

**Analyse der Funktion von A-Ephrinen  
in der Entwicklung des Nervensystems an einem  
neu etablierten transgenen Mausmodell**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Lothar Lindemann

München, 2002

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Abteilung Neurobiochemie (Martinsried, Deutschland), sowie am Friedrich Miescher Institut, Teil der Novartis Forschungstiftung Basel (Schweiz) durchgeführt.

Eingereicht zur Beurteilung am 05.08.2002  
Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2002

1. Gutachter: Prof. Dr. Yves-Alain Barde
2. Gutachter: PD Dr. Mark Hübener

<b>1 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>4</b>
<b>2 EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Prinzipien neuronaler Konnektivität.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2 Axonale Zielführungsmoleküle.....</b>	<b>7</b>
2.2.1 Semaphorine .....	8
2.2.2 Slit und Netrine.....	11
2.2.3 Nogo.....	13
<b>2.3 Die Eph-Familie.....</b>	<b>15</b>
2.3.1 Molekulare Eigenschaften .....	15
2.3.2 Signaltransduktion.....	17
2.3.3 Biologische Funktionen der Eph-Familie .....	18
2.3.3.1 Topographische Projektionen .....	18
2.3.3.2 Faszikulierung.....	20
2.3.3.3 Zellwanderung und Etablierung von Zellgrenzen.....	21
2.3.3.4 Blutgefäßsystem .....	22
2.3.3.5 Synaptogenese und synaptische Plastizität.....	23
<b>2.4 Untersuchung der <i>in-vivo</i> Funktion von A-Ephrinen für die Entwicklung topographischer Projektionen und axonales Wachstum.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5 Konzept von Neuroantikörpern .....</b>	<b>26</b>
<b>3 ZIEL DER ARBEIT .....</b>	<b>28</b>
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Expression von EphA-Rezeptoren und A-Ephrinen in Spinalganglien und Rückenmark von Huhn und Maus.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Design und Klonierung des EphA5-Rezeptorkörpers .....</b>	<b>33</b>
<b>4.3 Charakterisierung des EphA5-Rezeptorkörpers .....</b>	<b>37</b>
4.3.1 Expression des Rezeptorkörpers in 293 Zellen.....	37
4.3.2 N-terminale Aminosäuresequenzierung des Rezeptorkörpers .....	39
4.3.3 Bindung des Rezeptorkörpers an Ephrin-A5 und Ephrin-A2 .....	40
<b>4.4 Expression des Rezeptorkörpers in einer transgenen Maus.....</b>	<b>44</b>
4.4.1 Wahl des Genlokus .....	44
4.4.2 Genaustausch durch homologe Rekombination in ES-Zellen .....	44
4.4.2.1 Design und Klonierung des Rekombinationskonstruktes.....	44

4.4.2.2 Homologe Rekombination in ES-Zellen.....	48
4.4.2.3 Karyotypisierung der rekombinierten ES-Klone .....	51
4.4.3 Etablierung der $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ Mauslinie .....	53
4.4.3.1 Erzeugung von Chimären mittels Blastocysteninjektion .....	53
4.4.3.2 Keimbahntransmission des rekombinanten Gens.....	54
4.4.3.3 Etablierung einer PCR-basierten Genotypisierungsstrategie.....	55
4.4.3.4 Erzeugung einer congenischen Mauslinie mittels Rückkreuzung .....	56
4.4.4 Grundeigenschaften der $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ Mauslinie .....	58
4.4.4.1 Überlebensfähigkeit und Fertilität, äußeres Erscheinungsbild .....	58
4.4.4.2 Analyse des Genaustausches auf RNA-Ebene .....	58
4.4.4.3 Analyse des Genaustausches auf Protein-Ebene.....	62
4.4.4.4 Quantifizierung der Gewebekonzentration des Rezeptorkörpers.....	67
4.4.4.5 Analyse der Hirnmorphologie.....	70
4.4.5 Spezifische Phänotypen der $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ Mauslinie .....	72
4.4.5.1 Sensorische Projektionen im Rückenmark .....	72
4.4.5.2 Nervenverzweigungen in Extremitäten und Interkostalnerven .....	77
4.4.5.3 Blutgefäße .....	83
4.4.5.4 Visuelles System .....	88
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>94</b>
<b>5.1 Die Strategie von Neuroantikörpern für die funktionelle Neutralisierung von A-Ephrinen .....</b>	<b>94</b>
<b>5.2 Grundeigenschaften der <math>\tau^{EphA5lg/EphA5lg}</math> Mauslinie .....</b>	<b>97</b>
5.2.1 Die A-Ephrine sind in der $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ Mauslinie effektiv inaktiviert .....	97
5.2.2 Die Deletion von Tau ist vollständig .....	99
5.2.3 Sonstige Eigenschaften.....	100
<b>5.3 Spezifische Phänotypen der <math>\tau^{EphA5lg/EphA5lg}</math> Mauslinie .....</b>	<b>101</b>
5.3.1 Sensorische Projektionen im Rückenmark.....	101
5.3.2 Nervenverzweigungen in der Peripherie .....	103
5.3.3 Blutgefäße .....	105
5.3.4 Visuelles System .....	106
<b>5.4 Ausblick.....</b>	<b>113</b>
<b>6 MATERIAL UND METHODEN:.....</b>	<b>114</b>
<b>6.1 Materialien .....</b>	<b>114</b>
6.1.1 Geräte .....	114
6.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	114
6.1.3 Antikörper und Enzyme .....	116
6.1.4 Bakterien, Mäuse, Vektoren, Oligodesoxynukleotide und DNA-Sonden .....	116
6.1.5 Zelllinien.....	120
6.1.6 Lösungen für die Zellkultur .....	120
6.1.7 Sonstige Lösungen.....	122

---

<b>6.2 Methoden .....</b>	<b>125</b>
6.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	125
6.2.2 Zellkulturtechniken .....	135
6.2.3 Proteinchemische Methoden.....	138
6.2.4 Histologische und immuncytochemische Methoden.....	141
6.2.5 Transgene Mäuse .....	147
<b>7 ABKÜRZUNGEN UND BEGRIFFE .....</b>	<b>153</b>
<b>8 LITERATUR .....</b>	<b>157</b>
<b>9 DANKSAGUNG.....</b>	<b>174</b>
<b>10 LEBENSLAUF.....</b>	<b>175</b>

# 1 Zusammenfassung

Die Eph-Familie von Rezeptortyrosinkinasen und ihre Liganden, die Ephrine, sind die größte Gruppe von axonalen Zielführungsmolekülen. Die membrangebundenen Ephrine und ihre Rezeptoren sind jedoch nicht ausschließlich für die Etablierung neuronaler Konnektivität, sondern auch für Entwicklungsvorgänge außerhalb des Nervensystems wie die Ausbildung des Blutgefäßsystems und die Steuerung von Zellmigration von Bedeutung. Als charakteristisches Merkmal dieser Molekülfamilie kann jeder einzelne Rezeptor durch eine Vielzahl verschiedener Ephrine aktiviert werden, was eine starke funktionelle Redundanz zur Folge hat. Konventionelle knock-out Experimente liefern daher nur ein unvollständiges Bild von der Funktion dieser Proteine, da eine genetische Deletion von Einzelmolekülen zumindest partiell von anderen Vertretern der Eph-Familie kompensiert werden kann.

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine transgene Mauslinie etabliert, welche im gesamten Nervensystem ein sezerniertes, Antikörper-ähnliches Fusionsprotein, einen sog. Rezeptorkörper, exprimiert. In dieser Mauslinie sollte der Rezeptorkörper alle Ephrine der sog. A-Subfamilie zugleich binden und neutralisieren, und damit die funktionelle Redundanz der A-Ephrine überwinden. Hierzu wurde in einem ersten Schritt der Rezeptorkörper kloniert, in Zelllinien exprimiert und hinsichtlich seiner Funktionalität charakterisiert. In einem zweiten Schritt wurde nun das Mikrotubuli bindende Protein Tau gegen die cDNA des Rezeptorkörpers ersetzt (sog. knock-in), und nach Keimbahntransmission des rekombinanten Allels wurde durch Rückkreuzung gegen den Inzuchtstamm C57BL/6 eine congenische Mauslinie erzeugt. In dieser Mauslinie wurde der Rezeptorkörper mit dem räumlich-zeitlichen Expressionsmuster von *tau* exprimiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden einige Eigenschaften der knock-in Mauslinie charakterisiert. Die vollständige Deletion des Tau-Proteins sowie die pan-neuronale Expression des Rezeptorkörpers wurden mit Hilfe von Northern-Transfer, mRNA *in-situ* Hybridisierung, RT-PCR sowie mit Western-Transfer und immunhistochemischen Experimenten belegt. Tiere mit dem rekombinanten Allel waren fertil, zeigten keine Hinweise für eine erhöhte prä- oder postnatale Letalität, und das äußere Erscheinungsbild der Mäuse war weitgehend unauffällig. Eine erste Analyse der Hirnanatomie mit Hilfe klassischer histologischer Färbemethoden lieferte keine Hinweise auf starke, offensichtliche morphologische Veränderungen. Mit einem Immunassay wurde die Gewebekonzentration des Rezeptorkörpers zu verschiedenen embryonalen und postnatalen Entwicklungsstufen quantifiziert. Auf subzellulärer Ebene wurde mittels immunocytochemischer Färbungen dissoziierter Neuronen demonstriert, daß der Rezeptorkörper nicht auf das Soma der Zellen beschränkt, sondern auch in Nervenfortsätzen lokalisiert war.

Die Analyse der Mauslinie auf spezifische Veränderungen im dritten Teil der Arbeit konzentrierte sich auf sensorische Projektionen in Peripherie und Rückenmark, sowie auf physiologische Aspekte des visuellen Systems und Blutgefäße. In neugeborenen Tieren wurden keine offensichtlichen Veränderungen der topographischen Projektionen von Spinalganglien in das Rückenmark detektiert. In der Peripherie wurde in dem knock-in

hingegen eine signifikante Zunahme von Nervenverzweigungen in verschiedenen Strukturen beobachtet, die bei der Innervierung von Extremitäten sowie bei Interkostalnerven zwischen dem 12. und dem 14. Tag der Embryonalentwicklung (E12-14) besonders ausgeprägt war. Die Untersuchung der Blutgefäße im zentralen Nervensystem adulter Mäuse mit Hilfe von Korrosionsausgüssen ließ in der Mutante keine offensichtlichen Veränderungen erkennen. Mit Hilfe der in Anwendung auf Mäuse neuartigen Technik „Intrinsic Signal Optical Imaging“ wurde die Repräsentation der Retina im Primären Visuellen Cortex juveniler und adulter Mäuse untersucht. Zentraler Befund dieser Experimente war eine Verzerrung der retinotopen Karte in dem knock-in, die in jungen Mäusen erheblich stärker war als in adulten Tieren.

## 2 Einleitung

### 2.1 Prinzipien neuronaler Konnektivität

Das Nervensystem ist die komplexeste Struktur im Organismus von Säugetieren. Es dient der Detektion von Stimuli aus dem Körper und der Umwelt, der Integration dieser Informationen und letztlich der Steuerung aller willkürlichen und unwillkürlichen Lebensvorgänge. Entscheidende Voraussetzung für diese umfassende Leistung ist die korrekte Verknüpfung der insgesamt ca.  $80 \times 10^9$  Neuronen (Williams *et al.* 1988, Williams 2000) mit ihren Zielzellen. Hierfür müssen die Nervenfortsätze während der Entwicklung Wegstrecken im Bereich von Metern zurücklegen und ihr Zielgebiet mit einer Genauigkeit im Bereich von wenigen  $\mu\text{m}$  treffen. Die vorliegende Arbeit untersucht Aspekte der molekularen Mechanismen, welche der Etablierung neuronaler Verknüpfungen zu Grunde liegen.

Cajal lieferte schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt einen Erklärungsansatz für die Entwicklungen von Nervenverknüpfungen. Er vermutete, daß Axone in ihrem gerichteten Wachstum chemischen Signalmolekülen folgen, welche in den jeweiligen Zielgebieten gebildet werden (Cajal 1893). In der einfachsten Form dieser Hypothese könnten Axone ihre Zielgebiete aufgrund individueller molekularer Marker identifizieren, welche das gesamte Netzwerk neuronaler Verknüpfungen vorzeichnen. Theoretische Überlegungen stellten diese Möglichkeit jedoch rasch in Frage, da hierfür die genetische Kodierung einer sehr großen Anzahl unterschiedlicher molekularer Marker sowie ein extensives „Suchverhalten“ der Axone auf dem Weg zu ihren jeweiligen Zielgeweben erforderlich wäre. Transplantations- und Regenerationsexperimente an Fischen und Fröschen bildeten die Grundlage für eine Verfeinerung der Hypothese und mündeten in die Formulierung der sog. Chemoaffinitätstheorie (Sperry 1943, Sperry 1963).

Die Chemoaffinitätstheorie benötigt für die Erklärung axonaler Zielfindung lediglich wenige molekulare Marker. Sie setzt voraus, daß diese sog. axonalen Zielführungsmoleküle in Form von Gradienten exprimiert sind, welche als molekulare Wegweiser das Zielgebiet der Axone markieren. Diese Funktionsweise erlaubt eine erhebliche Anpassungsfähigkeit des axonalen Wachstums an umgebungsbedingte Schwankungen und ermöglicht sehr unterschiedliche Aktionsradien der axonalen Zielführungsmoleküle. Da Wachstumskegel sehr klein sind, müssen gemäß dieser Theorie die Konzentrationsunterschiede der Zielführungsmoleküle aus der unmittelbaren Umgebung des Wachstumskegels im Zellinneren verstärkt werden (Meinhardt *et al.* 1974, Gierer 1981). Weiterhin setzt die Theorie voraus, daß auch die Rezeptoren in Form von Gradienten auf den axonalen Wachstumskegeln exprimiert sind (Bonhoeffer *et al.* 1984), womit sich die unterschiedliche Sensitivität verschiedener Neuronen für dieselben Zielführungsmoleküle erklären läßt. Das Expressionsniveau sowie die Spezifität der Rezeptoren auf dem Wachstumskegel entscheiden hierbei, mit welcher Sensitivität, und auf welche Zielführungsmoleküle das jeweilige Axon reagiert. Die Chemoaffinitätstheorie hat ihre grundlegende Bedeutung bis heute nicht verloren, allerdings ergeben die seit ihrer Formulierung gesammelten Befunde ein wesentlich komplexeres Bild von den Mechanismen axonaler Zielführung. So wurden neben anziehenden auch repulsive

axonale Zielführungsmoleküle gefunden, die sich in ihrer Wirkung vielfach gegenseitig beeinflussen.

## 2.2 Axonale Zielführungsmoleküle

Zu der gezielten Suche und molekularen Charakterisierung axonaler Zielführungsmoleküle trug die Entwicklung von *in-vitro* Assays bei, von denen stellvertretend der Streifenassay (Walter *et al.* 1987) und der Kollapsassay (Cox *et al.* 1990, Raper *et al.* 1990) genannt werden sollen. Im Streifenassay wird das axonale Wachstum von retinalen Ganglienzellen (RGZ) auf zwei unterschiedlichen Membranpräparationen untersucht, die z.B. aus zwei verschiedenen Bereichen des optischen Tektums isoliert werden und in einem Kulturgefäß in Form alternierender Streifen angeordnet sind. Das präferentielle Wachstum der Axone auf einem der angebotenen Substrate liefert Hinweise auf mögliche Unterschiede in der Zielführungsaktivität der beiden Membranpräparationen. Im Kollapsassay werden Kulturen von RGZ Membranpräparationen ausgesetzt, wobei ein transienter oder vollständiger Kollaps der Wachstumskegel Rückschlüsse auf die in den Membranpräparationen enthaltenen Aktivitäten ermöglicht. Mit Hilfe dieser Assays gelang Stahl *et al.* die biochemische Charakterisierung eines Glykosylphosphatidylinositol- (GPI) verankerten Proteins in der Zellmembran des optischen Tektums vom Huhn, das eine repulsive Wirkung auf die Axone von RGZ hat und RGM genannt wurde (engl.: Repulsive Guidance Molecule, Stahl *et al.* 1990). Wenig später gelang Drescher *et al.* (1995) die Charakterisierung und Klonierung eines axonalen Zielführungsmoleküls aus dem optischen Tektum vom Huhn, bei dem es sich um Ephrin-A5 handelte. Dieses aufgrund seiner biologischen Aktivität ursprünglich als RAGS (engl.: Repulsive Axon Guidance Signal) bezeichnete Molekül war ebenfalls ein GPI-verankertes Protein.

Axonales Wachstum wird nicht ausschließlich von axonalen Zielführungsmolekülen, sondern auch von der Gegenwart trophischer Faktoren, extrazellulären Matrixproteinen sowie der elektrischen Aktivität der Neuronen gesteuert und moduliert (für Übersichtsarbeiten siehe z.B. Müller *et al.* 1999, Zhang *et al.* 2001, Dickson *et al.* 2001, Skaper *et al.* 2001). Neurotrophe Faktoren z.B. ermöglichen nicht nur das Überleben von Neuronen, sondern sind auch an der Induktion von axonalem Wachstum *per se* beteiligt (Goldberg *et al.* 2002). Untersuchungen der letzten Jahre verdeutlichen zunehmend, daß die Zielführung axonaler Nervenfortsätze und die Etablierung neuronaler Konnektivität komplexe, multifaktorielle Prozesse sind, die nicht losgelöst von anderen Entwicklungsvorgängen verstanden werden können.

Im folgenden werden die wichtigsten Familien axonaler Zielführungsmoleküle vorgestellt, welche ihre Wirkung über definierte Rezeptoren bei direktem Kontakt (Kontaktattraktion/Kontaktrepulsion) oder als lösliche Moleküle über größere Distanzen (chemotrope Attraktion/Repulsion) entfalten. Von den bekannten Proteinfamilien, welche diese Kriterien erfüllen, werden zunächst Semaphorine, Slit und Netrine sowie Nogo anhand ausgewählter Eigenschaften einzelner Vertreter diskutiert. Im Anschluß werden molekulare Eigenschaften und zentrale *in-vivo* Funktionen der Ephrine und ihrer Rezeptoren in einem separaten Kapitel dargestellt. Für eine schematische

Gegenüberstellung der genannten 5 Molekülfamilien siehe Abb. 1 (für Übersichtsarbeiten zu den einzelnen Molekülfamilien siehe für Semaphorine z.B. Raper 2000, für Slit z.B. Brose *et al.* 2000, für Netrine z.B. Livesey *et al.* 1999, für Nogo z.B. Brittis *et al.* 2001, für Ephrine z.B. Flanagan *et al.* 1998).

## 2.2.1 Semaphorine

Bei Semaphorinen handelt es sich um teils membranverankerte und teilweise sezernierte Proteine, die im N-terminalen Molekülbereich ein nach der Molekülfamilie benanntes Sema-Motiv von ca. 500 Aminosäuren (AS) Länge enthalten (Übersichtsarbeit: Raper 2000). Die bisher identifizierten mehr als 20 Semaphorine werden aufgrund von Unterschieden im C-terminalen Molekülbereich in 7 verschiedene Klassen eingeteilt, von denen Semaphorine der Klassen 1 und 2 in Invertebraten, die Vertreter der Klassen 3-7 in Vertebraten gefunden wurden (Semaphorin Nomenclature Committee 1999). Es wird angenommen, daß Semaphorine vorwiegend über kurze Distanzen wirken, da auch die sezernierten Vertreter der Klassen 2 und 3 mit der Zellmembran und extrazellulären Matrixproteinen interagieren können. Das zu den übrigen Vertretern der Molekülfamilie entfernt verwandte, in Pockenviren gefundene Semaphorin A39R (Corneau *et al.* 1998) spielte eine wichtige Rolle bei der Identifizierung von Plexinen (siehe unten) als Komponente funktionaler Semaphorinrezeptoren. Eine Bedeutung von A39R im Zusammenhang mit axonaler Zielführung gilt hingegen als unwahrscheinlich.

### Abb. 1: (folgende Seite) Die 5 wichtigsten Klassen axonaler Zielführungsmoleküle.

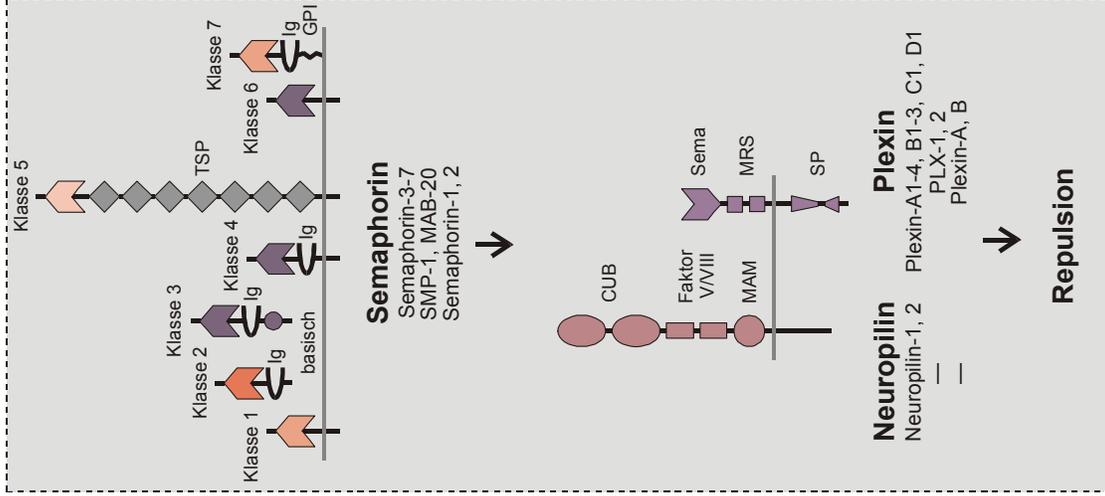
Struktur und Wirkung der 5 wichtigsten Molekülfamilien axonaler Zielführungsmoleküle und ihrer Rezeptoren sind schematisch nebeneinandergestellt. Die Domänenstruktur bezieht sich auf die in höheren Wirbeltieren gefundenen Orthologen, und die einzelnen molekularen Domänen sind zwecks besserer Übersichtlichkeit nicht maßstabgetreu wiedergegeben. Es sind jeweils die vorherrschenden Wirkungen im Zusammenhang mit axonalem Wachstum aufgeführt.

**ALPS:** Agrin-Laminin-Perlecan-Slit Motiv; **C:** Netrin, C-terminaler Bereich; **CUB:** Ci/Uegf/BMP-I Motiv; **DCC:** Deleted in Colorectal Cancer; **EGF:** Epidermal Growth Factor Motiv; **FNIII:** Fibronectin Typ III Motiv; **GPI:** Glycosylphosphatidylinositol-Anker; **Ig:** Immunglobulin-Domäne; **LRR:** Leucin reiche Domäne (engl.: Leucin Rich Repeat); **MAM:** Meprin/A5 Antigen Motiv; **MRS:** Met Tyrosinkinase-ähnliches Motiv (engl.: Met Tyrosine Kinase-Related Sequence); **PDZ:** PSD-95/SAP90 / Disc-large / Z0-1 Domäne; **RK:** Arginin/Lysin-reiche basische Domäne; **SAM:** „Sterile alpha“ Motiv; **SP:** „Sex and plexins“ Domäne; **TK:** Tyrosinkinase Domäne; **TSP:** Thrombospondin Domäne; **VI / V:** Homologe Bereiche zu den Domänen VI und V von Laminin.

Modifiziert nach: Yu *et al.* (2001).

# Liganden

Säugetiere:  
*C.elegans*:  
*D.melanogaster*:



## Neuropilin

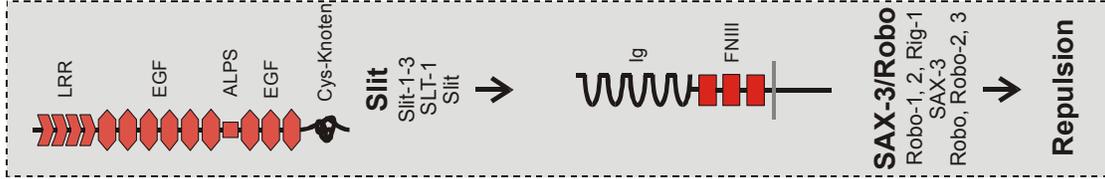
Neuropilin-1, 2  
 —  
 —

## Plexin

Plexin-A1-4, B1-3, C1, D1  
 PLX-1, 2  
 Plexin-A, B

↓

Repulsion

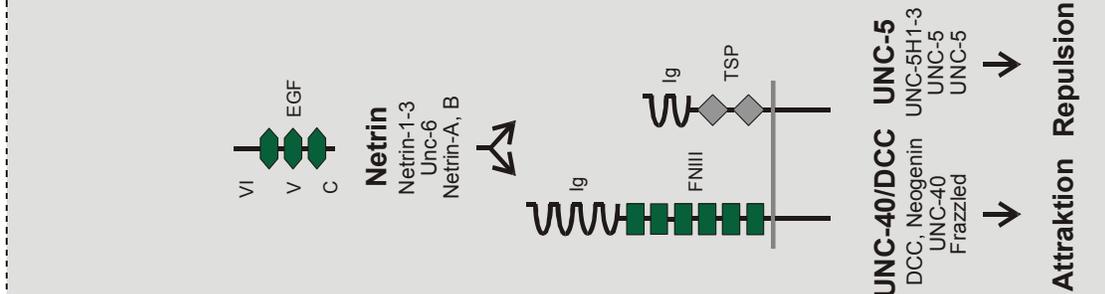


## SAX-3/Robo

Robo-1, 2, Rig-1  
 SAX-3  
 Robo, Robo-2, 3

↓

Repulsion



## UNC-40/DCC UNC-5

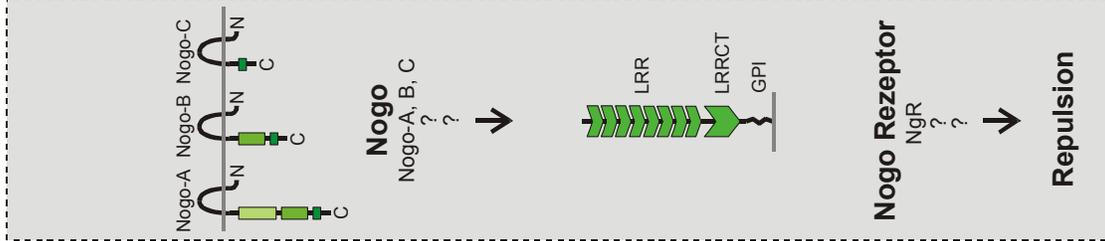
DCC, Neogenin  
 UNC-40  
 Frazzled

UNC-5H1-3  
 UNC-5  
 UNC-5

↓

Attraktion

Repulsion

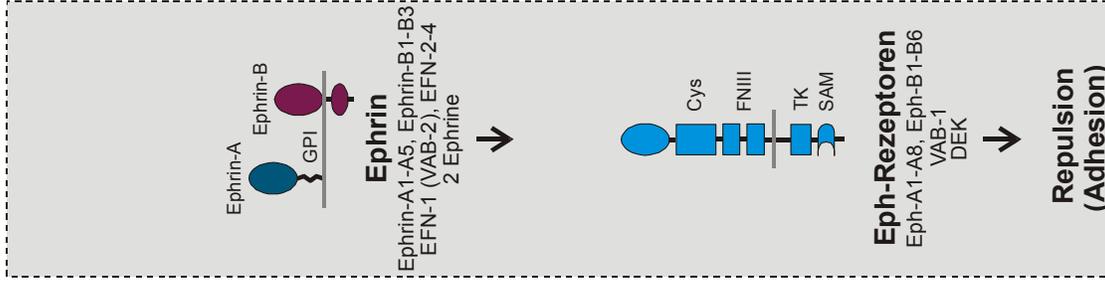


## Nogo Rezeptor

NgR  
 ?  
 ?

↓

Repulsion



## Eph-Rezeptoren

Eph-A1-A8, Eph-B1-B6  
 VAB-1  
 DEK

↓

Repulsion (Adhesion)

# Rezeptoren

Säugetiere:  
*C.elegans*:  
*D.melanogaster*:

# Wirkung

Als einer der ersten Vertreter der Molekülfamilie wurde das Transmembranprotein Semaphorin 1 aufgrund seiner Eigenschaft identifiziert, die Faszikulierung und das gerichtete Wachstum einer Gruppe sensorischer Axone in den Extremitäten von Heuschrecken zu steuern (Kolodkin *et al.* 1992). Weitere Semaphorine wurden wenig später durch biochemische Aufreinigung aus dem Hirn von Hühnerembryonen (Luo *et al.* 1993) sowie aus einer Genbibliothek vom Huhn (Luo *et al.* 1995) isoliert. Die ursprünglich als Collapsine bezeichneten Proteine aus dem Huhn waren dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Paralyse und den Kollaps von Wachstumskegeln sensorischer Neuronen schon in sehr geringer Konzentration induzieren konnten. Diese frühen Beobachtungen spiegeln prototypisch zwei zentrale Funktionen von Semaphorinen wider, die auch in Säugetieren gefunden wurden. Semaphorin 3 A defiziente Mäuse zeigen eine ausgeprägte Defaszikulierung unter anderem des Nervus trigeminalis und des Nervus facialis, sowie eine Fehlplatzierung von Spinalnerven und peripheren Projektionen der Spinalganglien (Behar *et al.* 1996, Tanigucki *et al.* 1997). Beide Befunde wurden mit einer repulsiven Wirkung von Semaphorin 3 A erklärt, wie sie *in-vitro* für eine Subpopulation sensorischer Neuronen von Spinalganglien demonstriert werden konnte (Messersmith *et al.* 1995). Experimente an Semaphorin 3 A defizienten Mäusen wiesen darauf hin, daß die Bedeutung von Semaphorinen nicht auf axonale Zielführung beschränkt ist (Behar *et al.* 1996).

Erst nach Beschreibung der ersten Semaphorine als axonale Zielführungsmoleküle wurden die zugehörigen Rezeptoren Neuropilin 1 und 2 mittels Expressionsklonierung isoliert (He *et al.* 1997, Kolodkin *et al.* 1997). Ein direkter Beleg für die Rezeptorfunktion war die Beobachtung, daß Projektionen von Spinalganglien Neuropilin 1 defizienter Mäuse ihre Sensitivität für Semaphorin 3 A verlieren (Kitsukawa *et al.* 1997). Da jedoch auch die ektopische Expression mutierter Neuropiline ohne cytoplasmatische Domäne in RGZ eine Sensitivität für Semaphorin 3 A induzieren kann (Nakamura *et al.* 1998), wurde die Existenz weiterer Rezeptorkomponenten angenommen, die wenig später als Plexine identifiziert wurden (Tamagnone *et al.* 1999). Mittlerweile gilt als gesichert, daß die 9 bisher in Vertebraten identifizierten Plexine die signaltransduzierende Komponente funktioneller Semaphorinrezeptoren darstellen, die sich aus Neuropilinen und Plexinen zusammensetzen (Takashi *et al.* 1999). Der erheblich schwerwiegendere Phänotyp von Neuropilin 1 defizienten Mäusen im Vergleich zu Semaphorin 3 A defizienten Mutanten wurde als Hinweis auf eine funktionelle Redundanz der Semaphorine gewertet.

In neueren Arbeiten wird ein Antagonismus zwischen unterschiedlichen Semaphorinen als Mechanismus der Regulation diskutiert. Grundlage dieser Überlegung ist die Beobachtung, daß die hochaffine Bindung der Semaphorine 3 A und 3 E an Neuropilin 1 keine Repulsion von Wachstumskegeln auslöst, sondern vielmehr die repulsive Wirkung von Semaphorin 3 D blockieren kann (Übersichtsarbeit: Chen *et al.* 1998). Die Details der molekularen Mechanismen, welche die Wirkung von Semaphorinen regulieren, sind bislang wenig verstanden.

## 2.2.2 Slit und Netrine

Die beiden Proteinfamilien von Slit und Netrinen sollen hier gemeinsam anhand der Entwicklung von Projektionen vorgestellt werden, welche die beiden Hälften des ZNS verbinden (sog. commissurale Projektionen). Die Wechselwirkung beider Proteinfamilien konnte in neueren Arbeiten anhand dieser Projektionen besonders deutlich demonstriert werden.

Einen ersten Hinweis auf die Existenz von Slit lieferte die Charakterisierung der Mutante *roundabout (robo)* in *D.melanogaster* in einem Screen, welcher auf die Identifikation von Genen mit einer Funktion für die Entwicklung commissuraler Projektionen ausgerichtet war (Seeger *et al.* 1993). Während diese Projektionen normalerweise nach Überschreiten der Mittellinie auf der contralateralen Seite des Nervensystems verbleiben, kreuzten sie in *robo* defizienten Fliegen die Mittellinie mehrmals und ungeordnet. Diese und andere Beobachtungen führten zu der Annahme, daß es sich bei Robo um einen Rezeptor für ein an der Mittellinie gebildetes, repulsiv wirkendes Zielführungsmolekül für commissurale Projektionen handelte, welches einige Jahre später als Slit identifiziert wurde (Übersichtsarbeiten: Zinn *et al.* 1999, Brose *et al.* 2000).

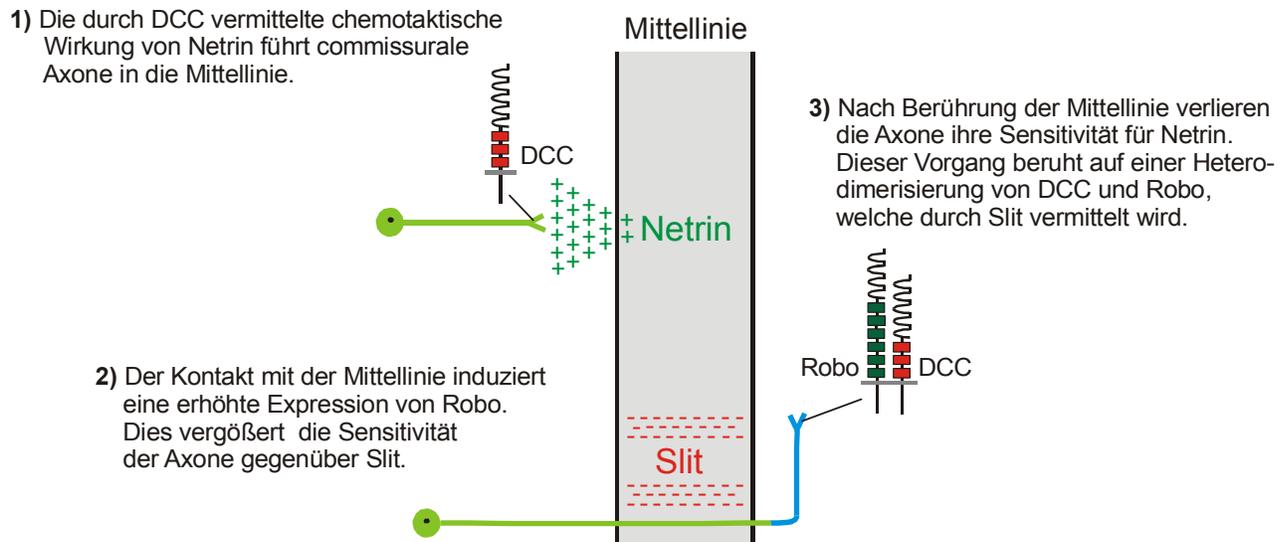
In Säugetieren wurden bisher 3 Slit-Proteine identifiziert. Hierbei handelt es sich um sezernierte Proteine mit einer Länge von ca. 1500 AS, welche unter anderem ein sog. Agrin-Laminin-Perlecan-Slit (ALPS) Motiv sowie einen sog. Cystein-Knoten enthalten. Die Anwesenheit des ALPS-Motivs deutet auf eine Interaktion von Slit mit extrazellulären Matrixproteinen, der Cystein-Knoten hingegen auf eine Dimerisierung hin. Die Aminosäuresequenzen der 3 in Säugetieren gefundenen Slit Proteine weisen untereinander eine hohe Homologie von insgesamt ca. 65%, sowie eine identische Domänenstruktur und eine Ähnlichkeit von ca. 40% zu den jeweils singulären Orthologen in *D.melanogaster* und *C.elegans* auf. Eine direkte Demonstration der Rezeptorfunktion von Robo für Slit erfolgte mit Hilfe von *in-vitro* Assays und Expressionsstudien (Brose *et al.* 1999): Jedes der 3 Slit-Proteine von Säugetieren kann mit beiden in Säugern identifizierten Robo-Proteinen mit Bindungskonstanten im nanomolaren Bereich interagieren. Die Bindung von Slit an Robo hat eine repulsive Wirkung, wie z.B. für embryonale Motoneuronen der Ratte gezeigt werden konnte. Hierbei steht die Expression von Slit in der sog. Bodenplatte gut im Einklang mit einer Wegweiserfunktion für commissurale Projektionen. Wie für Slit-2 beobachtet wurde, kommt es unmittelbar nach Sekretion des ca. 200 kDa schweren Proteins zu einer Spaltung in 2 jeweils ca. 140 kDa und 60 kDa große Fragmente durch eine noch nicht identifizierte Protease. Die biologische Bedeutung dieser Spaltung ist jedoch bislang ungeklärt.

Die Identifikation von Netrinen beruhte auf der frühen Beobachtung, daß Explantate der Bodenplatte eine diffusible Aktivität sezernieren, welche eine chemotaktische Wirkung auf commissurale Projektionen des Rückenmarks besitzt (Tessier-Lavigne *et al.* 1988). Auf der Grundlage dieser biologischen Wirkung gelang die proteinchemische Aufreinigung und anschließende Klonierung der ersten beiden der insgesamt 3 in Wirbeltieren gefundenen Netrine (Serafini *et al.* 1994, Kennedy *et al.* 1994). Bei Netrinen handelt es sich um sezernierte Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kDa, die sich

aus einem N-terminalen Bereich mit großer Ähnlichkeit zu der B1-Kette aus Laminin und einer basischen C-terminalen Domäne zusammensetzen. Die 3 Netrine von Wirbeltieren stimmen in ihrer Aminosäuresequenz zu 78% überein (Übersichtsarbeiten: Livesey 1999, Culotti *et al.* 1998).

Erste Hinweise auf die Rezeptoren von Netrinen kamen aus genetischen Experimenten, welche auf einen funktionalen Zusammenhang zwischen dem Ortholog zu Netrinen von Wirbeltieren in *C.elegans* Unc-6 und den Transmembranproteinen Unc-5 und Unc-40 deuteten. Beide Proteine wiesen eine starke Homologie zu dem Protein Deleted in Colorectal Cancer (DCC) in Säugetieren auf, einem Netrin bindenden Protein der Immunglobulin Superfamilie. Die Rezeptorfunktion von DCC wurde mit Hilfe funktionsblockierender Antikörper demonstriert, welche die chemotaktische Wirkung von Netrinen auf Axone von Rückenmarksexplantaten *in-vitro* neutralisieren konnten (Keino-Masu *et al.* 1996). Neben DCC wurden in Wirbeltieren die beiden Netrin bindenden Proteine Unc-5 und Neogenin gefunden, wobei Unc-5 als weiterer Rezeptor die repulsive Wirkung von Netrinen vermittelt, während die Funktion von Neogenin im Zusammenhang mit der Wirkung von Netrinen weitgehend unklar ist. Experimente mit gegen DCC gerichteten Antikörpern, welche zwar nicht die Bindung von Netrinen an DCC, jedoch die chemotaktische Wirkung von Netrinen neutralisieren können, weisen auf die mögliche Existenz weiterer Komponenten funktionaler Netrinrezeptoren hin (Keino-Masu *et al.* 1996).

Die gleichzeitige Wirkung einer chemotaktisch sowie einer repulsiv wirkenden Aktivität allein kann das Verhalten commissuraler Projektionen an der Mittellinie jedoch nicht hinreichend erklären (Abb. 2). Während im ipsilateralen Bereich die chemotaktische Wirkung von Netrin überwiegen muß, um die Axone in die Mittellinie zu führen, muß nach Überqueren der Mittellinie die repulsive Wirkung von Slit dominieren, um die Projektionen auf der contralateralen Seite zu halten. Diese differenzielle Wirkung von Netrin und Slit beruht auf der direkten biochemischen Interaktion von DCC und Robo, welche in einer neueren Arbeit auf molekularer Ebene aufgeklärt wurde (Stein *et al.* 2001). Die Dominanz der chemotaktischen Wirkung von Netrin auf der ipsilateralen Seite der Mittellinie beruht auf einem zunächst nur geringen Expressionsniveau von Robo im Vergleich zu DCC. Nach Überschreiten der Mittellinie führt jedoch eine Erhöhung des Expressionsniveaus von Robo auf den commissuralen Axonen zu einer verstärkten Sensitivität gegenüber Slit, während zugleich die chemotaktische Wirkung von Netrin auf die Axone stark abnimmt. Die Desensibilisierung der Axone für die attraktive Wirkung von Netrin beruht hierbei auf einer von Slit induzierten Heterodimerisierung von DCC und Robo, während die durch Kontakt mit der Mittellinie ausgelöste Induktion von Robo in Wirbeltieren noch wenig verstanden ist. Die Sequenz dieser Vorgänge erklärt die erst nach Überschreiten der Mittellinie beobachtete Repulsion durch Slit und stellt sicher, daß die commissuralen Projektionen auf der contralateralen Seite der Mittellinie gehalten werden.



**Abb. 2: Funktion von Slit und Netrin für die Projektion commissuraler Axone über die Mittellinie.**

Die chemotaktische Wirkung von Netrin, welches von der Bodenplatte sezerniert wird, über DCC lenkt die commissuralen Axone auf der ipsilateralen Seite zur Mittellinie. Durch einen bisher noch wenig verstandenen Mechanismus induziert die Berührung mit der Mittellinie eine erhöhte Expression von Robo auf den Axonen, wodurch sich die Sensitivität für Slit erhöht. Nach Berührung der Mittellinie führt eine durch Slit vermittelte Heterodimerisierung von Robo und DCC zu einer Desensibilisierung der Axone gegenüber Netrin. Die repulsive Wirkung von Slit hält die Axone auf der contralateralen Seite und verhindert ein erneutes Überqueren der Mittellinie.

Neben dieser Funktion für die Entwicklung commissuraler Projektionen sind noch weitere charakteristische Eigenschaften von Slit und Netrin zu nennen. So ist Slit mittels biochemischer Reinigung aus Rinderhirn als eine Aktivität charakterisiert worden, welche die Ausbildung kollateraler Verzweigungen sensorischer Neuronen von Spinalganglien stimuliert (Wang *et al.* 1999). Dieser Befund war in Anbetracht der zu Beginn der Arbeit schon bekannten repulsiven Wirkung von Slit als axonales Zielführungsmolekül völlig unerwartet. Für Slit ist eine wichtige Funktion im Zusammenhang mit der Wanderung olfaktorischer Neuronen im sog. Rostralen Migratorischen Strom (Wu *et al.* 1999) sowie bei der Migration GABAerger Neuronen aus der sog. Ganglionischen Eminenz in den Neocortex (Hu 1999) beschrieben worden. Für Netrine wurde in *Drosophila* eine Bedeutung bei der Muskelinnervierung beschrieben (Kolodziej *et al.* 1996). Untersuchungen an DCC und Netrin-1 defizienten Mäusen ergaben zudem eine wichtige Funktion von Netrin für das Auswachsen retinaler Projektionen in den optischen Nerv (Deiner *et al.* 1997).

### 2.2.3 Nogo

Der Entdeckung von Nogo liegt die Beobachtung zu Grunde, daß die inhibitorische Wirkung von Myelin höherer Wirbeltiere auf das Neuritenwachstum eine wesentliche Ursache für die stark eingeschränkte Regenerationsfähigkeit von Neuronen des zentralen

Nervensystems (ZNS) ist (Cajal 1928). Ein wichtiger Schritt für das Verständnis dieser Beobachtung war die Entdeckung, daß der gegen Myelinproteine gerichtete Antikörper IN-1 (Caroni *et al.* 1988) die inhibitorische Wirkung von Myelin auf axonales Wachstum teilweise neutralisieren kann. Nach der biochemischen Aufreinigung eines dieser Proteine aus bovinem Rückenmark (Spillmann *et al.* 1998) gelang schließlich die Klonierung der cDNA von Nogo (Chen *et al.* 2000, GrandPre *et al.* 2000), bei dem es sich aufgrund seiner Wirkung auf axonales Wachstum *in-vitro* sowie von Expressionsdaten tatsächlich um eine wichtige Komponente der inhibitorischen Aktivität von Myelin handelte.

In Nagetieren liegt Nogo in 3 Isoformen vor, die alle von einem einzelnen Gen transkribiert werden. Alle 3 Isoformen weisen 2 Transmembrandomänen sowie einen gemeinsamen C-Terminus auf. In Experimenten mit einzelnen Domänen von Nogo wurde eine inhibitorische Aktivität des Proteins unter anderem in dem nur 66 AS langen extrazellulären Abschnitt des Moleküls detektiert (Fournier *et al.* 2001). Unter Verwendung dieser als Nogo-66 benannten Domäne wurde mittels Expressionsklonierung ein Rezeptor für Nogo identifiziert. Die Rezeptorfunktion dieses nur in einer Isoform beschriebenen, GPI-verankerten Proteins mit der Bezeichnung NgR wird durch zahlreiche Beobachtungen gestützt (Fournier *et al.* 2001): Die Bindungskonstante von NgR für Nogo-66 ist annähernd identisch mit der für halbmaximale Inhibition des Neuritenwachstums erforderlichen Konzentration von Nogo-66. Die Expression von NgR ist fast ausschließlich auf das ZNS beschränkt, und die inhibitorische Wirkung von Nogo-66 auf das Neuritenwachstum wird *in-vitro* neutralisiert, wenn die auf den Neuronen exprimierten GPI-verankerten Proteine durch Vorbehandlung mit Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) entfernt werden. Das Wachstum von Neuriten embryonaler RGZ des Huhns, welche *per se* keine Sensitivität für Nogo aufweisen, wird nach Transfektion mit NgR durch Applikation von Nogo-66 inhibiert. Aufgrund der GPI-Verankerung von NgR wird angenommen, daß funktionale Nogo Rezeptoren neben NgR noch weitere Elemente, möglicherweise Transmembranproteine enthalten, welche die Signalübertragung in das Zellinnere vermitteln. Neuere Arbeiten weisen darauf hin, daß die Familie von Rho GTPasen bei der Signaltransduktion von Nogo eine wesentliche Rolle spielen.

## 2.3 Die Eph-Familie.

### 2.3.1 Molekulare Eigenschaften

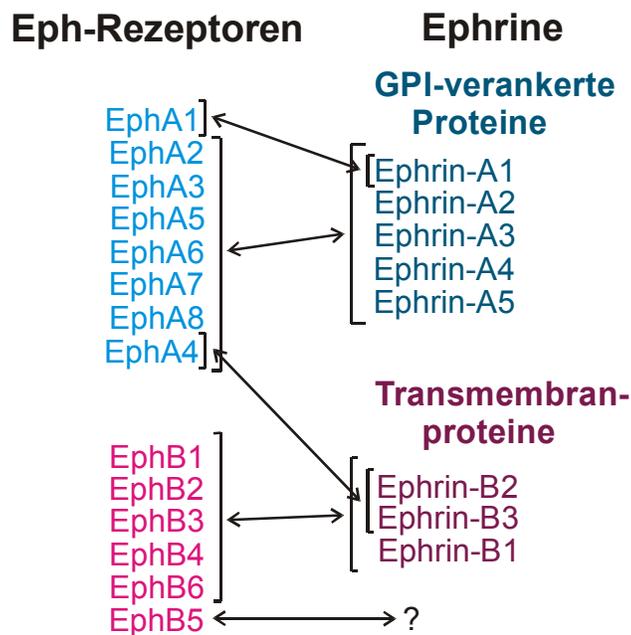
Bei den Eph-Rezeptoren handelt es sich um die größte Subfamilie von Rezeptortyrosinkinasen. Der erste Vertreter *eph* wurde als Protoonkogen aus einer *eph* überexprimierenden, humanen Zelllinie isoliert, welche der Molekülfamilie ihren Namen gab (*eph*, engl.: Erythropoietin-Producing Hepatocellular Carcinoma, Hirai *et al.* 1987). Die bislang in Säugetieren identifizierten 14 Eph-Rezeptoren tragen eine ungewöhnliche Kinase-Domäne, welche sich aus einer Mischung typischer Motive von Rezeptortyrosinkinasen und cytoplasmatischen Tyrosinkinasen zusammensetzt (Hanks *et al.* 1991) und innerhalb der Molekülfamilie eine Homologie von 65-90% aufweist. Eph-Rezeptoren sind Typ I-Transmembranproteine, welche auf der Grundlage von Sequenzhomologien der extrazellulären Domäne in die EphA-Rezeptoren A1-A8 und die EphB-Rezeptoren B1-B6 gegliedert werden.

Erst einige Jahre nach der Klonierung des ersten Eph-Rezeptors gelang die Identifizierung der Liganden, deren erster Vertreter Ephrin-A1 mittels Affinitätschromatographie aus einer Zelllinie isoliert wurde (Bartley *et al.* 1994), wobei zu dieser Zeit noch keine Hinweise auf eine Bedeutung von Ephrinen für axonales Wachstum vorlagen. Alle 7 in Säugetieren gefundenen Ephrine haben eine globuläre Struktur mit einer 125 AS langen Kernsequenz. Diese enthält 4 invariante Cysteinreste und weist eine Ähnlichkeit von 30-70% zwischen den einzelnen Proteinen auf. Die Liganden sind ausnahmslos Membranproteine, von denen die Ephrine-A1-5 über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verknüpft sind, während es sich bei den Ephrinen B1-3 um Transmembranproteine handelt. Existenz und Eigenschaften eines neuen Liganden Ephrin-A6 mit möglicherweise ungewöhnlichen Merkmalen, von dessen Expression in Retina und Rhombomeren des Huhns in einer singulären Publikation (Menzel *et al.* 2001) berichtet wurde, sollen hier nicht erörtert werden. Eph-Rezeptoren wurden auch in Zebrafisch (Cooke *et al.* 1997, Xu *et al.* 1994, Xu *et al.* 1996), *D.melanogaster* (Scully *et al.* 1999, Dearborn *et al.* 2002) sowie *C.elegans* (Wang *et al.* 1999) gefunden.

Als besonderes Merkmal der Eph-Familie kann, mit wenigen Einschränkungen, jedes A-Ephrin mit jedem einzelnen EphA-Rezeptor, und jedes B-Ephrin mit jedem einzelnen EphB-Rezeptor interagieren (Abb. 3), wobei Dissoziationskonstanten in einem Bereich von ca. 0.1-20 nM gefunden wurden (Beckmann *et al.* 1994, Brambilla *et al.* 1995, Brambilla *et al.* 1996, Gale *et al.* 1996). Von dieser Regel bilden der fast ausschließlich außerhalb des Nervensystems exprimierte Rezeptor EphA1 (Zhou *et al.* 1998) sowie EphA4 die einzigen Ausnahmen, wobei EphA1 präferentiell Ephrin-A1, EphA4 neben den A-Ephrinen auch die Ephrine B2 und B3 mit signifikanter Affinität bindet.

Eine wichtige Einschränkung dieser Befunde ergibt sich aus der Verwendung rekombinanter, löslicher Fusionsproteine für die Quantifizierung der Bindungskonstanten. Auch mit dieser Einschränkung können die Bindungsdaten lediglich als Anhaltspunkt für die biologische Relevanz der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen dienen, da z.B. die hochaffine Wechselwirkung von Ephrin-B2 mit EphB2 nicht zu einer Aktivierung des

Rezeptors führt (Brambilla *et al.* 1996). *In-vitro* Phosphorylierungsstudien haben darüber hinaus ergeben, daß eine Rezeptoraktivierung ausschließlich von membrangebundenen oder mit Hilfe von Antikörpern oligomerisierten Ephrinen ausgelöst wird, während künstliche monomere oder dimere Formen löslicher Ephrine zwar an die zugehörigen Rezeptoren binden, diese jedoch nicht aktivieren können (Davis *et al.* 1994). Strukturuntersuchungen weisen auf eine „2+2“-Stöchiometrie der biologisch aktiven Rezeptor-Ligand Komplexe hin, die aus jeweils 2 Monomeren des Rezeptors und seinen Liganden bestehen (Himanen *et al.* 2001). Eine mögliche biologische Bedeutung von Eph Rezeptor-Heterodimeren, wie sie für andere Rezeptortyrosinkinasen gefunden wurden (Carraway *et al.* 1994), ist bislang ungeklärt.



**Abb. 3: Interaktion von Eph-Rezeptoren mit ihren Liganden, den Ephrinen.**

Als besonderes Merkmal der Eph-Familie kann, mit wenigen Einschränkungen, jedes A-Ephrin mit jedem einzelnen EphA-Rezeptor, und jedes B-Ephrin mit jedem einzelnen EphB-Rezeptor interagieren. Als einzige Ausnahmen von dieser Regel bindet der EphA4-Rezeptor neben A-Ephrinen auch Ephrin-B1 und -B2, während der EphA1-Rezeptor nicht alle A-Ephrine mit ähnlicher Affinität, sondern präferentiell Ephrin-A1 bindet. Die Angaben beruhen auf Bindungsmessungen mit rekombinanten, teilweise solublen Proteinen, und nicht in allen Fällen löst eine Bindung von Ligand und Rezeptor eine Aktivierung des Rezeptors aus.

### 2.3.2 Signaltransduktion

Die Bindung von membranständigen oder oligomerisierten, solublen Ephrinen an ihre Rezeptoren löst eine Dimerisierung und die Autophosphorylierung von mindestens 2 in allen Eph-Rezeptoren konservierten Tyrosinresten aus (Holland *et al.* 1997, Ellis *et al.* 1997). Die phospho-Tyrosinreste dienen als Bindungsstellen cytoplasmatischer Proteine, welche vor allem die Aktivität Src-ähnlicher Tyrosinkinase sowie kleiner Rho GTPasen regulieren (Übersichtsarbeit: Brückner *et al.* 1998). Von diesen cytoplasmatischen Interaktoren der Eph-Rezeptoren hat das kürzlich identifizierte Protein Ephexin (Shamah *et al.* 2001) besondere Aufmerksamkeit erlangt, da es die erste direkte molekulare Verbindung zwischen Eph-Rezeptoren und kleinen Rho-GTPasen und damit zum Cytoskelett darstellt.

Bei Ephexin handelt es sich um einen Guaninnukleotid Austauschfaktor (GEF, engl.: Guanine Nucleotide Exchange Factor) der Dbl-Subfamilie, dessen Regulation durch EphA-Rezeptoren einen Erklärungsansatz für die repulsive Wirkung von Ephrinen auf Wachstumskegel liefert. Ephexin moduliert die Aktivität der kleinen Rho-GTPasen RhoA, Cdc 42 und Rac 1, indem es den Übergang von der inaktiven, GDP-gebundenen zu der aktiven, GTP-gebundenen Form der GTPasen stimuliert. Ephexin ist direkt an den Rezeptor gebunden und trägt ohne Rezeptoraktivierung zu der präferentiellen Aktivierung von Cdc 42 und Rac 1 bei, deren additive Wirkung das Auswachsen von Axonen erlaubt. Nach Aktivierung des Rezeptors verändert sich die Spezifität von Ephexin hingegen zu Gunsten von RhoA, dessen Aktivierung zu einer erhöhten Kontraktilität von Actinomyosinkomplexen führt und damit eine Retraktion von Filopodien und Lamellopodien auslösen könnte, während die zugleich verringerte Aktivität von Cdc 42 und Rac 1 eine lokale Depolymerisierung von Actin hervorruft.

Als Besonderheit der Eph-Familie transduzieren auch die Liganden nach „Aktivierung“ durch Bindung an die Rezeptoren Signale in das Zellinnere. Mit Hilfe von *in-vitro* Assays gelang der Nachweis einer Phosphorylierung der kurzen cytoplasmatischen Domäne von B-Ephrinen als Antwort auf Bindung der Liganden an ihre Rezeptoren (Holland *et al.* 1996, Brückner *et al.* 1997). Erste Hinweise auf die *in-vivo* Relevanz dieser bidirektionalen Signaltransduktion lieferten Experimente in Mauslinien mit mutiertem EphB2-Rezeptor (Henkemeyer *et al.* 1996): Die vollständige Deletion des EphB2-Rezeptors rief eine Fehlleitung der anterioren Commissur in Bereiche des ventralen Vorderhirns hervor, in welchem der EphB2-Rezeptors vorwiegend exprimiert war. Wurde hingegen nur die cytoplasmatische Domäne des Rezeptors deletiert, so war die Commissur unverändert. Gemäß Henkemeyer *et al.* liegt dieser Beobachtung zu Grunde, daß die „Aktivierung“ von B-Ephrinen, welche in der Commissur exprimiert sind, an die verbliebene extrazelluläre Domäne von EphB2 eine repulsive Wirkung auf die Nervenfasern der Commissur hervorruft. Neuere Untersuchungen ergaben, daß die in den zu 90-100% konservierten (Nicola *et al.* 1996) cytoplasmatischen Domänen von B-Ephrinen gefundenen sog. PDZ-Motive eine zentrale Rolle bei der reversen Signaltransduktion spielen (Lu *et al.* 2001). Für eine reverse Signaltransduktion durch die GPI-verankerten A-Ephrine liegen bisher lediglich indirekte Hinweise vor. Hierzu zählt die Phosphorylierung eines bisher noch nicht eindeutig identifizierten Proteins mit einem

Molekulargewicht von 120 kDa als Antwort auf die „Aktivierung“ von Ephrin-A2 und Ephrin-A5 durch Bindung an den EphA3-Rezeptor (Huai *et al.* 2001). Die „Aktivierung“ von Ephrin-A5 durch Bindung an soluble, oligomerisierte EphA5-Fusionsproteine in Zelllinien führt zur Erhöhung der von  $\beta$ 1-Integrin abhängigen Zelladhäsion *in-vitro* (Davy *et al.* 2000). Eine weitere Indikation für eine mögliche Rezeptorfunktion von A-Ephrinen lieferte die Analyse von Projektionen des vomeronasalen Organs (Knöll *et al.* 2001). Die vomeronasalen Projektionen exprimieren Ephrin-A5 und wachsen sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* präferentiell auf Substraten mit einer hohen Konzentration des EphA6-Rezeptors aus. Diese adhäsive Wirkung tritt jedoch möglicherweise nur in Gegenwart verstümmelter Rezeptorisoformen auf, denen eine aktive Kinasedomäne fehlt und die als Spleißvarianten für verschiedene Eph-Rezeptoren beschrieben wurden (Holmberg *et al.* 2000). Insgesamt sind die Mechanismen sowie die mögliche biologische Bedeutung einer reversen Signaltransduktion durch A-Ephrine bislang weitgehend unklar.

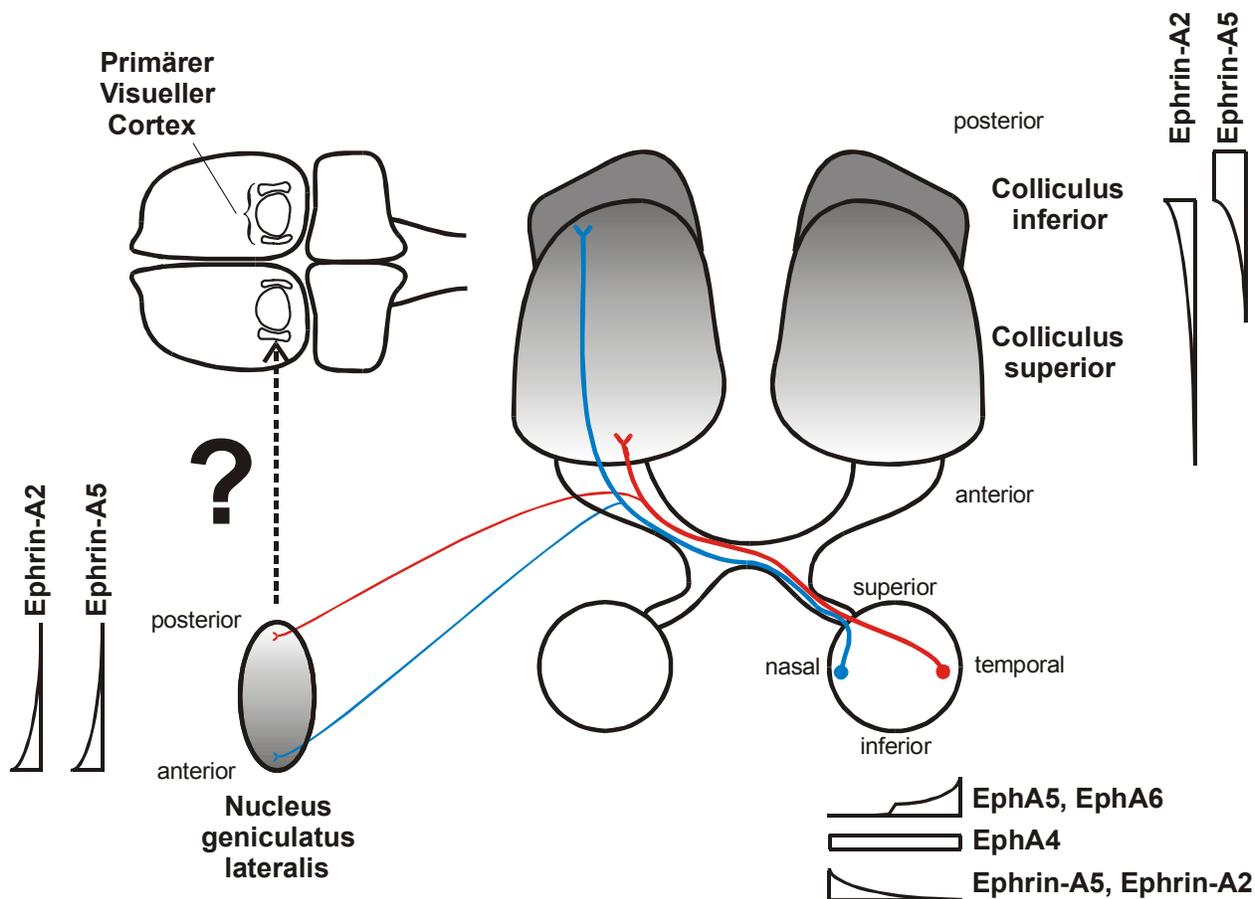
Auch die Regulierung der Sensitivität von Eph-Rezeptoren ist bisher wenig verstanden. Für andere Rezeptorfamilien typische Mechanismen wie die Internalisierung von Rezeptoren in cytoplasmatische Vesikel oder die Desensibilisierung über die Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste wurden für die Eph-Familie bisher nicht beschrieben. Als ein Mechanismus zur Steuerung der Sensitivität von Eph-Rezeptoren wird die Koexpression von Liganden und Rezeptoren auf denselben Zellen diskutiert. Die Koexpression von Rezeptoren und Liganden führt zur Erhöhung des basalen Niveaus der Rezeptoraktivität und damit zu einer Erhöhung der Ansprechschwelle für die aus der Umgebung eines axonalen Wachstumskegels präsentierten Ephrine. Dieser Mechanismus wurde z.B. bei RGZ beschrieben (Hornberger *et al.* 1999), deren Sensitivität für Ephrine umso geringer ist, je höher die Konzentration der zusammen mit den Rezeptoren koexprimierten Liganden ist. Ein Mechanismus zur Abschaltung der Signaltransduktion von EphA-Rezeptoren beinhaltet die proteolytische Spaltung von A-Ephrinen nach Bindung an ihre Rezeptoren. Die in einem stabilen Komplex an A-Ephrine gebundene Metalloprotease Kuzbanian ist verantwortlich für die proteolytische Spaltung des Liganden, die erst nach Bindung des Rezeptors erfolgt und damit die Signaltransduktion abschaltet (Hattori *et al.* 2000). Hierbei wird die proteolytische Spaltung nur von membranständigen oder oligomerisierten, nicht jedoch von mono- oder dimeren löslichen Formen der Rezeptoren ausgelöst. Wie von Hattori *et al.* mit Hilfe von Kuzbanian-resistenten Mutanten *in-vitro* gezeigt wurde, ist dieser proteolytische Schritt zugleich wichtige Voraussetzung dafür, daß die hochaffine Interaktion von A-Ephrinen mit ihren Rezeptoren eine repulsive Wirkung bei der axonalen Zielführung auslösen kann.

### **2.3.3 Biologische Funktionen der Eph-Familie**

#### **2.3.3.1 Topographische Projektionen**

Die erste biologische Funktion von Eph-Molekülen wurde für das retinotektale System vom Huhn beschrieben (Drescher *et al.* 1995). In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Streifenassays eine biologische Aktivität aus dem optischen Tektum charakterisiert, welche auf Axone des RGZ abstoßend wirkt und bei der es sich um Ephrin-A5 handelt. In

späteren Arbeiten (Cheng *et al.* 1995, Monschau *et al.* 1997) wurde eine zweite Komponente dieser Aktivität als Ephrin-A2 identifiziert, das zum Zeitpunkt der Innervation durch RGZ im Tektum gemeinsam mit Ephrin-A5 in einem überlappenden, von posterior nach anterior abnehmenden Gradienten exprimiert ist. Die Schlüsselfunktion von Ephrin-A5 und -A2 für die Entwicklung des visuellen Systems wurde mit Hilfe von genetischer Deletion dieser Moleküle in der Maus untermauert (Frisen *et al.* 1998, Feldheim *et al.* 1998, Feldheim *et al.* 2000) und ist zusammenfassend in Abb. 4 dargestellt:



**Abb. 4: Schema der topographischen Projektionen von Retinalen Ganglienzellen (RGZ) zu ihren Zielgeweben.**

RGZ projizieren in den Colliculus superior und den Nucleus geniculatus lateralis (NGL) in Mittel- bzw. Vorderhirn. Die Axone aus dem nasalen Bereich der Retina projizieren in den posterioren Bereich des Colliculus superior und den anterioren Bereich des NGL, während Projektionen aus dem temporalen Bereich der Retina im anterioren Bereich des Colliculus superior und dem posterioren Bereich des NGL terminieren. Diese Topographie der retinalen Projektionen beruht auf der repulsiven Wirkung von A-Ephrinen, welche vom Expressionsniveau der Liganden und Rezeptoren abhängig ist. Die Struktur und Physiologie der Projektionen vom NGL in den Primären Visuellen Cortex in der Maus sind bisher weitgehend ungeklärt.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Projektionen der Retina zum ipsilateralen NGL sowie die leichte Verdrehung des NGL gegen die anterior-posteriore Achse in der Skizze nicht berücksichtigt.

Die RGZ projizieren zu ihren im Mittel- bzw. Vorderhirn lokalisierten Zielgebieten. Bei diesen handelt es sich um den Colliculus superior, dem Äquivalent des optischen Tektums in Säugetieren, sowie den Nucleus geniculatus lateralis (NGL). Die Zielbereiche von Axonen mit einem hohen Expressionsniveau an EphA-Rezeptoren exprimieren hierbei nur geringe Mengen an A-Ephrinen, während Zielbereiche von Axonen mit niedrigem Expressionsniveau an EphA-Rezeptoren höhere Konzentrationen von A-Ephrinen exprimieren. Die Rolle der Eph-Rezeptoren und ihrer Liganden als repulsiv wirkende axonale Zielführungsmoleküle ist für die Entwicklung der Projektionen von der Retina zum Colliculus superior und zum NGL sehr gut verstanden. Jedoch ist die Verbindung dieser Strukturen mit dem Primären Visuellen Cortex (PVC) in Mäusen bisher noch nicht analysiert worden. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie die funktionelle Inaktivierung von A-Ephrinen das durch einfache visuelle Stimuli ausgelöste Muster neuronaler Aktivität im PVC beeinflusst (Kap. 4.4.5.4).

Die Interaktion von Eph-Rezeptoren mit ihren Liganden hat eine im allgemeinen repulsive Wirkung zur Folge und setzt direkten Zellkontakt voraus. Hierbei handelt es sich um eine zentrale Eigenschaft der Eph-Familie, die sich in der vorwiegend komplementären Expression von Rezeptoren und ihren Liganden widerspiegelt (Gale *et al.* 1996). So wurde ein ähnliches Wirkungsprinzip von Eph-Molekülen z.B. auch für die Etablierung topographischer Projektionen von Motoneuronen (Helmbacher *et al.* 2000, Wang *et al.* 2001) sowie vom Hippocampus zum Septum (Gao *et al.* 1996, Zhou *et al.* 1997) beschrieben.

### 2.3.3.2 Faszikulierung

Die Zusammenfassung axonaler Nervenfortsätze zu Nervenbündeln, die sog. Faszikulierung, wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Molekülfamilien gesteuert (Übersichtsarbeit: Van Vactor 1998). Erste Hinweise auf die Bedeutung der Eph-Familie für die Faszikulierung lieferten *in-vitro* Experimente, in denen EphA5-positive cortikale Neuronen der Ratte auf einer Unterlage von Ephrin-A1-positiven Astrocyten kultiviert wurden. In diesen Kulturen kann schon nach wenigen Tagen eine starke Faszikulierung der Nervenfortsätze beobachtet werden. Dieses Phänomen konnte mit der Applikation eines löslichen, Antikörper-ähnlichen EphA5-Fusionsproteins vollständig unterbunden werden (Winslow *et al.* 1995). Die *in-vivo* Relevanz der Eph-Familie für die Faszikulierung axonaler Fortsätze geht aus Experimenten hervor, in denen EphB2 und EphB3 in Mäusen genetisch deletiert wurden (Henkemeyer *et al.* 1996, Orioli *et al.* 1996). Diese Mäuse wiesen unter anderem eine stark verminderte Faszikulierung einzelner Nervenäste auf, die in den Mutanten mit zwei deletierten Genen stärker ausgeprägt war als in den Mutanten mit nur einem einzelnen deletierten Gen. Als Wirkungsmechanismus wird in diesen und anderen Arbeiten diskutiert, daß Eph-Moleküle an der Regulation von Zelladhäsionsmolekülen beteiligt sind.

### 2.3.3.3 Zellwanderung und Etablierung von Zellgrenzen

Ein besonders gut untersuchtes Beispiel für die Funktion der Eph-Familie bei der Steuerung von Zellmigration ist die Wanderung von Neuralleistenzellen. Diese transiente Population neuroektodermaler Vorläuferzellen wandert in frühen Embryonalstadien aus dem dorsalen Bereich der Neuralleiste aus und bildet unter anderem die Spinalganglien und sympathischen Ganglien sowie das Darmnervensystem, trägt jedoch auch zu verschiedenen nicht-neuronalen Strukturen bei.

In der Rumpfregeion von Wirbeltieren wandern Neuralleistenzellen durch die Somiten in den Bereich der Sklerotome ein, wobei die Zellwanderung ausschließlich auf die jeweils anterioren Bereiche der Somiten beschränkt ist (Rickmann *et al.* 1985). In Expressionsstudien in Nagetieren wurde Ephrin-B2 ausschließlich im anterioren Bereich der Somiten gefunden, während die Neuralleistenzellen EphB2 und EphA4 exprimieren (Wang *et al.* 1997). Mit Hilfe sog. Transmigrationsassays konnte die repulsive Wirkung von Ephrin-B1 und Ephrin-B2 auf die Wanderung von Neuralleistenzellen demonstriert werden (Wang *et al.* 1997, Krull *et al.* 1997). Diese Experimente lieferten den Beleg, daß Eph-Moleküle eine zentrale Rolle bei der Steuerung dieser gerichteten Zellbewegung spielen. Weitere Hinweise auf die Funktion von Eph-Molekülen für die Wanderung von Neuralleistenzellen kommen aus Experimenten mit *X.laevis*, in dem eine ebenfalls komplementäre Expression von EphB1 und EphA4 in Neuralleistenzellen und von Ephrin-B2 im jeweils anterioren Bereich der Somiten gefunden wurde (Smith *et al.* 1997).

