

**Charakterisierung der Lenkungseigenschaften
von EphrinA5 *in vitro* in verschiedenen Spezies
(Frosch, Fisch, Huhn)**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von
Christine Weinl

Tag der mündlichen Prüfung:

18.12.2002

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. F. Bonhoeffer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Gauglitz

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Nervensystem	1
1.2 Zielgebietsfindung	1
1.3 Lenkungsmoleküle	4
Netrine.....	6
Semaphorine.....	6
Neurotrophine	7
Slit/Robo-System	8
Rezeptortyrosinphosphatasen.....	9
Rezeptortyrosinkinasen: Eph-Rezeptoren und Ephrine	9
RGM.....	12
1.4 Die retinotektale Projektion im Hühnchen	13
1.5 Die retinotektale Projektion in Xenopus	15
1.6 Die retinotektale Projektion im Zebrafisch	16
1.7 Modelle zur Entstehung retinotektaler Projektionen	18
2. Ziel der Arbeit	21
3. Material und Methoden	23
3.1 Chemikalien	23
3.2 Puffer und Medien	24
Puffer und Lösungen.....	24
Medien.....	25
3.3 Antikörper	26
3.4 Verbrauchsmaterial	26
3.5 Mikroskope	26
3.6 Software	26
3.7 Sonstige Geräte	27
3.8 Tiere	27
Hühnchen	27

<i>Xenopus laevis</i>	28
Zebrafisch <i>Brachydanio rerio</i>	28
3.9 Präparationsmethoden	29
Präparation und Kultivierung retinaler Ganglienzellen embryonaler Hühnchen ..	29
Präparation und Kultivierung retinaler Ganglienzellen von Xenopusembryonen.	29
Präparation und Kultivierung retinaler Ganglienzellen des Zebrafisches	30
Verschiedene Substrate zur Kultivierung der Neuronen	30
3.10 Färbung mit Fusionsproteinen aus alkalischer Phosphatase und EphrinA5 auf Zellen und Wachstumskegeln in Kultur	31
3.11 Kollapstest	31
3.12 Modifizierter Streifentest	33
3.13 Test mit beschichteten Latexkügelchen	34
Beschichtung der carboxylierten Latex-Kügelchen.....	34
Herstellung der Explantate für Versuche mit beschichteten Latexkügelchen	34
Funktionsweise der optischen Pinzette	35
3.14 Herstellung des Diffusionsgradienten löslicher Proteine	38
Herstellung der Mikrokapillaren.....	38
Herstellung des Diffusionsgradienten.....	38
4. Ergebnisse	42
4.1 Die retinotektale Projektion in Xenopus	42
Färbung von Axonen und Wachstumskegeln mit EphrinA5-AP zur Expressionsanalyse der EphA-Rezeptoren	42
Reaktion retinaler Ganglienzellaxone des Xenopus im Kollaps-experiment	43
Wachstum von Axonen des Xenopus im Streifentest.....	46
Lenkung von Axonen des Xenopus an EphrinA5-Fc beschichteten Kügelchen...47	
Wachstum retinaler Axone des Xenopus im Diffusionsgradienten löslicher Proteine	51
Zusammenfassung der Experimente an Xenopusaxonen	57
4.2 Die retinotektale Projektion im Huhn	58
Lenkung von Axonen des Hühnchens an EphrinA5-beschichteten Kügelchen ...	58
Wachstum retinaler Axone des Huhns im Diffusionsgradienten löslicher Proteine	74

Zusammenfassung der Experimente an Hühnchenaxonen	82
4.3 Die retinotektale Projektion im Zebrafisch	84
Wachstum retinaler Axone des Zebrafisches im Streifenfest	84
Wachstum retinaler Axone des Zebrafisches im EphrinA5-Diffusionsgradienten	85
Zusammenfassung der Experimente an Zebrafischaxonen.....	86
5. Diskussion.....	87
5.1 Die retinotektale Projektion in Xenopus.....	87
Expressionsanalyse der EphA-Rezeptoren in Xenopus	87
Verhalten retinaler Ganglienzellaxone des Xenopus im Kollapstest mit löslichem EphrinA5	88
Wachstum retinaler Ganglienzellaxone des Xenopus im Streifenfest	88
Lenkung von retinalen Ganglienzellaxonen des Xenopus an EphrinA5- beschichteten Kügelchen	89
Verhalten retinaler Ganglienzellaxone des Xenopus im Diffusionsgradient löslicher Proteine	91
Verhalten retinaler Ganglienzellaxone des Xenopus im Netrin-Diffusionsgradient	92
Verhalten retinaler Ganglienzellaxone des Xenopus im BDNF-Diffusionsgradient	93
Verhalten retinaler Ganglienzellaxone des Xenopus im EphrinA5- Diffusionsgradient	94
5.2 Die retinotektale Projektion im Hühnchen.....	97
Lenkung von retinalen Ganglienzellaxonen des Hühnchens an EphrinA5- beschichteten Kügelchen (Kügelchen direkt vor dem Wachstumskegel plaziert)	98
Lenkung von retinalen Ganglienzellaxonen des Hühnchens an EphrinA5- beschichteten Kügelchen (Kügelchen seitlich plaziert)	99
Abhängigkeit der Lenkung vom Reizort (Kügelchen am Axonschaft)	100
Reizung retinaler Ganglienzellwachstumskegel des Hühnchens mit zwei Kügelchen gleichzeitig	102
Verhalten retinaler Ganglienzellaxone des Hühnchens im EphrinA5- Diffusionsgradienten	103

Vergleich des Verhaltens von Axonen im EphrinA5- und EphrinA2-Diffusionsgradienten	104
Auswirkung verschiedener Entwicklungsstadien auf die Sensitivität temporaler Axone gegenüber Netrin im Diffusionsgradienten	105
5.3 Die retinotektale Projektion im Zebrafisch	107
5.4 Zusammenfassender Vergleich der verschiedenen Spezies (Frosch, Fisch und Huhn)	108
5.5 Modell der Lenkung durch EphrinA5	110
6. Zusammenfassung	115
7. Literaturverzeichnis	117
8. Anhang	131
Abkürzungsverzeichnis	131
Danksagung	133
Lebenslauf	137

1. Einleitung

1.1 Das Nervensystem

Das Nervensystem des Menschen besteht aus einem Netzwerk von ca. 10^{12} Nervenzellen, auch Neuronen genannt, wobei die einzelnen Nervenzellen mit bis zu 10^4 anderen Neuronen über Synapsen verbunden sind. Aufgabe des Nervensystems ist es, Informationen der Aussenwelt oder Signale des Körpers aufzunehmen, weiterzuleiten und zu verarbeiten.

Das Neuron als Grundbaustein des überaus komplexen Nervensystems besteht aus verschiedenen Elementen: Der *Zellkörper* oder das Soma enthält neben dem Zellkern noch andere für den Stoffwechsel der Zelle wichtige Kompartimente. *Dendriten* leiten Nervenimpulse von Sinneszellen oder von Axonen anderer Neuronen zum Zellkörper hin, während das *Axon* für deren Fortleitung in Form von Änderungen des elektrischen Membranpotentials (Aktionspotential) sorgt. Ort der Signalübertragung sind die *Synapsen*.

Um ein reibungsloses Funktionieren dieses hochkomplexen Systems zu gewährleisten, müssen die Verschaltungen der Synapsen untereinander und der Sinnesorgane mit den Zielgebieten im Gehirn äußerst spezifisch und präzise gebildet werden.

1.2 Zielgebietsfindung

Während der Embryonalentwicklung müssen Axone aus den Sinnesorganen zuverlässig über lange Distanzen und auf komplexen Pfaden durchs Gewebe wachsen, um das korrekte Zielgebiet zu erreichen. Proteine in der Umgebung der Wachstumspfade helfen den Axonen dabei, ihren richtigen Weg zu finden. Diese Lenkungsmoleküle können membranverankert oder löslich sein, sie können attraktiv oder repulsiv auf die wachsenden Axone wirken. Man unterscheidet vier Mechanismen der Axonlenkung: Chemoattraktion bzw. Chemo-repulsion über lange Distanzen hinweg, oder kontaktabhängige Attraktion bzw. Repulsion über kurze Distanzen (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996; Müller 1999) (siehe Abbildung 1).

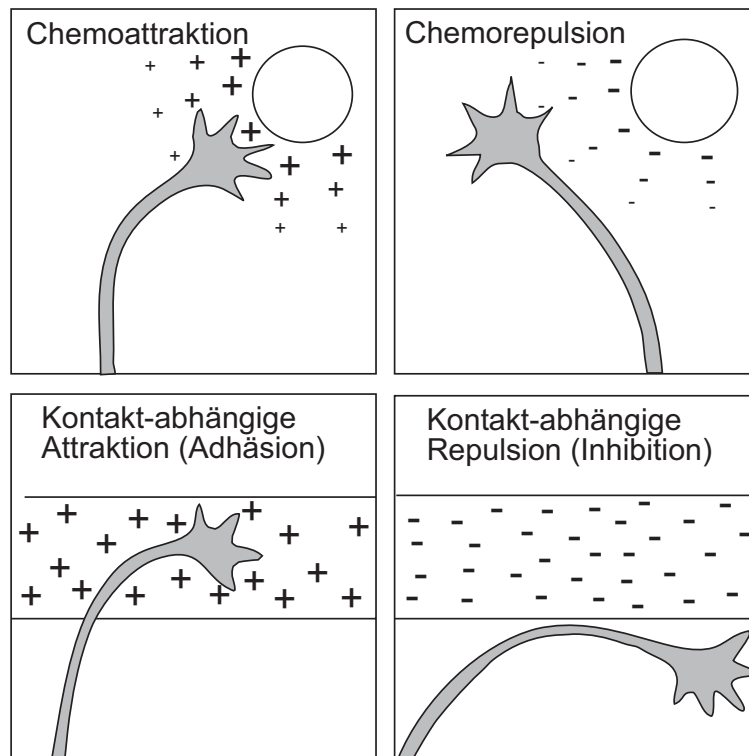


Abb. 1: Vier Kräfte bei der Axonlenkung: man unterscheidet Chemoattraktion bzw. -repulsion und kontaktabhängige Attraktion bzw. Repulsion. Ein Beispiel für eine Chemoattraktion über grosse Distanzen hinweg ist sekretiertes Netrin, das über den Rezeptor DCC (Deleted in Colorectal Cancer) wirkt. Chemorepulsiv wirken sekretierte Semaphorine und Netrine (in Wechselwirkung mit UNC-5-Rezeptoren). Kontakt-abhängige Attraktion und Adhäsion lösen Moleküle der extrazellulären Matrix wie Laminin aus. Ein Beispiel für kontaktabhängige Repulsion ist das System Ephrin/Eph-Rezeptoren (Abbildung nach Tessier-Lavigne und Goodman, 1996).

Verschiedene Mechanismen können Axone auf ihrem Weg durch das Gewebe in ihre speziellen Zielgebiete lenken. Proteine, die beidseitig des Wegs exprimiert sind, können Korridore bilden, an denen sich die Axone orientieren können. Gradienten mit steigender oder sinkender Konzentration an Lenkungsmolekülen oder Proteine, die Stoppsignale bilden, können Axone auf ihrem Wachstumspfad helfen, ihr korrektes Zielgebiet zu finden und auf ihr Zielgebiet beschränken, so dass sie kein inkorrektes Gewebe innervieren. Quellen diffusibler attraktiver Substanzen können Axone zu Zwischenzielen leiten. Durch Reduktion der Sensitivität gegenüber diesem attraktiven Signal oder aufgrund einer Hochregulierung repulsiv wirkender Rezeptoren, die mit den Liganden auf den Axonen in Wechselwirkung treten, können Axone diese attraktiven Zwischenziele wieder verlassen. Durch Modulation intrazellulärer Botenstoffe wie cAMP, cGMP oder Ca^{2+} , durch einen Substratwechsel oder durch

Festlegung unterschiedlicher Hierarchien in der Rezeptorantwort (Komplexbildung der Rezeptoren) kann ein Wechsel von attraktivem zu repulsivem Verhalten induziert werden. Das gleiche Lenkungsmolekül kann in unterschiedlichen Neuronentypen verschiedene Verhaltensweisen auslösen. Erst ein präzises Zusammenspiel verschiedener Faktoren (Neurontyp, Substrat, Ausstattung des Axons mit Rezeptoren/Liganden, Sensitivität gegenüber Lenkungsmolekülen, intrazellulärer Zustand des Axons) kann eine korrekte Projektion der Axone zu den Synapsen ihres Zielgebiets gewährleisten.

Der sensorische Teil des Axons, der die Lenkungsmoleküle auf dem Pfad ins Zielgebiet detektieren kann, ist der sogenannte Wachstumskegel oder „*growth cone*“. Er stellt die Spitze des Axons dar und besteht aus einer zentralen Domäne, dem Lamellipodium und den fingerartigen hochmotilen Antennen, den Filopodien. Eine Phasenkontrastaufnahme eines Wachstumskegels einer retinalen Ganglienzelle des Hühnchens ist in Abbildung 2 zu sehen.

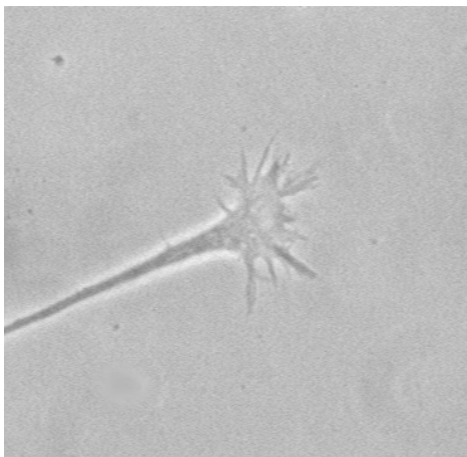


Abb. 2:

Wachstumskegel einer retinalen Ganglienzelle des Hühnchens:

Man sieht den Axonschaft und die Bestandteile eines Wachstumskegels, das Lamellipodium und die Filopodien, die wie Antennen die Umgebung nach Lenkungsmolekülen absuchen.

Der Wachstumskegel ist nur eine vorübergehende Struktur während der Phase des Axonwachstums ins Zielgebiet. Nach Erreichen der topographisch korrekten Position wird der Wachstumskegel ein Teil einer Synapse.

1.3 Lenkungsmoleküle

Lenkungsmoleküle sind Proteine, die die Wachstumskegel bei der Wegfindung in ihr Zielgebiet leiten. An Lenkungsmoleküle werden bestimmte Voraussetzungen gestellt: sie sollten zur richtigen Zeit am richtigen Ort exprimiert sein, d.h. einerseits auf dem Wachstumspfad der Axone und andererseits im Zielgebiet, in dem sie terminieren, spätestens dann, wenn die ersten Axone ihr Zielgebiet erreichen, und sie sollten inhomogen verteilt sein, denn eine homogene Verteilung beinhaltet keine Lenkungsinformation. Wird die Funktion des Lenkungsmoleküls durch verschiedene Techniken (knockout des Gens, Injektion dominant negativer Konstrukte) gestört, so dass der Wachstumskegel eine Lenkungsinformation des Lenkungsmoleküls nicht mehr auslesen kann, sollten sich *in vivo* Navigationsfehler der untersuchten Neuronklasse ergeben. *In vitro* sollte das Protein seine Lenkungseigenschaften in verschiedenen Testsystemen unter Beweis stellen (vgl. den Review von Song und Poo, 2001), wie für das Beispiel EphrinA5 in dieser Arbeit noch beschrieben werden wird.

Die meisten Lenkungsmoleküle sind bifunktional, d.h. sie können abhängig von Umgebungsfaktoren sowohl Attraktion als auch Repulsion des Wachstumskegels auslösen. Aufgrund der Richtungswahl der Axone, die durch die verschiedenen Lenkungsmoleküle induziert wird, wurden die Lenkungsmoleküle in zwei Gruppen eingeteilt: eine cAMP- (Gruppe I) und eine zweite cGMP- (Gruppe II) abhängige Gruppe (Abbildung 3).

