

Abb. 28. (A) Schematische Darstellung des Expressionsmusters von *UCH-L1*-mRNA (rote Punkte) in der RGC-Schicht am Tag E4,5, das in einem Gradienten (verblässender Pfeil) von T nach N verläuft. (B) Korrespondierende in situ-Hybridisierung auf 14 µm Gefrierschnitten mit nicht-radioaktiven *UCH-L1*-Sonden. Die temporalen RGCs zeigen stärkere Hybridisierungssignale als die nasalen RGCs. (B') Schematische Darstellung der sich bildenden RGC-Schicht (Vetter und Brown, 2001). Zu Beginn der retinalen Neurogenese findet nach wie vor Zellproliferation (blau) auf der skleralen Seite des Augenbechers statt. Währenddessen wandern postmitotische retinale Vorläuferzellen (rosa) auf die vitreale Seite des Augenbechers, wo sie sich niederlassen und zu „reifen“ RGCs (violett) differenzieren. Pap: Papille. Maßstab, 250 µm (schwarzer Balken in B), 50 µm (weisser Balken in B').

### 13. Computeranalysen der Aminosäuresequenz von UCH-L1

Für die Computeranalysen wurde die aus embryonaler Hühnerretina klonierte und sequenzierte *UCH-L1*-Gensequenz verwandt (Abschn. 14). Die *UCH-L1*-Aminosäuresequenz wurde von der Gensequenz abgeleitet (Abb. 29). Die konservierten Aminosäurereste Cystein (C), Histidin (H) und Aspartat (D), die wichtige Bestandteile des katalytischen Zentrums einer Ubiquitin C-terminalen Hydrolase sind, wurden rot markiert.

1	ATG	GCG	TGG	CAG	CCC	ATG	GAG	ATC	AAC	CCC	GAG	ATG	CTG	AAC	AAA	45
1	M	A	W	Q	P	M	E	I	N	P	E	M	L	N	K	15
46	GTG	CTG	TCC	CGC	CTC	GGG	GTG	AGC	CCC	GGC	TGG	CGC	TTC	GTG	GAC	90
16	V	L	S	R	L	G	V	S	P	G	W	R	F	V	D	30
91	GTG	CTG	GGC	TTC	GAG	GAG	GAG	GCT	CTG	GGT	GCC	GTT	CCC	AGC	CCG	135
31	V	L	G	F	E	E	E	A	L	G	A	V	P	S	P	45
136	GCC	TGC	GCC	CTG	CTG	CTC	CTC	TTC	CCC	CTC	ACC	GAG	CAG	CAT	GAG	180
46	A	C	A	L	L	L	L	F	P	L	T	E	Q	H	E	60
181	AAC	TTT	AGG	AAA	CAA	CAG	ACT	GAG	AAA	ATA	AAG	GAC	CAA	GAA	ATC	225
61	N	F	R	K	Q	Q	T	E	K	I	K	D	Q	E	I	75
226	AGT	TCC	AAG	GTG	TAT	TTC	CTG	AAG	CAG	ACT	GTC	AGT	AAC	TCC	TGC	270
76	S	S	K	V	Y	F	L	K	Q	T	V	S	N	S	C	90
271	GGG	ACG	ATT	GGT	CTG	ATA	CAT	GCA	GTT	GCT	AAT	AAC	AAA	GAC	AAA	315
91	G	T	I	G	L	I	H	A	V	A	N	N	K	D	K	105
316	GTT	AAA	CTT	GAT	GAG	GGA	TCT	GCC	CTG	AAG	AAA	TTT	CTT	GAT	GAA	360
106	V	K	L	D	E	G	S	A	L	K	K	F	L	D	E	120
361	ACA	GCT	GAT	CTG	TCT	CCT	GAA	GAG	AGA	GCT	AAG	CGT	TTT	GCA	AAT	405
121	T	A	D	L	S	P	E	E	R	A	K	R	F	A	N	135
406	AAT	AAG	GCT	ATA	CAA	GAA	GTC	CAC	AAC	TCT	GTT	GCA	CAG	GAA	GGA	450
136	N	K	A	I	Q	E	V	H	N	S	V	A	Q	E	G	150
451	CAG	TGT	CGG	GTT	GAG	GAC	AAC	AGT	GTG	AAC	TTC	CAC	TTC	ATC	CTG	495
151	Q	C	R	V	E	D	N	S	V	N	F	H	F	I	L	165
496	TTT	GCT	AAT	GTG	GAT	GGA	CAT	CTG	TAT	GAA	CTG	GAT	GGG	CGT	TTG	540
166	F	A	N	V	D	G	H	L	Y	E	L	D	G	R	L	180
541	CCA	TTT	CCT	GTA	AAC	CAT	GGC	ACA	AGC	TCA	GAT	GAC	TTG	CTA	TTG	585
181	P	F	P	V	N	H	G	T	S	S	D	D	L	L	L	195
586	AAG	GAT	TCT	GCT	AAG	ATC	TGC	AGA	CAA	TTT	ACA	GAA	CGT	GAA	AAA	630
196	K	D	S	A	K	I	C	R	Q	F	T	E	R	E	K	210
631	GGA	GAA	GTT	CGT	TTT	TCT	GCT	GTG	GCT	TTC	TGC	AAG	TCT	GCC	TGA	675
211	G	E	V	R	F	S	A	V	A	F	C	K	S	A	*	

Abb. 29. Kodierende DNA-Sequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz von UCH-L1 des Hühnchens. Das Adenin des ATG-Startcodons wurde +1 gesetzt. Die konservierten Cystein-, Histidin- und Aspartatreste sind durch rote Buchstabenfarbe hervorgehoben. \*Stopp-Kodon.

Anhand der UCH-L1-Aminosäuresequenz wurden mit Pepstats (Abschn. 28.6) verschiedene allgemeine physikochemische Eigenschaften von UCH-L1 des Hühnchens berechnet (Tab. 3).

Tab. 3. Potentielle physikochemische Eigenschaften von UCH-L1 des Hühnchens. EMBL NSD: „EMBL Nucleotide Sequence Database“.

Protein	Spezies	Aminosäure- reste	Molekulare Masse	Nettoladung	Isoelektrischer Punkt	EMBL NSD
UCH-L1	<i>G. gallus</i>	224	25,1 kDa	-2,0	5,966	AJ621938

Um die globalen Sequenzidentitäten und globalen Sequenzähnlichkeiten zwischen den UCH-L1-Aminosäuresequenzen von Hühnchen und anderen Spezies zu berechnen, wurden paarweise Sequenzvergleiche („pairwise sequence alignments“) durchgeführt. Hierfür wurden einige Sequenzen von wichtigen Modellorganismen ausgewählt. Die mit Hilfe von Needle (Abschn. 28.7) berechneten Werte wurden in Tab. 4 eingetragen. Die Pferde-Sequenz wurde in die Tabelle aufgenommen, weil sie unter den Wirbeltieren die größte Sequenzidentität und –ähnlichkeit zu der Hühnchen-Sequenz aufwies. Es wurde festgestellt, dass die größten Identitäten (I) und Ähnlichkeiten (Ä) zwischen der UCH-L1-Aminosäuresequenz von Hühnchen, Pferd (I: 75,4%; Ä: 88,0%), Mensch (I: 75,0%; Ä: 87,9) und Maus (I: 74,6%; Ä: 87,5%) bestehen.

Die UCH-L1-Aminosäuresequenzen des Hühnchens und der ausgewählten Spezies wurden auch in einen mehrfachen Sequenzvergleich („multiple sequence alignment“) eingesetzt (Abb. 30). Hierfür wurde ClustalW benutzt (Abschn. 28.8).

Tab. 4. Globale Sequenzidentitäten und globale Sequenzähnlichkeiten zwischen UCH-L1 des Hühnchens und verschiedenen Mitgliedern der UCH-Familie. gb: GenBank. nsd: EMBL NSD. sw: Swiss-Prot. tr: TrEMBL.

Protein	Spezies	Globale Sequenzidentität [%]	Globale Sequenzähnlichkeit [%]	Datenbank	Referenz
UCH-L1	Hühnchen ( <i>G. gallus</i> )	100	100	AJ621938 (nsd)	Diese Arbeit
UCH-L1	Pferd ( <i>E. caballus</i> )	75,4	88,8	Q9GM50 (sw)	(Sato et al., 2004)
UCH-L1	Mensch ( <i>H. sapiens</i> )	75,0	87,9	P09936 (sw)	(Liu et al., 2002)
Uch-11	Maus ( <i>M. musculus</i> )	74,6	87,5	Q9R0P9 (sw)	(Saigoh et al., 1999)
uchl1	Zebrafisch ( <i>D. rerio</i> )	64,4	76,9	Q6Y149 (tr)	(Son et al., 2003)
Uch	Fruchtfliege ( <i>Drosophila spec.</i> )	41,5	63,8	Q9TWA0 (tr)	(Wilkinson et al., 1992)
ubh-1	Fadenwurm ( <i>C. elegans</i> )	37,2	56,6	AF125955 (gb)	(1998)
YUH1	Bäckerhefe ( <i>S. cerevisiae</i> )	27,1	43,1	P35127 (sw)	(Miller et al., 1989)

<i>S. cerevisiae</i>	1	MSGENRAVVPIESNPEVFTNFAHKLGLKNEWAYFDIYSLTEPELLAFLPR	50
<i>C. elegans</i>	1	---MAAPWTPLESNPSVINPMIEKMGVS-GVKITVDVLFDD-ESIG---K	42
<i>D. melanogaster</i>	1	----MLTWTPLESNPEVLTKYIHKLVSPAWSVTDVIGLED-DTLEWIPR	45
<i>D. rerio</i>	1	-----MEWKPMELNPEMLNKVLSKLVGSKWRFDVVLGLED-ESLSGVPS	44
<i>E. caballus</i>	1	-----MQLKPMELNPEMLNKVLARLGVAGQWRFDVVLGLEE-ETLGSVPA	44
<i>M. musculus</i>	1	-----MQLKPMELNPEMLNKVLAKLVAGQWRFDVVLGLEE-ETLGSVPS	44
<i>H. sapiens</i>	1	-----MQLKPMELNPEMLNKVLSRLGVAGQWRFDVVLGLEE-ESLSGVPA	44
<i>G. gallus</i>	1	-----MAWQPMELNPEMLNKVLSRLGVSPGWRFDVVLGFEE-EALGAVPS	44
<i>S. cerevisiae</i>	51	PVKALVLLFPINEDRKSSTSQ---ITSSYD-----VIWFKQSVKNACG	91
<i>C. elegans</i>	43	PQHAVILCFPEYKKVDEIMKPIYEQAKAADD-----VFFMKQKISNACG	87
<i>D. melanogaster</i>	46	PVKAFILLFPCSETYEKHRAEHHDRIKEVEEQHP-EDLFYMRQFTHNACG	94
<i>D. rerio</i>	45	PCCAMMLLFPLTQQHEDFRSKQS--VGDKD-----VYFLKQTVVNSCG	86
<i>E. caballus</i>	45	PACALLLLFPLTAQHENFRKKQ---IEELKGQEVSPKVVYFMKQITIGNSCG	91
<i>M. musculus</i>	45	PACALLLLFPLTAQHENFRKKQ---IEELKGQEVSPKVVYFMKQITIGNSCG	91
<i>H. sapiens</i>	45	PACALLLLFPLTAQHENFRKKQ---IEELKGQEVSPKVVYFMKQITIGNSCG	91
<i>G. gallus</i>	45	PACALLLLFPLTEQHENFRKKQ---TEKIKDQEISSKVYFLKQITVSNCSG	91
<i>S. cerevisiae</i>	92	LYAILHSLSNQ---LLEPGSDLDNFKSQTSSSKNRFDDVTTDQFVL	139
<i>C. elegans</i>	88	TFALFHSLANLEDRINLGDG-SFAKWLAEAKKVGI-EERSDFLANN----	131
<i>D. melanogaster</i>	95	TVALIHVSANNKE-VDIDRG-VLKDFEIKTASLSP-EERGRALEKD----	137
<i>D. rerio</i>	87	TVGLVHAVANNQDSIDFDNNSALKKFEATSGMSP-AERAKELEQN----	131
<i>E. caballus</i>	92	TIGLIHAVANNQDKLEFEDGSVLKQFSETTEKLSPE-EDRAKCFEKN----	136
<i>M. musculus</i>	92	TIGLIHAVANNQDKLEFEDGSVLKQFSETTEKLSPE-EDRAKCFEKN----	136
<i>H. sapiens</i>	92	TIGLIHAVANNQDKLGFEDGSVLKQFSETTEKMSPE-EDRAKCFEKN----	136
<i>G. gallus</i>	92	TIGLIHAVANNKDKVKLDEGSALKKFEDETADLSP-EERAKRFANN----	136
<i>S. cerevisiae</i>	140	NVIKENVQTFSTGQSEAPEATADTNLEHITTYVEENGIFELDGRNLSGPL	189
<i>C. elegans</i>	132	AELAGIHAAAATDGTAPSGD--VEHHEICFVGKNGILYEDSR-RPFAR	178
<i>D. melanogaster</i>	138	EKFTADHEALAQEGQTNAANHEKVIHEHIALVNKEGTLYELDGR-KSFPI	186
<i>D. rerio</i>	132	KAIQETHDAVADEGQCRPEADK-VNEHFIITFVNVNRLYELDGR-IDGPV	179
<i>E. caballus</i>	137	EAIQAAHDAVAQEGQCRVDDK--VNEHFIIFNNDCHLYELDGR-MPPFV	183
<i>M. musculus</i>	137	EAIQAAHDSVAQEGQCRVDDK--VNEHFIIFNNDCHLYELDGR-MPPFV	183
<i>H. sapiens</i>	137	EAIQAAHDAVAQEGQCRVDDK--VNEHFIIFNNDCHLYELDGR-MPPFV	183
<i>G. gallus</i>	137	KAIQEVHNSVAQEGQCRVEDNS-VNEHFIIFANVDCHLYELDGR-LPPFV	184
<i>S. cerevisiae</i>	190	YLCKSDPTATDLIEQELVRRVRSYMEANANEDVLEFAMGLGPNWE	236
<i>C. elegans</i>	179	EIG---PTSDATLVKDAGAA-CQHLE--KLDN-VSFSIAIVVNQ--	216
<i>D. melanogaster</i>	187	KHG---PTSEETFVKDAAKV-CKEFMA--RDPNEVRFVLLALTAQQ	227
<i>D. rerio</i>	180	SHG---PTKPDFVMDAARV-CREFME--REKGEVRFSAVALCKA--	218
<i>E. caballus</i>	184	NHG---TSSDLLLQDAAKV-CREFTE--REQGEVRFSAVALCKAA-	223
<i>M. musculus</i>	184	NHG---ASSEDLLQDAAKV-CREFTE--REQGEVRFSAVALCKAA-	223
<i>H. sapiens</i>	184	NHG---ASSEDLLKDAKV-CREFTE--REQGEVRFSAVALCKAA-	223
<i>G. gallus</i>	185	NHG---TSSDLLLKDSAKI-CRQFTE--REKGEVRFSAVAFCKSA-	224

Abb. 30. Mehrfacher Sequenzvergleich zwischen UCH-L1 des Hühnchens und verschiedenen Mitgliedern der UCH-Familie. Die konservierten Aminosäuren Cystein (C), Histidin (H) und Aspartat (D) sind durch rote Pfeilspitzen gekennzeichnet. Im Vergleich zum Menschen, der Maus und dem Pferd, weist das Hühnchen an Position 158 einen zusätzlichen Serinrest auf (blaue Pfeilspitze). Der Schattierungsgrenzwert von ClustalW lag bei 95%.

Aus dem mehrfachen Sequenzvergleich ist ein Ergebnis hervorzuheben. Im Vergleich zu Mensch, Maus und Pferd besaß die UCH-L1-Aminosäuresequenz des Hühnchens an der Position 158 einen zusätzlichen Serin-Rest (blaue Pfeilspitze in Abb. 30). Die Existenz von Ser-158 wurde mehrfach bestätigt. Erstens: durch vollständige oder teilweise Sequenzierung von vier verschiedenen UCH-L1-Klonen (cDNA-Klon der Microarray-Experimente und die drei RCASBP(B)-Konstrukte). Zweitens: durch Sequenzierung von Strang- und Gegenstrang. Um zu prüfen, ob Ser-158 eine Abweichung gegenüber dem Konsensusmuster der UCH-Familie verursacht, wurde mit der UCH-L1-Sequenz des Hühnchens eine ScanProsite-Suche in der Prosite-Datenbank durchgeführt (Abschn. 28.9). Das UCH-Konsensusmuster, das sich von Position 84 bis 100 erstreckte, beinhaltete den Cystein-Rest des katalytischen Zentrums an Position 90 (rote Pfeilspitze in Abb. 30). Es stellte sich jedoch heraus, dass Ser-158 außerhalb von Sequenzabschnitten lag, die hochkonservierte Aminosäure-Reste umfassen. Daher verursachte dieser Serin-Rest auch keine Verletzung des Konsensusmusters.

#### **14. Effekt der retroviralen Fehlexpression von *UCH-L1* auf das in vitro-Wachstumsverhalten von nasalen und temporalen Ganglienzellaxonen**

Um den Effekt der retroviralen Fehlexpression von *UCH-L1* auf das Wachstum von RGC-Axonen zu untersuchen, wurde RCASBP(B)-*UCH-L1-eGFP* konstruiert. Dieser retrovirale DNA-Vektor diente zur Herstellung von infektiösen replikationskompetenten Retroviruspartikeln (Abschn. 26.2), die für den in vitro-Axonstreifenversuch benutzt wurden. Daneben wurden RCASBP(B)-*UCH-L1-FLU*<sup>14</sup> und RCASBP(B)-*UCH-L1* konstruiert, die jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter verwandt wurden.

Zu Beginn wurde Gesamt-RNA aus dem Gewebe einer embryonalen E6,5-Hühnchenretina isoliert. Da drei verschiedene Konstrukte hergestellt werden sollten, wurde die vollständige kodierende Sequenz des *UCH-L1*-Gens nach drei Strategien in RCASBP(B) kloniert. Hierzu wurden auf Grundlage des sequenzierten 3'-Endes des *UCH-L1*-cDNA-Klons (Abschn. 12.1) zwei 3'-Oligonukleotide abgeleitet. Erstens: cUCH\_III, das das Stoppkodon nicht veränderte. Und zweitens: cUCH\_II, welches das Stoppkodon durch Einführung eines Alanin-Kodons auflöste, um den Leserahmen von *UCH-L1* mit *eGFP* oder *FLU* zu fusionieren. Beide 3'-Oligonukleotide trugen eine 3' vom Stopp- bzw. Alaninkodon gelegene *EcoRI*-Erkennungssequenz. Das 5'-Ende von *UCH-L1* wurde anhand des EST ("expressed sequence tag") ChEST170k12 (GenBank BU412410.1) vorhergesagt. Von dieser EST-Sequenz wurde das 5'-Oligonukleotid cUCH\_I abgeleitet, das eine *BsaI*- mit impliziter *NcoI*-Erkennungssequenz trug. Die Verwendung der *BsaI*-Schnittstelle, die das ATG-Startkodon umfasste, war notwendig, weil die vollständige *UCH-*

<sup>14</sup> RCASBP(B)-Vektor für das Influenza-Haemagglutinin (HA)-„epitope tagging“.

*LI*-Sequenz zwei *NcoI*-Schnittstellen enthält. Somit wurde durch *BsaI*-Restriktion ein *NcoI*-kompatibles 5'-Ende erzeugt, ohne *UCH-L1* zu fragmentieren. In zwei verschiedenen RT-PCR-Experimenten wurde *UCH-L1*-mRNA in *UCH-L1-Stopp*-cDNA (cUCH\_I/cUCH\_III) und in *UCH-L1-Ala*-cDNA (cUCH\_I/cUCH\_II) umgeschrieben und amplifiziert. Die PCR-Produkte von *UCH-L1-Stopp* und *UCH-L1-Ala* wurden mit *EcoRI*, dann mit *BsaI* geschnitten. Die Adaptor-Vektoren pSLAX-21, pSLAX-13-*eGFP* und pSLAX-*FLU* wurden mit *EcoRI/NcoI* geschnitten und dephosphoryliert. Für die Konstruktion von RCASBP(B)-*UCH-L1* wurde die *UCH-L1-Stopp*-cDNA gerichtet in pSLAX-21 kloniert. Vorstufen von RCASBP(B)-*UCH-L1-eGFP* bzw. RCASBP(B)-*UCH-L1-FLU* wurden erzeugt, indem die *UCH-L1-Ala*-cDNA gerichtet in pSLAX-*eGFP* bzw. in pSLAX-*FLU* kloniert wurde. Um die 5'-3'-Orientierung der gerichteten Klonierung zu prüfen, wurden Kolonie-PCR-Experimente durchgeführt (b93\_254/T3). pSLAX-*UCH-L1*, pSLAX-*UCH-L1-eGFP* und pSLAX-*UCH-L1-FLU* wurden mit *Clal* geschnitten. Anschließend wurden die drei *Clal*-Fragmente jeweils in einen mit *Clal*-linearisierten RCASBP(B)-Vektor ungerichtet kloniert. Die erforderliche 5'-3'-Orientierung der cDNA-Fragmente wurde durch Kolonie-PCR-Experimente geprüft (RCAS-3'/cUch\_I).

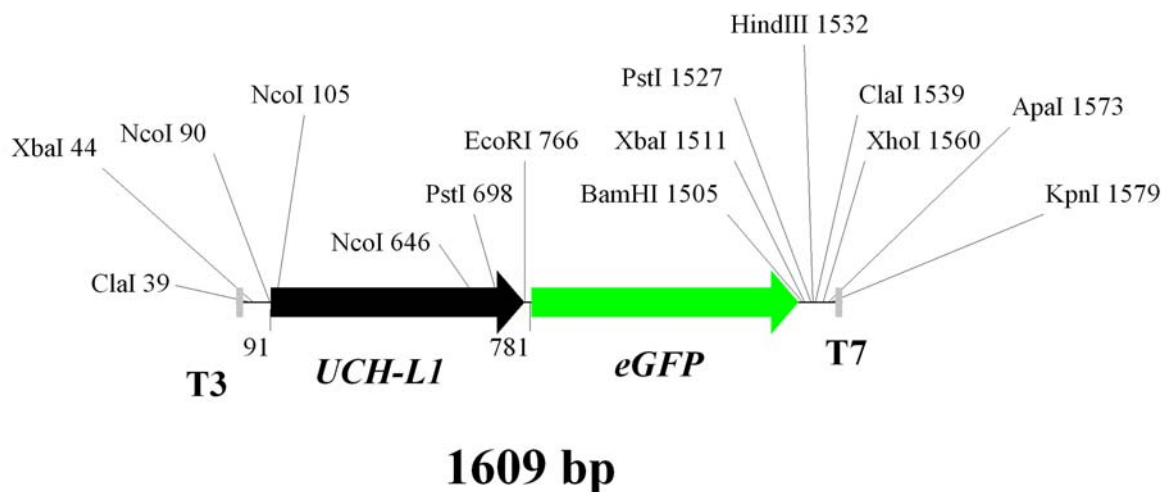


Abb. 31. Restriktionskarte von *UCH-L1-eGFP*. Die T3- und T7-Oligonukleotidstellen flankieren die Vielfachklonierungsstelle von pSLAX13. Dieses Plasmid wurde von pBluescript abgeleitet und dient als Adaptor für RCASBP-Vektoren. Das erste Nukleotid des offenen Leserahmens von *UCH-L1* (91) und *eGFP* (781) ist angegeben. Das *BsaI/EcoRI*-*UCH-L1*-cDNA-Fragment wurde über die *NcoI*(90)/*EcoRI*(766)-Schnittstellen eingefügt. Da *UCH-L1* zwei interne *NcoI*-Schnittstellen hat, wurde es an seinem 5'-Ende nicht mit *NcoI*, sondern mit *BsaI* geschnitten. *BsaI* umfasste die *NcoI*-Schnittstelle. Um *UCH-L1-eGFP* in RCASBP(B) zu klonieren, wurde es anschließend durch *Clal* (39; 1539) aus pSLAX13 geschnitten und über die *Clal*-Schnittstelle in RCASBP(B) eingefügt.

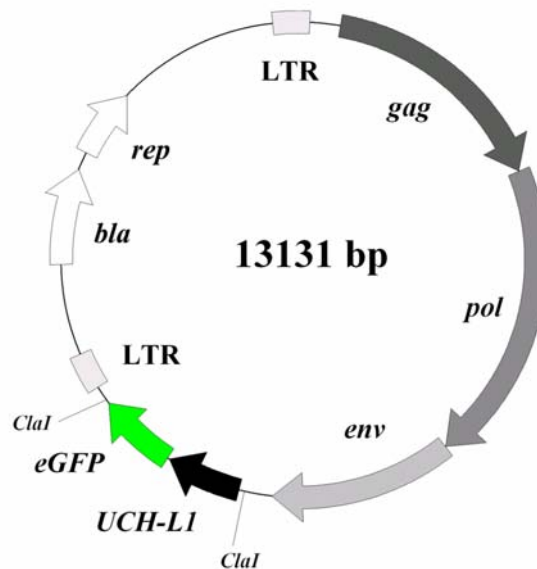


Abb. 32. Vektorkarte von RCASBP(B)-*UCH-L1-eGFP*. Die „long terminal repeats“ (LTR) (hellgrau) flankieren die retroviralen Gene *gag*, *pol*, *env* und das *Clal*-DNA-Fragment *UCH-L1-eGFP*, das aus pSLAX13-*UCH-L1-eGFP* stammt. Die virale DNA-Sequenz ist in Form eines Provirus angeordnet. Das  $\beta$ -Lactamase (*bla*)-Gen und das *E. coli*-Replikon (*rep*) stammen von pBR322. *Bla* vermittelt Resistenz gegen Ampicillin. Die Karte beruht auf einer RCASBP(B)-DNA-Sequenz<sup>15</sup> vom Retroviral Replication Laboratory (National Cancer Institute, Frederick, USA).

Um *UCH-L1* auf Grundlage von pSLAX-*UCH-L1-eGFP* vollständig zu sequenzieren, wurden die genspezifischen Oligonukleotide cUch\_297 (nicht-kodierender Strang) und cUch\_372 (kodierender Strang) benutzt. Des weiteren wurden T3 (5'-Ende kodierender Strang) und T7 (3'-Ende nicht-kodierender Strang) eingesetzt. Die vollständige kodierende DNA-Sequenz von *UCH-L1* und die abgeleitete Aminosäuresequenz (siehe Abschn. 13) wurden in der EMBL Nucleotide Sequence Database unter der Zugangsnummer AJ621938<sup>16</sup> abgelegt. Durch eine BLASTN-Suche in der Datenbank des Hühnchengenoms wurde festgestellt (Abschn. 28.5), dass das *UCH-L1*-Gen auf dem Makrochromosom Nr. 4 von *G. gallus* lokalisiert ist (Ensembl Gene Report ENSGAL14261).

Wie erwähnt diente RCASBP(B)-*UCH-L1-eGFP* zur Herstellung von infektiösen Viruspartikeln. Der erzeugte RCASBP(B)-*UCH-L1-eGFP*-Virusstamm hatte einen Titer von  $2 \times 10^7$  CFU/ml. Um die Qualität des Virusstammes zu prüfen, wurden RCASBP(B)-*UCH-L1-eGFP*-Viruspartikel in ovo injiziert (Abschn. 26.3). Gewebe von infizierten E6,5-Hühnchenretinae wurde präpariert, fixiert und mit einem Gefriermikrotom geschnitten (Abschn. 24). Anschließend wurden die Schnitte mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 33).

<sup>15</sup> [http://home.ncifcrf.gov/hivdrp/RCAS/RCASBPb\\_provisional\\_sequence.txt](http://home.ncifcrf.gov/hivdrp/RCAS/RCASBPb_provisional_sequence.txt)

<sup>16</sup> Datenbankeintrag vertraulich bis zum 31. Dezember 2006.

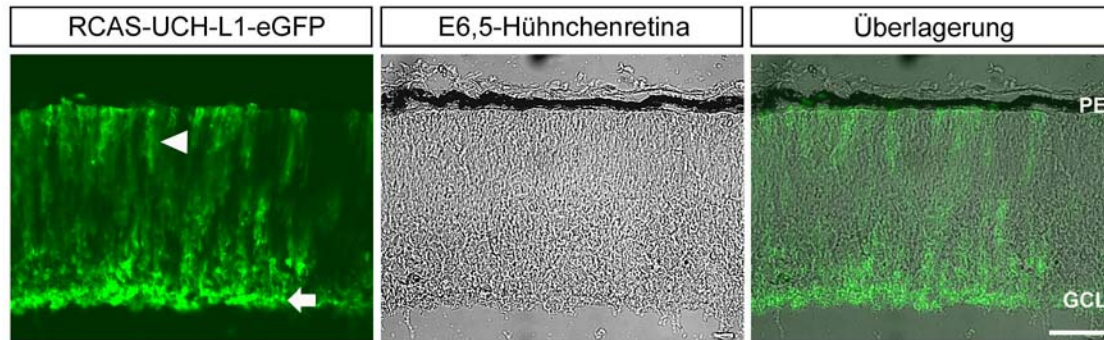
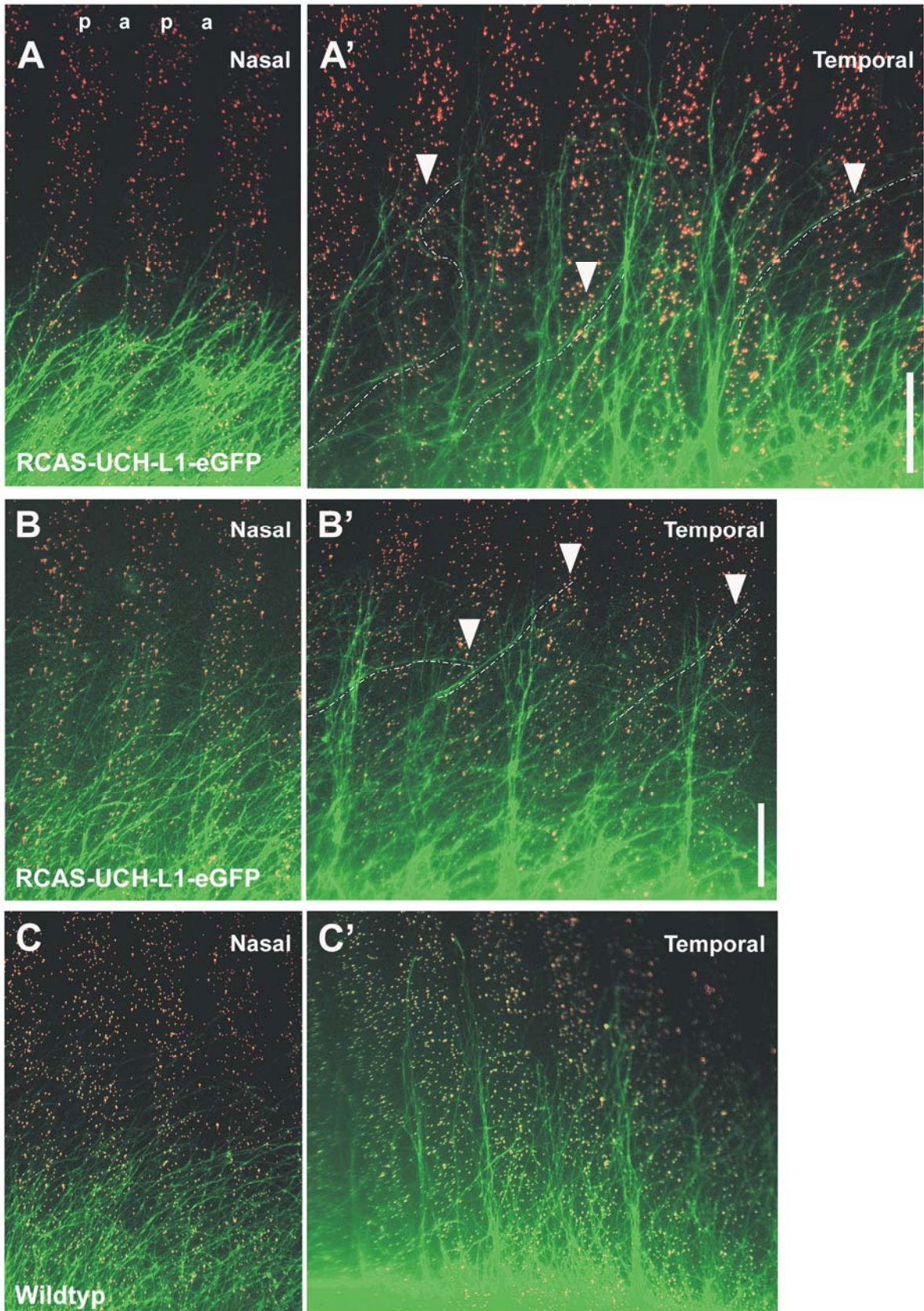


Abb. 33. Retrovirale Fehlexpression von RCASBP(B)-*UCH-L1-eGFP*. In der E6,5-Hühnchenretina ist die Bildung von RGCs fast zu 100% abgeschlossen. Der Pfeil weist auf die starke Fehlexpression in den inneren Schichten der Retina hin, insbesondere in der GCL, die auf der vitrealen Seite der Retina liegt. Von dort aus erstreckt sich die virale Infektion über die sich entwickelnden Schichten bis zur skleralen Seite der Retina (Pfeilkopf), wo sich das retinale Pigmentepithel (PE) anschließt. Maßstab, 50  $\mu$ m.

Um zu prüfen, ob die ektopische Expression von UCH-L1 die Zielpräferenzen von nasalen und temporalen RGC-Axonon stört, wurden *in vitro*-Axonstreifenversuche mit TN-Gewebestreifen von RCASBP(B)-*UCH-L1-eGFP* infizierten E6-Hühnchenretinae und mit uninfizierten E6-Kontrollretinae durchgeführt (Abschn. 26.4). Anschließend wurde das Wachstumsverhalten von nasalen und temporalen Axonen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert. Der Effekt der retroviralen Fehlexpression von UCH-L1 reichte nicht aus, um die Zielpräferenzen von nasalen RGC-Axonon und/oder von temporalen RGC-Axonon zu stören (Versuche,  $n = 7/7$ ). Dennoch wurde beobachtet, dass einzelne temporale Axone, die zunächst auf dem anterioren Membranstreifen wuchsen, den angrenzenden posterioren Streifen durchquerten (weisse gestrichelte Linien in A' und B'). Zum Teil wuchsen diese Axone auch über den nachfolgenden anterioren Membranstreifen. Diese Ereignisse wurden in den Kontrollversuchen nicht oder nur sehr selten beobachtet (Versuche,  $n = 5/5$ ; C').

Abb. 34 (Auf der nächsten Seite). Effekt der Fehlexpression von *UCH-L1-eGFP* auf die Entwicklung der retinotektalen Projektion. TN-Gewebestreifen, die entweder von uninfizierten E6-Kontrollretinae oder von RCASBP(B)-*UCH-L1-eGFP* infizierten E6-Hühnchenretinae stammten, wurden im rechten Winkel auf abwechselnden Streifen von anterioren (a) und posterioren (p) E10-Tektummembranen kultiviert. Dabei wurde den RGC-Axonon, die Wahl gelassen, ob sie auf a- oder auf p-Membranstreifen wuchsen. Die posterioren Membranfragmente wurden mit rot fluoreszierenden Latexkügelchen gefärbt. Nach 48 h wurde das Axonwachstum fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Für die Auswertung wurde die eGFP-Fluoreszenz durch Gabe des Fluoreszenzfarbstoffs „vital dye“ verstärkt. (A) Wachstum von uninfizierten RGC-Axonon. Die temporalen Axone werden von den p-Membranen abgestossen, wodurch das typische gestreifte Wachstumsmuster entsteht. Die nasalen Axone reagieren nicht auf p-Membranen und wachsen ohne Präferenz über den a/p-Streifentepich. (B) Wachstum von RCASBP(B)-*UCH-L1-eGFP* infizierten RGC-Axonon. Der Effekt der erzwungenen Expression von *UCH-L1-eGFP* reichte nicht aus, um das Wachstumsverhalten von temporalen und nasalen Axonen massiv zu ändern. Dennoch wurde in seltenen Fällen beobachtet, dass bestimmte temporale Axone (gestrichelte weisse Linien) über mehr als einen angrenzenden p-Streifen wuchsen. Maßstab, 200  $\mu$ m (A-A'; B-C').