Die Eph-Familie spielt auch bei der Ausbildung der Grenzen zwischen den Rhombomeren eine Rolle, indem die reziprok verteilten Rezeptoren und Liganden die Wanderung und Durchmischung von Zellen benachbarter Rhombomere einschränken. Hierbei exprimieren geradzahlige Rhombomere alle 3 B-Ephrine, während in ungeradzahligen Rhombomeren unter anderem die Rezeptoren EphB2 und EphB3 exprimiert sind. Experimente mit „dominant negativen“ Rezeptormutanten in Zebrafisch und *X.laevis* (Xu *et al.* 1995) lieferten Hinweise für die Funktion des Eph-Systems bei der Etablierung der Grenzen zwischen benachbarten Rhombomeren. Die von Eph-Molekülen vermittelte Etablierung von Grenzen zwischen benachbarten Zellpopulationen spielt auch bei der Entwicklung des Blutgefäßsystems eine entscheidende Rolle (siehe unten).

Die Steuerung der Migration von Neuralleistenzellen und die Begrenzung der Durchmischung von Zellen benachbarter Rhombomere wird durch die repulsive Wirkung der Rezeptor-Ligand Interaktion bei direktem Zellkontakt erklärt. Es wird hierbei diskutiert, daß dieselben molekularen Mechanismen, welche die Bewegung von axonalen Wachstumskegeln regulieren, auch für die Steuerung gerichteter Zellbewegung verantwortlich sind.

### 2.3.3.4 Blutgefäßsystem

Die Entwicklung des Blutgefäßsystems während der Embryonalentwicklung beginnt mit der Vaskulogenese, in deren Verlauf sich sog. Blutinseln ausbilden und ein primitives Kapillarnetzwerk aus endothelialen Vorläuferzellen entsteht. In einem als Angiogenese bezeichneten Entwicklungsabschnitt wird dieses präliminäre Kapillarnetzwerk zu einem komplexen Gefäßsystem aus venösen und arteriellen Gefäßen umgeformt (Übersichtsarbeit: Risau *et al.* 1995). Bei der Blutgefäßentwicklung kommt drei Familien von Rezeptortyrosinkinasen, den VEGF-, Tie1- und Eph-Rezeptoren sowie ihren Liganden, eine besondere Bedeutung zu (Übersichtsarbeit: Gale *et al.* 1999).

Erste Hinweise auf eine Funktion von Ephrinen für die Entwicklung von Blutgefäßen kommen aus Experimenten, welche die Induktion von Ephrin-A1 durch die starke angiogenetische Wirkung von Tumornekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in humanen endothelialen Zelllinien beschreiben (Holzman *et al.* 1990). Der angiogenetische Effekt von TNF- $\alpha$  konnte mit blockierenden Antikörpern gegen Ephrin-A1 reduziert werden, und in sog. Cornea Neovaskularisierungsassays erwies sich Ephrin-A1 selbst als stark angiogenetisch (Pandey *et al.* 1995). Die chemotaktische Wirkung von Ephrin-A1 auf die EphA2 exprimierenden Endothelzellen (Pandey *et al.* 1995), sowie die Expression von Ephrin-A1 an Orten aktiver Blutgefäßbildung während der Embryonalentwicklung (McBride *et al.* 1998) deuteten auf eine mögliche Rolle dieser beiden Moleküle bei der Blutgefäßbildung hin. Von den in 3 verschiedenen Arbeitsgruppen etablierten Mauslinien mit genetisch inaktiviertem EphA2-Rezeptor sind jedoch keine Defekte in der Blutgefäßentwicklung dokumentiert (Chen *et al.* 1996, Michael *et al.* 1999, Naruse-Nakajima *et al.* 2001). Eine Funktion von Ephrin-A1 und EphA2 für die Blutgefäßbildung *in-vivo* wurde bislang nur im Zusammenhang mit der Neovaskularisierung von Tumoren beschrieben (Ogawa *et al.* 2000).

In neueren Arbeiten wurden dann Ephrin-B2 und EphB4 als spezifische und frühe molekulare Marker arterieller bzw. venöser Blutgefäße identifiziert, deren genetische Deletion in Mäusen zu schweren Defekten in der Angiogenese beider Gefäßtypen führte (Wang *et al.* 1998). Hierbei waren die in Ephrin-B2 bzw. EphB4 defizienten Mäusen beobachteten Phänotypen weitgehend identisch und vorwiegend auf den Abschnitt der Angiogenese beschränkt. Diese Arbeiten wiesen darauf hin, daß die Angiogenese eine wechselseitige Interaktion und Aktivierung von Ephrin-B2 und EphB4 erfordert, konnten jedoch Ort und Zeitpunkt der Interaktion nicht exakt lokalisieren. Die Analyse weiterer Mausmutanten mit einer Deletion von EphB2 und EphB3 (Adams *et al.* 1999) sowie mit einer auf Endothelzellen beschränkten Deletion von Ephrin-B2 (Gerety *et al.* 2002) ergab, daß neben Ephrin-B2 und EphB4 sehr wahrscheinlich weitere Eph-Moleküle der B-Subfamilie an der Steuerung der Angiogenese beteiligt sind. Es wird angenommen, daß die Funktion der Eph-Familie in der Angiogenese vorwiegend über die Steuerung von Zellwanderung und der Etablierung von Zellgrenzen zustande kommt. Eine mögliche Rolle von Eph-Molekülen für die Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen wird im Zusammenhang mit der Entwicklung von Blutgefäßen als unwahrscheinlich diskutiert.

### 2.3.3.5 Synaptogenese und synaptische Plastizität

Erster Hinweis für eine Funktion von Eph-Molekülen in Zusammenhang mit der Entstehung von Synapsen sowie der Steuerung synaptischer Plastizität war die Detektion des EphA4-Rezeptors auf sog. Spines in Dendriten mittels Elektronenmikroskopie (Martone *et al.* 1997). Die *in-vivo* Relevanz dieses Befundes wurde bestätigt durch die Beobachtung, daß lösliche Formen des EphA5-Rezeptors sowie von Ephrin-A5 in Mäusen eine als Langzeitpotenzierung (LTP) bezeichnete Eigenschaft synaptischer Übertragung im Hippocampus (Gao *et al.* 1998) sowie das Lernverhalten von Mäusen (Gerlai *et al.* 1999) beeinflussen kann. Wenig später gelang Feng *et al.* der Nachweis, daß Ephrin-A5 und Ephrin-A2 eine wichtige Bedeutung für die korrekte Topographie motorischer Endplatten in Skelettmuskeln haben (Feng *et al.* 2000). Die Implikation von Eph-Molekülen in die Entstehung synaptischer Verbindungen während der Entwicklung sowie ihre Regulation wurde in den letzten Jahren durch die Analyse verschiedener transgener Mauslinien untermauert.

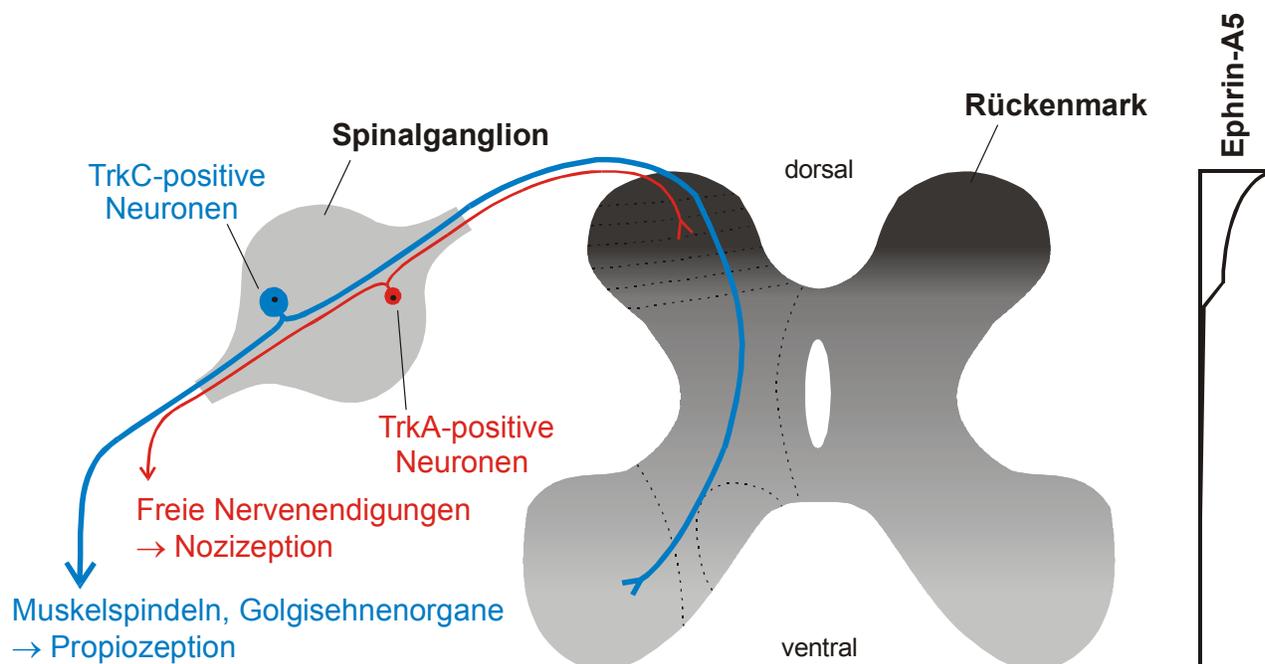
Neuere Arbeiten lieferten eine Fülle von Daten zu den molekularen Mechanismen, mit denen Eph-Rezeptoren und ihre Liganden die subzelluläre Lokalisation und die Translation bestimmter Ionenkanäle sowie Parameter der synaptischen Transmission beeinflussen (Übersichtsarbeit: Murai *et al.* 2002).

## 2.4 Untersuchung der *in-vivo* Funktion von A-Ephrinen für die Entwicklung topographischer Projektionen und axonales Wachstum

Wie aus den vorherigen Kapiteln hervorgeht, werden die Entwicklung topographischer Projektionen und axonales Wachstum von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren gesteuert. Die Grundlage für das spezifische Interesse an A-Ephrinen in der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zur Genexpression in sensorischen Neuronen von Spinalganglien (Friedel *et al.* 1997, sowie Harald Schnürch, Fortsetzung der Arbeit von Friedel *et al.*).

Die Spinalganglien beherbergen eine heterogene Population sensorischer Neuronen, die anhand ihrer Expression der Neurotrophinrezeptoren TrkA, TrkB und TrkC unterschieden werden können. In einer groben Einteilung sind hierbei TrkA exprimierende Neuronen für Nozizeption, TrkB exprimierende Neuronen für die Perzeption mechanischer Stimuli, und die TrkC exprimierenden Neuronen für Propiozeption verantwortlich (Übersichtsarbeit: Snider *et al.* 1996). Um einen Einblick in die molekularen Ursachen der unterschiedlichen Funktionen dieser neuronalen Subpopulationen zu erhalten, untersuchten Friedel *et al.* die Genexpression der beiden größten Subpopulationen sensorischer Neuronen in Spinalganglien. In dieser Arbeit wurden differentiell exprimierte Gene den TrkA-positiven, nozizeptiven Neuronen sowie den TrkC-positiven, propiozeptiven Neuronen detektiert, die zuvor mit Hilfe eines *in-vitro* Kultursystems aus Spinalganglien von Hühnerembryonen angereichert wurden. Als eines der differentiell exprimierten Gene wurde der EphA5-Rezeptor identifiziert, dessen Expression zehnfach höher in TrkA-positiven als in TrkC-positiven Neuronen war, während einer der Liganden des Rezeptors, Ephrin-A5, zehnfach stärker in der TrkC-positiven Subpopulation exprimiert war (Harald Schnürch, persönliche Mitteilung). Dieses Expressionsmuster führte zu der Arbeitshypothese, daß möglicherweise der Eph-Familie eine wichtige Funktion für die Entwicklung der topographischen Projektionen von Spinalganglien in das embryonale Rückenmark zukommt.

Die sensorischen Neuronen aus Spinalganglien projizieren zu unterschiedlichen Zielgebieten in der Peripherie und im Rückenmark. Während die TrkA-positiven, nozizeptiven Neuronen in dorsalen Bereichen des Rückenmarks terminieren, projizieren die propiozeptiven Neuronen in ventrale Bereiche des Rückenmarks (Abb. 5, Fyffe 1992).



**Abb. 5: Topographische Projektionen der beiden größten Gruppen sensorischer Neuronen von Spinalganglien in das Rückenmark.**

Die Neuronen in Spinalganglien können aufgrund der Expression von Neurotrophinrezeptoren in nozizeptive Neuronen (rot, TrkA), propiozeptive Neuronen (blau, TrkC) und sensorische Neuronen für die Wahrnehmung mechanischer Stimuli (TrkB, nicht eingezeichnet) unterteilt werden. Nozizeptive Neuronen projizieren spezifisch in dorsale Bereiche des Rückenmarks, während die Projektionen propiozeptiver Neuronen in ventralen Bereichen des Rückenmarks terminieren. Die Bedeutung der im Rückenmark exprimierten Ephrine (eingezeichnet: Ephrin-A5, Yue *et al.* 1999) für die Entwicklung dieser Topographie *in-vivo* ist bislang ungeklärt.

Hierbei ist möglicherweise die repulsive Wirkung der im Rückenmark exprimierten A-Ephrine auf die TrkA-positiven Axone dafür verantwortlich, daß diese Projektionen in den dorsalen Laminae des Rückenmarks terminieren und nicht in ventrale Rückenmarksbereiche einwachsen. Gestützt wird diese Arbeitshypothese durch die Beobachtung, daß A-Ephrine zu relevanten Zeitpunkten der Embryonalentwicklung im dorsalen Aspekt des Rückenmarks exprimiert sind (Yue *et al.* 1999), und daß A-Ephrine *in-vitro* einen repulsiven Effekt auf die Neuriten von Spinalganglien haben.

Eine Schwierigkeit für die experimentelle Überprüfung dieser Hypothese ergab sich aus der gleichzeitigen Expression mehrerer A-Ephrine im embryonalen Rückenmark (4.1). Aufgrund des besonderen Bindungsverhaltens von Eph-Rezeptoren und Ephrinen (2.3.1) könnten alle im Rückenmark exprimierten A-Ephrine in ähnlicher Weise repulsiv auf die TrkA-positiven Axone wirken. Die experimentelle Überprüfung der hier skizzierten Arbeitshypothese machte folglich die gleichzeitige Neutralisierung aller A-Ephrine erforderlich und war Ausgangspunkt für die Etablierung einer transgenen Mauslinie, in der alle A-Ephrine im Nervensystem funktional inaktiviert waren. Die Strategie dieser Mauslinie basiert auf Aspekten des sog. Konzept von Neuroantikörpern, welches im folgenden kurz vorgestellt wird.

## 2.5 Konzept von Neuroantikörpern

Lange bevor die technischen Voraussetzungen für die Deletion von Genen im lebenden Organismus zur Verfügung standen, wurden Antikörper als Werkzeug für die Blockierung von Molekülfunktionen sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* eingesetzt. So wurde z.B. die Wirkung von Nervenwachstumsfaktor (NGF, engl.: Nerve Growth Factor) mit Hilfe von Antikörpern *in-vivo* neutralisiert, welche entweder von einem gegen NGF immunisierten Muttertier auf ihre Embryonen übertragen (Johnson *et al.* 1980) oder dem trächtigen Muttertier direkt mittels Injektionen zugeführt wurden (Ruit *et al.* 1992). In beiden Studien wurde eine Reduktion derjenigen sympathischen und sensorischen Neuronen beobachtet, deren Überleben von NGF abhängig ist. Eine Schwierigkeit in diesen Experimenten war, daß die Antikörper den Embryonen über das Muttertier zugeführt wurden. Damit konnten die Embryonen nur systemisch, nicht jedoch lokal begrenzt und auch nur pränatal mit Antikörpern appliziert werden. Weiterhin trugen zum Teil starke Schwankungen der in den Embryonen verfügbaren Antikörperkonzentrationen zur Variabilität der Versuchsergebnisse bei.

Zur Vermeidung dieser Schwierigkeiten bei der *in-vivo* Applikation von Antikörpern schlugen Cattaneo und Mitarbeiter das Konzept sog. Neuroantikörper vor (Cattaneo *et al.* 1991). Nach ihrer Strategie sollten aus Hybridomzellen klonierte, monoklonale Antikörper in transgenen Mauslinien von Neuronen exprimiert werden, wo sie die biologische Aktivität ihrer Zielmoleküle *in-situ* neutralisieren würden. Grundlage des Konzeptes war die Beobachtung, daß neuronale Zellen funktionale rekombinante Antikörper produzieren und sezernieren können (Cattaneo *et al.* 1987). Expression und Verteilung der Antikörper in den Mäusen sollten hierbei mit der Wahl geeigneter Promotoren gesteuert werden. Anders als bei der Applikation der Antikörper von außen oder über das Muttertier, sollten mit dieser Strategie nicht nur Verteilung und Titer der Antikörper von Tier zu Tier reproduzierbarer, sondern auch lokal begrenzte sowie auf postnatale Stadien ausgedehnte *in-vivo* Applikationen möglich werden. Die ursprünglich nur im Zusammenhang mit dem Nervensystem diskutierte Strategie ist konzeptionell auch auf andere Gewebe übertragbar.

Neuroantikörper wurden erstmals für die Untersuchung von Substanz P angewendet, indem ein rekombinanter anti-Substanz P Antikörper im Nervensystem von Mäusen unter der Kontrolle des *vgf*-Promotors exprimiert wurde (Piccioli *et al.* 1995). Bei Substanz P handelt es sich um ein Neuropeptid der Tachykinin-Familie, für das eine biologische Funktion insbesondere im Zusammenhang mit Schmerzwahrnehmung sowie neurogenen Entzündungsvorgängen beschrieben wurde (Übersichtsarbeit: Regoli *et al.* 1994). Substanz P wird von dem Gen *präprotachykinin* kodiert, dessen alternativ gespleißte Transkripte zugleich für ein weiteres Neuropeptid der Tachykinin-Familie, Neurokinin A, kodieren. Eine Deletion von Substanz P durch Inaktivierung des Gens *präprotachykinin* ist daher nicht möglich, da hierbei zugleich Neurokinin A eliminiert würde. Mäuse, die einen anti-Substanz P Antikörper exprimierten, zeigten unter anderem eine verringerte Empfindlichkeit für die Induktion neurogener Entzündungen sowie eine veränderte lokomotorische Aktivität in bestimmten Verhaltenstests. Diese Beobachtungen wurden von Piccioli *et al.* auf dem Hintergrund der bekannten Funktion von Substanz P als Beleg

dafür interpretiert, daß die biologische Aktivität des Neuropeptids in den transgenen Mäusen tatsächlich weitgehend neutralisiert wurde. Zusätzlich wurden mit dieser Arbeit auch wichtige methodische Aspekte analysiert. Hierbei wurde zunächst demonstriert, daß verschiedenste Typen von Neuronen *in-vivo* funktionelle Antikörper sezernieren können, und daß die Expression der Antikörper dem für den *vgf*-Promotor (Levi *et al.* 1985, Lombardo *et al.* 1995) beschriebenen zeitlich-räumlichen Aktivitätsmuster folgte. Durch die anhaltende Expression des Antikörpers bis in adulte Entwicklungsstadien wurde die Cytoarchitektur der Neuronen nicht beeinträchtigt. Es wurden auch keine Anzeichen für eine unspezifische Degradierung des Antikörpers beobachtet. Weiterhin gab es keine Hinweise darauf, daß die transgenen Mäuse eine Immunreaktionen gegen den rekombinanten Antikörper entwickelten, welcher den Fc-Bereich humaner Immunglobuline der Klasse IgG1 enthielt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine transgene Mauslinie etabliert, welche ein Antikörper-ähnliches Fusionsprotein, einen sog. Rezeptorkörper, in einer transgenen Maus in allen Neuronen exprimiert. Dieser aus der Ektodomäne des EphA5-Rezeptors und dem Fc-Bereich humaner Immunglobuline der Klasse IgG1 bestehende Rezeptorkörper sollte alle 5 A-Ephrine zugleich binden und ihre biologische Aktivität, ähnlich wie ein funktionsblockierender Antikörper, neutralisieren. Diese Vorgehensweise wies einige Parallelen, jedoch auch Unterschiede zu dem ursprünglichen Konzept von Neuroantikörpern auf. So wurde anstelle eines rekombinanten Antikörpers ein maßgeschneidertes Fusionsprotein eingesetzt, welches nicht nur ein einzelnes, sondern 5 verschiedene Zielmoleküle zugleich neutralisieren konnte. Weiterhin wurde der Rezeptorkörper nicht in multiplen Kopien über Zufallsintegration, sondern mittels homologer Rekombination in einen definierten Genlocus inseriert. Damit sollte die Variabilität des Expressionsniveaus vermieden werden, die von Piccioli *et al.* zwischen verschiedenen Tieren beobachtet wurde.

Für die Expression des Rezeptorkörpers in Mäusen wurde der *tau*-Lokus gewählt, da es sich um einen genetisch und physiologisch im Detail charakterisierten Genlocus handelt (Binder *et al.* 1985, Nunez *et al.* 1997, Hirokawa *et al.* 1994), welcher die pan-neuronale Expression von frühen embryonalen Entwicklungszeitpunkten bis in späte adulte Entwicklungsstadien erlaubt. Eine zentrale Voraussetzung dieser Strategie war, daß die Deletion des Mikrotubuli bindenden Proteins Tau keinen neuronalen Phänotyp in Hinsicht auf axonales Wachstum, neuronale Konnektivität und Zellwanderung zur Folge hat (Hirokawa *et al.* 1994, Tucker *et al.* 2001).

### 3 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Etablierung einer transgenen Mauslinie, mit welcher die Funktion einer ganzen Familie membrangebundener Proteine, der sog. A-Ephrine, in ihrer Gesamtheit bei Vorgängen axonaler Zielfindung und der Entwicklung topographischer Projektionen im peripheren und zentralen Nervensystem unter *in-vivo* Bedingungen analysiert werden konnte. Die Ausgangsfragestellung war hierbei, inwiefern A-Ephrine die Etablierung der topographischen Projektionen von Spinalganglien in das embryonale Rückenmark steuern. Da vorangegangene Expressionsstudien auf eine Beteiligung mehrerer A-Ephrine an der Entwicklung dieser Topographie hinwiesen, war die gleichzeitige Inaktivierung aller A-Ephrine zentrale Voraussetzung für die experimentelle Überprüfung dieser Hypothese.

Die bisherigen Untersuchungen der Eph-Familie in der Embryonalentwicklung der Maus stützen sich auf Tiermodelle, in welchen vorwiegend Einzelmoleküle überexprimiert oder ab der Befruchtung im gesamten Organismus inaktiviert sind. Alle in der Literatur beschriebenen Mauslinien mit mutierten Genen von A-Ephrinen zeigen einen in Anbetracht der dynamischen und weitverbreiteten Expression der Moleküle unerwartet milden Phänotyp. Diese Beobachtungen werden teilweise auf die hochgradige funktionelle Redundanz innerhalb der Molekülfamilie zurückgeführt, der sehr ähnliche Bindungskonstanten aller 5 A-Ephrine zu ihren 8 EphA-Rezeptoren zugrunde liegen.

Diese Redundanz sollte mit einer neuartigen Strategie durchbrochen werden, indem ein sezerniertes, Antikörper-ähnliches Fusionsprotein, ein sog. Rezeptorkörper, im gesamten Nervensystem der Maus exprimiert wurde. Das aus der Ektodomäne des EphA5-Rezeptors und dem Fc-Bereich von humanen Immunglobulinen der Klasse G1 bestehende Fusionsprotein sollte die Eigenschaften der Molekülfamilie ausnutzen und mit ähnlicher Affinität alle A-Ephrine binden und hierdurch neutralisieren.

Auf der Grundlage einer detaillierten molekularen Charakterisierung der Mauslinie sollten zunächst die Projektionen von Spinalganglien in das Rückenmark analysiert werden. Die weitere Analyse sollte sich auf die sensorischen Projektionen in der Peripherie sowie auf die Entwicklung von Blutgefäßen und auf Aspekte des visuellen Systems konzentrieren.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expression von EphA-Rezeptoren und A-Ephrinen in Spinalganglien und Rückenmark von Huhn und Maus

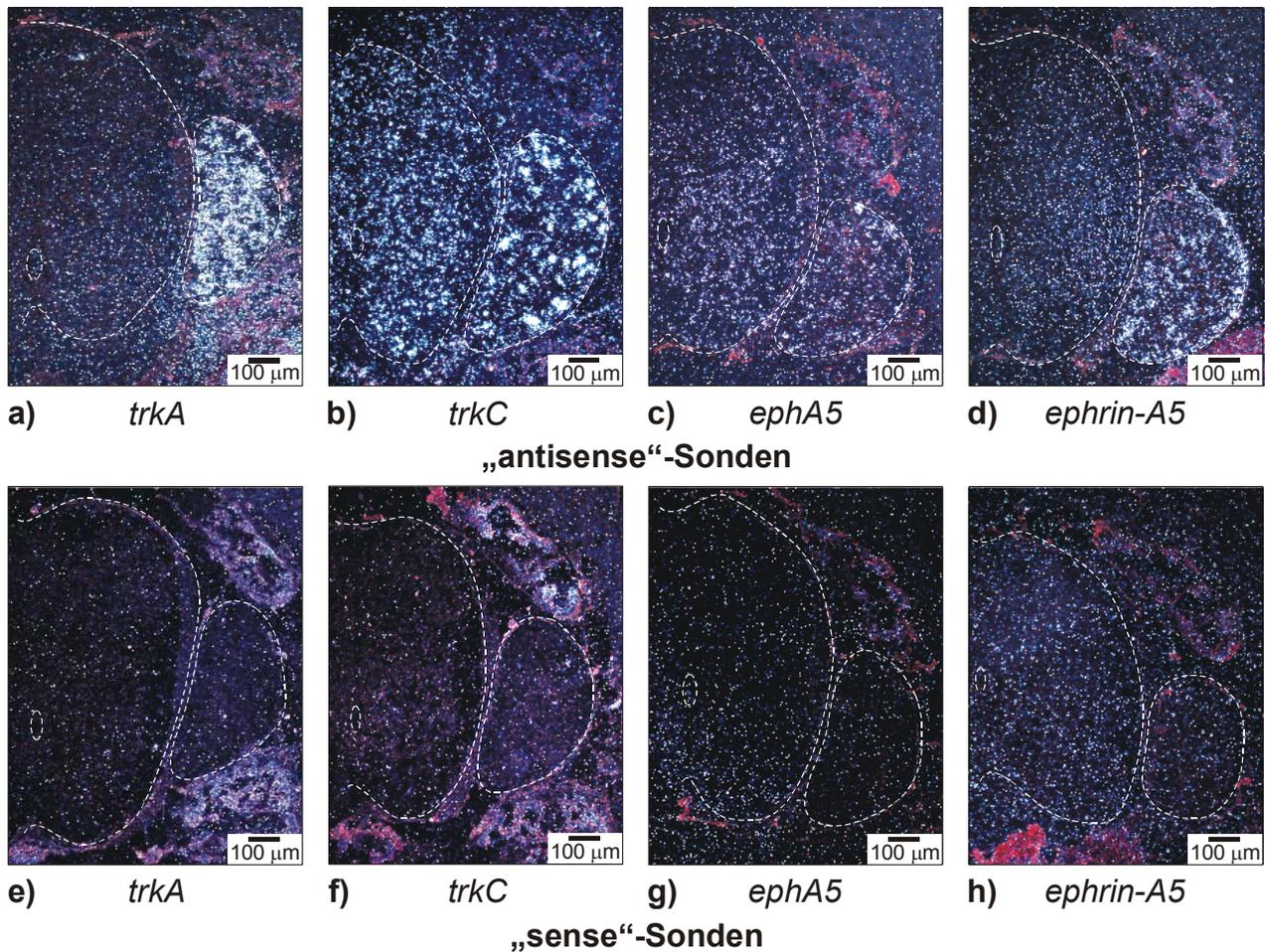
Wie unter 2.4 beschrieben, war aus der Arbeit von Friedel *et al.* (1997, sowie Harald Schnürch, Fortsetzung der Arbeit von Friedel *et al.*) bekannt, daß im Huhn EphA5 präferentiell in TrkA-positiven Neuronen und ein Ligand des Rezeptors, Ephrin-A5, in TrkC-positiven Neuronen exprimiert ist. Als Grundlage für die Analyse dieser Fragestellung in der Maus wurde zunächst überprüft, ob die im Huhn beobachtete differentielle Expression von EphA5 und Ephrin-A5 in TrkA- bzw. TrkC-positiven Neuronen in Spinalganglien auch in der Maus vorliegt.

Hierzu wurden mRNA *in-situ* Hybridisierungen auf transversalen Rumpfschnitten neugeborener Mäuse mit Sonden für *trkA*, *trkC*, *epha5* und *ephrin-A5* durchgeführt. Anders als im Huhn sind TrkA- und TrkC-positive Neuronen in Spinalganglien der Maus zu keinem Entwicklungszeitpunkt topographisch segregiert und können somit nicht aufgrund ihrer Lokalisation in den Spinalganglien identifiziert werden. Jedoch ist eine Zuordnung zu der TrkA- bzw. TrkC-positiven Subpopulation aufgrund des Zelldurchmessers möglich, da die TrkA-positiven Neuronen einen kleinen, die TrkC-positiven Neuronen hingegen einen vergleichsweise großen Zelldurchmesser aufweisen (Perl 1992).

**Abb. 6: (folgende Seite) Detektion der Transkripte für *trkA*, *trkC*, *epha5* und *ephrin-A5* in Spinalganglien neugeborener Mäuse mittels mRNA *in-situ* Hybridisierung.**

Hybridisierung transversaler Gewebeschnitte neugeborener Mäuse mit Sonden in „antisense“-Orientierung für **a) *trkA***, **b) *trkC***, **c) *epha5***, und **d) *ephrin-A5***, sowie jeweils benachbarter Gewebeschnitte mit Sonden in „sense“-Orientierung für **e) *trkA***, **f) *trkC***, **g) *epha5***, und **h) *ephrin-A5***. Die Abwesenheit von Signalen in den mit „sense“-Sonden durchgeführten Hybridisierungen belegte die Spezifität der Sonden unter den verwendeten Hybridisierungsbedingungen. Die Umrisse von Rückenmark, Spinalganglion und Zentralkanal des Rückenmarks sind mit durchbrochenen weißen Linien nachgezeichnet. Dorsal ist oben, ventral ist unten.

Es wurden transversale Gewebeschnitte neugeborener Mäuse des Inzuchtstammes Balb/c aus dem lumbosakralen Bereich des Rückenmarks angefertigt und für die mRNA *in-situ* Hybridisierung gemäß 6.2.4.6 eingesetzt.



Die Hybridisierung mit der *trkA*-spezifischen Sonde (Abb. 6 a) lieferte erwartungsgemäß ein Signal in der überwiegenden Zahl von Neuronen in Spinalganglien, während die Hybridisierung mit einer *trkC*-spezifischen Sonde (Abb. 6 b) nur in einer wesentlich kleineren Fraktion von Zellen ein Signal ergab. Hierbei wiesen die *trkA*-positiven Neuronen einen kleinen, die *trkC*-positiven Neuronen hingegen einen vergleichsweise großen Zelldurchmesser auf.

Wie aus Abb. 6 c) und d) hervorgeht, waren sowohl EphA5, als auch Ephrin-A5 in Spinalganglien neugeborener Mäuse exprimiert. Da EphA5 vorwiegend in Zellen mit kleinerem, Ephrin-A5 bevorzugt in Zellen mit größerem Durchmesser detektiert wurde, handelte es sich bei den EphA5-positiven Neuronen vermutlich um eine Subpopulation TrkA-positiver, bei den Ephrin-A5-positiven Neuronen hingegen wahrscheinlich um eine Subpopulation TrkC-positiver Neuronen. Zusammenfassend wurde aus den mRNA *in-situ* Hybridisierungen geschlossen, daß die im Huhn gefundene Kollokalisierung von TrkA mit EphA5 und von TrkC mit Ephrin-A5 auch in Spinalganglien der Maus zumindest partiell gegeben war.

Die Expression der übrigen Vertreter der EphA-Subfamilie neben EphA5 und Ephrin-A5 in Rückenmark und Spinalganglien von Mäusen wurde mittels RT-PCR analysiert. Hierzu

wurde von Mäusen des Inzuchtstammes C57BL/6 der Entwicklungsstufen E14.5, E16.5, E18.5 und P0.5 gesamt-RNA aus Spinalganglien und Rückenmark isoliert und unter Verwendung von oligo-dT Primern in cDNA revers transkribiert. Mit diesen cDNAs als Matrize wurden PCR-Reaktionen mit Primern durchgeführt, welche jeweils ein 300-600 bp langes DNA-Fragment aus den Genen der Rezeptoren EphA2-8 sowie der Ephrine A1-A5 amplifizierten. Da der Rezeptor EphA1 nicht in signifikantem Umfang im Nervensystem exprimiert ist (Zhou *et al.* 1998), wurde dieses Molekül nicht in die Analyse einbezogen. Die Reaktionsbedingungen der PCR wurden so gewählt, daß auch noch eine sehr schwache Expression der Moleküle detektiert werden konnte. Abb. 7 zeigt exemplarisch das Ergebnis von PCR-Reaktionen, welche mit cDNA aus Rückenmark von Mausembryonen der Entwicklungsstufe E16.5 als Matrize durchgeführt wurden.

Diese Experimente wiesen darauf hin, daß die Rezeptoren EphA2-8 sowie die Liganden Ephrin-A1-5 sowohl im Rückenmark als auch in Spinalganglien über einen Entwicklungszeitraum von E14.5 – P0.5 exprimiert waren. Aufgrund der experimentellen Parameter konnte jedoch die relative Stärke der Expression sowie die exakte Lokalisation einzelner Moleküle in Rückenmark und Spinalganglien nicht beurteilt werden.

Auf dem Hintergrund publizierter Daten machten die Befunde somit eine Beteiligung weiterer Eph-Moleküle neben EphA5 und Ephrin-A5 an der Etablierung der topographischen Projektionen sensorischer Neuronen im Rückenmark wahrscheinlich. Hierbei mußte offengelassen werden, welchen individuellen Molekülen aufgrund ihres räumlich-zeitlichen Expressionsmusters eine spezifische Funktion zukommen könnte.

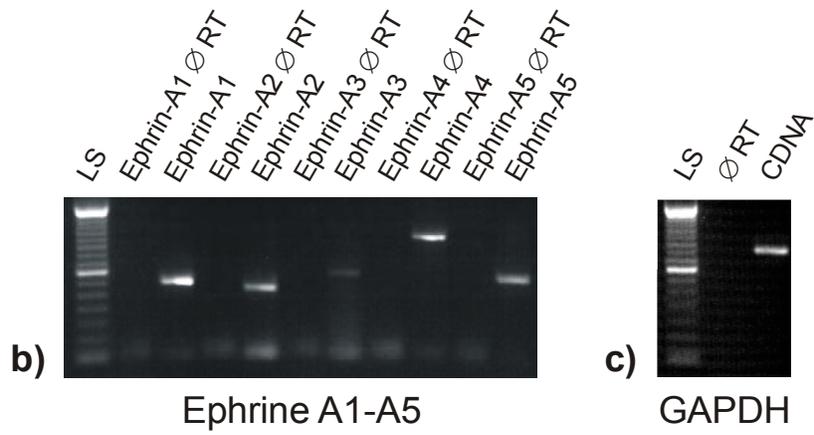
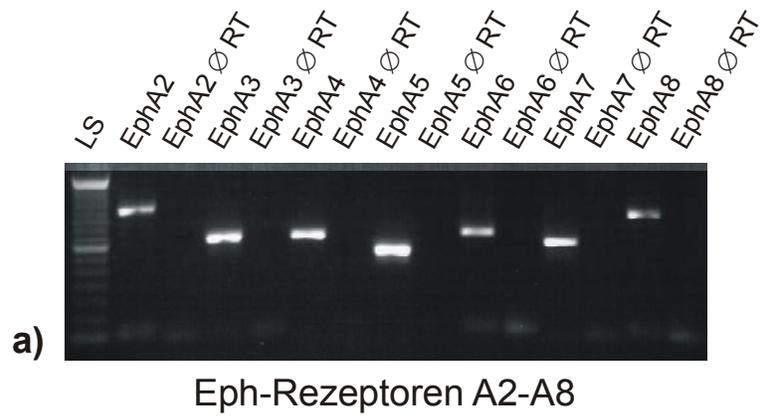
**Abb. 7: (folgende Seite) Expression der Rezeptoren EphA2-A8 und der Ephrine A1-A5 in Rückenmark von Mausembryonen der Entwicklungsstufe E16.5.**

- a) Detektion der Eph-Rezeptoren A1-A8, sowie
- b) der Ephrine-A2-A5 mittels RT-PCR in Rückenmark von Wildtyp Mäusen der Entwicklungsstufe E16.5.
- c) Kontrollreaktion mit den Primern „GAP 1“ und „GAP 2“, welche ein DNA-Fragment von 452 bp Länge des Glykolyseenzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) amplifizieren.

Die PCR-Reaktionen wurden mit manuellem „hot-start“ mit cDNA aus Rückenmark der Entwicklungsstufe E16.5 durchgeführt. Es wurde pro Reaktion cDNA äquivalent zu 20 ng gesamt-RNA eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden mit 40 Zyklen (Eph-Rezeptoren und Ephrine) bzw. 20 Zyklen (GAPDH) durchgeführt. Die Experimente mit cDNAs aus Spinalganglien sowie von anderen Entwicklungsstufen lieferten äquivalente Resultate.

**LS:** Längenstandard „50 bp DNA ladder“ (Gibco); **Ø RT:** PCR-Reaktion mit RNA anstelle von cDNA als Matrize.

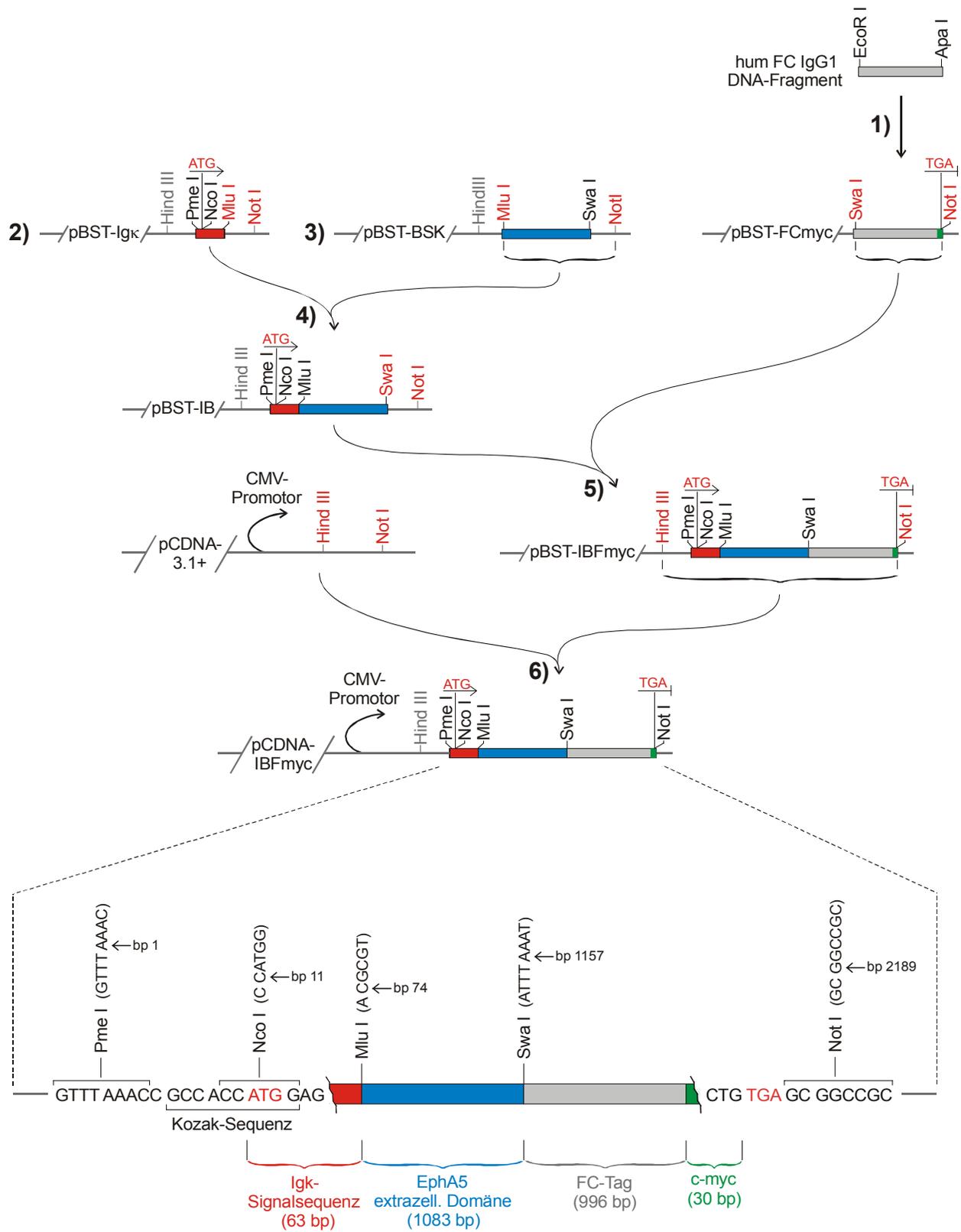
Für die Detektion der Transkripte wurden die folgenden Primer verwendet: **EphA2:** „EphA2 IST 1“, „EphA2 IST 2“ (365 bp Fragment); **EphA3:** „EphA3 IST 1“, „EphA3 IST 2“ (372 bp Fragment); **EphA4:** „EphA4 IST 1“, „EphA4 IST 2“ (379 bp Fragment); **EphA5:** „EphA5 IST 3“, „EphA5 IST 4“ (312 bp Fragment); **EphA6:** „EphA6 IST 1“, „EphA6 IST 2“ (412 bp Fragment); **EphA7:** „EphA7 IST 1“, „EphA7 IST 2“ (375 bp Fragment); **EphA8:** „EphA8 IST 1“, „EphA8 IST 2“ (364 bp Fragment); **Ephrin-A1:** „EA1 IST 1“, „EA1 IST 2“ (322 bp Fragment); **Ephrin-A2:** „EA2 IST 1“, „EA2 IST 2“ (594 bp Fragment); **Ephrin-A3:** „EA3 IST 1“, „EA3 IST 2“ (328 bp Fragment); **Ephrin-A4:** „EA4 IST 1“, „EA4 IST 2“ (265 bp Fragment); **Ephrin-A5:** „EA5 IST 1“, „EA5 IST 2“ (269 bp Fragment).



## 4.2 Design und Klonierung des EphA5-Rezeptorkörpers

Für die Klonierung des Rezeptorkörpers wurde die Ektodomäne von EphA5 verwendet, da für diesen Rezeptor zuerst eine differentielle Expression in spezifischen Subpopulationen sensorischer Neuronen in Spinalganglien gefunden wurde. Zugleich sind für diesen Rezeptor die insgesamt stärksten Affinitäten zu den A-Ephrinen beschrieben worden (Flanagan *et al.* 1998), was eine entscheidende Voraussetzung für die funktionelle Inaktivierung aller A-Ephrine in einer transgenen Maus war. Die Ektodomäne wurde mit dem katalytisch inerten und für *in-vivo* Applikationen bereits bewährten (Piccioli *et al.* 1995, Gerlai 2000) Fc-Bereich von humanen Immunglobulinen der Klasse IgG1, einem sog. Fc-Tag versehen, welcher infolge der Dimerisierung des Moleküls zu einer Erhöhung der Affinität beiträgt. Um für die Detektion des Rezeptorkörpers ein zweites, unabhängiges Epitop zu schaffen, wurde diesem Tag C-terminal das aus 10 Aminosäuren bestehende 9E10 Epitop des humanen Proto-Oncogens c-myc angefügt (Evan *et al.* 1985). Die für eine möglichst hohe Gewebekonzentration erforderliche, effiziente Sekretion des Rezeptorkörpers sollte durch die Verwendung eines Ig $\kappa$ -Signalpeptids sichergestellt werden.

Der Rezeptorkörper setzte sich schließlich in folgender Reihenfolge (von N- zu C-Terminus) aus einem Ig $\kappa$ -Signalpeptid, aus der Ektodomäne des murinen EphA5-Rezeptors, dem Fc-Bereich von humanem IgG1 sowie einem myc-Epitop zusammen. Die einzelnen Bestandteile des Rezeptorkörpers wurden separat kloniert und anschließend zur vollständigen cDNA des Rezeptorkörpers zusammengesetzt (Abb. 8).

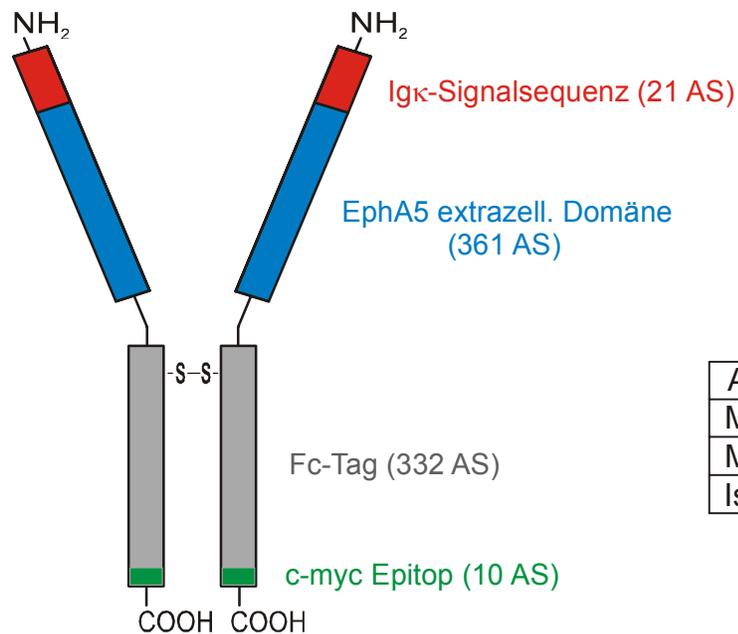


**Abb. 8: (vorhergehende Seite) Klonierung des Plasmids „pCDNA-IBFmyc“ zur Expression des Rezeptorkörpers unter der Kontrolle des Promotors von Cytomegalovirus (CMV-Promotor).**

Plasmide wurden der besseren Übersichtlichkeit wegen linear, unter Weglassung aller Elemente des Plasmidrückgrates sowie nur mit einer Auswahl der wichtigsten Restriktionsschnittstellen dargestellt. Die in den einzelnen Klonierschritten verwendeten Restriktionsschnittstellen sowie Start- und Stopcodon der cDNA sind rot markiert.

- 1) Für die Klonierung des Fc-Tags wurde freundlicherweise von Dr. Titus Kretzschmar (MorphoSys AG) ein DNA-Fragment zur Verfügung gestellt, welches den Fc-Bereich von humanen Immunglobulinen der Klasse IgG1 enthielt. Dieses DNA-Fragment wurde als Matrize in einer PCR mit den Primern „FC 1“ und „FC 2“ verwendet, in welcher der relevante Abschnitt des Fc-Bereichs (Genbank Accession Nr. S79307, bp 450-1448, entsprechend AS 139-470) amplifiziert und die Schnittstellen Swa I und Not I eingefügt wurden. Das PCR-Produkt wurde als Matrize in einer weiteren PCR-Reaktion mit den Primern „FC 1“ und „FC 3“ eingesetzt, mit welcher die Sequenz für das c-myc Epitop eingefügt wurde. Das Produkt dieser PCR-Reaktion wurde in die EcoR V-Restriktionsschnittstelle von „pBSTII-SK+“ ligiert (Plasmid „pBST-FCmyc“).
- 2) Das Igk-Signalpeptid wurde in voller Länge (Genbank Accession Nr. AJ012557, bp 1-63, entsprechend AS 1-21) als Oligodesoxynukleotid synthetisiert (Oligodesoxynukleotid „Igk sense“), mittels PCR unter Verwendung der beiden Primer „Igk 1“ und „Igk 2“ amplifiziert und in die EcoR V-Restriktionsschnittstelle von „pBSTII-SK+“ ligiert (Plasmid „pBST-Igk“).
- 3) Für die Klonierung der extrazellulären Domäne des EphA5-Rezeptors wurde aus Hirngewebe einer neugeborenen Maus des Stammes Balb/c gesamt-RNA isoliert und mit oligo-dT Primern in eine cDNA revers transkribiert. Die extrazelluläre Domäne des Rezeptors ohne Signalpeptid (Genbank Accession Nr. U07357, bp 574-1647, entsprechend AS 51-410) wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer „BSK 1“ und „BSK 2“ aus dieser cDNA amplifiziert und in die EcoR V-Restriktionsschnittstelle von „pBSTII-SK+“ ligiert (Plasmid „pBST-BSK“).
- 4) Das Plasmid „pBST-BSK“ wurde mit Mlu I und Not I verdaut, und das ausgeschnittene Fragment wurde in das ebenfalls mit Mlu I und Not I verdaute Plasmid „pBST-Igk“ ligiert (Plasmid „pBST-IB“).
- 5) Das Plasmid „pBST-FCmyc“ wurde mit Swa I und Not I verdaut, und das ausgeschnittene Fragment wurde in das ebenfalls mit Swa I und Not I verdaute Plasmid „pBST-IB“ ligiert (Plasmid „pBST-IBFmyc“).
- 6) Die cDNA des Rezeptorkörpers wurde durch Verdau mit Hind III und Not I aus dem Plasmid „pBST-IBFmyc“ ausgeschnitten und in den mit Hind III und Not I verdauten Vektor „pCDNA-3.1+“ ligiert (Plasmid „pCDNA-IBFmyc“).

Bei der Klonierung wurde so vorgegangen, daß sich die cDNA des Rezeptorkörpers aus dem Expressionsplasmid „pCDNA-IBFmyc“ mit einer am 5'-Ende lokalisierten Pme I- und einer am 3'-Ende eingefügten Not I-Restriktionsschnittstelle in das Rekombinationskonstrukt für die homologe Rekombination in Embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) inserieren ließ und das Startcodon mit einer optimierten Kozak-Sequenz umgeben war (Kozak 1987). Die molekularen Eigenschaften des Rezeptorkörpers sind in Abb. 9 zusammengefaßt.



Aminosäuren	703 <sup>1</sup>
M <sub>w</sub> (berechnet)	77.7 kDa <sup>1</sup>
M <sub>w</sub> (tatsächlich)	90 kDa <sup>2</sup>
Isoelektrischer Punkt	5.0 <sup>1</sup>

**Abb. 9: Schematische Darstellung des Rezeptorkörpers mit Auflistung der wichtigsten proteinchemischen Eigenschaften.**

<sup>1</sup>: Die Angaben beziehen sich auf die monomere Form des Rezeptorkörpers ohne Igκ-Signalpeptid. <sup>2</sup>: Das „tatsächliche“ Molekulargewicht wurde mittels SDS-PAGE abgeschätzt. Die Diskrepanz zwischen berechnetem und tatsächlichem Molekulargewicht erklärt sich aus der Glykosylierung von EphA5-Ektodomäne und Fc-Tag.

## 4.3 Charakterisierung des EphA5-Rezeptorkörpers

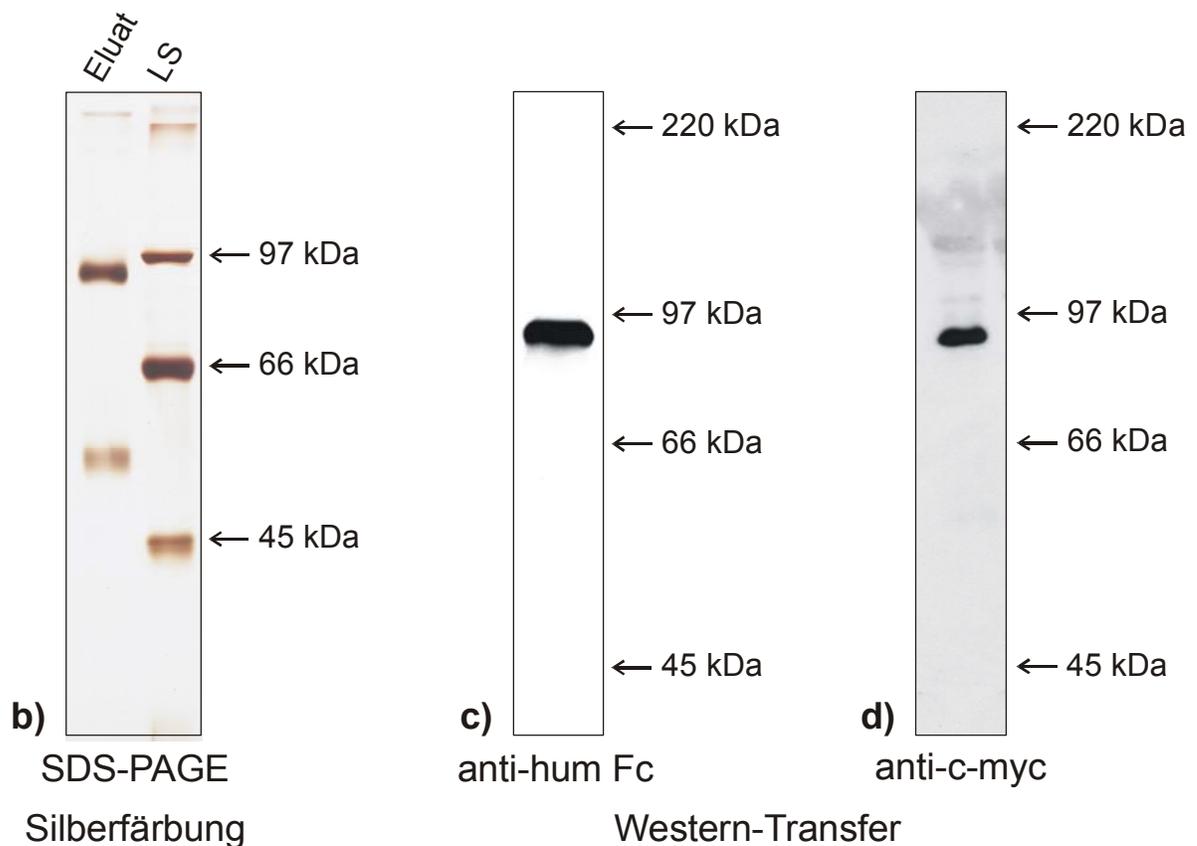
Als Voraussetzung für die Expression in einer transgenen Maus wurden einige essentielle molekulare Eigenschaften des Rezeptorkörpers mit Hilfe von *in-vitro* Experimenten untersucht. Hierzu wurde der Rezeptorkörper zunächst in Säugerzelllinien exprimiert, aus Kulturüberstand aufgereinigt und hinsichtlich erfolgreicher Sekretion und Prozessierung des Pro-Proteins, der Aminosäuresequenz sowie der Fähigkeit, A-Ephrine zu binden, analysiert.

### 4.3.1 Expression des Rezeptorkörpers in 293 Zellen

Für die Expression des Rezeptorkörpers in 293 Zellen (Graham *et al.* 1977) wurde das Plasmid „pCDNA-IBFmyc“ verwendet, welches die Expression des Rezeptorkörpers unter der Kontrolle des Promotors des Cytomegalovirus (CMV-Promotor, Boshart *et al.* 1985, Nelson *et al.* 1987) erlaubt. Hierbei wurde der Rezeptorkörper mittels Affinitätschromatographie über eine Protein-A Sepharose Säule aus dem konditionierten Medium von transient mit dem Expressionsplasmid transfizierten 293 Zellen aufgereinigt.

Der Erfolg der Aufreinigung wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese kontrolliert. Weiterhin demonstrierte ein Western-Transfer, daß das gereinigte Protein Immunreaktivität gegen den Fc-Bereich von humanem IgG1 sowie das c-myc Epitop trug.

- 1) Transiente Transfektion des Expressionsplasmids „pCDNA-IBFmyc“ in 293-Zellen
- ↓
- 2) Konditionierung Serum-freien Mediums für 3 d
- ↓
- 3) Affinitätschromatographische Reinigung des Rezeptorkörpers über eine Protein A-Sepharos Säule
- ↓
- a) 4) Dialyse des Eluats aus 3) gegen PBS



**Abb. 10: Expression des Rezeptorkörpers in 293-Zellen und affinitätschromatographische Reinigung des Rezeptorkörpers aus dem Zellkulturüberstand.**

- a) Flußdiagramm einer Expression des Rezeptorkörpers in 293 Zellen mit nachfolgender affinitätschromatographischer Aufreinigung aus dem Zellkulturüberstand.
- b) SDS-PAGE des Eluats aus der Affinitätschromatographie. Eluat mit einem Gesamtproteingehalt von 300 ng wurde unter reduzierenden Bedingungen auf einem Gel mit 10% Polyacrylamid aufgetrennt und mittels Silberfärbung angefärbt. **LS**: Längenstandard „Silver Stain SDS-Page Standard Low range“ (Biorad).
- c), d) Western-Transfers von Eluat aus der Affinitätschromatographie mit 100 ng Gesamtproteingehalt je Spur nach Auftrennung auf einem Gel mit 10% Polyacrylamid, inkubiert mit einem gegen den Fc-Tag (c); Kaninchen anti-human Fc Antikörper 1:10.000, Jackson, sowie HRP-konjugierter Sekundärantikörper) bzw. gegen das c-myc Epitop (d); monoklonaler Antikörper 9E10, 50 ng/ml, sowie HRP-konjugierter Sekundärantikörper) gerichteten Antikörper. Beide Western-Transfers lieferten Signale bei einem Molekulargewicht von 90 kDa.

Die Silberfärbung des Polyacrylamidgels (Abb. 10 b) ergab eine Hauptbande bei einem Molekulargewicht von 90 kDa, welche zweifellos der monomeren Form des Rezeptorkörpers zuzuordnen ist. Die Diskrepanz zu dem berechneten Molekulargewicht von 77.7 kDa ist hierbei mit der Glykosylierung sowohl des Fc-Tags als auch der Ektodomäne des EphA5-Rezeptors erklärbar. Die schwache Nebenbande bei einem Molekulargewicht von 50 kDa ist vermutlich auf die schweren Ketten von Immunglobulinen aus Serumresten des Kulturmediums zurückzuführen. Der Western-Transfer des Eluats ergab bei Inkubation mit gegen den Fc-Tag bzw. das c-myc Epitop gerichteten Antikörpern (Abb 10 c) bzw. d) jeweils ein intensives Signal bei einem Molekulargewicht von 90 kDa und bestätigte den Befund aus dem silbergefärbten Polyacrylamidgel.

Diese Ergebnisse lieferten zusammen den Beleg dafür, daß der Rezeptorkörper von den transfizierten Zellen mit dem erwarteten Molekulargewicht sezerniert wurde und daß es weder zu einer Degradierung noch zu einer C-terminalen Verstümmelung des Moleküls in detektierbarem Umfang kam.

#### 4.3.2 N-terminale Aminosäuresequenzierung des Rezeptorkörpers

Da der N-Terminus von Eph-Rezeptoren verantwortlich für Ligandenbindung und -Spezifität ist (Labrador *et al.* 1997), sollte sichergestellt werden, daß das Igκ-Signalpeptid korrekt abgespalten wird und es nicht etwa zu einer N-terminalen Verstümmelung der EphA5-Ektodomäne des Rezeptorkörpers kommt.

Hierzu wurde aus konditioniertem Medium aufgereinigter Rezeptorkörper mittels SDS-PAGE über ein Gel mit 10% Polyacrylamid aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert, mit Coomassie angefärbt und mittels Gasphasen-Edmann Sequenzierung einer N-terminalen Aminosäuresequenzierung über eine Länge von 4 Resten unterzogen.



**Abb. 11: N-terminale Aminosäuresequenzierung des Rezeptorkörpers.**

Gegenüberstellung von

- a) Der in Genbankeintrag U07357 vorhergesagten Position des Signalpeptids des EphA5-Rezeptors und  
 b) Des in dem Rezeptorkörper verwendeten Igκ-Signalpeptids. Die Aminosäuresequenzierung ergab, daß der Rezeptorkörper im Vergleich zu den Angaben des Genbankeintrags U07357 am N-Terminus die beiden zusätzlichen Aminosäuren Aspartat und Alanin trägt (b, in blau).

**rot:** Vorhergesagte Positionen des Signalpeptids mit der dazugehörigen Schnittstelle der Signalpeptidase (Pfeil); **schwarz:** Aminosäuresequenz des maturen EphA5-Rezeptors; **blau:** Die zusätzlichen, an dem Rezeptorkörper gefundenen Aminosäuren Aspartat und Alanin.

Die Aminosäuresequenzierung ergab, daß der Rezeptorkörper im Vergleich zu publizierten Vorhersagen (Eintrag zu Genbank Accession Nr. U07357) N-terminal die

beiden zusätzlichen Aminosäuren Aspartat und Alanin trug, welche aus dem Signalpeptid stammten.

Das Verbleiben dieser beiden Aminosäuren des Ig $\kappa$ -Signalpeptids am maturen Rezeptorkörper könnte eventuell damit erklärt werden, daß die exakte Position der Schnittstellen von Signalpeptidasen unter anderem von dem Kontext der umgebenden Aminosäuresequenz abhängt (von Heijne, G. 1986). Möglicherweise hat die Übertragung des Ig $\kappa$ -Signalpeptids aus seiner natürlichen Umgebung, der  $\kappa$ -Kette muriner Immunglobuline, auf die Ektodomäne des EphA5-Rezeptors zu der beobachteten Abweichung von der vorhergesagten Position der Schnittstelle geführt. Weiterhin handelt es sich bei den Angaben in dem Genbankeintrag U07357 zur Position des Signalpeptids um Vorhersagen, gemäß der zugehörigen Referenz (Zhou *et al.* 1994) jedoch nicht um das Ergebnis einer Aminosäuresequenzierung. Falls die Schnittstelle der Signalpeptidase für EphA5 also möglicherweise um einen Rest verschoben ist, könnte es sich bei einer der beiden zusätzlichen Aminosäuren, Alanin, um den tatsächlichen N-Terminus des EphA5-Rezeptors handeln.

Aufgrund der Aminosäuresequenzierung des Rezeptorkörpers konnte ausgeschlossen werden, daß es aufgrund inkorrekt abspaltung des Signalpeptids zu einer N-terminalen Verstümmelung des Rezeptorkörpers kam.

### 4.3.3 Bindung des Rezeptorkörpers an Ephrin-A5 und Ephrin-A2

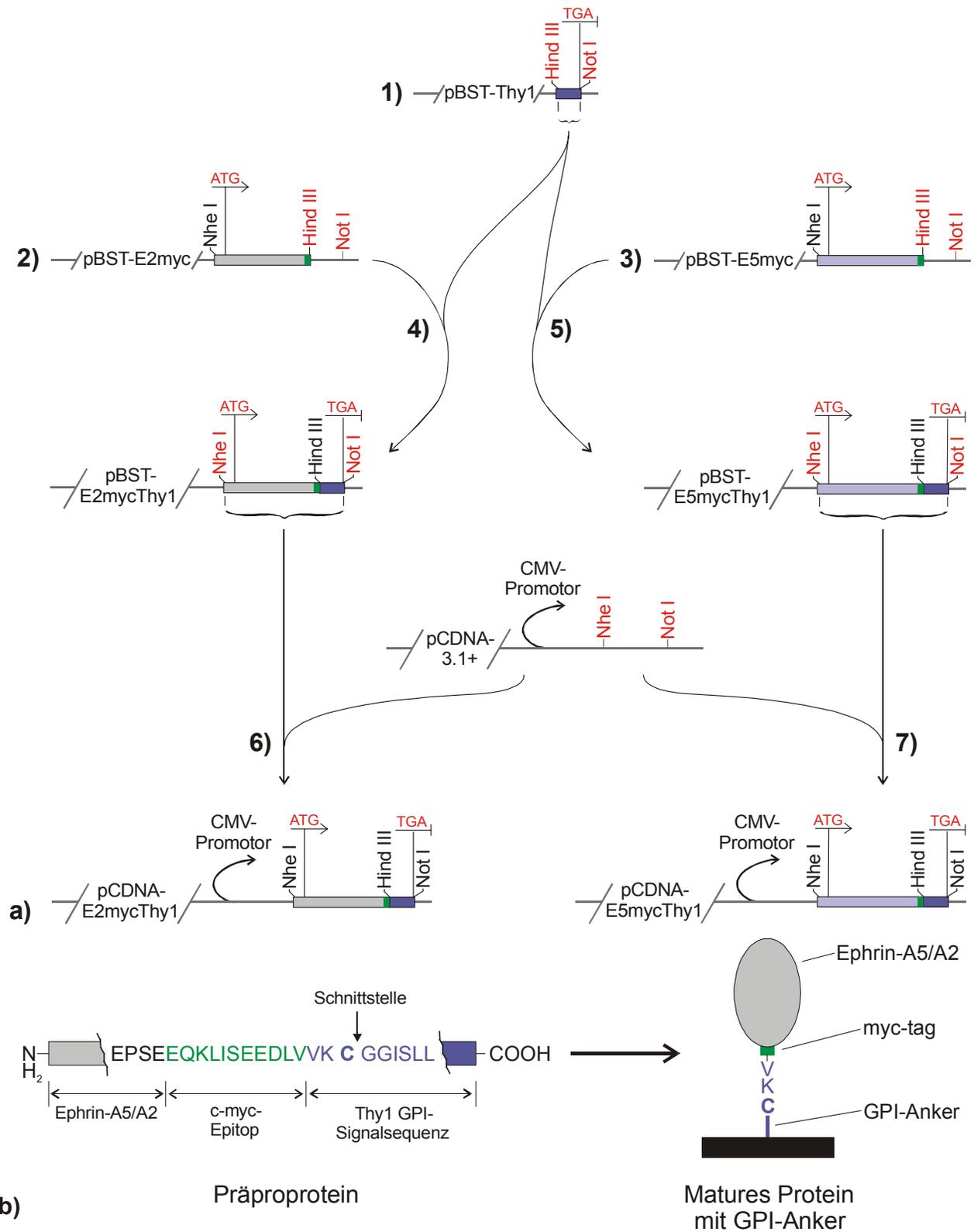
Als zentrale Voraussetzung für eine *in-vivo* Applikation sollte die Fähigkeit des Rezeptorkörpers überprüft werden, A-Ephrine zu binden. Hierzu wurden zunächst Plasmide für die Expression von Ephrin-A2 und Ephrin-A5 in Zelllinien kloniert (Abb. 12 a). Die Ephrine wurden C-terminal mit einem c-myc Epitop versehen, und die endogenen GPI-Signalsequenzen wurden aus klonierungstechnischen Gründen durch die GPI-Signalsequenz des Glykoproteins Thy1 ersetzt. Der Austausch der natürlichen durch die GPI-Signalsequenz von Thy1 hatte keine Modifikation der maturen Proteine zur Folge, da diese Sequenz bei der Übertragung des GPI-Ankers abgetrennt wurde (Abb. 12 b), Englund 1993, Udenfriend *et al.* 1995a, Udenfriend *et al.* 1995b).

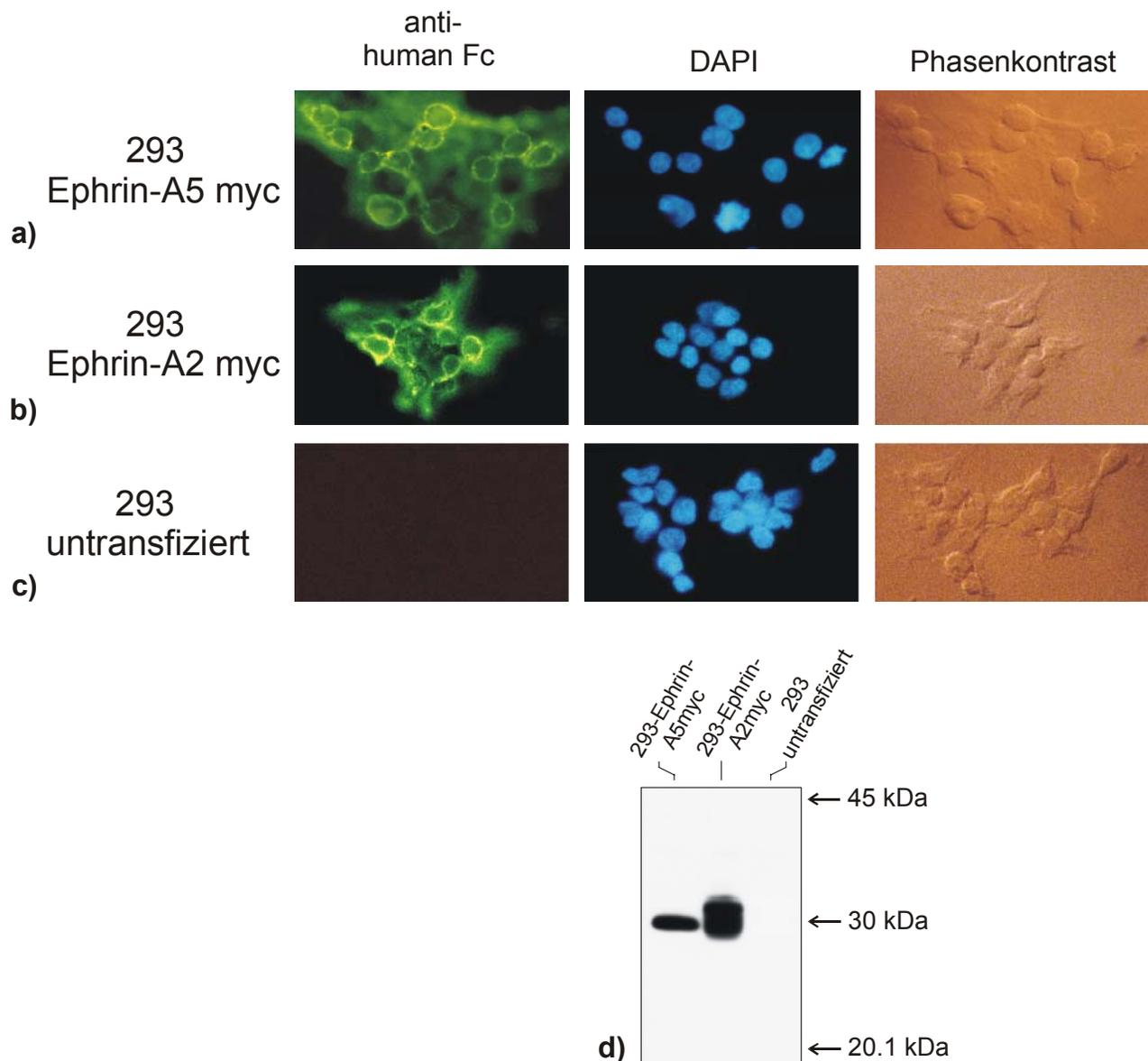
Die Expressionsplasmide für Ephrin-A2 („pCDNA-E2mycThy1“) und für Ephrin-A5 („pCDNA-E5mycThy1“) wurden stabil in 293 Zellen transfiziert. Die Zelllinien wurden nun in einer Oberflächenfärbung eingesetzt, in welchen der affinitätsgereinigte Rezeptorkörper anstelle eines Primärantikörpers verwendet wurde (Abb. 13 a)-c). Die Expression der mit einem c-myc Epitop versehenen Ephrine in den Zelllinien wurde mittels Western-Transfer überprüft (Abb. 13 d).

Ein intensives Signal in der Oberflächenfärbung der stabil transfizierten Zelllinien belegte die spezifische Interaktion des Rezeptorkörpers mit den Liganden Ephrin-A5 und Ephrin-A2 stellvertretend für die Subfamilie der A-Ephrine.