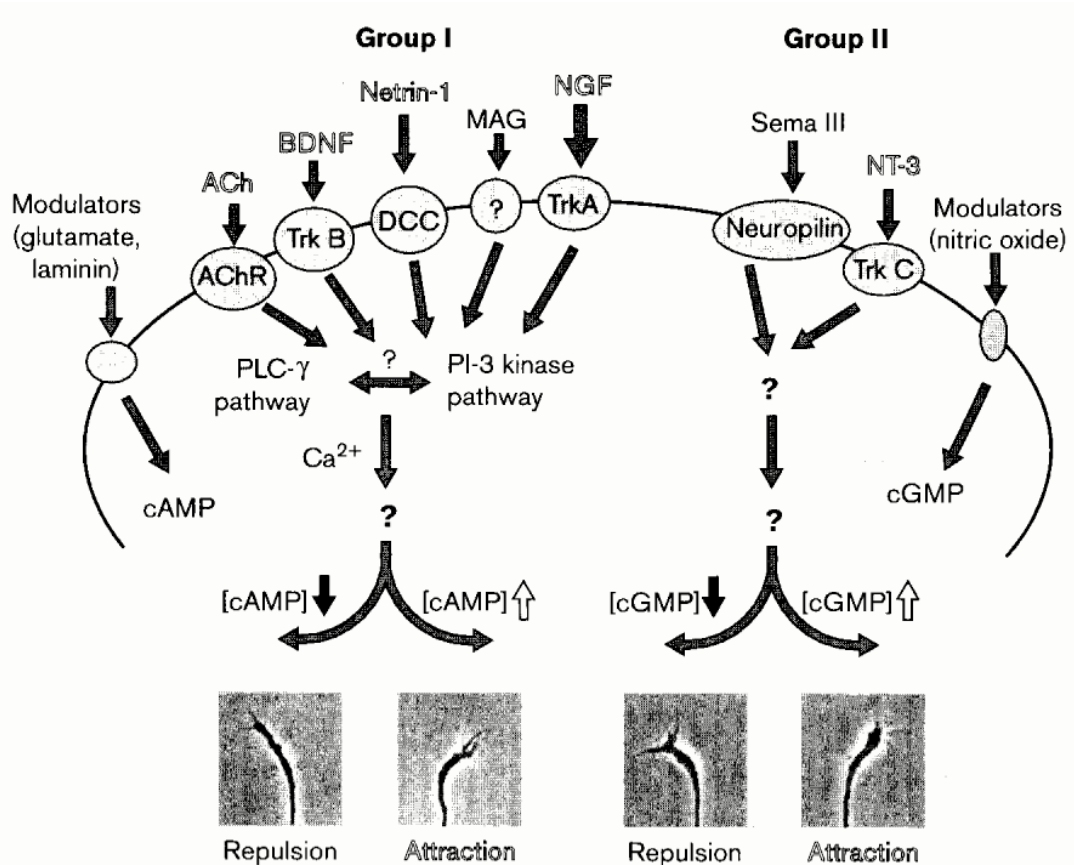


Abb. 3: Einteilung der Lenkungsmoleküle in zwei Gruppen: Zur Gruppe I gehören Acetylcholin (ACh), BDNF (brain derived neurotrophic factor), Netrin-1, MAG (myelin associated glycoprotein) und NGF (nerve growth factor). Die Signaltransduktion dieser verschiedenen Proteine mündet in den gleichen Signalweg, obwohl sie verschiedene Rezeptoren benutzen. Die Richtungsänderung, die durch diese Lenkungsmoleküle ausgelöst wird, wird durch Ca^{2+} und eine Modulation des cAMP-Spiegels hervorgerufen. Ein anderer Signalweg, den Gruppe II zugehörige Lenkungsmoleküle benutzen, ist unabhängig von Ca^{2+} und wird durch cGMP moduliert. In diese Gruppe fallen SemaIII und NT-3 (Neurotrophin-3) (Zeichnung nach Song und Poo, 1999).

In den folgenden Kapiteln werden die wichtigsten bekannten Klassen von Lenkungsmolekülen und solcher Proteine, die bei der Lenkung der Axone ins Zielgebiet helfen, selbst aber (noch) nicht als Lenkungsmoleküle bezeichnet werden können (z.B. weil die Liganden der Rezeptoren (noch) nicht bekannt sind), kurz charakterisiert und ihre Zuordnung zu den hier beschriebenen zwei Gruppen (wenn möglich) angegeben.

Netrine

Netrine sind sekretierte Proteine, die von Marc Tessier-Lavigne und Mitarbeitern zum ersten Mal in Hühnchen isoliert und charakterisiert werden konnten (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994). Netrine stellen das Paradebeispiel jener Klasse von Axonlenkungsmolekülen dar, deren Lenkungseigenschaft einerseits vom exprimierten Rezeptortyp abhängt, mit dem es eine Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung ausführt, und andererseits unter dem Einfluss von zyklischen Nukleotiden steht. Eine Wechselwirkung des Netrins mit dem DCC (deleted in colorectal cancer)-Rezeptor bewirkt eine attraktive Wirkung auf Axone, eine Wechselwirkung mit UNC-5 im Komplex mit DCC dagegen führt zu einer Repulsion (vgl. Reviews von Müller, 1999; Song und Poo, 1999). Die zweite Eigenschaft der Lenkungsmoleküle, dass die Richtungswahl vom internen Zustand des Wachstumskegels abhängt, konnte ebenfalls an Netrin gezeigt werden. Abhängig vom Substrat und damit dem internen Spiegel zyklischer Nukleotide (cAMP) kann eine Attraktion in Repulsion umgewandelt werden (Höpker et al., 1999). Damit gehört Netrin zur Gruppe I der cAMP-abhängigen Lenkungsmoleküle (siehe Abbildung 3).

Semaphorine

Semaphorine bilden aufgrund ihrer Ähnlichkeit in einer Sema-Domäne (ca. 500 Aminosäuren) am NH₂-Terminus eine Familie von Lenkungsmolekülen, die sowohl sekretiert als auch membrangebunden existieren. Sie wurden ursprünglich in Insekten (Grashüpfer) (Kolodkin et al., 1993) und im Hühnchen (Fan und Raper, 1995) gefunden (vgl. den Review von He et al., 2002). Verschiedene Isoformen eines Semaphorins können auf den gleichen Neuronentyp unterschiedliche Wirkung ausüben: kortikale Axone von Ratten reagieren z.B. mit Repulsion auf Sema3A, auf Sema3C mit Attraktion (Bagnard et al., 2000). Das gleiche Semaphorin kann aber auch unterschiedliche Wirkungen auf verschiedene Neuronstrukturen haben: Dendriten kortikaler Neuronen von Mäusen reagieren attraktiv auf Sema3A, Axone dieser Neuronen reagieren dagegen mit Repulsion (Polleux et al., 1998; Polleux et al., 2000; Strittmatter 2000). Semaphorine gehören in die Gruppe II der

Lenkungsmoleküle, da sie cGMP-abhängige Lenkung auslösen (Song et al., 1998). Sema3A kann altersabhängig Kollapsreaktionen in retinalen Ganglienzellaxonen des *Xenopus* auslösen und bewirkt eine repulsive Antwort der Wachstumskegel im Diffusionsgradient (Campbell et al., 2001).

Neurotrophine

Zur Gruppe der Neurotrophine werden NGF (nerve growth factor), BDNF (brain derived neurotrophic factor) und NT-3, NT-4, NT-5 (neurotrophin-3-5) gerechnet. Sie aktivieren zwei unterschiedliche Rezeptorklassen: Trk-Rezeptoren (tropomyosin related kinase) und p75, ein Mitglied der TNF (tumor necrosis factor)-Rezeptorsuperfamilie (Patapoutian und Reichardt, 2001). Bei den meisten Neuronen bewirkt eine Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung eine gesteigerte Überlebensrate (daher auch der Name „Neurotrophin“). Ob Neurotrophine als eine eigene Lenkungsmolekülklasse definiert werden kann, ist fraglich. Bisher gibt es nur Hinweise auf bei der Axonlenkung unterstützende Eigenschaften und einen Nachweis einer Lenkung *in vitro* im Diffusionsgradienten. Dabei gehören die verschiedenen Neurotrophine unterschiedlichen Gruppen von Lenkungsmolekülen an: NGF und BDNF sind cAMP-abhängige Proteine und fallen damit in Gruppe I, während NT-3 durch cGMP beeinflusst werden kann und somit Gruppe II angehört (vgl. den Review von Song und Poo, 1999).

Rückenmarksneuronen des *Xenopus* kultiviert auf Glas zeigen eine attraktive Antwort im Diffusionsgradienten von BDNF. Durch Kultivierung auf Laminin kann diese Attraktion in eine Repulsion umgekehrt werden (Höpker et al. 1999). Durch Zusatz von BDNF ins Medium können Axone desensitiviert werden, so dass sie einem BDNF-Gradienten ausgesetzt keine Richtungsänderung mehr zeigen (Ming et al., 2002). Für eine dauerhafte Desensitivierung muss BDNF kontinuierlich im Medium vorhanden sein, denn bei Auswaschen von BDNF erhalten die Wachstumskegel ihre Sensitivität zurück (Resensitivierung). Bestimmte Lenkungsmoleküle innerhalb einer Gruppe können sich gegenseitig desensitivieren, z.B. verhindert NGF im Medium eine chemotaktische Antwort von Wachstumskegeln in einem Netrin- oder BDNF-Gradient, während

Moleküle, die verschiedenen Gruppen angehören, sich nicht gegenseitig beeinflussen können, d.h. dass gemeinsame Signalwege innerhalb einer Gruppe existieren, aber voneinander unabhängige Signalübertragung in den zwei Gruppen stattfindet (Ming et al., 1999).

Slit/Robo-System

Dieses Axonlenkungssystem wurde erstmals in *Drosophila* gefunden (Seeger et al., 1993; Tear et al., 1996). Es hat wichtige Funktionen beim Aufbau der Bilateralsymmetrie des Körpers. Um die beiden Körperhälften miteinander zu verbinden, existieren sogenannte kommissurale Axone, die zur Mittellinie wachsen, die die beiden Körperhälften trennt. Man unterscheidet dabei zwei Arten: ipsilaterale Axone bleiben bei Kontakt mit dieser Mittellinie auf der gleichen Körperseite, kontralaterale Axone kreuzen über die Mittellinie auf die andere Körperseite. Ipsilaterale und kontralaterale Axone werden gleichermassen durch eine sekretierte Netrinquelle zur Mittellinie gelenkt. Ipsilaterale Axone dürfen die Mittellinie nicht passieren, kontralaterale Axone müssen dagegen kreuzen. Die Entscheidung, welche Axone nun die Mittellinie passieren, wird mit Hilfe des Slit/Robo-Systems getroffen. Der Ligand Slit ist ein von der Mittellinie sekretiertes repulsiv wirkendes Protein, der über Wechselwirkung mit dem Robo-Rezeptor (Robo = Roundabout) wirkt. Die Axone sind mit unterschiedlichen Rezeptoren ausgestattet, deren Expression zeitlich reguliert wird. Ipsilaterale Axone exprimieren bei Erreichen der Mittellinie ein hohes Mass an Robo, so dass sie durch Slit von der Mittellinie abgestossen werden und sie nicht kreuzen. Kontralaterale Axone dagegen exprimieren vor und während des Kreuzens nur wenig Robo, so dass sie die Mittellinie passieren können. Haben sie aber gekreuzt, wird die Roboexpression erhöht und die Axone werden abgehalten, die Mittellinie erneut zu kreuzen (Kaprielan et al., 1999 und 2000). Die Wahl des Pfades nach Kreuzen der Mittellinie wird ebenfalls durch die unterschiedliche Ausstattung der Axone mit Roborezeptoren vorgegeben (Rajagopalan et al., 2000, Simpson et al., 2000, Guthrie 2001). Je mehr Roborezeptoren die Axone exprimieren, desto weiter von der Mittellinie entfernte Pfade wählen sie, da die Slitrepulsion wirksam ist.

In vitro kann Slit eine Kollapsreaktion in retinalen Ganglienzellaxonen des Hühnchens induzieren (Niclou et al., 2000). In Diffusionsgradienten wurde die lenkende Eigenschaft von Slit noch nicht untersucht.

Rezeptortyrosinphosphatasen

Die Rezeptortyrosinphosphatasen werden eingeteilt in zytoplasmatische und transmembranverankerte Proteine. Über die zytoplasmatischen Phosphatasen ist noch wenig bekannt, für Axonlenkung und -wachstum sind besonders die transmembrangebundenen RTPTs bedeutend (Bixby 2000). Sie wurden erstmals in *Drosophila* gefunden, in denen Mutanten Defekte in der Motoraxonlenkung zum Zielmuskel oder ein komplettes Vorbeiwachsen am Zielgebiet zeigten (Stoker 2001). Die Fähigkeit zur Axonlenkung wurde im Diffusionsgradient mit retinalen Ganglienzellaxonen des Hühnchens getestet. PTP ρ wirkt repulsiv und gehört zur Gruppe II der Lenkungsmoleküle (Stepanek et al., 2001). Dagegen bewirkt PTP δ eine Attraktion im Pulsationsgradient und kann weder Gruppe I noch Gruppe II zugeordnet werden, sondern bildet eine neue Gruppe von Lenkungsmolekülen, die weder cAMP- noch cGMP-abhängig sind (Sun et al., 2000). Auch in *Xenopus* sind mittlerweile RTPTs bekannt, die eine Rolle bei der Entstehung der retinotektalen Projektion haben (Johnson und Holt, 2000; Johnson et al., 2001). Allerdings sind die zu den Rezeptortyrosinphosphatasen zugehörigen Liganden noch nicht identifiziert, weshalb ihre Einordnung in eine Klasse von „Lenkungsmolekülen“ fraglich ist.

Rezeptortyrosinkinase: Eph-Rezeptoren und Ephrine

Rezeptortyrosinkinase (RTKs) sind Transmembranproteine, die nach Eingang eines externen Stimulus dieses Signal ins Innere der Zelle weiterleiten („*forward signalling*“), aber (wie weiter unten gesagt wird) auch in der Lage sind, eine reverse Signaltransduktion auszuführen („*reverse signalling*“).

Unter den RTKs bilden die Eph-Rezeptoren die grösste Familie (13 Mitglieder). Der Name „Eph“ leitet sich ab von einer erythropoietin producing hepatoma Zell-Linie, in der erstmals ein Eph-Rezeptor kloniert werden konnte (Hirai et al., 1987). Im Hühnchen wurde der Ligand EphrinA5 von Drescher und

Mitarbeitern entdeckt und charakterisiert (Drescher et al., 1995). Die Liganden der Eph-Rezeptoren, die Ephrine, werden in zwei Untergruppen eingeteilt: die A-Ephrine sind GPI- (Glycosylphosphatidylinositol) verankerte Proteine (EphrinA1-EphrinA5, kürzlich wurde ein neues Protein dieser Familie, EphrinA6, gefunden, Menzel et al., 2001), die Ephrine der B-Klasse besitzen eine Transmembrandomäne (EphrinB1-EphrinB3). Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten und ihrer Ligandenaffinität werden die Eph-Rezeptoren ebenfalls in eine A- und eine B-Klasse untergliedert: EphA1-EphA8 und EphB1-EphBB4, EphB6. Rezeptoren der A-Klasse binden A-Ephrine, Rezeptoren der B-Klasse entsprechend die B-Ephrine. Eine Ausnahme bildet der EphA4-Rezeptor, der A- und B-Ephrine binden kann (Wilkinson, 2000; Flanagan und Vanderhaeghen, 1998; Kullander und Klein, 2002).

Die Signaltransduktion beginnt mit der Bindung der Ephrinliganden an die Rezeptoren. Dabei kommt es zur Immobilisierung der Liganden und nachfolgend zu einer Aggregation („Clusterbildung“) der Rezeptoren in der Membran. Dies ermöglicht eine Eph-Rezeptor-Autophosphorylierung und eine gesteigerte Kinaseaktivität (Kalo und Pasquale, 1999). Je nachdem, ob dimere, tetramere oder multimeren Ephrine an den Rezeptor binden, werden verschiedene Signalwege eingeschlagen (Stein et al., 1998). Auch monomere Ephrine können an die Rezeptoren binden, lösen jedoch keine intrazelluläre Signalkaskade aus und blockieren damit die Rezeptoren in ihrer Funktion (dominant negativ wirkende Monomere) (Davis et al., 1994).

Neben der vermuteten axonlenkenden Eigenschaft der Ephrine sind sie noch an weiteren Prozessen bei der Entwicklung eines Organismus beteiligt, z.B. der Axonfaszikulation, der Bildung der Kommissuren im Gehirn, bei der Lenkung von Motoraxonen und wandernden Neuralleistenzellen, bei der Stabilisierung von Mustern (Segmenten, Rhombomeren) im Neuralepithelium und bei der Entstehung des Blutgefäßsystems (Wilkinson, 2000). Auch im adulten Stadium wirken Ephrine in Plastizitätsprozessen und LTP (*long term potentiation*) mit, sind in Synapsen des Hippokampus anzufinden, lenken Migration und Verbindungsbildung von neuen Neuronen, die von Stammzellen im

erwachsenen Gehirn generiert wurden und spielen bei der adulten Angiogenese eine wichtige Rolle (Frisen et al., 1999). Die Ephrine sind bei der Entstehung sogenannter topographischer Projektionen beteiligt, deren bekanntester Vertreter die in dieser Arbeit untersuchte retinotektale Projektion von der Retina ins optische Tektum ist. Daneben sind Ephrine aber auch am Aufbau anderer Projektionen beteiligt, wie die vomeronasale Projektion (Knöll et al., 2001), die thalamo-kortikale, die septo-hippokampale, die nigro-striatale Projektion und die Projektion von Motorneuronen zu den Muskeln (Donoghue et al., 1996; Gao et al., 1996; 1998; Yue et al., 1999; Yue et al., 2002).