## DISKUSSION

### **15. Die lokale Expression von *cVax*, *cTbx5* und *Ephrin-B2* wird für die Faszikulierung und die intraretinale Wegfindung von Ganglienzellaxonen in der embryonalen Hühnchenretina benötigt**

Um die räumlichen Beziehungen einzelner Bildpunkte innerhalb des visuellen Feldes während der Entwicklung der retinotektalen Projektion von Wirbeltieren aufrechtzuerhalten, wird das optische Tektum bzw. der Colliculus superior in einer topographisch geordneten Weise von RGC-Axonon innerviert. An diesem Organisationsprinzip axonaler Verbindungen sind mindestens zwei Komponenten beteiligt: Erstens die Wachstumskegel der RGC-Axone, die Positionsinformationen im Tektum lesen und zweitens ihre Fähigkeit entlang bestehender retinaler Axone und/oder Axonfaszikel auf einem definierten Weg zu wandern. Dabei ist die intraretinale Wegfindung von RGC-Axonon zur Papille der erste Schritt während der gesamten Axonwegfindung in die visuellen Zentren des Gehirns.

Die Axonwegfindung in der Wirbeltierretina wird von Rezeptoren und Liganden verschiedener Proteinfamilien beeinflusst. Hierzu zählen Netrin-1 und sein Rezeptor DCC (Deiner et al., 1997), IgSF-CAMs wie L1/Ng-CAM (Brittis und Silver, 1995; Silver und Rutishauser, 1984; Zisch et al., 1997) und Neurolin/BEN (Ott et al., 1998; Weiner et al., 2004) oder die RTKs EphB1, EphB2 und EphB3 (Birgbauer et al., 2000; Oster et al., 2004). Zur Charakterisierung dieser Moleküle wurden verschiedene experimentelle Ansätze gewählt, wie die *in vivo*-Injektion funktionsblockierender Antikörper (Goldfisch, Ratte) oder die Gendelektion (Maus). Interessanterweise wurden durch solche Manipulationen nur wenige Axonbündel in ihrem Wachstum gestört. In den meisten Studien mündete die Mehrheit der RGC-Axone korrekt in den optischen Nerv. Beispielsweise führte in Mausembryonen der Verlust von mehr als einem EphB-Genprodukten zu einer fehlerhaften Wegfindung dorsaler RGC-Axone nahe der Papille (Birgbauer et al., 2000; Oster et al., 2004). Diese Beobachtung deutet zumindest auf eine teilweise Störung der Balance von EphB/Ephrin-B-vermittelten Axon-Axon-Kontakten innerhalb der Retina hin. In der embryonalen Maus- bzw. Hühnchenretina wird die Expression von *EphB*-Genen von *mVax2* bzw. *cVax* und *cTbx5* kontrolliert (Schulte et al., 1999; Koshiba-Takeuchi et al., 2000; Barbieri et al., 2002; Mui et al., 2002). Das erste Projekt der vorliegenden Arbeit hatte daher zum Ziel, einen Einblick in die Rolle von *cVax*-, *cTbx5*- und EphB/Ephrin-B-vermittelten Axon-Axon-Kontakten bei der Faszikelbildung und Wegfindung von RGC-Axonon in der embryonalen Hühnchenretina zu gewinnen.

### 15.1 Die Genexpression von *EphB*-Rezeptoren und *Ephrin-B*-Liganden ist in stabile komplementäre DV-Domänen unterteilt

Bereits am Tag E2,5 (HH15) also unmittelbar nach Beginn der retinalen Neurogenese (Prada et al., 1991), wurden im Augenbecher des Hühnchens *EphB2*-, *Ephrin-B1*- und *Ephrin-B2*-Transkripte in entgegengesetzten DV-Domänen exprimiert (Abschn. 8). Hierbei wurden die beiden *B-Ephrine* in der dorsalen Hälfte des Augenbechers und *EphB2* in der ventralen Hälfte exprimiert. *EphB3*-mRNA wurden erst am embryonalen Tag 3,5 in der ventralen Retina nachgewiesen (Abschn. 8). Die für *Ephrin-B1* und *Ephrin-B2* sowie für *EphB2* und *EphB3* beschriebenen DV-Domänen blieben auch an den embryonalen Tagen 3,5 und 6,5 stabil (Abschn. 8; 10). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den veröffentlichten Daten über die retinale Expression von *EphB2* und *EphB3* (Holash und Pasquale, 1995; Braisted et al., 1997; Connor et al., 1998; Schulte et al., 1999) sowie für *Ephrin-B1* und *Ephrin-B2* (Braisted et al., 1997; Schulte et al., 1999) in späteren Entwicklungsstadien. Die komplementären Verteilungen der *Ephrin-B1*- und *Ephrin-B2*-Transkripte sind mindestens bis E14 nachweisbar (Braisted et al., 1997), kurz bevor gegen E16 die Bildung des retinalen Schichtungsmusters abgeschlossen ist (Mey und Thanos, 2000).

Im Gegensatz zu den räumlich-zeitlich stabilen mRNA-Expressionsdomänen der embryonalen Hühnchenretina wurde in der embryonalen Mausretina beobachtet, dass die *EphB*- und *Ephrin-B*-Expressionsmuster dynamisch verlaufen (Birgbauer et al., 2000; Hindges et al., 2002). Während des Zeitraums zwischen E13 und E16 werden in der Mausretina viele RGCs gebildet, die ihre Axone in Richtung der Papille aussenden. RGCs, die zwischen E13 und E14 in der zentralen Retina gebildet werden, exprimieren *EphB1*-, *EphB2*- und *EphB3*-Transkripte. Ihre Expressionsmuster sind jedoch noch symmetrisch, verlaufen also nicht in einem DV-Gradienten. In diesem Zeitraum wird nur *Ephrin-B1* als einziges *B-Ephrin* auf RGCs exprimiert und zwar ebenfalls einheitlich. Das *Ephrin-B2*-Expressionmuster zeigt zwar bereits am Tag E13 einen klaren DV Gradienten, dieser ist jedoch nicht auf RGCs zu finden, sondern auf Zellen der äußeren Retina beschränkt. Am Tag E16, wenn RGCs in der mittleren Retinaperipherie gebildet werden, exprimieren RGCs *EphB1*, *EphB3* und *EphB4* noch immer symmetrisch entlang der DV-Achse. Gleichzeitig bildet sich ein deutlicher von ventral nach dorsal verlaufender Gradient von *EphB2*-Transkripten heraus, der zuerst in Zellen der äußeren Retina, kurz darauf auch auf RGC sichtbar ist. Zu diesem Zeitpunkt beginnen die RGCs, neben *Ephrin-B2* und *Ephrin-B3*, auch *Ephrin-B1* zu exprimieren. Das *Ephrin-B1*-Expressionsmuster ähnelt dem der anderen beiden *B-Ephrine* und verläuft symmetrisch entlang der DV-Achse. Klare DV-Gradienten von *EphB3*, *EphB4* und *Ephrin-B1* zeigen sich erst ab dem ersten postnatalen Tag (P0), wenn die meisten RGC-Axone die Netzhaut bereits verlassen haben.

Beim Vergleich der *EphB*- und *Ephrin-B*-Expressionsprofile von embryonaler Hühnchen- und Mausretina fallen charakteristische Unterschiede auf: im Hühnchen bilden sich die axialen Verteilungsschwerpunkte von *EphB*- und *Ephrin-B*-Transkripten bereits zu Beginn der retinalen Neurogenese heraus (E2,5) und bleiben solange erhalten, bis die Mehrzahl der RGC-Axone ihre Wanderung zur Papille abgeschlossen hat. In der Maus hingegen sind in dem Zeitraum, in dem eine große Anzahl von RGC-Axonon zur Papille wandert (E13 bis E16), nur *EphB2*- und *Ephrin-B2*-Transkripte in gegenläufigen DV-Gradienten verteilt, während die übrigen *EphB*- und *Ephrin-B*-Gene symmetrisch, d. h. nicht differentiell, entlang der DV-Achse exprimiert werden. Weiterhin fällt auf, dass in der Maus in einem frühen Zeitraum (E13 bis E16) die *Ephrin-B2*-Transkripte nicht in der GCL, sondern nur in der äußeren Retina exprimiert werden, die in erster Linie noch aus undifferenzierten Zellen besteht. Im Hühnchen dagegen werden *Ephrin-B1*- und *Ephrin-B2*-Transkripte mindestens bis E14 auf Ganglienzellen, nicht jedoch auf RGC-Axonon exprimiert. Demnach gibt es einen charakteristischen Unterschied zwischen den *EphB*- und *Ephrin-B*-mRNA-Expressionsprofilen in der embryonalen Retina von Hühnchen und Maus. Dieser Unterschied liegt möglicherweise der Bildung des hühnchenspezifischen DV-Unterschieds des Axonfaszikelmusters zugrunde.

Die Bildung von EphB/Ephrin-B-vermittelten Axon-Axon-Kontakten in der Grenzregion zwischen dorsaler und ventraler Retina setzt voraus, dass die Proteine von EphB-Rezeptoren und Ephrin-B-Liganden gleichzeitig auf benachbarten Axonen exprimiert werden. In der embryonalen Hühnchenretina werden Ephrin-B1- und Ephrin-B2-Proteine überwiegend in den plexiformen Schichten exprimiert. Obwohl diese beiden B-Ephrine auch auf Ganglienzellen exprimiert werden (Ephrin-B1: E7-E10 und Ephrin-B2: E8), konnten ihre Proteine nicht auf RGC-Axonon nachgewiesen werden (Braisted et al., 1997). Dies gilt für die Nervenfaserschicht, den optischen Nerv, das optische Chiasma und den optischen Trakt (Braisted et al., 1997). Dagegen sind EphB2 und EphB3 im Hühnchen über einen längeren Zeitraum auf Zellkörpern sowie auf Axonen ventraler RGCs nachweisbar sind (EphB2-Protein: E4 bis E11 in Holash und Pasquale, 1997; *EphB3*-mRNA: E8 in Connor et al., 1998).

Zwischen den EphB-Rezeptoren und den B-Ephrinen gibt es keine strengen Bindungspartnerschaften (Pasquale, 2004). Aus diesem Grund sind weitere EphB/Ephrin-B-Wechselwirkungen theoretisch möglich, die eine Rolle bei intraretinalen Axon-Axon-Kontakten spielen. Im Folgenden sind daher die mRNA-Expressionsmuster weiterer retinaler EphB- und Ephrin-B-Vertreter – soweit bekannt – kurz beschrieben werden. Im Hühnchen wird das *EphB1*-Gen (zumindest) am Tag E8 symmetrisch entlang der retinalen DV-Achse exprimiert (Connor et al., 1998). Dagegen wird das Gen von *EphB4* in einem von ventral nach dorsal abnehmenden Gradienten differentiell exprimiert (Hindges et al., 2002). *EphB5*, dessen Gen in der

Hühnchenretina zwischen E4 und E6 in einem zentral zu periphär verlaufenden Gradienten exprimiert wird (Sefton et al., 1997), fehlt jedoch im Genom von Maus und Mensch (Pasquale, 2004). Das sechste und bisher letzte EphB-Molekül, EphB6, wurde nicht im Hühnchen, sondern nur in der Maus identifiziert; dort allerdings nicht in der Retina (Gurniak und Berg, 1996; Hindges et al., 2002). Während das *Ephrin-B3*-Gen in der dorsalen Hälfte der embryonalen Mausretina exprimiert wird (Birgbauer et al., 2000), wurde eine Expression von *Ephrin-B3* in der Hühnchenretina noch nicht nachgewiesen. Somit werden in der embryonalen Hühnchenretina - mit Ausnahme von *EphB1* und *EphB5* - die mRNA-Expressionsprofile von EphB-Rezeptoren in ventrale Domänen und die ihrer Ephrin-B-Liganden in dorsale Domänen entlang der DV-Achse unterteilt. Trotz der abweichenden mRNA-Expressionsprofile von *EphB1* und *EphB5* liegt der Verteilungsschwerpunkt der *EphB*-Transkripte in der ventralen Retina, während die Transkripte von *Ephrin-B1* und *Ephrin-B2* in der dorsalen Retina konzentriert sind. Deshalb ist es denkbar, dass sich an der Grenzfläche zwischen dorsaler und ventraler Retina EphB/Ephrin-B-vermittelte Axon-Axon-Kontakte ereignen, welche die Wegfindung zur Papille essentiell beeinflussen.

### **15.2 Der DV-Unterschied des Axonfaszikelmusters ist von der DV-Polarität der Retina abhängig**

In der adulten Hühnchenretina unterscheiden sich dorsale und ventrale RGC-Axone in Dicke und Myelinisierungsgrad: Während die dorsale NFL die größte Zahl von RGC-Axonon beinhaltet, die im Wesentlichen dünn und unmyelinisiert sind, enthält die ventrale NFL eine relativ kleine Zahl dicker RGC-Axone, von den viele myelinisiert sind (Imagawa et al., 1999). Es stellte sich daher zu Beginn des Projektes die Frage, ob diese unterschiedlichen Axonmerkmale dem DV-Unterschied des Axonfaszikelmusters zugrunde liegen, der bei der immunohistochemischen Analyse von Präparaten ganzer E18-Hühnchenretinae entlang der DV-Achse beobachtet wurde (Abschn. 7). Anhand der Untersuchung von Präparaten ganzer E6,5-Hühnchenretinae konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass die Bildung des DV-Axonfaszikelmusters die Konsequenz der differentiellen Myelinscheidenbildung durch Oligodendrocyten ist, die erst gegen E10 aus dem optischen Nerv in die retinale NFL einwandern (Abschn. 7). Dieses Zwischenergebnis war Grund zur Annahme, dass die Axonfaszikelbildung durch grundlegende Prozesse der frühen retinalen Musterbildung beeinflusst wird, welche die DV-Polarität der Retina bestimmen.

Der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor *cVax* hat eine Schlüsselfunktion bei der Musterbildung entlang der DV-Achse der Hühnchenretina (Schulte et al., 1999; Schulte et al., 2005). Um deshalb zu untersuchen, ob die Faszikelbildung von RGC-Axonon durch *cVax* beeinflusst wird, wurde das DV-Axonfaszikelmuster nach retroviraler Fehlexpression von *cVax* immunohistochemisch analysiert. Die intraretinale Wegfindung von RGC-Axonon wurde durch in vitro-DiI-Axonmarkierung analysiert. Die immunohistochemische Untersuchung von RCASBP(B)-*cVax*-

infizierten Präparaten ganzer E6,5-Hühnchenretinae zeigte, dass die dorsalen RGC-Axone dickere Faszikel bildeten, die den ventralen Bündeln morphologisch sehr ähnlich waren (Abschn. 9). Dieses Ergebnis belegt, dass die *cVax*-Fehlexpression ausreichend war, um das Axonfaszikelmuster der dorsalen NFL zu ventralisieren. Hierfür sind zwei Erklärungen denkbar. Erstens: In der Wildtyp-Hühnchenretina kontrolliert *cVax* mittel oder unmittelbar die Expression von Molekülen, die das Axonwachstum in der ventralen NFL regulieren bzw. lenken. Nach retroviraler Fehlexpression von *cVax* werden solche Moleküle in der dorsalen Retinahälfte ektopisch exprimiert. Infolge dessen haben dünne RGC-Axone, die charakteristisch für die dorsale NFL des Wildtyps sind, eine stärkere Tendenz zur Bündelbildung, wodurch dickere Faszikel entstehen. Zweitens: In der Wildtyp-Hühnchenretina kommen Ganglienzelltypen mit großem Axondurchmesser, so genannte  $\alpha$ -Ganglienzellen, hauptsächlich in den beiden ventralen Retinaquadranten vor (Ueshima und Uehara, 1983). Wie die immunohistochemischen Analysen uninfizierter E6,5- und E18-Hühnchenretinae der vorliegenden Arbeit belegen, werden in der ventralen NFL dickere Axonfaszikel als in der dorsalen NFL gebildet (Abschn. 7). Unter erzwungener *cVax*-Expression könnten von RGC-Neuroblasten, aus denen normalerweise die dorsalen Ganglienzelltypen mit dünnen Axonen hervorgehen, auch Ganglienzelltypen mit dicken Axonen gebildet werden. Wäre dies der Fall, so bestünde das ventralisierte Axonfaszikelmuster in der dorsalen Retina möglicherweise zu einem gewissen Anteil aus Ganglienzellen mit großen Axondurchmesser. Ob dies tatsächlich der Fall ist, ließe sich durch intrazelluläre Farbstoff-Injektion und morphologische Klassifizierung der Ganglienzellen klären (Boycott und Wässle, 1974; Wässle et al., 1981).

Um die Änderung der Faszikelbildung nach retroviraler Fehlexpression von *cVax* im Detail zu studieren, wurden in Explantaten infizierter E6,5-Hühnchenretinae kleinere Gruppen von RGC-Axonen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI markiert. Dabei wurde beobachtet, dass die markierten dorsalen RGC-Axone nach *cVax*-Fehlexpression in wellenförmigen Bahnen wuchsen, die den Faszikeln eine zopfförmige Morphologie verliehen (Abschn. 9). Bei höherer Auflösung war ein Bündelmuster zu erkennen, das aus faszikulierenden und defaszikulierenden Axonen bestand. Dieser „gain-of-function“-Phänotyp deutet darauf hin, dass während der intraretinalen Axonwegfindung die Balance zwischen anziehenden und abstoßenden Axon-Axon- bzw. Axon-Zell-Kontakten gestört wurde: einzelne Axone oder kleine Gruppen von Axonen trennten sich zunächst von ihren Faszikeln, fügten sich jedoch nach einer gewissen Wanderungsstrecke wieder an den ursprünglichen Faszikeln an. Das regelmäßige Muster könnte dadurch zustande kommen, dass sich das Lösen und Schließen von Axon-Axon- bzw. Axon-Zell-Kontakten kontinuierlich wiederholte. Diese Feststellung spricht gegen die erwähnte Bildung von dorsalen  $\alpha$ -Ganglienzellen, denn die DiI-Markierungen ventraler RGC-Axone in der Wildtyp-Hühnchenretina zeigten

keine zopfförmige Faszikelmorphologie, obwohl in dieser Hälfte der Wildtyp-Hühnchenretina eine große Anzahl von  $\alpha$ -Ganglienzellen vorkommen. Es ist daher eher wahrscheinlich, dass dem veränderten Faszikulierungsverhalten dorsaler RGC-Axone eine veränderte Expression von Molekülen zugrunde liegt, die das Axonwachstum regulieren oder lenken. Sehr wahrscheinlich handelt es sich dabei um EphB-Rezeptoren, deren Expression von *cVax* kontrolliert wird. Die *cVax*-Expression müsste allerdings indirekt durch Nachweis von RCASBP(B)-*cVax* erfolgen, da bislang kein *cVax*-Antikörper existiert. Aus methodischen Gründen war es leider nicht möglich, der *in vitro*-DiI-Axonmarkierung eine virusspezifische GAG-Färbung mit dem Antikörper p27 anzuschließen. Jedoch ließ sich durch diese Färbung, die gemeinsam mit der axonspezifischen Neurofilament-Färbung durchgeführt wurde, die Stärke der Gewebeeinfektion durch RCASBP(B)-*cVax* abschätzen. Wie diese Färbungen zeigten, ist bei allen untersuchten E6,5-Retinapräparaten Anzahl und Größe der virusfreien Gewebereiche relativ klein. Daher gab es wohl nur wenige Gruppen von RGC-Axonon, die nicht von der *cVax*-Fehlexpression betroffen waren.

Ein weiterer Befund der *in vitro*-DiI-Axonmarkierungen nach *cVax*-Fehlexpression waren Axonwegfindungsfehler in unmittelbarer Nähe der optischen Fissur (Abschn. 9). Anstatt in den optischen Nerv einzuwandern, trennten sich viele, jedoch nicht alle RGC-Axone von ihren Faszikeln und schlugen Wanderungsrichtungen ein, die sie von der optischen Fissur wegführten. Dabei wurden sogar einzelne Axone beobachtet, die ihre Bahn um bis zu 160 Winkelgrad änderten. Diese Feststellung unterstreicht unveröffentlichte Beobachtungen, die bei der Analyse der sogenannten anterograden<sup>17</sup> in ovo-DiI-Axonmarkierung an E18 Embryos gemacht wurden (D. Schulte, persönliche Mitteilung). Dabei wurde festgestellt, dass in den meisten der untersuchten Tieren weniger als die Hälfte der DiI markierten RGC-Axone in den optischen Nerv eintrat und bis ins Tektum projizierte, sondern statt dessen in der Retina verblieb.

Demzufolge scheint der *cVax*-Phänotyp aus mindestens zwei Komponenten zu bestehen. Erstens: aus dem wellenförmigen Axonfaszikelmuster in der dorsalen NFL, dessen Regelmäßigkeit möglicherweise auf das reversible, sich kontinuierlich wiederholende Lösen und Schließen von Axon-Axon- bzw. Axon-Zell-Kontakten zurückgeht. Zweitens: Aus den Axonwegfindungsfehlern in der Fissurregion, weshalb ein gewisser Anteil von RGC-Axonon die Retina nicht verließ und daher nicht zur Bildung der retinotektalen Projektion beitrug.

---

<sup>17</sup> Anterograd: nach vorne gerichtet.

Aus der Literatur ist bekannt, dass am Zustandekommen einer vergleichbaren Axonfaszikel-Morphologie eine Reihe unterschiedlicher Moleküle beteiligt sind. Ein schönes Beispiel liefert Fasciclin II (FasII), ein IgSF-CAM, das im ZNS der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* vorkommt und mit N-CAM („neural cell adhesion molecule“) der Wirbeltiere verwandt ist (Cunningham et al., 1987; Grenningloh et al., 1991). In *Drosophila* ist das FasII-Protein auf embryonalen ZNS-Axonon vorhanden (Grenningloh und Rehm, 1991). Der Verlust von FasII bewirkte, dass diese bestimmten Axone nicht mehr faszikulieren konnten (Lin et al., 1994). Unter Verwendung eines bestimmten genetischen Kontrollelementes können in *Drosophila* Gene fehlexprimiert werden. Diese experimentelle Manipulation angewandt, um den beschriebenen FasII-„loss-of-function“-Phänotyp zu retten (Lin et al., 1994). Infolge dessen wurden die Axone durch fehlexprimiertes *FasII* zur Refaszikulierung „gezwungen“. Aufgrund ihrer Ergebnisse postulierten Lin und Kollegen, dass FasII in *Drosophila* als neuronales Erkennungsmolekül („neuronal recognition molecule“) dient (Lin et al., 1994). Interessanterweise, ähnelt die Axonmorphologie, die durch Überexpression von *FasII* erzeugt wurde, stark dem wellenförmigen Faszikelmuster von RGC-Axonon, das nach retroviraler Fehlexpression von *cVax* in der dorsalen NFL des Hühnchens beobachtet wurde.

Es stellt sich nun die Frage, ob N-CAM eine ähnliche Rolle bei der intraretinalen Axonwegfindung in der embryonalen Hühnchenretina spielt, wie sie für das verwandte FasII in *Drosophila* postuliert wurde. Es wurde gezeigt, dass N-CAM an L1 binden kann (Friedlander et al., 1994; Larsen et al., 1996; Larsen et al., 1998). L1 ist ein IgSF-CAM, dessen homophile L1/L1-Bindungen einen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Bündelung von RGC-Axonon leisten (Oster et al., 2004). In Mausembryonen ist L1 auf RGC-Axonon in der gesamten Retina vorhanden (Hankin und Lagenaur, 1994). Mäusen, denen L1 fehlt, haben optische Nerven, die in etwa die normale Größe haben (D. Sretavan, unveröffentlichte Beobachtungen). Dies deutet darauf hin, dass die Mehrzahl der RGC-Axone auch ohne L1 den Weg zum optischen Nerven korrekt finden. In vitro wurde gezeigt, dass Tyrosin-Reste von L1 durch EphB2 phosphoryliert werden (Zisch et al., 1997). Auch wenn der tatsächliche in vivo-Beweis noch aussteht, ist zu vermuten, dass Ng-CAM, das L1-Ortholog des Hühnchens, durch EphB-RTKs phosphoryliert wird. Zumindest ist einer anderen Studie zu entnehmen, dass EphB2-Protein mindestens zwischen E4 und E11 in der GCL und in der NFL nachzuweisen ist (Holash und Pasquale, 1997). Weitere in vitro-Ergebnisse deuten jedenfalls stark darauf hin, dass L1- und EphB-Moleküle in vivo miteinander wechselwirken (Birgbauer et al., 2001; Suh et al., 2004). Dorsale und in geringem Maße auch ventrale RGC-Axone der embryonalen Mausretina reagierten in Gegenwart von Laminin-Substrat auf ECDs von EphB1, EphB2 oder EphB3 mit einem typischen Wachstumskegel-Kollaps (Birgbauer et al., 2000). Wachsen dorsale RGC-Axone hingegen auf

L1-Substrat reagierten sie auf EphB1, EphB2 oder EphB3 hingegen nicht mit einem Wachstumskegel-Kollaps (Suh et al., 2004). Diese L1-Signale reichten also aus, um die Reaktionsfähigkeit der RGC-Axone auf EphB-Proteine zu „neutralisieren“. Aufgrund dieses Mechanismus könnte in vivo die Sensitivität des Wachstumskegels gegenüber den hemmenden EphB-Axonleitmolekülen moduliert werden.

Aus den geschilderten Daten lässt sich folgende Hypothese in bezug auf die intraretinale Axonwegfindung in der embryonalen Hühnchenretina formulieren: die heterophile Bindung zwischen N-CAM und Ng-CAM exprimierenden RGC-Axonon trägt neben der homophilen Ng-CAM-Bindung zur Faszikulierung bei. Dieser anziehende Axon-Axon-Kontakt kann mittels Phosphorylierung der Ng-CAM-Tyrosinreste durch EphB2 moduliert werden. Die räumlich-zeitlich korrekte Expression von *EphB2* wird wiederum von dem Regionalisierungsfaktor *cVax* bestimmt. Dies könnte zur Bildung des groben Axonfaszikelmusters in der ventralen NFL beitragen.

Die ektopische Expression des T-Box-Transkriptionsfaktors *cTbx5* übt einen dorsalisierenden Effekt auf die Bildung der retinotektalen Projektion des Hühnchens aus (Koshiba-Takeuchi et al., 2000). Daher sollte geprüft werden, ob die retrovirale Fehlexpression von *cTbx5* auch die Bildung des Axonfaszikelmusters in der ventralen NFL beeinflusst. Entgegen der Erwartung wurde festgestellt, dass das fehlexprimierte Wildtyp-Allel *cTbx5* nicht ausreichend war, um den DV-Unterschied der Axonfaszikelmuster aufzuheben, der bei uninfizierten Retinae beobachtet wurde (Abschn. 9). Interessanterweise konnte jedoch die retrovirale Fehlexpression des dominant-negativen *cTbx5*-Allels *cTbx5<sup>en</sup>* das dorsale Axonfaszikelmuster ventralisieren: in der dorsalen NFL bildeten die RGC-Axone dickere Faszikel, die den Bündeln in der ventralen NFL morphologisch sehr ähnlich waren und an den ventralisierenden Effekt der *cVax*-Fehlexpression erinnerten (Abschn. 9). In vivo beruht der dominant-negative Effekt von *cTbx5<sup>en</sup>* darauf, dass dieses Fusionsprotein aus *cTbx5*-DNA-Bindedomäne und Engrailed-Repressordomäne mit endogenen Tbx5-Protein um DNA-Bindestellen stromaufwärts von Tbx5-Zielgenen konkurriert (Rallis et al., 2003). Gebundenes *cTbx5<sup>en</sup>* hemmt die Transkription dieser Zielgene aktiv, indem die Engrailed-Repressor-Domäne einen Korepressor rekrutiert, der das Zielgen „stilllegt“ (Jimenez et al., 1997).

Da die retrovirale Fehlexpression von *cTbx5* keinen dorsalisierenden Effekt auf das Axonfaszikelmuster in der ventralen NFL ausübte, sollte durch in situ-Hybridisierung geprüft werden, ob sich eine ektopische Expression von *cTbx5* zumindest auf die mRNA-Expressionsprofile ventraler und/oder dorsaler Markergene auswirkt. Selbige Prüfung sollte auch mit *cTbx5<sup>en</sup>* durchgeführt werden und die Ergebnisse mit denen von *cTbx5* verglichen werden.

Überraschenderweise wurde festgestellt, dass sich weder nach *cTbx5*- noch nach *cTbx5<sup>en</sup>*-Fehlexpression die erwarteten Änderungen der mRNA-Expressionsprofile von *EphB2/EphB3*- oder *Ephrin-B1/Ephrin-B2* beobachten ließen (Abschn. 10). Unveröffentlichte Daten anderer Arbeiten (D. Schulte, persönliche Mitteilung; M. Logan, National Institute for Medical Research, Mill Hill, United Kingdom, persönliche Mitteilung) unterstreichen dieses Ergebnis, auch wenn es in direktem Widerspruch zu der angeführten Studie von Koshiba-Takeuchi (2000) steht.

Dieser Widerspruch kann verschiedene Gründe haben. Möglicherweise waren die Änderungen der mRNA-Expressionsprofile von *cTbx5*-Zielgenen nach *cTbx5*- oder *cTbx5<sup>en</sup>*-Fehlexpression so gering, dass sie *in vitro* durch eine *in situ*-Hybridisierung nicht gemessen werden konnten, aber ausreichend waren, um eine Änderung des Faszikelmusters hervorzurufen. Dies ist durchaus möglich, denn die Fehlexpression von *cTbx5* mittels *in ovo*-Elektroporation dorsalisierte die retinalen mRNA-Expressionsprofile von *B-Ephrinen* und unterdrückte die Expression von *EphB*-Transkripten vollständig (Koshiba-Takeuchi et al., 2000). Es ist allerdings anzumerken, dass hierbei ein Expressionsvektor verwandt wurde, der *Tbx5* unter der Kontrolle eines CMV<sup>18</sup>-beta-Aktin-Promoters exprimiert und durch *in ovo*-DNA-Elektroporation in den optischen Vesikel von Hühnchen eingebracht wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden *cTbx5* und auch *cTbx5<sup>en</sup>* mittels replikationskompetenter retroviraler RCAS-Viruspartikel fehlexprimiert, wodurch die retinalen *EphB*- und *Ephrin-B*-Expressionsmuster jedoch nicht geändert wurden. Bei diesen unterschiedlichen Gentransfer-Methoden treten unabwendbar Unterschiede in der Expressionsstärke des ektopisch exprimierten Gens auf. Infolgedessen wurde der Effekt der *cTbx5*-Fehlexpression möglicherweise verzerrt.

Es ist jedoch auch denkbar, dass die Genexpression der untersuchten *cTbx5*-Zielgene posttranslational reguliert wird und deswegen nicht durch *in situ*-Hybridisierung bestimmbar war. Diese beiden Interpretationsansätze liefern jedoch nur im Fall von *cTbx5<sup>en</sup>* eine Erklärung für die Änderung des dorsalen Faszikelmusters. Ein weiterer Interpretationsansatz, der sowohl die Ventralisierung des dorsalen Axonfaszikelmusters nach *cTbx5<sup>en</sup>*-Fehlexpression als auch den ausgebliebenen dorsalisierenden Effekt nach *cTbx5*-Fehlexpression berücksichtigt, fordert die Beteiligung weiterer T-Box-Proteine, die mit *cTbx5* koexprimiert werden.

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, ob andere T-Box-Genprodukte als Kandidaten für eine *Tbx5*-Koexpression in Frage kommen, sollen im Folgenden kurz die retinalen mRNA-Expressionsmuster von *Tbx2*, *Tbx3* und *Tbx12* beschrieben werden. In Hühnchenembryonen werden von E2,5 an *Tbx2*, *Tbx3* und *Tbx5* in der dorsalen Hälfte des Augenbechers koexprimiert, wobei die Expressionsstärke von *Tbx2* höher zu sein scheint, als die von *Tbx3* (Gibson-Brown et

---

<sup>18</sup> Cytomegalovirus.

al., 1998). Dieselbe DV-Asymmetrie haben die *Tbx2* und *Tbx5* auch in der embryonalen Mausretina (Sowden et al. 2001). Hier verflacht der *Tbx2*-Gradient jedoch, bevor sich die GCL gebildet hat. Anschließend bleibt die *Tbx2*-Expression auf retinale Vorläuferzellen, später auf RGCs sowie Zellen der inneren nukleären Schicht („inner nuclear layer“, INL) beschränkt. Die dorsale Expressionsdomäne von *Tbx3* wird, wie die von *Tbx5*, auch in Mausembryonen während der GCL-Bildung aufrecht erhalten. Abgesehen vom *mTbx5*-mRNA-Expressionsmuster (Sowden et al., 2001), wurden bis dato keine Daten veröffentlicht, die belegen, dass mTbx5 eine der cTbx5 entsprechende Funktion bei der axialen Musterbildung der Mausretina ausübt. *Tbx12* der Maus wird gegen E8,5 in der dorsalen Hälfte des optischen Vesikels exprimiert. Nach E11,5 können von *Tbx12* jedoch keine Transkripte mehr in der Retina festgestellt werden.

In Anbetracht des ausgebliebenen dorsalisierenden Effektes der retroviralen Fehlexpression von *cTbx5* auf die Bildung retinaler Axonfaszikel erscheint es aufgrund der beschriebenen retinalen mRNA-Expressionsmuster weiterer *T-Box*-Gene durchaus plausibel, dass gewisse Charakteristika der dorsalen Retinahälfte eher von der räumlich-zeitlich konzertierten Expression mehrerer *T-Box*-Genprodukte kontrolliert werden als von der Expression des *cTbx5*-Transkriptionsfaktors alleine. Etwaige regulatorische Wechselwirkungen zwischen cTbx5 und den vorgestellten *T-Box*-Faktoren während der frühen axialen Musterbildung der Retina könnten in einem zukünftigen Projekt durch retrovirale Fehlexpression und anschließender Analyse von mRNA-Expressionsmustern untersucht werden.

Auch die retinale Regionalisierung entlang der TN-Achse wird von hierarchisch organisierten Molekülen kontrolliert. In der embryonalen Hühnchenretina wird das Gen des „winged helix“-Transkriptionsfaktors *FoxG1* in einem von nasal nach temporal verlaufenden Gradienten exprimiert, wobei der mRNA-Verteilungsschwerpunkt von *cFoxG1* in der nasalen Retinahälfte liegt (Yuasa et al., 1996; Schulte und Cepko, 2000). Das *FoxG1*-Genprodukt, das gleichzeitig mit *cVax* und *cTbx5* exprimiert wird, ist an der retinotektalen Projektion entlang der TN-Achse beteiligt (Yuasa et al., 1996). Um zu untersuchen, ob es eine molekulare Verknüpfung zwischen der Regionalisierung entlang der TN-Achse und der Entstehung des Axonfaszikelmusters entlang der DV-Achse gibt, wurde *cFoxG1* in der embryonalen Hühnchenretina retroviral fehlexprimiert (Abschn. 9). Es wurde festgestellt, dass die ektopische Expression von *cFoxG1* weder im dorsal-temporalen noch im ventral-temporalen Retinaquadranten einen Einfluß auf die Bildung des Axonfaszikelmusters entlang der DV-Achse ausübte. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Methode der retroviralen Fehlexpression an sich keine Änderung des DV-Faszikelmusters bewirkt.

