

Institut für Säugetiergenetik, GSF-Forschungszentrum, Neuherberg

Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

**Molekulare und funktionale Analyse des
Ephrin-A5-Gens der Maus**

Dipl.-Biologe Univ. Konstantinos Zarbalis

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Rudolf Balling
2. Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl
3. Univ.-Prof. Dr. Klaus Dieter Pfeffer

Die Dissertation wurde am 24.05.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 17.07.2000 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	PRINZIPIEN NEURONALER KONNEKTIVITÄT	1
1.2	DAS RETINOTEKTALE SYSTEM	2
1.3	TYROSIN-KINASE-REZEPTOREN DES EPH SUBTYP S UND IHRE LIGANDEN	4
1.4	DIE ROLLE DER EPH-REZEPTOREN UND EPHRINE BEI DER ETABLIERUNG DER RETINOTEKTALEN TOPOGRAPHIE	8
1.4.1	DIE FAMILIE DER EPHA-REZEPTOREN UND EPHRIN-A-LIGANDEN	8
1.4.2	DIE FAMILIE DER EPHB-REZEPTOREN UND EPHRIN-B-LIGANDEN	9
1.5	FUNKTIONELLE ANALYSEN DER EPH-REZEPTOREN UND EPHRINE AN TRANSGENEN TIEREN	11
1.6	REGULATION DER EPH-REZEPTOREN UND EPHRINE	13
1.7	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	15
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	GERÄTELISTE	16
2.2	BEZUGSQUELLEN VON CHEMIKALIEN, ENZYMEN UND ANDEREM VERBRAUCHSMATERIAL	18
2.3	ZUSAMMENSETZUNG DER REAGENZIEN, PUFFER UND STAMMLÖSUNGEN	20
2.3.1	MOLEKULARBIOLOGIE	20
2.3.2	HISTOLOGIE	23
2.3.2.1	Färbungen mit Fusionsproteinen alkalischer Phosphatase	23
2.3.2.2	<i>In situ</i> -Hybridisierung	24
2.3.2.3	Immunhistochemische Färbungen	25
2.3.2.4	X-Gal-Färbung	25
2.3.2.5	Skelettfärbung	26
2.3.4	ES-ZELL-KULTUR	26
2.4	OLIGONUKLEOTIDPRIMER	26
2.5	PLASMID-DNA-KLONE ZUR HERSTELLUNG VON cRNA-SONDEN	27
2.6	VERWENDETE TIERE - HALTUNG	28
2.7	BESTIMMUNG EMBRYONALER STADIEN	28
2.8	ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA	29
2.8.1	ISOLIERUNG VON GENOMISCHER DNA AUS GEWEBE	29
2.8.2	ISOLIERUNG VON GENOMISCHER DNA AUS ZELLEN	30
2.9	ISOLIERUNG VON RNA	30
2.10	GEL-ELEKTROPHORESE	31
2.10.1	DNA-GEL-ELEKTROPHORESE	31
2.10.2	DENATURIERENDE RNA-GEL-ELEKTROPHORESE	31

2.11	TRANSFERTECHNIKEN	31
2.11.1	SOUTHERN-BLOTTING	31
2.11.2	NORTHERN-BLOTTING	32
2.12	HYBRIDISIERUNG MIT ³²P-MARKIERTEN DNA-SONDEN	32
2.13	AUTORADIOGRAPHIE	33
2.14	ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN	33
2.15	MOLEKULARE KLONIERUNGEN	34
2.15.1	LIGATIONSREAKTIONEN	34
2.15.2	HERSTELLUNG TRANSFORMATIONS-KOMPETENTER <i>E. COLI</i> -ZELLEN	34
2.15.3	TRANSFORMATION KOMPETENTER <i>E. COLI</i> -ZELLEN	34
2.15.4	PLASMIDISOLIERUNG AUS TRANSFORMIERTEN BAKTERIEN (MINIPRÄPARATION)	35
2.15.5	PLASMIDISOLIERUNG AUS TRANSFORMIERTEN BAKTERIEN (MAXIPRÄPARATION)	35
2.16	ISOLIERUNG VON KLONEN AUS EINER GENOMISCHEN PHAGEN-BIBLIOTHEK	36
2.16.1	ANZUCHT DER WIRTSBAKTERIEN	36
2.16.2	TITERBESTIMMUNG	36
2.16.3	AUSPLATTIEREN VON PHAGEN	36
2.16.4	TRANSFER VON PHAGEN-DNA AUF NYLONMEMBRANEN	36
2.16.5	GEWINNUNG REINER PHAGENKLONE	37
2.17	ISOLIERUNG VON PHAGEN-DNA	37
2.18	CHARAKTERISIERUNG GENOMISCHER KLONE	38
2.19	MARKIERUNG VON DNA- UND cRNA-SONDEN	39
2.19.1	MARKIERUNG VON DNA-SONDEN MIT ³² P	39
2.19.2	MARKIERUNG VON cRNA-SONDEN MIT ³⁵ S	40
2.19.3	MARKIERUNG VON cRNA-SONDEN MIT DIGOXIGENIN	40
2.20	REVERSE TRANSKRIPTION DER mRNA	41
2.21	5' -RACE	42
2.22	GENOTYPISIERUNG TRANSGENER MÄUSE	43
2.22.1	GENOTYPISIERUNG DER <i>EPHRIN-A5^{NEO}</i> -MUTANTEN	43
2.22.1.1	Genotypisierung über PCR	43
2.22.1.2	Genotypisierung über Hybridisierung genomischer DNA	44
2.22.2	GENOTYPISIERUNG DER <i>EN1^{LACZ}</i> -MUTANTEN	44
2.22.3	GENOTYPISIERUNG DER <i>EPHRIN-A5</i> -PROMOTOR-TRANSGENEN	45
2.23	DNA-SEQUENZIERUNG	45
2.23.1	SEQUENZREAKTIONEN	45
2.23.2	ELEKTROPHORESE DES SEQUENZGELS	46
2.23.3	AUSWERTUNG DER SEQUENZEN	47
2.24	RNA-<i>IN SITU</i>-HYBRIDISIERUNG	47
2.24.1	RNA- <i>IN SITU</i> -HYBRIDISIERUNG AN GANZKÖRPERPRÄPARATEN VON EMBRYONEN	47
2.24.2	RNA- <i>IN SITU</i> -HYBRIDISIERUNG AN SCHNITTEN GEFRORENESEN GEWEBES	48
2.24.2.1	Herstellung von Gefrierschnitten	48
2.24.2.2	Hybridisierung mit ³⁵ S-markierten cRNA-Sonden	49
2.24.2.3	Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden	49

2.24.3	RNA- <i>IN SITU</i> -HYBRIDISIERUNG AN PARAFFIN-SCHNITTEN	50
2.24.3.1	Herstellung von Paraffin-Schnitten	50
2.24.3.2	Hybridisierung mit ³⁵ S-markierten cRNA-Sonden	50
2.24.3.3	Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden	51
2.25	HÄMALAUN / EOSIN (HE)-FÄRBUNG	51
2.26	NISSL-FÄRBUNG	51
2.27	REZEPTOR-BINDUNGSASSAYS MIT ALKALISCHER PHOSPHATASE (AP)-FUSIONSPROTEINEN	52
2.28	IMMUNOHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG AN GANZKÖRPERPRÄPARATEN VON EMBRYONEN	52
2.29	X-GAL-FÄRBUNG	53
2.30	SKELETTFÄRBUNG	53
2.31	FÄRBUNG VON AXONEN MIT LIPOPHILEN FARBSTOFFEN	53
2.32	DOKUMENTATION HISTOLOGISCHER ERGEBNISSE	54
2.33	KULTIVIERUNG UND MANIPULATION EMBRYONALER STAMMZELLEN (ES-ZELLEN) DER MAUS	55
2.33.1	VERWENDETE ES-ZELLEN	55
2.33.2	PRÄPARATION UND ANZUCHT VON FEEDERZELLEN	56
2.33.3	ELEKTROPORATION UND SELEKTION VON ES-ZELLEN	56
2.33.3.1	Vorbereitung der ES-Zellen für die Elektroporation	56
2.33.3.2	Vorbereitung der DNA und Elektroporation	57
2.33.3.3	Kultur und Expansion resistenter Klone	57
2.33.3.4	Überprüfung der ES-Zell-DNA auf homologe Rekombination	58
2.33.3.5	Vermehrung der positiven ES-Zellklone	58
2.33.4	AUFZUCHT DER <i>EPHRIN-A5</i> -MUTANTEN	59
2.34	PRÄPARATION VON DNA FÜR DIE OOCYTEN-MIKROINJEKTION	59
3	ERGEBNISSE	61
3.1	cDNA-ISOLIERUNG DES <i>EPHRIN-A5</i>-GENS UND ABLEITUNG DER PROTEINSTRUKTUR	61
3.2	STRUKTUR DES <i>EPHRIN-A5</i>-GENS	62
3.2.1	AMPLIFIKATION UND SEQUENZBESTIMMUNG DER cDNA ÜBER 5'-RACE	62
3.2.2	GENOMISCHE SOUTHERN-BLOT-ANALYSE DES <i>EPHRIN-A5</i> -GENS	64
3.2.3	ISOLIERUNG UND KARTIERUNG DER λ -PHAGEN	65
3.3	EXPRESSION DES <i>EPHRIN-A5</i>-GENS	70
3.3.1	NORTHERN-BLOT-ANALYSE	70
3.3.2	EMBRYONALE EXPRESSION VON <i>EPHRIN-A5</i>	70
3.3.3	<i>EPHRIN-A5</i> -EXPRESSION IM ZENTRALNERVENSYSTEM	74
3.3.3.1	<i>Ephrin-A5</i> -Expression in Hypothalamus und Hypophyse	75
3.3.3.2	<i>Ephrin-A5</i> -Expression in corticalen Strukturen	78
3.3.3.3	<i>Ephrin-A5</i> -Expression im olfaktorischen System	79
3.3.3.4	Expression von <i>Ephrin-A5</i> im Cerebellum	82
3.4	VERGLEICHENDE EXPRESSIONSANALYSE VON <i>EPHRIN-A5</i> UND <i>EPHRIN-A2</i>	83

3.5	MUTAGENISIERUNG VON <i>EPHRIN-A5</i>	84
3.5.1	STRATEGIE DER HOMOLOGEN REKOMBINATION	84
3.5.2	KLONIERUNG DES PGK- <i>NEO^R</i> -MUTAGENISIERUNGSKONSTRUKTS	86
3.5.3	DIE ELEKTROPORATION DES PGK- <i>NEO^R</i> -KONSTRUKTES	88
3.5.4	DIE GENERIERUNG VON CHIMÄREN AUS DEN MUTAGENISIERTEN ES-ZELLEN	89
3.5.5	KLONIERUNG DES <i>LACZ</i> -PGK- <i>NEO^R</i> -MUTAGENISIERUNGS-KONSTRUKTES	91
3.5.6	DIE ELEKTROPORATION DES <i>LACZ</i> -PGK- <i>NEO^R</i> -KONSTRUKTES	93
3.5.7	DIE GENERIERUNG VON CHIMÄREN AUS DEN MUTAGENISIERTEN ES-ZELLEN	93
3.6	ANALYSE DES PHÄNOTYPS <i>EPHRIN-A5</i>-DEFIZIENTER MÄUSE	96
3.6.1	KONTROLLE DES <i>EPHRIN-A5</i> -TRANSKRIPTS BEI DEN MUTANTEN	96
3.6.2	ANALYSE DER WURFGRÖßEN - EMBRYONALE LETALITÄT	98
3.6.3	ANALYSE DER DEFEKTE DES ANTERIOREN NEURALROHRS	98
3.6.4	ZELLIDENTITÄTSANALYSE BEI DEN <i>EPHRIN-A5^{NEO/NEO}</i> -FÖTEN	100
3.6.5	ANALYSE DER ENTWICKLUNG DES NERVENSYSTEMS	102
3.6.6	ANALYSE DES RETINOCOLLICULAREN SYSTEMS	104
3.6.7	ANALYSE DER THALAMOCORTICALEN PROJEKTIONEN	105
3.6.8	DEFEKTE DES CEREBELLUMS	107
3.6.9	POSTNATALE ENTWICKLUNG <i>EPHRIN-A5</i> -DEFIZIENTER MÄUSE	108
3.7	EXPRESSION DER <i>EPHRIN-A</i>-LIGANDEN IN <i>EN1</i>-MUTANTEN	110
3.8	UNTERSUCHUNGEN ZUR PROMOTORREGION DES <i>EPHRIN-A5</i>-GENS	113
3.8.1	COMPUTERGESTÜTZTE ANALYSE DER PROMOTORREGION	113
3.8.2	KLONIERUNG DES <i>EPHRIN-A5</i> -REPORTERKONSTRUKTES	115
3.8.3	EXPRESSION DES REPORTERS IN TRANSGENEN EMBRYONEN	116
4	DISKUSSION	119
4.1	ORGANISATION DES <i>EPHRIN-A5</i>-GENS	119
4.2	EXPRESSION VON <i>EPHRIN-A5</i>	120
4.2.1	EMBRYONALE EXPRESSION VON <i>EPHRIN-A5</i>	122
4.2.2	<i>EPHRIN-A5</i> -EXPRESSION IN HYPOTHALAMUS UND HYPOPHYSE	123
4.2.3	<i>EPHRIN-A5</i> -EXPRESSION IN CORTICALEN STRUKTUREN	124
4.2.4	<i>EPHRIN-A5</i> -EXPRESSION IM OLFAKTORISCHEN SYSTEM	125
4.3	MUTAGENISIERUNG DES <i>EPHRIN-A5</i>-GENS	126
4.4	PHÄNOTYPISCHE VERÄNDERUNGEN DER <i>EPHRIN-A5^{NEO/NEO}</i>-MUTANTEN	128
4.4.1	DEFEKTE DES NEURALROHRS	128
4.4.2	WEITERE URSACHEN EMBRYONALER LETALITÄT	130
4.4.3	ANALYSE DER ZELLIDENTITÄT ÜBER MOLEKULARE MARKER	131
4.4.4	ANALYSE DER EMBRYONALEN INNERVIERUNG	132
4.4.5	ANALYSE DER RETINOCOLLICULAREN PROJEKTIONEN	134
4.4.6	DIE FUNKTION VON <i>EPHRIN-A5</i> IN DEN THALAMOCORTICALEN PROJEKTIONEN	138
4.4.7	ANALYSE DER VERÄNDERUNGEN DES CEREBELLUMS	138

4.5	REGULATION DES <i>EPHRIN-A5</i>-GENS	139
4.5.1	ANALYSE DES <i>EPHRIN-A5</i> -PROMOTORS	139
4.5.2	EXPRESSION VON <i>EPHRIN-A</i> -LIGANDEN IN <i>EN1</i> -MUTANTEN	141
4.6	AUSBLICK	143
5 ZUSAMMENFASSUNG		144
6 LITERATURVERZEICHNIS		146
7 ANHANG		161
7.1	ERMITTELTE GENOMISCHE SEQUENZEN	161
7.1.1	ERMITTELTE <i>EPHRIN-A5</i> -PROMOTORSEQUENZ	161
7.1.2	ERMITTELTE SEQUENZ UM EXON II	163
7.1.3	ERMITTELTE SEQUENZ UM DIE EXONS III/IV	164
7.1.4	ERMITTELTE SEQUENZ UM EXON V	164
7.2	EIN- UND DREIBUCHSTABEN-CODE FÜR AMINOSÄUREN	164
8 DANKSAGUNG		165

ABKÜRZUNGEN

A	Purinbase Adenin	μ l	Mikroliter
Abb.	Abbildung	mM	millimolar
Ac	Acetat	MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat	mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> bzw. Boten-Ribonukleinsäure
ATP	Adenosintriophosphat	MT	Mutante
bp	Basenpaare	n	Stichprobenumfang
BSA	<i>bovine serum albumin</i> bzw. Rinderserumalbumin	nm	Nanometer
bzw.	beziehungsweise	OD	Optische Dichte
°C	Grad Celsius	PAA	Polyacrylamid
Ch	<i>chicken</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
cDNA	<i>copyDNA</i>	PCR	<i>polymerase chain reaction</i> bzw. Polymerase-Kettenreaktion
cM	centi Morgan	PEG	Polyethylenglykol
cpm	<i>counts per minute</i>	PFA	Paraformaldehyd
Da	Dalton	pmol	Picomol
DEAE	Diethylaminoethyl	RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat	r	Rhombomer
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> bzw. Desoxyribonukleinsäure	RT	Raumtemperatur
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat	s.	siehe
DTT	1, 4-Dithiothreitol	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> bzw. Natriumdodecylsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	sog.	Sogenannt
EGTA	Ethylenglykol-bis-(b-Aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraacetat	Tab.	Tabelle
ES	embryonale Stammzellen	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
EtBr	Ethydiumbromid	Tris	Trishydroxymethyl-aminoethan
EtOH	Ethanol	tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i> bzw. Transfer-Ribonukleinsäure
evtl.	eventuell	U/min	Umdrehungen pro Minute
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)	ü.N.	über Nacht
g	Gramm	UV	Ultraviolett
G	Purinbase Guanin	Vol.	Volumen
h	Stunde	WT	Wildtyp
I.E.	Internationale Einheiten	X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- -D-galactopyranosid
kbp	Kilobasenpaare	z.B.	zum Beispiel
LB	Luria Broth	z.T.	zum Teil
min	Minute(n)		
M	molar		
μ g	Mikrogramm		

Die chemischen Elemente werden mit den üblichen Symbolen abgekürzt. Die Aminosäuren werden im Ein- oder Dreibuchstabencode angegeben der Anhang 6.2 entnommen werden kann. Fremdwörter, die wissenschaftliche Begriffe bezeichnen werden im allgemeinen kursiv geschrieben. In einzelnen Fällen, wie z.B. DNA, RNA, Primer, Blotten usw. haben die englischen Fachbegriffe die inzwischen unüblichen und teilweise unzureichenden deutschen Begriffe auch

aus der deutschen Fachliteratur verdrängt und werden daher hier verwendet. Da viele wissenschaftliche Termini anatomischer Strukturen Einzug in den deutschen Sprachgebrauch erhalten haben (z.B. Cerebellum, Cortex, Hypophyse), werden sie als deutsche Wörter behandelt und in aufrechten Buchstaben geschrieben. Die *Ephrin*-Gene werden gemäß der Nomenklatur des *Human Genome Organization Gene Nomenclature Comitee* mit *Efn* abgekürzt. Da in allen mir zur Verfügung stehenden Arbeiten diese Abkürzung nicht verwendet wird, sondern die Gene mit vollem Namen ausgeschrieben werden, wurde auch in dieser Arbeit aus pragmatischen Gründen auf eine Abkürzung verzichtet. Die Gene werden folglich kursiv ausgeschrieben. *Ephrin-A5*-spezifische Primer werden mit *Efn* abgekürzt.

Εφοροι

Die Ephoren bildeten eine Behörde aus fünf, jährlich gewählten höchsten Beamten in verschiedenen dorischen Städten der Antike. Sie waren vor allem in Sparta mit besonderer Macht ausgestattet, so daß sie sogar den erblichen Königen verpflichtend und beaufsichtigend gegenüberstanden.

GEORG BUSOLT.: Griechische Staatskunde.
Oscar Beck Verlag, 3. Aufl., München (1926)

1 Einleitung

1.1 Prinzipien neuronaler Konnektivität

Ein großer Anteil der komplexen Aufgaben, die Nervensysteme zu bewältigen haben, wie Reizaufnahme, Signalweiterleitung, Prozessierung und Hervorrufen einer Reaktion, wird durch ihren nicht minder komplexen Aufbau gewährleistet. Dabei ist insbesondere das enorm diffizile Netzwerk an spezifischen Verbindungen zwischen den Neuronen entscheidend. Diese Verbindungen werden über spezialisierte Fortsätze der Nervenzellen hergestellt, den Dendriten und Axonen. Vor allem Axone müssen während Entwicklung und Regeneration enorme Wegstrecken zurücklegen, was ein hochentwickeltes regulatorisches System voraussetzt. Da die Entstehung korrekter Verbindungen Voraussetzung für die Funktion des Nervensystems ist, gehört die Etablierung neuronaler Konnektivität zu den zentralen Fragen der Entwicklungsneurobiologie, die sie seit den ersten, vor mehr als hundert Jahren von RAMÓN Y CAJAL (1890) durchgeführten Arbeiten auf diesem Gebiet, beschäftigt. RAMÓN Y CAJAL formulierte bereits zu diesem frühen Zeitpunkt die Hypothese, daß Axone Signalen chemischer Natur, die von der Zielregion ausgeschüttet werden, bei ihrem zielgerichteten Auswachsen folgen (1893). Diese Hypothese sollte durch erste Erfolge zum Verständnis der Axonwanderung, die in den 40er Jahren von SPERRY (1943) gemacht wurden und die nach weiteren Forschungen in den 60ern zur Formulierung der Chemoaffinitätstheorie führten, weitgehend gestützt werden. Die Chemoaffinitätstheorie, die im Wesentlichen auf Erkenntnissen aus Transplantations- und Regenerationsstudien im retinotektalen System von Fischen und Fröschen basiert, geht davon aus, daß auswachsende Axone in einem aktivitätsunabhängigen Prozeß ihre Zielregion über wegweisende Erkennungsmoleküle finden und innervieren. Dieser Prozeß wird über Interaktionen zwischen Rezeptoren und Liganden vermittelt, die sich einerseits auf den Filopodien des Wachstumskegels der Axone befinden und andererseits in der Zielregion in Gradienten verteilt sind (SPERRY, 1963).

Durch weitere Forschungen konnten drei Phasen und vier prinzipielle Wirkungen, die das Auswachsen von Axonen regulieren, identifiziert werden. Bei den aufeinanderfolgenden Phasen handelt es sich um axonale Wegfindung (*pathway selection*), Zielgebietserkennung (*target selection*) und Erkennung der Zielzellen (*address selection*). Bei den Wirkungen handelt es sich um Kontaktattraktion und Kontaktrepulsion sowie chemotrope Attraktion und chemotrope Repulsion über diffusible Faktoren. Für jede dieser Wirkungen auf auswachsende Axone sind Faktoren, die sie vermitteln, identifiziert worden. So können beispielsweise die zellmembranständigen Cadherine Kontaktattraktion vermitteln, während Semaphorine Kontaktrepulsion auslösen. Netrine sind sekretierte Faktoren, die abhängig vom System entweder chemotrope Attraktion oder Repulsion vermitteln können (Übersicht bei GOODMAN und SCHATZ, 1993; GOODMAN, 1996; TESSIER-LAVIGNE und GOODMAN, 1996; VARELA-ECHAVARIA und GUTHRIE, 1997). Die Isolierung derartiger Faktoren und ihrer Wirkungsweisen hat sich nicht nur zu einer spannenden Frage für die Grundlagenforschung entwickelt, sondern ist auch von akutem medizinischen Interesse. Die Identifizierung von Molekülen, die eine wie auch immer

geartete Wirkung auf auswachsende Axone ausüben könnte sich zu einem hoffnungsvollen Ansatz zur Unterstützung von Regenerationsprozessen im Nervensystem nach Verletzungen entwickeln.

Verschiedene Systeme neuronaler Konnektivität sowie Modellorganismen haben sich als geeignet zum Studium der Axonwanderung und zur Isolierung der daran beteiligten Faktoren erwiesen. So z.B. das Mittelliniensystem von *Drosophila*, das System kommissuraler Fasern des Neuralrohres bei Wirbeltieren und insbesondere das retinotektale System bei Wirbeltieren (Übersicht bei GOODMAN und SCHATZ, 1993; COLAMARINO und TESSIER-LAVIGNE 1995; MEY und THANOS, 1992; HOLT und HARRIS, 1993; CHIEN und HARRIS, 1994; GILBERT, 1997).

1.2 Das retinotektale System

Das retinotektale System stellt aufgrund seiner Übersichtlichkeit und Zugänglichkeit sowie übergeordneten funktionellen Bedeutung das bislang bestuntersuchte System neuronaler Konnektivität bei Vertebraten dar. Seine prinzipielle Organisation besteht aus der topographischen Projektion der Axone der retinalen Ganglienzellen (RGZ) in das Tectum opticum niederer Wirbeltiere bzw. den Colliculus superior der Säuger. Diese topographische Organisation, die darin besteht, daß die Nachbarschaftsbeziehungen der RGZ sich in der räumlich geordneten Terminierung ihrer Fortsätze widerspiegelt, stellt die Grundlage der neuronalen Bildanalyse dar und findet sich in allen Wirbeltierklassen. Sie ist folgendermaßen aufgebaut: RGZ der dorsalen Retina projizieren in das ventrale Tectum, RGZ der ventralen Retina in das dorsale Tectum. Entlang der antero-posterioren Achse projizieren RGZ der nasalen Retina in das posteriore Tectum, RGZ der temporalen Retina in das anteriore Tectum (Abb. 1.1). Die Aufklärung dieses Organisationsprinzips im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus Transplantations- und Regenerationsexperimenten an Fröschen führte Sperry zur Formulierung der Chemoaffinitätstheorie (SPERRY, 1963).

Ein Großteil der Bemühungen zur Aufklärung der Mechanismen, die zur Ausbildung der retinotektalen Topographie (Retinotopie) führen konzentrierte sich auf die Isolierung von Faktoren, die von der Chemoaffinitätstheorie postulierte Eigenschaften zeigen und die als molekulare Wegweiser für die in das Tectum einwachsenden Axone der RGZ dienen könnten. Diese Bemühungen führten erstmals zum Erfolg als TRISLER *et al.* 1981 zwei Aktivitäten isolieren konnten, die eine spezifische, graduelle Verteilung entlang der antero-posterioren und dorso-ventralen Achse der Retina zeigen sowie im Tectum in komplementären Gradienten exprimiert sind (TRISLER, 1990). Diese Aktivitäten wurden TOP_{AP} und TOP_{DV} (für toponymische Moleküle) genannt und konnten im Falle von TOP_{AP} kloniert und charakterisiert werden. Bei TOP_{AP} handelt es sich um ein *coiled-coil* integrales Membran-Protein (SAVITT *et al.*, 1995). Weiterhin konnten 9-O-Acetyl-GD3 (CONSTANTINE-PATON *et al.*, 1986; GOODHILL und RICHARDS, 1999) und TRAP (*temporal retinal axon protein*; McLOON, 1991), beide mit positionsspezifischer Expression in der Retina, charakterisiert werden. Doch gemeinsames Merkmal dieser Moleküle bleibt das Fehlen einer nachgewiesenen funktionellen Bedeutung bei der Entwicklung der Retinotopie.

Von besonderer Bedeutung bei der Isolierung von membrangebundenen Molekülen, die regulierend in die retinotektale Topographie eingreifen, war die Etablierung zweier *in*

in vitro-Tests, des Streifen-Assays (WALTER *et al.*, 1987) und des Kollaps-Assays (Cox *et al.*, 1990; RAPER und KAPFHAMMER, 1990). Diese Assays dienen dazu, die biochemischen Unterschiede von Membranpräparationen aus verschiedenen Bereichen des Tectums direkt in ihrer Wirkung auf auswachsende retinale Axone zu überprüfen. Das Prinzip des Streifen-Assays beruht auf der Beschichtung des Bodens eines Kulturgefäßes mit alternierenden Streifen aus isolierten Membranen des posterioren bzw. anterioren Tectums. An einem Ende dieser Beschichtung werden vertikal zur Ausrichtung der Streifen retinale Explantate in nasal-temporaler (anterio-posteriorer) Orientierung angelegt und für ca. 48 h inkubiert. Das Auswachsen der RGZ-Axone während dieser Inkubationszeit wird durch nachträgliches Anfärben studiert und kann präferentielles Auswachsen auf einem bestimmten Substrat anzeigen, was wiederum Schlüsse auf die darin enthaltenen Aktivitäten zuläßt. Im Kollaps-Assay setzt man auswachsenden Axonen nasaler und temporaler Retina Membranpräparationen aus anteriorem und posteriorem Tectum aus. Die Wirkung der tektalen Membranen auf die auswachsenden Axone, z.B. transienter oder vollständiger Kollaps der Wachstumskegel, läßt auf die in der jeweiligen Membranpräparation enthaltenen Aktivitäten schließen.

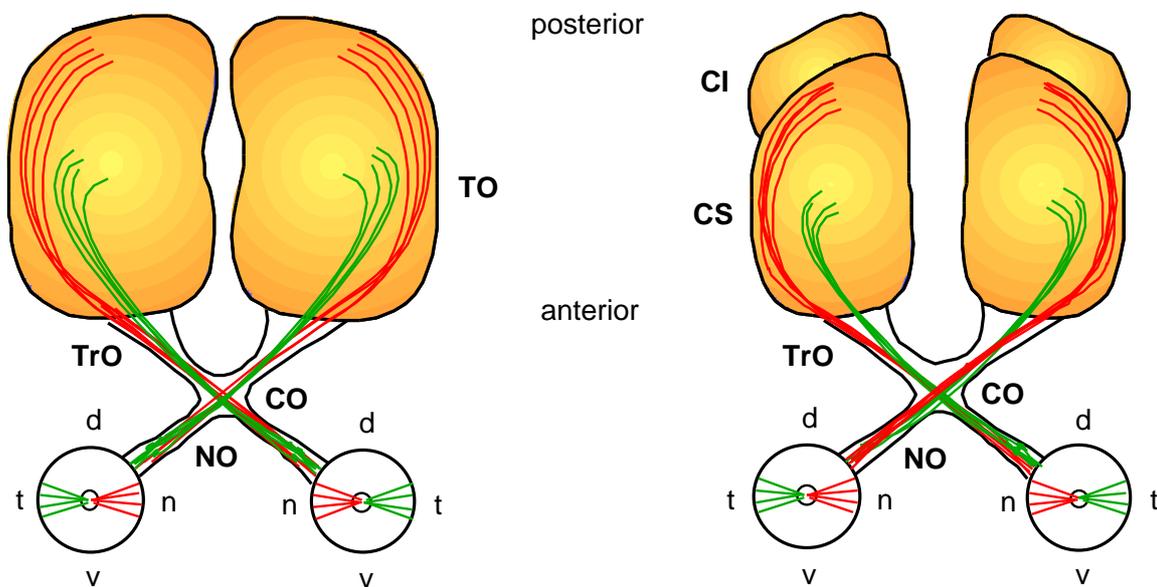


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Projektionen der Retina in das Tectum opticum der Vögel (links) bzw. den Colliculus superior der Säuger (rechts) entlang der antero-posterioren Achse am Beispiel der Modellorganismen Huhn und Maus. CI: Colliculus inferior, CO: Chiasma opticum, CS: Colliculus superior, NO: Nervus opticus, TO: Tectum opticum, TrO: Tractus opticus; d: dorsal, n: nasal, t: temporal, v: ventral.

Die beiden dargestellten Assays verhalten zur Eingrenzung verschiedener Aktivitäten mit charakteristischen Wirkungen auf retinale Fasern. So gelang die Isolierung eines 33 kDa großen Moleküls, das RGM (*repulsive guidance molecule*) genannt wurde und welches ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankertes Glykoprotein der Zellmembran ist. Diese

bislang molekular nicht charakterisierte Aktivität ist im posterioren Tectum exprimiert und übt eine abstoßende Wirkung auf temporale retinale Axone aus (STAHL *et al.*, 1990).

Darüberhinaus gelang es DRESCHER *et al.* 1995 ein Molekül aus dem posterioren Tectum opticum des Huhns zu isolieren, welches spezifisch zum Zeitpunkt der Innervierung des Tectums durch RGZ exprimiert wird (E 9 - E 11). Dieses Molekül wird in einem abnehmenden postero-anteriorem Gradienten im Tectum opticum exprimiert und wurde ursprünglich RAGS (*repulsive axon guidance signal*) genannt. Wie festgestellt werden konnte, zeigt RAGS nicht nur ein interessantes Expressionsmuster im Hinblick auf die retinotektale Topographie, sondern vielmehr auch in den beiden beschriebenen *in vitro*-Tests eine repulsive Aktivität auf Axone temporaler retinaler Ganglienzellen. Bereits ein Jahr zuvor hatten CHENG und FLANAGAN ein Molekül charakterisiert, das ursprünglich ELF-1 (*Eph ligand family-1*) genannt wurde und ebenfalls in einem abnehmenden postero-anteriorem Gradienten im Tectum opticum exprimiert wird. Für ELF-1 konnte über einen Bindungs-Assay gezeigt werden, daß der korrespondierende Rezeptor in der Retina in einem komplementären, temporal-nasal abnehmenden Gradienten exprimiert wird (CHENG *et al.*, 1995). Diese Charakteristika machen aus RAGS und ELF-1 repulsiv wirksame Schlüsselfaktoren der retinotektalen Projektion. Die Übereinstimmung in Expression und potentieller Funktion wurde durch die Sequenzhomologie zwischen beiden Molekülen ergänzt, die auf Proteinebene ca. 50% erreicht und sie zu Mitgliedern einer Gen-/Proteinfamilie von Liganden für Tyrosin-Kinase-Rezeptoren macht. Wie in den folgenden Abschnitten dargelegt wird, sollte sich die Involvierung dieser Liganden und ihrer Rezeptoren in die Regulation neuronaler Konnektivität nicht nur auf das retinotektale System beschränken. Vielmehr stellt ihre im allgemeinen repulsive Aktivität nach Zell-Zell-Kontakt ein allgemeines Prinzip ihrer Wirkungsweise dar, die der anderer in jüngster Zeit identifizierter Inhibitoren des Axonwachstums gleicht (PINI, 1993; Übersicht bei SCHWAB *et al.*, 1993; KEYNES und COOK, 1995; KOLODKIN, 1996).

1.3 Tyrosin-Kinase-Rezeptoren des Eph Subtyps und ihre Liganden

Da die Entwicklung und Funktion des Nervensystems, wie die eines gesamten vielzelligen Organismus, an die Möglichkeit zur Interaktion zwischen den Zellen gebunden ist, entstanden während der Evolution Moleküle, die entweder als Signale oder deren Rezeptoren wirken. Oft werden derartige molekulare Signale über Zelloberflächen-Rezeptoren mit Transmembrandomänen in das Innere der Zelle übertragen. Eine große Gruppe derartiger Rezeptoren besitzt intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität und bildet die Familie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. Die Tyrosin-Kinase-Rezeptoren unterteilen sich in mehrere Unterfamilien, die neben der immer vorhandenen intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne, z.T. weitere übereinstimmende strukturelle Merkmale zeigen. Derartige oft auftretende Sequenzmotive sind insbesondere Cysteinreiche-Domänen, mit vielen über Disulfid-Brücken verbundenen Cysteinresten, Fibronectin-Typ III-Module und immunoglobulinartige, globuläre Domänen, die zumeist für die Ligandenbindung verantwortlich sind (Abb. 1.2). Bindet ein Ligand an einen Tyrosin-Kinase-Rezeptor, so führt dies zu seiner Dimerisierung bei der sich die Monomere

gegenseitig an Tyrosinresten phosphorylieren, wodurch wiederum Bindungsstellen für eine Vielzahl intrazellulärer Proteine geschaffen werden (Übersicht bei PAWSON und BERNSTEIN, 1990; VAN DER GEER *et al.*, 1994).

1987 gelang es HIRAI *et al.* das Gen eines neuen Tyrosin-Kinase-Rezeptors aus einer humanen Genbibliothek zu isolieren, die sie mit einer Sonde abgesucht hatten, die der Tyrosin-Kinase-Domäne des viralen Onkogens *v-fps* entsprach. Es stellte sich heraus, daß das isolierte Gen für einen Subtyp von Tyrosin-Kinase-Rezeptoren kodiert, die seitdem, nach der humanen Tumor-Zelllinie (*erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma*), aus der ihr erster Vertreter isoliert wurde, die Eph-Subklasse genannt wird. In den folgenden Jahren wurden weitere Mitglieder dieser Genfamilie isoliert und heute stellt sie mit mindestens 14 bekannten Eph-Rezeptoren die größte innerhalb der 14 Unterfamilien von Tyrosin-Kinase-Rezeptoren dar (Übersicht bei TUZZI und GALICK, 1994; VAN DER GEER *et al.*, 1994; MÜLLER *et al.*, 1996; PASQUALE, 1997; ZISCH und PASQUALE, 1997). Es zeigte sich, daß die Eph-Rezeptoren überwiegend im zentralen Nervensystem (ZNS) während der Embryonalentwicklung als auch adult exprimiert sind, womit sich das Interesse an ihrer Erforschung, insbesondere im Zusammenhang mit Fragestellungen neuronaler Konnektivität, erhöhte (ZHOU *et al.*, 1994; Fox *et al.*, 1995; Übersicht bei TUZZI und GULLICK, 1994).

Die lange Suche nach Liganden für diese Rezeptoren führte 1994 zum Erfolg als über Affinitätschromatographie der erste Ligand für den ECK-Rezeptor (EphA2) isoliert werden konnte, der B61 (Ephrin-A1) genannt wurde (BARTLEY *et al.*, 1994). Dieser Durchbruch hatte zur Folge, daß im Laufe der folgenden Jahre über Homologiesuchen, Affinitätschromatographie und Aktivitätsisolierungen weitere sieben Liganden identifiziert werden konnten. Interessanterweise stellte man fest, daß alle Liganden entweder über eine Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Verbindung oder eine Transmembrandomäne an der Zellmembran verankerte Moleküle sind und somit ihre Rezeptoren nur über direkten Zell-Zell-Kontakt aktivieren können. Dies wird zusätzlich dadurch bestätigt, daß ein wichtiger Aspekt bei der Aktivierung der Rezeptoren die Gruppierung der Liganden ist. Es konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung der Rezeptoren nur über zellmembrangebundene, bzw. artifiziell über Antikörper zu Gruppen verbundene Liganden erfolgen kann (DAVIS *et al.*, 1994). Liganden in löslicher Form, wie sie bei diffusiblen Faktoren vorkommen würden, führen hingegen zu einer Art dominant-negativen Effekt über Sättigung der Rezeptorbindungsstellen ohne jedoch eine Aktivierung hervorzurufen (DURBIN *et al.*, 1998; LACKMAN *et al.*, 1998). Weiterhin fand man heraus, daß die N-terminale, globuläre Domäne der Eph-Rezeptoren für die Ligandenbindung verantwortlich ist (LABRADOR *et al.*, 1997). Bei den Liganden mit Transmembrandomäne konnte darüberhinaus festgestellt werden, daß sie nach ihrer Bindung an einen Rezeptor ebenfalls phosphoryliert werden und in der Lage sind ein Signal ins Zellinnere zu leiten. Die Rezeptor-Ligand-Interaktion führt hier zu einer bidirektionalen Signaltransduktion (HOLLAND *et al.*, 1996; BRÜCKNER *et al.*, 1997)

Eine wichtige Voraussetzung für die physiologische Wirkung der Liganden scheint ihre gruppierte Lokalisation auf der Zelloberfläche zu sein. Insofern ist es nicht verwunderlich, daß der Mechanismus dieser Gruppierung Gegenstand intensiver Untersuchungen war, der vor kurzem für die Transmembrandomänen-enthaltende Gruppe aufgeklärt werden konnte. Sie wird offensichtlich über PDZ (*postsynaptic density protein*)-Domänen enthaltende Proteine vermittelt, die Sequenzmotive am C-Terminale, intrazellulären Abschnitt der Liganden,

erkennen und binden. Bislang wurden über Interaktionsklonierung in der Hefe (*Yeast-Two-Hybrid-System*) drei derartige cytoplasmatische Moleküle identifiziert, PICK1, GRIP und GRIP2 (TORRES *et al.*, 1998; BRÜCKNER *et al.*, 1999). Interessanterweise interagieren nicht nur membranüberspannende Ephrine, sondern offensichtlich auch die Eph-Rezeptoren mit Proteinen, die PDZ-Domänen enthalten. Wie kürzlich gezeigt werden konnte, bindet das Ras-bindende Protein AF-6/Afadin mit seiner PDZ-Domäne C-terminale, intrazelluläre Sequenzmotive der Eph-Rezeptoren, mit denen es an Synapsen kolokalisiert. Dieser Kontakt über die PDZ-Domäne führt zu einer Aktivierung von AF-6 über die Phosphorylierung von Tyrosinresten und damit zu einer möglichen Interaktion mit anderen intrazellulären Proteinen (HOCK *et al.*, 1998; BUCHERT *et al.* 1999). Die GPI-gebundenen Liganden werden ebenfalls, trotz des Fehlens einer intrazellulären Domäne, in einer gruppierten Anordnung auf der Zelloberfläche präsentiert. Sie sind, wie GPI-gebundene Moleküle im allgemeinen, zu weniger als 50 Molekülen in Glykosphingolipid/Cholesterol-angereicherten, sog. Mikrodomänen von weniger als 70 nm Durchmesser konzentriert (VARMA und MAYOR, 1998; FRIEDRICHSON und KURZCHALIA 1998; Übersicht bei ANDERSON, 1998). Überraschenderweise konnte kürzlich festgestellt werden, daß Ephrin-A5 (RAGS), trotz des Fehlens einer intrazellulären Domäne, wahrscheinlich exemplarisch für alle GPI-gebundenen Liganden, in der Lage ist, nach Rezeptor-Bindung ein Signal ins Zellinnere zu transduzieren. Diese Signaltransduktion, innerhalb der Mikrodomäne, erfordert die Aktivierung der Kinase Fyn aus der Src (*sarcoma*)-Familie von Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und führt in der Folge zu einer Umorganisation des Cytoskeletts (DAVY *et al.*, 1999). Diese Vorgänge könnten eine hinreichende Erklärung für den Einfluß der Eph-Rezeptoren und Ephrine bei der Regulation der Zellmigration und axonalen Zielfindung geben, die sich in Stabilisierung bzw. Destabilisierung des Cytoskeletts manifestieren.

Da viele verschiedene Arbeitsgruppen zur Identifizierung von Rezeptoren und Liganden beigetragen haben, wurde die Nomenklatur uneinheitlich und daher unübersichtlich, was zur Folge hatte, daß ein aus eben jenen Arbeitsgruppen gebildetes Komitee sich 1996 für eine Vereinheitlichung entschied. Seitdem heißen die Rezeptoren Ephs und die Liganden Ephrine. (EPH NOMENCLATURE COMMITTEE, 1997).

GALE *et al.* konnten 1996 zeigen, daß trotz der Vielzahl an Eph-Rezeptoren und Ephrinen Promiskuität in der Bindungsaffinität zur Bildung von lediglich zwei Spezifitäts-Subklassen führt. Während fast alle Rezeptoren der A-Subklasse ausschließlich die Ephrin-A-Liganden binden zeigen die EphB-Rezeptoren ausschließlich zu den Ephrin-B-Liganden Affinität. Zu den A-Liganden werden sämtliche GPI-gebundenen Ephrine gezählt, während den B-Liganden, die Ephrine mit transmembraner und intrazellulärer Domäne zugerechnet werden. Eine Sonderstellung nehmen EphA4 und EphA1 ein. Während EphA4 auch B-Liganden bindet besitzt EphA1 nur zu Ephrin-A1 eine signifikante Affinität. Trotz der Promiskuität in der Bindung kann die Bindungsaffinität zwischen einzelnen Rezeptor-Liganden-Paaren bis zum 100fachen variieren (Übersicht bei FLANAGAN und VANDERHAEGHEN, 1998).

Ein zusätzlicher Aspekt der Rezeptor-Liganden-Interaktion betrifft ihre Verteilung im Organismus. Hier konnte überraschenderweise festgestellt werden, daß die Ephrine und ihre korrespondierenden Rezeptoren nicht gemeinsam sondern komplementär exprimiert sind. Während der Embryonalentwicklung nehmen sie zumeist angrenzende aber nicht

überlappende Territorien ein, so daß eine Interaktion zwischen ihnen nur an diesen Grenzflächen möglich ist (GALE *et al.*, 1996).

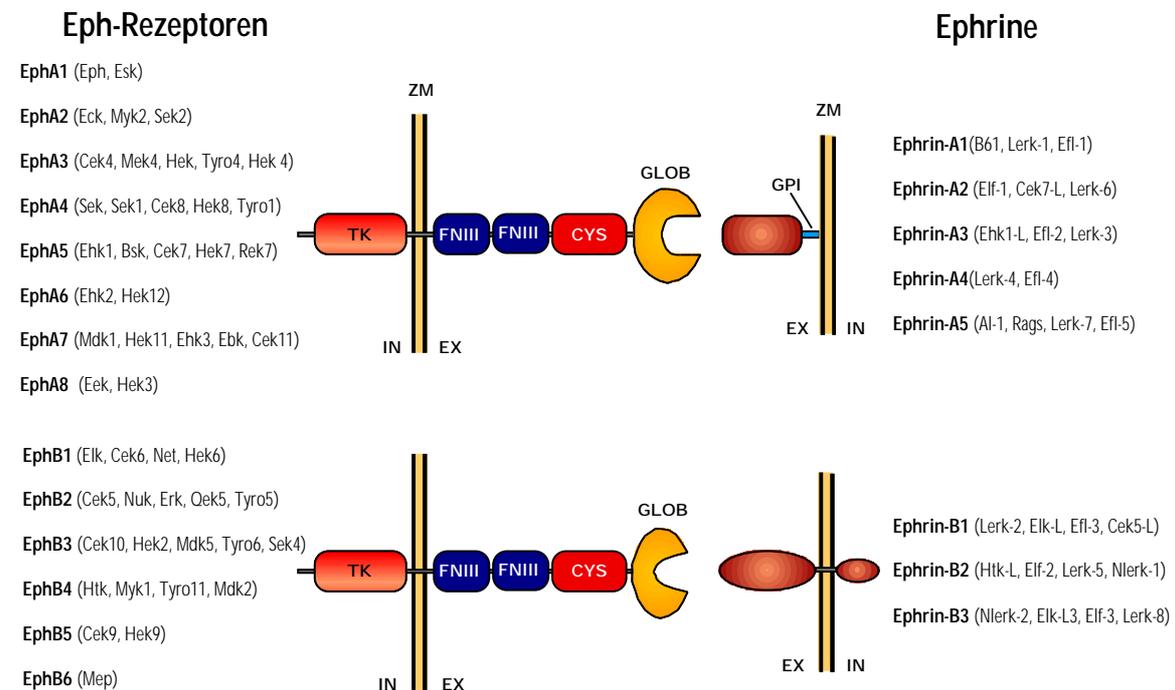


Abb. 1.2: Übersicht über die Eph-Rezeptoren und ihre Liganden. Frühere Bezeichnungen vor der Vereinheitlichung der Nomenklatur sind in Klammern angegeben. CYS: cysteinreiche Domäne, FNIII: Fibronectin-Typ III-Modul, GLOB: Globuläre Domäne, GPI: Glykosylphosphatidylinositol-Anker, EX: extrazellulär IN: intrazellulär TK: Tyrosin-Kinase-Domäne, ZM: Zellmembran

Vor kurzem konnten Eph-Rezeptoren auch aus Invertebraten isoliert werden. Dek ein Eph-Rezeptor aus *Drosophila*, zeigt sowohl zu den EphA- als auch zu den EphB-Rezeptoren der Wirbeltiere eine vergleichbare Sequenzübereinstimmung und kann damit keinem Subtyp näher zugeordnet werden. Dek ist während der Embryonalentwicklung in einer Vielzahl von Interneuronen, als auch allen Photorezeptorzellen exprimiert und wird in die Wachstumskegel zum Zeitpunkt axonaler Zielfindung transportiert (SCULLY *et al.*, 1999). Dies läßt vermuten Eph-Rezeptoren könnten auch bei Wirbellosen bei Vorgängen axonaler Zielfindung und Konnektivität mitwirken. Aus dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* konnte der VAB-1 Eph-Rezeptor isoliert werden, der ebenfalls weder den EphA- noch EphB-Rezeptoren zugeordnet werden kann. *vab-1* ist während der Entwicklung in ventralen Neuroblasten exprimiert und führt im Falle seiner Mutierung, über einen nicht zellautonomen Effekt, zu einer fehlerhaften Schließung der Epidermis an der ventralen Körperseite (GEORGE *et al.*, 1999). In beiden Fällen steht die Isolierung der korrespondierenden Liganden noch aus.

1.4 Die Rolle der Eph-Rezeptoren und Ephrine bei der Etablierung der retinotektalen Topographie

Wie bereits dargestellt, besteht eine wichtige Wirkung der Eph-Rezeptoren und Ephrine darin, als repulsive Signale bei der Regionalisierung des Embryos und beim Auswachsen der Axone zu fungieren. Diese Wirkungsweise ist insbesondere für das retinotektale System eingehend studiert worden. Vertreter beider Subklassen von Rezeptoren und Liganden sind hier in streng regulierten zeitlich-räumlichen Mustern exprimiert und spielen sich ergänzende Rollen bei der Etablierung der Retinotopie.

1.4.1 Die Familie der EphA-Rezeptoren und Ephrin-A-Liganden

Die graduell im posterioren Tectum exprimierten Moleküle Ephrin-A2 und Ephrin-A5 konnten in *in vitro*-Assays funktionell mit der retinotektalen Topographie assoziiert werden (s. 1.2). Die korrespondierenden Rezeptoren für diese Liganden in der Retina scheinen EphA3 und EphA6 zu sein, die hier einen komplementären, temporal (hoch)-nasalen (niedrig) Expressionsgradienten zeigen (CHENG *et al.*, 1995; FELDHEIM *et al.*, 2000). Die Komplexität erhöht sich noch dadurch, daß Ephrin-A2 und Ephrin-A5 ebenfalls in der Retina, in einem zu EphA3 und EphA6 komplementären, nasal-temporal abnehmenden Gradienten exprimiert werden (CONNOR *et al.*, 1998). Diese Beobachtung ließ vermuten, hierbei handelt es sich um einen Mechanismus zur Modulation der Rezeptor-Funktion. Diese Annahme konnte kürzlich von HORNBERGER *et al.*, (1999) sowie DÜTTING *et al.*, (1999) auf elegante Weise bestätigt werden. Wird Ephrin-A2 ektopisch in der Retina exprimiert, so führt die Desensitivierung der retinalen Ganglienzellen dazu, daß temporale Fasern ihre eigentliche Terminationszone im anterioren Tectum nicht erkennen und in weiter posterior liegende Bereiche projizieren. Wird eine derartige ektopische Expression mit Ephrin-A5 durchgeführt so hat dies zur Folge, daß sowohl temporale als auch nasale Fasern Projektionsfehlern unterliegen. Zusätzlich sind drei weitere Rezeptoren in der Retina exprimiert, EphA4 und EphA5 und EphA7. Während die EphA4-Expression gleichmäßig in der Retina verläuft ist sie bei EphA7 in der dorsalen Hälfte konzentriert. (HORNBERGER *et al.*, 1999; SEFTON *et al.*, 1997). Bei EphA5 sind die Angaben zur Expression widersprüchlich. ZHANG *et al.* (1996) berichten von einer gleichmäßigen Verteilung bei der Maus (E 18) im Gegensatz zu FELDHEIM *et al.* (2000), die, wie bei EphA3 und EphA6, eine temporal höhere Expression feststellen. Eine Übersicht über die Expression dieser Moleküle im retinotektalen System ist Abb. 1.3 zu entnehmen.

Neben diesen Expressionsstudien sind es insbesondere funktionell ausgerichtete Experimente gewesen, welche die Annahme bei den Eph-Rezeptoren und Ephrinen handelt es sich um Schlüsselmoleküle der retinotektalen Topographie stützen. Diese Arbeiten wurden in erster Linie am Huhn durchgeführt, dem etabliertesten Modellorganismus für das retinotektale System. 1996 gelang es NAKAMOTO *et al.* erstmals *in vivo* zu zeigen, daß Ephrin-A2, über retrovirale Vektoren ektopisch im anterioren Tectum des Huhns exprimiert, dazu führt, daß temporale retinale Axone ektopisch terminieren. Nasale Axone hingegen reagieren auf das Vorhandensein von Ephrin-A2 nicht. Diese Daten konnten durch HORNBERGER *et al.* (1999)

bestätigt und zu einem allgemeinen Modell der molekularen Steuerung der Retinotopie ausgebaut werden. Demnach ist der Grad der Phosphorylierung der Eph-Rezeptoren einer retinalen Ganglienzelle, die ein Axon aussendet um eine bestimmte Zielregion des Tectums zu innervieren entscheidend. Ist aufgrund von Rezeptor-Liganden-Interaktion ein bestimmtes Phosphorylierungsniveau intrazellulärer Moleküle erreicht, wird das Auswachsen des Axons eingestellt und es werden Verbindungen geknüpft.

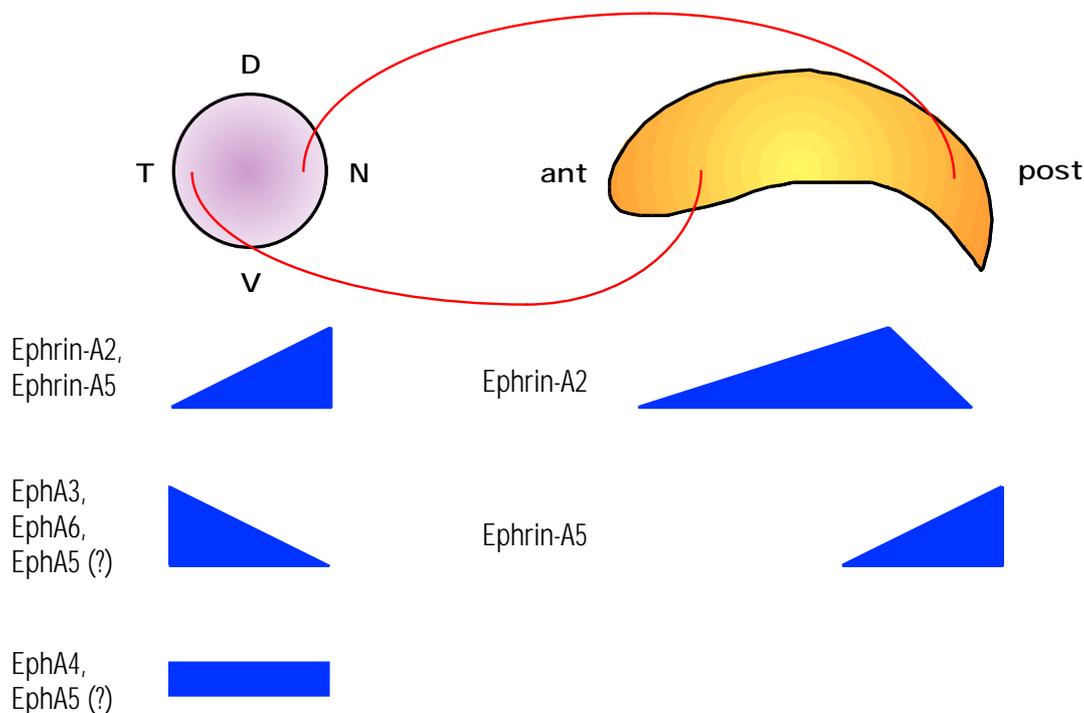


Abb. 1.3: Übersicht über die Expressionsdomänen der EphA-Rezeptoren und Ephrin-A-Liganden in Retina und Colliculus superior der Maus in schematischer Darstellung. Die graduelle Expression der meisten dieser Moleküle ist in Dreieckform angezeigt. Die roten Linien verdeutlichen das ungefähre Projektionsschema der RGZ. ant: anterior, post: posterior; d: dorsal, n: nasal, t: temporal, v: ventral.

1.4.2 Die Familie der EphB-Rezeptoren und Ephrin-B-Liganden

Rezeptoren und Liganden der B-Klasse stehen ebenfalls mit dem retinotektalen Projektionssystem in Verbindung. Interessanterweise könnten sie für die ventral-dorsale Topographie bzw. Differenzierung der Retina von Bedeutung sein. So sind die Ephrine B1 und B2, zum Zeitpunkt des Auswachsens der retinalen Fasern, in der dorsalen Hälfte der Retina exprimiert, während die Rezeptoren EphB2 und EphB3 komplementär in der ventralen Hälfte der Retina exprimiert werden (HOLASH und PASQUALE, 1995; KENNY *et al.*, 1995; MARCUS *et al.*, 1996; HENKEMEYER *et al.*, 1996; HOLASCH *et al.*, 1997; BRAISTED *et al.*, 1997; BIRGBAUER *et al.*,

2000). Die subzelluläre Verteilung dieser Moleküle zeigt, neben der Expression in der RGZ-Schicht, eine Konzentrierung in den plexiformen Schichten (Axone und Dendriten der retinalen Neurone) und läßt damit auch eine Rolle bei der Bildung intraretinaler Verbindungen als möglich erscheinen. Ein weiterer Rezeptor der B-Klasse, EphB5, wird ebenfalls in der Retina in einem Gradienten exprimiert, der von der Peripherie zum Zentrum abnimmt. Diese Expression könnte bei der intraretinalen Zielfindung von Axonen eine Rolle spielen (SEFTON *et al.*, 1997). Im Tectum können Liganden und Rezeptoren der B-Klasse ebenfalls detektiert werden. Ephrin-B1 zeigt im Tectum einen von dorso-posterior nach ventro-anterior abnehmenden Expressionsgradienten (BRAISTED *et al.*, 1997). Zusätzlich ist ein weiterer B-Ligand, Ephrin-B2, in den tieferen Schichten des Tectums, die retinale Fasern bei der Bildung ihrer Verbindungen meiden, exprimiert und könnte hier die Information über das Erreichen der korrekten Schicht vermitteln (BRAISTED *et al.*, 1997). Darüberhinaus sind die Rezeptoren EphB1, -B2 und -B3 ebenfalls in verschiedenen Schichten und Gradienten im Tectum opticum verteilt (CONNOR *et al.*, 1998). EphB2 z.B. findet sich im Stratum griseum periventriculare und Stratum griseum centrale in einem posterior-anterior abnehmenden Gradienten.

FELDHEIM *et al.* (1998) konnten zeigen, daß Ephrin-A2 und Ephrin-A5 wahrscheinlich nicht nur in die topographischen Projektionen von RGZ in das Tectum opticum regulierend eingreifen, sondern auch bei der retinalen Innervierung des Vorderhirns eine Rolle spielen. Interessanterweise sind diese Moleküle in allen primären Zielregionen retinaler Fasern graduell exprimiert und vermitteln ihnen so topographische Informationen. Diese weiteren Zielregionen, die ebenfalls topographisch organisierte Verbindungen mit RGZ eingehen, umfassen den dorsalen und ventralen Corpus geniculatum laterale sowie das Pretectum. Diese erstaunlichen Ergebnisse könnten vielleicht ein allgemeines Prinzip neuronaler Konnektivität aufzeigen. Demnach wird die Topographie von Axonen eines Projektionsfeldes modular, in allen Zielregionen von den gleichen Molekülen, reguliert.

Die Entwicklung der retinotektalen Topographie in Abhängigkeit von Ephrinen und Eph-Rezeptoren wurde in erster Linie bei den Modellorganismen Huhn und Maus untersucht. Die grundlegenden Zusammenhänge scheinen allerdings bei allen Wirbeltieren zu bestehen. So konnten aus dem Zebrafisch (*Brachydanio rerio*) Homologe von Ephrin-A2 (ZfEphL3) und Ephrin-A5 (ZfEphL4) isoliert werden, die im Streifen-Assay eine zum Huhn vergleichbare repulsive Wirkung auf retinale Axone ausüben (BRENNAN *et al.*, 1997; Übersicht bei WILSON *et al.*, 1997). Für *Ephrin-A5* konnte außerdem festgestellt werden, daß wohl aufgrund einer teilweisen Duplikation des Zebrafisch-Genoms (POSTLETHWAIT *et al.*, 1998) zwei getrennte Gene vorhanden sind, die ähnlich aber nicht identisch exprimiert werden (*Ephrin-A5a* und *Ephrin-A5b*; PICKER *et al.*, 1999). Kürzlich gelang die Isolierung und Expressionsanalyse für EphA3, EphA7, Ephrin-A2 und Ephrin-A5 bei einem Beuteltier. Beim Wallaby (*Macropus eugenii*) finden sich im retinotektalen System prinzipiell die gleichen Expressionsmuster für diese Moleküle und damit wahrscheinlich auch die funktionellen Zusammenhänge, wie sie bei der Maus bereits dargestellt wurden (VIDOVIC *et al.*, 1999).

1.5 Funktionelle Analysen der Eph-Rezeptoren und Ephrine an transgenen Tieren

Um mehr Informationen über die Funktionsweise der Eph-Rezeptoren und ihrer Liganden zu gewinnen, wurden transgene Tiermodelle etabliert bzw. transgene Techniken eingesetzt, in denen die für diese Moleküle kodierenden Gene mutiert oder ektopisch exprimiert wurden. Diese Experimente lieferten interessante Einblicke in die *in vivo*-Funktion der Eph-Rezeptoren und Ephrine, die im Wesentlichen mit den Erkenntnissen aus den *in vitro*-Experimenten übereinstimmen (Übersicht bei ORIOLI und KLEIN, 1997; HOLDER und KLEIN, 1999).

EphA4, der während der Embryogenese in einer Vielzahl von Expressionsdomänen, wie dem sich entwickelnden Prosencephalon, Myelencephalon und Mesoderm detektiert werden kann, zeigt sich insbesondere während der finalen pränatalen Stadien im Zentralnervensystem akkumuliert. Strukturen mit intensiver EphA4-Aktivität sind insbesondere die Großhirnrinde (Pallium), das Striatum, der Thalamus, der Hippocampus und das ventrale Rückenmark. *EphA4*-defiziente Mäuse zeigen eine Verkürzung der corticospinalen Fasern, die von Schicht V des Palliums ausgehen und entweder direkt oder über, in der Medulla oblongata liegende Interneurone, Motoneurone des Rückenmarks innervieren. Dieser Defekt hat motorische Störungen, insbesondere der Hinterextremitäten zur Folge, die zu einem abnormen, unkoordinierten Gang bei den homozygoten Mutanten führen (DOTTORI *et al.*, 1998).

Die Mutagenese des *EphB2*-Rezeptor-Gens über homologe Rekombination in ES-Zellen führt bei den homozygot mutanten Mäusen ebenfalls zu axonalen Zielfindungsdefekten. Hier ist das Auswachsen der Axone der Commissura anterior, die als die Kommissur des Paläocortex die Zentren des Riechhirns über die Mittellinie hinweg miteinander verbindet, betroffen. Insbesondere die anterioren Fasern verbleiben in ihrer Wanderung auf der ipsilateralen Seite und projizieren in das ventrale Vorderhirn. Dieser Phänotyp läßt sich über die repulsive Aktivität von EphB2, der im gesamten Zentralnervensystem ventral exprimiert wird, auf die kommissuralen Fasern erklären, die ihrerseits den Transmembran-Liganden Ephrin-B1 exprimieren. Daß dieser Effekt nicht zellautonom für die *EphB2*-exprimierenden Zellen des ventralen Prosencephalon ist, konnte über die Schaffung eines weiteren Allels für *EphB2* gezeigt werden, daß nicht in einer Nullmutante resultiert, sondern ein Fusionsprotein der extrazellulären Domäne von EphB2 mit der β -Galactosidase kodiert. Diesem Molekül fehlt somit die intrazelluläre Tyrosin-Kinase-Domäne und damit die Fähigkeit zur intrazellulären Signaltransduktion. Tiere, die homozygot das *EphB2*^{lacZ}-Allel tragen, zeigen keine mißgeleitete Migration der kommissuralen Fasern, da diese das erforderliche repulsive Signal über die extrazelluläre Domäne von EphB2 erhalten und korrekt geleitet werden (HENKEMEYER *et al.*, 1996).

Die Redundanz im System der Eph-Rezeptoren und ihrer Liganden konnte an den *EphB2/EphB3*-Doppelmutanten demonstriert werden. Diese beiden Rezeptoren zeigen z.T. überlappende bis identische Expressionsdomänen im ventralen Prosencephalon und in den Rhombomeren r3 und r5 sowie ähnliche Affinität zu den gleichen Liganden. Während der Verlust von EphB2, wie bereits erwähnt, zu einer abnormen Migration der Fasern der vorderen Kommissur führt, fehlt den EphB3-Mutanten ein korrekt ausgebildetes Corpus callosum, der Verbindungstrakt der beiden Hälften des Neocortex. Bei den Doppelmutanten zeigen sich

beide Fasersysteme jeweils verstärkt betroffen, da von der fehlerhaften Migration nun ausnahmslos alle Axone betroffen sind. Zusätzlich sterben die doppelmutanten Embryonen, wahrscheinlich aufgrund eines gespaltenen Gaumens, nach der Geburt, während die Einzelmutanten voll überlebensfähig sind (ORIOLI *et al.*, 1996). Darüberhinaus zeigen neuste Studien, daß bei den doppelmutanten Mäusen die Zielfindung der retinaler Fasern zur Austrittsstelle der Retina (Macula lutea) Fehler aufweist, die bei den Einzelmutanten nicht auftreten (BIRGBAUER *et al.*, 2000).

Die Inaktivierung des EphA8-Rezeptors in Mäusen führte ebenfalls zu aberranter axonaler Zielfindung in einem kommissuralen Fasersystem. Die kommissuralen Axone einer Subpopulation von EphA8 exprimierenden Neuronen des Colliculus superior, die sich mit dem Colliculus inferior der kontralateralen Seite verbinden, kreuzen nicht mehr die Mittellinie sondern wachsen auf der ipsilateralen Seite aus und terminieren im cervicalen Rückenmark (PARK *et al.*, 1997).

Daß die Wirkung der Eph-Rezeptoren und Ephrine nicht allein auf das Nervensystem beschränkt ist, konnte gezeigt werden als man der Funktion des EphB4-Rezeptors und seines Liganden Ephrin-B2 über die Mutierung des Ephrin-B2-Gens bei Mäusen nachging. Dieses Rezeptor-Liganden-Paar scheint von tragender Bedeutung bei der Spezifizierung von Arterien und Venen während der Angiogenese zu sein. Während arterielle Zellen, zu diesem frühen Zeitpunkt der Entwicklung des Kreislaufsystems, ausschließlich den Liganden exprimieren, wird in venösen Zellen ausschließlich der Rezeptor exprimiert. Homozygot mutante *Ephrin-B2^{lacZ}*-Mäuse sterben bei normaler Vaskulogenese ab Embryonaltag 10,5 (E 10,5) aufgrund nicht erfolgter Angiogenese ab. Die embryonale Letalität zu diesem frühen Zeitpunkt scheint insbesondere auf den Verlust des Kapillarnetzes im Dottersack, der für die Versorgung des Embryos unumgänglich ist, zurückzuführen zu sein. Jedoch betrifft die defiziente Angiogenese nicht allein die Ausbildung der Arterien, die den Liganden exprimieren, sondern auch die Bildung der Venen, die den Rezeptor exprimieren und für ihre Spezifizierung auf die Interaktion mit den arteriellen, endothelialen Zellen angewiesen sind (WANG *et al.*, 1998). Neueste Arbeiten konnten zeigen, daß in diesen Prozeß auch Ephrin-B1 involviert ist, welches in Arterien und Venen exprimiert wird sowie der Rezeptor EphB3 der in manchen Arterien exprimiert wird (ADAMS *et al.*, 1999). Die Rolle von EphB4 und seinen Liganden bei der Angiogenese scheint auch evolutionär konserviert zu sein, da die Inaktivierung von EphB4 über RNA-Gegenstrang-Injektionen bzw. die ektopische Expression seiner Liganden bei *Xenopus* zu Defekten bei der Bildung von Arterien und Venen führt (HELBLING *et al.*, 2000).

Zusätzliche Einsicht in die Wirkungsweise der Eph-Rezeptoren und Ephrine, insbesondere im Hinblick auf die Regulation der Zellmigration im Metencephalon, wurde durch die Verwendung eines weiteren Modellorganismus, des Zebrafisches ermöglicht (*Danio rerio*). Beim Zebrafisch ist es möglich zu einem frühen, nur aus wenigen Zellen bestehenden Entwicklungsstadium RNA in eine Zelle zu injizieren und damit die aus ihr translatierten Proteine ektopisch in allen Nachläufer-Zellen zu exprimieren. Sowohl *in vitro*, mit aus Zebrafisch-Embryonen in Kultur genommenem Gewebe aus der animalen Kappe, als auch *in vivo*, bei der Bildung der Rhombomere des Metencephalons, konnte festgestellt werden, daß die Unterbindung der Zellmigration zwischen zwei distinkten Zellpopulationen, die einerseits Rezeptoren (EphA4 in r3 und r5 und EphB4 in r2, r5 und r6) und andererseits Liganden (Ephrin-B2 in r1, r4 und r7) exprimieren, an die bidirektionale Signaltransduktion zwischen

Eph-Rezeptoren und Ephrinen der B-Klasse gebunden ist. Die unidirektionale Signaltransduktion, wie sie aus der Injektion mit RNA für dominant-negative Rezeptoren bzw. B-Liganden, denen die Tyrosin-Kinase-Domäne fehlt, resultiert, kann die Vermischung der Zellen aus den beiden unterschiedlichen Kompartimenten nicht verhindern (MELLITZER *et al.*, 1999; XU *et al.*, 1999). Der gleiche Effekt kann auch bei *Xenopus*-Embryonen beobachtet werden, die mit einem derart dominant-negativen Konstrukt injiziert werden. Dies kann anhand der aberranten Expression, des für die Rhombomere r3 und r5 charakteristischen Transkriptionsfaktors Krox-20 festgestellt werden (XU *et al.*, 1995). Interessanterweise führt die ektopisch exprimierte, dominant-negative Form von EphA4 auch im Vorderhirn zu Defekten, insbesondere zu einer Ausdehnung der Augenanlage mit einhergehender Reduzierung des Diencephalons (XU *et al.*, 1996).

Die Ergebnisse dieser Analysen lassen für das System der Eph-Rezeptoren und ihrer Liganden vielzählige Funktionen, insbesondere während der Embryogenese, erkennen. Vor allem ihre regulierende Wirkung auf das Auswachsen von Axonen sowie die Verhinderung der Durchmischung von Zellen verschiedener Kompartimente, über ihre repulsive Aktivität, macht sie zu Schlüsselfaktoren der neuronalen Konnektivität und Musterbildung während der Embryogenese.

1.6 Regulation der Eph-Rezeptoren und Ephrine

Im Laufe der letzten zwei Jahrzehnte ist eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren identifiziert worden, die entscheidend in die Entwicklung des Nervensystems eingreifen. Insbesondere Musterbildungsprozesse sowie die Regionalisierung der Neuralplatte sind direkt an die Expression derartiger Schlüsselfaktoren gebunden, wie in erster Linie aus Geninaktivierungsstudien an transgenen Tieren hervorgeht (Übersicht bei CHALEPAKIS *et al.*, 1993; STUART *et al.*, 1993; BONCINELLI, 1994; RUBENSTEIN und PUELLES, 1994; RUBENSTEIN *et al.*, 1994; SHIMAMURA *et al.*, 1995; JOYNER, 1996; BALLY-CUIF und BONCINELLI, 1997; BRAND und WURST, 1997; ALLEN *et al.*, 1997). Die Erfolge auf diesem Gebiet führten zunehmend dazu, daß auch die Aufklärung der transkriptionellen Kontrolle axonaler Wegfindung ein intensiver Forschungsgegenstand in der Entwicklungsneurobiologie wurde (Übersicht bei DASTON und KOESTER, 1996). Seit der Entdeckung der Eph-Rezeptoren und Ephrine sowie der Aufklärung ihrer Funktion bei Prozessen neuronaler Konnektivität stehen nun Moleküle bzw. Gene zur Verfügung deren transkriptionelle Aktivierung direkt studiert werden kann.

Vor allem die Rolle der eine Homeodomäne enthaltenden *En*-Transkriptionsfaktoren bei der Expression der Ephrine und damit der Ausbildung der retinotektalen Topographie stand im Mittelpunkt intensiver Studien (Übersicht bei RÉTAUX und HARRIS, 1996). Die Gene, die für diese Transkriptionsfaktoren kodieren sind Homologe des *Drosophila* Segment-Polarität-Gens *engrailed* und werden u.a. im Mesencephalon ähnlich den *Ephrin-A2* und *A5*-Genen in einen antero-posterior zunehmenden Gradienten exprimiert (DAVIS und JOYNER, 1988). In *Xenopus*-Embryonen konnte festgestellt werden, daß einer Inhibierung der *En*-Expression, über Injektion von Gegenstrang-Oligonukleotiden, Wegfindungs-Fehler retinaler Fasern als auch der intertektalen Kommissur folgen (RÉTAUX *et al.*, 1996). Diese Daten konnten über retrovirale, ektopische Expression von *En* in Huhn-Embryonen nachdrücklich unterstützt

werden. Nasale retinale Fasern projizieren ins posteriore Tectum. Werden nun die *En*-Gene (*En1* und *En2*) ektopisch im anterioren Tectum exprimiert, so führt dies zur ihrer ektopischen Terminierung im anterioren Tectum. Temporale Fasern, die normalerweise das anteriore Tectum innervieren würden, meiden es z.T. gänzlich (ITASAKI und NAKAMURA, 1996; FRIEDMAN und O'LEARY, 1996). Der Verdacht diese Wirkung von *En* würde auf die Aktivierung der zuvor entdeckten, im Tectum exprimierten Ephrine beruhen, wurde erhärtet als man erkannte, daß die ektopische Expression von *En1* und *En2* zur deckungsgleichen ektopischen Expression von Ephrin-A2 und -A5 führt (LOGAN *et al.*, 1996; SHIGETANI *et al.*, 1997). Ob diese Aktivierung auf einer direkten transkriptionellen Kontrolle beruht bleibt allerdings noch ungeklärt.

Im Zusammenhang mit der retinotektalen Topographie sind neben den *En*-Faktoren weitere Transkriptionsfaktoren isoliert worden, deren ektopische Expression zu Zielfindungsfehlern retinaler Fasern führt. Hierzu gehören die Faktoren CBF-1 und CBF-2, die als DNA-bindendes Motiv eine *winged-helix* enthalten und *Vax*, welcher eine Homeodomäne enthält (YUASA *et al.*, 1996; SCHULTE *et al.*, 1999). CBF-1 wird während der Entwicklung in der nasalen Retina exprimiert, während CBF-2 in der temporalen Retina exprimiert wird. Werden diese beiden Moleküle über retrovirale Infektion in den jeweils komplementären retinalen Kompartimenten ektopisch exprimiert, führt dies zu Fehlern in der Topographie retinaler Fasern entlang der antero-posterioren Achse (YUASA *et al.*, 1996). *Vax* wiederum wird in der ventralen Retina exprimiert und führt im Falle seiner ektopischen Expression in der dorsalen Retina zu einer Ventralisierung derselben, wie anhand des Verlustes der Expression der dorsalen Marker-Moleküle Ephrin-B1 und Ephrin-B2 sowie der dorsal induzierten Expression der Eph-Rezeptoren B2 und B3 festgestellt werden kann. Ob der Einfluß von *Vax* auf die Expression dieser Moleküle auf einer direkten transkriptionellen Kontrolle basiert, ist bislang ungeklärt. Letztlich führt eine derartige ektopische Expression zum Verlust der Zielfindung nun ventralisierter dorsaler retinaler Axone (SCHULTE *et al.*, 1999).

Die Aufklärung der Regulation von Ephrinen und Eph-Rezeptoren blieb allerdings nicht nur auf die Moleküle des retinotektalen Systems beschränkt. THEIL *et al.* (1998) gelang erstmals die Aufklärung der direkten transkriptionellen Kontrolle eines Eph-Rezeptors im Metencephalon. *EphA4*, welches in den Rhombomeren r3 und r5 des Rautenhirns exprimiert wird, besitzt in einem Kontrollelement seines Promotors mehrere Bindungsstellen für den Zinkfinger-enthaltenden Transkriptionsfaktor Krox-20. Werden diese Bindungsstellen mutiert hat das den Verlust dieser Expressionsdomänen zur Folge. Ektopische Expression von Krox-20 in den Rhombomeren r4 oder r6, in entsprechenden transgenen Mauslinien, führt auch zur ektopischen Expression des *lacZ*-Reportergens unter Regulation des *EphA4*-Kontrollelements. Für *EphA2*, einen weiteren im Metencephalon in r4 exprimierten Eph-Rezeptor konnte *in vitro* ebenfalls eine Interaktion von Kontrollelementen seines Promotors durch die in diesem Territorium koexprimierten HOXA1- und HOXB1-Transkriptionsfaktoren festgestellt werden. Diese Interaktion ist allerdings an die Präsenz eines weiteren Homeodomänen-Transkriptionsfaktors gebunden, Pbx1 (STRUDER *et al.*, 1998). Diese Daten konnten *in vivo* in *Hoxa1/Hoxb1*-Maus-Doppelmutanten bestätigt werden, da es hier zu einer starken Reduktion der Expression von *EphA2* im r4-Territorium kommt, wohingegen bei den Einzelmutanten kein derartiger Effekt beobachtet werden kann, was die Synergie in der Wirkungsweise dieser Transkriptionsfaktoren verdeutlicht (CHEN und RULEY, 1998). Diese Studien zeigen eindrucksvoll die Wirkung von Transkriptionsfaktoren auf die Expression von Zelloberflächen-

Molekülen, wie den Ephrinen und ihren Rezeptoren und damit auch auf die Entwicklung neuronaler Konnektivität auf.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die Organisation, Expression, Regulation und Funktion des *Ephrin-A5*-Gens der Maus (*Mus musculus*) aufgeklärt werden.

Zu diesem Zweck sollen cDNA sowie genomische Klone isoliert, und diese über Restriktionskartierung und Sequenzierung charakterisiert werden, so daß die genomische Organisation von *Ephrin-A5* ersichtlich wird. Auf der Basis dieser Erkenntnis kann eine Strategie entwickelt werden, mit welcher der Locus im Maus-Genom über homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) gezielt mutagenisiert und dadurch inaktiviert werden kann. Im Anschluß sollen über Injektion der mutagenisierten ES-Zellen in Blastocysten chimäre Mäuse erzeugt werden und diese durch geeignete Verpaarungen, für das mutierte Allel heterozygote und homozygote Nachkommen produzieren.

Aus dem phänotypischen Vergleich von Mäusen, die einen intakten Locus besitzen und Mäusen, in denen das Gen inaktiviert worden ist, können Schlüsse auf die Funktion von *Ephrin-A5* im Organismus gezogen werden. Diese Analyse möglicher phänotypischer Veränderungen *Ephrin-A5*-defizienter Mäuse soll durch eine detaillierte Expressionsanalyse von *Ephrin-A5* unterstützt werden. Dazu sollen an Ganzkörperpräparaten sowie an Schnitten embryonalen und adulten Gewebes RNA-*in situ*-Hybridisierungen durchgeführt werden, und das Expressionsmuster studiert werden. Insbesondere soll die bereits vermutete Funktion von *Ephrin-A5* bei der Etablierung der retinotektalen Karte durch geeignete Markierungs-Experimente überprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen auch Fragen zur Regulation des *Ephrin-A5*-Gens geklärt werden. Hierzu soll versucht werden 5'-regulatorische Elemente zu klonieren, zu sequenzieren und die ermittelte Sequenz einer computergestützten Analyse zur Identifizierung potentieller Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren zu unterziehen. Um die Funktionalität dieser Promotorelemente zu überprüfen sollen *lacZ*-Reporterkonstrukte hergestellt werden, die über Vorkerninjektion in das Genom von Mäusen integriert werden. Die Aktivierung der *lacZ*-Kassette kann durch den histochemischen Nachweis der von ihr kodierten -Galactosidase mittels X-Gal-Färbung festgestellt werden. Aus dem Vergleich der RNA-*in situ*-Hybridisierungen und der Expression des Reporters sollen Schlüsse auf die Funktion der isolierten Elemente gezogen werden.