Eine wichtige Aufgabe der Ephrine ist die Zellrepulsion und Bildung von Grenzen, die auf der repulsiven Eigenschaft der Ephrine beruhen. Es wurden jedoch auch attraktive bzw. adhäsive Eigenschaften der Ephrine gefunden (Holmberg und Frisen, 2002). So wurde eine chemoattraktive Wirkung von EphrinA1 gegenüber Endothelzellen (Pandey et al., 1995) und eine neurotrophische Aktivität in Kulturen von Rattenrückenmarksneuronen (Magal et al., 1997) gefunden. Ein weiteres Beispiel wurde bei der Entwicklung des Nervensystems in der Maus gefunden. Beim Schliessen der Neuralfaltens kehren bestimmte Formen des EphA7-Rezeptors das repulsive EphrinA5-Signal um in ein Adhäsionssignal (Holmberg et al., 2000). Die Beobachtung, dass Pyramidalneuronen ihre Verzweigungspunkte vorwiegend in Zielgebieten ausbilden, in denen EphrinA5 stark exprimiert ist, deutet ebenfalls auf eine nicht-repulsive Wechselwirkung hin (Castellani et al., 1998). Eine adhäsive/attraktive Aktion des EphrinA5 bei der Entstehung einer topographischen Projektion wurde (wie oben erwähnt) von Knöll et al., 2001 in der vomeronasalen Projektion der Maus gefunden. Hier projizieren Axone mit hoher Ligandexpression in Gebiete mit hoher Rezeptorexpression und umgekehrt, was nur mittels einer adhäsiven oder attraktiven Eigenschaft der Ephrinwechselwirkung erklärt werden kann. Diese These wurde mit Hilfe von *in vitro* Tests (Streifenfest) untermauert: die Axone des Vomeronasalorgans bevorzugten Bahnen, die EphA7 enthielten (Knöll et al., 2001). In *Xenopus* konnte eine attraktive Wirkung des EphrinB/EphB-Systems bei der Entstehung

der retinotektalen Projektion in dorso-ventraler Richtung durch Verwendung ähnlicher *in vitro* und *in vivo* assays gezeigt werden (Mann et al., 2002).

Eine herausragende Eigenschaft der Proteine der Ephrin-Klasse ist die Fähigkeit der bidirektionalen Signalweiterleitung. Das Signal wird nicht nur in die Rezeptor-exprimierende Zellen geleitet („*forward signaling*“, „*inside-out*“), sondern auch über den Liganden in die Zellen zurück gesendet („*reverse signaling*“, „*outside-in*“). Das gemeinsame Auftreten beider Signalarten nennt man bidirektionale Signalleitung (*bidirectional signaling*). Damit wird die klassische Definition von „Liganden“ und „Rezeptoren“ in Frage gestellt, da bei der bidirektionalen Signalweiterleitung Ephrine und Eph-Rezeptoren sowohl als Liganden als auch als Rezeptoren fungieren können.

Diese Art der bidirektionalen Signalleitung kann man sich nur in der EphrinB-Klasse leicht vorstellen, da hier die für die Signalweiterleitung in die Zelle hinein notwendige intrazelluläre Domäne vorhanden ist. Neueste Arbeiten zeigen jedoch auch für die Ephrine der A-Klasse eine solche bidirektionale Signalleitung (Davy et al., 1999; Davy et al., 2000; Huai und Drescher, 2001; Knöll et al., 2001). Die Ephrine der A-Klasse sind in sogenannten „raft“ Mikrodomänen versammelt, die eine lokale Plattform für die Signaltransduktion bilden (Boyd und Lackmann, 2001; Tsui-Pierchala et al., 2002). Spezielle Proteine wie z.B. Integrine übernehmen dabei das Signal, das von den Ephrinen ausgesendet wurde.

RGM

Neben EphrinA5 und EphrinA2 wurde von Bernhard Müller und Mitarbeitern ein 33 kDa Protein im Tektum von Hühnchen gefunden, das die Kriterien eines potentiellen Lenkungsmoleküls ebenso erfüllt wie die Proteine der Ephrinklasse: es ist im Tektum gradiert verteilt, ist zum Zeitpunkt des Einwachsens der Axone in ihr Zielgebiet exprimiert und zeigt in ersten *in vitro* Tests auf seine Lenkungseigenschaften hin einen repulsiven Effekt. Dieses Protein wurde als RGM (*repulsive guidance molecule*) bezeichnet. Kollaps- und Streifentests mit RGM-exprimierenden Zellen ergaben eine dosisabhängige kollapsinduzierende Wirkung der Membranen und ein Vermeiden der RGM-enthaltenden

Membranbahnen temporaler Axone (Monnier et al., 2002). Durch gezielte Zerstörung des Proteins über CALI (*chromophore assisted laser inactivation*) konnte im Bereich der Inaktivierung durch den Laser die Entscheidung aufgehoben werden, so dass temporale Axone nun auf beiden Streifenarten gleich gut wuchsen (Müller et al., 1996).

1.4 Die retinotektale Projektion im Hühnchen

Die retinotektale Projektion ist ein bekanntes Beispiel einer sogenannten topographischen Projektion. Dabei bleibt die Nachbarschaftsbeziehung, die unter reifenden Zellen in der Retina besteht, auch bei deren Axonen im Zielgebiet erhalten (Willshaw und Malsburg, 1976). Temporale bzw. nasale Axone projizieren ins anteriore bzw. posteriore Tektum, die gleiche Beziehung gilt für die dorsale/ventrale Achse.

Das Hühnchen bietet als Modellsystem einige Vorteile. Es besitzt ein hochentwickeltes visuelles System. Die Entstehung der retinotektalen Projektion beginnt sehr früh in der Entwicklung 30 Stunden nach der Befruchtung des Eies und ist zur Zeit des Schlüpfens des Hühnchens abgeschlossen. Einige Aspekte der retinotektalen Projektion können leicht *in vitro* nachgebildet werden. *In vitro* Kulturen von Retina und Tektum können leicht präpariert und in künstlichen Medien am Leben gehalten werden (Thanos 2001).

Rein schematisch kann die retinotektale Projektion im Hühnchen wie in Abbildung 4 dargestellt werden. Zusätzlich aufgeführt sind die Konzentrationsverteilungen der beteiligten Proteine der EphA/EphrinA-Familie. Auf der Retina sind Liganden und Rezeptoren koexprimiert (Hornberger et al., 1999), im Tektum geben zwei überlagerte Gradienten von EphrinA2 und EphrinA5 die Zielpositionen der Axone entlang der anterior-posterioren Achse an. Gradienten der EphB/EphrinB-Familie, die die dorsoventrale Achse markieren, sind hier nicht dargestellt.

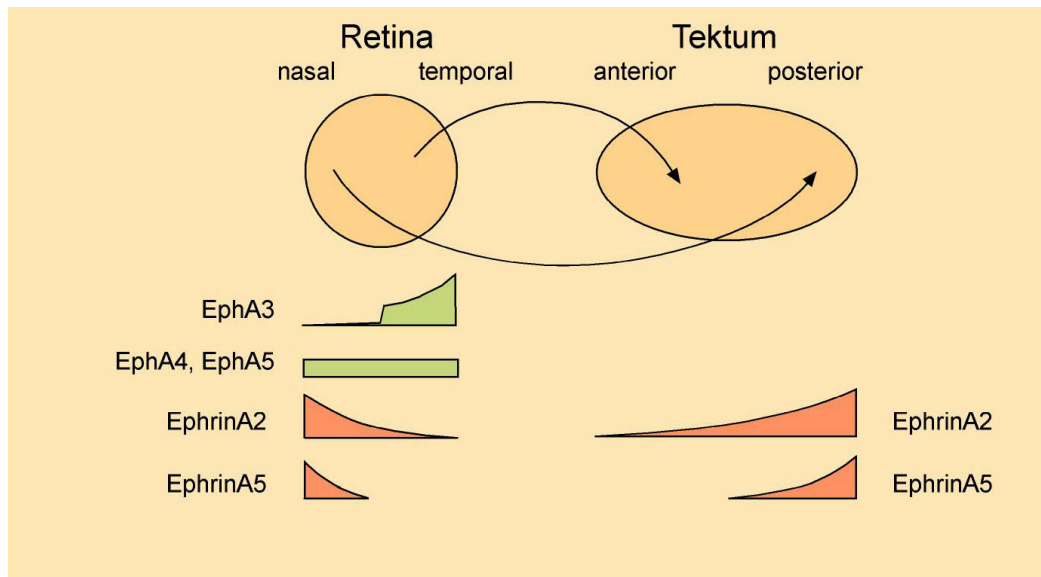


Abb. 4: Die retinotektale Projektion im Hühnchen. Temporale Axone der Retina projizieren in den anterioren, nasale in den posterioren Teil des optischen Tektums. Lenkungsmoleküle, die am Aufbau der Projektion beteiligt zu sein scheinen, sind Ephrine und ihre entsprechenden Eph-Rezeptoren. Auf der Retina sind Ephrinliganden und Rezeptoren koexprimiert, im Tektum bilden EphrinA2 und EphrinA5 Gradienten unterschiedlicher Steigung aus (Zeichnung nach Flanagan und Vanderhaeghen, 1998).

Der Wachstumspfad, den retinale Ganglienzellaxone *in vivo* einschlagen, um ihr Zielgebiet, das optische Tektum, zu erreichen, ist in Abbildung 5 an einem horizontalen Gefrierschnitt durch einen Hühnchenkopf zu verfolgen. Zwischen E2-E3 verlassen erste Axone das Auge, kreuzen an E4 am Chiasma auf die kontralaterale Gehirnseite und erreichen an E6 das anteriore Tektum. Zwischen E7-E12 erfolgt die Innervation des posterioren Teils. An E10-E11 sind sich verzweigende Axone im anterioren Tektum zu erkennen (Mey und Thanos, 1992). Zwischen E12-E16 kommt es in 30-40% zum Zelltod, der überschüssige retinale Ganglienzellen eliminiert (vgl. den Review von Mey und Thanos, 2000). An E11 können erste postsynaptische Potentiale nach Stimulation des optischen Nerven abgeleitet werden.

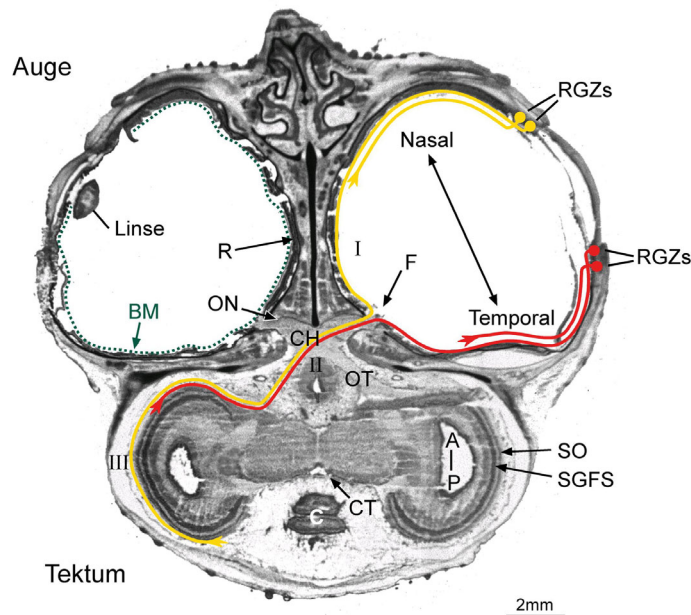


Abb. 5: Die retinotektale Projektion *in vivo*, gezeigt an einem horizontalen Schnitt durch einen Hühnchenkopf am 11. Tag der Embryonalentwicklung. Nasale Axone retinaler Ganglienzellen (RGZs) sind gelb, temporale Axone rot dargestellt. Sie wachsen intraretinal zur optischen Fissur (F), bilden den optischen Nerv (ON), kreuzen am Chiasma (CH) auf die kontralaterale Gehirnseite und wachsen ins optische Tektum (OT) ein, wo sie entlang der anterior-posterioren Achse (A-P) ihre topographisch korrekten Zielgebiete innervieren (Abbildung nach Antje Feucht, Diplomarbeit 1997). Weitere Abkürzungen: R Retina, BM Basalmembran, SO Stratum opticum, SGFS Stratum griseum et fibrosum superficiale, CT Commissura tectalis.

In verschiedenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich Retina und Tektum unabhängig voneinander entwickeln. Das Tektum exprimiert auch in Abwesenheit der Augen die Lenkungsmoleküle. Nach Entfernung des Tektums wachsen die Axone der Retina zuerst in ihr ehemaliges Zielgebiet, in der sich das Tektum befunden hatte, ein (Thanos 2001). Für ein nachfolgendes Überleben der Neurone ist eine Ausschüttung von Neurotrophinen (BDNF brain derived neurotrophic factor, CNTF ciliar neurotrophic factor) notwendig.

1.5 Die retinotektale Projektion in *Xenopus*

Im afrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* verlassen die ersten Axone der dorsozentralen Retina im Stadium 28 (entspricht 32 Stunden nach der Befruchtung) die Retina, kreuzen im Stadium 32 (40 Stunden) das optische Chiasma und erreichen 19 Stunden nach Verlassen des Auges den anterioren Teil des Tektums (Stadium 37/38) (siehe Abbildung 6).

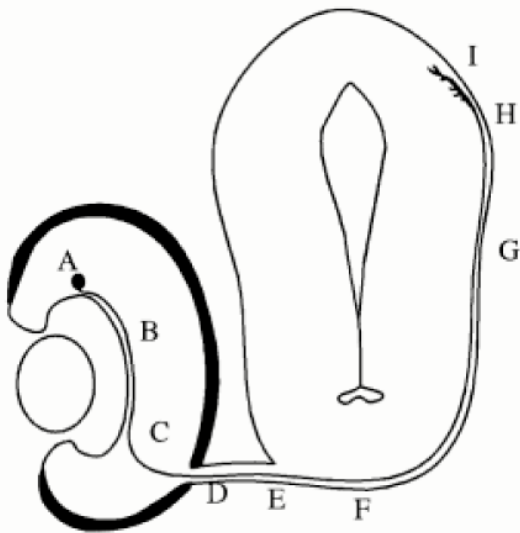


Abb. 6: Die retinotektale Projektion am Beispiel des *Xenopus*: Gezeigt ist die schematische Darstellung eines Schnitts durch ein rechtes Auge und Tektum. Die Buchstaben A-I bezeichnen bestimmte Positionen auf dem Weg ins Zielgebiet. (A) Im Stadium 28 bilden retinale Ganglienzellen der dorsozentralen Retina die ersten Axone. (B) Diese sogenannten Pionieraxone wachsen ventral nahe der Glaskörperoberfläche des Auges zum ONH (optic nerve head). (C) Am ONH bilden die Wachstumskegel eine hochkomplexe Form aus, während sie in den optischen Nerv eintauchen. (D) Während

des Wachstums im optischen Nerv nehmen die Wachstumskegel eine Keulenform an. (E) Im Stadium 32 erreichen die ersten Wachstumskegel das optische Chiasma, an dem sie auf die kontralaterale Seite des Gehirns kreuzen. (F) Axone navigieren auf dem Neuroepithelium. Im Stadium 35/36 vollziehen sie eine Ablenkung in posteriorer Richtung, so dass sie in (G) weiter auf der Tektumoberfläche weiterwachsen. (H) Die ersten Axone erreichen das anteriore Tektum im Stadium 39. (I) Haben die Axone ihre korrekte Position im Tektum erreicht, bilden sie Verzweigungen aus, die die topographische Projektion ergeben. (Zeichnung nach Dingwell et al., 2000)

Um dem erwachsenen Frosch ein binokulares Sehen zu ermöglichen, müssen die Augen während der Metamorphose von der Kaulquappe zum erwachsenen Frosch aus ihrer lateralen Stellung in der Kaulquappe in ihre dorsofrontale Position im Frosch wandern. Eine zweite Voraussetzung für binokulares Sehen ist das Vorhandensein einer ipsilateralen Projektion der retinalen Ganglienzellaxone. Deshalb erfolgt die Projektion im erwachsenen Frosch nicht ausschliesslich in die kontralaterale Gehirnhälfte (wie z.B. im Hühnchen), eine kleine Untergruppe von Axonen erhält ihre ipsilaterale Projektion aufrecht (Hutson et al., 2002).

1.6 Die retinotektale Projektion im Zebrafisch

Der Zebrafisch besitzt kein binokulares Sehen, die Axone kreuzen vollständig auf die kontralaterale Gehirnhälfte, es besteht keine ipsilaterale Projektion (Hutson et al., 2002). Erste Axone verlassen 34-35 Stunden nach Befruchtung die Retina und erreichen nach 46-48 Stunden das Tektum. Nach 54-56 Stunden ist der anteriore Teil des Tektums vollständig mit Axonen bedeckt, während der

posteriore Teil zuerst noch frei ist von terminierenden Axonen. 70-72 Stunden nach der Befruchtung ist das gesamte Tektum innerviert (Stürmer 1988).

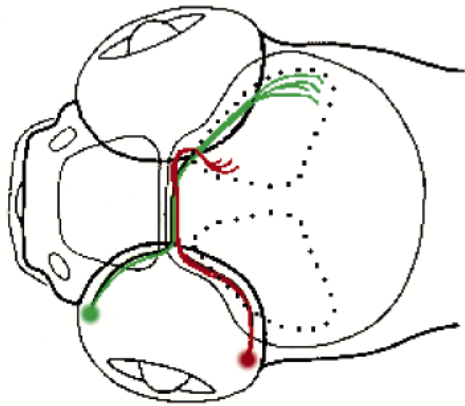


Abb. 7: Schematische Ansicht der retinotektalen Projektion im Zebrafisch (5 Tage alt). Gezeigt ist der dorsale Blick auf den Kopf des Fisches, das optische Tektum ist gepunktet umrahmt. Axone der nasal-dorsalen Retina (grün) projizieren in die posterior-ventrale Region des Tektums, Axone der temporal-ventralen Retina (rot) in den anterior-dorsalen Teil des Tektums (Abbildung nach Baier et al., 1996; Karlstrom et al., 1997).