### 15.3 Die Ephrin-B2-vermittelte in vivo-Stimulation von EphB-Rezeptoren stört Axon-Axon-Kontakte und verursacht Axonwegfindungsfehler in der ventralen Retina

Im Gegensatz zur embryonalen Hühnerretina gibt es in der sich entwickelnden Mausretina keine räumlich voneinander abgegrenzten und zeitlich stabilen Expressionsprofile von *EphB*- und *Ephrin-B*-Transkripten entlang der DV-Achse (Abschn. 8; Birgbauer et al., 2000; Hindges et al., 2002). Trotz dieses artspezifischen Unterschieds in der *EphB*- und *Ephrin-B*-Genexpression ist es wahrscheinlich, dass in diesen beiden Wirbeltierarten gewisse molekulare Mechanismen der Faszikulierung und intraretinalen Wegfindung von RGC-Axonon stammesgeschichtlich konserviert sind. So wurde bei der Charakterisierung von Mausmutanten, denen *EphB2/EphB3* oder *EphB1/EphB2/EphB3* fehlten (Birgbauer et al., 2000; Oster et al., 2004), durch in vitro-DiI-Axonmarkierung festgestellt, dass sich in 33% der untersuchten Retinae kleinere Gruppen dorsaler RGC-Axone, kurz bevor sie die Papille erreichten, von den Axonfaszikeln abtrennten und ziellos, teilweise auf beiden Seiten der Papille vorbei, in die ventrale Hälfte der Retina hineinwanderten. Diese Beobachtung belegt sehr deutlich, dass eine Störung der Balance von EphB/Ephrin-B-vermittelten Axon-Axon-Kontakten durch Verlust von zwei bzw. drei EphB-Rezeptoren („loss-of-function“) zu intraretinalen Wegfindungsfehlern führt. Um zu prüfen, ob auch durch Hinzufügen eines Ephrin-B-Liganden („gain-of-function“) die Faszikulierung benachbarter RGC-Axone und dadurch womöglich Fehler bei der intraretinalen Wegfindung verursacht werden, wurden EphB-Rezeptoren durch retrovirale Fehlexpression von *Ephrin-B2* in vivo stimuliert. Anschließend wurde der DV-Faszikelmuster-Phänotyp entweder immunohistochemisch oder durch in vitro-DiI-Axonmarkierung untersucht (Abschn. 11).

Das Ergebnis der Doppelfärbung von Präparaten ganzer E6,5-Hühnerretinae mit den axon- und virusspezifischen Antikörpern zeigte, dass eine über die gesamte Retina erzwungene *Ephrin-B2*-Expression zu Störungen des Faszikelmusters in der ventralen, aber nicht der dorsalen NFL führte: Die dicken Axonbündel defaszikulierten, wobei kleinere Gruppen von Axonen, vielleicht sogar einzelne Axone, in lockenförmigen Bahnen wuchsen. Dieser Ephrin-B2-Phänotyp wurde mit unterschiedlicher Häufigkeit in zwei Ausprägungen beobachtet: Bei 86% der untersuchten Retinae defaszikulierten die ventralen Axone außerhalb sehr stark infizierter Geweberegionen, während in nur 14% der Fälle die gestörte Faszikelmorphologie innerhalb sehr stark infizierter Geweberegionen aufzutreten schien. Beide Varianten dieser Faszikulierungsstörungen wurden in unregelmäßigen Abständen innerhalb der gesamten ventralen NFL beobachtet.

Im Gegensatz zur embryonalen Mausretina befindet sich der axiale Verteilungsschwerpunkt von *EphB*-Transkripten während der intraretinalen Wegfindung von RGC-Axonon in der ventralen Hälfte der embryonalen Hühnchenretina (Abschn. 8). Deswegen war die Bildung von EphB/Ephrin-B2-Komplexen in der dorsalen Retinahälfte nicht möglich und Störungen des Axonfaszikelmusters in der dorsalen NFL aufgrund einer experimentell herbeigeführten in vivo-Stimulation von EphB-Rezeptoren von vornherein unwahrscheinlich.

Der retrovirale Vektor RCASBP(B)-*Ephrin-B2*, der für den Gentransfer von *Ephrin-B2* benutzt wurde, war replikationskompetent. Daher konnte dieses Retrovirus, ausgehend von einer infizierten Zelle des retinalen Neuroepithels, jede benachbarte Zelle infizieren, die mitotische Zellteilung durchführte. Gemäß des Protokolls wurden die RCAS-Virusinfektionen im Stadium des optischen Vesikels eingeleitet (E1,5; HH11). Bis zum Zeitpunkt der Retinapräparationen (E6,5) hatten sich die Virusinfektionen auf sehr große Bereiche des Retinagewebes verbreitet. In diesem Entwicklungsstadium ist die Neurogenese der RGCs beinahe abgeschlossen und die intraretinale Wegfindung von RGC-Axonon in vollem Gange. Die meisten RGC-Axone, die an Faszikulierungsstörungen in der ventralen NFL beteiligt waren, waren mit RCASBP(B)-*Ephrin-B2* infiziert, wie die Kollokalisierungen der virus- und neurofilamentspezifischen Antikörper p27 und RMO270 jeweils belegten (Abschn. 11). Aus der immunohistochemischen Analyse des Ephrin-B2-Phänotyps darf also gefolgert werden, dass die Faszikulierungsstörungen auf EphB/Ephrin-B2-vermittelten Axon-Axon- und/oder Axon-Zell-Kontakten beruhen. Ob diese experimentell erzeugten Kontakte anziehender oder abstossender Natur sind, konnte anhand der Antikörper-Doppelfärbungen aus zwei methodischen Gründen jedoch nicht eindeutig belegt werden. Erstens: Da eine Neurofilament-Färbung alle RGC-Axone markiert, war es nicht möglich, kleinere Gruppen von Axonen zu untersuchen. Zweitens: Da bei allen untersuchten Retinapräparationen Anzahl und Größe der virusfreien Gewebereiche klein waren, gab es kaum RGC-Axone, die nicht von der *Ephrin-B2*-Fehlexpression betroffen waren. Insofern relativiert sich die Bedeutung der Feststellung ein wenig, dass etwa bei einem Zehntel der untersuchten Retinapräparate defaszikulierte RGC-Axone auch innerhalb stark infizierter Geweberegionen beobachtet wurden (Abschn. 11).

Die immunohistochemische Analyse des ventralen Faszikelmusters deutete darauf hin, dass die experimentell eingeleiteten EphB/Ephrin-B2-vermittelten Axon-Axon-Kontakte kleinere Axongruppen und womöglich sogar einzelne Axone zu intraretinalen Wegfindungsfehlern zwangen. Um festzustellen, ob dies auf veränderte Axon-Axon-Kontaktanziehung oder Axon-Axon-Kontaktabstossung beruhte, musste das Axonwegfindungsverhalten innerhalb und außerhalb von virusinfiziertem Retinagewebe im Detail untersucht werden. Hierfür sollten zunächst in Explantaten von RCASBP(B)-*Ephrin-B2*-infizierten E6,5-Hühnchenretinae kleinere

Gruppen von RGC-Axonon mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff DiI markiert und anschließend fluoreszenz- oder lasermikroskopisch analysiert werden (Abschn. 11). Erwartungsgemäß wuchsen die dorsalen RGC-Axone ohne Reaktion auf die erzwungene *Ephrin-B2*-Expression, in parallelen Bahnen in Richtung der Papille. Wie die Neurofilament-Färbungen vermuten ließen, war die intraretinale Wegfindung ventraler RGC-Axone nach retroviraler Fehlexpression von *Ephrin-B2* massiv gestört. Viele Axonfaszikel entbündelten sich, einzelne Axone verließen ihre Bahnen und wuchsen in Halbkreisen. Andere Axone wiederum schienen in einem vollständigen Kreis zu wachsen. Es wurde auch festgestellt, dass defaszikulierte Axonbündel bestimmte Geweberegionen zu umwandern schienen. Ob es sich dabei um stark infiziertes Gewebe handelte, in dem größere Mengen von *Ephrin-B2*-Protein vorhanden waren, konnte ohne immunohistochemischen Nachweis des viralen Vektors nicht festgestellt werden. Wie bei den cVax-Experimenten (Abschn. 9) war es aus methodischen Gründen nicht möglich, im Anschluss an eine DiI-Axonmarkierung eine p27-Färbung durchzuführen, die eine ausreichende Spezifität hatte (Daten nicht gezeigt).

Ein neuer Lösungsansatz sieht vor, *Ephrin-B2* in einen retroviralen Vektor wie pRISAP („replication incompetent avian retroviral vector with additional splice acceptor site and alkaline phosphatase“; Chen et al., 1999) zu klonieren, der nicht vermehrungsfähig, also replikationsinkompetent ist. Solche replikationsinkompetenten Retroviren können aufgrund gentechnischer Manipulation nach der Infektion einer Wirtszelle keine neuen infektiösen Viruspartikel produzieren. Deshalb verbreiten sich solche Retroviren nach der Erstinfektion nicht auf Zellen des umliegenden Gewebes. Diesen Vorteil könnte man sich zunutze machen, um die *Ephrin-B2*-Fehlexpression auf kleinere infizierte Gewebereiche zu beschränken. Auf diese Weise könnte das Wegfindungsverhalten von RGC-Axonon in Gegenwart und Abwesenheit von *Ephrin-B2*-Fehlexpression innerhalb eines Retinapräparats mit Hilfe der etablierten immunohistochemischen Analyse untersucht werden.

Im Gegensatz zum cVax-Phänotyp (Abschn. 9) traten beim *Ephrin-B2*-Phänotyp (Abschn. 11) die Störungen des Axonfaszikelusters und die intraretinalen Axonwegfindungsfehler in der ventralen, aber nicht in der dorsalen NFL auf. Weil in der embryonalen Hühnerretina EphB-Rezeptoren in der ventralen Hälfte der Retina exprimiert werden (Schulte et al., 1999), ist eine Bildung von EphB/*Ephrin-B2*-Komplexen in der dorsalen Retinahälfte normalerweise nicht möglich. Deshalb war es nicht überraschend, dass nach *Ephrin-B2*-Fehlexpression Faszikulierungsstörungen in der dorsalen Retinahälfte auftraten. Auch unterschieden sich die Axonwegfindungsstörungen beider Phänotypen qualitativ: Während nach *Ephrin-B2*-Fehlexpression viele defaszikulierte Axone in halben oder ganzen Kreisbahnen wuchsen, vollzogen viele der unter cVax-Fehlexpression stehenden RGC-Axone periodische De- und

Refaszikulierung. Dies lag vermutlich an den unterschiedlichen experimentellen Ansätzen: Durch *Ephrin-B2*-Fehlexpression sollte geprüft werden, ob die in vivo-Stimulation von EphB-Rezeptoren durch einen ektopisch exprimierten Ephrin-B-Liganden die Faszikulierung benachbarter RGC-Axone stört und dadurch möglicherweise intraretinale Wegfindungsfehler verursacht. Durch ektopische *cVax*-Expression hingegen wurde die Transkription von *EphB2* und *EphB3* in der dorsalen Retinahälfte aktiviert und gleichzeitig die dorsale Expression von *Ephrin-B1* und *Ephrin-B2* vollständig unterdrückt (Schulte et al., 1999). Inwiefern die Expression von *EphB1*, *EphB5* und *Ephrin-B3* durch fehlexprimiertes *cVax* beeinflusst wird, ist nicht bekannt. Durch Fehlexpression von *cVax* entstand ein dorsaler *EphB*-Verteilungsschwerpunkt, den es eben nach retroviraler Fehlexpression von *Ephrin-B2* nicht gab. Weil B-Ephrine höchstwahrscheinlich keinen Einfluss auf die Transkriptionsregulation von *EphB*-Genen haben, blieben die *EphB*-Expressionsmuster trotz Fehlexpression von *Ephrin-B2* unverändert auf die ventrale Retinahälfte begrenzt. Dies könnte dazu beigetragen haben, dass die Faszikulierungsstörungen nach *Ephrin-B2*-Fehlexpression massiver waren als nach *cVax*-Fehlexpression.

Anders als beim Ephrin-B2-Phänotyp traten die Axonwegfindungsstörungen beim *cVax*-Phänotyp in der ventralen NFL scheinbar nur in unmittelbarer Nähe der optischen Fissur auf (Abschn. 9). Die Ventralisierung der *EphB*-Expressionsmuster bzw. die Unterdrückung der *Ephrin-B*-Expression in der dorsalen Retina scheint als alleinige Begründung nicht auszureichen, um die Entstehung dieser *cVax*-Phänotyp-Komponente zu erklären. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass *cVax* die Expression weiterer Genprodukte reguliert, die im Kontext mit dem EphB/Ephrin-B-System an der intraretinalen Wegfindung von RGC-Axonon entlang der DV-Achse beteiligt sind. Insofern besteht die Herausforderung zukünftiger Projekte darin, neue Genprodukte zu finden, deren Transkription durch *cVax* reguliert wird bzw. die mit *cVax* wechselwirken, um die Expression von Zielgenen zu regulieren.

Da mit Hilfe des retroviralen *Ephrin-B2*-Vektors ein EphB-Ligand voller Länge fehlexprimiert wurde, konnten die in der ventralen Retina erzwungenen EphB/Ephrin-B2-Wechselwirkungen theoretisch vorwärts, rückwärts oder/und bidirektional-gerichtete Signaltransduktion auslösen. Es ist deshalb nicht möglich, eine konkrete Aussage über die Signalrichtung zu treffen, die durch diese in vivo-Stimulation erzeugt wurde. Dennoch liefert ein Modell, das die intraretinalen Axonwegfindungsfehler der bereits vorgestellten *EphB2/EphB3*-Mausmutante erklären soll, einen Hinweis darauf, dass die beobachteten Faszikulierungsstörungen und Axonwegfindungsfehler in der Hühnchenretina möglicherweise durch rückwärts gerichtete Signaltransduktion eingeleitet wurden. Folgende Ergebnisse trugen zur Entwicklung dieses „ephrin-B reverse signaling“-Modells bei (Birgbauer et al., 2000; 2001). In der Mausmutante, der EphB2 und EphB3 fehlten,

betrug die relative Häufigkeit bestimmter Wegfindungsfehler<sup>19</sup> dorsaler RGC-Axone 21%. In einer anderen Mausmutante, der nur EphB3 und die intrazelluläre Kinase-Domäne von EphB2 fehlten, war das Auftreten dieser Axonwegfindungsfehler auf 4% reduziert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass allein die Gegenwart der extrazellulären Domäne (ECD) von EphB2 ausreichte, um eine nahezu korrekte Wegfindung aller dorsalen RGC-Axone zur Papille zu ermöglichen. Wurden dorsale RGC-Axone der gelösten ECD von EphB1, EphB2 oder EphB3 in vitro ausgesetzt, war der Wachstumskegelkollaps die häufigste Reaktion. Wurden dorsale RGC-Axone mit der Substrat gebunden ECD von EphB1, EphB2 oder EphB3 in vitro konfrontiert, drehten die Wachstumskegel ab oder stoppten sogar ganz. Somit ist die ECD dafür verantwortlich, dass EphB-Proteine auch eine kinaseunabhängige Funktion als so genannte hemmende Axonleitmoleküle („inhibitory axon guidance cues“) ausüben, die in der retinalen Ephrin-B tragenden Zelle rückwärts gerichtete Signaltransduktion auslösen.

Nun besagt dieses Modell, dass Ephrin-B tragende dorsale RGC-Axone, die ventral in Richtung der Papille wandern, mit einem ansteigenden Gradienten hemmender EphB-ECDs konfrontiert werden. Diese Hemmung führt zu einer immer dichter gedrängten Bündelung der dorsalen RGC-Axone. Diese feste Faszikulierung wiederum verhindert, dass die dorsalen RGC-Axone in die ventrale NFL einwandern. Ist diese hemmende Wirkung der EphB-ECDs sehr stark vermindert, wie im Falle der EphB-Doppelmutante, machen dorsale RGC-Axone die beschriebenen Wegfindungsfehler. Ein einfaches „ephrin-B reverse signaling“-Modell scheint allerdings zur vollständigen Erklärung der Wegfindungsfehler dorsaler RGC-Axone der embryonalen Mausretina nicht auszureichen, denn in den *EphB*-Mausmutanten werden *Ephrin-B1* und *Ephrin-B3* nicht nur in der dorsalen Hälfte, sondern auch in der ventralen Hälfte der Retina exprimiert.

Wenn dieses Modell als Ansatz zur Erklärung der beobachteten Faszikulierungsstörungen und Axonwegfindungsfehler in der Hühnchenretina dienen soll, ist folgendes zu beachten. Anders als in der sich entwickelnden Mausretina bleiben die axialen Verteilungsschwerpunkte von *EphB*- und *Ephrin-B*-Transkripten in der embryonalen Hühnchenretina stabil (Abschn. 8). Des Weiteren wurden die Charakterisierungen der *EphB*-Mausmutanten und Wildtyp-Mäuse zwischen E13 und E16 durchgeführt (Birgbauer et al., 2000; Oster et al., 2004). In der Retina von Wildtyp-Mäusen werden innerhalb dieses Zeitraums nur *EphB2* und *Ephrin-B2* in gegenläufigen DV-Gradienten exprimiert, während die anderen *EphB*- und *Ephrin-B*-Gene symmetrisch, also nicht differentiell, entlang der DV-Achse exprimiert werden. Somit ist *Ephrin-B2* im Wildtyp und auch in den beiden *EphB*-Mutanten derjenige EphB-Ligand, bei dem der Unterschied der Expressionsstärke zwischen dorsaler und ventraler Retinahälfte in diesem Zeitraum am größten ist. Zudem ist *Ephrin-B2* das einzige B-Ephrin, das zwischen E13 und E16 nicht in der GCL, sondern nur in der

---

<sup>19</sup> Fehlgeleitete RGC-Axone mit einer Gesamtlänge von größer bzw. gleich 1000 µm.

so genannten äußeren Retina exprimiert wird. P0 ist der früheste Untersuchungszeitpunkt, an dem *Ephrin-B2* auch von RGCs in einem DV-Gradienten exprimiert wird (Hindges et al., 2002). Folglich dürften in Retinae von Wildtyp- und *EphB*-Mutanten zwischen E13 und E16 von den drei B-Ephrinen nur Ephrin-B1- und Ephrin-B3-Protein in der GCL und der NFL vorhanden sein. In der dorsalen Hälfte der embryonalen Hühnchenretina, hingegen, werden Ephrin-B1- und Ephrin-B2-Proteine nur in der GCL, aber nicht in der NFL exprimiert (Braisted et al., 1997). Wenn also die dorsalen RGC-Axone der *EphB1/EphB2/EphB3*-Mausmutante zwischen E13 und E16 ventral in Richtung der Papille wandern, dürften sie in der NFL ausschließlich auf EphB4 treffen. Es ist anzumerken, dass EphB4 zwischen E14 und E16 jedoch nur symmetrisch entlang der DV-Achse exprimiert wird (Hindges et al., 2002). Insofern ist es denkbar, jedoch nicht sehr wahrscheinlich, dass in der *EphB*-Dreifach-Mutante EphB4 als einzig verbliebenes EphB-Protein die korrekte Wegfindung der unbeschädigten dorsalen RGC-Axone ermöglicht. Höchstwahrscheinlich arbeiten jedoch EphB-Proteine hierbei mit anderen Zelloberflächen-Molekülen wie L1 auf verschiedene Weise zusammen (Abschn. 15.2).

Wie bereits geschildert, treten in den *EphB2/EphB3*- und *EphB1/EphB2/EphB3*-Mausmutanten fehlgeleitete dorsale RGC-Axone nur in der Papillenregion auf, während die Mehrheit der dorsalen und ventralen RGC-Axone korrekt zur Papille wandern. Diese räumliche Beschränkung der Axonwegfindungsfehler ist in Anbetracht der beschriebenen retinalen *EphB*-Expressionsmuster überraschend. Denn sollten nach Verlust mehrerer EphB-Rezeptoren nicht größere Gewebereiche von Axonwegfindungsfehlern betroffen sein, die auf denselben gestörten molekularen Mechanismus zurückzuführen sind? In der embryonalen Hühnchenretina hingegen treten nach *in vivo*-Stimulation von EphB-Proteinen innerhalb der gesamten ventralen NFL in unregelmäßiger Verteilung Störungen der Faszikelmuster auf (Abschn. 11). Möglicherweise liegt hierbei ein weiterer speziesspezifischer Unterschied zwischen der intraretinalen Axonwegfindung von Hühnchen und Maus. Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass die experimentellen Manipulationen zwischen den angeführten Studien mit Mausmutanten und der vorliegenden Arbeit prinzipiell verschieden sind. In dieser Arbeit wurde eine *Ephrin-B2*-Expression über die gesamte Retina durch retrovirale Fehlexpression erzwungen („gain-of-function“-Bedingungen), wobei die EphB-Expressionsprofile in der ventralen Retinahälfte erhalten blieben. Dies bedeutet, dass EphB-vermittelte Signaltransduktionen, z. B. im Kontext mit L1 und/oder Laminin, trotz der *in vivo*-Stimulation möglich gewesen wären. Anders in den *EphB*-Mausmutanten, in denen abgesehen von EphB4, keine EphB-vermittelten Möglichkeiten der interzellulären Kommunikation mehr vorhanden waren. In einem zukünftigen Projekt wäre es möglich, die *EphB2-ECD* in einen replikationskompetenten oder replikationsin-kompetenten retroviralen Vektor zu klonieren, um eine ektopische Expression von *EphB2-ECD* über die gesamte

Hühnchenretina zu erzeugen. Auf diese Weise könnte geprüft werden, ob eine kinaseunabhängige in vivo-Stimulation von B-Ephrinen die Bildung des Faszikelmusters bzw. die Axonwegfindung in der dorsalen NFL stört. Käme es zu Faszikulierungsstörungen, die zu fehlerhafter Wegfindungsfehlern dorsaler RGC-Axone führen, wäre der Beweis erbracht, dass rückwärts gerichtete Signaltransduktion auch bei der intraretinalen Axonwegfindung im Hühnchen eine bedeutende Rolle spielt. Alternativ könnte die EphB-Expression in der embryonalen Hühnchenretina durch die RNA-Interferenz-Methode unterdrückt werden.

Mit Hilfe des Birgbauerschen Modells allein können die intraretinalen Wegfindungsfehler dorsaler RGC-Axone in der embryonalen Mausretina nicht erklärt werden. In dieser Hinsicht scheint die Modulation der EphB-vermittelten Signaltransduktion durch L1 und Laminin eine Möglichkeit zu sein, das Konzept des Birgbauerschen Modells sinnvoll zu ergänzen. In der Mausretina treffen L1 tragende RGC-Axone nur in der unmittelbaren Umgebung der Papille auf Laminin (Höpker et al., 1999). In einer in vitro Studie wurde gezeigt, dass dorsale RGC-Axone der Mausretina, die auf einer Kombination aus L1- und Laminin-Substrat wachsen, auf EphB1, EphB2 oder EphB3 nicht mit dem typischen Kollaps des Wachstumskegels, sondern mit einer neuen Variante von Wachstumshemmung reagieren (Suh et al., 2004). Diese Hemmung äußerte sich darin, dass das Axonwachstum stoppte, wobei jedoch die Kegelmorphologie und Filopodienaktivität aufrecht erhalten wurden. In vivo würde die daraus resultierende Unterbrechung der Axonverlängerung verhindern, dass die RGC-Axone über die Papille hinaus wandern. Da die Filopodienaktivität jedoch weiterhin vorhanden ist, würden die RGC-Wachstumskegel in unmittelbarer Nähe an der Papille „empfindlich“ für weitere Axonleitmoleküle sein. Netrin-1 ist hierfür ein interessanter Kandidat. Denn bei der Charakterisierung von Mausmutanten, denen Netrin-1 fehlt, wurde festgestellt, dass DCC tragende RGC-Axone Netrin-1 benötigen, um in den optischen Nerv einzuwandern (Deiner et al., 1997). Diese Ergänzung des Modells von Birgbauer und Kollegen verdeutlicht, dass eine korrekte Axonwegfindung in der embryonalen Mausretina das konzertierte Zusammenwirken verschiedener Molekülararten erfordert. Trotz der beschriebenen morphologischen Unterschiede zwischen der Retinaentwicklung von Hühnchen und Maus ist es weiterhin erstrebenswert, zur Aufklärung der molekularen Mechanismen von Faszikulierung und intraretinalen Axonwegfindung in der embryonalen Hühnchenretina Daten aus Mausmodellen heranzuziehen. Daher sollte in einem zukünftigen Projekt beispielsweise geprüft werden, ob die L1/Laminin vermittelte Modulation der EphB-Signale auch eine Bedeutung für die intraretinale Axonwegfindung im Hühnchen hat.

Auch die Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden der A-Unterklasse, die entlang der TN-Achse exprimiert werden, stehen unter Kontrolle hierarchisch organisierter Regionalisierungsfaktoren. In der embryonalen Hühnchenretina werden die Transkripte von *Ephrin-A5* in einem von nasal nach temporal abnehmenden Gradienten exprimiert (Connor et al., 1998). Die Transkripte von *EphA3*, einer der retinalen Ephrin-A5-Rezeptoren, werden hingegen in einem gegenläufigen Gradienten, also von temporal nach nasal abnehmend, exprimiert (Cheng et al., 1995). Wechselwirkungen zwischen Ephrin-A5 und EphA3 dienen möglicherweise der intraretinalen Zell- und Gewebeorganisation (Connor et al., 1998). Wie im Fall von EphA3 und Ephrin-A5 wechselwirken Eph-Rezeptoren normalerweise nur mit Ephrin-Liganden derselben Unterklasse. Bis vor kurzem bildete EphA4 die einzige Ausnahme dieser Regel (Gale et al., 1996a; 1996b). Überraschenderweise wurde kürzlich in einer in vitro-Studie festgestellt, dass die Stimulation von EphB2 (der Maus) durch Ephrin-A5 (des Menschen) bei den Rezeptor tragenden Neuronen zum Kollaps des Wachstumskegels und Zurückziehen des Axons führte (Himanen et al., 2004). In der embryonalen Hühnchenretina verläuft das mRNA-Expressionsmuster von *EphB2*, wie auch das von *EphB3*, in einem von ventral nach dorsal abnehmenden Gradienten (Abschn. 8; Schulte et al., 1999).

Da die in vivo-Stimulation von EphB-Rezeptoren durch Fehlexpression von *Ephrin-B2* Störungen von Axon-Axon-Kontakten verursachte, wurde geprüft, ob eine Stimulation von EphB2 durch fehlexprimiertes *Ephrin-A5* auch in vivo Störungen des Faszikelmusters in der ventralen NFL hervorruft (Abschn. 11). Die immunohistochemische Analyse ergab jedoch, dass eine über die gesamte Retina erzwungene *Ephrin-A5*-Expression keine Änderung des DV-Axonfaszikelmusters verursachte. Obwohl der Ephrin-A5-Ligand den EphB2-Rezeptor in vitro stimulieren kann (Himanen et al., 2004), deutet das Ergebnis der vorliegenden Arbeit stark darauf hin, dass sich in vivo keine Ephrin-A5-vermittelte EphB2-Stimulation ereignete. Falls es dennoch zu einer Ephrin-A5/EphB2-Bindung kam, hatte diese jedoch keinen Einfluß auf die Bildung des DV-Axonfaszikelmusters. Auch die retrovirale Fehlexpression von *cFoxG1* hatte keinen Einfluß auf das DV-Faszikelmuster (Abschn. 9). Das Ephrin-A5- und das *cFoxG1*-Ergebnis deuten gemeinsam darauf hin, dass weder TN-Regionalisierungsfaktoren noch TN-Axonleitmoleküle eine bedeutende Rolle bei der Faszikelbildung entlang der TN-Achse spielen. Abgesehen davon zeigen beide Ergebnisse, dass die Methode des retroviralen Gentransfers die Faszikelbildung nicht stört.

## 15.4 Mögliche Konsequenz des retinalen DV-Axonfaszikelmusters für das visuelle

### Verhalten des Hühnchens

Obwohl die Myelinscheidenbildung nicht ursächlich an der Entstehung des beschriebenen Axonfaszikelmusters der Hühnchenretina beteiligt ist (Abschn. 7), beeinflusst die differentielle Axonmyelinisierung entlang der DV-Achse wahrscheinlich die Erregungsfortleitung von RGC-Axonon. Myelinisierte Axone haben nämlich aufgrund der saltatorischen Fortleitung von Aktionspotentialen eine höhere Leitungsgeschwindigkeit als Axone ohne Myelinscheide. Ebenso steht der Unterschied in Zahl und Zusammensetzung dorsaler und ventraler Ganglienzellaxone vermutlich in Beziehung zur Sehschärfe dieses Vogels. Für das Hühnchen ist es überlebenswichtig, dass es am Boden liegende Nahrungsobjekte erkennt und von oben nahende Fraßfeinde rechtzeitig wahrnimmt. Durch die Augenlinse werden größere, sich schnell bewegende Objekte des oberen visuellen Felds auf die ventrale Retina und kleinere Objekte des unteren visuellen Felds auf die dorsale Retina abgebildet. Demnach scheint die relativ geringe Zahl großer, hauptsächlich myelinisierter RGC-Axonon der ventralen NFL, die Erfordernis einer sehr schnellen Leitungsgeschwindigkeit zu erfüllen. In der dorsalen Retina adulter Hühnchen wurden dagegen zwei Regionen hoher Ganglienzell-Dichte gefunden (Chen and Naito, 1999). Eine dieser beiden Zonen, die Area centralis, ist dorsozentral gelegen und dient als Zentrum schärfsten Sehens. Folglich ist die Area centralis des Hühnchens der Fovea centralis der Primaten ähnlich. Darüber hinaus besitzen Hühnchen in der ventralen Retina eine höhere Dichte an Stäbchenphotorezeptoren als in der dorsalen (Bruhn und Cepko, 1996; Schulte et al., 2005). Im Gegensatz zur dorsalen Hälfte ist die ventrale Hälfte der Retina somit besser dafür geeignet, unter schwächeren Lichtverhältnissen sich bewegende Objekte wahrzunehmen (skotopisches Sehen), wie beispielsweise nahende Greifvögel in der Dämmerung. Damit ist also auch die asymmetrische Verteilung von Stäbchenphotorezeptoren eine Anpassung an die Lebensweise von Hühnchen. Interessanterweise steht die Musterbildung der Stäbchenphoto-rezeptoren genau wie die Bildung des Faszikelmusters von RGC-Axonon, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, unter Kontrolle des Homöobox-Transkriptionsfaktors *cVax* (Schulte et al., 2005). Folglich spielt *cVax* als DV-Regionalisierungsfaktor eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung verschiedener Eigenschaften der Retina, die für die Anpassung von Hühnervögeln an ihre ökologische Nische wichtig sind.

## **16. Screening nach Genen, die asymmetrisch entlang der temporal-nasalen-Achse der embryonalen Hühnchenretina exprimiert werden**

Beim Hühnchen bzw. bei der Maus wird die retinotektale bzw. retinocolliculare Projektion in einem mehrschrittigen Prozess entwickelt (McLaughlin et al., 2003). Nach der Sperry'schen Chemoaffinitätshypothese liefert die asymmetrische Verteilungen von topographischen Molekülen entlang der retinalen TN- bzw. DV-Achse und tektalen AP- bzw. LM-Achse die notwendigen Positionsinformationen, um die Projektionen von RGC-Axonon zu kontrollieren (Sperry, 1963). Am Ende dieses Prozesses hat sich eine streng sortierte, topographische Karte der axonalen Verbindungen zwischen RGCs und tektalen Neuronen gebildet. Die Information zur TN-Kartierung der Retina entlang der anterior-posterioren Achse des Tektums bzw. Colliculus wird durch das EphA/Ephrin-A-System erzeugt.

Trotz dieser wichtigen Erkenntnis sind einige Fragen unbeantwortet. Die anfänglichen retinotektalen bzw. retinocollicularen RGC-Projektionen sind nicht präzise, obwohl die EphA-Rezeptoren und Ephrin-A-Liganden in räumlich-zeitlich stabilen Gradienten im Tektum bzw. Colliculus exprimiert werden (Nakamura und O'Leary, 1989; Simon und O'Leary, 1992; Cheng et al., 1995; Drescher et al., 1995). Darüber hinaus wurde bei einer Mausmutante, der Ephrin-A2 und Ephrin-A5 fehlen, festgestellt, dass trotz des Verlusts dieser primären Axonleitmoleküle eine gewisse topographische Ordnung der retinocollicularen Projektion erhalten bleibt (Feldheim et al., 2000). Das zweite Projekt hatte daher zum Ziel, weitere Moleküle zu identifizieren, die möglicherweise die Topographie von RGCs entlang der TN-Achse beeinflussen. Hierfür wurde ein cDNA-Microarray-Screening nach Genen durchgeführt, die asymmetrisch entlang der TN-Achse exprimiert werden.

### **16.1 Etablierung und Anwendung der cDNA-Microarray-Methode**

Nach wie vor stehen nur wenige gewebe- und entwicklungsspezifische cDNA-Microarrays für die Anwendung in der Entwicklungsbiologie zur Verfügung. Dies trifft in erster Linie für Spezies zu, deren Genom nicht sequenziert wurde oder die nicht von einem größeren EST-Projekt unterstützt werden. Mittlerweile ist es jedoch möglich, cDNA-Microarrays auch in kleineren Serien nicht-kommerziell herzustellen. Im einfachsten Fall werden hierfür zufällige, unbekannte Klone einer gewebe- oder entwicklungs-spezifischen cDNA-Bibliothek benutzt (Livesey et al., 2000). Dabei werden nur diejenigen Klone durch Sequenzierung und Datenbanksuche identifiziert, die nach der Datenanalyse vielversprechend erscheinen. Genau nach diesem Prinzip wurden in einer vorausgegangenen Arbeit die cDNA-Microarrays hergestellt, die in der vorliegenden Arbeit für die Etablierung der Methode und deren Anwendung benutzt wurden.

Die großen Herausforderungen bei der Anwendung der Microarray-Methode in der Entwicklungsbiologie sind die Heterogenität des Gewebes und die geringen Expressionsstärken vieler Gene. Dies trifft insbesondere für neuronales Gewebe zu. Bereits das sich entwickelnde Nervensystem ist aus heterogenen Zellpopulationen zusammengesetzt, die anhand ihrer Morphologie und Lage im Gewebe häufig schwer zu unterscheiden sind. Nach Abschluss ihrer Entwicklung besteht eine Wirbeltierretina aus 7 Zellklassen, die wiederum in verschiedene Unterklassen eingeteilt werden. Insgesamt handelt es sich um über 50 verschiedene neuronale und glialen Zelltypen, die in einer hochorganisierten laminaren Struktur angeordnet sind.