**Abb. 12: (folgende Seite) Klonierung von Plasmiden für die Expression von Ephrin-A2 und Ephrin-A5 in Gewebekultur.**

- a) Klonierung der Plasmide „pCDNA-E2mycThy1“ und „pCDNA-E5mycThy1“ zur Expression von Ephrin-A2 bzw. Ephrin-A5 unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Plasmide wurden zwecks besserer Übersichtlichkeit linear, unter Weglassung aller Elemente des Plasmidrückgrates sowie nur mit einer Auswahl der wichtigsten Restriktionsschnittstellen dargestellt. Die in den einzelnen Klonierschritten verwendeten Restriktionsschnittstellen sowie Start- und Stopcodon der cDNA sind rot markiert.
- 1) Für die Klonierung der Thy 1 GPI-Signalsequenz wurde aus Hirngewebe einer neugeborenen Maus des Inzuchtstammes Balb/c gesamt-RNA isoliert und mit oligo-dT Primern in eine cDNA revers transkribiert. Der relevante Bereich der Thy1 mRNA-Sequenz (Genbank Accession Nr. NM\_009382, bp 385-489, entsprechend AS 129-162) wurde aus dieser cDNA mittels PCR mit den Primern „T1“ und „T2“ amplifiziert. Der entsprechende Bereich der mRNA-Sequenz wurde in dieser PCR mit den Restriktionsschnittstellen Hind III und Not I versehen. Das PCR-Produkt wurde in die EcoR V-Restriktionsschnittstelle von „pBSTII-SK+“ ligiert (Plasmid „pBST-Thy1“).
  - 2, 3) Die relevanten Abschnitte der mRNA-Sequenzen von Ephrin-A2 (Genbank Accession Nr. U14941, bp 10-564, entsprechend AS 1-185) bzw. Ephrin-A5 (Genbank Accession Nr. U90664, bp 15-611, entsprechend AS 1-199) wurden aus der unter 1) hergestellten cDNA mittels PCR amplifiziert. Hierbei wurden die Primer „EA2 1“ und „EA2 2“ (für Ephrin-A2) sowie „EA5 1“ und „EA5 2“ (für Ephrin-A5) verwendet, und die entsprechenden Bereiche der mRNA-Sequenzen wurden jeweils mit den Restriktionsschnittstellen Nhe I und Hind III sowie einem c-myc Epitop versehen. Die PCR-Produkte wurden jeweils in die EcoR V-Restriktionsschnittstelle von „pBSTII-SK+“ ligiert (Plasmide „pBST-E2myc“ und „pBST-E5myc“).
  - 4, 5) Das Plasmid „pBST-Thy1“ wurde mit Hind III und Not I verdaut, und das ausgeschnittene Fragment wurde jeweils in die ebenfalls mit Hind III und Not I verdauten Plasmide „pBST-E2myc“ und „pBST-E5myc“ ligiert (Plasmide „pBST-E2mycThy1“ und „pBST-E5mycThy1“).
  - 6, 7) Die Plasmide „pBST-E2mycThy1“ und „pBST-E5mycThy1“ wurden mit Nhe I und Not I verdaut, und die ausgeschnittenen Fragmente wurden jeweils in das ebenfalls mit Nhe I und Not I verdaute Plasmid „pCDNA-3.1+“ ligiert (Plasmide „pCDNA-E2mycThy1“ und „pCDNA-E5mycThy1“).
- b) Bei der Prozessierung der Fusionsproteine aus den Ephrinen A2 bzw. A5, dem c-myc Epitop und der Thy1 GPI-Signalsequenz von der Präproform zum maturen Protein wird die GPI-Signalsequenz nach dem 3. Rest proteolytisch gespalten, und der Lipidanker wird auf die  $\alpha$ -Carboxylgruppe des nun C-terminalen Cystein-Restes übertragen.





**Abb. 13: Spezifische Interaktion des Rezeptorkörpers mit den Liganden Ephrin-A2 und Ephrin-A5.**

**a)-c)** Oberflächenfärbung der stabil transfizierten Zelllinien „293 Ephrin-A2myc“ (a) und „293 Ephrin-A5myc“ (b) sowie von untransfizierten 293-Zellen (c) mit dem affinitätsgereinigten Rezeptorkörper gemäß 6.2.4.4. Ein intensives, an der Zellmembran lokalisiertes Signal in den transfizierten Zelllinien demonstrierte die spezifische Interaktion des Rezeptorkörpers mit den Liganden.

**d)** Western-Transfer mit Lysaten der stabil transfizierten Zelllinien „293 Ephrin-A2myc“ und „293 Ephrin-A5myc“ sowie von untransfizierten 293-Zellen.

Lysate der Zelllinien (10 µg Gesamtprotein je Spur) wurden mittels SDS-PAGE auf einem Gel mit 13% Polyacrylamid aufgetrennt und mit Hilfe von Western-Transfer analysiert. Die Membran des Western-Transfer wurde mit einem gegen das c-myc Epitop gerichteten monoklonalen Antikörper (Klon 9E10, 50 ng/ml) sowie einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1:10.000, Jackson) inkubiert.

## 4.4 Expression des Rezeptorkörpers in einer transgenen Maus

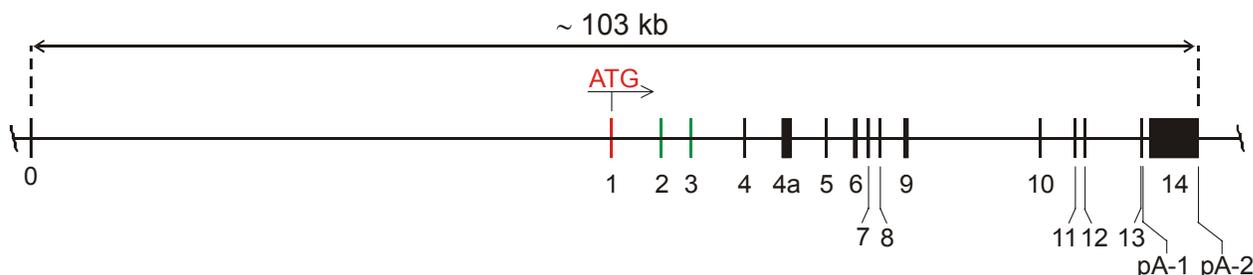
### 4.4.1 Wahl des Genlokus

Für die Expression des Rezeptorkörpers in einer transgenen Maus wurde der *tau*-Lokus gewählt, da er die Expression des Rezeptorkörpers im gesamten Nervensystem ab einem frühen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung auf hohem Niveau erlaubt (Binder *et al.* 1985, Nunez *et al.* 1997, Hirokawa *et al.* 1994). Entscheidende Voraussetzung für die Verwendung des *tau*-Lokus war die Tatsache, daß die Deletion des Tau-Proteins keinen neuronalen Phänotyp zur Folge hat (Hirokawa *et al.* 1994, Tucker *et al.* 2001). Für die Verwendung des *tau*-Lokus sprach weiterhin die Verfügbarkeit einer Mauslinie im Labor, in welcher EGFP in den *tau*-Lokus inseriert war und die deshalb als ideale Kontrolle für den Rezeptorkörper knock-in verwendet werden konnte (Tucker *et al.* 2001).

### 4.4.2 Genaustausch durch homologe Rekombination in ES-Zellen

#### 4.4.2.1 Design und Klonierung des Rekombinationskonstruktes

Bei dem *tau*-Gen der Maus handelt es sich um einen komplexen Locus, der sich aus 14 Exons zusammensetzt und dessen Transkription während der Embryonalentwicklung in 3 verschiedenen, alternativ gespleißten Isoformen einer dynamischen Regulation unterliegt (Poorkaj *et al.* 2001, Kosik *et al.* 1989). Die cDNA des Rezeptorkörpers wurde unter Verwendung des natürlichen Startcodons in Exon I des Gens inseriert, da dieses Exon in allen Spleißvarianten des Transkriptes enthalten ist und somit eine vollständige Deletion des Tau-Proteins erzielt werden konnte.



**Abb. 14:** Intron/Exon-Abfolge des *tau*-Gens in der Maus.

Exon 0 kodiert für den 5'-untranslatierten Bereich der mRNA, das natürliche Startcodon des *tau*-Gens befindet sich in Exon I, welches Bestandteil aller Isoformen des Transkriptes ist. Die in Hirn adulter Mäuse alternativ gespleißten Exons 2 und 3 sind in grüner Farbe dargestellt, pA-1 und pA-2 repräsentieren zwei alternative Polyadenylierungssignale. Die relativen Abstände der Exons sind maßstabsgetreu wiedergegeben, während die Größe der Exons zur besseren Übersichtlichkeit nicht maßstabsgetreu gezeichnet wurden.

Modifiziert nach: Poorkaj *et al.* (2001).

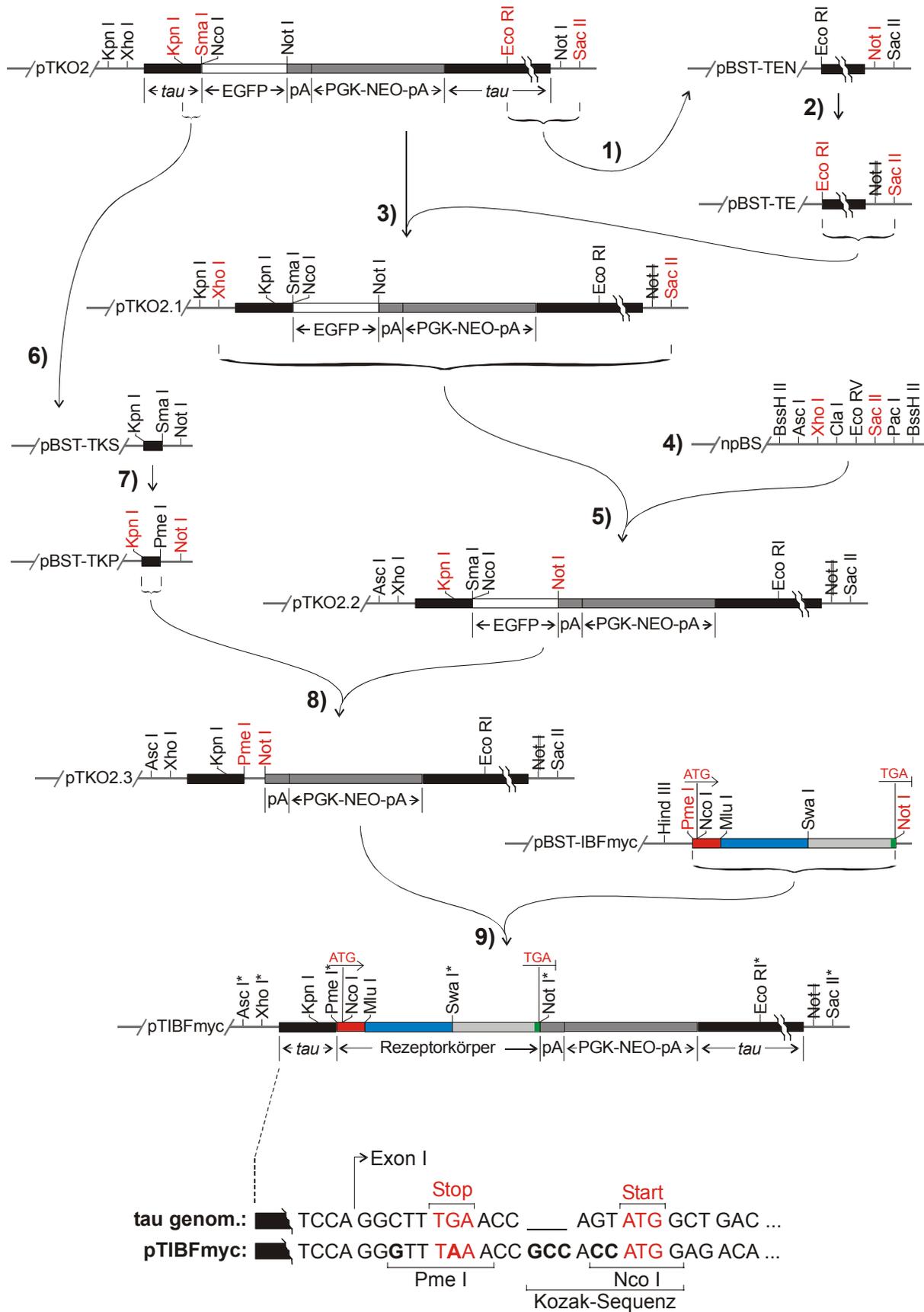
Für die Klonierung des Rekombinationskonstruktes „pTIBFmyc“ zur Insertion der Rezeptorkörper-cDNA in den *tau*-Lokus wurde von Kerry Tucker freundlicherweise ein Plasmid zur Verfügung gestellt, welches 8.3 kb der genomischen Sequenz um das Exon I des *tau*-Gens enthielt. Das Rekombinationskonstrukt „pTIBFmyc“ setzte sich aus dem Rückgrat des Plasmids „pBSTII-SK+“, aus 8.3 kb genomischer DNA aus einem Bereich um Exon I des *tau*-Lokus sowie aus der Rezeptorkörper-cDNA zusammen. Das Plasmid enthielt weiterhin einen positiven Selektionsmarker, bei dem es sich um das Enzym Neomycin-Phosphotranferase handelte, welches unter der Kontrolle des bovinen Phosphoglyceratkinase (PGK) Promotors exprimiert wurde.

Das Rekombinationskonstrukt „pTIBFmyc“ wurde nach dem Kassettenprinzip konzipiert, womit der Austausch einzelner Komponenten des Konstruktes sowie die Insertion von beliebigen cDNAs in den *tau*-Lokus in einem einzigen Klonierschritt ermöglicht wurden. Das Konstrukt wurde in einem eigens maßgeschneiderten Vektor kloniert, in dessen multiple Klonierstelle mehrere seltene Restriktionsschnittstellen eingefügt wurden, um eine Linearisierung weitgehend unabhängig von der jeweils inserierten cDNA zu ermöglichen. Weiterhin wurde auf eine Flankierung der Resistenzkassette mit loxP-Sequenzen verzichtet, da in vorangegangenen Experimenten beobachtet wurde, daß sich der Verbleib des Selektionsmarkers im Genom nicht auf die Eigenschaften des *tau*-Promotors auswirkt (Tucker *et al.* 2001, sowie Tucker, persönliche Mitteilung). Das Startcodon des Rezeptorkörpers wurde mit einer optimierten Kozak-Sequenz umgeben, welche im natürlichen *tau*-Transkript nicht vorhanden ist. Ein im natürlichen *tau*-Transkript vorhandenes, vor dem Startcodon befindliches Stopcodon im Leseraster wurde bei der Insertion der Rezeptorkörper-cDNA beibehalten, während das Startcodon aus Gründen der Klonierstrategie um 3 bp versetzt wurde (Abb. 15).

**Abb. 15: (folgende Seite) Klonierung des Rekombinationskonstruktes „pTIBFmyc“ zur Insertion der cDNA des Rezeptorkörpers in den *tau*-Lokus mittels homologer Rekombination in ES-Zellen.**

Plasmide wurden zwecks besserer Übersichtlichkeit linearisiert, unter Weglassung aller Elemente des Plasmidrückgrates, mit nur einer Auswahl der wichtigsten Restriktionsschnittstellen sowie nicht maßstabsgetreu dargestellt. Die in den einzelnen Klonierschritten verwendeten Restriktionsschnittstellen sowie Start- und Stopcodon der cDNA sind rot markiert, zerstörte Restriktionsschnittstellen sind durchgestrichen. Im Rekombinationskonstrukt „pTIBFmyc“ sind Restriktionsschnittstellen, welche nur einmalig im Plasmid vorkommen, mit einem Stern gekennzeichnet.

- 1) Das von Kerry Tucker freundlicherweise zur Verfügung gestellte Plasmid „pTKO2“ enthielt 8.3 kb genomische DNA des *tau*-Lokus (*tau*), die cDNA für EGFP (EGFP), eine SV40 Polyadenylierungssignal (pA) sowie einen positiven Selektionsmarker, welcher sich aus dem Promotor des bovinen Gens für Phosphoglyceratkinase (PGK), der cDNA des Gens Neomycinphosphotransferase (NEO) und einem SV40 Polyadenylierungssignal (pA) zusammensetzte.  
Aus dem Plasmid „pTKO2“ wurde mittels Verdau mit Eco RI und Sac II ein Fragment *tau*-genomischer DNA isoliert und in ebenfalls mit Eco RI und Sac II verdauten „pBSTII-SK+“ ligiert (Plasmid „pBST-TEN“).
- 2) Die Not I-Restriktionsschnittstelle des Plasmids „pBST-TEN“ wurde zerstört. Hierzu wurde das Plasmid durch Verdau mit Not I linearisiert, die Not I-Restriktionsschnittstelle wurde mittels einer Klenow-Auffüllreaktion gemäß 6.2.1.11 aufgefüllt, und das Plasmid wurde durch Inkubation mit T4 DNA-Ligase wieder zirkularisiert (Plasmid „pBST-TE“).
- 3) Das *tau*-genomische DNA-Fragment mit der zerstörten Not I-Restriktionsschnittstelle wurde durch Verdau mit Eco RI und Sac II aus dem Plasmid „pBST-TE“ ausgeschnitten und in das ebenfalls mit Eco RI und Sac II verdaute Plasmid „pTKO2“ ligiert (Plasmid „pTKO2.1“).
- 4) Auf der Grundlage von „pBSTII-SK+“ wurde ein Plasmid mit einer maßgeschneiderten multiplen Klonierstelle erzeugt. Hierzu wurde die originäre multiple Klonierstelle des Plasmids „pBSTII-SK+“ durch Verdau mit Bss HII vollständig entfernt. In das Plasmidrückgrat wurde nun eine neue multiple Klonierstelle ligiert, welche aus den jeweils an ihrem 3'-Terminus phosphorylierten Oligodesoxyribonukleotiden „Linker 1“ und „Linker 2“ erzeugt wurde (Plasmid „npBS“).
- 5) Aus dem Plasmid „pTKO2.1“ wurde durch Verdau mit Xho I und Sac II ein DNA-Fragment isoliert und in das ebenfalls mit Xho I und Sac II verdaute Plasmid „npBS“ ligiert (Plasmid „pTKO2.2“). Durch diesen Schritt wurde die Kpn I-Restriktionsschnittstelle in der multiplen Klonierstelle des Plasmids „pTKO2.1“ durch eine Asc I-Restriktionsschnittstelle ersetzt.
- 6, 7, 8) Das Plasmid „pTKO2.2“ wurde auf die Insertion der Rezeptorkörper-cDNA vorbereitet, indem die Sma I-Restriktionsschnittstelle in der *tau*-genomischen DNA des Plasmids durch eine Pme I-Restriktionsschnittstelle ersetzt wurde.  
Aus dem Plasmid „pTKO2“ wurde durch Verdau mit Kpn I und Sma I ein Fragment *tau*-genomischer DNA isoliert und in die Eco RV-Restriktionsschnittstelle von „pBSTII-SK+“ ligiert (Plasmid „pBST-TKS“). Dieses Plasmid wurde als Matrize für eine PCR mit den Primern „TKP 1“ und „TKP 2“ eingesetzt, und das PCR-Produkt wurde in die Eco RV-Restriktionsschnittstelle von „pBSTII-SK+“ ligiert (Plasmid „pBST-TKP“). Ein aus dem Plasmid „pBST-TKP“ durch Verdau mit Kpn I und Not I isoliertes DNA-Fragment wurde in das ebenfalls mit Kpn I und Not I verdaute Plasmid „pTKO2.2“ ligiert (Plasmid „pTKO2.3“).
- 9) Die Rezeptorkörper-cDNA wurde durch Verdau mit Pme I und Not I aus dem Plasmid „pBST-IBFmyc“ ausgeschnitten und in das ebenfalls mit Pme I und Not I verdaute Plasmid „pTKO2.3“ ligiert (Plasmid „pTIBFmyc“).

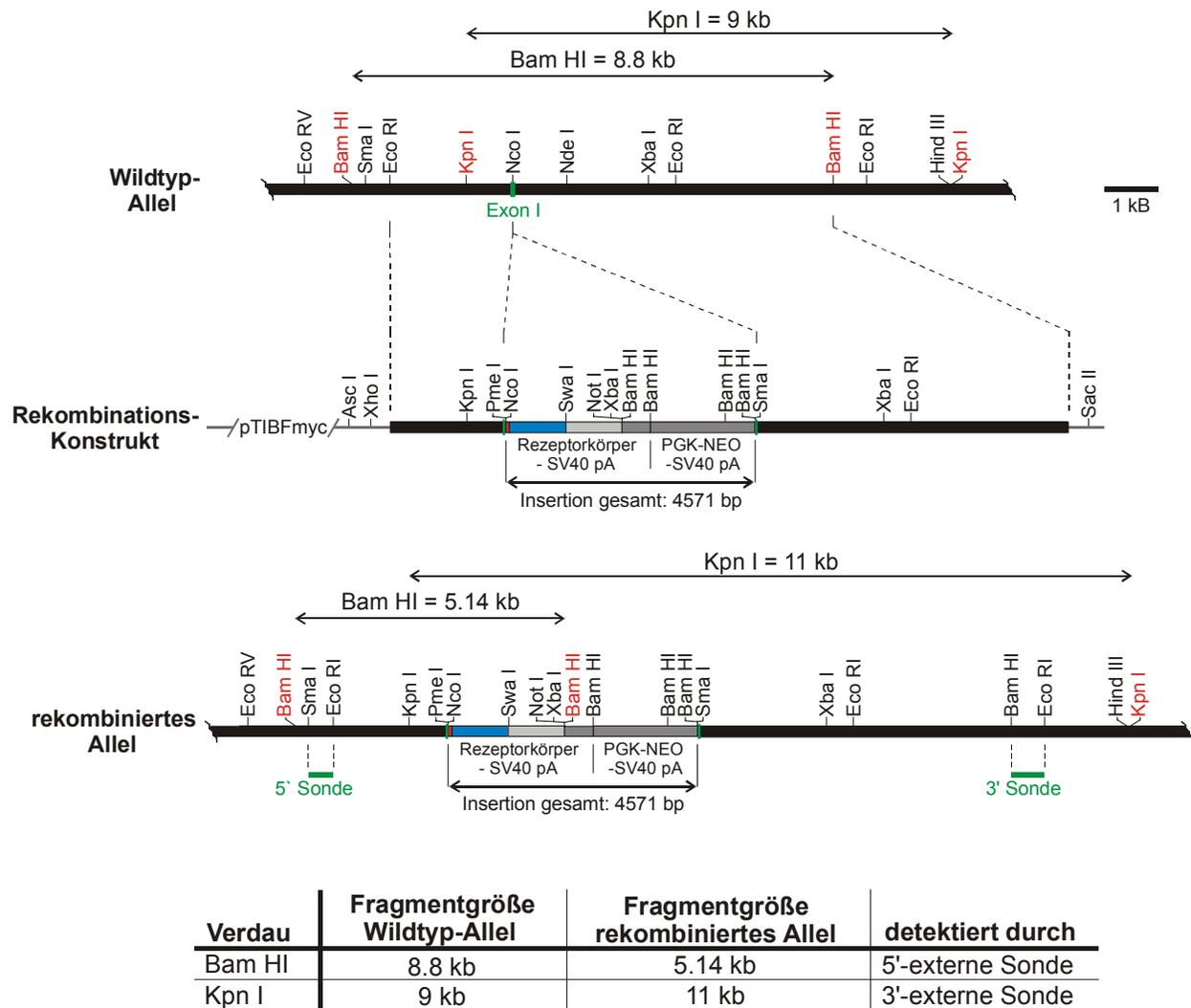


#### 4.4.2.2 Homologe Rekombination in ES-Zellen

Für die homologe Rekombination wurden 20 µg des mit Asc I linearisierten Konstruktes „pTIBFmyc“ in R1 ES-Zellen (Nagy *et al.* 1993) elektroporiert. Nach 24 h wurde mit der G418 Selektion begonnen, und nach 10 Tagen wurden 144 Klone in 96 Well Schalen gepickt und 2 mal in insgesamt 4 Kopien gesplittet. Hiervon wurden 3 Kopien in 96 Well Schalen eingefroren, während von der verbleibenden Kopie 91 Klone sukzessive auf 35 mm Kulturschalen expandiert und für die Extraktion genomischer DNA verwendet wurden.

Die Detektion eines korrekten Rekombinationsereignis beruht traditionell auf der Analyse von Unterschieden im Restriktionsmuster der genomischen DNA vor und nach homologer Rekombination mittels Southern-Transfer. Hierbei müssen die Sonden für die Detektion der relevanten Restriktionsfragmente genomische Sequenzabschnitte außerhalb des Restriktionskonstruktes erkennen (sog. 5'- bzw. 3'-externe Sonden), um eine Differenzierung zwischen korrekter homologer Rekombination und einer Zufalls- oder Mehrfachintegration des Restriktionskonstruktes zu erlauben.

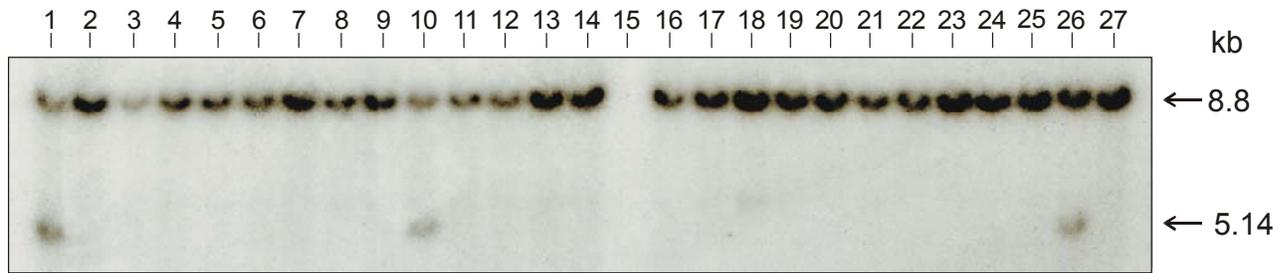
Im vorliegenden Falle wurde die veränderte Größe vor und nach homologer Rekombination von Fragmenten ausgenutzt, welche das Exon I umschließen. Nach korrekter homologer Rekombination kam es zu einer Verkleinerung eines mittels Bam HI erzeugten, durch eine 5'-externe Sonde detektierten Fragmentes von 8.8 kb auf 5.14 kb, während es zu einer Vergrößerung eines durch Verdau mit Kpn I erzeugten, durch eine 3'-externe Sonde detektierbaren Fragmentes von 9 kb auf 11 kb kam (Abb. 16).



**Abb. 16: Insertion der Receptorkörper-cDNA in den *tau*-Lokus mittels homologer Rekombination in ES-Zellen.**

Eine korrekte homologe Rekombination konnte anhand einer Verkleinerung des mit der 5'-externen Sonde detektierbaren Bam HI-Fragmentes von 8.8 kb auf 5.14 kb sowie einer Vergrößerung des mit der 3'-externen Sonde detektierbaren Kpn I-Fragmentes von 9 kb auf 11 kb detektiert werden.

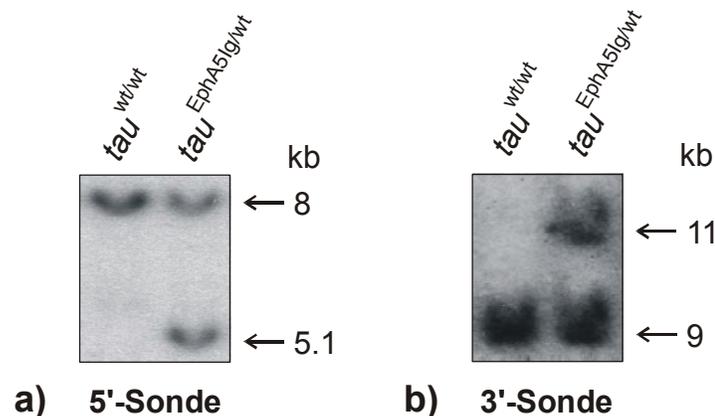
Die genomische DNA wurde mit Bam HI verdaut, auf einem 0.6% Agarosegel aufgetrennt und mittels Southern-Transfer mit der 5'-externen Sonde analysiert.



**Abb. 17: Analyse der ES-Zellklone mittels Southern-Transfer auf homologe Rekombination, Beispiel einer mit der 5'-externen Sonde hybridisierten Membran.**

Ein Signal auf der Höhe von 5.14 kb in den Spuren 1, 10 und 26 zeigte ein korrektes Rekombinationsereignis, ein Signal auf der Höhe von 8.8 kb das Wildtyp Allel an. Das unterschiedliche Intensitätsverhältnis der Banden von Wildtyp bzw. rekombiniertem Allel erklärt sich durch den Beitrag der embryonalen Fibroblasten zur genomischen DNA, welche ausschließlich das Wildtyp Allel tragen. Spur 15 zeigte kein Signal, da hier der Molekulargewichtsstandard geladen wurde.

Anschließend wurden alle Klone, deren Analyse mit der 5'-externen Sonde auf ein korrektes Rekombinationsereignis hinwies, durch Southern-Transfer unter Verwendung der 3'-externen Sonde analysiert.



**Abb. 18: Analyse der ES-Zellklone mittels Southern-Transfer auf homologe Rekombination mit 5'- und 3'-externer Sonde, Beispiel des korrekt rekombinierten Klones # 73.**

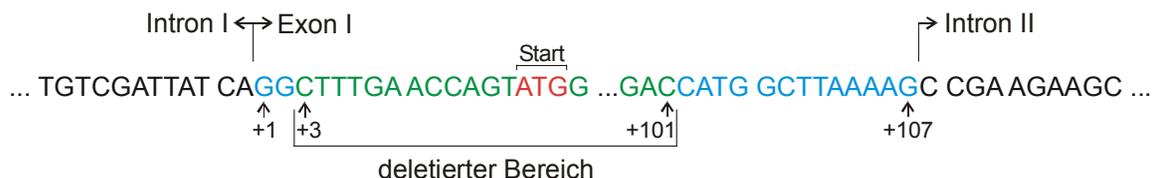
Die genomische DNA wurde mit Bam HI bzw. Kpn I verdaut, auf einem 0.6% Agarosegel aufgetrennt, und die Membran wurde nach Southern-Transfer mit der 5'-externen bzw. der 3'-externen Sonde hybridisiert. Die Signale auf der Höhe von 5.14 kb (Bam HI, 5'-externe Sonde) bzw. 11 kb (Kpn I, 3'-externe Sonde) belegen, daß sowohl für den 5'- als auch den 3'-genomischen Arm des Rekombinationskonstruktes eine korrekte homologe Rekombination stattgefunden hat.

Von den 91 Klonen zeigten 11 Klone ein Signal bei Hybridisierung mit der 5'-externen Sonde auf der Höhe von 5.14 kb. Die genomische DNA dieser 11 Klone wurde anschließend mit Kpn I verdaut und mittels Southern-Transfer mit der 3'-externen Sonde analysiert, wobei 10 der 11 Klone ein positives Signal auf der Höhe von 11 kb lieferten. Insgesamt wurde eine Rekombinationsfrequenz von 11% bezogen auf die Gesamtzahl der analysierten ES-Klone erzielt.

Klone auf 96 Well Schale gepickt	144
Davon auf 35 mm expandiert	91
5'-Sonde positives Signal	11
<u>Davon 3'-Sonde positives Signal</u>	<u>10</u>
Korrekt rekombinierte ES-Klone	10 $\cong$ 11%

**Tab. 1: Übersicht über die homologe Rekombination des Konstruktes „pTIBFmyc“ in ES-Zellen.**

Nach der vorangegangenen Verifizierung der homologen Rekombination mit Hilfe von Southern-Transfers wurde die exakte Positionierung der Rezeptorkörper-cDNA sowie des Selektionsmarkers im Kontext von Exon I des *tau*-Gens analysiert. Durch Vergleich von mRNA- und genomischer Sequenz des *tau*-Gens wurden zunächst die Grenzen von Exon I zu den benachbarten Introns im *tau*-Gen ermittelt. Der Vergleich der *tau*-genomischen Sequenz mit der DNA-Sequenz des Rekombinationskonstruktes ergab, daß durch die Insertion von Rezeptorkörper-cDNA und Selektionsmarker 99 bp aus Exon 1 deletiert und durch eine Insertion von insgesamt 4571 bp ersetzt wurden.



**Abb. 19: Exakte Positionierung der Insertion von Rezeptorkörper-cDNA und Selektionsmarker im Kontext von Exon I des *tau*-Gens.**

Von dem 107 bp umfassenden Exon I wurde ein Bereich von 99 bp durch eine Insertion von insgesamt 4571 bp ersetzt. Für die Lokalisierung der Intron/Exon-Grenzen wurden Datenbankeinträge zu *tau*-mRNA (Genbank Accession Nr. M18776) und *tau*-genomischer Sequenz (Genbank Accession Nr. AC091629) verwendet.

**schwarz:** Intronsische Sequenz des *tau*-Gens; **blau:** Nach Insertion von Rezeptorkörper-cDNA und Selektionsmarker erhaltener Abschnitt von Exon I; **grün:** Deletierter Abschnitt von Exon I im rekombinierten Allel; **rot:** Startcodon der *tau*-mRNA.

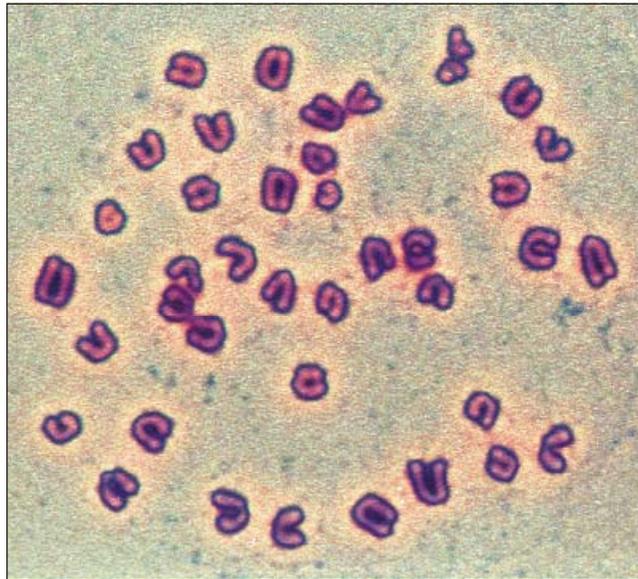
Da die in Exon I des *tau*-Gens inserierte DNA-Sequenz 2 als transkriptionelle Stoppsignale wirkende Polyadenylierungssequenzen enthielt, wurde davon ausgegangen, daß diese Manipulation eine vollständige Deletion von Tau zur Folge hat, welche unter 4.4.4.3 auf der Ebene des Proteins mittels Western-Transfer belegt werden konnte.

#### 4.4.2.3 Karyotypisierung der rekombinierten ES-Klone

Durch fortgesetztes Passagieren kann es zu chromosomalen Anomalien, sog. Aneuploidien, der ES-Zellen kommen, womit das Potential der betroffenen ES-Zellen zur Keimbahntransmission verloren geht. Das Passagieren von ES-Zellen in 96 Well Schalen begünstigt hierbei die Selektion auf aneuploide ES-Klone, da infolge von Verdünnungseffekten bevorzugt langsam wachsende Klone verloren gehen, während sich schnell wachsende Klone anreichern. Dem liegt die Tatsache zugrunde, daß ES-Zellen mit einer Trisomie des Chromosoms 8 sich schneller teilen als euploide ES-Zellen (Liu et

al. 1997). In den vorliegenden Experimenten war das Risiko für Aneuploidien erhöht, da Qualität und Karyotyp der eingesetzten ES-Zellen nicht bekannt waren. Aus diesen Gründen wurde der Karyotypisierung der ES-Zellklone vor der Injektion in Blastocysten eine besondere Bedeutung beigemessen.

Von den rekombinanten ES-Klonen wurden 40-50 Karyotypen je Klon photographiert und gezählt. Hierbei wurden nur solche Karyotypen photographiert, in denen sich die einzelnen Chromosomen eindeutig identifizieren ließen und die zu individuellen Zellen gehörigen Chromosomensätze einen hinreichenden Abstand zueinander aufwiesen, während die Karyotypen ansonsten zufallsbedingt ausgewählt wurden.



**Abb. 20: Beispiel für einen optimal aufgelösten Karyotyp einer Maus ES-Zelle mit 40 Chromosomen.**

Für die Auswertung wurden alle Karyotypen mit weniger als 40 oder einer offensichtlich präparationsbedingt verfälschten Chromosomenzahl verworfen, da die betreffenden Zellen nicht lebensfähig gewesen wären. ES-Klone wurden als euploid gewertet, sofern die Zahl der Karyotypen mit einer Chromosomenzahl von mehr als 40 weniger als 10% der insgesamt ausgezählten Karyotypen ausmachte.

Klon Nr.	Chromosomenzahl						Passage
	< 40	40	41	42	43	nonsens	
49	1× 38, 1× 39	8	41	1	0	1	8
61	3× 36, 2× 38, 4× 39	30	0	0	0	4	7
73	1× 37, 2× 38, 5× 39	38	1	0	0	6	7
79	2× 38, 4× 39	29	9	1	0	7	7
80	1× 36, 3× 38, 3× 39	3	7	29	2	10	7
95	1× 38, 3× 39	13	37	3	0	1	8
108	2× 37, 1× 38, 3× 39	10	32	2	0	6	7
145	1× 37, 1× 38, 3× 39	7	40	0	0	1	7
156	1× 36, 3× 39	7	34	3	0	4	7
191	2× 37, 6× 38, 16× 39	13	3	6	4	5	7

**Tab. 2: Ergebnis der Karyotypisierung der 10 korrekt rekombinierten ES-Zellklone.**

Es ist jeweils die Anzahl der mit einer bestimmten Chromosomenzahl photographierten Karyotypen sowie die Passagenzahl angegeben, bei welcher der Karyotyp bestimmt wurde (gezählt ab Picken des Klones). Karyotypen mit einer offensichtlich präparationsbedingt verfälschten Chromosomenzahl sind in der Spalte „nonsens“ subsumiert.

Auf der Grundlage dieser Kriterien erwiesen sich die beiden ES-Klone Nr. 61 und Nr. 73 entsprechend 20% aller korrekt rekombinierten Klone als euploid, während die übrigen ES-Klone einen aneuploiden Karyotyp zeigten.

#### 4.4.3 Etablierung der $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ Mauslinie

##### 4.4.3.1 Erzeugung von Chimären mittels Blastocysteninjektion

Die Etablierung einer transgenen Mauslinie aus ES-Zellen setzt die Erzeugung sog. Chimären voraus, bei denen es sich um Mäuse handelt, die zu einem bestimmten Anteil aus ES-Zellen bestehen. Hierzu werden die ES-Zellen in das Blastocöl von Mausembryonen des Entwicklungsstadiums E3.5, sog. Blastocysten, injiziert, in denen sie sich mit der sog. inneren Zellmasse vermischen. Diese injizierten Mausembryonen werden in den Uterus einer scheinchwangeren Amme eingesetzt und nach Geburt und Heranwachsen der Tiere mit Wildtyp Mäusen verpaart. Da auch die Keimzellen der Chimären zu einem Teil aus den injizierten ES-Zellen hervorgehen, kann es zur Keimbahntransmission der in den ES-Zellen vorliegenden Mutation kommen, und die betreffenden Nachkommen tragen die Mutation in jeweils einem Allel in allen Zellen. Durch anschließende Verpaarung der heterozygoten Gründertiere kann die Mauslinie mit Tieren aller 3 Genotypen etabliert werden.

Für die Erzeugung von Chimären wurden die beiden korrekt rekombinierten, euploiden ES-Klone Nr. 61 und Nr. 73 in Blastocysten des Inzuchtstammes C57BL/6 injiziert, welche zum Austragen in die Uteri scheinchwangerer Ammen des Stammes NMRI transferiert

wurden. Da die R1 ES-Zellen aus dem Mausstamm SV129 isoliert wurden und somit das *agouti*-Allel tragen, konnte der Grad des Chimärismus etwa ab dem 7. postnatalen Tag anhand der Fellfarbe abgeschätzt werden, wobei schwarze Fellhaare den Beitrag der Blastocyste, braune Fellhaare den Beitrag der ES-Zellen repräsentierten.

ES-Klon	Injektion	Geburt	Zahl	schwarz	Chimärismus <sup>1</sup>				Bemerkungen
					< 30%	< 50%	< 70%	> 70%	
61	29.11.'99	17.12.'99	5			1 ♂			4× † 18.12.'99
61	30.11.'99	17.12.'99	8	5	1 ♀			1 ♂, 1 ♀	
61	30.11.'99	18.12.'99	4	4	1 ♂	1 ♂		1 ♂	1× † 20.12.'99
73	6.12.'99	23.12.'99	6				1 ♂	2 ♂	3× † 3.1.'00
73	7.12.'99	26.12.'99	3				1 ♂	1 ♀	1× † 27.12.'99

**Tab. 3: Ergebnis der Injektion der beiden ES-Klone Nr. 61 und Nr. 73 in Blastocysten des Inzuchtstammes C57BL/6.**

<sup>1</sup>: Prozentangaben zum Grad des Chimärismus aufgrund des geschätzten Anteils brauner Fellhaare.

†: Verstorben.

Nach dem Umzug der Arbeitsgruppe mußte die transgene Mauslinie erneut aus ES-Zellen über die Erzeugung von Chimären etabliert werden. Hierbei wurden die Chimären mit einer der Blastocysten-Injektion verwandten Technik, der sog. Morula-Aggregation, aus ES-Zellen und frühen Mausembryonen des Entwicklungsstadiums E2.5 erzeugt. Bei den zur Aggregation eingesetzten Mausembryonen handelte es sich genetisch um ein F1-Hybrid der beiden Inzuchtstämmen C57BL/6 und FVB. Hierdurch konnte der Beitrag der ES-Zellen zu den Chimären nur anhand von subtileren Merkmalen der Fellzeichnung detektiert werden, und quantitative Aussagen zum Grad des Chimärismus waren nicht zuverlässig möglich. Aus diesem Grunde sollen die Ergebnisse der Morula-Aggregation nicht detailliert dargestellt werden.

#### 4.4.3.2 Keimbahntransmission des rekombinanten Gens

Für die Etablierung der transgenen Mauslinie wurden die männlichen Chimären mit Weibchen des Inzuchtstammes C57BL/6 verpaart. Hierbei wurden nur die Chimären mit dem größten Grad an Chimärismus verpaart, da in diesen ein hoher Beitrag der ES-Zellen zu den Keimzellen besonders wahrscheinlich ist. Weibliche Chimären wurden nicht verpaart, da sie aufgrund des Beitrages der männlichen ES-Zelllinie zu den Gonaden des Tieres mit erhöhter Wahrscheinlichkeit steril sind und erfahrungsgemäß in den aus ES-Zellen hervorgegangenen Zellen oft einen X0-Genotyp tragen.

Die Nachkommen dieser Verpaarungen wiesen eine braune Fellfarbe auf, sofern es zu einer Keimbahntransmission gekommen war, während die Tiere mit schwarzer Fellfarbe keinen Beitrag der ES-Zellen hatten und genetisch reine C57BL/6 Inzuchttiere waren. Da die verwendeten ES-Zellen heterozygot hinsichtlich der am *tau*-Lokus vorgenommenen Mutation waren, trugen statistisch 50% der Nachkommen mit brauner Fellfarbe das

rekombinierte Allel in allen Körperzellen. Diese heterozygoten sog. Gründertiere der Generation F1 wurden untereinander verpaart, um homozygote Mutanten zu erzeugen.

Chimäre	ES-Klon (% ES-Beitrag) <sup>1</sup>	Nachkommen insgesamt	Schwarze Fellfarbe	Braune Fellfarbe	Heterozygote Gründertiere
5-F0	61, 70-90%	17	11	6	5
6-F0	61, 30-50%	51	38	13	8
8-F0	73, 50%	23	10	13	13
11-F0	73, 50%	68	65	3	0

**Tab. 4: Fellfarbe und Genotyp von Nachkommen der Chimären.**

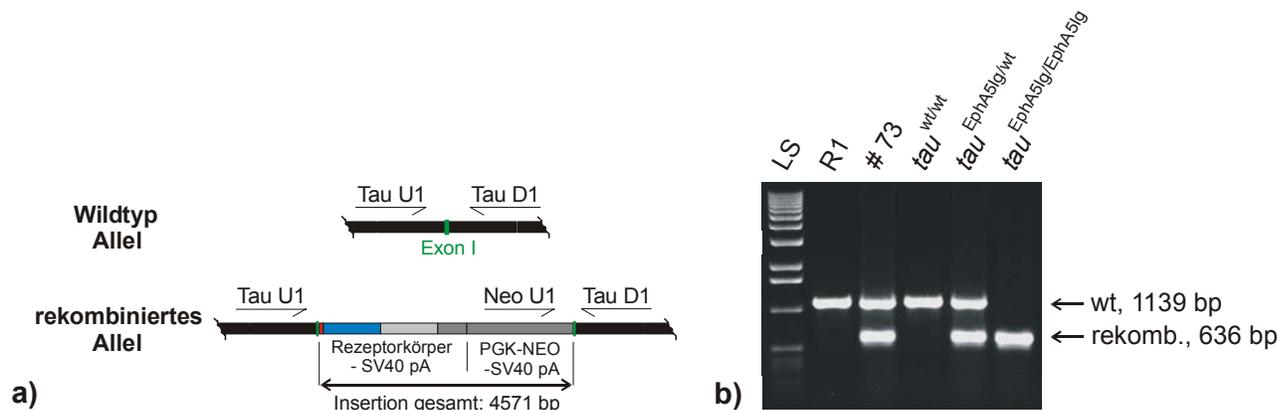
Aufgeführt sind die Nachkommen von vier männlichen Chimären aus Verpaarungen mit Weibchen des Inzuchtstammes C57BL/6. Die Chimären wurden mittels Blastocysteninjektion der ES-Klone Nr. 61 und Nr. 73 erzeugt.

<sup>1</sup>: Der Grad des Beitrages von ES-Zellen zu den Chimären wurde anhand der Fellfarbe geschätzt.

Die Mauslinie wird im folgenden  $tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  genannt (hierbei steht  $tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  für homozygote,  $tau^{EphA5lg/wt}$  für heterozygote Mutanten).

#### 4.4.3.3 Etablierung einer PCR-basierten Genotypisierungsstrategie

Für die Bestimmung des Genotyps der Mäuse wurde eine PCR-basierte Strategie etabliert, welche die gleichzeitige Detektion des Wildtyps als auch des rekombinierten Allels in derselben Reaktion mit genomischer DNA aus Schwanzbiopsien als Matrize erlaubte. Diese Strategie verwendete 3 Primer, welche um das Exon I des *tau*-genomischen Locus angeordnet waren (Abb. 21). Die Primer „Tau U1“ und „Tau D1“ amplifizierten ein 1139 bp langes DNA-Fragment ausschließlich aus dem Wildtyp Allel, da im rekombinierten Allel die Entstehung eines PCR-Produkts durch die Insertion von zusätzlich 4571 bp zwischen den Ansatzstellen der Primer verhindert war. Die Primer „Neo U1“ und „Tau D1“ amplifizierten ein 636 bp langes DNA-Fragment aus dem rekombinierten Allel, welches sich aus *tau*-genomischer Sequenz und einem Abschnitt des Gens Neomycin-Phosphotransferase zusammensetzte.



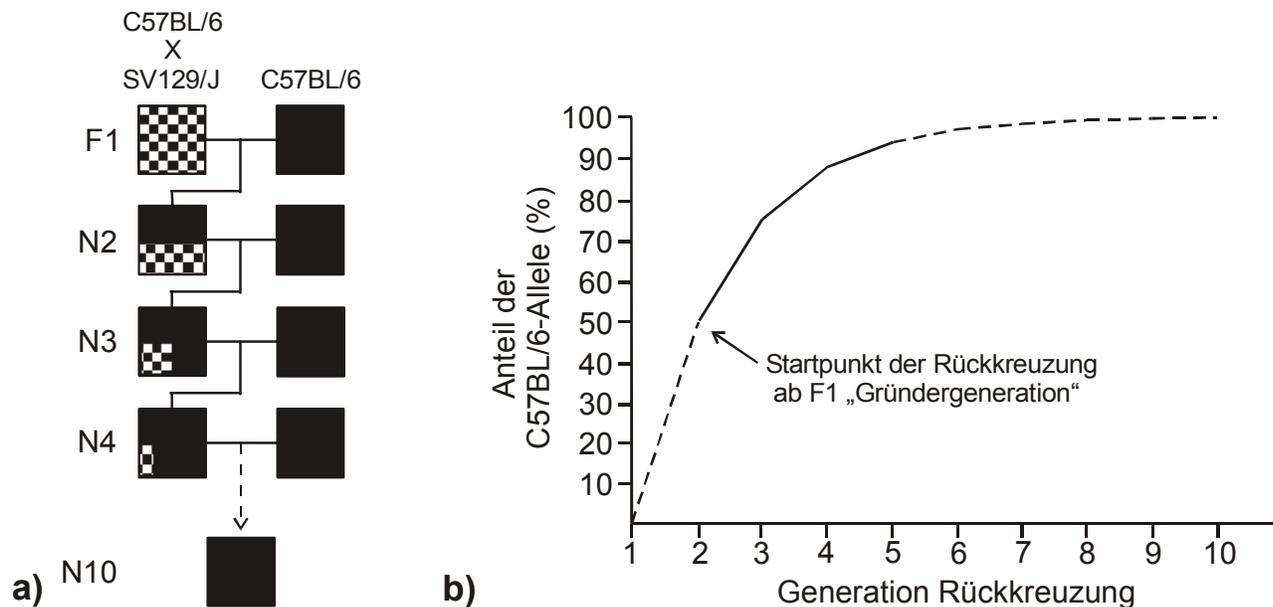
**Abb. 21: PCR-basierte Genotypierungsstrategie für die Mauslinie  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ .**

- a) Schematische Darstellung der PCR zur gleichzeitigen Detektion von rekombiniertem sowie Wildtyp Allel in einer gemeinsamen PCR-Reaktion. Wildtyp sowie rekombiniertes Allel wurden mit dem gemeinsamen 3'-Primer „Tau D1“ sowie dem jeweiligen 5'-Primern „Neo U1“ bzw. „Tau U1“ detektiert, wobei das Wildtyp Allel ein PCR-Fragment von 1139 bp, das rekombinierte Allel ein PCR-Fragment von 636 bp lieferte.
- b) Beispiel für die Genotypisierungs-PCR, durchgeführt mit genomischer DNA aus **R1**: Wildtyp R1 ES-Zellen, **# 73**: Korrekt rekombinierter ES-Zellklon, welcher für die Blastocysteninjektion verwendet wurde,  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ ,  $\tau^{EphA5lg/wt}$ ,  $\tau^{wt/wt}$ : Schwanzbiopsie jeweils einer Wildtyp Maus sowie einer heterozygoten und einer homozygoten Mutante; **LS**: Längenstandard „1 kb DNA ladder“ (Gibco).

#### 4.4.3.4 Erzeugung einer congenischen Mauslinie mittels Rückkreuzung

Der genetische Hintergrund hat häufig einen profunden Einfluß auf den Phänotyp einer Mauslinie (Sanford *et al.* 2001, Doetschman 1999). Da in einer Mauslinie mit „gemischtem“ genetischen Hintergrund der Beitrag der einzelnen Inzuchtstämme in den individuellen Einzeltieren starken Schwankungen unterliegt, kann ein solcher Hintergrund eine beträchtliche phänotypische Variabilität auslösen. Um diese Variabilität zu minimieren, kann aus einer Mauslinie mit gemischtem genetischen Hintergrund mittels Rückkreuzung eine sog. congenische Mauslinie erzeugt werden, in welcher alle Allele mit Ausnahme des mutierten Locus einem Inzuchtstamm angehören und die Einzeltiere der Linie genetisch identisch sind. Der Anteil der Allele am gesamten Genom, der nach N Generationen Rückkreuzung statistisch dem betreffenden Inzuchtstamm entspricht, berechnet sich nach  $1-(1/2)^{N-1}$ , und konventionsgemäß wird eine Mauslinie ab der 10. Generation Rückkreuzung congenisch genannt.

Da die verwendete R1 ES-Zelllinie aus SV129 Mäusen stammte (Nagy *et al.* 1993, Threadgill *et al.* 1997) und die Chimären mit C57BL/6 Tieren verpaart wurden, hatte die Mauslinie  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  in der F1-Generation einen gemischten genetischen Hintergrund mit jeweils 50-prozentigem Anteil der beiden Inzuchtstämme SV129 und C57BL/6. Diese Mäuse wurden für insgesamt 5 Generation gegen Tiere des Inzuchtstammes C57BL/6 rückgekreuzt, womit eine über 90-prozentige Congenität erzeugt wurde.



**Abb. 22: Erzeugung einer congenischen Mauslinie mittels Rückkreuzung.**

- a) Die F1-Tiere der Mauslinie  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  mit einem gemischten genetischen Hintergrund mit jeweils 50-prozentigem Anteil der beiden Inzuchtlinien SV129 (weiße Farbe) und C57BL/6 (schwarze Farbe) wurden für insgesamt 5 Generationen gegen Tiere des Inzuchtstammes C57BL/6 zurückgekreuzt.
- b) Durch die Rückkreuzung über 5 Generationen wurde eine über 90-prozentige Congenität der Mauslinie erzielt. Nach weiteren 5 Generationen Rückkreuzung wird es sich um eine definitionsgemäß congenische Mauslinie handeln.  
Modifiziert nach: Silver (1995).

Aufgrund des Umzugs der Arbeitsgruppe mußte die Rückkreuzung nach der erneuten Etablierung der Mauslinie in Basel wiederholt werden, weshalb die Vervollständigung der Rückkreuzung bis zur 10. Generation noch erfolgen muß und die rückgekreuzten Tiere erst in zukünftigen Experimenten für die phänotypische Analyse eingesetzt werden können.

#### 4.4.4 Grundeigenschaften der $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ Mauslinie

##### 4.4.4.1 Überlebensfähigkeit und Fertilität, äußeres Erscheinungsbild

Die Mauslinie  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  zeigte keine Anzeichen für eine verringerte Überlebensfähigkeit. Nach Genotypisierung von 523 geborenen Nachkommen aus Verpaarungen von heterozygoten Tieren mit gemischtem Hintergrund zeigte die Mauslinie eine nur geringfügige Abweichung von der erwarteten Mendelschen Verteilung. Hierbei wurden jeweils nur Tiere in der Statistik berücksichtigt, welche bis zum Absetzalter von 4 Wochen überlebten.

	Gesamt	$\tau^{wt/wt}$	$\tau^{EphA5lg/wt}$	$\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$
<b>Anzahl</b>	523	115	253	155
<b>Entspricht %</b>	100	22	48	30
<b>Erwartet (%)</b>		131 (25%)	261 (50%)	131 (25%)

**Tab. 5: Verteilung der Genotypen auf die Nachkommen aus Verpaarungen heterozygoter Tiere.**

Es wurden nur die bis mindestens bis zum Absetzalter von 4 Wochen überlebenden Tiere gezählt.

Die Abweichungen der gefundenen Genotypenverteilung von den Mendel'schen Vorhersagen waren gering. Die durchschnittliche Wurfgröße sowie die durchschnittliche Zeitspanne zwischen Ansetzen von Verpaarungen und Geburt lieferten keine Hinweise auf eine veränderte Fertilität der Mauslinie.

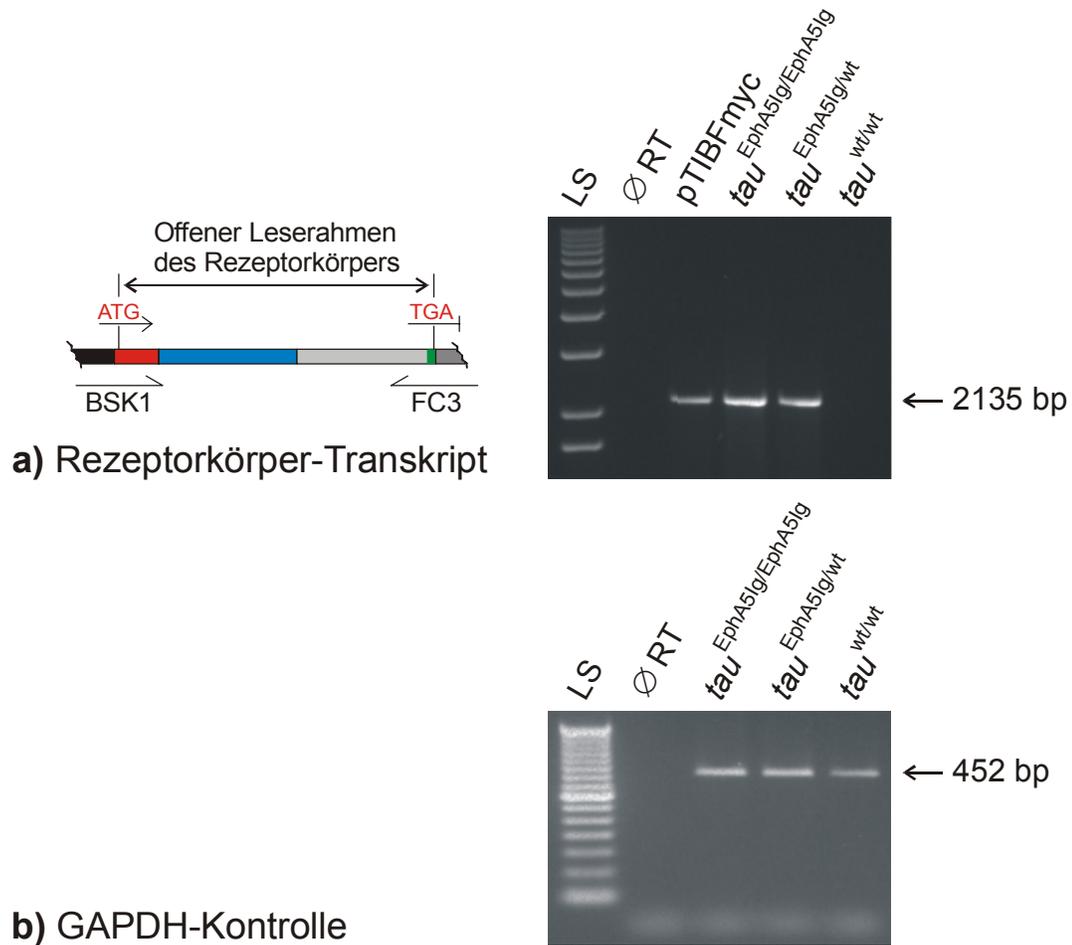
Das äußere Erscheinungsbild von  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen war weitestgehend unauffällig. Die Tiere zeigten keine offensichtlichen Anzeichen von sensorischen (Wunden infolge fehlender Schmerz Wahrnehmung, Entzündungen infolge von Infektionen, „Circling“ aufgrund von Innenohrdefekten) motorischen (Ataxie, Koordinationsprobleme, Schwäche der Tiere) oder morphologischen (Körpergröße und Proportionen, Pigmentierung, Form und Haltung von Extremitäten) Defizite. Lediglich bei den rückgekreuzten Tiere wurde eine Tendenz zu vermehrtem aggressiven Verhalten sowie ein verstärktes Zittern in perinatalen Stadien festgestellt, daß sich jedoch ab dem 10. postnatalen Tag auflöste.

##### 4.4.4.2 Analyse des Genaustausches auf RNA-Ebene

Bei der Insertion synthetischer DNA-Sequenzen in einen endogenen Genlokus kann es zu unerwünschten Effekten wie Silencing oder der Verstümmelung des mRNA-Transkriptes kommen, in deren Folge entweder die Transkription aufgrund von Modifikationen der DNA blockiert oder die Translation eines funktionellen Proteins infolge von Spleißereignissen verhindert sein können. Um derartige Effekte auszuschließen, sollte das intakte Transkript des Rezeptorkörpers in neuronalem Gewebe der Mutante mittels RT-PCR und Northern-Transfer nachgewiesen werden.

Für die Analyse des Rezeptorkörper-Transkriptes mittels RT-PCR wurde aus Hirngewebe von 11 Tage alten Mäusen aller 3 Genotypen gesamt-RNA isoliert und unter Verwendung

von oligo-dT Primern in cDNAs revers transkribiert. Diese cDNAs sowie das Rekombinationskonstrukt wurden als Matrize für PCR-Reaktionen mit den Primern „BSK 1“ sowie „FC 3“ eingesetzt, welche das Start- und das Stopcodon des Rezeptorkörpers umschließen.



**Abb. 23: Detektion des Rezeptorkörper-Transkriptes in Hirngewebe 11 Tage alter  $\tau^{EphA5lg/wt}$  Mäuse mittels RT-PCR.**

a) PCR mit den Primern „BSK 1“ und „FC 3“ sowie mit den cDNAs 11 Tage alter Mäuse aller 3 Genotypen und dem Rekombinationskonstrukt als Matrize. Die verwendeten Primer umschließen das Start- und das Stopcodon des Rezeptorkörper-Transkriptes und amplifizieren ein DNA-Fragment von 2135 bp.

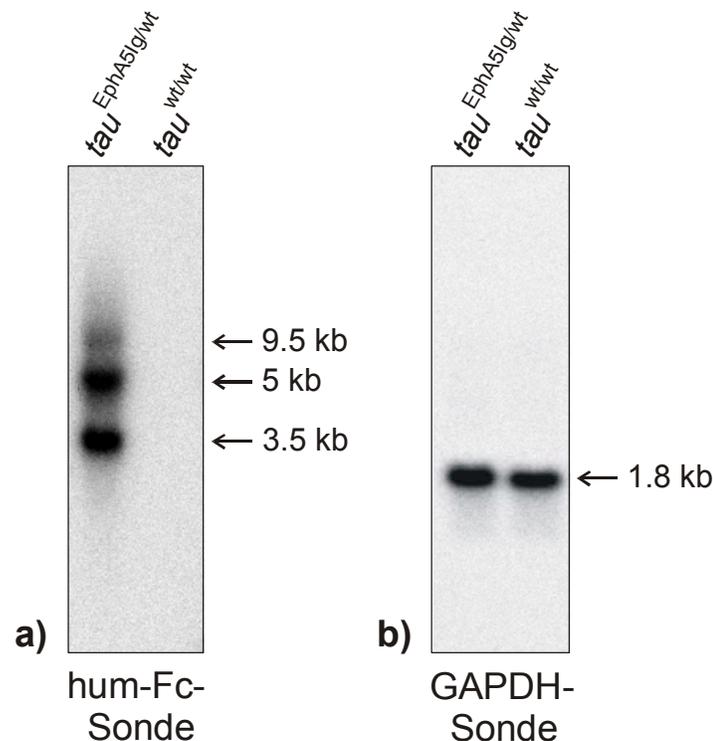
**LS:** Längenstandard „1 kb DNA ladder“ (Gibco); **Ø RT:** PCR-Reaktion mit RNA anstelle von cDNA als Matrize; **pTIBFmyc:** PCR-Reaktion mit dem Rekombinationskonstrukt;  **$\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$** ,  **$\tau^{EphA5lg/wt}$** ,  **$\tau^{wt/wt}$** : PCR-Reaktionen mit cDNAs aus Hirngewebe jeweils einer Wildtyp Maus sowie und einer heterozygoten und einer homozygoten Mutante.

b) PCR mit den Primern „GAP 1“ und „GAP 2“ sowie mit den in a) verwendeten cDNAs als Matrize. Die Primer amplifizierten ein DNA-Fragment von 452 bp aus dem Transkript des Glykolyseenzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Die Reaktionen belegen, daß die verwendeten cDNAs eine äquivalente Qualität besitzen.

**LS:** Längenstandard „50 bp DNA ladder“ (Gibco); **Ø RT:** PCR-Reaktion mit RNA anstelle von cDNA als Matrize;  **$\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$** ,  **$\tau^{EphA5lg/wt}$** ,  **$\tau^{wt/wt}$** : PCR-Reaktionen mit cDNAs aus Hirngewebe jeweils einer Wildtyp Maus sowie und einer heterozygoten und einer homozygoten Mutante.

Durch den Vergleich der PCR-Produkte konnte ausgeschlossen werden, daß es zu einer Deletion interner Segmente des Rezeptorkörper-Transkriptes kam, in deren Folge verkürzte PCR-Fragmente aus den cDNAs amplifiziert worden wären.

Mit Hilfe von Northern-Transfer wurde die Länge der Rezeptorkörper-Transkripte analysiert. Hierbei wurde poly-A<sup>+</sup> RNA aus Hirngewebe jeweils eines 9 Tage alten heterozygoten und eines Wildtyp Tieres eingesetzt. Die Membran wurde mit einer Sonde hybridisiert, welche den Fc-Bereich des Rezeptorkörper-Transkriptes detektiert.

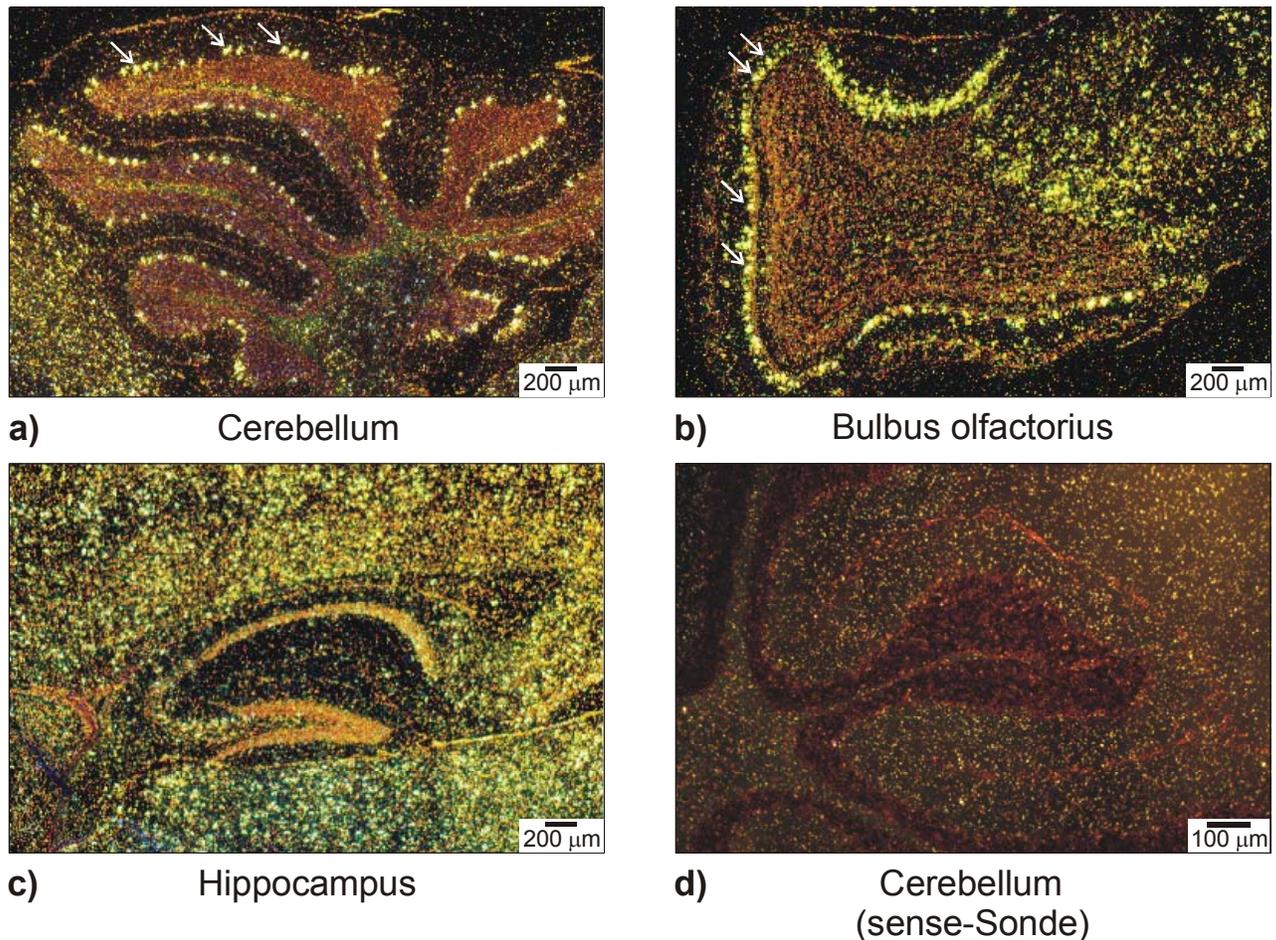


**Abb. 24: Analyse der Rezeptorkörper-Transkripte mittels Northern-Transfer.**

- a) Die Inkubation der Membran mit einer gegen den Fc-Bereich des Rezeptorkörper-Transkriptes gerichteten Sonde ergab 2 Hauptsignale auf einer Höhe von ca. 3.5 kb und ca. 5 kb sowie eine schwache Nebenbande bei ca. 9.5 kb. Die Abwesenheit von Signalen in der Spur mit Wildtyp RNA belegte die Spezifität der Sonde. Die verwendete Sonde entspricht den 3'-terminalen 468 bp des offenen Leserahmens des Rezeptorkörpers.
- b) Inkubation derselben Membran mit einer gegen das Transkript für Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) gerichteten Sonde (Genbank Accession Nr. M32599, bp 566-1017). Für den Northern-Transfer wurde poly-A<sup>+</sup> RNA (3 µg pro Spur) aus Hirngewebe jeweils einer 9 Tage alten heterozygoten Mutante ( $\tau^{EphA5lg/wt}$ ) und eines Wildtyp ( $\tau^{wt/wt}$ ) Tieres eingesetzt. Die RNA wurde über ein Formaldehyd haltiges 0.8-prozentiges Agarosegel aufgetrennt.

Die Hybridisierung lieferte 3 Signale auf der Höhe von 3.5 kb, 5 kb und 9.5 kb. Da die Länge aller 3 detektierten Transkripte größer ist als der offene Leseramen des Rezeptorkörpers von 2175 bp, ist es sehr wahrscheinlich, daß der offene Leseramen in keinem der 3 Isoformen des Rezeptorkörper-Transkriptes verstümmelt ist.

Mittels *in-situ* Hybridisierung wurde die Lokalisierung des Rezeptorkörper-Transkriptes in Gewebeschnitten analysiert, um Anhaltspunkte für die Neuron-spezifische Expression des Rezeptorkörpers zu erhalten. In diesen Experimenten wurden parasagittale Hirnschnitte einer 23 Tage alten Chimäre angefertigt und mit einer gegen den 3'-terminalen Bereich der Rezeptorkörper-cDNA gerichteten Sonde hybridisiert. Hierbei wurde dieselbe Sonde wie für den Northern-Transfer eingesetzt.



**Abb. 25: Detektion des Rezeptorkörper-Transkriptes in parasagittalen Hirnschnitten einer 23 Tage alten Chimäre mittels *in-situ* Hybridisierung.**

Unter Dunkelfeldbeleuchtung angefertigte Aufnahmen von Ausschnitten aus

- a) Dem Cerebellum
- b) Dem Hippocampus
- c) Dem Bulbus olfactorius.

Pfeile in a) und c) zeigen auf Purkinjezellen bzw. Mitralzellen, die aufgrund ihrer exponierten Lokalisierung im Gewebe und ihres besonderen Zelldurchmessers identifiziert wurden. In a) – c) sind nicht alle Neuronen markiert, da nur ein Teil der Zellen des chimären Hirngewebes aus ES-Zellen entstanden war und das rekombinierte Allel trug.

- d) Kontrollexperiment: Ausschnitt vom Cerebellum eines benachbarten Gewebeschnittes, welcher mit der in sense-Orientierung transkribierten Sonde hybridisiert wurde.

Die *in-situ* Hybridisierung erfolgte gemäß 6.2.4.7 mit einer gegen den Fc-Bereich des Rezeptorkörper-Transkriptes gerichteten RNA-Sonde.