Die anfänglich gebildete Projektion im Zebrafisch ist im Vergleich zu den beschriebenen Projektionen im *Xenopus* und im Hühnchen die präziseste (Chien et al., 1995). Im Zebrafisch und im *Xenopus* besteht während der gesamten Entwicklung eine weitere Grössenzunahme des Tektums. Deshalb muss die Projektion immer wieder neu angepasst werden. Im Hühnchen dagegen ist das Tektum schon in sehr frühen Stadien zu seiner endgültigen Grösse herangereift. Zur Bildung der endgültigen korrekten Projektion werden falsche synaptische Verbindungen im Zusammenspiel mit kontrolliertem Zelltod (Apoptose) eliminiert. In Mäusen schießen die Wachstumskegel über ihr eigentliches Ziel hinaus. Die korrekte Projektion entsteht durch extensives *Backbranching* (Bildung von Seitenverzweigungen am Axonschaft) und Elimination der überschüssigen Axone. Bei der Bildung aller beschriebenen retinotektalen Projektionen ist die anfängliche Bildung unabhängig von neuronaler Aktivität, erst die Verfeinerung der synaptischen Verbindungen benötigt elektrische Aktivität (Stürmer 1988; Gnügge et al., 2001).

1.7 Modelle zur Entstehung retinotektaler Projektionen

Bevor erste Lenkungsmoleküle auf dem Weg der retinalen Ganglienzellaxone in ihr Zielgebiet und im Tektum, dem Zielgebiet, gefunden worden waren, gab es die Auffassung, dass das Tektum eine Quelle globaler Positionsinformation darstellt und diffusible Faktoren aussendet, durch die die Axone angezogen werden. Diese Hypothese konnte jedoch durch Experimente widerlegt werden. Ektopisch implantierte Tektum wurden nur dann von Axonen innerviert, wenn diese nahe ihres eigentlichen Weges lagen. Eine Entfernung des Tektums in sehr frühen Entwicklungsstadien störte das Wachstum der Axone keinesfalls, die Axone wuchsen unbeeinflusst auf das „Phantomtektum“ zu (Holt und Harris, 1993). Es mussten also andere Mechanismen bei der Entstehung der Projektion beteiligt sein.

Erste Versuche von Bonhoeffer und Huf (1982) ergaben, dass temporale Axone eine Präferenz für anteriore Tektumzellen zeigen, wenn sie die Wahl zwischen zwei unterschiedlichen Zellmonolayern bestehend aus anterioren oder posterioren Tektumzellen haben. Diese Präferenz kann durch eine Adhäsion an anteriore Tektumzellen oder durch repulsive Eigenschaften posteriorer Zellen zustande kommen. In späteren Versuchen konnten die Membraneigenschaften auf einen repulsiven Mechanismus der posterioren Tektumzellen zurückgeführt werden, da eine Hitzeinaktivierung der posterioren Tektumzellen zu einer Aufhebung des Streifenwachstums führte (Walter et al., 1987).

Auf diesen Experimenten aufbauend wurde im gleichen Labor die Technik der Herstellung von sogenannten Streifenteppichen entwickelt. Auswachsene Axone werden mit alternierenden Bahnen aus anterioren und posterioren Tektummembranen konfrontiert. Temporale Axone vermieden posteriore Bahnen (ein Gebiet, in das sie *in vivo* nicht einwachsen) und wuchsen bevorzugt auf den anterioren Bahnen (entsprechend ihrem Zielgebiet *in vivo*). Hiermit war ein erster Hinweis geschaffen, dass die Axonlenkung im Tektum bezüglich der anterior-posterioren Zielposition auf einem repulsiven Mechanismus basiert.

Drescher und Mitarbeiter fanden in EphrinA5 und EphrinA2 zwei Kandidaten, die im Tektum inhomogen entlang der anterior-posterioren Achse verteilt sind

und die in Streifenexperimenten repulsiv auf temporale Axone wirken (Drescher et al., 1995). Damit hatte die ursprünglich von Sperry formulierte Chemoaffinitätshypothese, nach der den einwachsenden Axonen durch eine geringe Anzahl an gradiert verteilten Lenkungsmolekülen ein zweidimensionales Koordinatensystem auf dem Tektum angeboten wird, zumindest für diese eine Dimension in den Ephrinen ihre molekulare Entsprechung gefunden (Sperry 1963). Durch Arbeiten von Gierer und Bonhoeffer konnte diese These in ein mathematisches Modell eingebunden werden (Gierer 1981, 1983, 1987; Bonhoeffer und Gierer, 1984). Eine ursprüngliche Hypothese, dass jedes Axon eine spezifische Ausstattung mit einem Rezeptor besitzt, der nur mit einem einzigen Ligand im Zielgebiet wechselwirken kann, war aufgrund der grossen Vielzahl der hierfür benötigten Kodierung, die die Kapazität des Genoms übersteigen würde, unwahrscheinlich geworden und konnte durch die Gradiententheorie ersetzt werden.

Es bleibt die Frage, welche Proteine zur Markierung des Zielgebiets geeignet sind. Vorstellbar sind repulsive oder attraktive Gradienten von Lenkungsmolekülen oder ein Zusammenspiel aus beiden. Das Axon würde gemäss einem Modell an der Position stoppen, an der sich repulsive und attraktive Kräfte genau aufheben. Das sogenannte „Kompetitionsmodell“ schlägt eine Kombination aus repulsivem Gradient mit Konkurrenz im Zielgebiet vor. Temporale Axone können nicht ins posteriore Tektum einwachsen, da sie von einem repulsiven Gradienten, der in Richtung posterior ansteigt, abgehalten werden. Nasale Axone, die weniger vom repulsiven Gradienten beeinflusst werden, terminieren im posterioren Gebiet, da sie im anterioren Gebiet eine zu grosse Konkurrenz von bereits eingewachsenen temporalen Fasern erfahren (Feldheim et al., 2000).

Ein weiteres Modell, das zuerst in Maus, später auch im Hühnchen, verfolgt wurde, basiert auf einem anfänglichen Überschiessen der Axone über ihr eigentliches Zielgebiet hinaus. Die korrekte Projektion entsteht anschliessend durch *Backbranching* (seitliche Verästelungen) am Axonschaft, bevorzugtes

Arborisieren in der richtigen Terminationszone und Rückzug des überschüssigen Axons (Yates et al., 2001; Hindges et al., 2002).

Im Hühnchen ergibt sich nach Berücksichtigung der Ergebnisse von Hornberger et al., 1999 folgendes Bild: in der Retina sind Liganden und Rezeptoren auf den Ganglienzellen koexprimiert. Diese Koexpression hat einen Einfluss auf die Zielfindung der Axone. Die Rezeptoren werden in ihrer Funktion durch die Liganden moduliert. Der EphA4-Rezeptor ist uniform in der Retina exprimiert, beide Liganden EphrinA5 und EphrinA2 sind nasal höher exprimiert als temporal. Durch Wechselwirkung der Liganden mit den koexprimierten Rezeptoren könnte die Konzentration an funktionellem Rezeptor verringert werden: bei nasal liegen also weniger freie funktionelle Rezeptoren vor als bei temporalen Axonen. Im Tektum sind die Liganden EphrinA5 und EphrinA2 in einem nach posterior ansteigenden Gradienten vorhanden. Temporale Axone, die noch eine hohe Konzentration an freien Rezeptoren besitzen, werden durch den repulsiven Ephringradient abgestossen und am Weiterwachsen gehindert. Auf nasalen Axonen mit einer hohen Ligandexpression sind weniger freie funktionelle EphA-Rezeptoren vorhanden, wodurch die Axone weniger sensitiv werden, so dass sie erst bei höheren Konzentrationen im Tektum abgestossen werden und ins posteriore Tektum einwachsen können (Dütting et al., 1999). Der zusätzlich gradiert verteilte Rezeptor EphA3 (hoch auf temporal) bewirkt eine Schärfung und Modulation der Rezeptorgradienten. Nach neueren Untersuchungen bei der Diskussion der Entstehung der Projektion muss auch im Hühnchen ein Überschüssigen der Axone über ihr eigentliches Ziel hinaus und anschliessendes *Backbranching* als Verfeinerung der topographischen Projektion berücksichtigt werden (Yates et al., 2001; Sakurai et al., 2002).

2. Ziel der Arbeit

Das retinotektale System als ein gut untersuchtes Beispiel einer topographischen Projektion soll an drei verschiedenen Modellorganismen (Fisch, Frosch und Huhn) untersucht werden. Charakterisiert werden soll die Rolle speziell des EphrinA5 und weiterer Lenkungsmoleküle (Netrin, BDNF, EphrinA2) beim Aufbau der retinotektalen Projektion. Angewendet werden verschiedene *in vitro* Testsysteme, mit deren Hilfe unterschiedliche Fragestellungen beantwortet werden sollen.

- Färbungen an kultivierten Axonen und Wachstumskegeln sollen Aufschluss geben über die Expression der Eph-Rezeptoren.
- Resultate aus Kollapsexperimenten gewonnen mit löslichen Formen des EphrinA5 geben einen ersten Anhaltspunkt über kollapsinduzierende Eigenschaften.
- Der Streifentest soll über repulsive oder attraktive Wirkungsweisen substratgebundener Proteine aufklären.
- Lokale Applikation von Proteinen über Bindung an Kügelchen kann folgende Fragen zu beantworten helfen: Welche Konzentrationen werden vom Wachstumskegel noch wahrgenommen? Welchen Einfluss hat das Substrat auf die Richtungswahl? Ist die Richtungswahl abhängig vom Reizort? Ist der Axonschaft noch sensitiv gegenüber Reizung oder liegt die ganze Informationsverarbeitung im Wachstumskegel? Welche Reaktion bewirkt eine gleichzeitige Reizung mit Kügelchen auf beiden Seiten des Wachstumskegels? Ist eine Reizung mit einem 30% beschichteten Kügelchen adäquat zu einer Reizung mit zwei 15% beschichteten Kügelchen?

- Eine sehr wichtige Frage, die es mit Hilfe des Diffusionsgradienten löslicher Proteine zu klären gilt, ist: Kann EphrinA5 Axone *in vitro* lenken, d.h. eine Richtungsänderung induzieren? Kann auch die künstlich löslich gemachte Form des Proteins (EphrinA5-Fc) diese Funktion ausüben? Hinweise, dass EphrinA5 an der Zielgebietsfindung und Lenkung der retinalen Axone beteiligt ist, gibt es viele, gewonnen aus *in vitro* und *in vivo* Daten. Der letztendliche Beweis einer Lenkungseigenschaft des EphrinA5 *in vitro* ist aber noch nicht erbracht.
- Abschliessend sollen die resultierenden Effekte der drei Tiermodelle untereinander auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede hin verglichen werden, um so Aussagen über mögliche Mechanismen treffen zu können.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien

BCIP (5`-Bromo-4`-chloro-3`-indoylphosphat)	Promega
BDNF (brain derived neurotrophic factor)	Gibco
Carbodiimid-Kit	Polysciences
zur Beschichtung von carboxylierten Mikropartikeln	
Carboxylierte Latex-Mikropartikel	Polysciences
2,5%ige Suspension, 4,5 µm Durchmesser	
Concanavalin A (Lectin)	Serva
EphrinA2/Fc-Konstrukt (human)	R&D-Systems
EphrinA5/Fc-Konstrukt (human)	R&D-Systems
FCS (fötales Kälberserum)	PAA Laboratories
Fibronektin	Roche
Fluoreszein	Molecular Probes
Formaldehyd	Merck
Gentamycin	Gibco
Glutamin	Gibco
HEPES	Roth
Homoarginin	Sigma
Laminin	Becton Dickinson
Leibovitz L15	Sigma
Matrigel	Becton Dickinson
Methylzellulose	Dow Chemicals
NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid)	Promega
Poly-D-Lysin	Sigma
Penicillin	Seromed
Protein A (von <i>S. aureus</i> , löslich)	Sigma
Streptomycin	Seromed
Trypsin/EDTA-Gemisch (10x)	Gibco

3.2 Puffer und Medien

Puffer und Lösungen

AP-Puffer	0,1 M Tris/HCl pH 9,5 0,1 M NaCl 5 mM MgCl ₂ in <i>Aqua dest.</i>
Hanks (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	8,0 g/l NaCl 0,4 g/l KCl 60 mg/l NaH ₂ PO ₄ 60 mg/l Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 0,35 g/l NaHCO ₃ 1,0 g/l Glucose 20 mM HEPES 10mg/l Phenolrot pH 7,4
HBHA-Puffer	0,5 mg/ml BSA 0,1% Natriumazid 20 mM HEPES pH 7,0 in Hanks A
HBS-Puffer	20 mM HEPES pH 7,0 150 mM NaCl in <i>Aqua dest.</i>
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 6,5 mM Na ₂ PO ₄ pH 7,4

Medien

E3 (Fischmedium)	5 mM NaCl 0,17 mM KCl 0,33 mM CaCl ₂ 0,33 mM MgSO ₄ 10 ⁻⁵ % Methylenblau
F12KM	50 ml FCS 10 ml Hühnchenserum 5 ml 200 mM L-Glutamin 500 µl Penicillin/Streptomycin 435 ml F12-Medium
F12MZ	F12KM-Medium 0,4% Methylzellulose
Leibovitz L15-Froschmedium	6 ml Leibovitz L15-Medium 4 ml H ₂ O 100 µl FCS 20 µl Streptomycin 50 µl Gentamycin
MBSH-Medium	88 mM NaCl 1 mM KCl 2,4 mM NaHCO ₃ 0,82 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0,33 mM Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O 0,41 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O 10 mM HEPES 10 mg/l Benzylpenicillin 10 mg/l Streptomycin pH 7,4

3.3 Antikörper

Ziege anti-humanes IgG (Fc spezifisch)	Sigma
Ziege anti-humanes IgG (Fc spezifisch) FITC-konjugiert	Sigma

3.4 Verbrauchsmaterial

Deckgläschen (Stärke 1) Ø 40 mm	Knittel Gläser
Nitrozellulose (Protran, 0,2 µm)	Schleicher & Schuell
Pap Pen	Science Service
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Tissue Tek	Sakura
Petrischalen Ø 6 cm, Ø 10 cm	Greiner
Glaskapillaren (1,0 mm O.D x 0,58 I.D standard wall, without filament), Borosilikatglas	Clark Electromedical Instruments
Membranfilter ME 25/31, Ø 47 mm, 0,45 µm ...	Schleicher & Schuell
BM flüssig	Biomed
Elastosil Silikonkautschuk	Wacker-Chemie GmbH
Metallklötzchen, 2 mm x 2 mm, 10 mm lang	Werkstatt, eigene Herstellung
Glasklötzchen	Eigene Herstellung

3.5 Mikroskope

Präparationsstereolupe	Zeiss
Axiovert 10	Zeiss
mit computergesteuertem Objektisch	Märzhäuser
und C2400-72 CCD Kamera	Hamamatsu
Filtersatz für FITC-Anregung	Zeiss
BP 450-490, FT 510, LP 520	

3.6 Software

Analysis	Soft Imaging Systems GmbH
Photoshop 5,0	Adobe

SigmaStat 2,0	SPSS, Inc.
Steuerungssoftware	Jürgen Löschinger
NIH Image (Makros)	
PC-Steuerung des Mikroskopiertischs	
PC-Steuerung der Videodisk	
Word, Excel	Microsoft

3.7 Sonstige Geräte

Analysewaage	Mettler
Brutschrank für primäre Zellkultur	Heraeus
(37°C, 4% CO ₂ , 100% Luftfeuchtigkeit)	
Gewebehacker	Mc Ilwain
Kapillarziehgerät, Model P-87	Sutter Instruments
Optische Pinzette (Laserfalle)	PALM
Diodengepumpter Festkörperlaser	
Laserleistung ca. 600 mW	
Wellenlänge 1200 nm	
Spektrometer UV-160A	Shimadzu
Steril-Werkbank (laminar flow)	Heraeus
Wasserbad Lauda B	Lauda GmbH
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf

3.8 Tiere

Hühnchen

Für die Präparation der Retinae werden Embryonen aus „White Leghorn“ (HISEX-Bruteier) verwendet, die bis zur Inkubation im Kühlschrank bei 4°C gelagert und anschliessend in einem Inkubator für Bruteier bei 37°C mit 65% Luftfeuchtigkeit bebrütet werden.

Xenopus laevis

Embryonen des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* werden durch künstliche Befruchtung erhalten (Banker and Goslin, 1993). Weibliche Frösche werden durch eine einmalige Injektion von HCG (*human chorionic gonadotropin hormone*, von Sigma) zur Eiablage stimuliert. Froschhodentestis des männlichen Tieres werden zerkleinert und in 0,1% MBSH-Medium belassen, um die Spermien beweglich zu halten. Die Spermien werden zu den abgelegten Eiern gegeben. Nach 10-15 Minuten ist die Befruchtung beendet, sichtbar durch eine Drehung der Eier, so dass der pigmentierte animale Pol oben zu liegen kommt. Anschliessend werden die Eier 10 Minuten mit 2% Cystein behandelt, um die Gallerthülle, die die Eier umgibt, zu zerstören. Nach mehrmaligem Waschen werden die Eier in 0,1% MBSH-Medium überführt, die unbefruchteten und beschädigten Eier aussortiert und die sich entwickelnden Embryonen in 0,1% MBSH-Medium bis zur Präparation belassen. Durch die Wahl der Temperatur kann die Entwicklungsgeschwindigkeit beeinflusst werden, bei 13°C halbiert sich die Entwicklungsgeschwindigkeit gegenüber Raumtemperatur.

