ruoslahti E.** An Eph receptor regulates integrin activity through R-Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(24): 13813-8.
-

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Direkt oder indirekt übernommene Daten anderer sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht worden.

Ich habe keine entgeltlichen Hilfen von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (z.B. Promotionsberater) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in dieser oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

Christiane Peuckert

Jena, den 13. September 2006

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Jürgen Bolz danke ich für die Überlassung und Betreuung des Dissertationsthemas und für die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft während der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Lennart Olsson möchte ich für das Interesse an meiner Arbeit und für die kritische Diskussion bei der Fertigstellung der Arbeit danken.

Bei Herrn PD Dr. Knuth Krohn und bei Frau Pharm. Ing. Petra Süptitz aus der IZKF Core Unit DNA-Technologien in Leipzig möchte ich mich für die zuverlässige und nette Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Dr. Joachim Clement, AG-Leiter des Onkologischen Forschungslabors der Klinik für Innere Medizin II Jena, danke ich für die Möglichkeit, das LightCycler-Gerät seiner Arbeitsgruppe nutzen zu können.

Bei Herrn Dr. Torsten Kroll und Herrn Dr. Stefan Knoth möchte ich mich für die Unterstützung bei der Auswertung und Normalisierung der Affymetrix-Daten bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern des Instituts für Allgemeine Zoologie der FSU Jena für das motivierende Arbeitsklima.

Ganz besonders danke ich Frau Erika Krause, die mit ihrer exzellenten technischen Assistenz und zuverlässigen Zusammenarbeit einen bedeutenden Beitrag für diese Arbeit geleistet hat. Bei Frau Renate Winkler und Frau Elke Woker möchte ich mich für die Mühen bei der Tierhaltung und Verpaarung der Mäuse bedanken. Herrn Dipl. Chem. Jürgen Rapus danke ich für seine Hilfe bei der Durchführung der Western Blots. Bei der Technischen Assistentin Frau Christine Raue möchte ich mich ebenfalls für ihre Unterstützung im Labor bedanken. Ich bedanke mich bei Frau Dipl. Biol. Katharina Merz, die in ihrer Diplomarbeit die Genfragmente der Ephrine und Eph-Rezeptoren zur Herstellung von RNA-Sonden kloniert hat. Ich danke weiterhin Frau Dipl. Biol. Sandra Barchmann, sie stellte Daten aus ihrer Diplomarbeit zur Verfügung.

Bei Frau Jutta Behr, der Sekretärin des Instituts, möchte ich mich für ihre Unterstützung bei der Organisation und Bestellung von Materialien bedanken.

Dr. Fanco Weth und den Mitarbeitern der Nachwuchsgruppe Neurogenetik am Theoretikum des Klinikums Jena danke ich für die anregenden Diskussionen. Bei Franco möchte ich mich besonders für die Einführung in die *In situ*-Hybridisierung bedanken.

Besonderer Dank gilt meiner Familie: Stefan, Clara, meinen Eltern und meiner Schwester Cornelia.

Lebenslauf

geb. 06.01.1975 in Bützow/ Mecklenburg

Ausbildung

- 1991-1993 Abitur am Gymnasium „J.-W.-Goethe“ in Schwerin
- 1993-1994 Biologiestudium (Diplom) an der MLU Halle
- 1995-1996 Studium der Kunstgeschichte, Psychologie und Afrikanistik an der Universität
Leipzig
- 1996-2001 Fortsetzung des Biologiestudiums an den Universitäten Leipzig und Jena
- 1997-1998 Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe von Dr.
Thomas Günther am Institut für Angewandte und ökologische Mikrobiologie
der FSU Jena
- 2000-2001 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Karsten König am Institut für
AnatomieII der Friedrich-Schiller-Universität Jena zum Thema „Anwendung
von Femtosekunden-Laserpulsen im NIR-Spektralbereich für Untersuchungen
an humaner Haut“. Förderung durch die Beiersdorf AG Hamburg
- 2001 Abschluss als Diplombiologin mit der Note „sehr gut“
- Seit August 2001 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. J. Bolz, Institut
für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie an der FSU Jena mit dem Ziel
einer Promotion
- Oktober 2002 Arbeitsaufenthalt am Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale
U616 bei Prof. Patricia Gaspar in Paris
- Nov.-Dez.2004 Arbeitsaufenthalt an den Universitäten Sao Paulo (USP) in der Gruppe von
Prof. Dania Hamassaki-Britto und Rio de Janeiro (ICB– UFRJ) bei Prof.
Roberto Lent in Brasilien

Veröffentlichungen

Die im Zusammenhang mit der vorgelegten Arbeit entstandenen Veröffentlichungen sind durch Fettdruck kenntlich gemacht.