In der vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe von cDNA-Microarrays Gene identifiziert werden, die potentiell-nasal oder potentiell-temporal in der embryonalen Hühnchenretina exprimiert werden. Nach der Etablierung der cDNA-Microarray-Methode wurde daher ein TN-Screening nach direktem Design in der E6,5-Hühnchenretina durchgeführt. Die Retina-Microarrays, die hierfür benutzt wurden, trugen unbekannte Klone einer nicht-normalisierten und nicht-subtrahierten cDNA-Bibliothek, welche die Entwicklung der Hühnchenretina zwischen E6 und E8 umfaßte (Abschn. 27). Zudem trugen diese Microarrays bekannte cDNA-Klone, die als Kontrollen für bekannte differentielle Genexpression dienen sollten. Aufgrund mangelnder Druckqualität war jedoch nur wenige dieser Klone wie Visinin verwendbar. Ein anschauliches Beispiel für die differentielle Expression eines „idealen“ temporalen Kandidaten ist der EphA3-Rezeptor (Schulte und Cepko, 2000). Die meisten *EphA3*-Transkripte werden in der temporalen Hälfte der Hühnchenretina exprimiert, während die wenigsten bzw. gar keine *EphA3*-Transkripte in der nasalen Hälfte exprimiert werden. In der Praxis ist dies für andere Gene jedoch selten der Fall, denn die Transkripte vieler Gene sind in einem mehr oder weniger steil verlaufenden Konzentrationsgradienten entlang der TN- oder der dazu senkrechten DV-Achse verteilt. Daher sind die mRNA-Expressionsunterschiede zwischen der temporalen und der nasalen Retinahälfte häufig gering. Um den Kontrast zwischen der temporalen und der nasalen Genexpression dennoch zu verstärken, wurden für die TN-Vergleiche nur die äußeren Bereiche der nasalen und temporalen Retina verwandt. Hierfür wurde in Zusammenarbeit mit der Mechanik-Werkstatt des Instituts ein Schneidewerkzeug konstruiert, das das genaue Abtrennen eines peripheren nasalen und eines temporalen Gewebeteils vom übrigen Retinagewebe ermöglichte (Abschn. 23). Auf diese Weise konnten nahezu gleich große Gewebeteile für Wiederholungsexperimente präpariert werden. An der Zusammensetzung des Retinagewebes änderte diese Zerlegungsstrategie jedoch nichts. Heterogenes Gewebe kann die Ursache der so genannten „zellulären Mittelwertbildung“ von Genexpressionsstärken sein. Dieser Effekt trägt dazu bei, dass Genexpressionsänderungen, die sich in wenigen oder nur einer Zellpopulation ereignen, in der Gesamtheit der Transkripten stark „verdünnt“ werden (Barlow und Lockhart, 2002; Griffin et al., 2003). Aufgrund dieses Effekts

übersteigen die Expressionsänderungen auf Gewebeebene häufig nicht einmal eine zweifache Differenz zwischen der Probe und ihrer Kontrolle (Mirnics et al., 2000). Im Microarray-Experiment kann dies dann zu einer deutlichen Überlappung zwischen der tatsächlichen Genexpressionsdifferenz und dem experimentellen Rauschen führen (Mirnics, 2001). So lagen die  $M_0$ -Werte der ausgewählten cDNA-Klone tatsächlich in der Größenordnung von 2 oder weniger (Abschn. 12). Eine „zelluläre Mittelwertbildung“ von Genexpressionsstärken könnte nur dann verhindert werden, wenn die zu untersuchende Zellpopulation aus der heterogenen Zusammensetzung des Nervengewebes isoliert wird, z. B. mit Hilfe von Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS).

Auch Präparationsartefakte können einen erheblichen Einfluss auf die Datenerhebung haben, wie folgendes Beispiel einer cDNA-Microarray-Studie zeigt (Diaz et al., 2003). In dieser Studie, die während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurde, wurde die Genexpression zwischen der nasalen und temporalen sowie zwischen der dorsalen und ventralen Retina von E14,5-Mäusen verglichen. Überraschenderweise bestanden 10% der am höchsten potentiell differentiell exprimierten Gene aus Hämoglobin-Untereinheiten, während nur wenige biologisch interessante Gene identifiziert wurden. Dieses Ergebnis ist möglicherweise auf Probleme bei der Gewebepräparation zurückzuführen, denn Ganglienzellschicht und innere plexiforme Schicht der Mausretina sind mit Kapillarplexi durchzogen. Daher ist eine Präparation der Mausretina ohne eine Kontamination mit Blutgefäßen kaum möglich. In der Hühnerretina hingegen sind Ganglienzellschicht und plexiforme Schicht frei von Blutgefäßen. Dadurch wurde die Gefahr einer Verunreinigung der Präparate mit Kapillargewebe stark vermindert. In der Tat wurden auch keine Blutgefäß-spezifischen Gene identifiziert, wie die Zusammenstellung der Kandidaten belegt (Abschn. 12).

Bei den meisten der bislang veröffentlichten cDNA-Microarray-Studien wurde Gesamt-RNA in Mikrogramm-Maßstab pro Hybridisierung eingesetzt. Solche Mengen können in der Regel problemlos aus Bakterien, Hefepilzen oder aus kultivierten Zelllinien, jedoch nur schwer aus präparierten Gewebeteilen, insbesondere embryonalem Gewebe, gewonnen werden. Die einfachste Lösung dieses Problems ist, eine sehr große Anzahl von Gewebeproben zu sammeln. Alternativ sind verschiedene Methoden zur cDNA-Amplifikation geringer RNA-Ausgangsmengen verfügbar, wie zum Beispiel die SMART-Methode (Abschn. 27.2). Bedenkenlos kann die cDNA-Amplifizierung jedoch nicht angewandt werden, denn bei jeder exponentiellen Amplifizierung durch PCR wird die tatsächliche Häufigkeit von Transkripten verzerrt (Blackshaw und Livesey, 2002). Dies kann sich im Verlust von Transkripten und/oder einer signifikanten Änderung der Mengenverhältnisse verschiedener Transkripte äußern, was als Amplifizierungsfehler („amplification bias“) bezeichnet wird. Die Folge ist, dass schwach-

exprimierte Transkripte bei der Datenanalyse nicht identifiziert werden, weil sie gegenüber stark exprimierten Transkripten unterrepräsentiert sind. Die Markierung von cDNA-Zielmolekülen durch Klenow-Enzym, wie sie bei vielen Protokollen üblich ist, birgt einen weiteren systematischen Fehler, denn Klenow-Enzym baut Cy5- und Cy3-dCTP mit unterschiedlicher Effizienz in den cDNA-Strang ein (Yang und Speed, 2002). Um diesen Markierungsfehler auszugleichen, müssen bei Verwendung von Klenow-markierten cDNA-Zielmolekülen stets Farbstofftausch-Wiederholungsexperimente durchgeführt werden. Um Amplifizierungs- und Markierungsfehler von Zielmolekülen zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit die ASAP-Methode zur direkten Markierung von mRNA-Zielmolekülen benutzt (Abschn. 27.3). Bei dieser Markierungsmethode werden die mRNA-Zielmoleküle durch eine chemische Reaktion direkt mit Cy3- oder Cy5-Farbstoffmolekülen verknüpft, wobei es laut Herstellerangaben keinen Effizienzunterschied zwischen den Markierungsreaktionen geben soll. Dennoch wurde bei einem der vier TN-Vergleiche die Farbstoffzuordnung getauscht (Tab. 37 im Anhang), da für diese neue Markierungsmethode keine Erfahrungswerte vorlagen.

Das Design und die Datennormalisierung für cDNA-Microarray-Experimente sind in den letzten Jahren intensiv weiterentwickelt worden. Da bei den kompetitiven cDNA-Microarray-Hybridisierungen nicht absolute, sondern relative Expressionsstärken bestimmt werden, hat das experimentelle Design einen großen Einfluß auf die Datengewinnung. In der vorliegenden Arbeit wurden die TN-Vergleiche nach dem direkten Design durchgeführt (Abschn. 12). Der Vorteil dieses Designtyps besteht darin, dass die Varianz der Genexpressionsstärken, d. h. die Streuung der M-Werte, geringer ist als bei einem indirekten Design (Yang und Speed, 2002). Normalisierung bedeutet, jeden Fehler zu korrigieren, der auf systematische Abweichungen und nicht auf biologische Unterschiede zwischen den Transkript-Proben und den gedruckten Sondenmolekülen zurückzuführen ist. Der älteste und einfachste Normalisierungsansatz ist die globale Normalisierung, die in vielen Bildanalyse-Programmen enthalten ist. Diese auch als Gesamtintensitätsnormalisierung („total intensity normalization“) bezeichnete Methode basiert auf zwei Annahmen. Erstens: Die Mehrzahl der Transkripte zwischen den beiden Zielmolekül-Proben wird gleich exprimiert und nur ein geringer Anteil der Transkripte wird tatsächlich differentiell exprimiert. Zweitens: Der Anteil von differentiell exprimierten Transkripten ist in beiden Zielmolekül-Proben in etwa gleich groß, wobei es sich nicht um dieselben Genprodukte handeln muss. Der Nachteil der globalen Normalisierung ist, dass die gruppenweisen Anordnungen der cDNA-Punkte auf dem Glasträger, die Druckkopfgruppen<sup>20</sup>, als Gesamtheit und nicht einzeln betrachtet werden. Daher können lokale Unterschiede in der Punktqualität, wie die Variationen beim Drucken oder Hybridisieren, durch diese klassische Methode nicht ausgeglichen

---

<sup>20</sup> Eine Druckkopfgruppe ist die kleinste, in Zeilen und Reihen angeordnete Gruppe von gedruckten cDNA-Punkten auf einem Glasträger.

werden. Im Gegensatz dazu kann eine neue Normalisierungsmethode solche räumlichen Qualitätsunterschiede zwischen den Druckkopfgruppen eines Trägers durch Skalierung ausgleichen. Dieser Ansatz wird als Druckkopfgruppen-Skalierungsmethode bezeichnet (Yang et al., 2001; Yang et al., 2002). Da die genannten systematischen Fehler nach Wiederholungsexperimenten auch zwischen den einzelnen Experimenten auftreten können, ist es oft notwendig, die M-Werte mittels der „multiple-slide“-Skalierungsmethode zusätzlich zu korrigieren (Smyth und Speed, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden die Kandidatengene nach folgenden Strategien ausgewählt. Nachdem die M-Werte aus den TN-Vergleichen entweder ausschließlich durch die Druckkopfgruppen-Skalierungsmethode oder zusätzlich durch die „multiple-slide“-Skalierungsmethode normalisiert worden waren, wurde das Kriterium des Mittelwerts von M ( $M_0$ ) und das Kriterium des prozentualen Fehlers von  $M_0$  (Variationskoeffizient von  $M_0$  in Prozent,  $VK_0$ ) angewandt.  $VK_0$  erlaubte, die Genauigkeit von  $M_0$  nach Wiederholungsexperimenten zu beurteilen (Lorenz, 1996).

In der vorliegenden Arbeit gingen aus der Datenanalyse insgesamt 14 potentiell-differentiell exprimierte cDNA-Klone hervor, darunter der als Kontrolle dienende *Visinin*-Klon. Durch nicht-radioaktive in situ-Hybridisierung wurden *Visinin* und 3 Kandidaten (einmal *UCH-L1*, zweimal *CA-II*) verifiziert. Dies entsprach einer Verifikationsrate von rund 29%. Dieser Wert lag in einer Größenordnung, die durchaus vergleichbar war mit den Verifikationsraten der cDNA-Microarray-Studie von Diaz und Kollegen (2003), bei der direkte TN-Vergleiche in der embryonalen Mausretina durchgeführt wurden. Beim Vergleich der Verifikationsraten muß auch beachtet werden, dass in der Diaz-Studie Microarrays benutzt wurden, die etwa 19000 Klone des RIKEN 19K Maus-cDNA-Klonsortiments trugen (Miki et al., 2001). Die RIKEN-cDNA-Klone unterschieden sich in mehreren Eigenschaften von den Retina-cDNA-Klonen der vorliegenden Arbeit. Erstens: Die Identität aller RIKEN-Klone war bekannt, während die Retina-Klone unbekannt waren. Zweitens: Schätzungsweise 14000 der 19000 RIKEN-Klone (= 74%) waren nicht-redundant, d. h. sie kamen nur einmal im Sortiment vor. Im Gegensatz dazu stammten die Retina-Klone aus einer cDNA-Bibliothek, die nicht normalisiert und nicht subtrahiert war. Drittens: Die RIKEN-Klone bestanden aus cDNA voller Länge, während die Retina-Klone den 3'-Bereich der kodierenden Gensequenz und einen Anteil der 3'-nicht-translatierten Region umfaßten. Es ist daher überraschend, dass die Diaz-Studie verhältnismäßig hohe Falsch-Positiv-Raten aufwies, zumal dieselben Normalisierungsmethoden und eine neuartige Strategie zur Auswahl von Kandidatengenen angewandt wurden. Bei der Zusammensetzung der Kandidatengene der vorliegenden Arbeit war auffällig, dass es sich bei etwa der Hälfte der unbekanntem cDNA-Klone um das *LZI* („leucin zipper 1“-) Gen handelte. Der vorhergesagte T>N-Gradient von *LZI*-Transkripten wurde jedoch nicht bestätigt. Das redundante Auftreten der *LZI*-

Kandidatengene könnte auf die fehlende Normalisierung der Retina-cDNA-Bibliothek zurückzuführen sein. Der Zweck der Normalisierung einer cDNA-Bibliothek besteht darin, die Häufigkeit der am meisten vorhandenen Klone zu vermindern, um auch schwächer exprimierte Gene identifizieren zu können. Dabei sollen die seltensten und die häufigsten Klone in ein Verhältnis von  $1:10^4$  bis  $1:10^2$  oder besser gebracht werden. Zwei weitere Aspekte fielen bei der Betrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf. Erstens: Es wurde keine bekannte differentielle Genexpression entlang der TN-Achse identifiziert, wie z. B. der EphA3-Rezeptor. Es ist schwierig, hierfür einen plausiblen Grund anzugeben. Möglicherweise lag es an einer Kombination mehrerer störender Einflüsse. Die geringen Unterschiede zwischen den temporalen und nasalen Genexpressionsstärken, die wahrscheinlich durch den Effekt der „zellulären Mittelwertbildung“ verursacht wurden, spielten dabei vermutlich eine Rolle. So wird beispielsweise EphA3 ausschließlich von RGCs exprimiert. Da zur Herstellung von markierten Zielmolekülen die gesamten nasalen bzw. temporalen Gewebeteile benutzt wurden, beinhalteten die präparierten Gewebeteile auch die übrigen retinalen Zelltypen. Auf diese Weise könnte die bestimmbare EphA3-Genexpression vermindert worden sein. Die hohe Redundanz der Retina-Klone wirkte sich wahrscheinlich ebenso erschwerend auf die Bestimmung der potentiell-differentiellen Genexpression aus. Zweitens: Die Anzahl der identifizierten Kandidatengene war gering. Dies ist sehr wahrscheinlich auf den stringenten Wert des  $VK_0$ -Kriteriums zurückzuführen. Wie das  $M_0$ -Kriterium ist auch das  $VK_0$ -Kriterium ein Grenzwert-Kriterium. Der Zahlenwert des  $M_0$ -Kriteriums orientierte sich an den Herstellerangaben der ASAP-Methode. Der Zahlenwert  $VK_0$ -Kriteriums wurde willkürlich gewählt, um eine geringere Anzahl von Kandidaten zu erhalten, die im zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit geprüft werden konnten. Die geringe Anzahl ausgewählter Kandidatengene bedeutet jedoch nicht, dass die normalisierten Daten keine weiteren potentiell-differentiell exprimierten cDNA-Klone enthielten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der angeführten Studien zeigen, dass die Anwendung der cDNA-Microarray-Methode in der Entwicklungsbiologie möglich, jedoch nicht einfach ist, da neben der zeitlichen auch die räumliche Komponente der Zelldifferenzierung eine sehr große Rolle spielt.

## 16.2 UCH-L1 und seine mögliche Rolle bei der Entwicklung des visuellen Systems des Hühnchens

UCH-L1 ist ein zytoplasmatisches Enzym, das von Neuronen des Zentralen Nervensystems exprimiert wird (Day und Thompson, 1987; Wilkinson et al., 1989; Wilkinson et al., 1992). In vitro katalysiert UCH-L1 die Hydrolyse von C-terminalen Ubiquityl-Estern und von C-terminalen Ubiquityl-Amiden (Spaltung von Isopeptidbindungen; Larsen et al., 1996; 1998). In vivo ist UCH-L1 sehr wahrscheinlich an der Erzeugung von freiem Ubiquitin (Ub) beteiligt, zumal es an freies Ub bindet und dadurch dessen Halbwertszeit verlängert (Osaka et al., 2003). Eine Aufrechterhaltung des Mono-Ub-Spiegels ist für eukaryontische Zellen essentiell, den freies Ub wird für den Ub-abhängigen Proteinabbau benötigt. Ub ist ein relativ kleines Polypeptid, das aus einer Kette von 76 konservierten Aminosäuren besteht. Das Anhängen von Ub an Zielproteine ist streng reguliert und umfasst das Ub-aktivierende Enzym (E1), das Ub- konjugierende Enzym (E2) und die Ub-Ligase (E3; Höller and Dikic, 2004). E3 besitzt Substratspezifität und knüpft die Isopeptidbindung zwischen der C-terminalen Carboxyl-Gruppe von Ub und der  $\epsilon$ -Aminogruppe einer Lysin-Seitenkette des Zielproteins. In vielen Aspekten zeigt die Ubiquitinierung Ähnlichkeit mit der Phosphorylierung von Proteinen. Die Möglichkeiten einer Ub-Modifikation sind jedoch vielfältiger. Denn durch Nutzung verschiedener Lysin-Seitenketten von Ub können nicht nur Ub-Ketten, sondern auch verschiedene Ub-Verknüpfungstypen erzeugt werden. Die unterschiedlichen Ubiquitinierungssignale werden von Ub-bindenden Proteinen erkannt, die dann über Stabilität, Lokalisierung oder Bindungseigenschaften der ubiquitinierten Zielproteine bestimmen. Die Monoubiquitinierung ist ein Signal für die Sortierung von Membran gebundenen Proteinen in den endosomal-lysosomalen Weg, während polyubiquitinierte Proteine zum Abbau dem 26S-Proteasom zugeführt werden (Weissman, 2001). Wie die Phosphorylierung ist auch die Ubiquitinierung umkehrbar. Hierbei spielen die deubiquitinierenden Enzyme eine bedeutende Rolle, zu denen auch die Ub carboxy-terminalen Hydrolasen (UCHs) zählen (Wilkinson, 2000).

Eine Störung des Abbaus polyubiquitiniertes Proteine gilt als eine der Ursachen neurodegenerativer Krankheiten. Bei der Parkinson'schen Krankheit treten UCH-L1, Ub und  $\alpha$ -Synuclein als Bestandteile potentiell-pathogener zellulärer Aggregate auf, die Lewy-Körper genannt werden (Lowe et al., 1990). Bei der Suche nach einem Parkinson-Tiermodell stieß man auf eine Mausmutante mit *graziler axonaler Dystrophie (gad)* (Saigoh et al., 1999). Das *gad*-Allel kodiert für eine verkürzte Version des UCH-L1-Proteins, das jedoch nicht exprimiert wird (Osaka et al., 2003). Infolgedessen ist der Ub-Spiegel in ZNS-Neuronen homozygoter *gad*-Mutanten stark herabgesetzt. Interessanterweise wurde bei der Charakterisierung eines bestimmten Polymorphismus des menschlichen *UCH-L1*-Gens festgestellt, dass UCH-L1 - zumindest in vitro - auch eine zweite, dimerisierungsabhängige Ubiquityl-Ligaseaktivität besitzt (Liu et al., 2002).

Diese Ligaseaktivität und die ihr entgegenwirkende Hydrolaseaktivität sind möglicherweise gemeinsam an der Regulation des Ub-Spiegels von ZNS-Neuronen beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die vollständige kodierende Sequenz des *UCH-L1*-Gens aus embryonaler Hühnchenretina kloniert und sequenziert (Abschn. 14). Um verschiedene Computeranalysen durchzuführen, wurde die Gensequenz in die korrespondierende Aminosäuresequenz translatiert (Abschn. 13). Aus dem mehrfachen Vergleich zwischen den *UCH-L1*-Aminosäuresequenzen von Hühnchen und anderen Spezies, unter anderem wichtigen Modellorganismen, ist ein Ergebnis hervorzuheben. Im Vergleich zu den Sequenzen von Mensch, Maus und Pferd besaß die Hühnchen-Sequenz einen zusätzlichen Serin-Rest an Position 158, dessen Existenz experimentell mehrfach bestätigt wurde. Unter allen ausgewählten Wirbeltieren hatte nur die Zebrafisch-Sequenz an der vergleichbaren Position 153 eine Aminosäure. Dabei handelte es sich jedoch um einen Lysin-Rest. Die Hühnchen-Sequenz bestand daher nicht aus 223, sondern aus insgesamt 224 Aminosäuren. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob Ser-158 eine Abweichung gegenüber dem Aminosäure-Konsensusmuster der *UCH*-Familie verursachte. Dieses Muster ist eine molekulare Signatur dieser Proteinfamilie, die aus dem Vergleich aller bekannten *UCH*-Mitglieder abgeleitet ist (Abschn. 28.9). Es beinhaltet den hochkonservierten Cystein-Rest des katalytischen Zentrums der *UCH*s. Aus der Computeranalyse ging jedoch hervor, dass Ser-158 außerhalb von Sequenzabschnitten lag, die hochkonservierte Aminosäuren umfassten. Deshalb verursachte der Serin-Rest an Position 158 keine Verletzung des *UCH*-Konsensusmusters.

In der Retina adulter Hühnchen ist die die Expression von *UCH-L1*-Proteinen auf RGCs und Horizontalzellen beschränkt, wie in einer immunohistochemischen Studie festgestellt wurde (Bonfanti et al., 1992). In adulten Retinae verschiedener Säuger, darunter Ratte, Kaninchen und Katze, wurde *UCH-L1*-Immunoreaktivität auf RGCs und auf RGC-Axonon nachgewiesen (Bonfanti et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass in embryonalen Hühnchenretina das mRNA-Expressionsmuster von *UCH-L1* auf RGCs in einem Gradienten von temporal nach nasal verläuft, wobei der mRNA-Verteilungsschwerpunkt in der temporalen Retinahälfte lag (Abschn. 12). Diese asymmetrische Verteilung von *UCH-L1*-Transkripten wird spätestens gegen E4,5 gebildet und bleibt bis E6,5 bestehen (Abschn. 12). In der embryonalen Hühnchenretina beginnt die RGC-Neurogenese zwischen E2 und E3 in einer dorsozentralen Region des retinalen Neuroepithels, nahe der zukünftigen Papille (Prada et al., 1991). Von dort aus verlaufen Geburt und Differenzierung von RGCs in konzentrischen Wellen vom Zentrum bis in die Peripherie der Retina. Die RGC-Neurogenese endet am Tag E9. Möglicherweise folgt die differentielle Expression des *UCH-L1*-Gens „nur“ dem räumlich-zeitlichen Verlauf der Wellen. Das beobachtete mRNA-Expressionsmuster von *UCH-L1* entspricht jedoch nicht exakt der

Differenzierungswelle von RGCs (McCabe et al., 1999), insbesondere am Tag E4,5. Die asymmetrische Verteilung von *UCH-L1*-Transkripten zwischen E4,5 und E6,5 deutet daher eher darauf hin, dass der differentiellen Expression von *UCH-L1* Positionsinformation unterliegt. Es ist möglich, dass die *UCH-L1*-Expression räumlich und zeitlich mit der Expression von Zelloberflächen-Rezeptoren zusammenfällt, die an der Projektion von RGC-Axonon ins Tektum maßgeblich beteiligt sind. In einem zukünftigen Projekt sollten deshalb durch Antikörperfärbung auf embryonalen Hühnchenretinae zwei Dinge untersucht werden. Erstens: Sind *UCH-L1*-Proteine sowohl auf RGCs als auch auf RGC-Axonon vorhanden? Zweitens: Unterliegen die *UCH-L1*-Proteine einer differentiellen Expression entlang der TN-Achse?

Die Rolle von *UCH-L1* bei der Entwicklung der Wirbeltierretina ist unbekannt. Funktionelle Daten über *UCH-L1* wurden bislang nur für die adulte Mausretina veröffentlicht (Harada et al., 2004). In der betreffenden Studie wurde die Rolle von *UCH-L1* bei der Apoptose retinaler Neurone untersucht. Hierzu wurden Retinae von *gad*- und Wildtyp-Mäusen durch eine künstlich eingeleitete Durchblutungsstörung verletzt und mit unbehandelten Retinae verglichen. In *Wt*-Retinae führte diese Manipulation zu massiver Apoptose, hauptsächlich von RGCs. In *gad*-Retinae hingegen war die Apoptose um etwa 70% verringert. *UCH-L1* scheint daher in der Retina – zumindest in adulten Tieren – eine wichtige Rolle beim programmierten Zelltod zu spielen. In *gad*-Retinae führte dieser Eingriff zu einer stärkeren Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, XIAP und dem „Überlebensfaktor“ BDNF („brain derived neurotrophic factor“). Dies deutet darauf hin, dass *UCH-L1* einen hemmenden Effekt auf die retinale *BDNF*-Expression ausübt. BDNF gehört zur Familie der Neurotrophine. Sekretierte BDNF-Moleküle fungieren als Liganden des Tyrosinkinase-Rezeptors *trkB* („tropomyosin-related tyrosine kinase B“). Da *BDNF* auch während der Entwicklung des visuellen Systems von Wirbeltieren exprimiert wird, beeinflusst *UCH-L1* hierbei möglicherweise die Expression von BDNF. In der sich entwickelnden Mausretina beispielsweise reguliert *trkB*/*BDNF*-vermittelte Signaltransduktion die Dynamik des RGC-Zelltods (Pollock et al., 2003). Auch in der embryonalen Hühnchenretina exprimieren RGCs *trkB* und *BDNF* (Hallbook et al., 1996). Die Regulation des RGC-Zelltods hat einen unmittelbaren Einfluss auf die Entwicklung der retinotektalen bzw. retinocollicularen Projektion. Der RGC-Zelltod spielt auch bei der „Reifung“ axonaler Verbindungen im Tektum bzw. Colliculus eine Rolle. Insofern ist es nicht überraschend, wenn sich die Expression von BDNF-Proteinen im Colliculus von Nagern gerade dann erhöht, wenn dort RGCs entfernt werden (Frost et al., 2001). Im embryonalen Tektum des Hühnchens ist die Situation ähnlich (Pollock et al., 2003). Dort steigt die BDNF-Proteinexpression am embryonalen Tag E4 an und bleibt bis zum Schlüpfen des Kükens erhöht. Während dieses Zeitraums erreicht der Zelltod tektaler RGCs sein Maximum.

Für die Untersuchung der Rolle von UCH-L1 bei der retinotektalen Projektion wäre die Kenntnis der subzellulären Lokalisation des UCH-L1-Proteins sehr hilfreich. In einer *in vitro*-Studie wurde gezeigt, dass in embryonalen RGC-Axonwachstumskegeln von *Xenopus* die Maschinerie zur Proteintranslation und zum Proteinabbau über den Ub-Proteasom-Weg vorhanden ist (Campbell and Holt, 2001). Dadurch können Axonwachstumskegel den Umsatz ihrer Zelloberflächen-Rezeptoren rasch ändern, um auf Axonwegfindungsmoleküle zu reagieren. Dass der proteasomale Proteinabbau für den gezielten lokalen Axonabbau *in vivo* erforderlich ist, zeigte eine Studie, bei der das so genannte „axon pruning“ in *Drosophila* untersucht wurde (Watts et al., 2003). Interessanterweise deuten darüber hinaus Untersuchungen von Axonen des Goll'schen Kerns<sup>21</sup> der Maus darauf hin, dass UCH-L1 tatsächlich in Axonwachstumskegeln vorhanden ist (Saigoh et al., 1999). Denn während Wachstumskegel von adulten Wildtyp-Mäusen UCH-L1-Immunoreaktivität zeigten, blieb sie in Wachstumskegeln von *gad*-Mäusen aus. Es wurde jedoch nicht geklärt, ob UCH-L1 im Wachstumskegel translatiert wird oder ob UCH-L1 posttranslational dorthin transportiert wird. Trotzdem ist es denkbar, dass UCH-L1 während der retinotektalen Projektion den Ub-abhängigen proteasomalen Proteinabbau fördert. Wenn sich RGC-Axone auf dem Weg ins optische Tektum befinden, könnte UCH-L1 im Axonwachstumskegel den raschen Abbau von Zelloberflächen-Rezeptorproteinen des Wachstumskegels ermöglichen. Auf diese Weise könnte das Axon auf bestimmte Axonleitmoleküle in seiner Umgebung reagieren und die Morphologie seines Wachstumskegels entsprechend anpassen. Ein solcher Mechanismus würde es UCH-L1 auch erlauben, während der Reifung der retinotektalen Karte am kontrollierten Entfernen von RGCs beteiligt zu sein, die nicht in der Lage waren, korrekte synaptische Verbindungen mit tektalen Neuronen einzugehen. In RGC-Axonwachstumskegeln könnte UCH-L1 direkt oder vielleicht über UIM („Ub interacting motif“)-Proteine an dem Ub-abhängigen Umsatz von Rezeptor-Proteinen auf dem axonalen Wachstumskegel sein. EphA-, EphB- oder trkB-Rezeptoren sind hierfür interessante Kandidaten.

Die Bedeutung des EphA/Ephrin-A-Systems bei der Bildung der retinotektalen bzw. retinocollicularen Karte wurde durch verschiedene Ansätze nachgewiesen: *In vivo* durch DiI-Markierung von RGC-Axonon und *in vitro* durch den Axonstreifenversuch. Im Hühnchen wurden dabei die Rezeptor- bzw. Liganden-Funktionen dieser Moleküle durch retroviralen Fehlexpression untersucht. In der Maus wurden hingegen entsprechende Gendelektionsmutanten hergestellt (Brennan et al., 1997; Brown et al., 2000; Feldheim et al., 1998; Feldheim et al., 2000; Monschau et al., 1997; Nakamoto et al., 1996; Frisen et al., 1998). Mit Hilfe des Axonstreifen-Versuchs kann das Verhalten von nasalen und temporalen RGC-Axonon auf Substraten aus Membranen des optischen Tektums untersucht werden. Aufgrund ihrer natürlichen Zielpräferenz wachsen Axone

---

<sup>21</sup> Der Goll'sche Kern ist ein Umschaltkern des Hirnstamms, in den Nervenbahnen aus der unteren Körperhälfte und den unteren Extremitäten münden.

aus dem temporalen Retinastreifen bevorzugt auf Membranen aus dem anterioren Tektum, während nasale Axone weder posteriore noch anteriore Tektummembranen bevorzugen. Dieses Axonverhalten beruht im Wesentlichen auf der Kontaktabstossung zwischen EphA tragenden temporalen Axonen und Ephrin-A tragenden Zellen des posterioren Tektums. Dies führt jedoch zu einem Widerspruch in sich. Obwohl die Wechselwirkung zwischen Rezeptor tragendem Axon und Liganden tragender Zelle auf der gegenseitigen Anziehung von Rezeptoren und Liganden beruht, trennen und entfernen sich Axon und Zelle voneinander. Deshalb muss es einen Mechanismus geben, der die Anziehung unmittelbar nach dem Membrankontakt aufhebt. Beim EphA/Ephrin-A-System beruht dieser Mechanismus auf der proteolytischen Abspaltung der extrazellulären Ephrin-A-Domäne (Hattori et al., 2000). Interessanterweise hat sich beim EphB/Ephrin-B-System ein alternativer Mechanismus entwickelt, wie in einer in vitro-Studie gezeigt wurde (Zimmer et al., 2003). Hierbei wird die Kontaktabstossung ermöglicht, indem die EphB/Ephrin-B-Multimere durch bidirektionale Endozytose von den Zelloberfläche der Rezeptor sowie der Liganden tragenden Zelle entfernt werden. In den beiden vorgestellten Studien wurde allerdings nicht gezeigt, ob die Endozytose der Rezeptor/Liganden-Multimere in den proteasomalen, den lysosomalen oder einen alternativen Weg mündet. Trotzdem zeigt dieses Beispiel, dass durch Internalisierung von Eph/Ephrin-Komplexen moduliert werden kann, wie eine Eph-Rezeptor tragende und eine Ephrin tragende Zelle aufeinander reagieren.

Um den Effekt der ektopischen *UCH-L1*-Expression auf das Wachstum von RGC-Axonon in dem in vitro-Axonstreifenversuch zu untersuchen (Abschn. 14), wurde der DNA-Vektor RCASBP(B)-*UCH-L1-eGFP* konstruiert und zur Herstellung von replikationskompetenten Viruspartikel verwandt (Abschn. 13). Für die Durchführung des in vitro-Axonstreifenversuchs wurden TN-Gewebestreifen von E6-Retinae benutzt, um die asymmetrische in vivo-Expression von UCH-L1 entlang der TN-Achse zwischen E4,5 und E6,5 zu berücksichtigen. In Wildtyp-Retinae lag der Verteilungsschwerpunkt von *UCH-L1*-Transkripten auf temporalen RGCs (Abschn. 12). Durch den Vergleich des Wachstumsverhaltens von RGC-Axonon ohne und mit *UCH-L1*-Fehlexpression wurden zwei Hypothesen geprüft. Erstens: Die ektopische Expression von *UCH-L1* temporalisiert die Zielpräferenz nasaler RGC-Axone. Folglich bevorzugen nasale Axone das Wachstum auf anterioren Tektummembranen. Zweitens: Die Zielpräferenz temporaler RGC-Axone wird durch Erhöhung der Menge an UCH-L1-Protein gestört. Hierbei ist eine Vorhersage des Effektes schwieriger. Möglicherweise wachsen temporale Axone sowohl auf anterioren als auch auf posterioren Tektummembranen. Eventuell wird die anteriore Zielpräferenz temporaler Axone durch zusätzliches UCH-L1-Protein „nur“ verstärkt. Der Effekt der retroviralen Fehlexpression von *UCH-L1* reichte jedoch nicht aus, um die Zielpräferenzen von nasalen RGC-Axonon (Hypothese 1) und/oder von temporalen RGC-Axonon (Hypothese 2) zu stören. Dennoch

wurde in seltenen Fällen beobachtet, dass einzelne temporale Axone den angrenzenden posterioren Streifen durchquerten. Teilweise wuchsen diese Axone sogar über den nachfolgenden anterioren Membranstreifen. Diese Ereignisse wurden in den Kontrollversuchen nicht oder nur sehr selten beobachtet. Durch die Methode des retroviralen Gentransfers wurde die asymmetrische TN-Expression von *UCH-L1* durch Hinzufügen von *UCH-L1* aufgehoben („gain-of-function“-Bedingung). Das Wachstumsverhalten von RGC-Axonon sollte jedoch auch unter Verlust von *UCH-L1* untersucht werden („loss-of-function“-Bedingung). In einem zukünftigen Projekt sollten daher retinale TN-Gewebestreifen aus der *gad*-Mausmutante im Axonstreifenversuch untersucht werden.

Eine Interpretation des ausgebliebenen Effekts der *UCH-L1*-Fehlexpression ist schwierig, denn bislang ist unklar, ob und wenn ja welches Rezeptor/Liganden-System mit UCH-L1 interagiert. Die Identifikation von UCH-L1-Substraten wäre ein entscheidender Schritt zum Verständnis der UCH-L1-Funktion. Neben den beschriebenen in vitro-Substraten wurde bislang jedoch nur ein in vivo-Substrat von UCH-L1 identifiziert. Es handelt sich um  $\alpha$ -Synuclein, ein präsynaptisches Protein, das Bestandteil der Lewy-Körper ist, die bei der Parkinson'schen Krankheit auftreten. Aufgrund der geführten Diskussion sollte die Charakterisierung von UCH-L1 fortgeführt werden, um einen Einblick in die Rolle dieses Enzyms bei der Entwicklung des embryonalen visuellen Systems zu erhalten.