Zebrafisch *Brachydanio rerio*

Embryonen des Zebrafisches *Brachydanio rerio* werden durch natürliche Befruchtung erhalten (Müller und Hassel, 1999). Je ein Männchen und ein Weibchen werden in einen Laichbehälter gesetzt, dessen Boden mit einem Gitter versehen ist. Durch das Gitter fallen die Eier auf den Boden des Behälters, so dass sie nicht von den gefräßigen Männchen erreicht werden können. Pro Laichakt können bis zu 100 Embryonen erhalten werden. Das Weibchen braucht dann eine Woche Erholungszeit. Die Eier werden in E3-Fischmedium, dem zur Unterdrückung von Schimmelwachstum Methylenblau zugesetzt wird (Haffter et al., 1996), in einem Inkubator bei 28°C gehalten, um eine definierte Entwicklungsgeschwindigkeit zu gewährleisten (Westerfield 1994) (Stadienbestimmung nach Kimmel et al., 1995).

3.9 Präparationsmethoden

Präparation und Kultivierung retinaler Ganglienzellen embryonaler Hühnchen

Embryonale Hühnchen aus „White Leghorn“ (HISEX) Bruteiern werden am Tag 6 dekapitiert, die Augen entnommen und diese in Hanks Lösung bis zur Präparation gelagert. Entlang der Fissur wird in das Auge eingestochen, die Pigmentschicht und der Glaskörper entfernt und die intakte Schicht der retinalen Ganglienzellen auf einem mit Concanavalin A beschichteten Rundfilter ausgebreitet (siehe Abbildung 8). Mit einem Gewebehacker wird die Retina in 275 μm breite Streifen gehackt, so dass rein temporale und rein nasale Explantate entstehen, in die beschichteten Videoschalen gelegt und an den Enden mit Metallklötzchen beschwert. Als Medium dient F12KM (1ml) ohne Zusatz von Methylzellulose. Die Explantate werden bei 37,5°C bei 4%CO₂ im Inkubator über Nacht kultiviert (Baier und Bonhoeffer, 1992).

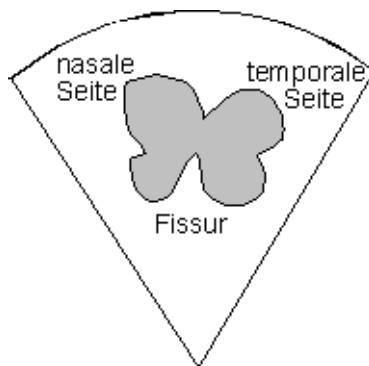


Abb. 8: Die Retina eines linken Auges ausgebreitet auf einem mit Concanavalin A beschichteten Rundfilter. Bei einem linken Auge ist die linke Seite die temporale, die rechte Seite die nasale Hälfte der Retina. Die Streifen werden so gehackt, dass rein temporale bzw. nasale Streifen entstehen.

Präparation und Kultivierung retinaler Ganglienzellen von *Xenopus*-embryonen

Zur Präparation der retinalen Ganglienzellen werden *Xenopus laevis*-Embryonen im Stadium 32 verwendet (Stadienbestimmung nach Nieuwkoop und Faber, 1956). Die Augen werden entnommen, in 30 ml Hanks Lösung mit 30 μl Gentamicin gewaschen und in die beschichteten Videoschalen überführt. Das Kulturmedium besteht aus 60% Leibovitz L15, 40% Wasser, 1% fötalem

Kälberserum und 0,01% Gentamicin. Die Explantate können ausserhalb eines Inkubators bei Raumtemperatur kultiviert werden (nach Harris et al., 1985).

Präparation und Kultivierung retinaler Ganglienzellen des Zebrafisches

Drei Tage alten Embryonen des Zebrafisches *Brachydanio rerio* werden die Augen in Ringers Lösung entnommen, die Pigmentschicht und die Linse entfernt und die verbleibende durchsichtige Ganglienzellschicht pro Auge in vier Stücke zerteilt. Acht Explantatstückchen pro Schale werden zur besseren Adsorption leicht ans Substrat (Laminin) angedrückt und bei Raumtemperatur ausserhalb eines Inkubators in L15-Medium analog *Xenopus* kultiviert (Dr. Suresh Jesuthasan, persönliche Mitteilung, Singapur).

Verschiedene Substrate zur Kultivierung der Neuronen

Die Kultivierung der Neuronen erfolgt in sogenannten „Videoschalen“, Petrischalen mit einem Durchmesser von 60 mm, in die im Zentrum ein 20 mm im Durchmesser grosses Loch gestanzt wurde, das mit einem Deckgläschen der Stärke 1 beklebt wird. Dieser Aufbau ermöglicht die Beobachtung im Phasenkontrast, die bei Verwendung unbehandelter Petrischalen aufgrund der schlechteren Optik nicht möglich wäre. Auf das Deckgläschen werden die Zellen ausgesät.

Um ein gutes Wachstum der Neuronen auf den Videoschalen zu ermöglichen, werden die aufgeklebten Deckgläschen mit unterschiedlichen wachstumsfördernden Proteinen beschichtet. Verwendet werden Poly-D-Lysin in Kombination mit Laminin (20 µg/ml), Poly-D-Lysin bzw. Laminin oder Fibronectin (20 µg/ml). Die Beschichtungen erfolgen mindestens 1 Stunde im Inkubator bei 37,5°C in 4% CO₂-Atmosphäre.

Will man eine Beschichtung verwenden, die eher die *in vivo* Situation widerspiegelt, ist Basallamina als Substrat zu empfehlen (Präparation beschrieben in Ledig et al., 1999, und Halfter et al., 1997). Sie wird aus 7 Tage bebrüteten Hühnchenretinae präpariert. Die explantierte Retina wird auf einem unbeschichteten Rundfilter ausgebreitet und mit der Retinaseite nach unten auf

ein mit Poly-D-Lysin (20 µg/ml) beschichtetes Deckgläschen aufgelegt. Nach 10 Minuten Inkubation bei 37°C und 4% CO₂-Atmosphäre kann der Filter abgenommen werden, die Basallamina bleibt als Unterlage auf dem Deckglas haften. Bis zur Explantierung der retinalen Ganglienzellen wird die Basallamina in F12KM-Medium gelagert.

3.10 Färbung mit Fusionsproteinen aus alkalischer Phosphatase und EphrinA5 auf Zellen und Wachstumskegeln in Kultur

Retinale Ganglienzellen des *Xenopus* im Stadium 28 werden explantiert und auf Matrigel für 48 Stunden bei Raumtemperatur kultiviert. Vor der Färbung wird das Kulturmedium abgenommen und die Explantate einmal mit PBS und anschliessend 3x 10 Minuten in HBHA gewaschen. Die Färbung mit Konstrukten der alkalischen Phosphatase werden analog den Protokollen von Cheng und Flanagan (1994) durchgeführt. Die Inkubation mit dem Fusionsprotein aus alkalischer Phosphatase und EphrinA5 (EphrinA5-AP) erfolgt für 2 Stunden. Nichtgebundenes Protein wird durch Waschen mit HBS (4 x 5 Minuten) entfernt und das gebundene Protein für 1,5 Minuten fixiert (in 60 % Aceton, 3,7 % Formaldehyd, 20 mM HEPES pH 7,0 in HBS). Nach mehrmaligem Waschen mit HBS (6 x 5 Minuten) werden die Phosphatasen endogener Herkunft bei 65°C im Wasserbad für 1 Stunde inaktiviert. Nach 10 minütigem Waschen mit AP-Puffer werden die Schnitte in AP-Puffer mit 10 mM Homoarginin inkubiert und zuletzt im Dunkeln mit Substratpuffer bis zur gewünschten Farbtiefe gefärbt (4,5 µl NBT/3,4 µl BCIP je ml AP-Puffer). Die Färbung wird durch Waschen mit PBS gestoppt.

3.11 Kollapstest

Im Kollapstest wird das Verhalten der Wachstumskegel vor und nach Zugabe eines löslichen, im Medium homogen verteilten Proteins oder einer Lösung suspendierter Membranpartikel in Zeitrafferaufnahmen untersucht. Die Methode wurde von Cox et al. (1990) und Raper und Kapfhammer (1990) etabliert.

Videoschalen mit Explantaten retinaler Ganglienzellaxone von Huhn bzw. *Xenopus* werden 24 Stunden nach Explantierung in einem inversen Mikroskop (Axiovert 10) eingesetzt und mit einem 63x Objektiv beobachtet. Experimente mit Hühnchenaxonen müssen in einem auf 37°C vorgeheizten Wärmezelt durchgeführt werden, um ein Überleben der Axone während des Versuchs zu gewährleisten. Bei Verwendung von *Xenopus*neuronen können die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Im Kollapsexperiment können 10-15 Wachstumskegel parallel beobachtet und Zeitrafferfilme von ihrem Wachstumsverhalten aufgenommen werden. Ein computergesteuerter Objektisch ermöglicht es, beliebige Positionen zu speichern und mit 0,1 µm Positioniergenauigkeit wiederholt anzufahren. Alle 3 Minuten werden einzelne Bilder von jeder Position gespeichert. Die einzelnen Wachstumskegel werden 30 Minuten vor und nach Zugabe der interessierenden Substanz beobachtet. Ein Wachstumskegel wird als „kollabiert“ gewertet, wenn die beweglichen Strukturen (Lamellipodium und Filopodien) verschwunden sind und ein Wachstumsstop eintritt. Oft ist die Kollapsreaktion mit einem Rückzug des ganzen Axonschaftes verbunden.

Das im Kollapsexperiment zugegebene Hühnchen-EphrinA5-Fc wird in einer Konzentration von 1 µg/ml Endkonzentration in der Videoschale eingesetzt. EphrinA5 *in vivo* ist über einen GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-Anker in der Membran verankert. Für die Experimente *in vitro* wurde der GPI-Anker durch den Fc-Teil eines IgG-Antikörpers ersetzt und damit löslich gemacht. Im Kontrollexperiment wird nur der Fc-Teil in der Konzentration 1 µg/ml zugegeben, von dem bekannt ist, dass er keinen Kollaps auslöst.

Im Experiment mit retinalen Ganglienzellaxonen des *Xenopus* wird dasselbe Hühnchenkonstrukt EphrinA5-Fc eingesetzt, da zu erwarten ist, dass die Proteine in verschiedenen Spezies hochkonserviert sind und damit auch *Xenopus*axone ein Hühnchenkonstrukt erkennen können.

3.12 Modifizierter Streifentest

Der modifizierte Streifentest dient zur Untersuchung der Lenkungseigenschaften löslicher Proteine, die ans Substrat gebunden werden. Hierbei werden nicht wie im Streifentest Tektenmembranen verwendet, sondern aufgereinigte Proteine (nach Vielmetter et al., 1990, Hornberger et al., 1999). Als Substrat dient Nitrozellulose (5 cm auf 5 cm Nitrozellulose in 12 ml Methanol gelöst, 660 µl dieser Lösung in Ø 6 cm Petrischalen getropft und über Nacht das Lösungsmittel verdampft). Eine Silikonmatrize, die 90 µm breite Kanäle enthält, wird auf das Substrat gedrückt und die erste Proteinlösung mit Hilfe einer Hamiltonspritze in die Kanäle injiziert. 100 µl einer Proteinlösung, die 8 µg/ml EphrinA5-Fc geclustert mit 80 µg/ml anti-Fc-Antikörper (FITC-konjugiert) enthält, werden in die Kanäle injiziert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschliessend wird überschüssige Proteinlösung durch Spülen der Kanäle mit Hanks A verdrängt und die Matrizen vorsichtig entfernt. Für die zweite Sorte an Proteinstreifen werden 80 µl einer Lösung von 3 µg/ml Fc-Protein geclustert mit 30 µg/ml anti-Fc-Antikörper auf die zuvor durch die Matrize bedeckte Oberfläche aufgebracht. Der zweite Antikörper ist nicht an ein Chromophor konjugiert, so dass aufgrund der einfachen Markierung der einen Streifensorte die beiden Arten von Proteinstreifen voneinander zu unterscheiden sind. In Kontrollexperimenten bestehen beide Streifen aus geclustertem Fc-Protein, wovon wiederum nur der erste der beiden Streifen markiert wird. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation wird mit Hanks gewaschen und die gesamte Fläche mit Laminin (20 µg/ml) überschichtet, um ein besseres Wachstum der Axone zu erhalten. Nach einer Stunde Inkubation wird mit Hanks gewaschen und der entstandene Streifenteppich bis zur Aussaat der Explantate in Medium aufbewahrt (zum besseren Wachstum wird Medium mit 4% Methylzellulose verwendet). Nach 48 Stunden Wachstum konnten die Explantate mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert und im Hinblick auf gestreiftes Wachstum analysiert werden.

3.13 Test mit beschichteten Latexkugelchen

Beschichtung der carboxylierten Latex-Kugelchen

Die Beschichtung der Kugelchen erfolgt nach Kuhn et al., 1995. Für die Experimente werden carboxylierte Latexkugelchen mit einem Durchmesser von 4,5 µm eingesetzt. Die Beschichtung der Kugelchen erfolgt in zwei Schritten.

Im ersten Schritt werden die Kugelchen mit Protein A mit Hilfe des Polysciences Kit (Data Sheet # 238F) beschichtet. Wichtig ist die Einwirkung von Carbodiimid, das als Kondensationsmittel wirkt und die direkte Veresterung einer OH-Gruppe des Protein A mit einer Carboxylgruppe an der Kugelchenoberfläche beschleunigt. Das Protein A wird dadurch kovalent gebunden, die übrigen freien Bindungsstellen des Kugelchens werden durch BSA abgesättigt. Die mit Protein A beschichteten Kugelchen werden in einem zweiten Schritt über Nacht bei 4°C mit einem anti-Fc-Antikörper geclusterten EphrinA5-Fc inkubiert, abzentrifugiert, in PBS gewaschen und bei 4°C gelagert. EphrinA5-Fc Verdünnungen auf den Kugelchen werden durch Inkubieren der Protein A beschichteten Kugelchen mit einer Mischlösung von gelcustertem EphrinA5-Fc und geclustertem Fc erreicht. Eingesetzt werden Kugelchen mit Beschichtungsverhältnissen von EphrinA5/Fc von 80/20, 50/50, 30/70 und 15/85.

Der Antikörper, mit dem das EphrinA5-Fc geclustert wird, ist fluoreszenzmarkiert. Durch Untersuchung im Licht der Wellenlänge 450-490 nm kann überprüft werden, ob die Kugelchenbeschichtung erfolgreich war. Versuche werden nur dann als gültig gewertet, wenn die Kugelchen im blauen Licht eine grüne Fluoreszenz zeigen.

Herstellung der Explantate für Versuche mit beschichteten Latexkugelchen

Nach Zugabe der Latexkugelchen ins Kulturmedium können diese frei diffundieren, so dass es zu einem unkontrollierten Kontakt der Wachstumskegel mit den Kugelchen kommen würde. Deshalb müssen Wachstumskegel und Kugelchen räumlich voneinander getrennt werden.

Im Falle der Hühnerkulturen geschieht dies durch Beschweren der Retinastreifen mit Metallklötzchen bzw. Glasklötzchen. Die Klötzchen wirken als Barriere für die frei diffundierenden Kügelchen. Das Glasklötzchen ermöglicht ein Beobachten des Kügelchens während der Positionierung mit Hilfe des Lasers (siehe Abbildung 9).

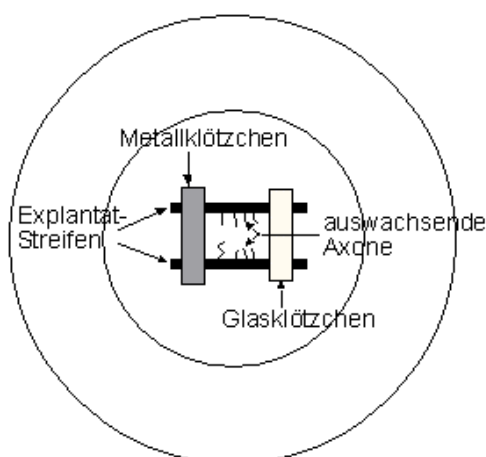


Abb. 9: Versuchsanordnung für Experimente mit der optischen Pinzette: Die auswachsenden Axone müssen räumlich von den zugegebenen Kügelchen getrennt werden. Dies geschieht mit Hilfe eines Metallklötzchens auf der der Zugabe abgewandten Seite und einem Glasklötzchen auf der der Zugabe zugewandten Seite. Das Glasklötzchen ermöglicht eine Beobachtung des Kügelchens während des Positionierens vor dem Wachstumskegel.

Damit die Xenopusexplantate, die ohne Beschweren mit Klötzchen ausgesät werden, nicht mit den diffundierenden Kügelchen in Berührung kommen, werden die Kügelchen hier in einen „Käfig“ aus zwei Filterstreifen und einem Glasklötzchen pipettiert und das Kügelchen unter dem Glasklötzchen hindurch zu den Explantaten gefahren.

Funktionsweise der optischen Pinzette

Das Laser-Mikroskop System ist ein Werkzeug zur berührungslosen, völlig sterilen, optischen Mikromanipulation. Es besteht aus dem Mikroskop, der optischen Pinzette (auch Laserfalle oder laser tweezer genannt) und einem geeigneten Laser-Mikroskop-Interface. Mit Hilfe von präzise fokussiertem Laserlicht lassen sich mikroskopisch kleine Objekte fangen und positionieren (PALM GmbH, Produktbeschreibungen). Ursache dieses Phänomens ist der Strahlungsdruck des Lasers auf die Objekte. Die eintreffenden Photonen übertragen einen Impuls, der bei einem fokussierten Laserstrahl ausreichend groß ist, um damit die mikroskopisch kleinen Teilchen zu bewegen. Durch Beugung und Brechung des Laserlichtes an der Partikeloberfläche und der

daraus resultierenden Umlenkung der Photonenimpulse entstehen Kräfte, die das Partikel in den Fokuspunkt des Lasers verschieben und dort festhalten (Ashkin, 1997).