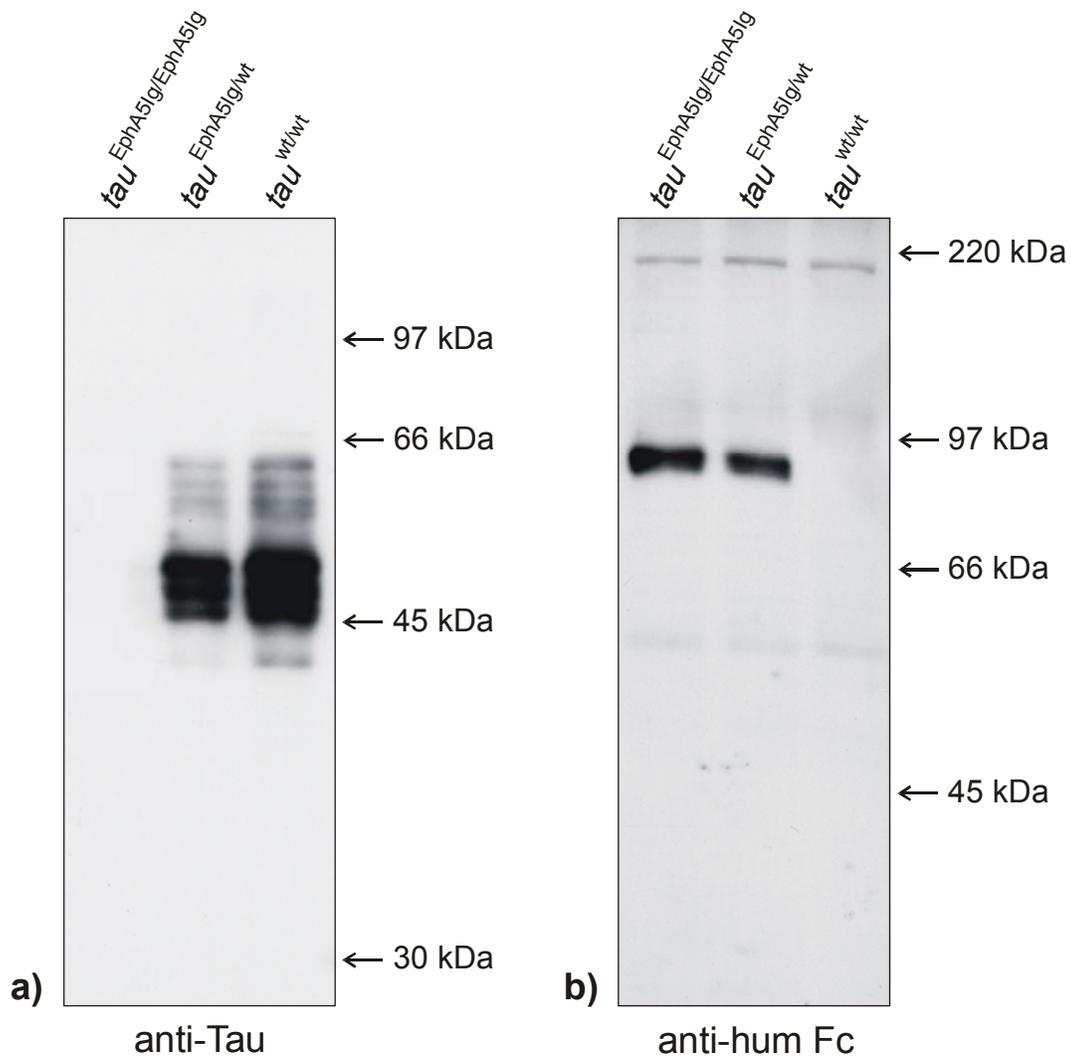
Die *in-situ* Hybridisierung von Gehirnschnitten einer Chimäre mit einer gegen den Fc-Bereich des Rezeptorkörper-Transkriptes gerichteten Sonde lieferte distinkte Signale, die in einzelnen Strukturen wie dem Cerebellum und dem Bulbus olfactorius eindeutig Neuronen zugeordnet werden konnten. So waren aufgrund ihrer prominenten Lokalisation im Gewebe die sehr intensiven Signale im Cerebellum (Abb. 25 a), Pfeile) Purkinjezellen, die im Bulbus olfactorius gefundenen Signale (Abb. 25 c), Pfeile) Mitralzellen zuzuordnen. In den Gewebeschnitten gaben nicht alle Neuronen ein Signal, da nur ein Teil der Zellen der Chimäre aus ES-Zellen hervorgegangen war und ausschließlich diese Zellen das rekombinierte Allel trugen.

Diese Experimente belegten mit drei unterschiedlichen Methoden, daß die Rezeptorkörper-cDNA unter *in-vivo* Bedingungen in neuronalem Gewebe transkribiert wurde und es sehr wahrscheinlich nicht zu einer Verstümmelung des offenen Leserahmens kam. Die *in-situ* Hybridisierung lieferte darüber hinaus Anhaltspunkte für die Neuron-Spezifität der Transkription.

#### 4.4.4.3 Analyse des Genaustausches auf Protein-Ebene

Der Genaustausch in der  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mauslinie wurde auch auf der Ebene des Proteins untersucht, um den Beleg für die vollständige Deletion von Tau in homozygoten Mutanten zu erbringen. Einer vollständigen Deletion des Tau-Proteins wurde besondere Bedeutung beigemessen, da eine fortdauernde Expression von nur einzelnen Isoformen oder isolierten Domänen des Tau-Proteins in der Mutante potentiell einen unerwünschten neuronalen Phänotyp auslösen könnte (Lee *et al.* 2001, Hong *et al.* 1998). Weiterhin sollte der Rezeptorkörper in verschiedenen neuronalen Geweben qualitativ nachgewiesen und quantifiziert werden.

Zunächst wurde der Genaustausch mit Hilfe von Western-Transfer anhand von Hirnllysaten unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers Tau-1 (Binder *et al.* 1985) untersucht. Dieser Antikörper erkennt alle 3 murinen Isoformen von Tau unabhängig vom Grad ihrer Phosphorylierung. Der Rezeptorkörper wurde mit einem polyklonalen, gegen den Fc-Tag gerichteten Antikörper detektiert.



**Abb. 26: Untersuchung des Genaustausches mittels Western-Transfer von Hirnlysaten.**

Detektion von a) Tau und b) des Rezeptorkörpers.

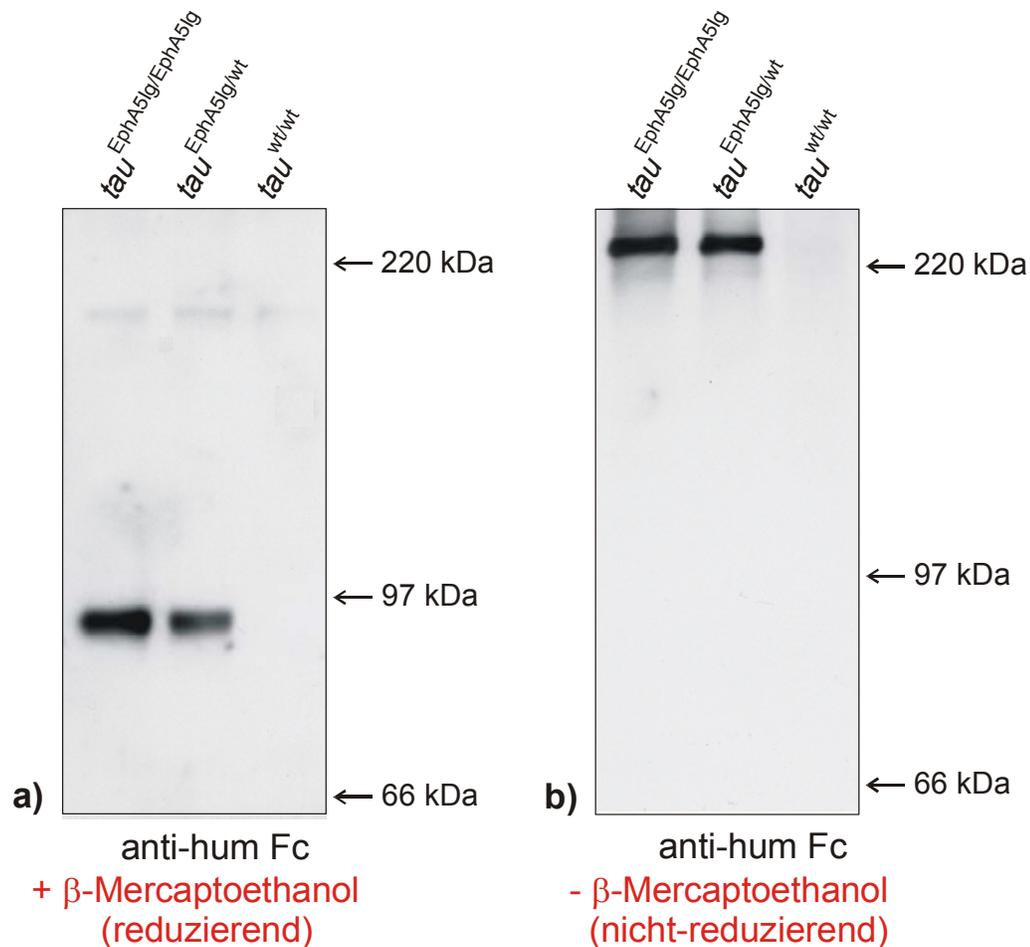
a) Das Hirnlysate homozygoter Mutanten ( $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ ) zeigte keinerlei Tau-Immunreaktivität, während sich in den Lysaten von heterozygoten ( $\tau^{EphA5lg/wt}$ ) oder von Wildtyp Mäusen ( $\tau^{wt/wt}$ ) das erwartete Bandenmuster fand.

b) Der Rezeptorkörper war in den Hirnlysaten homozygoter ( $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ ) und heterozygoter ( $\tau^{EphA5lg/wt}$ ) Mäuse detektierbar. Die Abwesenheit eines Signals in Hirnlysate von Wildtyp ( $\tau^{wt/wt}$ ) Mäusen belegte die Spezifität des Antikörpers.

Für den Transfer wurde jeweils Lysate mit einem Gesamtproteingehalt von 10  $\mu$ g pro Spur von 24 Tage alten Mäusen aller 3 Genotypen mittels SDS-PAGE auf einem Gel mit 12% (a) bzw. 10% (b) Polyacrylamid unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Membranen wurden mit Tau-1 (a), 1:2000, Boehringer Mannheim) bzw. einem Kaninchen-anti human Fc Antikörper (b), 1:10.000, Jackson) sowie anschließend mit einem geeigneten, HRP-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert.

Der Western-Transfer belegte, daß Tau in der  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mauslinie vollständig deletiert ist. Der Rezeptorkörper wurde in den Hirnlysaten von homozygoten und heterozygoten Mäusen bei dem erwarteten Molekulargewicht von 90 kDa detektiert und zeigte keinerlei Anzeichen von Degradation.

Da eine Dimerisierung von Rezeptorkörpern die Affinität zu den jeweiligen Liganden wesentlich erhöht, sollte das Verhältnis von dimerer zu monomerer Form des Rezeptorkörpers in der Mutante analysiert werden. Für diesen Teil der Analyse wurde die Tatsache ausgenutzt, daß die Dimerisierung von Rezeptorkörpern mit einem Fc-Tag über Disulfidbrücken erfolgt. Hirnlysate aller 3 Genotypen wurden unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und für Western-Transfers eingesetzt, in welchen der Rezeptorkörper anhand des Fc-Tags detektiert wurde.



**Abb. 27: Analyse des Verhältnis von dimerer zu monomerer Form des Rezeptorkörpers in Hirnlysaten.**

Western-Transfers von Hirnlysaten 24 Tage alter Mäuse aller 3 Genotypen

a) Unter reduzierenden und

b) Unter nicht-reduzierenden Bedingungen.

Während der Western-Transfer für Hirnlysate homozygoter ( $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ ) und heterozygoter ( $\tau^{EphA5lg/wt}$ ) Mäuse unter reduzierenden Bedingungen ausschließlich ein Signal bei 90 kDa ergab, wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen ein Signal bei ca. 240 kDa detektiert.

Für den Transfer wurde jeweils Lysate mit einem Gesamtproteingehalt von 10  $\mu$ g pro Spur von 24 Tage alten Mäusen aller drei Genotypen mittels SDS-PAGE auf einem Gel mit 10% Polyacrylamid unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Membran wurde mit einem Kaninchen anti-human Fc Antikörper (1:10.000, Jackson) sowie anschließend mit einem geeigneten, HRP-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert.

Unter reduzierenden Bedingungen wurde in den Hirnlysaten heterozygoter und homozygoter Mäuse ein Signal auf der Höhe von 90 kDa gefunden, was dem Molekulargewicht der monomeren Form des Rezeptorkörpers entspricht. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen hingegen wurde ein einziges, distinktes Signal bei einem Molekulargewicht von ca. 240 kDa gefunden. Dieser Befund belegte, daß der Rezeptorkörper in Hirngewebe der Mausmutante quantitativ als Dimer vorliegt, und daß die Dimerisierung über Disulfidbrücken vermittelt wird.

Die geringfügige Abweichung des unter nicht-reduzierenden Bedingungen gefundenen Molekulargewichtes von ca. 240 kDa von dem für Dimere des Rezeptorkörpers erwarteten Molekulargewicht von 180 kDa ist mit den Eigenschaften der SDS-PAGE erklärbar, in welcher das logarithmische Verhältnis der Lauflänge zum Molekulargewicht von Proteinen nur unter reduzierenden Bedingungen gewährleistet ist.

Mit Hilfe von immunhisto- und immunocytochemischen Färbungen sollte die Expression des Rezeptorkörpers im Gewebe demonstriert sowie die subzelluläre Lokalisation des Rezeptorkörpers analysiert werden. In diesen Experimenten stand insbesondere die Frage im Vordergrund, ob der Rezeptorkörper ausschließlich im Soma, oder auch in axonalen oder dendritischen Fortsätzen der Neuronen detektiert werden könnte. Diese Frage war von großer Bedeutung, um mögliche Phänotypen in der Innervierung peripherer Strukturen wie z.B. der Extremitäten oder der Körperwandung sinnvoll zu interpretieren. Hierzu wurden sowohl Gewebeschnitte von Hirn und Rückenmark, als auch dissoziierte hippocampale Neuronen mit Antikörpern gefärbt, welche gegen den Fc-Tag des Rezeptorkörpers gerichtet waren. Abb. 28 zeigt eine Auswahl der analysierten Gewebe und Zellen.

**Abb. 28: (folgende Seiten) Detektion des Rezeptorkörpers in Gewebeschnitten (a)-i) sowie dissoziierten, kultivierten Neuronen (j), k) mit einem gegen den Fc-Tag des Rezeptorkörpers gerichteten Antikörper.**

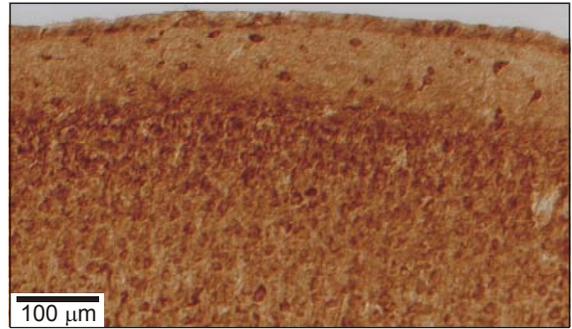
Es wurden die folgenden Gewebe und Zellen aus Wildtyp Mäusen ( $tau^{wt/wt}$ ) und homozygoten Mutanten ( $tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ ) gefärbt:

- a), b) In parasagittaler Orientierung geschnittenes Cerebellum 8 Tage alter Mäuse.
- c), d) In parasagittaler Orientierung geschnittener Cortex 21 Tage alter Mäuse.
- e), f) Purkinjezellen in parasagittalen Gewebeschnitten aus dem Cerebellum 8 Tage alter Mäuse in hoher Vergrößerung. In e) sind Zellkörper von Purkinjezellen mit Pfeilspitzen, die dendritischen Fortsätze dieser Zellen mit Pfeilen markiert.
- g)-i) Dissoziierte hippocampale Neuronen aus Embryonen des Entwicklungsstadiums E17.5, gefärbt nach 4 d in Kultur. Pfeile in g) und h) markieren Neuriten, in welchen der Rezeptorkörper detektiert werden konnte.
- j), k) Transversalschnitte vom Rückenmark neugeborener Mäuse, angefertigt aus dem lumbosakralen Bereich.
- l), m) Transversalschnitte von Spinalganglien neugeborener Mäuse.

Die immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten erfolgte gemäß 6.2.4.1-6.2.4.2. Die Kultivierung und Färbung hippocampaler Neuronen erfolgte gemäß 6.2.2.1 bzw. 6.2.4.3. In allen Färbungen wurde ein Kaninchen anti-human IgG1 Antikörper (1:2500, Jackson) sowie das ABC Elite Kit (Herstellerangaben, Vector) verwendet, und die Färbungen wurden mit dem Färbesubstrat DAB entwickelt.



a) *tau*<sup>EphA5Ig/EphA5Ig</sup>



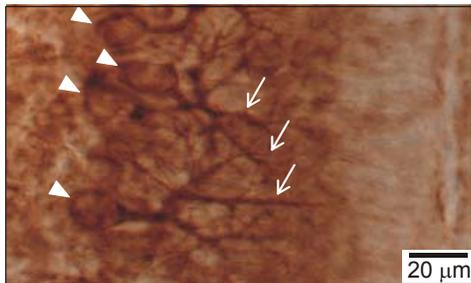
c) *tau*<sup>EphA5Ig/EphA5Ig</sup>



b) *tau*<sup>wt/wt</sup>  
**Cerebellum**



d) *tau*<sup>wt/wt</sup>  
**Cortex**



e) *tau*<sup>EphA5Ig/EphA5Ig</sup>



g)



f) *tau*<sup>wt/wt</sup>  
**Cerebellum  
Purkinjezellen**



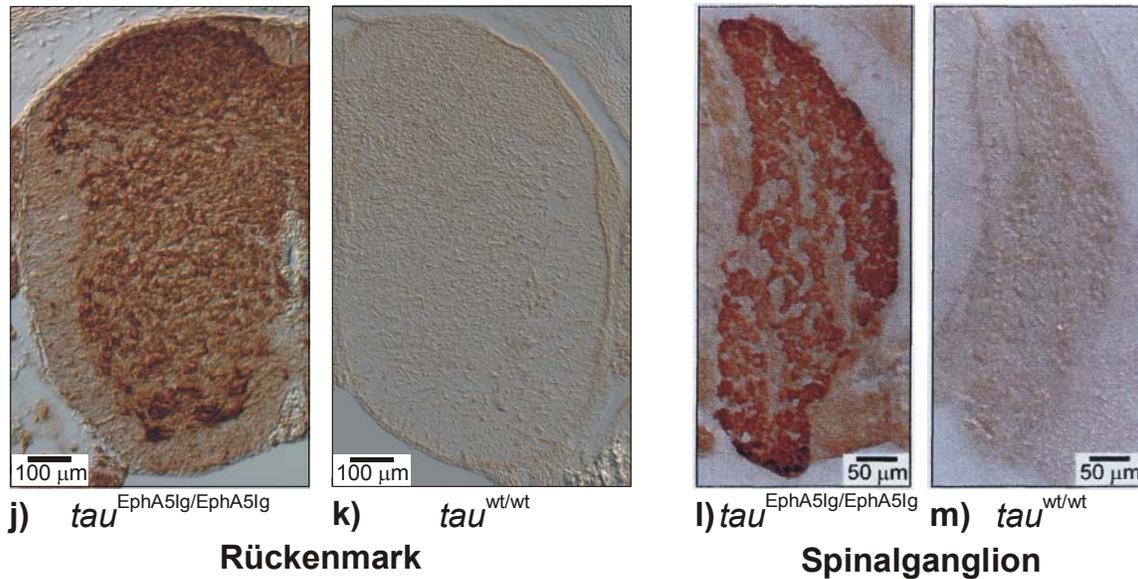
h)

*tau*<sup>EphA5Ig/EphA5Ig</sup>



i)

*tau*<sup>wt/wt</sup>  
**Dissoziierte  
hippokampale Neuronen**

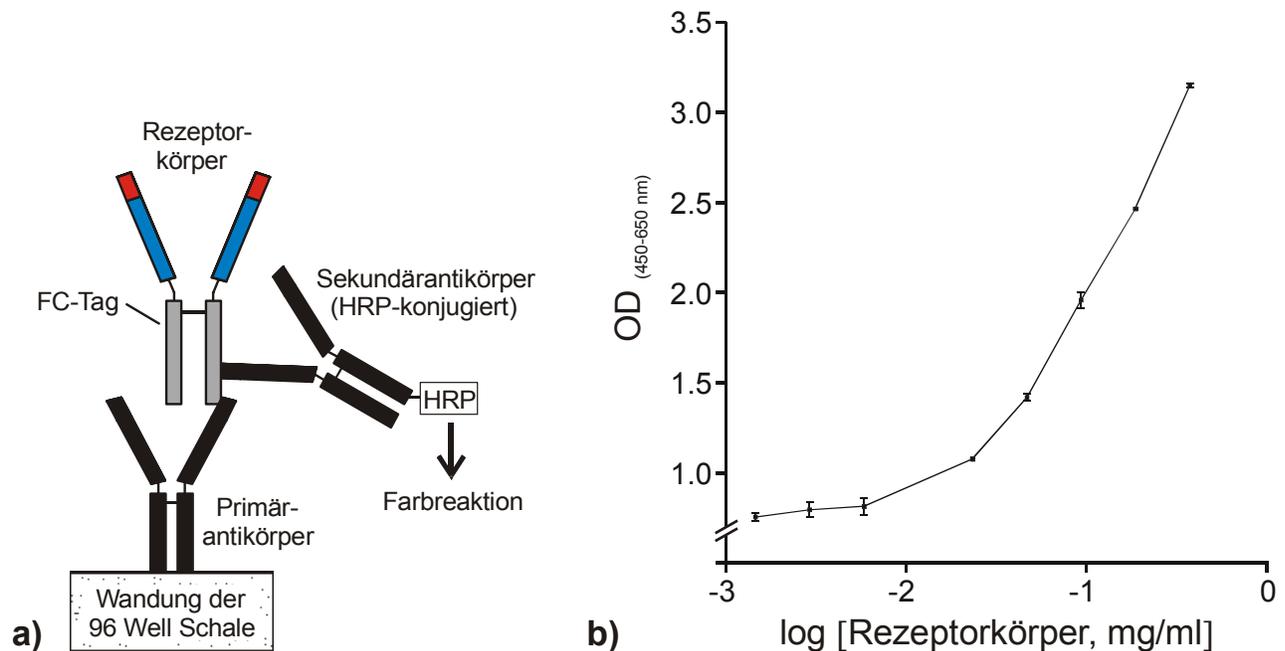


Das intensive Signal in allen Färbungen von Geweben und Zellen homozygoter Tiere belegte die robuste Expression des Rezeptorkörpers in der  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mauslinie. In den Färbungen von Purkinjezellen (Abb. 28 e), Pfeile) sowie von dissoziierten hippocampalen Neuronen (Abb. 28 g) und h), Pfeilspitzen) konnten eindeutig dendritische Fortsätze bzw. Neuriten angefärbt werden.

Die wichtigste Schlußfolgerung aus diesen Experimenten war, daß die subzelluläre Lokalisation des Rezeptorkörpers nicht auf das Soma von Neuronen beschränkt ist, sondern daß sich der Rezeptorkörper vielmehr auch in Nervenfortsätzen befindet.

#### 4.4.4.4 Quantifizierung der Gewebekonzentration des Rezeptorkörpers

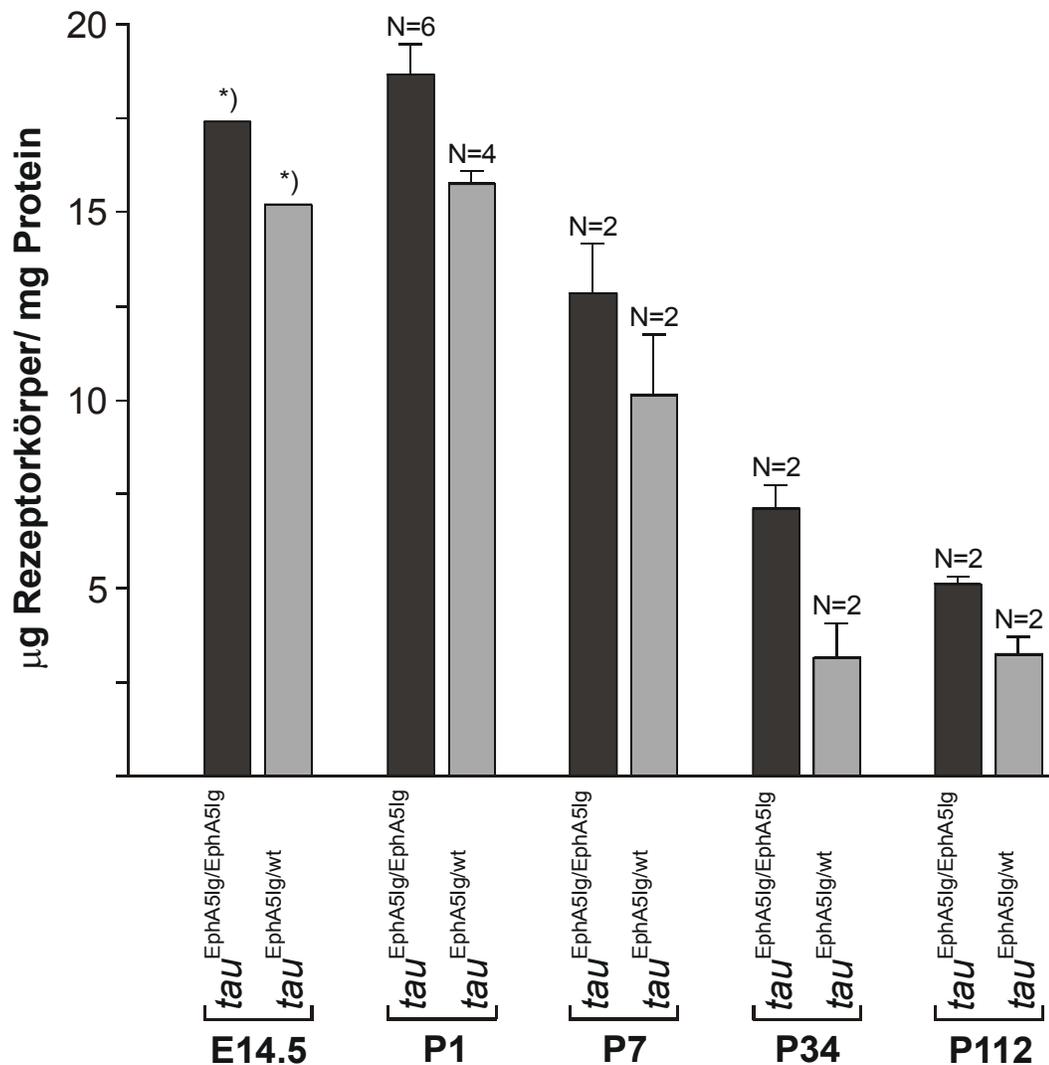
Als Grundlage für die Interpretation von biologischen Effekten sollte die Gewebekonzentration des Rezeptorkörpers in der Mauslinie quantifiziert werden. Hierfür wurde ein Enzymgekoppelter Immunassay (ELISA, engl.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) etabliert, bei welchem der in 293-Zellen überexprimierte und aus konditioniertem Medium isolierte Rezeptorkörper als Standard diente. Da für den ELISA 2 unterschiedliche, gegen den Fc-Tag gerichtete polyklonale Antikörper verwendet wurden, handelte es sich um einen sog. Sandwich-ELISA.



**Abb. 29: Sandwich-ELISA für die Quantifizierung von Rezeptorkörper-Konzentrationen in Geweblysaten.**

- a) Schematische Darstellung der Funktionsweise des Sandwich-ELISA für die Quantifizierung von Rezeptorkörper-Konzentrationen. Ein üblicherweise in einer 96 Well Schale immobilisierter Primärantikörper bindet den Rezeptorkörper an dem Fc-Tag. In einem zweiten Schritt bindet ein HRP-konjugierter Sekundärantikörper den Rezeptorkörper in demselben Molekülbereich. Die Quantifizierung erfolgt spektrometrisch nach enzymatischer Umsetzung eines chromogenen Substrates durch das am Sekundärantikörper konjugierte HRP.
- b) Beispiel einer Standardkurve des Sandwich-ELISA, wie er für die Quantifizierung des Rezeptorkörpers in Geweblysaten verwendet wurde.

Mit Hilfe dieses Sandwich ELISA wurden die Gewebekonzentrationen des Rezeptorkörpers in Mäusen über eine Altersspanne von E14.5 – P112 bestimmt. In diesen Messungen wurden die Gewebsextrakte mit einem auf dem Detergenz CHAPS basierenden Lysepuffer hergestellt und unverdünnt sowie in 1:5 und 1:10 Verdünnungen eingesetzt. Für die Auswertung wurden jeweils die Meßpunkte herangezogen, welche sich im linearen Bereich der Standardkurve befanden.



Alter	µg Receptorkörper/mg Protein	
	$\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$	$\tau^{EphA5lg/wt}$
E14.5	17.41*	15.76*
P1	18.67 (+/- 0.758, n=6)	15.76 (+/- 0.29, n=4)
P7	12.85 (+/- 1.27, n=2)	10.14 (+/- 1.55, n=2)
P34	7.13 (+/- 0.57, n=2)	3.16 (+/- 0.87, n=2)
P112	5.11 (+/- 0.17, n=2)	3.26 (+/- 0.41, n=2)

**Abb. 30: Gewebekonzentration des Receptorkörpers in Hirnlysaten von  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen.**

Die Konzentrationen beziehen sich auf den Gehalt an Gesamtprotein in den Lysaten. Die Fehlerbalken sowie die in Klammern gegebenen +/- Werte repräsentieren Standardabweichungen.

\*) Es wurden 6 Hirne gepoolt, lysiert und als Duplikat gemessen.

Die Gewebekonzentration des Receptorkörpers in den homozygoten Mutanten nahm von dem höchsten gefundenen Wert von 18.7 µg Receptorkörper/mg Protein bei der

Altersstufe P1 auf einen Wert von 5.1  $\mu\text{g}$  Rezeptorkörper/mg Protein in Hirnlysaten von 112 Tagen alten Tieren ab. In allen analysierten Altersstufen wurde in heterozygoten Tieren deutlich mehr als 50% der Gewebekonzentrationen gefunden, welche für die homozygoten Mutanten ermittelt wurden.

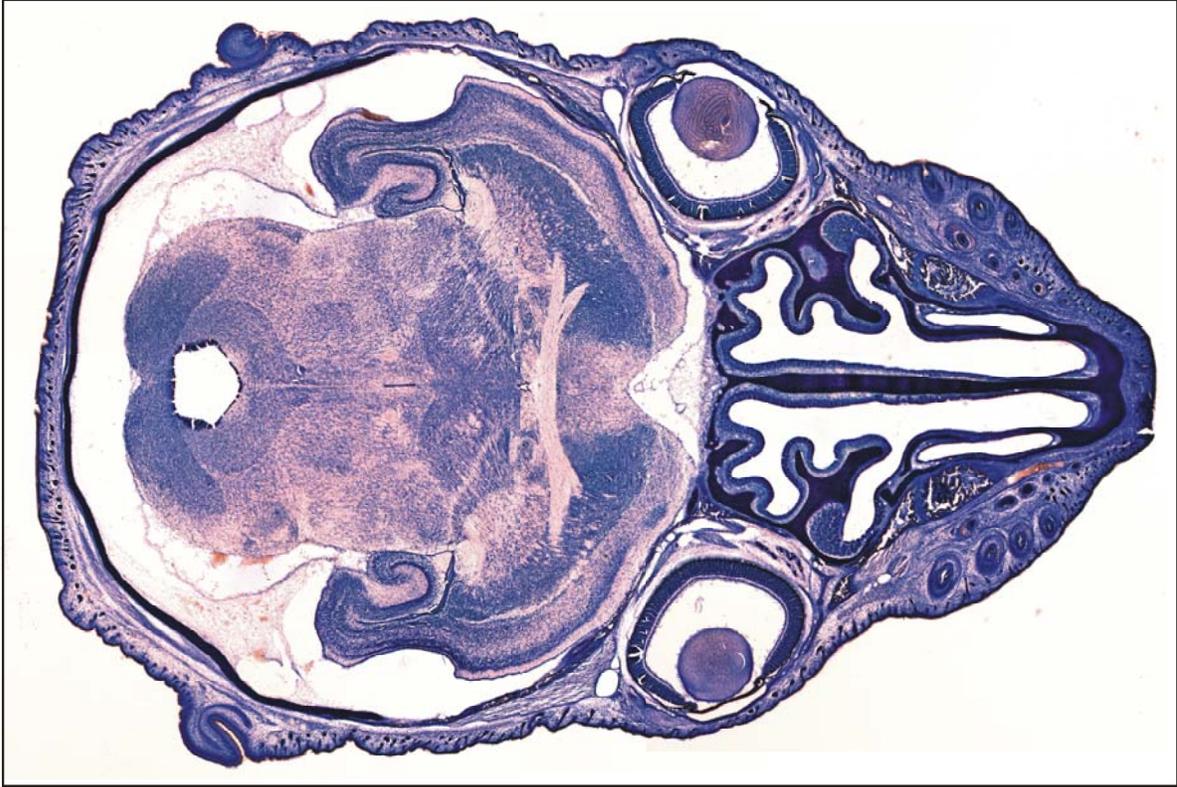
#### 4.4.4.5 Analyse der Hirnmorphologie

Die EphA-Subfamilie weist während der Embryonalentwicklung im Nervensystem eine sehr dynamische und weit verbreitete Expression auf. Die Inaktivierung einer ganzen Molekülfamilie könnte somit Fehlentwicklungen auslösen, die möglicherweise schon auf morphologischer Ebene detektiert werden könnten. Um einen ersten Überblick über solche möglichen Veränderungen im zentralen Nervensystem zu erhalten, wurden Hirnschnitte von homozygoten Mutanten und Wildtyp Mäusen verschiedener postnataler Altersstufen aus den ersten 3 Wochen nach Geburt mit Hilfe von klassischen histologischen Färbemethoden untersucht.

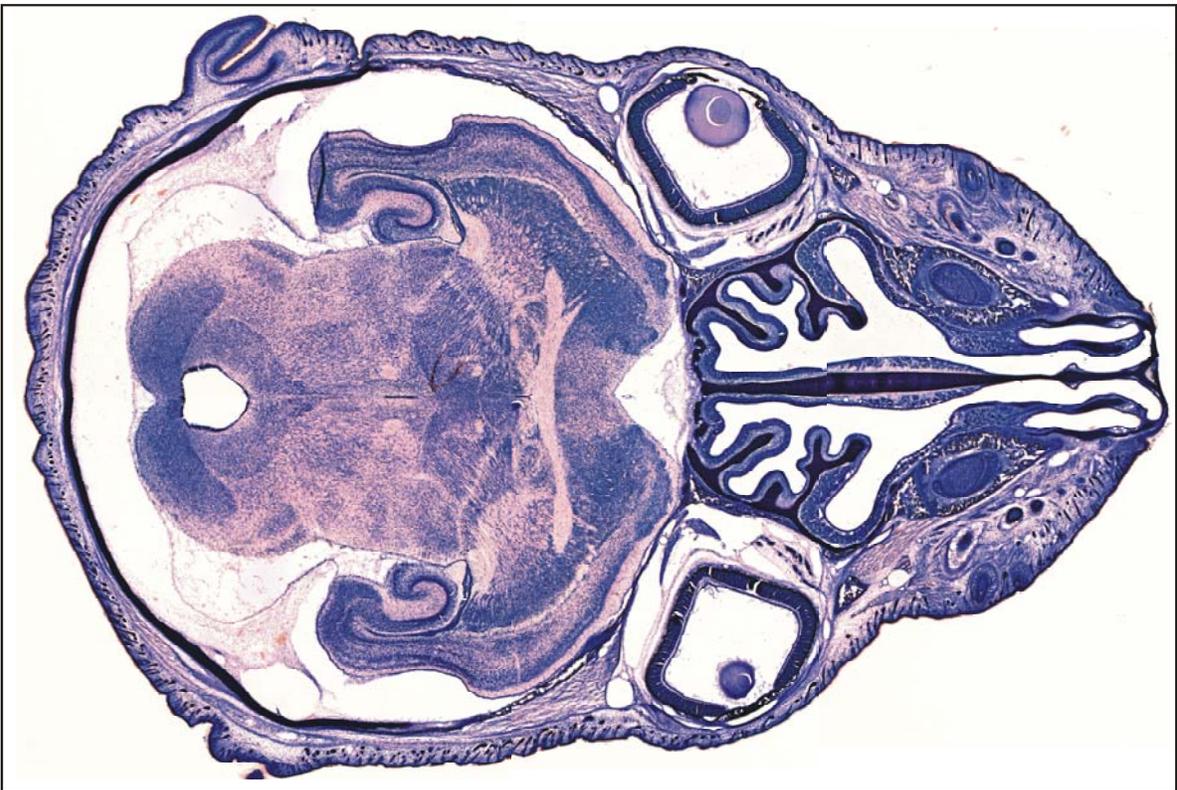
#### Abb. 31: (folgende Seite) Hirnmorphologie von $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ Mäusen.

Beispiel von Gewebeschnitten einer neugeborenen Wildtyp Maus ( $\tau^{wt/wt}$ ) sowie einer homozygoten Mutante ( $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ ), geschnitten in horizontaler Orientierung.

Die Gewebe stammen aus Geschwistern desselben Wurfes. Die Schnitte mit einer Dicke von 25  $\mu\text{m}$  wurden gemäß 6.2.4.1 angefertigt und mit einer 0.02% (w/v) Toluoidinblau Lösung in  $\text{H}_2\text{O}$  gefärbt.



*tau*<sup>wt/wt</sup>



*tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup>

Die Analyse von Hirnschnitten aus Mäusen der Altersstufen P0.5, P8, P11 und P21 mit Hilfe klassischer histologischer Färbungen ließ keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen erkennen.

#### 4.4.5 Spezifische Phänotypen der $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ Mauslinie

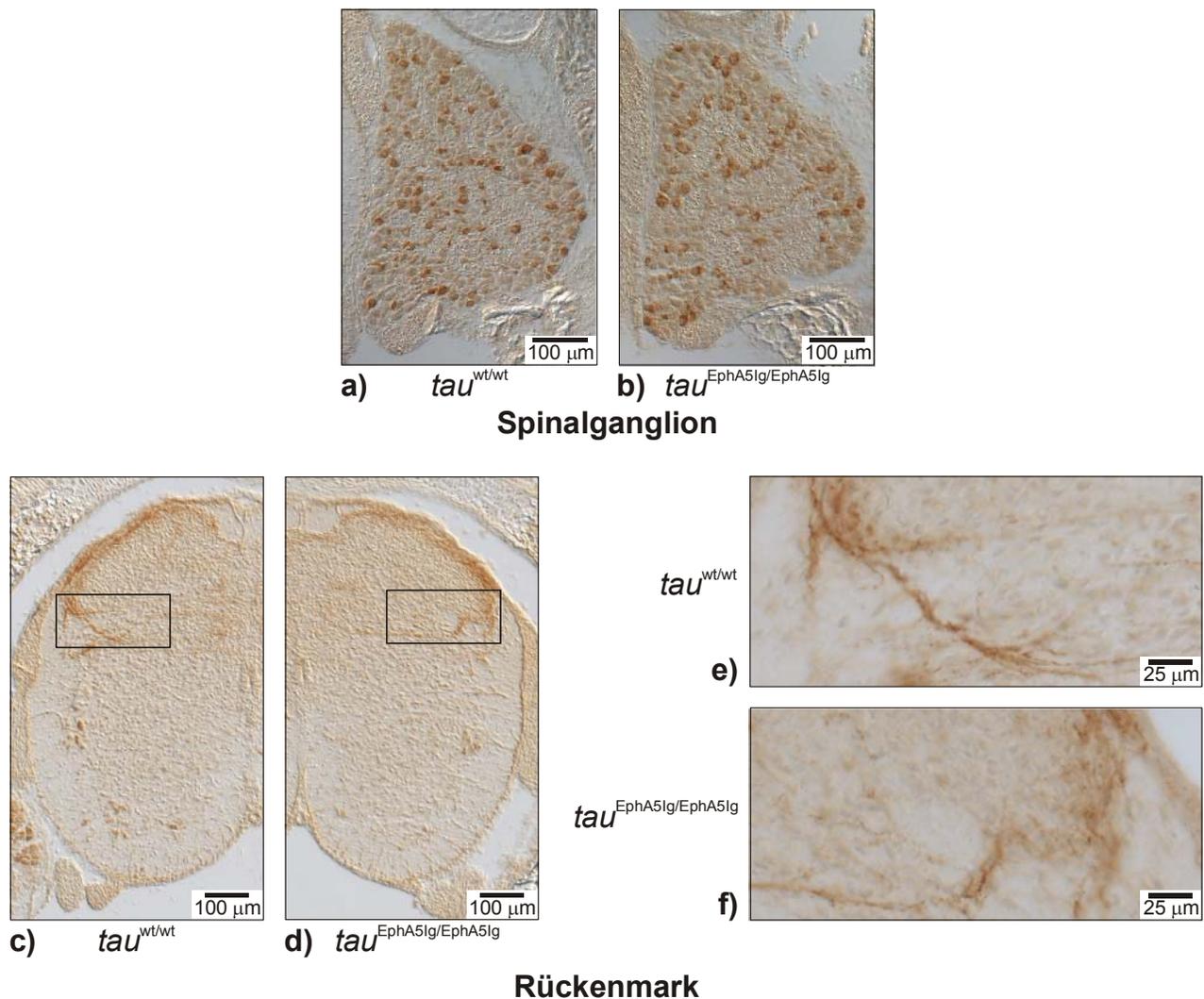
##### 4.4.5.1 Sensorische Projektionen im Rückenmark

Die beiden größten Subpopulationen sensorischer Neuronen in Spinalganglien, welche sich durch die Expression der Neurotrophinrezeptoren TrkA und TrkC auszeichnen, projizieren zu unterschiedlichen Positionen im Rückenmark (2.3.3.1.). Während TrkA-positive Axone ausschließlich in dorsalen Laminae des Rückenmarks terminieren, projizieren TrkC-positive Neuronen zu medialen und ventralen Positionen im Rückenmark. Wie unter 4.1. beschrieben, wurde eine spezifische Expression von EphA5 in TrkA-positiven Neuronen sowie von A-Ephrinen im embryonalen Rückenmark beobachtet. Aufgrund dieses Expressionsmusters wurde vermutet, daß die im Rückenmark exprimierten A-Ephrine spezifisch auf die TrkA-positiven Axone eine repulsive Wirkung ausüben und damit ein Einwachsen dieser Projektionen in ventrale Rückenmarksbereiche verhindern. Das Wachstum der TrkC-positiven Axone, die keinen EphA5-Rezeptor exprimieren, wäre von den im Rückenmark exprimierten A-Ephrinen hingegen unbeeinflusst. Gemäß dieser Arbeitshypothese wurde vermutet, daß die TrkA-positiven Projektionen nach Neutralisation der A-Ephrine im Rückenmark durch den Rezeptorkörper in  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Tieren möglicherweise nicht mehr in den dorsalen Laminae terminieren, sondern in ventrale Bereiche des Rückenmarks vordringen würden.

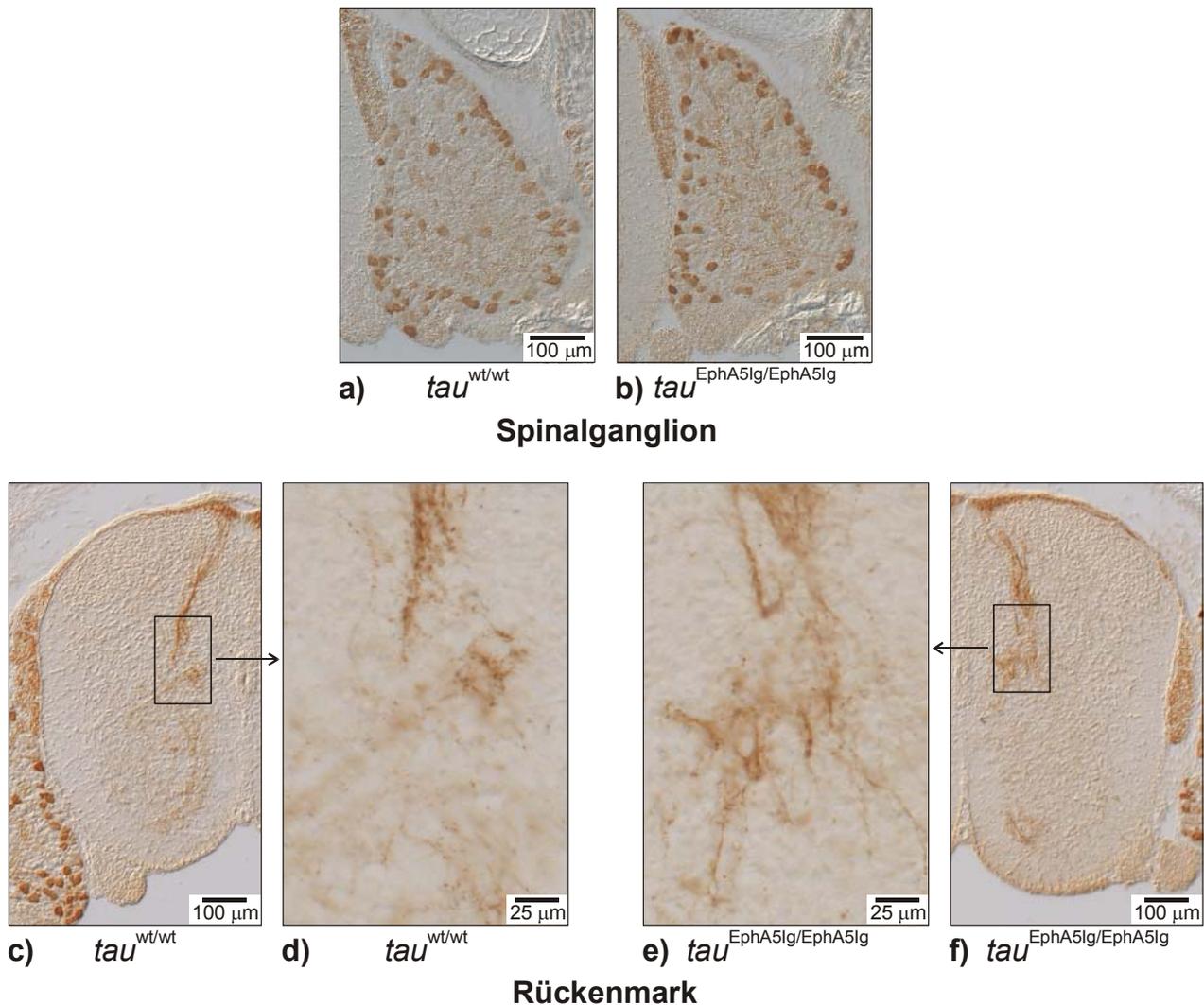
Die sensorischen Projektionen wurden mittels Immunhistochemie unter Verwendung der beiden Marker Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) und Parvalbumin für die TrkA- bzw. TrkC-positiven Neuronen untersucht, da sie die beiden Subpopulationen vollständig (CGRP, Averill *et al.* 1995, Silos-Santiago *et al.* 1995) oder zum überwiegenden Teil (Parvalbumin, Snider *et al.* 1996, Mu *et al.* 1993) erfassen. Von retrograden Markierungsexperimenten mit lipophilen Farbstoffen wurde abgesehen, da diese Methode sehr leicht zu variablen Ergebnissen führt, wodurch insbesondere eine quantitative Analyse der Projektionen erheblich limitiert würde. Weiterhin wären mit Hilfe von retrograden Markierungstechniken unterschiedslos alle zentralen Projektionen aus den Spinalganglien angefärbt worden, was die Detektion subtiler, oder nur in bestimmten neuronalen Subpopulationen auftretender Veränderungen erschwert hätte. Da sich die sensorische Innervierung verschiedener Rückenmarksbereiche entlang der rostro-caudalen Achse des Embryos stark unterscheidet, mußten immer dieselben Segmente des Rückenmarks von Wildtyp und  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen miteinander verglichen werden. Aus diesem Grunde wurden die Experimente mit dem lumbosakralen Rückenmark durchgeführt, da die Identifikation individueller Spinalganglien in diesem Bereich aufgrund ihrer besonderen Größe erleichtert war. Serienschnitte dieses Rückenmarkabschnitts mit anhängenden Spinalganglien von neugeborenen Mutanten und Wildtyp Mäusen wurden mit den erwähnten Markern CGRP und Parvalbumin gefärbt und in Hinsicht auf Unterschiede in den sensorischen Projektionen analysiert.

**Abb. 32: (folgende Seite) Färbungen von Rückenmark und Spinalganglien neugeborener Mäuse gegen CGRP, einem Marker für TrkA-positive Neuronen und ihre Projektionen.**

- a), b)** Spinalganglien aus dem lumbosakralen Rückenmarksabschnitt einer Wildtyp Maus (a),  $\tau^{wt/wt}$ ) sowie einer homozygoten Mutante (b),  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ ).
- c), d)** Transversalschnitte durch Rückenmark einer Wildtyp Maus (c),  $\tau^{wt/wt}$ ) sowie einer homozygoten Mutante (d),  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ ). Die mit einem Rahmen markierten Rückenmarksbereiche in c) und d) sind in hoher Vergrößerung in e) und f) wiedergegeben.
- e), f)** Ausschnitte der Rückenmarksfärbungen von c) und d), aufgenommen mit hoher Vergrößerung. Die CGRP-positiven Zellkörper und Projektionen konnten in Gewebe von Mutante ( $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ , b), d), f) und Wildtyp Mäusen ( $\tau^{wt/wt}$ , a), c), e) eindeutig identifiziert werden. Die exakte Auswertung der Präparate war jedoch durch eine Hintergrundfärbung beeinträchtigt, und einzelne Axone konnten nur bei hoher Vergrößerung (e), f) aufgelöst werden.
- Es wurden Mäuse des jeweiligen Genotyps aus demselben Wurf verwendet. Das Rückenmark der Mäuse wurde mit anhängenden Spinalganglien in einem Bereich caudal des Spinalganglions L1 einer Ventralaminektomie unterzogen. Von diesem Gewebe gemäß 6.2.4.1 angefertigte Gefrierschnitte mit einer Dicke von 14  $\mu\text{m}$  wurden mit einem Kaninchen anti-CGRP Antikörper (1:2500, Affiniti) sowie dem ABC Elite Kit (Vector, Herstellerangaben) gefärbt und mit dem Färbesubstrat Diaminobenzidin entwickelt.



Die Färbungen von Rückenmark und Spinalganglien mit einem anti-CGRP Antikörper ließen eine eindeutige Identifikation von CGRP-positiven Zellkörpern und Projektionen zu. Infolge einer starken Hintergrundfärbung der Präparate konnten individuelle Axone jedoch nur bei hoher Vergrößerung aufgelöst werden. Die technische Qualität der Färbung konnte durch Verwendung unterschiedlichster Fixierungsprotokolle sowie von insgesamt 4 verschiedenen Antisera gegen CGRP nicht verbessert werden. Auch die Verwendung des alternativen Markers Substanz P erbrachte kein verbessertes Färberesultat.



**Abb. 33: Färbungen von Rückenmark und Spinalganglien neugeborener Mäuse gegen Parvalbumin, einem Marker für TrkC-positive Neuronen und ihre Projektionen.**

**a), b)** Spinalganglien aus dem lumbosakralen Rückenmarksabschnitt einer Wildtyp Maus (a),  $\tau^{wt/wt}$  sowie einer homozygoten Mutante (b),  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ .

**c), f)** Transversalschnitte durch Rückenmark einer Wildtyp Maus (c),  $\tau^{wt/wt}$  sowie einer homozygoten Mutante (f),  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ . Die mit einem Rahmen markierten Rückenmarksbereiche in c) und f) sind in hoher Vergrößerung in d) und e) wiedergegeben.

**d), e)** Ausschnitte der Rückenmarksfärbungen von c) und f), aufgenommen mit hoher Vergrößerung. Parvalbumin-positive Zellkörper und Projektionen konnten in Gewebe von Mutante ( $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ , b), e), f) und Wildtyp Mäusen ( $\tau^{wt/wt}$ , a), c), d) eindeutig identifiziert werden.

Praktische Gewebeprozessierung sowie Durchführung der Immunfärbung mit einem Kaninchen anti-Parvalbumin Antikörper (Swant, 1:2500) wie für CGRP (siehe Legende zu Abb. 32).

Die Färbungen mit einem gegen Parvalbumin gerichteten Antikörper ergaben ein optimales Verhältnis von Signal zu Hintergrund, auf dem Parvalbumin-positive Zellen und Projektionen eindeutig auch bei niedriger Vergrößerung identifiziert werden konnten.

Der überwiegende Teil der CGRP-positiven Projektionen terminierte in Wildtyp wie in  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen in den dorsalen Laminae des Rückenmarks, während jeweils nur ein kleiner Teil der Axone unabhängig vom Genotyp auch in tieferen Laminae des Rückenmarkes detektiert wurde (Abb. 32 a) und d), Pfeile). Die Parvalbumin-positiven Projektionen traten, ebenfalls unabhängig vom Genotyp, dorsal im medialen Bereich in das Rückenmark ein und projizierten in die ventrale Hälfte des Rückenmarks (Abb. 33 a) und d). In Spinalganglien wurde der überwiegende Teil der Neuronen mit einem anti-CGRP Antikörper, hingegen nur ein kleiner Teil der Zellen mit einem anti-Parvalbumin Antikörper gefärbt. Bei den mit einem anti-CGRP Antikörper gefärbten Neuronen handelte es sich um Zellen mit kleinem Durchmesser, während die gegen Parvalbumin gefärbten Neuronen einen vorwiegend großen Zelldurchmesser aufwiesen (Abb. 32 und Abb. 33, jeweils e) und f). Die Färberesultate deckten sich mit publizierten Daten in Hinsicht auf Anteil und Durchmesser der mit den jeweiligen Markern gefärbten Neuronen (Übersichtsarbeit: Snider *et al.* 1996) und waren eine Bestätigung für die Spezifität der Färberesultate.

Die Hauptschwierigkeiten bei der Auswertung waren die starke Hintergrundfärbung für den Marker CGRP sowie eine starke Variabilität. Hierbei wurden in Färbungen mit jedem der beiden Marker in Wildtyp sowie  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen große Unterschiede im Färbungsmuster von Tier zu Tier beobachtet, welche wahrscheinlich auf intrinsischen biologischen Schwankungen beruhten. Bei den topographischen Projektionen neugeborener Mäuse konnten sowohl für die CGRP- als auch für die Parvalbumin-positiven Projektionen keine Unterschiede festgestellt werden.

In weiteren Experimenten ist die Verwendung rückgekreuzter Tieren geplant, in welchen der Beitrag des genetischen Hintergrundes zur phänotypischen Variabilität weitestgehend eliminiert ist. Darüber hinaus sollen die topographischen Projektionen der TrkA-positiven Neuronen während der Embryonalentwicklung zwischen E12.5-E14.5 analysiert werden, da hier etwaige Fehlprojektionen möglicherweise stärker ausgeprägt sein könnten. Da die etablierten Marker für TrkA-positive Projektionen in diesen embryonalen Entwicklungsstadien noch nicht exprimiert sind (Hall *et al.* 1997), soll für diese Experimente eine Mauslinie eingesetzt werden, in welchen das *trkA*-Gen durch ein Fusionsprotein ersetzt wurde, das sich aus LacZ und dem Mikrotubuli bindenden Teil von Tau zusammensetzt ( $trkA^{taulacZ/taulacZ}$ ). Während die Zahl der für ihr Überleben von NGF abhängigen Neuronen in Spinalganglien bei heterozygoten Tieren der  $trkA^{taulacZ/taulacZ}$  Mauslinie bei Geburt praktisch unverändert ist, fehlen in homozygoten Tieren diese Neuronen bei Geburt fast vollständig (Smeyne *et al.* 1994, Silos-Santiago *et al.* 1995). Auf diesem Hintergrund soll mit der  $trkA^{taulacZ/taulacZ}$  Mauslinie in zukünftigen Experimenten die Koexpression von EphA5 und TrkA in Spinalganglien auf quantitativer Ebene untersucht werden.

#### 4.4.5.2 Nervenverzweigungen in Extremitäten und Interkostalnerven

Um einen Überblick über mögliche Veränderungen in neuronalen Projektionen des peripheren Nervensystems (PNS) zu erhalten, wurde eine Methode für die immunhistochemische Färbung von Neuronen und axonalen Fortsätzen in ganzen Embryonen der Altersstufen E12.5 und E14.5 optimiert. Für diese Färbungen wurde ein gegen den C-terminalen Bereich des Proteins Neurofilament-M gerichtetes polyklonales Antiserum verwendet (Harris *et al.* 1991). Bei Neurofilament-M handelt es sich um ein abundantes, vorwiegend in Neuronen lokalisiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 145 kDa, das als wesentliche Komponente des Cytoskeletts den sog. Intermediärfilamenten zuzuordnen ist (Lee *et al.* 1996).



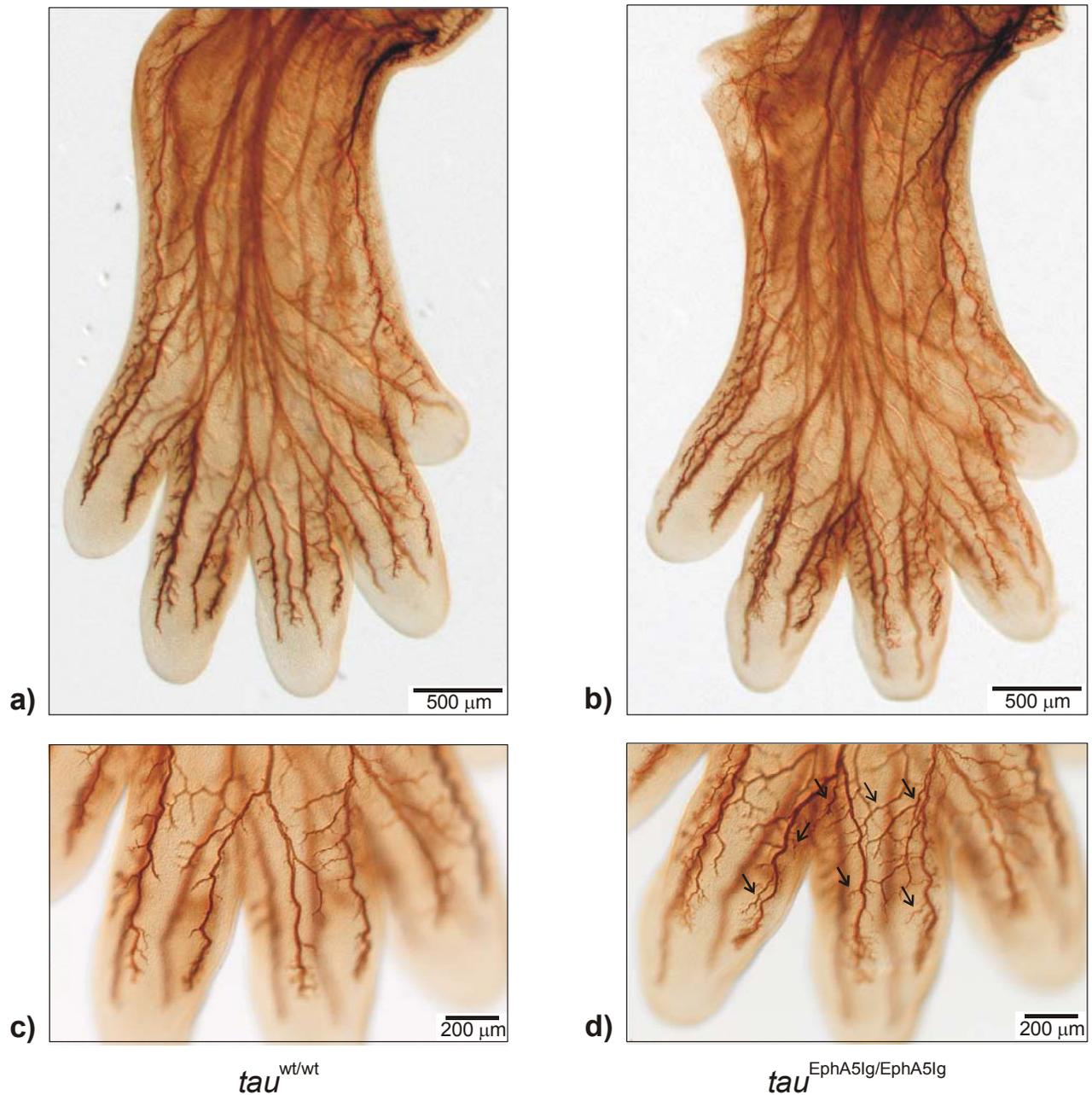
**Abb. 34: Beispiel für die Färbung eines Wildtyp Mausembryos der Altersstufe E12.5 gegen das Protein Neurofilament-M.**

Embryo nach Färbung gemäß 6.2.4.5, Dehydratisierung und Behandlung mit einer Mischung aus Benzylalkohol und Bisbenzylbenzoat, in Seitenansicht unter Durchlicht photographiert. Durch die Behandlung mit dem Lösungsmittelgemisch wurden alle nicht gefärbten Gewebebereiche transparent, wodurch zuvor verdeckte, innenliegende Strukturen sichtbar wurden.

Die erzielten Färberesultate erlaubten eine Analyse selbst feinsten Details von sowohl oberflächlichen als auch im Inneren des Embryos liegenden Strukturen. Die Methode war für eine quantitative und vergleichende Analyse besonders geeignet, da die Präparate nach Entwicklung mit dem Substrat DAB über Monate stabil waren und keinerlei Effekte

wie das Ausbleichen oder ein Nachdunkeln der Präparate auftraten, welche eine wiederholte Analyse derselben Objekte erschwert hätten.

Bei der Analyse der Embryonen wurde in einer Vielzahl von Strukturen eine Zunahme von Nervenverzweigungen beobachtet, welche in der Innervierung von Extremitäten sowie der Körperwand besonders ausgeprägt war. Da die Unterschiede zwischen Wildtyp und  $\tau^{EphA5Ig/EphA5Ig}$  Mäusen derselben Entwicklungsstufe eine hohe Variabilität aufwiesen, machte die Auswertung eine Quantifizierung erforderlich.



**Abb. 35: (vorherige Seite) Innervierung der rechten hinteren Extremität von Embryonen der Entwicklungsstufe E14.5.**

Das grundlegende Innervierungsmuster der hinteren Extremitäten von

a), c) Wildtyp ( $\tau^{wt/wt}$  Mäusen) und

b), d) knock-in ( $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ ) Embryos

zeigte keine offensichtlichen Unterschiede. Bei höherer Vergrößerung (c), d) wurde jedoch eine deutliche Zunahme von Nervenverzweigungen in  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Embryonen gefunden, welche im distalen Aspekt der Extremität besonders ausgeprägt war (d), Pfeile).

Die rechte hintere Extremität von Wildtyp sowie von  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Embryonen der Entwicklungsstufe E14.5 wurden gemäß 6.2.4.5 gegen Neurofilament-M gefärbt, dehydratisiert, mit Bisbenzylbenzoat/Benzylalkohol behandelt und unter Durchlicht fotografiert.

Eine Quantifizierung wurde zunächst in Extremitäten versucht, da es sich um eine sehr kompakte Struktur mit einem repetitiven, im Detail charakterisierten Innervierungsmuster handelt, wodurch das Auffinden und der Vergleich distinkter Nervenäste in verschiedenen Präparaten besonders zuverlässig möglich war. In diesen Experimenten wurden die Extremitäten von Embryonen der Altersstufe E14.5 gegen Neurofilament-M gefärbt, fotografiert und auf Veränderungen des Innervierungsmusters untersucht (Abb. 35).

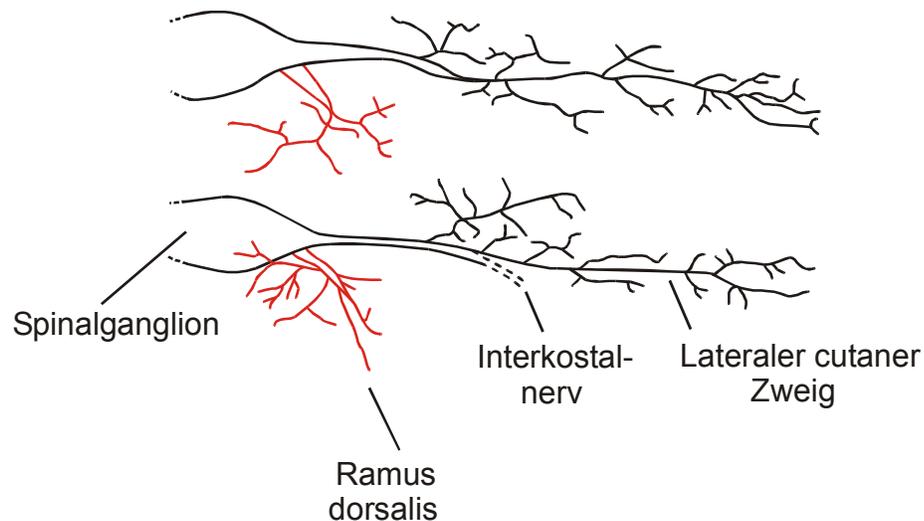
Die Färbungen der Extremitäten gegen Neurofilament-M wiesen ein sehr gutes Verhältnis von Signal zu Hintergrund auf. In allen analysierten Präparaten war das grundlegende Innervierungsmuster der Extremitäten in der Mutante erhalten, und es wurde weder das Fehlen großer Nervenäste, noch das Auftreten zusätzlicher solcher Äste beobachtet. Bei hoher Vergrößerung wurde jedoch eine Zunahme von Nervenverzweigungen in der Mutante festgestellt, welche im distalen Aspekt der Extremität besonders ausgeprägt war. Hierbei wurden in den Extremitäten beider Genotypen große Schwankungen in Größe, Zahl und Lokalisation von Nervenverzweigungen beobachtet, welche wahrscheinlich auf einer intrinsischen biologischen Variabilität beruhen. Die quantitative Auswertung der Nervenverzweigungen wurde durch den Umstand erschwert, daß es sich bei den Extremitäten um eine dreidimensionale Struktur handelt, in denen die Nervenverzweigungen zum Teil durch große Nervenäste verdeckt oder außerhalb der Fokusebene waren.

Zusammenfassend wurde aus der Analyse der Extremitäten geschlossen, daß in  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mauslinie beim Embryonalstadium E14.5 eine Zunahme an überwiegend kleinen Nervenverzweigungen vorlag, die jedoch eine starke Variabilität aufwies und auf deren Quantifizierung aus technischen Gründen verzichtet wurde.

Für eine quantitative Analyse von Nervenverzweigungen im PNS wurden aufgrund von vorwiegend methodischen Überlegungen die Interkostalnerven ausgewählt. Interkostalnerven waren für eine Quantifizierung von Nervenverzweigungen besonders geeignet, da die Metamerie des PNS eine einfache Identifikation individueller Interkostalnerven in den Embryonen erlaubt. Weiterhin waren die Projektionen dieser Nerven auch an der Körperoberfläche sichtbar und damit einer Quantifizierung besonders gut zugänglich.

Bei den Interkostalnerven handelt es sich um gemischte Nerven mit motorischem und sensorischem Anteil, welche in den einzelnen Körpersegmenten aus der ventralen Wurzel

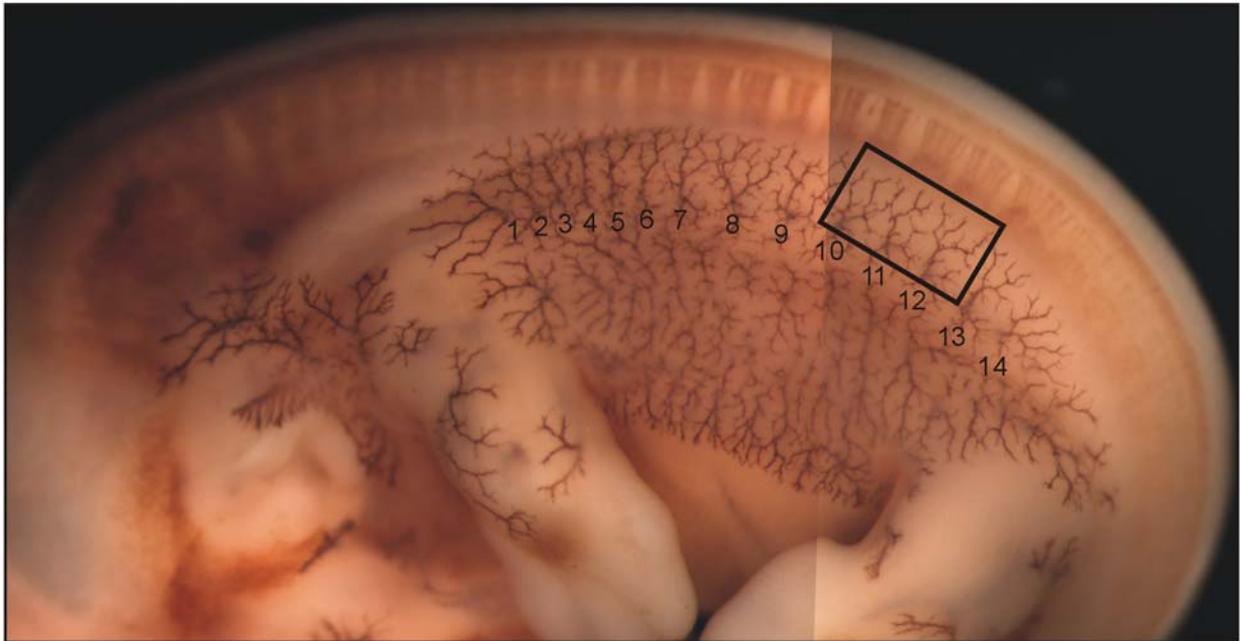
des Rückenmarks entspringen und einen Teil der Rumpfmuskulatur sowie die Körperwand versorgen. Für die Analyse wurde willkürlich ein Nebenast der Interkostalnerven, der sog. Ramus dorsalis, ausgewählt, da er aufgrund seiner kompakten Struktur und der oberflächlichen Lage seiner Projektionen für eine Quantifizierung besonders geeignet war.



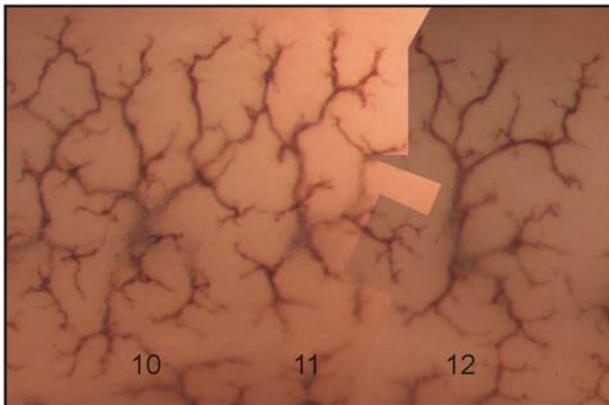
**Abb. 36: Schematischer Aufbau von Interkostalnerven.**

Die gemischten Nerven mit einem motorischen und einem sensorischen Anteil entspringen in den ventralen Wurzeln des Rückenmarks und innervieren Rumpfmuskulatur und Körperwand. Es wurde jeweils der sog. Ramus dorsalis analysiert.

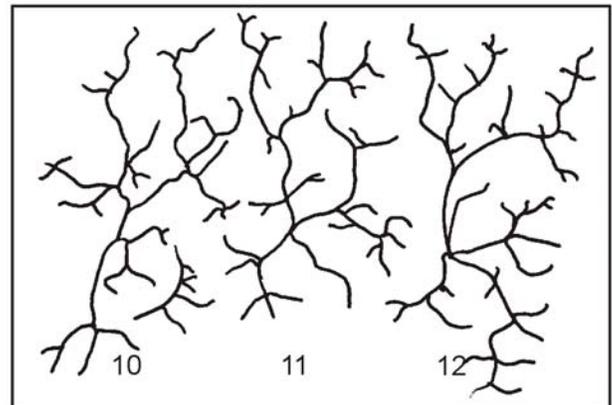
In den Experimenten wurden Embryonen der Altersstufe E12.5 gegen Neurofilament-M gefärbt und in seitlicher Orientierung unter Aufsicht in Übersicht sowie unter hoher Vergrößerung photographiert. Bei der Auswertung wurden von einzelnen Interkostalnerven die Gesamtzahl an Verzweigungspunkten sowie die Gesamtlänge der zu den Nerven gehörenden Projektionen ermittelt.



a) Rumpf eines E12.5 Mausembryos in Seitenansicht, gefärbt als Ganzkörperpräparat gegen Neurofilament-M.



b) Montage des Ramus dorsalis der Segmente 10-12.



c) „Tracing“ des Ramus dorsalis der Segmente 10-12.