Letzlich soll die Rolle der En-Transkriptionsfaktoren bei Expression und Regulation der Ephrine im Tectum ermittelt werden. Hierzu sollen *in situ*-Studien mit wildtypischen und *En*-defizienten Mäusen durchgeführt werden. Eventuelle Veränderungen in Expressionsverlauf oder -intensität, insbesondere im Bereich des Nervensystems, sollen in die Modelle der Regulation von Ephrin-A2 und -A5 im Tectum integriert werden

2 Material und Methoden

2.1 Geräteliste

Agarosegel-Elektrophoreseapparaturen:	MWG-Biotech
Autoklav:	Melag Typ 24
Brutschrank:	WT-Binder
Elektrophorese-Netzgeräte:	Pharmacia, ECPS 3000/150; Biorad, Model 200/2.0
Elektroporationsgeräte:	Biorad, Gene Pulser II, Pulse Controller Plus
Feinwaagen:	Precisa 40SM-200A; Sartorius LP 4200 S
Gefrierschränke (-80 °C/-140 °C):	New Brunswick Scientific, Heraeus
Gefrierschränke (-20 °C):	Liebherr
Geldokumentationsanlage:	MWG-Biotech, Gel Print 2000i
Heizblöcke:	Eppendorf, Thermomixer 5436
Heizer/Magnetrührer:	IKA Labortechnik, RCT basic
Hybridisierungsöfen/-röhren:	MWG-Biotech
Inkubationsöfen:	Memmert
Inkubationsschränke (ES-Zellen):	Heraeus
Kaltlichtquellen:	Leica, KL 1500; Shott, KL 750
Kühlschränke (4 °C):	Liebherr
Laborglaswaren:	Shott
Mikroskope:	Leica DMIL, MZ 6, MZ APO, DMRB

Paraffin-Einbettvorrichtung:	Sakura, Tissue-Tek TEC
PCR-Geräte:	Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9600/9700
Photometer:	Pharmacia Biotech, Gene Quant II
pH-Meßgerät:	WTW, pH 538
Pipettierhilfe:	Hirschmann, pipetus -akku
Pipetten (2 µl - 1 ml / 0,5 - 10 µl)	Gilson / Eppendorf
Polyacrylamidgel- Elektrophoreseapparatur:	Biometra
Reinstwasser-Aufbereitungsanlage:	Millipore, Milli-QUFPlus, Seral, Seralpur PRO 90 CN
Schüttler / Schwenker:	Heidolph, Unimax 2010, Polymax 1040, REAX 2; Infors; CLAY ADAMS Brand, Nutator
Sequenzier-Automaten:	Applied Biosystems 370 A und 373 A
Sterilbänke:	Nunc, Laminar Flow Workstation, Microflow Safety Cabinet Heraeus, LaminAir HB 2448
Flüssigstickstofftank:	MVE Cryogenics, XLC 230
UV-DNA/RNA-Crosslinker.	Stratagene, UV Stratalinker 1800/2400
UV-Transiluminator:	Bachhofer
Vakuum-Konzentrator:	Bachhofer
Vortex:	Ika, MS1 Minishaker
Wasserbäder:	GFL, Julabo
Zentrifugen:	Beckman, J2-MC (Rotoren: JLA-16.250/JA-20) Heraeus, Biofuge pico, Megafuge 1.0R Hettich, Universal 30F

2.2 Bezugsquellen von Chemikalien, Enzymen und anderem Verbrauchsmaterial

Alconox , New York, USA	Alconox®
American National Can , Chicago, USA	Parafilm
Amersham , Braunschweig	Nylontransfermembran Hybond N+, Hybond N-Rundmembranen, Megaprime DNA labelling systems, Redivue [³² P]dCTP
Applied Biosystems , Foster City, California, USA	Taq DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit
BDH Laboratory Supplies , Poole, GB	DPX Einschlußmittel, Gelatine
Becton Dickinson , Europe (Vertrieb Schubert & Weiss, München)	Falcon®-Gefäße, Kanülen, Spritzen
Biozym , Hameln	Kapillarspitzen, PCR-Reaktionsgefäße
Clontech , Heidelberg	Advantage PCR-Pure Kit
Eppendorf , Hamburg	Combitips (div. Größen), Safe-Lock-Reaktionsgefäße (1,5/2,0 ml)
Fresenius AG , Bad Homburg	Ampuwa®-Wasser
GIBCO-BRL , Eggenstein	ART Sterilfilterspitzen, DNA Mass Ladder, 1kb-Ladder, Formamid, 5´-RACE Kit, Restriktionsenzyme incl. 10fach Puffer, RNA-Molekulargewichtsstandard, Superscript RNase H ⁻ Reverse Transcriptase, Zellkulturmedien und Zusätze
Greiner Labortechnik , Frickenhausen	Bakterienkulturschalen, Einmalpipetten
Kodak , New Haven, USA (Vertrieb Sigma, Deisenhofen)	Autradiographie-Emulsion (Typ NTB-2), Entwickler (D-19), Fixierer, Filme (Biomax, X-OMAT)

MERCK , Darmstadt	Bromphenolblau, Borsäure, Calciumchlorid, Chloroform, Eisessig, Ethanol, Formamid, Gelatine, Glukose, Glycerin, Harnstoff, KAISERS Glyceringelatine, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Lithiumchlorid, Magnesiumchlorid, Maleinsäure, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumhydroxyd
MILLIPORE , Neu Isenburg	Ultrafree [®] -MC Filters (NMWL 30,000)
National Diagnostics/Kimberly , Vertrieb Biozym, Hameln	Sequagel [®] -, Accugel [®] -Polyacrylamid-Fertiglösungen
NEN Lifesciences , Boston, USA	Genescreen , Röntgenfilme
Nunc , Wiesbaden	Verbrauchsmaterial aller Art für die ES-Zellkultur
Pharmacia Biotech , Freiburg	Ready To Go [™] T-Primed First-Strand Kit
Promega , Mannheim	Wizard Plus Midiprep DNA Purification System
QIAGEN , Hilden	Plasmid Maxi Kit, RNeasy Kit
Roche , Mannheim	-Digixigeninantikörper, Blockierungsreagenz, DNA-Molekulargewichtsstandards, dNTPs, NTPs, Dig-11-UTP, DTT, Proteinase K, Restriktionsenzyme incl. 10fach Puffer, Rnase A, T4 DNA-Ligase, T3-, T7-RNA-Polymerase, <i>Taq</i> -Polymerase,
Roth , Karlsruhe	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1), Trockenperlen, Rotiszint -Szintillationslösung, X-Gal
Sarstedt , Nümbrecht	Pipettenspitzen
Schleicher & Schüll , Dassel	Faltenfilter, Polytrap-Papier
SERVA , Heidelberg	Ammoniumperoxodisulfat (APS), Cäsiumchlorid, Ethylendiamintetraacetat Na ₂ -Salz (EDTA), Natriumdodekylsulfat (SDS), RNAsin, Trishydroxymethyl-aminoethan (Tris)
Sigma , Deisenhofen	Alcianblau, Alizarinrot, Amberlite [®] , Ampicillin (Na-Salz), BSA, DMSO, EDTA, Ethyldiombromid,

	Monoclonal α -Neurofilament 160 (Clone NN18), MOPS, Natriumazid, PBS (Fertigmischung), PFA, Polyethylenglykol (PEG), SDS, Thesit
Stratagene , Heidelberg	<i>TaqPlus</i> Long PCR System, p-Bluescript II KS+ -DASH II, FLASH [®] Chemiluminescent Gene Mapping Kit
Whatman , Maidstone, GB	3MM-Filterpapier

2.3 Zusammensetzung der Reagenzien, Puffer und Stammlösungen

2.3.1 Molekularbiologie

Acetat-Lösung (Lös. III): (Für alkalische Lyse)	3 M Kaliumacetat 11,5% Eisessig
Assay-Puffer: (für Restriktionskartierung)	10 mM Diethanolamin 1 mM MgCl ₂ mit HCl auf pH 10,0 eingestellt
10 × dNTP-Mix:	2 mM Desoxyadenosintriphosphat (dATP) 2 mM Desoxycytosintriphosphat (dCTP) 2 mM Desoxyguanintriphosphat (dGTP) 2 mM Desoxythymidintriphosphat (dTTP)
Denaturierungslösung:	0,5 N NaOH 1,5 M NaCl
Depurinierungslösung:	0,2 N HCl
Formamid-Ladepuffer:	90% Formamid 50 mM EDTA deionisiert
Glukose-Lösung: (für alkalische Lyse)	25 mM Tris (pH 8,0) 10 mM EDTA 1% Glukose
Hybridisierungslösung: (für BAC-Bibliothek)	0,5 M Natriumphosphat (pH 7,0) 7% SDS

Hybridisierungslösung: (für Phagen-Bibliothek)	15% Formamid 7% SDS 1% BSA 0,5 M Natriumphosphat (pH 7,0) 0,1 M EDTA (pH 8,0)
Hybridisierungslösung: (für Kolonienhybridisierung)	7 % SDS 0,5 M Natriumphosphat (pH 7,0) 1 mM EDTA (pH 8,0)
5 × Ladepuffer:	50% Glycerin 0,01% Bromphenolblau
LB-Medium:	1% Bakto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 0,5% Natriumchlorid mit HCl auf pH 7,2 eingestellt
Lysispuffer: (für Gewebe)	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM EDTA 50 mM NaCl 0,5% SDS
Lysispuffer: (für ES-Zellen)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 10 mM NaCl 0,5% N-Lauroylsarcosyn
MOPS-Puffer:	0,4 M MOPS 0,1 M Natriumacetat 10 mM EDTA mit NaOH auf pH 7 einstellen
NaOH/SDS-Lösung: (für alkalische Lyse)	0,2 N Natronlauge 1% SDS
Neutralisierungslösung:	0,5 M Tris-HCl (pH 7,2) 1,5 M NaCl
Phenol/Chloroform/ Isoamylalkkohol:	25 Volumen Phenollösung (70 mM Phenol in TE-Puffer + 0,25 g Hydroxycholin) 24 Volumen Chloroform 1 Volumen Isoamylalkkohol

Polyacrylamid-Lösung für 10%ige Gele:	25% Accugel-Polyacrylamid-Fertiglösung (40%ig) (Acrylamid:Bisacrylamid 29:1) 10% 10 × TBE-Puffer 15% Glycerin
RF1-Lösung:	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 15% Glycerol mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt, sterilfiltriert
RF2-Lösung:	10 mM 3-(N-Morpholino)propansulfansäure (MOPS) 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15 % Glycerol mit NaOH auf pH 6,8 eingestellt, sterilfiltriert
20 × SSC-Puffer:	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
50 × TAE-Puffer:	2 M Tris-Base 1 M Natriumacetat 50 mM EDTA
10 × <i>Taq</i>-PCR-Puffer: (für Genotypisierung)	100 mM Tris-HCl (pH 8,4) 15 mM MgCl ₂ 500 mM KCl
10 × <i>Taq</i>-PCR-Puffer: (für 5´-RACE)	300 mM Tricin (pH 8,4) 20 mM MgCl ₂ 50 mM β-Mercaptoethanol 0,1% Gelatine 1% Thesit
10 × TBE-Puffer:	1 mM Tris-Base 0,83 mM Borsäure 20 mM EDTA
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0)

Top-Agar:	LB-Medium 0,7 % Bacto-Agar 10 mM MgSO ₄
TSS-Lösung:	LB-Medium 10% Polyethylenglykol 5% Dimethylsulfoxid 50 mM MgSO ₄
Wasch-Puffer 1: (für Restriktionskartierung)	2 × SSC 1% SDS
Wasch-Puffer 2: (für Restriktionskartierung)	2 × SSC 1% Triton X-100
X-Gal-Lösung:	20 mg/ml in deionisiertem N,-N-Dimethylformamid

2.3.2 Histologie

PBS:	120 mM NaCl 2,7 mM KCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄ ergibt pH 7,4
Kresylviolett-Lösung:	2,5 g Kresylviolett 0,102 g Natriumacetat 1,55 ml Eisessig mit Wasser auf 500 ml auffüllen

2.3.2.1 Färbungen mit Fusionsproteinen alkalischer Phosphatase

Fixierlösung:	60% Aceton 3,7% Formaldehyd 20 mM Hepes (pH 7,0) in HBS-Puffer
HBHA-Puffer:	HBSS-Medium 0,5 mg/ml BSA 0,1% NaN ₃

HBS-Puffer: 150 mM NaCl
20 mM Hepes (pH 7,0)

HBSS-Medium: 5,4 mM KCl
0,45 mM KH_2PO_4
137 mM NaCl
4,2 mM NaHCO_3
0,34 mM Na_2HPO_4
0,1% D-Glukose
0,001% Phenolrot

2.3.2.2 *In situ*-Hybridisierung

Hybridisierungslösung: 50% Formamid
(Für Ganzkörperpräparate) 5 × SSC (pH 4.5)
50 µg/ml tRNA
50 µg/ml Heparin
1% SDS
0.1% CHAPS

Hybridisierungslösung: 50% Formamid
(Für Schnitte) 20 mM Tris-HCl (pH 8,0)
300 mM NaCl
5 mM EDTA (pH 8,0)
10% Dextransulfat
0.02% Ficoll 400
0.02% Polyvinylpyrrolidone
0.02% BSA
0,5 mg/ml tRNA
0,2 mg/ml Blockade-DNA
200 mM DTT

NTE-Puffer: 500 mM NaCl
10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
5 mM EDTA

Waschlösung 1: 50% Formamid
5 × SSC (pH 4,5)
1% SDS
0.1% CHAPS

Waschlösung 2:	500 mM NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 0.1% Tween-20 0.1% CHAPS
Waschlösung 3:	50% Formamid 2 × SSC (pH 4,5)
MAB-Puffer:	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5 mit NaOH eingestellt
NTM-Puffer:	100 mM NaCl 100 mM Tris-HCl (pH 9,5) 50 mM MgCl ₂

2.3.2.3 Immunhistochemische Färbungen

10 × TBS:	138 mM NaCl 2.5 mM KCl 250 mM Tris-HCl (pH 7,5)
------------------	---

2.3.2.4 X-Gal-Färbung

Fixierlösung:	2% Paraformaldehyd 0,2% Glutaraldehyd 2 mM MgCl ₂ 5 mM EGTA
0,1 M Phosphat-Puffer:	77 mM Na ₂ HPO ₄ 23 mM NaH ₂ PO ₄ ergibt pH 7,3
Wasch-Puffer:	0,1 Phosphat-Puffer (pH 7,3) 2 mM MgCl ₂ 0,02% Nonidet-P40
X-Gal-Färbelösung:	1 mg/ml X-Gal 5 mM Kaliumferrocyanid 5 mM Kaliumferricyanid in Wasch-Puffer

2.3.2.5 Skelettfärbung

Alcianblau-Lösung:	0,3% Alcianblau in 70% EtOH
Alizarinrot-Lösung:	0,1% Alizarinrot in 95% EtOH
Färbelösung:	5% Alcian blau-Lösung 5% Alizarin rot-Lösung 5% Essigsäure in EtOH
Mazerierungslösung:	20% Glycerin 1% KOH

2.3.3 ES-Zell-Kultur

ES-Zellen-Medium:	13% Fötale Kälber Serum (FKS) 2 mM L-Glutamin 0,1 mM β -Mercaptoethanol 1.500 U/ml m-LIF in DMEM
Feeder-Medium:	10% Fötale Kälber Serum (FKS) 2 mM L-Glutamin 2 mM nicht-essentielle Aminosäuren in DMEM
2 × Einfriermedium:	50% Fötale Kälber Serum 30 % ES-Zellen-Medium 20 % Dimethylsulfoxid

2.4 Oligonukleotidprimer

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden in der Arbeitsgruppe Biologische Datenverarbeitung (AG BIODV) der GSF von Herrn Utz Linzner mit einem Applied Biosystems 394 DNA/RNA Synthesizer hergestellt. Die Oligonukleotide wurden lyophilisiert erhalten und zur Konzentrationsbestimmung sowie weiterer Verdünnung 15 min bei 50 °C in 400 μ l Wasser gelöst. Die Konzentration wurde über die Absorption bei 260 nm gemessen. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm (OD_{260}) entspricht für einzelsträngige Oligonukleotide ca. 20 μ g/ml (SAMBROOK *et al.*, 1989). Um die Konzentrationsbestimmung zusätzlich intern zu standardisieren, wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt. Lag das Verhältnis OD_{260}/OD_{280}

über 1,8 - was immer der Fall war - wurde der Wert der OD₂₆₀-Messung zur Konzentrationsberechnung übernommen (OD₂₆₀ · 20 · Verdünnungsfaktor). Nach Bestimmung der Konzentration wurden 100 µl-Aliquots von 10 pmol/µl angelegt, die für die PCR-Amplifikationen verwendet wurden. Für die Sequenzreaktionen wurden Aliquots mit einer Konzentration von 3,2 pmol/µl angelegt. Diese Aliquots wurden ebenso wie die Stocklösungen bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Alternativ zu den Oligonukleotiden, die von der GSF erhalten wurden, wurden lyophilisierte und entsalzte, in einer 0,02 µmol Synthese hergestellte, Oligonukleotide der Firma Metabion verwendet, die in einer Konzentration von 100 pmol/µl als Stocks angelegt wurden. Die Schmelztemperaturen der Primer wurden mit dem Oligo-Editor Programm berechnet (AG BIODV).

2.5 Plasmid-DNA-Klone zur Herstellung von cRNA-Sonden

Für die *in situ*-Hybridisierungen wurden Sonden verwendet, die aus folgenden tabellarisch aufgelisteten Plasmiden über *in vitro*-Transkription hergestellt wurden.

Gen	DNA-Insertgröße [bp]	Restriktionsenzym und RNA-Polymerase für Sonden-RNA (<i>antisense</i>)	zur Verfügung gestellt von (Referenz)
<i>Ephrin-A2</i>	601	<i>EcoRI</i> /T3	Dr. Uwe Drescher (persönliche Mitteilung)
<i>Ephrin-A3</i>	395	<i>BamHI</i> /T3	Dr. Uwe Drescher (persönliche Mitteilung)
<i>Ephrin-A4</i>	513	<i>BamHI</i> /T3	Dr. Uwe Drescher (persönliche Mitteilung)
<i>Ephrin-A5</i>	928	<i>SalI</i> /T7	Dr. Uwe Drescher (ZARBALIS und WURST, 2000)
<i>EphA4</i>	1182	<i>XhoI</i> /T7	Dr. Uwe Drescher (persönliche Mitteilung)
<i>EphA6</i>	541	<i>BamHI</i> /T3	Dr. Uwe Drescher (persönliche Mitteilung)
<i>En2</i>	ca. 800	<i>ClaI</i> /T7	Dr. Alexandra Joyner (JOYNER und MARTIN, 1987)
<i>Pax2</i>	ca. 500	<i>BamHI</i> /T3	Dr. Peter Gruss (persönliche Mitteilung)

In situ-Hybridisierungen mit dem jeweils kodierenden Strang der aufgelisteten Sonden führten zu keinerlei unspezifischem Hintergrund mit Ausnahme der *Ephrin-A5*-Sonde, die in der Pyramidenzellschicht des Hippocampus zu unspezifischen Signalen führt.

2.6 Verwendete Tiere - Haltung

Zur Gewinnung von Embryonen für die *in situ*-Hybridisierungen wurden, sofern die Studien nicht an entsprechenden Mutanten durchgeführt wurden, Mäuse des Stammes C3H nach natürlicher Verpaarung verwendet.

Für die Gewinnung von Blastocysten (E 3,5) wurden Weibchen des Stammes C57BL/6 nach hormoneller Behandlung zur Superovulation verwendet. Die Superovulation dient der Erhöhung der Anzahl an ovulierten Eizellen und erfolgt durch die Behandlung der Weibchen mit Analoga der gonadotropen Hormone follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH). Dadurch erhält man pro Tier mehr Eizellen, wodurch die Anzahl der verwendeten Spendertiere minimiert werden kann. Die Applikation der Hormone erfolgte durch intraperitoneale Injektion und begann stets um 15 Uhr mit einer Dosis von 7,5 I.E. *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (PMSG, Intervet), um die Reifung der Follikel zu induzieren. 48 Stunden später, wurden die Spender-Weibchen mit 7,5 I.E. humanem Chorion-Gonadotropin (hCG/Ovogest, Intervet) behandelt. Durch die Gabe von hCG sollte die Ovulation der Eizellen erreicht werden. Die mit PMSG und hCG behandelten Weibchen wurden einzeln mit einem Männchen des gleichen Stammes verpaart. Am nächsten Tag wurde geprüft, ob die Weibchen von den Männchen gedeckt wurden. Dies konnte man anhand eines die Vagina verschließenden, festsitzenden weiblichen Pfropfes aus geronnenem Sekret, welches ein Produkt der beiden vorderen Prostataloben ist, erkennen. Als Ammen-Mütter dienten pseudoträchtige Weibchen des Stammes CD-1. Zur Einleitung einer Scheinschwangerschaft wurden die Weibchen mit sterilen CD-1-Männchen, die nach HOGAN *et al.* (1994) vasktomiert wurden, verpaart. Für die Rückkreuzung der Chimären wurden Mäuse des Stammes C57BL/6 verwendet.

Alle Mäuse stammen aus den Beständen der GSF-Tierhaltung, wo sie in einem geschlossenen System, unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen, gemäß den Bestimmungen der Tierschutzverordnung gehalten und gezüchtet werden. Futter und Wasser standen den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung. Die Temperatur betrug 22 ± 2 °C und die relative Luftfeuchtigkeit $55 \pm 5\%$. Eine automatische Zeitschaltuhr regelte die Tag- und Nachtphasen, die jeweils 12 Stunden betragen. Die Hellphase dauerte von 6 bis 18 Uhr.

Mäuse aus der Mutantenzucht wurden drei Wochen nach der Geburt von den Eltern abgesetzt und nach Geschlecht getrennt. Die Markierung der Mäuse erfolgte durch Ohrlochung, was eine Numerierung von 1 bis 99 erlaubte.

2.7 Bestimmung embryonaler Stadien

Sowohl der Kopulationszeitpunkt als auch das Entwicklungstempo einzelner Embryonen innerhalb eines Wurfes können variieren (KAUFMAN, 1992). Um die ausgesprochen dynamisch verlaufende *Ephrin-A5*-Expression möglichst präzise mit bestimmten Entwicklungsstadien zu assoziieren, werden die Altersangaben sowohl als embryonale Tage (E) als auch genauer in Theiler-Stadien (TS) angegeben (THEILER, 1989; RUGH, 1990; KAUFMAN, 1992). Wann immer Vergleiche von Genexpressionsmustern durchgeführt wurden, wurde darauf geachtet

möglichst gleichdatierte Föten zu verwenden. Die vorwiegend untersuchten Entwicklungsstadien vom Beginn der Gastrulation bis zur frühen Organogenese (TS9 - TS21) sind in der folgenden Tabelle kurz beschrieben.

Tabelle 2.1 Die Theiler-Stadien der Embryonalentwicklung der Maus.

Theiler-Stadium	nominelles Alter (E)	Anzahl der Somiten	Beschreibung
TS9	6,5	-	Bildung des Mesoderms
TS10	7	-	Bildung von Amnion, Allantois und Primitivgrube
TS11	7,5	-	Bildung der Neuralplatte, Präsomitenstadium
TS12	8 - 8,5	1 - 7	Erste Somiten werden sichtbar, die Neuralfalten beginnen sich in der occipital/cervicalen Region zu schließen
TS13	8,5 - 9,0	8 - 14	Drehung des Embryos, 2 Branchialbögen
TS14	9,0 - 9,5	13 - 20	Erhebung der Kopffalten, Formierung des anterioren Neuroporus, optische Erhebung um die Augenanlage wird deutlich
TS15	9,5 - 10,25	21 - 29	Vorderbeinknospen deutlich zu erkennen, 3 Branchialbögen, maxillärer Anteil des ersten Branchialbogens knickt nach vorne um, deutlich erkennbarer dritter Branchialbogen wird bereits vom zweiten überwachsen, Formierung des posterioren Neuroporus, dorsale Einschnürung des Diencephalons erscheint und Telencephalonventrikel wird deutlich
TS16	10,25 - 10,75	30 - 34	die Hinterbeinknospen sowie die Schwanzknospe werden sichtbar, 4 Branchialbögen, Schließung des posterioren Neuroporus, Ohrbläschen werden sichtbar
TS17		35 - 39	Extremitätenknospen sehr prominent, caudale Branchialbögen deutlich zu erkennen, Linse scharf abgegrenzt
TS18	11,0 - 11,5	40 - 44	Rückenlinie beschreibt oft ebenmäßige Parabel, Extremitätenknospen distal abgeflacht, die Untergliederung des Gehirns in seine einzelnen Abschnitte ist deutlich zu erkennen
TS19	11,5 - 12,0	43 - 48	Rückenlinie beschreibt oft weiterhin eine ebenmäßige Parabel, Extremitätenknospe distal vieleckig, alle Gehirnteile noch deutlich zu erkennen, in der Thorakalregion beginnt die Fötalentwicklung
TS20	12,0 - 12,5	48 - 52	Einbuchtungen der Finger werden sichtbar, Gehirnteile weniger deutlich unterscheidbar, viertes Ventrikel beginnt mit seiner Zusammenfaltung, Fötalentwicklung erreicht den Schwanz
TS21	12,5 - 13,0	52 - 55	Fötalentwicklung im ganzen Körper

2.8 Isolierung genomischer DNA

2.8.1 Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe

Die Präparation genomischer DNA erfolgte in erster Linie zur Genotypisierung der Mäuse und wurde daher in den meisten Fällen aus einem ca. 0,5 - 1 cm langem Schwanzstück der Tiere isoliert. Zur Genotypisierung von Embryonen, wurde die DNA bei frühen Stadien (bis E 12,5) aus dem Amnion isoliert, bei älteren Stadien hingegen ebenfalls aus einem Stück des

Schwanzes.

Das Gewebe wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 - 500 μ l Lysis-Puffer überschichtet dem 1 mg/ml Proteinase K zugefügt wurde. Dieser Ansatz wurde über Nacht (ü.N.) bei 52 °C inkubiert. Eventuell noch vorhandene Proteinreste (Proteinase K verdaut sich weitgehend selbst) wurden nur bei den 500 μ l-Ansätzen mit einem äquivalenten Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) durch vorsichtiges Schwenken für 1 h extrahiert. Die Trennung der wäßrigen Phase von der organischen erfolgte durch Zentrifugieren bei 4.000 \times g für 7 min. Durch Hinzugabe des Kunstwachses Phase Lock Gel (5 Prime-3 Prime, Inc., Kat.-Nr.: pl-429220) wurden die Phasen isoliert. Die DNA wurde aus der wässrigen Phase mit dem 0,6fachen Volumen an Isopropanol gefällt, durch 10minütige Zentrifugation bei 13.000 \times g präzipitiert und nach Dekantieren des Überstandes mit 70% EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen bei RT wurde das Präzipitat in 50 - 100 μ l TE-Puffer oder Wasser aufgenommen, dann, um die DNA wieder in Lösung zu bringen ü.N. bei 50 °C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.8.2 Isolierung von genomischer DNA aus Zellen

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS ein- bis zweimal gewaschen und mit Lysispuffer, der 1 mg/ml Proteinase K enthielt, bedeckt. Die Zellkulturschale wurde im Anschluß mit Parafilm an der Kante umhüllt, in eine feuchte Kammer gegeben und ü.N. bei 52 °C inkubiert. Nach Abschluß der Lyse wurde die DNA mit dem doppelten Vol. kaltem EtOH, dem 75 mM NaCl zugegeben wurden, präzipitiert und dreimal mit 70% EtOH gewaschen. Die getrocknete DNA wurde in einem geeigneten Volumen TE-Puffer gelöst.

2.9 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von RNA aus Zellen oder Gewebe wurde der RNeasy Kit von QIAGEN (Kat.-Nr. 74104) verwendet. Die Methode basiert auf der mechanischen und chemischen Lyse der Zellen bzw. Gewebe in Guanidinium Isothiocyanat-Puffer (CHOMCZYNSKY und SACCHI, 1987). Das dafür verwendete Dispergiergerät führt durch seine schnelle Rotation zusätzlich zur Scherung der genomischen DNA. Das Gewebe oder vereinzelte und präzipitierte Zellen wurden nach vorherigem Schockgefrieren für 30 - 120 s bis zum Erhalt eines klaren Lysats dispergiert. Das Lysat wurde im Anschluß auf die dem Kit beigegebenen Säulen appliziert, an die die RNA ab einer Größe von 200 b selektiv bindet. Kontaminierende Komponenten wurden durch zweimaliges Waschen entfernt und die RNA abschließend mit Wasser eluiert. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch über die OD_{260} . Bei RNA entspricht eine Absorptionseinheit bei 260 nm (OD_{260}) 40 μ g/ml (SAMBROOK *et al.*, 1989). RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -140 °C aufbewahrt.

2.10 Gel-Elektrophorese

2.10.1 DNA-Gel-Elektrophorese

Je nach Größe der elektrophoretisch aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,7 - 2%ige Agarosegele oder 10%ige Polyacrylamidgele verwendet. Je kleiner die erwarteten Fragmente, desto höherprozentig waren die eingesetzten Gele. Agarosegele wurden durch Einwiegen von Agarose in TAE- bzw. TBE-Puffer und Auflösen in einem Mikrowellengerät hergestellt. Danach wurde die noch flüssige, mit 20 - 100 ng/ml Ethydiumbromid (EtBr) versetzte Lösung in eine vorbereitete Kunststoffschale gegossen, wo sie durch Abkühlung zum Gel erstarrte. Bei Polyacrylamidgelen wurden 10 ml einer 10%igen Stammlösung mit 100 μ l APS und 10 μ l TEMED versetzt und zur Polymerisation zwischen zwei senkrecht aufgestellte Platten gegossen. Die Färbung mit EtBr erfolgte erst nach Abschluß der Elektrophorese.

PCR-Reaktionen wie auch Restriktionsverdauungen wurden mit 5 \times Ladepuffer versetzt und in einem Agarosegel bzw. einem 10%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die für die Elektrophorese eingesetzten Puffer waren TAE für Agarosegele und TBE für Polyacrylamidgele.

Die elektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde durch UV-Illumination sichtbar gemacht. Das eingesetzte UV-Licht von 305 nm regt das Ethydiumbromid zu einem orangenen Leuchten an (590 nm) und macht somit die DNA-Banden sichtbar, in die es interkaliert hat. Die Nachweisgrenze einer scharfen Bande liegt mit dieser Methode bei ca. 5 bis 10 ng DNA. Die Gele wurden mit einer Videokamera aufgenommen und zur Dokumentation fotografiert.

2.10.2 Denaturierende RNA-Gel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Agarose-Gelen. Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose in Wasser bis zur Auflösung gekocht und nach Abkühlung auf ca. 60 °C mit 0,1 Vol. 10 \times MOPS-Puffer und Formaldehyd bis zu einer finalen Konzentration von 2 M versetzt. Der Laufpuffer bestand aus 0,1 Vol. 10 \times MOPS-Puffer und 0,5 M Formaldehyd.

Proben (10 - 20 μ g) wurden mit Denaturierungspuffer versetzt, 5 min auf 70 °C erhitzt, auf Eis rasch abgekühlt und anschließend aufgetragen. Gesamt-RNA wurde in 1 - 1,2%igen Gelen bei 2 - 2,5 V/cm aufgetrennt.

2.11 Transfertechniken

2.11.1 Southern-Blotting

Mit Hilfe des Southern-Transfers (SOUTHERN, 1975) wurden in Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf Nylonmembranen übertragen und immobilisiert. Nach der

Horizontal-Gelelektrophorese wurde die doppelsträngige DNA für ca. 10 min schwenkend mit Depurinierungslösung behandelt, um sie begrenzt zu fragmentieren. Die Depurinierung wurde nur eingesetzt, wenn einzelne Fragmente eine Größe von mehr als 7 oder 8 kbp erreichten. Im Anschluß wurde zweimal für 20 min in Denaturierungslösung geschwenkt und abschließend 30 min in Neutralisierungslösung. Das Gel wurde dann auf Whatman 3MM-Filterpapier (Kat.-Nr.: 3030 917) gelegt, dessen Enden in $10 \times$ SSC eintauchten, und mit Plastikfolie umgrenzt, um einen Flüssigkeitsdurchfluß nur durch das Gel zu erlauben. Auf das Gel wurden in gleicher Größe eine Nylonmembran (GeneScreen, NEN, Kat.-Nr.: NEF-972) und zwei Filterpapiere, die ebenfalls in $10 \times$ SSC getränkt waren, luftblasenfrei gelegt. Darüber wurden mehrere Lagen (ca. 5 cm) trockenen Papiers gelegt und der ganze Aufbau mit einem ca. 500 g schweren Gewicht beschwert. Während einer Transferzeit von 12 - 24 h wird die $10 \times$ SSC-Lösung durch das Gel über Kapillarkräfte in die trockenen Papiertücher gesogen, wobei die DNA mittransportiert wird und an der Membran haften bleibt (Kapillartransfer). Nach dem Transfer wurde der Filter in $2 \times$ SSC gespült und anschließend um die DNA kovalent an die Membran zu binden mit 120 mJ UV-Licht (254 nm) bestrahlt (*crosslinking*). So hergestellte Membranen wurden bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.11.2 Northern-Blotting

Das Northern-Blotting zum Transfer und zur Immobilisierung von RNA auf Nylonfiltern wurde mit folgenden Modifikationen analog zum Southern-Blotting durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA-Fragmente erfolgte unter denaturierenden Bedingungen wie in 2.9.2 beschrieben. Nach der Elektrophorese wurde das Gel dreimal in DEPC-Wasser geschwenkt, um das Formaldehyd zu entfernen. Der Transfer erfolgte mit $20 \times$ SSC, das mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt wurde. Die kovalente Verbindung der RNA mit der Nylonmembran (Hybond N+, Amersham, Kat.-Nr.: RPN 203B) erfolgte durch Bestrahlung mit 70 mJ UV-Licht (254 nm). RNA-Längenstandard enthaltende Spuren wurden vom Filter abgeschnitten, die RNA für 15 min mit 5% Essigsäure auf der Membran fixiert und 10 min in Methyleneblaulösung angefärbt. Die Filter wurden unter fließendem Wasser entfärbt, luftgetrocknet und nach der Autoradiographie zur Evaluierung des Molekulargewichts hybridisierender Banden herangezogen.

2.12 Hybridisierung mit ^{32}P -markierten DNA-Sonden

Nach Waschen der Nylonfilter in Wasser wurden sie noch feucht entweder in Hybridisierungsröhren (rechteckige Filter) oder in bakteriellen Kulturschalen (Rundfilter) mit einem adäquaten Volumen an Hybridisierungspuffer benetzt. Die Hybridisierung der genomischen Bibliothek bzw. die Kolonienhybridisierung erfolgte mit den angegebenen Hybridisierungslösungen (s. 2.3.1). Für die Southern- bzw. Northern-Blot-Analyse wurden QuickHyb - (Stratagene, Kat.-Nr.: 201220) und Rapid-hyb- (Amersham, Kat.-Nr.: RPN 1635) Fertiglösungen verwendet. Unter der für jede Sonde empirisch optimierten

Hybridisierungstemperatur wurde mit den unter 2.1.1 angegebenen Hybridisierungslösungen für mindestens 1 h prähybridisiert und 4 - 16 h hybridisiert. Das Wegwaschen ungebundener Probe wurde in 150 mM Natriumphosphat (pH 7,0)/0,1% SDS (genomische Phagen-Bibliothek) bzw. 2 - 0,1 × SSC/0,1% SDS (genomische BAC-Bibliothek) durchgeführt. Das Waschen nach der Kolonienhybridisierung wurde in 40 mM Natriumphosphat (pH 7,0)/1% SDS durchgeführt. Die Waschttemperaturen lagen bei 40 - 60 °C. Mit QuickHyb und Rapid-hyb wurde für 30 min prähybridisiert und 1 - 2 h hybridisiert. Anschließend wurde in 0,1 × SSC/0,1% SDS bei 50 - 65 °C gewaschen.

2.13 Autoradiographie

Hybridisierte Filter wurden nach dem Waschen leicht getrocknet und anschließend in Folie verschweißt. Die so verpackten Filter wurden auf eine Unterlage aufgeklebt und bei Rotlicht in der Dunkelkammer mit einem Reflection -Röntgenfilm (NEN, Kat.-Nr.: NEF-495/496) in eine Autoradiographiekassette mit Reflection -Intensivierungsfolie (NEN, Kat.-Nr.: NEF-490/491) gelegt. Die Expositionszeit bei -80 °C richtete sich nach der Intensität der Signale und betrug zumeist zwischen 12 Stunden und 4 Tagen. Die Expositionszeit für einen genomischen Southern-Blott betrug typischerweise 16 - 20 h, für einen Northern-Blott 3 - 4 Tage. Intensive Hybridisierungssignale von transferierter Plasmid-DNA konnten üblicherweise schon nach einigen Minuten bis wenigen Stunden Exposition bei RT erzielt werden. Nach Ablauf der Expositionszeit wurden die Filme nach Herstellerangaben entwickelt.

2.14 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Subklonierung von DNA-Fragmenten und zur Herstellung von Sonden für die Markierung mit ³²P wurden die entsprechenden Produkte aus Restriktionsverdau oder PCR-Amplifikationen in TAE-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Abschluß der Elektrophorese wurde das Gel dokumentiert und unter Bestrahlung mit einer langwelligen UV-Lichtquelle Agarosestücke, die die ausgewählten Fragmente enthielten, mit einem sterilen Messer aus dem Gel herausgeschnitten. Die Agaroseblöcke wurden bei 50 - 55 °C unter Verwendung und nach Anleitung des Advantage PCR-Pure Kits (Clontech Kat.-Nr.: K-1111-1) aufgelöst und die DNA an Glasmilch gebunden. Nach einmaligem Waschen wurde die präzipitierte Glasmilch getrocknet und anschließend die DNA bei 37 °C in 20 - 50 µl Wasser eluiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Teil des Eluats einer Elektrophorese unterzogen und die DNA-Menge über direkten Vergleich mit einem parallel aufgetragenen DNA-Größen- und Mengen-Standard (Low DNA Mass Ladder, GibcoBRL, Kat.-Nr.: 10068-013) bestimmt.

2.15 Molekulare Klonierungen

2.15.1 Ligationsreaktionen

Der Einbau von zumeist aufgereinigten PCR-Produkten, Restriktionsfragmenten oder synthetisch hergestellten Oligonukleotiden in Vektoren erfolgte unter Verwendung rekombinanter Phagen-T4-Ligase. Plasmid-Vektor und Insert wurden in einem Gewichts-Verhältnis von 1 : 1 bis 1 : 3 eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte dann ü.N. bei 16 °C in einem 20 µl-Ansatz, dem 5 U T4 DNA-Ligase (Roche, Kat.-Nr.: 799009) zugegeben wurden. Die Gesamtmengen an eingesetzter DNA betragen 0,1 - 1 µg.

2.15.2 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

100 ml Luria Broth (LB)-Medium wurden mit 1 ml einer frischen ü.N.-Kultur von *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5⁻ Bakterien (HANAHAH, 1985) angeimpft und bei 37 °C und 175 U/min geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,4 erreicht war. Die Zellen wurden dann bei 4 °C und 1000 ×g für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Behandlung auf Eis gestellt. Kompetente Zellen wurden im folgenden nach zwei Methoden hergestellt, der Rubidiumchlorid-Methode (HANAHAH, 1983) und der TSS-Methode (CHUNG *et al.*, 1989).

Für die Rubidiumchloridmethode wurden die Zellen in 33 ml eiskaltem RF1-Puffer resuspendiert, für 15 min auf Eis inkubiert und erneut bei 4 °C und 1000 ×g präzipitiert. Anschließend wurden die Bakterien in 8 ml eiskaltem RF2-Puffer resuspendiert und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden nach dieser letzten Behandlung entweder direkt für die Transformation verwendet oder als 200 µl Aliquots in 1,5 ml-Reaktionsgefäße abgefüllt und schockgefroren. Dazu wurden die Reaktionsgefäße in mit Methanol überschichtetes Trockeneis gestellt (-80 °C).

Für die TSS-Methode wurden die Bakterien vorsichtig in 10 ml eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert und entweder direkt für die Transformation verwendet oder wie für die Rubidiumchloridmethode beschrieben, aliquotiert und schockgefroren. Die Lagerung kompetenter Zellen erfolgte bei -80 °C.

2.15.3 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Hierfür wurden 200 µl kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, unter vorsichtigem Rühren mit 2 - 20 µl eines Ligationsansatzes (10 ng - 1 µg DNA) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen für 90 s in einen auf 42 °C eingestellten Heizblock gestellt und anschließend mit 800 µl LB-Medium aufgefüllt. Daraufhin wurden die Bakterien für 20 - 30 min bei 37 °C geschüttelt und anschließend bis zu 200 µl dieser Suspension auf 100 µg/ml Ampicillin enthaltende LB-Agar-Platten verteilt. Die Platten wurden vorher für ca. 30 min bei 37 °C oder unter dem Luftstrom einer Sterillbank getrocknet. War es möglich, auf

die Unterbrechung des *lacZ*-Gens im Vektor zu testen, so wurden zusätzlich 50 μ l X-Gal-Lösung auf der Plattenoberfläche verteilt. Nach der ü.N.-Inkubation bei 37 °C wurde blau-weiß-selektiert. Dazu wurde die Farbentwicklung bei 4 °C für ca. 1 h intensiviert und weiße Kolonien, da nur Plasmide dieser Zellen ein unterbrochenes *lacZ*-Gen enthalten, selektiert um weiter charakterisiert zu werden.

2.15.4 Plasmidisolierung aus transformierten Bakterien (Minipräparation)

Das eingesetzte Verfahren der alkalischen Lyse (BIRNBOIM und DOLY, 1979) beginnt mit der ü.N.-Kultivierung der nach entsprechenden Auswahlverfahren positiven Klone in einem Volumen von 3 ml LB-Amp-Flüssigmedium (100 μ g/ml Ampicillin). Die Kultivierung erfolgte in einem Drehrad bei 37 °C und 220 U/min. Je 2 ml der Bakterienkultur wurden am nächsten Tag in ein entsprechendes Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien bei 13.000 \times g für 1 min aus der Suspension abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Bakterienpellet in 100 μ l kalter GET-Lösung resuspendiert. Zur Suspension wurden 200 μ l NaOH/SDS-Lösung gegeben und nach vorsichtigem Schwenken für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 150 μ l Acetat-Lösung hinzugegeben und die Reaktionen nach vorsichtigem Durchmischen für 5 min auf Eis gestellt.

Die Reaktionen wurden bei 13.000 \times g für 5 min zentrifugiert und danach der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Zu dieser Lösung wurde 1ml 100% EtOH gegeben, gemischt und für ca. 30 min auf -80 °C gekühlt. Anschließend wurde für 15 min bei 13.000 \times g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Präzipitat wurde unter dem Luftzug eines Abzugs getrocknet und anschließend für 10 min bei 37 °C in 30 - 50 μ l Wasser, dem 20 ng/ml RNase A hinzugegeben wurden, gelöst. 2 - 3 μ l dieser Lösung wurden zur Kontrolle der Ligationsreaktion einem Restriktionsverdau unterzogen, der nach elektrophoretischer Auftrennung ausgewertet wurde.

2.15.5 Plasmidisolierung aus transformierten Bakterien (Maxipräparation)

Plasmide, die dem erwünschten Ergebnis entsprachen, wurden in größerem Maßstab und höherem Reinheitsgrad für Lagerung sowie weitere Anwendungen wie Sequenzierung oder Sondenisolation über Restriktionsverdau isoliert. Dazu wurde der QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Kat.-Nr.: 12163) oder das Wizard *Plus* Midiprep DNA Purification System (Promega, Kat.-Nr.: A 7640) in Kombination mit der Vac-Man -Saugvorrichtung (Promega) auf Grundlage der alkalischen Lyse (BIRNBOIM und DOLY, 1979) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Das verwendete Kulturvolumen betrug 50 - 100 ml. Die Ausbeute betrug zumeist 300 - 500 μ g.

2.16 Isolierung von Klonen aus einer genomischen Phagen-Bibliothek

Genomische Klone, die Teile des *Ephrin-A5*-Locus enthalten, wurden aus einer Bibliothek isoliert, die aus DNA des Maus-Stammes 129/Sv hergestellt wurde. Diese Bibliothek wurde von Dr. A. Reaume (Mount Sinai Hospital, Toronto) hergestellt und uns freundlicherweise von Dr. Janet Rossant zur Verfügung gestellt. Der Vektor dieser Bibliothek ist der Phage DASH II (Stratagene, Kat.-Nr: 247211). Die Inserts klonal isolierter Phagen wurden zumeist mit *NotI* aus dem Vektor isoliert und in das *NotI* vorgeschchnittene Phagemid pBluescript II+ subkloniert.

2.16.1 Anzucht der Wirtsbakterien

Zwei bis drei Kolonien des frisch ausplattierten Wirtsstammes XL1 blue MRA (Stratagene, Kat.-Nr.: 200302) wurden für 8 bis 12 h bei 37 °C in 50 ml mit 10 mM MgCl₂ versetztem LB-Medium schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde daraufhin bei 5000 ×g zentrifugiert und das Bakterienpräzipitat in 25 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Die so behandelten Bakterien wurden bei 4 °C gelagert und bis zu einer Woche verwendet.

2.16.2 Titerbestimmung

Um die optimale Dichte infektiöser Phagen (pfu = *plaque forming units*) auf einer Platte zu erhalten, wurde der aktuelle Titer der Phagensuspension ermittelt. Dazu wurde eine in Zehnerpotenzen abgestufte Verdünnungsreihe an Phagen in Phagenpuffer angelegt und diese ausplattiert. Durch Auszählen der Plaques und unter Berücksichtigung der Verdünnung ergab sich die Konzentration an infektiösen Phagen.

2.16.3 Ausplattieren von Phagen

300 µl an Wirtsbakterien wurden mit dem entsprechenden Volumen an Phagensuspension gemischt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit 3,5 ml Top-Agar für eine 10 cm-Platte bzw. 7 ml Top-Agar für eine 15 cm Platte vermischt und die Suspension über eine auf 37 °C vorgewärmte Platte gegossen und schwenkend verteilt. Nach Antrocknen der Platten wurden sie ü.N. bei 37 °C inkubiert.

2.16.4 Transfer von Phagen-DNA auf Nylonmembranen

Um Klone aus einer Phagenbibliothek isolieren zu können, muß deren DNA zuerst auf Nylonmembranen fixiert werden, um so der Hybridisierung mit der ausgewählten Sonde

zugänglich gemacht zu werden. Das eingesetzte Verfahren entsprach dabei weitgehend dem Protokoll von BENTON und DAVIS (1977). Pro Platte wurde eine Membran (Hybond[®], Amersham, Kat.-Nr.: RPN 82N) hergestellt. Dazu wurde der Filter für 5 min luftblasenfrei auf die Agarplatte gelegt. Die Position der Filter wurde an drei Punkten durch Durchstechen mit einer Kanüle markiert und die Einstichlöcher am Boden der Platte noch zusätzlich mit Farbe gekennzeichnet. Dieses Verfahren soll später ermöglichen, die Position der positiven Klone zu bestimmen. Dazu werden nach der Hybridisierung Platten und Autoradiogramm, auf das ebenfalls die Position der Einstichlöcher übertragen wurde, übereinandergelegt.

Nach Abziehen der Filter von der Platte mit einer Pinzette wurden diese mit der DNA-Seite nach oben für 5 min auf ein mit Denaturierungslösung getränktes Filterpapier gelegt. Anschließend wurden die Filter in der gleichen Weise zweimal für 5 min mit Neutralisierungslösung und zweimal für 5 min mit $2 \times$ SSC behandelt. Durch Reiben zwischen zwei Filterpapieren wurden Agarreste entfernt und die Filter anschließend in einem Stratalinker mit 120 mJ UV-Licht (254 nm) zur Fixierung der DNA bestrahlt.

2.16.5 Gewinnung reiner Phagenklone

Nach der Hybridisierung der Filter mit der ausgewählten Sonde (s. 2.9) und erfolgter Autoradiographie (s. 2.12) wurden Autoradiogramm und Agarplatte übereinstimmend ausgerichtet, der Bereich um einen positiven Klon mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze kreisförmig aus der Platte gestochen (ca. 5 mm) und in 1 ml Phagenpuffer mit einem Tropfen Chloroform aufgenommen. Nach mehrstündigem Schütteln wurde diese Phagensuspension in Zehnerpotenzen verdünnt und die einzelnen Stufen der Verdünnungsreihe für ein erneutes Ausplattieren verwendet. Von den so hergestellten Platten wurden die ausgewählt, deren Dichte an Phagenhöfen es erlaubte, individuelle Klone auszustechen. Von diesen Platten wurden durch Abklatsch ebenfalls Nylonfilter mit immobilisierter Phagen-DNA hergestellt und mit der gleichen Sonde einer Hybridisierung unterzogen. Das Verfahren wurde soweit fortgesetzt, bis Platten hergestellt wurden, bei denen jeder Phagenhof mit einem Hybridisierungssignal auf dem Autoradiogramm korrespondierte. Aus den so hergestellten klonalen Platten wurden mehrere Plaques ausgestochen und in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml Phagenpuffer und 100 μ l Chloroform überführt. So hergestellte klonale Phagensuspensionen wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

2.17 Isolierung von Phagen-DNA

Aus einem Phagenstock wurden je 10 μ l zu 1, 10 und 100 μ l Bakterien-ü.N.-Kultur (10 mM $MgSO_4$) gegeben und 15 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Dieser Ansatz wurde in 10 ml 10 mM $MgSO_4$ enthaltendem LB-Medium verdünnt und ü.N. bei 37 °C und guter Luftzufuhr schüttelnd inkubiert.

Die Lyse der Bakterien wurde anhand der Menge koagulierten Bakteriendebris beurteilt. Um restliche, intakte Bakterien aufzubrechen, wurden 250 μ l Chloroform hinzugefügt

und 10 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde bei 12.000 ×g für 10 min zentrifugiert und der vorsichtig dekantierte Überstand mit 20 µl RNase/DNase (je 10 mg/ml) für 30 min bei RT inkubiert. Nach Hinzufügen von 2 ml SDS-Mix wurde für 30 min bei 70 °C inkubiert, danach auf RT abgekühlt, 2,5 ml 8 M Kaliumacetat hinzugefügt und für 15 min auf Eis gestellt. Im Anschluß wurde bei 12.000 ×g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert, nach Trennen von Präzipitat und Überstand letzteres mit 7 ml Isopropanol versetzt, gut gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Das Gemisch wurde für 30 min bei 4 °C und 12.000 ×g zentrifugiert, das DNA-Pellet zweimal mit 70% EtOH gewaschen und anschließend getrocknet. Das getrocknete Präzipitat wurde in 300 µl TE-Puffer mit 1 mg/ml RNase A resuspendiert und 1 h bei 37 °C restliche RNA verdaut. Nach Hinzufügen von 300 µl 0,3 M Natriumacetat (pH 8,0) wurde zweimal mit Phenol/Chloroform (1:1) sowie zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die DNA wurde mit 0,54 Volumen Isopropanol gefällt, bei 13.000 ×g für 15 min abzentrifugiert, zweimal mit 1 ml 70% EtOH gewaschen und anschließend getrocknet. Die so isolierte und aufgereinigte DNA wurde in 100 µl TE-Puffer gelöst. Die Ausbeute an Phagen-DNA betrug 10 - 100 µg.

2.18 Charakterisierung genomischer Klone

Die Restriktionskartierung der genomischen Klone wurde nach Herstellerangaben mit den im FLASH[®] Chemiluminescent Gene Mapping Kit von Stratagene (Kat.-Nr.: 200381) enthaltenen Puffern und Lösungen durchgeführt. Nach der Exzision der zu analysierenden DNA aus dem Vektor (zumeist mit dem Restriktionsenzym *NotI* durchgeführt) wurde der partielle Verdau in einer steigenden Konzentration von EtBr nach folgendem Schema durchgeführt:

	DNA [µl]	H2O [µl]	Puffer [µl]	Enzym [µl]*	EtBr [µl]**	total [µl]
1	10	16	3	1	0	30
2	10	14	3	1	2	30
3	10	12	3	1	4	30
4	10	10	3	1	6	30
5	10	8	3	1	8	30
6	10	6	3	1	10	30

*2,5 U Enzym ** 0,1 mg/ml

Die Inkubation betrug 1 h bei der für das jeweilige Enzym adäquaten Temperatur. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte in zwei (getrennt für T3 und T7) 0,8%igen Gelen bei 1,2 V/cm. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die EtBr-angefärbten Gele unter UV-Ilumination fotografiert und anschließend nach SOUTHERN (1975) auf Nylonmembranen geblotet. Die DNA wurde durch UV-Licht-Bestrahlung auf Nylonfilter fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Die Hybridisierung der Filter mit den alkalische Phosphatase (AP)-konjugierten T3- und T7-Oligonukleotiden wurde bei 37 °C durchgeführt. Dazu wurden die Filter mit Wasser befeuchtet und 10 min bei 37 °C mit 50 µl Hybridisierungspuffer pro 1 cm² Membran prähybridisiert. Die T3- bzw. T7-Sonde wurde 1:250 in Hybridisierungspuffer gelöst und ebenfalls bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernung des Prähybridisierungspuffers wurde für 30 - 60

min bei 37 °C hybridisiert. Zur Entfernung ungebundener Sonde wurden die Membranen (T3 und T7 separat) in 100 ml, auf 37 °C vorgewärmtem Waschpuffer 1 für 1 min geschwenkt. Daraufhin wurde mit 200 ml frischen vorgewärmtem Waschpuffer 1 für 10 min gewaschen und dann der Waschpuffer 1 durch vorgewärmten Waschpuffer 2 ersetzt, worin weitere 10 min gewaschen wurde. Nach 10minütiger Behandlung mit 2 × SSC bei Raumtemperatur konnte zur Substratreaktion übergegangen werden.

Das Chemolumineszenz-Substrat 3-(4-methoxispiro {1,2-dioxetan-3,2´-(5´chloro)tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl) Phenylphosphat, Dinatriumsalz (CSPD) wurde auf Raumtemperatur erwärmt und das erforderliche Volumen an Substratpuffer vorbereitet (50 µl Substratpuffer pro 1 cm² Membran). Dazu wurden 60 µl CSPD in 10 ml Assaypuffer gelöst. Die Membranen wurden 2 × 5 min in Assaypuffer geschwenkt, anschließend luftblasenfrei mit entsprechendem Volumen an Substratpuffer in Hybridisierungsbeuteln verschweißt und 10 min bei Raumtemperatur unter Bewegung inkubiert. Die Filter wurden anschließend aus den Beuteln genommen, nach Abtropfen der Flüssigkeit in frische Hybridisierungsbeutel gegeben und in eine Filmkassette zusammen mit einem Röntgenfilm gelegt.

2.19 Markierung von DNA- und cRNA-Sonden

2.19.1 Markierung von DNA-Sonden mit ³²P

Zur Markierung von DNA-Sonden für die Hybridisierung mit auf Nylonmembranen immobilisierter Phagen-, Kolonien-, genomischer und Plasmid-DNA sowie mit RNA wurde [³²P]-markiertes dCTP enzymatisch inkorporiert. Für die Markierungsreaktion wurde das Megaprime DNA labelling system (Amersham, Kat.-Nr.: RPN 1604/5/6/7) verwendet.

Je Reaktion wurden 20 - 50 ng der doppelsträngigen Sonde bei 95 °C in Anwesenheit von nonameren Oligonukleotiden mit zufälliger Sequenzabfolge denaturiert. Das rasche Abkühlen auf Eis, nach 3 - 5 min Denaturierung, führte zur bevorzugten Hybridisierung der Sonden-Stränge mit den Nonameren. Ein Gemisch unmarkierter Nukleotide und [³²P]-dCTPs (40 - 50 µCi Aktivität) wurde zur Replikation der getrennten Stränge mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* verwendet.

Die Aufreinigung derartig markierter Sonden, insbesondere die Abtrennung nicht inkorporierter Nukleotide erfolgte über Sephacryl gefüllte MicroSpin S-300 HR-Säulen (Pharmacia Biotech, Kat.-Nr.: 27-5130-01). Diese Säulen garantieren den Verbleib von Nucleinsäuren bis zu einer Größe von 200 bp im Säulenmaterial. Die durch die Säule passierte Flüssigkeit (700 ×g, 2 min) wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen, 1 µl daraus entnommen und die Inkorporationseffizienz durch anschließende Messung überprüft. Dabei traten bei einer bis zu 60%igen Inkorporation üblicherweise Messwerte von 80 - 200 · 10⁵ cpm/µl auf.

2.19.2 Markierung von cRNA-Sonden mit ^{35}S

DNA, aus der über *in vitro*-Transkription markierte cRNA-Sonden (Ribosonden) hergestellt werden sollten, wurde in die multiple Klonierungsstelle von Transkriptionsvektoren ligiert, die über flankierende Promotoren für die RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3, T7 oder SP6 verfügen (DUNN und STUDIER, 1983; KASSAVETIS, 1982). Zur radioaktiven Markierung von Ribosonden wurde [γ -thio ^{35}S]-UTP (NEN, Kat.-Nr.: NEG-039H) verwendet. Dazu wurde 1 μg eines das entsprechende Insert tragenden Vektors über Restriktionsverdau linearisiert (Generierung von *run-off-transcripts*). Nach mehreren Stunden Verdau wurde durch Zugabe von 3 M NaAc (pH 5,4) und 100% EtOH die DNA für ca. 2 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Anschließend wurde durch Zentrifugation bei $13.000 \times g$ die DNA präzipitiert und das Pellet mit 250 μl 70% EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen der DNA wurde in folgendem Ansatz die *in vitro*-Transkription durchgeführt:

Matrizen-DNA (1 μg)	
10 \times Transkriptionspuffer	2,2 μl
Unmarkierter NTP-Mix	3,3 μl
3 mM ATP	
3 mM CTP	
3 mM GTP	
90 nM UTP	
[γ -thio ^{35}S]-UTP	13,0 μl
250 mM DTT	1,0 μl
Plazentaler RNase-Inhibitor (40 U/ μl)	0,5 μl
RNA-Polymerase (20 U/ μl)	2,0 μl

Nach einer Inkubation von 2 - 2,5 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden dem Reaktionsansatz 1 μl 10 mg/ml tRNA aus Hefe, 1 μl RNase-Inhibitor und 1 μl RNase-freie DNase I zugesetzt und für weitere 15 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ die Matrizen-DNA verdaut. Anschließend wurde mit Wasser auf 100 μl aufgefüllt, 60 μl 7,5 M NH_4Ac (pH 5,2) hinzugefügt und mit 400 μl EtOH die RNA für 30 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Nach der Fällung wurde die RNA bei RT durch Zentrifugation bei $13.000 \times g$ präzipitiert und ebenfalls bei RT einmal mit 300 μl 70% EtOH gewaschen. Nach Antrocknen des Präzipitats wurde es für 10 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 50 μl 100 mM DTT gelöst, dem 1 μl RNase-Inhibitor zugesetzt wurde. Die Aktivität und damit Qualität der Probe sowie erforderliche Verdünnung für den Einsatz wurde durch Entnahme von 1 μl und Messung in einem Szintillationsmesser bestimmt. Die Messwerte lagen im Bereich zwischen $4 \cdot 10^6$ und $6 \cdot 10^6$ cpm/ μl .

2.19.3 Markierung von cRNA-Sonden mit Digoxigenin

Die Markierung von cRNA-Sonden mit Digoxigenin erfolgte, entsprechend dem Roche-Protokoll, mit Digoxigenin-11-uridin-5'-triphosphat (DIG-11-UTP, Roche, Kat.-Nr.: 1209256). Dazu wurde, wie im vorherigen Abschnitt bereits beschrieben 1 μg , eines das entsprechende

Insert tragenden Vektors, über Restriktionsverdau linearisiert, anschließend die DNA präzipitiert und gewaschen. Nach dem Trocknen wurde in folgendem Ansatz die *in vitro*-Transkription durchgeführt:

Matrizen-DNA (1 μ g)	
Wasser	6,5 μ l
10 \times Transkriptionspuffer	2,0 μ l
10 mM ATP	2,0 μ l
10 mM CTP	2,0 μ l
10 mM GTP	2,0 μ l
10 mM UTP	1,2 μ l
10 mM DIG-11-UTP	0,8 μ l
250 mM DTT	1,0 μ l
Plazentaler RNase-Inhibitor (40 U/ μ l)	0,5 μ l
RNA-Polymerase (20 U/ μ l)	2,0 μ l

Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C wurde 1 μ l RNase-freie DNase I (1U/ μ l) hinzupipetiert und für weitere 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach Auffüllen des Ansatzes mit Wasser auf 100 μ l und Hinzugabe von 10 μ l 4 M LiCl und 300 μ l EtOH wurde bei -20 °C für 30 min präzipitiert. Anschließend wurde bei 13.000 \times g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Präzipitat in 100 μ l Wasser aufgenommen. War das Pellet aufgelöst, wurde erneut unter den oben genannten Bedingungen präzipitiert. Nach Zentrifugieren und Trocknen wurde der Niederschlag in 50 μ l Wasser gelöst und zur visuellen Kontrolle 2 μ l daraus entnommen, bei 65 °C für 3 min denaturiert und in einem 1%igen TAE-Agarosegel der Elektrophorese unterzogen. War als Ergebnis der Elektrophorese eine einzige scharfe Bande zu erkennen die in Quantität (ca. 400 ng) und Größe den Erwartungen entsprach, wurde die Sonde für *in situ*-Hybridisierungen verwendet. Die Ausbeute einer wie oben beschriebenen *in vitro*-Transkription betrug ca. 10 μ g.

2.20 Reverse Transkription der mRNA

Zur reversen Transkription der isolierten mRNA wurde Rnase H⁻ SuperScript (GibcoBRL, Kat.-Nr.: 18053-017) reverse Transkriptase verwendet, die aus einem abgewandelten Moloney-Mäuse-Leukämie-Virus-Gen hergestellt wird. Endprodukt der Reaktion sind RNA-DNA-Hybriddoppelstränge, die für die PCR-Amplifikation verwendet werden können. Als Primer für die Reverse Transkriptase wurde folgendes Oligonukleotid verwendet:



Dieses Oligonukleotid hybridisiert an den 3'-Poly(A)-Schwanz der mRNA und stellt nach Synthese des cDNA-Erststrangs dessen 5'-Ende dar. Die für die cDNA-Synthese eingesetzte Menge an RNA betrug zumeist 5 - 10 μ g. Ein typischer Ansatz wird anhand folgender Auflistung gezeigt:

Gesamt-RNA	5 - 10 μ g
dNTPs	je 10 mM
DTT	10 mM
Oligo (dT)-Primer	10 pmol
Reverse Transkriptase	200 U

Die Reaktionen fanden in einem Gesamtvolumen von 20 μ l, bei 37 °C für 1 h statt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Temperatur auf 42 °C erhöht, um die thermische Auflösung potentieller, die reverse Transkription inhibierender, Sekundärstrukturen zu ermöglichen, und die Reaktion für weitere 20 min fortgesetzt. Die Reaktionsansätze wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.21 5' -RACE

Zur Isolierung des 5'-nichttranslatierten Bereichs der cDNA von *Ephrin-A5* wurde das 5'-RACE System (Version 2.0) von GibcoBRL (Kat.-Nr.: 18374-058) verwendet. Die Methode basiert im wesentlichen auf dem von FROHMAN *et al.* (1988) dargelegten Protokoll, das hier kurz erläutert werden soll.

Ausgehend von bekannter Sequenzinformation wird ein Oligonukleotidprimer konstruiert, der revers-komplementär zur amplifizierenden mRNA ist. Dieser Primer wird dazu verwendet, um mittels RNase H-reverser Transkriptase (Superscript II) ausschließlich die reverse Transkription der ausgewählten mRNA zu promovieren. Daraufhin wird die RNA über RNase-Verdau degradiert und über Aufreinigungsverfahren entfernt (GlassMAX, GibcoBRL, Kat.-Nr.: 15590-045). Im Anschluß wird dem 3'-OH-Ende der synthetisierten cDNA mit terminaler Transferase und dCTP ein homopolymerer Schwanz von 20 - 30 Nukleotiden angehängt. Die so hergestellte Matrize bietet nun zwei Regionen bekannter Sequenz und einen dazwischenliegenden unbekanntem Bereich, der über PCR (MULLIS und FALOONA, 1987) mit adäquaten Primern amplifiziert werden kann. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Gene Amp System 9700 Thermocycler von Perkin Elmer nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung:	20"	95 °C
Annealing:	20"	60 °C
Extension:	1-3'	72 °C
	35 Zyklen	

Abschließend wurde noch 5 min bei 72 °C inkubiert, um unter Ausnutzung der terminalen Transferase-Aktivität der *Taq*-DNA-Polymerase eine möglichst hohe Rate der Verlängerung des 3'-Endes der synthetisierten Stränge um ein Adenin-Überhang zu erreichen. Ein 50- μ l Ansatz sei exemplarisch an folgender Auflistung dargestellt:

cDNA: 20 ng
Primer: je 20 pmol (S. Tab. 3.1)
dNTP: 5 nmol
10 × *Taq*-Puffer: 5 µl
Taq-DNA-Polymerase: 5 U

Kontrollreaktionen unter Ausschluß von reverser Transkriptase sowie terminaler Transferase wurden parallel zu den eigentlichen Reaktionen durchgeführt. Alle Amplifikations-Produkte, die nach Auswahlverfahren wie Hybridisierung mit genspezifischen Sonden oder Größe als spezifisch angesehen wurden, wurden über TA-Klonierung in pBluescript II KS+ ligiert. Dazu wurde dem Vektor durch Schneiden mit glatte Enden produzierendem *EcoRV* und Inkubation mit 2 mM dTTP und *Taq*-DNA-Polymerase bei 72 °C ein Thymin-Überhang angehängt. Über blau-weiß-Selektion, Kolonien-Hybridisierung und Restriktionsverdau, nach Plasmid-Minipräparation, wurden Klone ausgewählt, aus ihnen, im größeren Maßstab, aus Maxi-Präparation Plasmid-DNA gewonnen und diese mit T3- sowie T7-Primer sequenziert.

2.22 Genotypisierung transgener Mäuse

Transgene Mäuse wurden durch zwei Verfahren genotypisiert: PCR mit isolierter genomischer DNA als Matrize und Hybridisierung verdauter und geblotteter genomischer DNA mit geeigneten Sonden.

2.22.1 Genotypisierung der *Ephrin-A5^{neo}*-Mutanten

2.22.1.1 Genotypisierung über PCR

Die Sequenzen der zur Genotypisierungs-PCR eingesetzten Primer lauten wie folgt:

EfnA5-wt-5´: 5´-CAC ATT GAT GTC TGT ATC AAT GAC TAC C-3´

EfnA5-wt/mt-3´: 5´-CAA GGA GAC ATC TGT AAC ACA GAG TCC-3´

EfnA5-mt-neo: 5´-ATC GAT CCG TCC TGT AAG TCT GC-3´

Der Primer *Efn-A5*-wt-5´ wurde in einer finalen Konzentration von 0,1 pmol/µl eingesetzt, die andere beiden Primer hingegen in einer Konzentration von 0,4 pmol/µl. Dieses empirisch ermittelte Verhältnis der optimalen Primer-Konzentrationen ermöglichte die äquivalente Amplifikation der für den Wildtyp bzw. für die Mutante charakteristischen DNA-Fragmente. PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt und enthielten folgende Komponenten:

DNA: 0,5-1 μ g
 Primer: 2,5-10 pmol
 dNTPs: 5 nmol
 10 \times *Taq*-Puffer: 2,5 μ l
Taq-DNA-Polymerase: 1 U

Das verwendete PCR-Programm lautet wie folgt:

Denaturierung:	10"	95 °C
Annealing:	20"	55 °C
Extension:	20"	72 °C
	35 Zyklen	

Die Genotypisierungs-PCR resultierte in einer Amplifikationsprodukt von 402 bp für den Wildtyp und ca. 640 bp für die Mutante.

2.22.1.2 Genotypisierung über Hybridisierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde mit *Eco*RI für die 5´-externe Sonde bzw. mit *Eco*RV für die 3´-externe Sonde verdaut, wie in 2.8.1 beschrieben auf Nylonfilter transferiert und immobilisiert. Daraufhin wurden die Filter nach 30 min Prähybridisierung in QuickHyb - bzw. RapidHyb-Hybridisierungspuffer ca. 2 h mit der ³²P-markierten Sonde unter ständiger Rotation bei 68 bzw. 65 °C hybridisiert. Nach zweimaligem Waschen bei 60 °C in 0,1 \times SSC/0,1% SDS und Auflegen des Films wurde die Autoradiographie ausgewertet. Für den Wildtyp beträgt das Molekulargewicht des hybridisierenden Fragments 5,5 kbp für die 5´-externe Sonde bzw. 9,7 kbp für die 3´-externe Sonde. Für die Mutante respektive 4,8 kbp für die 5´-externe Sonde und 7,2 kbp für die 3´-externe Sonde.

2.22.2 Genotypisierung der *En1*^{lacZ}-Mutanten

En1^{lacZ}-Mutanten wurden über zwei getrennte PCR-Reaktionen genotypisiert. Jede PCR-Reaktion diente der Identifizierung eines Allels. Konnte nach zweimaliger Wiederholung der PCR für ein Allel kein Signal erzielt werden, galt das Individuum als negativ für dieses Allels. Die PCR-Bedingungen entsprachen den Bedingungen für die Genotypisierung der *Ephrin-A5*^{neo}-Mutanten. Das wildtypische Allel wurde über die Identifizierung eines ca. 1 kbp großen Fragments bestimmt. Die hierfür verwendeten Primer sind:

5´-Primer-*En1*: 5´-CCA CGC ACC AGG AAG CTA AAG-3´

3´-Primer-*En1*: 5´-CGG GAG GGA TAG ACA AGA CCA-3´

Die Identifizierung des mutanten Allels erfolgte über die Amplifikation eines 630 bp großen Fragments aus der *lacZ*-Kassette. Die dafür verwendeten Primer sind:

5'-Primer-*lacZ*: 5´-GGT GGC GCT GGA TGG TAA-3´

3'-Primer-*lacZ*: 5´-CGC CAT TTG ACC ACT ACC-3´

2.22.3 Genotypisierung der *Ephrin-A5*-Promotor-Transgenen

Die Integration des Reporterkonstruktes im Genom wurde durch die Identifizierung der *lacZ*-Kassette über PCR überprüft. Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden die gleichen Primer und Bedingungen gewählt wie bereits im vorherigen Abschnitt für die Identifizierung des Mutanten-*lacZ*-Allels der *En1^{lacZ}*-Mäuse angegeben.

2.23 DNA-Sequenzierung

2.23.1 Sequenzreaktionen

Die Sequenzierung der PCR-Produkte folgte dem Prinzip der Kettentermination (SANGER *et al.*, 1977), durch den Einsatz von Nukleotid-Didesoxy-Analoga (Terminatoren), die mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt sind. Verwendet wurde das ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit von Perkin Elmer (Kat.-Nr. 402080). Die Sequenzierungs-Reaktionen entsprechen weitgehend einer unidirektionalen PCR. Bei den verwendeten DNA-Matrizen handelte es sich um Plasmide oder aufgereinigte PCR-Fragmente. Die Reaktionen fanden in einem Gesamtvolumen von 20 µl statt; ein Ansatz sei durch folgende Auflistung gezeigt:

DNA-Matrize: 0,5 - 1 µg (Plasmid)
 50 - 100 ng (PCR-Fragment)
 Primer: 3,2 pmol
 Terminatoren-Farbmix/Puffer: 8 µl

Das *Cycle Sequencing* erfolgte in den Perkin Elmer PCR-Geräten 9600 und 9700. Das PCR-Programm folgte folgendem Schema:

Denaturierung:	10"	96 °C
Annealing:	5"	50-55 °C (je nach verwendetem Primer)
Extension:	4'	60 °C
	25 Zyklen	

Nach Ablauf der Reaktionen wurden die Produkte in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, worin bereits 2 µl 3M Natriumacetat (pH 5,4) sowie 50 µl 95% EtOH vorgelegt waren. An eine 15minütige Inkubation auf Eis anschließend wurde das Gemisch für 20 min bei 13.000 ×g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand dekantiert, das Präzipitat mit 250 µl 70% EtOH überschichtet und der Überstand erneut dekantiert. Nach Abschluß des Waschvorgangs wurden die Proben im Luftzug eines Abzugs getrocknet und maximal vier Wochen bei -20 °C gelagert.

2.23.2 Elektrophorese des Sequenzgels

Die elektrophoretische Auftrennung der Sequenzier-Produkte erfolgte in einem 6%igem Polyacrylamidgel im Applied Biosystems-Sequencer 373A (Version 1.2.1) bei einer angelegten Spannung von ca. 1300 V und einer Stromstärke von 25 - 30 mA. Bei dem verwendeten Laufpuffer handelte es sich um TBE-Puffer, die Laufzeit betrug 14 Stunden.

Zur Herstellung des 6%igen Polyacrylamidgels wurden SequaGel®-Fertiglösungen (National Diagnostics/Kimberly) verwendet. 14,4 ml Konzentrat und 39,6 ml Verdünner wurden für 10 min mit einer Spatelspitze Amberlite®-Deionisierer gerührt und anschließend zusammen mit 6 ml 10 × TBE-Puffer durch eine 0,2 µm-Membran sterilfiltriert. Das Filtrat wurde mit einer Wasserstrahlpumpe für 10 min entgast, anschließend mit 50 mg APS (als 10%ige Lösung in Wasser) sowie 21 µl TEMED versetzt und nach kurzem, vorsichtigen Rühren zwischen zwei mit Dampfstrahler und einer 0,75%igen Alconox®-Lösung gereinigte Glasplatten gegossen. Die Platten waren an den 0,4 mm dicken Spacern mit Klammern fixiert. Nach dem Gießen wurde noch ein Platzhalter eingesetzt, der die Aussparung für den später einzupassenden Haifischkamm schuf. Das Gel wurde, nachdem es nach einer Stunde horizontaler Lagerung polymerisiert war, von den außen an den Platten haftenden getrockneten Polyacrylamidresten mit Wasser gereinigt und in den Sequenzierapparat eingesetzt. Unter den oben beschriebenen Bedingungen des normalen Sequenzlaufs wurde ein Vorlauf von einer Stunde Dauer gestartet.

Die lyophilisierten Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel in 4µl Formamid-Ladepuffer aufgenommen und für 2 min bei 95 °C denaturiert. Um die Denaturierung zu erhalten, wurden die Proben unmittelbar nach dem Erhitzen auf Eis gekühlt.

Die vom Photomultiplier aufgezeichneten Fluoreszenzdaten wurden in einem kompletten Gelbild sowie einzelnen Spuren (im folgenden Chromatogramme genannt) und den davon erstellten Sequenz-Dateien auf einem angeschlossenen Computer (Macintosh IIci) gespeichert. Die Bearbeitung der Fluoreszenzdaten und deren Umrechnung in Sequenzen erfolgte durch das 373A DNA Sequencer Data Analysis Program (Version 1.2.1 © 1989 Applied Biosystems, Inc.). Bei unkorrekter oder unzureichender Spurvorgabe vom Gerät wurde diese nachbearbeitet und lediglich diese überarbeiteten Dateien für die weitere Sequenzanalyse übernommen. Um sichere Sequenzdaten zu bekommen, wurden für die meisten Positionen Strang und Gegenstrang sequenziert.

2.23.3 Auswertung der Sequenzen

Von den rund 700 Basenzuweisungen, die ein Datenfile aus einer Sequenzierung mit dem ABI Sequencer 373A enthält, kann in der Regel nur ein Teil eindeutig interpretiert werden. Systembedingt sind Sequenzen, die über die Position 500 hinausgehen, nicht mehr sicher auswertbar. Auch der Anfang jeder Sequenz ist in der Regel nicht interpretierbar, da hier aufgrund des hohen Überschusses an Terminatoren während der ersten Sequenzierzyklen die Fluoreszenzsignale sehr intensiv sind. Die finale Auswertung und Editierung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms SeqEd (Version 1.0.3) von Applied Biosystems.

2.24 RNA-*in situ*-Hybridisierung

2.24.1 RNA-*In situ*-Hybridisierung an Ganzkörperpräparaten von Embryonen

Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen wurden mit geringfügigen Modifikation nach den Vorschriften von WILKINSON (1992) durchgeführt. Alle Schritte erfolgten unter ständiger Rotation bzw. Schwenken, um eine optimale Durchmischung zu gewährleisten. Embryonen wurden nach Präparation aus dem Uterus und Entfernung der extraembryonalen Membranen in frisch angesetztem und filtriertem 4%igen Paraformaldehyd in PBS ü.N. bei 4 °C fixiert. Das Fixans wurde daraufhin zweimal mit eiskaltem PBS, das 0.1% Tween-20 (PBT) enthielt, ausgewaschen und in die Embryonen in einer ansteigenden Methanolreihe auf Eis dehydriert (25 50 und 75% Methanol in PBT und zuletzt zweimal 100% Methanol). So behandelte Embryonen konnten mehrere Monate bei -20 °C gelagert werden.

Embryonen wurden vor der Hybridisierung durch eine absteigende Serie von Methanol in PBT (75 50 and 25%) und schließlich zweimaliges Waschen in PBT rehydriert. Anschließend wurden die Präparate für 1 h bei RT mit 6% H₂O₂ in PBT gebleicht. Durch Behandlung mit 10 µg/ml Proteinase K in PBT für 1 - 15 min wurde das Gewebe permeabilisiert. Die Dauer der Proteinase K-Behandlung richtete sich nach der Größe des Objekts und damit nach dem embryonalen Stadium, wie folgender Tabelle zu entnehmen:

Stadium	Inkubationszeit
<E 6,5	1 min
E 6,5 – 7,5	3 min
E 8,5	5 min
E 9,5	8 min
E 10,5	12 min
E >10,5	15 min

Für Embryonen bis zu E 9,5 wurde z.T. ganz auf Proteinase K-Behandlung verzichtet. Nach dem kontrollierten Verdau wurde zweimal mit PBT gewaschen und anschließend in frischem 4% Paraformaldehyd/0.1% Glutaraldehyd in PBS bei RT für 20 min nachfixiert. Nach

zweimaligem Waschen in PBT wurden die Präparate in Hybridisierungs-Lösung gegeben und mindestens 1 h bei 58 - 60 °C prähybridisiert. Nach Ablauf der Prähybridisierung wurde die Hybridisierungs-Lösung durch frische Lösung unter Hinzugabe von 0,1 - 0,5 µg/ml einer Digoxigenin-markierten cRNA-Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 58 - 60 °C üN.

Nach der Hybridisierung wurde überschüssige Probe durch zweimaliges je 30minütiges Waschen mit Waschlösung 1 bei Hybridisierungstemperatur entfernt. Danach wurde noch einmal mit einem 1:1-Gemisch aus Waschlösung 1 und Waschlösung 2 für 10 min bei Hybridisierungstemperatur und zweimal 5 min mit Waschlösung 2 bei RT gewaschen. Nach 5minütiger Inkubation in Waschlösung 2 ohne CHAPS wurde zweimal mit 100 µg/ml RNase A in Waschlösung 2 (ohne CHAPS) für je 30 min bei 37 °C behandelt. Anschließend wurde überschüssige RNase A mit Waschlösung 2 entfernt und durch zweimalige 30minütige Inkubation unter Hybridisierungsbedingungen mit Waschlösung 3 RNA-Fragmente entfernt.