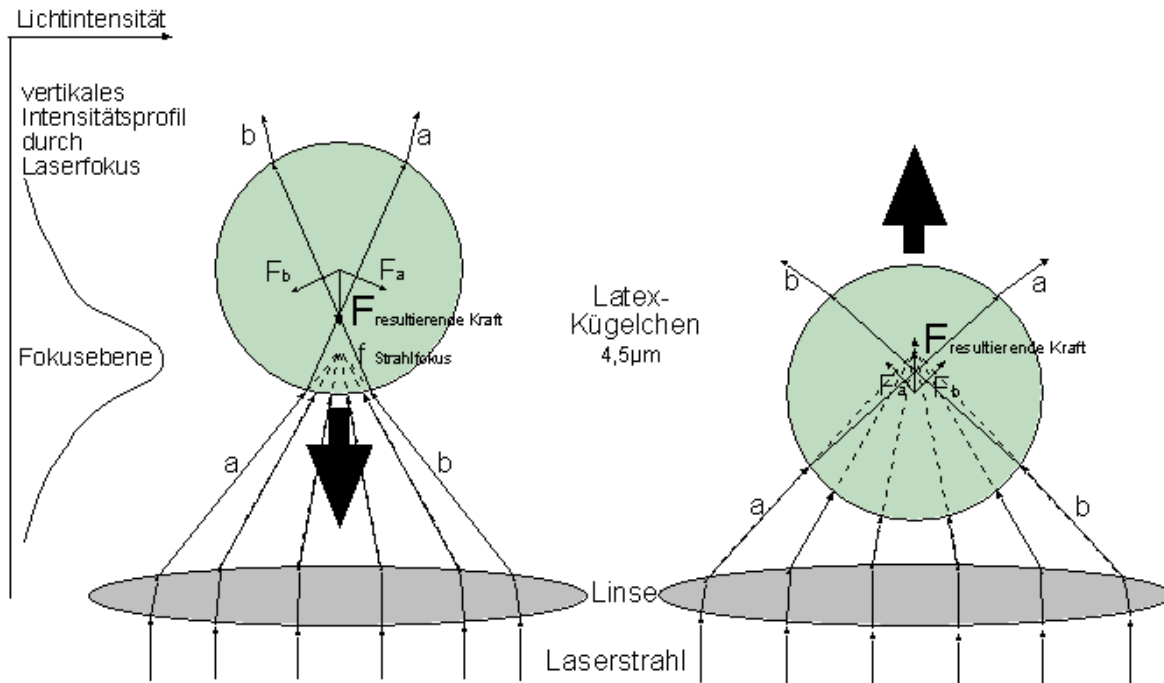


Abb. 10: Kräfte, die auf ein Mikropartikel, das oberhalb des Fokuspunktes des Laserstrahls liegt, wirken und es nach unten ziehen (links), bzw. Kräfte, die auf ein unterhalb liegendes Partikel wirken und es nach oben ziehen (rechts). Verfolgt wird jeweils der Strahlengang zweier Lichtstrahlen a und b und deren resultierenden Kräfte F_a und F_b bei der Brechung des Strahls. Diese Kräfte ergeben über ein Kräfteparallelogramm die resultierende Gesamtkraft $F_{\text{resultierende}}$, die die Kügelchen in beiden Fällen in den Fokuspunkt verschiebt.

Diese Kräfte sind dafür verantwortlich, daß sich das Partikel einmal im Fokus gefangen nicht mehr nach oben bzw. nach unten verschieben kann.

Da der Laserstrahl ein Lichtintensitätsprofil besitzt, das vom Rand des Strahls zum Zentrum hin zunimmt, wird verhindert, daß sich das Partikel nach links/rechts bzw. nach vorn/hinten verschieben kann. Partikel, die sich nicht im Zentrum des Strahls befinden, werden durch die verschiedenen starken Kräfte, hervorgerufen durch verschieden starke Leuchtintensitäten, in das Zentrum des Strahls gezogen. Der starke Intensitätsgradient des Laserlichtes fixiert somit kleine Teilchen im Zentrum des Strahls.

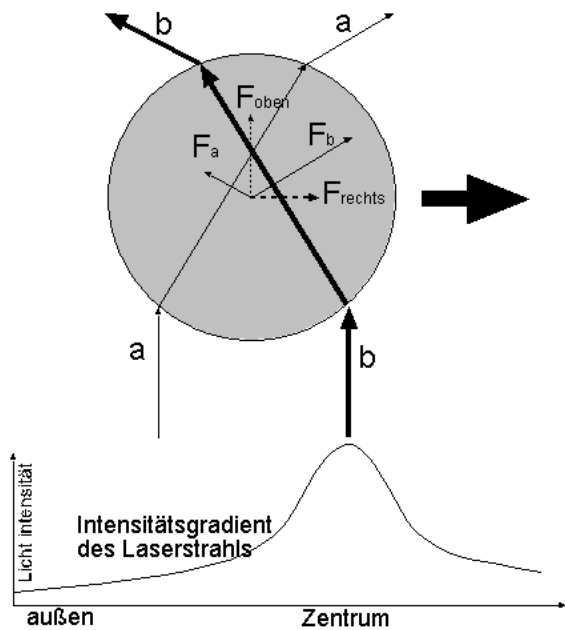


Abb. 11: Mikropartikel im Intensitätsprofil des Laserstrahls. Durch Eintreffen eines Strahls mit höherer Intensität (Strahl b) verschiebt sich das Partikel in Richtung des Intensitätsmaximums ins Zentrum des Laserstrahls und bleibt dort aufgrund des Kräftegleichgewichts fixiert. Die resultierende Kraft aus den Kräften F_a und F_b kann in die zwei Kräfte F_{rechts} und F_{oben} zerlegt werden. Die Kraft F_{oben} wirkt entgegengesetzt der Schwerkraft hebt sich zum einen mit dieser und zum anderen mit der in Abb. 10 links dargestellten Rückstellkraft auf.

Folglich wird das Partikel in allen Raumrichtungen festgehalten.

Der Laserstrahl ist in seiner Position auf der Objektebene festgelegt und kann selbst nicht bewegt werden. Um damit Mikropartikel transportieren zu können, wird das Partikel festgehalten und der Objektisch darunter weggefahren, so daß eine relative Objektbewegung durch das Verfahren des Objektisches erfolgt. Der Objektisch ist über einen Joystick in allen drei Raumrichtungen beweglich und über eine Steuerelektronik mit dem Computer verbunden.

Im Experiment wird eine Videoschale mit ausgewachsenen Explantaten unter das Mikroskop plaziert, ein Wachstumskegel angefahren und ein Kügelchen vor den auswachsenden Wachstumskegel positioniert. Alle 30 Sekunden wird ein Bild dieser Position aufgenommen. Die erhaltenen Filme können im Hinblick auf die Reaktion des Wachstumskegels ausgewertet werden. Folgende Reaktionen sind möglich: Wachstum ohne Richtungsänderung am Kügelchen vorbei, Kollaps oder Lenkung, d.h. die Wachstumsrichtung vor Kontakt mit dem Kügelchen weicht von der Richtung nach Vorbeiwachsen am Kügelchen ab. Diese Abweichung kann als Winkel gemessen und ausgewertet werden.

3.14 Herstellung des Diffusionsgradienten löslicher Proteine

Herstellung der Mikrokapillaren

Um einen Diffusionsgradienten aufzubauen, werden Mikrokapillaren mit Spitzendurchmessern bis 1 μm benötigt. Dazu werden Borosilikatglaskapillaren (Clark Electromedical Instruments, 1 mm Aussen-, 0,58 mm Innendurchmesser, ohne Filament) verwendet, deren Spitze in einem fünfstufigen Prozess ausgezogen wird. Einem Programm folgend, in dem die Parameter Hitze, Ziehstärke, Geschwindigkeit und Gasströmung eingestellt werden können, entstehen zwei symmetrische Kapillaren. Im vorliegenden Gerät (Sutter Instruments Company, USA, Model P-87, Flaming/Brown Micropipette Puller) wurden die Parameter [Wert des Ramptests/0/18/100] ermittelt, die reproduzierbar zu Spitzendurchmessern unter 5 μm führen.

Herstellung des Diffusionsgradienten

Die Herstellung von Diffusionsgradienten löslicher Proteine wurde zum ersten Mal von Lohof et al., 1992 und Zheng et al., 1994 in der Literatur beschrieben. Analog wurde eine ähnliche Anlage zur Erzeugung von Diffusionsgradienten löslicher Proteine aufgebaut.

Die Videoschalen mit den Explantaten werden auf dem Mikroskopisch eines Axiovert 10 der Firma Zeiss justiert, ein aktiver Wachstumskegel ausgewählt und über ein 40x Objektiv beobachtet. Die Mikropipette wird mit 4 μl einer Lösung der zu untersuchenden Substanz befüllt und so über einen Mikromanipulator (Firma Leitz Wetzlar) positioniert, dass der beobachtete Wachstumskegel 100 μm entfernt in einem Winkel von 45° in Bezug auf die ursprüngliche Auswachsrichtung des Axonschafts zu liegen kommt. Durch Anlegen eines Drucks von 3 psi für 20 ms mit einer Frequenz von 2 Hz (Pulsgenerator PM 5715 von Philips, Pneumatic PicoPump PV 820) wird die Substanz in das Nährmedium abgegeben und erreicht den Wachstumskegel über Diffusion. Seine Reaktion wird während der Versuchsdauer alle fünf Minuten

über eine CCD-Kamera (Firma AIT Göhner GmbH, Stuttgart), die mit einem Computer verbunden ist, dokumentiert. Um den Gradienten sichtbar zu machen, wird Fluoreszein (0,1 mM) in die Proteinlösung gemischt. Abbildung 12 zeigt den gesamten Versuchsaufbau und eine Detailansicht der Anlage. Ausserdem ist gezeigt, wie die Mikrokapillare in Bezug auf die Wachstumskegel positioniert wird (siehe Abbildung 13).



Abb. 12: Anlage zur Erzeugung von Diffusionsgradienten löslicher Proteine. Links ist die gesamte Anlage zu sehen, rechts eine Detailansicht. Das inverse Mikroskop ist auf einem schwingungsgedämpften Tisch in einem beheizbaren Wärmezelt untergebracht. Die Axone, kultiviert in Videoschalen, werden über eine CCD-Kamera fotografiert. Über einen Mikromanipulator kann eine Mikropipette exakt vor den auswachsenden Wachstumskegel positioniert werden. Über einen angeschlossenen Frequenzgenerator werden Druckpulse auf die Kapillare aufgebracht, die die Lösung aus der Pipette austossen. Retinale Ganglienzellaxone des Hühnchens müssen während der gesamten Versuchsdauer mit CO_2 begast und auf $37,5^\circ\text{C}$ gehalten werden. Retinale Ganglienzellaxone des Xenopus und des Zebrafisches benötigen keine zusätzliche CO_2 -Versorgung und können bei Raumtemperatur untersucht werden.

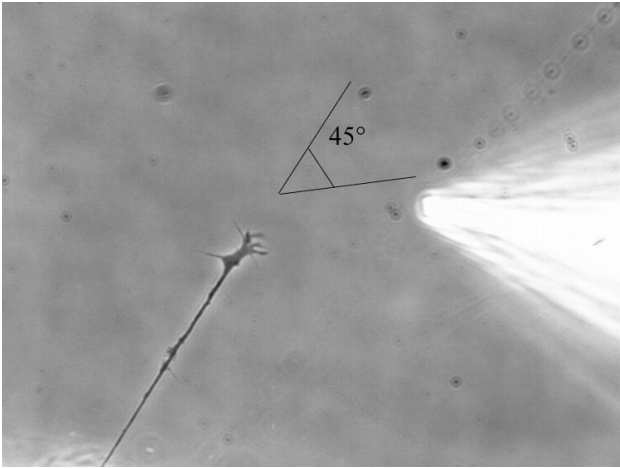


Abb. 13: Die Kapillare wird mit Hilfe eines Mikromanipulators in 100 μm Entfernung in einem Winkel von 45° in Bezug auf die ursprüngliche Auswachsrichtung positioniert. Der Spitzendurchmesser der Kapillare liegt bei ca. 1 μm . Nach Start des Gradienten werden alle 3-5 Minuten Bilder des Wachstumskegels aufgenommen, aus deren Abfolge nach Auswertung entschieden werden kann, ob die Substanz in der Kapillare repulsiv oder attraktiv wirkt oder keinen Einfluss auf die Wachstumsrichtung ausübt.

Die Versuche mit retinalen Ganglienzellaxonen des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) und des Zebrafisches (*Brachydanio rerio*) können bei Raumtemperatur ohne zusätzliche CO_2 -Versorgung durchgeführt werden, da im Leibovitz L15-Medium ein Puffersystem enthalten ist. Retinale Ganglienzellaxone des Hühnchens dagegen benötigen eine externe CO_2 -Versorgung aufgrund des im Medium enthaltenen Carbonatpuffersystems und eine Thermostatisierung auf $37,5^\circ\text{C}$ auch während des Experiments, die durch eine CO_2 -Anlage und ein beheizbares Wärmezelt gewährleistet wird.

Im Diffusionsgradienten werden verschiedene Proteine getestet, die unterschiedlichen Lenkungsmolekülklassen angehören: EphrinA5 und EphrinA2, Netrin-1 und BDNF (brain derived neurotropic factor, das zur Klasse der Neurotrophine gehört). Versuche werden jeweils mit retinalen Ganglienzellaxonen des Hühnchens, des Xenopus und des Zebrafisches durchgeführt. Variiert wird im Versuch mit Hühnchenaxonen zusätzlich die Beschichtung (Laminin, Basallamina, Fibronectin) und das Alter der explantierten Retinae (im Falle der Netrinversuche E5 bzw. E6).

Ausgewertet werden die Wachstumsrichtung der Wachstumskegel in Bezug auf die Kapillare und die Wachstumslänge während des Versuchs. Daraus ergeben sich Winkel-Endpunkt-Diagramme. Aus der Wachstumsrichtung kann

entschieden werden, ob die Axone mit Repulsion oder Attraktion auf die aus der Kapillare austretende Substanz reagieren, oder ob keine Richtungsänderung im Vergleich zur ursprünglichen Wachstumsrichtung vorliegt. Aus den sich ergebenden Winkeln kann ein Winkelmittelwert mit Standardabweichung berechnet werden. Aus den Winkelwerten kann eine Kumulationsverteilung der Winkel konstruiert werden, deren eventuelle Verschiebung (im Lenkungstest) bezüglich der Kontrollkurve (aufgenommen ohne lenkende Substanz) eine Aussage über die Richtungswahl der Axone machen kann.

4. Ergebnisse

Untersucht wurde die retinotektale Projektion dreier Spezies: von Frosch (*Xenopus laevis*), Hühnchen und Zebrafisch (*Brachydanio rerio*). Mit Hilfe von bereits etablierten *in vitro* Testsystemen wurde die Rolle speziell des EphrinA5 charakterisiert, eines Proteins, das an der axonalen Lenkung ins Zielgebiet, dem optischen Tektum, beteiligt ist, und untersucht, inwieweit dieses EphrinA5 lenkende Eigenschaften besitzt. Neben EphrinA5 wurden andere Proteine aus bereits bekannten Lenkungsmolekülklassen (Netrin, BDNF) getestet. Ein Vergleich der unterschiedlichen Modellsysteme sollte Aufschlüsse über die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Mechanismen der Axonlenkung in Amphibien, Vögeln und Fischen geben.

4.1 Die retinotektale Projektion in Xenopus

Färbung von Axonen und Wachstumskegeln mit EphrinA5-AP zur Expressionsanalyse der EphA-Rezeptoren

Um durch EphrinA5 eine spezifische Reaktion der Wachstumskegel des *Xenopus* auslösen zu können, müssen auf den Axonen und Wachstumskegeln die entsprechenden Rezeptoren exprimiert sein. EphrinA5 gekoppelt an alkalische Phosphatase wird benutzt, um diese Rezeptoren sichtbar zu machen. Nakagawa et al., 2000 fand eine Expression von EphA-Rezeptoren in der ventrotemporalen Retina, die in Richtung ventronasal abnimmt und eine scharfe Grenze an der Fissur bildet. Diese Daten wurden aus intakten Gewebe-Färbungen erhalten.

Die hier gezeigten Nachweisreaktionen für Ephrinrezeptoren sind Färbungen der Axone und Wachstumskegel in Kultur. Die Färbereaktion beruht auf einer Rezeptor/Ligand-Wechselwirkung und ist sehr spezifisch. Eine Dunkelfärbung zeigt die Expression der Rezeptoren an. Im Kontrollexperiment, bei dem unkonjugierte alkalische Phosphatase zugegeben wird, bleiben die Axone ungefärbt.