**Abb. 37: Vorgehensweise für die Quantifizierung von Nervenfortsätzen im Ramus Dorsalis von Interkostalnerven.**

- a) Mausembryonen der Entwicklungsstufe E12.5 wurden als Ganzkörperpräparat gemäß dem optimierten Protokoll 6.2.4.5 gegen Neurofilament-M gefärbt und unter Aufsicht in Seitenansicht in Übersicht fotografiert.
- b) Von den Interkostalnerven der Segmente 10-12 wurden Aufnahmen mit hoher Vergrößerung angefertigt, und die Rami dorsali der Segmente wurden am Computer aus Einzelbildern montiert.
- c) Für die erleichterte Auswertung wurden die Rami dorsali aus den Segmenten 10-12 manuell abgepaust, gescannt, und anschließend manuell hinsichtlich der Gesamtzahl an Nervenverzweigungen sowie mit Hilfe des Computerprogramms Metamorph (Universal Imaging Corporation) in Hinsicht auf die Gesamtlänge der in einem Ausschnitt gefundenen Nervenfortsätze analysiert.

Insgesamt wurde der Ramus dorsalis der Interkostalnerven in den Segmenten 10-12 von 8 Mausembryonen der Altersstufe E12.5 untersucht. Zur Minimierung systematischer Fehler wurden die Auswertungen hierbei jeweils ohne Kenntnis des zu einzelnen Präparaten gehörenden Genotyps durchgeführt.

Embryo	Genotyp	Seite <sup>1</sup>	Verzweigungspunkte (Gesamtzahl)		Gesamtlänge Projektionen <sup>2</sup>		Bemerkungen
			links	rechts	Mittelwert	SEM	
#1	<i>tau</i> <sup>wt/wt</sup>	links	98		3951.4		
		rechts	86		4215.3		
#2	<i>tau</i> <sup>wt/wt</sup>	links	116		4642.2		
		rechts	129		4562.4		
#3	<i>tau</i> <sup>wt/wt</sup>	links	110		4866.1		
		rechts	133		4786.2		
#4	<i>tau</i> <sup>wt/wt</sup>	links	119		5881.0		
		rechts	156		5881.8		
#5	<i>tau</i> <sup>EphA5lg/EphA5lg</sup>	links	120		5520.7		
		rechts	169		6420.9		
#7	<i>tau</i> <sup>EphA5lg/EphA5lg</sup>	links	-		-		beschädigt <sup>3</sup>
		rechts	112		4051.6		
#8	<i>tau</i> <sup>EphA5lg/EphA5lg</sup>	links	163		5679.7		
		rechts	150		5612.2		

a)

Genotyp	Verzweigungspunkte (Gesamtzahl)			Gesamtlänge Projektionen <sup>2</sup>		
	Mittelwert	SEM	N <sup>4</sup>	Mittelwert	SEM	N <sup>4</sup>
<i>tau</i> <sup>wt/wt</sup>	118.4	7.66	8	4848.3	248.86	8
<i>tau</i> <sup>EphA5lg/EphA5lg</sup>	142.8	11.43	5	5457.0	386.15	5

b)

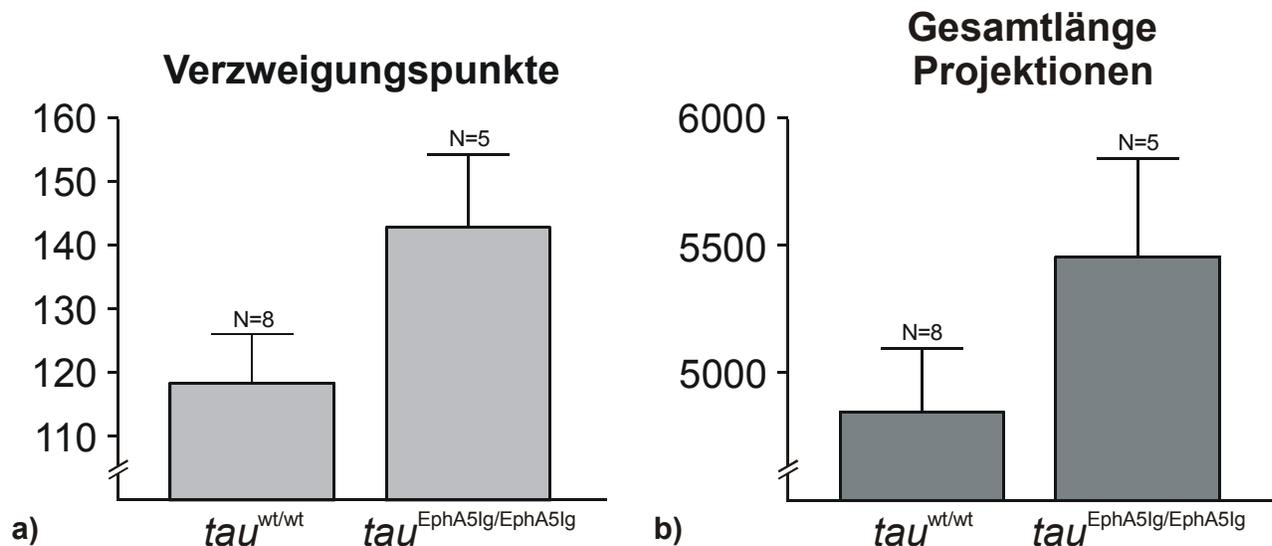
Tab. 6: Gesamtzahl an Verzweigungspunkten sowie Gesamtlänge an Nervenverzweigungen von Interkostalnerven der Segmente 10-12 in Embryonen der Altersstufe E12.5.

a) Individuelle Meßwerte für die einzelnen Embryonen, und

b) Durchschnittswerte.

**SEM:** Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert (engl.: Standard Error of the Mean). Alle analysierten Embryonen stammten aus demselben Wurf.

<sup>1</sup>: Es handelte sich um die rechte bzw. linke Körperseite der Embryos. <sup>2</sup>: Willkürliche, relative Einheit. <sup>3</sup>: Wegen einer präparationsbedingten Beschädigung der linken Körperseite des Embryo #7 wurde diese nicht in die Analyse einbezogen. <sup>4</sup>: Die linken und rechten Seiten der Embryonen wurden als unabhängige Datenpunkte gewertet.



**Abb. 38: Unterschiede im Ramus dorsalis der Interkostalnerven aus den Segmenten 10-12 von Wildtyp und knock-in Embryonen der Altersstufe E12.5.**

Vergleich von

- a) Gesamtzahl an Verzweigungspunkten sowie  
 b) Gesamtlänge der Projektionen in den betreffenden Segmenten. In den  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Embryonen wurde eine Zunahme an Verzweigungspunkten um durchschnittlich 20.6% sowie eine Zunahme in der Gesamtlänge der Projektionen in den betreffenden Segmenten um durchschnittlich 12.6% gefunden. Die Fehlerbalken repräsentieren SEM. Für die statistische Auswertung wurden die einzelnen Seiten der Embryonen als unabhängige Datenpunkte gewertet.

Beim Vergleich von Wildtyp zu  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Embryonen wurde eine signifikante Zunahme in der Zahl von Verzweigungspunkten um durchschnittlich 20.6% sowie eine signifikante Zunahme in der Gesamtlänge der in dem betreffenden Segment gefunden Projektionen um durchschnittlich 12.6% gefunden.

#### 4.4.5.3 Blutgefäße

Ausgangspunkt für die Untersuchung von Blutgefäßen waren Befunde aus der Analyse dendritischer Fortsätze von Purkinjezellen in perinatalen Entwicklungsstufen. Aufgrund der Expression mehrerer EphA-Rezeptoren in den Purkinjezellen sowie mehrerer A-Ephrine im Neuropil des Cerebellums in späten embryonalen sowie frühen postnatalen Stadien (Rogers *et al.* 1999, Matsunaga *et al.* 2000) wurde eine Bedeutung der EphA-Subfamilie für die Migration und Entwicklung von Purkinjezellen vermutet. Die Morphologie dendritischer Fortsätze von Purkinjezellen wurde hierbei mittels immunhistochemischer Färbungen an parasagittalen Schnitten vom Cerebellum 8 Tage alter Mäuse analysiert. Dieser Zeitpunkt erwies sich aus methodischen Gründen als besonders geeignet, da die Dendriten benachbarter Purkinjezellen gerade noch nicht überlappten und somit einzeln aufgelöst werden konnten. Als Marker für Purkinjezellen wurde Calbindin verwendet, bei dem es sich um ein cytoplasmatisches, Calcium bindendes Protein handelt, das im juvenilen und muren Cerebellum fast ausschließlich

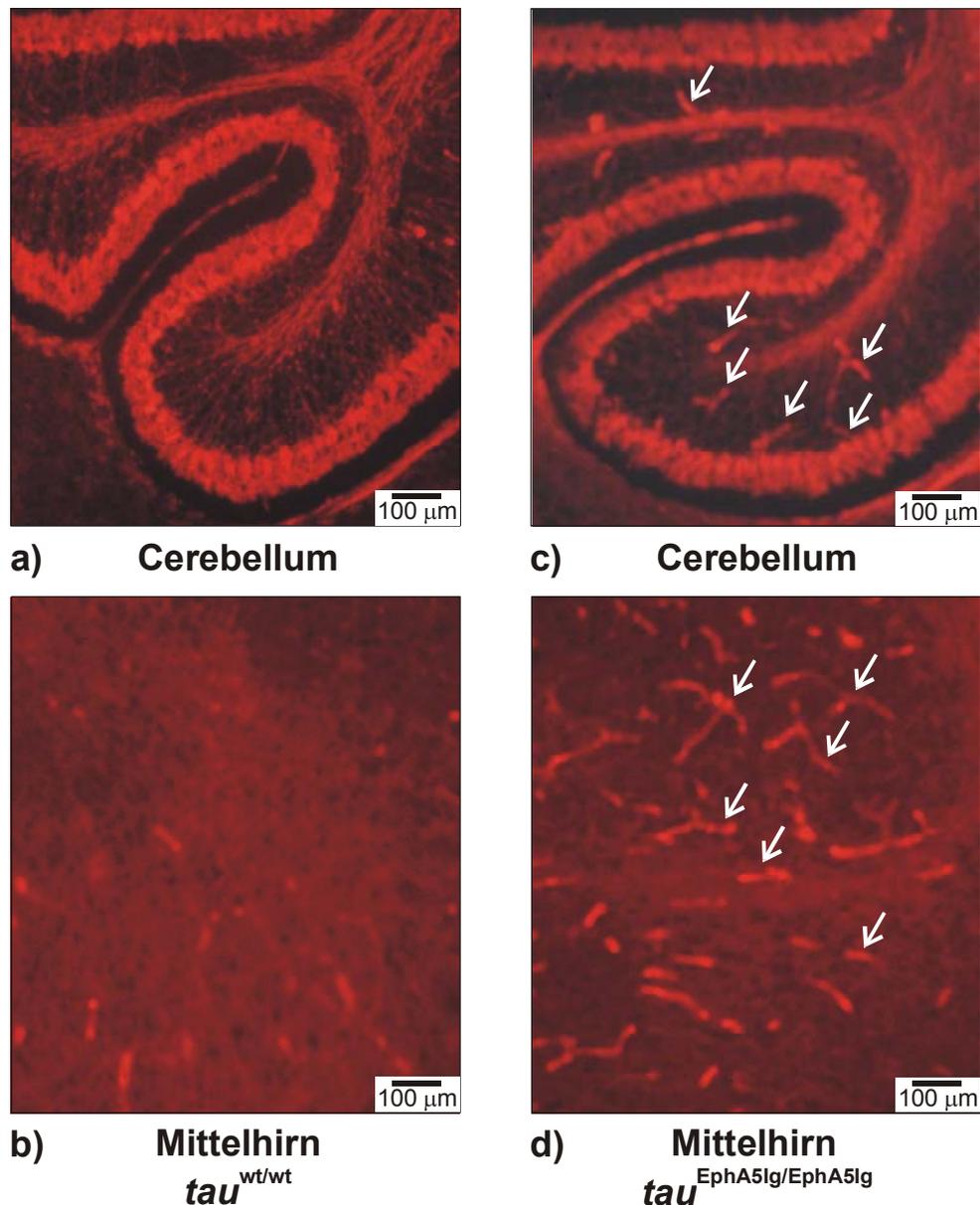
---

in Purkinjezellen exprimiert wird und dort bis zu 15% des gesamten zellulären Proteins ausmacht (Andressen *et al.* 1993, Iacopino *et al.* 1990).

Während die Analyse der Morphologie dendritischer Fortsätze von Purkinjezellen aufgrund einer sehr starken Variabilität nicht weiterverfolgt wurde, lieferte eine Kreuzreaktivität des verwendeten Antiserums (Swant, Ascitis des monoklonalen Antikörpers D28K) Anhaltspunkte für mögliche Veränderungen in den Blutgefäßen der Mutante.

Beim Vergleich der anti-Calbindin Färbungen von Cerebellum und Mittelhirn von *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> und Wildtyp Mäusen wurde im knock-in eine erhöhte Anzahl von Strukturen detektiert, bei denen es sich aufgrund von Größe und Anordnung wahrscheinlich um Blutgefäße handelte (Abb. 39, Pfeile).

Diese Ausgangsbefunde sollten mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen mit dem klassischen Endothelzellmarker CD31 evaluiert werden. Bei CD31 handelt es sich um ein auf Endothelzellen aller Gefäßtypen sowie auf einigen Blutzellen exprimiertes, glykosyliertes Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa (DeLisser *et al.* 1994, Vecchi *et al.* 1994), das aufgrund seiner initialen Beschreibung als endotheliales Zelladhäsionsmolekül die alternative Bezeichnung PECAM trägt (engl.: Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule).



**Abb. 39: Färbung von Hirnschnitten 8 Tage alter Mäuse gegen Calbindin.**

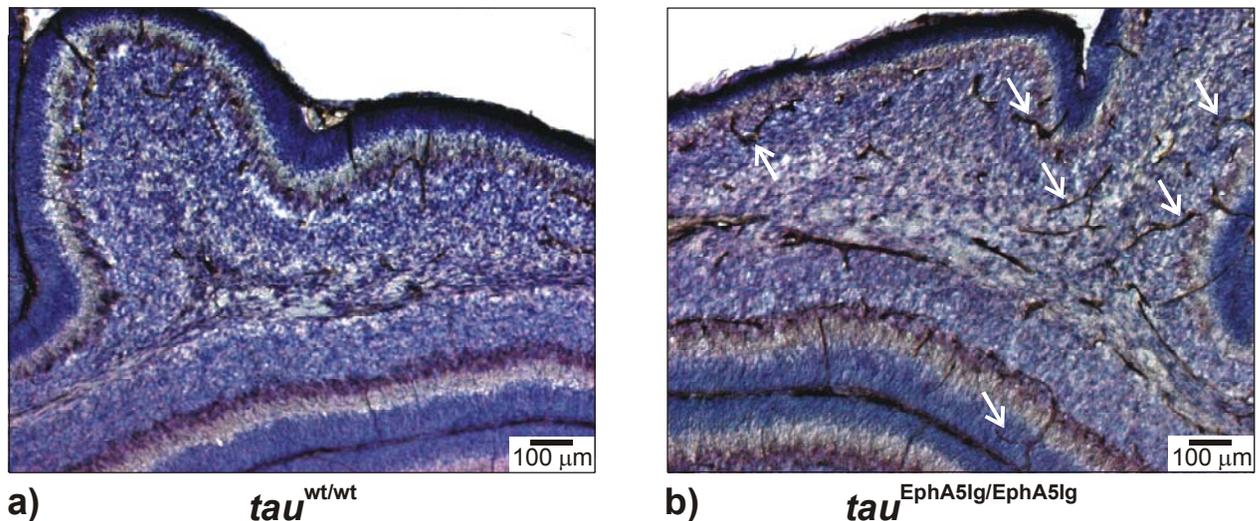
Ausschnitte parasagittaler Hirnschnitte 8 Tage alter Mäuse vom  
a), b) Cerebellum und

c), d) Mittelhirn, gefärbt mit einem gegen Calbindin gerichteten Antiserum.

Während im Cerebellum wie erwartet im wesentlichen Purkinjezellen markiert wurden, kam es aufgrund der Kreuzreaktivität des Antikörpers zur Markierung von Blutgefäßen (Pfeile) auch in anderen Hirnbereichen. Der Vergleich des Färbemusters in Wildtyp ( $\tau^{wt/wt}$ ) und knock-in ( $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ ) Tieren lieferte Hinweise auf eine möglicherweise erhöhte Gefäßdichte im knock-in.

Von Hirnen 8 Tage alter Mäuse wurden gemäß 6.2.4.1-6.2.4.3 Gewebeschnitte in parasagittaler Orientierung mit einer Dicke von 25  $\mu\text{m}$  angefertigt und freischwimmend mit einem Maus anti-Calbindin Antikörper (Swant, 1:5000) sowie einem Cy3 konjugierten Sekundärantikörper (Jackson, 1:500) gefärbt und unter Epifluoreszenz photographiert.

Parasagittale Gefrierschnitte von Cerebella 8 Tage alter Mäuse wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD31 (Pharmingen, Klon MEC13.3) gefärbt und auf mögliche Veränderungen in Zahl, Größe und Anordnung von Blutgefäßen analysiert.



**Abb. 40: Färbung des Cerebellums 8 Tage alter Mäuse gegen den Endothelzellmarker CD31.**

Ausschnitte parasagittaler Gewebeschnitte vom Cerebellum 8 Tage alter Mäuse von

a) Wildtyp ( $tau^{wt/wt}$ ) und

b) Homozygoter Mutante ( $tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ ), gegen CD31 sowie mit Toluoidinblau gefärbt.

In den Gewebeschnitten der Mutante wurde im Cerebellum eine erhöhte Dichte von Gefäßen detektiert. Von diesen Gefäßen wies ein erhöhter Anteil einen vergrößerten Gefäßdurchmesser auf. Während die Gefäße im Cerebellum von Wildtyp Mäusen vorwiegend parallel zur Zellschichtung orientiert waren, wurde in der Mutante ein erhöhter Anteil von Gefäßen detektiert, die nicht parallel zur Zellschichtung verliefen (a, Pfeile).

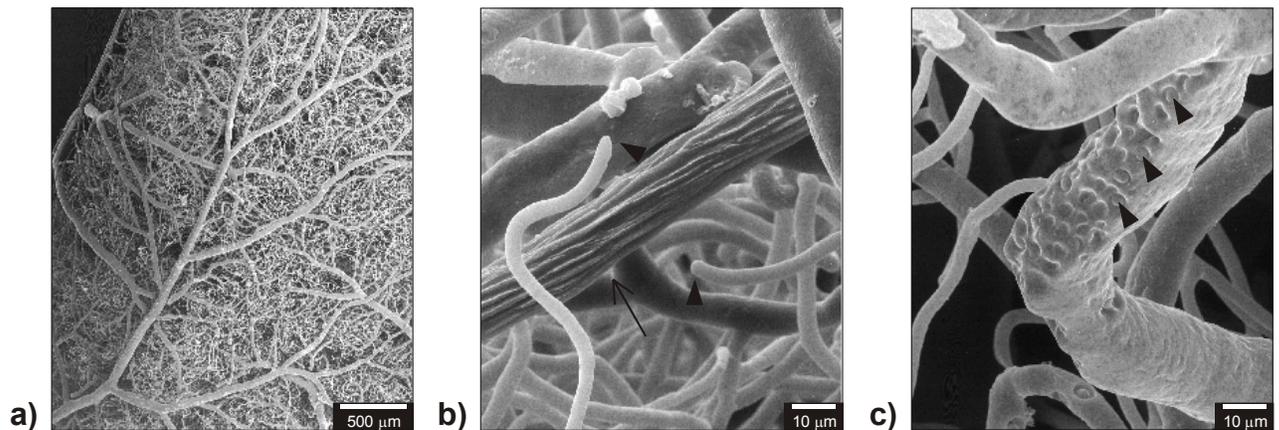
Von Hirnen 8 Tage alter Mäuse wurden gemäß 6.2.4.1-6.2.4.3 14 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, mit einem monoklonalen Ratte anti-CD31 Antikörper (Pharmingen, 1:2500) sowie dem ABC Elite Kit (Vector, Herstellerangaben) gefärbt, mit dem Färbesubstrat DAB entwickelt und anschließend mit Toluoidinblau gefärbt.

In den Gewebeschnitten von  $tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen wurde im Cerebellum eine erhöhte Dichte von Gefäßen detektiert, von denen ein erhöhter Anteil einen vergrößerten Durchmesser aufwies. Im Cerebellum von Wildtyp Mäusen verlief der überwiegende Teil der Gefäße parallel oder senkrecht zur Laminierung der Zellen. Im Cerebellum von  $tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen hingegen wurde ein erhöhter Anteil von Gefäßen beobachtet, die weder parallel noch senkrecht zur Laminierung der Zellen orientiert waren. Analoge Beobachtungen wurden auch in anderen Hirnstrukturen gemacht, wobei die Unterschiede in der Gefäßanordnung in Strukturen mit einer ausgeprägten Zellschichtung wie z.B. dem Hippocampus besonders deutlich waren. Insgesamt waren die mit Hilfe der CD31-Immunfärbungen festgestellten Veränderungen jedoch weit weniger deutlich, als sie aufgrund der Kreuzreaktivität des anti-Calbindin Antiserums zunächst angenommen worden waren. Die auf Gewebeschnitten beobachteten Veränderungen in den Blutgefäßen wiesen zudem eine hohe Variabilität auf und waren unterschiedlich stark ausgeprägt abhängig davon, aus welchem mehr lateralen oder medialen Bereich des

Cerebellums oder des Hippocampus die Präparate angefertigt wurden. Die Variabilität wurde teilweise darauf zurückgeführt, daß das Erscheinungsbild von Gefäßen stark von der Lage im Präparat und von dem Winkel abhängig ist, mit dem die Gefäße angeschnitten wurden.

Anhand der CD31-Immunfärbungen von Hirnschnitten konnte insgesamt nicht abschließend beurteilt werden, ob in  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen signifikante Veränderungen der Blutgefäße vorlagen. Hierbei waren vor allem die starke Variabilität sowie die methodische Schwierigkeit ausschlaggebend, anhand von Schnitten einen Überblick über Durchmesser, Dichte und Anordnung der Blutgefäße zu erhalten.

Aus diesem Grunde wurden in Zusammenarbeit mit Eric Meyer, Thomas Krucker und Alexandra Schuler sog. Korrosionsausgüsse von Gehirnen hergestellt, mit denen die dreidimensionale Gefäßstruktur eines Organs dargestellt und im Überblick auf systematische Veränderungen untersucht werden kann. Für das Anfertigen von Korrosionsausgüssen wurden die betreffenden Mäuse unter Narkose transkardial mit einem Kunstharz perfundiert, welches das Blut verdrängt und im Lumen der Gefäße polymerisiert. Nach Aushärten des Kunstharzes wurde das umliegende Gewebe mit einer kombinierten Behandlung von Proteasen und alkalischen Lösungen verdaut und marzeriert und mittels geeigneter Waschschriffe entfernt. Die Ausgüsse wurden getrocknet, mit Gold bedampft und an einem Scanning Elektronenmikroskop analysiert.



**Abb. 41: Analyse der dreidimensionalen Gefäßstruktur mit Hilfe von Korrosionsausgüssen.**

Beispiele für Präparate vom Hirngewebe einer adulten Wildtyp Maus.

- a) Übersichtsaufnahme vom Cortex (posteriorer Abschnitt, an der Grenze zum Cerebellum).
- b) Detail eines arteriellen Gefäßes (Pfeil) aus dem Cerebellum, erkennbar an der parallel zur Längsachse verlaufenden Textur der Gefäßwand. Der Ausschnitt zeigt zwei blind endende Gefäße mit kleinem Durchmesser (Pfeilspitzen).
- c) Detail eines Gefäßes aus dem Cerebellum, in dessen Wandung Abdrücke vermutlich von Endothelzellen (Pfeilspitzen) erkennbar sind.

Die Korrosionsausgüsse wurden von 3 Monate alten Tieren gemäß Romeis (1989) mit Modifikationen angefertigt und an einem Scanning Elektronenmikroskop photographiert.

Die Methode lieferte sowohl Informationen zu Organisation und Anordnung von Gefäßen in großen Gewebearealen (Abb. 41 a) als auch Detailinformationen zu

Gefäßdurchmessern, eventuell blind endenden Gefäßen (Abb. 41 b), Pfeilspitze) sowie Hinweise auf den jeweiligen Gefäßtyp (Abb. 41 c), Pfeil; die Textur der Gefäßwandung weist auf ein arterielles Gefäß hin). Hinsichtlich detailgetreuer Wiedergabe der dreidimensionalen Gefäßanordnung in ganzen Organen handelte es sich somit um die Methode der Wahl.

Ein systematischer Vergleich von jeweils 10 Korrosionsausgüssen des Gehirns von adulten Wildtyp und  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen lieferte jedoch keine Hinweise auf offensichtliche Veränderungen in der dreidimensionalen Gefäßstruktur. Hierbei wurden weder eine offensichtlich veränderte Verteilung von Gefäßdurchmessern, noch eine offensichtlich veränderte Dichte oder Anordnung von Blutgefäßen oder eine veränderte Anzahl „blind“ endender Gefäße in der Mutante beobachtet. Ein wesentliches Merkmal der Präparate war wiederum eine sehr starke Variabilität in allen genannten Parametern, die unabhängig vom jeweiligen Genotyp und dem jeweils untersuchten Gehirnareal war.

#### 4.4.5.4 Visuelles System

Die Experimente zur Analyse des visuellen Systems wurden im Rahmen einer Kollaboration von Mark Hübener, Sven Schütt und Claire Creutzfeld am Max-Planck-Institut für Neurobiologie durchgeführt. Da diese Experimente einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung der Mutante liefern, werden hier das Konzept der Experimente skizziert und die zentralen Befunde zusammenfassend dargestellt.

Die Literatur zu der Funktion von EphA-Rezeptoren und A-Ephrinen für die Entwicklung des visuellen Systems der Maus konzentriert sich bisher auf die anatomischen Aspekte der topographischen Projektionen von RGZ zu ihren Zielgeweben im Mittelhirn und Vorderhirn (siehe 2.3.3.1., sowie Feldheim *et al.* 1998, Frisen *et al.* 1998, Feldheim *et al.* 2000, Brown *et al.* 2000). In dieser Arbeit hingegen wurden die physiologischen Auswirkungen einer funktionellen Inaktivierung von A-Ephrinen untersucht. Hierbei wurde die Repräsentation der Retina im PVC mit Hilfe von „Intrinsic Signal Optical Imaging“ (ISOI), einer in ihrer Anwendung auf Mäuse neuartigen Technik (Schütt *et al.* 2002, in press), in juvenilen und adulten Mäusen aller drei Genotypen analysiert. Durch diese Experimente war es möglich, unter *in-vivo* Bedingungen die durch einfache visuelle Stimuli in den Mäusen ausgelöste cortikale Aktivität nachzuzeichnen und somit indirekt Hinweise zu sammeln, welche Bedeutung A-Ephrine für das Sehvermögen der Mäuse haben könnten.

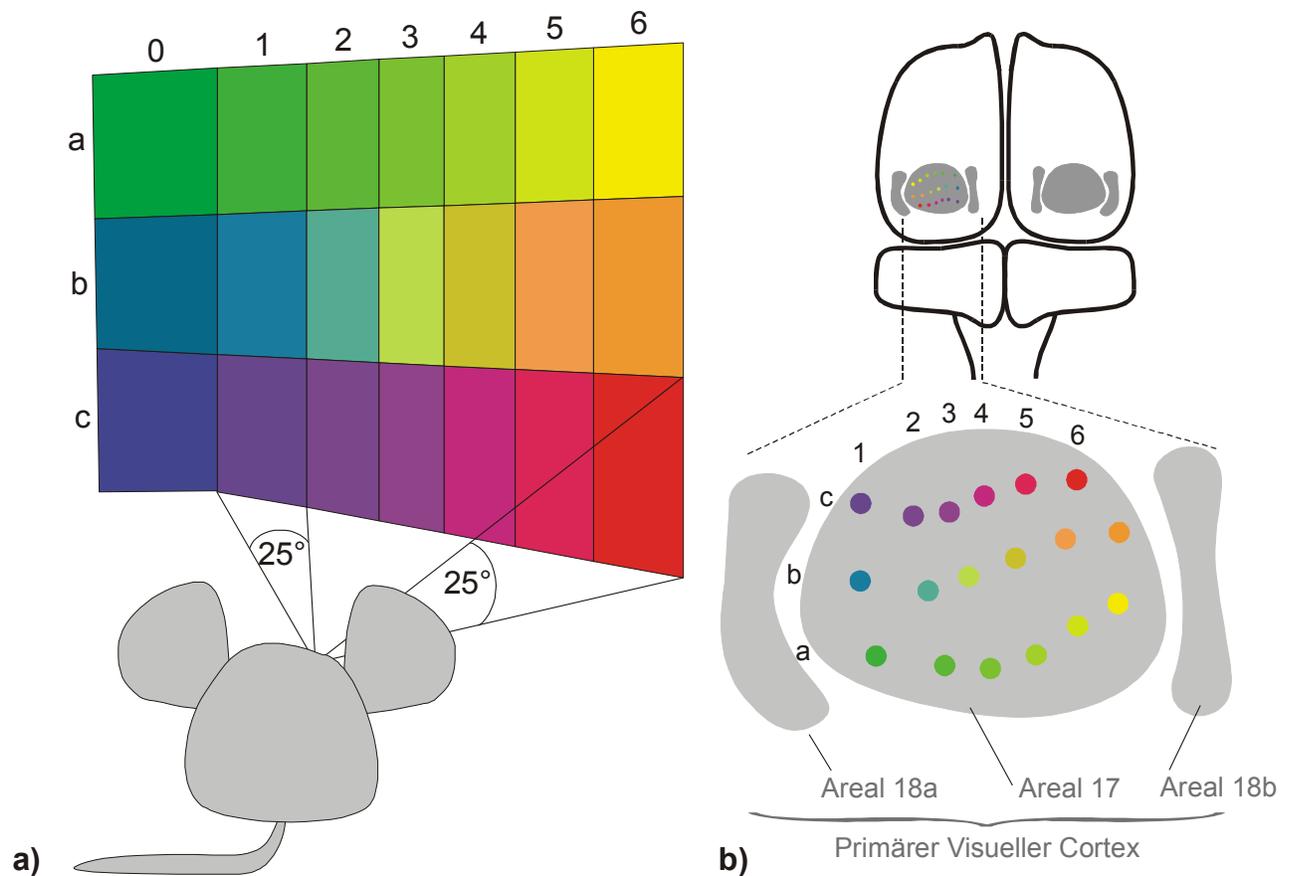
Die Technik ISOI (Grinvald *et al.* 1986, Frostig *et al.* 1990) ermöglicht die nicht-invasive Analyse der funktionalen Architektur cortikaler Strukturen am lebenden Organismus. ISOI beruht auf der Beobachtung, daß sich die intrinsischen optischen Eigenschaften des Cortex in Abhängigkeit von neuronaler Aktivität verändern. Hierbei ist eine lokal begrenzte Änderung der neuronalen Aktivität im Cortex mit einer Änderung der Absorption des Cortex im langwelligen Wellenlängenbereich verbunden. Es wird angenommen, daß dieses Phänomen vorwiegend auf einer Kopplung zwischen neuronaler Aktivität und der lokalen Blutzirkulation beruht. ISOI setzt eine intakte Vaskularisierung voraus und ist

darauf ausgelegt, relative Unterschiede in der neuronalen Aktivität oberflächlicher Gewebereiche zu detektieren.

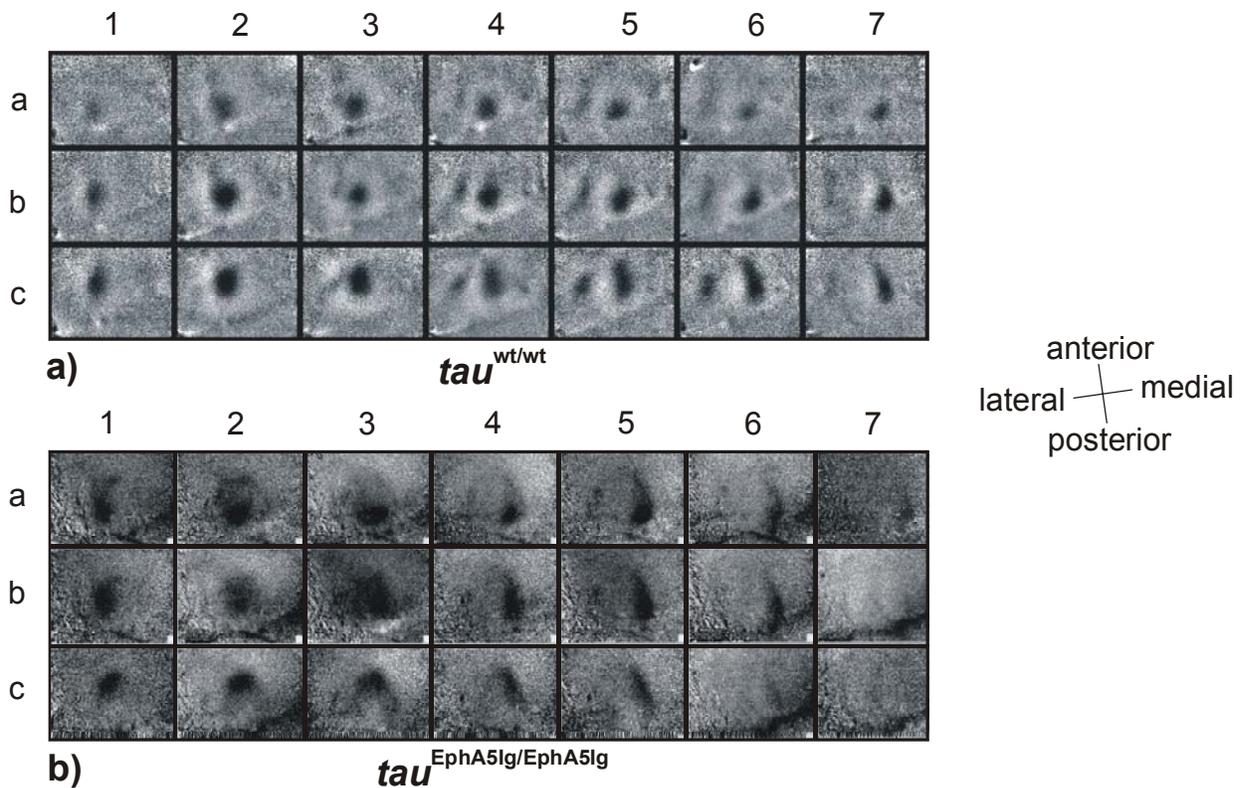
In den Experimenten wurden Mäuse unter Narkose optischen Stimuli ausgesetzt, bei denen es sich um jeweils einzeln hell erleuchtete Rechtecke handelte, welche mit einem Inkrement von  $25^\circ$  über das gesamte Sehfeld eines Auges der Maus angeordnet waren (Abb. 42). Für die Experimente mit Mäusen waren diese sehr einfachen Stimuli erforderlich, da die Augen der Maus ein nur geringes räumliches Auflösungsvermögen besitzen (Sven Schütt, persönliche Mitteilung). Das durch einen bestimmten visuellen Stimulus ausgelöste Aktivitätsmuster wurde mit Hilfe einer Videokamera im PVC durch den intakten Schädelknochen hindurch detektiert, der vor Beginn des Experiments partiell freigelegt wurde. Auf diese Weise wurde eine Karte erstellt, welche die Repräsentation des Sehfeldes bzw. der Retina im PVC widerspiegelt.

**Abb. 42: (folgende Seite) Vereinfachte Darstellung des Versuchsaufbaus zur Messung der Retinotopie mit Hilfe von „Intrinsic Signal Optical Imaging“ (ISOI) in Mäusen.**

- a) Im Versuchsaufbau wurde eine narkotisierte Maus hell erleuchteten, über das gesamte Sehfeld eines Auges verteilten Rechtecken ausgesetzt, während mit Hilfe einer Infrarotkamera das Aktivitätsmuster im PVC detektiert wurde. Die Rechtecke wurden jeweils einzeln mit identischer Helligkeit beleuchtet, und die Messung erfolgte durch den intakten Schädelknochen hindurch, der vor Beginn des Experimentes partiell freigelegt wurde.
- b) Mit den Messungen wurden Karten erzeugt, aus welchen die Repräsentation des Sichtfeldes bzw. der Retina im PVC hervorgeht (sog. retinotope Karte). Die Rechtecke waren weiß, die Farbkodierung in der Skizze dient der besseren Übersichtlichkeit. In b) ist lediglich der sog. Areal 17 des visuellen Cortex wiedergegeben, Form und Aufbau der retinotopen Karte sind in der Skizze stark schematisiert.



Der erste Teil der Experimente wurde an jeweils 3 Monate alten homozygoten Mutanten und Wildtyp Mäusen durchgeführt. Die optischen Stimuli lösten neuronale Aktivität in mehreren Bereichen des visuellen Cortex aus, von denen hier nur die im Areal 17 gesammelten Erregungsmuster dargestellt werden. Abb. 43 zeigt jeweils ein Beispiel für das in der oben skizzierten Anordnung in einer Wildtyp Maus ( $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ ) und einer homozygoten Mutante ( $\tau^{wt/wt}$ ) evozierte Aktivitätsmuster.



**Abb. 43: Beispiel retinotoper Karten von 3 Monate alten Mäusen.**

- a) Wildtyp Maus ( $\tau^{wt/wt}$ )  
 b) Knock-in ( $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ )

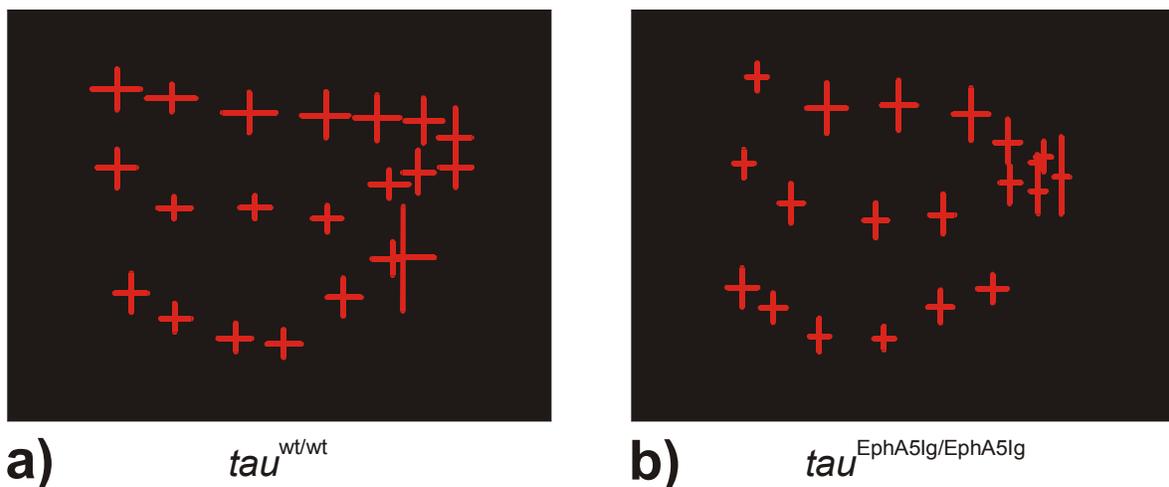
Die Mäuse wurden mittels der in Abb. 42 dargestellten Versuchsanordnung visuellen Stimuli ausgesetzt, während das Aktivitätsmuster im PVC mittels ISOI im Areal 17 gemessen wurde. Jeder Quadrant der retinotoper Karten zeigt den gesamten PVC, wobei starke neuronale Aktivität durch dunkle, geringere neuronale Aktivität durch helle Grauschattierungen dargestellt ist. Die Quadranten der retinotoper Karten sind analog zu den verwendeten visuellen Stimuli angeordnet und benannt, d.h. die z.B. in den Quadranten 1 a dargestellten Aktivitätsmuster wurden durch das hell erleuchtete Rechteck in Position 1 a in der Versuchsanordnung (Abb. 42) ausgelöst. Die Angaben zur Orientierung (anterior/posterior, lateral/medial) beziehen sich auf die Körperachse der Maus.

Die an Wildtyp Mäusen gemessenen retinotoper Karten (Abb. 43 a) demonstrierten eine eindeutige Korrelation von Intensität, Form und Lage des Erregungsmusters im PVC zu dem jeweils präsentierten optischen Stimulus. Die Bereiche neuronaler Erregung waren im PVC scharf abgegrenzt und von einem Bereich mit unter den Basalwert verringerter Aktivität umgeben (Abb. 43 a), heller Ring um den als dunkler „Fleck“ auftretenden Bereich neuronaler Erregung). Wie aus Abb. 43 a) hervorgeht, änderte sich mit der Lage des optischen Stimulus sowohl die Größe des Bereichs neuronaler Aktivität, als auch dessen Lage im PVC.

Bei den an  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen durchgeführten Messungen wurde zunächst festgestellt, daß eine systematische retinotope Karte existierte und die grundlegende Struktur der Retinotopie erhalten war. Die retinotope Karte des knock-in wies jedoch eindeutige Abweichungen von der Wildtyp Situation auf, die durchgehend bei allen vermessenen Tieren gefunden wurden. Wie aus Abb. 43 hervorgeht, waren die Bereiche

neuronaler Aktivität in der Mutante weniger scharf abgegrenzt als in den Wildtyp Tieren. In den Wildtyp Mäusen wurde um die Bereiche neuronaler Aktivität ein ringförmiges Areal mit verminderter neuronaler Aktivität gefunden. Dieser Bereich verminderter Aktivität war in den  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen weitgehend abwesend, und das Muster neuronaler Aktivität in der Mutante war erheblich diffuser strukturiert. Neben diesen allgemeinen Veränderungen der retinotopen Karte in dem knock-in wurden weitere, systematische Veränderungen der Retinotopie beim Vergleich sog. gemittelter retinotoper Karten gefunden.

In den Experimenten wurden alle Mäuse in mehrfacher Wiederholung denselben visuellen Stimuli ausgesetzt, welche insgesamt, wie in Abb. 42 skizziert, das gesamte Sehfeld eines Auges der Maus abdeckten. Gemittelte retinotope Karten wurden erzeugt, indem die aus den individuellen Einzelkarten der Meßdurchgänge berechneten „Mittelwerte“ zusammen mit den zugehörigen Streuungen in eine topographische Karte eingetragen wurden.



**Abb. 44: Gemittelte retinotope Karten adulter Mäuse.**

Gegenüberstellung gemittelter retinotoper Karten

- a) Einer adulten Wildtyp Maus ( $\tau^{wt/wt}$ ) und  
 b) Einer homozygoten Mutante ( $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ ).

Es wurden jeweils die „Mittelwerte“ von 6 Einzelkarten einer Maus berechnet, und der Schwerpunkt eines jeden Areals neuronaler Aktivität wurde mit einem Kreuz in eine retinotope Karte eingetragen. Die Länge der jeweiligen „Kreuzbalken“ repräsentiert die Größe der Streuung zwischen den einzelnen Meßdurchgängen (berechnet als SEM).

Beim Vergleich der gemittelten Karten von adulten Wildtyp mit  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen wurde eine Stauchung der retinotopen Karte entlang der medial-lateralen Achse beobachtet. Hierbei war der Abstand zwischen den einzelnen Bereichen neuronaler Erregung insbesondere im medialen Aspekt des Areals 17 im PVC verringert, und dementsprechend war in den betroffenen Mäusen der laterale Bereich der Retina im Vergleich zu den Wildtyp Tieren auf einer geringeren Fläche des PVC repräsentiert.

In einem zweiten Teil der Experimente wurden Messungen an 14-20 Tage alten Tieren durchgeführt. In diesen Versuchen wurden qualitativ dieselben Effekte wie in älteren Mäusen beobachtet, jedoch waren die Veränderungen in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen quantitativ wesentlich stärker ausgeprägt (Mark Hübener, persönliche Mitteilung). Hierbei war nicht nur das Fehlen der Abgrenzung von Bereichen neuronaler Erregung gegenüber den umliegenden Bereichen im PVC, sondern auch die Stauchung der retinotopen Karte erheblich verstärkt. Zugleich war die Form des Areals 17 in der Mutante im Vergleich mit der Wildtyp Situation verändert. Diese altersabhängigen, quantitativen Unterschiede wiesen auf das Vorhandensein von Korrekturmechanismen hin, welche eine partielle Anpassung initialer Fehlentwicklungen an die Wildtyp Situation leisteten.

## 5 Diskussion

Der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit waren Befunde zur Genexpression in sensorischen Neuronen von Spinalganglien (2.4, Friedel et al. 1997, sowie Harald Schnürch, Fortsetzung der Arbeit von Friedel *et al.*). Diese Expressionsstudien lieferten Hinweise, daß A-Ephrine und ihre Rezeptoren an der Etablierung der topographischen Projektionen von Spinalganglien in das Rückenmark beteiligt sein könnten. Die repulsive Wirkung der im Rückenmark exprimierten A-Ephrine auf die TrkA-positiven Axone von Spinalganglien könnte möglicherweise dafür verantwortlich sein, daß diese Projektionen in den dorsalen Laminae des Rückenmarks terminieren und nicht in ventrale Rückenmarksbereiche vordringen (2.4).

Für die experimentelle Überprüfung dieser Hypothese wurde im ersten Teil der Arbeit eine transgene Mauslinie etabliert, in welcher alle A-Ephrine gleichzeitig im gesamten Nervensystem funktionell neutralisiert sind. Bei der Analyse dieser Mauslinie standen neben der Topographie im Rückenmark auch die Entwicklung sensorischer Projektionen in der Peripherie, die Ausbildung von Blutgefäßen sowie Aspekte des visuellen Systems im Vordergrund.

### 5.1 Die Strategie von Neuroantikörpern für die funktionelle Neutralisierung von A-Ephrinen

Für die gleichzeitige Inaktivierung aller 5 A-Ephrine in einer transgenen Mauslinie wurde ein aus der EphA5-Ektodomäne und einem Fc-Tag bestehendes Fusionsprotein, ein sog. Rezeptorkörper, unter der Kontrolle des *tau*-Promotors im gesamten Nervensystem exprimiert. Diese Vorgehensweise baute auf dem von Cattaneo *et al.* (1991) formulierten Konzept von Neuroantikörpern (2.5) auf, welches erstmals für die Neutralisierung von Substanz P durch Expression eines funktionsblockierenden Antikörpers in einer transgenen Maus eingesetzt wurde (2.5, Piccioli *et al.* 1995). Ein wichtiger methodischer Befund dieser Arbeit war, daß Neuronen Antikörper effektiv sezernieren können und es in den Neuronen zu einer korrekten Assemblierung der in denselben Zellen koexprimierten leichten und schweren Ketten der Antikörper kommt. Auch für das in dieser Arbeit eingesetzte, Antikörper-ähnliche Fusionsprotein war eine über Disulfidbrücken vermittelte Dimerisierung Voraussetzung für eine hochaffine Bindung der Zielmoleküle.

Im Unterschied zu dem ursprünglichen Konzept von Neuroantikörpern wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch kein Antikörper, sondern ein Fusionsprotein von Neuronen exprimiert, welches nicht nur ein einzelnes Epitop binden, sondern 5 verschiedene Zielmoleküle zugleich neutralisieren konnte. Auch wurde der Rezeptorkörper nicht mittels Zufallsintegration, sondern mittels homologer Rekombination in einen definierten Genloкус inseriert. Damit sollte die Variabilität des Expressionsniveaus vermieden werden, die von Piccioli *et al.* zwischen verschiedenen Tieren beobachtet wurde.

Die Expression des Rezeptorkörpers in einer transgenen Maus beruhte weiterhin auf den folgenden, in der Literatur dokumentierten Befunden:

- 1) Aus der Ektodomäne eines EphA-Rezeptors und einem Fc-Tag bestehende Rezeptorkörper haben sich sowohl bei Anwendungen *in-vitro* (z.B. Ciossek *et al.* 1998) als auch *in-vivo* (z.B. Gerlai *et al.* 1999) für die funktionelle Inaktivierung von A-Ephrinen bewährt. Da die EphA5-Ektodomäne die insgesamt stärksten Affinitäten zu den A-Ephrinen besitzt (Flanagan *et al.* 1998), ist sie für die gleichzeitige Maskierung möglichst vieler A-Ephrine besonders geeignet. Gleichartige EphA5-Rezeptorkörper sind spezifisch für A-Ephrine und interagieren mit keinem der 3 B-Ephrine mit signifikanter Affinität (Gale *et al.* 1996, Flanagan *et al.* 1998).
- 2) Bei einer konstitutiven Sezernierung von Antikörpern von Neuronen in einer transgenen Maus wurde weder eine Veränderung der Cytoarchitektur, noch eine Beeinträchtigung der Funktionalität der betreffenden Neuronen beobachtet (Piccioli *et al.* 1995). Die Gewebekonzentration des Antikörpers folgt hierbei dem räumlichen-zeitlichen Expressionsmuster des Promotors, welcher die Expression steuert. Die Sekretion rekombinanter Proteine, welche den Fc-Abschnitt humaner Immunglobuline enthalten, von Neuronen induziert in der transgenen Maus keine unerwünschte Immunreaktion (Piccioli *et al.* 1995).
- 3) Beim *tau*-Lokus handelt es sich um einen starken, pan-neuronalen und weitestgehend Neuron-spezifischen Genloкус, dessen Aktivität bei E9.0 einsetzt und bis in späte adulte Stadien persistiert. Die Deletion von Tau hat keinen Effekt auf axonales Wachstum, und für Tau-defiziente Mäuse sind keinerlei morphologische Veränderungen auf makroskopischer oder zellulärer Ebene beschrieben worden (Hirokawa *et al.* 1994, Tucker *et al.* 2001).

Ein Vorteil des *tau*-Lokus war die erst ab E9.0 einsetzende Aktivität des Promotors. Hierdurch wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht, daß sich die Spinalganglien in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen korrekt ausbilden konnten. Da Ephrine auch in die Steuerung der Migration von Neuralleistenzellen involviert sind (2.3.3.3), hätte eine frühere Expression des Rezeptorkörpers möglicherweise mit der Entwicklung von Spinalganglien interferiert. Dies hätte die Analyse der topographischen Projektionen aus Spinalganglien in das embryonale Rückenmark erheblich komplizieren können.

Neben dieser Strategie waren alternative Vorgehensweisen für die gleichzeitige Inaktivierung aller A-Ephrine in einer transgenen Maus denkbar.

- 1) Über die simultane Deletion aller 5 A-Ephrine mit Hilfe konventioneller knock-out Technologie in einer transgenen Maus hätte die sichere und vollständige Entfernung aller A-Ephrine im gesamten Organismus erzielt werden können. Dieser Ansatz war jedoch in Anbetracht des experimentellen Aufwandes im Rahmen dieser Arbeit nicht realisierbar.

2) Eine Neutralisierung der biologischen Wirkung von A-Ephrinen hätte auch mit der gleichzeitigen Inaktivierung der 8 EphA-Rezeptoren durch die Überexpression sog. dominant-negativer Rezeptormutanten angestrebt werden können. Bei derartigen dominant-negativen Mutanten handelt es sich typischerweise um Rezeptoren mit einer inaktiven Tyrosinkinasedomäne. Infolge eines hohen Überschusses der mutierten gegenüber der endogenen Rezeptorform werden fast ausschließlich Heterodimere mit mindestens einem mutierten Dimerisierungspartner gebildet. Da diese Heterodimere zwar noch ihre Liganden binden können, jedoch keine Signaltransduktion in das Zellinnere mehr leisten, kann es zu einer weitgehenden Neutralisierung der Rezeptorfunktion kommen. Diese Strategie wäre jedoch mit beträchtlichen konzeptionellen Nachteilen verbunden gewesen.

Hauptschwierigkeit wäre hierbei ein Nachweis für die Spezifität der Rezeptormutanten gewesen, der in den bekannten Beispielen für eine Anwendung dominant negativer Eph-Rezeptormutanten (z.B. Xu *et al.* 1995) nicht vorgelegt wurde. Als Voraussetzung für diese Strategie hätte sichergestellt werden müssen, daß die verwendete dominant negative Rezeptormutante ausschließlich alle EphA-Rezeptoren, nicht jedoch Eph-Rezeptoren der B-Subfamilie, oder sogar andere Rezeptortyrosinkinasen inaktiviert.

Zwar liegen bisher nur indirekte Hinweise auf eine bidirektionale Signaltransduktion durch A-Ephrine vor, jedoch könnten die dominant negativen EphA-Rezeptormutanten eine reverse Signalübertragung durch ihre Liganden auslösen. Ein biologischer Effekt in der transgenen Mauslinie könnte hierbei sowohl auf der angestrebten Inhibition der Rezeptorfunktion, als auch auf einer ungewollten reversen Signaltransduktion durch „aktivierte“ A-Ephrine beruhen. Diese Situation würde die ursächliche Interpretation eines Phänotyps erheblich komplizieren.

Insgesamt wurden mit der in dieser Arbeit etablierten Mauslinie 2 bewährte Konzepte, nämlich die Applikation von Rezeptorkörpern zur Neutralisierung endogener Liganden sowie das Konzept von Neuroantikörpern, erstmals in einer gemeinsamen Strategie integriert. Diese Strategie wies im Vergleich mit alternativen Vorgehensweisen wesentliche Vorteile auf und war zugleich mit geringeren Risiken verbunden.

## 5.2 Grundeigenschaften der $\tau^{EphA5Ig/EphA5Ig}$ Mauslinie

### 5.2.1 Die A-Ephrine sind in der $\tau^{EphA5Ig/EphA5Ig}$ Mauslinie effektiv inaktiviert

Die wichtigste Voraussetzung für die Interpretation eines Phänotyps der  $\tau^{EphA5Ig/EphA5Ig}$  Mauslinie war der Nachweis, daß der Rezeptorkörper seine Liganden effektiv bindet und maskiert. Hierbei wurden zunächst die molekularen Eigenschaften des Rezeptorkörpers *in-vitro* analysiert und die Expression des Rezeptorkörpers in Neuronen *in-vivo* belegt.

- 1) Der Rezeptorkörper bindet seine Liganden. Stellvertretend für die gesamte Klasse von A-Ephrinen wurde die Interaktion des Rezeptorkörpers mit Ephrin-A2 und Ephrin-A5 anhand von affinitätsgereinigtem Protein demonstriert (4.3.3). Weiterhin wurde der Rezeptorkörper in Hinsicht auf wesentliche proteinchemische Eigenschaften wie N-Terminus, Molekulargewicht und Dimerisierung charakterisiert. Aufgrund der für identische EphA5-Fusionsproteine in der Literatur dokumentierten Eigenschaften (Gale *et al.* 1996, Flanagan *et al.* 1998) wurde geschlossen, daß der für den knock-in eingesetzte Rezeptorkörper spezifisch alle 5 A-Ephrine mit ähnlicher Affinität bindet und maskiert und zugleich mit keinem der B-Ephrine interagiert.
- 2) Die Expression des Rezeptorkörpers *in-vivo* wurde sowohl auf der Ebene des Transkriptes, als auch für das Protein belegt.

Da es sich bei der in den  $\tau$ -Lokus inserierten cDNA des Rezeptorkörpers um eine künstliche DNA-Sequenz handelte, bestand ein gewisses Risiko, daß die Expression des Rezeptorkörpers in  $\tau^{EphA5Ig/EphA5Ig}$  Mäusen infolge von Silencing blockiert wird. Das Phänomen von Silencing ist als Abwehrmechanismus gegen fremde DNA, wie sie z.B. im Zusammenhang mit Virusinfektionen in den Organismus gelangen kann, bekannt und beruht auf der Unterdrückung der Genexpression infolge der Methylierung von DNA. Mittels RT-PCR, Northern-Transfer und *in-situ* Hybridisierung wurde gezeigt, daß die in den  $\tau$ -Lokus inserierte cDNA in Neuronen transkribiert wurde und es nicht zu einem Silencing des Gens kam.

Der Nachweis des Rezeptorkörpers *in-vivo* als Protein mittels Western-Transfer und immunhistochemischen Färbungen demonstrierte, daß es keine Anzeichen für eine Degradierung gab und der Rezeptorkörper quantitativ als Dimer vorlag. Anhand von kultivierten Primärzellen aus  $\tau^{EphA5Ig/EphA5Ig}$  Mäusen konnte gezeigt werden, daß der Rezeptorkörper auch von Neuronen sezerniert wird (Daten nicht gezeigt). Der Rezeptorkörper wurde nicht nur im Soma von Neuronen, sondern auch in Neuriten nachgewiesen (Abb. 28 g-i). Dieser Befund war eine wichtige Grundlage für die Interpretation von Phänotypen, welche nicht in unmittelbarer Nähe zu neuronalen Zellkörpern, sondern im distalen Aspekt neuronaler Projektionen beobachtet wurden.

- 3) Die Quantifizierung des Rezeptorkörpers in Hirngewebe homozygoter Embryonen der Altersstufe E14.5 bzw. von neugeborenen Mäusen ergab Konzentrationen von

ca. 17.4  $\mu\text{g}$  bzw. 18.7  $\mu\text{g}$  Rezeptorkörper pro mg Gesamtprotein in den Gewebelysaten. Hierbei wurden die Gewebelysate mit einem ausschließlich auf dem Detergenz CHAPS beruhenden Lysepuffer hergestellt, mit welchem insbesondere membranassoziierte und Transmembranproteine wahrscheinlich nur partiell in Lösung gebracht wurden. Da die Proteinkonzentrationen in den Gewebelysaten somit vermutlich niedriger sind als in frischem Gewebe, sind die Konzentrationen des Rezeptorkörpers pro mg Protein in Hirngewebe möglicherweise geringer als sie in den Lysaten gemessen wurden. Hierbei unterschieden sich die Gewebekonzentrationen in homozygoten und heterozygoten Tieren nicht wie erwartet um 100%, sondern lediglich um ca. 20%. Aufgrund dieser Beobachtung sind die aktuellen Konzentrationen des Rezeptorkörpers in Hirngewebe vermutlich nahe an einer Sättigungsgrenze.

Unerwartet war das mit fortschreitendem Alter der Tiere rasche Abfallen der Gewebekonzentration (Abb.30). Da in späteren Entwicklungsstadien der Anteil nicht-neuronaler Zellen stark zunimmt, handelt es sich hierbei möglicherweise um einen „Verdünnungseffekt“. Zu der mit Hilfe des ELISA beobachteten Abnahme der Gewebekonzentration des Rezeptorkörpers könnten auch methodische Aspekte bei der Herstellung der Gewebelysate beitragen. So nehmen mit zunehmendem Alter die Festigkeit sowie der nicht solubilisierbare Anteil von Hirngewebe zu. Da somit besonders das Gewebe älterer Tiere weniger Effizient solubilisiert und der in dem Gewebe enthaltene Rezeptorkörper weniger vollständig freigesetzt wurde, könnte die tatsächliche Gewebekonzentration des Rezeptorkörpers in Hirngewebe älterer Tiere über dem mittels ELISA gemessenen Wert liegen. Der zeitliche Verlauf der Gewebekonzentration spiegelt möglicherweise auch die Eigenschaften des *tau*-Promotors wider. Da zum räumlich-zeitlichen Muster der Expression von Tau keine quantitativen Daten vorliegen, mußte der Einfluß der Promotoreigenschaften auf den Expressionsverlauf des Rezeptorkörpers offenbleiben. Da auch in neuronalem Gewebe alter Mäuse keine Anzeichen für eine Degradation des Rezeptorkörpers gefunden wurden, ist der Abbau des Rezeptorkörpers im Gewebe als mögliche Ursache für das Abnehmen der Gewebekonzentration unwahrscheinlich.

Zwar konnte aus der vorliegenden Literatur nicht abgeschätzt werden, welche Gewebekonzentration des Rezeptorkörpers für die Neutralisierung von A-Ephrinen konkret erforderlich sein würde. Die in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen ermittelten Gewebekonzentrationen lagen jedoch über den Konzentrationen von funktionsblockierenden Antikörpern, welche in einer transgenen Mauslinie zur Neutralisierung von NGF ausreichend waren. In dieser Mauslinie wurde ein rekombinanter anti-NGF Antikörper unter der Kontrolle des CMV-Promotors mit einer Gewebekonzentration von bis zu 200 ng/ml Hirnextrakt exprimiert (Capsoni *et al.* 2000, Ruberti *et al.* 2000).

Zusammenfassend wurde sowohl die Funktionalität, als auch die Expression des Rezeptorkörpers in den knock-in Mäusen belegt. Auf dem Hintergrund von Erfahrungen mit der Expression von anti-Neurotrophin Antikörpern in transgenen Mäusen lassen die vorliegenden Daten insgesamt den Schluß zu, daß der Rezeptorkörper *in-vivo* effektiv seine Liganden bindet und neutralisiert.

## 5.2.2 Die Deletion von Tau ist vollständig

Die vollständige Deletion von Tau war von großer Bedeutung, da die Expression von nur einzelnen Isoformen oder ungewöhnlichen Speißvarianten des Tau-Proteins einen unerwünschten neuronalen Phänotyp auslösen könnte (Lee *et al.* 2001, Hong *et al.* 1998).

Die vollständige Inaktivierung des *tau*-Gens sollte durch die Deletion des überwiegenden Teils von Exon I herbeigeführt werden. Hierbei sollte das zusammen mit der cDNA in Exon I eingefügte Polyadenylierungssignal als transkriptionelles Stoppsignal wirken und die Transkription von in 3'-Orientierung zu Exon I lokalisierter genomischer Sequenz des *tau*-Gens verhindern. Für den Fall, daß die inserierte cDNA infolge ungewöhnlicher Spleißereignisse wider erwarten ausgespart würde, sollte es sich bei den hierbei entstehenden mRNAs aufgrund der weitgehenden Deletion von Exon I um „nonsens-Transkripte“ handeln, welche Stopcodons in allen 3 Leserastern enthalten und lediglich für wenige AS lange, funktionslose Proteinfragmente kodieren würden. Mit einer vergleichbaren Vorgehensweise wurde in einer früheren Arbeit die vollständige Deletion des Tau-Proteins erzielt (Tucker *et al.* 2001).

Die Abwesenheit von Tau wurde auf der Ebene des Proteins nachgewiesen. Hierbei wurden Lysate verschiedener neuronaler Gewebe mittels Western-Transfer mit einem Antikörper analysiert, der alle 3 Isoformen von Tau der Maus unabhängig vom Grad ihrer Phosphorylierung erkennt (Abb. 26).

Unerwartet war in diesem Zusammenhang die Detektion von insgesamt 3 Transkripten des Rezeptorkörpers mit einer Länge von ca. 3.5 kb, 5 kb und 9.5 kb (Abb. 24). Aufgrund des zusammen mit der cDNA in Exon I inserierten Polyadenylierungssignals wurde nur ein einzelnes Transkript erwartet. Ein „Überlesen“ des Polyadenylierungssignals auf Transkriptionsebene, in die Sequenz des übrigen *tau*-Gens hinein, konnte jedoch ausgeschlossen werden, da die Größendifferenz der in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen gefundenen Transkripte stark von dem Spleißmuster des *tau*-Gens abwich. Zwar liegen in adultem Hirn der Maus ebenfalls 3 Transkripte vor, diese unterscheiden sich in ihrer Länge aber nur durch die alternativ gespleißten 84 bp bzw. 87 bp umfassenden Exons 2 und 3 (Poorkaj *et al.* 2001), nicht jedoch um mehrere 1000 bp wie im vorliegenden Fall. Der Befund ist möglicherweise mit der Existenz nicht-kodierender Exons erklärbar, welche in der genomischen Sequenz 5' zu Exon 0 lokalisiert und alternativ gespleißt sein könnten. Weiterhin könnte ein alternativer transkriptioneller Startpunkt zu dem Entstehen der 3 verschiedenen Transkripte beitragen.

Da es sich bei Tau um ein Mikrotubuli bindendes Protein und einen abundanten Bestandteil des Cytoskeletts handelte, könnte die Deletion von Tau in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen möglicherweise einen unerwünschten Effekt auf axonales Wachstum haben. Dieses Risiko konnte aufgrund von publizierten Befunden ausgeschlossen werden. So zeigten 2 Mauslinien, in denen Tau deletiert (Hirokawa *et al.* 1994) oder durch das Grüne Fluoreszierende Protein (EGFP, engl.: Enhanced Green Fluorescent protein) ersetzt worden war (Tucker *et al.* 2001), keine Anzeichen für ein verändertes axonales Wachstum.

### 5.2.3 Sonstige Eigenschaften

Das äußere Erscheinungsbild von  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen war weitgehend unauffällig, und es gab keine Hinweise auf eine erhöhte prä- oder postnatale Letalität der Mutanten. Die Tiere zeigten eine unbeeinträchtigte Fertilität und keine Anzeichen für sensorische oder motorische Defizite. Auch die Hirnmorphologie verschiedener postnataler Entwicklungsstufen ließ keine offensichtlichen Veränderungen erkennen. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit dem überwiegend unauffälligen Phänotyp der bisher bekannten Mauslinien mit einer Deletion von A-Ephrinen oder EphA-Rezeptoren (EphA2: Naruse-Nakajima *et al.* 2001; EphA4: Dottori *et al.* 1998; EphA8: Park *et al.* 1996; Ephrin-A5: Frisen *et al.* 1998; Ephrin-A2/A5: Feldheim *et al.* 2000).

## 5.3 Spezifische Phänotypen der $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$ Mauslinie

### 5.3.1 Sensorische Projektionen im Rückenmark

Durch die Expression von TrkA bzw. von TrkC sind 2 große, nicht überlappende Subpopulationen von Neuronen in Spinalganglien definiert. Während TrkA-positive Neuronen ausschließlich in dorsale Laminae des Rückenmarks projizieren, terminieren die TrkC-positiven Neuronen in medialen und ventralen Positionen im Rückenmark (2.3.3.1, Abb. 5). Hierbei sind mehrere A-Ephrine im embryonalen Rückenmark, sowie EphA5 spezifisch in TrkA-positiven Neuronen exprimiert (4.1). Dieses Expressionsmuster führte zu der Arbeitshypothese, daß die im Rückenmark vorliegenden A-Ephrine eine repulsive Wirkung spezifisch auf die TrkA-positiven Axone ausüben und das Einwachsen dieser Projektionen in ventrale Rückenmarksbereiche verhindern könnten.

Diese Hypothese wurde mittels immunhistochemischer Färbungen der TrkA-positiven (Abb. 32) und der TrkC-positiven (Abb. 33) Projektionen an Transversalschnitten des Rückenmarks neugeborener Wildtyp und  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäuse überprüft. Hierbei wurden weder in TrkA-, noch in TrkC-positiven Projektionen Unterschiede zwischen Wildtyp und  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen detektiert.

Da lediglich TrkA-, nicht jedoch TrkC-positive Neuronen den EphA5-Rezeptor exprimierten, wurde für die TrkC-positiven Projektionen keine Sensitivität für die im Rückenmark exprimierten A-Ephrine angenommen. Auf diesem Hintergrund entsprach die Übereinstimmung der Topographie TrkC-positiver Projektionen zwischen Wildtyp und  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen der Erwartung.

Entgegen der Arbeitshypothese wurden jedoch für die TrkA-positiven Neuronen in  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen keine Fehlprojektionen in ventralen Bereichen des Rückenmarks beobachtet. Es wurde erwartet, daß diese Axone aufgrund der Neutralisation der A-Ephrine im Rückenmark durch den Rezeptorkörper in  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Tieren zumindest partiell nicht mehr in dorsalen Laminae terminieren, sondern in ventrale Bereiche des Rückenmarks vordringen würden. Für diesen Befund waren die folgenden Erklärungen denkbar.

1) Bei den mit anti-CGRP Antikörpern gefärbten Präparaten wurde eine starke Variabilität zwischen individuellen Tieren beobachtet, die wahrscheinlich zumindest partiell auf dem gemischten genetischen Hintergrund der Tiere beruhte. Durch diese Variabilität, sowie durch eine starke Hintergrundfärbung der Präparate, war die Detektion möglicher subtiler Unterschiede zwischen den TrkA-positiven Projektionen von Wildtyp und  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen erschwert. Möglicherweise hätten mit Hilfe besserer Marker sowie bei Verwendung rückgekreuzter Mäuse subtile Unterschiede in den TrkA-positiven Projektionen neugeborener Tiere detektiert werden können.

Aufgrund der vorliegenden Daten ist es theoretisch immer noch denkbar, daß geringfügige Unterschiede in der Topographie TrkA-positiver Projektionen zwischen

neugeborenen  $\tau_{\text{EphA5lg/EphA5lg}}$  und Wildtyp Mäusen vorliegen, und diese lediglich durch eine hohe Variabilität sowie eine starke Hintergrundfärbung verdeckt waren.

- 2) Als weitere Erklärung für die Abwesenheit TrkA-positiver Projektionen in ventralen Rückenmarksbereichen neugeborener  $\tau_{\text{EphA5lg/EphA5lg}}$  Mäuse ist denkbar, daß zu frühen embryonalen Zeitpunkten entstandene Fehlprojektionen in späteren Entwicklungsstadien bis zur Geburt korrigiert werden.

Während der Embryonalentwicklung der Maus wachsen die Axone der Spinalganglien über das dorsale Horn schon ab E10.5 in Richtung Rückenmark, in welches sie ab etwa E12.5 eintreten. Bei E15.5 haben diese Projektionen alle Laminae des Rückenmarks erreicht, bis die Topographie bei E17.5 weitgehend ausgebildet ist (Ozaki *et al.* 1995). Da die Tiere erst nach Geburt analysiert wurden, könnte eine Korrektur früh entstandener Mißprojektionen während einer Zeitspanne mehrerer Tage stattfinden. Ein ähnlicher „Korrekturvorgang“ wurde z.B. bei Semaphorin III/D defizienten Mäusen beschrieben. Die in diesen Mäusen beobachtete Zunahme von Projektionen unter anderem in der Umgebung der Augen sowie in der vorderen Extremität bei E12.5 war schon bei E15.5 wieder beinahe vollständig abwesend (Taniguchi *et al.* 1997, White *et al.* 2000). Die hier beobachteten Korrekturmechanismen könnten z.B. auf einem Mangel an trophischen Faktoren in der Umgebung der Fehlprojektionen sowie darauf beruhen, daß die mißgeleiteten Projektionen keine funktionellen synaptischen Verbindungen ausbilden können.

Aufgrund dieser Überlegungen wäre es möglich, daß zwar in frühen Embryonalstadien Fehlprojektionen TrkA-positiver Neuronen im Rückenmark von  $\tau_{\text{EphA5lg/EphA5lg}}$  Mäusen vorlagen, diese jedoch mit der Analyse neugeborener Mäuse nicht erfaßt wurden. Die TrkA-positiven Projektionen in Mausembryonen waren einer Analyse mit klassischen Markern wie CGRP oder Substanz P nicht zugänglich, da diese erst ab kurz vor Geburt exprimiert sind (Hall *et al.* 1997).

- 3) Die TrkA-positiven Projektionen sind möglicherweise nicht allein über die Repulsion durch A-Ephrine, sondern über die additive Wirkung mehrerer verschiedener Zielführungsmoleküle auf die dorsalen Laminae des Rückenmarks beschränkt. Nach dieser Annahme hätte die Neutralisierung von A-Ephrinen nur bei gleichzeitiger Deletion anderer Zielführungsmoleküle TrkA-positiver Fehlprojektionen in ventrale Rückenmarksbereiche induzieren können.