Nach diesen Waschschritten wurden die Föten zweimal in 0.1% Tween-20 enthaltendes MAB (MABT) überführt. An eine mindestens einstündige Inkubation in 2% Blockierungsreagenz (Roche, Kat.-Nr.: 1096176) enthaltendes MABT schloß sich die Antikörper-Bindung an. Dazu wurden die Embryonen ü.N. bei 4 °C mit dem 1:5000 in 2% Blockierungsreagenz enthaltendem MABT verdünnten Anti-Digoxigenin-AP-Antikörper (Roche, Kat.-Nr.: 1093274) inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde, abhängig von der Größe der Embryonen, durch zwei bis fünf Tage andauerndes Waschen mit MABT bei 4 °C entfernt. Dabei wurde täglich mehrfach die Lösung gewechselt.

Nach ausreichendem Auswaschen ungebundenen Antikörpers wurden die Embryonen zweimal für je 10 min mit 2 mM Levamisol enthaltendem NTMT bei RT gespült. Die Farbreaktion wurde mit dem Überstand zentrifugierter BM Purple-Lösung (Roche, Kat.-Nr.: 1442074) durchgeführt, die 2 mM Levamisol und 0.1% Tween-20 enthielt. Das Reaktionsprodukt in Form eines blauen Niederschlags konnte bei 4 °C zumeist innerhalb weniger Stunden bis spätestens zwei Tagen optimal angereichert werden, um die Färbung abubrechen. Die Farbreaktion wurde mit zwei Wechseln der Lösung mit PBT gestoppt und die Embryonen bei 4 °C in 4% PFA in PBS gelagert.

2.24.2 RNA-*In situ*-Hybridisierung an Schnitten gefrorenen Gewebes

2.24.2.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Gewebestücke bzw. ganze Organe und Körperteile wurden nach der Präparation in Aluminiumfolie gelegt und auf Trockeneis gestellt, bis sie gefroren waren. Das so gefrorene Gewebe wurde bei -80 °C für längere Zeiträume gelagert. Alternativ zum Einfrieren nativen Gewebes wurden Tiere über Perfusion mit 4% PFA in PBS fixiert, deren Gehirn entnommen und über Immersion in 30% Sucrose in PBS für das Einfrieren vorbereitet. Nach Abschluß der begrenzten Dehydrierung in der Sucrose-Lösung wurde das Gehirn herausgenommen, Reste haftender Lösung vorsichtig abgesaugt und das Gewebe wie oben beschrieben eingefroren.

Vor dem Schneiden wurden die Gewebestücke auf einen Metallpräparatehalter mit Hilfe von festgefrorenem Einbettmedium (Jung, Vertrieb Leica, Kat.-Nr.: 0201 08926) befestigt. Die Schnitte wurden in einem Kryostat bei -14 bis -20 °C in einer Dicke von 20 µm geschnitten

und nach dem Aufziehen auf Objektträgern (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Kat.-Nr.: 041300) sofort auf einer Wärmeplatte bei ca. 40 °C getrocknet. Die so hergestellten Schnitte wurden in Plastikboxen bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.24.2.2 Hybridisierung mit ³⁵S-markierten cRNA-Sonden

Für die Hybridisierung wurden die Schnitte auf RT erwärmt und ca. 30 min vor der weiteren Behandlung getrocknet. Anschließend wurde für 10 min in eiskaltem 4% PFA in PBS fixiert und anschließend dreimal für je 5 min in PBS gewaschen. Eine 10minütige Acetylierung unter ständigem Rühren mit 0,25 M Essigsäureanhydrid (gelöst in 0,1 M Triethanolamin-HCl, pH 8,0) diente der Neutralisierung positiv geladener Moleküle wie basischen Proteinen und damit der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Im Anschluß wurde zweimal in 2 × SSC für je 5 min gewaschen und über eine ansteigende Ethanolreihe dehydriert (60%, 75%, 95% und 100%). Adultes Gewebe wurde zusätzlich für 5 min mit Chloroform behandelt und abschließend in 95% EtOH das Chloroform entfernt.

Die staubfrei getrockneten Objektträger wurden mit ca. 100 µl Hybridisierungslösung, die 70.000 cpm/µl an ³⁵S-markierter cRNA-Sonde enthielt, bedeckt und mit einem Deckgläschen belegt. Die so behandelten Objektträger wurden in einer feuchten Kammer, deren Boden mit einer Lösung aus 50% Formamid in 4 × SSC bedeckt war, ü.N. bei 65 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger von den Deckgläschen in 4 × SSC vorsichtig getrennt und weitere viermal für je 5 min bei RT in 4 × SSC gewaschen. Für 20 - 30 min wurde mit 20 µg/ml RNase A in NTE-Puffer bei 37 °C behandelt. Im Anschluß wurde zweimal in 2 × SSC/1 mM DTT für je 5 min bei RT gewaschen, einmal in 1 × SSC/1 mM DTT für 10 min bei RT und einmal in 0,5 × SSC/1 mM DTT für weitere 10 min bei RT. Hochstringentes Waschen wurde zweimal in 0,1 × SSC/1 mM DTT für je 20 - 30 min bei 65 °C durchgeführt. Abschließend wurde noch zweimal in 0,1 × SSC bei RT für je 10 min gewaschen und anschließend getrocknet. Die getrockneten Objektträger wurden für 24 - 48 h auf Film (Kodak, Biomax, Kat.-Nr.: 870 1302) exponiert, nach Entwicklung der Autoradiographie Hintergrund und Signalintensität evaluiert und danach die Expositionsdauer für die Photoemulsion bemessen. Die Objektträger wurden hierfür dünn mit Photoemulsion (Kodak, NTB-2, Kat.-Nr.: 165 4433) bedeckt, ü.N. getrocknet und in trockener Luft bei 4 °C im Dunkeln bis zur Entwicklung gelagert. Die Expositionszeit betrug zumeist 2 - 4 Wochen. Nach Abschluß der Entwicklungszeit wurde die Photoemulsion entwickelt und fixiert. Nach Antrocknen der Schnitte konnten sie mit DPX (Kat.-Nr.: 360294H) überschichtet und einem Deckglas abgedeckt werden.

2.24.2.3 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden

In situ-Hybridisierungen mit Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden wurden, unter folgenden Modifikationen, wie die Hybridisierungen mit ³⁵S-markierten Proben durchgeführt: Die Hybridisierungslösung enthielt 1 µg/ml Digoxigenin-markierter cRNA-Probe. Nach den Waschschritten wurden die Schnitte für 5 min in MAB bei RT überführt. An eine mindestens

30minütige Inkubation in 1% Blockierungsreagenz enthaltendem MAB schloß sich die Antikörper-Bindung an. Dazu wurden die Schnitte ü.N. bei 4 °C mit dem 1:5000 in 1% Blockierungsreagenz enthaltenden MAB verdünnten Anti-Digoxigenin-AP-Antikörper inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen mit MAB bei RT entfernt. Nach Auswaschen ungebundenen Antikörpers wurden die Schnitte zweimal für je 10 min mit 2 mM Levamisol enthaltendem NTM bei RT gespült. Die Farbreaktion wurde mit BM Purple-Lösung durchgeführt, die 2 mM Levamisol enthielt. Das Reaktionsprodukt in Form eines blauen Niederschlags konnte bei 4 °C zumeist innerhalb weniger Stunden bis spätestens zwei Tagen optimal angereichert werden, um die Färbung abzurechnen. Die Farbreaktion wurde mit zwei Wechseln der Lösung mit PBS gestoppt, die Schnitte mit KAISERS Glyceringelatine (Merck, Kat.-Nr.: 1.09242.0100) umschlossen und mit Deckgläsern abgedeckt.

2.24.3 RNA-*In situ*-Hybridisierung an Paraffin-Schnitten

2.24.3.1 Herstellung von Paraffin-Schnitten

Das Gewebe wurde nach Fixierung in 4% PFA in PBS einmal mit PBS und einmal in 0,9% NaCl bei 4 °C für je 1 h gewaschen. Anschließend wurde in einer ansteigenden Isopropanol-Reihe (50%, 75% und 90%) und abschließend zweimal in 100% Isopropanol jeweils 3 - 6 h dehydriert. Das Gewebe wurde dann in einer Lösung aus 50% Isopropanol/50% Paraffin bei 60 °C ü.N. und im Anschluß in reinem Paraffin bei 60 °C für weitere 8 h inkubiert. Nach Abschluß dieser Behandlung wurde die Probe in einer Metallschale im noch flüssigen Paraffin ausgerichtet, ein Kunststoffträger aufgebracht und das Paraffin durch Abkühlen erhärtet. Der Paraffinblock mit dem eingeschlossenen Gewebe wurde bis zur Herstellung von Schnitten bei 4 °C gelagert.

Ein Paraffinblock wurde nach Zurechtschneiden in optimaler Größe in das Mikrotom eingespannt und in einer Dicke von 7 - 10 µm geschnitten. Mit Hilfe einer gekrümmten Nadel oder eines Pinsels wurden die Schnitte auf Objektträger (SuperFrost Plus) übertragen. Die Objektträger wurden auf einer 40 °C warmen Heizplatte ausgebreitet und mit Wasser bedeckt, so daß sich die darauf gelegten Schnitte möglichst ohne Falten ausbreiten können. So hergestellte Schnitte wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.24.3.2 Hybridisierung mit ³⁵S-markierten cRNA-Sonden

Durch zweimalige je 10minütige Xylolbehandlung wurden die Paraffinschnitte entwacht und anschließend durch zweimal 5 min EtOH das Xylol entfernt. Die Schnitte wurden dann in 70% EtOH begrenzt und durch dreimaliges Waschen in DEPC-behandeltem Wasser vollständig rehydriert. An eine 3minütige Inkubation in PBS schloß sich eine Fixierung in 4% PFA in PBS an. Nach zweimaliger Inkubation von je 5 min in PBS schloß sich eine Behandlung mit 20 µg/ml Proteinase K in Proteinase K-Puffer für 7 min bei RT an. Anschließend wurde für 5 min in PBS gewaschen und erneut für 20 min in 4% PFA in PBS bei RT fixiert. Nach einer weiteren Inkubation von 5 min in PBS wurde in 0,1 M Triethanolamin-HCl (pH 8,0), das mit 0,25 M Essigsäureanhydrid versetzt war, unter ständiger Rotation eines Magnetrührers für 10 min

acetyliert. An ein zweimaliges 5minütiges Waschen in $2 \times$ SSC schloß sich eine steigende Ethanolreihe (60%, 75%, 95% und 100%), mit der die Schnitte entwässert wurden, an. Die so behandelten Schnitte wurden staubfrei getrocknet.

Das weitere Verfahren erfolgte wie für die *in situ*-Hybridisierung an Gefrierschnitten bereits beschrieben.

2.24.3.3 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden

Die *in situ*-Hybridisierungen an Paraffinschnitten mit Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden erfolgten, unter Berücksichtigung der Modifikationen, die bereits in 2.23.2.3 beschrieben wurden, wie die Hybridisierungen mit den ^{35}S -markierten Sonden.

2.25 Hämalaun / Eosin (HE)-Färbung

Die Schnitte wurden durch zweimalige je 10minütige Inkubation in Xylol deparaffiniert und in einer abnehmenden Ethanolreihe (100%, 90%, 70% und 50% in Wasser) für jeweils 2 min rehydriert. Anschließend wurde zweimal für je 3 min in Wasser gebadet. Die Objektträger wurden dann in eine wäßrige, zuvor filtrierte Hämalaunlösung nach visueller Kontrolle gefärbt und im Anschluß für ca. 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Danach wurde in einer wäßrigen, filtrierten Eosinlösung gefärbt. Nach einer abschließenden Dehydrierung in einer ansteigenden Ethanolreihe wurde mit DPX überschichtet und mit einem Deckglas abgeschlossen.

2.26 Nissl-Färbung

Die Nissl-Färbung färbt Bestandteile des rauhen endoplasmatischen Reticulums an und zeigt damit die Zellsomata an. Getrocknete Gefrierschnitte wurden zur Säuberung und Entfettung für je 3 - 5 min mit 50 und 70% EtOH in Wasser behandelt. Anschließend wurde rehydriert und bis zu 15 min in filtrierter Kresylviolett-Lösung gefärbt. Nach dem Spülen mit Wasser und 70% EtOH wurden die Färbungen in 96%igen, mit einem Tropfen Eisessig angesäuertem EtOH differenziert. Anschließend wurde dreimal mit 96% sowie zweimal mit 100% EtOH gespült. Der Abschluß der Färbung erfolgte durch einmalige Behandlung mit Xylol. Die Schnitte wurden anschließend mit Einschlußmittel überschichtet und mit Deckgläschen abgedeckt.

2.27 Rezeptor-Bindungsassays mit alkalischer Phosphatase (AP)-Fusionsproteinen

Die Methodik basiert im Wesentlichen auf dem von CHENG und FLANAGAN entwickelten Protokoll (*receptor alkaline phosphatase in situ*, 1994). Die Färbungen wurden an Gefrierschnitten durchgeführt, die wie in 2.24.2.1 beschrieben hergestellt wurden. Die Schnitte wurden vor den weiteren Behandlungsschritten für ca. 10 min in -20 °C kaltes Methanol fixiert. Anschließend wurde für 10 min in HBHA-Puffer und für weitere 2 h mit 4 - 7 nM AP-Fusionsproteinen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Uwe Drescher, Tübingen) in HBHA-Puffer inkubiert. Nach Abschluß der Bindungsreaktion wurden ungebundene AP-Fusionsproteine viermal für je 5 min mit HBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurde für 1,5 min mit Fixierlösung behandelt und weitere sechsmal in HBS-Puffer gewaschen. In HBS-Lösung wurden für 60 min bei 65 °C endogene alkalische Phosphatasen inaktiviert und danach für 10 min in AP-Puffer und weitere 10 min in AP-Puffer mit 10 mM L-Homoarginin die Schnitte inkubiert. Die Farbreaktionen erfolgte mit BM-Purple, dem 10 mM L-Homoarginin zugefügt wurden. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die Reaktion in PBS gestoppt. Die Schnitte wurden leicht getrocknet, in Nuclear Fast Red (Vector, Kat.-Nr. H-3403) für 10 min gegengefärbt und für 2 min in Wasser abgespült. Letztlich wurde mit KAISERS Glyceringelatine überschichtet und mit Deckgläschen abgedeckt.

2.28 Immunohistochemische Färbung an Ganzkörperpräparaten von Embryonen

Embryonen wurden dem Uterus entnommen, von allen extraembryonalen Membranen befreit und in 4% PFA in PBS ü.N. bei 4 °C fixiert. Dieser, wie alle folgenden Inkubationsschritte, erfolgten unter kontinuierlichem Schütteln, um eine optimale Durchmischung zu gewährleisten. Nach der Fixierung wurden sie in einer steigenden Methanolreihe (25%, 50%, 75% in PBS und zweimal 100%) dehydriert und so für längere Zeiträume gelagert.

Durch eine 4 - 5stündige Behandlung mit einer Lösung aus Methanol/DMSO/30% H₂O₂ (4:1:1) wurden die Embryonen gebleicht und endogene Peroxidasen inaktiviert. Anschließend wurden die Embryonen in einer absteigenden Methanolreihe (75%, 50% und 25% in PBS) rehydriert und in PBS für 15 min inkubiert. Nach der Rehydrierung wurde zweimal für je eine Stunde in PBS mit 2% Milchpulver und 0,1% Triton X-100 (PBSMT) bei RT gewaschen. Anschließend wurde in der gleichen Lösung mit dem 1:300 verdünntem Antikörper bei 4°C ü.N. inkubiert. Durch fünfmaliges je einstündiges Waschen mit PBSMT wurde nicht gebundener Antikörper entfernt und im Anschluß mit dem 1:200 verdünnten sekundären, mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Antikörper, in PBSMT ü.N. bei 4 °C inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde erneut durch fünfmaliges je einstündiges Waschen mit PBSMT entfernt und abschließend die Embryonen in PBS überführt. Die Färbung erfolgte durch Addierung von 0,3 mg/ml Diaminobenzidin (DAB) in PBS für 20 - 30 min. Die Farbentwicklung wurde durch Hinzugabe von H₂O₂ in einer Konzentration von 0,03% induziert und war

innerhalb von 10 - 15 min abgeschlossen. Durch Überführen in PBS wurde die Färbung beendet.

2.29 X-Gal-Färbung

Embryonen wurden nach Entnahme aus dem Uterus und Befreiung von allen extraembryonalen Membranen kurz bei RT mit 0,1 M Phosphatpuffer gespült und anschließend bei RT für 20 - 30 min schüttelnd in Fixier-Lösung fixiert. Nach dem Fixieren wurde dreimal für je 15 min mit Wasch-Puffer bei RT schüttelnd gewaschen und im Anschluß die X-Gal-Färbelösung als Substrat für die β -Galaktosidase auf die Embryonen gegeben. Es wurde mehrere Stunden bis ü.N. in der Färbelösung bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach Abschluß der Farbreaktion wurden die Embryonen zweimal mit Waschlösung gespült und in dieser Lösung unter Zusatz einiger Tropfen 1 M NaN_3 bei 4 °C gelagert. Im Allgemeinen intensivierte sich die Färbung nach einiger Zeit in dieser Lösung, so daß die Embryonen recht bald zur Dokumentation fotografiert wurden.

2.30 Skelettfärbung

Skelett-Präparationen wurden mit Hilfe des Acianblau / Alizarinrot-Verfahrens durchgeführt, das Knorpel blau und verknöchertes, calciumhaltiges Gewebe rot färbt (KESSEL *et al.*, 1990).

Neugeborene Mäuse wurden ausgenommen, für 4 Tage in EtOH fixiert, für 3 Tage in Aceton gegeben und dann kurz in Wasser gespült. Anschließend wurden sie für 3 Tage mit Färbelösung behandelt. Nach kurzem Abspülen mit Wasser wurden sie in Mazerierungslösung von allem weichen Gewebe befreit und entfärbt. Üblicherweise waren die Skelette von allem umgebenden Gewebe innerhalb einiger Tage bzw. weniger Wochen gesäubert und wurden dann in einer Lösung aus 50% Glycerin in Wasser aufbewahrt.

2.31 Färbung von Axonen mit lipophilen Farbstoffen

In Kooperation mit Prof. Dr. Dr. Solon Thanos (Universität Münster) wurden Markierungen der Axone retinaler Ganglienzellen (RGZ) mit dem retrograd transportierten lipophilen Farbstoff N-4-4-(4-Didecylaminostyrol)-N-Methylpyridiniumjodid (4-Di-10-ASP; Molecular Probes, Kat.-Nr.: D-291) durchgeführt. Dieser Farbstoff wird aufgrund seines lipophilen Charakters in die Zellmembran internalisiert und fluoresziert nur dann, wenn er von Membranen aufgenommen wird. Das Absorptionsmaximum für die Anregung liegt bei 492 nm, das Emissionsmaximum im gelben Bereich bei 612 nm. 4-Di-10-ASP wird über den schnellen axonalen Transport (200 - 400 mm/d) zum Zellsoma der RGZ transportiert und reichert sich in zwei bis drei Tagen, nach der Injektion in den Colliculus superior, ausreichend für eine Detektion an.

Für die Durchführung der Injektion wurden 4 - 8 Wochen alte Tiere anästhesiert,

positionsfixiert und operiert. Dazu wurde der Schädel über dem Colliculus superior einer Seite geöffnet und ein 4-Di-10-ASP-Kristall in einer ausgewählten Position plziert. Nach Beendigung des Eingriffs wurde die Wunde durch Zunähen der Kopfhaut wieder verschlossen und das Tier für weitere fünf Tage unter normalen Bedingungen gehalten. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Tier durch cervicale Dislokation getötet und Gehirn sowie Augen entnommen. Der Colliculus superior wurde von überlagerndem Gewebe befreit und unter fluoreszierenden Bedingungen zur exakten Positionsbestimmung des 4-Di-10-ASP-Kristalls fotografiert. Die kontralaterale Retina wurde unter PBS vom restlichen Auge freipräpariert und auf einem Filterpapier, mit der RGZ-Schicht nach oben, ausgebreitet. Unter Fluoreszenzbeleuchtung wurden *Camera lucida*-Zeichnungen angefertigt und diese ausgewertet.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jürgen Bolz (Universität Jena) wurden Markierungsexperimente für das thalamocorticale Projektionssystem durchgeführt. Hierzu wurden 8 Tage alte Tiere durch cervicale Dislokation getötet, ihre Gehirne entnommen und in 4% PFA/PBS für mindestens 24 h immersionsfixiert. Anschließend wurden die Gehirne in 4% Agarose eingebettet und 400 μ m dick in einem Winkel geschnitten, der den thalamocorticalen Pfad erhält. Die Anfärbung thalamocorticaler Axone erfolgte durch die Implantation eines Kristalls von Dil (1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanin-perchlorat; Molecular Probes, Kat.-Nr.: D-3911) in den ventrobasalen Thalamus. Die Schnitte wurden daraufhin bis zu zwei Wochen in PBS, dem 0,2% Natriumazid zugegeben wurde bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Analyse im konfokalen Mikroskop (ZEISS LSM 510).

Färbungen von Axonen in embryonalen Stadien wurden ebenfalls mit Kristallen von Dil durchgeführt. Hierzu wurden die Kristalle mit einer spitz ausgezogenen Glaskapillare positioniert und die Föten solange bei RT in 4% PFA in PBS inkubiert, bis der Farbstoff alle Nervenendigungen erreicht hatte. Die Ergebnisse der Färbungen wurden unter fluoreszierenden Bedingungen (Absorptionsmaximum: 549 nm, Emissionsmaximum: 565 nm) betrachtet und dokumentiert.

2.32 Dokumentation histologischer Ergebnisse

Für die Dokumentation histologischer Färbungen an Ganzkörperpräparaten wurden die Embryonen in PBS in eine 6 cm-Petrischale, in die zuvor eine dünne Schicht 1%ige Agarose in PBS gegossen worden war, gelegt. In die Agarose wurden kleine Gruben ausgearbeitet in denen die Embryonen beliebig und stabil ausgerichtet wurden. Die Aufnahmen wurden am Binokular-Mikroskop (Leica MZ APO) unter einer Kombination aus Durch- und Auflichtbeleuchtung gemacht. Diese Aufnahmetechnik erlaubte die Abbildung innerer, angefärbter Strukturen und unterdrückte die Schattenbildung.

Hell- sowie Dunkelfeldaufnahmen von histologischen Schnitten auf Objektträgern wurden mit dem Binokular-Mikroskop Leica DMRB (Objektive 2,5-100 \times) und in geringerem Maße (bei zu großen Objekten) mit Leica MZ APO durchgeführt.

Die Dokumentation der Aufnahmen erfolgte mit der Digital-Kamera ProgRes 3012, unterstützt vom Programm Daguerre (Version 2.1). Die Aufnahmen wurden daraufhin ins

Bildverarbeitungsprogramm Adobe Photoshop (Version 4.0) importiert, auf die interessierenden Ausschnitte verkleinert und phototechnisch bearbeitet. Kopien einzelner Aufnahmen, die zu einer Collage zusammengefügt werden sollten, wurden im EPS-Format in Adobe Illustrator (Version 6.0.1) importiert und hier plazierte.

Die Identifizierung und Benennung anatomischer Strukturen an Ganzkörperpräparaten sowie an Schnitten erfolgte nach den Angaben in den histologischen Atlanten von KAUFMAN (1992), DREWS (1993), SCHAMBRA *et al.* (1992), ALTMAN und BAYER (1995), ALVAREZ-BOLADO und SWANSON (1996), FRANKLIN und PAXINOS (1997), JACOBOWITZ und ABBOTT (1998).

2.33 Kultivierung und Manipulation embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) der Maus

2.33.1 Verwendete ES-Zellen

Um *Ephrin-A5*-defiziente Mausmutanten zu generieren, wurde der gewählte Genabschnitt gegen einen DNA-Vektor in pluripotenten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus ausgetauscht. Der Austausch zwischen dem endogenen Genabschnitt und dem Vektor erfolgt nach Rekombination zwischen den homologen Sequenzen. Die pluripotenten, aus der inneren Zellmasse der Mausblastozysten stammenden ES-Zellen (MARTIN, 1981; EVANS und KAUFMAN, 1981) besitzen die Fähigkeit, sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Es ist aber möglich, diese Zellen im undifferenzierten Stadium zu kultivieren. Bringt man die ES-Zellen durch Injektion in Mausblastozysten oder durch Aggregation mit Mausembryonen im Morulastadium zurück in den Embryo, so können sich diese Zellen an der Entwicklung aller Organe einschließlich der Gonaden beteiligen, und es entstehen Chimären. Bei Keimbahnchimären werden auch Nachkommen geboren, deren Genotyp dem Genotyp der ES-Zellen entspricht. Für diese Arbeit wurden drei ES-Zelllinien verwendet:

- die Linie R1 aus der Sublinie (129/Sv × 129/Sv)_{F₁} (NAGY *et al.*, 1993)
- die Linie E14 aus der Sublinie 129/Ola (HOOPER *et al.*, 1987)
- die Linie TBV2 aus der Sublinie 129/Sv (etabliert von Dr. V. Blanquet)

Für die Zellkultur-Arbeiten und Manipulationen der Embryonen wurden die Fachbücher von JOYNER (ed. 1993) und HOGAN *et al.* (1994) herangezogen. Um den undifferenzierten, pluripotenten Zustand der ES-Zellen zu erhalten, wurden diese alle zwei Tage vereinzelt und verdünnt ausgesät. ES-Zellen wie Feederzellen wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.33.2 Präparation und Anzucht von Feederzellen

Zur Beibehaltung der pluripotenten Eigenschaften von ES-Zellen während ihrer Kultivierung werden neben speziell konditionierten Medien wie "Buffalo-Rat-Liver" (BRL)-Zellen enthaltendes Medium (SMITH und HOOPER, 1987) oder Leukämie-Inhibierungsfaktor (LIF) enthaltendes Medium (WILLIAMS *et al.*, 1988; SMITH *et al.*, 1988) mitotisch inaktivierte Fibroblasten (Feederzellen) (MARTIN, 1981; DOETSCHMAN, 1985) benötigt. In dieser Arbeit wurden die ES-Zellen auf einer einfachen Feederzellschicht im LIF enthaltenden Medium gehalten. Die Feederzellen wurden aus Fibroblasten von E 14,5 - E 16,5 alten Maus-Embryonen unter sterilen Bedingungen präpariert und als 1 ml-Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurden Embryonen des Mausstammes CD-1 verwendet.

In flüssigem Stickstoff eingefrorene Feederzellen-Ampullen wurden schnell bei 37 °C aufgetaut, in 10 ml DMEM gegeben und 5 Minuten bei 1.000 ×g zentrifugiert, um das Einfriermedium zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 10 ml DMEM resuspendiert und auf fünf 13,2 cm-Platten mit je 25 ml Medium verteilt. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und zur Teilungsinaktivierung mit Mitomycin C für 3 h behandelt. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 7,5 ml Trypsin/EDTA 15 min im Inkubator vom Boden abgelöst. Nach Vereinzeln und Zentrifugation der Zellen wurden sie in Medium aufgenommen und die Zellzahl in der Suspension bestimmt. Die Zellen wurden je nach Bedarf auf Platten unterschiedlicher Größe in einer Konzentration von 2 - 2,5 · 10⁴ Zellen/cm² ausplattiert. Die Feederplatten waren nach mindestens dreistündiger Inkubation verwendbar, im besseren Fall aber ü.N. kultiviert worden. Mit Mitomycin behandelte Feederplatten konnten bis 7 Tage nach der Behandlung verwendet werden, wenn das Medium nach 4 Tagen gewechselt wurde.

2.33.3 Elektroporation und Selektion von ES-Zellen

Die Elektroporation ist eine physikalische Methode zum Gentransfer. Sie basiert auf dem Umstand, daß biologische Membranen durch die Einwirkung kurzer elektrischer Impulse oberhalb einer kritischen Feldstärke vorübergehend permeabilisiert werden, ohne daß die Membranstruktur zerstört wird. Während der Phase erhöhter Durchlässigkeit kann ein Stofftransport durch die Membran erfolgen. Die Elektroporation der ES-Zellen wurde nach den Angaben von WURST und JOYNER (1993) durchgeführt.

2.33.3.1 Vorbereitung der ES-Zellen für die Elektroporation

Die in flüssigem Stickstoff aufbewahrten ES-Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Um das Einfriermedium zu entfernen, wurde die Zellsuspension (ca. 1 ml) in 20 ml Waschmedium überführt und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml ES-Zell-Kulturmedium aufgenommen und auf eine 6 cm-Feederplatte ausgesät. Nach ca. 48 h Inkubation wurden die Zellen auf der Feederplatte mit PBS gewaschen. Nach 15minütiger

Einwirkung von 1,5 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C wurden sie vom Boden gelöst. Um die Zellen zu vereinzeln, pipettierte man die Zellsuspension ungefähr 10 - 15 mal auf und ab. Nach dem Entfernen von Trypsin/EDTA durch Waschen der Zellsuspension wurden die ES-Zellen auf eine 10cm-Feederplatte mit 10 ml Medium neu ausgesäht (Verdünnung ca. 1:2,5).

Die Zellen wurden für weitere 48 h kultiviert und auf vier 10-cm Gelatineplatten passagiert. Nach weiteren 36 - 48 h Inkubation war eine Zellzahl erreicht, die für zwei bis drei Elektroporationen ausreichend war. Um ein exponentielles Wachstum von ES-Zellen zu erreichen, wurde 3 - 5 h vor der Elektroporation das Medium gewechselt. Die Zellen wurden gewaschen, trypsinisiert, durch rigoroses Pipetieren vereinzelt, in kaltem PBS aufgenommen und ausgezählt.

2.33.3.2 Vorbereitung der DNA und Elektroporation

30 µg der Vektor-DNA wurden mit 40 U *NotI*-Enzym für mindestens 3 h Stunden in einem Volumen von bis zu 100 µl linearisiert. Anschließend wurde das Enzym 15 min bei 70 °C inaktiviert und dieser Ansatz direkt für eine Elektroporation in einer Küvette (Biorad, Kat.-Nr.: 165-2088) verwendet. Die Elektroporation wurde mit $6 \cdot 10^7$ ES-Zellen in einem Gesamtvolumen von 850 µl durchgeführt. Die linearisierte Vektor-DNA wurde bei 240 V und 500 µF transfiziert. Die Werte für die Zeitkonstante betragen 6,6 - 6,8 ms, was im erwünschten Bereich lag. Nach der Elektroporation wurde der Ansatz in der Küvette für 10 - 15 min bei RT belassen, anschließend in 40 ml Medium vorichtig verteilt und auf vier 10 cm-Kulturschalen verteilt.

24 h nach der Elektroporation konnte mit der Antibiotika-Behandlung begonnen werden. Als positive Selektion für den Nachweis einer Neomycin-Resistenz und somit der Integration der Vektor-DNA im Genom diente das Neomycin-Analogon Geneticin (G418), welches in einer Konzentration von 200 µg/ml eingesetzt wurde. Gangcyclovir (GANC) wurde erst 48 h nach der Elektroporation in einer Konzentration von 2 µM für die negative Selektion verwendet, da GANC Zellen mit dem *tk*-Gen des Herpes-Simplex-Virus die Zellen abtötet. Während der Selektion wurde das Antibiotika enthaltende Medium jeden Tag gewechselt.

Die überlebenden Zellkolonien wurden nach der Antibiotika-Behandlung isoliert. Dafür wurden sie unter einem Binokularmikroskop unter der Sterilbank mit einer Pipettenspitze vom Boden abgelöst und in 96-Lochplatten mit Feederzellen überführt. In jedes Loch wurden 150 µl Medium gegeben.

2.33.3.3 Kultur und Expansion resistenter Klone

Einen Tag nach ihrer Isolierung wurden die ES-Zellkolonien vereinzelt und in neue 96-Loch-Feederplatten überführt. Zum Vereinzeln der Zellen wurden 30 µl Trypsin/EDTA pro Loch verwendet. Nach zweitägiger Kultivierung wurden die ES-Zellen wieder passagiert. Je nach Zelldichte wurden sie entweder 1:3 oder 1:4 verdünnt. Für die ES-Zell-DNA-Isolierung wurden zwei 96-Loch-Gelatineplatten angelegt. Für die Expandierung der positiven Klone nach der

Selektion auf homologe Rekombination wurden die ES-Zellen auf zwei 96-Loch-Feederplatten zwei Tage nach der Passage als Aggregate von 5 - 10 Zellen eingefroren. Zum Einfrieren verwendete man pro Loch 100 μ l 2 \times Einfriermedium, das in 30 μ l Trypsin/EDTA und 70 μ l Kulturmedium 1:2 verdünnt wurde. Das Einfrieren der Platten bei -80 °C wurde durch Isolierung in mit Papier ausgekleideten Pappschachteln langsam durchgeführt.

2.33.3.4 Überprüfung der ES-Zell-DNA auf homologe Rekombination

Um genügend DNA für eine Southern-Blot-Analyse aus den Zellen zu erhalten, wurde bis zur Konfluenz kultiviert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden 50 μ l Lysispuffer mit 1 mg/ml Proteinase K zu jedem Loch gegeben. Danach wurden die Platten bei 52 °C ü.N. in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Präzipitierung der DNA erfolgte durch Zugabe von 100 μ l kaltem EtOH mit 75 mM NaCl zum Zellysat und Schütteln der Platten für 30 min bei RT.

Nach dem Zentrifugieren wurde die Mischung aus Lysispuffer und EtOH durch Wenden der Platten dekantiert. Die gefällte DNA erschien als Filamente auf dem Boden der Platten. Salz wurde durch dreimaliges Waschen mit 70%igem EtOH entfernt. Die DNA wurde im Anschluß auf der Platte luftgetrocknet und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Für die Hybridisierung mit der 5'-externen-Sonde (Wildtypbande: 5,5 kbp, Rekombinanten-Bande: 4,8 kbp) wurde die genomische DNA mit dem Enzym *EcoRI* verdaut. Erwiesen sich Klone als homolog rekombiniert wurde die DNA der Replika-Platte für die Hybridisierung mit der 3'-externen-Sonde herangezogen. Dazu wurde mit dem Enzym *EcoRV* verdaut (Wildtypbande: 9,7 kbp, Rekombinanten-Bande: 7,2 kbp). Der Verdau-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

3 μ l	10 \times Puffer
1,5 μ l	Restriktionsenzym (40 U/ μ l)
1,2 μ l	Spermidin (0,1 M)
0,3 μ l	RNase A (10 mg/ml)
24 μ l	Wasser

Der DNA-Verdau erfolgte ü.N. bei 37 °C in feuchter Umgebung. Die fragmentierte DNA wurde anschließend in einem 0,8%igem TAE-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen.

2.33.3.5 Vermehrung der positiven ES-Zellklone

Zellklone, für die homologe Rekombination festgestellt wurde, wurden in den 96-Loch-Feederplatten, in denen sie eingefroren wurden, aufgetaut. Die ES-Zellen einer Platte wurden in einem auf 37 °C eingestellten Wasserbad schnell aufgetaut, während die andere Duplikatplatte zur Reserve aufgehoben wurde. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1000 \times g wurde das Einfriermedium entfernt und die positiven ES-Zellklone auf eine neue 96-Loch-Feederplatte überführt. Zwei Tage danach wurden die Zellen in eine 48-Loch-Feederplatte (ca.

1:3 Verdünnung) ausgesät. Die Zellen wurden alle zwei Tage vereinzelt und jeder Klon über eine 24-Loch-Feederplatte, eine 3,5 cm-Feederplatte, eine 6 cm-Feederplatte und eine 10 cm-Feederplatte auf vier 10 cm-Feederplatten expandiert.

Die so expandierten ES-Zellklone wurden über Trypsin/EDTA-Behandlung zu Aggregaten von 10 - 20 Zellen dissoziiert und abzentrifugiert. Die präzipitierten Zellen wurden in kaltem ES-Zellen-Medium resuspendiert und die Zellsuspension mit dem gleichen Volumen an kaltem 2 × Einfriermedium vermischt. Anschließend wurde je 1 ml dieser Suspension in ein Kryoröhrchen rasch abgefüllt. Danach wurden die Röhrchen in ein auf 4 °C gekühltes, mit Isopropanol gefülltes Gefäß gestellt und bei -80 °C eingefroren. Das Isopropanol sollte gewährleisten, daß die Temperatur graduell um ca. 1 °C/min absank. Anschließend wurden die Röhrchen im Flüssig-Stickstofftank aufbewahrt. Je nach Zelldichte konnten von einer 10 cm-Platte drei oder vier Kryoröhrchen eingefroren werden. Die Zellen wurden für die Injektion in Blastocysten zur Erstellung von Chimären verwendet.

2.33.4 Aufzucht der *Ephrin-A5*-Mutanten

In der Regel wurden die transferierten Embryonen 16 Tage nach dem Uterustransfer geboren. Die Chimären unterschieden sich von den Nichtchimären durch das braun-schwarz-gefleckte Fell. Geschlechtsreife Chimären in einem Alter von 6 - 8 Wochen wurden mit Mäusen vom Stamm C57BL/6 verpaart, um die Fähigkeit der ES-Zellen, zur Keimbahn beizutragen, zu überprüfen. Nach einer dreiwöchigen Trächtigkeit wurden Nachkommen geboren. Wenn die Keimzellen aus den manipulierten ES-Zellen stammten, bekamen die Jungtiere ein braunes Fell. Die Tiere wurden nach ca. 3 Wochen vom Elternpaar nach Geschlecht getrennt und erhielten über Lochung der Ohren eine Kennnummer. Zur Genotypisierung wurde ein Stück Schwanz abgeschnitten und die gewonnene DNA mittels Southern-Blot-Analyse auf Transmission des mutierten Allels überprüft.

Heterozygote Mäuse einer Generation wurden untereinander gekreuzt um kongene Mäuse zu erhalten. Nachkommen dieser Verpaarungen wurden sowohl für embryonale als auch adulte Untersuchungen verwendet. Embryonen gewünschter Stadien wurden der Mutter entnommen, nachdem über Kontrolle des Vaginalpfropfens der Empfängniszeitpunkt festgelegt wurde. Die weitere Haltung erfolgte wie unter 2.5 beschrieben.

2.34 Präparation von DNA für die Oocyten-Mikroinjektion

Die Klonierungsschritte zur Herstellung des in dieser Arbeit verwendeten Konstrukts zur Generierung transgener Mäuse ist in 3.8.2 beschrieben. 20 µg Plasmid-DNA wurden über Restriktionsverdau von bakteriellen Vektorsequenzen befreit und in einem präparativen 1%igem TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das DNA-Fragment nach 2. aus dem Gel isoliert in 200 - 300 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)/ 0,1 mM EDTA (Mikroinjektionspuffer) eluiert und so gut wie möglich durch wiederholtes Zentrifugieren und Abpipetieren vom Silikat befreit. Anschließend wurde das Eluat durch einen Filter mit 0,22 µm

Porendurchmesser passiert (Millipore, MILLEX-GV4, Kat.-Nr. SLGVL04OS) und auf einer Membran von 0,05 μ m Porendurchmesser (Millipore, type VM, Kat.-Nr. VMWP02500) gegen ein Volumen von 20 - 30 ml Mikroinjektionspuffer bei RT für 3 - 4 h mikrodialysiert. Die DNA-Konzentration wurde im Anschluß photometrisch über OD_{260} und nach Elektrophorese visuell über Vergleich mit einem konzentrationsstandardisierten DNA-Molekulargewichtsstandard bestimmt. Für die Mikroinjektion wurde die DNA in einer Konzentration von 2 - 4 ng/ μ l verdünnt.

Die Injektion von 1 - 2 pl der aufgereinigten DNA erfolgte in den (größeren) männlichen Vorkern befruchteter Eizellen. Diese wurden für einige Stunden kultiviert, bevor sie in den Eileiter einer scheinträchtigen Maus transferiert wurden. Nach 9 - 15 Tagen wurde die Amme getötet, die Embryonen entnommen und der X-Gal-Färbung unterzogen. Die Genotypisierung erfolgte mit DNA, die aus dem zuvor präparierten Amnion isoliert wurde.

3 Ergebnisse

3.1 cDNA-Isolierung des *Ephrin-A5*-Gens und Ableitung der Proteinstruktur

Die cDNA des *Ephrin-A5*-Gens wurde ursprünglich beim Huhn von DRESCHER *et al.* (1995; GenBank acc. no. X90377) und human von WINSLOW *et al.* (1995; GenBank acc. no. NM_001962) isoliert. Damit stand bereits die Sequenz zwei relativ divergenter Spezies zur Verfügung und ermöglichte es aus konservierten Bereichen geeignete Oligonukleotidprimer zu erstellen, um mittels degenerierter PCR nach der Maus-cDNA zu suchen. In der Tat gelang es Dr. Uwe Drescher (MPI, Tübingen) auf diesem Wege ein Fragment der cDNA der Maus zu isolieren, welches er uns freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat. Dieses Fragment entspricht im wesentlichen Exon II und III von *Ephrin-A5*, und wurde für das Absuchen der Bibliothek nach genomischen Klonen verwendet. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde ein weiteres Fragment von Dr. David Wilkinson (London) zur Verfügung gestellt, welches für die *in situ*-Hybridisierungen und zur Erstellung von Primern für die 5'-RACE verwendet wurde. Die Sequenz dieser cDNA-Fragmente entsprach erwartungsgemäß, der kurz darauf von FLENIKEN *et al.* (1996) publizierten Sequenz für Maus-*Ephrin-A5* (GenBank acc. no. U90664). Die daraus abgeleitete Protein-Sequenz zeigt alle Charakteristika eines Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-gebundenen Zelloberflächen-Moleküls (Abb. 3.1). Ein hydrophober N-terminaler Bereich, der einen Teil des Signalpeptids für den Export aus der Zelle darstellt, wird von einem weitgehend hydrophilen Peptid gefolgt, welches in seinem abschließenden C-terminalen Bereich wieder eine Signalsequenz mit hydrophoben Resten enthält, die für die GPI-Anbindung an die Zellmembran verantwortlich ist. Die jeweils terminalen Signalsequenzen werden während der Prozessierung entfernt und sind im reifen Protein nicht mehr enthalten (Übersicht bei UDENFRIED und KODUKULA, 1995). Die Spaltungsstelle für die N-terminale Signalsequenz wurde nach Ser²⁰ postuliert (VON HEIJNE, 1986) und die Spaltungsstelle für die C-terminale Signalsequenz (-Stelle) nach Asn²⁰³ (FERGUSON und WILLIAMS, 1988; CROSS, 1990). Das reife Protein besteht demnach aus 183 Aminosäureresten zwischen Gln²¹ und Asn²⁰³. Zusätzlich konnte festgestellt werden, daß Ephrin-A5 wie alle anderen bekannten Ephrine vier konsevierte Cystein-Reste besitzt, die für die Interaktion mit den Rezeptoren von Wichtigkeit sind (Vergleiche Abb. 3.2).

Bei Ephrin-A5 der Maus handelt es sich demnach um ein Zelloberflächen-Protein, das über eine lipidartige GPI-Verbindung an die Außenseite der Zellmembran gebunden ist. Außerdem konnte festgestellt werden, daß *Ephrin-A5* innerhalb seines kodierenden Bereiches alternativ gespleißt wird (Exon IV) und damit für zwei alternative Proteine kodiert (FLENIKEN *et al.*, 1996; Vergl. Abb. 3.28). Das kleinere Transkript (*Ephrin-A5s*) kodiert für ein - im C-terminalen, nicht-rezeptorbindenden Bereich, um 27 Aminosäurereste verkürztes Protein (Ephrin-A5-), welches sich in seiner Aktivität von der längeren Form (Ephrin-A5-) nicht unterscheidet (LAI *et al.*, 1999).

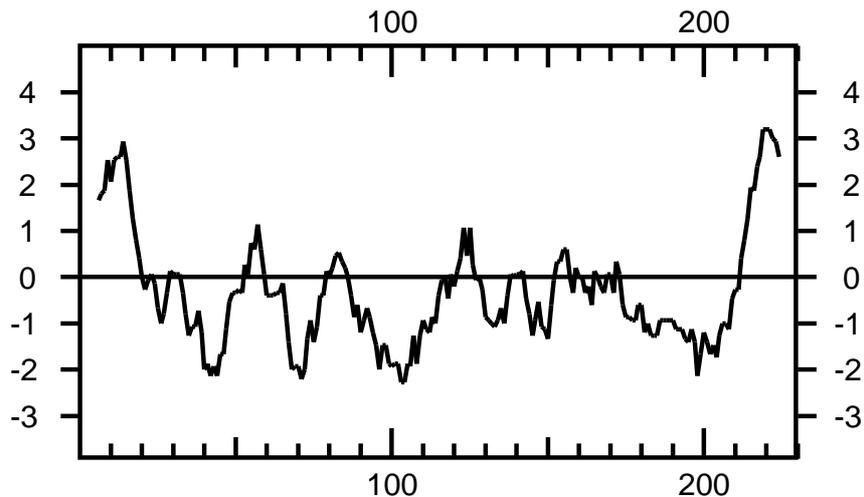


Abb. 3.1: Hydropathie-Index (mittlere Hydropathie von neun aufeinanderfolgenden Resten) der abgeleiteten Sequenz von Ephrin-A5 der Maus. Positive Werte zeigen hydrophobere Regionen der Polypeptidkette an, negative Werte hydrophilere Regionen. Die Abszisse gibt die Position der Aminosäuren in der Sequenz an. (Nach KYTE und DOOLITTLE, 1982). Das abgeleitete Peptid zeigt einen für GPI-gebundene Zelloberflächen-Moleküle charakteristischen Hydropathie-Index.

3.2 Struktur des *Ephrin-A5*-Gens

3.2.1 Amplifikation und Sequenzbestimmung der cDNA über 5'-RACE

Um das 5'-Ende der cDNA zu erhalten und damit die Transkriptionsinitiationsstelle zu kartieren wurde RNA aus Embryonen des Stadiums E 10,5 präpariert. Anschließend wurden *Ephrin-A5*-Transkripte unter Verwendung des *Ephrin-A5*-genspezifischen Primers 1 (GSP-1), wie in 2.19 und 2.20 beschrieben revers transkribiert und über 5'-RACE amplifiziert. Die Amplifikation der cDNA erfolgte mit den im Kit enthaltenen 5'-Primern (5'-RACE Abridged Anchor Primer und Abridged Universal Amplification Primer) und den *Ephrin-A5*-spezifischen Gegenprimern deren Sequenz Tabelle 3.1 entnommen werden kann. Dabei wurden sukzessive Primer eingesetzt, die sich immer mehr dem 5'-Ende näherten (*primer extension*). Spezifische PCR-Produkte wurden subkloniert und sequenziert. Nachdem keine Amplifikationsprodukte mehr gewonnen werden konnten, die eine Verlängerung der ermittelten Sequenz zum 5'-Ende hin ermöglichten, wurde die 5'-RACE abgeschlossen und das 5'-Ende der ermittelten Sequenz als Transkriptionsinitiationsstelle festgelegt. Die ermittelte Sequenz, die dem 5'-nichttranslatierten Bereich zuzurechnen ist, konnte über Vergleich mit der genomischen Sequenz aus -1.6 gänzlich dem Exon I zugerechnet werden auf dem sie kartiert.

ACGCGCGCGGGCTCGCGTGGTGCCGAGGCTGCTGCCGCCTGGGCCCGCCGCGGCAGTCGGC	60
TTTACACGCAGGTCATTAACGAGGGGGCGTCCCCGAGGAGATTTTTTTTCCATAAAGCA	120
TTTTTTCTCTCCTTTTCTTTTTTTTTTTTTTCCCTCCTTTTTTGCAAAACTGACTTTTTCCCC	180
TCCTTTCTACTTCTCGCCAGTCTTCCCAACCTCTCCAGGCTGCTCGCGCCGCTGCACTCA	240
AGTTTATTTTTCCCGCCTGGGCAGAGGTTTTAGGATTCGGTTCGGTGGCTTTCACCTCTCGT	300
TACTGCTGTGCCAAGGAGGGAAGGAGGAGGCAGCTCCGGATCGGGAAGGTTTTCTGATG	360
TAGTCATCGGGGAGGTGCCAGCAGCTCGCGTGTGCTCCCTCTCCCTTTTTCCCTCCCGGT	420
TTCAAACCTGATTGATGAATCTCTACAAGTTGCTGGGGTTGGGGCCGGAGAGGTCCGAGTC	480
CCAGGGACACTTCTGAGAGCTCCCCCCCCGGGGCTCTGGGCACGCCGTGCGGGGGTTTACGC	540
CTCTCTCCCGGAAGGCGAACGGAGACTGTATCAGCCCATCCCGGACTTGGAGGGCTCCA	600
TCCGAAAGTGATTGTTTTCCCTCTCGCTTCTCAGCCCGCAGTTGGCTTGGCGTCCGCCCT	660
GCAGGTTTTGGGCATCCCCGGCCCCGCTGGCTGGCTGGTTTACAACTCTGCTCTTCAATC	720
ACTCCGCGGCACCCACACCCGGCCAAGACAAGCTAGCAGGAGAAATCCCCGACTCAGCCA	780
GCGCCCCGGGGTGCATCTCGCTCTGCCTCTGCGGTTCGGACTCCTTTGGGGACCTGCTGG	840
AAGACGTGAAGAGCCAACTTTTCTTGGAGCCTTTTCCGAAGCAAGACCCGCTCCTCCTC	900
TCCTCGCCTGAGCGCTCGGCTGCGGCTTTGGGCAGTTCAGGACTCCGGCAGAGCCGGGC	960
TTGCGGATCCAGATCGCCACTCTTCTCTGCGCACCTCCGGGTACCGCAGTCCACAGGACT	1020
CCTGCGAGCCTTGGCGGGGGTGCCTGGCCAAGGCACAGAAGGGAGGCTCCGGACTGCTT	1080
CCAGCTCCTGGGGACACCAAGTGTGAGGACGCCCCCCCCCCCCCTCCACACAGCGC	1140
CCTCCTCCTGCAGTTTCTCTCCGGCCGCAAAGTAACCTTGGAAACAAAGCGGGGCGCACGG	1200
TGAGGGCCCCAGCGCGGCGGAGGAAGCCCGTGCAGACCGCGCGCGGACACTGAGCCGGGC	1260
CCGGCGGGCCGGTGTATGTCTCCCCGAGCCGCGCGCTCAACTCCCCGTGACTGTGCAG	1320
CGCGCGCCGCCCTGCCCGAACCCGCGCTGCCGCGCCCGGCCCGCACGCACCTCCTC	1380
CTCCCGGGGTGACCGGCTTGCAGCCGCCGCCGAGACACAGTCCGCACCCCTACTCCCG	1440
CCCTCGCCGCGCCACCGCACACACGCACGCGTCTCTCCGTCTTGTGATTCTTCTCCCCT	1500
CCCGAGCCCTCAGTGGGGGTGCGAGTTTGTCCCCCGCCCCAGCCACTGCCTCCTTCTT	1560
CTCTCTCTCCTCTTCTCTTCTCCTCCCGCGCTCGCCGCGCGCCTCTCGCCCTTCATCGTA	1620
TTTATTCCTATTTATTTGGCGTCCGCTCTCTTCTGCTGCCCTCTCCCTCCCTCCCTCG	1680
GATCCCCGATCTCTCCCCGAGTGGCGCGTCCGGGGCTCCGCCGCTGGCTAGGCGTGATG	1740
	M
	1
TTGACAGTGGAGATGTTGACGCTGCTCTTTCTGGTGTCTGGATGTGTGTGTTAGCCAG	1800
L H V E M L T L L F L V L W M C V F S* Q	21
GACCCGGGCTCCAAAGTCGTCGCCGACCGCTACGCCGTCTACTGGAACAGCAGCAACCCC	1860
D P G S K V V A D R Y A V Y W N S S N P	41
AGATTCAGAGGGGTGACTACCACATTGATGTCTGTATCAATGACTACCTGGATGTTTTTC	1920
R F Q R G D Y H I D V C I N D Y L D V F	61
TGCCCTCACTATGAGGACTCTGTCCCAGAAGACAAGACTGAGCGCTACGTCTGTACATG	1980
C P H Y E D S V P E D K T E R Y V L Y M	81
GTGAATTTTGTGAGGTACAGTGCCTGCGACCACACGTCCAAAGGGTTCAAGAGATGGGAA	2040
V N F D G Y S A C D H T S K G F K R W E	101
TGTAACCGGCCTCACTCCCCAAACGGACCGCTGAAGTTCTCGGAAAAATTCCAGCTCTTC	2100
C N R P H S P N G P L K F S E K F Q L F	121
ACTCCCTTTTCTTTAGGATTTGAATTCAGGCCAGCCGAGAGTATTTCTACATCTCCTCT	2160
T P F S L G F E F R P G R E Y F Y I S S	141
GCAATCCAGACAACGGAAGAAGGTCCTGTCTAAAGCTCAAAGTCTTTGTGAGACCAACA	2220
A I P D N G R R S C L K L K V F V R P T	161
AAATAGCTGTATGAAAATATAGGTGTTTCATGATCGTGTTCGATGTTAACGACAAAGTA	2280
N S C M K T I G V H D R V F D V N D K V	181
GAAAATTCATTAGAACCAGCAGATGACACCGTACATGAGTCAGCCGAGCCATCCCGCGGT	2340
E N S L E P A D D T V H E S A E P S R G	201
GAGAACGCGGCGCAGACACCAAGGATACCCAGCCGCCTTTTGGCAATCCTACTGTTCTCTC	2400
E N* A A Q T P R I P S R L L A I L L F L	221
CTGGCGATGCTTTTGGACATTATAGCACAGTCTCCTCCCGTCCGCTGTGAG	2551
L A M L L T L STOP	228

Abb. 3.2 zeigt die ermittelte und bekannte cDNA-Sequenz von *Ephrin-A5* sowie die abgeleitete Proteinsequenz. Das ATG-Start-Codon sowie das TAG-Stop-Codon sind unterstrichen. Die Exongrenzen sind durch Pfeilspitzen angezeigt. Sterne (*) stehen für Peptid-Spaltungsstellen. Die vier unter den Ephrinen konservierten Cystein-Reste sind durch fette Buchstaben angegeben.

Tabelle 3.1: Die für die 5'-RACE verwendeten genspezifischen Primer (GSPs).

Name	Sequenz 5' - 3' (Länge)	T _m [°C]
GSP-1	GGT TGC TGC TGT TCC AGT AGA CG (23)	57,7
GSP-2	CTG CAC AGT CAC GGG GAG TTG AGC (24)	63,7
GSP-3	TGC GGG GAG ACA TAC ACC GGC (21)	63,5
GSP-4	GGT CTG CAC GGG CTT TCT TCC G (22)	63,6
GSP-5	GGC GAC GCC AAG CCA ACT GC (20)	64,4
GSP-6	GGG AAA CAA TCA CTT TCG GAT GGA GC(26)	63,5
GSP-7	CTG ATG ACA GTC TCC GTT CGC CTTC(25)	62,0
GSP-8	ATG ACT ACA TCA GAA AAC CTT CCC GAT C(28)	59,9
GSP-9	GCA GTA ACG AGA GGT GAA AGC CAC C (25)	61,1

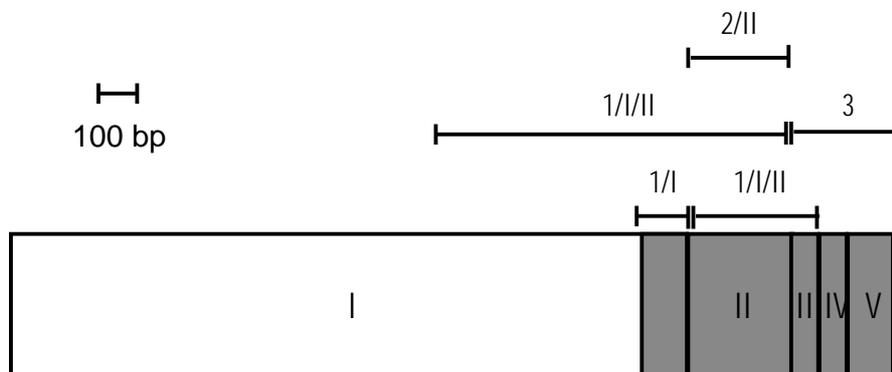


Abb.3.3: Schematische Darstellung der in Abb.3.2 angegebenen cDNA-Sequenz. Die Abschnitte einzelner Exons (Römische Ziffern) sind als Rechtecke dargestellt. Grau schattierte Rechtecke stellen den kodierenden Bereich dar. Position und Ausdehnung der einzelnen, in dieser Arbeit verwendeten *Ephrin-A5*-Sonden sind als Linien dargestellt. Ihre Bezeichnung ist über den Linien angegeben. Die Organisation des 3'-nichttranslatierten Bereichs wurde hier nicht charakterisiert, so daß das 3'-Ende der cDNA offen bleibt.

3.2.2 Genomische Southern-Blot-Analyse des *Ephrin-A5*-Gens

Ephrin-A5 liegt in einer einzelnen Kopie im Maus-Genom vor, wie aus der Hybridisierung genomischer DNA mit der Sonde *Ephrin-A5-2/II* festgestellt wurde (Abb. 3.4). Diese Sonde entspricht dem zweiten Exon. Die Hybridisierung von genomischen Fragmenten, die mit Restriktionendonukleasen wie *Asp718* (*KpnI*), *BamHI*, *EcoRI* oder *HindIII* gepalten wurden ergab jeweils ein Signal im Bereich von 5,5 bis 8 kbp.

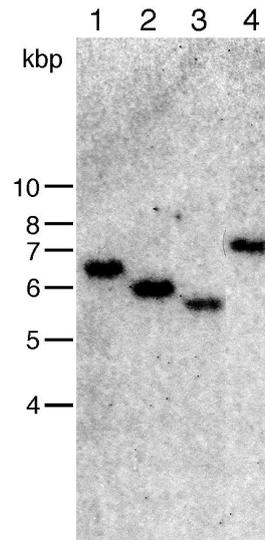


Abb. 3.4 zeigt das Ergebnis der genomischen Southern-Blot-Analyse für *Ephrin-A5*. Die DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut und mit der Sonde *Ephrin-A5-2/II*, die weitgehend dem Exon II entspricht, unter Verwendung der Rapid-Hyb-Lösung hybridisiert. In allen Fällen konnte nur ein einziges hybridisierendes Fragment detektiert werden. 1: *Asp718* (*KpnI*), 2: *BamHI*, 3: *EcoRI*, 4: *HindIII*

3.2.3 Isolierung und Kartierung der λ -Phagen

Bereits im Hinblick auf die spätere Mutierung des *Ephrin-A5*-Gens, über homologe Rekombination in ES-Zellen, wurden Phagenklone isogener Maus-DNA isoliert und charakterisiert. Die Verwendung von isogener, d.h. aus dem gleichen Mausstamm erhaltener DNA für das Transgen kann die Frequenz homologer Rekombination deutlich steigern (DENG und CAPECCHI, 1992; TE RIELE *et al.*, 1992; VAN DEURSEN und WIERINGA, 1992; WURST *et al.*, 1994). Phagen, die das *Ephrin-A5*-Gen enthalten wurden aus einer genomischen Bibliothek des Mausstammes 129/Sv isoliert (von Dr. A. Reaume etabliert und freundlicherweise von Dr. Janet Rossant zur Verfügung gestellt) und sind somit isogen zu den in dieser Arbeit verwendeten ES-Zellen, die den Sublinien 129/Sv \times 129/SvJ (R1) und 129/Sv (TBV2) entstammen. Zusätzlich wurde die ES-Zelllinie E14 verwendet, die der nicht isogenen Sublinie 129/Ola entstammt. In mehreren Experimenten wurden jeweils $6 \cdot 10^5$ Phagen mit verschiedenen Sonden abgesucht. Phagen, die über Hybridisierung mit der Sonde *Ephrin-A5-1/I*, Sonde *Ephrin-A5-2/II/III*, oder Sonde *Ephrin-A5-3* isoliert wurden, wurden respektive mit -1, -2 oder -3 gekennzeichnet. Initial konnten aus der Hybridisierung mit Sonde *Ephrin-A5-1/I* zehn Phagen klonal isoliert werden, von denen -1.6 näher charakterisiert wurde. Aus der Hybridisierung mit Sonde *Ephrin-A5-2/II/III* konnten zwei Phagen (-2.1 und -2.5) klonal isoliert werden, die beide einer eingehenden Charakterisierung unterzogen wurden und aus der Suche mit der Sonde *Ephrin-A5-3* wurden ebenfalls zwei isolierte Phagen charakterisiert (-3.1 und -3.2).

Zuerst wurden die isolierten Phagen einer Restriktionskartierung unterzogen und zur detaillierten Analyse teilweise sequenziert. Die Restriktionskarte für den *Ephrin-A5*-Locus wurde wie in 2.17 beschrieben erstellt und ist Abb. 3.6 für die analysierten λ -Phagen zu entnehmen. Ein exemplarisches Ergebnis aus der Restriktionskartierung eines Teilfragmentes, des Phagen λ -2.5 mit dem FLASH[®] Chemiluminescent Gene Mapping Kit ist aus der Abbildung 3.5 zu entnehmen.

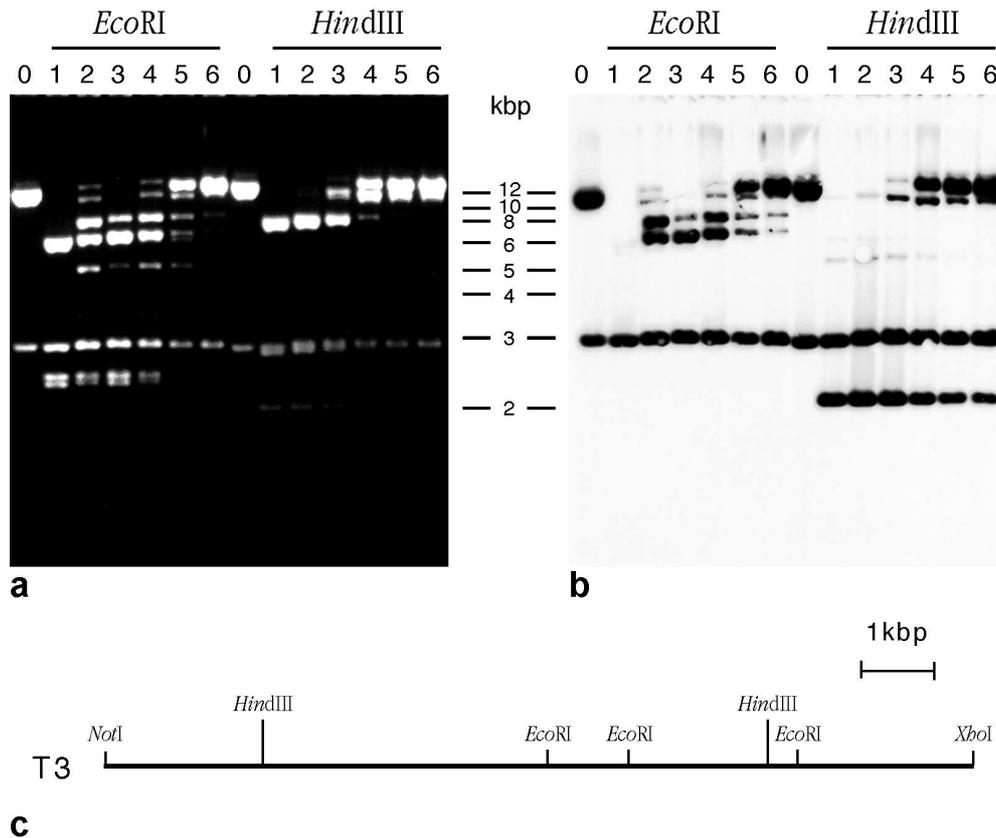


Abb. 3.5 zeigt das Ergebnis aus der Restriktionskartierung des 11,8 kbp langen *NotI/XhoI*-Fragments aus dem Phagen λ -2.5 mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* und *HindIII*. In a ist das EtBr-gefärbte Gelbild, in b das Resultat aus der nichtradioaktiven Hybridisierung mit dem T3-Oligonukleotid zu sehen. In c ist die graphische Darstellung der erstellten Restriktionskarte für die beiden verwendeten Restriktionsenzyme zu sehen. Die bei ca. 3 kbp sichtbaren Signale entsprechen dem Vektor pBluescript II KS+ in den das Fragment subkloniert wurde und der ebenfalls die T3-Sequenz besitzt. Je Spur wurden 1 μ g DNA aufgetragen, die nach dem angegebenen Schema in 2.17 verdaut wurden. Die DNA in Spur 0 wurde zur Kontrolle auf Excision des Inserts nur mit *NotI/XhoI* verdaut. In Spur 1 wurde ein kompletter Verdau ohne Zusatz von EtBr durchgeführt während in den Spuren 2 - 6 die EtBr-Konzentration graduell erhöht wurde.

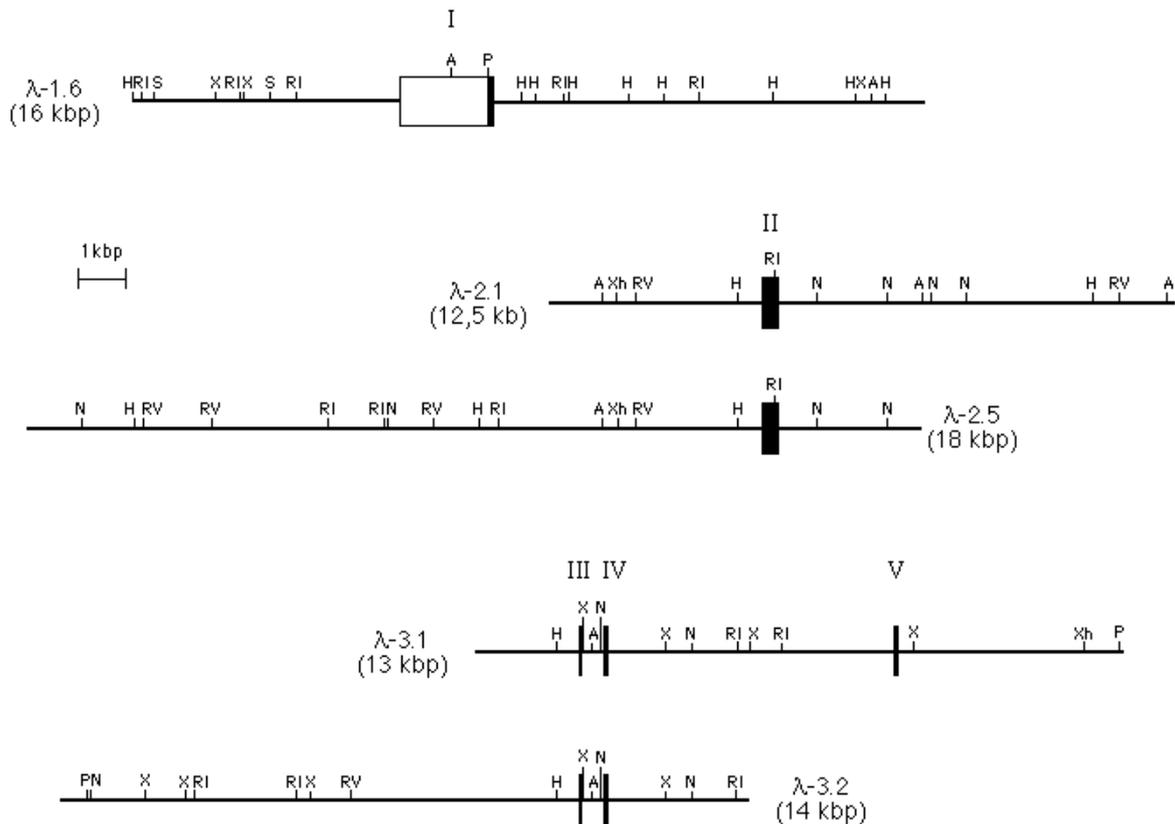


Abb. 3.6 zeigt die für die Phagen -1.6, -2.1, -2.5, -3.1 und -3.2 erstellten Restriktionskarten. Die über Sequenzanalyse kartierten Exons sind als Rechtecke eingezeichnet. Die Rechtecke sind schwarz gefüllt für kodierende und weiß für nicht kodierende Bereiche. A: *Asp718* (*KpnI*), H: *HindIII*, P: *PmlI*, N: *NcoI*, RI: *EcoRI*, RV: *EcoRV*, S: *SpeI*, X: *XbaI*, Xh: *XhoI*

Aus den drei, mit jeweils verschiedenen Sonden durchgeführten Suchen konnten keine Phagen isoliert werden, die überlappende Fragmente zu Phagen des jeweils anderen Screens enthalten. Um die fehlenden Intron-Sequenzen zwischen Exon I und II und zwischen Exon II und III zu erhalten wurde zusätzlich eine maschinell erstellte *bacterial artificial chromosome* (BAC)-Bibliothek (Research Genetics, Kat.-Nr. RPCI-23) nach genomischen *Ephrin-A5*-Klonen abgesucht. Da diese Bank außerordentlich große genomische DNA-Fragmente des Maus-Stamms 129/Sv enthält (üblicherweise zwischen 150 und 250 kbp) ist die Wahrscheinlichkeit Klone zu erhalten, die den gesamten *Ephrin-A5*-Locus enthalten deutlich erhöht. Diese Suche sollte somit Aufschluß über die Länge der intronischen Sequenzen liefern, die mit den Phagen-Bibliothek-Screens nicht erhalten werden konnten. Ein Teil der Bibliothek (83.000 Klone auf 3 Filtern 4,8 Genomäquivalente) wurde gleichzeitig mit den Sonden *Ephrin-A5-2/II/III* und *Ephrin-A5-3* abgesucht. Aus der Suche wurden fünf Klone erhalten (370L15, 453G10, 399A10, 319A16, 376C21), die Sequenzen des *Ephrin-A5*-Gens enthalten. Über Minipräparation isolierte DNA dieser Klone wurde als Matritze für die PCR-Amplifikation (*TaqPlus Long PCR System*,

Stratagene, Kat.-Nr. 600203) der fehlenden Intron-Abschnitte verwendet. Die hierfür verwendeten Oligonukleotidprimer sind folgender Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 3.2: Die für die Amplifikation der fehlenden Intron-Abschnitte verwendeten Primer.

Name	Sequenz 5´ 3´	T _m [°C]	Fragment aus
<i>Efn-A5</i> -1.6-3´	CAA ACA TGG AGG ATG AAA GCC TTT CC	61,8	
<i>Efn-A5</i> -2.5-5´	CAG GAA ACC AGC TGG GCA AAC C	61,4	Intron 1/4,6 kbp
<i>Efn-A5</i> -2.1-3´	CGA GAA AGT AAT GCC AGC CTG TGG	59,8	
<i>Efn-A5</i> -3.1-5´	TTT CTA CTA CAA AGG GCC ACC AGC ATC C	60,5	Intron 2/7,3 kbp

Tab. 3.3: Auflistung der bestimmten Exon/Intron-Grenzen von Maus-*Ephrin-A5*. Exon-Sequenzen sind groß- und Intron-Sequenzen kleingeschrieben. Die Codons sind durch die Aminosäurereste für die sie kodieren angezeigt.

Intron	Spleiß-Donorstelle* A ₆₂ G ₇₇ <u>GTA</u> A ₆₀ A ₇₄ G ₈₄ T ₅₀	Spleiß-Akzeptorstelle* 11 Py ₇₇₋₉₁ NC ₇₈ <u>AGG</u> ₅₅	Intron-Größe	Intron-Phase
1	CCCAGgtaaggtggccg Pro Ar	ttctgtttccaacagATTC gPhe	26,8 kbp	2
2	ATCTgtgagtagcttg Ile S	ttgcctcaccacagCCTCT er Ser	20,7 kbp	1
3	ACAAGtaagttctaga Thr A	ctattttcgttatagATAGC sn Ser	442 bp	1
4	GCAggttagtatgctt Ala A	ctctctattgaacagATGAC sp Asp	6,8 kbp	1
5	TAGCACAGTCTCgtcgctgctc Stop		1,4 kbp	

* Konsensus -Sequenzen basieren auf den Daten von PADGETT *et al.* (1986) und FICHANT (1992). Die tiefgestellten Zahlen stehen für den prozentuellen Anteil des Vorkommens im eukaryotischen Genom. Invariable Positionen sind fett und unterstrichen angegeben.

Wie der Tab. 3.3 entnommen werden kann variieren die fünf charakterisierten Introns von *Ephrin-A5* in ihrer Länge zwischen 442 bp und 26,8 kbp. Mit Ausnahme von Intron 1, daß sich in Phase 2 im Vergleich zum offenen Leserahmen befindet, befinden sich die Introns 2 - 4, die kodierende Sequenzen trennen, in Phase 1. Eine weitere Besonderheit stellt, mit ca. 1,7 kb die ungewöhnlich lange Sequenz des 5´-nichttranslatierten Bereichs dar. Für den 3´-nichttranslatierten Bereich kann demnach für die zwei dominanten Spleißvarianten von 5 und 7 kb (s. 3.3.1) eine Größe von ca. 4,5 und 2,5 kb respektive abgeleitet werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß das im Maus-Genom in einer einzelnen Kopie vorliegende *Ephrin-A5*-Gen aus mindestens sechs Exons besteht, die sich über einen Abschnitt von mindestens 60 kbp erstrecken. Die gesamte genomische Organisation liegt nicht vor, da das 3´-Ende des Gens nicht vollends charakterisiert wurde. Für die Planung der

Mutagenisierungsstrategie erwies sich die die Kartierung des 3'-nichttranslatierten Bereiches als nicht notwendig.

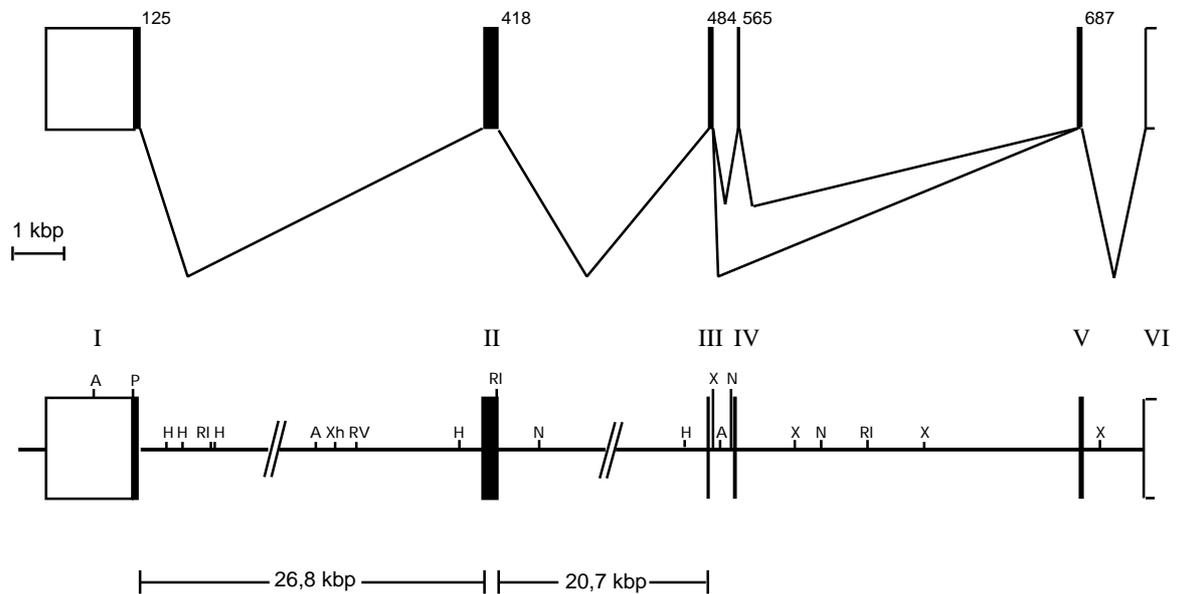


Abb. 3.7: Zusammenfassende Darstellung der Organisation von *Ephrin-A5* (für den analysierten Bereich) und der aus diesem Locus generierten Transkripte. Rechtecke representieren Exons. Kodierende Sequenzen sind schwarz unterlegt. Der charakterisierte Bereich umfaßt ca. 60 kbp. Die Ausdehnung des Exons VI ist zum 3'-Ende hin offen. A: *Asp718 (KpnI)*, RI: *EcoRI*, RV: *EcoRV*, H: *HindIII*, P: *PmlI*, N: *NcoI*, X: *XbaI*, Xh: *XhoI*

3.3 Expression des *Ephrin-A5*-Gens

3.3.1 Northern-Blot-Analyse

Gesamt-RNA aus Fibroblasten, ES-Zellen, juvenilem Gehirn (P 8) sowie aus Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien wurde einer Northern-Blot-Hybridisierung mit der *Ephrin-A5*-spezifischen Sonde 3 unterzogen, um die Größe des Transkripts und eventuelle alternative Spleißformen zu identifizieren. In allen untersuchten Proben konnten *Ephrin-A5*-Transkripte in mindestens zwei Spleißformen detektiert werden. Die Größen der beiden Transkripte liegen bei ca. 5 und 7 kb und sind in allen untersuchten Proben in gleichen Mengen detektierbar. Da die Größe der beiden Spleißvarianten es nicht zuläßt über Northern-Blot-Analyse weitere, sich in der Größe nur geringfügig unterscheidende Spleißformen zu erkennen, kann deren Vorhandensein nicht ausgeschlossen werden. Das alternative Spleißen findet im 3'-nichttranslatierten Bereich statt, der bislang nicht charakterisiert wurde.

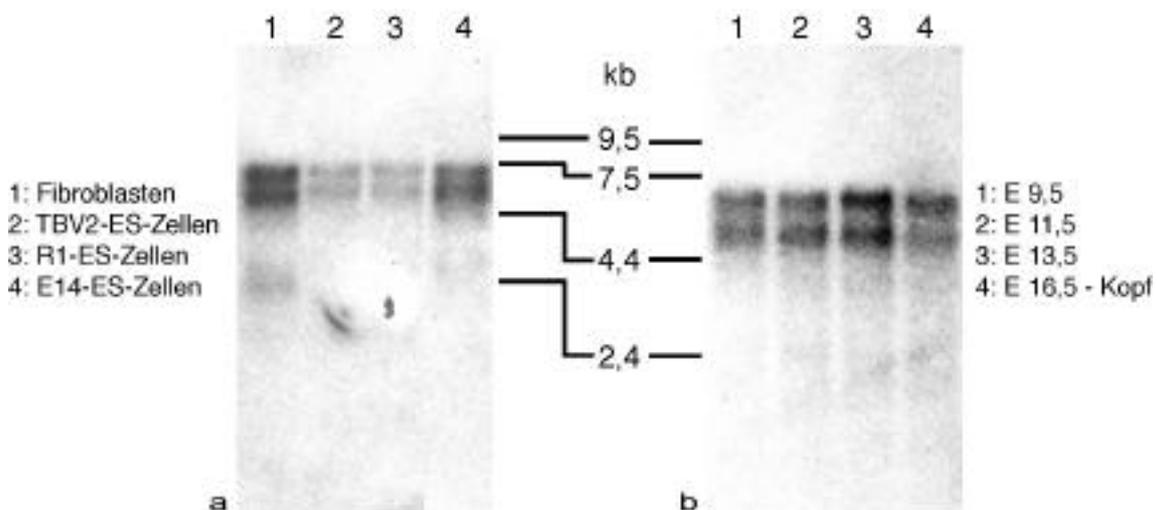


Abb 3.8: Northern-Blot-Hybridisierung mit der Sonde *Ephrin-A5*-3. Je 5 (a) bzw. 10 μ g (b) Gesamt-RNA wurden auf Nylonfilter transferiert und bei 68 °C mit QuickHyb[®]-Puffer für ca. 2 h hybridisiert. Gewaschen wurde bei 65 °C in 0,1 \times SSC/0,1% SDS. In allen untersuchten Proben konnten *Ephrin-A5*-Transkripte detektiert werden. Die zwei zu erkennenden Spleißvarianten haben eine Größe von 5 und 7 kb. Die RNA-Quellen sind jeweils angegeben.