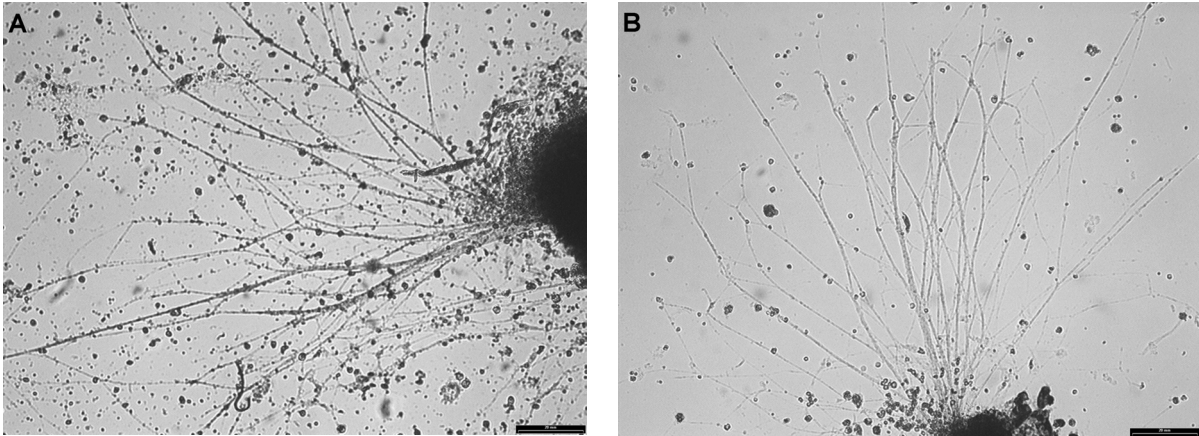


Abb. 14: Färbung retinaler Ganglienzellaxone und Wachstumskegel des *Xenopus*, die 48 Stunden auf Matrigel gewachsen waren, mit EphrinA5-AP (alkalische Phosphatase) (A) oder AP als Kontrolle (B). Mit dem EphrinA5-AP werden EphA-Rezeptoren angefärbt. Bei Zugabe von EphrinA5-AP ins Medium werden Axone und Wachstumskegel angefärbt, im Kontrollexperiment bei Zugabe von ungekoppelter Phosphatase sind sie ungefärbt.

Die hier abgebildete Färbung zeigt deutlich, dass EphA-Rezeptoren exprimiert sind. Dieser Befund bildet die Grundlage für alle folgenden *in vitro* Versuche. Denn nur bei Expression der Rezeptoren sind die Axone und Wachstumskegel prinzipiell sensitiv auf EphrinA5, das in den folgenden *in vitro* Systemen getestet wird.

Reaktion retinaler Ganglienzellaxone des *Xenopus* im Kollaps- experiment

Im sogenannten Kollapsexperiment können 10-15 Wachstumskegel parallel vor und nach Zugabe der interessierenden Substanz beobachtet und ihre Reaktion auf die Substanz ausgewertet werden.

Getestet wird EphrinA5, ein Protein, das im Hühnchensystem Kollaps auslöst und bei der Zielfindung der retinalen Ganglienzellaxone in ihr Zielgebiet, dem optischen Tektum, beteiligt zu sein scheint.

Erstmals wurde EphrinA5 im *Xenopus*system auf seine kollapsinduzierende Wirkung getestet. Die Vermutung lag nahe, dass auch hier ein Effekt zu sehen sein würde, da das Ephrinsystem in vielen anderen Versuchstieren (wie Maus, Huhn, Zebrafisch) exprimiert ist. EphrinA5 wird als lösliches Fc-Konstrukt homogen im Medium verteilt. Als Kontrollsubstanz, die keinen Kollaps induzieren soll, bot sich das reine Fc-Protein an. Beide Proteine werden in einer

Endkonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Durch Erhöhung der Konzentration von EphrinA5-Fc konnte eine Dosisabhängigkeit der Kollapsreaktion gezeigt werden.

Die folgenden Abbildungen zeigen Wachstumskegel vor und nach Zugabe des Fc oder EphrinA5-Fc.

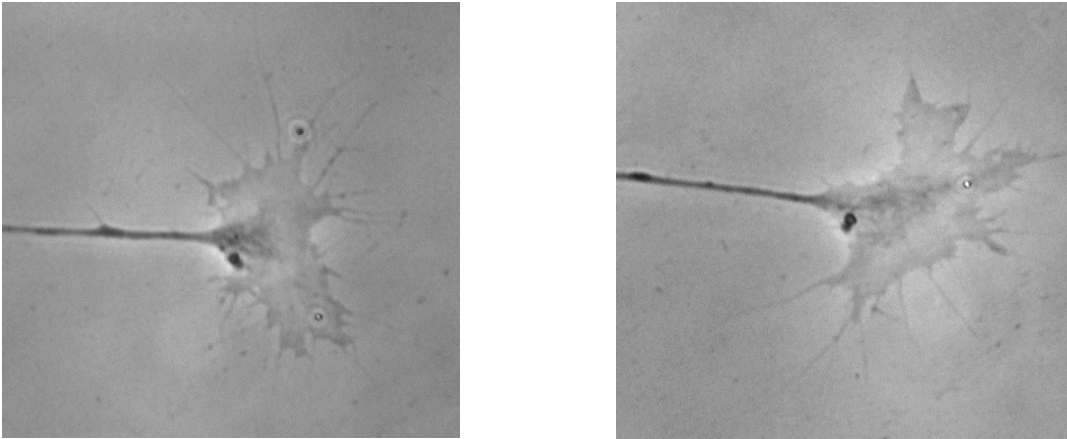


Abb. 15: Kontrollexperiment mit retinalen Ganglienzellaxonen des *Xenopus* auf Laminin als Substrat. Im Kontrollexperiment wird Fc in einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ zum Medium zugegeben, das keinen Kollaps auslösen sollte. Der hier gezeigte Wachstumskegel wächst nach Zugabe ohne Kollapsreaktion weiter.

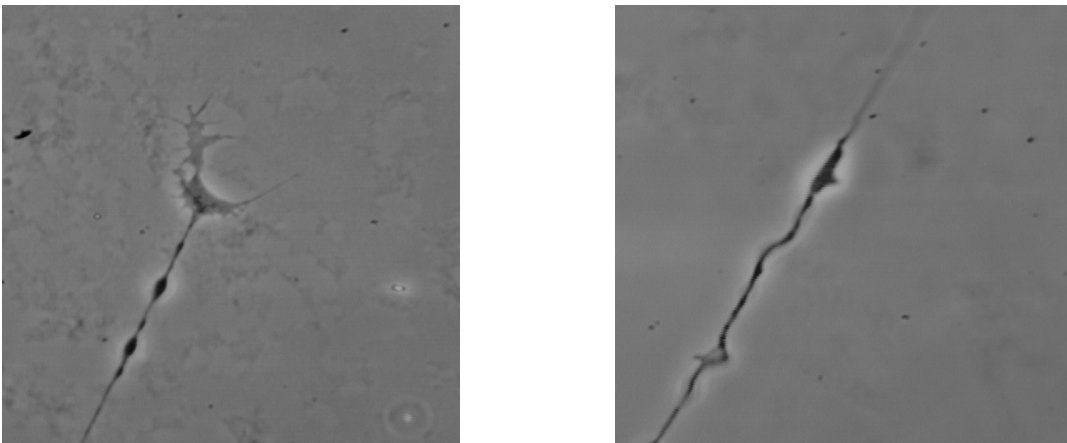


Abb. 16: Kollapsexperiment mit retinalen Ganglienzellaxonen des *Xenopus* auf Laminin als Substrat. Im Experiment wird EphrinA5-Fc in einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ zum Medium zugegeben. Der hier gezeigte Wachstumskegel wächst nach Zugabe von EphrinA5-Fc noch für weitere 9 Minuten weiter und reagiert dann mit einem dramatischen Rückzug auf das EphrinA5-Fc. Das Lamellipodium und die Filopodien werden eingezogen und der ganze Axonschaft zurückgezogen.

Durch Zugabe von Fc-Protein in Kontrollexperimenten ändert sich die Form des Wachstumskegels nicht, er wächst mit gleicher Geschwindigkeit unbeeinflusst

weiter. Bei Zugabe von EphrinA5 dagegen fällt die Reaktion sehr dramatisch aus: die Filopodien und das Lamellipodium, beides bewegliche Strukturen, mit denen der Wachstumskegel seine Umgebung nach Lenkungsmolekülen absuchen kann, werden komplett eingezogen. In manchen Fällen, wenn die Reaktion sehr dramatisch ausfällt, beginnt sich der ganze Axonschaft zurückzuziehen. Die Prozentzahlen der Wachstumskegel, die auf Zugabe von EphrinA5 mit Kollaps reagiert haben, sind aus folgender Tabelle ersichtlich:

Experiment	Gesamtzahl der beobachteten Wachstumskegel	Zahl der kollabierten Wachstumskegel	Kollapshäufigkeit in Prozent
Kontrolle (1 µg/ml Fc ungeclustert)	74	7	9%
EphrinA5 (1 µg/ml ungeclustert)	158	70	44%
EphrinA5 (5 µg/ml geclustert)	29	23	80%
EphrinA5 (20 µg/ml ungeclustert)	26	23	88%

Tabelle 1: Auswertung des Kollapsexperiments mit retinalen Ganglienzellaxonen des *Xenopus*. Durch Zugabe von Kontrollprotein Fc ergibt sich eine Kollapshäufigkeit von 9%, die einer unspezifischen Hintergrundkollapshäufigkeit entspricht. Bei Zugabe von EphrinA5-Fc reagieren die Wachstumskegel spezifisch mit Kollaps. Die Kollapshäufigkeit ist konzentrationsabhängig. Mit steigender Konzentration an zugegebenem EphrinA5-Fc steigt die Kollapsreaktion an. Das EphrinA5-Fc wird mit einem anti-Fc-Antikörper aggregiert angeboten (= "geclustert") oder ungeclustert angeboten.

Die durchgeführten Kollapsexperimente zeigen, dass EphrinA5 in der Lage ist, eine spezifische Kollapsreaktion in retinalen Ganglienzellwachstumskegeln des *Xenopus* zu induzieren. Die Kollapsreaktion ist dosisabhängig und wird in 94% aller beobachteten Fälle innerhalb der ersten 40 Minuten ausgelöst.

Wachstum von Axonen des *Xenopus* im Streifenfest

Während im Kollapstest lösliche Proteine oder Membransuspensionen auf ihre kollapsinduzierenden Eigenschaften untersucht werden, können im Streifenfest substratgebundene Proteine auf ihre möglichen Lenkungsfähigkeiten hin untersucht werden. Anders als im herkömmlichen Streifenfest, bei dem verschiedene Arten von Tektummembranen in alternierenden Bahnen auf Membranfilter gesaugt werden, werden im sogenannten modifizierten Streifenfest gereinigte Proteine direkt auf eine Unterlage adsorbiert. Eine Streifenorte enthält EphrinA5-Fc, die andere reines Fc-Protein.

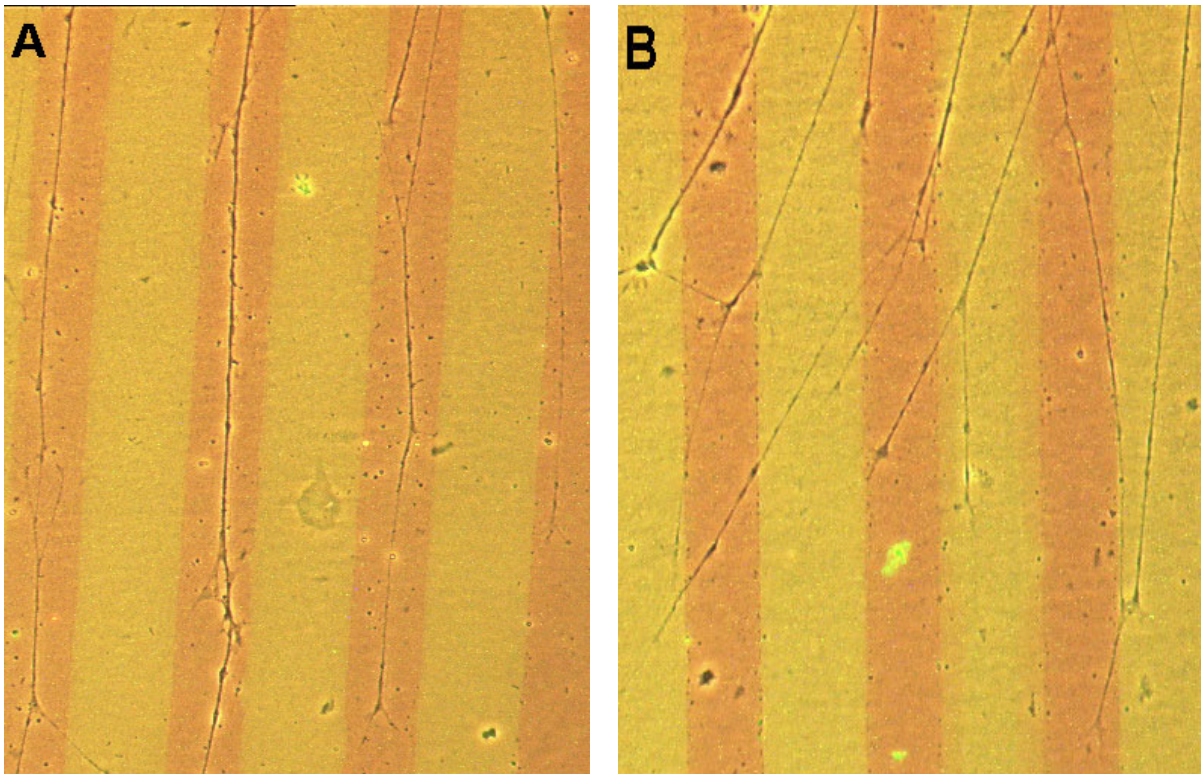


Abb. 17: Modifizierter Streifenfest mit retinalen Ganglienzellaxonen des *Xenopus*. (A) Zum Test der Lenkungseigenschaften des EphrinA5 werden zwei alternierende Bahnen, eine mit EphrinA5, die andere mit Kontrollprotein Fc, auf eine Nitrozelluloseunterlage aufgebracht. Die Axone vermeiden die EphrinA5 enthaltenden Bahnen und wachsen auf Kontrollproteinstreifen. Zur Unterscheidung der beiden Streifen wird zum ersten Streifen ein fluoreszierender Antikörper gemischt. (B) Im Kontrollversuch bestehen beide Bahnen aus demselben Kontrollprotein. Die Axone ignorieren die gestreifte Unterlage und wachsen quer über die Bahnen hinweg, ohne eine Bahn zu bevorzugen.

In der obigen Abbildung ist der EphrinA5 enthaltende Streifen gelb, der Streifen mit Kontroll-Fc-Protein rot gefärbt. Es wird deutlich, dass die retinalen Ganglienzellaxone des *Xenopus* die EphrinA5 enthaltenden Bahnen vermeiden und auf den Kontrollprotein enthaltenden Bahnen wachsen. EphrinA5 übt eine repulsive Aktion auf die Axone aus. Dadurch werden sie in gerade Bahnen gelenkt, die ihrem natürlichem Kurvenwachstum entgegenwirken. In Kontrolleexperimenten ist kein solches Streifenwachstum erkennbar, die Axone wachsen quer über beide Streifenarten hinweg.

Nachteilig an diesem System ist, dass nur der fixierte Endzustand nach 24 Stunden in Kultur beobachtet werden kann, d.h. das gestreifte Wachstum der Axone. Ob das gestreifte Auswachsen durch wiederholten Kollaps an den Streifenrändern oder durch tatsächliche Lenkung im Sinne einer Richtungsänderung entsteht, bleibt ungeklärt. Zur Klärung des zugrundeliegenden Mechanismus ist eine lokale Konzentration an EphrinA5 in Form beschichteter Kügelchen geeignet, um die Reaktion des Wachstumskegels bei Auftreffen auf dieses lokal gebundene EphrinA5 in Zeitrafferaufnahmen beobachten zu können. Der im folgenden vorgestellte Lenkungstest mit EphrinA5-beschichteten Kügelchen stellt ein solches System dar.

Lenkung von Axonen des *Xenopus* an EphrinA5-Fc beschichteten Kügelchen

Im Lenkungstest mit Kügelchen werden anders als im Streifentest, bei dem das ganze Explantat beobachtet wird, einzelne Wachstumskegel gezielt mit einem beschichteten oder in Kontrolleexperimenten mit einem unbeschichteten Kügelchen konfrontiert und ihre Reaktion auf das Kügelchen alle 30 Sekunden während der gesamten Versuchsdauer dokumentiert. Als Beschichtung der Kügelchen wird 80% EphrinA5-Fc gewählt, das mit 20% Fc-Protein gemischt wird.

Ein Wachstumskegel gilt als gelenkt, wenn die Wachstumsrichtung nach Kontakt um mindestens 20° von der ursprünglichen Wachstumsrichtung abweicht (ein Beispiel siehe Abbildung 18). Eine andere mögliche Reaktion ist eine Kollapsreaktion nach Kontakt (siehe Abbildung 19). Die Reaktion auf unbeschichtete Kontrollkügelchen sollte im Idealfall ein unbeeinflusstes Vorbeiwachsen am Kügelchen ohne Richtungsänderung sein, wie in Abbildung 20 gezeigt wird.