Als Kandidat für ein weiteres, spezifisch auf die TrkA-positiven Projektionen wirkendes Zielführungsmolekül kommt insbesondere Semaphorin III/A in Frage. Dieses lösliche, in ventralen Bereichen des embryonalen Rückenmarks von Mäusen exprimierte Protein hat *in-vitro* auf die für ihr Überleben von NGF, nicht jedoch auf die von NT-3 abhängigen Neuronen von Spinalganglien eine repulsive Wirkung (Messersmith *et al.* 1995). Die dokumentierten Befunde an Semaphorin III/A defizienten Mäusen sind jedoch widersprüchlich. Während in der ersten Charakterisierung einer Semaphorin III/A defizienten Mauslinie Fehlprojektionen TrkA-positiver Axone in ventrale Rückenmarksbereiche beobachtet wurden (Behar *et al.* 1996), konnten Taniguchi *et al.*

(1997) diese Befunde an einem unabhängig von der ersten Mutante erzeugten Semaphorin III/A knock-out nicht bestätigen. Auch in anderen Aspekten zeigten die beiden Semaphorin III/A defizienten Mauslinien Unterschiede, so z.B. in einer perinatalen Lethalität homozygoter Mutanten von ca. 70%, welche von Behar *et al.*, nicht jedoch von Taniguchi *et al.* berichtet wurde. Da in beiden Mauslinien derselbe Bereich des *semaphorin III*-Gens deletiert ist, werden diese Diskrepanzen des Phänotyps vorwiegend mit Unterschieden des genetischen Hintergrundes in Verbindung gebracht (Raper *et al.* 2000). Die publizierten Daten ergeben somit kein eindeutiges Bild davon, ob die Repulsion durch Semaphorin III/A allein für die Begrenzung der TrkA-positiven Projektionen auf die dorsalen Rückenmarksbereiche ausreichend ist. Möglicherweise ist jedoch die konzertierte Repulsion durch A-Ephrine und Semaphorin III/A *in-vivo* dafür verantwortlich, daß die TrkA-positiven Projektionen von Spinalganglien in den dorsalen Laminae des Rückenmarks terminieren. Die Abwesenheit TrkA-positiver Fehlprojektionen in  $\tau^{EphA5Ig/EphA5Ig}$  Mäusen könnte hierbei darauf beruhen, daß die von Semaphorin III/A ausgehende Repulsion der TrkA-positiven Projektionen gegenüber der Wirkung von A-Ephrinen dominiert.

Insgesamt wurden an Neugeborenen  $\tau^{EphA5Ig/EphA5Ig}$  Mäusen keine Fehlprojektionen TrkA-positiver Axone im Rückenmark beobachtet. Jedoch sind aufgrund einer hohen Variabilität und der starken Hintergrundfärbung in den gegen CGRP gefärbten Präparaten subtile Defekte der TrkA-positiven Projektionen nicht ausgeschlossen.

In späteren Experimenten ist geplant, die TrkA-positiven Projektionen im Rückenmark von  $\tau^{EphA5Ig/EphA5Ig}$  Mäusen in frühen Embryonalstadien zu analysieren. Für diese Experimente soll eine Mauslinie eingesetzt werden, welche ein aus LacZ und der Mikrotubuli bindenden Domäne von Tau bestehendes Fusionsprotein in allen TrkA-positiven Neuronen exprimiert.

### 5.3.2 Nervenverzweigungen in der Peripherie

Für die Analyse der neuronalen Projektionen von  $\tau^{EphA5Ig/EphA5Ig}$  Mäusen in der Peripherie wurden 2 verschiedene Methoden eingesetzt.

In einer ersten Versuchsserie wurden Nachkommen einer Verpaarung zwischen  $\tau^{EphA5Ig/EphA5Ig}$  Tieren und einer Mauslinie analysiert, welche EGFP im *tau*-Lokus exprimiert ( $\tau^{EGFP/EGFP}$ , Tucker *et al.* 2001). Die Nachkommen aus den Verpaarungen exprimierten von jeweils einem *tau*-Allel den EphA5-Rezeptorkörper sowie EGFP ( $\tau^{EphA5Ig/EGFP}$ ). Diese Tiere lieferten einen raschen und sehr einfachen Zugang zu einem Überblick über das gesamte Innervierungsmuster in der Peripherie, da frische Gewebeproben direkt unter Epifluoreszenz analysiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Jedoch wiesen die Präparate nicht die für eine quantitative Auswertung von Nervenverzweigungen erforderliche Haltbarkeit auf, und die in einzelnen Strukturen teils beträchtliche Hintergrundfluoreszenz erschwerte die Analyse feiner Details.

Aus diesem Grund wurden für den überwiegenden Teil der Experimente immunhistochemische Färbungen an Ganzkörperpräparaten mit einem anti-Neurofilament Antikörper angefertigt. Nachteil dieser Färbungen war der beträchtliche Zeitaufwand, jedoch waren die Präparate über Monate stabil und ermöglichten die Analyse selbst feinsten Strukturen. Weiterhin konnten mit dieser Methode auch Embryonen analysiert werden, welche den Rezeptorkörper von beiden Allelen des *tau*-Gens exprimierten.

In *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen wurde eine signifikante Zunahme von Nervenverzweigungen im Vergleich zu Wildtyp Tieren in den Embryonalstadien E12.5 und E14.5 in einer Vielzahl von Strukturen des PNS beobachtet. Bei Interkostalnerven von Embryonen der Entwicklungsstufe E12.5 wurde in den Segmenten 10-12 (Abb. 37) eine Zunahme der Gesamtzahl an Verzweigungspunkten um durchschnittlich 20.6% sowie der Gesamtlänge der Projektionen um 12.6% gefunden (Abb. 38).

Als mögliche Ursachen für die Zunahme an Nervenverzweigungen in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen sind hierbei ein verstärktes *de-novo* Wachstum von Nervenfortsätzen, eine Zunahme der Zahl von Neuronen, sowie die Defaszikulierung von Nerven denkbar.

1) In einer neueren Arbeit konnten Yates *et al.* (2001) für RGZ zeigen, daß A-Ephrine neben dem Auswachsen von Axonen auch die *de-novo* Ausbildung axonaler Verzweigungen inhibieren können. Da in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen auch die inhibierende Wirkung von A-Ephrinen auf die Ausbildung von axonalen Verzweigungen neutralisiert ist, könnte die Zunahme an Nervenverzweigungen in dem knock-in möglicherweise auf einer erhöhten *de-novo* Ausbildung von Verzweigungen beruhen.

Nach diesem Erklärungsansatz wäre die verstärkte *de-novo* Ausbildung von Verzweigungen auf Nerven beschränkt, in deren Umgebung A-Ephrine exprimiert sind. Diese Forderung steht in Einklang mit der Beobachtung, daß es sich bei der Zunahme von Nervenverzweigungen in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen nicht um ein generalisiertes, sondern auf bestimmte Nerven beschränktes Phänomen handelte.

2) Die Zunahme von Nervenverzweigungen in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen könnte auch auf einer vergrößerten Zahl von Neuronen beruhen. Hierbei würden die neuronalen Fortsätze möglicher zusätzlicher Neuronen zu der erhöhten Zahl der Nervenverzweigungen in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen beitragen. Da jedoch bislang nur wenige Hinweise auf eine Funktion der Eph-Familie für das Überleben von Zellen vorliegen, handelt es sich hierbei um einen vorwiegend theoretischen Erklärungsansatz, der eine experimentelle Überprüfung erfordert.

3) In Mäusen sind mehrere A-Ephrine ab E10.5 im ventralen Aspekt sowie in der unmittelbaren Umgebung von Somiten exprimiert (Gale *et al.* 1996), mit denen die aus der ventralen Wurzel des Rückenmarks austretenden Interkostalnerven in Kontakt kommen. Die hierdurch ausgelöste Aktivierung der auf Interkostalnerven exprimierten EphA-Rezeptoren könnte einen wichtigen Beitrag zur Faszikulierung dieser Nerven leisten. Zu der Bündelung der Interkostalnerven könnte hierbei sowohl die Regulierung

von Zelladhäsionsmolekülen, als auch die von der unmittelbaren Gewebsumgebung der Nerven ausgehende repulsive Wirkung beitragen. Auf diesem Hintergrund könnte eine Defaszikulierung von Nerven zu der Zunahme von Nervenverzweigungen beitragen.

Eine Bedeutung von A-Ephrinen für die Faszikulierung von Axonen geht auch aus *in-vitro* Experimenten von Winslow *et al.* (1995, 2.3.3.2) hervor: In Kulturen EphA5-positiver kortikaler Neuronen auf einer Unterlage von Astrocyten ist die Faszikulierung von Nervenfortsätzen blockiert, wenn das auf Astrocyten exprimierte Ephrin-A1 durch Zugabe eines EphA5-Rezeptorkörpers in das Kulturmedium neutralisiert wird. Winslow *et al.* vermuten, daß Ephrine die Faszikulierung von Nervenfortsätzen lediglich indirekt beeinflussen. Hierbei könnte die Regulation von Zelladhäsionsmolekülen durch die Interaktion von A-Ephrinen mit ihren Rezeptoren eine Rolle spielen, wie sie für  $\beta$ 1-Integrin kürzlich auf Zelllinien gezeigt werden konnte (Davy *et al.* 2000).

Von diesen möglichen Erklärungsansätzen für die Zunahme von Nervenverzweigungen in  $\tau$ <sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen erscheinen eine erhöhte *de-novo* Ausbildung von Nervenverzweigungen sowie die Defaszikulierung von Nerven am wahrscheinlichsten. Deutliche Anzeichen einer Defaszikulierung wurden hierbei nicht nur in Interkostalnerven, sondern auch in der Innervierung von Extremitäten, dem Schweif (Daten nicht gezeigt) sowie dem Nervus facialis (Daten nicht gezeigt) beobachtet. Dieser Erklärungsansatz steht im Einklang mit dem dokumentierten Expressionsmuster von A-Ephrinen und ihren Rezeptoren während der Embryonalentwicklung sowie mit der Beobachtung, daß das grundlegende Innervierungsmuster in der Peripherie in  $\tau$ <sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen erhalten ist.

Eine definitive Antwort auf die Frage, in welchem Umfange die Zunahme von Nervenverzweigungen in  $\tau$ <sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen auf einer verstärkten *de-novo* Ausbildung von Nervenverzweigungen oder auf der Defaszikulierung von Nervensträngen beruht, wäre mit Hilfe von Elektronenmikroskopie möglich gewesen. Hierbei sollten defaszikulierte Nerven eine weitgehend unveränderte Anzahl, jedoch eine weniger dicht gepackte Anordnung von Axonen aufweisen. Eine Überprüfung der Hypothese ist auch mit Hilfe von Kulturen dissoziierter Neuronen aus Spinalganglien denkbar. In diesen Kulturen läßt sich insbesondere bei hoher Zelldichte nach einigen Tagen eine ausgeprägte Faszikulierung von Neuriten beobachten. Falls sich diese Faszikulierung durch die Gegenwart von Rezeptorkörper im Kulturmedium blockieren ließe, so wäre dies ein Hinweis darauf, daß Defaszikulierung zu der Zunahme von Nervenverzweigungen in  $\tau$ <sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen beiträgt.

### 5.3.3 Blutgefäße

Ausgangspunkt für die Analyse von Blutgefäßen in  $\tau$ <sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen waren Beobachtungen an immunhistochemischen Färbungen von Gewebeschnitten juveniler Mäuse mit einem anti-Calbindin Antiserum. Eine Kreuzreaktivität dieses Antiserums mit einem nicht identifizierten Epitop in Blutgefäßen (Abb. 39), sowie anschließende Färbungen gegen den Endothelzellmarker CD31 (Abb. 40) lieferten Hinweise auf eine

erhöhte Dichte sowie veränderte Anordnung von Blutgefäßen in Hirngewebe des knock-in. Diese Beobachtungen standen in Einklang mit der bekannten Funktion von Ephrin-A1 für die Blutgefäßentwicklung und der dokumentierten starken Expression dieses Ephrins an Orten akuter Angiogenese (2.3.3.4).

Die Hinweise aus den Färbungen wurden mit Hilfe von Korrosionsausgüssen adulter Tiere überprüft. Während die Methode sowohl einen optimalen Überblick über die dreidimensionale Gefäßstruktur, als auch die Analyse feinsten Details von Blutgefäßen erlaubte, wurden in  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen keine offensichtlichen Veränderungen in der dreidimensionalen Gefäßstruktur detektiert. Zwischen den Befunden aus den immunhistochemischen Färbungen und den Korrosionsausgüssen liegt eine offensichtliche Diskrepanz vor.

Wie aus Abb. 39 und 40 hervorgeht, waren die Veränderungen der Blutgefäße in  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen besonders deutlich in innenliegenden Geweberealen in Strukturen mit einer ausgeprägten Zellschichtung, wie z.B. dem Hippocampus. Bei der Analyse der Korrosionsausgüsse war jedoch lediglich die Oberfläche der Präparate einer Analyse mit dem Scanning Elektronenmikroskops zugänglich. Hierbei kam erschwerend hinzu, daß Struktur und Anordnung von Blutgefäßen unabhängig vom Genotyp große Unterschiede zwischen verschiedenen Einzeltieren aufwiesen. Da vergleichbare Schwankungen auch an Inzuchtieren gefunden wurden (Alexandra Schuler, persönliche Mitteilung), trägt der gemischte genetische Hintergrund der  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäuse wahrscheinlich nur unbedeutend zu der beobachteten Variabilität bei.

Zwar können subtile Veränderungen der Blutgefäße in innenliegenden Gewebereichen nicht sicher ausgeschlossen werden, jedoch ist es aufgrund der vorliegenden Daten insgesamt eher wahrscheinlich, daß die Blutgefäße in  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäuse nicht reproduzierbar verändert waren. Diese Befunde waren eine wichtige Grundlage für die Analyse der Retinotopie mit Hilfe von ISOI, einer Meßmethode, welche ein intaktes Gefäßmuster insbesondere in oberflächlichen Bereichen des Cortex voraussetzt.

### 5.3.4 Visuelles System

Die Familie von A-Ephrinen und ihren Rezeptoren spielt eine wichtige Rolle für die Entwicklung der topographischen Projektionen von RGZ zu ihren unmittelbaren Zielgebieten im Mittel- und Vorderhirn (2.3.3.1). Auf diesem Hintergrund war die Analyse des visuellen Systems in  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen von besonderem Interesse. Während sich jedoch frühere Untersuchungen auf die Projektionen von RGZ zum Colliculus superior und zum NGL konzentrierten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von A-Ephrinen für die topographische Repräsentation der Retina im Cortex untersucht.

Die Verarbeitung von aus der Umwelt und dem Körperinneren aufgenommenen sensorischen Informationen erfolgt in spezialisierten Bereichen des Neocortex, in welchem die unterschiedlichen Sinnesorgane topographisch repräsentiert sind. In der Maus werden hierbei die in der Retina erzeugten sensorischen Informationen zunächst in

die unmittelbaren Zielgebiete der RGZ im Mittel- bzw. Vorderhirn, den Colliculus superior und den NGL projiziert. In einem zweiten Schritt werden diese Informationen vom NGL in den PVC weitergegeben (2.3.3.1). Die Abbildung der visuellen Informationen im PVC wird als Retinotopie bezeichnet.

In  $\tau\text{au}^{\text{EphA5lg/EphA5lg}}$  Mäusen war die grundlegende Struktur der Retinotopie erhalten, zeigte jedoch im Vergleich zu Wildtyp Tieren einige spezifische Veränderungen. Diese werden für die größte Substruktur des PVC, das sog. Areal 17, im folgenden diskutiert. Die gemittelten retinotopen Karten von  $\tau\text{au}^{\text{EphA5lg/EphA5lg}}$  Mäusen wiesen eine Kompression entlang der medial-lateralen Achse auf (Abb. 44). Hierbei ergab zwar die Stimulation aller Bereiche der Retina ein Signal in Areal 17 des PVC, und auch die Gesamtgröße von Areal 17 war in  $\tau\text{au}^{\text{EphA5lg/EphA5lg}}$  Mäusen nur wenig verändert. Jedoch war der Abstand zwischen einzelnen Bereichen neuronaler Aktivität speziell im medialen Aspekt von Areal 17 verringert. Als Konsequenz dieser Kompression war der temporale Bereich der Retina, der im medialen Bereich von Areal 17 abgebildet ist, auf einer kleineren Fläche des Cortex repräsentiert. Zur Erklärung dieser Kompression der retinotopen Karte sind vorwiegend 2 Erklärungsansätze denkbar.

- 1) In dem ersten Erklärungsmodell sind Ursache und Entstehungsort für die Veränderungen der Retinotopie im NGL, nicht jedoch im PVC lokalisiert. Nach dieser Überlegung löst die Neutralisierung von A-Ephrinen eine Verzerrung der topographischen Projektionen von den RGZ zum NGL aus, die nachfolgend weitgehend unverändert im PVZ abgebildet wird.

Dieses Erklärungsmodell baut auf den Befunden retrograder Markierungsexperimente auf, welche an Ephrin-A5 defizienten ( $\text{Ephrin-A5}^{-/-}$ , Feldheim *et al.* 1998) sowie an Ephrin-A5/Ephrin-A2 defizienten ( $\text{Ephrin-A5/A2}^{-/-}$ , Feldheim *et al.* 2000) Mäusen durchgeführt wurden. Hierbei sind in den subcortikalen Strukturen des visuellen Systems der Maus die Ephrine A2 und A5 am stärksten exprimiert. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, daß die topographischen Projektionen in den subcortikalen Komponenten des visuellen Systems in  $\tau\text{au}^{\text{EphA5lg/EphA5lg}}$  Mäusen qualitativ dieselben Veränderungen aufweisen, wie sie für  $\text{Ephrin-A5}^{-/-}$  bzw.  $\text{Ephrin-A5/A2}^{-/-}$  Mäuse beschrieben wurden.

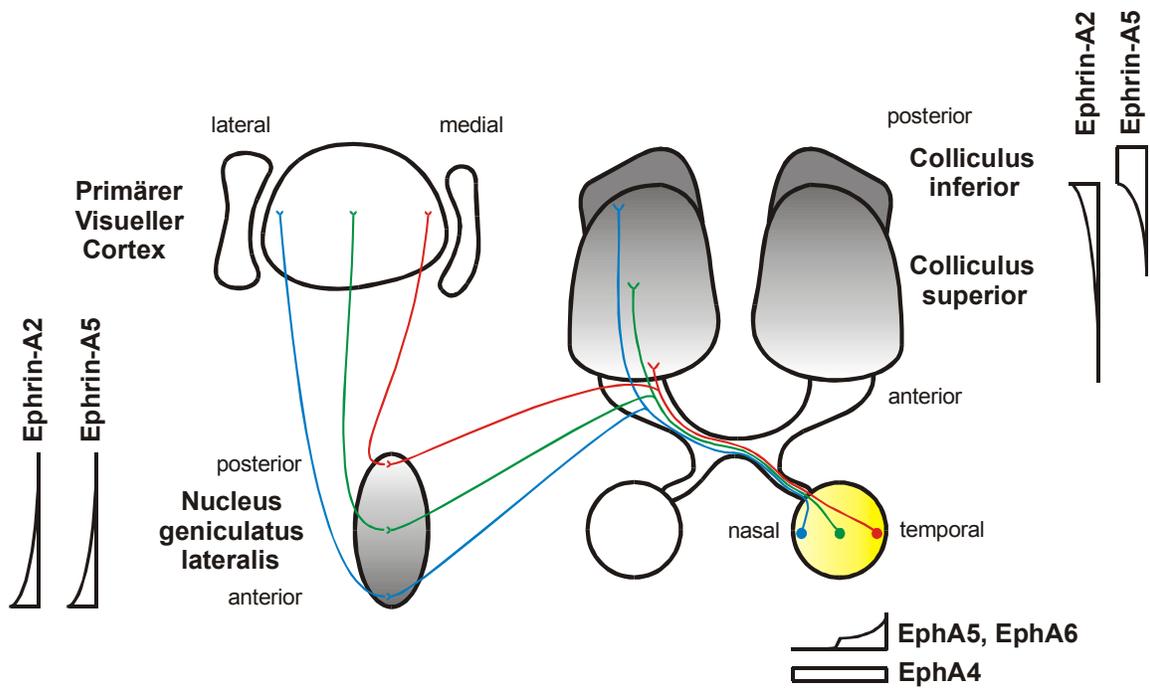
Wie in Abb. 45 schematisch dargestellt, löst die Deletion von Ephrinen eine Veränderung der topographischen Projektionen von den RGZ in den Colliculus superior und den NGL aus. Hierbei sind die Projektionen von RGZ aus dem temporalen Bereich der Retina, die eine besonders hohe Sensitivität für Ephrine besitzen, am stärksten betroffen. Während die Projektionen aus den temporalen RGZ in der Wildtyp Situation im posterioren Bereich des NGL bzw. dem anterioren Bereich des Colliculus superior terminieren, projizieren diese Axone in Ephrin defizienten Mäusen vorwiegend in den anterioren Aspekt des NGL und den posterioren Bereich des Colliculus superior. Zwar sind die retinalen Projektionen auch in Ephrin defizienten Mäusen noch über den gesamten NGL und den gesamten Colliculus superior verteilt (in Abb. 45 nicht dargestellt), jedoch kommt es insgesamt zu einer Konzentration der Projektionen im anterioren Aspekt des NGL bzw. im posterioren Bereich des Colliculus superior.

Die Kompression der retinotopen Karte in  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen ließe sich hierbei mit einer einfachen Abbildung der topographischen Projektionen aus dem NGL in Areal 17 des PVC erklären: Eine Konzentration der retinalen Projektionen im anterioren Aspekt des NGL spiegelt sich in einer Stauchung des medialen Bereichs der retinotopen Karte in Areal 17 wider. Da die retinalen Projektionen auch in Ephrin defizienten Mäusen noch über den gesamten NGL verteilt sind, steht diese Erklärung auch in Einklang mit der Beobachtung, daß die Gesamtgröße von Areal 17 in  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Tieren nur wenig verändert ist. Nach diesem Erklärungsansatz wären lediglich die retinalen Projektionen in den NGL verzerrt, die topographischen Projektionen vom NGL zum PVC hingegen weitgehend unverändert.

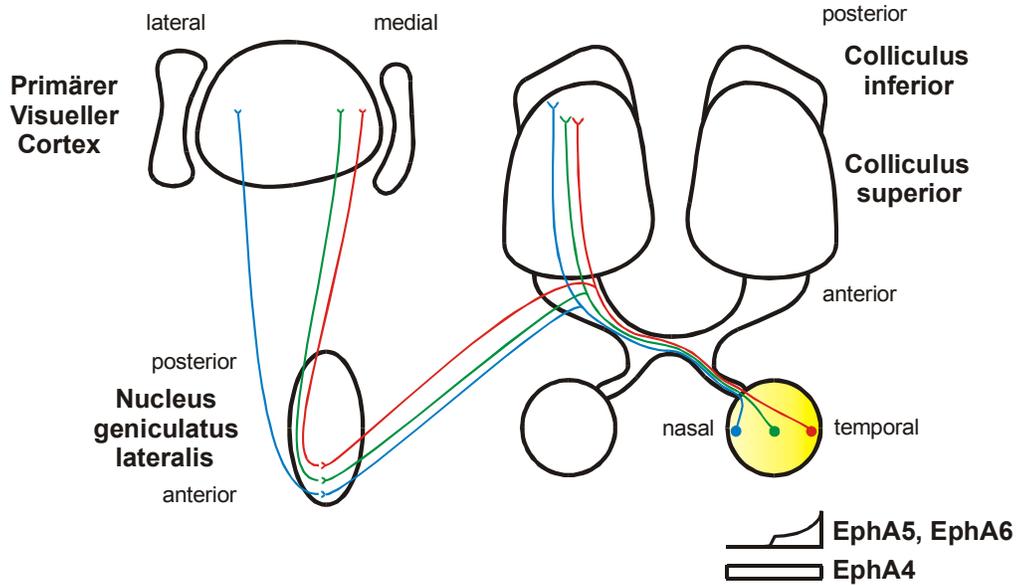
**Abb. 45: (folgende Seite) Erklärungsmodell für die Verzerrung der Retinotopie in  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen.**

- a) In der Wildtyp Situation projizieren die Axone aus dem nasalen Bereich der Retina in den posterioren Bereich der Retina und den anterioren Bereich des NGL, Axone aus dem temporalen Bereich der Retina terminieren hingegen im anterioren Bereich des Colliculus superior und dem posterioren Bereich des NGL. Die Struktur der Projektionen vom NGL zum Cortex, welche der Abbildung dieser Topographie im PVC zugrunde liegen, sind bislang weitgehend ungeklärt.
- b) Die Neutralisierung von A-Ephrinen führt zu einer Verzerrung der topographischen Projektionen von der Retina in den Colliculus superior sowie in den NGL. Die Abbildung der im NGL vorliegenden Verzerrung der Topographie im PVC ist die wahrscheinlichste Erklärung für die Stauchung der retinotopen Karte in  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen, die im medialen Bereich von Areal 17 besonders ausgeprägt ist.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Projektionen der Retina zum ipsilateralen NGL, die leichte Verdrehung des NGL gegen die anterior-posteriore Achse sowie die Expression von Ephrinen auf retinalen Axonen in der Skizze nicht berücksichtigt.



a) Retinotopie in der Wildtyp Situation



b) Retinotopie nach Neutralisierung von A-Ephrinen

2) Das zweite Erklärungsmodell geht davon aus, daß sich die Veränderungen der Retinotopie aus 2 Komponenten zusammensetzen. Nach diesem Erklärungsansatz kommt es sowohl bei der Projektion von der Retina zum NGL, als auch in der nachgelagerten Verschaltung vom NGL zum PVC zu Verzerrungen der Topographie, deren Addition die veränderte Retinotopie in den  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen auslöst.

Diese Erklärung setzt voraus, daß auch die Projektionen aus dem NGL in den PVC eine Sensitivität für A-Ephrine besitzen, und daß weiterhin A-Ephrine in Form eines Gradienten in Areal 17 exprimiert sind. Zur Expression und Gewebsverteilung von EphA5 innerhalb des NGL während der Entwicklung liegen bislang nur wenige Daten vor. Bisher wurde lediglich eine schwache und homogene Expression von EphA5 im NGL in perinatalen Entwicklungsstadien beschrieben (Gao *et al.* 1998). Im Cortex wurde die Expression der Ephrine A2, A3 und A5 beschrieben, wobei alle 3 A-Ephrine im PVC im Vergleich mit anderen kortikalen Strukturen nur wenig prominent und ohne erkennbaren Gradienten exprimiert sind (Vanderhaeghen *et al.* 2000). Aufgrund dieser Expressionsdaten ist es wenig wahrscheinlich, daß auch in der Verschaltung vom NGL zum PVC eine Verzerrung der Topographie stattfindet, welche zur Stauchung der retinotopen Karte in  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen beiträgt.

Zusammenfassend entsteht die Veränderung der Retinotopie in  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen wahrscheinlich vorwiegend durch die Verzerrung der Projektionen von der Retina in den NGL. Die Abbildung dieser Verzerrung in der neuronalen Verschaltung vom NGL zum PVC bedingt die in dem knock-in beobachtete Kompression der retinotopen Karte.

Zusätzlich zu der Kompression der retinotopen Karte war die Abgrenzung der einzelnen Bereiche neuronaler Aktivität im PVC von  $\tau^{EphA5lg/EphA5lg}$  Mäusen diffuser als in Wildtyp Tieren (Abb. 43). Auch bei dieser Beobachtung können Ort und Ursache für die Entstehung dieser Veränderung sowohl in der Projektion von RGZ in den NGL, als auch in der neuronalen Verschaltung vom NGL in den PVC lokalisiert sein.

Aus Beobachtungen an Ephrin-A5<sup>-/-</sup> Mäusen geht hervor, daß A-Ephrine bei der Fokussierung der Terminierungszone von RGZ eine wichtige Rolle spielen. So sind die Terminierungszonen retinaler Projektionen im NGL in Ephrin-A5<sup>-/-</sup> Mäusen nicht nur entlang der anterior-posterioren Achse verschoben, sondern haben auch eine wesentlich diffusere Struktur als in Wildtyp Tieren (Feldheim *et al.* 1998).

Einen Erklärungsansatz für diese mangelnde Fokussierung der Terminierungszonen von RGZ liefern Beobachtungen aus den retinocolliculären Projektionen. Während der Embryonalentwicklung von Nagetieren projizieren RGZ zunächst mit einer diffusen Topographie in den Colliculus superior. Im Verlauf der ersten postnatalen Woche kommt es zu einer Remodellierung der retinocolliculären Topographie, in deren Folge Verzweigungen retinaler Projektionen ausschließlich an ihren korrekten Terminierungszonen im Colliculus superior beobachtet werden (Simon *et al.* 1992). Neuere Arbeiten weisen darauf hin, daß A-Ephrine eine wichtige Rolle bei dieser Remodellierung spielen, indem sie die Ausbildung von Verzweigungen an inkorrekten Positionen inhibieren (Yates *et al.* 2001). In den Experimenten von Yates *et al.* induzierte

die Neutralisierung von A-Ephrinen *in-vitro* die Entstehung ektopischer Verzweigungen auf retinalen Projektionen. Diese Beobachtungen machen es wahrscheinlich, daß A-Ephrine auch im NGL die Ausbildung von Verzweigungen an inkorrekten Positionen inhibieren. Gemäß dieser Annahme löst die Neutralisierung von A-Ephrinen im NGL die Ausbildung ektopischer Verzweigungen aus, die sich in der diffusen Struktur der Terminierungszonen retinaler Ganglienzellen widerspiegelt. Die Abbildung dieser diffusen Terminierungszonen vom NGL in den PVC trägt möglicherweise zu der diffusen Abgrenzung individueller Bereiche neuronaler Aktivität in der retinotopen Karte in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen bei.

Aufgrund der geringen Expression von EphA-Rezeptoren im NGL und von A-Ephrinen im PVC (siehe oben) ist es wahrscheinlich, daß auch diese Veränderung der retinotopen Karte primär in den Projektionen von der Retina in den NGL entsteht und über die nachgelagerte Verschaltung zum Cortex im PVC abgebildet wird.

Darüber hinaus könnte auch eine Defaszikulierung von Nervenfasern, wie sie in der Peripherie beobachtet wurde (4.4.5.2), zu der diffuseren Abgrenzung einzelner Bereiche neuronaler Aktivität im PVC in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen beitragen. Zwar wurden die prominenten Nervenfasern des visuellen Systems im Rahmen dieser Arbeit nicht auf Defaszikulierung analysiert. Jedoch läßt die Expression von 3 verschiedenen EphA-Rezeptoren sowie 2 verschiedenen A-Ephrinen im Nervus opticus die Vermutung zu, daß insbesondere dieser Nerv eine hohe Sensitivität für die Neutralisierung von A-Ephrinen aufweist und in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen Anzeichen von Defaszikulierung zeigen könnte. Eine Defaszikulierung des Nervus opticus könnte hierbei zu einer reduzierten Fokussierung der Terminierungszone retinaler Projektionen in den NGL beitragen, die sich in der diffuseren Abgrenzung von Bereichen neuronaler Aktivität im PVC niederschlägt.

Eine interessante Erweiterung dieser Befunde ergab sich aus dem Vergleich der in adulten *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen gefundenen Veränderungen der Retinotopie mit präliminären Beobachtungen an juvenilen Tieren. Zwar stimmten die in juvenilen Tieren beobachteten Veränderungen qualitativ mit den Befunden aus adulten Tieren weitgehend überein, jedoch waren die Effekte in jüngeren Tieren erheblich stärker ausgeprägt (Mark Hübener, persönliche Mitteilung). Welche Erklärungen sind für diese Altersabhängigkeit denkbar?

Offensichtlich kommt es in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen zu einer Reorganisation der retinotopen Karte, die vermutlich zumindest partiell auf der Ebene der Projektionen von der Retina zum NGL stattfindet. In Mäusen erreichen die retinalen Projektionen den NGL bei E16, in dem sie sich bis zur Geburt in einer diffusen topographischen Karte anordnen, die etwa nach der ersten postnatalen Woche vollständig entwickelt ist (Godement *et al.* 1984). Wie Experimente an Ephrin-A defizienten Mäusen zeigen, spielen die im NGL exprimierten Ephrine A2 und A5 eine zentrale Rolle bei der Etablierung dieser Topographie (Abb. 45). Hierbei nimmt die Expression von Ephrin-A2 und Ephrin-A5 im NGL etwa nach der ersten postnatalen Woche stark ab (Feldheim *et al.* 1998). Aus diesen

Befunden geht hervor, daß die in Ephrin-A defizienten Mäusen beobachteten Fehlprojektionen schon kurz nach der Geburt voll ausgebildet sein müssen. Da Ephrin-A2 und Ephrin-A5 als einzige A-Ephrine im NGL exprimiert sind, nimmt mit der verringerten Expression dieser Ephrine zugleich die Sensitivität der retinalen Projektionen im NGL für den Rezeptorkörper ab. Diese verringerte Sensitivität ist möglicherweise die Grundlage für die Reorganisation der topographischen Projektionen im NGL, die sich in einer partiellen Korrektur der verzerrten Retinotopie beim Übergang von juvenilen zu adulten Tieren widerspiegelt.

Als molekulare Triebkraft für diese Korrektur von Fehlprojektionen im NGL ist die „Kompetition“ benachbarter Axone um die okkupierte Fläche im Zielgewebe denkbar. Eine derartige Kompetition von retinalen Axonen wurde von Brown *et al.* (2000) aufgrund von Beobachtungen an einer Mauslinie vorgeschlagen, welche EphA3 in einer Subpopulation von RGZ unter dem *Islet2*-Promotor exprimiert. Diese Mauslinie zeigt eine Verdrängung von korrekt lokalisierten Projektionen im Colliculus superior durch fehlgeleitete Axone, die mit einer Kompetition zwischen Axonen um ihr Zielgewebe erklärt wurde. Möglicherweise treibt diese Kompetition der retinalen Axone um ihr Zielgewebe eine Reorganisation der Projektionen im NGL an, die sich in einer zumindest partiellen Korrektur der verzerrten Topographie im NGL niederschlagen könnte.

Die hier beobachtete Plastizität unterscheidet das visuelle System von topographischen Karten des Primären Somatosensorischen Cortex (PSC). So wurde in Ephrin-A5<sup>-/-</sup> Mäusen eine Verzerrung der Repräsentation von Barthaaren in einem spezialisierten Bereich des PSC, dem sog. Barrel Cortex, beobachtet, die auf der Expression von Ephrin-A5 im PSC in Form eines Gradienten beruht (Vanderhaeghen *et al.* 2000). Anders als bei der Retinotopie wurden für diese Verzerrung jedoch weder qualitative noch quantitative Unterschiede beim Vergleich von neonatalen mit adulten Tieren beobachtet.

Für die Veränderungen der Retinotopie in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen sind physiologische Implikationen denkbar. Aus Beobachtungen am PSC von Säugetieren ist bekannt, daß die jeweilige Fläche des Cortex, mit der verschiedene Areale der Körperoberfläche repräsentiert sind, proportional ist zur Bedeutung der sensorischen Information, welche der Organismus über die betreffenden Bereiche der Körperoberfläche aufnimmt. Hierbei liegen Hinweise darauf vor, daß die sensorische Leistungsfähigkeit eines Areals der Körperoberfläche mit dem Flächenanteil im sensorischen Cortex korreliert, welcher den entsprechenden Bereich der Körperoberfläche zugeordnet ist (Übersichtsarbeit: Buonomano *et al.* 1998).

Aufgrund der Kompression der retinotopen Karte in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen war der laterale Bereich der Retina im Vergleich zu Wildtyp Tieren auf einer kleineren Fläche des Cortex repräsentiert. Als mögliche Konsequenz dieser Kompression der retinotopen Karte ist ein verringertes visuelles Auflösungsvermögen in bestimmten Bereichen des Sehfeldes denkbar. Das im Vergleich zu anderen Sinnesinformationen geringe Gewicht der visuellen Wahrnehmung für Nagetiere war vermutlich Ursache dafür, daß die Veränderungen der Retinotopie keine offensichtlichen Verhaltensänderungen der *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäuse zur Folge hatten.

## 5.4 Ausblick

In weiteren Experimenten soll die Bedeutung von A-Ephrinen für die Etablierung nozizeptiver Projektionen von Spinalganglien in das Rückenmark während der Embryonalentwicklung analysiert werden. Zu Beginn dieser Arbeit waren keine etablierten Marker verfügbar, welche diese Fraktion sensorischer Projektionen in pränatalen Entwicklungsstadien vollständig erfaßte. Für zukünftige Experimente steht jedoch eine Mauslinie zur Verfügung, welche ein Fusionsprotein aus LacZ und dem Mikrotubuli bindenden Teil von Tau unter der Kontrolle des *trkA*-Promotors von frühen Embryonalstadien an exprimiert.

Mit Hilfe retrograder Markierungstechniken sollen die topographischen Projektionen von der Retina in den NGL und den Colliculus superior in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Experimente sollen das Verständnis der veränderten Retinotopie in *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen vervollständigen. Weiterhin soll die Analyse der Retinotopie in juvenilen *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> Mäusen fortgesetzt und einem detaillierten Vergleich mit den in adulten Tieren gewonnenen Befunden unterzogen werden.

## 6 Material und Methoden:

### 6.1 Materialien

#### 6.1.1 Geräte

Acrylamid Minigelsystem (Hoefer)	PROCISE Protein Sequencing Systems (Applied Biosystems)
Agarose-Gelkammern (MWG Biotech)	Röntgengenerator STABILIPAN 2 (Siemens) mit Röntgenröhre TR300f (Siemens)
DNA Sequencer 373 (Applied Biosystems)	Säulen für die Chromatographie (Sigma)
Eierinkubator (W. Ehret GmbH)	Schüttler Unitwister (Uniequip)
ELISA-Lesegerät Thermo max microplate reader (Molecular Devices)	Spannungsquelle Standard Power Pack P25 (Bioemetra)
Filmentwicklermaschine CURIX 60 (Agfa)	SpeedVac Vakuumentrifuge Univapo 100H (Uniequip)
Fluoreszierendes Lineal (Stratagene)	Spektrophotometer Ultrospec 3000 pro (Amersham)
Gefriermikrotom CM 3050 S (Leica)	Stereomikroskop MZ12 <sup>5</sup> mit Photographiereinrichtung (Leica)
Geldokumentationssystem Eagle Eye (Stratagene)	Szintillationszähler LS 500 TA (Beckman)
GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer)	Sterilwerkbank Skan Modell 0.9 (Skan)
Genepulser II mit Capacitance Extender Plus (BioRad)	TE 42 Transfor II Tank Blotting System (Amersham)
Heizblock (Eppendorf)	UV Stratalinker (Stratagene)
Inkubator für Bakterienkulturen (Heraeus)	UV Transilluminator 302 nm (Bachofer)
Konfokalmikroskop BX61 (Olympus)	VacuGene XL Vacuum Blotting System (Amersham)
Microinjector 5242 (Eppendorf)	Vertikalschüttler (Unitwist)
Mikromanipulator 5170 (Eppendorf)	Wasserbäder (Haake)
Mikroskope Axioplan II mit CCD-Kamera AxioCam und Software Axiovision (Zeiss)	Zellinkubatoren IG150 (Jouan), Cytoperm II (Heraeus)
MilliQ Wasseraufbereitungsanlage (Millipore)	Zentrifugen PicoFuge (Roth), Tischzentrifuge 3-15 (Sigma), Tischzentrifuge 3K30 (Sigma), RC-5B (Sorvall), 5415C (Eppendorf)
Mr. Frosty Einfriergerät (Nalgene)	
Peristaltikpumpe Minipuls 2 (Gilson)	
pH Meter 766 Calimatic (Knick) mit Einstabmeßkette (Mettler Toledo)	
Phosphoimager FujiX BAS 1000 (Fuji)	
Pipettenziehgerät Flaming/Brown Micropipette Puller P97 (Sutter Instrument Co)	

#### 6.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von Sigma oder Merck in der jeweils höchsten zur Verfügung stehenden Reinheit bezogen. Einwegmaterial für die Zellkultur stammen von Nunc, Falcon und Greiner.

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dCTP (Hartmann Analytik)	ABI PRISM BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
[ $\alpha$ - <sup>35</sup> S] UTP (Amersham)	Acrylamid (Biorad)
2-Mercaptoethanol (Sigma)	all-trans-Retinol (Sigma)
3-Aminopropyl-trimethoxysilan (TESPA, Fluka)	Ammoniumpersulfat (APS, BioRad)
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid (X-Gal, Sigma)	Ampicillin (Sigma)
	Benzoylbenzoat (Merck)

- Benzylalkohol (Merck)  
 Biotin (Sigma)  
 BM Blue POD Substrate (soluble) Substratlösung (Roche)  
 BSA für die Zellkultur (Sigma)  
 Colcemid (Sigma)  
 Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva)  
 D-Galactose (Sigma)  
 DC Proteinassay (Biorad)  
 Deconex Fertiglösung von Merck  
 desoxy-Ribonukleotide (dNTPs, Gibco)  
 Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma)  
 DNA Gel Extraction Kit (Quiagen)  
 ECL<sup>+</sup>-Chemolumineszenz-Detektionssystem (Amersham)  
 Elektroporationsküvette mit 0.4 cm Elektrodenabstand (Biorad)  
 Embryo-getestetes leichtes Paraffinöl (Sigma)  
 Entellan Einbettmittel für Mikroskopie (Merck)  
 Eosin Y (Merck)  
 ESGRO Murine Leukemia Inhibitory Factor (Gibco)  
 Ethanolamin (Sigma)  
 Fötale Kälberserum (FCS, Roche, sowie Sigma)  
 G418 (Gibco)  
 Gelatine (Sigma)  
 Gewebekulturschalen (Falcon, Nunc, Costar, Greiner)  
 Giemsa Färbelösung (Gibco)  
 Glasplättchen rund 13 mm (Assistent)  
 Glutaraldehyd, 30-prozentige Lösung, Qualität für die Elektronenmikroskopie (Serva)  
 Glutathion (Sigma)  
 Gurr Puffer Tabletten (Gibco)  
 Humanes Chorion Gonadotropin (hCG, Sigma)  
 HybondN<sup>+</sup> Nylonmembran (Amersham)  
 Hybond-XL Nylonmembran (Amersham)  
 ImmobilonP Membran mit 0.2 µm Porenweite (Millipore)  
 Immunofluor Einbettmittel für Mikroskopie (ICN)  
 Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG, Sigma)  
 Kanamycin (Sigma)  
 Katalase (Sigma)  
 Ketamin (Handelsname „Ketanest“, Parke-Davis)  
 L-Alanin (Sigma)  
 L-Carnitin (Sigma)  
 L-Glutamin (100x Lösung, Gibco)  
 L-Prolin (Sigma)  
 Linolensäure (Sigma)  
 Linolsäure (Sigma)  
 Molekulargewichtsmarker „1 kb DNA ladder“ (Gibco)  
 Molekulargewichtsmarker „50 bp DNA ladder“ (Gibco)  
 Molekulargewichtsmarker für Proteine „Rainbow coloured protein molecular weight markers“ (Amersham)  
 Molekulargewichtsmarker für Proteine „Silver Stain SDS-Page Standard Low range“ (Biorad)  
 Molekulargewichtsmarker für RNA (Gibco)  
 N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin (TEMED, Sigma)  
 Natriumpyruvat (100x Lösung) (Gibco)  
 Natriumpyruvat (Sigma)  
 Natriumselenit (Sigma)  
 Objektträger 76×26 mm mit Mattrand von Assistent  
 Oligolabelling Kit (Amersham)  
 Oligotex mRNA Purification Kit (Quiagen)  
 Papanicolaus 1a Färbellösung (Merck)  
 PAP-PEN (DAKO)  
 Parafilm (American National Can)  
 PCR Purification Kit (Quiagen)  
 Penicillin (Gibco)  
 Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1 (Sigma)  
 Photographische Emulsion NTB-2 für die Autoradiographie (Kodak)  
 Plasmidisolierungskit (Quiagen)  
 Poly-DL-Ornithin Hydrobromid (Sigma)  
 Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG, Sigma)  
 ProbeQuant G-50 Micro Columns (Amersham)  
 Progesteron (Sigma)  
 Proteaseinhibitor Mischung „Complete Protease Inhibitor Cocktail“ (Roche)  
 Protein G Sepharose CL-4B (Amersham)  
 Putrescin (Sigma)  
 QIAQUICK Gel Extraction Kit (Quiagen)  
 QIAQUICK PCR Purification Kit (Quiagen)  
 Retinylacetat (Sigma)  
 Ribonukleotide (NTPs, Amersham)  
 Rinderserumalbumin (BSA, Sigma)  
 Röntgenfilme RX (Fuji), sowie Hyperfilm (Amersham)  
 rProtein A Sepharose Fast Flow (Amersham)  
 Salmon Sperm DNA (ssDNA, Sigma)  
 Säulen für die Chromatographie (Sigma)  
 Silikonlösung (Serva)  
 Slide-A-Lyzer Dialysekassette mit 10 kDa Anschlussvolumen (Pierce)  
 Streptomycin (Sigma)  
 Superoxyddismutase (Sigma)  
 Szintillationsflüssigkeit Rotiszint (Roth)  
 tert-Amylalkohol (2-Methy-2-butanol, Aldrich)  
 Tissue-Tek OCT Compound (Miles)  
 Tocopherol (Sigma)  
 Tocopherolacetat (Sigma)  
 Toluidine Blau (Merck)  
 Transferrin (Sigma)

2, 2, 2-Tribromethanol (Aldrich)  
 Trizol Reagenz für RNA-Isolation (Gibco)  
 Ultra Pure Agarose (Gibco)  
 Vitamin B12 (Sigma)  
 Whatman 3MM (Whatman)

Xylacin (Handelsname „Rompun“, Bayer)  
 Zellfilter 40 µm und 70 µm (Falcon)  
 Ziegenserum (NGS, Sigma)

### 6.1.3 Antikörper und Enzyme

#### Antikörper

Kaninchen anti-EphA5 Antikörper (Santa Cruz)  
 Kaninchen anti-human IgG Antikörper,  
 unkonjugiert (Jackson)  
 Kaninchen anti-human IgG Antikörper, Cy3  
 konjugiert (Jackson)  
 Kaninchen anti-human IgG Antikörper, Cy2  
 konjugiert (Jackson)  
 Kaninchen anti-Maus IgG Antikörper, HRP  
 konjugiert (Jackson)  
 Kaninchen anti-Neurofilament Antikörper  
 (Chemicon)

Maus anti-human c-myc Antikörper  
 (monoklonaler Antikörper 9E19, wurde am  
 Max-Planck-Institut aus Hybridomzellen  
 produziert und affinitätsgereinigt)  
 Maus anti-Kaninchen IgG Antikörper, HRP  
 konjugiert (Jackson)  
 Maus anti-phospho Tyrosin Antikörper  
 (monoklonaler Antikörper Klon 4G10, Upstate  
 Biotechnology)  
 Ratte anti-PECAM Antikörper (monoklonaler  
 Antikörper Klon MEC13.3, Pharmingen)  
 Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories)

#### Enzyme

DNase I für Zellkultur (Roche)  
 DNase I, RNase frei (Roche)  
 Klenow-Enzym (Roche)  
 Papain (Sigma)  
 Pfu DNA Polymerase (Stratagene)  
 Proteinase K (Roche)  
 Restriktionsenzyme und Puffer (Roche, New  
 England Biolabs)  
 RNase A (Roche)  
 Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP, Roche)  
 SP6 RNA Polymerase (Stratagene)

Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco)  
 T3 RNA Polymerase (Stratagene)  
 T4 DNA Ligase und Puffer (New England  
 Biolabs)  
 T7 RNA Polymerase (Stratagene)  
 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)  
 Taq DNA Polymerase und Puffer (Gibco)  
 Trypsin/EDTA für die Zellkultur (Gibco)  
 Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen)

### 6.1.4 Bakterien, Mäuse, Vektoren, Oligodesoxynukleotide und DNA-Sonden

#### Bakterien

*E. coli*-Stamm XL-1 Blue (Stratagene)  
*E. coli*-Stamm TOP10-F' (Invitrogen)

## Mäuse

Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 (Tierhaus des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried, sowie Charles-River, Sulzbach)

Mäuse des Stammes NMRI (Charles-River, Sulzbach)

## Plasmide

Plasmid „pBSTII-SK+“ (Stratagene)

Plasmid „pCDNA-3.1+“ (Invitrogen)

Plasmid „pCR4-TOPO“ (Invitrogen)

Plasmid „pCR4-BLUNT-TOPO“ (Invitrogen)

## Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide wurde von der Firma Metabion bezogen und sind in 5'-3'-Orientierung aufgelistet:

Name	Sequenz	Kommentar
BSK 1	GATCGATCGA <u>CGCGTTGCGG</u> <u>ACCCTTTTGG</u> <u>CCAGC</u>	<b>blau:</b> Restriktionsschnittstelle Mlu I, <b>unterstrichen:</b> Kompletärer Bereich des Primers zu Maus EphA5 cDNA-Sequenz
BSK 2	CC <u>ATTTAAT</u> T <u>GCTTTGATC</u> <u>ATTAGATGCT</u> <u>GCAACTGACA</u> C	<b>blau:</b> Restriktionsschnittstelle Swa I, <b>unterstrichen:</b> Kompletärer Bereich des Primers zu Maus EphA5 cDNA-Sequenz
EA1 IST 1	CCATCAGGAA TCCCAGTGC	Die Primer amplifizieren ein 322 bp Fragment, entsprechend bp 404-725 von Genbank Accession Nr. U90662
EA1 IST 2	GAGGCTTCAT GGTGGCG	
EA2 1	GATCGATCG <u>CTAGCCACC</u> <u>ATGGC</u> GCCCG <u>CGCAGCGC</u>	<b>blau:</b> Restriktionsschnittstellen Nhe I und Nco I, <b>rot:</b> Starcodon, <b>unterstrichen:</b> Kompletärer Bereich des Primers zu Ephrin-A2
EA2 2	GATCGATCAA <u>GCTTTTGTTT</u> <u>GCTGTTACTG</u> <u>GTGAAGATGG</u> G	<b>blau:</b> Restriktionsschnittstelle Hind III, <b>unterstrichen:</b> Kompletärer Bereich des Primers zu Ephrin-A2
EA2 IST 1	CTCCTAGTGT CAGGCCG	Die Primer amplifizieren ein 594 bp Fragment, entsprechend bp 634-1227 von Genbank Accession Nr. U14752
EA2 IST 2	GTGGCTGGAA GAAGAGTGG	
EA3 IST 1	GCTCCAACCA GCACCTG	Die Primer amplifizieren ein 328 bp Fragment des offenen Leserahmens von Ephrin-A3 (Lai <i>et al.</i> 1999)
EA3 IST 2	CAATGCAGGT TGTGAGTGG	
EA4 IST 1	GACTGGTCAG GCTACGAG	Die Primer amplifizieren ein 265 bp Fragment, entsprechend bp 313-577 von Genbank Accession Nr. U90663
EA4 IST 2	GAGCTGACTC ATGTGATGAC C	
EA5 1	GATCGATCG <u>TAGCCACC</u> <u>AT</u> <u>GTTGCACGTG</u> <u>GAGATGTTGA</u> <u>CG</u>	<b>blau:</b> Restriktionsschnittstelle Nhe I, <b>rot:</b> Starcodon, <b>unterstrichen:</b> Kompletärer Bereich des Primers zu Ephrin-A5
EA5 2	GATCGATCAA <u>GCTTTTGTTT</u> <u>GCTGTTACTG</u> <u>GTGAAGATGG</u> G	<b>blau:</b> Restriktionsschnittstelle Hind III, <b>unterstrichen:</b> Kompletärer Bereich des Primers zu Ephrin-A5
EA5 IST 1	GCACGTGGAG ATGTTGACGC	Die Primer amplifizieren ein 586 bp Fragment, entsprechend bp 20-605 von Genbank Accession Nr. U90665
EA5 IST 2	CATCGCCAGG AGGAACAGT	

Name	Sequenz	Kommentar
EA5 IST 3	GGATGTGTGT GTTCAGCC	Die Primer amplifizieren ein 269 bp Fragment, entsprechend bp 58-353 von Genbank Accession Nr. U90665
EA5 IST 4	CTTCAGCGGT CCGTTTGG	
EphA2 IST 1	GTCCATTGGG GCCGTGC	Die Primer amplifizieren ein 365 bp Fragment, entsprechend bp 3029-3393 von Genbank Accession Nr. X78339
EphA2 IST 2	GGTAGTGCTT AGCCTCAGC	
EphA3 IST 1	GATCATCACC AGCGCGG	Die Primer amplifizieren ein 372 bp Fragment, entsprechend bp 2755-3126 von Genbank Accession Nr. M68513
EphA3 IST 2	GGAGCTTCTG CAGCATC	
EphA4 IST 1	CAACAATGGC GGCTCCG	Die Primer amplifizieren ein 379 bp Fragment, entsprechend bp 1225-1603 von Genbank Accession Nr. U18310
EphA4 IST 2	CTGTGTCTTT CCAGCCTTGG	
EphA5 IST 1	CCTTCTCCAG TCACCAATGT G	Die Primer amplifizieren ein 312 bp Fragment, entsprechend bp 1336-1647 Genbank Accession Nr. U07357
EphA5 IST 2	CTGGCTTTGA TCATTAGATG CTGC	
EphA6 IST 1	CCTGTATCTT GTGCCTCAGC	Die Primer amplifizieren ein 412 bp Fragment, entsprechend bp 3407-3818 von Genbank Accession Nr. U58332
EphA6 IST 2	GAACTCGTGA GCTACTCGAT C	
EphA7 IST 1	GCCAGGAACA CAGCAGAG	Die Primer amplifizieren ein 375 bp Fragment, entsprechend bp 3120-3482 von Genbank Accession Nr. X79082.1
EphA7 IST2	CCATCCTCGA CTATGTGCG	
EphA8 IST 1	CCAGCTGTCA GGGGCTC	Die Primer amplifizieren ein 364 bp Fragment, entsprechend bp 3120-3483 von Genbank Accession Nr. U72207
EphA8 IST 2	CACTCATGGT GACCTGCAC	
FC 1	GATC <u>ATTTAA AT</u> <u>TCAGCCTC CACCAAGGGT C</u>	<b>blau:</b> Restriktionsschnittstelle Swa I, <b>unterstrichen:</b> Kompletärer Bereich des Primers zu human Fc IgG 1 cDNA-Sequenz
FC 2	GATC <u>GCGGCCGC</u> <u>TCATTTAC CCGGAGACAG GGAG</u>	<b>blau:</b> Restriktionsschnittstelle Not I, <b>unterstrichen:</b> Kompletärer Bereich des Primers zu human Fc IgG 1 cDNA-Sequenz
FC 3	CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AA <u>GAACAAA</u> <u>ACTCATCTCA GAAGAGGATC TG TGA GCGGC</u> <u>CGC GATC</u>	<b>blau:</b> Restriktionsschnittstelle Not I, <b>rot:</b> Stopcodon, <b>grün:</b> c-myc Epitop, <b>unterstrichen:</b> Kompletärer Bereich des Primers zu human Fc IgG 1 cDNA-Sequenz
GAP 1	ACCACAGTCC ATGCCATCAC	Die Primer amplifizieren ein 452 bp Fragment, entsprechend bp 566-1017 von Genbank Accession Nr. M32599
GAP 2	TCCACCACCC TGTTGCTGTA	
Igκ 1	GATCG <u>GTTTA AAC</u> CGCCA <u>CC ATGG</u>	<b>blau:</b> Restriktionsschnittstellen Pme I und Nco
Igκ 2	GATCCA <u>ACGC GT</u> CACCAGTG G	<b>blau:</b> Restriktionsschnittstelle Mlu I
Igκ sense	GATCG <u>GTTTA AACCGCCACC ATGG</u> AGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTA CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACTGGT <u>GACGCGTTGG</u> ATC	<b>blau:</b> Schnittstellen Pme I, Nco I, Mlu I; <b>rot:</b> Startcodon; <b>unterstrichen:</b> Optimierte Kozak-Sequenz
Linker 1	CGCG <u>GGCGCGCC</u> <u>CTCGAG ATCGAT GATATC</u> GATCGATC <u>CCGCGG TTAATTA</u> GG	<b>blau (jeweils abgesetzt):</b> Asc I, Xho I, Cla I, Eco RV, Sac II, Pac I
Linker 2	<u>CCGCGCGG GAGCTC TAGCTA CTATAG</u> CTAGCTAG <u>GGCGCC AATTAATT</u> CCGCGC	<b>blau (jeweils abgesetzt):</b> Asc I, Xho I, Cla I, Eco RV, Sac II, Pac I
Neo U1	GATTCGCAGC GCATCGCCTT C	

Name	Sequenz	Kommentar
T 1	GATCAAGCTT ATTTCTGAAG AAGACTTGGT CAAGTGTTGGC GGCATAAGC	<b>blau:</b> Restriktionsschnittstelle Hind III, <b>grün:</b> Teil des c-myc Epitops, <b>unterstrichen:</b> Komplementärer Bereich des Primers zu Thy1
T 2	GATCGCGCCG CTCACAGAGA AATGAAGTCC AGGGC	<b>blau:</b> Restriktionsschnittstelle Not I, <b>rot:</b> Stopcodon, <b>unterstrichen:</b> Komplementärer Bereich des Primers zu Thy1
Tau D1	CCCTCTTGTC AGCTCCTG	
Tau U1	CATGGTGTCC CTTTCCCTTA C	
TKP 1	GATCGGTACC TCTTTGGTGC TGTCC	<b>blau:</b> Kpn I-Restriktionsschnittstelle, <b>unterstrichen:</b> Komplementärer Bereich des Primers zu dem Kpn I/Sma I-Fragment <i>tau</i> -genomischer DNA (Abb. 15, Schritt 7)
TKP 2	GATCGGGTTT AAAC CCTGGA GGAAAAAAG ACAATGGAAT TGGTTAC	<b>blau:</b> Pme I-Restriktionsschnittstelle, <b>unterstrichen:</b> Komplementärer Bereich des Primers zu dem Kpn I/Sma I-Fragment <i>tau</i> -genomischer DNA (Abb. 15, Schritt 7)
trkA IST 1	GGCTCAGTCA CCTGAATCTC TCC	Primer zur Klonierung der <i>in-situ</i> Sonde <i>trkA</i>
trkA IST 2	GCCCACATCA TTCTCTGCCC	
trkC IST 1	ACATCACGGA CATCTCAAGG	Primer zur Klonierung der <i>in-situ</i> Sonde <i>trkC</i>
trkC IST 2	ACTGACTGAT GTTCATGCGG	

## DNA-Sonden

Die für *in-situ* Hybridisierungen sowie Northern- und Southern-Transfer als Sonden verwendeten DNA-Fragmente wurden in die Vektoren „pCR4-TOPO“ (Invitrogen) oder „pBSTII-SK+“ (Stratagene) kloniert. Die Fragmente wurden entweder ausgeschnitten und mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP radioaktiv markiert (Northern- und Southern-Transfer), oder als Matrize für *in-vitro* Transkription von mit [ $\alpha$ - $^{35}$ S] UTP markierten einzelsträngigen RNA-Sonden verwendet.

Name	Sonde	Verwendung
<b>EphA5</b>	cDNA-Fragment des murinen <i>ephA5</i> -Gens Genbank Accession Nr. U07357, entsprechend bp 1336-1647, kloniert in „pCRII-TOPO“ aus cDNA mit den Primern „EphA5 ist 1“ und „EphA5 ist 2“.	mRNA <i>in-situ</i> Hybridisierung
<b>Ephrin-A5</b>	cDNA-Fragment des murinen <i>ephrin-A5</i> -Gens Genbank Accession Nr. U90665, entsprechend bp 20-605, kloniert in „pCRII-TOPO“ aus cDNA mit den Primern „EA5 ist 1“ und „EA5 ist 2“.	mRNA <i>in-situ</i> Hybridisierung
<b>GAPDH</b>	cDNA-Fragment des murinen <i>GAPDH</i> -Gens Genbank Accession Nr. M32599, entsprechend bp 566-1017, kloniert in „pCR4-TOPO aus cDNA“ mit den Primern „GAP 1“ und „GAP 2“.	Northern-Transfer
<b>hum FC</b>	Fragment der 3'-terminalen 468 bp des offenen Leserahmens des Rezeptorkörpers, kloniert in „pCR4-TOPO“.	mRNA <i>in-situ</i> Hybridisierung, Northern-Transfer

Name	Sonde	Verwendung
<b><i>tau BRI</i></b>	<i>tau</i> -genomisches Bam HI/Eco RI-Fragment, kloniert in „pBSTII-SK+“ (genaue Lokalisation siehe Abb. 16).	Southern-Transfer, 3'-Sonde zur Analyse der homologen Rekombination
<b><i>tau SRI</i></b>	<i>tau</i> -genomisches Sma I/Eco RI-Fragment, kloniert in „pBSTII-SK+“ (genaue Lokalisation siehe Abb. 16).	Southern-Transfer, 5'-Sonde zur Analyse der homologen Rekombination
<b><i>trkA</i></b>	cDNA-Fragment des murinen <i>trkA</i> -Gens, kloniert in „pCR4-TOPO“ aus cDNA mit den Primern „trkA IST 1“ und „trkA IST 2“. Die mRNA-Sequenz lag im April 2002 nicht als Genbank-Eintrag vor. Das verwendete Fragment entspricht bp 408-883 des Gens der Ratte, Genbank Accession Nr. M85214.	mRNA <i>in-situ</i> Hybridisierung
<b><i>trkC</i></b>	cDNA-Fragment des murinen <i>trkC</i> -Gens, kloniert aus cDNA mit den Primern „trkC IST 1“ und „trkC IST 2“ in „pCR4-TOPO“. Genbank Accession Nr. AF035400, entsprechend bp 419-823.	mRNA <i>in-situ</i> Hybridisierung

### 6.1.5 Zelllinien

293 Ephrin-A2myc: Zelllinie 293, stabil transfiziert mit dem Expressionsplasmid pCDNA-E2mycThy1.

293 Ephrin-A5myc: Zelllinie 293, stabil transfiziert mit dem Expressionsplasmid pCDNA-E5mycThy1.

293: Humane Nierenepithelzelllinie, immortalisiert durch Transformation mit gescherter DNA von Adenovirus 5 (Graham *et al.* 1977, ATCC-Eintrag CRL-1573).

R1: Murine ES-Zelllinie (Nagy *et al.* 1993).

### 6.1.6 Lösungen für die Zellkultur

293 Kulturmedium: 50 ml (v/v) hitzeinaktiviertes FCS (Sigma), 5 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco, 100× Konzentrat), ad 500 ml mit DMEM mit 5 g/l Glucose und Glutamax II (Gibco).

293 Einfriermedium: 293 Kulturmedium mit 10% (v/v) Dimethylsulfoxyd.

293 Selektionsmedium: 293 Kulturmedium mit 1 mg/ml G418.

BBS Transfektionspuffer: 50 mM BES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.95.

EF-Medium: 50 ml hitzeinaktiviertes FCS (Roche), 5 ml MEM Nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco, 100× Konzentrat ohne L-Glutamin), 5 ml Natriumpyruvat (Gibco, 100 mM), 5 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco, 100× Konzentrat), 10 ml 200 mM L-Glutamin Konzentrat (Gibco; Pulver in DMEM auflösen und in Aliquots bei -20°C gefroren lagern), ad 500 ml DMEM mit 4.5 g Glucose/Liter sowie ohne Glutamax und ohne Glutamin (Gibco).

EF-Einfriermedium: EF-Medium mit 10% (v/v) Dimethylsulfoxyd.

ES-Einfriermedium: ES-Medium mit 10% (v/v) Dimethylsulfoxyd.

ES-Medium: 75 ml hitzeinaktiviertes FCS (Roche, speziell für ES-Zellen getestet), 5 ml MEM Nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco, 100× Konzentrat ohne L-Glutamin), 5 ml Natriumpyruvat (Gibco, 100 mM), 5 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco, 100× Konzentrat), 10 ml 200 mM L-Glutamin Konzentrat (Gibco; Pulver in DMEM auflösen und in Aliquots bei -20°C gefroren lagern), 5 ml LIF (Gibco, Endkonzentration: 10<sup>3</sup> units/ml), 5 µl β-Mercaptoethanol (Sigma), ad 500 ml DMEM mit 4.5 g Glucose/Liter sowie ohne Glutamax und ohne Glutamin (Gibco).

ES-Selektionsmedium: ES-Medium mit 250 µg/ml G418 (bezogen auf Aktivität).

ES-Trypsin: 0.1% (w/v) Trypsin (Gibco) in glukosehaltiger Saline (0.2 g EDTA, 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 0.2 g Glukose in 1 l H<sub>2</sub>O auflösen, auf pH 7.2 einstellen und sterilfiltrieren).

Hybridoma Auftaumedium: 15 ml FCS (Roche; speziell getestet für Hybridomzellen), 2 ml 200 mM Glutamin-Konzentrat (Gibco, Pulver in DMEM auflösen und in Aliquots bei -20°C gefroren lagern), 10 ml NCTC-135 Medium mit L-Glutamine (Gibco), 1 ml MEM nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco, 100× Konzentrat), 1 ml Hybridoma Lösung 1, 1 µl β-Mercaptoethanol, ad 100 ml DMEM mit 5 g/l Glucose mit Glutamax I (Gibco).

Hybridoma Lösung 1: 1320 mg Oxalsäure sowie 80 mg kristallines Rinderinsulin (Sigma; 25 Units/mg) unter Rühren in 80 ml destilliertem Wasser bei 37°C auflösen. 550 mg Natriumpyruvat hinzufügen, auf 100 ml auffüllen, sterilfiltrieren und in Aliquots bei -20°C gefroren lagern.

Hybridoma Produktionsmedium: 2 ml Ultrosor HY Konzentrat (Gibco, Inhalt einer Ampulle in DMEM auflösen und in Aliquots bei -20°C gefroren lagern), 2 ml 200 mM L-Glutamin Konzentrat (Gibco, Pulver in DMEM auflösen und in Aliquots bei -20°C gefroren lagern) 1 ml Natriumpyruvat (Gibco, 100 mM), 1 ml MEM nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco, 100× Konzentrat), 1 µl β-Mercaptoethanol, ad 100 ml DMEM mit 5 g/l Glucose mit Glutamax I (Gibco).

Komplettmedium: Für das Komplettmedium für die Kultivierung hippocampaler oder kortikaler Neuronen folgende wässrige bzw. ethanolische Stammlösungen ansetzen und in Aliquots zu 0.5 ml bei der angegebenen Lagertemperatur für maximal 1 Jahr aufbewahren:

Substanz	Konzentration Stammlösung mg/ml	µl Stammlösung pro 100 ml Medium	Lagertemperatur Stammlösung
<b>Wässrige Lösungen</b>			
L-Alanin	2	100	-20
Biotin	0,1	100	-20
L-Carnitin	2	100	-20
Ethanolamin	1	100	-20
D-Galactose	15	100	-20
L-Prolin	7,76	100	-20
Putrescin	16,1	100	-20
Natriumpyruvat	25	100	-20
Natriumselenit	0,016	100	-20
Vitamin B12	0,34	100	-20
Zinksulfat	0,194	100	-20
Katalase	16	16	-20
Glutathion	1	100	-20
Superoxyddismutase	2,5	100	-20

Substanz	Konzentration Stammlösung mg/ml	µl Stammlösung pro 100 ml Medium	Lagertemperatur Stammlösung
<b>Ethanolische Lösungen</b>			
Linolsäure	100	1	-20
Linolensäure	100	1	-20
Progesteron	0,63	1	-20
all-trans-Retinol	10	1	-20
Retinylacetat	10	1	-20
Tocopherol	100	1	-20
Tocopherolacetat	100	1	-20

In einem 50 ml Falcongefäß ca. 30 ml DMEM mit 4.5 g Glucose/l und Glutamax II (Gibco) vorlegen, 1 g BSA für die Zellkultur (Sigma), 2 mg Transferrin (Sigma), 1.6 mg Insulin sowie die angegebenen Mengen der Stammlösungen hinzufügen, ad 400 ml mit DMEM mit 4.5 g Glucose/l und Glutamax II auffüllen und sterilfiltrieren.

M16 Medium (Speciality Media)

M2 Medium (Speciality Media)

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 90 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4.

## 6.1.7 Sonstige Lösungen

10× *in-situ* Puffer: 3M NaCl, 0.1 M Tris/HCl, 0.1 M NaPO<sub>4</sub>, 50 mM EDTA, pH 7.5.

10× MOPS: 0.2 M MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7.0.

10× SSC: 1.5 M NaCl, 0.15 M Na-Citrat, pH 7.0.

20× SSPE: 3 M NaCl, 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM EDTA pH 7.4.

4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS: 20 g Paraformaldehyd in 500 ml PBS in einem Erlenmeyer unter Schütteln im Wasserbad auf 95°C erhitzen, bis das Paraformaldehyd gelöst ist. Lösung auf Eis abkühlen und vor Gebrauch durch einen 0.2 µ Filter filtrieren.

Avertin Narkoselösung (für Uterustransfer): 10 g 2,2,2-Tribromethanol in 10 ml tert-Amylalkohol lösen. Diese 100-prozentige Avertinlösung in 0.9% (w/v) NaCl in H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 2.5% (v/v) verdünnen, im Dunkeln bei 4°C für max. 3 Monate lagern. Die Dosierung von ca. 14-18 µl der 2.5-prozentigen Lösung pro g Körpergewicht für die jeweilige Stammlösung austesten.

Chloralhydrat Narkoselösung (für Perfusionen): 3.5% (w/v) Chloralhydrat, 0.9% (w/v) NaCl in H<sub>2</sub>O. Lösung für maximal 2 Monate bei 4 °C lagern.

Church Hybridisierungspuffer: 0.5 M NaPO<sub>4</sub>, 5% SDS, 1% BSA, pH 7.2.

Coomassie-Färbelösung: 40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0.4% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250.

Coomassie-Entfärbelösung: 10% (v/v) Ethanol, 7% (v/v) Essigsäure.

DAB-Färbelösung: Diaminobenzidin Tabletten mit einer Endkonzentration von 0.5 mg/ml in PBS lösen, durch einen 0.2 µm Spritzenvorsatzfilter filtrieren und mit 4 µl einer 0.1% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung/ml DAB-Lösung versetzen. Färbelösung erst unmittelbar vor Gebrauch ansetzen und auf Eis im Dunkeln halten.

Dent's Fixativ: 20% (v/v) Dimethylsulfoxyd, 80% (v/v) Methanol.

DNA-Extraktionspuffer: 100 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.2% (w/v) SDS, 0.1 mg/ml Proteinase K, pH 8.5. Die Proteinase K in einer Stocklösung von 10 mg/ml ansetzen, bei -20°C lagern und erst unmittelbar vor Verwendung des Puffers hinzufügen.

*E. coli* Lysepuffer I: 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8.0.

*E. coli* Lysepuffer II: 200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS.

*E. coli* Lysepuffer III: 3 M Kaliumacetat, pH 5.5.

ELISA-Blockierlösung: 2% (w/v) BSA in 50 mM NaCO<sub>3</sub>-Puffer pH, 9.6.

ELISA-Lysepuffer: 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 6 mM Chaps, pH 7.5. Den Puffer unmittelbar vor Gebrauch mit „Complete Protease Inhibitor Cocktail“ (Roche) versetzen.

ELISA-Waschpuffer: 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, pH 7.5.

Immunoblockierlösung I: 10% (v/v) Ziegenserum (NGS), 0.03% (w/v) Caragenan und 0.1% (v/v) Triton X-100 in PBS. Caragenan unter Rühren in PBS aufkochen, auf Eis abkühlen, und Triton X-100 sowie Ziegenserum zufügen.

Immunoblockierlösung II: 3% (v/v) Ziegenserum (NGS), 0.03% (w/v) Caragenan und 0.1% (v/v) Triton X-100 in PBS. Caragenan unter Rühren in PBS aufkochen, auf Eis abkühlen, und Triton X-100 sowie Ziegenserum zufügen.