3.3.2 Embryonale Expression von *Ephrin-A5*

Um das zeitliche und räumliche Muster der Expression des *Ephrin-A5*-Gens (*Ephrin-A5*) zu bestimmen, wurden Ganzkörperpräparate von Embryonen sowie Schnitte embryonalen Gewebes mit der Digoxigenin-markierten cRNA-Sonde *Ephrin-A5*-1/1/1 hybridisiert. Bereits bei E 6,5, dem Beginn der Gastrulation, kann *Ephrin-A5* in embryonalen wie extraembryonalen

Strukturen nachgewiesen werden. Diese Expression ist im Ektoderm und Mesoderm, aber nicht im visceralen Mesoderm und der Ektoplazenta vorhanden (Abb. 3.9a und Daten nicht abgebildet). Die Expression in den erwähnten Strukturen setzt sich ausgeprägter bei E 7,5 fort (Abb. 3.9b).

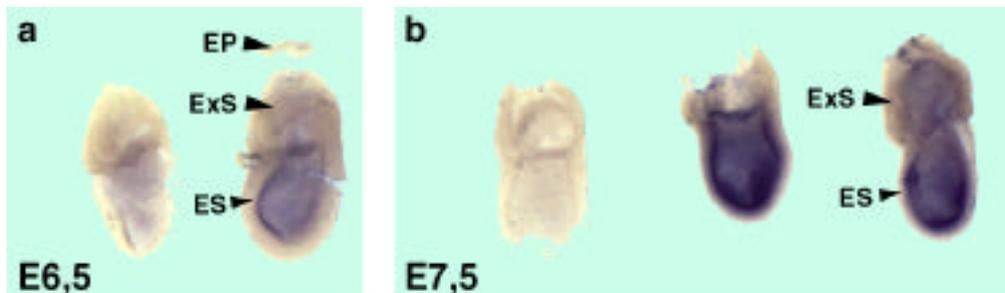


Abb 3.9 Expression von *Ephrin-A5* bei E 6,5 (a) und E 7,5 (b) visualisiert durch *in situ*-Hybridisierung an Ganzkörperpräparaten. Die jeweils links gezeigten Embryonen sind als negativ-Kontrolle mit der Sonde des kodierenden Stranges inkubiert worden. Hierbei konnten keine spezifischen Hybridisierungssignale erkannt werden. Der mittlere und rechte Embryo in b unterscheiden sich geringfügig im Entwicklungsstadium. EP: Ektoplazenta, ES: embryonale Strukturen, ExS: extraembryonale Strukturen.

Um E 8,5, bei einsetzender Drehung des Embryos, kann die Expression von *Ephrin-A5* in den Kopffalten, mit einem Maximum im distalen Abschnitt, detektiert werden (Abb. 3.10a). Bei E 8,75 - E 9,0 zeigt sich neben dieser Expressionsdomäne, die die Krümmung der Kopffalte mitvollzieht ein weiterer Bereich intensiver *Ephrin-A5*-Expression, die dem zukünftigen Mesencephalon entspricht (Abb. 3.10b). Diese Expressionsdomäne bleibt während der gesamten Entwicklung erhalten, besitzt eine scharfe posteriore Grenze am Isthmus, der Einschnürung zwischen Mesencephalon und Metencephalon und verläuft in einem posterior-anterior abnehmenden Gradienten im Colliculus superior (Abb. 3.10c/d/e/f und Abb. 3.11a/e). Ab E 10 nimmt die Dynamik der *Ephrin-A5*-Expression deutlich zu. Neben den Expressionsdomänen in dem sich entwickelnden Gehirns, können *Ephrin-A5*-Transkripte im nasalen Mesenchym, den Branchialbögen, dorso-proximal in den Extremitätenknospen und schwach im posterioren Abschnitt der Somiten detektiert werden (Abb. 3.10c/d). In späteren Stadien nehmen die Expressionsdomänen mesenchymaler Elemente des Ober- und Unterkiefers in Ausdehnung und Intensität zu. Insbesondere das nasale Mesenchym sowie ein weiter dorsal gelegener Abschnitt, der der Ursprungsregion des vomeronasalen Organs (Jacobsonsches Organ) entspricht treten als prominente Expressionsterritorien klar hervor (Abb. 3.10e/g/i). Ab E 10,5 wird *Ephrin-A5* in einem nasal-temporal abnehmenden Gradienten in der Retina exprimiert (Abb. 3.10d/e/g und Abb. 3.10a/c). Ab E 11,5 kann Expression von *Ephrin-A5* entlang der Rückenlinie im dorsalen Mesenchym und dem Ektoderm gesehen werden, während die Spinalganglien frei bleiben (Abb. 3.10h und Abb. 3.11d).

Zusätzlich können auf Sagittalschnitten *Ephrin-A5*-Transkripte, ab E 12,5, in den Zwischenwirbelscheiben, einem proximo-ventralen Abschnitt des Unterkiefers und im ventralen Diencephalon, der Region des sich entwickelnden Hypothalamus detektiert werden (Abb. 3.11e). Die Rathkesche Tasche sowie das sich ventral davon entwickelnde Knorpelgewebe bleibt frei von *Ephrin-A5*-Expression (Abb. 3.11f).

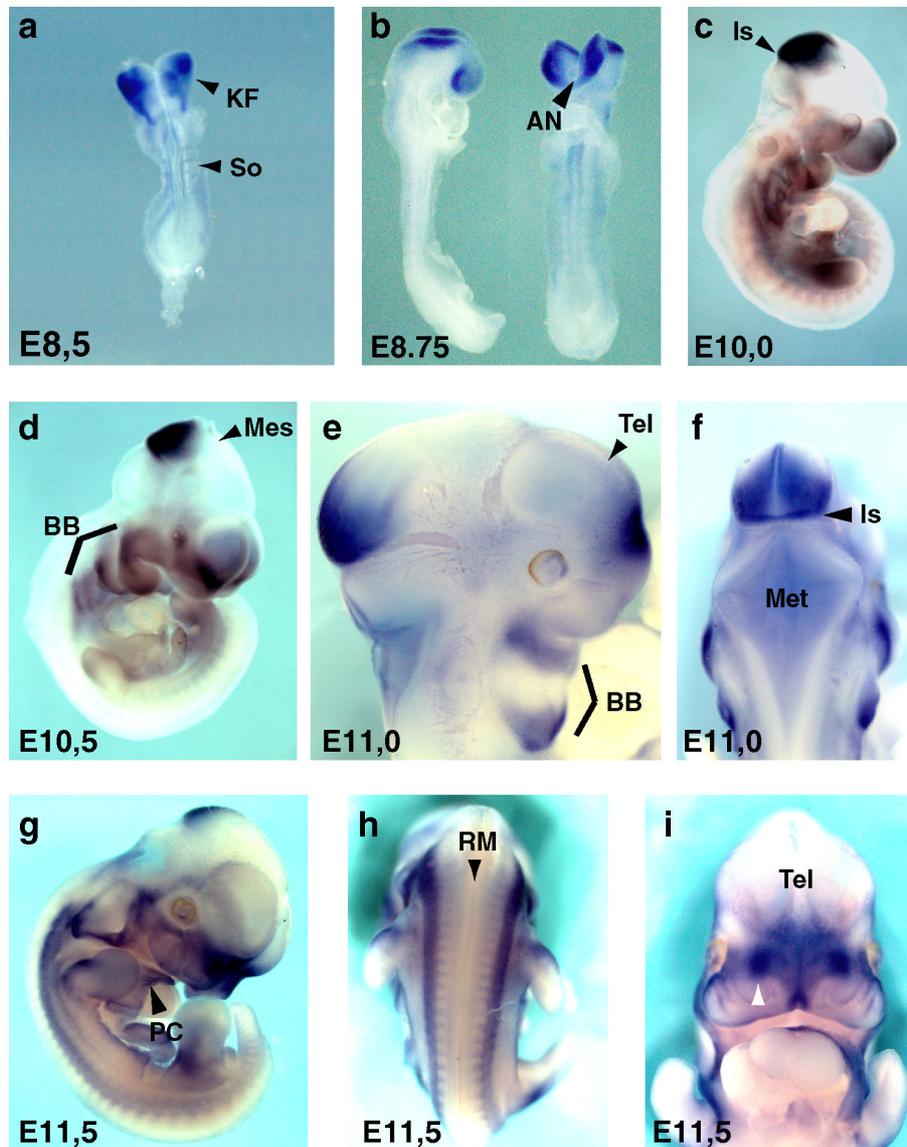


Abb 3.10: Embryonale Expression von *Ephrin-A5* zwischen E 8,5/TS13 und E 11,5/TS19 visualisiert durch *in situ*-Hybridisierung an Ganzkörperpräparaten. Die verschiedenen Stadien sind jeweils angegeben. Die Föten bei E 11,0 und E 11,5 sind in jeweils verschiedenen Ansichten gezeigt. Bei i ist die Position der Anlage des vomeronasalen Organs mit einer weißen Pfeilspitze angezeigt. AN: anteriorer Neuroporus, BB: Branchialbögen, Is: Isthmus, KF: Kopffalte, Mes: Mesencephalon, Met: Metencephalon, PC: Pericard, RM: Rückenmark, So: Somiten, Tel: Telencephalon.

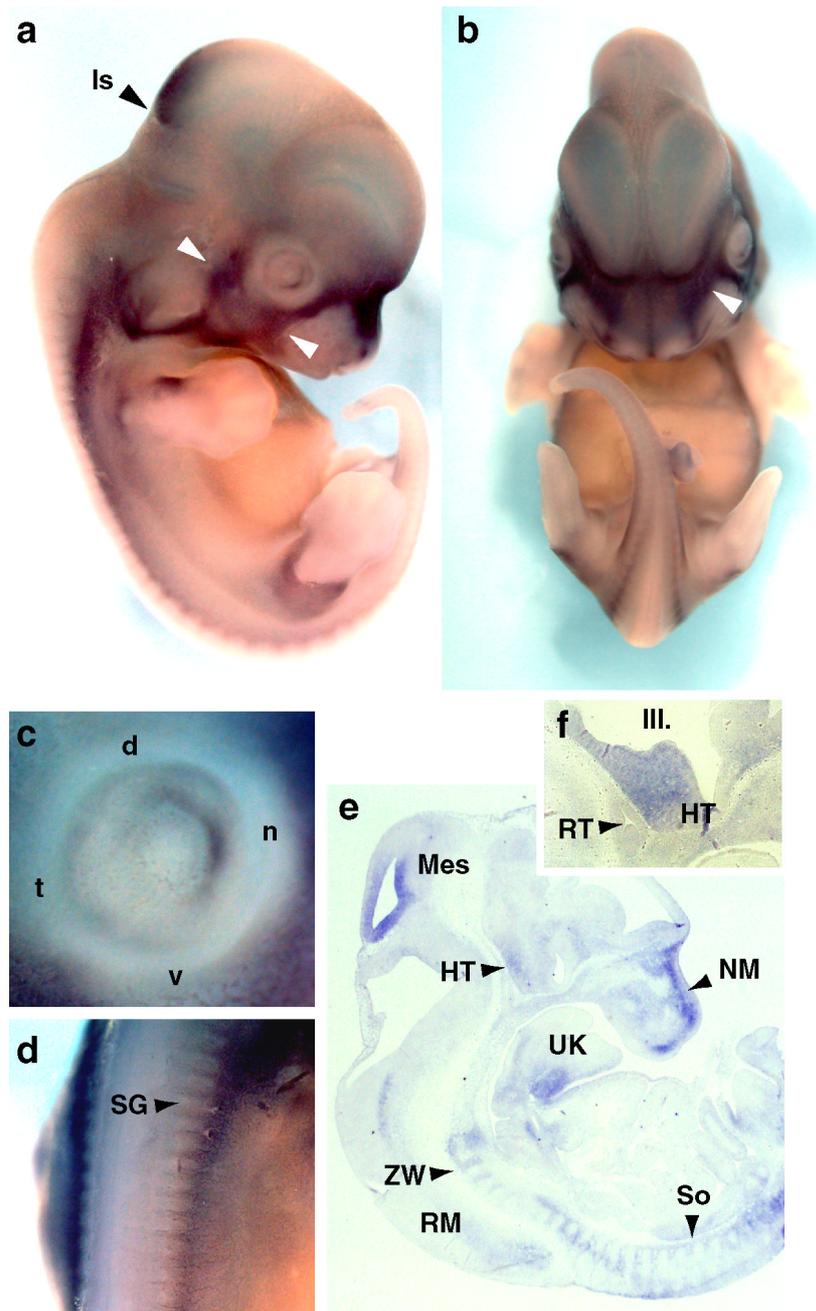


Abb. 3.11: Expressionsanalyse von *Ephrin-A5* bei E 12,5 (TS21) am Ganzkörperpräparat (a - d) und im Parasagittalschnitt (e, f). In a und b sind faciale Expressionsdomänen durch weiße Pfeilspitzen angezeigt. In c und d sind jeweils Vergrößerungen der Retina und der dorsalen Ansicht auf den Embryo im thorakalen Bereich zu sehen. In f ist ein Ausschnitt des Hypothalamus aus einem parallel zu e und annähernd mitsagittal verlaufeneden Schnitt zu sehen. HT: Hypothalamus, Is: Isthmus, NM: nasales Mesenchym, Mes: Mesencephalon, RM: Rückenmark, RT: Rathkesche Tasche SG: Spinalganglien, SO: Somiten, ZW: Zwischenwirbelscheiben, UK: Unterkiefer, III.: dritter Ventrikel; d: dorsal, n: nasal, t: temporal, v: ventral.

3.3.3 *Ephrin-A5*-Expression im Zentralnervensystem

Bereits die Expressionsanalyse embryonaler Stadien hat für das *Ephrin-A5*-Gen individuelle Abschnitte des zentralen Nervensystems als dominante Expressionsterritorien aufgezeigt. Der Expressionsverlauf in diesen Domänen wurde bei verschiedenen Stadien bis zum Zeitpunkt der Geburt verfolgt, und die *Ephrin-A5*-Expression einzelnen Kerngebieten zugerechnet. Hervorzuheben sind dabei Strukturen der Verarbeitung sensorischer Informationen wie der Bulbus olfactorius sowie das sensorische Riechepithel (Regio olfactoria), der cerebrale Cortex (Pallium), das Pretectum, die Colliculi superior und inferior sowie das Cerebellum. Weitere Kerngebiete intensiver *Ephrin-A5*-Expression umfassen das Striatum, Thalamus, Hypothalamus, Tegmentum und distinkte Kerne des Stammhirns (Abb. 3.12). Diese Expressionsdomänen bleiben, wie im folgenden gezeigt wird, z.T. bis in adulte Stadien erhalten.

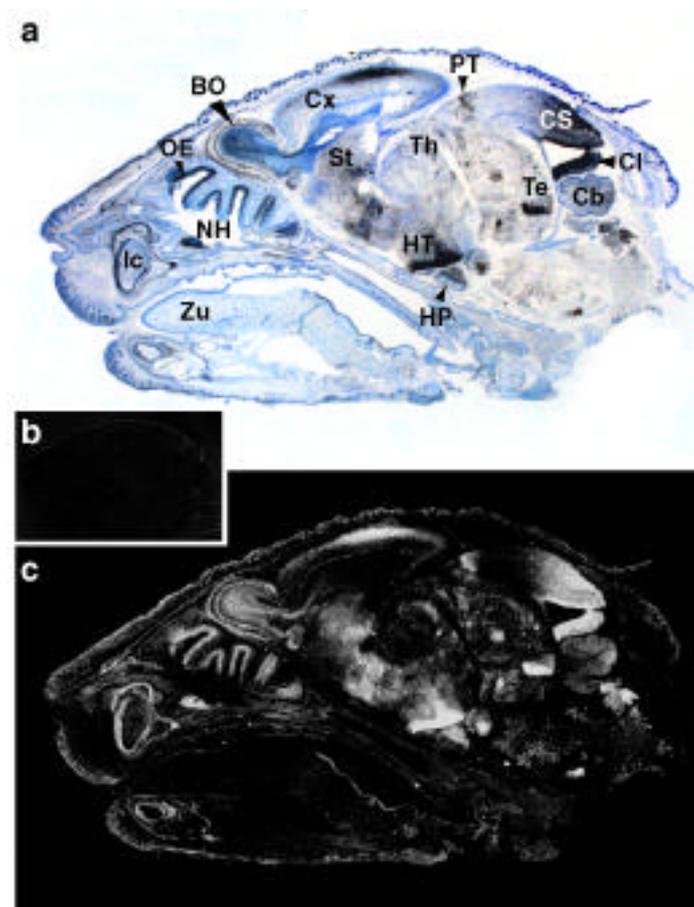


Abb 3.12: Expressionsanalyse von *Ephrin-A5* bei der Geburt (P 0). Der Schnitt verläuft annähernd midsagittal durch den Kopf einer neugeborenen Maus und ist im Hellfeld (a) und im Dunkelfeld (c) gezeigt. In b ist das Ergebnis einer Kontroll-Hybridisierung mit dem kodierenden Strang zu sehen. Die Hybridisierungen erfolgten mit der ³⁵S-markierten cRNA-Sonde *Ephrin-A5-1/II/II*. BO: Bulbus olfactorius, Cl: Colliculus inferior, Cb: Cerebellum, Cx: cerebraler Cortex, CS: Colliculus superior, HP: Hypophyse HT: Hypothalamus Ic: Incisivus, NH: Nasenhöhle, OE: Olfaktorisches Epithel, PT: Pretectum, St: Striatum, Te: Tegmentum, Th: Thalamus, Zu: Zunge.

Neben dem Zentralnervensystem wird das *Ephrin-A5*-Gen auch in nicht-neuronalen Domänen exprimiert. Diese Expressionsterritorien sollen hier nur kurz erwähnt werden ohne weiter im Detail besprochen zu werden. *Ephrin-A5*-Expression ist in Haut und Haarwurzeln sichtbar, in mesenchymalen Elementen des Oberkiefers und in den sich bildenden Zähnen (Abb. 3.12). Die Expression in den Zähnen betrifft die Epithelien des Schmelzorgans (Adamantoblasten und äußeres Epithel), während die Schmelzpulpa weitgehend frei von *Ephrin-A5*-Expression bleibt.

3.3.3.1 *Ephrin-A5*-Expression in Hypothalamus und Hypophyse

Die Expressionsanalyse mittgestaler Entwicklungsstadien zeigte im ventralen Diencephalon eine Expressionsdomäne auf, die in mehrfacher Hinsicht besonders interessant erscheint (Vergleiche Abb. 3.11e/f). Zum einen wird diese Region von ZHANG *et al.* (1996) als exklusives Expressionsterritorium von *Ephrin-A5* erwähnt; andere Ephrine werden hier nicht exprimiert, was durch eigene Expressionstudien bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Funktionelle Redundanz zwischen Mitgliedern dieser Molekülklasse kann in diesem Areal daher weitgehend ausgeschlossen werden. Zum anderen werden hier mit Hypothalamus und Hypophyse die wichtigsten Strukturen des Säuger-Hormonsystems gebildet, welches von essentieller Bedeutung für Entwicklung, Physiologie und Reproduktion ist (Übersicht bei KANDEL *et al.*, 1991; ECKERT *et al.*, 1993). In der vorliegenden Arbeit konnte eventuelle phänotypische Veränderungen *Ephrin-A5*-defizienter Mäuse in diesem System, sollten mit hoher Wahrscheinlichkeit Fehlfunktionen auslösen. Weiterhin konnte festgestellt werden, daß *Ephrin-A5* im ventralen Diencephalon deutlich früher exprimiert wird (E 12,5) als von ZHANG *et al.* (1996) beschrieben und könnte damit bei Zellmigrations- oder Musterbildungsprozessen in dieser Region eine Rolle spielen. Aus den oben genannten Erwägungen wurde eine detaillierte Expressionsanalyse für den Hypothalamus und die Hypophyse, während verschiedener Entwicklungsstadien durchgeführt.

Bei E 12,5, ein wichtiges Entwicklungsstadium bei der Entwicklung der Hypophyse, da hier die Trennung der Rathkeschen Tasche vom Stomodäum erfolgt (Übersicht bei KIOUSSI *et al.*, 1999), kann *Ephrin-A5* im Hypothalamus und im Infundibulum, der Anlage der Neurohypophyse, detektiert werden. Die Rathkesche Tasche, Anlage der Adenohypophyse, bleibt weitgehend frei von *Ephrin-A5*-Transkripten und grenzt sich damit klar vom Hypothalamus und dem Infundibulum ab (Abb. 3.13a). Die Expressionsanalyse bei E 13,5 zeigt im Hinblick auf die Verteilung der *Ephrin-A5*-Transkripte ein unverändertes Bild. Während der Hypothalamus und die Anlage der Neurohypophyse stark positiv sind, bleibt die Anlage der Adenohypophyse frei von *Ephrin-A5*-Expression. Interessanterweise ist ein deutlicher, von ventral nach dorsal abnehmender Gradient der *Ephrin-A5*-Expression im Hypothalamus zu erkennen, der möglicherweise mit Differenzierungsprozessen zusammenhängt (Abb. 3.13b-d/f-h). Dieses Expressionsmuster bleibt in späteren Stadien der Fötalentwicklung erhalten (Daten nicht gezeigt).

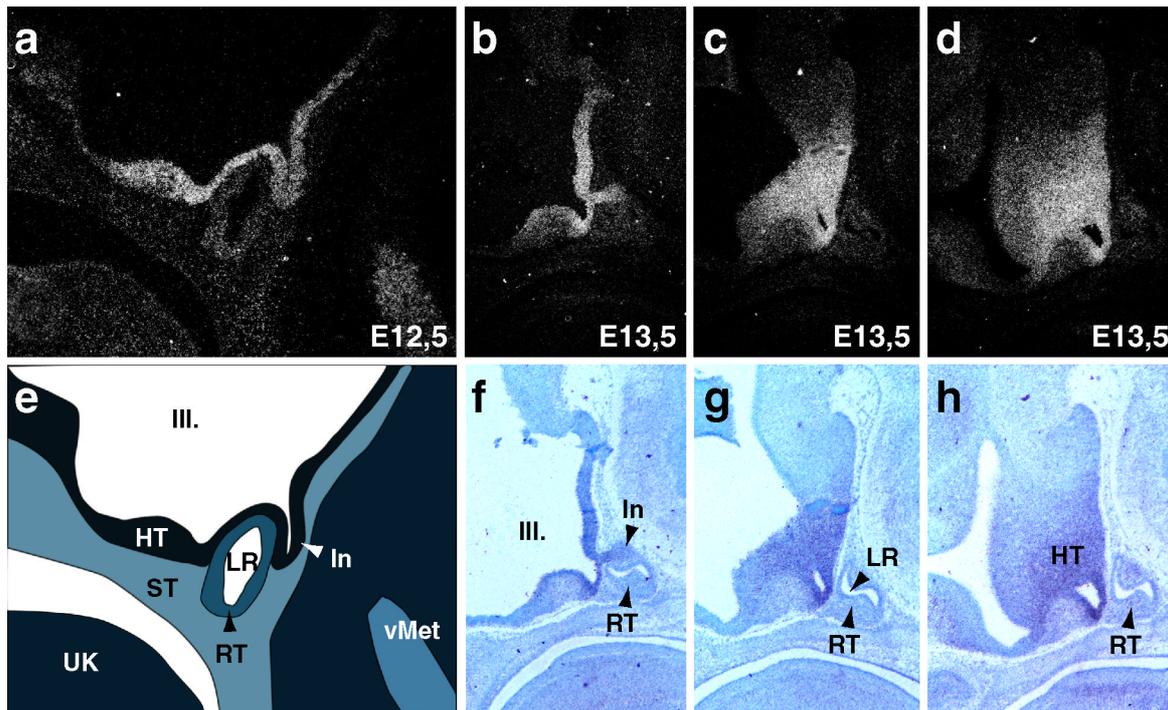


Abb 3.13: Expressionsanalyse von *Ephrin-A5* im embryonalen Hypothalamus mit der ^{35}S -markierten cRNA-Sonde *Ephrin-A5-1/II/III* bei E 12,5/TS20 (a) und E 13,5/TS22 (b - d und f - h). Die abgebildeten Ausschnitte entsprechen dem ventralen Diencephalon und verlaufen annähernd midsagittal. Die *in situ*-Hybridisierungen wurden an Paraffinschnitten durchgeführt. In a - d sind Dunkelfeld-Aufnahmen gezeigt. In f - h Hellfeld-Aufnahmen von b - d respektive. In e ist zur besseren Verdeutlichung der Strukturen eine schematische Darstellung der Aufnahme a gezeigt. HT: Hypothalamus, In: Infundibulum, LR: Lumen der Rathkeschen Tasche, RT: Rathkesche Tasche, St: Stomodäum, UK: Unterkiefer, vMet: ventrales Metencephalon, III: dritter Ventrikel.

Im Hypothalamus ist *Ephrin-A5* auch in postnatalen Stadien exprimiert, wobei individuelle Kerne differenziert werden können. Unmittelbar nach der Geburt (P 0) kann *Ephrin-A5*-Expression im gesamten Hypothalamus, in einem ventral nach dorsal abnehmenden Gradienten festgestellt werden (Abb. 3.14a/b). Besonders interessant erscheint das Expressionsmuster in der Hypophyse, wo Hinter- und Mittellappen intensiv *Ephrin-A5* exprimieren, der Vorderlappen hingegen negativ ist. In Coronarschnitten können insbesondere der Nucleus arcuatus sowie die Nuclei mammillari medialis und lateralis als stark *Ephrin-A5*-positiv identifiziert werden (Abb. 3.14c/d). Bei P 6 ist *Ephrin-A5*-mRNA insbesondere in folgenden Kernen vorhanden: Nucleus hypothalamicus dorsomedialis, Nucleus hypothalamicus ventromedialis, Nucleus arcuatus, Nucleus mammillaris medialis, Nucleus supramammillaris lateralis (Abb. 3.14e/f/l/m). Durch eine sukzessive von anterior nach posterior durchgeführte Expressionsanalyse des adulten Hypothalamus können folgende Kerne als Domänen der *Ephrin-A5*-Expression identifiziert werden: Nucleus suprachiasmaticus, Nucleus paraventricularis, Nucleus arcuatus und Nucleus mammillaris lateralis. Zusätzlich können

Transkripte im dorsalen Abschnitt der Eminentia mediana festgestellt werden (Abb. 3.14g-k/n-r).

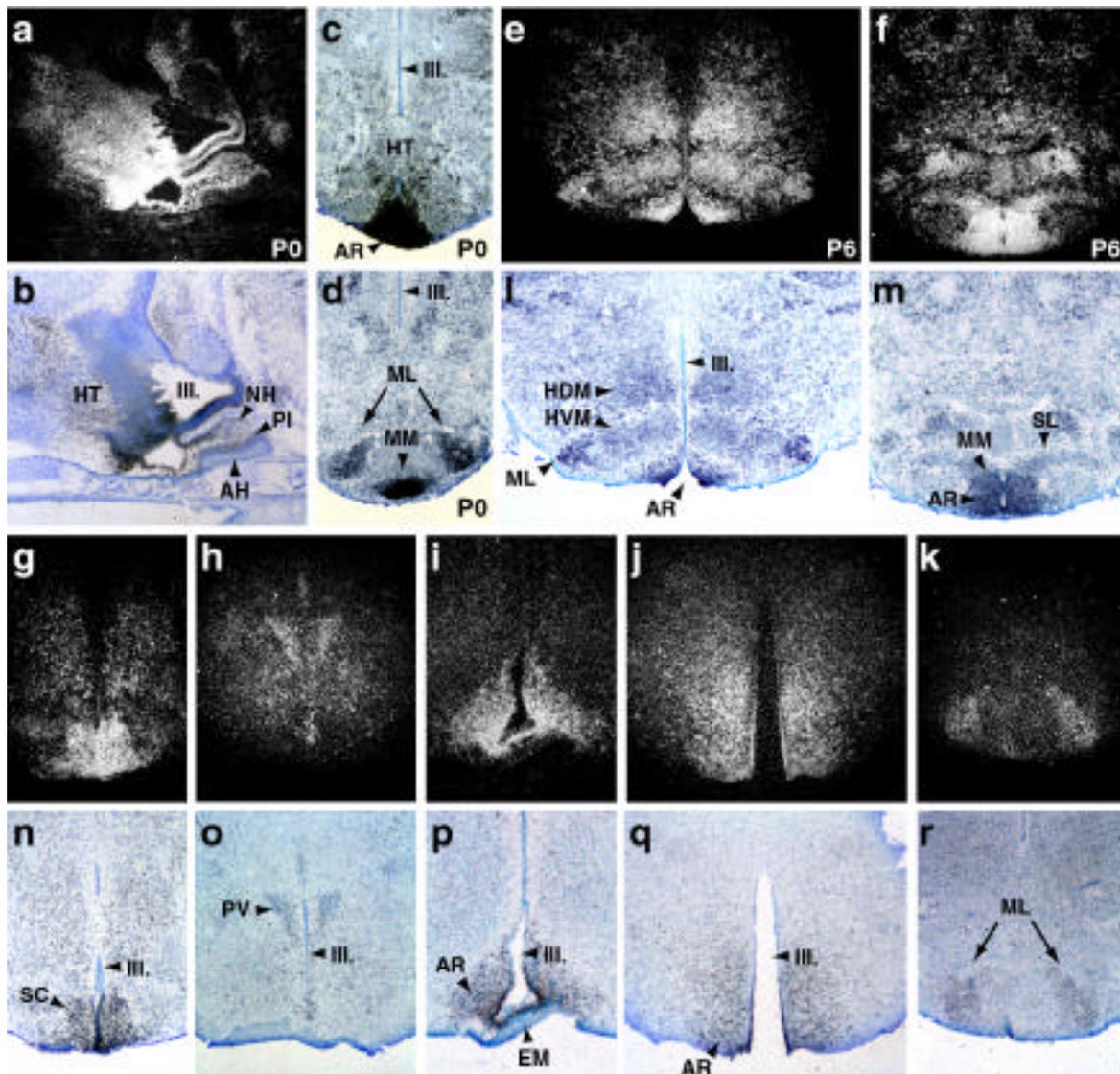


Abb 3.14: Expressionsanalyse von *Ephrin-A5* im Hypothalamus ab der Geburt (P 0). In a und e - k sind Dunkelfeld-Aufnahmen der Hellfeld-Aufnahmen in b und l - r respektive gezeigt. a, b Mittsagittal verlaufender Schnitt durch Hypothalamus und Hypophyse. c, d Coronar verlaufende Schnitte bei P 0. e, f bzw. l, m Coronar-schnitte bei ca. eine Woche (P 6) alten Tieren. g - k bzw. n - o coronar verlaufende Schnitte bei adulten Tieren AH: Adenohypophyse, AR: Nucleus arcuatus, EM: Eminentia mediana, HDM: Nucleus hypothalamicus dorsomedialis, HT: Hypothalamus, HVM: Nucleus hypothalamicus ventromedialis, MM: Nucleus mammillaris medialis, ML: Nucleus mammillaris lateralis, NH: Neurohypophyse, PI: Pars intermedia, PV: Nucleus paraventricularis, SC: Nucleus supra-chiasmaticus, SL: Nucleus supramammillaris lateralis, III.: dritter Ventrikel.

3.3.3.2 *Ephrin-A5*-Expression in corticalen Strukturen

Ephrin-A5 wird im sich entwickelnden Cortex areal- und schichtenspezifisch exprimiert. Bei neugeborenen Mäusen kann die stärkste Expression im sensomotorischen Areal vor allem des somatomotorischen Cortex gesehen werden (Abb. 3.15a). Später in der postnatalen Entwicklung und adult wird *Ephrin-A5* auch in anderen Arealen, wie z.B. dem limbischen Cortex exprimiert (Abb. 3.15c,d). Ausserdem wird *Ephrin-A5* im adulten Cortex von Nervenzellen in allen Schichten exprimiert. Je nach Areal sind jedoch bestimmte Schichten durch eine besonders starke Expression gekennzeichnet. So kann z.B. *Ephrin-A5*-mRNA in besonders hohen Mengen in den Pyramidenzellen der Schicht V, den Zellen die subcortical projizieren, detektiert werden.

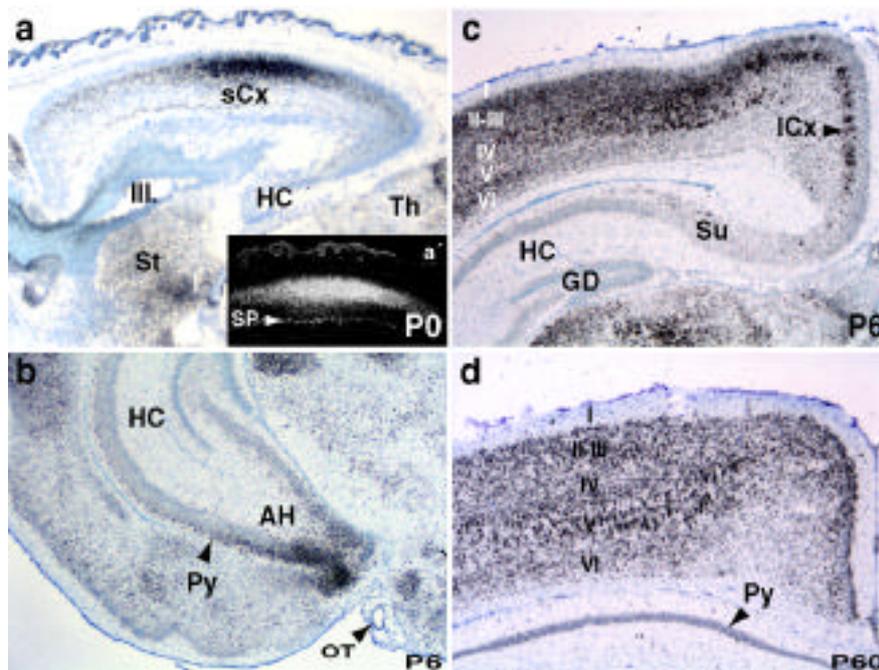


Abb. 3.15: Expression von *Ephrin-A5* im neonatalen (P 0), juvenilen (P 6) und adulten (P 60) cerebralen Cortex. a. Sagittalschnitt durch den Cortex bei P 0 hybridisiert mit der *Ephrin-A5*-Sonde und im Hellfeld fotografiert. a'. Ausschnitt des sensomotorischen Bereichs im Dunkelfeld. Intensive Signale können im sensomotorischen Cortex (sCx) und in der *subplate* (SP) detektiert werden. b. Coronarschnitt durch den Cortex und Hippocampus bei P 6 (b) im Hellfeld. Intensive Expression kann in der Pyramidenzellschicht des amygdalo-hippocampalen Areals detektiert werden. c. Im juvenilen Cortex kann je nach Areal eine schichtenspezifische Expression von *Ephrin-A5* gesehen werden. d. Im adulten Cortex wird *Ephrin-A5* weiterhin schichtenspezifisch exprimiert. Die stärkste Expression in diesem Areal kann in Schicht V detektiert werden. AH: amygdalo-hippocampales Areal, GD: Gyrus dentatus, HC: Hippocampus, ICx: limbischer Cortex, OT: optischer Trakt, Py: Pyramidenzellschicht des Hippocampus, sCx: sensomotorischer Cortex, SP: *subplate* St: Striatum, Su: Subiculum, Th: Thalamus, III.: dritter Ventrikel. Die corticalen Schichten sind in römischen Ziffern angegeben.

Für *Ephrin-A5* liegt im Cortex, wie schon für andere Systeme beschrieben, ein Expressionsgradient vor. Dieser verläuft von anterior nach posterior und medial nach lateral abnehmend und geht damit mit der fortschreitenden Differenzierung der Neurone einher. In frühen Stadien kann *Ephrin-A5*-Expression nicht nur in der corticalen Platte, der corticalen Struktur in der sich die ausdifferenzierenden Neurone befinden, beobachtet werden. Zusätzlich ist *Ephrin-A5* besonders stark in den am weitesten differenzierten Neuroblasten der Rindenplatte, einer nur transient auftretenden Zellschicht in der Matrixzone des Cortex (*subplate*), lokalisiert. Die *subplate* ist insbesondere für die Entwicklung der thalamocorticalen Projektionen und damit für die Informationszufuhr des Cortex von essentieller Bedeutung (Übersicht bei ALLENDOERFER und SCHATZ, 1994). Im Hippocampus juveniler Stadien wird *Ephrin-A5* in der Pyramidenzellschicht des amygdalo-hippocampalen Areals exprimiert. In anderen Regionen des Hippocampus konnte hingegen keine Expression gesehen werden.

3.3.3.3 *Ephrin-A5*-Expression im olfaktorischen System

Die Analyse der *Ephrin-A5*-Expression bei neugeborenen Mäusen zeigte bislang nicht-dokumentierte Expressionsterritorien im olfaktorischen System auf. Hierzu gehören das olfaktorische sensorische Epithel, der Bulbus olfactorius, das vomeronasale Organ und seine Zielregion, der Bulbus olfactorius accessorius (Abb. 3.16). Um der Frage nach potentiellen Migrationsdefekten bzw. Zielfindungsdefekten olfaktorischer Nerven nachzugehen zu können, wurde primär eine detaillierte Expressionsstudie durchgeführt. Der Schwerpunkt liegt hier auf dem akzessorischen olfaktorischen System, welches einerseits in seiner einfacheren Organisation zugänglicher für eine spätere phänotypische Analyse ist, andererseits aber in der molekularen Regulation seiner Organisation weniger gut verstanden ist.

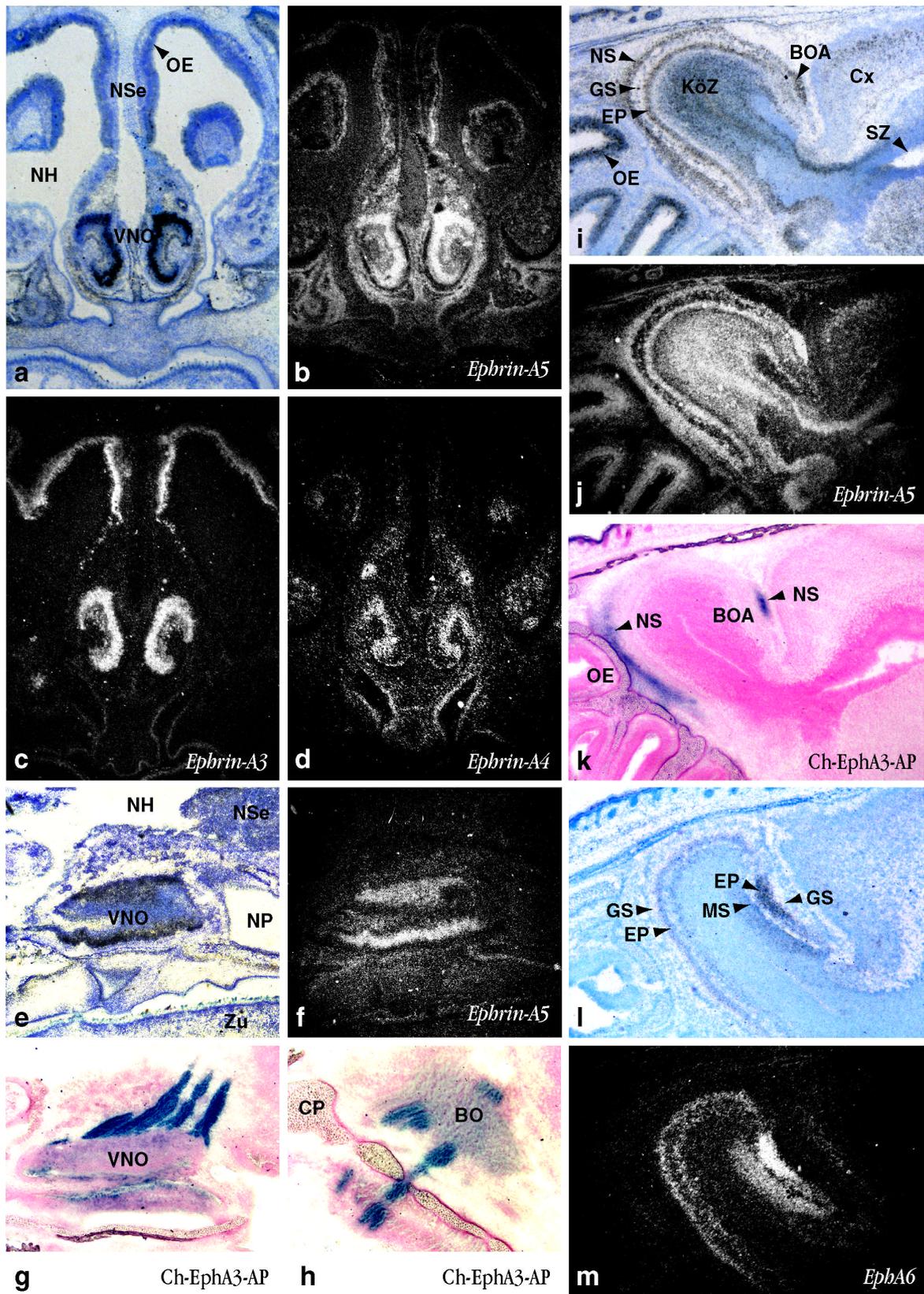
Ephrin-A5-Transkripte können bei der Geburt in allen Turbinalia (I - IV) des olfaktorischen Epithels detektiert werden sowie in einzelnen Schichten des Bulbus olfactorius. Bei diesen Schichten handelt es sich um die äußere Nervenschicht, die externe plexiforme Schicht sowie die Körnerzellschicht. Interessanterweise spiegelt das Expressionsmuster in den Körnerzellen den Migrationspfad von Interneuron-Vorläufern wieder. Diese entstehen in der anterioren subventrikulären Zone des Palliums und wandern in den Bulbus olfactorius ein, um dort zu Interneuronen auszdifferenzieren (LUSKIN, 1993; Übersicht bei O'ROURKE, 1996). Im akzessorischen Riechkolben finden sich *Ephrin-A5*-Transkripte ebenfalls in der Körnerzellschicht und der externen plexiformen Schicht sowie der äußeren Nervenschicht, wo die intensivsten Signale detektiert werden können. Dies ist insofern überraschend als es sich hier nur um axonale Nervenzellfortsätze ohne eigenen Transkriptionsapparat handelt. Offensichtlich wird die *Ephrin-A5*-mRNA über weite Strecken von den sensorischen olfaktorischen Zellen in ihre Axonendigungen transportiert, um dort translatiert und als reifes Protein an die Außenseite der Zellmembran geheftet zu werden. In der Tat können intensive *Ephrin-A5*-Signale im sensorischen Epithel des vomeronasalen Organs (Jacobson'sches Organ; VNO) detektiert werden. Über Ch-EphA3-AP-Färbung kann jedoch gezeigt werden, daß die *Ephrin-A5*-mRNA in erster Linie in den Axonen der Sinneszellen translatiert wird. In den Somata, die im sensorischen Epithel liegen, werden deutlich geringere Mengen des reifen

Proteins detektiert als in den austretenden Fasern. Die Translation findet somit hauptsächlich in den Axonen der olfaktorischen Sinneszellen statt.

Um der Frage nach einer potentiellen funktionellen Redundanz mit anderen Ephrinen nachzugehen, wurden *in situ*-Hybridisierungen mit Sonden für alle weiteren Ephrine der A-Klasse durchgeführt. In diesen Koexpressionsstudien konnte gezeigt werden, daß zwei weitere Ephrine im vomeronasalen Organ exprimiert werden: *Ephrin-A3* im sensorischen Epithel und *Ephrin-A4* in den Stützzellen (Abb. 3.16c,d). Weiterhin konnten *in situ*-Hybridisierungen mit Sonden für *EphA*-Rezeptoren einen potentiellen Interaktionspartner für *Ephrin-A5* im akzessorischen olfaktorischen System aufzeigen. Intensive *EphA6*-Expression kann in der externen plexiformen und Mitralzellenschicht des akzessorischen Riechkolbens detektiert werden, während Signale geringerer Intensität sich in der Körnerzellschicht finden. Interessanterweise können *EphA6*-Transkripte in der anterioren externen plexiformen Schicht des akzessorischen Riechkolben in größeren Mengen detektiert werden als in der posterioren, was eine Rolle bei der funktionellen Unterteilung des akzessorischen Riechkolbens nahelegt (Abb 3.16m).

Abb. 3.16: Expression von Ephrinen und Eph-Rezeptoren im olfaktorischen System. a. Hellfeld-Aufnahme eines mit der *Ephrin-A5*-Sonde hybridisierten und mit Thionin gegengefärbten, coronar verlaufenden Schnittes durch das vomeronasale Organ. b. Der gleiche Schnitt wie in a in Dunkelfeld-Beleuchtung. c, d. Dunkelfeld-Aufnahmen von parallel zu a/b verlaufenden Schnitten, die respektive mit den Sonden für *Ephrin-A3* und *Ephrin-A4* hybridisiert wurden. Während *Ephrin-A3* in den sensorischen Zellen detektiert werden kann, bleibt die *Ephrin-A4*-Expression auf die Stützzellen begrenzt. e, f. Eine *Ephrin-A5 in situ*-Hybridisierung durch eine sagittale Ebene der Nasenscheidewand in Hellfeld- (e) und Dunkelfeld-Aufnahme (f) zeigt Expression in den sensorischen Neuronen des VNO. g, h. Ch-EphA3-AP-Färbungen mit der Ephrin-A-Liganden detektiert werden können. g zeigt im Sagittalschnitt durch das VNO intensive Signale in den austretenden Fasern. h. Weiter dorsal können die Fasern bei ihrem Eintritt in den Bulbus olfactorius durch die cribiforme Platte verfolgt werden. I, j. Hellfeld- (i) und Dunkelfeld-Aufnahme (j) einer *Ephrin-A5 in situ*-Hybridisierung an einem Sagittalschnitt des Riechkolbens. k. Ein parallel zu i/j verlaufender Schnitt zeigt die Verteilung von Ephrin-A-Liganden nach der Durchführung eines Bindungsassays mit Ch-EphA3-AP. l, m. Expression von *EphA6* im Bulbus olfactorius in Hellfeld- (l) und Dunkelfeld-Aufnahme (m) eines Sagittalschnitts durch den Riechkolben. Die Expression in der externen plexiformen Schicht des akzessorischen Riechkolbens ist nicht homogen, sondern konzentriert sich im anterioren Abschnitt. BO: Bulbus olfactorius, BOA: Bulbus olfactorius accessorius, CP: cribiforme Platte, Cx: cerebraler Cortex, EP: externe plexiforme Schicht, GS: glomeruläre Schicht, KöZ: Körnerzellen, MZ: Mitralzellenschicht, NH: Nasenhöhle, NP: Nasopharynx, NS: Nervenschicht, NSe: Nasenseptum, OE: olfaktorisches Epithel, SZ: subventrikuläre Zone, VNO: vomeronasales Organ, Zu: Zunge.





3.3.3.4 Expression von *Ephrin-A5* im Cerebellum

Ephrin-A5-Expression kann bereits bei der Geburt, noch vor Ausbildung der typischen Dreischichtung des cerebellären Cortex, in den Purkinje-Zellen des Cerebellums detektiert werden. Die Purkinje-Zellen sind die einzigen efferenten Elemente der cerebellären Rinde und bilden im ausdifferenzierten Zustand das Stratum ganglionare. Durch die postnatale Entwicklung hindurch bis in adulte Stadien hinein bleiben diese Zellen *Ephrin-A5*-positiv. In anderen Zellen des cerebellären Cortex konnten keine *Ephrin-A5*-Transkripte nachgewiesen werden. Durch Rezeptor-Bindungsassays mit Ch-EphA3-AP an coronar verlaufenden Schnitten des Cerebellums konnten keine Signale identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Dieses überraschende Ergebnis könnte auf eine zu geringe Sensitivität des Assays oder eine von der mRNA verschiedene Lokalisation des reifen Proteins zurückzuführen sein.

Zu den Domänen der *Ephrin-A5*-Expression im Kleinhirn gehören auch dessen zentralen Kerne. Bei der Geburt können *Ephrin-A5*-Transkripte in Zellen des sich ausdifferenzierenden Nucleus fastigii detektiert werden. In späteren Stadien ist der Nucleus dentatus, die am intensivsten *Ephrin-A5* exprimierende Struktur im Cerebellum. Er erhält das Groß, der efferenten Fasern der Purkinje-Zellen und ist somit Hauptschaltstation für die Ausgangssignale des Kleinhirns (Übersicht bei ALTMAN und BAYER, 1997, VOOGD und GLICKSTEIN, 1998).

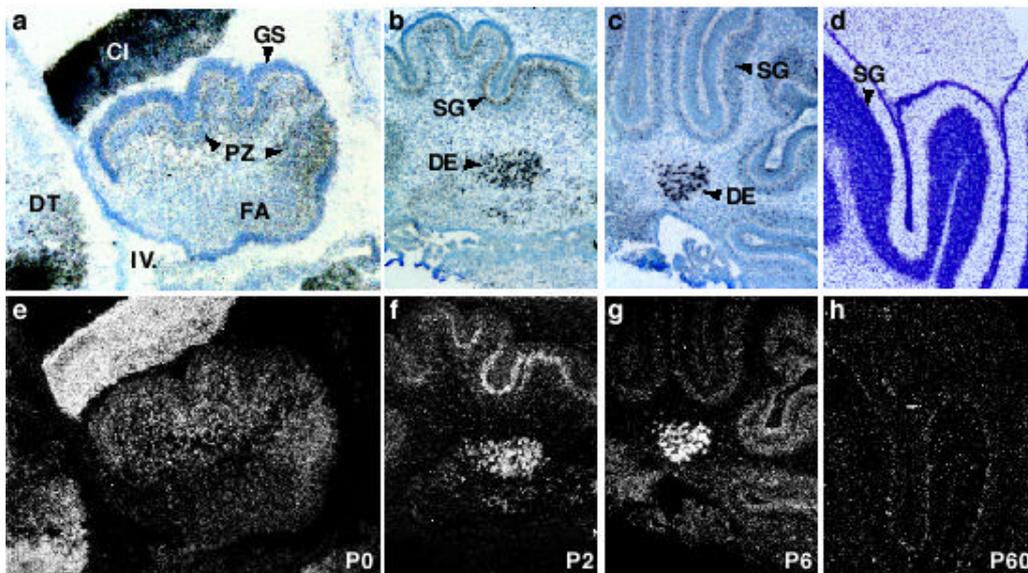


Abb. 3.17: *Ephrin-A5*-Expression im Cerebellum. a, e Sagittalschnitt durch das Cerebellum einer neugeborenen Maus. Transkripte können im Stratum ganglionare, der Schicht, der sich entwickelnden Purkinje-Zellen sichtbar gemacht werden. b, f. Zwei Tage nach der Geburt bleibt die Expression in den Purkinje-Zellen erhalten. Zusätzlich kann intensive *Ephrin-A5*-Expression im *Nucleus dentatus* visualisiert werden. c, g. Bei P 6 kann die Expression von *Ephrin-A5* in den gleichen Strukturen gesehen werden, wie bereits in P2 beschrieben. d, h. Adulte Expression in der Purkinje-Zellschicht. CI: Colliculus inferior, DE: Nucleus dentatus, DT: dorsales Tegmentum, FA: Nucleus facialis, GS: Germinative Schicht, PZ: Purkinje-Zellen, SG: Stratum ganglionare, IV.: vierter Ventrikel.

3.4 Vergleichende Expressionsanalyse von *Ephrin-A5* und *Ephrin-A2*

Ephrin-A5 und sein nächstes homolog *Ephrin-A2*, ein Molekül mit dem es auf Proteinebene ca. 50% Identität aufweist, besitzen ähnliche Expressionsdomänen und sind beide als repulsive Faktoren, die regulierend in die Entwicklung der retinotektalen Topographie eingreifen beschrieben worden (CHENG und FLANAGAN, 1994; CHENG *et al.*, 1995; WINSLOW *et al.*, 1995; DRESCHER *et al.* 1995; Übersicht bei TESSIER-LAVIGNE, 1995; DRESCHER *et al.*, 1997; FLANAGAN und VANDERHAEGHEN, 1998). Trotz der ähnlichen Eigenschaften beider Moleküle zeigen sich beim Modellorganismus Huhn auch Unterschiede in Expression und Funktion. Insbesondere die Expressionsterritorien beider Moleküle unterscheiden sich stark entlang der antero-posterioren Achse des Tectums. Die anteriore Ausdehnung von *Ephrin-A2* reicht über die von *Ephrin-A5* hinaus und bedeckt fast das gesamte Tectum (MONSCHAU *et al.*, 1997). Um diese Verhältnisse in der Maus zu überprüfen wurden Expressionsanalysen für beide Moleküle an embryonalen Stadien der Maus durchgeführt.

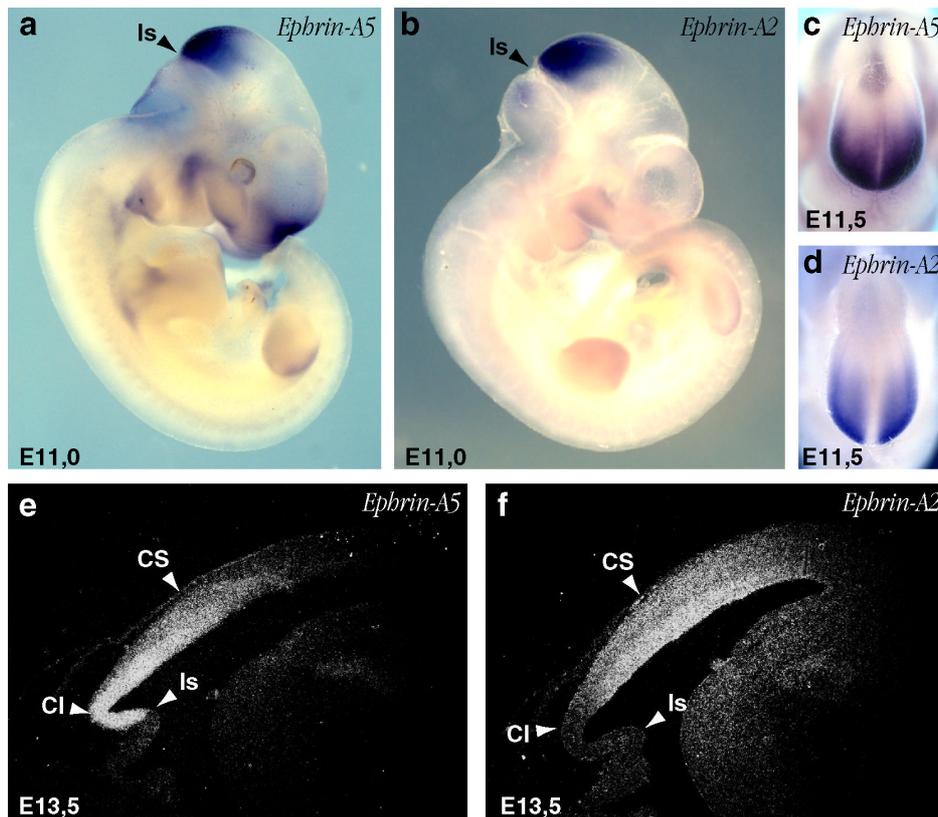


Abb 3.18: Vergleichende Expression von *Ephrin-A5* (a,c,e) und *Ephrin-A2* (b,d,f) während der mittgestalen Entwicklung. Die Stadien sind jeweils angegeben. a - d zeigen die Ergebnisse von Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen, e und f hingegen mitsagittal verlaufende Ausschnitte des dorsalen Mesencephalon, die mit ^{35}S -markierten cRNA-Sonden hybridisiert worden sind. Cl: Colliculus inferior, CS: Colliculus superior, IS: Isthmus, Mes: Mesencephalon, OF: Oberkieferfortsatz.

Bei E 11,0 zeigen *Ephrin-A5* und *Ephrin-A2* einen ähnlich verlaufenden Expressionsgradienten im dorsalen Mesencephalon mit einem Maximum im Isthmus. Das Expressionsterritorium von *Ephrin-A2* reicht dabei erkennbar weiter anterior im Vergleich zu *Ephrin-A5*. Schwächere Signale für *Ephrin-A2* können auch im Bereich der proximalen Extremitätenknospe (Abb. 3.18a/b) detektiert werden. Zusätzlich zeigt *Ephrin-A5*, die bereits in 3.3.2 dargestellten Expressionsdomänen in der Retina, im nasalen Mesenchym im Mandibularbogen und den fusionierten Bögen III und IV. Der Expressionsgradient im Mesencephalon bleibt während der gesamten Embryonalentwicklung erhalten, verläuft jedoch für *Ephrin-A2* graduiertes und zieht sich weiter anterior (3.18c-f). Das Expressionsmaximum liegt bei *Ephrin-A2* im posterioren Colliculus superior, während *Ephrin-A5* am Isthmus am stärksten exprimiert wird (Abb. 3.18e/f). Spätestens ab E 13,5 reicht die *Ephrin-A2*-Expression nicht mehr in den Colliculus inferior hinein sondern bleibt auf den Colliculus superior beschränkt (Abb. 3.18f). Die Expressionsdomäne von *Ephrin-A5* hingegen ist durch eine scharf verlaufende posteriore Grenze am Isthmus gekennzeichnet (Abb. 3.18e).

3.5 Mutagenisierung von *Ephrin-A5*

Das Studium entwicklungs-genetischer Prozesse bei der Maus basierte über viele Jahrzehnte hinweg im Wesentlichen auf dem Vorhandensein natürlich vorkommender oder Mutagen-induzierter Mutanten. Während der letzten zwanzig Jahre wurde es zunehmend möglich gezieltere Eingriffe in das Genom der Maus vorzunehmen, die eine direktere Korrelation zwischen genetischer und phänotypischer Veränderung erlauben (Übersicht bei HOGAN *et al.*, 1994). Zu den Methoden der stabilen und vererbaren Veränderung des Maus-Genoms zählen die direkte Mikroinjektion eines Transgens in die befruchtete Eizelle (BRINSTER *et al.*, 1981), retrovirale Infektion (JAENISCH 1976; VAN DER PUTTEN *et al.*, 1985; SORIANO und JAENISCH, 1986) sowie die Einbringung genetischer Information in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) und ihren Retransfer in einen Wirts-Embryo, wo sie alle somatischen Gewebe sowie die Keimbahn kolonisieren können (GOSSLER *et al.*, 1986; ROBERTSON *et al.*, 1986; HOOPER *et al.*, 1987). Die Methode, die hier angewendet wurde um den *Ephrin-A5*-Locus zu mutagenisieren basiert auf der homologen Rekombination des nativen chromosomalen Allels durch eingeführte exogene DNA in ES-Zellen (THOMAS und CAPECCHI, 1987; Übersicht bei CAPECCHI, 1989; BRADLEY *et al.*, 1992; MELTON, 1994; BALLING, 1997).

3.5.1 Strategie der homologen Rekombination

Der Konstruktion des Mutagenisierungs-konstrukts lag die Aufschlüsselung der genomischen Organisation des *Ephrin-A5*-Gens sowie die erstellte Restriktionskarte zugrunde (Abb. 3.6 und 3.7). Anhand dieser Informationen wurde entschieden ein 670 bp großes *HindIII/EcoRI*-Fragment, daß 260 bp des zweiten Exons enthält zu deletieren. Da es mit 293 bp das größte kodierende Exon (97 der 228 Aminosäurereste) ist sollte der Verlust an Sequenzinformation in jedem Fall zu einem defekten und damit nicht aktiven Protein führen (Nullmutante). Die dabei

eingesetzten Konstrukte zur homologen Rekombination tauschen endogene Sequenzen des nativen Allels durch speziesfremde, heterologe DNA-Segmente aus. Hierbei handelt es sich um die vom ubiquitären Phosphoglycerat-Kinase (PGK)-Promotor regulierte Neomycin-Resistenz (PGK-*neo^R*)-Kassette mit einer Größe von ca. 1,8 kbp, die für eine Phosphotransferase kodiert und für die positive Selektion der rekombinierten ES-Zellklone mit dem Neomycin-Analogon Geneticin (G418) verantwortlich ist, bzw. die *En2*-SA (Spleiß-Akzeptor)-*lacZ*-PGK-*neo^R*-Kassetten mit einer Gesamtlänge von 6,9 kbp, die zugleich für den Expressions-Reporter - Galactosidase kodieren, dessen Aktivität über X-Gal-Färbung visualisiert werden kann.

Für die homologe Rekombination in ES-Zellen der Maus werden flankierende, genomische Fragmente, in der Regel in einer Größe von 1 - 6 kbp, benötigt. Diese flankierenden Fragmente wurden dem genomischen Phagenklon -2.1 entnommen, der etwa 12,5 kbp des *Ephrin-A5*-Gens inkl. des zweiten Exons enthält (Abb. 3.6). Die Auswahl der flankierenden genomischen Bereiche (Arme der homologen Rekombination) ist entscheidend für die Effizienz eines Mutagenisierungskonstruktes und orientierte sich an folgenden Kriterien: (i) Wie in 3.2.3 bereits dargestellt wurde isogene DNA verwendet. (ii) Die beiden Arme sind unterschiedlich lang. Der kürzere Arm soll dabei die Möglichkeit zur Suche nach Rekombinationsereignissen über PCR mit Primern ermöglichen, die Fragmente über den Rekombinationsbruchpunkt amplifizieren. Sollte die Rekombinationsfrequenz für den *Ephrin-A5*-Locus sehr niedrig liegen, könnte im Hinblick auf Zeit- und Materialaufwand die PCR-Suche eine günstigere Alternative zur Southern-Blot-Analyse auf der Suche nach derart seltenen Rekombinationsereignissen werden. (iii) HASTY *et al.* (1991) konnten für den *hprt*-Locus zeigen, daß der kurze Arm 2 kbp möglichst nicht unterschreiten sollte um eine noch effiziente Rekombinationsfrequenz zu erzielen, hingegen die Ausdehnung des langen Armes über 6 kbp keine Steigerung derselben mehr erbringt. So wurde entschieden für den kurzen Arm ein 2 kbp und für den langen Arm ein 6,4 kbp großes Fragment zu verwenden.

Da die homologe Rekombination gegenüber der nicht-homologen Integration bis zum Faktor 10^5 seltener auftreten kann wurden Konstrukte verwendet, die eine positiv/negativ Doppelselektion und damit eine Anreicherung homolog rekombinierter Klone ermöglichen. Dabei wird auf die Präsenz der *neo^R*-Kassette durch Zugabe des Neomycin-Analogons G418 positiv selektiert. Eine endständige Stellung der Thymidin-Kinase-Kassette des Herpes-Simplex-Virus (HSV-*tk^S*) im Vektor kann zur negativ-Selektion verwendet werden. Nach homologer Rekombination sollte diese abbrechen und daher nicht in der Lage sein das Nukleotid-Analogon Gangcyclovir, daß dem Medium zugegeben wird, zu einem für ES-Zellen toxischen Produkt umzusetzen (MANSOUR *et al.*, 1988; Übersicht bei ZIMMER, 1992; BRADLEY *et al.*, 1992; JOYNER (Ed.), 1993).

Ist das zu mutierende Gen in ES-Zellen exprimiert, kann die Anreicherung homologer Rekombinationsereignisse auch dadurch erreicht werden, daß eine promotorlose, positive Selektion im Konstrukt eingebaut wird. Alle Integrationsereignisse, die nicht zu einer effizienten Transkription des positiven Selektionsmarkers in ES-Zellen führen werden in der Folge eliminiert. In dieser Arbeit wurde für das in ES-Zellen exprimierte *Ephrin-A5*-Gen (s. Abb. 3.8) diese Methode ebenfalls angewendet. Hierfür wurde ein Konstrukt verwendet welches die heterologen Sequenzen *En2*-SA-IRES- β geo-pA enthält (MOUNTFORD *et al.*, 1994). Der Vektor enthält, im Unterschied zu den bislang vorgestellten Vektoren, ein *internal ribosome-entry site* (IRES)-Fragment aus dem 5' untranslatierten Bereich des Enkephalomyokarditis-Virus (EMCV),

welches die Translation bicistronischer Transkripte erlaubt (GHATTAS *et al.*, 1994; Übersicht bei MOUNTFORD UND SMITH, 1995). Dieses Element folgt dem zweiten Exon des *En2*-Gens, dessen Spleiß-Akzeptor-Sequenz in die Integration in das reife Transkript ermöglicht (JOYNER UND MARTIN, 1987). Letztlich ermöglicht ein *lacZ-neo^R*-Fusionsgen (βgeo) ohne eigenen Promotor gleichzeitig Selektion und Detektion (FRIEDRICH UND SORIANO, 1991). Da aus der Elektroporation dieses Konstruktes in ES-Zellen (R1 und E14) keine homolog rekombinierten Klone erhalten wurden, werden zu seiner Herstellung und Elektroporation keine Ergebnisse präsentiert. Abschließend wird dieses Ergebnis in der Diskussion besprochen.

3.5.2 Klonierung des PGK-*neo^R*-Mutagenisierungskonstrukts

Die PGK-*neo^R*-Kassette wurde 5´ mit dem 2 kbp kurzen Arm und 3´ mit dem 6,4 kbp langen Arm flankiert, die dem Phagen λ -2.1 entnommen wurden und die homologe Rekombination vermitteln. 5´ des 5´-Armes wurde für die negative Selektion mit Gangcyclovir die PGK-Thymidin Kinase-Kassette (PGK-*tk^S*) kloniert.

Die Klonierungsschritte im Einzelnen: Der *EcoRV/HindIII*-geschnittene 2 kbp große 5´-Rekombinationsarm wurde in das entsprechend vorgeschchnittene pBluescript II KS+ Phagemid ligiert. Aus dem pPNT-Vektor (TYBULEWICZ *et al.*, 1991) wurde mit *Asp718* und *HindIII* die PGK-*HSV-tk^S*-Kassette (2,8 kbp) ausgeschnitten und die Überhänge mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* aufgefüllt (Blunten). Das isolierte Fragment wurde in 5´-3´-Orientierung in den *SmaI*-vorgeschrittenen Vektor aus dem ersten Klonierungsschritt ligiert. Ein 6,4 kbp großes *EcoRI/HindIII*-Fragment soll als 3´-Rekombinationsarm dienen und wurde aus λ -2.1 isoliert. Dieses Fragment wurde in den *XhoI*-vorgeschrittenen Vektor aus dem zweiten Ligationsschritt 3´ des 5´-Rekombinationsarms ligiert. Vor diesem Ligationsschritt wurden die kohäsiven Enden von Insert und Vektor mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt. Finaler Klonierungsschritt war die Insertion, der PGK-*neo^R*-Kassette zwischen die beiden Arme der homologen Rekombination. Dazu wurde sie über *XhoI/SalI*-Verdau dem pGEM7(KJ1) *SalI*/PGK-*neo^R*-Vektor (freundlicherweise von Dr. Alexandra Joyner zur Verfügung gestellt) entnommen, durch Klenow-Behandlung mit glatten Enden versehen und in den *SalI*-vorgeschrittenen und ebenfalls mit glatten Enden versehenen Vektor hineinligiert. Aus diesem Ligationsschritt ergaben sich Produkte in denen die PGK-*neo^R*-Kassette in 5´-3´ sowie in 3´-5´-Orientierung zur Ausrichtung der Rekombinationsarme ligiert wurde. Für die homologe Rekombination in ES-Zellen wurde jedoch, die mit dem endogenen Locus übereinstimmende Orientierung gewählt (Abb. 3.20). Das so hergestellte Konstrukt kann über die einzige endständige *NotI*-Restriktionsschnittstelle linearisiert werden.

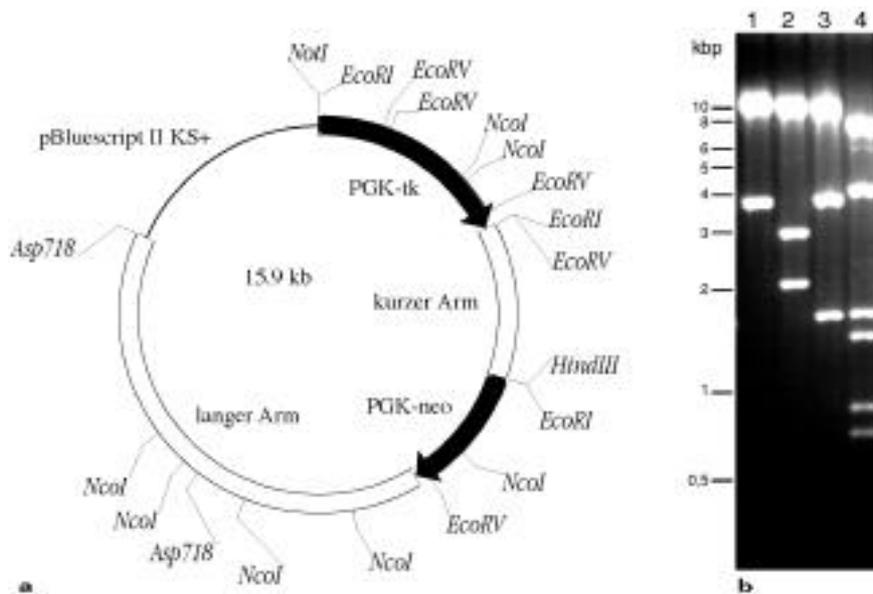


Abb 3.19 zeigt in a die zirkuläre Karte des PGK-*neo^R*-Mutagenisierungsvektors und in b das Ergebnis des Kontrollverdaus des Mutagenisierungskonstrukts mit verschiedenen Restriktionsenzymen. Die erhaltenen Fragmente entsprechen den Vorgaben der Karte. 1: *Asp718*, 2: *EcoRI*, 3: *EcoRV*, 4: *NcoI*.

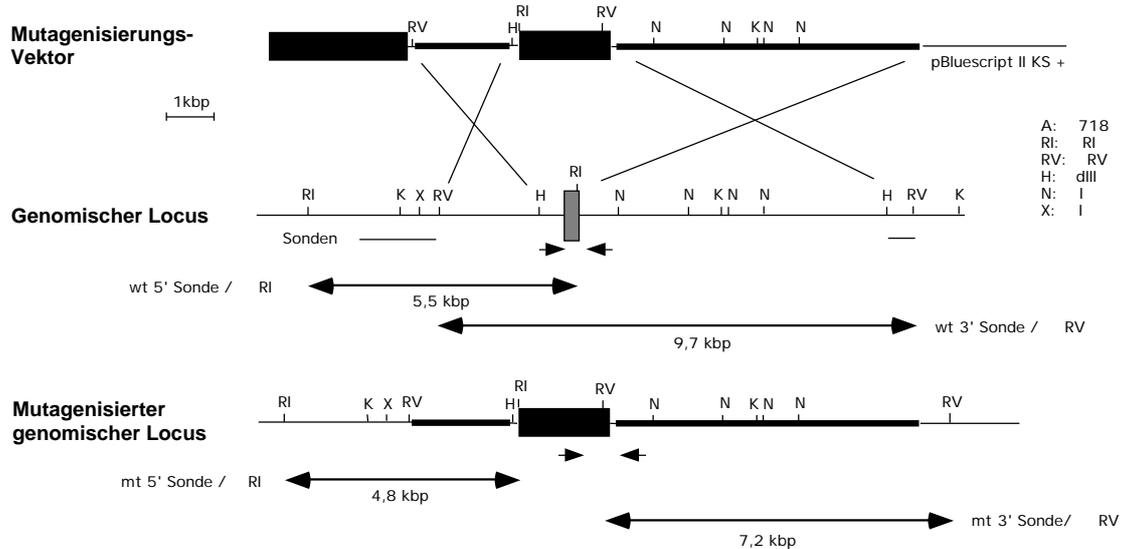


Abb. 3.20: Strategie zur Deletion des *Ephrin-A5*-Gens der Maus. Schematische Darstellung des Vorgangs der homologen Rekombination. Oben ist der des PGK-*neo^R*-Mutagenisierungsvektor dargestellt, dessen zum genomischen Locus (in der Mitte dargestellt) homologen Sequenzen (dicke Linien) rekombinieren. Das Ergebnis ist, wie unten dargestellt, ein mutiertes Allel in dem ein 670 bp großes *HindIII/EcoRI*-Fragment, das 280 bp des zweiten Exons enthält, durch die bakterielle PGK-*neo^R*-Kassette ersetzt ist. Die nicht homologen Sequenzen von HSV-*tk^S* und pBluescript II KS+ werden nicht integriert. Als doppelspitziige Pfeile sind die mit den externen Sonden hybridisierenden genomischen Fragmente gezeigt. Die Positionen der Genotypisierungs-Primer sind durch Pfeile angegeben.

3.5.3 Die Elektroporation des PGK-*neo*^R-Konstruktes

Die ES-Zellen wurden wie in 2.32.3.1 beschrieben für die Elektroporation vorbereitet. Exponentiell wachsende R1-ES-Zellen (NAGY *et al.*, 1993) der Passage 11 wurden durch Trypsinisierung geerntet und mit 30 µg Vektor-DNA transfiziert. Die Zellen wurden anschließend auf vier mit Gelatine beschichtete 10 cm-Kulturschalen ausgesät. Die Selektion in G418 (positiv-Selektion) begann nach 24 h, in Gangcyclovir (negativ-Selektion) nach 48 h. Die Selektion wurde insgesamt für 8 bis 9 Tage aufrechterhalten bis alle Zellen, mit Ausnahme klar zu unterscheidender, individueller, resistenter Klone, abstarben. Zur Kontrolle der Rekombinationseffizienz wurden die Zellen einer Platte nur mit G418 selektioniert.

Aus acht Elektroporationen mit der R1-ES-Zelllinie wurden 600 doppelstselektionierte Klone über Southern-Blot-Analyse mit der 5'-externen Sonde auf homologe Rekombination abgesucht. Aus dieser Suche konnten zwei, mit beiden Armen homolog rekombinierte Klone isoliert werden (4E5 und 5A3). Die Rekombinationsfrequenz lag somit bei 0,33%.

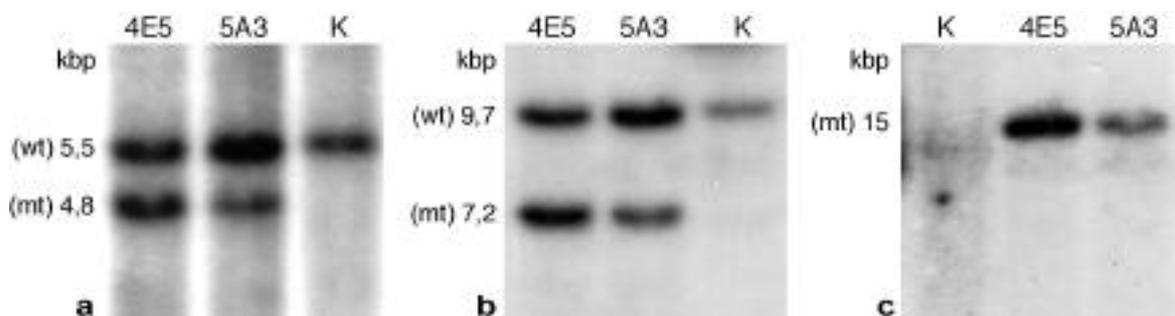


Abb. 3.21 zeigt die Southern-Blot-Analyse für die homolog rekombinierten ES-Zellklone 4E5 und 5A3 sowie von Kontroll-DNA (K). In a ist die Analyse mit der 5'-externen Sonde, nach Verdauung mit *EcoRI* und in b mit der 3'-externen Sonde zu nach Verdauung mit *EcoRV* zu sehen. In c ist die Hybridisierung mit der internen *neo*-Sonde, nach Verdauung mit *EcoRI* zu sehen. Der Verdauung mit *EcoRI*, mit einer internen und einer externen Schnittstelle, ermöglicht die Detektion multipler Integrationen. Die Polymorphismen entsprechen den erwarteten Größen wie in Abb. 3.20 dargestellt.

Das PGK-*neo*^R-Konstrukt wurde ebenfalls der E14-ES-Zelllinie (HOOPER *et al.*, 1987) unter den weiter oben dargestellten Bedingungen transfiziert. Die Suche nach homologer Rekombination, über Southern-Blot-Analyse mit der 5'-externen Sonde, konnte bei 280 doppelstselektionierten ES-Zell-Klonen kein derartiges Ereignis identifiziert werden.

3.5.4 Die Generierung von Chimären aus den mutagenisierten ES-Zellen

Die ES-Zellklone 4E5 und 5A3, für die über Southern-Blot-Analyse ein homolog rekombiniertes Allel nachgewiesen wurde, wurden expandiert, in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und für die Injektion in Blastocysten (E 3,5) verwendet, die aus superovulierten C57BL/6-Weibchen gewonnen wurden. Die mit ES-Zellen injizierten Blastocysten wurden in scheinträchtige Ammenmäuse retransferiert und die Chimären anhand der Agouti-Fellfarbe identifiziert. Die Ergebnisse aus der Injektion der ES-Zellen und der aus ihnen generierten Chimären sind Tab. 3.4 zu entnehmen.

Tab. 3.4: Injektions- und Transfer-Daten sowie Anzahl und Qualität der aus ihnen generierten Chimären. Der Chimärismus wurde anhand der Fellfarbe im Alter von ca. 5 Wochen bestimmt.

Zelllinie	retransferierte Embryos	Wurfgröße	männliche Chimären	weibliche Chimären	#/Agouti-Färbung
4E5	16	-	-	-	-
	16	-	-	-	-
	16	10	5	1	1/40% 2/50% 3/50% 4/80% 6/90%
	18	5	2	-	7/100% 8/20%
	18	5	2	2	9/100% 10/95% 11/50% 12/50%
	18	10	6	-	13/80% 14/90% 15/100% 16/100% 17/90% 18/20%
	16	6	4	1	19/100% 20/100% 21/100% 22/90% 23/50%
	5A3	19	1	1	-
	18	1	1	-	25/100%

Chimären deren Fellfarbe zu 90 - 100% der Agouti-Färbung entsprach wurden mit Mäusen des Stammes C57BL/6 rückgekreuzt und die Nachkommen über Southern-Blot-Analyse auf Transmission des mutierten Allels überprüft. Die folgende Tabelle listet die Ergebnisse aus der Rückkreuzung auf.

Tab. 3.5: Ergebnisse aus der Rückkreuzung ausgewählter männlicher Chimären mit C57BL/6-Weibchen.

Chimäre (#)	Nachkommen mit Agouti-Fellfarbe	Heterozygote (+/-)
7	3	1
9	7	-
	8	-
	9	-
14	6	-
16	2	2
17	8	6
19	9	3
	9	5
	13	8
20	6	3
	7	2
21	2	1
	11	6
	4	-
22	7	-
25	11	-
	3	3
Anteil		32%

Nachkommen der F1-Generation, die ein mutiertes Allel trugen wurden untereinander, zur Generierung homozygot mutanter Nachkommen verpaart. Die Nachkommen wurden über Southern-Blot-Analyse bzw. PCR genotypisiert wie in Abschnitt 2.21 beschrieben. Alle möglichen Allel-Kombinationen konnten detektiert werden (+/+, +/-, -/-).