## MATERIAL UND METHODEN

Wenn nicht anders angegeben, sind %-Angaben w/v-Werte und beziehen sich auf die Endkonzentrationen.

### 17. Bakterien- und Tierstämme sowie Zelllinien

Tab. 5. Bakterien-, Tierstämme und Zelllinien.

Spezies	Stamm/Zelllinie	Relevanter Genotyp/Phänotyp	Hersteller/Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\Phi$ 80d/lacZM15, $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, <i>recA</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>rk-mk</i> +), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>endA1</i> , $\lambda$ -	Bethesda Research Laboratories (BRL), USA
Fibroblasten, immortalisiert, vom Huhn	DF-1		ATCC, Rockville, USA
Huhn ( <i>Gallus gallus</i> ), embryonal			Lokaler Händler
Huhn ( <i>Gallus gallus</i> ), embryonal	spezifisch pathogenfrei (SPF)		Charles River SPAFAS, Sulzfeld
Maus ( <i>Mus musculus</i> ), embryonal und adult	CD-1		MPI für Hirnforschung, Frankfurt

### 18. Lösungen und Puffer

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Lösungen und Puffer nach (Sambrook und Russell, 2004) hergestellt.

### 19. Enzyme und Proteine

Tab. 6. Enzyme und Proteine.

Enzym oder Protein	Hersteller/Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase, aus Garnelen	Roche Diagnostics
BSA	Serva Feinbiochemica
DNase I, RNase-frei	Roche Diagnostics
Klenow-Enzym	Roche Diagnostics
Protector RNase-Inhibitor	Roche Diagnostics
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (NEB)
T3 RNA-Polymerase	Roche Diagnostics
T4 DNA-Ligase	Roche Diagnostics
T4 Polynukleotid-Kinase, frei von 3'-Phosphatase	Roche Diagnostics
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Roche Diagnostics

## 20. „Kits“ und Sonstiges

Tab. 7. „Kits“.

„Kit“	Hersteller/ Bezugsquelle
„Effectene Transfection Reagent“	Qiagen
„ET mix“	Amersham Biosciences
„Micromax ASAP RNA Labeling Kit“	PerkinElmer LA
„Oligotex mRNA Mini Kit“	Qiagen
„QIAGEN Plasmid Maxi Kit“	Qiagen
„QIAprep Spin Miniprep Kit“	Qiagen
„QIAquick Gel Extraction Kit“	Qiagen
„QIAquick PCR Purification Kit“	Qiagen
„RNeasy Protect Mini Kit“	Qiagen
„SMART PCR cDNA Synthesis Kit“	BD Clontech
„SuperScript One-Step RT-PCR System for Long Templates“	Invitrogen, Groningen, Niederlande

Tab. 8. Sonstiges.

Chemikalie/Lösung/Puffer	Hersteller/Bezugsquelle
„CMT Hybridization Chamber“	Corning, bezogen über VWR International, Darmstadt
„DIG RNA Labeling Mix“, 10x	Roche Diagnostics
„dNTP Set, PCR Grade“	Roche Diagnostics
„Fast Green FCF“	Sigma-Aldrich, Steinheim
„Fluorescein RNA Labeling Mix“, 10x	Roche Diagnostics
„Lifterslip 22x60I-2-4861“	Erie Scientific Company, bezogen über Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk, Braunschweig
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente	Roche Diagnostics
Anti-Fluorescein-AP, Fab-Fragmente	Roche Diagnostics
Cyanin 3-dCTP (NEL 576)	PerkinElmer LAS
Cyanin 5-dCTP (NEL 577)	PerkinElmer LAS
Halothan Eurim	Eurim-Pharm Arzneimittel, Piding/Bad Reichenhall
Isopropyl- $\beta$ -D-thio-galactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich Chemie
PCR-Puffer	Eurogentec, Seraing, Belgien
PCR-Reaktionspuffer, 10x	Roche Diagnostics
RNase-Inhibitor	Boehringer Mannheim bzw. Roche Diagnostics
Sequabrene	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasser, für die HPLC	Roth, Karlsruhe
X-Gal	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
Zufallshexamere („random primers“)	Invitrogen, Groningen, Niederlande

## 21. Mikrobiologische Methoden

### 21.1 Nährmedium und Zusätze für die Kultur von *Escherichia coli*

Das nachfolgend aufgeführte Medium wurde zur Kultivierung von *E. coli* verwendet.

Tab. 9. Nährmedium und Zusätze für *E. coli*.

Medium	Bestandteil		Referenz
LB (-Agar)	Hefeextrakt	0,5 %	(Miller, 1972)
	NaCl	0,5 %	
	Trypton	1,0 %	
	Agar (für festes Medium)	1,5 %	
Amp-LB	Ampicillin	50 µg/ml	
	LB		
Amp-X-Gal-LB	Ampicillin	50 µg/ml	
	X-Gal	50 µg/ml	
	LB		

### 21.2 Kultur von *Escherichia coli*

*E. coli*-Kulturen wurden in Reagenzgläsern mit 5-10 ml LB-Medium oder in Erlenmeyerkolben, die mit 10% des Nennvolumens LB-Medium gefüllt waren, bei 37°C über Nacht bei 200 U/min geschüttelt.

### 21.3 Herstellung einer Glycerinstammkultur von *Escherichia coli*

Eine *E. coli*-Kultur wurde über Nacht inkubiert. Aus dieser Kultur wurde ein 1 ml-Aliquot entnommen, in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und mit 250 µl einer sterilen 20 % (v/v) Glycerinlösung gemischt. Eine Glycerinstammkultur von *E. coli* kann für mehrere Monate bei -70 °C aufbewahrt werden.

## 22. Molekulargenetische Methoden

### 22.1 Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter Zellen von *E. coli*

Chemisch kompetente Zellen von *E. coli* wurden nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode (Cohen et al., 1972) hergestellt und transformiert.

### 22.2 Nucleinsäuren

#### 22.2.1 DNA- und RNA-Längenstandards

Die Längen und Mengen der gelelektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente wurden durch Vergleich mit den Längenstandards „DNA Molecular Weight Marker VI“ oder „DNA Molecular Weight Marker VII“ (beide Roche) bestimmt.

Die Länge der gelelektrophoretisch getrennten RNA-Fragmente wurde durch Vergleich mit dem Längenstandard „RNA Molecular Weight Marker I“ (Roche) bestimmt.

### 22.2.2 Oligonucleotide

Wenn nicht anders angegeben, wurden Oligonucleotide eingesetzt, die von MWG-Biotech synthetisiert wurden (Tab. 10). Die Oligonucleotid-Stammlösungen wurden mit sterilem bidestillierten Wasser auf 100 pmol/μl eingestellt.

Tab. 10. Oligonucleotide. Die Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) wurden dem Datenblatt des Herstellers entnommen.

Experiment	Bezeichnung	Oligo-Stamm-Nr.	Sequenz (5'→3')	$T_m$ [°C]	Referenz
SMART-PCR	„anchored-oligodT“	110	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT (AGC) (AGCT)	50,5	BD Clontech Germany, Heidelberg
	MA-PCR	111	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GT	60,6	
	MA-oligodT	116	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	67,4	
PCR; DNA-Sequenzierung	cUCH_297	274	AAC TGC GTG TAT CAG ACC AAT CG	57,0	Diese Arbeit
	cUCH_372	275	GTC TCC TGA AGA GAG AGC TAA GC	57,0	Diese Arbeit
	b93_254	221	CAC TGT CCT TCC TGT GCA AC	59,4	Diese Arbeit
	b93_246	222	TTC CTG TGC AAC AGA GTT GTG	57,9	Diese Arbeit
	T3+4	237	GCG CAA TTA ACC CTC ACT AAA GGG AA	63,2	Diese Arbeit
	T7+4	236	GCG CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG	68,0	Diese Arbeit
	RCAS-3'	generell	ATC TCT GCA ATG CGG AAT TCA GTG	61,0	D. Schulte, MPI f. Hirnf.
In vitro-Mutagenese mittels PCR	cUCH_I	233	AAA GGT CTC CCA TGG CGT GGC AGC CCA TG	72,3	Diese Arbeit
	cUCH_II	234	GGG AAT TCG CGG CAG ACT TGC AGA AAG CC	70,9	Diese Arbeit
	cUCH_III	235	GGG AAT TCT CAG GCA GAC TTG CAG AAA GCC A	69,5	Diese Arbeit

### 22.2.3 Plasmidvektoren

Tab. 11. Plasmidvektoren.

Vektor	Relevanter Genotyp und/oder Phänotyp	Bezugsquelle/Referenz
pSLAX21	AmpR; <i>src</i> -Gen ( <i>Clal</i> -Fragment aus RCASBP) in pBluescript	Morgan und Fekete, 1996
pSLAX13- <i>eGFP</i>	AmpR; <i>src</i> -Gen ( <i>Clal</i> -Fragment aus RCASBP) in pBluescript; <i>eGFP</i> ( <i>EcoRI/BamHI</i> -Fragment aus pDRIVE)	A. Badde, MPI für Hirnforschung, Frankfurt
pSLAX- <i>FLU</i>	AmpR; <i>src</i> -Gen ( <i>Clal</i> -Fragment aus RCASBP) in pBluescript; Influenza-Haemagglutinin (HA)-„epitope tagging“	(Laufer et al., 1997)
RCASBP(A)	AmpR	Petropoulos und Hughes, 1991
RCASBP(B)	AmpR	Petropoulos und Hughes, 1991

Die pSLAX- und RCASBP-DNA-Vektoren wurden in Dam (+) *E. coli*-Stämmen vermehrt.

## **22.3 Isolierung von Nucleinsäuren**

### **22.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli***

Plasmid-Minipräparationen wurden nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979), modifiziert nach Sambrook und Russell (2001) durchgeführt. Um reinere Plasmid-DNA für Sequenzierungen und andere Anwendungen zu isolieren, wurden Ionenaustauschersäulen (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

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

Nach Elektrophorese der DNA-Fragmente in TAE-Agarosegelen wurden die gewünschten Fragmente mit einer Einwegklinge ausgeschnitten. Nach Angaben des Herstellers wurde die DNA aus dem Gel heraus gelöst, durch Ionenaustauschersäulen (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) isoliert und anschließend von der Bindematrix eluiert.

### **22.3.3 Isolierung von RNA aus Gewebe**

Gesamt-RNA aus Gewebe embryonaler Hühnchenretinae wurde mit Trizol, einer Phenol/Guanidin-isothiocyanat-Lösung, nach Angaben des Herstellers (Life Technologies) isoliert. Um einen hohen Reinheitsgrad zu erzielen und Reste chromosomaler DNA zu entfernen, wurde die isolierte Gesamt-RNA mit Ionenaustauscher-Säulen aus dem „RNeasy Protect Mini Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers zusätzlich gereinigt. Alle wässrigen Lösungen wurden aus RNase freien Substanzen hergestellt und mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Die gereinigte Gesamt-RNA wurde bis zum Gebrauch in gefälltem Zustand bei -70°C gelagert.

### **22.3.4 Synthese von cDNA**

mRNA wurde nach Angaben des Herstellers mit dem „SuperScript One-Step RT-PCR System for Long Templates“ (Invitrogen) in korrespondierende cDNA umgeschrieben.

### **22.3.5 Absorptionsmessungen von Nucleinsäuren**

Die Konzentration von Nucleinsäuren wurde photometrisch durch Absorptionsmessungen bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Bei der Konzentrationsberechnung wurde eine OD<sub>260</sub> von 1 bei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml einzelsträngiger DNA bzw. RNA zugrunde gelegt.

## 22.4 Modifikationen von DNA

### 22.4.1 Enzymatische in vitro-Reaktionen

Das Schneiden von DNA durch Restriktionsendonucleasen wurde in den gebrauchsfertigen Puffern des Herstellers unter den angegebenen Bedingungen durchgeführt. Um die Rezirkularisierung von Plasmidvektor-Fragmenten während der Ligationsreaktion zu vermeiden, wurden die 5'-Phosphatgruppen der DNA-Fragmente durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase entfernt (Sambrook und Russell, 2001). DNA-Fragmente wurden mit Hilfe von T4-DNA-Ligase in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer bei 14°C ligiert.

### 22.4.2 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente für Klonierung, Sequenzierung oder zum Einsatz als Sonde in einer in vitro-RNA Hybridisierung wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt (Mullis und Faloona, 1987). Zu diesem Zweck wurden 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase (Roche) zusammen mit dem PCR-Puffer in 25 oder 50 µl Reaktionsansätzen pipettiert. Die Ansätze enthielten zudem 0,2 mM jedes Desoxynukleotids, 10 pmol der beiden Oligonucleotide und entsprechende Mengen von Matrizen-DNA („template DNA“). Bei der so genannten Kolonie-PCR wurde eine kleine Menge von Plasmid-DNA tragender *E. coli*-Zellen direkt in den Reaktionsansatz gegeben. Die PCR wurde in dem „PTC-200 Peltier Thermal Cycler“ (MJ Research) durchgeführt. Die Polymerisationszeit und die Hybridisierungstemperatur („annealing temperatur“) wurden in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonucleotide und der Länge der erwarteten PCR-Produkte gewählt.

### 22.4.3 In vitro-Mutagenese mittels PCR

Um gezielte Mutationen in ein DNA-Fragment mit Hilfe von PCR-Amplifikation zwecks Restriktion einzuführen, wurde die Methode von (Higuchi et al., 1988) angewandt.

## 22.5 Elektrophorese von Nucleinsäuren

Die Nucleinsäurefragmente wurden vor dem Auftragen mit 1/6 6x Auftragspuffer versetzt (Sambrook und Russell, 2001). Als Längenstandard für DNA dienten der „DNA Molecular Weight Marker VI“ oder der „DNA Molecular Weight Marker VII“ (beide Roche) und für RNA der „RNA Molecular Weight Marker I“ (Roche). Zur Detektion der Nucleinsäurefragmente im UV-Licht wurden die Moleküle in einer 50 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung gefärbt.

### 22.5.1 TAE-Agarosegel-Elektrophorese von DNA

DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarosegelen nach Sambrook und Russell (2004) elektrophoretisch getrennt. Die Agarosekonzentration variierte je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente zwischen 1 und 1,5%. Als Pufferlösung diente 1x TAE-Lösung. Die Zusammensetzung des nativen Auftragspuffers ist Tab. 12 zu entnehmen.

Tab. 12. Auftragspuffer für die Gelelektrophorese.

Puffer	Bestandteil	
Auftragspuffer, nativ	Bromphenolblau	0,25%
	Glycerin	50% (v/v)
	Xylencyanol	0,25%
	TE-Puffer	

### 22.5.2 Native TBE-Agarosegel-Elektrophorese von RNA

Gesamt-RNA wurde in horizontalen Agarosegelen nach Sambrook und Russell (2004) elektrophoretisch getrennt, wobei 1x TBE als Pufferlösung diente. Die TBE-Lösung wurde aus RNase-freien Substanzen hergestellt und mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Die Gelkammer und der Gelkamm wurden vor Durchführung der Elektrophorese mit RNaseZAP (Sigma-Aldrich) von RNasen gereinigt. Es wurde ein nativer Auftragspuffer verwandt (Tab. 12).

### 22.6 Sequenzierung von DNA

Doppelsträngige Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip des Didesoxy-Kettenabbruchs sequenziert (Sanger et al., 1977). Um einzelsträngige DNA-Kettenabbruchfragmente zu erzeugen, wurde die Plasmid-DNA-Matrize, ein Oligonucleotid und der „ET Mix“ (5'-Flourophor gekoppelte ddNTPs, dNTPs, *Taq*-Polymerase; Amersham Biosciences) in eine PCR eingesetzt. Die Kettenabbruchfragmente wurden mit der Sequenziermaschine „MegaBASE 1000“ (Amersham Biosciences) sequenziert. Die gesamte Durchführung folgte den Angaben des Herstellers.

### 22.7 Konstruktion von RCASBP-DNA-Vektoren

Das replikationskompetente Retrovirus RCAS leitet sich von dem vogelspezifischen onkogenen Rous-Sarcoma-Virus (RSV) ab (Hughes et al., 1987). In der vorliegenden Arbeit wurde RCASBP verwandt, welches die Bryan-RNA-Polymerase besitzt (Petropoulos und Hughes, 1991). Es wurden ausschließlich RCASBP-Retroviren der Hülluntergruppen („envelope subgroups“) A und B benutzt. RCASBP-DNA-Vektoren wurden wie konventionelle Plasmid-DNA durch Replikation in *E. coli* vermehrt. Hierfür wurde ein *E. coli*-Stamm benutzt, der Dam(+) ist. Dam methyliert die zweite *Cla*I-Schnittstelle, die für die Einführung eines Gens oder Genfragments, das

fehlexprimiert werden soll, nicht benötigt wird. RCASBP ist mit 11 kbp relativ groß und wird deshalb von einer *E. coli*-Zelle in nur geringer Kopienzahl hergestellt. Um ein Gen oder Genfragment in den RCASBP-Vektor zu klonieren, wurden die DNA-Fragmente daher zunächst in das Adaptor-Plasmid pSLAX subkloniert. Das pSLAX-Plasmid basiert auf einem pBluescript-Vektor, in dessen Vielfachklonierungsstelle ein *ClaI*-Fragment kloniert wurde. Dieses *ClaI*-Fragment trägt die 5' untranslatierte Region (UTR) des *sarcoma (src)*-Gens von RCAS (Riddle et al., 1993). Diese 5' UTR umfasst neben dem Spleißakzeptor weitere, für die effiziente Translation notwendige DNA-Sequenzen. Ursprünglich wurde das *src*-Gen nämlich durch *ClaI* aus der proviralen DNA von RCAS herausgeschnitten, um RCAS-Retroviren als Werkzeug nutzbar zu machen (Hughes et al., 1987). Ein eingeführtes Gen oder Genfragment kann nur dann durch RCASBP retroviral fehlexprimiert, wenn dessen offener Leserahmen mit den ATG-Nucleotiden der *NcoI*-Schnittstelle des *ClaI*-Fragmentes fusioniert wurde. Am 3'-Ende des Gens oder Genfragments kann mit jeder Restriktionsendonuclease geschnitten werden, die kompatibel zu den 3'-UTR-Schnittstellen von *src* ist, wie beispielsweise *BamHI* oder *EcoRI*. Nach der pSLAX-Subklonierung wurden die DNA-Fragmente über die *ClaI*-Schnittstelle in den RCASBP-Vektor kloniert. Das eingeführte Gen oder Genfragment darf maximal 2,4 kbp umfassen, da die Größe der Virushülle die Länge der DNA-Fragmente bestimmt (Morgan und Fekete, 1996).

### 23. Präparation und Fixierung von Gewebe

Befruchtete Eier der Rasse „White Leghorn“ wurden in einem befeuchteten Brutschrank bei 38°C bis zum gewünschten embryonalen Tag (E) inkubiert. Die Hühnchenembryonen wurden aus den Eiern entnommen und zügig durch Abtrennen der Köpfe getötet. Das Entwicklungsstadium der Hühnchenembryonen wurde nach der morphologischen Klassifizierung von Hamburger und Hamilton (1951) bestimmt. Nachdem das umliegende Binde- und Knorpelgewebe (in späteren Stadien auch Knochengewebe) entfernt worden war, richtete sich die Präparation des Auges nach den Erfordernissen des jeweiligen Experimentes.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Präparationen in 1x PBS bei ZT durchgeführt und die Präparate in 4% Paraformaldehyd (PFA) über Nacht bei 4°C fixiert. **Immunohistochemie mit ganzen Retinae:** Linse, Glaskörper und Pigmentepithel wurden entfernt. **In situ-Hybridisierungen auf ganzen Retinae:** Präparation der Retina wie zuvor beschrieben. Um die PFA-fixierten Retinapräparate zu dehydrieren, wurde das Gewebe in 25%, 50%, 75% (in DEPC-behandelten 1x PBS) und 100% Methanol (zweimal) für jeweils 5 min bei ZT inkubiert. In Methanol konnte das Gewebe bei -20°C für mehrere Wochen gelagert werden. Für die Rehydrierung wurde das Gewebe durch eine absteigende Methanolreihe geführt und anschließend zweimal in 1x PBS bei ZT gewaschen. Danach wurde die Retina durch vier gezielte Schnitte in

zwei ventrale und zwei dorsale Quadranten eingeteilt, wodurch sich das Gewebe auffalten ließ. Um die ganzen, aufgefalteten Retinapräparate während des Experimentes vor Beschädigungen zu schützen, wurde eine Retina zwischen zwei kleinen Blättern eines 125 µm-Nylongeflechts (Small Parts, Miami Lakes, Florida, USA) „eingeschweißt“. Dabei sorgten mehrere, von einem LötKolben an den Rändern gesetzte Schweißpunkte für das Zusammenhalten der beiden Blätter.

**In situ-Hybridisierungen und Immunohistochemie auf Gefrierschnitten:** es wurden lediglich Linse und Glaskörper entfernt (sogenannter Augenbecher).

**In situ-Hybridisierungen auf Vibratomschnitten:** Präparation des ganzen Kopfes von E2,5- oder E3,5-Hühnchenembryonen. Die Präparation von Retinaexplantaten für den **in vitro-Axonstreifenversuch** und von Retinae für die **in vitro-Axonmarkierung mit DiI** sind in dem jeweiligen Abschnitt der Methode beschrieben. Trächtige **Mäuse** wurden anhand des Scheidenpropfes identifiziert. Das Alter der Mausembryonen wurde bestimmt, indem der Mittag des auf die Befruchtung folgenden Tages als embryonaler Tag 0,5 (E0,5) gewertet wurde. Die Muttertiere wurden durch Halothan Eurim betäubt und durch Abtrennen des Kopfes getötet.

**Immunohistochemie mit ganzen Retinae von E18,5 Mausembryonen oder von adulten Mäusen:** Präparation und Fixierung erfolgte wie für Hühnchen beschrieben, allerdings ohne Entfernen des Pigmentepithels.

**Isolierung von Gesamt-RNA zwecks Herstellung von cDNA- oder RNA-Zielmolekülen für cDNA-Microarray-Experimente:** um nasale und temporale Gewebeteile von Hühnchenretinae reproduzierbar herzustellen, wurde die so genannte Schneidehilfe benutzt. Dieses Schneidewerkzeug wurde in Zusammenarbeit mit der Mechanik-Werkstatt des Instituts eigens für dieses Projekt entwickelt. Die Schneidehilfe ermöglichte das Abtrennen eines peripheren nasalen und temporalen Gewebeteils vom übrigen Retinagewebe durch gleichzeitiges Schneiden mit zwei Rasierklingen. Mit Hilfe einer Millimeterschraube wurde der Abstand der beiden Rasierklingen zueinander eingestellt. Die Augen von E4,5- oder E6,5-Hühnchenembryonen wurden vom Bindegewebe befreit. Das präparierte Auge wurde mit der Stelle, wo sich die Linse befand, nach unten direkt auf ein Stück Nylonnetz gelegt und durch zwei Wolframnadeln fixiert. Dieses Nylonnetz war zuvor in einer Petrischale, die mit 1x Agarose und 1x PBS gefüllt war, mit vier Nadeln an den Ecken fixiert worden. Nach Abtrennen des nasalen und temporalen Gewebestücks vom Augenbecher, wurde das Pigmentepithel entfernt. Danach wurde das Gewebe der neuralen Retina in ein 1,5 ml-Gefäß mit Trizol (Life Technologies) überführt, um die Gesamt-RNA zu isolieren.

**Isolierung von Gesamt-RNA:** wie zuvor beschrieben, jedoch ohne das Gewebe zu schneiden.

## 24. Herstellung von Gefrierschnitten

Fixierte Augenbecher- und Retinapräparate von Hühnchen sowie PFA-fixierte Retinapräparate von Mäusen (E18,5 oder adult) wurden jeweils 60 min in 10% und 20% steriler Saccharose (in PBS), anschließend über Nacht in 30% steriler Saccharose (in PBS) inkubiert. Um die Augenbecher in dem viskösen Einbettmedium (Jung) einzubetten, wurden die Becher mit Einbettmedium gefüllt (1:1 verdünnt in 30% Saccharose), bevor sie in unverdünntes Einbettmedium eingelegt und eingefroren wurden. Retinapräparate von Hühnchen und Mäusen wurden dagegen direkt in dem Einbettmedium eingelegt und dann eingefroren. Mit einem CM 3050 S-Gefriermikrotom (Leica) wurden Gefrierschnitte mit Schnittdicken von 14 µm hergestellt, die bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert wurden.

## 25. Immunohistochemische Methoden

### 25.1 Primär- und Sekundärantikörper

Tab. 13. Primärantikörper.

Antigen	Antikörper	Verdünnung	Hersteller / Bezugsquelle
PGP9.5 (UCH-L1), <i>H. sapiens</i>	anti-PGP9.5-Ig, gereinigt	1:3000	Biogenesis; bezogen über Quartett, Berlin
Gag-Protein p19, Geflügel-Sarcomavirus	3C2, monoklonal aus Überstand einer Hybridomazellkultur	unverdünnt	C. L. Cepko, Harvard Medical School, Boston
160 kDa Neurofilament (RMO270)	anti-NF-M-Ig, monoklonal, Maus	1:6000	V. Lee, University of Pennsylvania Medical School
p27, ein RCASBP spezifisches Protein	anti-p27, polyklonal, Kaninchen	1:8000	Charles River SPAFAS, Sulzfeld

Tab. 14. Sekundärantikörper.

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle/ Hersteller
Ziege-anti-Maus-IgG (H+L), gekoppelt an Alexa Fluor 488	1:500	Molecular Probes, Eugene, USA
Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L), gekoppelt an Alexa Fluor 488	1:500	Molecular Probes, Eugene, USA
Ziege-anti-Maus-IgG (H+L), gekoppelt an Alexa Fluor 594	1:500	Molecular Probes, Eugene, USA
Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L), gekoppelt an Alexa Fluor 594	1:500	Molecular Probes, Eugene, USA

### 25.2 Färbungen mit ganzen Retinae

Die Präparation von Hühnchenretinae wurden durchgeführt, wie in Abschn.23 beschrieben. Die Antikörperdoppelfärbungen mit ganzen Hühnchenretinae wurden nach dem Protokoll von (Kardon, 1998) durchgeführt. Hierbei wurden die RGC-Axone durch einen anti-Neurofilamentantikörper und RCASBP durch einen anti-Gag-Antikörper nachgewiesen (Tab. 13). Nach der Färbung wurde das Retinagewebe durch vier gezielte Schnitte in zwei ventrale und zwei dorsale Quadranten eingeteilt, wodurch sich das Gewebe auffalten ließ. Das Gewebe wurde auf

einen Objektträger übertragen und mit einigen Tropfen „Aqua-Poly/Mount“ (Polysciences) und einem Deckglas eingedeckelt. Um die Färbungen auszuwerten, wurde ein Axioscop 2-Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss) benutzt.

## 26. Zell- und Entwicklungsbiologische Methoden

### 26.1 Nicht-radioaktive RNA-in situ-Hybridisierung

#### 26.1.1 Herstellung von Digoxigenin- und Fluorescein-markierten RNA-Sonden

Strang- und Gegenstrang-RNA-Sonden für die nicht radioaktive in situ-Hybridisierung wurden mit dem „DIG RNA Labeling Mix“ oder dem „Fluorescein RNA Labeling Mix“ (beide Roche) nach Angaben des Herstellers hergestellt. Um Qualität und Ausbeute der RNA-Sonden zu prüfen, wurden jeweils 2 µl (= 1/10) einer in vitro-Transkriptionsreaktion auf ein 1% TBE-Agarosegel aufgetragen.

Tab. 15. RNA-Sonden.

RNA-Sonde	Gegenstrang-Sonde	Matrizenlänge [kb]	Bezugsquelle
<i>RCAS</i>	T3; <i>Sall</i> ; pBluescript II SK	2,1	C. L. Cepko, Harvard Medical School, Boston (Ma), USA
<i>UCH-L1</i>	T7, pBluescript II SK	0,8	D. Schulte, MPI f. Hirnforsch.
<i>CA-II</i>	T7, pBluescript II SK	~0,6	D. Schulte, MPI f. Hirnforsch.
<i>Visinin</i>	T3, pBluescript	0,3	D. Schulte, MPI f. Hirnforsch.
<i>Ephrin-B1</i>	T7; <i>EcoRI</i> ; pBluescript II KS	0,7	T. McLaughlin, Salk Institute, La Jolla (Ca), USA
<i>Ephrin-B2</i>	T7, <i>EcoRI</i>	0,7	D. Schulte, MPI f. Hirnforsch.
<i>Epb2G</i>	T7, <i>PstI</i>	0,7	D. Schulte, MPI f. Hirnforsch.
<i>EphB3G</i>	T3; <i>Clal</i>	1,8	D. Schulte, MPI f. Hirnforsch.

#### 26.1.2 In situ-Hybridisierung auf Gefrierschnitten von Hühnerretinae

Gefrierschnitte von E4,5-Hühnerretinae wurden hergestellt, wie im Abschn. 24 beschrieben. Das Protokoll gliederte sich in drei Abschnitte. **(A) Hybridisierung (Tag 1)**. Die Sonden wurden hergestellt und geprüft, wie im Abschn. 26.1.1 beschrieben. In Abhängigkeit der Ausbeute wurden der Dig-markierten Sonde einige Mikroliter entnommen, 1:100 in Hybridisierungspuffer verdünnt und bei 70°C für 10 min denaturiert. 100 µl der denaturierten Sonde wurden auf die Gewebeschnitte eines Objektträgers pipettiert. Unmittelbar danach wurde der Objektträger mit einer Einweg-Kunststoffolie abgedeckt, welche die Maße des Objektträgers hatte. Mehrere Objektträger wurden in einen vorgewärmten Hybridisierungskasten aus Kunststoff gelegt. In dem Kasten befanden sich Papiertücher, die mit 50% Formamid und 1x SSC getränkt waren. Der Kasten wurde luftdicht verschlossen und bei 68°C über Nacht in einem Wärmeschrank inkubiert. **(B) Posthybridisierung (Tag 2)**. Eine vorgewärmte Glasküvette mit Färbegestell wurde mit 65°C warmer Waschlösung gefüllt. Mehrere Objektträger mit Folie wurden in das Färbegestell gesteckt

und in die Glasküvette überführt. Nachdem die Folien unter leichtem Schwenken der Küvette abgeschwommen waren, wurde das Färbegestell in eine zweite Glasküvette überführt, die ebenfalls mit 68°C warmer Waschlösung gefüllt war. In dieser Küvette wurden die Objektträger bei 68°C für 60 min in einem Wärmeschrank inkubiert. Zwei Glasküvetten mit MABT-Lösung wurden vorbereitet. Die Objektträger wurden in ein neues Färbegestell gesteckt und in die erste Küvette überführt. Nach einer Inkubation von 30 min bei ZT und leichtem Schwenken wurde das Färbegestell in die zweite Küvette überführt und wie zuvor inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in einen neuen Kasten überführt, in dem sich ein mit Wasser getränktes Papiertuch befand. Dort wurden 300 µl MABT auf die Gewebeschnitte eines Objektträgers pipettiert. Nach dem Absaugen der Lösung wurden die Schnitte in 300 µl 20% Hühnerserum (in MABT) pro Objektträger bei ZT für mindestens 60 min inkubiert. Ein anti-Dig-AP-Antikörper wurde 1:5000 in AK-Puffer verdünnt. Nachdem die Serumlösung entfernt war, wurden 100 µl des verdünnten Antikörpers auf die Schnitte eines Objektträgers pipettiert. Die Objektträger wurden mit einer Einweg-Kunststoffolie abgedeckt und bei 4°C über Nacht inkubiert. **(C) Färbereaktion (Tag 3).** Drei neue Glasküvetten mit MABT wurden vorbereitet. Die Objektträger wurden in ein neues Färbegestell gesteckt und in die erste Küvette überführt. Nachdem die Folie unter leichtem Schwenken abgeschwommen war, wurde das Gestell in die zweite Küvette überführt und unter leichtem Schwenken bei ZT für 20 min inkubiert. Danach wurde das Gestell in die dritte Küvette überführt und wie zuvor inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger wieder in den Kasten überführt. Pro Objektträger wurden 300 µl MABT auf die Schnitte pipettiert. Nach 20 min Inkubation bei ZT wurde die Lösung abgesaugt und durch weitere 300 µl MABT erneuert. Dieser Waschgang wurde einmal wiederholt. Nachdem die MABT-Lösung abgesaugt war, wurden 300 µl AK-Puffer auf die Schnitte pipettiert und für 10 min bei ZT inkubiert. Dieser Waschgang wurde einmal wiederholt. Nach dem Absaugen des AK-Puffers, wurden 100 µl NBT/BCIP-Lösung auf die Schnitte pipettiert und der Objektträger mit einer neuen Folie abgedeckt. Der Kasten wurde im Dunkeln bei ZT inkubiert, bis die alkalische Phosphatase das NBT/BCIP-Substrat zu einem blau-violetten Niederschlag umgesetzt hatte. Um die Färbung zu beenden und die Folie abzuschwemmen, wurden die Objektträger in eine Küvette mit PBS (pH 5,5) überführt. Dieser Waschgang wurde einmal wiederholt. Die Schnitte wurden mit einem Tropfen „Aqua-Poly/Mount“ (Polysciences) und einem Deckgläschen eingedeckelt. Die mRNA-Expressionsmuster wurden im Durchlicht eines Axiophot-Mikroskops (Zeiss) untersucht und mit einer Digitalkamera dokumentiert.

Tab. 16. Pufferlösungen für die in situ-Hybridisierung auf Gefrierschnitten.

Lösungen/Puffer	Bestandteil	
10x Salzpuffer	Tris-HCl (pH 7,5)	126 mM
	NaCl	1,85 M
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	100 mM
	EDTA	50 mM
	bidestilliertes Wasser	ad 100 ml
50x Denhardt's-Lösung	BSA	1%
	Ficoll	1%
	Polyvinylpyrrolidon	1%
	bidestilliertes Wasser	ad 100 ml
Hybridisierungspuffer	Salzpuffer, 10x	1 ml
	Formamid, deionisiert	5 ml
	Dextransulfat, 50%	2 ml
	Hefe-RNA, 10 mg/ml	1 ml
	Denhardt-Lösung, 50x	100 µl
	bidestilliertes Wasser, RNase frei	900 µl
Waschlösung	SSC, 20x	1x
	Formamid	50%
	Tween	0,1%
	bidestilliertes Wasser	ad 300 ml
MABT-Puffer	Maleinsäure (pH7,5)	100 mM
	NaCl	150 mM
AK-Puffer	Tris-HCl (pH 9,5)	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM
	NaCl	100 mM
	Tween-20	0,1%
NBT/BCIP-Lösung	NBT, 75 mg/ml in Dimethylformamid	1:220
	BCIP als Dinatriumsalz, 50 mg/ml in Wasser	1:285

Die Salz- und MABT-Lösung wurden autoklaviert. Denhardt's-Lösung wurde bei -20°C gelagert.