*In-situ* Hybridisierungspuffer (5 ml): 500 µl 10× *in-situ* Puffer, 200 µl 50× Denhardt's, 500 µl tRNA (10 µg/µl), 50 µl 1 M Dithiothreitol, 1 ml 50% (w/v) Dextransulfat in H<sub>2</sub>O, 50 µl 1 M β-Mercaptoethanol, 50 µl Heringspermien-DNA (10 µg/µl), 2.5 ml Formamid, 150 µl H<sub>2</sub>O.

*In-situ* Waschpuffer: 1x *in-situ* Puffer, 50% (v/v) Formamid, 20 mM β-Mercaptoethanol (1,4 ml/l).

LB Medium: 10 g Trypton (Difco), 5 g Hefeextrakt (Difco) sowie 10 g NaCl in 1 l H<sub>2</sub>O lösen, mit 5 N NaOH auf pH 7.0 einstellen und autoklavieren.

LB-Agar: 10 g Trypton (Difco), 5 g Hefeextrakt (Difco) sowie 10 g NaCl in 1 l H<sub>2</sub>O lösen, mit 5 N NaOH auf pH 7.0 einstellen, 12 g/l Agar (Difco) zusetzen und für 20 min bei 121°C autoklavieren. Nach Abkühlen der Lösung auf 50°C ggf. Antibiotika zusetzen, Platten unter einer Sterilwerkbank gießen, bei RT erstarren lassen und bei 4°C lagern.

Modified Hank's Puffer (MHP): 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µM ZnCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose, 25 mM HEPES, pH 7.4.

RF1-Puffer: 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% (v/v) Glycerol, mit 0.2 M Essigsäure auf pH 5.8 einstellen.

RF2-Puffer: 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) Glycerol, pH 6.8.

RNA-Ladepuffer (1.5 ml): 750  $\mu$ l Formamid, 150  $\mu$ l 10 $\times$  MOPS, 240  $\mu$ l Formaldehyd (37%-ige Lösung), 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 100  $\mu$ l Glycerin (87%-ige Lösung), 80  $\mu$ l 2% (w/v) gesättigte Lösung Bromphenolblau in H<sub>2</sub>O.

RNAse A Puffer: 0.5 M NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5.

SDS-PAGE Laufpuffer: 250 mM Glycin, 25 mM Tris/HCl, 0.1% (w/v) SDS.

SDS-PAGE Puffer I (Sammelgel, 4 $\times$  Konzentrat): 1.5 M Tris/HCl, 0.4% (w/v) SDS, pH 8.8.

SDS-PAGE Puffer II (Trenngel): 0.5 M Tris/HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 6.8.

Silberfärbung Färbelösung: 1 g AgNO<sub>3</sub> in 100 ml H<sub>2</sub>O lösen und unter Rühren 1.4 ml 25% (v/v) NH<sub>3</sub> sowie 2 ml 1 M NaOH zufügen.

Silberfärbung Entwickler: 50 mg Zitronensäure in 90 ml H<sub>2</sub>O lösen und 10 ml Methanol sowie 100  $\mu$ l einer 37% (v/v) Formaldehydlösung zusetzen.

Silberfärbung Fixativ I: 50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Eisessig.

Silberfärbung Fixativ II: 5% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Eisessig.

SOC Medium: 20 g Trypton (Difco), 5 g Hefeextrakt (Difco) sowie 0.5 g NaCl in 1 l H<sub>2</sub>O lösen, 10 ml einer 250 mM KCl Lösung zufügen, mit 5 N NaOH auf pH 7.0 einstellen, autoklavieren und nach abkühlen der Lösung auf < 60°C 20 ml einer 1 M Glukoselösung sowie 5 ml einer 2 M MgCl<sub>2</sub> Lösung zufügen.

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE): 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0.

Tris-EDTA-Puffer (TE): 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5.

Western Transferpuffer: 20 mM Tris Base, 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol. Lösung vor Gebrauch auf 4°C vorkühlen.

Western-Blockierlösung: 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl, pH 7.4. Lösung mit 0.25 g/l Gelatine (Sigma, 50 Blooms) versetzen, aufkochen, auf Eis abkühlen, mit 0.5% (v/v) Triton X-100 versetzen und durch einen 0.2  $\mu$ m Sterilfilter filtrieren.

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 6.2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Herstellung kompetenter Bakterien erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan 1983). Bei dieser Methode werden Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase mit hypotonischen, Rubidiumchlorid haltigen Puffern gewaschen und anschließend in Aliquots schockgefroren. In dieser Arbeit wurden die beiden Bakterienstämme XL-1 Blue (Stratagene) sowie TOP10-F' (Invitrogen) verwendet.

Von einer eingefrorenen Kultur von *E.coli* wurde zunächst eine 5 ml Übernachtskultur in LB Medium angeimpft. Am Morgen des folgenden Tages wurde die Kultur in 250 ml auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium überführt und bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0.4 durch Zentrifugation bei 4°C und 1000 ×g für 10 min geerntet. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden in 50 ml eiskaltem RF1-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut bei 4°C und 1000 ×g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand wurde abgegossen. Die Zellen wurden in 20 ml RF2-Puffer resuspendiert, für 15 min auf Eis inkubiert, in Aliquots von 200 µl in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 6.2.1.2 Transformation von Bakterien

TOP10F' oder XL-1 Blue Bakterien wurden mit gereinigter plasmidischer DNA oder mit Ligationansätzen transformiert, welche als Selektionsmarker Ampicillin- oder Kanamycinresistenz enthielten.

Ein Aliquot mit 200 µl Suspension kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut, mit 1 µl 1 M β-Mercaptoethanol sowie mit 1-5 µl Ligationansatz oder 5-50 ng plasmidischer DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde für 30 sec im Wasserbad bei 42°C und für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 250 µl SOC Medium versetzt, und die Bakterien wurden für 30 min (Ampicillinresistenz) bzw. 60 min (Kanamycinresistenz) bei 37°C geschüttelt, auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) bzw. Kanamycin (50 µg/ml) ausplattiert und für 12-16 h bei 37°C inkubiert.

#### 6.2.1.3 Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Isolation von plasmidischer DNA wurde mittels alkalischer Lyse durchgeführt (Sambrook *et al.* 1989). Kleine Mengen (5-50 µg) wurden mit einfacher Fällung nach Phenol-Chloroform-Extraktion (PCE), größere Mengen (>20 µg) mittels Ionenaustauscherchromatographie isoliert.

Für die Isolation von kleinen Mengen plasmidischer DNA wurde eine transformierte Einzelkolonie von LB-Agar in 5 ml LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum überführt und ü/n bei 37°C geschüttelt. Von dieser Übernachtskultur wurden 1.5 ml in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß für 1 min bei 13.000 ×g zentrifugiert, und das Zellpellet wurde in 250 µl *E.coli* Lysepuffer I resuspendiert. Es wurden 250 µl *E.coli* Lysepuffer II hinzugefügt, der Ansatz wurde 5-10× vorsichtig geschüttelt und für 5 min auf Eis inkubiert. Dem Ansatz wurden nun 250 µl *E.coli* Lysepuffer III hinzugefügt, es wurde erneut 5-10× geschüttelt und anschließend für 10 min bei RT und 13.000 ×g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt, und Proteinverunreinigungen wurden mittels PCE entfernt.

Zur Fällung der DNA wurde der Überstand der PCE mit 500 µl Isopropanol versetzt und für 30 min bei RT und 13.000 ×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet wurde mit 100 µl eiskaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen und für 1 min bei RT und 13.000 ×g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 50 µl 10 mM Tris pH 7.5 gelöst, und die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

Für die Isolation größerer Mengen plasmidischer DNA wurden Plasmidisolierungskits (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### **6.2.1.4 Phenol-Chloroform-Extraktion (PCE)**

Die PCE diente zur Abtrennung von Proteinverunreinigungen aus DNA bzw. RNA Lösungen.

Die zu extrahierende Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1 (PCI, Sigma) versetzt, gevortext und für 5 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 15 min bei 4°C und 13.000 ×g zentrifugiert, und der Überstand wurde in ein frisches 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt. Zur Abtrennung von mitgeschlepptem Phenol wurde im Anschluß an die PCE eine Fällung durchgeführt.

### 6.2.1.5 Fällung von DNA und RNA

DNA oder RNA wurde meist mittels Ethanolfällung präzipitiert. Hierbei wurde der Nukleinsäurelösung 10% (v/v) 3 M Natriumacetat pH 5.2 sowie das dreifache Volumen Ethanol zugesetzt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert, für 30 min bei 4°C und 13.000 ×g zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit eiskaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen und in einem geeignetem Volumen H<sub>2</sub>O oder 10 mM Tris pH 7.5 (DNA) bzw. pH 7.0 (RNA) gelöst.

In bestimmten Anwendungen wurden Nukleinsäuren mit Isopropanol gefällt. Dabei wurde wie bei der Ethanolfällung vorgegangen, jedoch wurden anstelle des Ethanols 70% (v/v) Isopropanol zugesetzt, und es wurde bei RT gefällt.

Für die Fällung von Nukleinsäuren aus sehr stark verdünnten Lösungen oder von sehr kurzen Nukleinsäurefragmenten (< 200 bp) wurden dem Fällungsansatz 10 µg Glykogen (Roche) als Carrier zugefügt.

### 6.2.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde spektralphotometrisch bei den Wellenlängen 260 nm bestimmt. Eine etwaige Verunreinigungen der Nukleinsäurelösungen mit Proteinen konnte durch Vergleich der Extinktion bei 260 nm mit der Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm abgeschätzt werden.

Die Extinktion einer 1:20-1:100 Verdünnung der jeweiligen Nukleinsäurelösung bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm wurde gemessen, und die Konzentration der Nukleinsäuren wurde wie folgt berechnet:

$$C_{[DNA/RNA]} = E_{260} \times f \times n \text{ [}\mu\text{g/ml]}$$

f: Verdünnungsfaktor, n: Multiplikationsfaktor für DNA = 50, für RNA = 40

Diese Formel beruht auf der Annahme, daß die Nukleinsäuren etwa gleiche Teile der verschiedenen Nukleinsäurebasen enthalten. Für DNA wird ein Verhältnis  $E_{260}/E_{280} \leq 1.8$ , für RNA hingegen ein Verhältnis  $E_{260}/E_{280} \approx 2.1$  erwartet, wobei eine Abweichung auf signifikante Proteinverunreinigungen hinweist.

Da Oligodesoxynukleotide häufig einen veränderten Anteil einzelner Nukleinsäurebasen enthalten, wurde ihre Konzentration mit folgender Formel berechnet:

$$C_{[oligo]} = E_{260} \times f / X \text{ [mol/l]}$$

f: Verdünnungsfaktor,

$X = n \text{ Adenin} \times 16.000 + n \text{ Guanosin} \times 12.000 + n \times \text{Cytosin} \times 7.000 + n \times \text{Tymidin} \times 9.600$ , mit n: Anzahl der jeweiligen Base in dem Oligodesoxynukleotid

### **6.2.1.7 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Plasmidische DNA oder PCR-Produkte wurden in einem Volumen von 20-50  $\mu\text{l}$  in einem Verhältnis von 2-10 U/ $\mu\text{g}$  DNA mit der Restriktionsendonuklease in dem vom Hersteller mitgelieferten Restriktionspuffer bei der jeweils empfohlenen Temperatur für 2-5 h inkubiert. Den Restriktionsansätzen wurde nie mehr als 1/10 des Gesamtvolumens Enzymlösung zugefügt, um das Auftreten sog. Sternaktivitäten zu vermeiden.

Beim Verdau von genomischer DNA wurde in der Regel ü/n verdaut, und die Restriktionsansätze wurden zusätzlich mit 10  $\mu\text{g/ml}$  BSA (Roche) supplementiert, um bei der Isolation der DNA eventuell mitgeschleppte Verunreinigungen von SDS oder Phenol zu adsorbieren.

### **6.2.1.8 Analyse von DNA mittels Agarose Gelelektrophorese**

Die Analyse von DNA mittels Agarose Gelelektrophorese wurde bei RT in TAE-Puffer sowie in Gegenwart von 0.2  $\mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid in Agarose und Laufpuffer bei 5 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt. Die Elektrophorese von genomischer DNA oder von sehr großen DNA-Fragmenten wurde bei 4°C und einer Spannung von nur 2 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt.

Die DNA wurde mittels Fluoreszenzanregung bei 273 nm visualisiert.

### **6.2.1.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die DNA-Fragmente wurden unter Fluoreszenzanregung im Agarosegel identifiziert, und die entsprechenden Bereiche des Agarosegels wurden mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten. Hierbei wurde die UV-Exposition des Agarosegels so stark wie möglich begrenzt, um Mutationen in der DNA zu vermeiden.

Die Isolierung der DNA aus den ausgeschnittenen Gelfragmenten erfolgte mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers.

### **6.2.1.10 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Die Dephosphorylierung der Enden eines geschnittenen Plasmids mit kompatiblen Enden verhindert die Religation des Plasmids ohne Insertion und erhöht hierdurch die Effizienz der Klonierung.

Die Dephosphorylierung eines geschnittenen Plasmids wurde mittels Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP) unmittelbar im Anschluß an den Verdau von 1-5  $\mu\text{g}$  Plasmid durchgeführt. Hierbei wurde 1  $\mu\text{l}$  SAP (1 U/ $\mu\text{l}$ , Roche) zu dem Restriktionsansatz hinzugefügt, der nun für 1 h bei 37°C inkubiert wurde. Das Restriktionsenzym und SAP

wurden mittels PCE und anschließender Fällung abgetrennt, und das geschnittene und dephosphorylierte Plasmid wurde für die gewünschte Ligation eingesetzt.

#### **6.2.1.11 Auffüllen von 5'-überstehenden Enden**

Die Ligation eines DNA-Fragments mit 5'-überhängenden Enden mit einem anderen Fragment mit glatten Enden erfordert das Auffüllen der überhängenden Enden. Dies geschieht üblicherweise mit Klenow Enzym (großes Fragment von DNA-Polymerase I), das eine 3'→5' DNA Polymerase-Aktivität sowie eine 5'→3' Exonuklease-Aktivität besitzt, wobei das Gleichgewicht zwischen den beiden Aktivitäten des Enzyms durch die Konzentration freier dNTPs im Reaktionsansatz bestimmt wird.

Für die Auffüllreaktion wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl 50 ng des DNA-Fragments mit 5'-überhängenden Enden mit jeweils 0.5 mM dNTPs (NEB), 2 µl 10× Reaktionspuffer und 5 U Klenow Enzym (NEB) zusammengegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei 25°C im Wasserbad inkubiert, und die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 10 min gestoppt. Die DNA-Fragmente wurden nach der Auffüllreaktion über ein Agarosegel gereinigt. Um die Fehlerrate der Auffüllreaktion zu minimieren, wurden nur die dNTPs in der Reaktion eingesetzt, welche zum Auffüllen des betreffenden 5'-überhängenden Endes erforderlich waren, so z.B. für das Auffüllen einer Not I Schnittstelle lediglich dGTP und dCTP, nicht jedoch dATP und dTTP.

#### **6.2.1.12 Abverdauen von 3'-überhängenden Enden**

3'-überhängende Enden wurden zwecks Erzeugung von glatten Enden mit T4 DNA-Polymerase (NEB) abverdaut. Hierzu wurden 200 ng des DNA-Fragmentes in einem Reaktionsvolumen von 20 µl in 1× Reaktionspuffer mit 1 U T4 DNA-Polymerase in Gegenwart von dNTPs (jeweils 0.5 mM) für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Inkubation für 10 min bei 70°C gestoppt, und die DNA-Fragmente wurden über ein Agarosegel aufgereinigt.

#### **6.2.1.13 Ligation von DNA-Molekülen**

Für Standardligationen von DNA-Fragmenten in ein geschnittenes Plasmid wurden 20-50 ng des Plasmids, ein 3-10-facher molarer Überschuß des DNA-Fragments sowie 5 U T4 DNA-Ligase (5 U/µl, NEB) in dem vom Hersteller mitgelieferten Ligationspuffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl ü/n bei 16°C inkubiert. Ligationen wurden nie hitzeinaktiviert und in der Regel unmittelbar nach Ende der Reaktion transformiert. Für spezielle Reaktionstypen (mehr als 2 Ligationspartner, sehr große Fragmente) wurden das molare Verhältnis der Ligationspartner sowie Reaktionstemperatur und Inkubationsdauer variiert.

#### 6.2.1.14 Austauschen von Linkern in Plasmiden

Die meisten Plasmide enthalten einen kurzen Sequenzabschnitt, der ein oder mehrere dicht aufeinanderfolgende Restriktionsschnittstellen enthält und das Einfügen von DNA-Fragmenten in ein Plasmid erleichtert. Diese sog. Polylinker können gegen maßgeschneiderte, auf eine spezielle Klonierstrategie angepasste Linker ausgetauscht werden.

Hierzu wurde der im Plasmid vorhandene Polylinker mit geeigneten Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten und das Plasmid über ein Agarosegel gereinigt. Nun wurden zwei an ihrem 5'-Ende phosphorylierte Oligodesoxyribonukleotide synthetisiert, welche die gewünschten Restriktionsschnittstellen enthielten und sich so anlagern konnten, daß sie einen zu dem geschnittenen Plasmid kompatiblen Überhang enthielten. Die Oligodesoxyribonukleotide wurden mit einer Konzentration von jeweils 2.5 pM in 5× konzentriertem Ligationspuffer in einem Volumen von 200 µl gemischt, im Wasserbad auf 95°C erhitzt und über einen Zeitraum von 6 h auf RT abgekühlt. Nun wurden 30 ng geschnittenes Plasmid in 7 µl H<sub>2</sub>O mit 2 µl angelagerten Oligodesoxyribonukleotiden sowie 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U/µl, NEB) gemischt und ü/n bei 16°C inkubiert. Von diesem Ligationsansatz wurden 5 µl in Bakterien transformiert. Die Ligationsprodukte wurden mittels Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzanalyse analysiert.

#### 6.2.1.15 Blau-Weiß-Selektion von Bakterienkolonien

Bei der Klonierung von DNA-Fragmenten in die Vektoren „pBSTII-SK+“ (Stratagene), „pCR4-TOPO“ (Invitrogen) und „pCR4-BLUNT-TOPO“ (Invitrogen) wurden Bakterienkolonien mit religiertem Vektor und Kolonien mit rekombiniertem Vektor mittels Blau-Weiß-Selektion unterschieden.

Die jeweiligen Ligationsansätze wurden in Bakterien transformiert und auf LB-Agar-Platten ausgebracht, auf die zuvor 40 µl 2% (w/v) X-Gal (Sigma) in DMSO und 7 µl 20% (w/v) IPTG (Sigma) in H<sub>2</sub>O ausplattiert wurden. Bakterien mit religiertem Vektor exprimierten das Enzym β-Galaktosidase, und die Kolonien konnten anhand ihrer Blaufärbung identifiziert werden. Bakterien mit rekombiniertem Vektor exprimierten keine funktionstüchtige β-Galaktosidase und wurden anhand ihrer weißen Farbe identifiziert.

#### 6.2.1.16 Miniprep-PCR

Rekombinante Plasmide mit inserierten DNA-Fragmenten < 2 kb wurden mittels einer Miniprep-PCR analysiert.

Hierzu wurde eine Bakterienkolonie einer frischen Transformation mit einer Impföse auf einer neuen LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen, und die an der Impföse verbliebenen Bakterienreste wurden in 50 µl TE in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß suspendiert und für 5 min auf 100°C erhitzt. Nun wurde eine PCR durchgeführt, in der 1 µl des Bakterienlysats als Matrize sowie Primer eingesetzt

wurden, welche die Insertionsstelle flankierten. Die Produkte der PCR wurden mittels Gelelektrophorese analysiert. Von den positiven Klonen wurde eine Plasmidisolierung durchgeführt, und die Plasmide wurden mittels Restriktions- und DNA-Sequenzanalyse charakterisiert.

#### **6.2.1.17 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) wurde zur Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen aus plasmidischer DNA, genomischer DNA sowie cDNA verwendet. Die PCR wurde sowohl zum analytischen Nachweis von bestimmten Sequenzen, als auch zur Klonierung sowie zur gezielten Mutation von DNA-Fragmenten eingesetzt.

Für einen typischen Ansatz mit 50 µl Reaktionsvolumen wurden 1-200 ng DNA als Matrize, jeweils 200 nM Primer (Metabion), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Gibco), je 200 µM dNTPs (Gibco) und 1-5 U DNA-Polymerase in 1× PCR-Puffer eingesetzt. Hierbei wurde für analytische Anwendungen Taq DNA-Polymerase (Gibco), für Klonierungen Pfu-Polymerase (Stratagene) verwendet, und die DNA-Polymerase wurde dem Reaktionsansatz erst nach einer anfänglichen Denaturierung bei 95°C zugefügt („hot-start“). Für analytische Standardanwendungen wurden Primer mit einem GC-Gehalt von ≥ 50% und einer Länge von ca. 20 bp verwendet. Hybridisierungstemperatur, Matrizenkonzentration sowie Zahl und Dauer der Zyklen wurden den jeweiligen Reaktionen angepaßt.

Sollte das Expressionsniveau von Genen in verschiedenen Geweben mittels semiquantitativer RT-PCR verglichen werden, so wurde als Standard zur Normalisierung verschiedener cDNAs eine Amplifikation von cDNA-Fragmenten des Glykolyseenzym Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) mit den Primern „GAP 1“ und „GAP 2“ durchgeführt. Um den nivellierenden Einfluß von Sättigungseffekten in der PCR zu vermeiden, wurden hierbei die PCR-Reaktionen mit möglichst geringer Zyklenzahl (typischerweise 20-22 Zyklen) durchgeführt.

#### **6.2.1.18 Reinigung von PCR-Produkten**

PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAQUICK PCR-Purification Kits (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

#### **6.2.1.19 DNA Sequenzanalyse**

DNA-Sequenzanalyse wurde nach der Didesoxynukleotid-Kettenabbruch Methode nach Sanger (Sanger *et al.* 1977) mit Hilfe eines 373 DNA Sequencer (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Sequenzierreaktion wurde mit dem ABI PRISM BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei die Reaktion standardmäßig mit 25 Zyklen durchgeführt wurde. Die

Auswertung und Analyse der Daten erfolgte mit den Softwarepaketen DNASTAR (Lasergene) sowie MacMolly (Tetra).

### 6.2.1.20 RNA-Isolation

Die Isolation von RNA aus Gewebe oder Zellen wurde basierend auf dem Prinzip von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski *et al.* 1987) durchgeführt.

Für die Isolation von gesamt-RNA aus Gewebe wurde die Gewebeprobe unmittelbar nach Entnahme aus dem Tier auf Eis in einem Glasdouncer mit dem zehnfachen Volumen Trizol Reagenz (Gibco) versetzt, bei dem es sich um eine Mischung aus H<sub>2</sub>O-gesättigtem Phenol und Guanidiniumisothiocyanat handelt. Das Gewebe wurde im Glasdouncer mit 20-30 Hüben homogenisiert, und das Homogenat wurde in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß mit 10% (v/v) Chloroform (Merck) versetzt und für 1 min gevortext. Der Ansatz wurde für 10 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert, und der klare Überstand wurde in ein frisches 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nun wurde der Überstand im Verhältnis 1+1 mit Isopropanol gemischt und für 15 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert, und das RNA-Präzipitat wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Die so erhaltene roh-RNA wurde zwecks Entfernung von DNA-Kontaminationen einem DNase Verdau unterzogen.

Hierzu wurde die roh-RNA je nach Größe der eingesetzten Gewebeprobe in einem Volumen von typischerweise 95 µl 10 mM Tris pH 7.0 gelöst, mit 5 µl 100 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 5 µl RNase freier DNase I (10<sup>3</sup> U/µl, Roche) versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde einer PCE und anschließend einer Ethanol-fällung unterzogen, und das RNA-Präzipitat wurde in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris pH 7.0 gelöst.

Die Isolation von poly-A<sup>+</sup> RNA aus gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung eines Oligotex mRNA Purification Kits (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers.

### 6.2.1.21 Synthese von cistronischer DNA aus RNA

Für die Synthese von cistronischer DNA (cDNA) aus RNA wurden standardmäßig 2 µg gesamt-RNA in einem Volumen von 11 µl pro Reaktion eingesetzt. Falls die RNA zu verdünnt war, wurde sie mittels Ethanol-fällung präzipitiert und in einem entsprechend geringeren Volumen 10 mM Tris pH 7.0 wieder gelöst. Für die reverse Transkription wurden oligo-dT Primer (Gibco) sowie das Enzym Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco) eingesetzt, bei dem es sich um rekombinantes Enzym handelt, in welchem die RNase-H Aktivität von Reverser Transkriptase zur Erhöhung der Ausbeute an cDNA deletiert war.

Für einen Reaktionsansatz wurden 2 µg gesamt-RNA in einem Volumen von 11 µl mit 1 µl oligo-dT Primern (oligo-dT<sub>12-18</sub>, 0.5 µg/µl, Gibco) gemischt, für 10 min im Wasserbad auf 70°C erhitzt und anschließend für 5 min auf Eis gebracht. Auf Eis wurden nun 4 µl

5× Reaktionspuffer (Gibco), 2 µl 1 M DTT (Gibco), 1 µl einer Mischung von jeweils 10 mM dNTPs (Amersham), 0.5 µl RNase Inhibitor (RNase-OUT, Gibco) sowie 0.8 µl Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/µl, Gibco) zugefügt. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 45°C inkubiert, und die Reaktion wurde mittels Hitzeinaktivierung bei 70°C für 5 min gestoppt. Anschließend wurde die Reaktion mit 10 mM Tris pH 7.5 auf ein Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt, und überschüssige oligo-dT Primern und Nukleotide wurden mit dem QIAQUICK PCR-Purification Kit (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers abgetrennt, wobei mit 100 µl 10 mM Tris pH 7.5 eluiert wurde. In den so erzeugten cDNAs war 1 µl cDNA äquivalent zu 20 ng gesamt-RNA.

#### **6.2.1.22 Isolation von genomischer DNA aus Gewebekultur**

Für die Isolation von genomischer DNA aus Gewebekultur wurden die Zellen 1× mit PBS gewaschen, mit DNA-Extraktionspuffer bedeckt und ü/n bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Zellysats aus der Kulturschale in ein 15 ml Falcongefäß überführt, mit demselben Volumen Isopropanol versetzt und für 1 h bei RT sanft geschüttelt. Das Präzipitat der genomischen DNA wurde nun in ein frisches 15 ml Falcongefäß mit 5 ml 70% (v/v) Ethanol überführt und für 1 h bei RT gewaschen. Anschließend wurde die genomische DNA in einem geeigneten Volumen 20 mM Tris pH 8.5 gelöst und bei 4°C gelagert.

#### **6.2.1.23 Isolation von genomischer DNA aus Schwanzspitzen**

Bei den Mäusen wurde eine Resektion von 3-5 mm langen Schwanzspitzen durchgeführt. Die Schwanzspitzen wurden in 1.5 ml Eppendorfgefäßen mit jeweils 0.5 ml DNA-Extraktionspuffer versetzt und ü/n unter Schütteln bei 55°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Gewebelysats für 1 min bei RT und 14.000 rpm zentrifugiert, und die Überstände wurden mit einer abgeschnittenen blauen Pipettenspitze in frische Eppendorfgefäße überführt und mit 0.5 ml Isopropanol versetzt. Nun wurden die Eppendorfgefäße mehrmals invertiert, und die genomische DNA wurde durch Zentrifugation für 20 min bei RT und 14.000 rpm präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Präzipitat wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, in einem geeigneten Volumen 20 mM Tris pH 8.5 gelöst und bei 4°C gelagert.

#### **6.2.1.24 Southern-Transfer Analyse**

Für die Analyse von genomischer DNA mittels Southern-Transfer wurden 5-20 µg genomische DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym verdaut und in einem Agarosegel ü/n bei 4°C und einer Spannung von 2 V/cm Elektrodenabstand elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde unter UV-Anregung photographiert, wobei ein unter Fluoreszenzanregung leuchtendes Lineal neben das Agarosegel gelegt wurde, um eine Zuordnung von Lauflänge zu Fragmentgröße auf der Membran zu erlauben. Nun wurde das Gel zwecks partieller Säurehydrolyse der genomischen DNA für 5 min in

0.25 M HCl inkubiert, 2× kurz mit H<sub>2</sub>O gespült und für 30 min in 0.4 M NaOH denaturiert. Anschließend wurde die genomische DNA nach dem Kapillarblotverfahren ü/n bei RT unter alkalischen Bedingungen (Sambrook *et al.* 1989) auf eine Hybond-N<sup>+</sup> Nylonmembran (Amersham) übertragen. Am folgenden Morgen wurde der Transfer abgebaut, die Position der Geltaschen wurde mit Bleistift auf der Membran markiert, und die Membran wurde 2× 30 sec in 2× SSPE gespült und an der Luft getrocknet.

Für die Herstellung einer radioaktiven Sonde wurden DNA-Fragmente mit einer Länge von 0.5-1 kb verwendet, die aus Plasmiden mit Restriktionsenzymen ausgeschnitten und über ein Agarosegel gereinigt wurden. Die radioaktive Markierung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem Random Hexanucleotide Labeling Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (Hartmann Analytik). Nach der Markierungsreaktion wurden nicht inkorporierte Nukleotide mit Hilfe von ProbeQuant G-50 Micro Columns (Amersham) gemäß Herstellervorschrift abgetrennt.

Die Membran wurde nun für 3 h mit Church Hybridisierungspuffer bei 65°C prähybridisiert. Nun wurde die Sonde durch Zugabe von 0.4 M NaOH (Endkonzentration) für 20 min bei RT denaturiert. Die Sonde wurde in einer Konzentration von 2×10<sup>6</sup> cpm/ml zum Church Hybridisierungspuffer zugesetzt, und die Membran wurde ü/n bei 65°C hybridisiert. Am nächsten Morgen wurde der Hybridisierungspuffer abgegossen, und die Membran wurde 3× 20 min bei 65°C mit 0.1× SSPE/0.5% (w/v) SDS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Membran ohne vorheriges Trocknen luftdicht in Plastikfolie eingeschweißt und ü/n auf einer Phosphorimager-Expositionsplatte in einer Filmkassette exponiert.

### 6.2.1.25 Northern-Transfer Analyse

Für Northern-Transfer Analyse wurden 1-2 µg poly-A<sup>+</sup> oder 5-10 µg gesamt-RNA je Spur eingesetzt. Die Proben mit einem Volumen von je 3 µl wurden mit 15 µl RNA Auftragspuffer sowie 1 µl 1% (w/v) Ethidiumbromidlösung gemischt, für 10 min im Wasserbad auf 70°C erhitzt und für 5 min auf Eis gebracht. Nun wurden die Proben auf ein 0.7% (w/v) Agarosegel aufgetragen, daß in 1× MOPS Puffer mit 2.2% (v/v) Formaldehyd gegossen wurde, und elektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Transfer wurde das Gel unter UV-Anregung neben einem unter Fluoreszenzanregung leuchtenden Lineal photographiert, um die Zuordnung von Lauflänge zu Fragmentgröße auf der Membran zu ermöglichen. Die RNA wurde anschließend mit Hilfe des VacuGene XL Vacuum Blotting System (Amersham) mit 20× SSC als Transferpuffer auf Hybond XL Nylonmembran (Amersham) gemäß den Angaben des Herstellers transferiert, an der Luft bei RT getrocknet und mittels UV-Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 312 nm mit einer Strahlendosis von 0.3 J/cm<sup>2</sup> auf der Membran fixiert.

Für die Herstellung einer radioaktiven Sonde wurden DNA-Fragmente mit einer Länge von 0.5-1 kb verwendet, die aus Plasmiden mit Restriktionsenzymen ausgeschnitten und über ein Agarosegel gereinigt wurden. Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte in gleicher Weise wie für die Southern-Transfer Analyse.

Die Membran wurde nun für 3 h mit Church Hybridisierungspuffer bei 65°C prähybridisiert. Nun wurde die Sonde durch Erhitzen auf 95°C für 10 min denaturiert für 20 min bei RT denaturiert. Die Sonde wurde in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  cpm/ml zum Church Hybridisierungspuffer zugesetzt, und die Membran wurde ü/n bei 65°C hybridisiert. Am nächsten Morgen wurde der Church Hybridisierungspuffer abgegossen, und die Membran wurde wie folgt bei 65°C gewaschen: 1× 30 sec 2× SSC/0.1% SDS, 2× 5 min 2× SSC/0.1% SDS, 2× 10 min 1× SSC/0.1% SDS, 4× 5 min 0.1× SSC/0.1% SDS. Nach dem letzten Waschschritt wurde die Membran ohne vorheriges Trocknen luftdicht in Plastikfolie eingeschweißt und ü/n auf einer Phosphoimager-Expositionsplatte in einer Filmkassette exponiert.

## 6.2.2 Zellkulturtechniken

### 6.2.2.1 Kultivierung hippocampaler und cortikaler Neuronen aus der Maus

Vor Beginn der Präparation wurden die Kulturschalen bzw. gereinigte runde Deckgläschen mit einem Durchmesser von 13 mm in 24 Well Schalen für mind. 3 h bei 37°C mit 0.01% (w/v) poly-DL-Lysin in H<sub>2</sub>O (Sigma) beschichtet, 3× mit PBS gespült und mit einem geeigneten Volumen Kulturmedium befüllt.

Für die Gewinnung von dissoziierten hippocampalen und cortikalen Kulturen wurden Mausembryonen der Entwicklungsstufe E17.5-18.5 verwendet. Die Muttertiere wurden mit Hilfe einer CO<sub>2</sub>-Überdosierung getötet, und die Uteri wurden entnommen und in PBS überführt. Die Embryos wurden aus den Decidua entnommen und decapitiert, und die Köpfe wurden in PBS/Glucose überführt. Nun wurden Hippocampi oder Cortices präpariert, in PBS/Glucose mit 1 mg/ml BSA (Sigma) gesammelt und anschließend in einem 15 ml Falcongefäß mit 5 ml einer Lösung von 0.5 mg/ml Papain (Sigma) in PBS/Glucose mit 1 mg/ml BSA unter gelegentlichem Schwenken für 20 min bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 1 ml hitzeinaktiviertem FCS (Sigma) gestoppt, das Gewebe wurde mit einer rundgeschmolzenen Pasteurpipette vorsichtig trituriert, und die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 ×g pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen wurden in 5 ml Medium aufgenommen und in 24 Well Schalen mit einer Dichte von ca.  $6 \times 10^4$  Zellen pro Well ausgebracht. Nach 3 h wurde das Medium gegen 0.5-1 ml Kompletmedium pro Well ausgetauscht, und die Zellen wurden nach einer Kulturdauer von 3-14 d analysiert.

Die hier verwendete Rezeptur für das Kompletmedium (Zafra *et al.* 1990, Brewer *et al.* 1989) entspricht weitestgehend Neurobasalmedium (Gibco) mit Zusatz von B27-Supplement (Gibco).

### 6.2.2.2 Kultivierung von 293-Zellen

293 Zellen (Graham *et al.*, 1977) wurden auf Nunclon  $\Delta$  Surface Schalen in 293 Kulturmedium bei 10% (v/v) CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie mit PBS gewaschen, durch Inkubation in 1× Trypsin/EDTA (Gibco) für 5 min bei 37°C von der Schale abgelöst und in Kulturmedium pelletiert. Die Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen, trituriert und auf die gewünschte Zahl neuer Kulturschalen verteilt (passagiert).

Für Immuncytochemie wurden die Zellen auf runden Glasplättchen (Assistent) in 24 Well Schalen kultiviert. Hierfür wurden entfettete Glasplättchen für 2 h bei 37°C mit 0.5 ml einer 0.01% (w/v) poly-DL-Lysinlösung (Sigma) pro Well beschichtet, 2× mit PBS gewaschen und mit 0.5 ml Kulturmedium pro Well versehen. Die Zellen wurden zur besseren Vereinzelnung erst am Vorabend der Immunfärbung mit einer Dichte von  $5-10 \times 10^5$  Zellen pro Well ausgebracht und am nächsten Morgen gefärbt.

Zur Lagerung wurden die 293 Zellen von einer subkonfluenten Schale abgelöst, pelletiert und bei RT mit einer Dichte von  $10^6$  Zellen/ml in 293 Einfriermedium resuspendiert. Aliquots von 1.8 ml der Zellsuspension wurden in Kryoröhrchen (Nunc) mit einem Mr. Frosty Einfriergerät (Nalgene) gemäß Herstellerangaben eingefroren und in flüssigem N<sub>2</sub> gelagert.

### 6.2.2.3 Kultivierung von Hybridomzellen

Bei Hybridomzellen handelt es sich um spezielle, monoklonale Antikörper exprimierende Zelllinien, die aus der Fusion von Milzzellen einer mit dem gewünschten Antigen immunisierten Maus und einer Myelomzelllinie entstehen. Mit Hilfe von Hybridomzelllinien können praktisch unbegrenzte Mengen des betreffenden Antikörpers erzeugt werden, der in den Zellkulturüberstand sezerniert wird. Die individuellen Eigenschaften und Anforderungen an die Kulturbedingungen einer spezifischen Hybridomzelllinie hängen maßgeblich von der als Fusionspartner eingesetzten Myelomzelllinie ab.

In dieser Arbeit wurde die Hybridomzelllinie 9E10 verwendet, die freundlicherweise von Dr. Michael Meyer zur Verfügung gestellt wurde. Die Zelllinie sezerniert einen Antikörper des Isotyps IgG1, der gegen das humane c-myc Epitop mit der Aminosäuresequenz EQKLISEEDL (Evan *et al.* 1985) gerichtet ist.

Eine Ampulle der 9E10 Hybridomzellen wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, und der Inhalt der Ampulle wurde sofort nach Auftauen in 5 ml Hybridoma Auftaumedium pipettiert. Die Zellen wurden pelletiert, in 3 ml Hybridoma Auftaumedium resuspendiert und in einer 3.5 cm Schale kultiviert. Die Zellen wurden durch schrittweises Zugabe von Medium soweit expandiert, bis sie in 500 ml Kulturflaschen kultiviert werden konnten. Da die Zelllinie nicht-adhärent wächst, wurde jede Zugabe von Medium als Passage gezählt, und es wurde jeweils maximal 1/3 des bisherigen Kulturvolumens

Medium hinzugefügt oder abgenommen. Das Wiedereinfrieren eines Aliquots der Zellen erfolgte, bevor die Zellen in Produktionsmedium transferiert wurden.

Nach 3 Passagen in Auftaumedium wurden die Zellen schrittweise in Produktionsmedium überführt. Es wurden alle 2-3 Tage frisches Produktionsmedium hinzugefügt sowie konditioniertes Medium und ein Teil der Zellen abgenommen, und das konditionierte Medium wurde für die Reinigung des anti-c-myc Antikörpers verwendet, der in einer Konzentration von ca. 8 mg/l Kulturüberstand gefunden wurde. Hierbei wurde besonders ein zu starkes Ansteigen der Zelldichte vermieden, da speziell diese Hybridomzelllinie auf eine zu hohe Zelldichte mit einem irreversiblen Zusammenbruch der Antikörperproduktion reagiert.

#### 6.2.2.4 Transiente und stabile Transfektion von 293 Zellen

293 Zellen wurden mit Hilfe der Calciumphosphat-DNA-Kopräzitationsmethode transfiziert (Chen *et al.* 1987). Diese Methode beruht auf der Bildung eines schwerlöslichen Kopräzipitats aus  $\text{CaCl}_2$  und DNA unter bestimmten pH- und Salzbedingungen, das von den Zellen aufgenommen werden kann. Unter optimalen Bedingungen kann mit dieser Methode bei 293 Zellen eine Transfektionseffizienz von über 90% erzielt werden. Die auf diese Weise in die Zellen gelangte DNA wird zunächst nur vorübergehend transkribiert und geht nach einigen Zellteilungen verloren (transiente Transfektion).

In einem sehr geringen Teil der Zellen wird die transfizierte DNA in die chromosomale DNA der Zellen integriert und kann damit über viele Zellteilungen weitergegeben werden (stabile Transfektion). Nach stabiler Transfektion wird die transfizierte DNA abhängig vom Ort der Integration in die chromosomale DNA, sowie abhängig von der Zahl der in die Chromosomen integrierten Kopien und möglichen partiellen Deletionen der transfizierten DNA mit unterschiedlicher Effizienz transkribiert. Stabil transfizierte Zellen können von den transient transfizierten Zellen mit Hilfe eines positiven Selektionsmarkers isoliert werden, der entweder auf demselben Plasmid enthalten ist oder mit Hilfe eines separaten Plasmids kotransfiziert wird.

Am Vorabend der Transfektion wurden die Zellen mit einer Dichte von  $10^6$  Zellen pro 10 cm Schale in 10 ml Kulturmedium ausgebracht, und am nächsten Morgen wurde das Kulturmedium erneuert. Am Nachmittag wurden pro Transfektionsansatz 10  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in 450  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  mit 50  $\mu\text{l}$  2.5 M  $\text{CaCl}_2$  Lösung gemischt und unter kräftigem Schütteln mit 500  $\mu\text{l}$  BBS Transfektionspuffer versetzt. Der Transfektionsansatz wurde 20 min bei RT inkubiert und vorsichtig zu dem Kulturmedium der Zellen pipettiert, und die Zellen wurden über Nacht bei 3% (v/v)  $\text{CO}_2$  und 95% relativer Luftfeuchte inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit Kulturmedium gewaschen und in frischem Kulturmedium bei 10% (v/v)  $\text{CO}_2$  und 95% relativer Luftfeuchte kultiviert. Auf diese Weise transient transfizierte Zellen wurden 24-36 h nach Transfektion für Experimente eingesetzt.

Für die Erzeugung stabil transfizierter Zelllinien wurden 293 Zellen zunächst mit einem Plasmid transfiziert, das neben der gewünschten cDNA auch das Gen Neomycin-

Phosphotransferase trägt, welches das Antibiotikum G418 inaktiviert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen einer Schale abgelöst und pelletiert und in 293 Selektionsmedium auf 20 Schalen verteilt. Das Selektionsmedium wurde alle 3 Tage gewechselt, und nach 12-14 Tagen bzw. wenn die auf den Schalen sichtbaren Klone einen Durchmesser von 3-5 mm erreicht hatten, wurden einzelne Klone mit Hilfe einer blauen Pipettenspitze von der Schale abgelöst, in eine 48 Well Schale überführt und durch schrittweises Passagieren in stetig größere Kulturschalen expandiert, bis die einzelnen Zelllinien in 10 cm Schalen kultiviert werden konnten.

### 6.2.2.5 Konditionierung von Medium mit Rezeptorkörper

Der EphA5-Rezeptorkörper wurde in 293 Zellen exprimiert, die transient mit dem Plasmid „pCDNA3-IBFmyc“ transfiziert wurden. Es wurden keine stabil transfizierten Zelllinien verwendet, da diese Vergleichsweise sehr viel geringere Mengen Rezeptorkörper produzierten.

Für einen Ansatz wurden 100 10 cm Schalen transient mit dem Expressionsplasmid „pCDNA-IBFmyc“ transfiziert. Für die Konditionierung wurden die 293 Zellen nach der Transfektion in Kulturmedium ohne FCS gehalten, da die im Serum enthaltenen Immunglobuline bei der Isolierung des Rezeptorkörpers zu Verunreinigungen führten. Das serumfreie Medium wurde nach 3 d Konditionierung von den Zellen abgenommen, mit 1/10 Volumen 1 M Tris/HCl Puffer pH 9.0 versetzt, durch einen 0.2 µm Filter sterilfiltriert und bis zur Reinigung des Rezeptorkörpers bei 4°C gelagert. Das konditionierte Medium enthielt ca. 1-1.5 mg/l Rezeptorkörper.

## 6.2.3 Proteinchemische Methoden

### 6.2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Transfer

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde unter Verwendung des Acrylamid Minigelsystems (Hoefer) bei 5 V/cm Elektrodenabstand gemäß Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.* 1989) durchgeführt.

Bei SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde dem Auftragspuffer kein β-Mercaptoethanol zugefügt, und die Proben wurden für 5 min bei 60°C anstelle von 95°C denaturiert, um eine durch Oxidation bedingte Lösung von Disulfidbindungen zu vermeiden. Hierbei wurden nicht-reduzierende nie gemeinsam mit reduzierenden Proben auf demselben Gel aufgetrennt, da sich β-Mercaptoethanol auch auf die in benachbarten Spuren befindlichen Proben auswirkt.

Western-Transfer wurde unter Verwendung des TE 42 Transfor II Tank Blotting System (Amersham) durchgeführt. Hierbei wurde die Kammer mit 6 l auf 4°C gekühltem Transferpuffer befüllt, und das Polyacrylamidgel wurde zwischen zwei mit Transferpuffer getränkten Lagen Whatman Filterpapier (Schleicher&Schüll) auf Immobilon P Transfermembran (Millipore) in die Transferapparatur eingesetzt. Der Transfer wurde bei

1000 mA bei 4°C für 60 min unter Rühren durchgeführt. Nach Ende des Transfers wurde die Transfermembran entnommen, durch Abschneiden einer Ecke markiert und für 30 min bei RT in Western-Blockierlösung geschwenkt. Nun wurde die Membran mit einer geeigneten Verdünnung des Primärantikörpers in Western-Blockierlösung ü/n bei 4°C geschwenkt und am nächsten Morgen 10× für 10 min in TBST gewaschen. Die Membran wurde anschließend für 3 h bei RT mit einer geeigneten Verdünnung eines HRP-konjugierten Sekundärantikörpers in Western-Blockierlösung inkubiert, erneut 10× für 10 min in TBST gewaschen und unter Verwendung des ECL<sup>+</sup>-Chemolumineszenz-Detektionssystem (Amersham) sowie von Hyperfilm Röntgenfilmen (Amersham) entwickelt.

### **6.2.3.2. Anfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen mittels Silberfärbung**

Nach beendeter Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt, und alle Inkubationsschritte der Silberfärbung wurden auf einem Vertikalschüttler bei RT durchgeführt. Das Gel wurde nacheinander für jeweils 30 min bei RT in Silberfärbung Fixativ I, Silberfärbung Fixativ II und in 10% (v/v) Glutaraldehyd (Serva) in H<sub>2</sub>O inkubiert. Nun wurde das Gel für 30 min bei RT in Silberfärbung Färbelösung inkubiert und 10× für jeweils 10 min in H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Gel wurde nun bis zum Erreichen der gewünschten Farbtiefe in Silberfärbung Entwicklerlösung gefärbt, und die Farbentwicklung wurde durch Inkubation für 2× 15 min in 5 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Eisessig gestoppt. Um ein Nachfärben zu vermeiden, wurde das Gel abschließend 5× für 15 min in H<sub>2</sub>O gewaschen.

### **6.2.3.3 Quantifizierung der Rezeptorkörper-Konzentration mittels ELISA**

Für die Quantifizierung der Gewebekonzentration des Rezeptorkörpers wurden zunächst Lysate von Hirngewebe verschiedener Altersstufen hergestellt. Das Hirngewebe wurde mit 1 ml eiskaltem ELISA-Lysepuffer pro 65 mg Naßgewicht Gewebe versetzt und in einem Glasdouncer (Brown) mit 25 Hüben homogenisiert. Das rohe Homogenat wurde für 30 min bei 3000 ×g zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen, auf flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

96 Well Schalen („Nunc-Immuno Plate with Max-Sorb surface“, Nunc) wurden ü/n bei 4°C unter leichtem Schütteln mit 200 µl pro Well einer 1:3000 Verdünnung eines Kaninchen anti-human IgG1 Antikörper (Jackson) in 50 mM NaCO<sub>3</sub>-Puffer pH 9.6 beschichtet. Am nächsten Morgen wurde die Lösung verworfen, und die 96 Well Schale wurde für 2 h bei RT mit 250 µl ELISA-Blockierlösung pro Well inkubiert. Die Blockierlösung wurde entfernt, und die Schale wurde mit 190 µl Probenlösung pro Well befüllt und ü/n bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Hierbei wurde chromatographisch gereinigter Rezeptorkörper als Standard verwendet, und es wurden sowohl Standard als auch Proben in ELISA-Lysepuffer verdünnt. Am nächsten Morgen

wurden die Proben verworfen, die Schale wurde 3× 1 min mit ELISA-Waschpuffer gewaschen, und es wurden nach dem letzten Waschschrift alle Flüssigkeitsreste durch „Ausschlagen“ der Schale auf einer Zellstoffunterlage entfernt. Die Schale wurde nun mit 190 µl pro Well einer 1:70.000 Verdünnung eines HRP-konjugierten Maus anti-human IgG1 Antikörpers in ELISA-Lysepuffer befüllt und ü/n bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Lösung abgegossen, die Schale wurde 3× 1 min bei RT mit ELISA-Waschpuffer gewaschen, und in der Schale verbliebene Flüssigkeitsreste wurden durch „Ausschlagen“ der Schale auf einer Zellstoffunterlage entfernt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 200 µl BM Blue POD Substrate (soluble) Substratlösung (Roche) gestartet und nach Inkubation für 10 min bei RT durch Zugabe von 50 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Well gestoppt, wodurch gleichzeitig ein Farbumschlag von grün-blau zu gelb hervorgerufen wurde. Der ELISA wurde an einem ELISA-Lesegerät (Molecular Devices) bei Wellenlängen von 450 und 650 nm gelesen. Die Auswertung des ELISA erfolgte mit der Software Sigmaplot (SPSS Science) unter Verwendung der Differenz aus den Meßwerten bei 450 und 650 nm.

#### 6.2.3.4 Reinigung von Rezeptorkörpern und monoklonalen Antikörpern

Die gebräuchlichste Möglichkeit zur Reinigung von Antikörpern oder Rezeptorkörpern aus Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatographie beruht auf der hochaffinen Bindung des Fc-Bereichs von Antikörpern an die bakteriellen Proteine A bzw. G unter bestimmten pH- und Salzbedingungen. Die Affinität des Fc-Bereichs an Protein A bzw. G ist von der Klasse des betreffenden Immunglobulins sowie von der Spezies abhängig, aus welcher der Antikörper isoliert wurde, wobei erfahrungsgemäß der murine Fc-Bereich besser an Protein A, der humane Fc-Bereich hingegen besser an Protein G bindet. Nach Bindung der Immunglobuline an immobilisiertes Protein A bzw. G bei leicht alkalischem pH und geeigneten Waschschriften können die Antikörper bei niedrigem pH eluiert werden.

Für die Reinigung von Antikörpern aus Hybridomaüberstand wurde eine Säule mit Protein A-Sepharose (Amersham) mit einem Gelbettvolumen von 1 ml vorbereitet und mit 100 mM Tris/HCl pH 8.0 äquilibriert. Der Zellkulturüberstand wurde mit 1/10 Volumen 1 M Tris/HCl pH 8.0 versetzt und durch einen 0.2 µm Sterilfilter filtriert, und anschließend mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min über die Säule geleitet. Die Säule wurde nacheinander mit jeweils zehn Gelbettvolumina 100 mM Tris/HCl pH 8.0 und 10 mM Tris/HCl pH 8.0 gewaschen, und der Antikörper wurde mit 100 mM Glycin pH 3.0 eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen von 0.5 ml in vorgelegtem 1 M Tris pH 8.0 aufgefangen, und die Fraktionen wurden durch Messung der OD<sub>280</sub> auf Antikörpergehalt getestet. Alle Antikörper haltigen Fraktionen wurden vereinigt und für 3× 6 h gegen jeweils 2 l PBS bei 4°C dialysiert. Der Antikörpergehalt des Dialysats wurde erneut durch Messung der OD<sub>280</sub> bestimmt, und die Antikörperlösung wurde in Aliquots bei -80°C eingefroren. Zur Verringerung von mikrobiellen Kontaminationen während der Aufreinigung wurden nicht mehr als 1 l Zellkulturüberstand pro Isolierung eingesetzt.

Für die Reinigung von Rezeptorkörper aus Zellkulturüberstand wurde analog vorgegangen, jedoch wurde Protein G-Sepharose anstelle von Protein A-Sepharose

eingesetzt, und das Eluat wurde mit 50% (v/v) Glycerin versetzt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert, da der Rezeptorkörper durch Einfrieren inaktiv wurde.

#### **6.2.3.4 Messung von Proteinkonzentrationen**

Proteinkonzentrationen wurden mit dem DC Proteinassay (Biorad) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Um der unterschiedlichen Empfindlichkeit des Assays für verschiedenartige Proteine Rechnung zu tragen, wurde für die Konzentrationsbestimmung gereinigter Antikörper oder Rezeptorkörper  $\gamma$ -Globulin (Biorad), in allen übrigen Fällen BSA (Sigma) als Standard verwendet.

#### **6.2.3.5 N-terminale Aminosäuresequenzierung**

Die N-terminale Aminosäuresequenzierung wurde nach dem Prinzip des Edmann-Abbaus an dem automatischen Gasphasensequenziergerät „PROCISE Protein Sequencing Systems“ (Applied Biosystems) durchgeführt.

Hierzu wurde ein Aliquot des affinitätsgereinigten Rezeptorkörpers mittels SDS-PAGE mit 10% (w/v) Polyacrylamid elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde zur Lokalisierung des Proteins in Coomassie-Färbelösung angefärbt und in Coomassie Entfärbelösung differenziert, und es wurde ein Bereich um die Proteinbande von ca.  $0.5\text{ cm}^2$  der Membran für die Sequenzierung ausgeschnitten. Der Membranabschnitt wurde nacheinander in Methanol, in 20% (v/v) Methanol in  $\text{H}_2\text{O}$ , in  $\text{H}_2\text{O}$  und schließlich in Ethylacetat gespült und in den Adapter des Sequenzierautomaten überführt. Nun wurde die automatische Sequenzierung für 4 Abbauschritte gestartet. Die Phenylthiohydantoin-Derivate der Aminosäuren wurden hierbei mit einer Umkehrphasen-HPLC über eine PTH  $\text{C}_{18}$ -Säule mit einem linear ansteigenden Acetonitrilgradienten aufgetrennt und mittels einer Durchflußküvette bei einer Wellenlänge von 269 nm photometrisch detektiert. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe der Software des Geräteherstellers.

### **6.2.4 Histologische und immunocytochemische Methoden**

#### **6.2.4.1 Transkardiale Perfusion von Mäusen**

Mäuse in postnatalen Altersstufen wurden vor der Herstellung von Gewebeschnitten transkardial perfundiert. Hierzu wurden die Mäuse zunächst durch Injektion von  $20\ \mu\text{l}$  pro Gramm Körpergewicht Chloralhydrat Narkoselösung i.p. narkotisiert, und es wurde mit der Präparation begonnen, sobald die Mäuse keinen Schmerzreflex mehr zeigten. Die Mäuse wurden mit der Bauchseite nach oben mit Präpariernadeln auf einer Styroporunterlage fixiert, und der Bauchraum wurde mit einer spitzen Schere geöffnet. Nun wurde das Diaphragma punktiert, und nach Kollabieren der Lunge wurde das Herz der Maus freigelegt. Bei der Präparation wurde sorgfältig jede Beschädigung von

Blutgefäßen vermieden. Nun wurde das Herz mit einer stumpfen Pinzette fixiert, die Perfusionskanüle wurde in die linke Herzkammer eingeführt und der rechte Vorhof wurde mit einer spitzen Schere punktiert. Nun wurde bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min zunächst mit 10 ml PBS, anschließend mit 20 ml 4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS perfundiert. Nach Ende der Perfusion wurden die Gewebe der Maus entnommen und ü/n in 4% (w/v) PFA in PBS refixiert.

#### **6.2.4.2 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Für die Anfertigung von Gewebeschnitten wurden Objektträger zur Reinigung ü/n in 10% (v/v) Deconex (Merck) in H<sub>2</sub>O eingeweicht, in H<sub>2</sub>O gespült und in 70% (v/v) Ethanol entfettet. Die Objektträger wurden nun für 5 min bei RT in 2% (v/v) Aminopropylmethoxysilan (TESPA, Sigma) in Aceton inkubiert, 3× für jeweils 5 min in Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet.

Freischwimmende Gewebeschnitte wurden auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen. Hierbei wurden Objektträger zunächst mit Deconex (Merck) und Ethanol gereinigt. Die Objektträger wurden nun in eine Gelatinelösung (200 mg CrK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•12 H<sub>2</sub>O in 400 ml H<sub>2</sub>O lösen, 2 g Gelatine zufügen, unter Rühren aufkochen und vor Gebrauch auf RT abkühlen) getaucht und an der Luft getrocknet

Fixiertes Gewebe wurde zwecks Kryoprotektion 2× ü/n in 0.5 M Saccharose in PBS inkubiert, in Peel Away Kunststofförmchen (Miles) in Tissue-Tek (Miles) eingebettet und auf der Oberfläche von flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Die Gewebelöcke wurden auf den Objekthalter des Gefriermikrotoms (Leica) aufgefroren, bei einer Dicke von 10-20 µm geschnitten mit einem auf 40°C vorgewärmten Objektträger aufgenommen. Die Schnitte wurden für 20 min bei 40°C an der Luft getrocknet und bei -80°C gelagert.

Für die Färbung von freischwimmenden Gewebeschnitten wurden die Schnitte nicht mit Objektträgern aufgenommen, sondern mit einer vorgekühlten Pinzette in PBS mit 0.1% (w/v) NaN<sub>3</sub> in 24 Well Schalen überführt und bei 4°C gelagert.

#### **6.2.4.3 Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten**

Für immunhistochemische Färbungen wurden Gewebeschnitte wie unter 6.2.4.2 beschrieben mit einer Standarddicke von 14 µm angefertigt. Für Immunfärbungen am Rückenmark wurde eine Ventrallaminektomie durchgeführt, und in Abhängigkeit vom Alter wurde das Rückenmark jeweils bei 4°C für 2 h bei E14.5, für 2.5 h bei E16.5 und für 4 h bei P0.5 in 4% (w/v) PFA in PBS fixiert.

Die Schnitte wurden zunächst mit einem Fettstift (Daco) auf dem Objektträger eingekreist, in PBS befeuchtet und für 2 h in Immunblockierlösung I inkubiert. Nun wurden die Schnitte in einer geeigneten Verdünnung des Primärantikörpers in Immunblockierlösung II ü/n bei 4°C inkubiert und am nächsten Morgen 5× 20 min bei

RT in 0.1% (v/v) Triton X-100 in PBS (PBX) gewaschen. Nun wurden die Schnitte für 3 h bei RT mit einer geeigneten Verdünnung des Sekundärantikörpers in Immunoblockierlösung II inkubiert und erneut 5× für 20 min in PBX gewaschen. Bei direkt an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörpern wurde unmittelbar nach dem letzten Waschschrift die Farbentwicklung durchgeführt. Bei biotinylierten Sekundärantikörpern wurde für 1 h bei RT mit der nach Angaben des Herstellers (Vector) vorbereiteten ABC Lösung inkubiert, erneut 5× für 20 min bei RT in PBX gewaschen und anschließend entwickelt.

Für die Farbentwicklung wurde DAB-Färbelösung auf die Schnitte gegeben, und die Farbentwicklung wurde durchgeführt, bis die Präparate den gewünschten Färbegrad zeigten. Zum Abstoppen der Entwicklung wurden die Schnitte in eiskaltes PBS überführt, anschließend 5× 20 min bei RT in PBS gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe für jeweils 2 min in 30%, 60%, 80%, 95% und 100% Ethanol in H<sub>2</sub>O (je v/v) entwässert. Nun wurden die Schnitte 2× 15 min in Xylol inkubiert und mit Einbettmittel Entellan (Merck) unter einem Deckglas eingebettet.

Immunhistochemische Färbungen von dicken Gewebeschnitten ( $\geq 20 \mu\text{m}$ ) wurden zwecks besserer Penetration des Antikörpers freischwimmend durchgeführt. Hierbei wurden die Gewebeschnitte vom Gefriermikrotom mit einer vorgekühlten Pinzette in eine 24 Well Schale in PBS überführt, und es wurde dieselbe Abfolge von Inkubationsschritten wie bei Färbungen auf Objektträgern appliziert. Hierbei erfolgte die Inkubation auf einem Vertikalschüttler (Unitwist), und die Schnitte wurden für die gesamte Prozedur in demselben Well belassen, während lediglich die Inkubationslösungen mit Hilfe einer Pasteurpipette ausgewechselt wurden. Nach Abschluß der Färbung wurden die Schnitte mit einem Pinsel auf gelatinisierte Objektträger transferiert, an der Luft getrocknet und mit Einbettmittel Entellan (Merck) unter einem Deckglas eingebettet.

#### **6.2.4.4 Immuncytochemische Färbungen von kultivierten Zellen**

Runde Deckgläser mit einem Durchmesser von 13 mm wurden in einer Mischung aus 50% (v/v) konzentrierter HCl in Ethanol gereinigt, mit PBS gewaschen, in 24 Well Schalen verteilt und für 3 h bei 37°C mit 0.01% (w/v) poly-DL-Lysin (Sigma) in H<sub>2</sub>O beschichtet. Die Deckgläser wurden 3× mit PBS gespült, und die Zellen wurden am Vortag der Färbungen mit einer Dichte von  $3\text{-}8 \times 10^4$  Zellen pro Deckglas in 1 ml Medium pro Well ausgebracht.

Am nächsten Morgen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden 2× mit PBS gewaschen und für 20 min bei RT in 4% (w/v) PFA in PBS fixiert. Die Zellen wurden 3× für 5 min bei RT mit PBS gewaschen, für 2 h bei RT mit Immunoblockierlösung I inkubiert und ü/n bei 4°C in einer geeigneten Verdünnung des Primärantikörpers in Immunoblockierlösung II inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen 5× für 10 min bei RT in PBX gewaschen, für 2 h in einer geeigneten Verdünnung des Sekundärantikörpers in Immunoblockierlösung II inkubiert und anschließend erneut 5×

für 10 min in PBX gewaschen. Bei direkt an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörpern wurde unmittelbar nach dem letzten Waschschrift die Farbentwicklung durchgeführt, bei biotinylierten Sekundärantikörpern wurde für 1 h bei RT mit der nach Angaben des Herstellers (Vector) vorbereiteten ABC Lösung inkubiert, erneut 5× für 10 min bei RT in PBX gewaschen und anschließend entwickelt.

Für die Farbentwicklung wurde DAB-Färbelösung auf die Schnitte gegeben, und die Farbentwicklung wurde durchgeführt, bis die Präparate den gewünschten Färbegrad zeigten. Zum Abstoppen der Entwicklung wurden die Zellen in 0.1 % (w/v)  $\text{NaN}_3$  in PBS gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe mit 30%, 60%, 80%, 95% und 100% Ethanol in  $\text{H}_2\text{O}$  (jeweils v/v) entwässert. Die Deckgläser wurden mit einer Pinzette den 24 Well Schalen entnommen, in Xylol äquilibriert und mit Einbettmittel Entellan auf einem Objektträger eingebettet.

#### **6.2.4.5 Oberflächenfärbung kultivierter Zellen**

In dieser Arbeit wurden die über einen GPI-Anker mit der Plasmamembran verbundenen, an der Zellaußenseite exponierten Ephrine-A2 und A5 mit dem EphA5-Rezeptorkörper angefärbt. Zur Vermeidung unspezifischer cytoplasmatischer Färbungen infolge von Aufnahme des Rezeptorkörpers durch die Zelle wurde ohne vorherige Fixierung in Abwesenheit von Detergenz und in Gegenwart von  $\text{NaN}_3$  in sehr kurzen Inkubationsschritten unter Applikation hoher Konzentrationen des Rezeptorkörpers gefärbt.

Am Vortag der Färbung wurden Zellen der Zelllinien „293 Ephrin-A2myc“ und „293 Ephrin-A5myc“ auf entfettete und für 3 h bei 37°C mit 0.01% (w/v) poly-DL-Lysin (Sigma) in  $\text{H}_2\text{O}$  beschichtete runde Deckgläser mit einem Durchmesser von 13 mm in 24 Well Schalen mit einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen pro Well in jeweils 1 ml 293 Kulturmedium pro Well ausgebracht. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen mit einer Pinzette aus den 24 Well Schalen entnommen, und alle Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden 1× für 1 min mit Modified Hank's Puffer (MHP) gewaschen und anschließend für 15 min in 10% (v/v) Ziegenserum und 1% (w/v) BSA in MHP inkubiert. Nun wurden die Zellen für 30 min mit 20  $\mu\text{g/ml}$  affinitätsgerinigtem Rezeptorkörper in MHP mit 10% (v/v) Ziegenserum und 1% (w/v) BSA inkubiert und 3× für 1 min mit MHP gewaschen. Die Zellen wurden nun für 30 min mit einer 1:200 Verdünnung von Cy3- bzw. Cy2-konjugiertem Kaninchen anti-human IgG1 Antikörper (Jackson) inkubiert, 5× für 5 min in MHP gewaschen und für 30 min mit 4% (w/v) PFA in PBS fixiert. Die Deckgläschen wurden 2× mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, mit Immunofluor Eindeckmedium (ICN) in inverser Orientierung auf Objektträger eingebettet und unter Epifluoreszenz am Mikroskop analysiert.

#### 6.2.4.6 Immunhistochemische Färbungen von ganzen Mausembryonen

Für die Ganzkörperfärbungen von Mausembryonen wurden Mäuse der geeigneten Genotypen ü/n verpaart. Das Auftreten eines Vaginalpfropfes bei den Weibchen am folgenden Morgen zeigte eine erfolgreiche Kopulation während der Nacht an und wurde als E0.5 gezählt. Für die Ganzkörperfärbungen wurden Embryonen der Alter E12.5 und E14.5 verwendet.

Zur Entnahme der Embryonen wurden die trächtigen Muttertiere mit Hilfe einer CO<sub>2</sub> Überdosierung getötet, und es wurde der Uterus entnommen und in PBS überführt. Nun wurden die Embryonen aus den Decidua präpariert, in PBS gespült und anschließend unter Schütteln ü/n bei 4°C in Dent's Fixativ fixiert. Am nächsten Morgen wurden die Embryos zum Bleichen für 6 h in 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Dent's Fixativ inkubiert und in einer absteigenden Methanolreihe für jeweils 30 min bei RT in 70%, 50%, 30% (jeweils v/v) in PBX rehydratisiert und 2× 30 min in PBX inkubiert. Zum Blockieren wurden die Embryonen für 2 h bei RT in 80% FCS/20% Dimethylsulfoxyd (DMSO, jeweils v/v) inkubiert. Nun wurden die Embryonen unter Schütteln für 2 d bei 4°C in einer 1:200 Verdünnung des anti-Neurofilament Antikörpers (Chemicon) inkubiert und anschließend 10× für 30 min bei RT in PBX gewaschen. Nun wurden die Embryonen für 1 d bei 4°C in einer 1:500 Verdünnung des HRP-konjugierten anti-Maus Antikörpers (Jackson) inkubiert und anschließend 10× 30 min bei RT in PBX gewaschen. Um eine homogene Farbentwicklung zu gewährleisten, wurden die Embryonen unter Lichtausschluß zunächst für 20 min in DAB-Färbelösung ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> präinkubiert. Nun wurde die Farbentwicklung durch Zugabe von 4 µl 0.1% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro ml Färbelösung gestartet, und nach Erreichen des gewünschten Färbegrades wurde die Entwicklung gestoppt, indem die Embryonen in eiskaltes 0.1% (w/v) NaN<sub>3</sub> in PBS überführt wurden. Die Embryos wurden anschließend 5× 20 min bei RT in PBS gewaschen und in einer aufsteigenden Methanolreihe für jeweils 30 min in 30%, 50%, 70% und 100% (jeweils v/v) Methanol in PBS dehydratisiert.

Zum „Klären“ (transparent machen ungefärbter Gewebereiche) wurden die Mausembryonen aus 100% Methanol in eine Mischung aus 2/3 Benzylbenzoat (Merck) und 1/3 Benzylalkohol (Merck) überführt.

#### 6.2.4.7 mRNA *in-situ* Hybridisierung

Für die mRNA *in-situ* Hybridisierung wurden Gewebeschnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt, auf TESPA-beschichtete Objektträger aufgenommen und für 20 min bei 50°C an der Luft getrocknet. Die Schnitte wurden für 10 min bei RT in 4% (w/v) PFA in PBS refixiert, in einer aufsteigenden Ethanolreihe mit 30%, 60%, 80%, 95%, 100% (jeweils v/v) dehydratisiert und bei RT an der Luft getrocknet.

Als Matrizen für die Herstellung radioaktiv markierter, einzelsträngiger RNA-Sonden wurden Fragmente der zu detektierenden Transkripte verwendet, welche in den pCR4-

TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert wurden. In diesem Vektor ist die Insertionsstelle von Promotorsequenzen für T3 und T7 RNA-Polymerase flankiert. Zunächst wurden die Plasmide mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme linearisiert und mittels PCE sowie Ethanol fällung gereinigt. Diese linearisierte Plasmid-DNA diente als Matrize für die *in-vitro* Transkription von einzelsträngigen RNA-Transkripten sowohl in antisense Orientierung (als eigentliche Sonde) als auch in sense Orientierung (als Kontrollsonde). Die radioaktive Markierung erfolgte hierbei durch Einbau von [ $\alpha^{35}$ -S]-UTP. Für einen *in-vitro* Transkriptionsansatz wurden 1  $\mu$ l linearisierte Plasmid-DNA (1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 4  $\mu$ l 5 $\times$  Transkriptionspuffer (Roche), 1  $\mu$ l einer Mischung von ATP/CTP/GTP (je 10 mM, Amersham), 2  $\mu$ l [ $\alpha^{35}$ -S]-UTP (20  $\mu$ Ci/ $\mu$ l, Amersham), 0.5  $\mu$ l Dithiothreitol (1 M, Amersham), 0.5  $\mu$ l RNase A-Inhibitor (Roche), 1  $\mu$ l T3 bzw. T7 RNA-Polymerase (10 U/ $\mu$ l, Stratagene) sowie 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gemischt und für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zum Abbau der Plasmid-DNA wurden dem Ansatz nun 27.5  $\mu$ l TE, 2.5  $\mu$ l 100 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 1  $\mu$ l RNase freie DNase I (10<sup>3</sup> U/ $\mu$ l, Roche) zugefügt, und der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Nun wurden freie Nukleotide sowie Pufferbestandteile mittels Gelfiltration über eine ProbeQuant G-50 Micro Column (Amersham) gemäß Herstellervorschrift abgetrennt, und die Markierung der Sonden wurde mittels Szintillationszählung bestimmt. Die Sonden wurden in *in-situ* Hybridisierungspuffer auf eine Zählrate von 40.000 cpm/ $\mu$ l verdünnt.

Vor der Hybridisierung wurden die Gewebeschnitte für 15 min in 2.5  $\mu$ g/ml Proteinase K (Roche) in 5 $\times$  TE bei RT inkubiert, und der Verdau wurde durch Inkubation für 30 sec in 0.2% (w/v) Glycin (Merck) in PBS gestoppt. Die Schnitte wurden dann bei RT für 1 min in PBS, für 10 min in 4% (w/v) PFA in PBS und erneut 2 min in PBS inkubiert, für 10 min in 0.25% (v/v) Essigsäureanhydrid (Sigma) in 0.1 M Triethanolamin (Sigma) pH 8.0 acetyliert und schließlich für 2 min in PBS gewaschen. Nun wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe für je 2 min in 30%, 60%, 80%, 95% und 100% Ethanol in H<sub>2</sub>O (je v/v) inkubiert und an der Luft getrocknet.

Die in *in-situ* Hybridisierungspuffer verdünnten Sonden wurden für 10 min bei 70°C denaturiert und bis zum Auftragen auf die Schnitte bei 54°C gehalten. Je nach Größe wurden die Schnitte mit 20-40  $\mu$ l Sonde überschichtet, mit kleinen Parafilmstücken abgedeckt und für 6 h bei 60°C in einer feuchten Kammer hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Parafilmstücke durch kurzes Eintauchen in *in-situ* Waschpuffer bei 50°C abgespült, und die Schnitte wurden nun 3 $\times$  für 20 min bei 50°C in *in-situ* Waschpuffer inkubiert. Darauf wurden die Schnitte 2 $\times$  für 5 min bei 37°C in RNase Puffer gespült und für 30 min bei 37°C in 20  $\mu$ g/ml RNase A (Sigma) in RNase Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut 3 $\times$  für 20 min bei 50°C in *in-situ* Waschpuffer inkubiert und in einer aufsteigenden Ethanolreihe für jeweils 2 min in 30%, 60%, 80%, 95% und 100% Ethanol in H<sub>2</sub>O (je v/v) dehydratisiert, wobei den Alkoholbädern mit Ausnahme des 100%-igen Ethanols 250 mM NH<sub>4</sub>Ac (Endkonzentration) zugefügt wurde, um das Auswaschen der Radioaktivität aus den Schnitten zu minimieren.