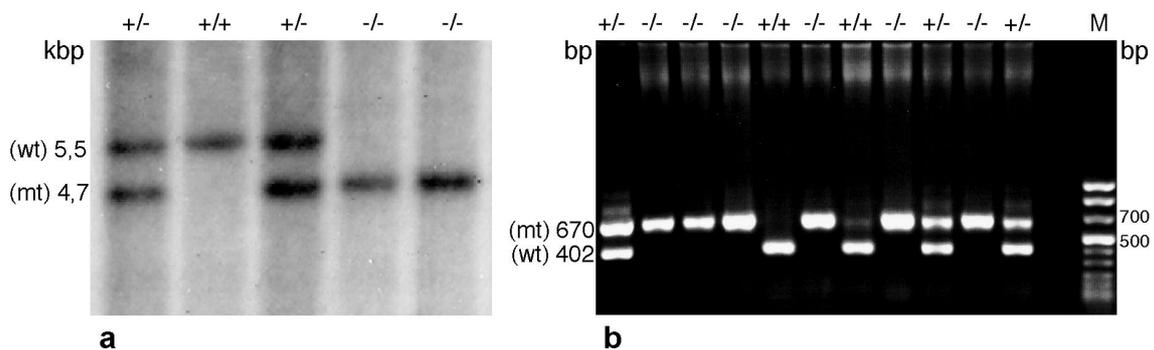


Abb. 3.22: Genotypisierung von Tieren der F2-Generation. a) Southern-Blot-Analyse über Hybridisierung mit der 5'-externen Sonde. b) EtBr-gefärbtes Agarosegel, in dem die Produkte der PCR-Genotypisierung eines Wurfs elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Es können alle drei möglichen Allel-Kombinationen detektiert werden. M: Molekulargewichtsstandard.

3.5.5 Klonierung des *lacZ*-PGK-*neo*^R-Mutagenisierungs-konstruktes

Die Untersuchungen dieser Arbeit sowie anderer Gruppen haben gezeigt, daß es sich bei *Ephrin-A5* um ein räumlich wie zeitlich, dynamisch und komplex reguliertes Gen handelt. Um die Expression von *Ephrin-A5* detaillierter verfolgen zu können wurde entschieden den Locus zusätzlich durch ein Konstrukt zu mutagenisieren, daß nicht nur zur Inaktivierung des Gens führt sondern zusätzlich *lacZ* als Reporter gen enthält. Das Reporter genprodukt (β -Galaktosidase) kann durch relativ einfache histochemische Methoden visualisiert werden. Die Aktivität der β -Galaktosidase, die die Spaltung von Laktose in Glukose und Galaktose katalysiert, kann mit chemischen Substraten, z.B. 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal), nachgewiesen werden. Die β -Galaktosidase setzt das farblose X-Gal in das 5-Brom-4-chlorindoxyl um, daß an der Luft zu blauem 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert. Somit sollte im Idealfall der Expresionsverlauf des Reporters, der leicht an der blauen Färbung erkannt werden kann, der Expression von *Ephrin-A5* folgen.

Die im PGT-3/PT-1-Vektor (kloniert von Dr. David Hill und Dr. Wolfgang Wurst, modifiziert von Peter Timpel) enthaltene *En2*-SA-*lacZ*-PGK-*neo*^R-Kassette (6,9 kbp) wurde jeweils nach partiellem Verdau mit *Hind*III und *Bgl*II (durch Hinzufügen von EtBr) sukzessive an den flankierenden *Hind*III- und *Bgl*II-Restriktionsschnittstellen mit folgenden, jeweils eine *Sal*I-Schnittstelle enthaltende, Verbindungsstücken versehen:

	<i>Hind</i> III	<i>Sal</i> I	<i>Hind</i> III
<i>Hind</i> III:	AGCTTCGCGTAGTCGACGCGA		
		AGCGCATCAGCTGCGCTTCGA	
	<i>Bgl</i> II	<i>Sal</i> I	<i>Bgl</i> II
<i>Bgl</i> II:	GATCTCGCGTAGTCGACGCGA		
		AGCGCATCAGCTGCGCTCTAG	

Anschließend wurde über Verdau mit *Sal*I die Kassette ausgeschnitten und in den mit *Sal*I vorgeshnittenen Vektor ligiert, der wie in 3.5.2 bereits beschrieben aus den PGK-HSV-*tk*^S, 5´-2 kbp-Rekombinationsarm und 3´-6,4 kbp-Rekombinationsarm besteht. Das in diesem Vektor verwendete *lacZ*-Gen besitzt weder einen eigenen Promotor noch ein eigenes Translationsinitiationscodon und unterliegt daher der Regulation des endogenen Locus. Um zu gewährleisten, daß nach der homologen Rekombination die *lacZ*-Kassette im richtigen Leserahmen in den endogenen *Ephrin-A5*-Locus integriert, wurde ein Vektor verwendet, in welchem das *En2*-Intron mit dem pSA3-Spleiß-Akzeptor ausgestattet ist. Dieser Spleiß-Akzeptor (agG TCC CAG) simuliert Phase 2 für das *En2*-Intron und befindet sich demnach in der gleichen Phase wie auch das erste Intron des *Ephrin-A5*-Gens. Der modifizierte Locus sollte demnach zu einem reifen Transkript bestehend aus dem ersten *Ephrin-A5*-Exon und *lacZ* führen sowie die korrekte Translation in die β -Galaktosidase ermöglichen.

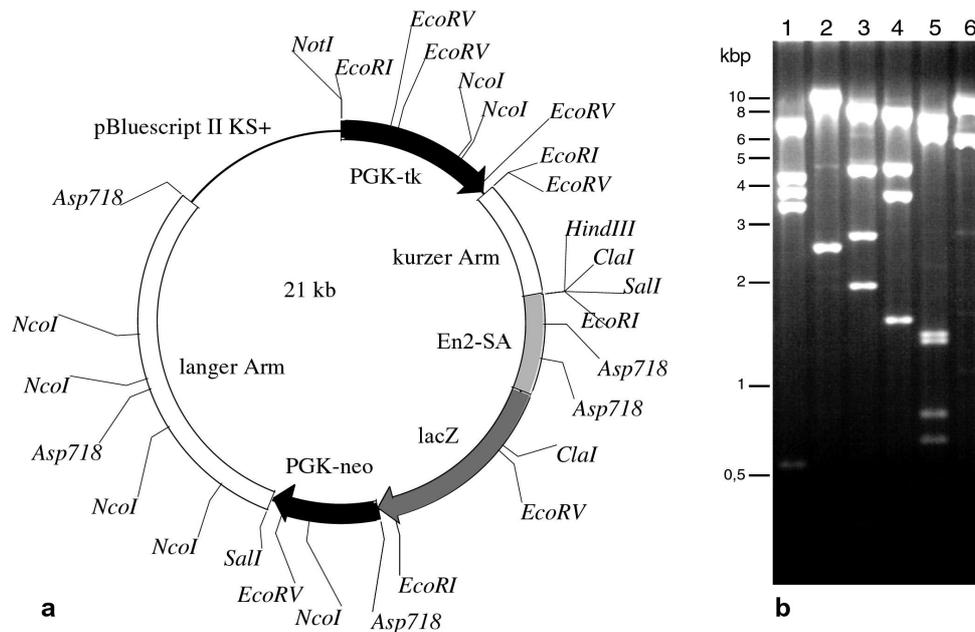


Abb 3.23 zeigt in a die zirkuläre Karte des *lacZ*-PGK-*neo*^R-Mutagenisierungsvektors und in b Kontrollverdau-Ergebnisse des Vektors mit verschiedenen Restriktionsenzymen. Die erhaltenen Restriktionsfragmente entsprechen den Angaben der Karte. 1: *Asp718*, 2: *ClaI*, 3: *EcoRI*, 4: *EcoRV*, 5: *NcoI*, 6: *Sall*.

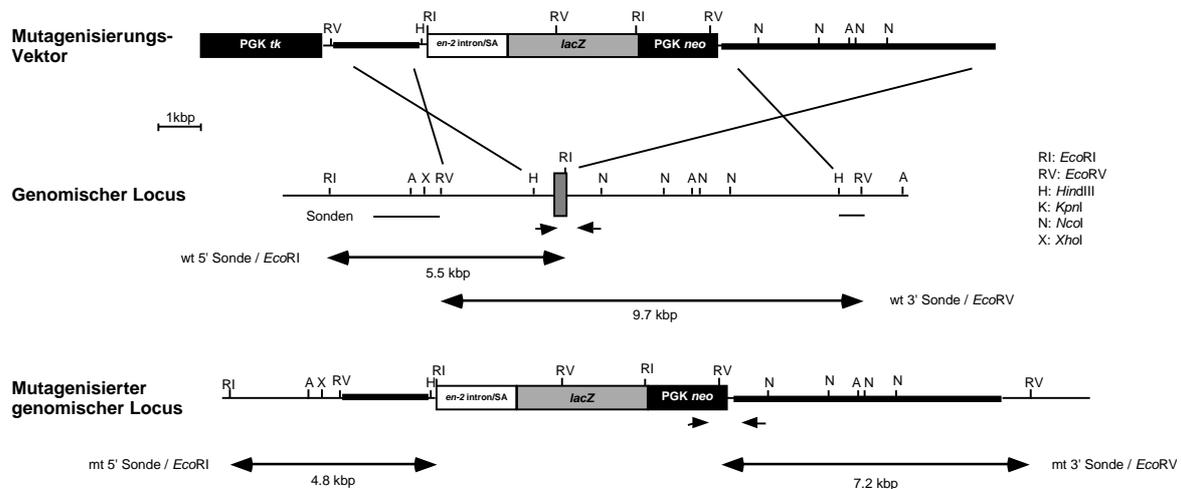


Abb. 3.24: Strategie zur Deletion des *Ephrin-A5*-Gens der Maus mit dem *lacZ*-PGK-*neo*^R-Mutagenisierungsvektor anhand einer schematischen Darstellung des Vorgangs der homologen Rekombination. Im oberen Teil ist der Vektor dargestellt, der mit seinen zum genomischen Locus (in der Mitte dargestellt) homologen Sequenzen (dicke Linien) rekombiniert. Das Ergebnis ist, wie unten gezeigt, ein mutiertes Allel, in dem ein 670 bp großes *HindIII*/*EcoRI*-Fragment, das 280 bp des zweiten Exons enthält durch die bakteriellen *lacZ*-PGK-*neo*^R-Kassetten ersetzt wird. Die nicht homologen Sequenzen von HSV-*tk*^S und pBluescript II KS+ werden nicht integriert. Als doppelspitziige Pfeile sind die mit den externen Sonden hybridisierenden genomischen Fragmente dargestellt. Die Positionen der Primer zur PCR-Genotypisierung sind als Pfeilspitzen angegeben.

3.5.6 Die Elektroporation des *lacZ*-PGK-*neo*^R-Konstruktes

ES-Zellen der Linie TBV2 (hergestellt von Dr. Veronique Blanquet) wurden wie in 2.32.3.1 beschrieben für die Elektroporation vorbereitet. Exponentiell wachsende ES-Zellen der Passage 10 wurden durch Trypsinisierung geerntet und mit 30 µg über *NotI*-Verdau linearisierter Vektor-DNA transfiziert. Aussaat und Selektion der Zellen wurde wie in 3.5.3 für das PGK-*neo*^R-Konstrukt bereits beschrieben durchgeführt. Zur Kontrolle der Rekombinationseffizienz wurden die Zellen einer Platte nur mit G418 selektioniert. Im Ergebnis ergab die Doppelselektion ungefähr eine Halbierung der Anzahl resistenter Klone im Vergleich zur Einfachselektion.

Aus drei Elektroporationen mit der TBV2-ES-Zelllinie wurden 575 doppelstelierte Klone über Southern-Blot-Analyse mit der 5'-externen Sonde auf homologe Rekombination abgesucht. Aus dieser Suche konnten drei, mit beiden Armen homolog rekombinierte Klone isoliert werden (1F6, 2D7 und 7D2). Die Rekombinationsfrequenz lag somit bei ca. 0,5%.

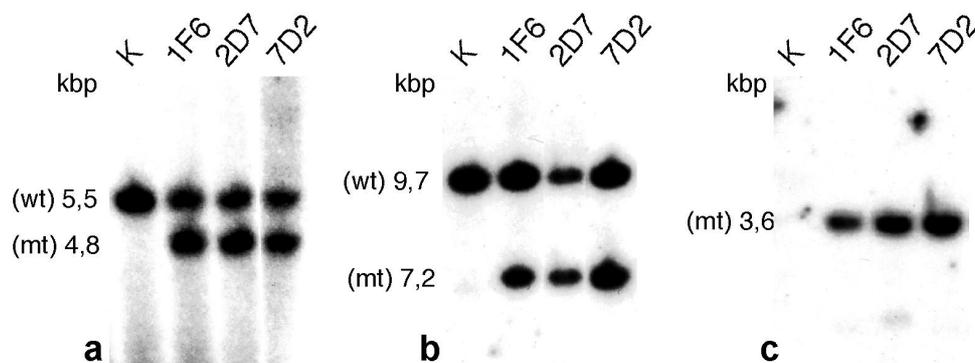


Abb. 3.25 zeigt die Ergebnisse der Southern-Blot-Analyse für die homolog rekombinierten ES-Zell-Klone 1F6, 2D7 und 7D2 sowie von Kontroll-DNA (K). In a ist das Hybridisierungsergebnis der *EcoRI*-gespaltenen Fragmente mit der 5'-externen Sonde zu sehen, in b das Ergebnis für die *EcoRV*-gespaltenen Fragmente mit der 3'-externen Sonde und in c mit der internen *neo*-Sonde nach *EcoRV*-Verdau. Die Restriktions-Polymorphismen entsprechen den erwarteten Größen wie aus Abb. 3.24 zu entnehmen.

3.5.7 Die Generierung von Chimären aus den mutagenisierten ES-Zellen

Wie bereits in 3.5.4 dargestellt wurden resistente ES-Zell-Klone, die für das *lacZ*-PGK-*neo*^R-enthaltende Mutagenisierungskonstrukt homologe Rekombination zeigten zur Generierung von Chimären über Blastocysteninjektion und den Rücktransfer in scheinträchtige Ammenmäuse verwendet. Die Injektions- und Transfer-Daten können folgender Tabelle entnommen werden.

Tab. 3.6: Injektions- und Transfer-Daten sowie Anzahl und Qualität der aus ihnen generierten Chimären für das *lacZ*-PGK-*neo*^R-Mutagenisierungs-konstrukt. Der Chimärismus wurde anhand der Fellfarbe im Alter von ca. 5 Wochen bestimmt.

Zelllinie	retransferierte Embryos	Wurfgröße	männliche Chimären	weibliche Chimären	#/Agouti-Färbung
2D7	16	5	2	1	1/50%
					2/50%
					3/20%
	18	5	-	-	-
	20	3	1	-	4/60%
	20	-	-	-	-
	21	9	1	5	5/80%
					6/40%
					7/80%
					8/50%
					9/40%
					10/10%
	20	6	1	11/10%	
				12/70%	
1F6	22	-	-	-	-
7D2	22	-	-	-	-
	17	8	3	2	13/80%
					14/90%
					15/100%
					16/90%
	17	-	-	-	17/50%
					-

Einzelne Chimären mit hohem Anteil an Agouti-Färbung in der Fellfarbe wurden mit Mäusen des Stammes C57BL/6 rückgekreuzt und die Nachkommen über Southern-Blot-Analyse auf Transmission des mutierten Allels überprüft. Die folgende Tabelle listet die Ergebnisse aus der Rückkreuzung auf.

Tab. 3.7: Ergebnisse aus der Rückkreuzung ausgewählter männlicher Chimären mit C57BL/6-Weibchen.

Chimäre (#)	Nachkommen mit Agouti-Fellfarbe	Heterozygote (+/-)
13	1	-
	1	-
	5	5
	3	1
	5	2
14	1	1
	1	1
	4	1
Anteil		52%

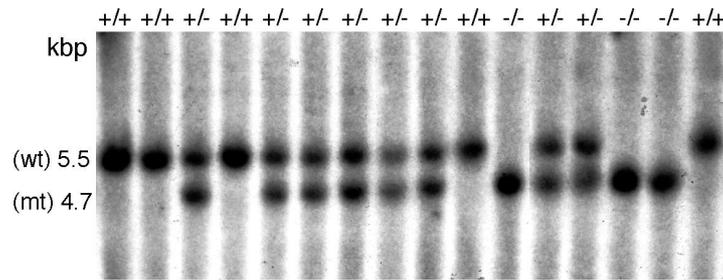


Abb. 3.26 zeigt die Genotypisierung von Tieren der F2-Generation mittels Southern-Blot-Analyse nach *Eco*RI-Verdau über Hybridisierung mit der 5' -externen Sonde. Es können alle drei möglichen Allel-Kombinationen detektiert werden.

Um die Aktivierung des *lacZ*-Reportergens zu überprüfen wurde vier Wochen alten wildtypischen sowie mutanten Tieren das Gehirn entnommen, coronar geschnitten und einer X-Gal-Färbung unterzogen. Nach drei Tagen Inkubation in der Färbelösung sowie weiteren fünf Tagen Lagerung in 4% PFA-enthaltendem PBS konnte eine ausreichende Intensität der Färbung zur Dokumentation erreicht werden (Abb. 3.27). Da die X-Gal-Färbung oft schon nach wenigen Stunden zu intensiven Signalen führt läßt dieses Ergebnis auf eine geringe β -Galaktosidase-Aktivität und damit auf eine ineffiziente Transkription des *LacZ*-Gens schließen. In der Tat konnte über RT-PCR-Analyse, wie im Falle des PGK-*neo^R*-Konstruktes (s. 3.6.1), ein nativ nicht auftretendes, die integrierten Kassetten umgehendes, aberrantes Spleißen festgestellt werden. Darüberhinaus konnte in jüngeren Stadien (E 9,5, E 10,5, E11,5) keinerlei β -Galaktosidase-Aktivität detektiert werden. Erst ab E 17 kann eine schwache Färbung facialer Elemente sowie der Extremitäten gesehen werden (Daten nicht gezeigt). Die Ursache hierfür könnte in der Deletion regulativer Elemente des zweiten Introns liegen. Der Vergleich der *lacZ*-Expression mit den Daten aus den *in situ*-Hybridisierungen zeigt eine weitgehende Übereinstimmung mit Ausnahme des Hypothalamus, wo die für *Ephrin-A5* charakteristischen Expressionsdomänen transgen nicht rekonstruiert werden.

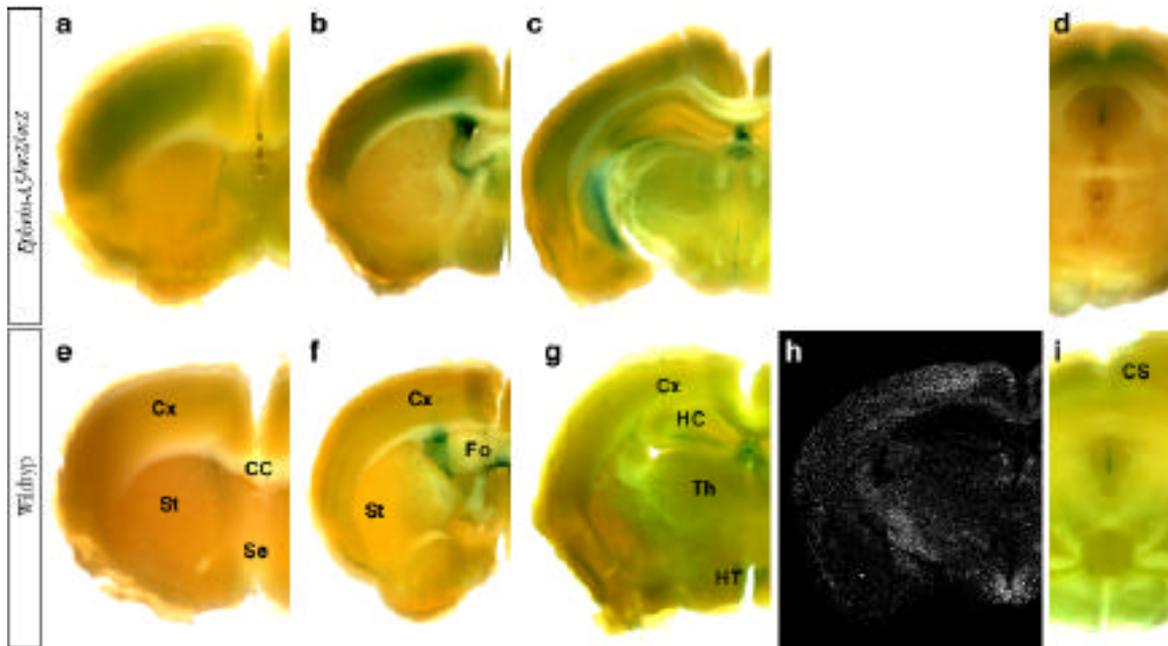


Abb. 3.27: Detektion der β -Galaktosidase-Aktivität in *Ephrin-A5^{lacZ/lacZ}*-Mäusen. Für die X-Gal-Färbung wurden ca. 1 mm-dicke, coronar verlaufende Gehirn-Schnitte verwendet. Schnitte eines transgenen Tieres (a - d) sind den Schnitten eines wildtypischen Tieres (e - g, i) gegenübergestellt. Die Schnitte verlaufen in a und e auf der Höhe des Septum, in b und f auf Höhe des Fornix in c und g ungefähr in der Mitte des Hippocampus und in d und i auf Höhe des Colliculus superior. In h ist eine *Ephrin-A5*-*in situ*-Hybridisierung gezeigt, die mit einem ähnlich wie in c und g verlaufenden Schnitt durchgeführt wurde. Der Vergleich mit der Lokalisation der mRNA soll bei der Interpretation der X-Gal-Färbung helfen. CC: Corpus callosum, CS: Colliculus superior, Cx: cerebraler Cortex, Fo: Fornix, HC: Hippocampus, HT: Hypothalamus, Se: Septum, St:Striatum, Th: Thalamus.

3.6 Analyse des Phänotyps *Ephrin-A5*-defizienter Mäuse

Sämtliche hier beschriebenen phänotypischen Analysen wurden an F2-Nachkommen der Chimären durchgeführt, die aus den ES-Zellklonen 4E5 und 5A3 generiert wurden. Diese ES-Zell-Klone wurden aus der Transfektion mit dem PGK-*neo^R*-Mutagenisierungsvektor gewonnen. Zwischen den Nachkommen der beiden ES-Zelllinien konnten weder in Qualität noch in Quantität Unterschiede in einzelnen untersuchten phänotypischen Parametern beobachtet werden.

3.6.1 Kontrolle des *Ephrin-A5*-Transkripts bei den Mutanten

Um festzustellen ob das Transkript des mutierten Allels hergestellt wird und damit die Effizienz der SV40-Terminierungs- und Polyadenylierungs-Sequenzen (SV40-pA), die das 3'-Ende der

PGK-*neo*^R-Kassette darstellen zu überprüfen, wurde mittels RT-PCR- und Northern-Blot-Analyse das *Ephrin-A5*-Transkript bei heterozygot und homozygot Mutanten überprüft. Das Ergebnis aus Abb. 3.28 zeigt, daß die SV40-pA-Kassette nicht zu einer Terminierung der Transkription führt, sondern aus dem mutierten Allel ein aberrantes, um das zweite Exon verkürztes Transkript entsteht. Dieses verkürzte Transkript, des rekombinierten Allels befindet sich, wie über Sequenzierung bestimmt wurde, nach Base 124 der kodierenden Sequenz ausserhalb des Leserahmens. Der versetzte Leserahmen ergibt sich dadurch, daß das letzte Triplet des Exons I 2/1 gespalten wird (Phase 2), hingegen das erste Triplet des Exons III 1/2 gespalten wird (Phase 1). Dieses verkürzte Transkript kodiert für ein verkürztes Protein von 65 Aminosäureresten, da die verbleibende kodierende Sequenz nach 192 bp ein TAG-Stop-Kodon im aberranten Leserahmen enthält. Die C-terminal liegenden 23 der 65 Aminosäurereste werden demnach von einem um 2 Nukleotide verschobenen offenen Leserahmen kodiert und weisen eine von Ephrin-A5 verschiedene Sequenz auf.

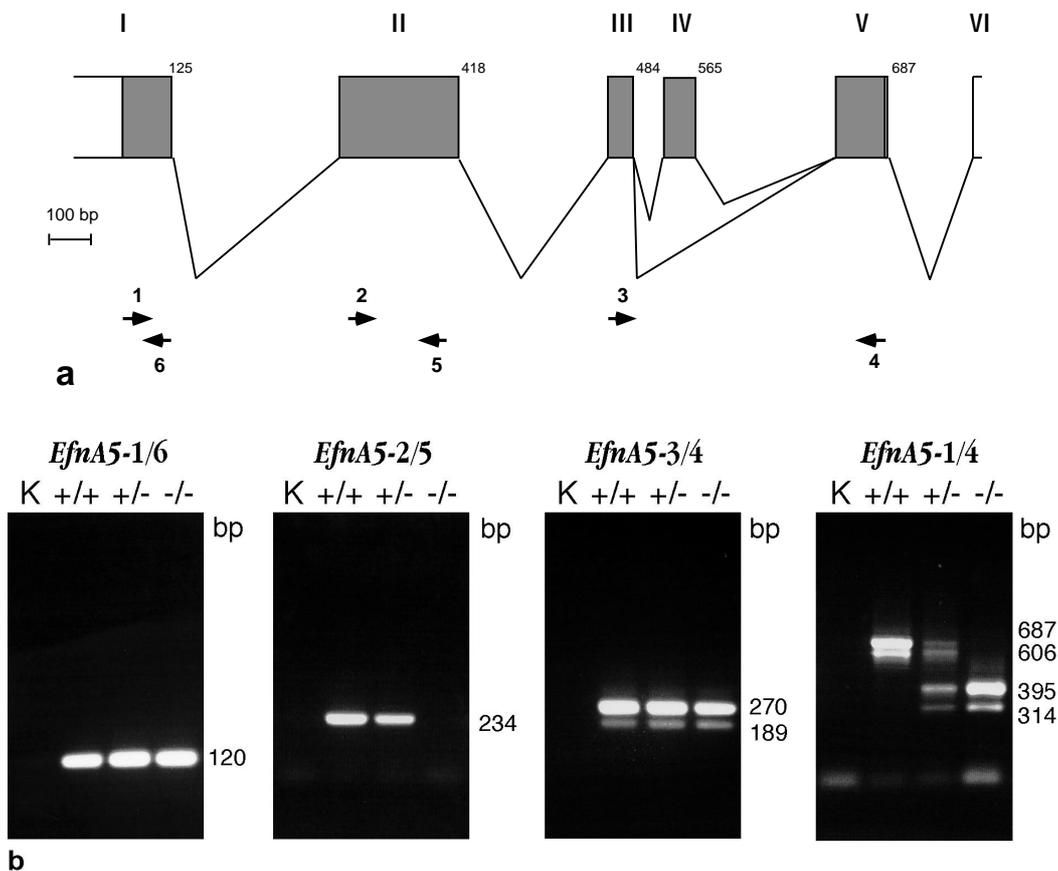


Abb. 3.28: Um das *Ephrin-A5*-Transkript nach der Mutagenisierung des Locus zu überprüfen wurde eine PCR-Strategie entwickelt, die in a schematisch dargestellt wird. Primer wurden so konstruiert, daß sie Sequenzen des I. (1/4), II. (2/5), III. -V. (3/4) und I. - V. (1/4) Exons amplifizieren (s. Tab. 3.8). Aus Gehirn von wildtypischen, heterozygoten und homozygoten Mutanten wurde Gesamt-RNA isoliert, mRNA revers transkribiert, restliche RNA verdaut, die cDNA aufgereinigt und für die PCR-Reaktionen eingesetzt. In b ist das Ergebnis aus der RT-PCR mit den verschiedenen Primer-Kombinationen zu sehen. Im mutierten Allel wird das Transkript, um das deletierte Exon verkürzt, hergestellt.

Tabelle 3.8: Die für die Kontrolle des *Ephrin-A5*-Transkripts verwendeten Primer.

Name	Sequenz 5´ 3´ (Länge)	T _m [°C]
<i>EfnA5-1</i>	ATG TTG CAC GTG GAG ATG TTG AC (23)	56,2
<i>EfnA5-2</i>	CAC ATT GAT GTC TGT ATC AAT GAC TAC C (28)	55,0
<i>EfnA5-3</i>	CTC CTC TGC AAT CCC AGA CAA C (22)	55,1
<i>EfnA5-4</i>	GCT ATA ATG TCA AAA GCA TCG CC (23)	54,8
<i>EfnA5-5</i>	ATC CTA AAG AAA AGG GAG TGA AGA GC (28)	56,0
<i>EfnA5-6</i>	GGT TGC TGC TGT TCC AGT AGA CG (23)	57,7

3.6.2 Analyse der Wurfgrößen - embryonale Letalität

Heterozygote Mäuse der F1-Generation, die aus der Verpaarung der Chimären mit C57BL/6-Mäusen hervorgingen und das mutierte Allel trugen wurden untereinander verpaart um in der F2-Generation Nachkommen mit zwei inaktivierten Allelen zu erhalten, sog. Nullmutanten. Die genotypische Analyse der F2-Generation zeigt ein deutliches Ungleichgewicht in der Verteilung zwischen Mutanten (-/-) und Heterozygoten (+/-) bzw. WT-Mäusen (+/+), wie aus Tabelle 3.9 entnommen werden kann. Die Analyse von 317 Nachkommen aus 42 Würfen ergab einen Anteil an homozygot Mutanten, der deutlich unter dem nach dem Mendelschen Vererbungsgesetz zu erwartenden Viertel liegt. Der Anteil der WT-Mäuse hingegen liegt deutlich über dem zu erwartenden Viertel. Diese Zahlen sind ein deutlicher Hinweis auf embryonale Letalität, die im Folgenden analysiert werden sollte.

Tab. 3.9: Statistische Verteilung der Genotypen in der F2-Generation nach Heterozygoten-Verpaarungen

Genotyp	+/+	+/-	-/-
Anzahl (n)	104	156	57
prozentueller Anteil (%)	~ 32,8	~ 49,2	18

3.6.3 Analyse der Defekte des anterioren Neuralrohrs

Um die Ursachen der embryonalen Letalität zu untersuchen, wurden die Föten dem Mutterleib entnommen. Aus 56 isolierten Embryonen des Genotyps -/- und der Stadien E 11,5 bis E 17,5 konnten 8 Föten mit Defekten des Neuralrohres identifiziert werden. Der sich daraus ergebende Anteil von ca. 14% kann nur die Hälfte der embryonalen Letalität über Neuralrohrdefekte erklären. Diese beträgt 28%, wie sich aus der Reduktion des zu erwartenden Viertels an homozygot Mutanten auf 18% errechnen läßt (s. Tab. 3.9). Da *Ephrin-A5* bereits früh in der Embryonalentwicklung exprimiert wird (Abb. 3.9) könnten z.B. Gastrulationsdefekte für den Verlust der restlichen homozygot Mutanten Embryonen verantwortlich sein.

Die Defekte des Neuralrohrs führen in den untersuchten embryonalen Stadien zu einer Exencephalie, die das Gehirn vom Vorderhirn bis ins Rückenmark betrifft. Das

überproliferierende Gewebe stülpt sich dabei über das restliche Gehirn und umschließt, wie auf sagittal geführten Schnitten zu sehen ist, große flüssigkeitsgefüllte Ventrikel. Die phänotypischen Veränderungen betreffen nicht nur die Strukturen des dorsalen Gehirns sondern auch ventrale Abschnitte, wie Hypothalamus und Hypophyse, die weitgehend disorganisiert sind (Abb. 3.29 und Daten nicht gezeigt).

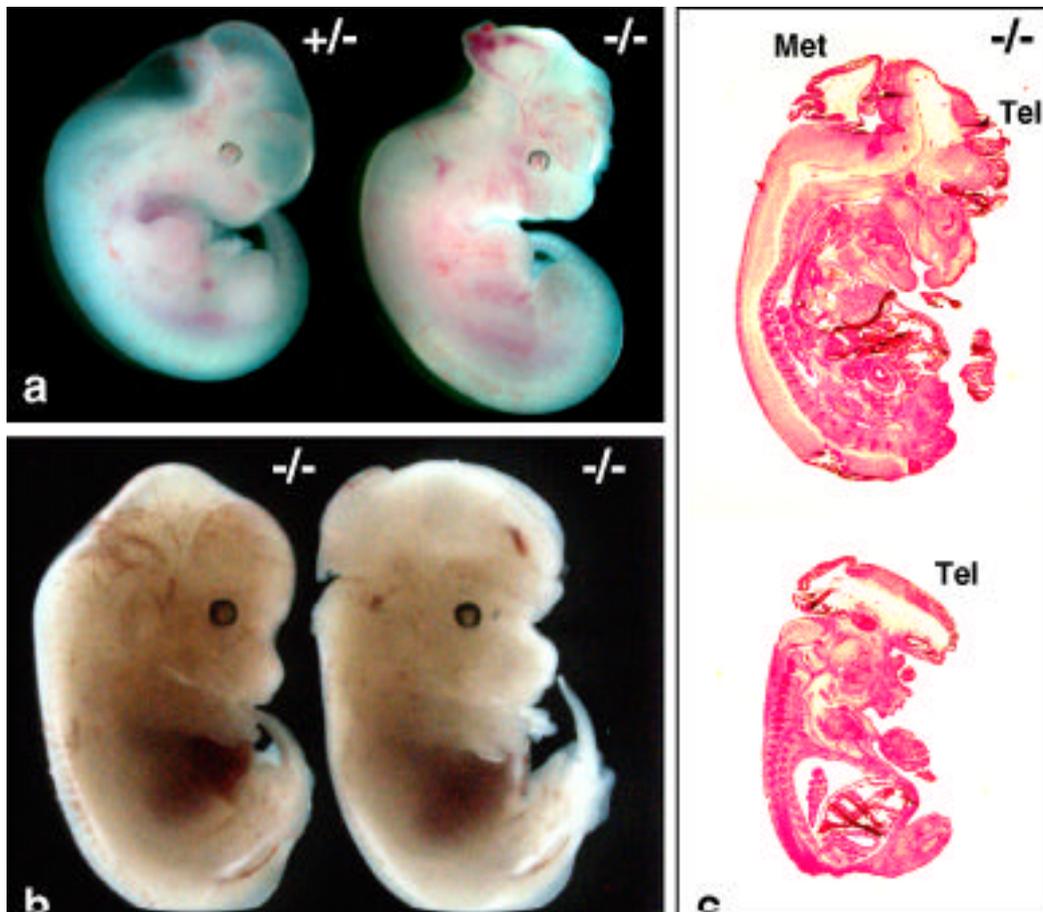


Abb. 3.29: Heterozygot (a, links) und homozygot (a rechts, b und c) mutante Föten der F2-Generation. In a liegt das Stadium E 11,5 in b und c E 13,5 vor. Der homozygote Embryo in b (links) ist phänotypisch nicht auffällig, wie die meisten Nachkommen dieses Genotyps. In c ist das exencephalische Individuum aus b in zwei Hämatoxylin/Eosin-gefärbten mitsagittal (unten) und parasagittal (oben) verlaufenden Schnitten gezeigt. Met: Metencephalon, Tel: Telencephalon

Tiere mit Neuralrohrdefekten starben innerhalb weniger Sekunden nach der Geburt und zeigten ein offenes Cranium mit Fehlen der darüberliegenden Haut sowie reduziertem Telencephalon (Abb. 3.30). Offenbar wird hier die Exencephalie im Laufe der weiteren Entwicklung soweit zurückgebildet, daß letztlich eine Anencephalie entsteht. Skelettpräparationen dieser Tiere, die mit wildtypischen und heterozygoten Geschwistern verglichen wurden, zeigen fehlende Elemente des Neurocraniums (Gehirn-bedeckender Anteil des Dermatocraniums) entlang der gesamten antero-posterioren Ausdehnung der dorsalen

Schädelkapsel. Für weitere Elemente insbesondere des ventralen Craniums sowie andere Skelett-Elemente konnten keine Veränderungen festgestellt werden (Abb. 3.30)

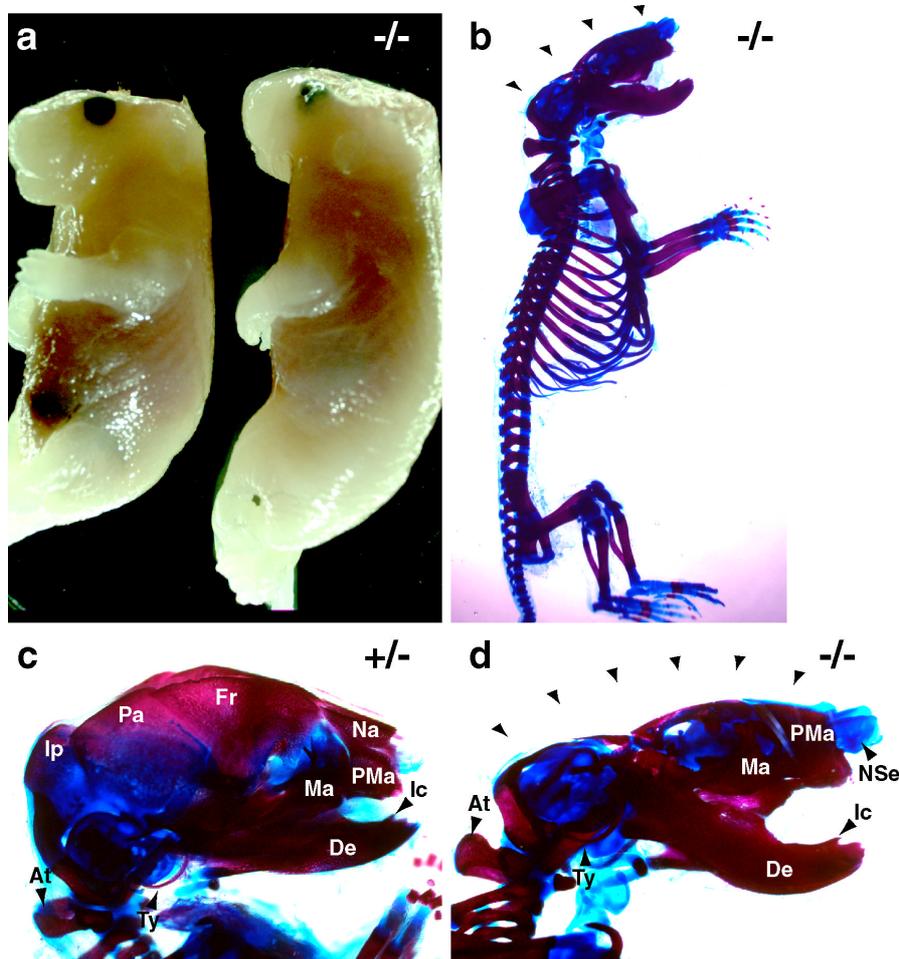


Abb. 3.30: a. Holotyp neugeborener anencephalischer *Ephrin-A5^{neo/neo}*-Mäuse. b. Skelettpräparation eines anencephalischen Individuums zeigt außer der offenen Schädelkapsel keine weiteren Veränderungen in der Skelett-Organisation. c, d. Vergleich des Schädels zwischen wildtypischen (c) und mutanten (d), anencephalischen F2-Nachkommen. Elemente des dorsalen Neurocraniums, wie Nasale, Frontale, Parietale und Interparietale, fehlen den Mutanten, was in einen offenen Schädel resultiert. Dies ist durch die Pfeilspitzen in d angedeutet. At: Atlas, De: Os Dentale, Fr: Os Frontale, Ic: Incisivus, IP: Os Interparietale, Ma: Os Maxillare, Na: OS Nasale, Nse: Nasenseptum, Pa: Os Parietale, Pma: Os Praemaxillare, Ty: Os Tympanicum.

3.6.4 Zellidentitätsanalyse bei den *Ephrin-A5^{neo/neo}*-Föten

Um die Zellidentität der *Ephrin-A5*-defizienten Föten zu überprüfen wurden Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen mit einer Auswahl an molekularen Markern durchgeführt. Hierbei wurden insbesondere Marker verwendet, die charakteristisch für die mes-/metencephalische

Region sind, bzw. an deren Spezifizierung mitwirken. Insbesondere wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren *En2* und *Pax2* sowie von *Ephrin-A2*, welches eine ähnliche Expression im dorsalen Mesencephalon wie *Ephrin-A5* besitzt und des *EphA4*-Rezeptors, der die Expression von von *Ephrin-A5* im Bereich der Extremitäten und des Oberkiefers umgrenzt überprüft (Abb. 3.31).

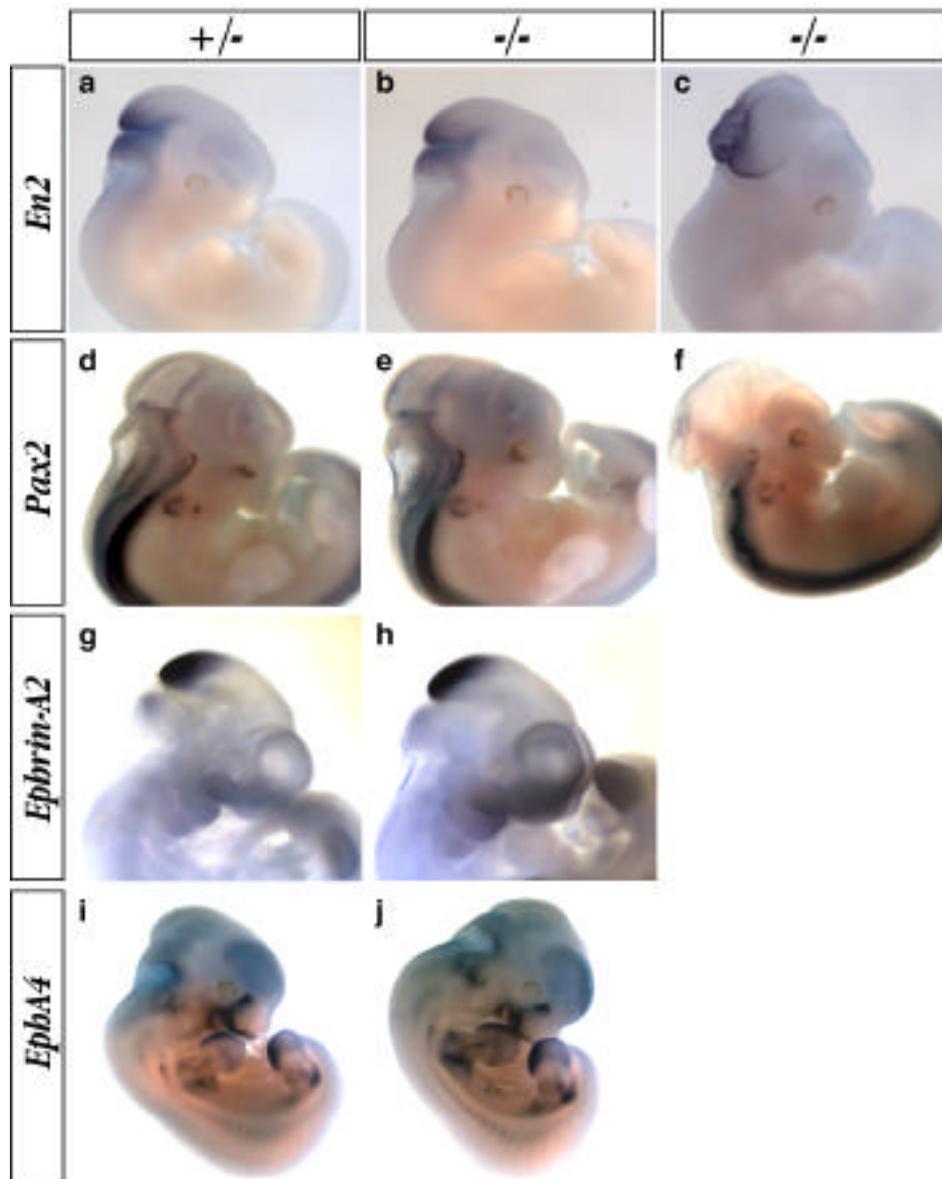


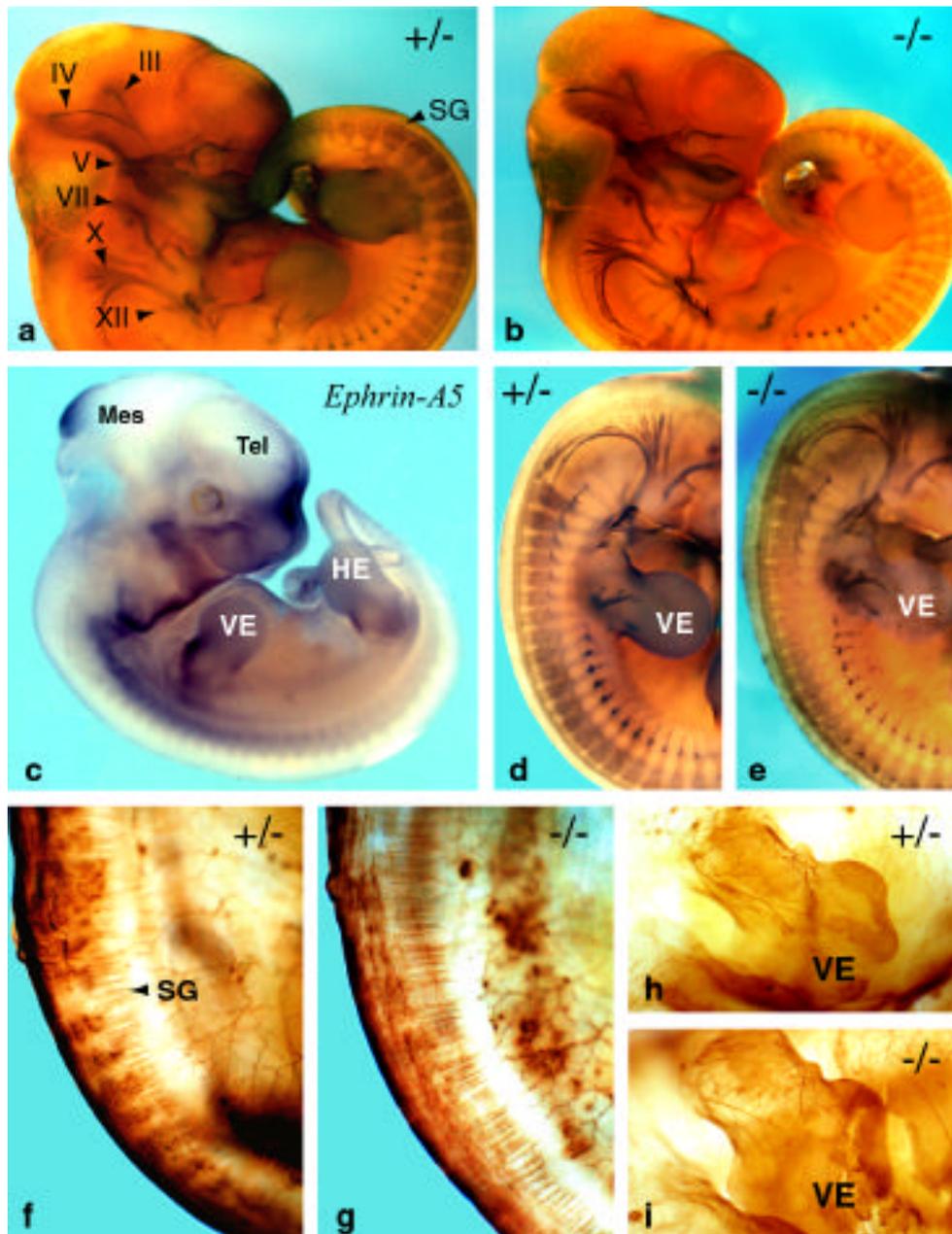
Abb. 3.31: Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen mit heterozygoten und homozygoten *Ephrin-A5*-Mutanten. Alle Föten entsprechen dem Stadium E 11,5 (TS19). Die Sonden sind jeweils links und die Genotypen jeweils oben angegeben. In c und f wurden exencephalische Embryonen mit den entsprechenden Sonden hybridisiert. Während bei den *Ephrin-A5*-defizienten Embryonen ohne Neuralrohr-Defekte keine Abweichungen vom wildtypischen Expressionsmuster festgestellt werden können, zeigen sich bei den exencephalischen Föten Veränderungen, die auf die abnorme Morphologie zurückzuführen sind.

Zwischen Embryonen verschiedener Genotypen konnten in der Expression der einzelnen Marker keine Unterschiede festgestellt werden. Sowohl Verteilung als auch Stärke der Signale aus den *in situ*-Hybridisierungen unterscheiden sich, in allen Domänen, nicht zwischen Mutanten und Wildtyp (Abb. 3.31). Allerdings kann die abnorme Morphologie der exencephalischen Föten auch anhand der Expressionsmuster, der hier exprimierten Gene nachvollzogen werden. Die molekulare Identität des stark proliferierenden Gewebes im mes-/metencephalischen Bereich der exencephalischen Föten bleibt jedoch erhalten (Abb. 3.31c). Der Expressionsverlauf von *Pax2* zeigt deutlich, daß sich die Defekte bis ins Rückenmark ausdehnen (Abb. 3.31f).

3.6.5 Analyse der Entwicklung des Nervensystems

Die Analyse der Expression von *Ephrin-A5* während der Embryonalentwicklung zeigte neben Domänen, die im Zusammenhang mit der retinotektalen Topographie stehen (Retina, Tectum; Abb. 3.10, 3.11, 3.12, 3.18) weitere Expressionsterritorien auf. Interessanterweise stehen manche dieser Territorien in enger räumlicher Beziehung zum frühen Verlauf einzelner Cranialnerven, wie z.B. des Trigeminus oder Fasern motorischer Neurone des Rückenmarks, die in die Extremitätenknospen einwachsen. Diese Verhältnisse legen eine Beteiligung von *Ephrin-A5* bei der korrekten Zielfindung und/oder Faszikulation dieser Nerven nahe. In der Tat konnte *in vitro* für *Ephrin-A5* ein inhibitorischer Effekt auf das Auswachsen von Motoneuron-Neuriten festgestellt werden (OHTA *et al.*, 1997). Um diese Annahme *in vivo* zu überprüfen wurden an Ganzkörperpräparaten von Embryonen immunhistochemische Färbungen mit einem monoklonalen -Neurofilament 160-Antikörper (Sigma, Kat-Nr.: N-5264) durchgeführt. Dieser Antikörper richtet sich gegen das 160 kDa-Polypeptid der Neurofilamente (aus drei Proteinen aufgebaute intermediäre Filamente von Nervenzellen) und ermöglicht damit die Visualisierung von Axonen und den aus ihnen gebildeten Nerven. Aus dem Vergleich der Immunfärbung von WT- mit *Ephrin-A5^{neol/neo}*-Föten sollen potentielle Defekte ersichtlich werden und aus der Relation zur Expression von *Ephrin-A5* in ihrem Mechanismus verstanden werden.

Die untersuchten Stadien für die Neurofilamentfärbungen lagen zwischen E 11,0 und E 12,5. Insgesamt 5 +/+, 5 +/- und 8 -/- sowie 3 +/+, 6 +/- und 5 -/- Föten der Stadien E 11,0/11,5 und E 12,5 respektive wurden analysiert. Bei 12,5 Tage alte Embryonen konnte aufgrund der zunehmenden Dicke des Gewebes und seiner geringeren Zugänglichkeit für die Antikörper nur Teile der Innervierung, in erster Linie der Extremitäten und die Spinalganglien sichtbar gemacht werden. Bei keinem Stadium konnten für die *Ephrin-A5^{neol/neo}*-Föten Defekte in Auswachsen oder Faszikulation von Nerven oder sonstige Abweichungen in der Organisation des Nervensystems erkannt werden. Sowohl die Cranialnerven als auch Spinalganglien oder motorische Fasern, die in die Extremitätenknospen einwachsen zeigen sich normal faszikuliert und zeigen einen wilotypischen Verlauf.



3.32: Neurofilament-Immunfärbungen an Ganzkörper-Präparaten von heterozygot (a, d, f, h) und homozygot (b, e, g, i) mutanten Föten. In c ist eine *Ephrin-A5*-Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierung gezeigt. Sie ermöglicht den direkten Vergleich des *Ephrin-A5*-Expressionsmusters mit dem Verlauf wichtiger Cranialnerven. Die in a - e gezeigten Föten sind 11,5 Tage alt, die Embryos in f - i 12,5 Tage alt. In f und g sind Ausschnitte der ventralen Rückenlinie in der Sacralregion und in h und i der Vorderextremität zu sehen. Bei den homozygot Mutanten liegt keine Abweichung vom wildtypischen Innervierungsmuster ab. HE: hintere Extremitätenknospe, Mes: Mesencephalon, SG: Spinalganglien, Tel: Telencephalon, VE: vordere Extremitätenknospe, III: Nervus oculomotorius, IV: Nervus trochlearis, V: Nervus trigeminus, VII: Nervus facialis, X: Nervus vagus, XI: Nervus accessorius.

Die Innervierung, der sich entwickelnden Extremitäten wurde zusätzlich durch Anfärben der Axone mit Dil-Kristallen, die proximo-dorsal in die Extremitätenknospen von 13,5 Tage alten Föten gesetzt wurden untersucht. Nach abgeschlossener Diffusion wurde das Innervierungsmuster zwischen Mutant und Wildtyp im Holotyp und Horizontalschnitt verglichen und ausgewertet. Aus diesen Studien konnten ebenfalls keine Abweichung im Auswachsen der motorischen Nerven bei *Ephrin-A5*-defizienten Embryonen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

3.6.6 Analyse des retinocollicularen Systems

Da der Expressionsverlauf sowie die Ergebnisse von *in vitro*- und *in vivo*-Studien beim Huhn (*Gallus gallus domesticus*), Ephrin-A5 in die Entwicklung der retinotektalen Karte implementieren (DRESCHER *et al.*, 1995; MONSCHAU *et al.*, 1997; CIOSEK *et al.*, 1998; Übersicht bei TESSIER-LAVIGNE, 1995; HARRIS und HOLT, 1995; DRESCHER *et al.*, 1997), wurde versucht die Rolle von Ephrin-A5 beim homologen retinocollicularen System der Säuger, über die Analyse der in dieser Arbeit generierten *Ephrin-A5*-defizienten Mäuse (*Ephrin-A5^{neo}*), zu entschlüsseln. Die Herstellung von genetisch defizienten Hühnern ist derzeit nicht möglich, wodurch der Wechsel des Modellorganismus sich anbietet, um diese technische Limitierung zu umgehen. Die Tatsache, daß die prinzipielle Organisation der retinocollicularen Karte der Maus mit der retinotektalen des Huhns übereinstimmt und die Expression von *Ephrin-A5* bei beiden Modellorganismen sehr ähnlich verläuft, erlaubt eine Interpretation der Ergebnisse im Sinne der ursprünglich beim Huhn erhobenen funktionellen Daten zu Ephrin-A5.

Um eine eventuelle Disorganisation der Topographie im retinocollicularen Projektionssystem zu erfassen, wurden Experimente zur retrograden Markierung von Axonen retinaler Ganglienzellen (RGZ) mit dem fluoreszierenden Farbstoff 4-Di-10-Asp durchgeführt. Die Markierungen erfolgten an 4 - 6 Wochen alten Mäusen. Hierzu wurde der Farbstoff operativ, fokal in festgelegte Positionen des Colliculus superior eingebracht. Nach retrogradem Transport des Farbstoffs über drei Tage wurden die Mäuse getötet, Retinae sowie Gehirne präpariert und die Ergebnisse dokumentiert. Insgesamt wurden 6 wildtypische und 17 homozygot mutante Mäuse beider Geschlechter injiziert. Zusätzlich wurde an coronar verlaufenden Schnitten überprüft ob innerhalb des optischen Nervs ein abnormer Verlauf der markierten Fasern auftritt, was auf ihre Disorganisation in intermediären Strukturen der retinotektalen Verbindung schließen läßt.

Aus den Ergebnissen der retrograden Markierungen ergeben sich keine Abweichungen in der Organisation der retinocollicularen Karte bei den *Ephrin-A5^{neo/neo}*-Mäusen (Abb. 3.33). Alle retrograd gefärbten retinalen Areale bei den Mutanten entsprechen auch im Wildtyp den jeweiligen korrespondierenden collicularen Positionen. Der Erhalt der retinocollicularen Karte betrifft sowohl Bereiche des äußersten nasalen als auch des temporalen Anteils der Retina. In der besonders präzisen Topographie zentraler retinaler Areale kann ebenfalls keine Abweichung vom Wildtyp festgestellt werden (Abb. 3.33). Die Auswertung coronar geführter Schnitte durch den optischen Nerv zeigte ebenfalls keine Abweichungen im Verlauf retinaler Fasern eines bestimmten Areals (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend kann aus der durchgeführten Analyse geschlossen werden, daß in adulten *Ephrin-A5*-defizienten Mäusen

keine Veränderungen der topographischen Projektion retinaler Axone in den Colliculus superior auftreten.

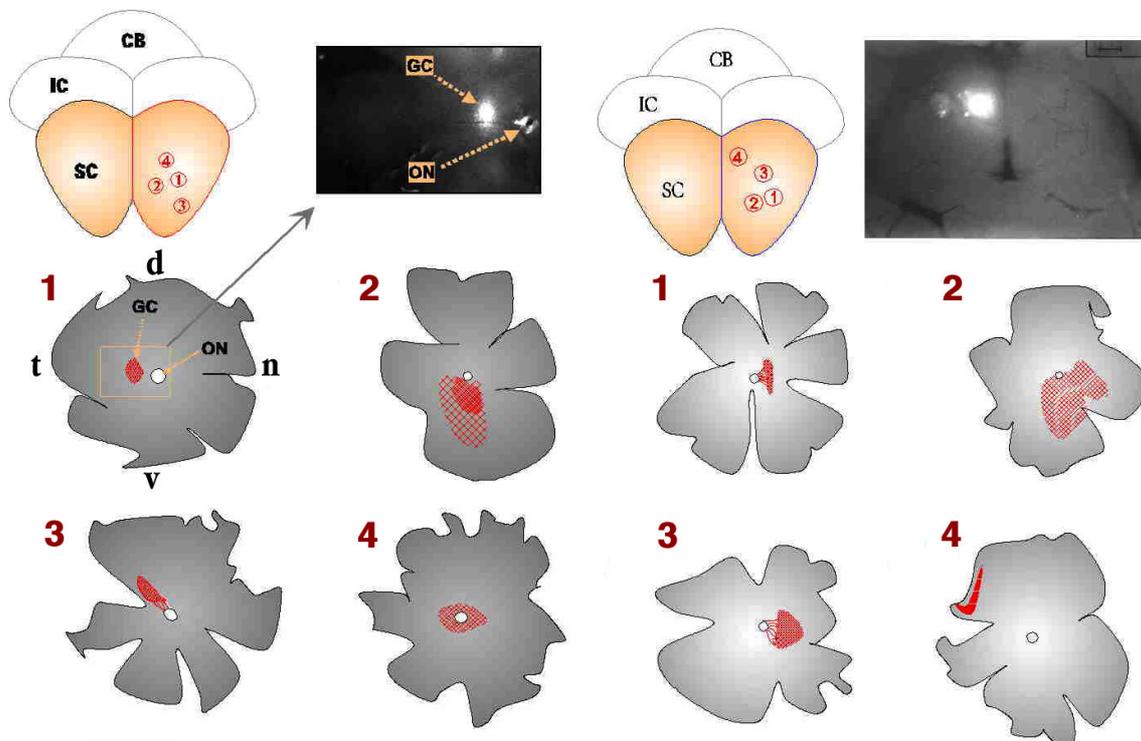


Abb. 3.33 zeigt acht exemplarische Ergebnisse aus der Analyse der retinocollicularen Projektionen adulter *Ephrin-A5^{neo/neo}*-Mäuse nach fokaler Injektion von Dil in den Colliculus superior. Die *Camera lucida*-Zeichnungen zeigen ausgebreitete Retinae, in denen die retrograd angefarbten Areale rot dargestellt sind. Die Injektionsstellen in den Colliculus superior (jeweils 1 - 4) korrelieren zu den Retina-Bildern. Als eingefügte Schwarzweiß-Fotografien sind links ein Ausschnitt aus einer retrograd gefärbten Retina zu sehen und rechts ein markierter Colliculus. CB: Cerebellum, GZ: retinale Ganglienzellen (markiert), IC: Colliculus inferior, ON: Austrittsstelle des optischen Nervs, SC: Colliculus superior; d: dorsal, n: nasal, t: temporal, v: ventral,

3.6.7 Analyse der thalamocorticalen Projektionen

Hinweise aus Expressionsstudien und *in vitro*-Experimenten deuten eine Beteiligung von Ephrin-A5 bei der Regionalisierung und/oder thalamischen Innervierung des cerebralen Cortex an. Wie bereits gezeigt (Abb. 3.15 und 3.27), wird *Ephrin-A5* bei der Geburt und in späteren Stadien im sensomotorischen corticalen Areal exprimiert. So wird vermutet, daß Ephrin-A5 für die abstoßende Wirkung auf Axone des medialen Thalamus verantwortlich ist (GAO *et al.*, 1998/a). Diese Fasern limbischer Neurone exprimieren den Rezeptor EphA5 und meiden ein Einwachsen in das sensomotorische Areal. Zusätzlich könnte Ephrin-A5 aufgrund seiner Expression mit der schichtenspezifischen Innervierung des Cortex in Verbindung stehen.

CASTELLANI *et al.* (1998) berichten davon, daß sich die *Ephrin-A5*-Expression, ab P 8 in Schicht IV dieses Areals konzentriert, der Schicht in der die meisten thalamischen Axone terminieren. Diese Axone bilden in Schicht IV terminale Seitenzweige, die der synaptischen Verbindung zu corticalen Neuronen dienen und leiten so den bei weitem größten Anteil der sensorischen Information in den Cortex.

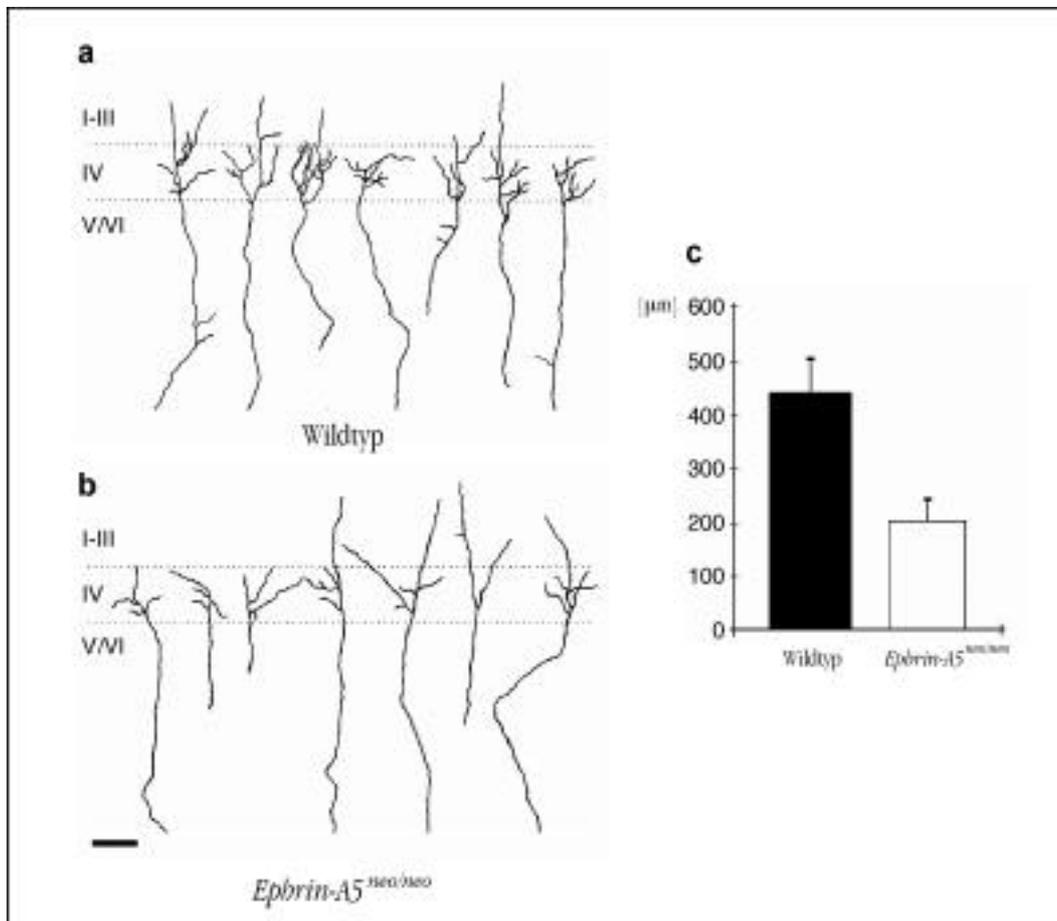


Abb. 3.34: Auswertung der Ergebnisse zur Bildung terminaler Verzweigungen bei Wildtyp und *Ephrin-A5*-defizienten Mäusen. In a und b sind *Camera lucida*-Zeichnungen thalamischer Axone gezeigt, die exemplarische Ergebnisse aus der Analyse der Verzweigungen in Schicht IV des Cortex bei Wildtyp- und homozygot mutanten Tieren respektive darstellen. Die corticalen Schichten sind in römischen Ziffern angegeben. In c ist die statistische Auswertung (t-Test) der Gesamtlänge der terminalen Verzweigungen graphisch dargestellt. Die Gesamtlänge resultiert aus der Anzahl der Arborisationen und Länge jeder einzelnen Arborisation, die beide bei den Mutanten betroffen sind. Der Balken entspricht 100 µm.

Um die Wirkung von Ephrin-A5 auf das thalamocorticale Projektionssystem *in vivo* zu überprüfen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jürgen Bolz (Universität Jena) bei *Ephrin-A5*-defizienten Mäusen Markierungsexperimente thalamischer Axone durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, daß in homozygot Mutanten die laminare Organisation des Cortex sowie die Terminierung thalamischer Afferenzen in der corticalen

Schicht IV erhalten bleibt. Die Zielfindung und schichtenspezifität ventrobasaler thalamischer Axone, welche mit Dil markiert wurden, zeigt in den homozygot Mutanten die gleiche Präzision wie im Wildtyp. Dagegen ist die terminale Arborisation in Schicht IV des Cortex, also die Länge und Anzahl der Verzweigungen die thalamische Axone hier bilden, stark reduziert. Die Untersuchung und statistische Auswertung (t-test) derartiger terminaler Verzweigungen an jeweils 32, mit Hilfe konfokaler Mikroskopie rekonstruierter, thalamischer Axonen von homozygot Mutanten und Wildtyp-Mäusen, ergab bei den homozygot Mutanten eine Reduktion ihrer Gesamtlänge um ca. 60% (Abb. 3.34). Zusätzlich zeigen Untersuchungen zum Verlauf von Axonen des limbischen Thalamus Zielfindungsfehler dieser Fasern bei den Mutanten. Diese wachsen nun aberrant in den somatosensorischen Cortex ein, ein Areal welches sie im Wildtyp meiden (Daten nicht gezeigt).

3.6.8 Defekte des Cerebellums

Die Analyse des Cerebellums *Ephrin-A5*-defizienter Mäuse zeigte ein unerwartetes Ergebnis. Bei allen untersuchten (n = 6) Individuen konnte eine abnorme Faltung der Kleinhirnhemisphären gesehen werden. Die makroskopische Untersuchung deutete auf einen Faltungsdefekt des distalen Abschnitts der zwei letzten cerebellären Lobuli, des Paraflocculus (Lobulus IX) und des Flocculus (Lobulus X), hin. Diese sind erhalten jedoch verkleinert und durch eine horizontalere Ausrichtung gekennzeichnet (Abb. 3.35).

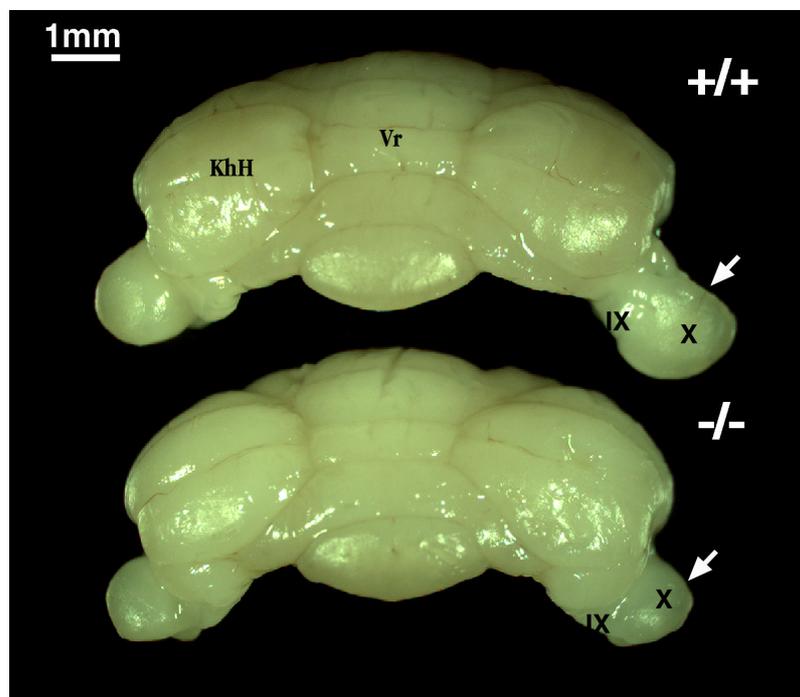


Abb. 3.35 zeigt die phänotypischen Veränderungen im Cerebellum *Ephrin-A5*-defizienter adulter Mäuse. Flocculus und Paraflocculus sind durch weiße Pfeile angezeigt und bei den Mutanten gegenüber dem Wildtyp (oben) deutlich verkleinert. KhH: Kleinhirnhemisphäre, Vr: Vermis, IX: Flocculus, X: Paraflocculus.

Da makroskopisch keine weiteren Unterschiede festzustellen waren, wurde eine histologische Untersuchung des Cerebellums durchgeführt. An coronar geführten Schnitten konnte gezeigt werden, daß sich der Faltungsdefekt auf den Paraflocculus beschränkt, während der Flocculus sich in Größe und Faltung vom Wildtyp nicht unterscheidet. Der Paraflocculus erscheint um ca. 1/3 seiner Länge verkürzt ansonsten aber normal organisiert (Abb. 3.36). Die weitere histologische Untersuchung des Cerebellums konnte keine morphologisch faßbaren Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante aufzeigen. Bei den heterozygot und homozygot Mutanten entsprechen sowohl die Größenverhältnisse der einzelnen Strukturen als auch die Laminierung der wildtypischen Organisation. Zusätzlich können keine Unterschiede in Verteilung und Architektur der einzelnen Zelltypen festgestellt werden (Abb. 3.36).

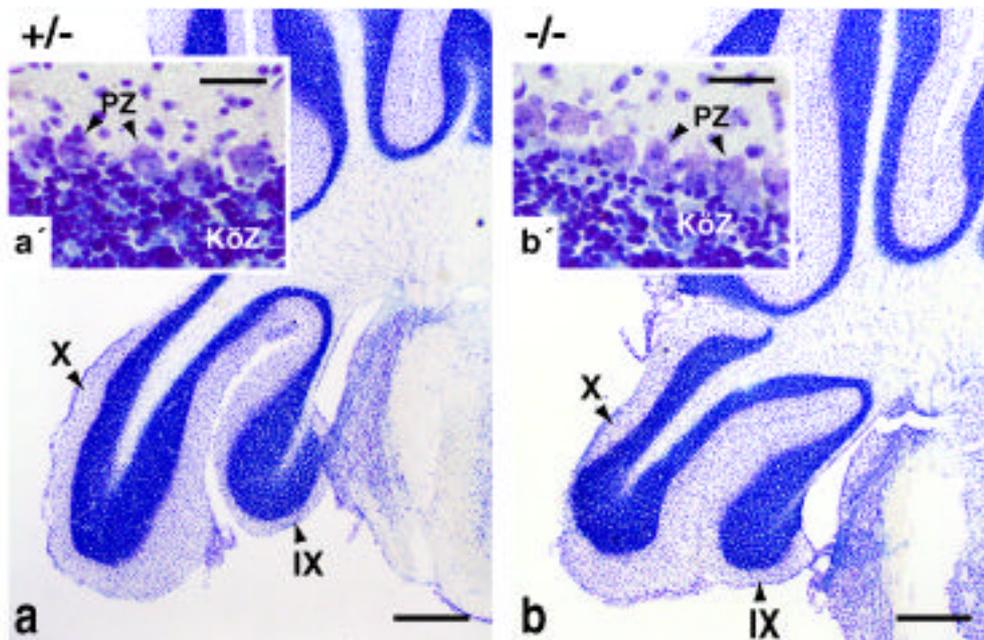


Abb. 3.36: Nissl-Färbung an Coronarschnitten des Cerebellums eines phänotypisch unauffälligen, heterozygoten (a, a') und eines homozygot mutanten Individuums (b, b'). In a' und b' sind jeweils vergrößerte Ausschnitte zu sehen, in denen die einzelnen Zelltypen unterschieden werden können. Mit Ausnahme des Größenunterschieds der Paraflocculi können keine weiteren Unterschiede festgestellt werden. Die Balken entsprechen in a, b 500 μm und in a', b' 50 μm . KöZ: Körnerzellen, PZ: Purkinje-Zellen; IX: Flocculus, X: Paraflocculus.

3.6.9 Postnatale Entwicklung *Ephrin-A5*-defizienter Mäuse

Bei *Ephrin-A5*-defizienten Mäusen, die offensichtlich keinen frühnatal sichtbaren Defekten des Neuralrohres unterliegen, konnte auch im weiteren Verlauf ihrer postnatalen Entwicklung keine Abnormalität festgestellt werden. Sie sind von ihren wildtypischen Geschwistern in

Verhalten und Morphologie nicht zu unterscheiden sowie uneingeschränkt und unabhängig vom Geschlecht paarungsfähig.

Wie bereits in 3.3.3.1 gezeigt gehören zu den prominentesten Expressiondomänen von *Ephrin-A5*, der Hypothalamus und die Hypophyse. Diese Strukturen sind die Hauptschaltzentralen der Hormonregulation im Säugetierorganismus und damit auch für die Regulation des Wachstums verantwortlich (Übersicht bei KANDEL *et al.*, 1991; ECKERT *et al.*, 1993). Um zu überprüfen ob es in den *Ephrin-A5*-defizienten Mäusen zu Wachstumsstörungen während der postnatalen Entwicklung kommt, wurde die Gewichtszunahme bei einer Anzahl von Tieren während der ersten sechs Lebenswochen überprüft. Die Kohorte umfaßte 32 Tiere (15 Männchen und 17 Weibchen) der F2-Generation, aus fünf Würfen mit folgender Verteilung der Genotypen: 8 +/+, 14, +/- und 10 -/-. Die Tiere wurden während der ersten drei Wochen alle zwei Tage, später in größeren zeitlichen Abständen gewogen und die Daten statistisch ausgewertet. Hierzu wurde die Steigung der „Tag-Gewicht“-Relation errechnet und deren approximierte Gerade (linearer Fit) unter den verschiedenen Genotypen verglichen. Die so durchgeführte Auswertung der Daten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren verschiedener Genotypen, wie Abb. 3.37 entnommen werden kann. Zwar kann ein Unterschied in der Gewichtszunahme zwischen den Geschlechtern festgestellt werden, dieser ist allerdings unabhängig vom Genotyp.

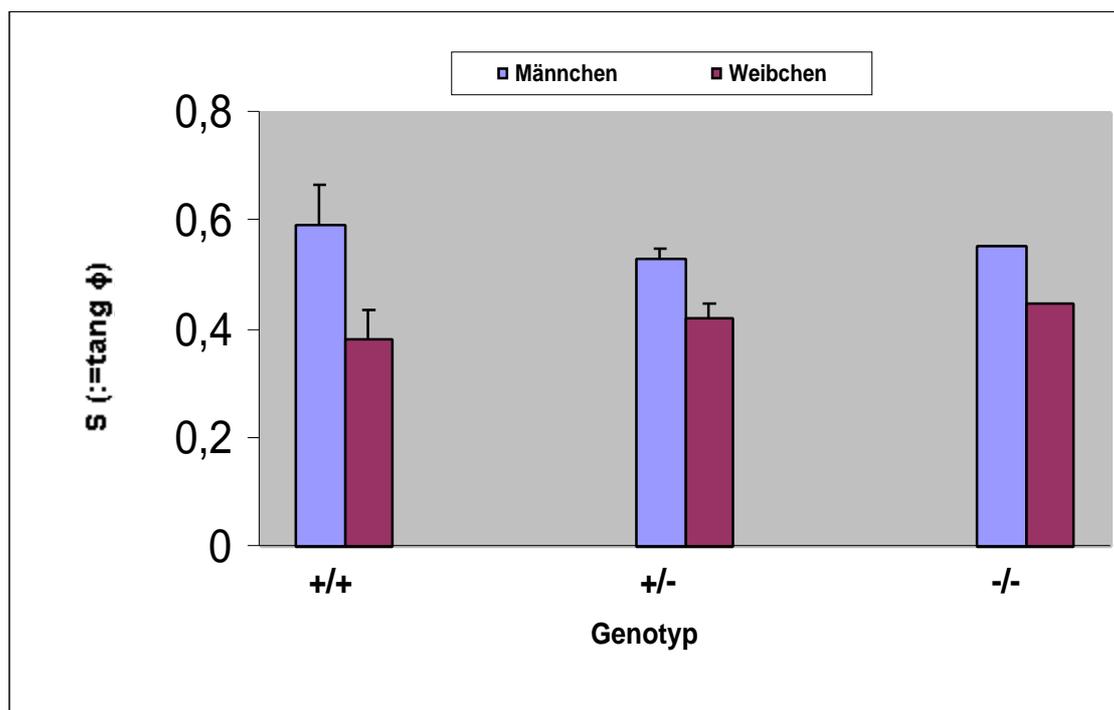


Abb. 3.37: Graphische Darstellung der ausgewerteten Daten aus dem Verlauf der Gewichtszunahme von 32 F2-Nachkommen. Die Balken geben die Steigung der approximierten Geraden (linearer Fit) der „Tag-Gewicht“-Relation an. Zusätzlich ist jeweils die Standardabweichung angegeben. Die Daten für Männchen und Weibchen sind getrennt berechnet und gezeigt. Zwischen den einzelnen Genotypen können keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

3.7 Expression der Ephrin-A-Liganden in *En1*-Mutanten

Die Transkriptionsfaktoren *En1* und *En2* (*Engrailed*) sind, neben anderen Transkriptionsfaktoren, im dorsalen Mesencephalon in einem postero-anterior abnehmenden Gradienten ab dem 1- bzw. 5-Somitenstadium exprimiert (McMAHON *et al.*, 1991). Die Ergebnisse verschiedener, in erster Linie am Huhn durchgeführter, *in vitro*- wie *in vivo*-Experimente haben die Vorstellung entstehen lassen, daß die En-Transkriptionsfaktoren regulierend auf die Etablierung der retinotektalen Topographie wirken (Übersicht bei RÉTAUX und HARRIS, 1996). Es konnte insbesondere gezeigt werden, daß die ektopische Expression von *En1* und *En2* zur Störung der Retinotopie und dem Wachstumsverhalten retinaler Fasern im Streifen-Assay führt (ITASAKI und NAKAMURA, 1996; LOGAN *et al.*, 1996; FRIEDMAN und O´LEARY, 1996). Zusätzlich konnte festgestellt werden, daß die ektopische Expression von *En1* und *En2*, evtl. durch direkte transkriptionelle Kontrolle, zur ektopischen Expression von *Ephrin-A2* und *Ephrin-A5* im Tectum führt (LOGAN *et al.*, 1996; SHIGETANI, *et al.*, 1997). Dieser interessante Befund liefert damit ein mögliches molekulares Bindeglied zwischen der ektopischen Expression der En-Transkriptionsfaktoren und der beobachteten aberranten Topographie.