### 26.1.3 In situ-Hybridisierung auf ganzen Hühnchenretinae

Ganze Hühnchenretinae wurden präpariert, fixiert, de- und rehydriert, wie im Abschn. 21 beschrieben. Die nicht-radioaktiven in situ-Hybridisierungen wurden durchgeführt, wie von Bruhn und Cepko (1996) beschrieben. Hierfür wurden RNA-Sonden hergestellt und geprüft, wie im Abschn. 26.1.1 beschrieben. Um das RCASBP-Retrovirus nachzuweisen, wurde bei der so genannten Zweifarben-in situ-Hybridisierung neben der Dig-markierten Sonde eine zweite, virusspezifische Sonde hergestellt. Diese Sonde wurde mit Fluorescein markiert (Roche). Die Retinae wurden mit beiden Sonden gleichzeitig hybridisiert. Zuerst wurde die DIG-markierte Sonde durch einen anti-Dig-AP-Antikörper nachgewiesen. Die alkalische Phosphatase (AP) setzte NBT/BCIP (Sigma-Aldrich) zu einem blau-violetten Niederschlag um. Anschließend wurde die Fluorescein-markierte Sonde durch einen anti-Fluorescein-AP-Antikörper nachgewiesen. Dabei wurde BCIP von der alkalischen Phosphatase zu einem türkis farbigen Niederschlag umgesetzt. Durch die Zweifarben-in situ-Hybridisierung wurde geprüft, ob die retrovirale Fehlexpression eines bestimmten Gens (Dig-Sonde) einen Effekt auf die Expression eines anderen Gens (Fluorescein-Sonde) ausübt. Die gefärbten Retinae wurden auf einen Objektträger übertragen und

mit einigen Tropfen „Aqua-Poly/Mount“ (Polysciences) und einem Deckglas eingedeckelt. Die mRNA-Expressionsmuster wurden in verschiedenen Vergrößerungen mit einem Stemi SV 11-Stereomikroskop (Zeiss) untersucht und mit einer Powershot G5-Digitalkamera (Canon) dokumentiert.

#### **26.1.4 In situ-Hybridisierung auf Vibratomschnitten von Hühnchenretinae**

Köpfe von E2,5- und E3,5-Hühnchen wurden präpariert, wie im Abschn. 23 beschrieben. Das Einbetten des PFA-fixierten Gewebes in BSA/Gelatine/Glutaraldehyd, das Schneiden mit Hilfe eines Vibratoms (Leica) und die nicht-radioaktive in situ-Hybridisierung auf den Vibratomschnitten wurden durchgeführt, wie von Christiansen et al. (1995) beschrieben.

#### **26.2 Herstellung von infektiösen RCASBP-Viruspartikeln**

Infektiöse RCASBP-Viruspartikel wurden hergestellt, wie von Logan und Tabin (1998) beschrieben. Immortalisierte DF-1 Fibroblasten von *G. gallus* (ATCC, Rockville, USA) wurden in DMEM [„Dulbecco’s Modified Eagle Medium (high glucose, with L-Glutamin“] (Gibco), supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum, 2% Hühnerserum, 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin-Lösung bei 37°C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> kultiviert. Um eine Passage durchzuführen, wurden die Fibroblasten mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA-Lösung trypsiniert. Die DF-1-Zellen wurden unter Verwendung des „Effectene Transfection Reagent“ (Qiagen) mit dem klonierten RCASBP-Vektor nach Angaben des Herstellers transfiziert. Vor der Ernte der Virusüberstände wurde die Infektionseffizienz des RCASBP-Virus bestimmt. Hierfür wurde die virale Infektion durch Färbung mit dem monoklonalen 3C2-Antikörper (C. L. Cepko, Harvard Medical School, Boston) nachgewiesen. 3C2 erkennt das Gag-Protein p19 der Viruspartikel (Potts et al., 1987). Diese Bindung wurde durch Verwendung des „Vectastain Kit“ und „DAB Substrate Kit“ (beide Vector Labs, Burlingame, USA) nachgewiesen. 3C2 wird von einem biotinylierten anti-Maus-Antikörper erkannt, an das ein Avidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat bindet. Die Umsetzung des Substrates Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) erzeugt einen braunen, unlöslichen Niederschlag. Die Färbung wurde mit Hilfe eines Stemi SV 11-Stereomikroskop (Zeiss) untersucht. Während des Erntezeitraumes wurden die Zellen ohne Serum kultiviert, da die Zellen unter dieser Bedingung die Erzeugung von Viruspartikeln erhöhen. Die Viruspartikelsuspensionen von insgesamt drei Ernten wurden durch Ultrazentrifugation konzentriert und anschließend vereinigt. Um das Virus zu titrieren, wurden DF1-Fibroblasten mit seriell verdünnten Suspensionen infiziert. Wie oben beschrieben, wurde abschließend die Infektionseffizienz bestimmt. Als Positivkontrolle wurde das RCASBP(B)-*eGFP* verwandt, während nicht-infizierte DF-1-Zellen als Negativkontrolle dienten.

### 26.3 In ovo-Injektionen von RCASBP-Viruspartikeln

Spezifisch pathogenfreie (SPF) Hühnchenembryonen des HH Stadiums 11 (E1,5) wurden mit RCASBP infiziert, indem die unverdünnte Suspension infektiöser Viruspartikel (Virionen) mit einer Glaskapillare in beide optische Vesikel injiziert wurde. Der apparative Aufbau und die Verwendung des Mikromanipulators, inklusive der Herstellung der Glaskapillare, wurde von Logan und Tabin (1998) beschrieben. Um die Füllung der Vesikel besser beobachten zu können, wurden die Suspensionen mit 0,025% „Fast Green“ (Sigma-Aldrich) gemischt. Zudem wurde bei Injektionen mit RCASBP(B)-Virionen 0,08 mg/ml Sequabren (Sigma-Aldrich) hinzugefügt, um den Infektionsvorgang zu unterstützen. In Tab. 17 wurden die RCASBP-Retroviren aufgelistet, die in dieser Arbeit zum Gentransfer durch retrovirale Fehlexpression verwandt wurden.

Tab. 17. RCASBP-Retroviren.

RCASBP-Retrovirus	DNA-Fragment	Genprodukt	Referenz
RCASBP(B)			Petropoulos und Hughes, 1991; Morgan und Fekete, 1996
RCASBP(B)- <i>cVax</i>	1	cVax (AF117299), 326 Aminosäuren	Schulte et al., 1999
RCASBP(B)- <i>cFoxG1</i>	1,4	cFoxG1 (U47275), 451 Aminosäuren	M. Noda, Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan; Yuasa et al., 1996
RCASBP(B)- <i>Ephrin-A5</i>	0,7	humanes Ephrin-A5, 228 Aminosäuren	D. Schulte, MPI für Hirnforschung
RCASBP(B)- <i>Ephrin-B2</i>	1	humanes Ephrin-B2, 333 Aminosäuren	D. Schulte, MPI für Hirnforschung
RCASBP(B)- <i>cTbx5</i>	1,6	cTbx5 (AF069396), 521 Aminosäuren	M. Logan, National Institute for Medical Research, Mill Hill, UK; Rallis et al., 2003
RCASBP(A)- <i>cTbx5<sup>em</sup></i>	1,7	Aminosäuren 1 bis 274 von Tbx5 (DNA-Bindedomäne) fusioniert mit Aminosäuren 2 bis 298 ( <i>Drosophila</i> Engrailed)	M. Logan, National Institute for Medical Research, Mill Hill, UK; Rallis et al., 2003
RCASBP(B)- <i>UCH-L1-eGFP</i>	1,4	UCH-L1-eGFP, 463 (=224+239) Aminosäuren (ohne Verknüpfungspeptid)	Diese Arbeit

### 26.4 In vitro-Axonstreifenversuch

Der in vitro-Axonstreifenversuch (“in vitro axon stripe assay”) wurde mit geringfügigen Änderungen nach dem Protokoll von (Walter et al., 1987) durchgeführt. Die Pufferlösungen, Gefäße, Kanülen, Pipettenspitzen und anderen Materialien waren steril. Um die Membranproteine zu schonen, wurden die Lösungen und Gefäße auf Eis gehalten. Das Protokoll gliederte sich in vier Abschnitte.

**(A) Präparation von Membranfragmenten.** Tekta von E10-Hühnchenembryonen wurden in kaltem HB („homogenization buffer“) präpariert. Von jedem Tektum wurden ein Drittel des anterioren und posterioren Gewebes abgeschnitten. Anteriores und posteriores Gewebe wurden getrennt voneinander in 1,5 ml-Gefäßen gesammelt, die 0,5 ml kalten HB+ (mit Proteinaseinhibitoren) enthielten. Um die Gewebe zu homogenisieren, wurden sie zweimal durch eine P1000-Pipettenspitze und dann dreimal durch eine G27-Kanüle gedrückt. Dabei sollten keine Luftblasen erzeugt werden. Anschließend wurde das Homogenat auf die obere Phase eines kalten 5%/50%-Saccharosestufengradienten geladen. Der Gradient wurde in einem dünnwandigen Ultrazentrifugenröhrchen (Sorvall) hergestellt, das zu einem MLS-50-Schwingrotor (Beckman) passt. Hierzu wurden 0,5 ml 5% Saccharose (in HB+) von 2,5 ml 50% Saccharose (in HB+) unterschichtet. Für das Unterschichten wurde eine G18-Kanüle mit begradigter Spitze benutzt. Die beladenen Saccharosestufengradienten wurden in einer Optimax 100 Ultrazentrifuge zentrifugiert (26000 U/min; 4°C; 30 min Laufzeit; Auslaufen lassen). Die Membranfragmente wurden mit einer Pasteurpipette aus der Interphase entfernt und in ein 2 ml-Gefäß überführt, das mit 1 ml kaltem PBS+ (mit Proteinaseinhibitoren) gefüllt war. Danach wurden die Gefäße in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (13000 U/min; 7 min; 4°C). Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen und verworfen. Die anterioren und posterioren Membranfragmente wurden in jeweils 300 µl kaltem PBS+ vollständig resuspendiert. Das Resuspensionsvolumen (RV) wurde mit einer P1000-Pipette bestimmt und notiert. Die anteriore und posteriore Membranpräparation sollten durch Verdünnung mit PBS+ auf die gleiche Konzentration eingestellt werden. Um das erforderliche Verdünnungsendvolumen (VEV) zu berechnen, wurde zunächst die optische Dichte (OD) der Membranpräparationen mit einem LC55 Spektrometer (PerkinElmer) bestimmt. Hierfür wurden die Präparationen zunächst in 15 ml-Gefäße überführt, und mit kaltem PBS+ auf 3,0 ml aufgefüllt (= 1:10 Verdünnung). Davon wurden pro Absorptionmessungen (220 nm) 60 µl in eine Quarzküvette pipettiert, die 900 µl 2% SDS (in PBS+) enthielt (= 1:16 Verdünnung). Als Referenz dienten 60 µl PBS+ in 900 µl 2% SDS (in PBS+). VEV wurde nach folgendem Rechengang bestimmt. Zuerst wurde der Verdünnungsfaktor (VF) berechnet. 
$$VF = \frac{OD_{\text{gemessen}}}{OD_{\text{gewünscht}}} \cdot 160 = \frac{OD_{\text{gemessen}}}{0,2} \cdot 160$$
 Da 60 µl RV pro Messung verbraucht wurden, wurde das restliche Resuspensionsvolumen rRV berechnet, indem von RV für jede Messung 60 µl subtrahiert wurde. 
$$VEV = rRV \cdot VF$$
 Die anterioren und posterioren Membranpräparationen gleicher Konzentration wurden auf 100 µl-Aliquots verteilt, die sofort bei -70°C eingefroren wurden.

(B) Die **Herstellung von Membranstreifenteppichen** beruhte auf folgendem Prinzip. Zuerst wurden die posterioren Membranfragmente mit rot fluoreszierende Kügelchen (Sigma) gemischt. Ein Kapillarfilter wurde auf eine Silikonmatrix gelegt, die aus mehreren parallelen Mikrokanälen bestand. In diesen Kanälen konnte mit einer Vakuumpumpe Unterdruck erzeugt werden. Nur dort, wo das Filter auf den Kanälen lag, wurden die Fragmente und die Kügelchen „angesaugt“. Dadurch entstanden parallele Streifen von gefärbten posterioren Membranfragmenten. Anschließend wurde das Filter auf ein feines Nylonnetz gelegt. Durch Unterdruck sammelten sich die anterioren Membranfragmente nur in den Streifen, die nicht von posterioren Fragmenten besetzt waren. Das Ergebnis war ein Kapillarfilter, auf das anteriore und gefärbte posteriore Membranfragmente in abwechselnden Streifen aufgetragen waren.

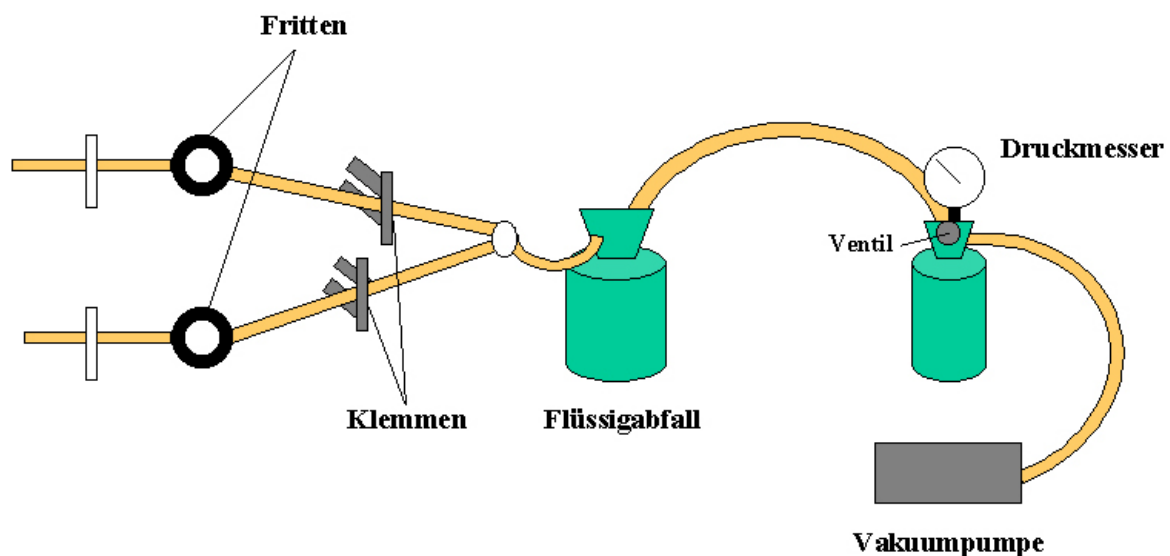


Abb. 35. Apparativer Aufbau für die Herstellung von Membranstreifenteppichen. Beschreibung im Text.

Für die Herstellung von 6 Streifenteppichen wurde jeweils ein anteriores und ein posteriores Aliquot benötigt. Nachdem die Aliquots im Eisbad aufgetaut waren, wurden 900  $\mu\text{l}$  kaltes PBS+ in das anteriore und 880  $\mu\text{l}$  kaltes PBS+ in das posteriore Aliquot pipettiert. Um bei der Auswertung die posterioren von den anterioren Membranstreifen unterscheiden zu können, wurden in das posteriore Aliquot zusätzlich 20  $\mu\text{l}$  der vorbereiteten Latexkügelchen-Suspension pipettiert. Bis zu 6 Nuclepore-Polykarbonatfilter wurden mit der glänzenden Seite nach oben in eine 100 mm-Agaroseschale gelegt. Um die Lage der Teppiche später besser bestimmen zu können, wurde mit einer Einwegklinge jeweils eine Ecke in das runde Filter geschnitten. Danach wurden die Filter mit PBS+ gesättigt und bis zum Gebrauch feucht gehalten. Anschließend wurden die so genannten Fritten (Abb. 35) zunächst zwei bis dreimal gewaschen, indem durch Unterdruck einer Vakuumpumpe jeweils 1000  $\mu\text{l}$  PBS hindurch gesaugt wurden ( $-9 \text{ mWs} = -900 \text{ mbar}$ ). Danach wurden die Silikonmatrix (posterior) und das Nylongeflecht (anterior) auf die Fritten gelegt und wie zuvor zwei- bis dreimal mit 200  $\mu\text{l}$  PBS+ gewaschen. Zuerst wurden die

posterioren Membranstreifen hergestellt. Hierzu wurde ein Nucleoporefilter auf die Matrix gelegt. 150 µl PBS wurden durch das Filter gesaugt (-9mWs), bis ein Rest Flüssigkeit verblieb. Durch eine Schlauchklemme wurde der Unterdruck schnell aufgehoben. Direkt danach wurden 160 µl des markierten posterioren Aliquots durch das Filter gesaugt (-9 mWs). Nach Ablauf von 90 s wurde der Unterdruck auf -1 bis -2 mbar vermindert. Nachdem die restliche Flüssigkeit mit einer Pipette abgesaugt war, wurde der Unterdruck durch die Schlauchklemme aufgehoben. Anschließend wurde das präparierte Filter mit einer Pinzette auf das Nylongeflecht überführt. Unmittelbar danach wurden 160 µl des anterioren Aliquots nach vorigem Schema durch das Filter gesaugt. Nachdem der Unterdruck durch die Schlauchklemme aufgehoben war, wurde der fertige Membranstreifenteppich in eine 35 mm-Agaroseschale überführt. An seinen Kanten wurde der Teppich mit zwei Klötchen beschwert. Danach wurde der Teppich mit 300 µl kaltem PBS+ überschichtet. Die Schale wurde bis zum Auflegen eines TN-Retinastreifens auf Eis gestellt.

**(C) Präparation von TN-Retinastreifen.** Die Augen von E6-Hühnchenembryonen wurden in vorgewärmten DMEM/F12 präpariert. Linse, Glaskörper und Pigmentepithel wurden entfernt. Nach einem Schnitt entlang der optischen Fissur und des ihr gegenüberliegenden dorsalen Gewebes sowie Einschnitten an der nasalen und temporalen Kante wurde die Retina mit der Nervenfaserschicht (NFL) nach oben auf einen Nitrozellulosefilter aufgezogen. Dabei diente die Fissur zur Orientierung. Mit einer Einwegklinge wurde entlang der retinalen TN-Achse ein Gewebestreifen aus der Retina geschnitten. Mit der NFL nach unten wurde der TN-Retinastreifen im rechten Winkel zu den Membranstreifen auf den Teppich gelegt. An seinen äußeren Kanten wurde der Streifen durch zwei Klötzchen beschwert. Retinastreifen und Membranstreifenteppich wurden mit 2 ml vorgewärmten Retinalem Wachstumsmedium überschichtet. Anschließend wurden die Schalen in einem Zellkulturschrank inkubiert (5% CO<sub>2</sub>; 37°C).

**(D) Auswertung.** Nach 48 Std wurde die Inkubation des Axonstreifenversuchs beendet. Da die Fluoreszenzintensität von eGFP („enhanced green fluorescent protein“) für die Auswertung zu gering war, wurden die Axone mit dem „vital dye“-Fluoreszenzfarbstoff zusätzlich gefärbt. Das Wachstumsmedium wurde abgesaugt und gegen 1 ml des Fluoreszenzfarbstoffs „vital dye“ ersetzt. Nach 5 minütiger Inkubation im Dunkeln und bei Zimmertemperatur wurde die Fluoreszenzfarbstoff-Lösung gegen 1 ml PPDA ausgetauscht. Nach einer Minute wurde das PPDA soweit abgesaugt, dass die Membran noch benetzt blieb. Direkt im Anschluß wurde das Wachstum der RGC-Axone mit einem Axiophot-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) ausgewertet.

Tab. 18. Kulturmedium und Pufferlösungen für den Axonstreifenversuch.

Medium/ Puffer	Bestandteil		Bezugsquelle/ Referenz
PBS	NaCl	136 mM	
	KCl	2,6 mM	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1 mM	
	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM	
	bidestilliertes Wasser	ad 100 ml	
PBS+	Spermidin	1 mM	Sigma
	Complete	1 Tablette	Roche
	1x PBS	ad 50 ml	
Homogenisierungspuffer (HB)	Tris-HCl (pH 7,4)	10 mM	
	1,5 mM CaCl <sub>2</sub>	1,5 mM	
	bidestilliertes Wasser	ad 100 ml	
HB+	Spermidin	1 mM	Sigma
	Complete	1 Tablette	Roche
	HB	ad 50 ml	
5% Saccharose	Saccharose	5%	
	HB+	ad 50 ml	
50% Saccharose	Saccharose	50%	
	HB+	ad 50 ml	
rot fluoreszierende Kügelchen	„FluoSpheres sulfate microspheres“, 1 µm	1:100	Molecular Probes
	PBS+	ad 100 µl	
retinales Wachstumsmedium, 200 ml	Methylcellulose	0,4%	Sigma
	DMEM/F12 (ohne L-Glutamin, enthält 0,3% D-Glucose)		Gibco
	Fötales Kälberserum	10% (v/v)	
	Hühnerserum	2% (v/v)	
	HEPES, 1M	20 mM	
	L-Glutamin, 200 mM	2 mM	
	D-(+/-)-Glucose	0,6%	
	Penicillin/Streptavidin	10 U/ml, jeweils	
„vital dye“	5- (und 6-) Carboxyfluorescein-Diacetat (in Dimethylsulfoxid), 10 mM	0,03 mM (in PBS)	Molecular Probes
PPDA	p-Phenylendiamin	~5 Flocken	Sigma

Die PBS- und HB-Pufferlösung sowie die 5%- und 50%-Saccharoselösung wurden autoklaviert, bevor die „Complete“-Tablette und das Spermidin hinzu gegeben wurden. Die Metallklötzchen wurden in der Mechanik-Werkstatt des Instituts angefertigt. Die beiden Fritten, die Silikonmatrix, das Nylongeflecht, die Schlauchklemmen und die Schläuche wurden über Herrn Dr. J. Jung bezogen (Abteilung Physikalische Biologie, MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen). Dieses Zubehör und die Metallklötzchen wurden durch 10 min Kochen in bidestilliertem Wasser sterilisiert. Um das Retinale Wachstumsmedium anzusetzen, wurde die Methylzellulose (mit Rührstab) autoklaviert. Unter leichtem Rühren wurde die Methylzellulose in DMEM/F12 über Nacht bei 4°C gelöst. Erst danach wurden die übrigen Bestandteile hinzu pipettiert. Während der Anwendung wurden „vital dye“ und PPDA vor Licht geschützt. Die „vital dye“-Stammlösung wurde bei -20°C gelagert.

## 26.5 In vitro-Axonmarkierung mit DiI

Zunächst wurden ganze E6,5-Hühnchenretinae präpariert, wie in Abschn. 23 beschrieben. Danach wurden die aufgefalteten Retinae mit der Nervenfaserschicht (NFL) nach oben auf Cellulosenitrat-Membranfilter (Porengröße 0,45 µm; Sartorius) aufgezogen. Um kleinere Gruppen von RGC-Axonon in vitro zu markieren, wurde mit einer Hamiltonspritze in dem gewünschten Retinaquadranten ein Tropfen 10% DiI<sup>22</sup> (in Dimethylformamid) auf die NFL aufgetragen. Anschließend wurde das Gewebe durch 0,2% PFA leicht fixiert. Um die Diffusion des lipophilen Farbstoffs in der Lipiddoppelschicht der RGC-Axone fortschreiten zu lassen, wurde die Retina unter leicht fixierenden Bedingungen im Dunkeln für 48 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. In einem abgedichteten Kunststoffkasten wurde das Gewebe mit 0,2% PFA-Dämpfe langsam fixiert. Nach Abschluss der Inkubation wurde das Gewebe mit 4% PFA vollständig fixiert. Danach wurden die DiI markierten RGC-Axone zunächst mit einem Axiophot-Floureszenzmikroskop (Zeiss) ausgewertet. Um detailliertere Strukturen zu untersuchen, wurde ein Axioscop 2-Konfokalmikroskop (Zeiss) benutzt.

## 27. cDNA-Microarray-Methode

Um cDNA-Microarrays mit Gensequenzen aus der embryonalen Retina von Hühnchen zu produzieren, stellte Frau Dr. Dorothea Schulte drei cDNA-Bibliotheken her. Die cDNA-Bibliotheken und die entsprechenden cDNA-Microarrays wurden im Labor von Frau Prof. Dr. Constance L. Cepko (Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston) hergestellt.

Die erste cDNA-Bibliothek umfasste die Retinaentwicklung von E1,5 bis E4, die zweite von E4 bis E6 und die dritte von E6 bis E8. Da für die Erststrang-cDNA-Synthese oligo(dT)-Oligonukleotide eingesetzt wurden, trugen die cDNA-Klone Anteile der 3'-nicht translatierten Region (3' UTR) sowie Anteile aus dem 3'-Bereich der kodierenden Gensequenzen. Die Klone wurden gerichtet in pBluescript II SK (+) kloniert (5'-Terminus: *EcoRI*, T7, M13 vorwärts; 3'-Terminus: *XhoI*, T3, M13 rückwärts). Die Bibliotheken wurden nicht subtrahiert und nicht normalisiert. Um aus einer Bibliothek einen cDNA-Microarray zu produzieren, ging Frau Dr. Dorothea Schulte folgendermaßen vor. Zunächst wurden die cDNA-Klone amplifiziert und nach Größen zwischen 0,5 kbp und 2,0 kbp selektiert. Davon wurden etwa 21.000 PCR-Produkte nach dem Zufall gewählt und zusammen mit etwa 300 bekannten cDNA-Klonen in 4 x 12 Druckkopfgruppen mit jeweils 21 x 21 Punktreihen auf Poly-L-Lysin-beschichtete Glasobjektträger gedruckt. Bei den bekannten Klonen handelte es sich hauptsächlich um cDNA-Fragmente, die ursprünglich als Matrizen für die Herstellung von RNA-Sonden dienten.

---

<sup>22</sup> D282, 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-perchlorat; Molecular Probes.

Für die ersten TN-Vergleiche in der E4,5-Hühnchenretina wurden cDNA-Microarrays der Retina-Bibliothek 2 verwandt. Dafür wurden die mRNA-Moleküle umgeschrieben, die cDNA-Moleküle amplifiziert und mit den Cyanin-Farbstoffen enzymatisch markiert (Abschn. 27.2). Um potentiell nasal oder temporal exprimierte Gene in der E6,5-Hühnchenretina zu identifizieren, wurden Retina-cDNA-Microarrays der Bibliothek 3 benutzt. Hierfür wurden mRNA-Zielmoleküle direkt mit den Cyanin-Farbstoffen chemisch markiert (Abschn. 27.3). Um Protokolle für die Nachprozessierung, die Hybridisierung und das Stringenz-Waschen anzupassen, wurden cDNA-Microarrays einer Vorserienproduktion benutzt. Diese Microarrays trugen nur etwa 17.000 unbekannte cDNA-Klone und besaßen keine bekannten cDNA-Klone.

### 27.1 Nachprozessieren von cDNA-Microarrays

Das Nachprozessieren (Rehydrieren, Sättigen und Denaturieren) bedruckter Poly-L-Lysin beschichteter cDNA-Microarrays wurde nach dem Protokoll von (DeRisi et al., 1997)<sup>23</sup> durchgeführt. Hierbei wurden folgende Änderungen vorgenommen. Beim Rehydrieren wurde für das Ansetzen von 0,5x SSC „Wasser, für die HPLC“ (Sigma-Aldrich) verwandt. Die Dauer der Befeuchtung wurde anhand einer Versuchsreihe mit „Vorserien-Microarrays“ auf 35 s festgelegt. „Wasser, für die HPLC“ (Roth) wurde auch für das Denaturieren benutzt. Nach dem Waschen in 95 % Ethanol wurden die Objektträger in 50 ml-Blue Max-Kunststoffröhrchen (Becton Dickinson) überführt. Um Flüssigkeitsreste zu entfernen, wurden die Objektträger im Auslenkrotor einer Heraeus Christ Minifuge GL (Kendro) für 5 min bei 1500 U/min und Zimmertemperatur zentrifugiert. Hierdurch sammelten sich Flüssigkeitsreste in der Spitze des Röhrchens, die dort von einem Schwammstückchen aufgesaugt wurden. Ein UV-Kreuzverknüpfen zwischen den cDNA- und Poly-L-Lysin-Molekülen wurde nicht durchgeführt.

### 27.2 Synthese, Amplifizierung, Markierung und Hybridisierung von cDNA-Zielmolekülen

Die Herstellung von markierten cDNA-Zielmolekülen gliederte sich in drei Abschnitte, denen die Hybridisierung und das Stringenz-Waschen folgten. (A) **Gesamt-RNA-Präparation.** Gesamt-RNA aus nasalem und temporalem Retinagewebe einer E4,5-Hühnchenretina wurde präpariert, wie im Abschn. 21 beschrieben. (B) **cDNA-Synthese und Amplifikation.** Um mRNA-Moleküle aus 1 µg der nasalen bzw. temporalen Gesamt-RNA-Präparation in cDNA-Moleküle umzuschreiben und zu amplifizieren, wurde das „SMART“-System (Clontech) nach Herstellerangaben benutzt (Tab. 7 in Abschn. 20; Tab. 10 in Abschn. 22.2.2). Um die amplifizierten cDNA-Moleküle von überschüssigen SMART-Bestandteilen durch Affinitätschromatographie zu trennen, wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen)

<sup>23</sup> URL: <http://derisilab.ucsf.edu/pdfs/PostProcessing2001.pdf>

benutzt. Die Konzentration der gereinigten cDNA-Moleküle wurde durch Absorptionsmessungen bestimmt, während die Qualität durch 1x TAE-Agarosegelelektrophorese geprüft wurde. **(C) cDNA-Markierung.** Um markierte cDNA-Zielmoleküle herzustellen, wurden 1 µg cDNA-Moleküle durch Einbau von Cy5 oder Cy3-dCTP (Perkin-Elmer) mittels DNA Polymerase I (Klenow-Enzym) (Roche) markiert. Hierbei wurden Zufallshexamere eingesetzt. Um die markierten cDNA-Moleküle von nicht eingebauten Farbstoffmolekülen zu trennen, wurden „ChromaSpin 100“-Gelfiltrationssäulchen (Clontech) nach Herstellerangaben verwandt. Die markierten cDNA-Zielmoleküle wurden in Gegenwart von Cot-1-DNA (Life Technologies) und Polyadenylinsäure (Sigma) durch Natriumacetat-Ethanol-Präzipitation gefällt. **(D) Hybridisierung und Stringenz-Waschen.** Die gefällten cDNA-Zielmoleküle wurden durch 60 µl vorgewärmten Hybridisierungspuffer (Tab. 19) resuspendiert und anschließend denaturiert. Wie in Abschn. 25.3 beschrieben wurden die cDNA-Zielmoleküle auf den cDNA-Microarray aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in einem Wärmeschrank bei 42°C. Anschließend wurden die Microarrays nacheinander jeweils 3 min in folgende Waschlösungen bei Zimmertemperatur überführt: 2x SSC/0,03% SDS; 2x SSC; 1x SSC; 0,2x SSC; 0,1x SSC (zweimal). Die Waschlösungen wurden mit „Wasser, für die HPLC“ (Roth) hergestellt. Vor der Überführung in die erste SDS freie Lösung wurden die Microarrays in ein neues Objektträgergestell gesteckt. Anschließend wurden die Microarrays in 50 ml-Blue Max-Kunststoffröhrchen (Becton Dickinson) überführt. Um Reste der Waschlösung zu entfernen, wurden die Objektträger zentrifugiert, wie in Abschn. 27.1 beschrieben.

Tab. 19. Puffer für die Hybridisierung von Cyanin-markierten cDNA-Molekülen.

Lösung/Puffer	Bestandteil	Bezugsquelle/ Referenz
50% Formamid	Formamid, deionisiert	
5x SSC	SSC	20x
5x Denhardt's-Lösung	Denhardt's-Lösung	50x
0,5% SDS	SDS	10%
5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 M
Wasser	Wasser, für die HPLC	ad 10 ml Roth

### 27.3 Markierung und Hybridisierung von mRNA-Zielmolekülen

Im Gegensatz zu „Northern“- oder „Southern“-Hybridisierungen werden bei cDNA-Microarray-Hybridisierungen nicht die Sondenmoleküle, sondern die Zielmoleküle markiert. Das Protokoll für die Markierung und Hybridisierung von mRNA-Zielmolekülen gliederte sich in drei Abschnitte. **(A) RNA-Markierung.** Die Moleküle einer Gesamt-RNA-Präparation aus nasalem oder temporalem Retinagewebe von E6,5-Hühnchenembryonen wurden mit Cyanin 3- oder

Cyanin 5-Fluoreszenzfarbstoff nach der Methode des „Micromax ASAP<sup>24</sup> RNA Labeling Kit“ (PerkinElmer) markiert. Die Durchführung richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Die Menge der eingesetzten Gesamt-RNA einer Markierungsreaktion richtete sich nach dem Hybridisierungsvolumen, das von der Fläche des benutzten Deckglases abhing (siehe unten). Bei dieser Markierungsmethode werden die RNA-Moleküle durch eine chemische Reaktion direkt mit dem Cyaninfarbstoff-Molekülen verknüpft. Dabei werden die mRNA-Moleküle nicht in cDNA umgeschrieben und nicht amplifiziert. Um die in Zeilen und Reihen gedruckten cDNA-Punkte eines Microarray während der Hybridisierung abzudecken, wurden Deckgläser einer Fläche von 22 x 60 mm benutzt. Daher wurden pro Markierungsreaktion 30 µg Gesamt-RNA aus nasalem oder temporalem Retinagewebe eingesetzt. Um diese größeren Mengen an Gesamt-RNA zu präparieren, wurden jeweils 4 bis 5 nasale bzw. temporale Gewebepräparationen vereinigt. **(B) Isolierung markierter mRNA-Zielmoleküle.** Um die Cy3 oder C5 markierten mRNA-Zielmoleküle von den anderen RNA-Molekülspezies durch Affinitätschromatographie zu isolieren, wurden Säulen des „Oligotex mRNA Mini Kit“ (Qiagen) benutzt. **(C) Kompetitive Hybridisierung und Stringenz-Waschen.** Die „Lifterslips 22x60I-2-4861“-Deckgläser (Erie Scientific Company) wurden auf die Objektträger gelegt, bevor die markierten mRNA-Moleküle (in Hybridisierungspuffer) darunter pipettiert wurden. Um Verdunstung des Puffers während der Hybridisierung zu vermeiden, wurde eine „CMT Hybridization Chamber“ (Corning) benutzt. Die Waschlösungen wurden mit „Wasser, für die HPLC“ (Roth) hergestellt. Reste von SDS, die nach dem Waschen auf der Trägeroberfläche verblieben, verursachten Hintergrundfluoreszenz. Diesbezüglich wurden zwei Maßnahmen ergriffen. Erstens: Die 0,5x SSC/0,01% SDS-, die 0,06x SSC/0,01% SDS- und die SDS freie 0,06% SSC-Waschlösung wurden in drei verschiedene 2 l-Bechergläser gefüllt. Zweitens: die Microarrays wurden vor der Überführung in die SDS freie Waschlösung in ein neues Objekt-Trägergestell gesteckt. Anschließend wurden die Microarrays in 50 ml-Blue Max-Kunststoffröhrchen (Becton Dickinson) überführt. Um Reste der Waschlösung zu entfernen, wurden die Objektträger zentrifugiert, wie im Abschn. 27.1 beschrieben.

#### 27.4 Analyse von cDNA-Microarray-Daten

Nach der Hybridisierung und dem Stringenz-Waschen wurden die Cy3- und Cy5-Fluoreszenzintensitäten der Hybridisierungsprodukte mit Hilfe des GenePix 4000A-Scanners (Axon) analysiert. Pro Analyse wurde ein Paar von 16 bit-TIFF-Bildern erzeugt, die mit Hilfe der Punktfinde- und Quantifizierungsautomatik des Programms GenePixPro 4.0 (Axon) ausgewertet wurden. Das Punkteraster wurde überprüft und gegebenenfalls manuell an den Durchmesser eines cDNA-Punktes angepasst. Bei schlechter Qualität der Hybridisierungsprodukte wurde ein Punkt von der Bildanalyse ausgeschlossen. Danach wurden die Hintergrund-korrigierten Cy3- und Cy5-

<sup>24</sup> „Accurate, Sensitive and Precise“.