Nun wurden die Schnitte an der Luft getrocknet und zur Kontrolle der Hybridisierung für 2-3 d auf Röntgenfilm exponiert. Bei befriedigendem Hybridisierungserfolg wurden die Schnitte mit einer photographischen Emulsion überschichtet. Hierzu wurde photographische Emulsion NTB-2 (Kodak) im Verhältnis 1+1 mit 0.5 M NH<sub>4</sub>Ac in H<sub>2</sub>O gemischt und im Wasserbad bei 42°C geschmolzen. Nun wurde die geschmolzene Emulsion mit einer Pipette auf die Gewebeschnitte aufgebracht, und überschüssige Emulsion wurde durch Schrägstellen der Objektträger ablaufen gelassen. Zum Erstarren der Emulsion wurden die Objektträger für 15 min auf eine eisgekühlte Metallplatte gelegt. Nun wurde die Emulsion an der Luft getrocknet, und anschließend wurden die Schnitte für 7-40 d bei 4°C exponiert.

Nach beendeter Exposition wurde die photographische Emulsion für 5 min in D19 Entwickler (Kodak) entwickelt, für 1 min in Leitungswasser gespült, für 5 min in 30% (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O fixiert und für >1 h in Leitungswasser gespült.

Nun erfolgte eine histologische Färbung der Gewebeschnitte mit einer 0.02% (w/v) Lösung des Kernfarbstoffes Toluoidinblau (Merck) in H<sub>2</sub>O. Hierzu wurden die Präparate zunächst für 15-30 min in der Toluoidin Färbelösung inkubiert, dann wurde die Färbung bis zum gewünschten Färbegrad in Leitungswasser differenziert. Die Präparate wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert, 2× je 15 min in Xylol inkubiert und mit Entellan (Merck) Einbettmittel unter einem Deckglas eingebettet.

Die Präparate wurden unter Dunkelfeldbeleuchtung mikroskopiert und photographisch dokumentiert, wobei die Spezifität der Signale durch Vergleich der mit antisense bzw. sense Sonden hybridisierten Schnitte beurteilt wurde.

#### 6.2.4.7 Anfertigung von Korrosionsausgüssen

Korrosionsausgüsse wurden gemäß Romeis (1989) angefertigt und an einem Scanning Elektronenmikroskop analysiert.

#### 6.2.5 Transgene Mäuse

Die Etablierung der Mauslinie *tau*<sup>EphA5lg/EphA5lg</sup> erfolgte mit Genehmigung der Regierung Oberbayern am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried (Tierversuchsvorhaben „Ephrin-Antagonist exprimierende transgene Maus“ Az 211-2531-91/99, Leiter des Tierversuchsvorhabens: Dr. Harald Schnürch, Stellvertretender Leiter: Diplom-Biochemiker Lothar Lindemann; Schreiben der Regierung Oberbayern vom 01.10.1999). Alle Arbeiten mit Mäusen wurden in Einklang mit den gültigen tierschutzrechtlichen Bestimmungen der Regierung Oberbayern bzw. des Veterinäramtes des Kantons Basel durchgeführt. Standardarbeiten wie Verpaarung von Mäusen, Entwöhnung von Jungtieren, Markierung von Tieren etc. erfolgten gemäß einschlägiger Standardprotokolle gemäß Silver *et al.* (1995) und Hogan *et al.* (1994) und werden hier nicht beschrieben.

### 6.2.5.1 Gewinnung von embryonalen Fibroblasten

Für die Präparation von embryonalen Fibroblasten (EF) wurde von Dr. Michael Meyer freundlicherweise eine Mauslinie zur Verfügung gestellt, welche das Gen Neomycin-Phosphotransferase in allen Zellen exprimiert. Die Mäuse wurden ü/n verpaart, und das Auftreten eines Vaginalpfropfes bei den Weibchen am nächsten Morgen zeigte eine erfolgreiche Kopulation an und wurde als E 0.5 gezählt.

Bei E14.5 wurden die trächtigen Muttertiere durch CO<sub>2</sub> Überdosierung getötet, die Uteri wurden entnommen und in PBS überführt und die Embryonen wurden in PBS freipräpariert. Von jeweils zehn Embryos wurden Kopf und innere Organe entfernt, und das Gewebe wurde nun zur Entfernung von Blut in PBS gespült und mit einer scharfen Schere in einer Petrischale in 1-2 mm kleine Stücke zerschnitten. Die Gewebestücke wurden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben in 30 ml 0.1% (w/v) Trypsin/EDTA (Gibco) in PBS mit 0.1 mg/ml DNase I (Sigma) in Gegenwart von Glasperlen für 30 min bei 37°C auf einem Magnetrührer vorsichtig gerührt. Nun wurde die Suspension durch ein Zellsieb mit 40 µm Maschenweite in EF-Medium filtriert, die Gewebereste wurden erneut mit 30 ml 0.1% (w/v) Trypsin/EDTA (Gibco) in PBS mit 0.1 mg/ml DNase I versetzt und für 30 min bei 37°C gerührt, und die Suspension wurde wieder durch ein Zellsieb filtriert. Die vereinigten Filtrate wurden bei 1000 rpm pelletiert und die Zellen wurden in EF-Medium resuspendiert und gezählt. Nun wurden 10<sup>6</sup> Zellen auf je einer 10 cm Kulturschale ausgebracht und ü/n kultiviert, und am nächsten Morgen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bis zur Konfluenz in EF-Medium kultiviert. Dieser Zustand wurde als Passage 0 (P0) gewertet.

Die P0 EF wurden bis zu P4 expandiert und hierbei jeweils im Verhältnis 1:4 gesplittet. Nun wurden die Zellen trypsiniert, pelletiert und zur Inaktivierung als Zellpellet mit einer Röntgenquelle mit 5500 rad bestrahlt. Die Zellen wurden in EF-Einfriermedium resuspendiert, gezählt und in Aliquots zu 1-5×10<sup>6</sup> Zellen eingefroren und in flüssigem N<sub>2</sub> gelagert.

### 6.2.5.2 Kultivierung von R1 ES-Zellen

R1 ES-Zellen wurden auf gelatinisierten Kulturschalen auf einer semikonfluenten Lage von EF-Zellen in Gegenwart von Leukemia-inhibiting Factor (LIF, Gibco) bei 10% (v/v) CO<sub>2</sub> kultiviert, wobei die inaktivierten, Neomycin-resistenten EF jeweils am Vortag mit einer Dichte von 5×10<sup>6</sup> Zellen pro 10 cm Kulturschale ausgebracht wurden. Hierbei wurde speziell auf Eignung für ES-Zellen getestet, für 60 min bei 56°C hitzeinaktiviertes Serum sowie 0.1% (w/v) Trypsin in Glukose haltiger Saline (ES-Trypsin) verwendet. R1 ES-Zellen wurden etwa alle zwei Tage im Verhältnis 1:3 gesplittet und nach zwei Passagen nach Auftauen mittels Elektroporation transfiziert.

### 6.2.5.3 Transfektion und Selektion der ES-Zellen

Für eine Elektroporation wurden 50 µg des Rekombinationskonstruktes mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert und mittels Ethanolfällung und Auflösen des Präzipitats in H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 1 µg/ml gebracht. Nun wurden ES-Zellen trypsinisiert, pelletiert und in PBS mit einer Dichte von 5×10<sup>6</sup> Zellen/ml resuspendiert. Es wurden 0.8 ml der ES-Zellsuspension in eine Elektroporationsküvette mit 4 mm Elektrodenabstand gegeben, mit 20 µg des linearisierten Rekombinationskonstruktes versetzt und bei einer Spannung von 250 V und einer Kapazität von 500 µF elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in der Küvette für 30 min auf Eis inkubiert, in ES-Medium resuspendiert und auf vier 10 cm Kulturschalen mit EF ausgebracht.

Nach 24 h wurde das ES-Medium durch ES-Selektionsmedium ersetzt und täglich gewechselt. Ab dem dritten Tag in ES-Selektionsmedium wurde Einsetzen von Zelltod, ab dem siebten Tag das Auftreten distinkter ES-Kolonien beobachtet. Ab dem zehnten Tag in ES-Selektionsmedium wurden ES-Zellklone gepickt. Hierzu wurde die Schale mit den ES-Kolonien mit PBS gewaschen, und es wurden einzelne ES-Zellklone unter PBS unter einem Präpariermikroskop mit einer gelben Pipettenspitze abgelöst und in eine 96 Well Schale mit Rundboden transferiert, welche zuvor mit 50 µl ES-Trypsin pro Well befüllt wurde. Die ES-Zellklone wurden für 5 min bei 37°C in der Trypsinlösung inkubiert, mit einer Mehrkanalpipette trituriert und in eine 96 Well Schale mit EF und 150 µl ES-Selektionsmedium pro Well überführt. Die ES-Zellen wurden in 96 Well Schalen 2× gesplittet, und 4 Duplikate der ES-Zellen in 96 Well Schalen wurden eingefroren. Hierzu wurden die adhärenen ES-Zellen mit 150 µl ES-Einfriermedium pro Well versehen, mit 50 µl sterilem Mineralöl überschichtet und in einer Styroporbox bei -80°C eingefroren.

Nun wurde eine Kopie der ES-Zellklone aufgetaut, expandiert und für die Isolation von genomischer DNA verwendet. Nach der Identifikation der ES-Zellklone mit korrekter Rekombination wurden die betreffenden Klone von den verbliebenen Duplikaten aufgetaut, expandiert, karyotypisiert und für die Erzeugung von Chimären eingesetzt.

### 6.2.5.4 Karyotypisierung

Vor Beginn der Karyotypisierung wurden die ES-Zellen für zwei Passagen auf gelatinisierten Kulturschalen ohne EF passagiert. Am Vortag der Karyotypisierung wurden die konfluenten Zellen auf eine 9 cm Schale gesplittet. Am nächsten Morgen wurde den Zellen Colcemid (Sigma) in einer Konzentration von 40 µg/ml in ES Medium zugesetzt. Nach 3 h wurden die Zellen trypsinisiert, pelletiert und in 1 ml PBS in einem 2 ml Eppendorfgefäß resuspendiert. In den folgenden Schritten wurden die Zellen jeweils durch Zentrifugation bei 400 ×g für 2 min in einer Tischzentrifuge bei RT pelletiert.

Die Zellen wurden pelletiert, der Überstand der Zellen wurde abgenommen, und die Zellen wurden vorsichtig in 0.56% (w/v) KCl resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Dieser Schritt diente dem Aufquellen der Zellen. Nun wurden die Zellen

pelletiert, für 10 min in Fixierlösung aus 75% Methanol und 25% Eisessig (jeweils v/v) fixiert und ü/n bei 4°C in Fixierlösung inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen in verschiedenen Verdünnungen in frischer Fixierlösung mit einer silikonisierten Pasteurpipette auf entfettete, feuchte Objektträger aus einer Höhe von ca. 1 m getropft, und die Objektträger wurden bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre getrocknet. Die Objektträger wurden für 20 min in Giemsa Färbelösung (Gibco) gefärbt, an der Luft getrocknet, in Xylol getaucht und mit Entellan Einbettmittel (Merck) unter Deckgläsern eingedeckt. Es wurden von 50 Karyotypen pro Zelllinie Photos angefertigt und die Zahl der Chromosomen bestimmt. Hierbei wurden alle Karyotypen mit weniger als 40 Chromosomen nicht in die Auswertung einbezogen.

### 6.2.5.5 Injektion von ES-Zellen in Blastocysten

Für die Erzeugung von Blastocysten zur Injektion von ES-Zellen wurden weibliche Mäuse des Stammes C57BL/6 (Tierhaus des MPI für Biochemie, Martinsried) mit einem Alter von vier Wochen superovuliert. Hierzu wurden die Weibchen bei einem 6.00-20.00 Uhr hell/ 20.00-6.00 Uhr dunkel-Rythmus gehalten, an Tag 1 um 18.00 Uhr mit jeweils 5 IU PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin, Sigma) und am Tag 3 um 15.00 Uhr mit jeweils 5 IU hCG (Human Chorionic Gonadotropin, Sigma) i.p. injiziert. In der Nacht von Tag 3 auf Tag 4 wurden jeweils zwei Weibchen mit einem Männchen des Inzuchtstammes C57BL/6 verpaart, und Weibchen, die am Morgen von Tag 4 einen Vaginalpfropf aufwiesen, wurden an Tag 7 zur Isolation von Blastocysten verwendet.

Die Weibchen wurden durch eine CO<sub>2</sub> Überdosierung getötet, und der Uterus der Tiere wurde zwischen Ovidukt und Ovar sowie am Cervix herausgeschnitten. Nun wurden die Blastocysten mit M2-Medium (Speciality Media) mit Hilfe einer Injektionsspritze in eine 3.5 cm Kulturschale aus dem Uterus vom Cervix her in Richtung Oviduct herausgespült. Die Blastocysten wurden mittels einer Mundpipette gesammelt und in Tropfen von M16 Medium (Speciality Media) unter Paraffinöl bei 37°C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> bis zu Beginn der Injektion inkubiert. Für die Injektion wurden nur Blastocysten in späten Reifestadien eingesetzt.

Die Injektion von ES-Zellen in Blastocysten erfolgte in M2-Medium (Speciality Media) unter Paraffinöl (Sigma) mit Hilfe einer mittels Öldruck operierenden Mikroinjektionsapparatur (Eppendorf), wobei ein Objektträger mit Vertiefung als Injektionskammer diente. In die Injektionskammer wurden 10-15 Blastocysten sowie einige hundert zuvor trypsinierte und sorgfältig vereinzelt, in M2-Medium (Speciality Media) resuspendierte ES-Zellen transferiert. Es wurden 10-20 ES-Zellen in die Injektionspipette eingesaugt, und eine Blastocyste wurde mit der Haltepipette so angesaugt, daß das Blastocöl distal zu der Haltepipette orientiert war. Nun wurde die Injektionspipette in das Blastocöl eingestochen, die ES-Zellen wurden injiziert und die Blastocyste wurde von der Haltepipette freigesetzt. Nach der Injektion wurden die Blastocysten für 2 h in M16 Medium (Speciality Media) bei 37°C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> unter Paraffinöl inkubiert und anschließend in die Uteri scheinträchtiger Mäuse transferiert.

### 6.2.5.6 Uterustransfer der injizierten Blastocysten

Für den Uterustransfer wurden an Tag 1 10 Wochen alte Weibchen des Stammes NMRI (Charles River) ü/n mit vasktomierten Männchen verpaart, die freundlicherweise von Dr. Michael Meyer zur Verfügung gestellt wurden. Für den Eingriff wurden Weibchen ausgewählt, welche am nächsten Morgen einen Vaginalpfropf aufwiesen und damit zwar nicht trächtig, jedoch von ihrem Hormonstatus in einen der Trächtigkeit äquivalenten Zustand versetzt worden waren. An Tag 3 wurden die Weibchen durch eine Injektion von 15 µl einer 2.5% (w/v) Lösung von Avertin (Sigma) in PBS pro g Körpergewicht i.p. narkotisiert. Nun wurde das Fell der narkotisierten Maus mit 70% (v/v) Ethanol gereinigt, es wurden Fell und Unterhaut lateral dorsal mit Hilfe einer spitzen Schere mit einem kleinen Schnitt geöffnet, und der Uterus und Ovidukt wurden mit einer stumpfen Pinzette vorsichtig auf die Körperaußenseite transferiert. Nun wurde in den Uterus an der dem Ovidukt zugewandten Seite mittels einer Injektionskanüle ein Loch eingestochen, und es wurden mit Hilfe der Transferkapillare 10 Blastocysten in den Uterus transferiert. Uterus und Ovidukt wurden nun wieder in das Körperinnere der Maus zurücktransferiert und Fell sowie Oberhaut wurde mittels Klammerung geschlossen. Nachdem dieselbe Operation auf der anderen Seite der Maus durchgeführt worden war, wurde die Maus mit einem Zellstofftuch umhüllt und im Käfig zum Aufwachen auf eine 37°C warme Wärmeplatte gestellt.

### 6.2.5.7 Aufzucht und Verpaarung von Chimären, Rückkreuzung

Die aus den injizierten Blastocysten geborenen Chimären wurden etwa ab dem 7. postnatalen Tag anhand der Fellfarbe auf den Grad des vorliegenden Chimärismus analysiert, wobei schwarze Fellhaare auf den Beitrag der Empfänger-Blastocyste, braune Fellhaare auf den Beitrag der ES-Zellen hinwiesen. Die Chimären wurden nach Ende der 4. postnatalen Woche von ihren Müttern abgesetzt. Da weibliche Chimären erfahrungsgemäß häufig einen X0-Genotyp haben bzw. infertil sind, wurden lediglich männliche Chimären mit einem geschätzten Fellchimärismus > 70% ab einem Alter von 10 Wochen mit Weibchen des Inzuchtstammes C57BL/6 (Tierhaus des MPI für Biochemie, Martinsried) verpaart. Mit dieser Strategie konnte anhand der Fellfarbe der 1. Filialgeneration (F1, sog. Gründertiere) ab dem 7. postnatalen Tag eindeutig unterschieden werden, ob die Tiere einen Beitrag der Stammzellen trugen: Alle Tiere mit Beitrag der ES-Zellen hatten eine braune Fellfarbe, alle Tiere ohne Beitrag der ES-Zellen hatten eine schwarze Fellfarbe.

Die F1 Tiere der Mauslinie hatten einen gemischten genetischen Hintergrund aus den Anteilen der beiden Inzuchtstämme SV129 und C57BL/6. Für die Erzeugung einer congenischen Mauslinie wurden die Tiere wiederholt gegen Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 (Tierhaus des MPI für Biochemie, Martinsried) gekreuzt. Mit Hilfe dieser sog. Rückkreuzung wurden dem Anteil des Inzuchtstammes SV129 zugehörigen Allele „herausverdünnt“ und es wurde eine congenische Mauslinie erzeugt, die in allen Genloki mit Ausnahme der den *tau*-Lokus unmittelbar umgebenden Loci ausschließlich Allele des Inzuchtstammes C57BL/6 trägt.

#### **6.2.5.8 Retinotopiemessung mittels Intrinsic Signal Optical Imaging**

Die Retinotopiemessungen mit Hilfe von Intrinsic Signal Optical Imaging wurden von Mark Hübener, Sven Schütt und Claire Creutzfeld am Max-Planck-Institut für Neurobiologie gemäß Schütt *et al.* (2002) durchgeführt.

## 7 Abkürzungen und Begriffe

Die chemischen Elemente wurden mit den üblichen Symbolen, organische Verbindungen gemäß der gültigen IUPAC-Nomenklatur, Aminosäuren mit dem Einbuchstabencode benannt. Die zu Genen gehörigen Molekülnamen wurden kursiv geschrieben. Eph-Rezeptoren und Ephrine wurden gemäß der vom Eph-Committee vorgeschlagenen, einheitlichen Nomenklatur benannt (Eph Nomenclature Committee 1997). Geschützte Warenzeichen und Produktnamen wurden nicht spezifisch als solche kenntlich gemacht.

In den Fällen, wo englische Fachbegriffe die inzwischen unüblichen und teilweise unzureichenden deutschen Begriffe ersetzt haben, oder wo die Namen anatomischer Strukturen nicht ins Deutsche zu übersetzen sind, wurden diese Fachtermini ohne Anführungszeichen verwendet. Ansonsten wurden in dieser Arbeit die folgenden Abkürzungen und Begriffe verwendet:

% (v/v)	Prozent auf das Volumen bezogen
% (w/v)	Prozent auf das Gewicht bezogen
μ	Mikro
9E10	Epitop eines monoklonalen Antikörpers des humanem c-myc Proteins mit der Aminosäuresequenz EQKLISEEDL
A	Adenosin
ABC	Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplex
ALPS	Agrin-Laminin-Perlecan-Slit Motiv
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BBS	2x BES gepufferte Lösung
BES	N,N-Bis(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl: Bovine Serum Albumin)
C	Cytosin
cDNA	Cistronische DNA, komplementäre DNA zu einer mRNA
CHAPS	3-[(3-Cholidopropyl-)dimethylammonio]-propansulfonat
Circling	Das sich im Kreise bewegen von Tieren, dient als Hinweis auf Innenohrdefekte
CMV	Cytomegalovirus
cpm	Zähleinheiten pro Minute (engl.: Counts per Minute)
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: Desoxyribonucleic Acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat

E		Tag der Embryonalentwicklung
EDTA		Ethylendiamintetraacetat
EF		Embryonale Fibroblasten
EGFP		Grünes Fluoreszierendes Protein (engl.: Enhanced Green Fluorescent Protein)
ELISA		Enzymgekoppelter Immunassay, Methode zur Messung von Antigenkonzentrationen mit Hilfe enzymgekoppelter Antikörper (engl.: Enzyme Linked Immunosorbant Assay)
<i>eph</i>		Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma
ES		Embryonale Stammzellen
FCS		Fötale Kälberserum (engl.: Fetal Calf Serum)
Fd		Farad
g		Gramm
G		Guanosin
G418		Geneticin
GABA, GABAerg		$\gamma$ -Aminobuttersäure, ein von GABAergen Neuronen verwendeter Neurotransmitter (engl.: $\gamma$ -Aminobutyric Acid), entsteht durch Decarboxylierung von Glutamat durch das Enzym Glutamat-Decarboxylase
GEF		Guaninnukleotid Austauschfaktor (engl.: Guanine Nucleotide Exchange Factor)
GPI		Glycosylphosphatidylinositol
h		Stunde (engl.: Hour)
hCG		Humanes Chorion Gonadotropin
hot-start		Start einer PCR-Reaktion durch Zugabe der DNA-Polymerase erst nach einer initialen Denaturierungsphase. Dient der Erhöhung der Spezifität der Reaktion.
HPLC		High Performance Liquid Chromatography
HPRT		Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP		Meerrettichperoxidase (eng.: Horseradish peroxidase)
i.p.		intraperitoneal
Ig		Immunglobulin
IgG1		Immunglobulin der Klasse G1
Intrinsic Optical Imaging (ISOI)	Signal Imaging	Eine auf dem Unterschied der Lichtabsorption von oxygeniertem und desoxygeniertem Blut bei Wellenlängen von 600-700 nm beruhende Technik zur Detektion von relativen Unterschieden der Stoffwechselaktivität in Geweben.
IPTG		Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
IU		Internationale Einheiten (engl.: International Units)
kb		Kilobasenpaare
kDa		Kilodalton
knock-in		Insertion einer fremden oder abgewandelten DNA-Sequenz in einen Genlocus mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen, welcher über die Keimbahn propagiert werden kann.

knock-out	Genetische Deletion einer Proteinfunktion oder Teilen einer Genfunktion mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen, welche über die Keimbahn propagiert werden kann.
Korrosionsausguß	Methode zur Darstellung der dreidimensionalen Gefäßstruktur. Die Gefäße in den betreffenden Geweben werden mit einem Kunstharz perfundiert, welches das Blut verdrängt und im Gefäßlumen polymerisiert. Nach Entfernung der um die Gefäße liegenden Gewebereiche und Goldbeschichtung wird der Korrosionsausguß am Elektronenmikroskop analysiert.
l	Liter
LB	Luria Bertani Medium
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
LTP	Langzeitpotenzierung (engl.: Long Term Potentiation)
m	Milli
M	Molar
min	Minute
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (engl.: Messenger RNA)
M <sub>w</sub>	Molekulargewicht (engl.: Molecular Weight)
n	Nano
N	Nukleotid
NEO	Neomycin Resistenzgen
NGF	Nervenwachstumsfaktor (engl.: Nerve Growth Factor)
NGL	Nucleus geniculatus lateralis
NGS	Ziegen Serum (engl.: Normal Goat Serum)
NT-3/4/5	Neurotrophin-3/4/5
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
p	Pico
P	Tag nach der Geburt
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat gepufferte Saline (engl.: Phosphate Buffered Saline)
PCI	Gemisch aus H <sub>2</sub> O gesättigtem Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction)
pellet	Bodensatz
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PMSG	Gonadotropin schwangerer Stuten (engl.: Pregnant Mare's Serum Gonadotropin)
PNS	Peripheres Nervensystem
poolen	engl.: Vereinigen
Primer	Als Startmoleküle für die DNA-Synthese in PCR-Reaktionen verwendete Oligodesoxyribonukleotide
PSC	Primärer Somatosensorischer Cortex

PVC	Primärer Visueller Cortex
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RAGS	Repulsive axonales Zielführungssignal (engl.: Repulsive Axon Guidance Signal)
Retinotopie	Die topographische Repräsentation der Retina im Primären Visuellen Cortex
Rezeptorkörper	Lösliches, dimeres Fusionsprotein, bestehend aus der extrazellulären Domäne eines Transmembranrezeptors und einem Tag, bei dem es sich meist um den Fc-Bereich von Immunglobulinen der Klasse G1 oder alkalischer Phosphatase handelt
RGM	Repulsive Zielführungsmolekül (engl.: Repulsive Guidance Molecule)
RGZ	Retinale Ganglienzelle
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: Ribonucleic Acid)
RNase	Ribonuklease
<i>robo</i>	<i>roundabout</i> , Name einer Deletionsmutante in <i>D.melanogaster</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: Revolutions per Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Kombination von Reverser Transkription und PCR
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
Screen	Absuchen z.B. einer Genbibliothek auf eine bestimmte DNA-Sequenz
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: Sodium Dodecyl Sulfate)
SEM	Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert (engl.: Standard Error of the Mean)
Silencing	Inaktivierung eines Gens, meist ausgelöst durch Methylierung bestimmter Sequenzabschnitte oder durch Bindung von Proteinen an regulatorische Bereiche.
Spines	Dendritische Dornfortsätze; spezialisierte Strukturen auf dendritischen Nervenfortsätzen, an welchen synaptische Kontakte lokalisiert sind
ssDNA	Heringsperm DNA (engl.: Salmon Sperm DNA)
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
Tag	Eine künstlich an ein Protein angefügte Aminosäuresequenz
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TESPA	3-Aminopropyl-trimethoxysilan
TNF- $\alpha$	Tumornekrose Faktor- $\alpha$
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
Trk	Tropomyosin related kinase
U	Uracil
ü/n	über Nacht
V	Volt
Well	Vertiefung in einer Zellkultur- oder ELISA Schale
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 8 Literatur

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., und Wortman, J.R. *et al.*: The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 2000 Mar 24; 287 (5461): 2185-95.

Adams, R.H., Wilkinson, G.A., Weiss, C., Diella, F., Gale, N.W., Deutsch, U., Risau, W., und Klein, R.: Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 1999 Feb 1; 13 (3): 295-306.

Andressen C., Blumcke I. und Celio M.R.: Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res* 1993 Feb; 271(2): 181-208.

Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., und Seed, B.: CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*. 1990 Jun 29; 61 (7): 1303-13.

Averill, S., McMahon, S.B., Clary, D.O., Reichardt, L.F., und Priestley, J.V.: Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur J Neurosci*. 1995 Jul 1;7 (7): 1484-94.

Baier, H., Klostermann, S., Trowe, T., Karlstrom, R.O., Nusslein-Volhard, C., und Bonhoeffer, F.: Genetic dissection of the retinotectal projection. *Development* 1996 Dec; 123: 415-25.

Bartley, T.D., Hunt, R.W., Welcher, A.A., Boyle, W.J., Parker, V.P., Lindberg, R.A., Lu, H.S., Colombero, A.M., Elliott, R.L., Guthrie BA, Holst, P.L., Skrine, J.D., Toso, R.J., Zhang, M., Fernandez, E., Trail, G., Varnum, B.Y., Arden, Y., Hunter, T.Y., und Fox, G.M.: B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase. *Nature* 1994 Apr 7; 368 (6471): 558-60.

Battaglia, A.A., McMahon S.B., und Gavazzi, I.: EphB1, EphA5 and Ephrin-B2 in dorsal root ganglion cells and spinal cord of adult rats: Expression patterns in-vivo and responsiveness of dissociated sensory neurons in-vitro. 31<sup>st</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2001, Sand Diego, Poster Presentation, Session ID 472.13.

Beckmann, M.P., Cerretti, D.P., Baum, P., Vanden Bos, T., James, L., Farrah, T., Kozlosky, C., Hollingsworth, T., Shilling, H., und Maraskovsky E.: Molecular characterization of a family of ligands for eph-related tyrosine kinase receptors. *EMBO J* 1994 Aug 15; 13 (16): 3757-62.

Behar, O., Golden, J.A., Mashimo, H., Schoen, F.J., und Fishman, M.C.: Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature* 1996 Oct 10; 383 (6600): 525-8.

Binder, L.I., Frankfurter, A., und Rebhun, L.I.: The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol*. 1985 Oct; 101 (4): 1371-8.

Buonomano, D.V., und Merzenich, M.M.: Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annu Rev Neurosci* 1998; 21: 149-86.

Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, und Schaffner W.: A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 1985 Jun;41 (2): 521-30.

Brambilla, R., Bruckner, K., Orioli, D., Bergemann, A.D., Flanagan, J.G., und Klein, R.: Similarities and differences in the way transmembrane-type ligands interact with the Elk subclass of Eph receptors. *Mol Cell Neurosci* 1996; 8 (2-3): 199-209.

Brambilla, R., Schnapp, A., Casagrande, F., Labrador, J.P., Bergemann, A.D., Flanagan, J.G., Pasquale, E.B., und Klein, R.: Membrane-bound LERK2 ligand can signal through three different Eph-related receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1995 Jul 3; 14 (13): 3116-26.

Brewer, G.J., und Cotman, C.W.: Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen. *Brain Res* 1989 Aug 7 ;494 (1) : 65-74.

Brittis, P.A., und Flanagan, J.G.: Nogo domains and a Nogo receptor: implications for axon regeneration. *Neuron* 2001 Apr; 30 (1): 11-4.

Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., und Kidd, T.: Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 1999 Mar 19; 96 (6): 795-806.

Brose, K., und Tessier-Lavigne, M.: Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Curr Opin Neurobiol* 2000 Feb; 10 (1): 95-102.

Brown, A., Yates, P.A., Burrola, P., Ortuno, D., Vaidya, A., Jessell, T.M., Pfaff, S.L., O'Leary, D.D., und Lemke, G.: Topographic mapping from the retina to the midbrain is controlled by relative but not absolute levels of EphA receptor signaling. *Cell* 2000 Jul 7; 102 (1): 77-88.

Brückner, K., Pasquale, E.B., und Klein, R.: Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* 1997 Mar 14; 275 (5306): 1640-3.

Brückner, K., und Klein, R.: Signaling by Eph receptors and their ephrin ligands. *Curr Opin Neurobiol* 1998 Jun; 8 (3): 375-82.

Cajal, R.Y.: Degeneration and regeneration of the nervous system. 1928, Hafner Verlag, New York.

Cajal, R.Y.: La rétine de vertébrés. *La cellule* 1893; 9: 119-258.

Capsoni, S., Ugolini, G., Comparini, A., Ruberti, F., Berardi, N., und Cattaneo, A.: Alzheimer-like neurodegeneration in aged antinerve growth factor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Jun 6; 97 (12): 6826-31.

Caroni, P., und Schwab, M.E.: Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1988 Mar; 1 (1): 85-96.

Carraway, K.L. 3rd, und Cantley, L.C.: A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling. *Cell* 1994 Jul 15; 78 (1): 5-8.

Carroll, S.L., Silos-Santiago, J., Frese, S.E., Ruit, K.G., Milbrandt, J., und Snider, W.D.: Dorsal root ganglion neurons expressing trk are selectively sensitive to NGF deprivation in utero. *Neuron* 1992 Oct; 9 (4): 779-88.

Cattaneo, A., und Neuberger, M.S.: Polymeric immunoglobulin M is secreted by transfectants of non-lymphoid cells in the absence of immunoglobulin J chain. *EMBO J* 1987 Sep; 6 (9): 2753-8.

Chen, H., He, Z., und Tessier-Lavigne, M.: Axon guidance mechanisms: semaphorins as simultaneous repellents and anti-repellents. *Nat Neurosci* 1998 Oct; 1 (6): 436-9.

Chen, M.S., Huber, A.B., van der Haar, M.E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A.A., Christ, F., und Schwab, M.E.: Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 2000 Jan 27; 403 (6768): 434-9.

Chen, J., Nachabiah, A., Scherer, C., Ganju, P., Reith, A., Bronson, R., und Ruley, H.E.: Germ-line inactivation of the murine Eck receptor tyrosine kinase by gene trap retroviral insertion. *Oncogene* 1996 Mar 7; 12 (5): 979-88.

Chen, C., und Okayama, H.: High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987 Aug; 7 (8): 2745-52.

Cheng, H.J. und Flanagan, J.G.: Identification and cloning of ELF-1, a developmentally expressed ligand for the Mek4 and Sek receptor tyrosine kinases. *Cell* 1994 Oct 7; 79 (1): 157-68.

Cheng, H.J., Nakamoto, M., Bergemann, A.D., und Flanagan, J.G.: Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* 1995 Aug 11; 82 (3): 371-81.

Chomczynski, P. und Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* (1987) 162, 156-159.

Ciossek, T., Monschau, B., Kremoser, C., Loschinger, J., Lang, S., Muller, B.K., Bonhoeffer, F., und Drescher, U.: Eph receptor-ligand interactions are necessary for guidance of retinal ganglion cell axons in vitro. *Eur J Neurosci* 1998 May; 10(5): 1574-80.

Comeau, M.R., Johnson, R., DuBose, R.F., Petersen, M., Gearing, P., VandenBos, T., Park, L., Farrah, T., Buller, R.M., Cohen, J.I., Strockbine, L.D., Rauch, C., und Spriggs, M.K.: A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR. *Immunity* 1998 Apr; 8 (4): 473-82.

Cooke, J., Xu, Q., Wilson, S.W., und Holder, N.: Characterization of five novel zebrafish Eph-related receptor tyrosine kinases suggests roles in patterning the neural plate. *Dev Genes Evol* 1997; 206: 515-31.

Coonan, J.R., Greferath, U., Messenger, J., Hartley, L., Murphy, M., Boyd, A.W., Dottori, M., Galea, M.P., und Bartlett, P.F.: Development and reorganization of corticospinal projections in EphA4 deficient mice. *J Comp Neurol* 2001 Jul 23; 436 (2): 248-62.

Cox, E.C., Müller, B., und Bonhoeffer, F.: Axonal guidance in the chick visual system: posterior tectal membranes induce collapse of growth cones from the temporal retina. *Neuron* 1990 Jan; 4 (1): 31-7.

Culotti, J.G., und Merz, D.C.: DCC and netrins. *Curr Opin Cell Biol* 1998 Oct; 10 (5): 609-13.

David, S., und Aguayo, A.J.: Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 1981 Nov 20; 214 (4523): 931-3.

Davis, S., Gale, N.W., Aldrich, T.H., Maisonpierre, P.C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M., und Yancopoulos, G.D.: Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* 1994 Nov 4; 266 (5186): 816-9.

Davy, A., und Robbins, S.M.: Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner. *EMBO J* 2000 Oct 16; 19 (20): 5396-405.

Dearborn, R. Jr, He, Q., Kunes, S., und Dai, Y.: Eph receptor tyrosine kinase-mediated formation of a topographic map in the Drosophila visual system. *J Neurosci* 2002 Feb 15; 22 (4): 1338-49.

Deiner, M.S., Kennedy, T.E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M., und Sretavan, D.W.: Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron* 1997 Sep; 19 (3): 575-89.

DeLisser H.M., Newman, P.J., und Albelda S.M.: Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today* 1994 Oct; 15 (10): 490-5.

Dickson, B.J.: Rho GTPases in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol* 2001 Feb; 11 (1): 103-10.

Doetschman, T.: Interpretation of phenotype in genetically engineered mice. *Lab Anim Sci*. 1999 Apr; 49 (2): 137-43.

Donoghue, M.J., Lewis, R.M., Merlie, J.P., und Sanes, J.R.: The Eph kinase ligand AL-1 is expressed by rostral muscles and inhibits outgrowth from caudal neurons. *Mol Cell Neurosci* 1996; 8 (2-3): 185-98.

Dottori, M., Hartley, L., Galea, M., Paxinos, G., Polizzotto, M., Kilpatrick, T., Bartlett, P.F., Murphy, M., Kontgen, F., und Boyd, A.W.: EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Oct 27; 95 (22): 13248-53.

Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Loschinger, J., Noda, M., und Bonhoeffer, F.: In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 1995 Aug 11; 82 (3): 359-70.

Ellis, C., Kasmi, F., Ganju, P., Walls, E., Panayotou, G., und Reith, A.D.: A juxtamembrane autophosphorylation site in the Eph family receptor tyrosine kinase, Sek, mediates high affinity interaction with p59fyn. *Oncogene* 1996 Apr 18; 12 (8): 1727-36.

Englund, P.T.: The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu Rev Biochem.* 1993; 62: 121-38.

Eph Nomenclature Committee: Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. Eph Nomenclature Committee. *Cell* 1997 Aug 8; 90 (3): 403-4.

Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., und Bishop, J.M. (1985): Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Molecular & Cellular Biology* 5, 3610-3616.

Feldheim, D.A., Vanderhaeghen, P., Hansen, M.J., Frisen, J., Lu, Q., Barbacid, M., und Flanagan, J.G.: Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain. *Neuron* 1998 Dec; 21 (6): 1303-13.

Feldheim, D.A., Kim, Y.I., Bergemann, A.D., Frisen, J., Barbacid, M., und Flanagan, J.G.: Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron* 2000 Mar; 25 (3): 563-74.

Flanagan, J.G., und Van Vactor, D.: Through the looking glass: axon guidance at the midline choice point. *Cell* 1998 Feb 20; 92 (4): 429-32.

Flanagan, J.G., und Vanderhaeghen, P.: The Ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.* 1998. 21: 309–45.

Flenniken A.M., Gale N.W., Yancopoulos G.D. und Wilkinson D.G.: Distinct and overlapping expression patterns of ligands for Eph-related receptor tyrosine kinases during mouse embryogenesis. *Dev Biol* 1996 Nov 1; 179 (2): 382-401.

Fournier, A.E., GrandPre, T., und Strittmatter, S.M.: Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 2001 Jan 18; 409 (6818): 341-6.

Friedel, R., Schnürch, H., Stubbusch, J. und Barde Y.-A.: Identification of genes differentially expressed by nerve growth factor- and neurotrophin-3-dependent sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Nov 11; 94 (23): 12670-5.

Friedel, R.: Untersuchungen zur Genexpression in sensorischen Neuronen. Dissertation 1999, Ludwig-Maximilian-Universität München.

Frisen, J., Yates, P.A., McLaughlin, T., Friedman, G.C., O'Leary, D.D. und Barbacid, M.: Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* 1998 Feb; 20 (2): 235-43.

Frostig, R.D., Lieke, E.E., Ts'o, D.Y., und Grinvald, A.: Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Aug; 87 (16): 6082-6.

Fyffe, R.E.W.: Laminar organization of primary afferent terminations in the mammalian spinal cord. In: Scott, S.A.: *Sensory Neurons. Diversity, Development, and Plasticity.* 1992, Oxford University Press, New York. S. 131-139.

Gale, N.W., Holland, S.J., Valenzuela, D.M., Flenniken, A., Pan, L., Ryan, T.E., Henkemeyer, M., Strebhardt, K., Hirai, H., Wilkinson, D.G., Pawson, T., Davis, S., und Yancopoulos, G.D.: Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* 1996 Jul; 17 (1): 9-19.

Gale, N.W., und Yancopoulos, G.D.: Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 1999 May 1; 13 (9): 1055-66.

Gao, W.Q., Shinsky, N., Armanini, M.P., Moran, P., Zheng, J.L., Mendoza-Ramirez, J.L., Phillips, H.S., Winslow, J.W., und Caras, I.W.: Regulation of hippocampal synaptic plasticity by the tyrosine kinase receptor, REK7/EphA5, and its ligand, AL-1/Ephrin-A5. *Mol Cell Neurosci* 1998 Aug; 11 (5-6): 247-59.

Gao, P.P., Sun, C.H., Zhou, X.F., DiCicco-Bloom, E., und Zhou, R.: Ephrins stimulate or inhibit neurite outgrowth and survival as a function of neuronal cell type. *J Neurosci Res* 2000 May 15; 60 (4): 427-36.

Gao, P.P., Yue, Y., Zhang, J.H., Cerretti, D.P., Levitt, P., und 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 Apr 28; 95 (9): 5329-34.

Gao, P.P., Zhang, J.H., Yokoyama, M., Racey, B., Dreyfus, C.F., Black, I.B., und Zhou, R.: Regulation of topographic projection in the brain: Elf-1 in the hippocamposeptal system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Oct 1; 93 (20): 11161-6.

Gaze, R.M., und Sharma, S.C.: Axial differences in the reinnervation of the goldfish optic tectum by regenerating optic nerve fibres. *Exp Brain Res* 1970; 10 (2): 171-81.

Gerety, S.S., und Anderson, D.J.: Cardiovascular ephrinB2 function is essential for embryonic angiogenesis. *Development* 2002 Mar; 129 (6): 1397-410.

Gerlai, R., Shinsky, N., Shih, A., Williams, P., Winer, J., Armanini, M., Cairns, B., Winslow, J., Gao, W., und Phillips, H.S.: Regulation of learning by EphA receptors: a protein targeting study. *J Neurosci* 1999 Nov 1; 19 (21): 9538-49.

Gerlai, R.: Protein targeting: altering receptor kinase function in the brain. *Trends Neurosci.* 2000 Jun; 23 (6): 236-9.

Gierer A.: Development of projections between areas of the nervous system. *Biol Cybern* 1981; 42 (1): 69-78.

Giger, R.J., und Kolodkin, A.L.: Silencing the siren: guidance cue hierarchies at the CNS midline. *Cell* 2001 Apr 6; 105 (1): 1-4.

Godement, P., Salaun, J., und Imbert, M.: Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. *J Comp Neurol* 1984 Dec 20; 230 (4): 552-75.

Goldberg, J.L., Espinosa, J.S., Xu, Y., Davidson, N., Kovacs, G.T., und Barres, B.A.: Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity. *Neuron* 2002 Feb 28; 33 (5): 689-702.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., und Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology* 36, 59-74.

GrandPre, T., Nakamura, F., Vartanian, T., und Strittmatter, S.M.: Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 2000 Jan 27; 403 (6768): 439-44.

Grinvald, A., Lieke, E., Frostig, R.D., Gilbert, C.D., und Wiesel, T.N.: Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature* 1986 Nov 27-Dec 3; 324 (6095): 361-4.

Hall A.K., Ai X., Hickman G.E., MacPhedran S.E., Nduaguba C.O., und Robertson C.P.: The generation of neuronal heterogeneity in a rat sensory ganglion. *J Neurosci* 1997 Apr 15;17 (8): 2775-84.

Hanks, S.K., und Quinn, A.M.: Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol* 1991; 200: 38-62.

Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y. und, Noda, T.: Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature*. 1994 Jun 9; 369 (6480): 488-91.

Harris J, Ayyub C, und Shaw G.: A molecular dissection of the carboxyterminal tails of the major neurofilament subunits NF-M and NF-H. *J Neurosci Res* 1991 Sep; 30 (1): 47-62.

Hattori M., Osterfield M., und Flanagan J.G.: Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 2000 Aug 25; 289 (5483): 1360-5.

He, Z., und Tessier-Lavigne, M.: Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 1997 Aug 22; 90 (4): 739-51.

Helmbacher, F., Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Tiret, L., und Charnay, P.: Targeting of the EphA4 tyrosine kinase receptor affects dorsal/ventral pathfinding of limb motor axons. *Development* 2000 Aug; 127 (15): 3313-24.

Henkemeyer, M., Orioli, D., Henderson, J.T., Saxton, T.M., Roder, J., Pawson, T., und Klein, R.: Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell* 1996 Jul 12; 86 (1): 35-46.

Himanan, J.P., Rajashankar, K.R., Lackmann, M., Cowan, C.A., Henkemeyer, M., und Nikolov, D.B.: Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature* 2001 Dec 20-27; 414 (6866): 933-8.

Hirai, H., Maru, Y., Hagiwara, K., Nishida, J., und Takaku, F.: A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* 1987 Dec 18; 238 (4834): 1717-20.

Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., und Lacy, E.: Manipulating the mouse embryo. 1994, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.

Holland, S.J., Gale, N.W., Gish, G.D., Roth, R.A., Songyang, Z., Cantley, L.C., Henkemeyer, M., Yancopoulos, G.D., und Pawson, T.: Juxtamembrane tyrosine residues couple the Eph family receptor EphB2/Nuk to specific SH2 domain proteins in neuronal cells. *EMBO J* 1997 Jul 1; 16 (13): 3877-88.

Holland, S.J., Gale, N.W., Mbamalu, G., Yancopoulos, G.D., Henkemeyer, M., und Pawson, T.: Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* 1996 Oct 24; 383 (6602): 722-5.

Holmberg, J., Clarke, D.L., und Frisen, J.: Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* 2000 Nov 9; 408 (6809): 203-6.

Holzman, L.B., Marks, R.M., und Dixit, V.M.: A novel immediate-early response gene of endothelium is induced by cytokines and encodes a secreted protein. *Mol Cell Biol* 1990 Nov; 10 (11): 5830-8.

Hong M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B.I., Geschwind, D.H., Bird, T.D., McKeel, D., Goate, A., Morris, J.C., Wilhelmsen, K.C., Schellenberg, G.D., Trojanowski, J.Q., und Lee, V.M.-Y.: Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science*. 1998 Dec 4; 282 (5395): 1914-7.

Hornberger, M.R., Dutting, D., Ciossek, T., Yamada, T., Handwerker, C., Lang, S., Weth, F., Huf, J., Wessel, R., Logan, C., Tanaka, H., und Drescher, U.: Modulation of EphA receptor function by coexpressed ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Neuron* 1999 Apr; 22 (4): 731-42.

Hu, H.: Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* 1999 Aug; 23 (4): 703-11.

Huai, J., und 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 Mar 2; 276 (9): 6689-94.

Huber, A.B., und Schwab, M.E.: Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol Chem* 2000 May-Jun; 381 (5-6): 407-19.

Iacopino A.M., Rhoten W.B. und Christakos S.: Calcium binding protein (calbindin-D28k) gene expression in the developing and aging mouse cerebellum. *Brain Res Mol Brain Res* 1990 Oct; 8 (4): 283-90.

Johnson, E.M. Jr, Gorin, P.D., Brandeis, L.D., und Pearson, J.: Dorsal root ganglion neurons are destroyed by exposure in utero to maternal antibody to nerve growth factor. *Science* 1980 Nov 21; 210 (4472): 916-8.

Joyner, A.L.: Gene Targeting. 1999, Second Edition, The Practical Approach Series, Oxford University Press, New York.

Karlstrom, R.O., Trowe, T., und Bonhoeffer, F.: Genetic analysis of axon guidance and mapping in the zebrafish. *Trends Neurosci* 1997 Jan; 20 (1): 3-8.

Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E.D., Chan, S.S., Culotti, J.G., und Tessier-Lavigne, M.: Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 1996 Oct 18; 87 (2): 175-85.

Kennedy, T.E., Serafini, T., de la Torre, J.R., und Tessier-Lavigne, M.: Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 1994 Aug 12; 78 (3): 425-35.

Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T., und Fujisawa, H.: Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 1997 Nov; 19 (5): 995-1005.

Klein, R., Silos-Santiago, I., Lira, S.A., Brambilla, R., Bryant, S., Zhang, L., und Snider, W.D.: Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene *trkC* eliminates Ia muscle afferents and results in abnormal movements. *Nature*. 1994 Mar 17;368 (6468): 249-51.

Knöll, B. und Drescher, U.: Ephrin-As as receptors in topographic projections. *Trends Neurosci* 2002 Mar; 25 (3):145-9.

Knöll, B., Zarbališ, K., Wurst, W., und Drescher, U.: A role for the EphA family in the topographic targeting of vomeronasal axons. *Development* 2001 Mar; 128 (6): 895-906.

Kolodkin, A.L., Levengood, D.V., Rowe, E.G., Tai, Y.T., Giger, R.J., und Ginty, D.D.: Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 1997 Aug 22; 90 (4): 753-62.

Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., O'Connor, T.P., Patel, N.H., Admon, A., Bentley, D., und Goodman, C.S.: Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron* 1992 Nov; 9 (5): 831-45.

Kolodziej, P.A., Timpe, L.C., Mitchell, K.J., Fried, S.R., Goodman, C.S., Jan, L.Y., und Jan, Y.N.: *frazzled* encodes a Drosophila member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* 1996 Oct 18; 87 (2): 197-204.

Kosik, K.S., Orecchio, L.D., Bakalis, S., und Neve, R.L.: Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron*. 1989 Apr; 2 (4): 1389-97.

Kozak, M.: An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*. 1987 Oct 26;15 (20): 8125-48.

Kozma, R., Sarner, S., Ahmed, S., und Lim, L.: Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol Cell Biol* 1997 Mar; 17 (3): 1201-11.

Krull, C.E., Lansford, R., Gale, N.W., Collazo, A., Marcelle, C., Yancopoulos, G.D., Fraser, S.E., und Bronner-Fraser, M.: Interactions of Eph-related receptors and ligands confer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. *Curr Biol* 1997 Aug 1; 7 (8): 571-80.

Labrador, J.P., Brambilla, R. und Klein, R.: The N-terminal globular domain of Eph receptors is sufficient for ligand binding and receptor signaling. *EMBO J.* 1997 Jul 1; 16 (13): 3889-97.

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug 15; 227 (259): 680-5.

Lai, K.O., Ip, F.C., und Ip, N.Y.: Identification and characterization of splice variants of ephrin-A3 and ephrin-A5. *FEBS Lett* 1999 Sep 17; 458 (2): 265-9.

Lee, V.M., Goedert, M., und Trojanowski, J.Q.: Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24: 1121-59.

Leighton, P.A., Mitchell, K.J., Goodrich, L.V., Lu, X., Pinson, K., Scherz, P., Skarnes, W.C., und Tessier-Lavigne, M.: Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. *Nature* 2001 Mar 8; 410 (6825): 174-9.

Levi, A., Eldridge, J.D., und Paterson, B.M.: Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science* 1985 Jul 26; 229 (4711): 393-5.

Liu, X., Wu, H., Loring, J., Hormuzdi, S., Disteche, C.M., Bornstein, P., und Jaenisch, R.: Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev Dyn.* 1997 May; 209 (1): 85-91.

Livesey, F.J.: Netrins and netrin receptors. *Cell Mol Life Sci* 1999 Oct 1; 56 (1-2): 62-8.

Lombardo, A., Rabacchi, S.A., Cremisi, F., Pizzorusso, T., Cenni, M.C., Possenti, R., Barsacchi, G., und Maffei, L.: A developmentally regulated nerve growth factor-induced gene, VGF, is expressed in geniculocortical afferents during synaptogenesis. *Neuroscience* 1995 Apr; 65 (4): 997-1008.

Lu, Q., Sun, E.E., Klein, R.S., und Flanagan, J.G.: Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell* 2001 Apr 6; 105 (1): 69-79.

Luo, Y., Raible, D., und Raper, J.A.: Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 1993 Oct 22; 75 (2): 217-27.

Luo, Y., Shepherd, I., Li, J., Renzi, M.J., Chang, S., und Raper, J.A.: A family of molecules related to collapsin in the embryonic chick nervous system. *Neuron* 1995 Jun; 14 (6): 1131-40.

Martone, M.E., Holash, J.A., Bayardo, A., Pasquale, E.B., und Ellisman, M.H.: Immunolocalization of the receptor tyrosine kinase EphA4 in the adult rat central nervous system. *Brain Res* 1997 Oct 17; 771 (2): 238-50.

Matsunaga T., Greene M.I. und Davis J.G.: Distinct expression patterns of eph receptors and ephrins relate to the structural organization of the adult rat peripheral vestibular system. *Eur J Neurosci* 2000 May;12 (5): 1599-616.

McBride, J.L., und Ruiz, J.C.: Ephrin-A1 is expressed at sites of vascular development in the mouse. *Mech Dev* 1998 Oct; 77 (2): 201-4.

Meinhardt, H., und Gierer, A.: Applications of a theory of biological pattern formation based on lateral inhibition. *J Cell Sci* 1974 Jul; 15 (2): 321-46.

Menzel, P., Valencia, F., Godement, P., Dodelet, V.C., und Pasquale E.B.: Ephrin-A6, a new ligand for EphA receptors in the developing visual system. *Dev Biol* 2001 Feb 1; 230 (1): 74-88.

Messersmith, E.K., Leonardo, E.D., Shatz, C.J., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S, und Kolodkin, A.L.: Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron* 1995 May; 14 (5): 949-59.

Michael K. Lee, M.K., und Cleveland, D.W.: Neuronal Intermediate Filaments. *Annu Rev Neurosci* 1996; 19: 187-217.

Michael, S.K., Brennan, J., und Robertson, E.J.: Efficient gene-specific expression of cre recombinase in the mouse embryo by targeted insertion of a novel IRES-Cre cassette into endogenous loci. *Mech Dev* 1999 Jul; 85 (1-2): 35-47.

Monschau, B., Kremoser, C., Ohta, K., Tanaka, H., Kaneko, T., Yamada, T., Handwerker, C., Hornberger, M.R., Loschinger, J., Pasquale, E.B., Siever, D.A., Verderame, M.F., Muller, B.K., Bonhoeffer, F., und Drescher, U.: Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *EMBO J* 1997 Mar 17; 16 (6): 1258-67.

Mu, X., Silos-Santiago, L., Carroll, S.L., und Snider, W.D.: Neurotrophin receptor genes are expressed in distinct patterns in developing dorsal root ganglia. *J Neurosci* 1993 Sep;13 (9): 4029-41.

Müller, B.K.: Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22: 351-88.

Murai, K.K., und Pasquale, E.B.: Can Eph receptors stimulate the mind? *Neuron* 2002 Jan 17; 33 (2): 159-62.

Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., und Roder, J.C.: Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Sep 15; 90 (18): 8424-8.

Nakamura, F., Tanaka, M., Takahashi, T., Kalb, R.G., und Strittmatter. S.M.: Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse. *Neuron* 1998 Nov; 21 (5): 1093-100.

Naruse-Nakajima, C., Asano, M., und Iwakura, Y.: Involvement of EphA2 in the formation of the tail notochord via interaction with ephrinA1. *Mech Dev* 2001 Apr; 102 (1-2): 95-105.

Nelson JA, Reynolds-Kohler C, Smith BA.: Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Mol Cell Biol* 1987 Nov; 7 (11): 4125-9.

Nicola, N.A., Viney, E., Hilton, D.J., Roberts, B., und Willson, T.: Molecular cloning of two novel transmembrane ligands for Eph-related kinases (LERKS) that are related to LERK-2. *Growth Factors* 1996; 13 (1-2): 141-9.

Nunez, J., und Fischer I.: Microtubule-associated proteins (MAPs) in the peripheral nervous system during development and regeneration. *J Mol Neurosci.* 1997 Jun; 8 (3): 207-22.

Ogawa, K., Pasqualini, R., Lindberg, R.A., Kain, R., Freeman, A.L., und Pasquale E.B.: The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization. *Oncogene* 2000 Dec 7; 19 (52): 6043-52.

O'Leary, D.D., und Wilkinson, D.G.: Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 1999 Feb; 9 (1): 65-73.

Orioli, D., Henkemeyer, M., Lemke, G., Klein, R., und Pawson, T.: Sek4 and Nuk receptors cooperate in guidance of commissural axons and in palate formation. *EMBO J* 1996 Nov 15; 15 (22): 6035-49.

Ozaki, S., und Snider, W.D.: Initial trajectories of sensory axons toward laminar targets in the developing mouse spinal cord. *J Comp Neurol* 1997 Apr 7; 380 (2): 215-29.

Pandey, A., Shao, H., Marks, R.M., Polverini, P.J., und Dixit, V.M.: Role of B61, the ligand for the Eek receptor tyrosine kinase, in TNF-alpha-induced angiogenesis. *Science* 1995 Apr 28; 268 (5210): 567-9.

Park, S., Frisen, J. und Barbacid, M.: Aberrant axonal projections in mice lacking EphA8 (Eek) tyrosine protein kinase receptors. *EMBO J* 1997 Jun 2; 16 (11): 3106-14.

Perl, E.R.: Function of dorsal root ganglion neurons: An overview. In *Sensory neurons: Diversity, Development, and Plasticity*. S.A. Scott (Hrsg.). 1992, Oxford University Press, New York, S. 3-23.

Piccioli, P., Di Luzio, A., Amann, R., Schuligoi, R., Surani, M.A., Donnerer, J., und Cattaneo, A.: Neuroantibodies: ectopic expression of a recombinant anti-substance P antibody in the central nervous system of transgenic mice. *Neuron* 1995 Aug; 15 (2): 373-84.

Piccioli, P., Ruberti, F., Biocca, S., Di Luzio, A., Werge, T.M., Bradbury, A., und Cattaneo, A.: Neuroantibodies: molecular cloning of a monoclonal antibody against substance P for expression in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Jul 1; 88 (13): 5611-5.

Poorkaj, P., Kas, A., D'Souza, I., Pham, Q., Stone, M., Olson, M.V.: A genomic sequence analysis of the mouse and human microtubule-associated protein tau. *Mamm Genome.* 2001 Sep; 12 (9): 700-12.

Raper, J.A., und Kapfhammer, J.P.: The enrichment of a neuronal growth cone collapsing activity from embryonic chick brain. *Neuron* 1990 Jan; 4 (1): 21-9.

Raper, J.A.: Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 2000 Feb; 10 (1): 88-94.

Regoli, D., Boudon, A., und Fauchere, J.L.: Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev* 1994 Dec; 46 (4): 551-99.

Rickmann, M., Fawcett, J.W., und Keynes, R.J.: The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite. *J Embryol Exp Morphol* 1985 Dec; 90: 437-55.

Risau, W., und Flamme, I.: Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 73-91.

Rogers J.H., Ciossek T., Menzel P. und Pasquale E.B.: Eph receptors and ephrins demarcate cerebellar lobules before and during their formation. *Mech Dev* 1999 Sep; 87 (1-2): 119-28.

Romeis, B.: *Mikroskopische Technik*. 1989, 17., neubearbeitete Auflage, Urban und Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore.

Ruberti, F., Capsoni, S., Comparini, A., Di Daniel, E., Franzot, J., Gonfloni, S., Rossi, G., Berardi, N., und Cattaneo, A.: Phenotypic knockout of nerve growth factor in adult transgenic mice reveals severe deficits in basal forebrain cholinergic neurons, cell death in the spleen, and skeletal muscle dystrophy. *J Neurosci* 2000 Apr 1; 20 (7): 2589-601.

Ruit, K.G., Elliott, J.L., Osborne, P.A., Yan, Q., und Snider, W.D.: Selective dependence of mammalian dorsal root ganglion neurons on nerve growth factor during embryonic development. *Neuron* 1992 Mar; 8 (3): 573-87.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sanford, L.P., Kallapur, S., Ornsby, I., und Doetschman, T.: Influence of genetic background on knockout mouse phenotypes. *Methods Mol Biol.* 2001; 158: 217-25.

Schuett, S., Bonhoeffer, T., und Huebener, M.: Mapping retinotopic structure in mouse visual cortex with optical imaging. *J Neurosci* 2002, in press.

Scott, S.A.: *Sensory Neurons. Diversity, Development, and Plasticity*. 1992, Oxford University Press, New York.

Scully, A.L., McKeown, M., und Thomas J.B.: Isolation and characterization of Dek, a *Drosophila* eph receptor protein tyrosine kinase. *Mol Cell Neurosci* 1999 May; 13 (5): 337-47.

Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D., und Goodman, C.S.: Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 1993 Mar; 10 (3): 409-26.

Semaphorin Nomenclature Committee: Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. *Cell* 1999 May 28; 97 (5): 551-2.

Serafini, T., Kennedy, T.E., Galko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., und Tessier-Lavigne, M.: The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 1994 Aug 12; 78 (3): 409-24.

Shamah, S.M., Lin, M.Z., Goldberg, J.L., Estrach, S., Sahin, M., Hu, L., Bazalakova, M., Neve, R.L., Corfas, G., Debant, A., und Greenberg, M.E.: EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* 2001 Apr 20; 105 (2): 233-44.

Silos-Santiago, I., Molliver, D.C., Ozaki, S., Smeyne, R.J., Fagan, A.M., Barbacid, M., und Snider, W.D.: Non-TrkA-expressing small DRG neurons are lost in TrkA deficient mice. *J. Neurosci.* 1995 15: 5929-5942.

Silver, L.M.: *Mouse Genetics*. 1995, Oxford University Press, New York.

Simon, D.K., und O'Leary, D.D.: Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection. *J Neurosci* 1992 Apr; 12 (4): 1212-32.

Skaper, S.D., Moore, S.E., und Walsh, F.S.: Cell signalling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues. *Prog Neurobiol* 2001 Dec; 65 (6): 593-608.

Smeyne, R.J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L.K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S.A., und Barbacid, M.: Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* 1994 Mar 17; 368 (6468): 246-9.

Smith, A., Robinson, V., Patel, K., und Wilkinson, D.G.: The EphA4 and EphB1 receptor tyrosine kinases and ephrin-B2 ligand regulate targeted migration of branchial neural crest cells. *Curr Biol* 1997 Aug 1; 7 (8): 561-70.

Snider, W. D., und Wright, D. E.: Neurotrophins Cause a New Sensation. *Neuron*, Vol. 16, 229–232, February, 1996.

Song, H., Ming, G., He, Z., Lehmann, M., McKerracher, L., Tessier-Lavigne, und Poo, M.M.: Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science* 1998 Sep 4; 281 (5382): 1515-8.

Sperry, R.W.: Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1963 July 29; 50: 703-709.

Sperry, R.W.: Visuomotor coordination in the newt (*Triturus viridescens*) after regeneration of the optic nerve. *J. Comp.Neurol.* 1943; 79: 33-55.

Spillmann, A.A., Bandtlow, C.E., Lottspeich, F., Keller, F., und Schwab, M.E.: Identification and characterization of a bovine neurite growth inhibitor (bNI-220). *J Biol Chem* 1998 Jul 24; 273 (30): 19283-93.

Stahl, B., Müller, B., von Boxberg, Y., Cox, E.C., und Bonhoeffer, F.: Biochemical characterization of a putative axonal guidance molecule of the chick visual system. *Neuron* 1990 Nov; 5 (5): 735-43.

Stein, E., und Tessier-Lavigne, M.: Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* 2001 Mar 9; 291 (5510): 1928-38.

Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L.H., Murakami, Y., Kalb, R.G., Fujisawa, H., und Strittmatter, S.M.: Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 1999 Oct 1; 99 (1): 59-69.

Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G.I., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M.L., Goodman, C.S., Poo, M., Tessier-Lavigne, M., und Comoglio, P.M.: Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 1999 Oct 1; 99 (1): 71-80.

Taniguchi, M., Yuasa, S., Fujisawa, H., Naruse, I., Saga, S., Mishina, M., und Yagi, T.: Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron* 1997 Sep; 19 (3): 519-30.

Tessier-Lavigne, M., Placzek, M., Lumsden, A.G., Dodd, J., und Jessell, T.M.: Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* 1988 Dec 22-29; 336 (6201): 775-8.

Tessier-Lavigne, M., und Goodman, C.S.: The molecular biology of axon guidance. *Science* 1996 Nov 15; 274 (5290): 1123-33.

Threadgill, D.W., Yee, D., Matin, A., Nadeau, J.H., und Magnuson, T.: Genealogy of the 129 inbred strains: 129/SvJ is a contaminated inbred strain. *Mamm Genome* 1997 Jun; 8 (6): 390-3.

Tucker, K.L., Meyer, M., und Barde, Y.A.: Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci* 2001 Jan; 4 (1): 29-37.

Udenfriend, S., und Kodukula, K.: How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem* 1995a; 64: 563-91.

Udenfriend, S., und Kodukula, K.: Prediction of omega site in nascent precursor of glycosylphosphatidylinositol protein. *Methods Enzymol* 1995b; 250: 571-82.

Van Vactor, D.: Adhesion and signaling in axonal fasciculation. *Curr Opin Neurobiol* 1998 Feb; 8 (1): 80-6.

Vanderhaeghen, P., Lu, Q., Prakash, N., Frisen, J., Walsh, C.A., Frostig, R.D., und Flanagan, J.G.: A mapping label required for normal scale of body representation in the cortex. *Nat Neurosci* 2000 Apr; 3 (4): 358-65.

Vecchi A., Garlanda C., Lampugnani M.G., Resnati M., Matteucci C., Stoppacciaro A., Schnürch H., Risau W., Ruco L., Mantovani A., und Dejana, E.: Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol* 1994 Apr; 63 (2): 247-54.

von Heijne, G.: A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 1986 Jun 11; 14 (11): 4683-90.

Walter, J., Kern-Veits, B., Huf, J., Stolze, B., und Bonhoeffer, F.: Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro. *Development* 1987 Dec; 101 (4): 685-96.

Wang, H., Chadaram, S.R., Norton, A.S., und Laskowski, M.B.: Development of inhibition by ephrin-A5 on outgrowth of embryonic spinal motor neurites. *J Neurobiol* 2001 Jun 5; 47 (3): 233-43.

Wang, H.U., Chen, Z.F., und Anderson, D.J.: Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998 May 29; 93 (5): 741-53.

Wang, H.U., und Anderson, D.J.: Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. *Neuron* 1997 Mar; 18 (3): 383-96.

Wang, X., Roy, P.J., Holland, S.J., Zhang, L.W., Culotti, J.G., und Pawson, T.: Multiple ephrins control cell organization in *C. elegans* using kinase-dependent and -independent functions of the VAB-1 Eph receptor. *Mol Cell* 1999 Dec; 4 (6): 903-13.

White, F.A., und Behar, O.: The development and subsequent elimination of aberrant peripheral axon projections in Semaphorin3A null mutant mice. *Dev Biol* 2000 Sep 1; 225 (1): 79-86.

Williams, R.W., und Herrup, K.: The control of neuron number. *Annu Rev Neurosci* 1988; 11: 423-53.

Williams, R.W.: Mapping genes that modulate mouse brain development: a quantitative genetic approach. *Results Probl Cell Differ* 2000; 30: 21-49.

Winslow, J.W., Moran, P., Valverde, J., Shih, A., Yuan, J.Q., Wong, S.C., Tsai, S.P., Goddard, A., Henzel, W.J., Hefti, F., Beck, K.D., und Carras I.W.: Cloning of AL-1, a ligand for an Eph-related tyrosine kinase receptor involved in axon bundle formation. *Neuron* 1995 May; 14 (5): 973-81.

Wu, W., Wong, K., Chen, J., Jiang, Z., Dupuis, S., Wu, J.Y., und Rao, Y.: Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 1999 Jul 22; 400 (6742): 331-6.

Xu, Q., Alldus, G., Holder, N., und Wilkinson, D.G.: Expression of truncated Sek-1 receptor tyrosine kinase disrupts the segmental restriction of gene expression in the *Xenopus* and zebrafish hindbrain. *Development* 1995 Dec; 121 (12): 4005-16.

Xu, Q., Alldus, G., Macdonald, R., Wilkinson, D.G., und Holder, N.: Function of the Eph-related kinase rtk1 in patterning of the zebrafish forebrain. *Nature* 1996 May 23; 381 (6580): 319-22.

Xu, Q., Holder, N., Patient, R., und Wilson, S.W.: Spatially regulated expression of three receptor tyrosine kinase genes during gastrulation in the zebrafish. *Development* 1994 Feb; 120 (2): 287-99.

Xu, Q., Mellitzer, G., Robinson, V., und Wilkinson, D.G.: In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature* 1999 May 20; 399 (6733): 267-71.

Yates, P.A., Roskies, A.L., McLaughlin, T. und O'Leary D.D.: Topographic-specific axon branching controlled by ephrin-As is the critical event in retinotectal map development. *J Neurosci* 2001 Nov 1; 21 (21): 8548-63.

Yu, T.W., und Bargmann, C.I.: Dynamic regulation of axon guidance. *Nat Neurosci* 2001 Nov; 4 Suppl: 1169-76.

---

Yue, Y., Su, J., Cerretti, D.P., Fox, G.M., Jing, S., und Zhou, R.: Selective inhibition of spinal cord neurite outgrowth and cell survival by the Eph family ligand ephrin-A5. *J Neurosci* 1999 Nov 15; 19 (22): 10026-35.

Zafra, F., Hengerer, B., Leibrock, J., Thoenen, H. und Lindholm D.: Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J* 1990 Nov; 9 (11): 3545-50.

Zhang, L.I., und Poo, M.M.: Electrical activity and development of neural circuits. *Nat Neurosci* 2001 Nov; 4 Suppl: 1207-14.

Zhou, R., Copeland, T.D., Kromer, L.F., und Schulz, N.T.: Isolation and characterization of Bsk, a growth factor receptor-like tyrosine kinase associated with the limbic system. *J Neurosci Res* 1994 Jan; 37 (1): 129-43.

Zhou, R.: Regulation of topographic projection by the Eph family receptor Bsk (EphA5) and its ligands. *Cell Tissue Res* 1997 Nov; 290 (2): 251-9.

Zinn, K., und Sun, Q.: Slit branches out: a secreted protein mediates both attractive and repulsive axon guidance. *Cell* 1999 Apr 2; 97 (1): 1-4.

## 9 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern, deren fortgesetzte Unterstützung in vielerlei Hinsicht eine wesentliche Grundlage und Voraussetzung für diese Arbeit war.

Vielmals herzlich danken möchte ich auch Yves-Alain Barde für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine andauernde Unterstützung sowie viele wichtige Hinweise und Anregungen.

Einen speziellen Dank möchte ich Harald Schnürch ausdrücken für die intensive und verantwortliche Betreuung während allen Stadien dieser Doktorarbeit. Seine vielen Ratschläge und Hinweise, die Unterweisung in einer Vielzahl molekular- und neurobiologischer Methoden, sowie sein unbestechliches Qualitätsurteil trugen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Besonders danken möchte ich auch Mark Hübener und Claire Creutzfeld sowie Martin Korte für die angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit und den Mitgliedern des Thesis Committees, Magdalena Götz und Barbara Conradt, für ihre wertvollen Hinweise und ihre Unterstützung bei der effizienten Umsetzung dieser Arbeit. Danken möchte ich vor allem auch Jens Richter für seine praktische und kollegiale Unterstützung insbesondere während und nach dem Laborumzug nach Basel.

Ebenfalls danken möchte ich Michael Meyer und Birgit Kunkel für ihre Hilfe bei der Blastocysteninjektion, Eric Meyer, Thomas Krucker und Alexandra Schuler für Ihre Unterstützung bei den Korrosionsausgüssen, Roland Friedel für viele anregende Diskussionen, Kerry Tucker für die Überlassung von Plasmiden, Titus Kretzschmar für die Überlassung einer cDNA für den Fc-Tag, sowie meinen Kollegen am Max-Planck-Institut für Neurobiologie, dem Friedrich Miescher-Institut und der Universität Tübingen für Ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

## 10 Lebenslauf

<b>Name</b>	Lothar Lindemann
<b>Geburtsdatum</b>	30. April 1971
<b>Geburtsort</b>	Köln
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch
1977-1981	Albert-Schweitzer-Grundschule (Köln/Weiß)
1981-1991	Gymnasium Sürther Straße (Köln/Rodenkirchen)
1991-1992	Tätigkeit beim Bundesamt für den Zivildienst
1992-1997	Diplomstudium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1997-1998	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Abteilung Neurobiochemie (Martinsried) in Zusammenarbeit mit dem Physiologisch-Chemischen Institut, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1998-2001	Dissertation am Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Abteilung Neurobiochemie (Martinsried)
2001-2002	Fortsetzung der Dissertation am Friedrich Miescher Institut, Teil der Novartis Forschungsstiftung Basel (Schweiz)