Wissenschaftliche Artikel

Tirlapur U, König K, Peuckert C, Krieg R, Halbhuber K.-J, Femtosecond near-infrared laser pulses elicit generation of reactive oxygen species in mammalian cells leading to apoptosis-like death. *Exp.Cell.Res.*2001. 263:88-97

Mann F, Peuckert C, Dehner F, Zhou R, Bolz J. Ephrins regulate the formation of terminal axonal arbors during the development of thalamocortical projections. *Development*.2002; 129 (16):3945-55

Bolz J, Uziel D, Mühlfriedel S, Güllmar A, Peuckert C, Zarbalis K., Wurst W, Torii M, Levitt P, Multiple roles of ephrins during the formation of thalamocortical projections: maps and more. *J Neurobiol.* 2004; 59 (1):82-94. Review.

Richter T, Peuckert C, Sattler M, Koenig K, Riemann I, Hintze U, Wittern K.P, Wiesendanger R, Wepf R, Dead but highly dynamic--the stratum corneum is divided into three hydration zones.*Skin Pharmacol Physiol.* 2004;17(5):246-57.

Herbert Z, Weigel S, Sendemir E, Marshall A, Caldwell JD, Petrusz P, Peuckert C, Jirikowski GF. Androgen-binding protein is co-expressed with oxytocin in the male reproductive tract.*Anat.Histol.Embryol.* 2005; 34(5): 286-93

Uziel D, Garcez P, Lent R, Peuckert C, Niehage R, Weth F, Bolz J. Connecting thalamus and cortex: The role of ephrins. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2006;.288A:135-42.

Veröffentlichungen in Vorbereitung

Peuckert C and Bolz J.: Expression profiling of S1 Kortex in Ephrin a5 knockout mice reveals compensatory mechanisms within the gene family of ephrins and Eph receptors. In preparation

Peuckert C and Bolz J.: Calretinin is expressed in layer V pyramidal cells of murine somatosensory cortex during early postnatal development. In preparation

Vortrag im Rahmen des 3. World Congress on Cellular and Molecular Biology, 2000 in Jena

Peuckert C, Riemann I, König K, Two photon induced autofluorescence of in vivo human skin with femtosecond laser pulses- a novel imaging tool of high spatial, spectral and temporal resolution. *Cell.Mol.Biol.*2000,46: 180

Posterpräsentationen

Peuckert C, Riemann I, Wollina U, König K, Remission microscopy with NIR femtosecond laser pulses for 3D in vivo imaging of human skin. *Cell.Mol.Biol.*2000,46: 181

König K, Peuckert C, Riemann I, Wollina U, Non-invasive 3D-optical biopsy of human skin with NIR femtosecond laser pulses for diagnosis of dermatological disorders. *Cell.Mol.Biol.*2000,46: 117

König K, Tirlapur U, Peuckert C, Riemann I, Bergmann A, Becker W, Time-resolved two-photon fluorescence imaging of living cells and tissues. Cell.Mol.Biol.2000, 46:119

Peuckert C, Weth F, Bolz J. Expression pattern of ephrin-A5 in murine neocortex during development. FENS Abstr. Vol 1, A039.13, 2002

Bolz J, Peuckert C, Güllmar A, Sauer H, Ephrin-A5- a wiring molecule for limbic and neocortical circuits.14th Biennial Winter Workshop on Schizophrenia, 2004, Poster No 211

Niehage R, Peuckert C, Vehre D, Krause E, Merz K, Weth F, Developmental expression patterns of wiring molecules of the ephrin/Eph-system in schizophrenia-related regions of the mouse brain. 15. Meeting der International Society for Developmental Neuroscience, 2004 Poster No P197

Peuckert C, Niehage R, Barchmann S, Weth F, Bolz J. Eph/ephrin expression patterns in the developing cortex. 30th Göttingen Neurobiology Conference, 2005, Poster No 375A

Peuckert C and Bolz J. Plasticity within the family of Ephrin receptors and ligands in the murine somatosensory cortex. 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2005