Um die Annahme, bei den En-Faktoren handelt es sich um die transkriptionellen Aktivatoren der Ephrine im Tectum zu überprüfen, wurden *En1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten in verschiedenen Entwicklungsstadien auf die Expression von *Ephrin-A2* und *-A5* hin untersucht. *En2*-Mutanten wurden für diese Studie nicht herangezogen da, im Gegensatz zu den *En1*-Mutanten, retinale Fasern in Streifen-Assays, die mit tektalen Membranpräparationen dieser Mäuse durchgeführt wurden keine Abweichung vom wildtypischen Wachstumsverhalten zeigen (persönliche Mitteilung Dr. Andrea Wizenmann, Universität Würzburg). Dies deutet darauf hin, daß hier von einer Veränderung in der Expression der Ephrine im dorsalen Mittelhirn nicht ausgegangen werden kann. Die Überprüfung von *En1/2*-Doppelmutanten, im Bezug auf die Expression von *Ephrin-A2/A5* im Mittelhirn, würde sich anbieten, um die funktionelle Redundanz der En-Faktoren zu umgehen. Dies ist bei diesen Tieren allerdings nicht möglich, da hier die Defizienz in beiden *En*-Genen zur Deletion des gesamten mes-/metencephalischen Gewebes führt, welche den Verlust der Colliculi superiores und inferiores umfaßt (persönliche Mitteilung Dr. Veronique Blanquet). Für die Untersuchungen in den *En1*-Mutanten wurden sowohl RNA-*in situ*-Hybridisierungen als auch *in situ*-Bindungsassays mit Rezeptor-AP-Fusionsproteinen durchgeführt, um sowohl mRNA als auch Protein zu detektieren. Die in der Untersuchung verwendeten Entwicklungsstadien von *En1*-defizienten Föten sind E 10,5, E 15,5, E 16,5 und P 0. Diese Stadien wurden gewählt, da sie mit wichtigen Entwicklungsschritten der retinocollicularen Topographie korrelieren. Bei E 10,5 werden erstmals die Ephrin-Gradienten im dorsalen Mesencephalon aufgebaut, zwischen E 15 und E 16 erreichen und wachsen retinale Axone in die Colliculi ein und P 0 ist das älteste Stadium, daß bei den *En1*-Mutanten zur Verfügung stand, da diese Mutation unmittelbar postnatal zum Tod der Tiere führt. Für jedes Stadium wurden jeweils drei Tiere der verschiedenen Genotypen verwendet. Die Embryonen wurden im Ganzkörperpräparat (E 10,5) bzw. in midsagittalen Schnitten (alle weiteren Stadien) beprobt.

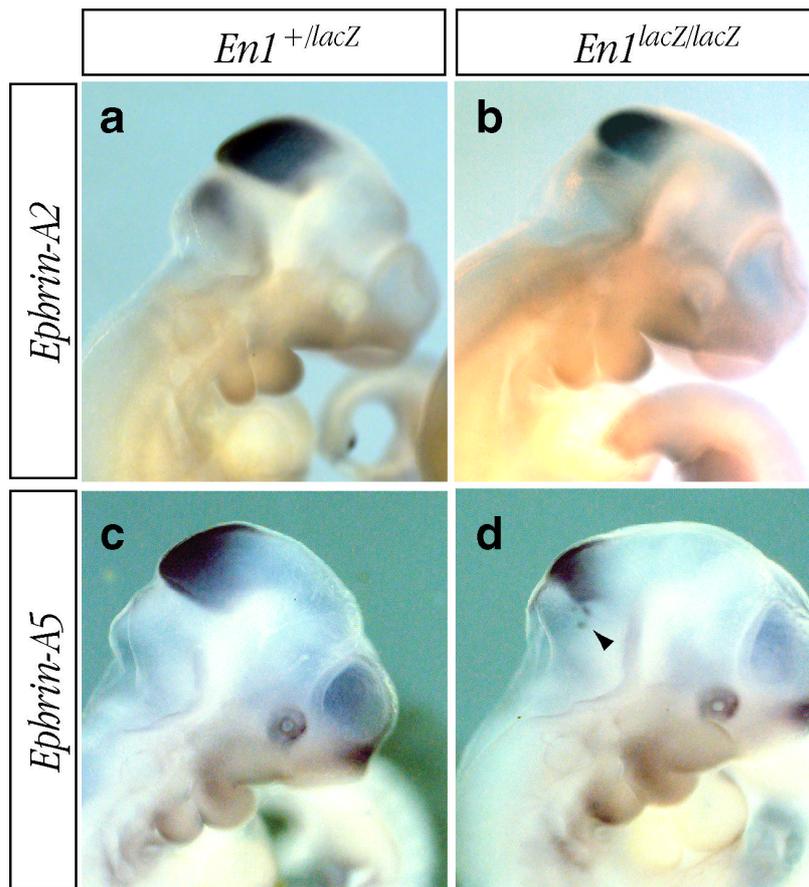


Abb. 3.38: Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen an 10,5 Tage alten Embryonen mit den Sonden für *Ephrin-A2* und *Ephrin-A5*. In beiden Fällen können Transkripte bei den homozygot Mutanten Embryonen (b, d) detektiert werden. Die Expressionsdomänen sind allerdings aufgrund der mes-/metencephalischen Deletion *En1*-defizienter Mäuse gegenüber den phänotypisch unauffälligen heterozygot Mutanten (a, c) eingeschränkt. Bei der *Ephrin-A5*-Expression können wenige positive Zellen detektiert werden, die außerhalb der mesencephalischen Domäne liegen (schwarze Pfeilspitze in d).

Die Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen an 10,5 Tage alten Embryonen ergaben, daß mit Ausnahme des durch die *En1*-Mutation deletierten mesencephalischen Gewebes die Expressionsdomänen von *Ephrin-A2* und *Ephrin-A5* erhalten bleiben (Abb. 3.38). Im Falle von *Ephrin-A2*, dessen graduelle Expression sich weiter anterior erstreckt und flacher als die von *Ephrin-A5* verläuft bleibt auch der Gradient im verbleibenden Gewebe erhalten. Zusätzlich wird *Ephrin-A2* bei E 10,5 transient auch in einer metencephalischen Domäne exprimiert (Abb. 3.38a). Bei den *En1*^{*lacZ*/*lacZ*}-Mutanten ist diese Domäne zwar reduziert aber noch vorhanden. Die *Ephrin-A5*-*in situ*-Hybridisierung zeigt, in Abweichung zur normalen Expression, eine wenige Zellen betreffende ektopische Expression ventral des Isthmus.

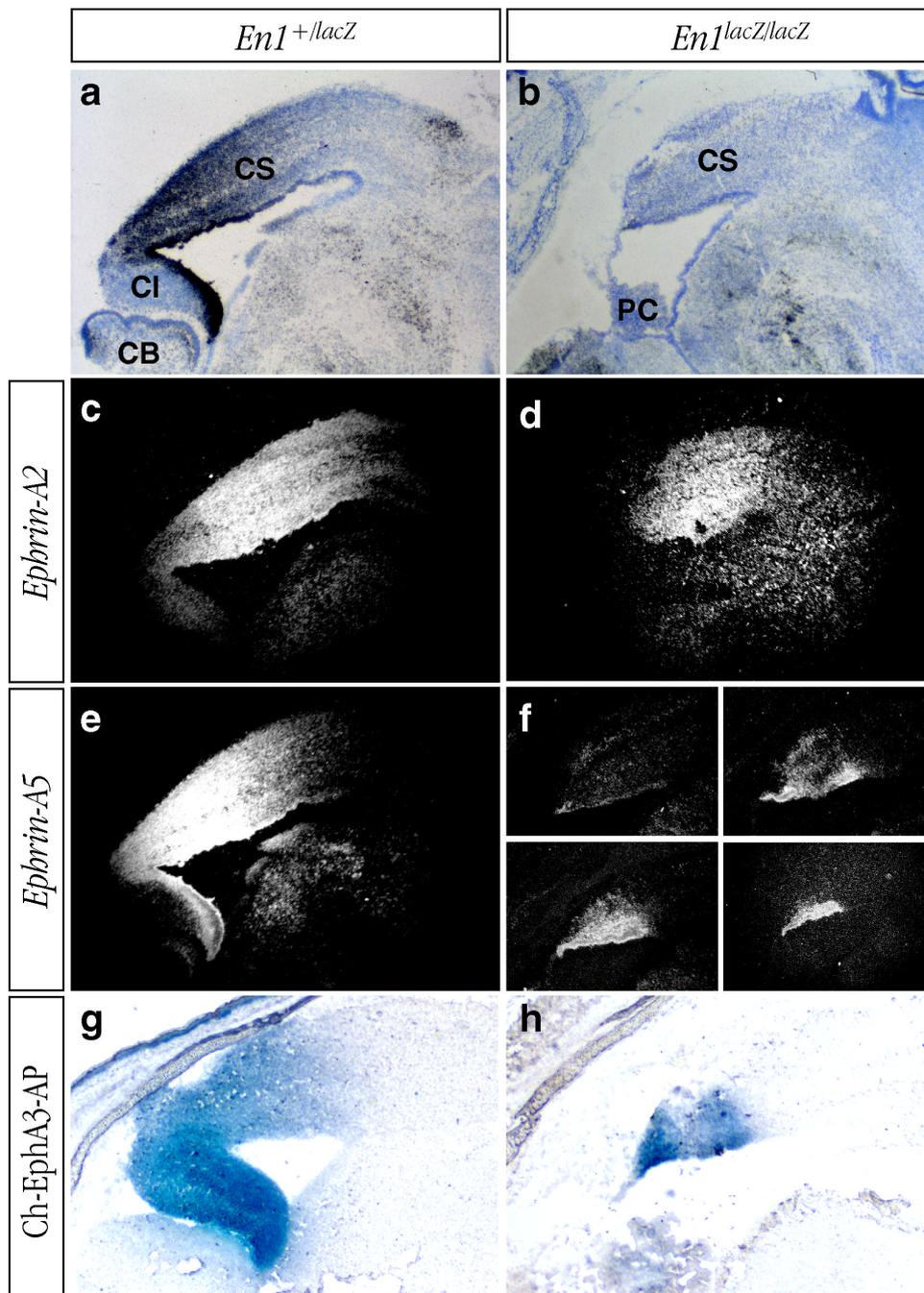


Abb. 3.39: Expressionsanalyse von *Ephrin-A2* (c, d) und *Ephrin-A5* (e, f) im Mittelhirn neugeborener heterozygoter und homozygoter *En1*-Mutanten. In a und b sind jeweils Hellfeld-Aufnahmen zur Verdeutlichung der Strukturen in den midsagittal verlaufenden Schnitten zu erkennen. In c und d ist die Expression von *Ephrin-A2* im heterozygot und homozygot mutanten Individuum respektive gezeigt. In e und f ist entsprechend die Expression von *Ephrin-A5* gezeigt. Da bei den homozygot Mutanten je nach Schnittebene, wohl aufgrund einer allgemeinen strukturellen Disorganisation, das Expressionsmuster stark variieren kann werden hier mehrere Aufnahmen verschiedener Schnittebenen gezeigt. In g und h sind Rezeptor-Bindungsassays mit Ch-EphA3-AP gezeigt. In den homozygot Mutanten können Ephrin-A-Proteine nachgewiesen werden. CB: Cerebellum, CI: Colliculus inferior, CS: Colliculus superior, PC: Plexus choroideus.

Die Untersuchung der Stadien E 15,5, E 16,5 (Daten nicht gezeigt) und P 0 (Abb. 3.39) an Sagittalschnitten ergab für die *Ephrine A2* und *A5* einen Erhalt ihrer Expression. Lediglich für *Ephrin-A5*, dessen Expressionsmaximum weiter posterior liegt, kann ein Verlust an gradueller Expression festgestellt werden (Abb. 3.39g). Dieser aberrante Expressionsverlauf von *Ephrin-A5* in den neugeborenen Mutanten ist wahrscheinlich auf eine allgemeinere Disorganisation des Gewebes in dieser, der Deletion unmittelbar benachbarten, Region zurückzuführen. Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen der Abb. 3.38 und 3.39 geschlossen werden, daß die Expression der *Ephrine A2* und *A5* im Tectum opticum nicht an die Expression des En1-Transkriptionsfaktors gebunden ist.

3.8 Untersuchungen zur Promotorregion des *Ephrin-A5*-Gens

Nach Ermittlung des 5'-Endes der cDNA über 5'-RACE und Kartierung dieser Position auf genomischer Ebene wurde der stromaufwärtsliegende Bereich einer computergestützten Analyse auf Bindungsmotive von Transkriptionsfaktoren unterzogen. Die Anordnung und Akkumulation derartiger Bindungsmotive erlaubt einen Rückschluß auf eine evtl. vorhandene Promotoraktivität, die in weitergehenden Studien detaillierter analysiert werden kann. Zu diesen weitergehenden Analysen, die hier ebenfalls angewendet wurden, gehört insbesondere die Herstellung von Reporterkonstrukten, die über Vorkerninjektion dem Genom von Mäusen in einer zufälligen Position integriert werden und über die Expression des bakteriellen *lacZ*-Reportergens Rückschlüsse auf die Promotoraktivität zulassen.

3.8.1 Computergestützte Analyse der Promotorregion

Etwa 8,2 kbp des Bereichs um die Transkriptionsinitiationsstelle (5,4 kbp stromaufwärts und 2,8 kbp stromabwärts) wurden einer mit dem Programm MatInspector (Version 2.2; QUANDT *et al.*, 1995; <http://www.gsf.de/cgl-bin/matsearch.pl>) durchgeführten *in silico*-Analyse auf Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren unterzogen. Dieses Programm bedient sich der TRANSFAC-Datenbank (Version 4.0; HEINEMEYER *et al.*, 1999) von Sequenzmotiven für Transkriptionsfaktoren. Aus der Analyse dieser Sequenz ergaben sich 703 potentielle Bindungsstellen auf beiden Strängen..

Diese Bindungsstellen wurden nach Akkumulation bzw. Häufigkeit über die gesamte Sequenz gewertet. Aus bislang durchgeführten Analysen an großen Bereichen genomischer DNA der Maus ist die Häufigkeit bestimmter Sequenzmotive bekannt. Liegt nun eine bestimmtes Motiv deutlich öfter vor als es durch reine Zufallsverteilung zu erwarten wäre, so ist dies ein deutliches Indiz auf Bindungsstellen, die auch *in vivo* eine Funktion ausüben. Eine derartige Häufung konnte u.a. für Sequenzmotive entwicklungsregulierter Transkriptionsfaktoren, wie Hox13 (24fach überrepräsentiert), Pax5 (10fach), Pax9 (30fach), Pbx1 (35fach) und NGFI-C (45fach) errechnet werden. Für die Pbx1-Bindungsstellen konnte darüberhinaus im Bereich um -3000 eine besonders hohe Akkumulation festgestellt werden. Hier finden sich

innerhalb von weniger als 40 bp vier Pbx1-Bindungsmotive. Eine besonders große Häufung konnte auch für abgeleitete Bindungsstellen des Zinkfinger enthaltenden NGFI-C festgestellt werden, da hier nahe dem Transkriptionsstart drei Sequenzmotive in weniger als 150 bp vorkommen (Abb. 3.40).

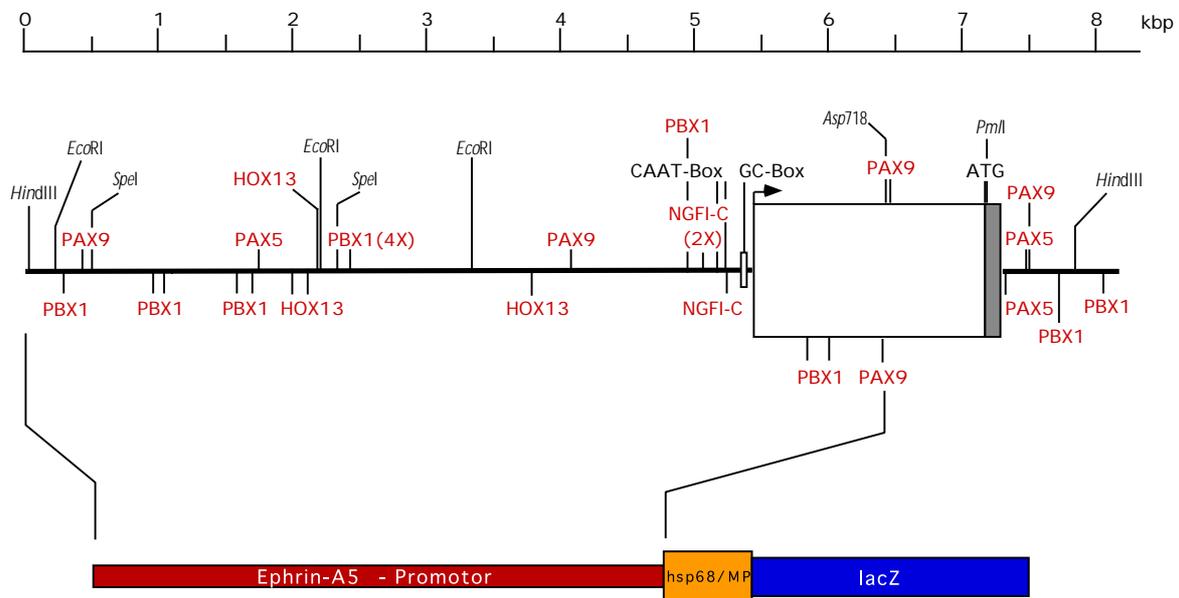


Abb. 3.40 zeigt eine schematische Darstellung ausgewählter Ergebnisse der computergestützten Promotoranalyse von *Ephrin-A5*. Potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren mit Homeodomänen sind ebenso wie die Sequenzmotive für den Zinkfinger enthaltenden Transkriptionsfaktor NGFI-C rot eingezeichnet. Basale Promotorelemente und das Startkodon der Translation sind in schwarz angegeben. *Cis*-ständige Elemente sind oberhalb der durchgezogenen Linie angegeben, *trans*-ständige darunter. Das erste Exon ist als Rechteck eingezeichnet, der kodierende Abschnitt grau unterlegt. Zusätzlich sind die Positionen ausgewählter Restriktionsschnittstellen angegeben. Eingezeichnet ist auch eine schematische Darstellung des Reporter-Konstruktes für die Vorkerninjektion. Ein 6,4 kbp langes Fragment wurde vor einen *hsp68*-Minimalpromotor und die *lacZ*-Kassette kloniert.

Eine detailliertere Untersuchung des Bereiches um -250, im allgemeinen der Abschnitt der basalen Promotorelemente des Transkriptionsinitiation, zeigte eine Besonderheit des *Ephrin-A5*-Promotors auf. Im Gegensatz zu den meisten entwicklungsbedingt regulierten Genen enthält dieser keine TATA-Box als transkriptionsinizierendes Element sondern eine GC-Box, die zumeist in konstitutiv aktiven Genen vorhanden ist. Diese wird vom Zinkfinger-Transkriptionsfaktor SP1 gebunden und tritt in vielen eukaryotischen Genen auf (DYNAN und TJIAN, 1983; Übersicht bei McKNIGHT und TJIAN, 1986). Zusätzlich sind im Bereich zwischen -200 und -250 zwei CAAT-Boxen, die vom Transkriptionsfaktor CP1 erkannt werden, vorhanden.

```

                CAAT-Box                                CAAT-Box
-253  TGTAAGCAAACAGCAGGCCTCTCCCTGACTGGTTACTCCAATCACCCCCC

-203  ACCCTCCAAGTAAACTGCATGGAGGGAGGGGGAGTGGGGAGGGGAGCAGC

-153  CCACATGACCTGGGCCGCGGAGGCAGCAGCGCCGGCGGCGCCTCCCCCTG

-103  CTCGGTCCGGAGCTCACCCCCACGCTCGCGCCGCCTGCCAACCCAGCGCC

-53   CCGCGCAACACGCCCGGGCGGAGCCCCCTCCCGCTGGCCCACGTCCACG

                GC-Box

-3    TCCACGCGC
        +1
        Initiator

```

Abb. 3.41: Schematische Darstellung der *cis*-ständigen Elemente der Region bis -253 von *Ephrin-A5*. Der Initiator-Sequenz gehen eine GC-Box sowie zwei CAAT-Boxen voraus. Die Sequenzmotive sind jeweils unterstrichen. Die Expression des *Ephrin-A5*-Gens wird durch einen TATA-losen Promotor reguliert.

Aus der computergestützten Analyse der *Ephrin-A5*-Promotorregion konnten u.a. potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Pax1 und Pax9 identifiziert werden. Um die Rolle dieser Elemente während der Embryonalentwicklung direkt im Organismus zu überprüfen wurden *Pax9*-defiziente Embryonen bzw. *Pax1/Pax9*-Doppelmutanten (für diese Arbeit freundlicherweise von Prof. Dr. Rudi Balling zur Verfügung gestellt) im Ganzkörperpräparat mit der *Ephrin-A5*-Sonde hybridisiert. Eventuelle Veränderungen im Expressionsmuster könnten somit Aufschluß über die Rolle dieser Transkriptionsfaktoren bei der Expressionsregulation von *Ephrin-A5* geben. Aus den Ergebnissen dieser Analysen, die bei den Stadien E 11,5 und E 12,5 durchgeführt wurden, konnten weder bei den *Pax1* und *Pax9*-Mutanten noch bei den *Pax1/Pax9*-Doppelmutanten Veränderungen in der Expression von *Ephrin-A5* festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). In allen, sich zumindest teilweise überlappenden Expressionsdomänen von *Ephrin-A5* mit *Pax1* und *Pax9*, wie das nasale Mesenchym, die Branchialbögen und die Extremitätenknospen (NEUBÜSER *et al.*, 1995; PETERS *et al.*, 1998), konnten keinerlei Abweichungen vom Wildtyp festgestellt werden. Da eine detaillierte Koexpressionsanalyse insbesondere an Schnittpräparaten nicht zur Verfügung stand, besteht die Möglichkeit subtiler Veränderungen in tiefer gelegenen Strukturen.

3.8.2 Klonierung des *Ephrin-A5*-Reporterkonstruktes

Um die Funktion des *in silico* charakterisierten *Ephrin-A5*-Promotors *in vivo* zu überprüfen wurde ein Vektor konstruiert, der das bakterielle *lacZ*-Reporter gen enthält, welches für die -Galaktosidase kodiert (s. Abb. 3.40). Dem *lacZ*-Gen wurde der putative *Ephrin-A5*-Promotor, der seine Expression regulieren soll, vorangestellt. Dieses Konstrukt wurde befruchteten Eizellen injiziert um eine Integration in deren Genom zu erzielen. Nach Durchführung einer

X-Gal-Färbung mit den sich daraus entwickelnden transgenen Embryonen, sollte im Falle der Aktivierung des Reporters ein blauer Niederschlag seine Expression anzeigen. Entspricht der Expressionsverlauf des Reporters zumindest teilweise der endogenen Expression von *Ephrin-A5*, kann davon ausgegangen werden, daß die notwendigen Elemente für die *Ephrin-A5*-Expression in den entsprechenden Domänen auf dem Transgen vorhanden sind.

Ein 6,4 kbp großes *Asp718*-Fragment wurde aus dem in pBluescript II KS+ subklonierten Phagenklon -1.6 isoliert (s. Abb. 3.6) und in den mit *Asp718* gespaltenen Vektor „pBluescript II KS+ (*Sall-Sall*)/*hsp68/lacZpA*“ (hergestellt von Dr. Cairine Logan und von Dr. A. Joyner freundlicherweise zur Verfügung gestellt) ligiert. Dieses Fragment wurde ausgewählt, da es den gesamten sequenzanalysierten, 5' des Transkriptionsstarts von *Ephrin-A5* gelegenen Bereich enthält. Durch Doppel-Verdau mit *Sall* und *NotI* konnte, das den Oocyten zu injizierende Fragment von den Sequenzen des bakteriellen Vektors getrennt werden.

3.8.3 Expression des Reporters in transgenen Embryonen

Ammenmütter, die Embryonen aus den Oocyten-Injektionen austrugen, wurden zumeist zehn Tage nach dem Rücktransfer der Embryonen geöffnet um diese zu entnehmen. Die Föten entsprachen zu diesem Zeitpunkt dem Stadium E 11,0/TS18. Aus den Injektionen des Reporterkonstruktes konnten insgesamt fünf transgene Föten gewonnen werden, die alle verschiedene Expressionsmuster des Transgens nach der X-Gal-Färbung zeigten. Die Effizienz bei der Generierung transgener Tiere mit diesem Konstrukt lag bei 6,2% (Tab. 3.10)

Tab. 3.10: Auflistung der Ergebnisse aus den Rücktransfers von mit dem Reporterkonstrukt injizierter Oocyten in scheinchwangere Ammenmütter.

Ammenmutter (#)	Wurfgröße	Transgene
160	7	1
164	14	1
218	7	-
219	-	-
244	4	-
344	-	-
378	1	-
405	10	1
449	3	1
460	1	-
479	6	-
596	9	-
597	2	-
598	2	-
599	6	-
619	3	1
620	1	-
643	5	-
Anteil		6,2%

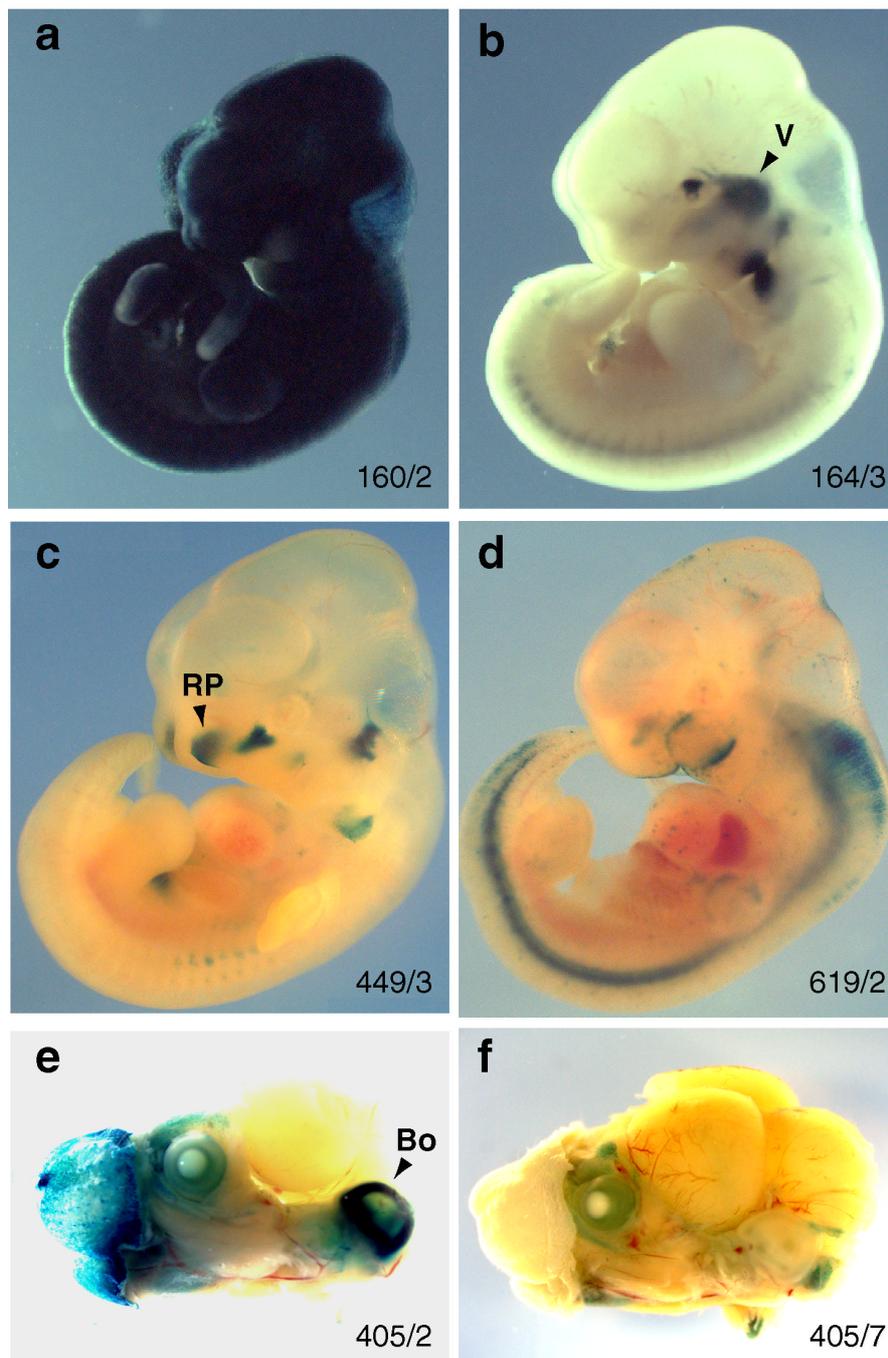


Abb. 3.42 zeigt die Ergebnisse aus der Vorkern-Injektion des Reporter-Konstrukts. Die transgenen Embryonen wurden einer X-Gal-Färbung unterzogen. a - d: E 11,0, e/f: E 17. Die Färbung in Auge und Unterkiefer von e beruht auf Hintergrundaktivität, wie sich aus dem Vergleich mit dem nicht transgenen Fötus 405/7 in f ergibt. Bo: Bogengang, RP: Riechplakode, V: Nervus Trigenus.

Bei den analysierten Embryonen konnte in keinem Fall ein Expressionsverlauf festgestellt werden, welcher der endogenen *Ephrin-A5*-Expression in allen Punkten entspricht. In einzelnen Fällen konnten Expressionsdomänen festgestellt werden, die teilweise mit der *Ephrin-A5*-Expression korrelieren. So kann im Embryo 449/3 (Abb. 3.42c) Expression in der Riechplakode gesehen werden, eine Domäne in der *Ephrin-A5* ebenfalls sehr früh exprimiert wird. Im Embryo 619/2 (Abb. 3.42d) zeigt die Expression ventro-posterior des Rhombencephalons einen ähnlichen Verlauf, wie die Expression von *Ephrin-A5* in der gleichen Domäne. Bei den meisten beobachteten Expressionsterritorien kann davon ausgegangen werden, daß sie auf die genetische Umgebung ihrer Integration zurückzuführen sind. Ein derartiger Integrationsdefekt wird insbesondere im Fall des Embryos 160/2 (Abb. 3.42a) offensichtlich, da hier eine ubiquitäre Expression festgestellt werden kann.

4 Diskussion

Ephrin-A5, ein Ligand für Tyrosin-Kinase-Rezeptoren des Eph-Subtyps ist aus Erkenntnissen von *in vitro*- wie *in vivo*-Studien, die in erster Linie am Huhn durchgeführt wurden, mit einer Vielzahl von Prozessen neuronaler Konnektivität assoziiert worden. Insbesondere seine graduelle Expression im Tectum opticum sowie seine repulsive Aktivität auf retinale Fasern machen es zu einem interessanten Kandidaten-Molekül für die Regulation der Retinotopie, der topographischen Anordnung von Projektionen der retinalen Ganglienzellen in das Tectum opticum (DRESCHER *et al.*, 1995; MONSCHAU *et al.*, 1997; DÜTTING *et al.*, 1999). Diese grundlegenden Zusammenhänge sind auch bei der Organisation der retinocollicularen Projektionen der Maus erhalten und erlauben damit die Überprüfung der Funktion von Ephrin-A5 durch gezielte Geninaktivierung. In dieser Arbeit wurde das *Ephrin-A5*-Gen in embryonalen Stammzellen der Maus mutiert und mit Hilfe von chimären Mäusen auf die Keimbahn übertragen. Somit stand ein Tiermodell zur Verfügung mit dem die Funktion von Ephrin-A5 *in vivo* untersucht werden konnte. Die phänotypischen Veränderungen, denen *Ephrin-A5*-defiziente Mäuse unterliegen, wurden eingehend studiert und lieferten interessante Erkenntnisse über die Funktion dieses Moleküls während der Neuronalentwicklung. Im Gegensatz zur postulierten Funktion von Ephrin-A5 bei der Regulierung des retinotektalen Topographie, konnten hier keine persistenten Veränderungen festgestellt werden. Interessanterweise zeigen Veränderungen im thalamocorticalen Projektionssystem *Ephrin-A5*-defizienter Mäuse erstmalig, daß Ephrin-A5 *in vivo* auch als wachstumsfördernder Faktor auf neuronale Fortsätze wirken kann. Zusätzlich scheinen in erster Linie Musterbildungsprozesse bei den mutanten Tieren betroffen zu sein, die z.T. zu aberranter Neuralrohrschließung, z.T. zu Faltungsdefekten des Cerebellums führen. Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung von Ephrin-A5 bei Musterbildungsprozessen auf, wie sie bereits für andere Vertreter dieser Molekülklasse nachgewiesen wurde (Übersicht bei HOLDER und KLEIN, 1999).

4.1 Organisation des *Ephrin-A5*-Gens

Für die Entwicklung der Mutagenisierungsstrategie über homologe Rekombination sowie die Identifizierung regulatorischer Elemente war es von essentieller Bedeutung die genomische Struktur des *Ephrin-A5*-Gens der Maus aufzuklären. Die Aufklärung erfolgte in erster Linie über Analyse der isolierten Phagen-Klone.

Die Sequenzhomologie unter den *Ephrin*-Genen zeigt ihren Ursprung von einem gemeinsamen Vorläufer an, der über die Prozesse der Genduplikation und anschließenden Diversifikation zu den acht bekannten Mitgliedern dieser Familie bei der Maus führte. Ein derartiger Entstehungsprozeß von Genfamilien führt oft zu einer gruppierten chromosomalen Lokalisation der entstandenen Gene, wie sie z.B. für die *Hox*-Gene aufgeklärt worden ist (Übersicht bei HOLLAND, 1992; KRUMLAUF, 1992). Dementsprechend konnte festgestellt werden, daß die *Ephrin*-Gene *A1*, *A3* und *A4* in nachbarschaftlicher Beziehung auf Maus-Chromosom 3

und Mensch-Chromosom 1 (CERRETTI *et al.*, 1996/a) kartieren. Kartierungsexperimente zum *Ephrin-A5*-Locus ergaben hingegen eine isolierte chromosomale Stellung zu den anderen *Ephrin*-Genen. Das *Ephrin-A5*-Gen kommt in einer einzigen Kopie auf Maus-Chromosom 17 und Mensch-Chromosom 5 bei Bande q21 vor (CERRETTI *et al.*, 1996/b). Für *Ephrin-A2* liegt nur die kartierte Position des humanen Gens bei Chromosom 19, Bande p13.3 vor (AASHEIM *et al.*, 1998). Maus-*Ephrin-A5* setzt sich aus mindestens 6 Exons zusammen, die sich über mindestens 60 kbp genomischer Sequenz erstrecken (s. Abb. 3.7). Das Gen erweist sich damit trotz der durchschnittlichen Größe des reifen Proteins als ausgesprochen groß, was bereits die ungewöhnliche Länge des Transkripts vermuten ließ. Die größte Spleißvariante hat eine Größe von 7 kb und ist damit ca. 10 mal länger als die kodierende Sequenz.

Der Vergleich der Organisation der *Ephrin*-Gene zeigt Unterschiede sowie Gemeinsamkeiten untereinander auf. Die *Ephrin*-Gene *A2* (Mensch), *A3* (Maus), *A4* (Maus), *A5* (Maus, Daten aus dieser Arbeit) und *B1* (Maus), deren genomische Struktur teilweise aufgeklärt wurde bestehen aus mindestens fünf Exons. Ihre Exon-Grenzen stimmen, bis auf folgende Unterschiede miteinander überein: (i) *Ephrin-A3* und *Ephrin-A5* besitzen ein alternativ gespleißtes viertes Exon, daß den anderen *Ephrin*-Genen fehlt (FLENIKEN *et al.*, 1996; KOZLOSKY *et al.*, 1997; CERRETTI und NELSON, 1998; LAI *et al.*, 1999). (ii) Für *Ephrin-A4* konnte kürzlich in B-Zellen eine weitere Spleißform entdeckt werden, bei der 146 bp des vierten Exons ausgespleißt werden. Dieser Spleißform fehlt die kodierende Sequenz für das Signal zur Ausbildung einer GPI-Verbindung, was aus *Ephrin-A4* das einzige bekanntermaßen sekretierte *Ephrin* macht (AASHEIM *et al.*, 2000). (iii) Das fünfte Exon von *Ephrin-B1* kodiert für die intrazelluläre Domäne, die den *Ephrinen* der A-Klasse fehlt, was naturgemäß dazu führt, daß der kodierende Bereich dieses Exons, den der anderen *Ephrin*-Gene übertifft (FLETCHER *et al.*, 1994; CERRETTI und NELSON, 1998). Ein gemeinsames Merkmal der Gene dieser Molekülklasse ist, das in seiner Größe alle anderen Introns übertreffende erste Intron: *Ephrin-A2* (9,2 kbp), *Ephrin-A3* (> 1 kbp), *Ephrin-A4* (> 1,5 kbp), *Ephrin-A5* (26,8 kbp) und *Ephrin-B1* (8,5 kbp). Dies könnte ein Hinweis auf regulative, zwischen den *Ephrin*-Genen konservierte Elemente sein, die im ersten Intron lokalisiert sind. Ein weiteres gemeinsames Merkmal für die Gene *Ephrin-A2*, *Ephrin-A4*, *Ephrin-A5* und *Ephrin-B1* betrifft ebenfalls Intron 1, daß in diesen Fällen in Phase 2 vorliegt (der Leserahmen wird zwischen 2. und 3. Base eines Kodons unterbrochen). Die Häufigkeit von Introns in Phase 2 ist gegenüber einer Zufallsverteilung signifikant reduziert und beträgt bei Wirbeltieren ca. 17% (FICHANT, 1992). Diese Ergebnisse verdeutlichen eindrucksvoll, die in beiden Subklassen konservierte Organisation der *Ephrin*-Gene und ihren gemeinsamen Ursprung aus einem ancestralen Vorgänger.

4.2 Expression von *Ephrin-A5*

Ephrin-A5 ist in einer Vielzahl von Geweben und Organen während der Entwicklung und in adulten Stadien exprimiert. Das *Ephrin-A5*-Expressionsmuster wurde in dieser Arbeit eingehend studiert und soll im folgenden in die Daten der vorhandenen Literatur integriert und diskutiert werden.

Die Northern-Blot-Analyse für *Ephrin-A5* ergab, daß in allen untersuchten Stadien und Geweben zwei dominante alternative Transkripte von 5 und 7 kb vorliegen. Das bzw. die alternativ gespleißten Exons, die diesen differentiellen Transkripten zugrunde liegen, konnten im analysierten 5'-Bereich des *Ephrin-A5*-Gens (2,55 kbp, Exon I - V) nicht identifiziert werden. Sie liegen 3' von Exon V. Die RT-PCR-Analyse ergab jedoch ein weiteres alternatives Transkript, welches aus dem Ausspleißen des vierten Exons hervorgeht. Dieses Transkript ist um 80 bp verkürzt und kann aufgrund der Gesamtgröße der Transkripte in der Northern-Blot-Analyse nicht unterschieden werden. Damit ist Exon IV das einzige Exon des kodierenden Bereiches, das alternativ gespleißt wird, was zu den Isoformen Ephrin-A5 und führt, die sich in ihrer Länge um 27 Aminosäurereste unterscheiden. Die kürzere Spleißform kann außer bei der Maus auch bei Mensch und Ratte identifiziert werden (FLENNIKEN *et al.*, 1996; LAI *et al.*, 1999). Die längere Spleißform kommt ebenfalls beim Menschen sowie bei Huhn und Zebrafisch vor (WINSLOW *et al.*, 1995; DRESCHER *et al.*, 1995; GALE *et al.*, 1996; KOZLOSKY *et al.*, 1997; BRENNAN *et al.*, 1997; LAI *et al.*, 1999). Diese längere Spleißform ist ein gemeinsames Merkmal zwischen *Ephrin-A5* und *Ephrin-A3* und wird in beiden Fällen in höheren Mengen als das kürzere Spleißprodukt transkribiert, existiert jedoch nicht in anderen *Ephrin*-Genen der A-Klasse (Abb. 3.28; LAI *et al.*, 1999). Die Aktivität der beiden Isoformen unterscheidet sich weder in Bindungs-Assays mit dem Rezeptor EphA3 noch in ihrer abstoßenden Wirkung auf auswachsende Neuriten von Spinalganglien in signifikanter Weise (LAI *et al.*, 1999). Da in allen untersuchten Geweben und Entwicklungsstadien beide Isoformen vorkommen bleibt die Frage nach der Ursache des Vorhandenseins zweier Formen eines Moleküls mit gleicher biologischer Wirkung ungeklärt. Die zwei detektierten Transkripte der Northern-Blot-Analyse stimmen mit den Daten von DONOGHUE *et al.*, (1996) überein. In teilweiser Abweichung zu den eigenen Daten berichten DAVENPORT *et al.* (1998) und LAI *et al.* (1999) von drei dominanten Transkripten von 7,2, 5,9 und 4,2 kb bei der Northern-Blot-Analyse von Maus-Gewebe, von denen das 5,9 kb große Transkript stark unterrepräsentiert ist. Dieser Unterschied zum eigenen Befund könnte auf die Verwendung von verschiedenen Sonden zurückzuführen sein und/oder auf die Verwendung von Maus-Gewebe, das Tieren eines anderen Mausstammes entnommen wurde. In Frage kommend ist auch eine nicht ausreichende Sensitivität, der eigenen Northern-Blot-Analyse für die Detektion des unterrepräsentierten Transkriptes. Drei Transkripte können auch beim Huhn (6,0, 5,0 und 2,5 kb) und beim Menschen (7,5, 6,0 und 3,5 kb) detektiert werden, während bei der Ratte gewebeabhängig, die Anzahl der Transkripte, mit Ausnahme eines dominanten Transkriptes von 5 kb, variiert (DRESCHER *et al.*, 1995; WINSLOW *et al.*, 1995; KOZLOSKY *et al.*, 1997).

Ephrin-A5-Expression konnte über Northern-Blot- und RT-PCR-Analyse auch in ES-Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 3.8). Da ES-Zellen, der in Kultur genommenen inneren Zellmasse von Blastocysten (E 3,5) entsprechen, könnte es sich hier um ein Indiz für eine sehr frühe Expression von *Ephrin-A5* handeln, also bereits im Präimplantationsstadium. Wie von LICKLITER *et al.* (1996) nachgewiesen sind mehrere Eph-Rezeptoren beider Subklassen in ES-Zellen exprimiert und daher mögliche Interaktionspartner für Ephrin-A5 vorhanden. Die Bedeutung dieser potentiell frühen Expression von Eph-Rezeptoren und ihren Liganden bleibt unklar, könnte jedoch in Zellmigrations-, Separations- oder Differenzierungsprozessen liegen. Unter Berücksichtigung des onkogenen Potentials mancher Eph-Rezeptoren, ist es auch

vorstellbar, daß sie während der Embryogenese Einfluß auf die lokale Proliferation von Zellen nehmen (HIRAI *et al.*, 1987; BOYD *et al.*, 1992; SOANS *et al.*, 1994; KIYOKAWA *et al.*, 1994; ROBINSON *et al.*, 1996; Übersicht bei XU und WILKINSON, 1997; ZHOU, 1998). Hier könnte einzelnen Zellen ihre korrekte Position innerhalb des Zellverbands über die Interaktion von Eph-Rezeptoren und Ephrinen vermittelt werden, was sich in der Folge auf ihr Teilungsverhalten auswirkt.

4.2.1 Embryonale Expression von *Ephrin-A5*

Ephrin-A5 wird während der Embryonalentwicklung ausgesprochen dynamisch exprimiert. Die Domänen der Expression umfassen sowohl neuronale als auch nicht neuronale Strukturen und betreffen Organanlagen des ektodermalen sowie mesodermalen Keimblattes. Expression kann bereits zu Beginn der Gastrulation (E 6,5) im Ektoderm detektiert werden und zusätzlich im weiteren Verlauf im sich bildenden Mesoderm. Diese, erstmals in dieser Arbeit dokumentierte, noch vor der Organogenese stattfindende Expression könnte im Zusammenhang mit der frühen Regionalisierung des Embryos stehen. Ihr Ausfall in *Ephrin-A5*-defizienten Embryonen könnte einen Teil der beobachteten embryonalen Letalität bedingen, wie in einem der folgenden Abschnitte besprochen wird.

Okupiert die *Ephrin-A5*-Expression ursprünglich (bei E 8,5) die gesamte Gehirnanlage, die Kopffalten, beginnt bald eine Regionalisierung. Ab E 8,75 kann die Expression von *Ephrin-A5* im zukünftigen Mesencephalon gesehen werden und verläuft hier spätestens ab E 9,5 graduell, posterio-anterior abnehmend. In der Retina kann ebenfalls eine graduell, von nasal nach temporal abnehmende Expression ab E 10,5 festgestellt werden. Diese frühe Expression im zukünftigen Tectum und der sich bildenden Retina ist nicht allein über die Funktion von *Ephrin-A5* bei der Regulierung der retinotektalen Topographie erklärbar. Die Innervierung des dorsalen Mittelhirns durch retinale Fasern beginnt erst ab E 14 bei der Maus, also zu einem deutlich späteren Stadium (SIMON und O'LEARY, 1992). Die deutlich früher einsetzende Expression von *Ephrin-A5* (und *A2*) könnte Folge eines Differenzierungs- oder Regionalisierungsprozesses sein. Die festgestellten Unterschiede im Expressionsverlauf von *Ephrin-A5* und *A2* im Mesencephalon entsprechen dem von FLENNIKEN *et al.* (1996), ZHANG *et al.* (1996), FRISÉN *et al.*, (1998) und FELDHEIM *et al.*, (2000) gezeigten räumlich-zeitlichen Muster. *Ephrin-A5* besitzt hier eine scharfe, posteriore Expressionsgrenze am Isthmus im Gegensatz zu *Ephrin-A2*, dessen Expression ab E 13,5 den Isthmus nicht mehr erreicht. Während das Expressionsmaximum von *Ephrin-A5* im Colliculus inferior liegt, bleibt *Ephrin-A2*-Expression im Colliculus superior beschränkt, was zu überlappenden Gradienten führt und eine kooperative Rolle der beiden Moleküle bei der Organisation der Retinotopie andeutet.

Ab E 10 wird die Expression von *Ephrin-A5* im nasalen Mesenchym deutlich, eine Expressionsdomäne, die über den gesamten Verlauf der Embryonalentwicklung aufrechterhalten wird und erst ab der Geburt deutlich an Stärke abnimmt. Zusätzlich exprimieren im Laufe der Entwicklung einzelne Abschnitte des Oberflächen-Ektoderms in dieser Region *Ephrin-A5*. Die Funktion von *Ephrin-A5* in diesem Bereich bleibt unklar. Die Analyse *Ephrin-A5*-defizienter Mäuse konnte keine Abnormitäten sich hier bildender Elemente des Facialskeletts aufzeigen.

Ephrin-A5 wird während der Entwicklung in den nur transient auftretenden Branchialbögen exprimiert. Die Expression beginnt hier ab ca. E 9,5 und begrenzt sich, wie an Schnittpräparaten festgestellt werden konnte, auf das Oberflächen-Ektoderm. Dies steht in Übereinstimmung mit den Daten von FLENNIKEN *et al.* (1996). Interessanterweise kann die Expression ursprünglich in allen Branchialbögen detektiert werden, ab E 11 allerdings nicht mehr im zweiten Branchialbogen. Die Dynamik der *Ephrin-A5*-Expression in diesen Territorien könnte mit ihrer Innervierung durch die Cranialnerven in Zusammenhang stehen.

4.2.2 *Ephrin-A5*-Expression in Hypothalamus und Hypophyse

Ephrin-A5 wird bereits früh in der Entwicklung im Neuroepithel des ventralen Diencephalon exprimiert (s. Abb. 3.13). In dieser Region entstehen die Anlagen von Hypothalamus und Hypophyse die zentralen neuronalen Systeme der hormonellen Kontrolle bei Wirbeltieren (Übersicht bei KANDEL *et al.*, 1991; ECKERT *et al.*, 1993). Die Expression in diesen Domänen bleibt während der gesamten Embryonalentwicklung erhalten und kann für distinkte hypothalamische Kerne auch adult detektiert werden. Bereits ab E 12,5 kann dabei ein Expressionsgradient beobachtet werden, der von ventral nach dorsal abnimmt. Die Hypothalamus-Expression von *Ephrin-A5* ist bislang nur von ZHANG *et al.* (1996) für das Stadium E 16 beschrieben und wurde im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht (ZARBALIS und WURST, 2000). Die Expression von *Ephrin-A5* im adulten Hypothalamus verläuft entlang seiner gesamten antero-posterioren Ausdehnung in distinkten Kernen. Ventral gelegene Kerne (z.B. Nucleus arcuatus) exprimieren dabei stärker *Ephrin-A5* als dorsaler liegende (z.B. Nucleus paraventricularis). Die Funktion von *Ephrin-A5* in dieser Expressionsdomäne bleibt bislang ungeklärt, könnte allerdings in Zusammenhang mit Abgrenzung und/oder Konnektivität hypothalamischer Kerne stehen. Eine weitere Funktion könnte in der Regulierung der Wanderung retinaler Fasern in diesem Bereich liegen. Ventral des Hypothalamus bilden die Axone der RGZ das Chiasma opticum, indem sie größtenteils zur kontralateralen Seite kreuzen. Nach dem Chiasma vollziehen sie eine deutliche Änderung ihrer Wachstumsrichtung von horizontal nach vertikal, um dorsal gelegene Kerngebiete des Thalamus und den Colliculus superior zu innervieren. TUTTLE *et al.* (1998) sowie MARCUS *et al.* (2000) konnten zeigen, daß hypothalamische Zellen *in vitro* eine abstoßende Wirkung auf retinale Fasern ausüben, was, wie die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten lassen, auf das hier exprimierte *Ephrin-A5* zurückzuführen ist. Da temporale Fasern dabei stärker betroffen sind als nasale Fasern, besteht die Möglichkeit der Vermittlung einer Positionsinformation an die retinalen Axone. Eine Erklärung für die stärkere *Ephrin-A5*-Expression im ventralen Hypothalamus und ihre Abschwächung weiter dorsal, wäre aus der Situation gegeben, daß bereits im Übergang von Hypothalamus zu Thalamus eine Defaszikulation des optischen Traktes stattfindet. Diese steht im Dienste der notwendigen Verbindungen, die zwischen den retinalen Axonen und dem hier lokalisierten Corpus geniculatum laterale gebildet werden müssen. Da *Ephrin-A5* die Faszikulation von neuronalen Fortsätzen fördert, wäre eine Expression hier unerwünscht (WINSLOW *et al.*, 1995; Übersicht bei CARAS *et al.*, 1997). Sollte die *Ephrin-A5*-Expression im Hypothalamus im Zusammenhang mit dem Verlauf retinaler Axone am Chiasma stehen, so

könnte es sich dabei nur um einen transienten Effekt handeln, da die Organisation retinaler Projektionen im optischen Nerv bei adulten *Ephrin-A5*-defizienten Mäusen erhalten bleibt, wie in einem der folgenden Abschnitte besprochen wird.

Die Expression in der Hypophyse beschränkt sich ursprünglich auf den neuronalen Anteil (Neurohypophyse), die aus dem Infundibulum entsteht. Die Adenohypophyse, die eine Ausstülpung des Munddachs darstellt ist *Ephrin-A5*-negativ. Ab E 15 kann *Ephrin-A5* zusätzlich in der Pars intermedia, die aus der Adenohypophyse entsteht, detektiert werden. Die Expression von Ephrin-A5 könnte hier z.B. dazu dienen die Vermischung von Zellen aus diesen beiden unterschiedlichen Anteilen zu verhindern. Damit könnte Ephrin-A5 eine regulierende Signalfunktion bei der Induktion der Adenohypophyse durch das ventrale Diencephalon zukommen (ERICSON *et al.*, 1998; TAKUMA *et al.*, 1998; Übersicht bei TREIER und ROSENFELD, 1996). Diese Annahme würde die Expression eines Eph-Rezeptors in der Adenohypophyse voraussetzen, was in den Expressionsstudien dieser Arbeit nicht festgestellt werden konnte. Eine makroskopische Untersuchung der Hypophyse adulter *Ephrin-A5*-defizienter Mäuse konnte keine Hinweise auf phänotypische Veränderungen liefern. Da sich homozygote, wie heterozygote Mutanten von WT-Mäusen weder in ihrer postnatalen Entwicklung noch in ihrer Fortpflanzungsfähigkeit unterscheiden, ist eine tiefgreifende Veränderung der damit zusammenhängenden Funktionen des endokrinen Systems nicht wahrscheinlich.

4.2.3 *Ephrin-A5*-Expression in corticalen Strukturen

Ephrin-A5 wird in schichten- und arealspezifischerweise im cerebralen Cortex exprimiert. Der Beginn der Expression liegt zwischen E 16,5 und P 0, was in Übereinstimmung mit den Daten von VANDERHAEGHEN *et al.* (2000) steht, die den Expressionbeginn auf E 18 datieren konnten. Die Expression bleibt perinatal im Wesentlichen im somatosensorischen und primären motorischen Areal (zusammenfassend sensomotorisch genannt) lokalisiert und verläuft hier graduell von dorso-medial nach ventro-lateral abnehmend. Interessanterweise wird perinatal diese Expressionsdomäne anterior und posterior von der Expression der Rezeptoren *EphA5* und *EphA7* im Cortex begrenzt (GAO *et al.*, 1998/a; RUBENSTEIN *et al.*, 1999). Dies stellt ein weiteres Beispiel für die komplementäre Verteilung von Rezeptor und Ligand dar und stützt die Vermutung *Ephrin-A5* würde an der Regionalisierung der Rindenplatte mitwirken. Zusätzlich kann *Ephrin-A5* bei P 0 in einer nur transient auftretenden Schicht von sich differenzierenden Neuroblasten an der Basis der Rindenplatte, der sog. *subplate* detektiert werden. Die *subplate* ist von besonderer Bedeutung für die thalamische Innervierung von Schicht IV des Cortex, was *Ephrin-A5* mit einem weiteren System neuronaler Konnektivität in Zusammenhang bringt (Übersicht bei ALLENDOERFER und SCHATZ, 1994). In der Tat konnte *in vitro* gezeigt werden, daß *Ephrin-A5* das Auswachsen thalamischer Neurite, die *EphA5* exprimieren, inhibiert (GAO *et al.*, 1998/a). Desweiteren werden im perinatalen Cortex weitere Ephrine exprimiert (*Ephrin-A2*, *-A3* und *-A4*), ohne allerdings die arealspezifische Verteilung von *Ephrin-A5* (eigene Befunde; MACKAREHTSCHIAN *et al.*, 1999; VANDERHAEGHEN *et al.*, 2000).

Nach Vollendung der corticalen Schichtenbildung, ca. eine Woche nach der Geburt, verläuft die Expression von *Ephrin-A5* schichtenspezifisch, allerdings nicht mehr auf das

sensomotorische Areal begrenzt. Diese Schichtenspezifität variiert abhängig vom corticalen Areal. Im somatosensorischen Cortex z.B. ist in erster Linie Schicht IV *Ephrin-A5*-positiv, während im primären motorischen Cortex zusätzlich die Schichten V und VI *Ephrin-A5* stark exprimieren. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von CASTELLANI *et al.* (1998), MACKAREHTSCHIAN *et al.* (1999) und VANDERHAEGHEN *et al.* (2000). Weiterhin konnte festgestellt werden, daß die Expression in Schicht IV des somatosensorischen Areals, offensichtlich durch die komplementäre Expression von *EphA5*, in den Schichten II/III und V begrenzt wird (CASTELLANI *et al.*, 1998).

Ephrin-A5 wird neben dem cerebralen Cortex auch in der Pyramidenzellschicht des Cornu ammonis im Hippocampus exprimiert. Hier kann juvenil besonders starke Expression im amygdalo-hippocampalen Areal gesehen werden (s. Abb. 3.15b), eine bislang undokumentierte Expressionsdomäne, die *Ephrin-A5* mit Fragestellungen neuronaler Plastizität in Zusammenhang bringt. Abweichende Expressionsdaten werden im Hippocampus von Ratten beschrieben. GAO *et al.* (1998/b) berichten von Expression im adulten Gyrus dentatus, was in den eigenen Expressionsanalysen bei keinem Stadium beobachtet werden konnte, während STEIN *et al.* (1999) ab P 2 *Ephrin-A5*-RNA in der Pyramidenzellschicht des Cornu ammonis sehen, hingegen, in Übereinstimmung mit den eigenen Daten (bei der Maus), keine im Gyrus dentatus. Die Funktion von *Ephrin-A5* in Zusammenhang mit seiner hippocampalen Expression bleibt unklar. Während für das hier ähnlich exprimierte *Ephrin-A3* *in vitro* eine abstoßende Wirkung auf Neuriten des entorhinalen Cortex, die in der äußeren Molekularschicht des Hippocampus terminieren, festgestellt werden konnte, zeigt *Ephrin-A5* keine derartige Wirkung (STEIN *et al.*, 1999).

4.2.4 *Ephrin-A5*-Expression im olfaktorischen System

Zu den prominentesten Domänen der *Ephrin-A5*-Expression während der Entwicklung gehören Strukturen des olfaktorischen Systems, wie das Riechepithel oder bestimmte Schichten des Bulbus olfactorius (S. Abb. 3.16i). Interessanterweise kann über Rezeptor-AP-Bindung in den Zellkörpern des olfaktorischen Epithels kein *Ephrin-A5* detektiert werden, was den Schluß zuläßt, daß die Translation der *Ephrin-A5*-mRNA in den Fasern der olfaktorischen Sinneszellen stattfindet. Diese treten durch die cribiforme Platte in den Riechkolben ein, wo sie die Nervenschicht bilden, in der *Ephrin-A5* über Rezeptor-AP-Bindung detektiert werden kann (S. Abb. 3.16k).

Zusätzlich exprimieren auch Elemente des akzessorischen olfaktorischen Systems, welches in erster Linie für die Perzeption von Botenstoffen sog. Pheromone verantwortlich ist, *Ephrin-A5* sehr stark. Die sensorischen Neurone für die Wahrnehmung der Pheromone sitzen im Epithel eines am Boden der Nasenscheidewand paarig angeordneten spezialisierten Organes, des vomeronasalen Organs (Jacobsonsches Organ). Fasern dieser Sinneszellen treten gebündelt aus dem vomeronasalen Organ (VNO) aus und projizieren in den akzessorischen Riechkolben (AOB), um dort in der glomerulären Schicht geordnete synaptische Verbindungen mit den Axonen der Mitralzellen einzugehen (RODRIGUEZ *et al.*, 1999; BELLUSCIO *et al.*, 1999; Übersicht bei HALPERN, 1987; FARBMAN, 1992; TIRINDELLI *et al.*, 1998; KEVERNE, 1999). *Ephrin-A5*

positive Strukturen des akzessorischen Riechsystems sind die Sinneszellen des VNO und der akzessorische olfaktorische Nerv, in dem hohe Mengen der mRNA detektiert werden können (Abb. 3.16b/f/j). Die Detektion des Ephrin-A5-Proteins über Rezeptor-AP-Bindung zeigt im Wesentlichen und in Übereinstimmung mit den Befunden von ZHANG *et al.* (1996) die gleiche Verteilung wie die mRNA, mit dem Unterschied, daß höhere Mengen des reifen Proteins in den Fasern als in den Somata der Sinneszellen vorhanden sind (Abb. 3.16g/h/k). Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, daß das *Ephrin-A5*-Gen in hohen Mengen in den Zellkörpern der Sinneszellen exprimiert wird und die mRNA über einen aktiven Transport in deren Axone gelangt, wo sie kontinuierlich translatiert wird.

Da es sich bei Ephrin-A5 um ein Molekül handelt, welches bei verschiedenen Systemen neuronaler Konnektivität eine repulsive Aktivität auf EphA-exprimierende Zellen und Fasern ausübt, liegt auch hier der Vermutung nahe, daß Fasern des akzessorischen Riechnervs durch die Präsentation von Ephrin-A5 an ihrer Oberfläche Fasern anderer Zellen daran hindern, mit ihnen unerwünschte Verbindungen einzugehen. Wie bereits erwähnt, bilden sich Verbindungen zwischen den Axonen des akzessorischen Riechnervs und den dendritischen Fortsätzen der Mitralzellen in der glomerulären Schicht des akzessorischen Riechkolbens. Die Suche nach einem Rezeptor, welcher selektiv im akzessorischen Riechkolben exprimiert wird, führte bei EphA6 zum Erfolg. Dieser Rezeptor wird intensiv in den Zellen der externen plexiformen, der Mitralzell- und der Körnerzellschicht exprimiert. Interessanterweise ist die *EphA6*-Verteilung in der externen plexiformen Schicht nicht homogen, sondern konzentriert sich vor allem im anterioren Abschnitt. Im Gegensatz dazu verläuft die Expression in den Mitralzellen und den tiefer gelegenen Körnerzellen des AOB gleichmäßig. Damit stellt EphA6 das erste bekannte Molekül dar, daß in der externen plexiformen Schicht des AOB differentiell exprimiert wird. Die Bedeutung einer derartigen antero-posterioren Unterteilung der tieferen Schichten des AOB, die in jüngster Zeit auch durch histochemische und physiologische Methoden nachgewiesen wurde, ist bislang unklar, könnte allerdings im Dienste einer topographischen Organisation der zu bildenden Verbindungen stehen (JIA und HALPERN, 1997; SUGAI *et al.*, 1997; SUGAI *et al.*, 2000).

4.3 Mutagenisierung des *Ephrin-A5*-Gens

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels homologer Rekombination in ES-Zellen das *Ephrin-A5*-Gen der Maus mutagenisiert. Hierfür wurden zwei Konstrukte mit identischen Rekombinationsarmen verwendet, die jedoch unterschiedliche Kassetten in den *Ephrin-A5*-Locus einführen. Während es sich in dem einen Fall um die PGK-*neo*^R-Kassette handelt, wird diese im zweiten Konstrukt zusätzlich stromaufwärts von dem Reporter gen *lacZ* und *En2*-Intronsequenzen flankiert. Dieser Intronabschnitt enthält eine Spleißakzeptor-Erkennungssequenz, welche die Integration der *lacZ*-Kassette in das reife Transkript der transgenen Maus-Mutanten ermöglichen soll. Dadurch soll der Expressionsverlauf von *Ephrin-A5* durch den einfachen histochemischen Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität sichtbar gemacht werden. Im folgenden sollen Aspekte der homologen Rekombination des *Ephrin-A5*-

Locus in ES-Zellen, wie Rekombinationseffizienz und Transkription des mutierten Allels, diskutiert werden.

Die homologe Rekombination eines Transgens in Säugerzellen ist gegenüber einer nicht-homologen Integration, üblicherweise in einer Größenordnung von 10^2 bis 10^5 , seltener (Übersicht bei HOOPER, 1993). Um eine Anreicherung homolog rekombinierter Klone zu erreichen wurden Vektoren eingesetzt, die mit PGK-*neo*^R/PGK-HSV-*tk*^S positiv/negativ doppelt selektierbar sind. Die Frequenz homologer Rekombination an beiden Armen lag beim PGK-*neo*^R-Konstrukt bei 0,33% (2 aus 600) während sie beim *LacZ*-PGK-*neo*^R-Konstrukt mit 0,5% (3 aus 575) höher lag. Dies ist umso interessanter als im zweiten Fall 0,67 kbp endogener Sequenz durch ein ca. 7 kbp großes Transgen ersetzt werden während im Falle des PGK-*neo*^R-Konstruktes das Verhältnis ersetzter zu ersetzender Sequenz deutlich ausgewogener ist (0,67 kbp durch 1,8 kbp). Ein zusätzlicher Unterschied bestand allerdings in der Wahl der ES-Zelllinie. Während mit dem PGK-*neo*^R-Konstrukt die Linie R1 aus der Sublinie (129/Sv × 129/Sv)_F₁ verwendet wurde, war es im Falle des *LacZ*-PGK-*neo*^R-Konstruktes die Linie TBV2 aus der Sublinie (129/Sv × 129/Sv)_F₁. Die Rekombinationsarme des Vektors, der aus Maus-DNA des Stamms 129/Sv hergestellt wurde, könnten Sequenzabweichungen zu den korrespondierenden DNA-Abschnitten der R1-Linie enthalten, die sich negativ auf seine Rekombinationseffizienz auswirken (DENG und CAPECCHI, 1992; TE RIELE *et al.*, 1992; VAN DEURSEN und WIERINGA, 1992; WURST *et al.*, 1994).

Beide Konstrukte führen bei den mutierten Allelen zu aberranten, nativ nicht auftretenden Spleißprodukten. Das primäre Transkript des *Ephrin-A5*-Locus wird durch die SV40-Polyadenylierungskassette nicht terminiert. In der Folge wird ein reifes Transkript gespleißt welches der nativen Sequenz unter Aussparung des zweiten Exons bzw. der inserierten transgenen Sequenzen entspricht. Günstigerweise führt die Deletion des zweiten Exons bei Fortsetzung der Transkription im mutierten Allel zu einem abweichenden Leserahmen und so zu einem inaktiven Genprodukt. Dieses aberrante Spleißen wirkt sich insbesondere bei der Verwendung der *lacZ*-Reportergen-kassette nachteilig aus. Hier führt es dazu, daß diese ineffizient transkribiert wird und damit die Signalintensität der X-Gal-Färbung so niedrig liegt, daß ihre Detektion erschwert ist.

Aberrantes Spleißen ist wahrscheinlich auch die Ursache dafür, daß kein homologes Rekombinationsereignis aus der Elektroporation mit dem *En2*-SA-IRES- β *geo*-pA-Vektor isoliert werden konnte. Die Resistenz mutagenisierter Klone basiert hier auf der Expressionskontrolle des Selektionsmarkers (*neo*^R) durch den endogenen Locus. Da die homologe Rekombination zu einem aberranten Ausspleißen der β *geo* und damit der *neo*^R-Kassette aus dem reifen Transkript führt bedeutet das auch einen Verlust der Resistenz gegenüber der Selektion mit G418.

4.4 Phänotypische Veränderungen der *Ephrin-A5*^{neo/neo}-Mutanten

Phänotypische Analysen deren Ergebnisse nachfolgend diskutiert werden, wurden an F2-Nachkommen der Chimären durchgeführt, die aus den ES-Zellklonen 4E5 und 5A3 generiert wurden. Beide ES-Zell-Klone stammen aus der Transfektion mit dem PGK-*neo*^R-Mutagenisierungsvektor. Homozygot mutante Tiere wurden mit Wildtypen oder mit den phänotypisch nicht auffälligen heterozygoten Tieren verglichen.

4.4.1 Defekte des Neuralrohrs

Bereits die Analyse der ersten Würfe aus den Verpaarungen heterozygot mutanter Tiere zeigte einen unerwarteten Phänotyp. Ein Teil der homozygoten Nachkommen, der später auf 14% festgelegt werden konnte, zeigt Defekte des Neuralrohres, die im wesentlichen der Pathologie einer Anencephalie entsprechen. Diese Tiere sterben innerhalb kürzester Zeit nach der Geburt und zeigen eine starke Reduktion des Telencephalons und des bedeckenden Schädels. In pränatalen Stadien bis E 13,5 findet sich jedoch ein anderes Bild. Hier liegt eine Exencephalie vor, eine Überproliferation von Gewebe, die in erster Linie Mesencephalon und Metencephalon betrifft. Offensichtlich wird das überproliferierte Gewebe im weiteren Verlauf der Gestation zurückgebildet und führt damit bei den perinatalen Stadien zur beobachteten Anencephalie. Insgesamt betreffen die Neuralrohr-Defekte der *Ephrin-A5*^{neo/neo}-Mutanten das gesamte Gehirn vom Telencephalon zum Myelencephalon und seinen Übergang ins Rückenmark. Aus der Analyse sagittal verlaufender Schnitte konnte zusätzlich festgestellt werden, daß auch die ventralen Abschnitte des Gehirns, wie Hypothalamus, Hypophyse und Pons von Disorganisation und einer abnormen Morphologie gekennzeichnet sind.

Während der Embryonalentwicklung der Maus schließt sich das ursprünglich offene Neuralrohr auf Höhe des späteren Gehirns zuerst an drei Punkten: der Grenze zwischen Rückenmark und Rhombencephalon, zwischen Diencephalon und Mesencephalon und am äußersten rostralen Punkt des Telencephalons, dem anterioren Neuroporus. Von diesen Punkten ausgehend vollzieht sich die Schließung des Neuralrohres in beide Richtungen nach rostral und caudal (Übersicht bei SAKAI, 1989; COPP *et al.*, 1990; MORRIS-KAY *et al.*, 1994; GILBERT, 1997; WOLPERT, 1998). *Ephrin-A5* ist in allen drei Regionen zum Zeitpunkt (E 8,5) der Neuralrohr-Schließung exprimiert (s. Abb. 3.10a/b) und könnte damit eine direkte Rolle bei diesem Prozeß zu spielen. Zusätzlich ist der Rezeptor EphA7 ebenfalls zu diesem Zeitpunkt um den anterioren Neuroporus exprimiert und könnte damit als Rezeptor von Ephrin-A5 zu der korrekten Schließung des anterioren Neuroporus beitragen (persönliche Mitteilung Dr. Jonas Frisén, Karolinska Institut, Stockholm).

Weitere Mausmutanten mit ähnlichen Neuralrohr-Defekten sind bereits beschrieben worden. Hierzu gehören die Mauslinie SELH/Bc (MACDONALD *et al.*, 1989; JURILOFF *et al.*, 1989), die natürliche Mutante *Spotch* (*Pax-3*) (AUERBACH, 1954) sowie die transgenen Linien *open brain* (*opb*) (GÜNTHER *et al.*, 1994) und *Hes-1* (ISHIBASHI *et al.*, 1995). Während bei der

Mauslinie SELH/Bc die Identifizierung einer konkreten Mutation für diesen Defekt systembedingt ausbleibt und für *opb* bislang kein Kandidatengen eingegrenzt werden konnte ist bei *splotch*, das für den Transkriptionsfaktor Pax-3 kodierende Gen als mutiert identifiziert worden. Die *Hes-1*-Mutation wurde über gezielte Geninaktivierung nach homologer Rekombination in ES-Zellen erzielt. Bei *Hes-1* handelt es sich ebenfalls um einen Transkriptionsfaktor, der als negativer Regulator der Neurogenese wirkt. Somit handelt es sich bei *Ephrin-A5^{neo/neo}* bislang um die einzige Mausmutante bei der ein Faltungsdefekt des Neuralrohrs einem Zelloberflächenmolekül zugeordnet werden konnte. Im Unterschied zu diesen weiteren Mutanten liegt allerdings bei *Ephrin-A5^{neo/neo}* nur eine partielle Penetranz der Neuralrohrdefekte vor.

FRISÉN *et al.* (1998) beschreiben bei *Ephrin-A5*-Mutanten gleichen genetischen Hintergrunds wie die hier verwendeten Mäuse eine Penetranz von Neuralrohr-Defekten, die bei 17% liegt allerdings mit einer unterschiedlich starken Ausprägung bei den neugeborenen Tieren. Die Defekte variieren hier zwischen einer kleinen Öffnung am Schädel bis zur Anencephalie mit weit offenem Schädel, gespaltenen Gaumen und Fehlen größerer Gehirnareale. Auch hier sterben alle anencephalischen Tiere unmittelbar nach der Geburt. Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten neugeborenen Tieren konnte nur die schwerste Ausprägung dieses Phänotyps festgestellt werden.

Wie sieht jedoch der Mechanismus aus, der nach der Inaktivierung eines repulsiv wirkenden Zelloberflächen-Moleküls zur Umorganisation des Cytoskeletts der betroffenen Zellen führt und damit zu Faltungsdefekten des Neuralrohrs? Wäre der Effekt nicht-zellautonomer Natur, so könnte die Antwort im Einfluß der Eph-Rezeptoren auf die Organisation des Cytoskeletts, z.B. über PDZ-Domänen-enthaltende intrazelluläre Moleküle, liegen (HOCK *et al.*, 1998; BUCHERT *et al.*, 1999). Kürzlich konnte über *gene trap*-Mutagenese eine Mausmutante erzeugt werden, in welcher der *shroom* (*shrm*)-Locus inaktiviert ist (HILDEBRAND und SORIANO, 1999). *Shroom* kodiert für zwei Proteine (*ShrmL*, *ShrmS*), die aus alternativem Spleißen hervorgehen und eine PDZ-Domäne enthalten. *Shrm* bindet direkt an fädiges (F-) Actin, welches die sogenannten Streßfasern des Cytoskeletts bildet und an Bewegungsvorgängen von Zellen teilnimmt. Die Inaktivierung von *shrm* führt bei allen Nachkommen zu Neuralrohrdefekten, die im Wesentlichen denen der *Ephrin-A5*-Mutanten entsprechen, allerdings bei partieller Penetranz (23%) zusätzlich auch zu Verschlüßstörungen des Rückenmarks (*Spina bifida*). Werden die an den Neuralfalten während der Neurulation exprimierten EphA-Rezeptoren aufgrund des Fehlens von *Ephrin-A5* nicht phosphoryliert, so unterbleibt auch ihre Interaktion mit PDZ-Faktoren und damit ihre Wirkung auf Organisation des Cytoskeletts und Bewegung der Zellen. Hierin könnte der molekulare Mechanismus der Anencephalie *Ephrin-A5*-defizienter Mäuse liegen. Die Wirkung der Eph-Rezeptoren auf die Anordnung der Actin-Filamente, die auch Grundlage von Bewegungsvorgängen während der axonalen Zielfindung ist, findet allerdings nicht nur über PDZ-Domänen-enthaltende Faktoren statt. Vielmehr haben sich Hinweise auf verschiedenste Wege der Signaltransduktion ergeben, von denen die Interaktion mit Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie hervorgehoben werden soll (MEIMA *et al.*, 1997; HOLLAND *et al.*, 1997; Übersicht bei BRÜCKNER und KLEIN, 1998). Ein physiologisches Substrat von Src ist Cortactin, welches direkt in die Quervernetzung von F-Actin positiv eingreift und von Src negativ reguliert wird (HUANG *et al.*, 1997). Ein Modell der

molekularen Interaktionen, die zur Überproliferation der Zellen entlang der Neuralfaltens führen und damit zur Anencephalie der *Ephrin-A5^{neo/neo}*-Föten könnte folgendermaßen aussehen: Die fehlende Aktivierung der EphA-Rezeptoren führt zu inaktivem Src, daß seine negativ-regulierende Wirkung auf Cortactin verliert und damit zu einer Verstärkung der Quervernetzung der Actin-Filamente führt. Diese zunehmende Quervernetzung führt zu einer „Erstarrung“ des Cytoskeletts, was dazu führt, daß die Zellen an den notwendigen Bewegungsvorgängen nicht mehr teilnehmen können.

Die molekularen Mechanismen, die zu den Neuralrohrdefekten der *Ephrin-A5*-defizienten Embryonen führen, könnten auch auf einen zellautonomen Effekt beruhen. Wie DAVY *et al.* (1999) zeigen konnten ist Ephrin-A5 in der Lage nach Rezeptor-Bindung ein Signal ins Zellinnere zu transduzieren. Dieser Vorgang findet an den sog. Mikrodomänen statt in denen Ephrin-A5 mit einer Vielzahl von Molekülen kolokalisiert, die mit intrazellulären Domänen ausgestattet sind und damit zur Signaltransduktion ins Zellinnere fähig sind. Dieses Ereignis erfordert die Aktivierung der Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase Fyn, die ebenfalls die Vernetzung des Cytoskeletts und damit Zellform und -adhesion regulieren kann.

Die große Mehrheit der Schließungsdefekte des Neuralrohrs kann beim Menschen über die Verabreichung von Folsäure an Schwangere verhindert werden (Übersicht bei CORCORAN, 1998). Die Neuralrohrdefekte, die von der *Ephrin-A5^{neo/neo}*-Mutation verursacht werden scheinen jedoch gegenüber einer derartigen Behandlung resistent zu sein, wie nach Verabreichung von physiologisch wirksamen Konzentrationen von Folsäure an trächtige Weibchen hervorgeht (persönliche Mitteilung Dr. Jonas Frisé, Karolinska Institut, Stockholm). Für eine weitere Mausmutante, die von Folsäure-resistenten Neuralrohrdefekten betroffen ist, die *curly tail (ct)*-Mutante, konnte eine wirksame Behandlung mit Inositol erzielt werden (GREENE und COPP, 1997). Eine derartige Inositol-Behandlung, deren Wirkung auf der Hochregulation des Retinsäure-Rezeptors- basiert, könnte auch bei der *Ephrin-A5*-Mutante ebenfalls zur Vermeidung der Neuralrohrdefekte führen.

Die partielle Penetranz läßt sich über den genetisch nicht homogenen Hintergrund (C57BL/6 × 129/Sv) der Zucht erklären. Es ist vorstellbar, daß kleine Unterschiede in der Regulation anderer, ähnlich exprimierter Ephrine dazu führen, daß sie zeitlich oder räumlich das fehlende Ephrin-A5-Signal kompensieren können. Nur in einem Anteil der *Ephrin-A5^{neo/neo}*-Tiere wird diese Kompensation verfehlt. Eine Expressionsanalyse für die Gesamtheit der Ephrine und Eph-Rezeptoren im rostralen Neuralrohr zum Zeitpunkt der Neurulation könnte weiteren Einblick in die molekularen Mechanismen liefern. Reinzüchtungen auf den Stamm 129/Sv sind momentan mit der Linie *Ephrin-A5^{lacZ/lacZ}* in Arbeit und könnten Aufklärung über den Einfluß des genetischen Hintergrunds auf die Penetranz der Neuralrohrdefekte geben.

4.4.2 Weitere Ursachen embryonaler Letalität

Etwa 30% der *Ephrin-A5*-defizienten Mäuse sind von embryonaler Letalität betroffen. Die Untersuchung embryonaler Stadien (ab E 11,5) ergab, daß nur ein Teil (14%) der Sterblichkeit über die beschriebenen Neuralrohrdefekte erklärt werden kann. Insofern müssen weitere Ursachen für die Letalität der *Ephrin-A5^{neo/neo}*-Embryonen vorliegen. Diese Ursachen sind

momentan unklar und könnten verschiedene Entwicklungsstadien betreffen. So könnte z.B. die Organisation der Blastocyste betroffen sein, ihre Implantation in die Uteruswand oder ein Postimplantationsstadium wie die Gastrulation.