Intensitätssignale in das Programm SMA (Abschn. 28.1) importiert. Für die anschließende Datenanalyse wurden für jeden Punkt zunächst zwei Parameter berechnet. Erstens: Das logarithmierte differentielle Expressionsverhältnis, das als M-Wert bzw. M bezeichnet wird. Der M-Wert ist Ausdruck der potentiellen Expressionsstärke eines cDNA-Klons:  $M = \log_2 R - \log_2 G = \log_2 R/G$ , wobei R das rote und G das grüne Vordergrundsignal darstellen. Zweitens: Die logarithmierte Intensität, die A-Wert genannt wird. Der A-Wert gibt die Helligkeit eines Punktes an:  $A = (\log_2 R + \log_2 G)/2 = \frac{1}{2} \cdot \log_2 R \cdot G$ . Um die M-Werte zwischen den 48 Druckkopfgruppen eines cDNA-Microarrays zu normalisieren, wurde die intensitätsabhängige Druckkopfgruppen-Skalierungsmethode („print-tip group scale method“) von SMA benutzt. Eine Druckkopfgruppe ist die kleinste, in Zeilen und Reihen angeordnete Gruppe von gedruckten cDNA-Punkten auf einem Glaträger. In der vorliegenden Arbeit bestand eine Druckkopfgruppe aus 21 x 21 Punkten. In einem zweiten Ansatz wurden die M-Werte auch zwischen den Microarrays normalisiert, die aus Wiederholungsexperimenten hervorgingen. Hierbei wurde die „multiple-slide“-Skalierungsmethode von LIMMA (Abschn. 28.1) benutzt. Für die anschließende Auswahl von Kandidatengen wurden die normalisierten M- und A-Werte der cDNA-Klone in Excel (Microsoft) importiert. Ein potentiell-differentiell exprimiertes Gen musste zwei Kriterien erfüllen. Erstens: das Kriterium des Mittelwerts von M ( $M_0$ ) von +0,75 bzw. -0,75. Zweitens: das Kriterium des prozentualen Fehlers von  $M_0$  ( $VK_0$ ) von 40%.  $VK_0$  beruht auf dem Variationskoeffizienten des Mittelwerts ( $VK_0$ ) und wurde nach folgender Formel berechnet:  $VK_0 = 100 \cdot S_0/M_0$  %. Hierbei ist  $S_0$  der Standardfehler des Mittelwertes („standard error of the mean“). Zum Beispiel war ein cDNA-Klon potentiell in der temporalen Retinahälfte exprimiert, wenn  $M_0$  des Klons gleich oder kleiner -0,75 war und  $VK_0$  dabei unter 40% lag.

Um die Identität der Kandidatengene festzustellen, wurden die ausgewählten cDNA-Klone sequenziert und mit Hilfe einer Datenbanksuche identifiziert (Abschn. 28.3). Um eine einfache Einschätzung der „Stärke“ eines mRNA-Expressionsgradienten entlang der retinalen TN-zu erhalten, wurde  $M_0$  eines cDNA-Klons in den potentiellen Expressionsfaktor ( $= 2^{*M_0}$ ) umgeformt. Hierbei wurde der Betrag von  $M_0$  benutzt:  $*M_0 = *-M_0$ . Um die potentielle differentielle Expression der Kandidatengene zu überprüfen, wurden nicht-radioaktive in situ-Hybridisierungen durchgeführt. Hierbei diente die Sequenz des cDNA-Klons als Matrize für die Herstellung der RNA-Sonde. Von allen Kandidatengen wurden in situ-Hybridisierungen auf ganzen Präparaten von E6,5-Hühnchenretinae durchgeführt. In einzelnen Fällen wurden auch in situ-Hybridisierungen auf Gewebeschnitten von E4,5-Hühnchenretinae durchgeführt.

## 28. Bioinformatische Methoden

### 28.1 SMA- und LIMMA-Programm

Um die M-Werte der Klone aus den cDNA-Microarray-Experimenten zu normalisieren, wurden verschiedene Funktionen von „Statistics for Microarray Analysis“ (SMA) <sup>25</sup> (Yang et al., 2001; Yang et al., 2002) und „Linear Models for Microarray Data“ (LIMMA) <sup>26</sup> (Smyth und Speed, 2003) angewandt. Diese Programme sind Implementierungen des statistischen Softwarepakets<sup>27</sup> R (Ihaka and Gentleman, 2005).

### 28.2 Chromas-Programm

Um die Elektropherogramme der DNA-Sequenzierungen zu editieren, wurde Chromas<sup>28</sup> V1.45 benutzt.

### 28.3 „TIGR *Gallus gallus* Gene Index“-Datenbank

Um die Kandidatengene der cDNA-Microarray-Datenanalyse zu identifizieren, wurde mit der cDNA-Sequenz der Kandidaten eine BLASTN-Suche in der Datenbank „TIGR *Gallus gallus* Gene Index“ (GgGI) durchgeführt. Hierfür wurde WU-BLAST 2.0<sup>29</sup> benutzt.

### 28.4 „EMBL Nucleotide Sequence Database“

Die kodierende DNA-Sequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz von UCH-L1 des Hühnchens wurden in der „EMBL Nucleotide Sequence Database (NSD)“ unter der Zugangsnummer AJ621938 eingetragen<sup>30</sup>.

### 28.5 Hühnchengenom-Datenbank

Um die chromosomale Lokalisation des *UCH-L1*-Gens festzustellen, wurde mit der kodierenden DNA-Sequenz von *UCH-L1* des Hühnchens eine BLASTN-Suche im Hühnchengenom durchgeführt (Version 25.1b.1, 01. Oktober 2004). Hierfür wurde BLASTView<sup>31</sup> verwandt.

<sup>25</sup> <http://www.stat.berkeley.edu/%7Eterry/zarray/Software/smacode.html>

<sup>26</sup> <http://bioinf.wehi.edu.au/limma/>

<sup>27</sup> <http://www.r-project.org/>

<sup>28</sup> URL: <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>

<sup>29</sup> URL: <http://tigrblast.tigr.org/tgi/>

<sup>30</sup> URL: <http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-page+query+-libList+EMBL>

<sup>31</sup> URL: [http://www.ensembl.org/Gallus\\_gallus](http://www.ensembl.org/Gallus_gallus)

## 28.6 Pepstats-Programm

Pepstats<sup>32</sup> wurde benutzt, um potentielle physikochemische Daten von UCH-L1 des Hühnchens zu berechnen, wie zum Beispiel die molekulare Masse.

## 28.7 Needle-Programm

Zur Berechnung der globalen Sequenzidentität und der globalen Sequenzähnlichkeit zweier Proteine, werden die Aminosäuresequenzen beider Proteine paarweise miteinander verglichen („pairwise sequence alignment“). Um solche Vergleiche zwischen dem UCH-L1-Protein des Hühnchens und UCH-L1-Proteinen anderer Spezies durchzuführen, wurde Needle<sup>33</sup> benutzt.

## 28.8 Bioedit-Programme

Bioedit<sup>34</sup> ist eine Sammlung von Programmen zur Editierung und grafischen Aufbereitung von Nucleotid- und Aminosäuresequenzen. Um einen mehrfachen Aminosäurevergleich („multiple sequence alignment“) zwischen UCH-L1 des Hühnchens und ausgewählter Mitglieder der UCH-Familie durchzuführen, wurde das in BioEdit implementierte ClustalW verwandt. Der Schattierungsgrenzwert lag bei 95%.

## 28.9 ScanProsite-Programm und Prosite-Datenbank

Prosite archiviert biologisch bedeutende Signaturen von Proteinfamilien wie zum Beispiel Konsensumuster. Solche Konsensumuster werden durch Aminosäuresequenzvergleiche von bekannten Mitgliedern einer Proteinfamilie erzeugt. Das UCH-Konsensumuster lautet Q-x(3)-N-[SA]-C-G-x(3)-[LIVM](2)-H-[SA]-[LIVM]-[SA] und ist in Prosite unter PS00140 gespeichert. Um zu prüfen, ob die UCH-L1-Aminosäuresequenz des Hühnchens mit dem Konsensumuster der Ubiquitin Carboxy-terminalen Hydrolasen (UCH) übereinstimmt, wurde eine Suche in Prosite durchgeführt. Hierfür wurde ScanProsite<sup>35</sup> benutzt.

---

<sup>32</sup> URL: <http://www.ebi.ac.uk/emboss/pepinfo/>

<sup>33</sup> URL: <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html?>

<sup>34</sup> URL: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

<sup>35</sup> URL: <http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>

ANHANG

cDNA-Microarray-Fluoreszenzintensitäten von Visinin und den Kandidatengen

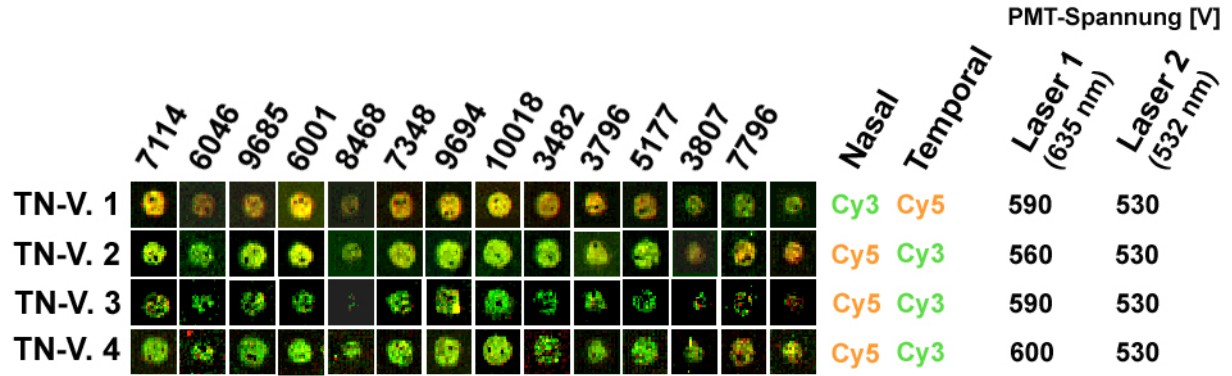


Abb. 36. Fluoreszenzintensitäten des Visinin-cDNA-Klons und der Kandidaten-cDNA-Klone aus den 4 unabhängigen TN-Vergleichen. Dargestellt sind die Überlagerungen der nicht-normalisierten Cy5/Cy3-Intensitäten in roter (nasal) und grüner (temporal) Falschfarbe. Die cDNA-Klon-Nummern korrespondieren mit Tab. 1 (Abschn. 12) und Tab. 20 (Anhang). Ebenfalls aufgelistet sind die PMT<sup>36</sup>-Spannungen des dualen konfokalen Laser-Scanners, mit denen die Hybridisierungsprodukte von Sonden- und Cy-markierten mRNA-Zielmolekülen analysiert wurden. Cy: Cyanin. nm: Laser-Wellenlänge in Nanometer. V: elektrische Spannung in Volt.

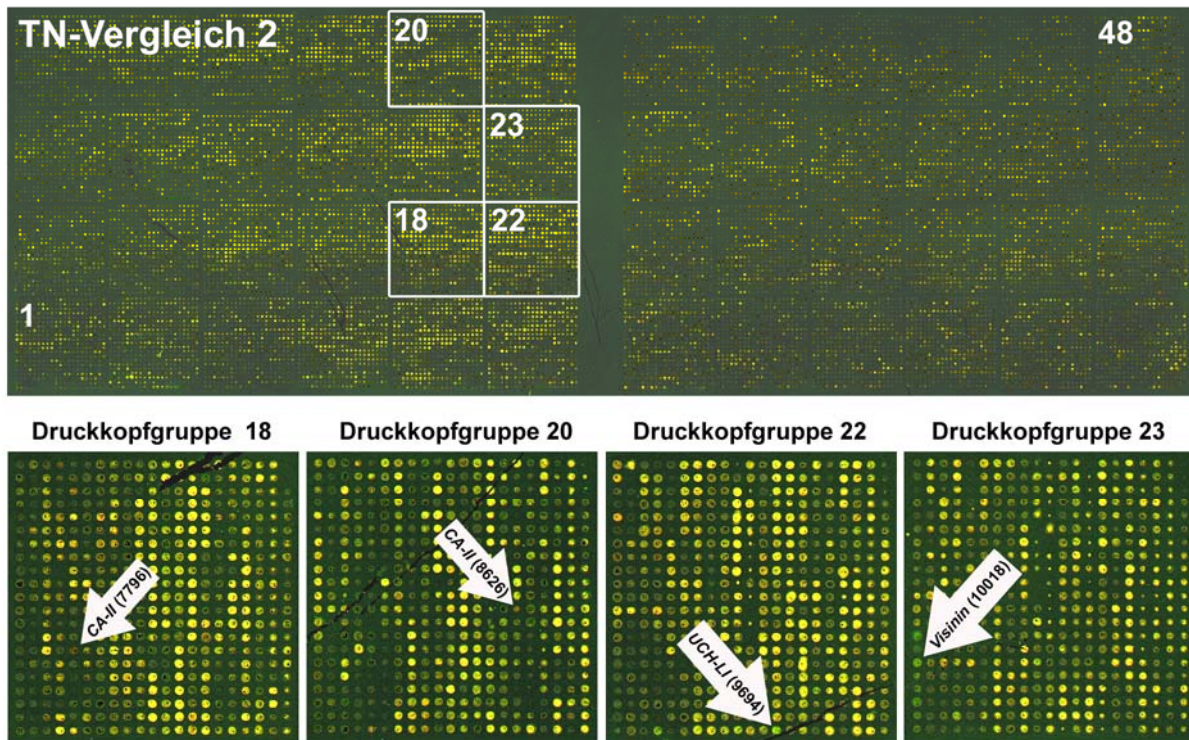


Abb. 37. (Oben) „Fußabdruck“ eines ausgewerteten Retina-cDNA-Microarrays am Beispiel des TN-Vergleichs 2. Insgesamt besteht der Retina-Array aus 48 Druckkopfgruppen, die 21 x 21 Punkte umfassen. (Unten) Einzelne Druckkopfgruppen, in denen die Punkte der Kandidaten-Klone CA-II und UCH-L1 sowie des Visinin-Klons liegen (Pfeile).

<sup>36</sup> PMT: Fotovervielfacher-Röhre („photo-multiplier tube“).

**Normalisierte M- und A-Werte (Ergänzung zu Tab. 1; Abschn. 12)**

Tab. 20. Normalisierte M- und A-Werte der ausgewählten cDNA-Klone und des Visinin-cDNA-Klons (Nr. 10018) aus 4 unabhängigen Vergleichen inklusive eines Farbstofftauschs. Die M-Werte der cDNA-Klone wurden mit der Druckkopfgruppen-Skalierungsmethode normalisiert. M<sub>0</sub>: Mittelwert des M-Werts. A<sub>0</sub>: Mittelwert des A-Werts. #zusätzliche Normalisierung mit der „multiple-slide“-Skalierungsmethode. \*Ohne Berücksichtigung des Farbstofftausch-Experiments. ID: „96 well plate identifier“.

cDNA-Klon-Nr.	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>0</sub>	ID
7114#	-0.59	-1.54	-0.77	-0.90	-0,95	7.71	7.68	6.92	7.03	7,33	Plate_0027_F12
6046#	-1.23	-1.04	-0.70	-0.60	-0,89	5.77	5.24	5.55	4.00	5,14	Plate_0014_F2
9685#	-0.90	-1.27	-0.57	-0.81	-0,89	6.26	6.72	6.69	5.68	6,33	Plate_0094_F6
6001#	-0.89	-0.99	-0.65	-0.99	-0,88	7.83	7.59	6.51	7.03	7,2	Plate_0030_D5
8468	-0.83	-0.85	-0.61	-1.19	-0,87	6.06	6.11	3.88	5.44	5,37	Plate_0085_C3
7348#	-0.64	-1.38	-0.70	-0.72	-0,86	6.96	7.07	6.78	6.31	6,78	Plate_0015_D12
9694#	-0.45	-0.67	-1.73	-0.60	-0,86	7.42	7.23	8.47	7.54	7,67	Plate_0046_H3
10018#	-0.25	-1.14	-1.68	-0.35	-0,85	7.18	6.30	6.85	7.16	6,87	Lab_Clone_0300_B24
3482	-0.40	-0.91	-0.82	-1.04	-0,79	7.83	7.20	4.83	4.20	6,02	Plate_0026_C7
3796	*	-0.67	-0.80	-0.84	-0,77	*	7.58	6.01	6.32	6,64	Plate_0031_D5
5177#	-0.72	-0.97	-0.46	-0.86	-0,75	6.5	6.49	5.53	5.07	5,89	Plate_0057_A5
3807	*	0.62	0.71	0.91	0,75	*	5.97	4.74	6.84	5,85	Plate_0083_F2
7796	*	0.87	0.76	0.61	0,75	*	6.26	4.47	5.64	5,64	Plate_0085_H9
8626#	0.51	0.93	1.21	0.48	0,78	5.53	6.39	6.30	6.50	6,18	Plate_0029_C3

**Effekte der Normalisierungsmethoden auf die Verteilung der M-Werte**

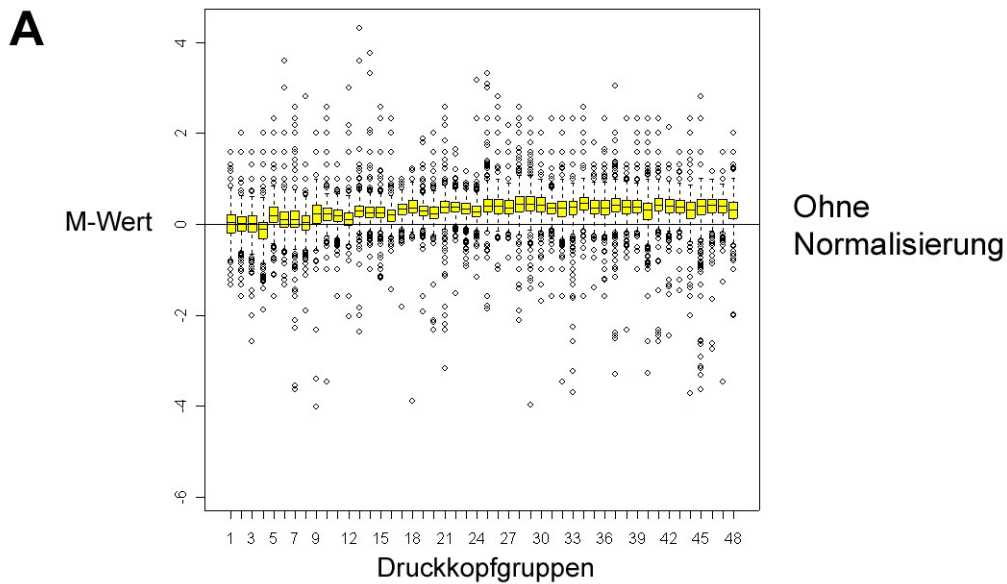


Abb. 38. Beschreibung auf der nächsten Seite.

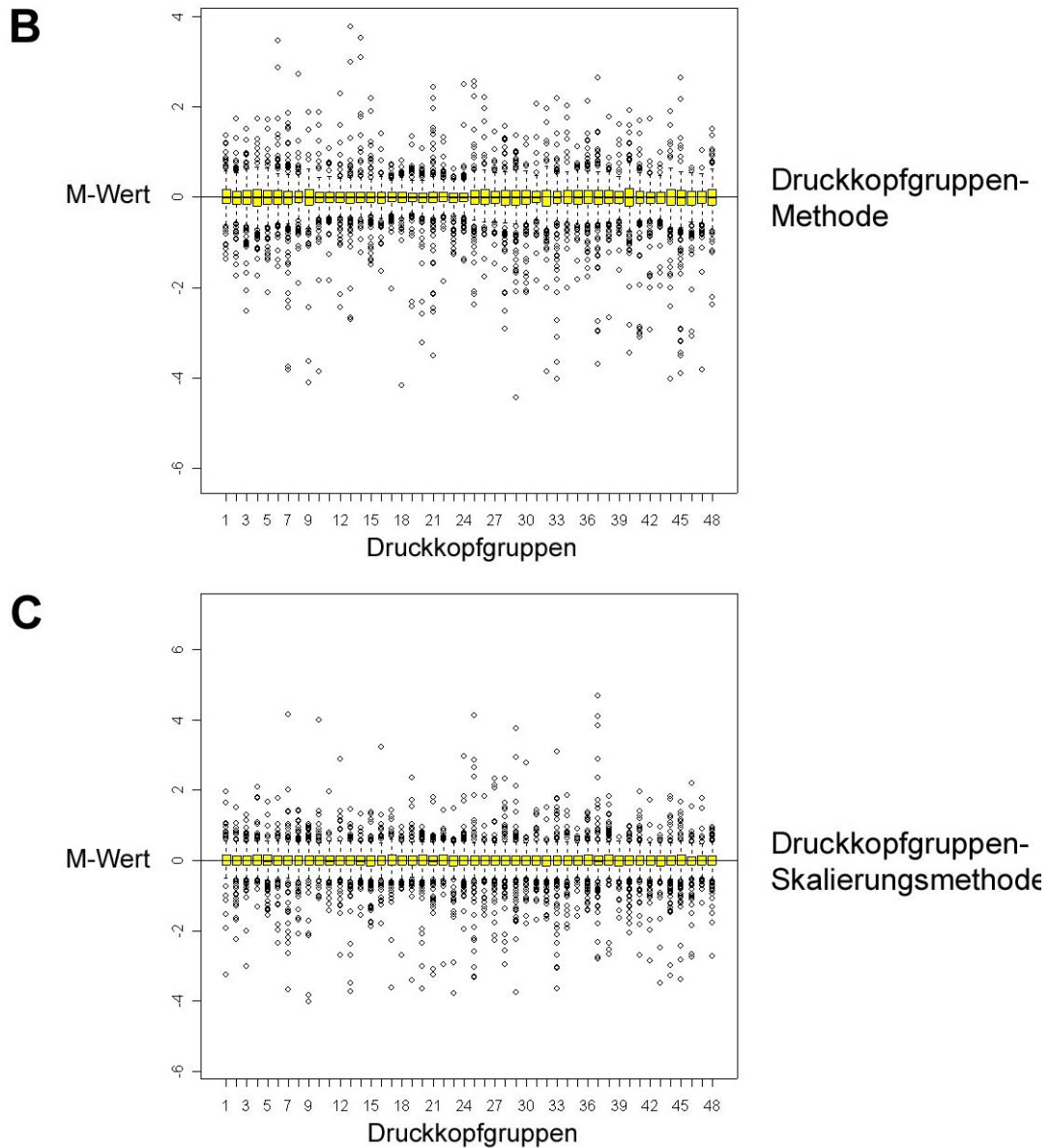


Abb. 38. Normalisierung innerhalb eines Retina-cDNA-Microarrays am Beispiel des TN-Vergleichs 1. Die Kasten-und-Schnurrhaar-Diagramme („box-and-whisker plots“) stellen die Verteilung der M-Werte für jede der 48 Druckkopfgruppen des cDNA-Microarrays dar. Die Druckkopfgruppen sind von links nach rechts (erste von zwölf Druckkopfgruppen-Zeilen) und dann von oben nach unten (erste von vier Druckkopfgruppen-Spalten) durchnummeriert. (A) Ohne Normalisierung. (B) Nach der Druckkopfgruppen-Methode, jedoch ohne Skalierungsanpassung. (C) Nach der Druckkopfgruppen-Skalierungsmethode.

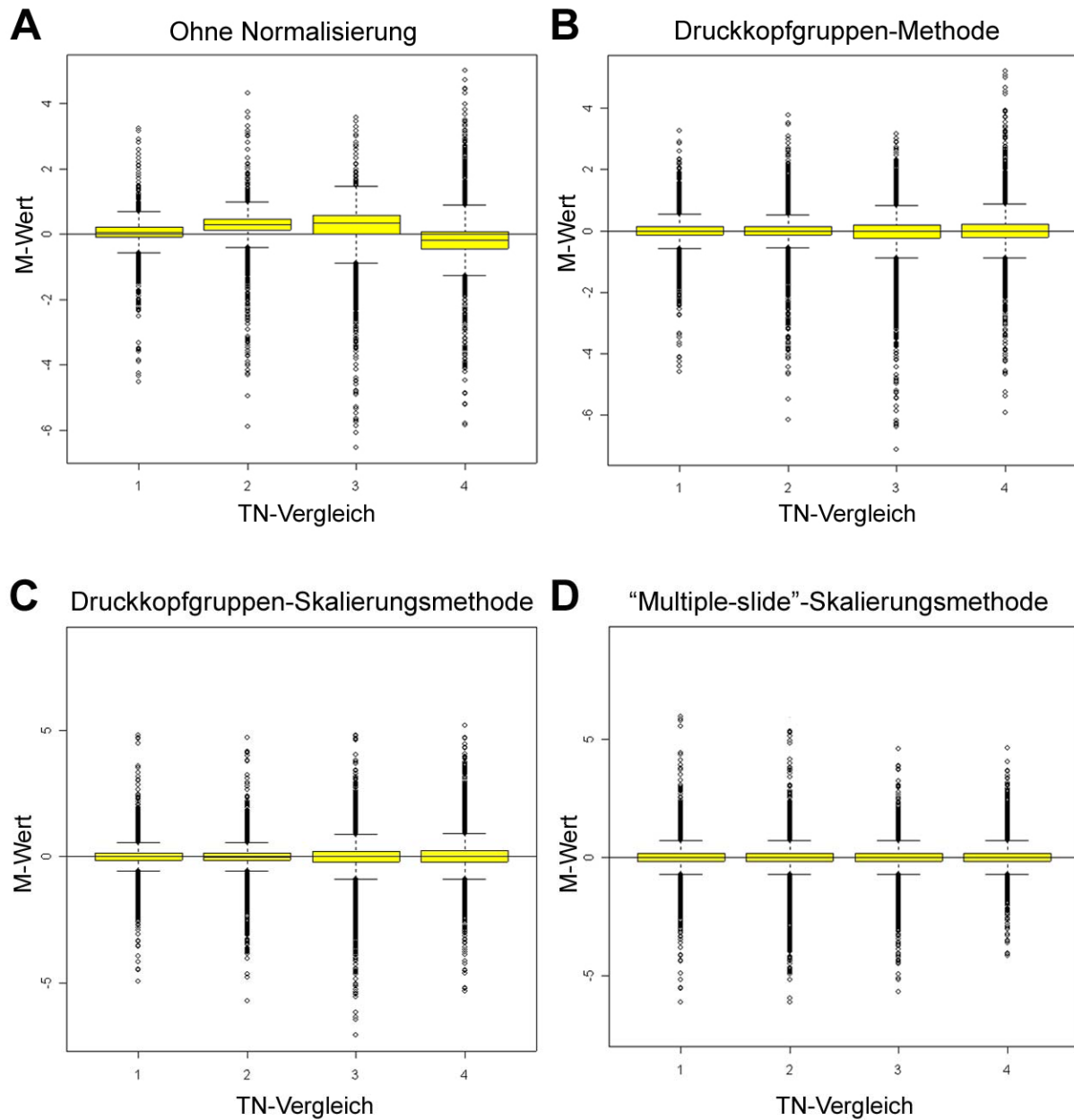


Abb. 39. Normalisierung zwischen mehreren cDNA-Microarrays am Beispiel der TN-Vergleiche 1 bis 4. Die Kasten-und-Schnurrhaar-Diagramme („box-and-whisker plots“) stellen die M-Wert-Verteilung der 4 Retina-cDNA-Microarrays dar. (A) Ohne Normalisierung. (B) Nach der Druckkopfgruppen-Methode, jedoch ohne Skalierungsanpassung. (C) Nach der Druckkopfgruppen-Skalierungsmethode. (D) Nach der „multiple-slide“-Skalierungsmethode.

## Überprüfung von Kandidatengen (Abschn. 12)

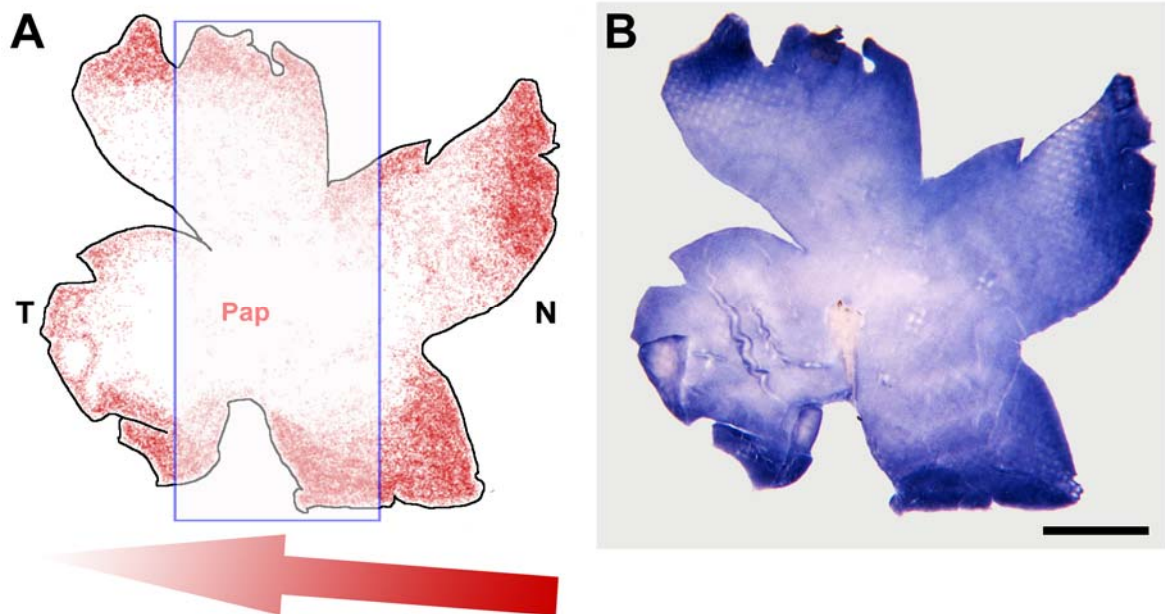


Abb. 40. Überprüfung des Microarray-Kandidatengens *CA-II*, das in der E6,5-Hühnchenretina potentiell nasal exprimiert wird. (A) Schematische Darstellung des mRNA-Expressionsmusters von *CA-II* (rote Punkte) am embryonalen Tag 6,5. Für die direkten TN-Vergleiche wurden ausschließlich temporale und nasale Gewebeteile verwandt (außerhalb des blauen Rahmens). (B) In situ-Hybridisierung mit nicht-radioaktiven *UCH-L1*-Sonden, die zur Darstellung in A korrespondiert. Die horizontalen und vertikalen Streifen stammen von den Maschen des Nylonnetzes, in das die Retina während der in situ-Hybridisierung eingeschweißt wurde. Pap: Papille. Maßstab, 1 mm.

## Effekt der retroviralen Fehlexpression von Ephrin-B2 auf die intraretinale Axonwegfindung (Ergänzung zu Abb. 26, Abschn. 11)

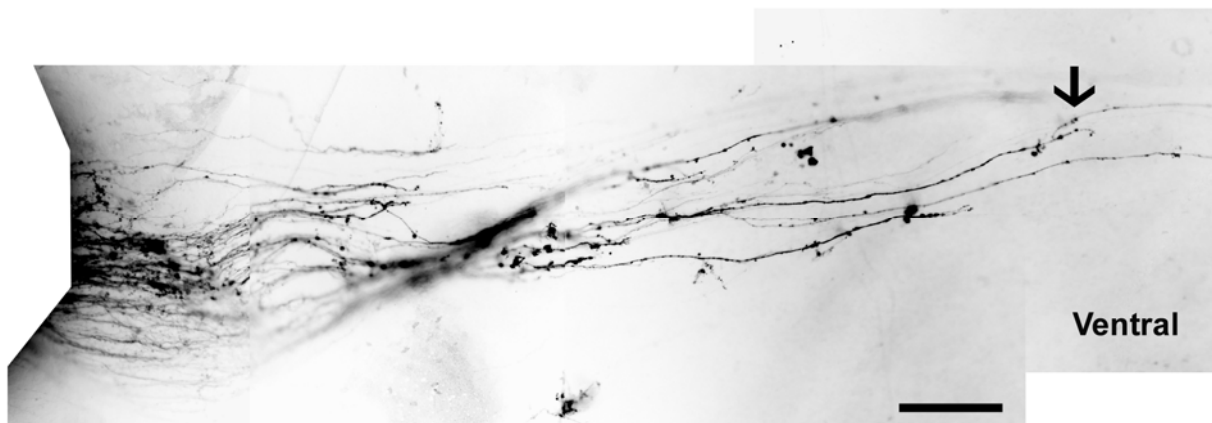


Abb. 41. In Explantaten RCASBP(B)-*Ephrin-B2*-infizierter E6,5-Hühnchenretinae wurden kleinere Gruppen von RGC-Axonem unter fixierenden Bedingungen mit Dil markiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Störung der intraretinalen Wegfindung (Pfeil): Diese defaszikulierte Axone wachsen in einer Schleife, bevor sie weiter in Richtung optische Fissur/Papille wachsen. Maßstab, 50  $\mu\text{m}$ .

## ABKÜRZUNGEN

Tab. 21. Abkürzungsverzeichnis.