In der Tat konnte gezeigt werden, daß Ephrin-A5 Gastrulationsdefekte im Zebrafisch induzieren kann. Wird es ektopisch als lösliche Form exprimiert, so wirkt es dominant-negativ indem es die Rezeptor-Funktion blockiert und führt bei Zebrafisch-Embryonen insbesondere zu einer Disorganisation des paraxialen Mesoderms (OATES *et al.*, 1999). Der korrespondierende Rezeptor scheint dabei EphA3 zu sein, der wie die Rezeptoren EphA2 und EphA4 während der Gastrulation exprimiert wird (XU *et al.*, 1994; GANJU *et al.*, 1994; RUIZ *et al.*, 1994; WINNING und SARGENT, 1994). Ephrin-A5 wird allerdings während der Gastrulation im Zebrafisch nicht exprimiert (BRENNAN *et al.*, 1997). Offensichtlich unterbricht die ektopische Expression von Ephrin-A5 die Bindung von Ephrin-A1, das früh-embryonal exprimiert wird, an den EphA3-Rezeptor, zu dem Ephrin-A5 die höchste Affinität besitzt (LACKMANN *et al.*, 1996; LACKMANN *et al.*, 1997). Die Verhältnisse liegen allerdings bei der Maus sowohl im Hinblick auf die Gastrulationsprozesse als auch auf die *Ephrin-A5*-Expression anders als beim Zebrafisch. In der Maus wird *Ephrin-A5* ab E 6,5, dem Beginn der Gastrulation, im mesodermalen und ektodermalen Keimblatt exprimiert (s. Abb. 3.9). Diese Expression setzt sich bis zur Neurulation fort (E 8,5), ab der sie sich auf die Neuralfalten beschränkt (Übersicht über die frühe Embryonalentwicklung der Maus bei HOGAN *et al.*, 1994; GILBERT, 1997; WOLPERT, 1998; BEDDINGTON und ROBERTSON, 1998; BEDDINGTON und ROBERTSON, 1999). Es ist vortellbar, daß diese frühe Expression von Ephrin-A5 im Dienste von Funktionen wie Zelladhäsion und Zellmigration und damit der Kompartimentierung und frühen Organisation des Embryos steht. Daß ein Verlust von Ephrin-A5, zu einem nicht voll penetranten Phänotyp im Hinblick auf die vermuteten frühen Defekte führt, könnte, wie schon im Falle der Neuralrohrdefekte dargestellt, im nicht homogenen genetischen Hintergrund auf eine teilweise Kompensation durch andere Ephrine zurückzuführen sein.

4.4.3 Analyse der Zellidentität über molekulare Marker

Eine wichtige Funktion der Ephrine und ihrer Rezeptoren besteht darin als repulsive Signale die Migration von Zellen und damit Musterbildungsprozesse zu regulieren (Übersicht bei DRESCHER, 1997; FRISÉN und BARBACID, 1997; GALE und YANCOPOULOS, 1997; ZISCH und PASQUALE, 1997; PASQUALE 1997; SEFTON und NIETO, 1997; ORIOLI und KLEIN, 1997; XU und WILKINSON, 1997; ZHOU, 1998; HOLDER *et al.*, 1998; FLANAGAN und VANDERHAEGHEN, 1998; FRISÉN *et al.*, 1999; HOLDER und KLEIN, 1999).

Um Veränderungen in Musterbildung und Zellidentität zu überprüfen wurden *in situ*-Hybridisierungen an Ganzkörperpräparaten von *Ephrin-A5*-defizienten Embryonen (E 11,5) durchgeführt. Dabei wurden cRNA-Sonden von in distinkten, neuronalen Domänen exprimierten Molekülen verwendet. Bei diesen Markern, die charakteristische Expressionsdomänen innerhalb des Neuralrohres einnehmen, handelt es sich um *En2*, *Pax2*, *Ephrin-A2* und *EphA4*.

Die Transkriptionsfaktoren *En2* - ein Marker der mes- metencephalischen Region - und *Pax2* - ein Marker des medialen Rückemarks, des Augenstiels sowie des otischen Vesikels am Tag 11 der Embryogenese - zeigen in den Mutanten keinerlei Abweichung vom wildtypischen Expressionsterritorium. Für *Ephrin-A2*, das ähnlich exprimierte und nächste Homolog von *Ephrin-A5*, kann ebenfalls keine Veränderung im Expressionsverlauf festgestellt werden, was in Übereinstimmung zu den Ergebnissen von FRISÉN *et al.* (1998) und VANDERHAEGHEN *et al.* (2000) steht. Für den Eph-Rezeptor *EphA4* konnten ebenfalls keine Veränderungen im Expressionsverlauf gezeigt werden. Dieser Eph-Rezeptor wird komplementär zu *Ephrin-A5*-Expressionsdomänen, insbesondere facialer Strukturen, exprimiert und könnte deren morphologische Abgrenzung bewirken.

Die Ergebnisse dieser Experimente konnten keinen Einfluß der *Ephrin-A5*-Mutation auf die embryonale Musterbildung aufzeigen, wobei dies für subtile Veränderungen nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Zellidentität bzw. -migration scheinen nicht verändert zu sein, was sich auch aus der offensichtlich normal erhaltenen Organisation des Embryos ergibt. Da nicht ausgeschlossen werden kann, daß in späteren Stadien der prä- und postnatalen Entwicklung derartige Defekte auftreten, wurde die Organisation adulter Gehirne in Schnittpräparaten untersucht.

Die Analyse des adulten Gehirns wurde mit histologischen Färbungen durchgeführt und ergab ebenso keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen bei den *Ephrin-A5*-defizienten Tieren. Alle mit diesen Methoden klar abgrenzbaren Kerne sind bei den Mutanten vorhanden und nehmen ihre normale Position ein. Zusätzlich konnten keine Unterschiede in der Schichtenbildung des cerebralen Cortex, Hippocampus oder Tectum festgestellt werden. Diese Befunde deuten eine weitgehend erhaltene zelluläre Struktur und Architektur des adulten Gehirns der überlebenden *Ephrin-A5*^{neo/neo}-Mäuse an.

4.4.4 Analyse der embryonalen Innervierung

In embryonalen Stadien können Domänen der *Ephrin-A5*-Expression gesehen werden, die im räumlichen Zusammenhang zu Gehirnnerven, Spinalganglien und motorischen Fasern der Extremitäten-Innervierung stehen (s. Abb. 3.10, 3.11 und 3.32). Einzelne Cranialnerven (insbesondere Branchialnerven), wie der Nervus Trigeminus verlaufen entlang *Ephrin-A5*-exprimierendem Gewebe. Die Spinalganglien wiederum werden von intensiv *Ephrin-A5*-exprimierendem Streifen des Oberflächen-Ektoderms begrenzt (s. Abb. 3.10g/h, 3.11a/d und 3.32). In den Extremitätenknospen können zwei proximo-laterale Domänen erkannt werden, welche die medial eintretenden motorischen und sensorischen Fasern umgrenzen (s. Abb. 3.10, 3.11 und 3.32). Diese Expressionsdomänen lassen vermuten, *Ephrin-A5* könnte bei der Zielfindung und/oder Faszikulation dieser Nerven von Bedeutung sein, was in *Ephrin-A5*-defizienten Embryonen *in vivo* überprüft wurde. Hierzu wurden -Neurofilament 160-Immunhistochemische Färbungen und Dil-Markierungen durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Experimente konnten weder für die heterozygot- noch homozygot-mutanten Embryonen Unterschiede in der Organisation der erwähnten Systeme nachweisen. Alle Gehirnnerven, die Spinalganglien und Motoneuronfasern der Extremitäten-

Innervierung zeigen in den untersuchten Stadien (E 11,0 - E 13,5) keine Veränderungen (s. Abb. 3.32). Dieser Befund ist insofern überraschend als Ephrin-A5 *in vitro* insbesondere mit der Innervierung der Extremitäten aufgrund seiner repulsiven Aktivität auf motorische Fasern des Rückenmarks in Verbindung gebracht worden ist (OHTA *et al.*, 1997). Eph-Rezeptoren der A-Klasse, die in den Motoneuronen exprimiert werden, und damit für die Interaktion mit Ephrin-A5 in Frage kommen sind EphA3, EphA4 und EphA5 (KILPATRICK *et al.*, 1996; OHTA *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 1997; YUE *et al.*, 1999). Da in den Domänen der Extremitätenknospe Ephrin-A2 (s. Abb. 3.18; OHTA *et al.*, 1997) ebenfalls exprimiert wird kann nicht ausgeschlossen werden, daß Redundanz zwischen den beiden Liganden das Fehlen von Ephrin-A5 kompensiert. Tatsächlich konnten bei *Ephrin-A2/A5*-Doppelmutanten topographische Defekte der Extremitäten-Innervierung durch motorische Fasern festgestellt werden (FENG *et al.*, 2000).

Für Ephrin-A5 wurde ein weiteres Konzept entwickelt, daß es mit der Innervierung der Extremitäten in Zusammenhang bringt. So konnte in Expressionsstudien festgestellt werden, daß es in der Maus (FLENNIKEN *et al.*, 1996) und im Huhn (ARAUJO *et al.*, 1998) in einer Subpopulation von Motoneuronen exprimiert wird. Die einzelnen Motoneuronsäulen werden durch die Expression verschiedener LIM-Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren spezifiziert und innervieren verschiedene Anteile der Axialmuskulatur bzw. der Extremitätenmuskulatur (Übersicht bei TANABE und JESSELL, 1996). Interessanterweise verläuft in Huhn-Embryonen die *Ephrin-A5*-Expression nicht gleichmäßig, sondern findet sich im thorakalen Abschnitt in den visceralen Motoneuronen, während sie sich im brachialen und lumbalen Abschnitt in den lateralen Motoneuronen konzentriert. Die lateralen Motoneuronensäulen innervieren in diesen Bereichen den dorsalen Anteil der Extremitätenknospen, die wiederum in ihrem dorso-proximalen Mesenchym *EphA7* exprimieren (ARAUJO und NIETO, 1997; ARAUJO *et al.*, 1998). Die *EphA7*-Expression kann, nach operativer Entfernung des dorsalen Oberflächen-Ektoderms unterbunden werden, da sich hier offensichtlich ein *EphA7*-induzierendes Signal findet. Daraufhin disorganisieren sich auch die Fasern, die den dorsalen Anteil der Extremitätenknospe innervieren, was eine Folge der fehlenden Interaktion zwischen Ephrin-A5 und EphA7 sein könnte (ARAUJO *et al.*, 1998).

Da diese funktionelle Studien in Huhn-Embryonen durchgeführt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, daß Spezies-Unterschiede in der Expression und letztlich Funktion dazu führen, daß in *Ephrin-A5*-defizienten Mausembryonen keine phänotypischen Veränderungen festgestellt werden können. In der Tat konnten YUE *et al.* (1999) zeigen, daß sich im lumbalen Rückenmark von 14 Tage alten Maus-Embryonen keine Expression von *Ephrin-A5* in den Motoneuronen findet, dafür aber im dorsalen Rückenmark. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit GALE *et al.* (1996), die im brachialen Bereich über Rezeptor-AP-Bindungsassay Ephrine der A-Klasse ebenfalls nur im dorsalen Rückenmark detektieren können. Zusätzlich konnte festgestellt werden, daß Ephrin-A5 eine wachstumshemmende Funktion auf Neuriten von Motoneuronen ausübt, die, wie bereits erwähnt, mehrere EphA-Rezeptoren exprimieren (YUE *et al.*, 1999). Hierdurch scheint eine Mitwirkung von Ephrin-A5 bei der dorso-ventralen Organisation des Rückenmarks möglich. Letztlich kann festgestellt werden, daß etwaige Veränderungen in der Organisation des Rückenmarks bzw. der Innervierung der Extremitäten in *Ephrin-A5*-defizienten Mäusen höchstwahrscheinlich in

Lokomotions-Problemen für diese Tiere resultieren würden. Dies konnte weder für einzelne Tiere noch bestimmte postnatale Stadien beobachtet werden.

4.4.5 Analyse der retinocollicularen Projektionen

Die Analyse der retinocollicularen Projektionen adulter Mäuse ergab unerwartete Befunde. Retrograde Markierungen retinaler Fasern in den *Ephrin-A5^{neo/neo}*-Mutanten zeigten eine normale retinocolliculare Topographie. Es konnten dabei für alle analysierten retinalen bzw. korrespondierend collicularen Positionen keine Abweichungen von der wildtypischen Organisation festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, als Ephrin-A5 seit seiner Identifizierung von DRESCHER *et al.* (1995) als Schlüsselmolekül für die Entwicklung der Retinotopie angesehen wird. Zur Entwicklung dieser Vorstellung haben sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Daten beigetragen. Sowohl Kollaps- als auch Streifen-Assay zeigen bei Huhn-Embryonen eine repulsive Aktivität von Ephrin-A5 auf temporale und nasale retinale Axone, wobei temporale Fasern sensitiver reagieren (DRESCHER *et al.*, 1995; MONSCHAU *et al.*, 1997). Eine lösliche, dominant-negativ wirkende Form von Ephrin-A5 bewirkt eine komplette Desensitivierung und damit ungeordnetes Wachstum retinaler Fasern im Streifen-Assay (CLOSSEK *et al.*, 1998). Ephrin-A5 wird in RGZ in einem nasal (hoch)-temporalen (niedrig) Gradienten exprimiert, was eine Modulierung der ebenfalls in der Retina exprimierten EphA-Rezeptoren bewirkt. Wird Ephrin-A5 in der Retina ektopisch in temporalen Axonen exprimiert so hat dies topographische Fehler in der Projektion zur Folge (DÜTTING *et al.*, 1999). Diese Daten werden durch die Analyse juveniler (P 14) *Ephrin-A5*-defizienter Mäuse durch FRISÉN *et al.* (1998) und FELDHEIM *et al.* (2000) gestützt. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß Tiere dieses Stadiums mit 50%iger Penetranz topographische Fehler temporaler retinaler Fasern zeigen, die teilweise posterior gelegene Ziele im Colliculus superior innervieren. Axone nasaler RGZ zeigen, zusätzlich zu normalen topographischen Projektionen, in fast allen Fällen aberrante Terminationszonen in weiter anterior gelegenen Positionen (FELDHEIM *et al.*, 2000). Da sowohl genetischer Hintergrund der Mäuse als auch die Mutagenisierungsstrategie in diesen Arbeiten mit der eigenen Arbeit übereinstimmen, kann hier nicht die Ursache für die Diskrepanz in den Ergebnissen liegen.

Die Kooperation von Ephrin-A5 mit Ephrin-A2 bei der Etablierung der retinotektalen Topographie könnte eine Erklärung für die korrekte Retinotopie *Ephrin-A5*-defizienter Mäuse sein. Ephrin-A2 könnte hier das fehlende Ephrin-A5 kompensieren. Diese Annahme ist allerdings nicht sehr wahrscheinlich, da sich zwischen den beiden Liganden sowohl in Expression als auch in ihrer Affinität zu den Eph-Rezeptoren deutliche Unterschiede zeigen. In der Tat konnte die Analyse heterozygoter und homozygoter Doppelmutanten die kooperative aber sich nicht gegenseitig ersetzende Funktion dieser beiden Liganden zeigen (FELDHEIM *et al.*, 2000). Ähnlich wie in den *Ephrin-A5*-Mutanten können bei *Ephrin-A2*-defizienten Mäusen topographische Fehler temporaler retinaler Axone mit einer 57%igen Penetranz festgestellt werden, während nasale Axone nicht betroffen sind. Der additive Effekt führt bei den Doppelmutanten zu einem allgemein schwereren Phänotyp. Temporale Fasern sind in nun in 85% der Tiere von Zielfindungsdefekten betroffen, während bei den nasalen Fasern hinsichtlich

der Penetranz keine Veränderungen auftreten. Bei den Doppelmutanten zeigen sich allerdings im Gegensatz zu den Einzelmutanten nun mehrere (bis zu fünf) Arborisationszentren für einzelne markierte Faserbündel, während bei den Einzelmutanten immer nur eine weitere Terminierung festgestellt werden kann. Zusätzlich treten bei den Doppelmutanten auch Fehler in der Topographie entlang der dorso-ventralen Achse auf.

Die wahrscheinlichste Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Daten dieser Arbeit und den Arbeiten von FRISÉN *et al.* (1998) und FELDHEIM *et al.* (2000) liegt in den unterschiedlichen postnatalen Stadien in denen die Projektionen RGZ studiert wurden. Die retinalen Projektionen wurden von FRISÉN *et al.* (1998) und FELDHEIM *et al.* (2000) zu dem Zeitpunkt P 14 studiert, da allgemein angenommen wird, daß die retinotektale Topographie dann bereits abgeschlossen ist (SIMON und O'LEARY, 1992). Das Studium älterer Stadien erfolgte somit erstmals in dieser Arbeit. Das Fehlen aberranter Verbindungen in adulten Mutanten dieser Arbeit, stellt einen starken Hinweis auf Plastizität innerhalb des retinotektalen Systems dar, die auch nach der Fertigstellung der topographischen Karte wirksam wird. Hier könnten insbesondere aktivitätsabhängige Prozesse von Bedeutung sein, wie sie für das visuelle System von Säugern bereits vielfach beschrieben worden sind (Übersicht bei GOODMAN und SHATZ, 1993; CRAMER und SUR, 1995; KATZ und SHATZ, 1996). Ein Indiz für die Plastizität enthalten bereits die Daten von FRISÉN *et al.*, (1998), da hier unmittelbar nach der Geburt (P 0) in den Colliculus inferior überschießende Fasern bei zwei Wochen alten Tieren nicht mehr beobachtet werden können. Diese Fasern werden offensichtlich wieder zurückgezogen oder abgebaut, infolge einer nachträglichen Korrektur, deren Mechanismus bislang nicht untersucht wurde. Die Tatsache, daß selbst bei der initialen Topographie die Penetranz der topographischen Fehler nicht vollständig ist, und neben den aberranten auch normale Terminationszonen vorhanden sind, könnte über das Fehlen von Ephrin-A5 und A2 in der Retina erklärt werden. Die beiden Moleküle werden hier in nasal (hoch)-temporalen (niedrig) Gradienten exprimiert, was offensichtlich zur graduellen Desensitivierung der RGZ-Axone über Aktivierung der kolokalisierten EphA-Rezeptoren führt (HORNBERGER *et al.*, 1999; DÜTTING *et al.*, 1999). In den Mutanten fehlen nun die Liganden sowohl im Tectum als auch in der Retina. Dies führt zur Sensibilisierung der nasalen retinalen Fasern, die nun auf den noch im Tectum erhaltenen Liganden (bei den Einzelmutanten) deutlich sensibler reagieren können und daher in ihrer topographischen Organisation nur teilweise gestört sind.

Die Resultate zeigen, daß die retinotektale Topographie nicht allein auf das molekulare System der EphA-Rezeptoren und ihrer Liganden zurückgeführt werden kann. Für weitere Molekülklassen ist eine regulatorische Wirkung bereits nachgewiesen auch wenn der Mechanismus noch weniger gut verstanden ist. So führt z.B. bei *Xenopus* die Inaktivierung von FGF (*fibroblast growth factor*)-Rezeptoren, die in der Retina exprimiert werden, zu fehlerhafter Zielerkennung retinaler Fasern im Tectum (McFARLANE *et al.*, 1996; Übersicht bei McFARLANE und HOLT, 1997). Ähnliche Experimente bei der Ratte zeigen, daß die Blockierung der FGF-Rezeptor-Aktivität über ein entsprechendes Antiserum, zu einer Desorganisation und Defaszikulation RGZ-Fasern in der Retina führt (BRITTIS *et al.*, 1996). Für den Faktor GAP (*growth associated protein*)-43, einen charakteristischen Marker auswachsender Axone (Übersicht bei BENOWITZ und ROUTTENBERG, 1997), konnte ebenfalls ein direkter Einfluß auf die Ausbildung der retinotektalen Topographie festgestellt werden. In *GAP-43*-defizienten Mäusen

führt eine unzureichende Auftrennung der retinalen Fasern am Chiasma opticum zu einer Auflösung der Retinotopie. Axone der RGZ, die normalerweise kontralateral projizieren, verbleiben auf der ipsilateralen Seite, erreichen im weiteren Verlauf den Colliculus superior, verlieren allerdings ihre Fähigkeit zur Knüpfung geordneter topographischer Verbindungen (STRITTMATER *et al.*, 1995; SRETAVAN und KRUGER, 1998; ZHU und JULIEN, 1999). Vor kurzem konnte bei *Xenopus* festgestellt werden, daß die Auftrennung kontralateral und ipsilateral projizierender retinaler Fasern am Chiasma auch unter den Einfluß von Ephrinen und Eph-Rezeptoren der B-Klasse steht. Dabei wird Ephrin-B1 und Ephrin-B2 am Chiasma opticum exprimiert und bewirkt das ipsilaterale Auswachsen einer Teilpopulation von Axonen RGZ, die EphB-Rezeptoren exprimieren (NAKAGAWA *et al.*, 2000).

Da es wenig wahrscheinlich ist, daß die bislang untersuchten Moleküle für die Ausbildung der retinotektalen topographischen Karte ausreichen, wird insbesondere durch ENU (*ethylNitrosourea*)-Mutagenese im Zebrafisch (*Danio rerio*) die Identifizierung neuer Molekülklassen erwartet, die Einsicht in die Bildung der Retinotopie bringen könnten. So konnten bereits mehr als hundert Mutationen (ca. 35 individuelle Gene) identifiziert werden, die zu Störungen der Retinotopie führen (BAIER *et al.*, 1996; TROWE *et al.*, 1996). Zusätzlich wurden mehr als 80 Mutationen identifiziert, die Einfluß auf das zielgerichtete Auswachsen retinaler Fasern ausüben (KARLSTROM *et al.*, 1996; Übersicht bei KARLSTROM *et al.*, 1997). Diese Daten lassen erkennen, daß derartig komplexe biologische Prozesse, wie die Ausbildung topographischer Karten, von ebenso komplexen molekularen Zusammenhängen gesteuert werden.

4.4.6 Die Funktion von Ephrin-A5 in den thalamocorticalen Projektionen

Ephrin-A5 wird intensiv im Cortex transkribiert und wurde sowohl mit seiner Regionalisierung als auch Prozessen axonaler Zielfindung in Verbindung gebracht (CASTELLANI *et al.*, 1998; GAO *et al.*, 1998/a; MACKARETSCHIAN *et al.*, 1999; DONOGHUE und RAKIC, 1999). In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Jürgen Bolz (Universität Jena) gelang der Nachweis einer Mitwirkung von Ephrin-A5 bei der Bildung terminaler Verzweigungen thalamocorticaler Fasern. Thalamische Axone wachsen während der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung in den Cortex ein und bilden in Schicht IV terminale Kollaterale aus, über die sie synaptische Verbindungen zu corticalen Neuronen knüpfen (GHOSH und SHATZ, 1992; MILLER *et al.*, 1993; AGMON *et al.*, 1993).

In *Ephrin-A5*-defizienten Mäusen konnte über Markierung der thalamischen Neurone und ihrer Axone mit Dil ihr Verlauf festgestellt werden. Die thalamischen Axone mutanter Tiere erreichen zwar den normal geschichteten Cortex und erkennen in Schicht IV ihre Terminationszone, da sie sich hier verzweigen. In der Folge sind allerdings Anzahl und Länge der terminalen Verzweigungen um die Hälfte reduziert. Dies resultiert in einer geringeren Dichte der Innervation und dementsprechend zu weniger synaptischen Verbindungen zwischen thalamischen und corticalen Neuronen. *In vitro* Experimente konnten zeigen, daß die wachstumsstimulierende Wirkung auf terminale Verzweigungen tatsächlich von Ephrin-A5

ausgeht, da von Membranpräparationen *Ephrin-A5*-transfizierter Zellen die gleiche Wirkung ausgeht (persönliche Mitteilung, Prof. Jürgen Bolz). Damit ist für *Ephrin-A5* erstmalig *in vivo* gezeigt, daß es nicht nur repulsiv, sondern auch als wachstumsstimulierender Faktor auf einwachsende Axone wirken kann. Diese wachstumsstimulierende Wirkung von *Ephrin-A5* ist bislang für kein anderes System neuronaler Konnektivität gezeigt worden. Eine Möglichkeit diese neue Aktivität zu erklären, wäre das Vorhandensein verschiedener Kofaktoren für die Eph-Rezeptoren, die, abhängig von den zu bildenden Projektionen, verschiedene zelluläre Antworten nach erfolgter Ligandenbindung vermitteln. Das würde bedeuten, daß das Wachstumsverhalten bestimmter axonaler Populationen von der Expression derartiger Kofaktoren abhängig ist. In der Tat gibt es bereits Indizien für eine derartige Verbindung zwischen Eph-Rezeptor-Aktivierung und -Funktion und Mitgliedern der L1-Familie von Zelladhäsionsmolekülen. Diese werden offensichtlich von Eph-Rezeptoren phosphoryliert und ermöglichen über ihre Interaktionen mit anderen Kinasen, wie den FGF-Rezeptoren, unterschiedliche zelluläre Reaktionen (ZISCH *et al.* 1997; Übersicht bei ZISCH und PASQUALE, 1997). Intrinsische Unterschiede zwischen verschiedenen Fasersystemen oder der gleichen axonalen Population zu verschiedenen Stadien könnten auch über einen einzigen Rezeptormechanismus erklärt werden. So konnte gezeigt werden, daß die Erhöhung der intrazellulären Konzentration cyclischer Nukleotide (cAMP oder cGMP) in auswachsenden Neuriten ausreicht um eine ursprünglich abstoßende Wirkung von Netrin-1 oder Semaphorin III, in eine attraktive Wirkung umzuwandeln (MING *et al.*, 1997; SONG *et al.*, 1998). Unterschiedliches Wachstumsverhalten bestimmter Axone könnte auch über eine Modulation der Rezeptor-Funktion durch Ephrine erzielt werden. Für das retinotektale System konnte gezeigt werden, daß auf RGZ mit EphA-Rezeptoren koexprimierte *Ephrin-A*-Liganden zur Desensitivierung dieser retinalen Fasern gegenüber anderen *Ephrin-A*-exprimierenden Zellen führt (HORNBERGER *et al.*, 1999; DÜTTING *et al.*, 1999). Im thalamocorticalen System könnte die sog. *subplate* zur Desensitivierung der thalamischen Axone führen, da diese transient auftretende Zellschicht *Ephrin-A3* und *A5* exprimiert und von den thalamischen Projektionen passiert wird (MACKAREHTSCHIAN *et al.*, 1999; Übersicht bei ALLENDORFER und SHATZ, 1994). Die thalamischen Afferenzen könnten demnach, nach ihrem Einwachsen in den embryonalen Cortex, nicht mehr in ihrem Wachstum inhibiert werden, sondern stattdessen zur Ausbildung terminaler Verzweigungen befähigt sein.

Die *Ephrin-A5*-Defizienz führt im primären somatosensorischen corticalen Areal (S1) zu weiteren Veränderungen, die vor kurzem von VANDERHAEGHEN *et al.* (2000) beschrieben wurden. Dabei konnte festgestellt werden, daß sowohl die Ausdehnung der hier lokalisierten Columnen als auch ihr Abstand zueinander, graduell, entlang der medio-lateralen Achse dieses Areals „verschoben“ sind. Dies ist offensichtlich eine Folge des Verlustes, der entlang der gleichen Achse verlaufenden, graduellen *Ephrin-A5*-Expression in diesem Areal, welche diese Parameter reguliert.

Im thalamocorticalen Projektionssystem konnte darüberhinaus ein Zielfindungsdefekt für limbische thalamische Axone, die von Neuronen des medialen Thalamus ausgehen, festgestellt werden. Diese meiden im Wildtyp das somatosensorische corticale Areal (vermutlich weil sie EphA5 exprimieren) wachsen aber bei den *Ephrin-A5*-Mutanten in dieses ein, was darauf hinweist, daß *Ephrin-A5* für diese Fasern ein repulsives Signal darstellt. Dieses

Resultat steht in Übereinstimmung mit der von GAO *et al.* (1998/a), anhand von *in vitro*-Experimenten, entwickelten Vorstellung Ephrin-A5 würde arealspezifische Informationen an einwachsende thalamische Axone vermitteln. Diese Ergebnisse weisen auf eine duale Funktion von Ephrin-A5 im System thalamocorticaler Projektionen hin. Einerseits wachstumsstimulierend auf terminale Verzweigungen thalamischer Axone und andererseits repulsiv wirkend auf Fasern limbischer thalamischer Neurone.

4.4.7 Analyse der Veränderungen des Cerebellums

Das Cerebellum der Säuger, eine Struktur des Metencephalons, unterteilt sich in einen stark gefalteten Cortex, der hauptsächlich der neuronalen Prozessierung dient und den zentral gelegenen Nuclei, die als Ausgangskanäle der prozessierten Information dienen (Übersicht bei ALTMAN und BAYER, 1997; VOOGD und GLICKSTEIN, 1998). Die Hauptfalten des Cerebellums sind die durch Sulci getrennten zehn Lobuli (I-X). Während der Entwicklung des Cerebellums kann *Ephrin-A5*-Expression im Wesentlichen in zwei Domänen detektiert werden, den Purkinje-Zellen, die das Stratum ganglionare bilden und im Nucleus dentatus.

Die Analyse der homozygot mutanten *Ephrin-A5*^{neo/neo}-Mäuse zeigt, bei voller Penetranz, einen Faltungsdefekt des Cerebellums. Der Lobulus X, der sog. Paraflocculus ist verkleinert und abnorm gefaltet, was zu einer horizontaleren Ausrichtung führt. Die zelluläre Architektur scheint bei den Mutanten nicht betroffen zu sein, da die histologische Analyse das Vorhandensein aller Zelltypen in normaler Verteilung zeigt (s. Abb 3.36). Die Ursache dieses Defektes könnte verschiedene Gründe haben, die im Folgenden diskutiert werden sollen.

Zur Zeit sind drei Mutationen bekannt die spezifisch zu Faltungsdefekten des Cerebellums führen. Die bislang molekular nicht klonierten Mutationen *Cerebellar folial pattern-1* (*Cfp-1*) (NEUMANN *et al.*, 1990) und *declival sulcus of cerebellum* (*dsc*) (WAHLSTEN und ANDISON, 1991) führen zur abnormen Bildung einzelner Sulci. Die Inaktivierung des *En2*-Gens führt neben einer allgemeinen Verkleinerung des Cerebellums auch zu einer Vielzahl von Faltungsdefekten, die in erster Linie die Vermis und die weiter posterior gelegenen Lobuli betreffen (JOYNER *et al.*, 1991; MILLEN *et al.*, 1994; KUEMERLE *et al.*, 1997). Allerdings sind im Vergleich zu diesen Defekten die Veränderungen bei den Ephrin-A5-Mutanten deutlich subtiler.

NEUMANN *et al.* (1990) haben, aufgrund der Analyse der *Cfp-1*-Mutanten, die Hypothese aufgestellt, die normale Faltung des Cerebellums sei an die Bildung einer normalen Purkinje-Zellschicht gebunden. Die Möglichkeit, daß die Purkinje-Zell-spezifische *Ephrin-A5*-Expression für die Spezifizierung oder Migration dieses Zelltypus verantwortlich ist könnte bestehen. Da die Purkinje-Zellen jedoch in allen cerebellären Lobuli verteilt sind, die abnorme Faltung jedoch nur die Lobuli IX und X betrifft erscheint das Fehlen des Ephrin-A5-Signals für diesen Zelltypus als einzige mechanistische Erklärung des Phänotyps als simplifizierend. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß die ungestörte Ausdifferenzierung des Paraflocculus an die unmittelbare Interaktion der Purkinje-Zellen in diesem Bereich mit einem Rezeptor gebunden ist, der wiederum selektiv nur in diesem Lobulus exprimiert wird. In der Tat konnten ROGERS *et al.* (1999) zeigen, daß Eph-Rezeptoren und Ephrine, die frühest bekannten Moleküle sind, die Lobuli-spezifisch exprimiert werden. So werden EphA-Rezeptoren bereits prenatal im Lobulus

VI und/oder VII exprimiert und EphB-Rezeptoren in den Lobuli VII, VIII und IX. Ephrin-A-Liganden werden im Lobulus VIII, während Ephrin-B-Liganden erst postnatal in nicht Lobuli-spezifischer Weise exprimiert werden. Demnach könnten die Eph-Rezeptoren und ihre Liganden bei der Spezifizierung lobulärer Identität eine Rolle spielen. Interessanterweise zeigen die Ephrin-A-Liganden früh postnatal, wie über Färbungen mit einem EphA7-AP-Fusionsprotein nachgewiesen wurde, einen Expressionsverlauf der auch die Flocculi und Paraflocculi mit einschließt. Es ist jedoch noch unklar welche Ephrine zu diesem früh postnatalen Zeitpunkt exprimiert werden. Sollte es sich dabei um Ephrin-A5 handeln, wäre die Hypothese bei den Eph-Rezeptoren und Ephrinen handelt es sich um Moleküle, die Musterbildung und lobuläre Spezifizierung des Cerebellums regulieren stark gestützt.

4.5 Regulation des *Ephrin-A5*-Gens

Die Expressionsanalyse des *Ephrin-A5*-Gens zeigt deutlich, daß es sich dabei um ein räumlich und zeitlich hochkomplex reguliertes Gen handelt. In dieser Arbeit wurde auf verschiedenem Wege versucht, die Regulation von *Ephrin-A5* aufzuschlüsseln. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden nachfolgend diskutiert.

4.5.1 Analyse des *Ephrin-A5*-Promotors

Für das Verständnis der Regulation eines Gens ist die Charakterisierung seiner regulatorischen Elemente von essentieller Bedeutung. Derartige regulatorische Elemente, die den Promotor bilden finden sich in erster Linie im 5'-Bereich vor dem Transkriptionsstart. Für das *Ephrin-A5*-Gen wurden ca. 5,5 kbp an genomischer Sequenz stromaufwärts des Transkriptionsstarts ermittelt und mit dieser Sequenz eine Computeranalyse im Hinblick auf potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren durchgeführt. Diese Analyse ergab neben Elementen eines basalen Promotors auch eine Vielzahl potentieller Bindungsstellen für entwicklungsregulierte Transkriptionsfaktoren wie Pbx-1, NGFI-C, Hoxa13 und Pax-1/9 (s. Abb. 3.37).

Die basalen Promotor-Elemente beinhalten eine GC-Box bei -36 sowie zwei CAAT-Boxen bei -214 und -245. Die vorhandene GC-Box und das Fehlen einer TATA-Box stellen eine Abweichung zur Mehrheit der entwicklungsregulierten Gene, die sich im allgemeinen durch die umgekehrte Konstellation auszeichnen, dar. Die GC-Box (SP1-Erkennungssequenz) konnte bei einer Vielzahl eukaryotischer Gene als basales Promotor-Element identifiziert werden ist allerdings charakteristisch für konstitutiv exprimierte Gene (*housekeeping genes*) (DYNAN und DJIAN, 1983; Übersicht bei MCKNIGHT und TJIAN, 1986; VOET und VOET, 1995). Genen ohne TATA-Box ist zumeist eine Transkriptions-Initiations-Erkennungssequenz gemein (Inr), die die RNA-Polymerase II an die korrekte Start-Stelle dirigiert (Übersicht bei VOET und VOET, 1995; BROWN, 1999; KNIPPERS 1999; LEWIN, 1999). Dieses Element (Py₂CAPy₅) findet sich auch bei *Ephrin-A5*, weicht allerdings vom wenig konservierten Konsensus in den Positionen +3 und +5 durch die Purinbase G ab (s. Abb. 3.41).

Um zu überprüfen, ob der charakterisierte Bereich Elemente enthält, die für das räumliche Expressionmuster von *Ephrin-A5* verantwortlich sind, wurden transgene Linien untersucht in denen das Reportergen *lacZ* unter Kontrolle dieses Bereiches exprimiert wird. In den untersuchten Linien konnte keine Rekapitulation des endogenen *Ephrin-A5*-Expressionsmusters erreicht werden. Hierfür kommen verschiedene Ursachen in Frage. Zum einen könnte in diesem Bereich ausschließlich der basale Promotor für die transkriptionelle Aktivierung lokalisiert sein, während sich Elemente der räumlichen Expression in anderen Bereichen des mindestens 60 kbp-großen *Ephrin-A5*-Gens finden. In der Tat gibt es Hinweise darauf, daß für die Expression wichtige Elemente weiter im 3'-Bereich lokalisiert sind. In der Linie *Ephrin-A5^{lacZ}* kann das zeitlich-räumliche Muster der *Ephrin-A5*-Expression erst ab E 16,5 durch die *lacZ*-Expression reproduziert werden. In früheren Stadien wird das *lacZ*-Gen nicht aktiviert. Dies könnte auf die Deletion von ca. 400 bp des zweiten Introns zurückzuführen sein, die sich nach der Integration des Vektors ereignet. In diesen 400 bp könnten sich somit regulatorische Elemente der zeitlich-räumlichen Expressionskontrolle finden.

Von den abgeleiteten Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren erscheinen die Erkennungssequenzen von NGFI-C (*nerve growth factor induced clone C*) als besonders interessant. Diese zeigen gegenüber einer Zufallsverteilung eine 45fache Überrepräsentierung, die höchste im analysierten Sequenz-Abschnitt. Zum anderen sind Modelle vorstellbar, die sie in die genetische Regulation neuronaler Konnektivität einbinden. Bei NGFI-C handelt es sich um einen neuronal exprimierten Transkriptionsfaktor, dessen DNA-bindende Domäne aus sog. Zinkfingern besteht (CROSBY *et al.*, 1991; CROSBY *et al.*, 1992; MACK *et al.*, 1995). *NGFI-C*-Expression wird innerhalb von Minuten nach Applikation von Nervenwachstumsfaktor (NGF) auf PC12-Zellen induziert und zählt damit zu den sog. *early response genes* (CROSBY *et al.*, 1991). Sollte NGFI-C ein positiver Regulator der *Ephrin-A5*-Expression sein, so könnten seine Bindungsstellen nahe dem Transkriptionsstart in Zusammenhang mit der Regulation der gerichteten Zielfindung auswachsender Axone stehen. Reagieren Neurone auf das Vorhandensein von NGF können sie zu einem verstärkten Auswachsen ihrer Axone angeregt werden, was wiederum über Erhöhung der intrazellulären NGFI-C-Konzentration zur verstärkten Produktion von *Ephrin-A5* führt. Die repulsive Wirkung die *Ephrin-A5* nach der Bindung an EphA-Rezeptoren vermittelt, könnte diesem axonalen Wachstum die notwendige regulierende Komponente hinzufügen, mit der das Einwachsen in unzulässige Territorien verhindert wird.

Da Mäuse mit einer Null-Mutation im *Pax1*- sowie *Pax9*-Gen zur Verfügung standen, konnte die biologische Signifikanz der ermittelten Bindungsstellen durch Expressionsanalyse von *Ephrin-A5* in diesen Tieren *in vivo* getestet werden. Hierzu wurden *in situ*-Hybridisierungen an Ganzkörperpräparaten von Embryonen durchgeführt, um zu überprüfen, ob der Expressionsverlauf von *Ephrin-A5* gestört ist. Hier sind insbesondere die Territorien von Interesse, in denen *Pax1/9* und *Ephrin-A5* eine teilweise überlappende Expression, wie in facalen Strukturen oder den Extremitätenknospen, zeigen (NEUBÜSER *et al.*, 1995; PETERS *et al.*, 1998). Es konnten weder bei *Pax1*- oder *Pax9*-Mutanten noch bei *Pax1/9*-Doppelmutanten Unterschiede zur normalen Expression von *Ephrin-A5* festgestellt werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die ermittelten Bindungsstellen *in vivo* nicht benutzt werden. Ebenso denkbar wäre eine Kompensierung durch andere Pax-Faktoren in den *Pax1/9*-

Mutanten. Eine weitere Erklärung für den Befund könnte sein, daß *Ephrin-A5* und *Pax1/9* nur in ganz bestimmten Zellen oder Stadien koexprimiert werden, die hier nicht erfaßt wurden. Eine andere Möglichkeit die Computervorhersage *in vivo* zu testen, wären Experimente, die auf der ektopischen oder Überexpression (*gain of function*) von *Pax1/9* basieren, um festzustellen, ob dadurch auch eine Aktivierung der *Ephrin-A5*-Expression erfolgt.

Zwei weitere Transkriptionsfaktoren, die durch die Computeranalyse nicht erfaßt wurden, sind mit der Regulation der *Ephrin-A5*-Expression in Verbindung gebracht worden. *Otx2* und *Gbx2* werden während der Embryonalentwicklung im Neuroepithelium in Domänen exprimiert, die exakt vom Isthmus begrenzt werden. Für *Otx2* stellt der Isthmus die posteriore Expressionsgrenze dar, während er für *Gbx2* die Expression anterior begrenzt. Somit überlappen sich die Expressionsdomänen von *Otx2* und *Gbx2* nicht (MILLET *et al.*, 1996; MILLET *et al.*, 1999; Übersicht bei BALLY-CUIF und BONCINELLI, 1997; WASSEF und JOYNER, 1997). Der Vergleich der Expression dieser Faktoren mit der Expression von *Ephrin-A5*, die posterior ebenfalls vom Isthmus begrenzt wird (s. Abb. 3.10), legt die Vermutung nahe, daß sie an der Expressionsregulation von *Ephrin-A5* mitwirken: *Otx2* als positiver Regulator und *Gbx2* als negativer Regulator. In der Tat konnten Expressionsstudien, die an transgenen Tiermodellen durchgeführt wurden diese Annahme stützen. In *Gbx2*-defizienten Mäusen kommt es sowohl zu einem Verlust an posterior des Isthmus gelegenen Strukturen, wie dem Cerebellum, als auch zu einer Verschiebung des *Ephrin-A5*-Expression in weiter posterior gelegene Bereiche (WASSARMAN *et al.*, 1997). In Maus-Mutanten, in denen *Otx2* ektopisch in der *En1*-Domäne des Metencephalons exprimiert wird, führt dies auch zu einer ektopischen Expression von *Ephrin-A5* (BROCCOLI *et al.*, 1999). Ob diese ektopische Expression von *Ephrin-A5* einer direkten transkriptionellen Aktivierung durch *Otx2* unterliegt konnte bislang nicht geklärt werden, da die Kontrollelemente, die für die gewebsspezifische Expression von *Ephrin-A5* in dieser Region verantwortlich sind, nicht lokalisiert sind.

Da in der zur Verfügung stehenden TRANSFAC-Datenbank-Version (4.0) keine DNA-Bindungssequenzen für die Faktoren *En1* und *En2* (*engrailed*) spezifiziert sind, war eine comutergestützte Analyse der *Ephrin-A5*-Sequenz hier nicht möglich. Wie im folgenden Abschnitt diskutiert wird handelt es sich allerdings bei den *En*-Faktoren um besonders interessante Kandidaten der Expressionsregulation von *Ephrin-A5* (und *-A2*). Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer kooperativen Bindung von *En* mit *Pbx1*. Bei *Pbx1* handelt es sich um einem Transkriptionsfaktor mit 35fach überrepräsentierten putativen Bindungsstellen im analysierten Sequenzabschnitt, der mit der sog. EH2-Domäne der *En*-Faktoren interagiert (VAN DIJK *et al.*, 1995; PELTENBURG und MURRE, 1996). Um die Regulation von *Ephrin-A5/A2* durch *En* *in vivo* zu überprüfen wurde ihre Expression in *En*-defizienten Mäusen überprüft.

4.5.2 Expression von Ephrin-A-Liganden in *En1*-Mutanten

Die Gene *En1* und *En2*, Homologe der *Drosophila*-Segmentpolaritätsgene *engrailed* und *invected*, sind während der Entwicklung in der mes- metencephalischen Region exprimiert und kodieren für Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren (DAVIS und JOYNER, 1988). Geninaktivierungsstudien konnten zeigen, daß ihre Expression während der Entwicklung des

Wirbeltiergehirns notwendig für seine Musterbildung ist (JOYNER *et al.*, 1991; WURST *et al.*, 1994). Zusätzlich deutet die im Mesencephalon graduell von anterior nach posterior abnehmende Expression der *En*-Faktoren eine Rolle bei seiner Spezifizierung und Differenzierung entlang dieser Achse hin. Infolgedessen wurden sie auch mit der Entwicklung der retinotektalen Topographie in Verbindung gebracht, die ursprünglich durch Transplantations-Experimente an Huhn-Embryonen studiert wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen, daß die Transplantation stark *En*-exprimierendes Gewebes aus dem Isthmus in das Diencephalon zwar nicht zu einem Verlust der *En*-Expression führt, sich allerdings der Expressionsgradient umkehrt (ITASAKI *et al.*, 1991; MARTINEZ *et al.*, 1991). Transplantationen, die bewirken, daß ein Tectum ausschließlich anteriore bzw. posteriore Identität erhält, führen zu einer aberranten Topographie retinotektaler Projektionen (ITASAKI *et al.*, 1991; ITASAKI und NAKAMURA, 1992). Die ektopische Expression von *En1* bzw. *En2* im optischen Tectum des Huhnembryos, mittels retroviraler Vektoren, bewirkt eine Störung der geordneten Topographie, da nasale bzw. temporale RGZ-Axone die Region erhöhter *En*-Expression meiden (ITASAKI und NAKAMURA, 1996). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß die ektopische Expression der *En*-Transkriptionsfaktoren, evtl. über direkte transkriptionale Kontrolle die ektopische Expression der Liganden Ephrin-A2 und -A5 im Tectum aktiviert (LOGAN *et al.*, 1996; FRIEDMAN und O'LEARY, 1996; SHIGETANI *et al.*, 1997). Deren graduiert repulsive Eigenschaften auf retinale Fasern wirken wiederum regulierend auf die Etablierung der retinotektalen Karte, womit sich der molekulare Zusammenhang zwischen der *En*-Expression und der Retinotopie erklären ließe (Übersicht bei RÉTAUX und HARRIS, 1996). Diese Hypothese wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit einer Überprüfung unterzogen, deren Ergebnisse hier diskutiert werden sollen.

Streifen-Assays, die mit Fasern normaler Retinae und collicularen Membranpräparationen aus *En1*- und *En2*-Mutanten durchgeführt wurden konnten zeigen, daß temporale Fasern nicht zwischen anterioren und posterioren Membranpräparationen des Colliculus superior von *En1*-Mutanten unterscheiden. Hingegen bleibt das Unterscheidungsvermögen in den Membranpräparationen der *En2*-Mutanten erhalten (persönliche Mitteilung Dr. Andrea Wizenmann, Universität Regensburg). Dieser Befund hat zum Entschluß geführt, die Expression der Ephrine A2 und A5 in den *En1*-Mutanten zu überprüfen, da in den *En2*-Mutanten, aufgrund der Befunde der Streifen-Assays, davon ausgegangen werden kann, daß keine Veränderungen auftreten. Da zwischen den *En*-Genen eine funktionelle Redundanz besteht, wäre das ideale Modellsystem zur *in vivo*-Untersuchung ihres Einflusses auf die Expression der Ephrine *En1/2*-Doppelmutanten (HANKS *et al.*, 1995). Derartige Expressionsstudien sind bei den Doppelmutanten allerdings nicht möglich, da hier u.a. eine Deletion des gesamten dorsalen Mittelhirns auftritt (persönliche Mitteilung Dr. Veronique Blanquet).

In *En1*-defizienten Mäusen kann in allen überprüften Stadien Expression von *Ephrin-A2* und *Ephrin-A5* im Colliculus superior gesehen werden. Neben der mRNA kann auch das reife Protein über Rezeptor-Bindungsassay detektiert werden. Die *En1*-Mutation führt im allgemeinen zu perinatalem Tod, so daß ältere Stadien als P 0 nicht überprüft werden konnten. Die Expressionsdomänen sind für *Ephrin-A2* und *Ephrin-A5* allerdings in unterschiedlichem Ausmaß betroffen. *Ephrin-A5* wird zum Zeitpunkt der Geburt sowohl im Colliculus superior als

auch im Colliculus inferior exprimiert, während *Ephrin-A2* nur im Colliculus superior exprimiert wird. Bedingt durch die Deletion mesencephalischen Gewebes ist folglich *Ephrin-A5* stärker betroffen als *Ephrin-A2*, daß sich von der Expression im Wildtyp kaum unterscheidet. Zusätzlich erscheint die *Ephrin-A5*-Expressionsdomäne im posterioren Colliculus superior, wohl aufgrund einer tiefgreifenden strukturellen Veränderung in dieser Region, disorganisiert und unregelmäßig. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigen, daß die Expression von *Ephrin-A2* und *Ephrin-A5* nicht notwendigerweise an die Aktivierung durch den En1-Transkriptionsfaktor gebunden ist. Die En1-Funktion könnte durch das Vorhandensein von En2 kompensiert werden, das die En1-Funktion *in vivo* übernehmen kann (HANKS *et al.*, 1995).

4.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit untersuchten Veränderungen bei *Ephrin-A5*-defizienten Mäusen konzentrierten in erster Linie auf anatomische Parameter. Andere mögliche Folgen der *Ephrin-A5*-Defizienz, die z.B. neuronale Integration und Verhalten betreffen wurden bislang nicht studiert. Es ist vorstellbar, daß z.B. die Veränderungen im Cerebellum zu einem gestörten Gleichgewichts-Empfinden bei diesen Tieren führen. Daß die Beobachtung der Tiere keine offensichtlichen Störungen zeigt, kann einen subtilen Effekt nicht ausschließen. Die verminderte Innervierungsdichte durch thalamische Afferenzen im somatosensorischen corticalen Areal könnte zu einer Veränderung des Tastempfindens führen. In jüngster Zeit wurde *Ephrin-A5* auch mit Vorgängen in Verbindung gebracht, die Verhaltens- und Lerndefizite bei den Mutanten bewirken könnten. Mehrere Eph-Rezeptoren sind in Pyramidenzellen des Hippocampus während der Entwicklung und insbesondere auch adult exprimiert, was den Verdacht nahe legt, sie könnten in Prozesse synaptischer Plastizität involviert sein. *Ephrin-A5* sowie andere Liganden sind ebenfalls in bestimmten Regionen des Hippocampus exprimiert, was eine Interaktion mit den Rezeptoren ermöglicht. So konnte gezeigt werden, daß die Perfusion des Hippocampus mit *Ephrin-A5* zu einer Erhöhung der normalen synaptischen Transmission führt, ein Vorgang der einer Langzeitpotenzierung ähnelt (GAO *et al.*, 1998/b). Bei der Langzeitpotenzierung handelt es sich um einen synaptischen Mechanismus von dem angenommen wird, er würde eine zelluläre Basis von Lernen und Erinnerung darstellen (Übersicht bei BLISS und COLLINGRIDGE, 1993). Die Untersuchung des Verhaltens bei Tieren, die mit einer derartigen hippocampalen *Ephrin-A5*-Perfusion behandelt wurden, zeigte in zwei verschiedenen Tests (*T-maze* und kontextabhängige Angst-Konditionierung) eine deutliche Verbesserung der Lernfähigkeit (GERLAI *et al.*, 1999). Zusätzlich konnten GERLAI und MCNAMARA (2000) kürzlich zeigen, daß eine retrograde Amnesie, wie sie nach einer Anästhesie induziert werden kann, durch eine hippocampale *Ephrin-A5*-Perfusion teilweise wieder aufgehoben werden kann. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Funktion von Eph-Rezeptoren und *Ephrin-A5* auf die Bildung von Erinnerung. Die *Ephrin-A5*-defizienten Mäuse könnten weitere Aufklärung in die Zusammenhänge zwischen synaptischer Plastizität und Eph-Rezeptor-*Ephrin*-Interaktion bringen.

5 Zusammenfassung

Ephrin-A5 ist ein membranständiges, GPI-verankertes 25 kDa-Glykoprotein, das einen Liganden der Eph-Subklasse von Tyrosin-Kinase-Rezeptoren darstellt. Ephrin-A5 ist in einem abnehmenden posterio-anterioren Gradienten im Tectum opticum exprimiert und zeigt in *in vitro*-Assays eine abstoßende Wirkung auf Axone von retinalen Ganglienzellen der temporalen Retina. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß die ektopische Expression von Ephrin-A5 im anterioren Tectum, zur aberranten Terminierung retinaler Fasern in diesem Bereich führt. Ephrin-A5 könnte somit an der Etablierung der retinotektalen Topographie beteiligt sein.

Um weitere mögliche Funktionen von Ephrin-A5 während der Entwicklung und im adulten Organismus näher bestimmen zu können, wurden zunächst detaillierte Expressionsstudien an Ganzkörperpräparaten und Schnitten von Embryonen sowie an Schnitten adulter Gehirne durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigen bislang nicht dokumentierte Domänen der *Ephrin-A5*-Expression, die mit verschiedenen Systemen neuronaler Konnektivität assoziiert werden können. Hervorzuheben sind dabei der cerebrale Cortex, wo *Ephrin-A5* sowohl areal- als auch schichtenspezifisch exprimiert wird, die Hypophyse und der Hypothalamus, wo distinkte Kerne *Ephrin-A5*-positiv sind sowie Strukturen des olfaktorischen Systems, wie das Riechepithel, das vomeronasale Organ und einzelne Schichten des Riechkolbens. Zusätzlich kann *Ephrin-A5* spätembryonal und postnatal im Cerebellum detektiert werden.

Des Weiteren wurden Studien zur Expressions-Regulation von *Ephrin-A5* durchgeführt. Hierzu wurden ca. 5,4 kbp an genomischer Sequenz stromaufwärts des Transkriptionsstarts ermittelt und einer Computeranalyse im Hinblick auf Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren unterzogen. Diese Analyse ergab, neben Elementen des basalen Promotors, Bindungsstellen für entwicklungs- und gewebsspezifisch regulierte Transkriptionsfaktoren wie NGFI-C, Hox13, Pbx1 und Pax1/9. Um die Funktion der identifizierten Elemente zu bestimmen wurden Konstrukte kloniert, in denen sie vor das bakterielle *lacZ*-Reportergen geschaltet wurden. Diese Konstrukte wurden über Vorkerninjektion in befruchtete Eizellen eingeschleust und die transgenen Embryonen im Hinblick auf die Expression des Reportergens durch X-Gal-Färbung untersucht. Diese Experimente zeigten eine Aktivierung der *lacZ*-Expression, allerdings ohne eine Rekapitulation der endogenen *Ephrin-A5*-Expression, was darauf schließen läßt, daß die Kontrollelemente für die gewebsspezifische *Ephrin-A5*-Expression nicht im 5,4 kbp proximal stromaufwärts gelegenen Bereich des *Ephrin-A5*-Gens liegen. Zusätzlich ist aus der Literatur bekannt, daß die ektopische Expression der En (*Engrailed*)-Transkriptionsfaktoren die Expression von *Ephrin-A5* induziert. Diese Regulation kann entweder direkt oder über die Interaktion mit Pbx1, für das Bindungsstellen identifiziert wurden, vermittelt werden. Aus diesem Grunde wurde die Regulation der *Ephrin-A5*-Expression in *En1*-defizienten Mäusen untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen eine Veränderung der *Ephrin-A5*-Expression im posterioren Colliculus superior, jedoch keinen vollständigen Verlust. Die Ursache für diesen Befund könnte in der Kompensation der En1-Funktion durch En2 liegen.

Die Ephrin-A5-Funktion *in vivo* zu studieren, wurde durch die gezielte Mutagenese des Ephrin-A5-kodierenden Gens über homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES)-Zellen der Maus ermöglicht. Hierzu wurden Klone genomischer Maus-DNA isoliert und diese über Restriktionskartierung und Sequenzierung charakterisiert. Die so gewonnene Information über die genomische Organisation des *Ephrin-A5*-Locus wurde dazu verwendet, „*gene targeting*“-Konstrukte zu seiner gezielten Mutagenese und damit Inaktivierung herzustellen. Mit diesen Mutagenisierungsvektoren gelang die homologe Rekombination in ES-Zellen und die Zellklone mit dem korrekten Rekombinationsereignis wurden zur Generierung von chimären Mäusen eingesetzt. Die erhaltenen Chimären transmittierten das mutierte Allel an ihre Nachkommen. Durch diese Versuche wurden zwei unabhängige Mutantenlinien etabliert.

Die phänotypische Analyse der homozygot mutanten Tiere zeigte erwartungsgemäß Veränderungen in *Ephrin-A5*-exprimierenden Geweben. So treten bei einem Teil der *Ephrin-A5*-Mutanten (14%) schwere Defekte in der Organisation des Neuralrohrs auf. Diese Defekte resultieren aus einer unzureichenden Schließung des anterioren Neuralrohrs (wo *Ephrin-A5* exprimiert wird), was letztlich zu Anencephalie und perinataler Letalität führt. Ausserdem konnten Faltungsdefekte des Cerebellums sowie Innervierungsdefekte des cerebralen Cortex durch thalamische Axone festgestellt werden. Die retinotektale Topographie *Ephrin-A5*-defizienter Mäuse wurde über retrograde Markierungsexperimente untersucht. Hier konnte für adulte Tiere keine Veränderung festgestellt werden, was auf eine Korrektur aberranter Verbindungen, die eventuell früh in der postnatalen Entwicklung auftreten, schließen läßt. Eine weitere Erklärung für dieses unerwartete Ergebnis wäre eine Kompensation durch das ähnlich exprimierte und wirkende Ephrin-A2. Die Analyse des thalamocorticalen Projektionssystems zeigte interessante Befunde in Bezug auf weitere Funktionen von Ephrin-A5 auf. Hier konnte festgestellt werden, daß thalamische Afferenzen eine Reduzierung ihrer Verzweigungen in ihrer Zielschicht, der corticalen Schicht IV, aufweisen, was erstmals zeigt, daß Ephrin-A5 auch als wachstumsstimulierender Faktor auf neuronale Fortsätze wirken kann.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß es sich bei *Ephrin-A5* um ein komplex reguliertes Gen handelt, welches in erster Linie neuronal exprimiert wird. In verschiedenen Systemen neuronaler Konnektivität und Musterbildung konnte eine funktionelle Beteiligung von Ephrin-A5 nachgewiesen werden. Insbesondere die Analyse des thalamocorticalen Systems zeigte erstmals eine Beteiligung von Ephrin-A5 in einen wachstumstimulierenden Prozeß auf. Axone thalamischer Neurone werden hier durch Ephrin-A5 zur Bildung von Verzweigungen angeregt.

6 Literaturverzeichnis

- AASHEIM H-C., PEDEUTOUR F., GROSGEORGE J., LOGTENBERG T.: Cloning, chromosomal mapping, and tissue expression of the gene encoding the human Eph-family kinase ligand ephrin-A2. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 252 (1998) 378-382.
- AASHEIM H-C., MUNTHE E., FUNDERUD S., SMELAND E. B., BEISKE K., LOGTENBERG T.: A splice variant of human ephrin-A4 encodes a soluble molecule that is secreted by activated human B lymphocytes. *Blood* 95 (2000) 221-230.
- ADAMS R. H., WILKINSON G. A., WEISS C., DIELLA F., GALE N. W., DEUTSCH U., RISAU W., KLEIN R.: Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev.* 13 (1999) 295-306.
- AGMON A., YANG L. T., O'DOWD D. K., JONES E. G.: Organized growth of thalamocortical axons from the deep tier of terminations into layer IV of developing mouse barrel cortex. *J. Neurosci.* 13 (1993) 5365-5382.
- ALLEN N. D., SKYNNER M. J., KATO H., PRATAP J. N.: Genetic control of brain development. In Molecular biology of the neuron. DAVIES R. W. und MORRIS B. J. editors. *BIOS Scientific Publishers Ltd.*, Oxford (1997).
- ALLEENDOERFER K. L., SHATZ C. J.: The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 17 (1994) 185-218.
- ALTMAN J., BAYER S. A.: Atlas of prenatal rat brain development. *CRC Press, Inc.*, Boca Raton, Florida (1995).
- ALTMAN J., BAYER S. A.: Development of the cerebellar system: in relation to its evolution, structure and functions. *CRC Press, Inc.*, Boca Raton, Florida (1997).
- ALVAREZ-BOLADO G., SWANSON L. W.: Developmental brain maps: structure of embryonic rat brain. *Elsevier Science B. V.*, Amsterdam (1996).
- ARAUJO M., NIETO M. A.: The expression of chick *EphA7* during segmentation of the central and peripheral nervous system. *Mech. Dev.* 68 (1997) 173-177.
- ARAUJO M., PIEDRA M. E., HERRERA M. T., ROS M. A., NIETO M. A.: The expression and regulation of chick *EphA7* suggests roles in limb patterning and innervation. *Development* 125 (1998) 4195-4204.
- AUERBACH R.: Analysis of the developmental effects of the lethal mutation in the house mouse. *J. Exp. Zool.* 127 (1954) 305-329.
- BAIER H., KLOSTERMANN S., TROWE T., KARLSTROM R. O., NÜSSLIN-VOLHARD C., BONHOEFFER F.: Genetic dissection of the retinotectal projection. *Development* 123 (1996) 415-425.
- BALLING R.: Transgenic technology as a tool. In embryos, genes and birth defects. THOROGOOD P. (ed.). *John Wiley & Sons Ltd.* (1997).
- BALLY-CUIF L., BONCINELLI E.: Transcription factors and head formation in vertebrates. *BioEssays* 19 (1997) 127-135.
- BARTLEY T. D., HUNT R. W., WELCHER A. A., BOYLE W. J., PARKER V. P., LINDBERG R. A., LU H. S., COLOMBERO A. M., ELLIOT R. L., GUTHRIE B. A., HOLST P. L., SKRINE J. D., TOSO R. J., ZHANG M., FERNANDEZ E., TRAIL G., VARNUM B., YARDEN Y., HUNTER T. Y., FOX G. M.: B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine-kinase. *Nature* 368 (1994) 558-560.
- BEDDINGTON R. S. P., ROBERTSON E. J.: Anterior patterning in the mouse. *Trends Genet.* 14 (1998) 277-284.
- BEDDINGTON R. S. P., ROBERTSON E. J.: Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* 96 (1999) 195-209.
- BELLUSCIO L., KOENTGES G., AXEL R., DULAC C.: A map of pheromone receptor activation in the mammalian brain. *Cell* 97 (1999) 209-220.
- BENOWITZ L. I., ROUTTENBERG A.: GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci.* 20 (1997) 84-91.
- BENTON W. D., DAVIS R. W.: Screening of recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* 196 (1977) 180-186.

- BIRGBAUER E., COWAN C. A., SRETAVAN D. W., HENKEMEYER M.: Kinase independent function of EphB receptors in retinal axon pathfinding to the optic disc from dorsal but not ventral retina. *Development* 127 (2000) 1231-1241.
- BIRNBOIM H. C., DOLY J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7 (1979) 1513-1523.
- BLISS T. V. P., COLLINGRIDGE G. L.: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361 (1993) 34-39.
- BONCINELLI E.: Early CNS development: Distal-less related genes and forebrain development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4 (1994) 29-36.
- BOYD A. W., WARD L. D., WICKS I. P., SIMPSON R. J., SALVARIS E., WILKS A., WELCH K., LOUDOVARIS M., ROCKMAN S., BUSMANIS I.: Isolation and characterisation of a novel receptor-type protein tyrosine kinase (hek) from a human pre-B cell line. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 3262-3267.
- BRAISTED J. E., MCLAUGHLIN T., WANG H. U., FRIEDMAN G. C., ANDERSON D. J., O'LEARY D. D. M.: Graded and Lamina-specific distributions of ligands of EphB receptor tyrosine kinases in the developing retinotectal system. *Dev. Biol.* 191 (1997) 14-28.
- BRADLEY A., HASTY P., DAVIS A., RAMIREZ-SOLIS R.: Modifying the mouse: design and desire. *Biotechnology* 10 (1992) 534-539.
- BRAND M., WURST W.: Regionale Determination der Neuralplatte der Wirbeltiere: Entstehung und Organisation der Mittel-Hinterhirn-Region. *Neuroforum* 1 (1997) 8-14.
- BRENNAN C., MONSCHAU B., LINDBERG R., GUTHRIE B., DRESCHER U., BONHOEFFER F., HOLDER N.: Two Eph receptor tyrosine kinase ligands control axon growth and may be involved in the creation of the retinotectal map in the zebrafish. *Development* 124 (1997) 655-664.
- BRINSTER R. L., CHEN H. Y., TRUMBAUER M., SENEAR A. W., WARREN R., PALMITTER R. D.: Somatic expression of herpes thymidine kinase gene in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* 27 (1981) 223-231.
- BRITTIS P. A., SILVER J., WALSH F. S., DOHERTY P.: Fibroblast growth factor receptor function is required for the orderly projection of ganglion cell axons in the developing mammalian retina. *Mol. Cell. Neurosci.* 8 (1996) 120-128.
- BROCCOLI V., BONCINELLI E., WURST W.: The caudal limit of *Otx2* expression positions the isthmus organizer. *Nature* 401 (1999) 164-168.
- BROWN T. A.: Genomes. *BIOS Scientific Publications Ltd.*, Oxford (1999).
- BRÜCKNER K., PASQUALE E. B., KLEIN R.: Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* 275 (1997) 1640-1643.
- BRÜCKNER K., KLEIN R.: Signalling by Eph receptors and their ephrin ligands. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8 (1998) 375-382.
- BRÜCKNER K., LABRADOR J. P., SCHEIFFELE P., HERB A., SEEBURG P. H., KLEIN R.: EphrinB ligands recruit GRIP family PDZ adaptor proteins into raft membrane microdomains. *Neuron* 22 (1999) 511-524.
- BUCHERT M., SCHNEIDER S., MESKENAITE V., ADAMS M. T., CANAANI E., BAECHI T., MOELLING K., HOVENS C. M.: The junction-associated protein AF-6 interacts and clusters with specific Eph receptor tyrosine kinases at specialized sites of cell-cell contact in the brain. *J. Cell Biol.* 144 (1999) 361-371.
- CAPECCHI M. R.: Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244 (1989) 1288-1292.
- CARAS I. W.: A link between axon guidance and axon fasciculation suggested by studies of the tyrosine kinase receptor EphA5/Rek7 and its ligand Ephrin-A5/AL-1. *Cell Tissue Res.* 290 (1997) 261-264.
- CASTELLANI V., YONG Y., GAO P.-P., ZHOU R., BOLZ J.: Dual action of a ligand for Eph receptor tyrosine kinases on specific populations of axons during the development of cortical circuits. *J. Neurosci.* 18 (1998) 4663-4672.
- CERRETTI D. P., LYMAN S. D., KOZLOSKY C. J., COPELAND N. G., GILBERT D. J., JENKINS N. A., VALENTINE V., KIRSTEIN M. N., SHAPIRO D. N., MORRIS S. W.: The genes encoding the Eph-related receptor tyrosine kinase ligands LERK-1 (*EPLG1*, *Epl1*), LERK-3 (*EPLG3*, *Epl3*), and LERK-4 (*LERK4*, *Epl4*) are clustered on human chromosome 1 and mouse chromosome 3. *Genomics* 33 (1996/a) 277-282.
- CERRETTI D. P., COPELAND N. G., GILBERT D. J., JENKINS N. A., KUEFER M. A., VALENTINE V., SHAPIRO D. N., CUI X., MORRIS S. W.: The gene encoding LERK-7 (*EPLG7*, *Epl7*), a ligand for the Eph-related receptor tyrosine

- kinases, maps to human chromosome 5 at band q21 and to mouse chromosome 17. *Genomics* 35 (1996/b) 376-379.
- CERRETTI D. P., NELSON N.: Characterization of the genes for mouse LERK-3/Ephrin-A3 (*Epl3*), mouse LERK-4/Ephrin-A4 (*Epl4*), and human LERK-6 Ephrin-A2 (*EPLG6*): Conservation of intron/exon structure. *Genomics* 47 (1998) 131-135.
- CHALEPAKIS G., STOYKOVA A., WIJNHOLDS J., TREMBLAY P., GRUSS P.: Pax: gene regulators in the developing nervous system. *J. Neurobiol.* 24 (1993) 1367-1384.
- CHEN J., RULEY H. E.: An enhancer element in the *EphA2* (*Eck*) gene sufficient for rhombomere-specific expression is activated by HOXA1 and HOXB1 homeobox proteins. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 24670-24675.
- CHENG H.-J., FLANAGAN J. G.: Identification and cloning of ELF-1 a developmentally expressed ligand for the Mek4 and Sek receptor tyrosine kinases. *Cell* 79 (1994) 157-168.
- CHENG H.-J., NAKAMOTO M., BERGEMANN A. D., FLANAGAN J. G.: Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* 82 (1995) 371-381.
- CHIEN C.-B., HARRIS W. A.: Axonal guidance from retina to tectum in embryonic *Xenopus*. *Curr. Top. Devel. Biol.* 29 (1994) 135-169.
- CHOMCZYNSKY P., SACCHI N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156-159.
- CHOU P. Y., FASMAN G. D.: Empirical Predictions of Protein Structure. *Annu. Rev. Biochem.* 47 (1978/a) 251-276.
- CHUNG C. T., NIEMELA S. L., MILLER R. H.: One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 2172-2175.
- CIOSEK T., MONSCHAU B., KREMOSER C., LÖSCHINGER J., LANG S., MÜLLER B. K., BONHOEFFER F., DRESCHER U.: Eph receptor-ligand interactions are necessary for guidance of retinal ganglion cell axons *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.* 10 (1998) 1574-1580.
- COLAMARINO S. A., TESSIER-LAVIGNE M.: The role of the floor plate in axon guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 18 (1995) 497-529.
- CONNOR R. J., MENZEL P., PASQUALE E. B.: Expression and tyrosine phosphorylation of Eph receptors suggest multiple mechanisms in patterning of the visual system. *Devel. Biol.* 193 (1998) 21-35.
- CONSTANTINE-PATON M., BLUM A. S., MENDEZ-OTERO R., BARNSTABLE C. J.: A cell surface molecule distributed in a dorsoventral gradient in the perinatal rat retina. *Nature* 324 (1986) 459-462.
- COPP A. J., BROOK F. A., ESTIBEIRO J. P., SHUM A. S. W., COCKROFT D. L.: The embryonic development of mammalian neural tube defects. *Progr. Neurobiol.* 35 (1990) 363-403.
- CORCORAN J.: What are the molecular mechanisms of neural tube defects? *Bioessays* 20 (1998) 6-8.
- COX E. C., MÜLLER B., BONHOEFFER F.: Axonal guidance in the chick visual system: posterior tectal membranes induce collapse of growth cones from the temporal retina. *Neuron* 2 (1990) 31-37.
- CRAMER K. S., SUR M.: Activity-dependent remodeling of connections in the mammalian visual system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5 (1995) 106-111.
- CROSBY S. D., PUETZ J. J., SIMBURGER K. S., FAHRNER T. J., MILBRANDT J.: The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGCG (GSG) element-binding protein family. *Mol. Cell Biol.* 11 (1991) 3835-3841.
- CROSBY S. D., VEILE R. A., DONIS-KELLER H., BARABAN J. M., BHAT R. V., SIMBURGER K. S., MILBRANDT J.: Neural-specific expression, genomic structure, and chromosomal localization of the gene encoding the zinc-finger transcription factor NGFI-C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4739-4743.
- CROSS G. A. M.: Glykolipid anchoring of plasma membrane proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6 (1990) 1-39.
- DASTON M. M., KOESTER S. E.: Transcriptional regulation of axon pathfinding. *Neuron* 17 (1996) 5-8.
- DAVENPORT R. W., THIES E., ZHOU R., NELSON P. G.: Cellular localization of Ephrin-A2, Ephrin-A5, and other functional guidance cues underlies retinotopic development across species. *J. Neurosci.* 18 (1998) 975-986.
- DAVIS C. A., JOYNER A. L.: Expression patterns of the homeo box-containing genes *En-1* and *En-2* and the proto-oncogene *int-1* diverge during mouse development. *Genes Devel.* 2 (1988) 1736-1744.

- DAVIS S., GALE N. W., ALDRICH T. H., MAISONPIERRE P. C., LHOTAK V., PAWSON T., GOLDFARB M., YANCOPOULOS G. D.: Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases require membrane attachment or clustering for activity. *Science* 266 (1994) 816-819.
- DAVY A., GALE N. W., MURRAY E. W., KLINGHOFFER R. A., SORIANO P., FEUERSTEIN C., ROBBINS S. M.: Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Devel.* 13 (1999) 3125-3135.
- DENG C., CAPECCHI M. R.: Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol. Cell. Biol.* 12 (1992) 3365-3371.
- DOETSCHMAN T. C., EISTETTER H., KATZ M., SCHMIDT W., KEMLER R.: The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87 (1985) 27-45.
- DONOGHUE M. J., LEWIS R. M., MERLIE J. P., SANES J. R.: The Eph kinase ligand AL-1 is expressed by rostral muscles and inhibits outgrowth from caudal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 8 (1996) 185-198.
- DONOGHUE M. J., RAKIC P.: Molecular evidence for the early specification of presumptive functional domains in the embryonic primate cerebral cortex. *J. Neurosci.* 19 (1999) 5967-5979.
- DOTTORI M., HARTLEY L., GALEA M., PAXINOS G., POLIZOTTO M., KILPATRICK T., BARTLETT P. F., MURPHY M., KÖNTGEN F., BOYD A. W.: EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 13248-13253.
- DRESCHER U., KREMOSER C., HANDWERKER C., LÖSCHINGER J., NODA M., 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* 82 (1995) 359-370.
- DRESCHER U., BONHOEFFER F., MÜLLER B. K.: The Eph family in retinal axon guidance. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7 (1997) 75-80.
- DRESCHER U.: The Eph family in the patterning of neural development. *Curr. Biol.* 7 (1997) 799-807.
- DREWS U.: Taschenatlas der Embryologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart* (1993).
- DUNN J. J., STUDIER F. W.: Complete nucleotides sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J. Mol. Biol.* 166 (1983) 477-535.
- DURBIN L., BRENNAN C., SHIOMI K., COOKE J., BARRIOS A., SHANMUGALINGAM S., GUTHRIE B., LINDBERG R., HOLDER N.: Eph signaling is required for segmentation and differentiation of the somites. *Genes Dev.* 12 (1998) 3096-3109.
- DÜTTING D., HANDWERKER C., DRESCHER U.: Topographic targeting and pathfinding errors of retinal axons following overexpression of EphrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Devel. Biol.* 216 (1999) 359-370.
- DYNAN W. S., TJIAN R.: The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35 (1983) 79-87.
- ECKERT R., RANDALL D., AUGUSTINE G.: Tierphysiologie. 2. Auflage, *Georg Thieme Verlag, Stuttgart* (1993).
- EPH NOMENCLATURE COMITEE: Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the Ephrins. *Cell* 90 (1997) 403-404.
- ERICSON J., NORLIN S., JESSELL T., EDLUND T.: Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* 125 (1998) 1005-1015.
- EVANS M. J., KAUFMAN M. H.: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292 (1981) 154-156.
- FARBMAN A. I.: Cell biology of olfaction. *Cambridge University Press* (1992).
- FELDHEIM D. A., VANDERHAEGHEN P., HANSEN M. J., FRISEN J., LU Q., BARBACID M., FLANAGAN J. G.: Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain. *Neuron* 21 (1998) 1303-1313.
- FELDHEIM D. A., KIM Y.-I., BERGEMANN A. D., FRISEN J., BARBACID M., FLANAGAN J. G.: Genetic analysis of Ephrin-A2 and Ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron* 25 (2000) 563-574.

- FENG G., LASKOWSKI M. B., FELDHEIM D. A., WANG H., LEWIS R., FRISÉN J., FLANAGAN J. G., SANES J. R.: Roles for ephrins in positionally selective synaptogenesis between motor neurons and muscle fibers. *Neuron* 25 (2000) 295-306.
- FERGUSON M. A., WILLIAMS A. F.: Cell-surface anchoring of proteins via glykosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu. Rev. Biochem.* 57 (1988) 285-320.
- FICHANT G. A.: Constraints acting on the exon positions of the splice site sequences and local amino acid composition of the protein. *Hum. Mol. Genet.* 1 (1992) 259-267.
- FLANAGAN J. G., VANDERHAEGHEN P.: The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.* 21 (1998) 309-345.
- FLENNIKEN A. M., GALE N. W., YANCOPOULOS G. D., WILKINSON D. G.: Distinct and overlapping expression patterns of ligands for Eph-related receptor tyrosine kinases during mouse embryogenesis. *Dev. Biol.* 179 (1996) 382-401.
- FLETCHER F. A., RENSCHAW B., HOLLINGSWORTH T., BAUM P., LYMAN S. D., JENKINS N. A., GILBERT D. J., COPELAND N. G., DAVISON B. L.: Genomic organization and chromosomal localization of mouse *Eplg2*, a gene encoding a binding protein for the receptor tyrosine kinase *Elk*. *Genomics* 24 (1994) 127-132.
- Fox G. M., Host P. L., Chute H. T., LINDBERG R. A., JANSSEN A. M., BASU R., WELCHER A. A.: cDNA cloning and tissue distribution of five human EPH-like receptor protein-tyrosine kinases. *Oncogene* 10 (1995) 897-905.
- FRANKLIN K. B. J., PAXINOS G.: The mouse brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press, Inc.*, San Diego (1997).
- FRIEDMAN G. C., O'LEARY D. D. M.: Retroviral misexpression of *engrailed* genes in the chick optic tectum perturbs the topographic targeting of retinal axons. *J. Neurosci.* 16 (1996) 5498-5509.
- FIREDRICH G., SORIANO P.: Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev.* 5 (1991) 1513-1523.
- FRIEDRICHSON T., KURZCHALIA T. V.: Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* 394 (1998) 802-805.
- FRISÉN J., BARBACID M.: Genetic analysis of the role of Eph receptors in the development of the mammalian nervous system. *Cell Tissue Res.* 290 (1997) 209-215.
- FRISÉN J., YATES P. A., MCLAUGHLIN T., FRIEDMAN G. C., O'LEARY D. D. M., BARBACID M.: Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* 20 (1998) 235-243.
- FRISÉN J., HOLMBERG J., BARBACID M.: Ephrins and their Eph receptors: multitasking directors of embryonic development. *EMBO J.* 18 (1999) 5159-5165.
- FROHMAN M. A., DUSH M. K., MARTIN G. R.: Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 8998-9002.
- 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., YANCOPOULOS G. D.: Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* 17 (1996) 9-19.
- GALE N. W., YANCOPOULOS G. D.: Ephrins and their receptors: a repulsive topic? *Cell. Tissue Res.* 290 (1997) 227-241.
- GANJU P., SHIGEMOTO K., BRENNAN J., ENTWISTLE A., REITH A. D.: The Eck receptor tyrosine kinase is implicated in pattern formation during gastrulation, hindbrain segmentation and limb development. *Oncogene* 9 (1994) 1613-1624.
- GAO P.-P., YUE Y., ZHANG J.-H., CERRETTI D. P., LEVITT P., ZHOU R.: Regulation of thalamic neurite outgrowth by the Eph ligand ephrin-A5: Implications in the development of thalamocortical projections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998/a) 5329-5334.
- GAO W.-Q., SHINSKY N., ARMANINI M. P., MORAN P., ZHENG J. L., MENDOZA-RAMIREZ J.-L., PHILLIPS H. S., WINSLOW J. W., 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.* 11 (1998/b) 247-259.

- GEORGE S. E., SIMOKAT K., HARDIN J., CHISHOLM A.: The VAB-1 EPH receptor tyrosine kinase functions in neural and epithelial morphogenesis in *C. elegans*. *Cell* 92 (1999) 633-643.
- GERLAI R., SHINSKY N., SHIH A., WILLIAMS P., WINER J., ARMANINI M., CAIRNS B., WINSLOW J., GAO W.-Q., PHILLIPS H. S.: Regulation of learning by EphA receptors: a protein targeting study. *J. Neurosci.* 19 (1999) 9538-9549.
- GERLAI R., MCNAMARA A.: Anesthesia induced retrograde amnesia is ameliorated by ephrin-A5-IgG in mice: EphA receptor tyrosine kinases are involved in mammalian memory. *Behav. Brain Res.* 108 (2000) 133-143.
- GHATTAS I. R., SANES J. R., MAJORS J. E.: The encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site allows efficient coexpression of two genes from a recombinant provirus in cultured cells and in embryos. *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 5848-5859.
- GHOSH A., SHATZ C. J.: Pathfinding and target selection by developing geniculocortical axons. *J. Neurosci.* 12 (1992) 39-55.
- GILBERT S. F.: Developmental biology. *Sinauer Associates, Inc.*, 5th Edition, Sunderland Massachusetts (1997).
- GOODHILL G. J., RICHARDS L. J.: Retinotectal maps: molecules, models and misplaced data. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Trends Neurosci.* 22 (1999) 529-534.
- GOODMAN C. S., SCHATZ C. J.: Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell/Neuron* (Suppl.) 10 (1993) 77-98.
- GOODMAN C. S.: Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 19 (1996) 341-377.
- GOSSLER A., DOETSCHMAN T., KORN R., SERFLING E., KEMLER R.: Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 9065-9069.
- GREENE N. D., COPP A. J.: Inositol prevents folate-resistant neural tube defects in the mouse. *Nat. Med.* 3 (1997) 60-66.
- GÜNTHER T., STRUWE M., AGUZZI A., SCHUGHART K.: *open brain*, a new mouse mutant with severe neural tube defects, shows altered gene expression patterns in the developing spinal cord. *Development* 120 (1994) 3119-3130.
- HALPERN M.: The organization and function of the vomeronasal system. *Annu. Rev. Neurosci.* 10 (1987) 325-362.
- HANAHAH, D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 (1983) 557-560.
- HANAHAH, D.: Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: DNA cloning a practical approach. Glover, D. M (Hrsg.). *IRL Press, Oxford-Washington D. C.* (1985).
- HANKS M., WURST W., ANSON-CARTWRIGHT L., AUERBACH A. B., JOYNER A. L.: Rescue of the *En-1* mutant phenotype by replacement of *En-1* with *En-2*. *Science* 269 (1995) 679-682.
- HARRIS W. A., HOLT C. E.: From tags to RAGS: Chemoaffinity finally has receptors and ligands. *Neuron* 15 (1995) 241-244.
- HASTY P., RIVERA-PÉREZ J., BRADLEY A.: The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 5586-5591.
- HEINEMEYER T., CHEN X., KARAS H., KEL A. E., KEL O. V., LIEBICH I., MEINHARDT T., REUTER I., SCHACHERER F., WINGENDER E.: Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucl. Acids Res.* 27 (1999) 318-322.
- HELBLING P. M., SAULNIER D. M., BRANDLI A. W.: The receptor tyrosine kinase EphB4 and ephrin-B ligands restrict angiogenic growth of embryonic veins in *Xenopus laevis*. *Development* 127 (2000) 269-278.
- HENKEMEYER M., ORIOLI D., HENDERSON J. T., SAXTON T. M., RÖDER J., PAWSON T., KLEIN R.: Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell* 86 (1996) 35-46.
- Hildebrand J. D., Soriano P.: Shroom, a PDZ domain-containing actin-binding protein, is required for neural tube morphogenesis in mice. *Cell* 99 (1999) 485-497.
- HIRAI H., MARU Y., HAGIWARA K., NISHIDA J., TAKAKU F.: A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* 238 (1987) 1717-1720.
- HOCK B., BÖHME B., KARN T., YAMAMOTO T., KAIBUCHI K., HOLTRICH U., HOLLAND S., PAWSON T., RÜBSAMEN-WAIGMANN H., STREBHARDT K.: PDZ-domain-mediated interaction of the Eph-related receptor tyrosine kinase EphB3 and the ras-binding protein AF6 depends on the kinase activity of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 9779-9784.

- HOGAN B., BEDDINGTON R., CONSTANTINI F., LACY E.: Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York (1994).
- HOLASH J. A., PASQUALE E. B.: Polarized expression of the receptor protein tyrosine kinase Cek5 in the developing avian visual system. *Devel. Biol.* 172 (1995) 683-693.
- HOLASH J. A., SOANS C., CHONG L. D., SHAO H., DIXIT V. M., PASQUALE E. B.: Reciprocal expression of the Eph receptor Cek5 and its ligand(s) in the early retina. *Devel. Biol.* 182 (1997) 256-269.
- HOLDER N., COOKE J., BRENNAN C.: The Eph receptor tyrosine kinases and the ephrins - roles in nervous system development. *Eur. J. Neurosci.* 10 (1998) 405-408.
- HOLDER N., KLEIN R.: Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development* 126 (1999) 2033-2044.
- HOLLAND P.: Homeobox genes in vertebrate evolution. *BioEssays* 14 (1992) 267-273.
- HOLLAND S. J., GALE N. W., MBAMALU G., YANCOPOULOS G. D., HENKEMEYER M., PAWSON T.: Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* 383 (1996) 722-725.
- HOLLAND S. J., GALE N. W., GISH G. D., ROTH R. A., SONGYANG Z., CANTLEY L. C., HENKEMEYER M., YANCOPOULOS G. D., PAWSON T.: Juxtamembrane tyrosine residues couple the Eph family receptor EphB2/Nuk to specific SH2 domain proteins in neuronal cells. *EMBO J.* 16 (1997) 3877-3888.
- HOLT C. E., HARRIS W. A.: Position, guidance, and mapping in the developing visual system. *J. Neurobiol.* 24 (1993) 1400-1422.
- HOOPER M., HARDY K., HANDYSIDE A., HUNTER S., MONK M.: HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326 (1987) 292-295.
- HOOPER M. C.: Embryonal stem cells: Introducing planned changes into the animal germline. *Harwood*, New York (1993).
- HORNBERGER M. R., DUTTING D., CIOSEK T., YAMADA T., HANDWERKER C., LANG S., WETH F., HUF J., WESSEL R., LOGAN C., TANAKA H., DRESCHER U.: Modulation of EphA receptor function by coexpressed ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Neuron* 22 (1999) 731-742.
- HUANG C., NI Y., WANG T., GAO Y., HAUDENSCHILD C. C., ZHAN X.: Downregulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 13911-13915.
- ISHIBASHI M., ANG S.-L., SHIOTA K., NAKANISHI S., KAGEYAMA R., GUILLEMOT F.: Targeted disruption of mammalian hairy and enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Devel.* 9 (1995) 3136-3148.
- ITASAKI N., ICHIJO H., HAMA C., MATSUNO T., NAKAMURA H.: Establishment of rostrocaudal polarity in tectal primordium: *engrailed* expression and subsequent tectal polarity. *Development* 113 (1991) 1133-1144.
- ITASAKI N., NAKAMURA H.: Rostrocaudal polarity of the tectum in birds: correlation of *en* gradient and topographic order in retinotectal projection. *Neuron* 8 (1992) 787-798.
- ITASAKI N., NAKAMURA H.: A role for gradient *en* expression in positional specification on the optic tectum. *Neuron* 16 (1996) 55-62.
- JACOBOWITZ D. M., ABBOTT L. C.: Chemoarchitectonic atlas of the developing mouse brain. *CRC Press, Inc.*, Boca Raton, Florida (1998).
- JAENISCH R.: Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukaemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 1260-1264.
- JIA C., HALPERN M.: Segregated populations of mitral/tufted cells in the accessory olfactory bulb. *Neuroreport* 8 (1997) 1887-1890.
- JOYNER A., MARTIN G. R.: En-1 and En-2, two mouse genes with sequence homology to the *Drosophila* engrailed gene: expression during embryogenesis. *Genes Dev.* 1 (1987) 29-38.
- JOYNER A. L., HERRUP K., AUERBACH B. A., DAVIS C. A., ROSSANT J.: Subtle cerebellar phenotype in mice homozygous for a targeted deletion of the *En-2* Homeobox. *Science* 251 (1991) 1239-1243.
- JOYNER A. L.: *Engrailed*, *Wnt* and *Pax* genes regulate midbrain-hindbrain development. *Trends Genet.* 12 (1996) 15-20.
- JOYNER A. L. (ed.): Gene targeting. *Oxford University Press*, Oxford (1993).

- JURILOFF D. M., MACDONALD K. B., HARRIS M. J.: Genetic analysis of the cause of exencephaly in the SELH/Bc mouse stock. *Teratology* 40 (1989) 395-405.
- KANDEL E. R., SCHWARZ J. H., JESSEL T. M.: Principles of neural science. 3rd edition. *Elsevier*, New York (1991).
- KARLSTROM R. O., TROWE T., KLOSTERMANN S., BAIER H., BRAND M., CRAWFORD A. D., GRUNEWALD B., HAFFTER P., HOFFMANN H., MEYER S. U., MÜLLER B. K., RICHTER S., VAN EDEN F. J. M., NÜSSELEIN-VOLHARD C., BONHOEFFER F.: Zebrafish mutations affecting retinotectal axon pathfinding. *Development* 123 (1996) 427-438.
- KARLSTROM R. O., TROWE T., BONHOEFFER F.: Genetic analysis of axon guidance and mapping in the zebrafish. *Trends Neurosci.* 20 (1997) 3-8.
- KASSAVETIS G. A., BUTLER E. T., ROULLAND D., CHAMBERLIN M. J.: Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 5779-5788.
- KATZ L. C., SHATZ C. J.: Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274 (1996) 1133-1138.
- KAUFMAN M. H.: The atlas of mouse development. *Academic Press Ltd.*, London (1992).
- KENNY D., BRONNER-FRASER M., MARCELLE C.: The receptor tyrosine kinase OEK5 mRNA is expressed in a gradient within the neural retina and the tectum. *Devel. Biol.* 172 (1995) 708-716.
- KESSEL M., BALLING R., GRUSS P.: Variations of cervical vertebrae after expression of a Hox-1.1 transgene in mice. *Cell* 61 (1990) 301-308.
- KEVERNE E. B.: The vomeronasal organ. *Science* 286 (1999) 716-720.
- KEYNES R., COOK G. M.: Axon guidance molecules. *Cell* 83 (1995) 161-169.
- KILPATRICK T. J., BROWN A., LAI M., GASSMANN M., GOULDING M., LEMKE G.: Expression of the *Tyro4/Mek4/Cek4* gene specifically marks a subset of embryonic motor neurons and their muscle targets. *Mol. Cell. Neurosci.* 7 (1996) 62-74.
- KIOUSSI C., CARRIERE C., ROSENFELD M. G.: A model for the development of the hypothalamic-pituitary axis: transcribing the hypophysis. *Mech. Dev.* 81 (1999) 23-35
- KIYOKAWA E., TAKAI S., TANAKA M., IWASE T., SUZUKI M., XIANG Y. Y., NAITO Y., YAMADA K., SUGIMURA H., KINO I.: Overexpression of ERK, an EPH family receptor protein tyrosine kinase, in various human tumors. *Cancer Res.* 54 (1994) 3645-3650.
- KNIPPERS R.: Molekulare Genetik. *Thieme Verlag*, Stuttgart, 7. Auflage (1999).
- KOLODKIN A. L.: Growth cones and the cues that repel them. *Trends Neurosci.* 19 (1996) 507-513.
- KOZLOSKY C. J., VANDENBOS T., PARK L., CERETTI D. P., CARPENTER M. K.: LERK-7: A ligand of the Eph-related kinases is developmentally regulated in the brain. *Cytokine* 9 (1997) 540-549.
- KRUMLAUF R.: Evolution of the vertebrate Hox homeobox genes. *BioEssays* 14 (1992) 245-252.
- KUEMERLE B., ZANJANI H., JOYNER A., HERRUP K.: Pattern deformities and cell loss in *Engrailed-2* mutant mice suggest two separate patterning events during cerebellar development. *J. Neurosci.* 17 (1997) 7881-7889.
- KYTE J., DOOLITTLE R. F.: A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* 157 (1982) 105-132.
- LABRADOR J. P., BRAMBILLA R., KLEIN R.: The N-terminal globular domain of Eph receptors is sufficient for ligand binding and receptor signaling. *EMBO J.* 16 (1997) 3889-3897.
- LACKMANN M., BUCCI T. A., MANN R. J., KRAVETS L., VINEY E., SMITH F. M., MORITZ R. L., CARTER W., SIMPSON R. J., NICOLA N. A., MAXWELL K. F., NICE E. C., WILKS A. F., BOYD A. W.: Purification of a ligand for the EPH-like receptor HEK using a biosensor-based affinity detection approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 2523-2527.
- LACKMANN M., MANN R. J., KRAVETS L., SMITH F. M., BUCCI T. A., MAXWELL K. F., HOWLETT G. J., OLSSON J. E., VANDEN BOS T., CERRETTI D. P., BOYD A. W.: Ligand for EPH-related kinase (LERK) 7 is the preferred high affinity ligand for the HEK receptor. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 16521-16530.
- LAI K.-O., IP F. C. F., IP N. Y.: Identification and characterization of splice variants of ephrin-A3 and ephrin-A5. *FEBS* 458 (1999) 265-269.
- LEWIN B.: Genes VII. *Oxford University Press* (2000).
- LICKLITER J. D., SMITH F. M., OLSSON J. E., MACKWELL K. L., BOYD A.: Embryonic stem cells express multiple Eph-subfamily receptor tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 145-150.

- LOGAN C., WIZENMANN A., DRESCHER U., MONSCHAU B., BONHOEFFER F., LUMSDEN A.: Rostral optic tectum acquires caudal characteristics following ectopic *Engrailed* expression. *Curr. Biol.* 6 (1996) 1006-1014.
- LUSKIN M. B.: Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11 (1993) 173-189.
- MACDONALD K. B., JURILOFF D. M., HARRIS M. J.: Developmental study of neural tube closure in a mouse stock with a high incidence of exencephaly. *Teratology* 39 (1989) 195-213.
- MACK K. J., YI S. D., CHANG S., MILLAN N., MACK P.: NGFI-C expression is affected by physiological stimulation and seizures in the somatosensory cortex. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 29 (1995) 140-146.
- MACKAREHTSCHIAN K., LAU C. K., CARAS I., MCCONELL S. K.: Regional differences in the developing cerebral cortex revealed by *Ephrin-A5* expression. *Cereb. Cortex* 9 (1999) 601-610.
- MANSOUR S. L., THOMAS K. R., CAPPECHI M. R.: Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations into mice. *Nature* 336 (1988) 348-352.
- MARCUS R. C., GALE N. W., MORRISON M. E., MASON C. A., YANCOPOULOS G. D.: Eph family receptors and their ligands distribute in opposing gradients in the developing mouse retina. *Devel. Biol.* 180 (1996) 786-789.
- MARCUS R. C., MATTHEWS G. A., GALE N. W., YANCOPOULOS G. D., MASON C. A.: Axon guidance in the mouse optic chiasm: retinal neurite inhibition by Ephrin "A"-Expressing hypothalamic cells in vitro. *Dev. Biol.* 221 (2000) 132-147.
- MARTIN G. R.: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 7634-7638.
- MARTINEZ S., WASSEF M., ALVARADO-MALLART R. M.: Induction of a mesencephalic phenotype in the 2-day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene *en*. *Neuron* 6 (1991) 971-981.
- McFARLANE S., CORNEL E., AMAYA E., HOLT C. E.: Inhibition of FGF receptor activity in retinal ganglion cell axons causes errors in target recognition. *Neuron* 17 (1996) 245-254.
- McFARLANE S., HOLT C. E.: Growth factors: a role in guiding axons? *Trends Cell Biol.* 7 (1997) 424-430.
- McKNIGHT S., TJIAN R.: Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* 46 (1986) 795-805.
- McLOON S. C.: A monoclonal antibody that distinguishes between temporal and nasal retinal axons. *J. Neurosci.* 11 (1991) 1470-1477.
- McMAHON A. P., JOYNER A. L., BRADLEY A., McMAHON J. A.: The midbrain-hindbrain phenotype of *Wnt-1/Wnt-1*-mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* 69 (1992) 581-595.
- MEIMA L., KLJAVIN I. J., MORAN P., SHIH A., WINSLOW J. W., CARAS I.: AL-1 induced growth cone collapse of rat cortical neurons is correlated with *Rek7* expression and rearrangement of the actin cytoskeleton. *Eur. J. Neurosci.* 9 (1997) 177-188.
- MELLITZER G., XU Q., WILKINSON D. G.: Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature* 400 (1999) 77-81.
- MELTON D. W.: Gene targeting in the mouse. *Bioessays* 16 (1994) 633-638.
- MEY J., THANOS S.: Development of the visual system of the chick - a review. *J. Hirnforsch.* 33 (1992) 673-702.
- MILLEN K. J., WURST W., HERRUP K., JOYNER A. L.: Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse *Engrailed-2* mutants. *Development* 120 (1994) 695-706.
- MILLER B., CHOU L., FINLAY B. L.: The early development of thalamocortical and corticothalamic projections. *J. Comp. Neurol.* 335 (1993) 16-41.
- MILLET S., BLOCH-GALLEGO E., SIMEONE A., ALVARADO-MALLART R.-M.: The caudal limit of *Otx2* gene expression as a marker of the midbrain/hindbrain boundary: a study using in situ hybridisation and chick/quail homotypic grafts. *Development* 122 (1996) 3785-3797.
- MILLET S., CAMPBELL K., EPSTEIN D. J., LOSOS K., HARRIS E., JOYNER A. L.: A role for *Gbx2* repression of *Otx2* and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* 401 (1999) 161-164.
- MING G., SONG H., BERNINGER B., HOLT C. E., TESSIER-LAVIGNE M., POO M.: cAMP-dependant growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* 19 (1997) 1225-1235.

- MONSCHAU B., KREMOSER C., OHTA K., TANAKA H., KANEKO T., YAMADA T., HANDWERKER C., HORNBERGER M. R., LÖSCHINGER J., PASQUALE E. B., SIEVER D. A., VERDERAME M. F., MÜLLER B. K., BONHOEFFER F., DRESCHER U.: Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *EMBO J.* 16 (1997) 1258-1267.
- MORRIS-KAY G., WOOD H., CHEN W.-H.: Normal neurulation in mammals. In *Neural tube defects*. Wiley, Chichester (1994).
- MOUNTFORD P. S., ZEVNIK B., DÜWEL A., NICHOLS J., LI M., DANI C., ROBERTSON M., CHAMBERS I., SMITH A.: Dicistronic targeting constructs - reporters and modifiers of mammalian gene-expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 4303-4307.
- MOUNTFORD P. S., SMITH A. G.: Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis. *Trends Genet.* 11 (1995) 179-184.
- MÜLLER B. K., BONHOEFFER F., DRESCHER U.: Novel gene families involved in neural pathfinding. *Curr. Opin. Gen. Devel.* 6 (1996) 469-474.
- MULLIS K. B., FALOONA F. A.: Specific Synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Method. Enzymol.* 155 (1987) 335-350.
- NAGY A., ROSSANT J., NAGY R., ABRAMOW-NEWERLY W., RÖDER J. C.: Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 8424-8428.
- NAKAGAWA S., BRENNAN C., JOHNSON K. G., SHEWAN D., HARRIS W. A., HOLT C. E.: Ephrin-B regulates the ipsilateral routing of retinal axons at the optic chiasm. *Neuron* 25 (2000) 599-610.
- NAKAMOTO M., CHENG H.-J., FRIEDMAN G. C., MCLAUGHLIN T., HANSEN M. J., YOON C. H., O'LEARY D. D. M., FLANAGA J. G.: Topographically specific effects of Elf-1 on retinal axon guidance *in vitro* and retinal axon mapping *in vivo*. *Cell* 86 (1996) 755-766.
- NEUBÜSER A., KOSEKI H., BALLING R.: Characterization and developmental expression of *Pax9*, a paired-box-containing gene related to *Pax1*. *Devel. Biol.* 170 (1995) 701-716.
- NEUMANN P. E., MUELLER G. G., SIDMAN R. L.: Identification and mapping of a mouse gene influencing cerebellar folial pattern. *Brain Res.* 524 (1990) 85-89.
- OATES A. C., LACKMANN M., POWER M. A., BRENNAN C., SMITH F. M., DO C., EVANS B., HOLDER N., BOYD A. W.: An early developmental role for Eph-ephrin interaction during vertebrate gastrulation. *Mech. Dev.* 83 (1999) 77-94.
- OHTA K., NAKAMURA M., HIROKAWA K., TANAKA S., IWAMA A., SUDA T., ANDO M., TANAKA H.: The receptor tyrosine kinase, *Cek8*, is transiently expressed on subtypes of motoneurons in the spinal cord during development. *Mech. Dev.* 54 (1996) 59-69.
- OHTA K., IWAMASA H., DRESCHER U., TERASAKI H., TANAKA H.: The inhibitory effect on neurite outgrowth of motoneurons exerted by the ligands ELF-1 and RAGS. *Mech. Devel.* 64 (1997) 127-135.
- ORIOLI D., HENKEMEYER M., LEMKE G., KLEIN R., PAWSON T.: *Sek4* and *Nuk* receptors cooperate in guidance of commissural axons and in palate formation. *EMBO J.* 15 (1996) 6035-6049.
- ORIOLI D., KLEIN R.: The Eph receptor family: axonal guidance by contact repulsion. *Trends Genet.* 13 (1997) 354-359.
- O'Rourke N. A.: Neuronal chain ganglia: homotypic contacts support migration into the olfactory bulb. *Neuron* 16 (1996) 1061-1064.
- PADGETT R. A., GRABOWSKI P. J., KONARSKA M. M., SEILER S. S., SHARP P. A.: Splicing of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* 55 (1986) 1119-1150.
- PARK S., FRISÉN J., BARBACID M.: Aberrant axonal projections in mice lacking EphA8 (*Eek*) tyrosine protein kinase receptors. *EMBO J.* 16 (1997) 3106-3114.
- PASQUALE E. B.: The Eph family of receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 (1997) 608-615.
- PAWSON T., BERNSTEIN A.: Receptor tyrosine kinases: genetic evidence for their role in *Drosophila* and mouse development. *Trends Genet.* 6 (1990) 350-356.
- PELTENBURG L. T., MURRE C.: Engrailed and Hox homeodomain proteins contain a related Pbx interaction motif that recognizes a common structure present in Pbx. *EMBO J.* 15 (1996) 3385-3393.
- PETERS H., NEUBÜSSER A., KRATOCHWIL K., BALLING R.: *Pax9*-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Devel.* 12 (1998) 2735-2747.

- PICKER A., BRENNAN C., REIFERS F., CLARKE J. D. W., HOLDER N., BRAND M.: Requirement for the zebrafish mid-hindbrain boundary in midbrain polarisation, mapping and confinement of the retinotectal projection. *Development* 126 (1999) 2967-2978.
- PINI A.: Chemorepulsion of axons in the developing mammalian central nervous system. *Science* 261 (1993) 95-98.
- POSTLETHWAIT J. H., YAN Y. L., GATES M. A., HORNE S., AMORES A., BROWNLIE A., DONOVAN A., EGAN ES., FORCE A., GONG Z., GOUTEL C., FRITZ A., KELSH R., KNAPIK E., LIAO E., PAW B., RANSOM D., SINGER A., THOMSON M., ABDULJABBAR T. S., YELICK P., BEIER D., JOLY J. S., LARHAMMAR D., ROSA F., *et al.*: Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat. Genet.* 18 (1998) 345-349.
- QUANDT K., FRECH K., KARAS H., WINGENDER E., WERNER T.: MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 23 (1995) 4878-4884.
- RAMÓN Y CAJAL S.: Sobre la aparición de las expansiones celulares en la médula embrionaria. *Gaceta Sanitaria de Barcelona* 12 (1890) 413-419.
- RAMÓN Y CAJAL S.: La rétine de vertébrés. *La cellule* 9 (1893) 119-258.
- RAPER J. A., KAPFFHAMMER J.: The enrichment of a neuronal growth cone collapsing activity from embryonic chick brain. *Neuron* 4 (1990) 21-29.
- RÉTAUX S., HARRIS W. A.: Engrailed and retinotectal topography. *Trends Neurosci.* 19 (1996) 542-546.
- RÉTAUX S., MCNEILL L., HARRIS W. A.: Engrailed retinotectal targeting, and axonal patterning in the midbrain during *Xenopus* Development: An antisense study. *Neuron* 16 (1996) 63-75.
- ROBERTSON E. J., BRADLEY A., KUEHN M., EVANS M.: Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323 (1986) 445-448.
- ROBINSON D., HE F., PRETLOW T., KUNG H. J.: A tyrosine kinase profile of prostate carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 5958-5962.
- RODRIGUEZ I., FEINSTEIN P., MOMBAERTS P.: Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system. *Cell* 97 (1999) 199-208.
- ROGERS J. H., CIOSEK T., MENZEL P., PASQUALE E. B.: Eph receptors and ephrins demarcate cerebellar lobules before and during their formation. *Mech Devel.* 87 (1999) 119-128.
- RUBENSTEIN J. L. R., PUELLES L.: Homeobox gene expression during development of the vertebrate brain. *Curr. Top. Devel. Biol.* 29 (1994) 1-63.
- RUBENSTEIN J. L. R., MARTINEZ S., SHIMAMURA K., PUELLES L.: The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science* 266 (1994) 578-580.
- RUBENSTEIN J. L. R., ANDERSON S., SHI L., MIYASHITA-LIN E., BULFONE A., HEVNER R.: Genetic control of cortical regionalization and connectivity. *Cereb. Cortex* 9 (1999) 524-532.
- RUGH R.: The mouse. Its reproduction and development. *Oxford University Press*, Oxford (1990).
- RUIZ J. C., CONLON F. L., ROBERTSON E. J.: Identification of a novel protein kinases expressed in the myocardium of the developing mouse heart. *Mech. Dev.* 48 (1994) 153-154.
- SAKAI Y.: Neurulation in the mouse: manner and timing of neural tube closure. *The Anatomical Record* 223 (1989) 194-203.
- SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2nd Edition (1989).
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A. R.: DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463-5467.
- SAVITT J. M., TRISLER D., HILT D. C.: Molecular cloning of TOPAP: a topographically graded protein in the developing chick visual system. *Neuron* 14 (1995) 253-261.
- SCHAMBRA U. B., LAUDER J. M., SILVER J.: Atlas of the prenatal mouse brain. *Academic Press, Inc.*, San Diego (1992).
- SCHULTE D., FURUKAWA T., PETERS M. A., KOZAK C. A., CEPKO C. L.: Misexpression of the Emx-related homeobox genes *cVax* and *mVax2* ventralizes the retina and perturbs the retinotectal map. *Neuron* 24 (1999) 541-553.

- SCHWAB M. E., KAPFHAMMER J. P., BANDTLOW C. E.: Inhibitors of neurite growth. *Annu. Rev. Neurosci.* (1993) 565-595.
- SCULLY A. L., MCKEOWN M., THOMAS J. B.: Isolation and characterization of Dek, a *Drosophila* Eph receptor protein tyrosine kinase. *Mol. Cell. Neurosci.* 13 (1999) 337-347.
- SEFTON M., ARAUJO M., NIETO A.: Novel expression gradients of Eph-like receptor tyrosine kinases in the developing chick retina. *Devel. Biol.* 188 (1997) 363-368.
- SEFTON M., NIETO A.: Multiple roles of Eph-like kinases and their ligands during development. *Cell Tissue Res.* 290 (1997) 243-250.
- SHIGETANI Y., FUNAHASHI J., NAKAMURA H.: En-2 regulates the expression of the ligands for Eph type tyrosine kinases in chick embryonic tectum. *Neurosci. Res.* 27 (1997) 211-217.
- SHIMAMURA K., HARTIGAN D. J., MARTINEZ S., PUELLES L., RUBENSTEIN J. L. R.: Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* 121 (1995) 3923-3933.
- SIMON D. K., O'LEARY D. D. M.: Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection. *J. Neurosci.* 12 (1992) 1212-1232.
- SMITH A. G., HOOPER M. L.: Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev Biol* 121 (1987) 1-9.
- SMITH A. G., HEATH J. K., DONALDSON D. D., WONG G. G., MOREAU J., STAHL M., ROGERS D.: Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336 (1988) 688-690.
- SOANS C., HOLASH J. A., PASQUALE E. B.: Characterisation of the expression of the Cek8 receptor-type tyrosine kinase during development and in tumor cell lines. *Oncogene* 9 (1994) 3353-3361.
- SONG H., MING G., HE Z., LEHMANN M., MCKERRACHER L., TESSIER-LAVIGNE M., POO M.: Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science* 281 (1998) 1515-1518.
- SORIANO P., JAENISCH R.: Retroviruses as probes for mammalian development: allocation of cells to the somatic and germ cell lineages. *Cell* 46 (1986) 19-29.
- SOUTHERN E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 (1975) 503-517.
- SPERRY R. W.: Visuomotor coordination in the newt (*Triturus viridescens*) after regeneration of the optic nerve. *J. Comp. Neurol.* 79 (1943) 33-55.
- SPERRY R. W.: Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 50 (1963) 703-710.
- SRETAVAN W., KRUGER K.: Randomized retinal ganglion cell axon routing at the optic chiasm of GAP-43-deficient mice: Association with midline recrossing and lack of normal ipsilateral axon turning. *J. Neurosci.* 18 (1998) 10502-10523.
- STAHL B., MÜLLER B., VON BOXBERG Y., COX E. C., BONHOEFFER F.: Biochemical characterization of a putative axonal guidance molecule of the chick visual system. *Neuron* 5 (1990) 733-743.
- STEIN E., SAVASKAN N. E., NINNEMANN O., NITSCH R., ZHOU R., SKUTELLA T.: A role for the Eph ligand ephrin-A3 in entorhino-hippocampal axon targeting. *J. Neurosci.* 19 (1999) 8885-8893.
- STRITTMATTER S. M., FANKHAUSER C., HUANG P. L., MASHIMO H., FISHMAN M. C.: Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43. *Cell* 80 (1995) 445-452.
- STRUDER M., GAVALAS A., MARSHALL H., ARIZA-MCNAUGHTON L., RIJLI F. M., CHAMBON P., KRUMLAUF R.: Genetic interactions between *Hoxa1* and *Hoxb1* reveal new roles in regulation of early hindbrain patterning. *Development* 125 (1998) 1025-1036.
- STUART E. T., KIOUSSI, C., GRUSS P.: Mammalian Pax genes. *Annu. Rev. Genet.* 27 (1993) 219-236.
- SUGAI T., SUGITANI M., ONODA N.: Subdivisions of the guinea pig accessory olfactory bulb revealed by the combined method with immunohistochemistry, electrophysiological and optical recordings. *Neuroscience* 79 (1997) 871-885.
- SUGAI T., SUGITANI M., ONODA N.: Novel subdivisions of the rat accessory olfactory bulb revealed by the combined method with lectin histochemistry, electrophysiological and optical recordings. *Neuroscience* 95 (2000) 23-32.

- TAKUMA N., SHENG H. Z., FURUTA Y., WARD J. M., SHARMA K., HOGAN B. L., PFAFF S. L., WESTPHAL H., KIMURA S., MAHON K. A.: Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development* 125 (1998) 4835-4840.
- TANABE Y., JESSELL T. M.: Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274 (1996) 1115-1123.
- TAYLOR J. S. H.: The early development of the frog retinotectal projection. *Development Supplement* 2 (1991) 95-104.
- TE RIELE H., MAANDAG E. R., CLARKE A., HOOPER M. L., BERNIS A.: Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells via homologous recombination with isogenic DNA constructs *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 5128-5132.
- TESSIER-LAVIGNE M., GOODMAN C. S.: The molecular biology of axon guidance. *Science* 274 (1996) 1123-1133.
- TESSIER-LAVIGNE M.: Eph receptor tyrosine kinases, axon repulsion, and the development of topographic maps. *Cell* 82 (1995) 345-348.
- THEIL T., FRAIN M., GILARDI-HEBENSTREIT P., FLENNIKEN A., CHARNAY P., WILKINSON D. G.: Segmental expression of the *EphA4 (Sek-1)* receptor tyrosine kinase in the hindbrain is under direct transcriptional control of *Krox-20*. *Development* 15 (1998) 443-452.
- THEILER K.: The house mouse. Atlas of embryonic development. *Springer Verlag*, New York (1989).
- THOMAS K. R., CAPECCHI M. R.: Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51 (1987) 503-512.
- TIRINDELLI R., MUCIGNAT-CARETTA, RYBA N. J. P.: Molecular aspects of pheromonal communication via the vomeronasal organ of mammals. *Trends Neurosci.* 21 (1998) 482-486.
- TORRES R., FIRESTEIN B. L., DONG H., STAUDINGER J., OLSON E. N., HUGANIR R. L., BRETT D. S., GALE N. W., YANCOPOULOS G. D.: PDZ proteins bind, cluster and synaptically colocalize with Eph receptors and their Ephrin ligands. *Neuron* 21 (1998) 1453-1463.
- TREIER M., ROSENFELD M. G.: The hypothalamic-pituitary axis: co-development of two organs. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8 (1996) 833-843.
- TRISLER D, SCHNEIDER M. D., NIRENBERG M.: A topographic gradient of molecules in the retina can be used to identify cell position. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 2145-2149.
- TRISLER D: Cell recognition and pattern formation in the developing nervous system. *J. Exp. Biol.* 153 (1990) 11-27.
- TROWE T., KLOSTERMANN S., BAIER H., GRANATO M., CRAWFORD A. D., GRUNEWALD B., HOFFMANN H., KARLSTROM R. O., MEYER S. U., MÜLLER B. K., RICHTER S., NÜSSLEIN-VOLHARD C., BONHOEFFER F.: Mutations disrupting the ordering and topographic mapping of axons in the retinotectal projection of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123 (1996) 439-450.
- TUTTLE R., BRAISTED J. E., RICHARDS L. J., O'LEARY D. D. M.: Retinal axon guidance by region-specific cues in diencephalon. *Development* 125 (1998) 791-801.
- TUZI N. L., GULLICK W. J.: eph, the largest known family of putative growth factor receptors. *Br. J. Cancer* 69 (1994) 417-421.
- TYBULEWICZ V. L. J., CRAWFORD C. E., JACKSON P. K., BRONSON R. T., MULLIGAN R. C.: Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the *c-abl* proto-oncogene. *Cell* 65 (1991) 1153-1163.
- UDENFRIED S., KODUKULA K.: How Glykosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.* 64 (1995) 563-591.
- VAN DER GEER P., HUNTER T., LINDBERG R. A.: Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10 (1994) 251-337.
- VANDERHAEGHEN P., LU Q., PRAKASH N., FRISÉN WALSH C. A., FROSTIG R. D., FLANAGAN J. G.: A mapping label required for normal scale of body representation in the cortex. *Nature Neurosci.* 3 (2000) 358-365.
- VAN DER PUTTEN H., BOTTERI F. M., MILLER A. D., ROSENFELD M. G., FAN H., EVANS R. M., VERMA I. M.: Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 6148-6152.
- VAN DEURSEN J., WIERINGA B.: Targeting of the creatine kinase M gene in embryonic stem cells using isogenic and nonisogenic vectors. *Nucl. Acids Res.* 20 (1992) 3815-3820.

- VAN DIJK M. A., PELTENBURG L. T., MURRE C.: Hox gene products modulate the DNA binding activity of Pbx1 and Pbx2. *Mech. Dev.* 52 (1995) 99-108.
- VARELA-ECHAVARRIA A., GUTHRIE S.: Molecules making waves in axon guidance. *Genes Devel.* 11 (1997) 545-557.
- VARMA R., MAYOR S.: GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 394 (1998) 798-801.
- VIDOVIC M., MAROTTE L. R., MARK R. F.: Marsupial retinocollicular system shows differential expression of messenger RNA encoding EphA receptors and their Ligands during development. *J. Neurosci. Res.* 15 (1999) 244-254.
- VOET D., VOET J. G.: Biochemistry. *John Wiley & Sons, Inc.*, 2nd Edition (1995).
- VON HEIJNE G.: A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucl. Acids. Res.* 14 (1986) 4683-4690.
- VOOGD J., GLICKSTEIN M.: The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci.* 21 (1998) 370-375.
- WAHLSTEN D., ANDISON M.: Patterns of cerebellar foliation in recombinant inbred mice. *Brain Res.* 557 (1991) 184-189.
- WALTER J., KERN-VEITS B., HUF J., STOLZE B., BONHOEFFER F.: Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons *in vitro*. *Development* 101 (1987) 685-696.
- WANG H. U., CHEN Z.-F., ANDERSON D. J.: Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93 (1998) 741-753.
- WASSARMAN K. M., LEWANDOSKI M., CAMPBELL K., JOYNER A. L., RUBENSTEIN J. L. R., MARTINEZ S., MARTIN G. R.: Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on *Gbx2* gene function. *Development* 124 (1997) 2923-2934.
- WASSEF M., JOYNER A. L.: Early mesencephalon/metencephalon patterning and development of the cerebellum. *Persp. Devel. Neurobiol.* 5 (1997) 3-16.
- WILKINSON, D.G.: Whole mount *in situ* hybridization of vertebrate embryos. In WILKINSON, D.G., (Ed.), *In Situ Hybridization: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford. (1992).
- WILLIAMS R. L., HILTON D. J., PEASE S., WILLSON T. A., STEWART C. L., GEARING D. P., WAGNER E. F., METCALF D., NICOLA N. A., GOUGH N. M.: Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336 (1988) 684-687.
- WILSON S. W., BRENNAN C., MACDONALD R., BRAND M., HOLDER N.: Analysis of axon tract formation in the zebrafish brain: the role of territories of gene expression and their boundaries. *Cell Tissue Res.* 290 (1997) 189-196.
- WINNING R. S., SARGENT T. D.: Pagliaccio, a member of the Eph family of receptor tyrosine kinase genes, has localized expression in a subset of neural crest and neural tissues in *Xenopus laevis* embryos. *Mech. Dev.* 46 (1994) 219-229.
- 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. CARAS I. W.: Cloning of AL-1, a ligand for an Eph-related tyrosine kinase receptor involved in axon bundle formation. *Neuron* 14 (1995) 973-981.
- WOLPERT L.: Principles of development. *Oxford University Press*, Oxford (1998).
- WURST W., JOYNER A. L.: Production of targeted embryonic stem cell clones. In Gene Targeting. A practical approach JOYNER A. L. (Ed.) *IRL Press*, Oxford (1993).
- WURST W., AUERBACH A. B., JOYNER A. L.: Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* 120 (1994) 2065-2075.
- XU Q., HOLDER N., PATIENT R., WILSON S. W.: Spatially regulated expression of three receptor tyrosine kinase genes during gastrulation in the zebrafish. *Development* 120 (1994) 287-299.
- XU Q., ALLDUS G., HOLDER N., WILKINSON D. G.: Expression of truncated *Sek-1* receptor tyrosine kinase disrupts the segmental restriction of gene expression in the *Xenopus* and hindbrain. *Development* 121 (1995) 4005-4016.
- XU Q., ALLDUS G., MACDONALD R., WILKINSON D. G., HOLDER N.: Function of the Eph-related kinase *rtk1* in patterning of the zebrafish forebrain. *Nature* 319 (1996) 319-322.

- XU Q., WILKINSON D. G.: Eph-related receptors and their ligands: mediators of contact dependent cell interactions. *J. Mol. Med.* 75 (1997) 576-586.
- XU Q., MELLITZER G., ROBINSON V., WILKINSON D. G.: *In vivo* cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and Ephrins. *Nature* 399 (1999) 267-271.
- YUASA J., HIRANO S., YAMAGATA M., NODA M.: Visual projection map specified by topographic expression of transcription factors in the retina. *Nature* 382 (1996) 632-635.
- YUE Y., SU J., CERRETTI D. P., FOX G. M., JING S., ZHOU R.: Selective inhibition of spinal cord neurite outgrowth and cell survival by the Eph family ligand ephrin-A5. *J. Neurosci.* 19 (1999) 10026-10035.
- ZARBALIS K., WURST W.: Expression of murine *Ephrin-A5* in the pituitary and hypothalamus. *Mech. Dev.* 93 (2000) 165-168.
- ZHANG J.-H., CERRETTI D. P., YU T., FLANAGAN J. G., ZHOU R.: Detection of ligands in regions anatomically connected to neurons expressing the Eph receptor Bsk: Potential roles in neuron-target interaction. *J. Neurosci.* 16 (1996) 7182-7192.
- ZHANG J.-H., PIMENTA A. F., LEVITT P., ZHOU R.: Dynamic expression suggests multiple roles of the eph family receptor brain-specific kinase (Bsk) during mouse neurogenesis. *Mol. Brain Res.* 47 (1997) 202-214.
- ZHOU R., COPELAND T. D., KROMER L. F., SCHULZ N. T.: Isolation and characterization of Bsk, a growth factor receptor-like tyrosine kinase associated with the limbic system. *J. Neurosci. Res.* 37 (1994) 129-143.
- ZHOU R.: The Eph family receptors and ligands. *Pharmacol. Theor.* 77 (1998) 151-181.
- ZHU Q., JULIEN J.-P.: A key role for GAP-43 in the retinotectal topographic organization. *Exp. Neurol.* 155 (1999) 228-242.
- ZIMMER A.: Manipulating the genome by homologous recombination in embryonic stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 15 (1992) 115-137.
- ZISCH A. H., STALLCUP W. B., CHONG L. D., DAHLIN-HUPPE K., VOSHOL J., SCHACHNER M., PASQUALE E. B.: Tyrosine phosphorylation of L1 family adhesion molecules: implication of the Eph kinase Cck5. *J. Neurosci.* 47 (1997) 655-665.
- ZISCH A. H., PASQUALE E.: The Eph family: a multitude of receptors that mediate cell recognition signals. *Cell Tissue Res.* 290 (1997) 217-226.

7 Anhang

7.1 Ermittelte genomische Sequenzen

Die folgenden Daten entstammen der Sequenzanalyse genomischer Klone und entsprechen den Bereichen, die einzelne Exons umgeben. Die Exons selbst werden durch fette Schrift hervorgehoben.

7.1.1 Ermittelte *Ephrin-A5*-Promotorsequenz

Nachfolgend ist die komplette Sequenz angegeben, die für die computergestützte Analyse potentieller Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren herangezogen wurde. Sie enthält das komplette erste Exon von *Ephrin-A5* sowie ca. 5400 bp stromaufwärts des Transkriptionsstart. Eine schematische Darstellung dieses sequenzierten Bereiches des *Ephrin-A5*-Locus ist Abb. 3.20 zu entnehmen.

```

GGATCCAGTCCCCCCCCCGCCCCACCACCACAGAAGCTTTTCGTCTGCAGGAAAATGCACATAATTTAAAGAAAGAA      80
GATCTGAGTTGCCATAATCCATGCTTCCCTTCCCTTTGCCAGTTTTGAACCGAAGGGGAAAAGTAAAGCCAGAGCTAA      160
AAAGGGCTTGAACCCAGCCTTCCCCATTTTATATAATCATGCTTATTGACTGGAGGTTATATGCTATGCTCCTCTTAA      240
TAGAATCTTGCAGAAGTTGATGAAAATCTTTGGTGAAAACTGATTGAGAACAAGTTTTCTCTACCTCCATGCTTGTGT      320
GTCTGTAGATTTCCGCACAGGAATCCCATGTCCCTGTTTGTGTACATATACGGTAGCACTGGCCACTTTTACAGAGATGT      400
ATTGGCTTTTGTAGACTTTCAAAGCAAGTAAAAGAATTTTTAAAAAACGCACACTTGTGTGCCCTCTGGGTGATGGTCTA      480
TGTAACCTGGCAGAACAGGCATATCCTAATCACTAGTTGGAATGTGGAAAATGTGTAATTC AATTTATTTCTGTAATAAC      560
TACACATATTCCTTTAAAAATGGGTGTTATAGATCCAATTATAAAATACAGATACCGACTCTCTTATGATATCACTTG      640
TAGTGATATATTGCTTAAAGCAAGATATTTATTTAATAAATTCAGAGAAGATAGTATTGGGTTATACTTTATGCTAATTGA      720
TTAGATTTGCAAAATGGAGACAATTTTCATCCACAGAATTTTATTTAAAAAGATGAAGAGGGAAATACAGATAAAACTA      800
TGTACATGCTCAAGCAGTGAGATTAGAGAAATGCTTAAGGGGAATAAACTCATTTATGTGCTTAGTGGCTGGTTACACA      880
ATCCTGTATATATTCTGAAATCTGCATAATAAAACGTGACGTGGGACTGGCTGAGACAACACTTATTTGCTTTCAGAATC      960
ACAAATGGACACACACACTTTGTAATACAAATGTATACACACACACTTACACACATACACACTTACACACATACACACA      1040
CACATGCACCTTATTAGGAGATCTAGGTGTTTCTCAAAATGACTGCTAACACATCTGCACATTTGGAGAATTTGCTACAG      1120
TCGCATTTTAAAAACGTGTTTTGAAGTAGGAAGAACAACACACAGCTTGCTCATTCCGAAATGGAACAACCTTAAATCC      1200
CTGTTTTAGAAATACACAGAGCCTTTTAAAAACCATTTCTGGATTGTTTTGTTTGGTTGTTCTTGTGTTGTTTTTTCC      1280
CCCTAGAGTGTAAAAGGAAGGATGCTGAAACAGACTACAGGAAGTCCCAGCACAGAAAGAGTCACATGAGAAGGAGACAA      1360
AAGATCAGGGTGATTGGTATTAAGGTAGGGATGTGATAGTCTGTAAGCAAGATCAGAGGTTGAAAATGAATGTTTTCCC      1440
TCATCGGGCTGCTGAGGAGAGAAGAGGCAGCAGACTTATATTCTAAGTGTCTGAGAAACTTCTCTTGTGAAAGAGG      1520
GTAAGAAGAGAGTAGATAGAGCTTCACTTCAGTCTGAGGGCAGGGTCGCGGAGTGACAGCTTAGTGGTTGGAGCTCTCA      1600
CTGAGGATTTAGAACAACACTAAAAGCTCTGCAGAAACAGTAGGATTGGCTTAAATACTATGCTAACATTCATTAGGGT      1680
TGTTTTGTTAATTAGGGATGTTAACTATACTTTCTTAAATCTTGCTCTAGAGTTTGTTCCTCTATTACTTTTGCTG      1760
GATAACAAGTTCCAATTTACATCTTAAACATAGTTAAATTTGATTTTCTTAAATGAGAGTTGCCGAGTCTACAAACGGTG      1840
GGGGCTTGATTCACTTTTTATTTATTTAATTTATCTCATTCACTCATTTTGGCTGGACACTTGACATAATAGAATCTAC      1920
AACGCTAATTC AATAAGCCAATAGAAAGATTTGCCCCACATTTAAAGGTAGGTATTGCTCCTGTAGTCATATCTTGGGA      2000
GATCATACTTGTAATAAATTTGTGTGACATGGAAAATTTGTTAAAAAGCGTCTTCAACTTAGCAGACTGGATCAAGAACT      2080
CTGCCTCACTGGTGAGCTGATAAATAAGAATGGGCCTTATTTCCCTGAAAGATTGAAGTAATTAAGGCAAAAATAAATTA      2160
CCTGGATCAGCGCTTCTCAATCTTCTATCCTCATTAGAATTTCTCCAGAGAGCTTTTTAAAAAATTACAGATCCAGGTCTAG      2240
CCTAAACAACGGGGGCTCAGGCCTCTCCTTCTAGAGAGCTCCCCTCAGTGATTCTAACTCATAGTTTAGATTAGAACA      2320
CAGATTTGTGTCAGTTAAAAGCAAAACAAGACAAAACAAAACAGAAATAAAAAAAAAAAAAAGAAAAACCCAAAGCAAA      2400
ACAAAATAAATCAATCAACCAACCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAAT      2480
AATGGTTTTGCCTCAGTATTACTGGTTTTAAAGTTACCAGAGTACTTGTCTGCTGATAACCATTTACAGGACTGCGAGGG      2560
CCCTGCATAGACCATTACCAACCTGCTTTTAAAGGTTTACCCCTGTTTTTATCATCTTGTGGAACCTAACACCTTCATCAAT      2640
CATGAATTTTTATTCCTTCACTTTTAAATGGCTCTTGTTTCTTTTGGTTGGACAAGAGGCTCCTGCCTTAGCTGAAGAAA      2720
AGCTACTCATTTGATAAAGAGCAGATTGGTAACATGGGGTTAAAACCATTTTATATGGAAGTATTTTCTATGGATTT      2800
ACTGTGTGTGCTTCCGACAGAGTCACATTACCTCGACTAGTCACATTACCTCGTAAGGCGTATAGTTAATATATACT      2880
TCTCTTCAAATTTGATCCACTCACGTATTCAAGGGTCACATTGCTTAGTAAAGTCCAATGTCAATACTTGGCTCCAGAGGA      2960

```

GACATTTAATTTAGAAATATTTCTAATAGACATCTGAGTCTGTTTTGAACTATTTCAAATCTAGTATCTTATTCCAACC 3040
CCATGAATCATTTTAAGGAAGACCATAGCATACTTTGTCTCATTAAAATAGGGCCATTCTTATTTAAAATAAAGTGGAG 3120
ATGTTTAAAGATAATAAAATGGACTTGTCTTTTGGTTTGTAGACTTTTTACATCTATATGCATTTCCAAGGGGAAATAA 3200
GCATGTATTATTTCTTTTTTTTTTGTCTGCCCTTTTCAACTGTGGTGTCTTAGGAAGCCAGCTGGCTCCGTCCTTGATAC 3280
CTGATAGCTCTTTGAGACTCTTTCTGAGTTTTCAGCATTTCCTCAAGACAGAAGTCTTGAATTCCTCCTTCTCTAAAGAT 3360
ACACATAAAGCTTTTAAAGGGTTTCAAATATTTTCTCAGAAATATTTCTCATGTGCCCTTTGTACATGAGTGCCATTACA 3440
GTTACCATCAAAAAGGCTGGGAAAGAAATCTATCCTTCCACAGCAGAGAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATAACCCCTG 3520
AACTTGTTCACCAGCCAGAGGGACAGCAGCATTTTAAATGAAAAACCCAAATTGATTTTAAATAGTTAAATCTTATCGTCT 3600
TGTTTTCTTAAAGTGTATCCCTCCTTTCTTGACGTTGGAAATTTGGTGAAGAGCAGAGGAGACTTAAAGCGAATAGAA 3680
TAGTCTCAATTTAAACTCTTATAAATAGTCTATCAGTTGGTCACTGCAGTCTAACGATAACGGTTGTAATTTACGT 3760
CTGGTCACTCAACATGGACGTTCTTTCAGGATAATTAGGAAAAATCTCCATCAGCTCCAGTAACGCCAGCTGTGGGAA 3840
CTGCTTCTTCTCTCATGTCTTCACTCATCTGACCTTAGATTTTCCATCAGGCTCAGCGTGGGCTGAGGCTGCCGTCA 3920
TTGCCCTGCTGGGTGCGGACTGCAGGCCGACCCTGGAGGCGTCTGGACGCTTCCAAATTTCTCCGAAGCGCTGGAAC 4000
CCAGGCCAGCTTTGGAACACGCAGGATGGAGAAATTTGATATTTAATTTTATTTCGTCTAATATGTAAGGAGGAAAGACG 4080
CAGTGTGAGAGGATGGAAGAAAGGTAACGGCTTTCTTTTTTGGGTTCCGCTTCTTACCAGGCTGTATACACTAGAG 4160
AACAAAATAAAAAGTCTGGGATGCAGTCTCAGCAGCATCGGTATGGGCTCGATGCCAGGGCGCAGGACCACAGGGGA 4240
CCCGTCCAGGCGCCAGGACTCCTCGCTCCAGGAGATCCGGCTTAGCTGGCCTCAAAGGATCTGGGCCCTGCAACCTC 4320
CTGACCAGCCAGGAATGCACGGCTTTTTTTCAGCAATAAAGGCGTTTTTCCCTCCCTCTCACTATTTCCCTCCCTTTCT 4400
TCTCAAACCGAGTTTAGTTCAAGATAATTTATGTGGGTGTGCGTGTGCGTAGCGAACCAGCCAGGATCCGCGTGGAAA 4480
AGGTGTAAGTACTGACGGGCTCGCGCTGCGTTTTTCTCCTTCCAGCTGAAGGTTCAACCTGAATTTGTAATCACTTTA 4560
AACTGAGATTTTTTTTTTTTCTCCGACTTTTCAAACCTGCTTTTCAGAGAATCACTTTAAAGAAAAGTCCCATTTCTGC 4640
CCCCAAGCTTTAAATCTCGGTAGAAAGAGAGGGTTGAAAGGCACAAGAGAGATGCTCAGATTTCCAGATGACCTGTG 4720
CGGCTGTGCGGCTGAAGAACGAGCGGAGTTTACACGAATCCGATTTACTTAGGGCTGCCCTAGCCAGTCCAGCGCAG 4800
ACTTCACTACCTGAGCGGTCGCCGAAGCAATTTTCGGCTCCCTTTTGGAGTGGGAGCCAGTTTCTTTCAATCGAAA 4880
GACCTACTTCCAAAGTAAAAAAGGAAAAAAGGAAAAAAGGAAAAAAGGAAAAAAGGAAAAAAGGAAAAAAGGAAAAAAG 4960
ACCAAAGGTTACTCGTGTGCCGGCTGGGCGCGGAGAGGGTGCCTCGGCACTCTCAGTAATTAATTAGTCAAGTTT 5040
CAGGAAGGTGGGCGGGGTGAGGTTGGAGGCGTGGGAGGAGGAGATGAGGAAAACGCTTTCTCCCGAGCAAACC 5120
AATCCGTTAGAGAAAAGAGAGGGGAAAAAAGGAAAAAAGGAAAAAAGGAAAAAAGGAAAAAAGGAAAAAAGGAAAAA 5200
TTACTCCAATCACCCCCACCCTCCAAGTAAACTGCATGGAGGGAGGGGAGTGGGAGGGGAGCAGCCACATGACCTG 5280
GGCGCGGAGGCGAGCAGCGCGCGCGGCTCCCTCGCTCCGTCGCGTCCGAGCTCACCCACGCTCGCGCCGCTGCCAAC 5360
CCAGCCCGCGCAGCAACGCCCGGGGAGCCCGCTCCGCTGCGCCACGCTCCACGCTCACGCGCGCGGCTCCGCTG 5440
GTGCCGAGGCTGCTGCCGCTGGGCGCGCGGCGAGTCCGCTTTACACGAGGTCATTAACGAGGGGGCGTCCCGAGGA 5520
GATTTTTTTTCCATAAAGCATTTTTTCTCTCTTTTCTTTTTTTTTTTTCCCTCCTTTTTCGAAAAGTACTTTTCCC 5600
CTCCTTTCTACTTCTCGCCAGTCTTCCAACTCTCCAGGCTGCTCGCGCCGCTGCACTCAAGTTTATTTTCCCGCTGG 5680
GCAGAGTTTAGGATTCGGTCCGGTGGCTTTCACTCTCGTTACTGCTGCTAAGGAGGGAAGGAGGAGGAGGCTCCG 5760
GATCGGAAAGTTTTCTGATGTAGTCACTCGGGGAGGTCCAGGCTCGCGTGTGCTCCCTCTCCCTTTTTCCTCCCTGG 5840
TTTTAAACTGATTGATGAATCTCTACAAGTTGCTGGGTTGGGCGCGGAGAGTCCGAGTCCAGGACACTTCTGAGAG 5920
CTCCCCCGGGGCTCTGGGCACGCGTGCAGGGGTTGAGGCTCTCTCCCGAAGGCGAACGGAGACTGTATCAGCCCA 6000
TCCCGGACTTGGAGGGTCCATCCGAAAGTATGTTTCCCTCTCGCTTCTCAGCCGCGAGTTGGCTTGGCGTCCGCC 6080
TGCAGGTTTGGGCATCCCGCCCGCCTGGCTGGTGGTTCAACACTCTGCTTCTTCACTCCGCGGACCCACACC 6160
CGGCCAAGACAAGTATGACAGGAGAAATCCCGACTCAGCAGCGCCCGGGGTGCCATCTCGCTCTGCTCTGCGGTCGG 6240
ACTCCTTTGGGGACTGCTGGAAGAGCTGAAGAGCAAACTTTTTCTGGAGCTTTTCCGAAAGCAAGACCCTCCTCCT 6320
CTCCTCGCTGAGCGCTCGGCTGCGGCTTTGGGAGTTCCAGGACTCCGGCAGAGCCGGCTTGGGATCCAGATCGCCA 6400
CTCTTCTCTGCGCACCTCCGGTACCGAGTCCACAGGACTCCTGCGAGCTTGGGGGGTCCGCTGGCCAAGGCACAG 6480
AAGGAGGCTCCGGACTGCTTCCAGCTCTTGGGGACACAGTGTGAGGACGCCCGCCCGCCCGCCCTCCACAGAGCG 6560
CCCTCCTCTGAGTTTCTCTCCGGCCCAAAGTAACTTGAACAAGCGGGGCGCACGGTGGGGCCAGCGCGGGCGG 6640
AGGAAGCCGTGCAGACGCGCGCGGACACTGAGCGGGCCCGGCGGCGGTGATGTCTCCCGCAGCCGCGGCGCT 6720
CAACTCCCGTGACTGTGACGCGCGCGCGGCTGCCCGACCCGCTGCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCAGCCACTCC 6800
TCTCCCGGGTGACCGGCTTGCAGCGCGCGCGGAGACAGCTCCGACCCCTACTCCCGCCTCGCGCGCGCACCGC 6880
ACACAGCAGCGTCTTCCGCTTGTGATTCTTCCCTTCCGAGCCCTCAGTGGGGTGCAGTTTGTCCCGCCG 6960
CCCAGCACTGCCTCTTCT 7040
ATTTATCTATTTATTTGGCGTCCGCTCTCTCTGCTGCCCCCTCTCCCTCCCTCCCGTGGATCCCGATCTCTCCCG 7120
GAGTGGCGCTCGGGGCTCCGCGCTGGCTAGGCGTGTGTTGACGTTGGAGATGTTGACGCTGCTTTTTCTGGTGTCT 7200
TGGATGTGTGTTTCCAGCAGGACCCGGCTCCAAAGTCTGCGCGACCGCTACGCGCTACTGGAACAGCAGCAACC 7280
CAGGTAAGGTGGCGGGGCGGGGCGCAAAAGCTCGGCTCCGCGGCTGGGCGGGAGCAGGGACACGGCGGGCGG 7360
GAGCGCGCGCACCAGCCGAGCAGCGTGCGCCCTCGGAGCCTGCGTGCAGACGCGCTGGCCGCCCGCGCGCGG 7440
GGAAGCGCTCGCTCCGCGCGCTCTTTGTTAAGCCAGGGCGGCGAGGGCCGGCGGCTGTAGCAATCCCAGGGCTGCGCG 7520
GAGCGCTGCCCGGCGGTTGCGGGGAAGACCGGAATGGGCGGAGCCCGGACCCGGGCAATCGCTTCCAGTCCG 7600
GGGAGATTGGCCCGCACTCCGATCCCGCTTAGAGCTTGGGTGCTGTAGCCTCGGGTGCCTACTGCCAAGAGTCTCT 7680
CCCTGGAGCTGGGGGCGGGGCTGAGGCCGGATCTGATAGATAGCATCAAAGTTTTCTTTTTTTTTTAAATTTTAA 7760
AATTTTTACTTTAAACATAATGCCTTCTTTTACTCTTTCGCGCATAGAGAGCGCTACCGGTTAGAGGGAAGCAAAG 7840
GGGGTTGAGAGGATGGGTGAGTGAAGCGGAAGCTTTAGGTTTAAATGTTCTTTTTAACTGCGAGATAACTGTAGGT 7920
GACCCCCCCCCCCCCACACACACCCCAAGTCCGCTTAGGCCATCGCGCTTGGCCCTGGAAGGATTTCTCCAGC 8000
TCGGCACCTCTCTTCCCGCCAGTGGCTTAAAGTGCACAAAAGTTGATCGAATGCCGGTTACGTCACGAGTGCAG 8080
AGCGAGCCGCTGGAGTTGCAAGCCGGAAGTGGGAGCCTTCCGCCCCGGGCTGGCGCTGTGCACCTGAGGGACGCGC 8160
GTGGTTACTCTG 8172

7.1.2 Ermittelte Sequenz um Exon II

CGCAAATCTCGAGGACAGCAAATGCTTGTATGTCCAGTGAATGGAAAAGAGGACTGGAAACCCCAACAAGAAATTGTCTCT 80
 CTAGGGACTGTGAAGCGGACCTATGGACATGGCGTTAGCAAGTTAATCTCTTAGGAAATGTTAGCTCCCAGGTCACTTTTC 160
 CCCTCTACCTTTTACTAGCTAGGAACACTGGGTATGTCTATGTGATTCCCTAAACTCCGTTTCTTTGCCTTTGAATGGATA 240
 TGACAACAGTGGGGATTCTGTGTGCTGTGATGAATGTTAACTGAAATAATGAATGTCACACAGAGAGTGTCTCAGTGTAA 320
 GTCATGCTCGTGAGTTTCTTCCAGTGAGAAAAGCCATGACCACCTTGTACCCAAATCGGGGAGGGCTTGGTATAAAATAAG 400
 GATATCTCATGCTGTCTTTCTCATTATATACTTGAGCACATTATAACAATAACTTTCATGTATTTTCAGTTAGTAATTTGTTG 480
 TGTATACACACACACACACGCACATCTTATTCTTTGACATGCAGTAGTAGACAAACTTGTGCAAATGAAAGATTTGTAAC 560
 CAGACAGACAAGCCTATAATCCTATCATGCAGGAGGCAGACACAAGAGGTTTAGGAGTTCAAGGGCCATTCTTGGCAACA 640
 GAGCAGATTCTAGCATAGCCTCAGCCACCTAACACCCTTGTCTGAAAAGACAAGCCCGAATGAAGCACAACCTGTGAATTG 720
 ACTATGATAGATTATTGTTCTCGGATATTGATCGGAGAGTACGAATATTACTCTGTACAAGAATCACATGTTTAAATAAC 800
 AACCTCAGTAATGTAAGCATCTCACATAAAAGCACACTATCCCTCAGTAATGTACACATCTCACATAAAAGCACCTAT 880
 CTCCTGAAGGGAACCACTCACCCACTGTGGAGTGGGTTTTCAGTTCCATAGTTTTTGCTTCTTAAAGATTTCTAGTAAC 960
 ATGAACAGGGACAAGATGGAAGATGAACTGAGCCTGAAATAATAATAGTAATAATAAACAACAACAACCTGACAA 1040
 CGTGGCTTTTAAATGTAGAAAAACCGAATTACAGAAATAAGGAATAACGGGGTGTGCCAGGTAGCTGCAGTTTTCATTT 1120
 TCAATTTAAGCACCCTTTCATGCTAGTCAAGCTAGCATGAATGACACTTAGGGAGAGGAAAAAAAACCTCCCCCTTGA 1200
 ATGCTTTTAAATCTGTAATAATAATAATAGTATAAAGTGCATCTGGGCATCGCCTTCTGCTGCAGTTTCTGTCTGGC 1280
 GTTTGTCCAATGCTGTCAGGCTACTCTTGAGTGGTGTATGATTCATAGCCAGCACCTTTTATCTGAACACTGCAATGTCT 1360
 TTTCTTTGTACTTAAGCAGTGTATTACCTTGATGTTGAGAAATCTTTTAAAGCAAGTCTTCCCTTGTGTCTTGACAAA 1440
 TCATTGTCCACCAGTAATGAAGAAGAGGGAAATGCGCGAGCATTCTAAACACAAGAAAAATAACATGTATGGCGTATGGC 1520
 TCTCTTTGCAAGAAGTGGCCACGAGAGGATTCTCATTGAAATGCAGATCCTCTGATGAAACCTCAGGTTTCTTCTCT 1600
 ATGCCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTGAGACTTGAGGGTCTTGGGAGGCCAGCAGGACGGATTTCTCATTG 1680
 TTATCCTATCTTATTCTTGGGAAACTGAGGCTCTGGATGATGTATGACGTCATCAGATCCGAGTCTTAAAGCCAGTTCT 1760
 GCCCACTCAATGAGTAGAACCATCACTTTCTCCTTTAAACAATGTGTCTCTCCAAAGGGAATCTTTGTGAGAGATATT 1840
 TAGCATTGAGGAGAAAAGTAGTCTTATTCTCCAGGTTGAACATTAGTTCCTAAGTCTGAAAGTCTCATGAGTGGGTCT 1920
 CTACATTTAAGAAGTCAATGGGAAACTGGGGGGCTGGGAGGATCCTGGAATGAGAAGGAGTCTGGGAATCATCCCAGA 2000
 GATAACCAAGGGACGAGGATTTTACGTGTGGGAAAGCGAAAGGAGAATCCAGAGACTGCTGACATCTCGGAATGTTT 2080
 TATAGACTACCTTGACAGAAGAAGAAATAGATTGCGCCTTTGTAAGTCCAGGCAGCAGAAGTCCGATCCGTTGGTATG 2160
 TACACAGAAGCAGATTTATGCTCAATACAGGAAGAAAGTTTCTAACATTTAGAGATGTCCAAAAATGGAATTGACCCGCT 2240
 CATCATCACTGGGAAGTGTTCATGTGAGACTGACTGTCCCGCATGAAGATTATGGCACTTTATGAGTGTGTATTTCAGC 2320
 AGGAACACAGTTTATGTTGAACCTTTCTGAGGGCTTAGGGAAGAAATTTCTCAGGAGCTAAAAACAAAAGCTTTTTTTT 2400
 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGATGCTTTCTGCGCCATGACTTTAGGCTGAGAAAGATTTACCCATATGACCCCTGA 2480
 TTCCCACTTCAGTATGCTCTGTGAAATACATTTAGCTGTTTGGAAAGAGTCAATTAATTAACAAGAGAAAGCCATAGTTT 2560
 TATAAAGTTAAACTGAAGCGGGATTTGGTACTCGCAGGGGTGATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAT 2640
 GTAAAACGTTTCAAATCAGGCTATAAATCCTAAGCGTTTCAGTGAAGACTTTTCATACAAAATGTTTGTATCTCCAAAGTTA 2720
 TTGAAGGATACAAGTGTAGATTCCGAGCAGAAACACCTCCCGGTATGAATTACCGTGTCTTTCTCTGTTTCCAACAG 2800
ATTCCAGAGGGGTGACTACCACATTGATGTCTGTATCAATGACTACCTGGATGTTTTCTGCCCTCACTATGAGGACTCTG 2880
TCCCAGAAGACAAGACTGAGCGTACGTCCTGTACATGGTGAATTTTGATGGGTACAGTGCCTGCGACCACAGTCCAAA 2960
GGGTTCAAGAGATGGAAATGTAACCGCCTCACTCCCCAACGGACCGCTGAAGTTCTCGGAAAAATTCAGCTCTTCAC 3040
TCCCTTTTCTTTAGGATTTGAATTCAGGCCAGGCCGAGAGTATTTCTACATCTGTGAGTACCTGGAGATTTATTACGTT 3120
 GTGGGGCAGCTGCAAACTCTTGACTGATTTCTTCTCTTTTTTTTAAACCTGTGTTTTGGAGAAGTGCACAGCTGGACT 3200
 CTGTGTTACAGATGTCTCCTTGTGAACACATACATCATGATCCCTAGATACATTAGCTGGGAATTGAGAGCCCAATTAG 3280
 ATTAAGCAACCGCACCTCTTCTCTATGAAACCCCGTGTGAGCCTGTGAGTGAACCACTGCCGACATTTATTTCTTTT 3360
 AAATGAAAATGCCAGGACTATTTTCTTTTTTTAAATCTTGGAGAAAGGGAAAAAAAAGATTTCTGGAAATAAAAAA 3440
 AAAAATGAAGGAATAATTAATTTACATAACTTGGAGTCC 3482

7.1.3 Ermittelte Sequenz um die Exons III/IV

```

CCCGCAGGCCTTGATACCGAAGTTACAGTGAATCTTAAAAGTAGGGAAGTATATATCTTCCCGAAAAACTCTCCTCAG      80
TGTGAACTAAAATGTTGTGCGTGTCTTTGTACCCATTTATAATCCATCCTTCTCTGGGAAAAATTAAGGAAGATAAACATG      160
CTAAAAAACCGGTGCTTTCAAAGCAATTGTGCTCAAAGCACTGCGGAGTCGCCGGGTTCCAGCCAGTCATATAGAAGAAA      240
GCACAGCCAAATCCCCAGAAAACTCAAAAATACCTGCTGCGGAGCACTGACAGAAAAGCTTTCAGGACAGAAAAAGCTCT      320
GCTTTCCCCAGCAGAAGTAGGTCAAGTTGAAGTCCGCCTTGTAAGTGTCTGTTACGGGTTTTGACAGCACTCTCACTGTG      400
GGGCTCTGCTGGGCTCTTTTTTTTTTTTCCCTGTGGTTGAGGAGCTGTTCCTGAAGCAAGAGAGTTCAGGCATTATCCC      480
TCCCATTAGAGAAAATGATAGCAGATCAAGTGAAAGGGGAGTGACTTGAAATAGAACTAAGCATTTCCTATAGG      560
ATTACCACATTCCTGCATGATTCCTCTTTATTTGTTTTGGGGAAAAAAGATGGGAATATGAGAGTCGCCTTC      640
CTATAGCATTAGCTCAGTCTGGAAGTATGTTTGTCTTAACTTCAGGACAAGACGCAGACAAGTGTATATCCCAGCAAG      720
AGTTTGAGTAGAGCATTATTTCGCATGTGTAACAAGAGTAATGAGTTGTTATTCTCTCTTTTTCTTCTGCCCTCTC      800
TCTTTGCCCTCACCCACAGCCTCTGCAATCCAGACAACGGGAAGAAGGTCCTGTCTAAAGCTCAAAGCTTTTGTGAGACCA      880
ACAAGTAAGTCTAGAAAAGAGCTTCTGAGGGTCCCCCTCACTGCGCATGCTCCATCCTATGGTCTGGTTACAGCGGTA      960
AAATCTGTTTTCATTCTGTTGTATCTATTTATTTTACTGTTCCAGACGTTGTGGTACCTGTTTTGTATATCCACATC      1040
CATGTTTGAGTTTTCCATCATATTTTTTTCCTCATTCTCATGATGCTTTTTTATTTTCGTGTATCGAAGGCCAGCAG      1120
TTGCTAACTTGTGTTTTCTCAGACTGTGTCCATGCACACAGCAACGGGAACGATACTGGCATGTGGATACATGCCATG      1200
GATTGTAATGAAACAATCTCTACATTAATAAAAGGAAACGATAGAGAGAAAAGAAAAAAGAGGAAGTGGGAGTTTAAAG      1280
GTGCTTCACTAACATATTTGGCTGTATCTCTATTTTCGTTATAGATAGCTGTATGAAAACATAGGTGTTTATGATCG      1360
TGTTTTCGATGTTAACGACAAAGTAGAAAATTCATTAGAACCCAGCAGGTAGTATGCTTAGAGAATCTCTTGTAAACAA      1440
CGCATCTCTCCTCCGGTGCCTTAGTCCCTGTTTTCTTTCTCTTTCTGTCATGCGTGCATGCGCCCGTGTGTTTCTGCTTC      1520
TGCCATTGTAGCCGCTTGCTAATATTACTTATCTTCTATCTCATTCTCCAGTATTTTTGTGTAGTGCATGCTAGATA      1600
GAGTACAACCTTTTCTTTCTGGACATGGGTCCCATGGAAAGCAGTTATTCTAATATAGAAGCCCTAAATACTAAAATCCC      1680
ACTGTCTTCTACCACAGCCTCACGTGTGTCAATGGATCACAGTACATATAAAGCCAGTTTTTCATACAAGACAGAAAACAT      1760
TTCTACTGTACATGTTTATGAAACTTTCTTTTATTTTCTTAATACCATATCCAAATCCGTGGATAAAAGCAGTAAGATG      1840
ACTGCACCAAATTAGCGACTGATTTAGCTTTCTCTAGTGCATCCAATGACGAACTGACTAAACGTG      1907

```

7.1.4 Ermittelte Sequenz um Exon V

```

TTAAGGGATGTGAATCTCATGAATGTGGCTCTCTATTGAACAGATGACACCGTACATGAGTCACCGAGCCATCCCGGGT      80
GAGAACCGCGCGCAGACACCAAGGGATCCCACCCCTTTTGGCAACCCTACTGTCCCTCCTGGCGATGCTTTTGACATTAT      160
AGCACAGTCTCGTGCTGTCACAGAAAATGTCAGGGTCTTGGAAACCACCAGAGATCCACTAACTGCTCATCCCAAGAAGG      240
GACTTGTTATGGTTTTTGGCAGATGCAGATTTTGTTTTCCCTTCAGCTGATTTCTAAGCAACAACCTGGGGTTGTTG      320
GGTGGGTGGGGGGGGAACCCAGTTGCTGCCTCCTTACCCCCACCCTAACCCCTAAGCCCTTGCCTTGACTCCTCTCAT      400
CCCCTTCCAATCAAACGGAGTCCAGATAAAAATGCCAGATTGTGAGAGTGACAGCAGCAGGTCTTGGCCTCCTGTGCGT      480
TTCTAGA      487

```

7.2 Ein- und Dreibuchstaben-Code für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Dr. Wolfgang Wurst für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe am Institut für Säugetiergenetik der GSF sowie am Max-Planck-Institut für Psychiatrie bedanken. Mein Dank gilt natürlich auch der Überlassung dieses interessanten Themas sowie seiner umfassenden, fachlichen und persönlichen Betreuung, die sich im angenehmen Klima und der hervorragenden Produktivität der ganzen Arbeitsgruppe widerspiegelt. Seine konstruktive Kritik hat mir immer wieder neue Perspektiven für die Durchführung dieser Arbeit aufgezeigt. Nicht zu vergessen wäre auch sein persönlicher Einsatz zu meiner finanziellen Unterstützung sowie die ausgezeichnete Ausstattung des Labors, die den Abschied von der Laborbank schwermacht.

Bei Prof. Rudi Balling, Direktor des Instituts für Säugetiergenetik der GSF und bei Prof. Florian Holsboer, Direktor des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, möchte ich mich für die gegebene Möglichkeit bedanken, an ihren jeweiligen Instituten meine Doktorarbeit durchführen zu haben. Die hervorragende Ausstattung dieser Institute, die zweifellos auf den persönlichen Einsatz ihrer Leiter zurückzuführen ist, hat es mir erlaubt jeden experimentellen Gedanken in die Tat umzusetzen. Bei Prof. Rudi Balling bedanke ich mich darüberhinaus für die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Dr. Wolfgang Wurst. Durch ihre kollegiale und immer hilfsbereite Art haben sie zu der angenehmen Atmosphäre beigetragen, die erfolgreiches Arbeiten in der wissenschaftlichen Forschung voraussetzt. Besonders hervorheben möchte ich jedoch Dr. Veronique Blanquet, für ihre fachlichen Ratschläge und hochqualifizierte Anleitung insbesondere zu Beginn meiner Arbeiten, was mir den Start erleichtert hat. Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Alexander von Holst, der durch seine außergewöhnliche fachliche Kompetenz und Übersicht über das weite Feld der Neurobiologie mir bei jeder Fragestellung hilfreich zur Seite gestanden hat und mich vor allem bei der Verfassung der Dissertation engagiert unterstützt hat. Bei Dr. Daniela Vogt-Weißhorn möchte ich mich für die Kooperation bei einzelnen Projekten bedanken. Ihr unermüdlicher Einsatz bei der Aufklärung anatomischer Sachverhalte und der tiefe Einblick, den sie mir in die Neuroanatomie gegeben hat, war für mich von unschätzbarem Wert. Dr. Christiane von Holst gilt mein Dank für die Korrekturlesung dieses Manuskripts und die teilweise Ausmerzungen meiner „Wurdemanie“. Bei Dr. Laure Bally-Cuif möchte ich mich für die Unterstützung bei der Abfassung englischsprachiger Manuskripte bedanken. Mein Dank gilt auch Dr. Jens Preil sowie Dr. Pablo Hagemeyer für die Durchsicht von Teilen dieses Manuskripts und Dr. Vania Broccoli für seine Unterstützung bei den *in situ*-Hybridisierungen. Dr. Thomas Metz danke ich für unzählige kritische und konstruktive Diskussionen, die zur Schärfung meiner wissenschaftlichen Denkweise und Argumentationsfähigkeit beigetragen haben.

Bei den technischen Assistentinnen unserer Arbeitsgruppe möchte ich mich für die unterschiedlichsten Hilfestellungen bedanken, die mir so manches erleichtert haben. Mein

besonderer Dank gilt Susanne Bourier für die Unterstützung in der ES-Zellkultur sowie Beate Klaedtke und Petra Westphal für die mehr als erfolgreich verlaufenen Blastocysten-Injektionen und Embryo-Rücktransfers. An dieser Stelle sollen auch die freundlichen Tierpflegerinnen des Streifen C nicht vergessen werden, die in Pflege und Zucht der Mäuse hervorragendes geleistet haben.

Bei den Sekretärinnen Sandra Rengsberger und Elisabeth Güll möchte ich mich für die hervorragende Arbeit bedanken, die sie in Hinblick auf Organisation und Bestellwesen in der Arbeitsgruppe leisten. Besonders dankbar bin auch für ihren engagierten Einsatz bei der Fertigstellung diverser Anträge. Dieser Dank gilt natürlich auch für das Sekretariat der Säugetiergenetik, wo mir Heidi Peczkowski und Anne Schubert sehr geholfen haben.

Schließlich gilt mein Dank allen Mitgliedern der anderen Arbeitsgruppen in den beiden Instituten, die mir bei kleineren und größeren Problemen des Laboralltags geholfen haben. Es wären zuviele, um sie hier einzeln zu erwähnen. Hervorheben möchte ich jedoch Dr. Thomas Werner, Leiter der Arbeitsgruppe für biologische Datenverarbeitung, für die Hilfe bei der rechnergestützten Promotor-Analyse des *Ephrin-A5*-Gens und Dr. Alexander Yassouridis für seine Hilfe bei statistischen Fragestellungen.

Bei Dr. Uwe Drescher und Bernd Knöll am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen bedanke ich mich für die erfolgreiche Zusammenarbeit an diesem Projekt. Bei Prof. Solon Thanos an der Universität Münster möchte ich mich für die fruchtbare Zusammenarbeit bei der Analyse der retinocolliculären Projektionen bedanken. Gleichermaßen möchte ich mich bei Prof. Jürgen Bolz an der Universität Jena für die Zusammenarbeit bei der Analyse des thalamocorticalen Phänotyps bedanken.

Bei Martina Elfinger möchte ich mich für ihre Hilfe bei der Erstellung von Abbildungen bedanken. Durch ihr untrügliches ästhetisches Empfinden hat sie es möglich gemacht, auch die nüchternsten wissenschaftlichen Abbildungen ansprechend zu gestalten. Achilleas Ziogas danke ich für seine Unterstützung bei der Überwindung von Computerproblemen und bei der Ausmerzung so manch absurden Computerbugs, wofür ich wiederum Microsoft verpflichtet bin.

Abschließend gilt mein Respekt und Dank meinen Eltern, die mir das Studium der Biologie ermöglicht haben und mich während der Jahre der Doktorarbeit mannigfaltig unterstützt haben.