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
A	Adenosin	CFU	koloniebildende Einheit („colony forming unit“)
A	A-Wert eines cDNA-Microarray-Klons	pH	„potentium hydrogenii“ (lat., Kraft des Wasserstoffs)
A <sub>0</sub>	(arithmetischer) Mittelwert von A	RCAS	replikationskompetentes Geflügel-Retrovirus mit Spleissakzeptor („replication-competent, avian leukemia virus [ALV] long terminal repeat [LTR], splice acceptor retrovirus vector“)
Abschn.	Abschnitt	RGC	retinale Ganglienzelle („retinal ganglion cell“)
Abb.	Abbildung	RNA	Ribonucleinsäure („ribonucleid acid“)
AmpR	Ampicillin-Resistenz	RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
AP	alkalische Phosphatase	s	Sekunde
AP	anterior-posterior	T	Thymidin
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat	TN	temporal-nasal
C	Cytidin	U	Uridin
cDNA	„copy DNA“	U/min	Umdrehung pro Minute
d	desoxy	U/ml	Einheit pro Milliliter
Da	Dalton	VK'0	Prozentualer Fehler von M0
DEPC	Diethyl-pyrocyanat	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
Dig	Digoxigenin	ZT	Zimmertemperatur
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanin-perchlorat	3' UTR	3'-nicht-translatierte Region („3' untranslated region“)
DNA	Desoxyribonucleinsäure („desoxyribonucleid acid“)	°C	Grad Celsius
DV	dorsal-ventral		
E	embryonaler Tag		
eGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein („enhanced GFP“)		
Eph	„erythropoietin producing human hepatocellular carcinoma cell line“		
Ephrin	„Eph receptor interactin protein“		
G	Guanosin		
GCL	Ganglienzellschicht („ganglion cell layer“)		
h	Stunde		
HH	Entwicklungsstadium nach Hamburger und Hamilton		
kbp	Kilobasenpaar		
l	Liter		
LM	lateral-medial		
m	milli		
M	molar		
M	M-Wert eines cDNA-Microarray-Klons		
M <sub>0</sub>	(arithmetischer) Mittelwert von M		
μ	mikro		
mWs	Meter Wassersäule		
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)		
NBT	Nitro-tetrazoliumblau-chlorid		
NFL	Nervenfaserschicht („nerve fiber layer“)		
P	postnataler Tag		
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		
PFA	Paraformaldehyd		

---

## LITERATUR

1. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. The *C. elegans* Sequencing Consortium. *Science* 282, 2012-2018.
2. Barbieri, A.M., Broccoli, V., Bovolenta, P., Alfano, G., Marchitello, A., Mocchetti, C., Crippa, L., Bulfone, A., Marigo, V., Ballabio, A., and Banfi, S. (2002). *Vax2* inactivation in mouse determines alteration of the eye dorsal-ventral axis, misrouting of the optic fibres and eye coloboma. *Development* 129, 805-813.
3. Barbieri, A.M., Lupo, G., Bulfone, A., Andreazzoli, M., Mariani, M., Fougerousse, F., Consalez, G. G., Borsani, G., Beckmann, J. S., Barsacchi, G., Ballabio, A., and Banfi, S. (1999). A homeobox gene, *vax2*, controls the patterning of the eye dorsoventral axis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10729-10734.
4. Barlow, C. and Lockhart, D. J. (2002). DNA arrays and neurobiology--what's new and what's next? *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 554-561.
5. Bassett, D.E., Jr., Eisen, M.B., and Boguski, M.S. (1999). Gene expression informatics-it's all in your mine. *Nat. Genet.* 21, 51-55.
6. Bastiani, M.J., Raper, J.A., and Goodman, C.S. (1984). Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. III. Selective affinity of the G growth cone for the P cells within the A/P fascicle. *J. Neurosci.* 4, 2311-2328.
7. Bellairs, R. and Osmond, M. (1998). The atlas of chick development. Academic Press. (San Diego: Academic Press).
8. Bergemann, A.D., Zhang, L., Chiang, M.K., Brambilla, R., Klein, R., and Flanagan, J.G. (1998). Ephrin-B3, a ligand for the receptor EphB3, expressed at the midline of the developing neural tube. *Oncogene* 16, 471-480.
9. Birgbauer, E., Cowan, C.A., Sretavan, D.W., and Henkemeyer, M. (2000). Kinase independent function of EphB receptors in retinal axon pathfinding to the optic disc from dorsal but not ventral retina. *Development* 127, 1231-1241.
10. Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
11. Blackshaw, S. and Livesey, R. (2002). Applying genomics technologies to neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 110-114.
12. Bonfanti, L., Candeo, P., Piccinini, M., Carmignoto, G., Comelli, M.C., Ghidella, S., Bruno, R., Gobetto, A., and Merighi, A. (1992). Distribution of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) in the vertebrate retina: evidence that immunoreactivity is restricted to mammalian horizontal and ganglion cells. *J.Comp. Neurol.* 322, 35-44.
13. Boycott, B.B. and Wässle, H. (1974). The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J. Physiol.* 240, 397-419.
14. Braisted, J.E., McLaughlin, T., Wang, H.U., Friedman, G.C., Anderson, D.J., and O'Leary, D.D. (1997). Graded and lamina-specific distributions of ligands of EphB receptor tyrosine kinases in the developing retinotectal system. *Dev. Biol.* 191, 14-28.

15. Brambilla, R., Bruckner, K., Orioli, D., Bergemann, A.D., Flanagan, J.G., and Klein, R. (1996). Similarities and differences in the way transmembrane-type ligands interact with the Elk subclass of Eph receptors. *Mol. Cell Neurosci.* 8, 199-209.
16. Brambilla, R., Schnapp, A., Casagrande, F., Labrador, J.P., Bergemann, A.D., Flanagan, J.G., Pasquale, E.B., and Klein, R. (1995). Membrane-bound LERK2 ligand can signal through three different Eph-related receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 14, 3116-3126.
17. Brennan, C., Monschau, B., Lindberg, R., Guthrie, B., Drescher, U., Bonhoeffer, F., and Holder, N. (1997). 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, 655-664.
18. Brittis, P.A. and Silver, J. (1995). Multiple factors govern intraretinal axon guidance: a time-lapse study. *Mol. Cell Neurosci.* 6, 413-432.
19. Brown, A., Yates, P.A., Burrola, P., Ortuno, D., Vaidya, A., Jessell, T.M., Pfaff, S.L., O'Leary, D.D., and Lemke, G. (2000). Topographic mapping from the retina to the midbrain is controlled by relative but not absolute levels of EphA receptor signaling. *Cell* 102, 77-88.
20. Brown, P.O. and Botstein, D. (1999). Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet.* 21, 33-37.
21. Bruckner, K., Pasquale, E.B., and Klein, R. (1997). Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* 275, 1640-1643.
22. Bruhn, S.L. and Cepko, C.L. (1996). Development of the pattern of photoreceptors in the chick retina. *J. Neurosci.* 16, 1430-1439.
23. Campbell, D.S. and Holt, C.E. (2001). Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* 32, 1013-1026.
24. Carlock, L., Vo, T., Lorincz, M., Walker, P.D., Bessert, D., Wisniewski, D., and Dunbar, J.C. (1996). Variable subcellular localization of a neuron-specific protein during NTera 2 differentiation into post-mitotic human neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 42, 202-212.
25. Chen, Y. and Naito, J. (1999). A quantitative analysis of cells in the ganglion cell layer of the chick retina. *Brain Behav. Evol.* 53, 75-86.
26. Chen, C.M., Smith, D.M., Peters, M.A., Samson, M.E., Zitz, J., Tabin, C.J., and Cepko, C.L. (1999). Production and design of more effective avian replication-incompetent retroviral vectors. *Dev. Biol.* 214, 370-384.
27. Cheng, H.J., Nakamoto, M., Bergemann, A.D., and Flanagan, J.G. (1995). Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* 82, 371-381.
28. Chow, R.L. and Lang, R.A. (2001). Early eye development in vertebrates. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 255-296.
29. Christiansen, J.H., Dennis, C.L., Wicking, C.A., Monkley, S.J., Wilkinson, D.G., and Wainwright, B.J. (1995). Murine Wnt-11 and Wnt-12 have temporally and spatially restricted expression patterns during embryonic development. *Mech. Dev.* 51, 341-350.
30. Churchill, G.A. (2002). Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat. Genet.* 32 *Suppl.*, 490-495.

31. Cohen, S.N., Chang, A.C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *69*, 2110-2114.
32. Connor, R.J., Menzel, P., and Pasquale, E.B. (1998). Expression and tyrosine phosphorylation of Eph receptors suggest multiple mechanisms in patterning of the visual system. *Dev. Biol.* *193*, 21-35.
33. Cowan, C.A., Yokoyama, N., Saxena, A., Chumley, M.J., Silvany, R.E., Baker, L.A., Srivastava, D., and Henkemeyer, M. (2004). Ephrin-B2 reverse signaling is required for axon pathfinding and cardiac valve formation but not early vascular development. *Dev. Biol.* *271*, 263-271.
34. Cunningham, B.A., Hemperly, J.J., Murray, B.A., Prediger, E.A., Brackenbury, R., and Edelman, G.M. (1987). Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* *236*, 799-806.
35. Davis, S., Gale, N.W., Aldrich, T.H., Maisonpierre, P.C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M., and Yancopoulos, G.D. (1994). Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* *266*, 816-819.
36. Davy, A., Gale, N.W., Murray, E.W., Klinghoffer, R.A., Soriano, P., Feuerstein, C., and Robbins, S.M. (1999). Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev.* *13*, 3125-3135.
37. Day, I.N. and Thompson, R.J. (1987). Molecular cloning of cDNA coding for human PGP 9.5 protein. A novel cytoplasmic marker for neurones and neuroendocrine cells. *FEBS Lett.* *210*, 157-160.
38. Deiner, M.S., Kennedy, T.E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M., and Sretavan, D.W. (1997). Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron* *19*, 575-589.
39. Deitcher, D.L., Fekete, D.M., and Cepko, C.L. (1994). Asymmetric expression of a novel homeobox gene in vertebrate sensory organs. *J. Neurosci.* *14*, 486-498.
40. DeRisi, J.L., Iyer, V.R., and Brown, P.O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* *278*, 680-686.
41. Diaz, E., Yang, Y.H., Ferreira, T., Loh, K.C., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y., Tessier-Lavigne, M., Speed, T.P., and Ngai, J. (2003). Analysis of gene expression in the developing mouse retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 5491-5496.
42. Dravis, C., Yokoyama, N., Chumley, M.J., Cowan, C.A., Silvany, R.E., Shay, J., Baker, L.A., and Henkemeyer, M. (2004). Bidirectional signaling mediated by ephrin-B2 and EphB2 controls urorectal development. *Dev. Biol.* *271*, 272-290.
43. Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Loschinger, J., Noda, M., and Bonhoeffer, F. (1995). In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* *82*, 359-370.
44. Dressler, G.R., Deutsch, U., Chowdhury, K., Nornes, H.O., and Gruss, P. (1990). Pax2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development* *109*, 787-795.
45. Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P., and Trent, J.M. (1999). Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat.Genet.* *21*, 10-14.

46. Feldheim, D.A., Kim, Y.I., Bergemann, A.D., Frisen, J., Barbacid, M., and Flanagan, J.G. (2000). Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron* 25, 563-574.
47. Feldheim, D.A., Vanderhaeghen, P., Hansen, M.J., Frisen, J., Lu, Q., Barbacid, M., and Flanagan, J.G. (1998). Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain. *Neuron* 21, 1303-1313.
48. Friedlander, D.R., Milev, P., Karthikeyan, L., Margolis, R.K., Margolis, R.U., and Grumet, M. (1994). The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 125, 669-680.
49. Frisen, J., Yates, P.A., McLaughlin, T., Friedman, G.C., O'Leary, D.D., and Barbacid, M. (1998). Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* 20, 235-243.
50. Frost, D.O., Ma, Y.T., Hsieh, T., Forbes, M.E., and Johnson, J.E. (2001). Developmental changes in BDNF protein levels in the hamster retina and superior colliculus. *J. Neurobiol.* 49, 173-187.
51. Gale, N.W., Flenniken, A., Compton, D.C., Jenkins, N., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Davis, S., Wilkinson, D.G., and Yancopoulos, G.D. (1996a). Elk-L3, a novel transmembrane ligand for the Eph family of receptor tyrosine kinases, expressed in embryonic floor plate, roof plate and hindbrain segments. *Oncogene* 13, 1343-1352.
52. 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., and Yancopoulos, G.D. (1996b). Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* 17, 9-19.
53. Gibson-Brown, J.J., Agulnik, I., Silver, L.M., and Papaioannou, V.E. (1998). Expression of T-box genes Tbx2-Tbx5 during chick organogenesis. *Mech. Dev.* 74, 165-169.
54. Grenningloh, G., Rehm, E.J., and Goodman, C.S. (1991). Genetic analysis of growth cone guidance in *Drosophila*: fasciclin II functions as a neuronal recognition molecule. *Cell* 67, 45-57.
55. Griffin, R.S., Mills, C.D., Costigan, M., and Woolf, C.J. (2003). Exploiting microarrays to reveal differential gene expression in the nervous system. *Genome Biol.* 4, 105.
56. Gurniak, C.B. and Berg, L.J. (1996). A new member of the Eph family of receptors that lacks protein tyrosine kinase activity. *Oncogene* 13, 777-786.
57. Halfter, W. (1996). Intraretinal grafting reveals growth requirements and guidance cues for optic axons in the developing avian retina. *Dev. Biol.* 177, 160-177.
58. Hallbook, F., Backstrom, A., Kullander, K., Ebendal, T., and Carri, N.G. (1996). Expression of neurotrophins and trk receptors in the avian retina. *J. Comp Neurol.* 364, 664-676.
59. Hamburger, V. and Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49-92.
60. Hamilton, W.J., Boyd, J.D., and Mossman, H.W. (1972). *Human Embryology. Prenatal development of form and function.* (Cambridge: W. Heffer & Sons).

61. Hankin, M.H. and Lagenaur, C.F. (1994). Cell adhesion molecules in the early developing mouse retina: retinal neurons show preferential outgrowth in vitro on L1 but not N-CAM. *J. Neurobiol.* 25, 472-487.
62. Harada, T., Harada, C., Wang, Y.L., Osaka, H., Amanai, K., Tanaka, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Sakurai, M., Sato, Y., Noda, M., and Wada, K. (2004). Role of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 in neural cell apoptosis induced by ischemic retinal injury in vivo. *Am. J. Pathol.* 164, 59-64.
63. Hatini, V., Tao, W., and Lai, E. (1994). Expression of winged helix genes, BF-1 and BF-2, define adjacent domains within the developing forebrain and retina. *J. Neurobiol.* 25, 1293-1309.
64. Hattori, M., Osterfield, M., and Flanagan, J.G. (2000). Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 289, 1360-1365.
65. Henkemeyer, M., Marengere, L.E., McGlade, J., Olivier, J.P., Conlon, R.A., Holmyard, D.P., Letwin, K., and Pawson, T. (1994). Immunolocalization of the Nuk receptor tyrosine kinase suggests roles in segmental patterning of the brain and axonogenesis. *Oncogene* 9, 1001-1014.
66. Henkemeyer, M., Orioli, D., Henderson, J.T., Saxton, T.M., Roder, J., Pawson, T., and Klein, R. (1996). Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell* 86, 35-46.
67. Higuchi, R., Krummel, B., and Saiki, R.K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 16, 7351-7367.
68. Hilfer, S.R. and Yang, J.J.W. (1980). Accumulation of CPC-precipitable material at apical cell surfaces during formation of the optic cup. *Anat. Rec.* 197, 423-433.
69. Himanen, J.P., Chumley, M.J., Lackmann, M., Li, C., Barton, W.A., Jeffrey, P.D., Vearing, C., Geleick, D., Feldheim, D.A., Boyd, A.W., Henkemeyer, M., and Nikolov, D.B. (2004). Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat. Neurosci.* 7, 501-509.
70. Himanen, J.P. and Nikolov, D.B. (2003). Eph receptors and ephrins. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 35, 130-134.
71. Hindges, R., McLaughlin, T., Genoud, N., Henkemeyer, M., and O'Leary, D.D. (2002). EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron* 35, 475-487.
72. Hoffmann, K.P. and Wehrhahn, C. (2001). Zentrale Sehsysteme. In *Neurowissenschaft: vom Molekül zur Kognition*, J. Dudel, R. Menzel, and R. F. Schmidt, Hrsg. (Berlin: Springer), 407-428.
73. Holash, J.A. and Pasquale, E.B. (1995). Polarized expression of the receptor protein tyrosine kinase Cck5 in the developing avian visual system. *Dev. Biol.* 172, 683-693.
74. Holland, S.J., Gale, N.W., Mbamalu, G., Yancopoulos, G.D., Henkemeyer, M., and Pawson, T. (1996). Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* 383, 722-725.
75. Höller, D. and Dikic, I. (2004). Receptor endocytosis via ubiquitin-dependent and -independent pathways. *Biochem. Pharmacol.* 67, 1013-1017.

76. Holmberg, J., Armulik, A., Senti, K.A., Edoff, K., Spalding, K., Momma, S., Cassidy, R., Flanagan, J.G., and Frisen, J. (2005). Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes Dev.* *19*, 462-471.
77. Holt, C.E., Bertsch, T.W., Ellis, H.M., and Harris, W.A. (1988). Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron* *1*, 15-26.
78. Höpker, V.H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., and Holt, C. (1999). Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* *401*, 69-73.
79. Hughes, J.T., Jerrome, D., and Krebs, H.A. (1972). Ultrastructure of the avian retina. An anatomical study of the retina of the domestic pigeon (*Columba livia*) with particular reference to the distribution of mitochondria. *Exp. Eye Res.* *14*, 189-195.
80. Hughes, S.H., Greenhouse, J.J., Petropoulos, C.J., and Suttrave, P. (1987). Adaptor plasmids simplify the insertion of foreign DNA into helper-independent retroviral vectors. *J. Virol.* *61*, 3004-3012.
81. Huh, S., Hatini, V., Marcus, R.C., Li, S.C., and Lai, E. (1999). Dorsal-ventral patterning defects in the eye of BF-1-deficient mice associated with a restricted loss of *shh* expression. *Dev. Biol.* *211*, 53-63.
82. Ihaka, R. and Gentleman, R. (2005). R: A language for data analysis and graphics. *J. Comput. Graph. Statist.* *5*, 299-314.
83. Imagawa, T., Fujita, Y., Kitagawa, H., and Uehara, M. (1999). Quantitative studies of the optic nerve fiber layer in the chicken retina. *J. Vet. Med. Sci.* *61*, 883-889.
84. Jimenez, G., Paroush, Z., and Ish-Horowicz, D. (1997). Groucho acts as a corepressor for a subset of negative regulators, including Hairy and Engrailed. *Genes Dev.* *11*, 3072-3082.
85. Kardon, G. (1998). Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development* *125*, 4019-4032.
86. Kerr, M.K. and Churchill, G.A. (2001a). Experimental Design for Gene Expression Microarrays. *Biostatistics* *2*, 183-201.
87. Kerr, M.K. and Churchill, G.A. (2001b). Statistical design and the analysis of gene expression microarray data. *Genet.Res.* *77*, 123-128.
88. Koshiba-Takeuchi, K., Takeuchi, J.K., Matsumoto, K., Momose, T., Uno, K., Hoepker, V., Ogura, K., Takahashi, N., Nakamura, H., Yasuda, K., and Ogura, T. (2000). *Tbx5* and the retinotectum projection. *Science* *287*, 134-137.
89. Kullander, K., Butt, S.J., Lebret, J.M., Lundfald, L., Restrepo, C.E., Rydstrom, A., Klein, R., and Kiehn, O. (2003). Role of EphA4 and EphrinB3 in local neuronal circuits that control walking. *Science* *299*, 1889-1892.
90. Larsen, C.N., Krantz, B.A., and Wilkinson, K.D. (1998). Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry* *37*, 3358-3368.
91. Larsen, C.N., Price, J.S., and Wilkinson, K.D. (1996). Substrate binding and catalysis by ubiquitin C-terminal hydrolases: identification of two active site residues. *Biochemistry* *35*, 6735-6744.

92. Laufer, E., Dahn, R., Orozco, O.E., Yeo, C.Y., Pisenti, J., Henrique, D., Abbott, U.K., Fallon, J.F., and Tabin, C. (1997). Expression of Radical fringe in limb-bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation. *Nature* 386, 366-373.
93. LaVail, M.M., Faktorovich, E.G., Hepler, J.M., Pearson, K.L., Yasumura, D., Matthes, M.T., and Steinberg, R.H. (1991). Basic fibroblast growth factor protects photoreceptors from light-induced degeneration in albino rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 638, 341-347.
94. Layer, P.G. and Sporns, O. (1987). Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 284-288.
95. Lin, D.M., Fetter, R.D., Kopczynski, C., Grenningloh, G., and Goodman, C.S. (1994). Genetic analysis of Fasciclin II in *Drosophila*: defasciculation, refasciculation, and altered fasciculation. *Neuron* 13, 1055-1069.
96. Linser, P. und Moscona, A. A. (1981). Carbonic anhydrase C in the neural retina: Transition from generalized to glia-specific cell localization during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7190-7194.
97. Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H.A., Liu, Z., and Lansbury, P.T., Jr. (2002). The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 111, 209-218.
98. Livesey, F.J., Furukawa, T., Steffen, M.A., Church, G.M., and Cepko, C.L. (2000). Microarray analysis of the transcriptional network controlled by the photoreceptor homeobox gene Crx. *Curr. Biol.* 10, 301-310.
99. Lockhart, D.J. and Winzler, E.A. (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405, 827-836.
100. Lorenz, R.J. (1996). *Grundbegriffe der Biometrie.* (Stuttgart, Jena, Lübeck, Lübeck, Ulm: G. Fischer).
101. Lowe, J., McDermott, H., Landon, M., Mayer, R.J., and Wilkinson, K.D. (1990). Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases. *J. Pathol.* 161, 153-160.
102. McCabe, K.L., Gunther, E.C., and Reh, T.A. (1999). The development of the pattern of retinal ganglion cells in the chick retina: mechanisms that control differentiation. *Development* 126, 5713-5724.
103. McLaughlin, T., Hindges, R., and O'Leary, D.D. (2003). Regulation of axial patterning of the retina and its topographic mapping in the brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 57-69.
104. Mey, J. and Thanos, S. (2000). Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 32, 343-379.
105. Miki, R., Kadota, K., Bono, H., Mizuno, Y., Tomaru, Y., Carninci, P., Itoh, M., Shibata, K., Kawai, J., Konno, H., Watanabe, S., Sato, K., Tokusumi, Y., Kikuchi, N., Ishii, Y., Hamaguchi, Y., Nishizuka, I., Goto, H., Nitanda, H., Satomi, S., Yoshiki, A., Kusakabe, M., DeRisi, J.L., Eisen, M.B., Iyer, V.R., Brown, P.O., Muramatsu, M., Shimada, H., Okazaki, Y., and Hayashizaki, Y. (2001). Delineating developmental and metabolic pathways in vivo by expression profiling using the RIKEN set of 18,816 full-length enriched mouse cDNA arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2199-2204.

106. Miller, H.I., Henzel, W.J., Ridgway, J.B., Kuang, W.J., Chisholm, V., and Liu, C.C. (1989). Cloning and expression of a yeast ubiquitin-protein cleaving activity in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N.Y.)* 7, 698-704.
107. Miller, J.H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).
108. Mirnics, K. (2001). Microarrays in brain research: the good, the bad and the ugly. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 444-447.
109. Mirnics, K., Middleton, F.A., Marquez, A., Lewis, D.A., and Levitt, P. (2000). Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron* 28, 53-67.
110. Monschau, B., Kremoser, C., Ohta, K., Tanaka, H., Kaneko, T., Yamada, T., Handwerker, C., Hornberger, M.R., Loschinger, J., Pasquale, E.B., Siever, D.A., Verderame, M.F., Müller, B.K., Bonhoeffer, F., and Drescher, U. (1997). Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *EMBO J.* 16, 1258-1267.
111. Morgan, B.A. and Fekete, D.M. (1996). Manipulating gene expression with replication-competent retroviruses. *Methods Cell Biol.* 51, 185-218.
112. Mui, S.H., Hindges, R., O'Leary, D.D., Lemke, G., and Bertuzzi, S. (2002). The homeodomain protein Vax2 patterns the dorsoventral and nasotemporal axes of the eye. *Development* 129, 797-804.
113. Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
114. Nakamoto, M., Cheng, H.J., Friedman, G.C., McLaughlin, T., Hansen, M.J., Yoon, C.H., O'Leary, D.D., and Flanagan, J.G. (1996). Topographically specific effects of ELF-1 on retinal axon guidance in vitro and retinal axon mapping in vivo. *Cell* 86, 755-766.
115. Nakamura, H. and O'Leary, D.D. (1989). Inaccuracies in initial growth and arborization of chick retinotectal axons followed by course corrections and axon remodeling to develop topographic order. *J. Neurosci.* 9, 3776-3795.
116. Nakazawa, T., Tachi, S., Aikawa, E., and Ihnuma, M. (1993). Formation of the myelinated nerve fiber layer in the chicken retina. *Glia* 8, 114-121.
117. Nornes, H.O., Dressler, G.R., Knapik, E.W., Deutsch, U., and Gruss, P. (1990). Spatially and temporally restricted expression of Pax2 during murine neurogenesis. *Development* 109, 797-809.
118. Ohsaki, K., Morimitsu, T., Ishida, Y., Kominami, R., and Takahashi, N. (1999). Expression of the Vax family homeobox genes suggests multiple roles in eye development. *Genes Cells* 4, 267-276.
119. Ono, K., Tsumori, T., Kishi, T., Yokota, S., and Yasui, Y. (1998). Developmental appearance of oligodendrocytes in the embryonic chick retina. *J. Comp Neurol.* 398, 309-322.
120. Osaka, H., Wang, Y.L., Takada, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Li, H., Sato, Y., Nishikawa, K., Sun, Y.J., Sakurai, M., Harada, T., Hara, Y., Kimura, I., Chiba, S., Namikawa, K., Kiyama, H., Noda, M., Aoki, S., and Wada, K. (2003). Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1945-1958.

121. Oster, S.F., Deiner, M., Birgbauer, E., and Sretavan, D.W. (2004). Ganglion cell axon pathfinding in the retina and optic nerve. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 125-136.
122. Ott, H., Bastmeyer, M., and Stuermer, C.A. (1998). Neurolin, the goldfish homolog of DM-GRASP, is involved in retinal axon pathfinding to the optic disk. *J. Neurosci.* 18, 3363-3372.
123. Pasquale, E.B. (2004). Eph-ephrin promiscuity is now crystal clear. *Nat. Neurosci.* 7, 417-418.
124. Peters, M.A. and Cepko, C.L. (2002). The dorsal-ventral axis of the neural retina is divided into multiple domains of restricted gene expression which exhibit features of lineage compartments. *Dev. Biol.* 251, 59-73.
125. Petropoulos, C.J. and Hughes, S.H. (1991). Replication-competent retrovirus vectors for the transfer and expression of gene cassettes in avian cells. *J. Virol.* 65, 3728-3737.
126. Pollock, G.S., Robichon, R., Boyd, K.A., Kerkel, K.A., Kramer, M., Lyles, J., Ambalavanar, R., Khan, A., Kaplan, D.R., Williams, R.W., and Frost, D.O. (2003). TrkB receptor signaling regulates developmental death dynamics, but not final number, of retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 23, 10137-10145.
127. Potts, W.M., Olsen, M., Boettiger, D., and Vogt, V.M. (1987). Epitope mapping of monoclonal antibodies to gag protein p19 of avian sarcoma and leukaemia viruses. *J. Gen. Virol.* 68, 3177-3182.
128. Prada, C., Puga, J., Perez-Mendez, L., Lopez, R., and Ramirez, G. (1991). Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur. J. Neurosci.* 3, 559-569.
129. Quackenbush, J. (2001). Computational analysis of microarray data. *Nat. Rev. Genet.* 2, 418-427.
130. Rager, G. (1976). Morphogenesis and physiogenesis of the retino-tectal connection in the chicken I. The retinal ganglion cells and their axons. *Proc. R. Soc. Lond. B* 192, 331-352.
131. Rallis, C., Bruneau, B.G., Del Buono, J., Seidman, C.E., Seidman, J.G., Nissim, S., Tabin, C.J., and Logan, M.P. (2003). Tbx5 is required for forelimb bud formation and continued outgrowth. *Development* 130, 2741-2751.
132. Ramón y Cajal, S.R. (1892). Le Rétine de Vertèbrès. *La Cellule* 9, 119-258.
133. Raper, J.A., Bastiani, M.J., and Goodman, C.S. (1984). Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. IV. The effects of ablating the A and P axons upon the behavior of the G growth cone. *J. Neurosci.* 4, 2329-2345.
134. Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., and Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75, 1401-1416.
135. Saigoh, K., Wang, Y.L., Suh, J.G., Yamanishi, T., Sakai, Y., Kiyosawa, H., Harada, T., Ichihara, N., Wakana, S., Kikuchi, T., and Wada, K. (1999). Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat. Genet.* 23, 47-51.
136. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2004). *Molecular cloning: a laboratory manual*.
137. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
138. Sato, F., Harigai, N., Iwanaga, T., Hasegawa, T., and Ishida, N. cDNA cloning of equine ubiquitin C-terminal hydrolase (PGP9.5). *GenBank* . 2004.

139. Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., and Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
140. Schulte, D. and Cepko, C.L. (2000). Two homeobox genes define the domain of EphA3 expression in the developing chick retina. *Development* 127, 5033-5045.
141. Schulte, D., Furukawa, T., Peters, M.A., Kozak, C.A., and Cepko, C.L. (1999). Misexpression of the Emx-related homeobox genes cVax and mVax2 ventralizes the retina and perturbs the retinotectal map. *Neuron* 24, 541-553.
142. Schulte, D., Peters, M.A., Sen, J., and Cepko, C.L. (2005). The rod photoreceptor pattern is set at the optic vesicle stage and requires spatially restricted cVax expression. *J. Neurosci.* 25, 2823-2831.
143. Sefton, M., Araujo, M., and Nieto, M.A. (1997). Novel expression gradients of Eph-like receptor tyrosine kinases in the developing chick retina. *Dev. Biol.* 188, 363-368.
144. Silver, J. and Rutishauser, U. (1984). Guidance of optic axons in vivo by a preformed adhesive pathway on neuroepithelial endfeet. *Dev. Biol.* 106, 485-499.
145. Simon, D.K. and O'Leary, D.D. (1992). Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection. *J. Neurosci.* 12, 1212-1232.
146. Smyth, G.K. and Speed, T. (2003). Normalization of cDNA Microarray Data. In *METHODS: Selecting candidate genes from DNA array screens: Application to neuroscience*, D. Carter, Hrsg.
147. Smyth, G.K., Yang, Y.H., and Speed, T. (2002). Statistical Issues in cDNA Microarray Data Analysis. In *Functional Genomics: Methods and Protocols*, (Totowa, New Jersey: Humana Press).
148. Son, O.L., Kim, H.T., Ji, M.H., Yoo, K.W., Rhee, M., and Kim, C.H. (2003). Cloning and expression analysis of a Parkinson's disease gene, uch-L1, and its promoter in zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 601-607.
149. Sowden, J.C., Holt, J.K., Meins, M., Smith, H.K., and Bhattacharya, S.S. (2001). Expression of *Drosophila* omb-related T-box genes in the developing human and mouse neural retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 3095-3102.
150. Sperry, R.W. (1963). Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fibre patterns and connections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50, 703-710.
151. Stadler, H.S. and Solursh, M. (1994). Characterization of the homeobox-containing gene GH6 identifies novel regions of homeobox gene expression in the developing chick embryo. *Dev. Biol.* 161, 251-262.
152. Stiemke, M.M. and Hollyfield, J.G. (1995). Cell birthdays in *Xenopus laevis* retina. *Differentiation* 58, 189-193.
153. Straznicky, C. and Chehade, M. (1987). The formation of the area centralis of the retinal ganglion cell layer in the chick. *Development* 100, 411-420.
154. Stuermer, C.A. and Bastmeyer, M. (2000). The retinal axon's pathfinding to the optic disk. *Prog. Neurobiol.* 62, 197-214.

155. Suh, L.H., Oster, S.F., Soehrman, S.S., Grenningloh, G., and Sretavan, D.W. (2004). L1/Laminin modulation of growth cone response to EphB triggers growth pauses and regulates the microtubule destabilizing protein SCG10. *J. Neurosci.* 24, 1976-1986.
156. Takahashi, H., Shintani, T., Sakuta, H., and Noda, M. (2003). CBF1 controls the retinotectal topographical map along the anteroposterior axis through multiple mechanisms. *Development* 130, 5203-5215.
157. Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1133.
158. Thanos, S. and Mey, J. (2001). Development of the visual system of the chick. II. Mechanisms of axonal guidance. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 35, 205-245.
159. Turner, D.L. and Cepko, C.L. (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328, 131-136.
160. Turner, D.L., Snyder, E.Y., and Cepko, C.L. (1990). Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* 4, 833-845.
161. Ueshima, T. and Uehara, M. (1983). Distribution of the a-type ganglion cells in the chicken retina. *Nippon Juigaku.Zasshi* 45, 289-295.
162. Vardimon, L., Fox, L.E., and Moscona, A.A. (1986). Developmental regulation of glutamine synthetase and carbonic anhydrase II in neural retina. *Proc.Natl. Acad. Sci.USA* 83, 9060-9064.
163. Walter, J., Kern-Veits, B., Huf, J., Stolze, B., and Bonhoeffer, F. (1987). Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro. *Development* 101, 685-696.
164. Wässle, H., Peichl, L., and Boycott, B.B. (1981). Morphology and topography of on- and off-alpha cells in the cat retina. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 212, 157-175.
165. Watts, R.J., Hoopfer, E.D., and Luo, L. (2003). Axon pruning during *Drosophila* metamorphosis: evidence for local degeneration and requirement of the ubiquitin-proteasome system. *Neuron* 38, 871-885.
166. Weiner, J.A., Koo, S.J., Nicolas, S., Fraboulet, S., Pfaff, S.L., Pourquie, O., and Sanes, J.R. (2004). Axon fasciculation defects and retinal dysplasias in mice lacking the immunoglobulin superfamily adhesion molecule BEN/ALCAM/SC1. *Mol.Cell Neurosci.* 27, 59-69.
167. Weissman, A.M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 169-178.
168. Wetts, R. and Fraser, S.E. (1988). Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science* 239, 1142-1145.
169. Wilkinson, K.D. (2000). Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11, 141-148.
170. Wilkinson, K.D., Deshpande, S., and Larsen, C.N. (1992). Comparisons of neuronal (PGP 9.5) and non-neuronal ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochem. Soc.Trans.* 20, 631-637.
171. Wilkinson, K.D., Lee, K.M., Deshpande, S., Duerksen-Hughes, P., Boss, J.M., and Pohl, J. (1989). The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science* 246, 670-673.

172. Yamagata, M., Mai, A., Pollerberg, G.E., and Noda, M. (1999). Regulatory interrelations among topographic molecules CBF1, CBF2 and EphA3 in the developing chick retina. *Dev. Growth Differ.* *41*, 575-587.
173. Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T.P. (2002). Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* *30*, e15.
174. Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., and Speed, T.P. Normalization for cDNA Microarray Data. 2001. SPIE BiOS.
175. Yang, Y.H. and Speed, T. (2002). Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 579-588.
176. Yuasa, J., Hirano, S., Yamagata, M., and Noda, M. (1996). Visual projection map specified by topographic expression of transcription factors in the retina. *Nature* *382*, 632-635.
177. Zhang, J., Jin, Z., and Bao, Z.Z. (2004). Disruption of gradient expression of Zic3 resulted in abnormal intra-retinal axon projection. *Development* *131*, 1553-1562.
178. Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J., and Klein, R. (2003). EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat. Cell Biol.* *5*, 869-878.
179. Zisch, A.H., Stallcup, W.B., Chong, L.D., Dahlin-Huppe, K., Voshol, J., Schachner, M., and Pasquale, E.B. (1997). Tyrosine phosphorylation of L1 family adhesion molecules: implication of the Eph kinase Cek5. *J. Neurosci. Res.* *47*, 655-665.

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen zur Abfassung des Textes benutzt. Die Ergebnisse wurden ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Materialien und durch Anwendung der beschriebenen Methoden erzielt.

Frankfurt am Main, 26.07.2005

[Thomas Mühleisen]

## LEBENS LAUF

Name: Thomas Walter Mühleisen  
Geburtsdatum, -ort: 10. Januar 1975, Frankfurt/Main  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

07/81 - 06/94 Schul Ausbildung

Grundschule, Frankfurt/Main

Schillerschule (Gymnasium), Frankfurt/Main

07/94 - 06/95 Grundwehrdienst als Sanitäter, Kastellaun (RP)

10/95 - 09/01 Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt

Diplomprüfungen: Biochemie (Prof. Dr. H. G. Gassen)

Genetik (Prof. Dr. A. A. Brakhage)

Zell- u. Entwicklungsbiologie (Prof. Dr. T. W. Holstein)

Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik

unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Axel A. Brakhage: „Charakterisierung des Homoacitase-Gens *lysF* der Lysinbiosynthese von *Aspergillus fumigatus*“

05/04 Liebmann, B., Mühleisen, T.W., Müller, M., Hecht, M., Weidner, G., Braun, A., Brock, M., Brakhage, A.A. (2004). Deletion of the *Aspergillus fumigatus* lysine biosynthesis gene *lysF* encoding homoacitase leads to attenuated virulence in a low-dose mouse infection model of invasive aspergillosis” Arch. Microbiol. 181: 378-83

01/02 - 07/05 Doktorarbeit am MPI für Hirnforschung in der Abteilung Neuroanatomie

unter Anleitung von Frau Dr. Dorothea Schulte und Betreuung von Herrn Prof. Dr. Heinz Wässle seitens des Instituts sowie von Herrn Prof. Dr. Thomas W. Holstein seitens der TU Darmstadt

Finanzielle Förderung durch ein Doktoranden-Stipendium des Graduiertenkollegs „Neuronale Plastizität: Moleküle, Strukturen und Funktionen“ der J. W. Goethe Universität Frankfurt und durch das MPI für Hirnforschung