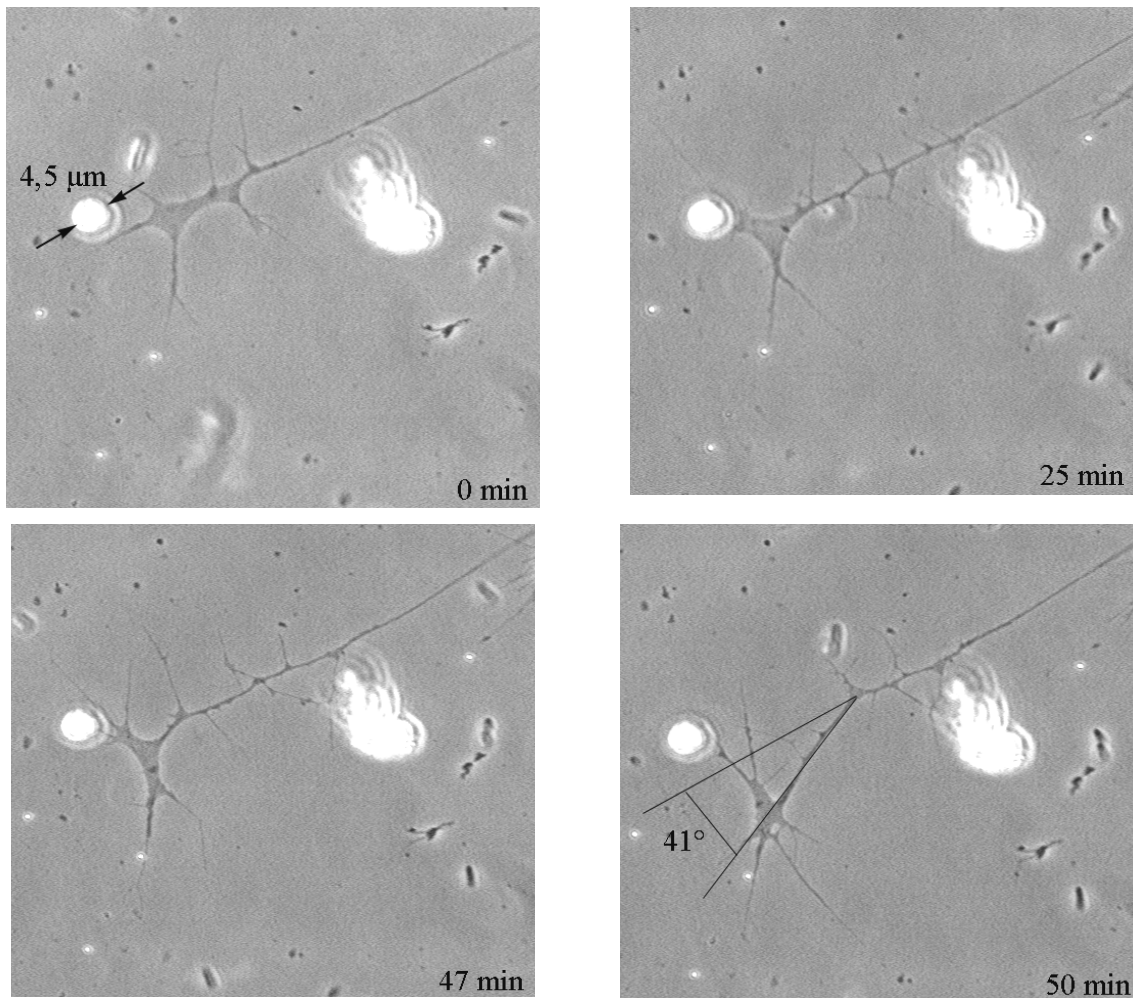


Abb. 18: Beispiel einer Lenkung eines retinalen Ganglienzellwachstumskegels von Xenopus. Das mit 80% EphrinA5 beschichtete Kügelchen wird vor den auf Laminin wachsenden Wachstumskegel plziert. Nach 25 Minuten erfolgt ein erster Kontakt mit dem Kügelchen. Nach weiteren 22 Minuten wendet sich der Wachstumskegel bereits ab von seiner ursprünglichen Wachstumsrichtung. Nach insgesamt 50 Minuten ist eine deutliche Richtungsänderung sichtbar, es resultiert ein Ablenkungswinkel von 41° .

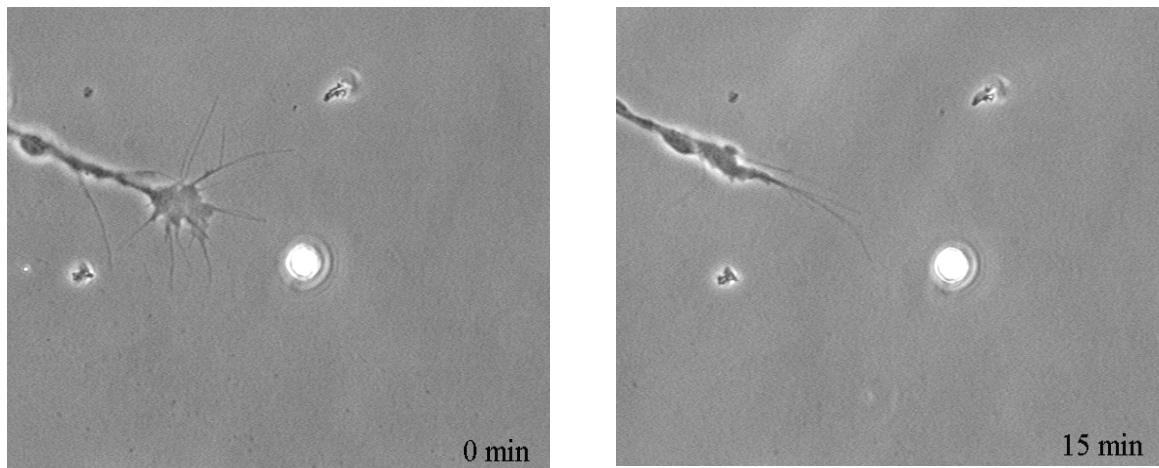


Abb. 19: Beispiel eines kollabierenden Xenopus-Wachstumskegels. Nach Berühren des Kügelchens zieht sich der Wachstumskegel innerhalb von 15 Minuten zurück, wobei die motilen Strukturen, das Lamellipodium und die Filopodien, ebenfalls eingezogen werden.

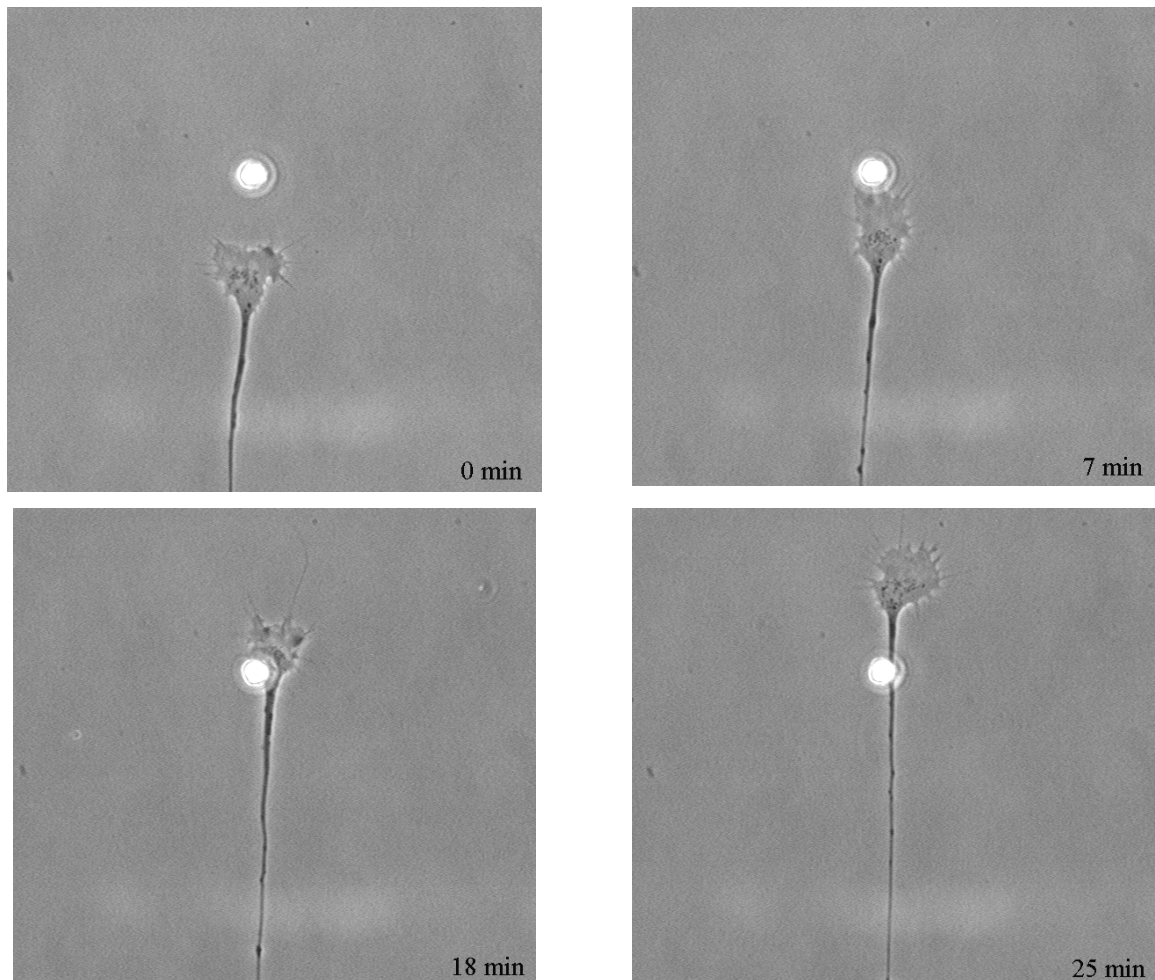


Abb. 20: Ein Wachstumskegel wird mit einem unbeschichteten Kontrollkügelchen konfrontiert. Er wächst ohne Richtungsänderung unbeeinflusst am Kügelchen vorbei.

Nach Auswertung der aufgenommenen Sequenzen und Messung der Winkel, die sich zwischen der Ursprungswachstumsrichtung und der Richtung nach Passieren des Kügelchens ergeben, resultiert folgendes Ergebnis (Abbildung 21):

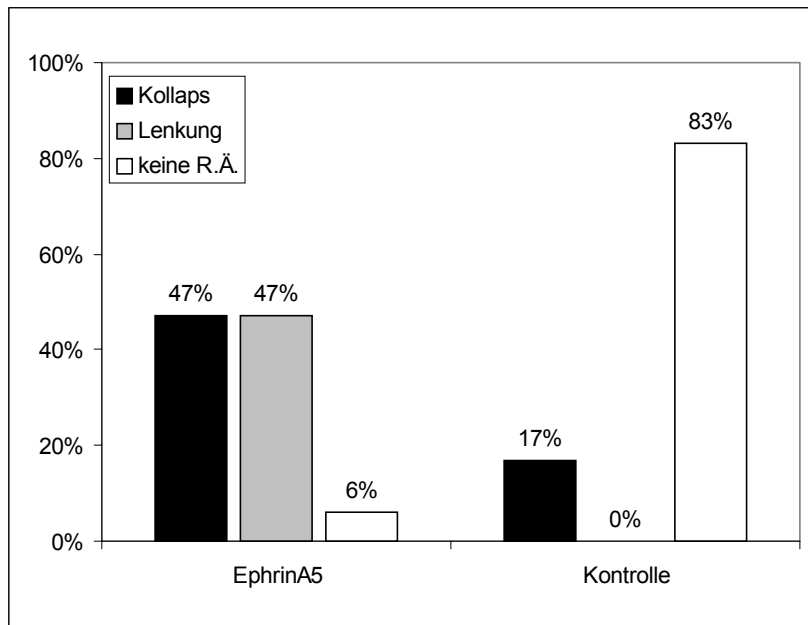


Abb. 21: Retinale Ganglienzellaxone des *Xenopus* auf Laminin werden mit Kügelchen konfrontiert, die mit 80% EphrinA5-Fc beschichtet sind. In Kontrollexperimenten werden unbeschichtete Kügelchen verwendet. Hier überwiegt das unbeeinflusste Vorbeiwachsen am Kügelchen ohne Richtungsänderung (R.Ä.). Bei Verwendung beschichteter Kügelchen reagieren 47% der Wachstumskegel mit Lenkung und der gleiche Anteil mit Kollaps. Als Lenkung wird die Reaktion bezeichnet, bei der die Wachstumsrichtung des Wachstumskegels nach Passieren des Kügelchens um mehr als 20° von der ursprünglichen Wachstumsrichtung abweicht.

In Kontrollversuchen überwiegt das unbeeinflusste Vorbeiwachsen ohne Richtungsänderung (83%). In 17 % der Fälle kommt es trotz Verwendung von unbeschichteten Kügelchen zu einer unspezifischen Kollapsreaktion.

Bei Verwendung von mit EphrinA5 beschichteten Kügelchen dagegen wachsen nur 6% der Axone ohne Richtungsänderung am Kügelchen vorbei. Alle anderen Wachstumskegel zeigen entweder eine Kollapsreaktion oder werden durch das EphrinA5 von ihrer ursprünglichen Wachstumsrichtung abgelenkt.

Misst man den Winkel, der sich zwischen der ursprünglichen Wachstumsrichtung und der Richtung nach Passieren des Kügelchens ergibt,

und bildet den Mittelwert aller gemessener Winkel pro EphrinA5-beschichteten bzw. unbeschichteten Kügelchen, so ergibt sich eine durchschnittliche Richtungsänderung nach Kontakt mit EphrinA5 von 41° im Gegensatz zu 6° in den Kontrollen. Das heisst, dass EphrinA5, immobilisiert an das Kügelchen gebunden, in der Lage ist, eine Richtungsänderung zu induzieren, d.h. Wachstumskegel zu lenken. Die Lenkung kann in diesem Versuchsansatz bei Plazierung der Kügelchen direkt vor die auswachsenden Wachstumskegel nur in Richtung weg vom Kügelchen erfolgen. Die Bezeichnung „Repulsion“ in diesem Zusammenhang wäre deshalb irreführend.

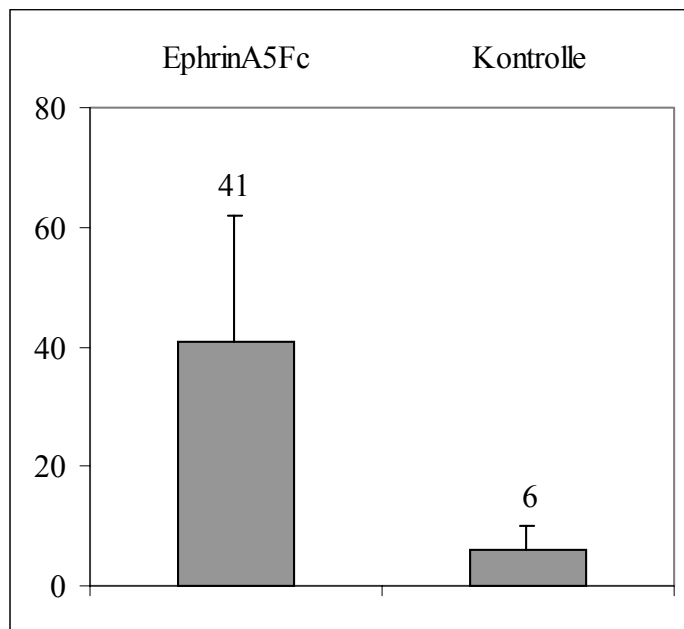


Abb. 22: Bildung der Mittelwerte aller gemessenen Winkel in Versuchen mit EphrinA5-Fc bzw. unbeschichteten Kontroll-Kügelchen. Wachstumskegel von *Xenopus*, die auf ein mit EphrinA5 beschichtetes Kügelchen treffen, zeigen eine durchschnittliche Ablenkung von 41° , in Kontrolleexperimenten dagegen beträgt der Winkel nur 6° (Ergebnisse signifikant unterschiedlich nach Man-Whitney-Test $p < 0,001$).

Wachstum retinaler Axone des *Xenopus* im Diffusionsgradienten löslicher Proteine

In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass EphrinA5 in substratgebundener Form, sei es gebunden an eine Kügelchenoberfläche oder gebunden an eine Nitrozellulosebeschichtung einer Petrischale, in der Lage ist, Wachstumskegel zu lenken. Eine wichtige Frage bleibt zu klären: ist EphrinA5 auch in löslicher Form befähigt zu lenken?

Ein System zum Test auf Lenkungseigenschaften löslicher Proteine wurde von Muming Poo und Mitarbeitern etabliert (Lohof et al., 1992, Zheng et al., 1994). Eine Mikropipette wird mit der zu untersuchenden Proteinlösung befüllt und über einen Mikromanipulator vor die auswachsenden Wachstumskegel positioniert. Durch Anlegen von Druckpulsen wird die Substanz in das Nährmedium abgegeben und erreicht den Wachstumskegel über Diffusion.

In der Literatur sind zahlreiche Experimente veröffentlicht, in denen die verschiedensten Proteine auf Lenkung getestet wurden. Dabei handelte es sich bisher ausschliesslich um *in vivo* sekretierte, d.h. lösliche Proteine. Untersucht wurden verschiedenen Klassen an Lenkungsmolekülen wie Netrine (Torre et al., 1997, Ming et al., 1997, Höpker et al., 1999 and Hong et al., 2000), Semaphorine (Song et al., 1998, Tamagnone et al., 1999), Neurotrophine (Ming et al., 1997, 1999) und Neurotransmitter (Zheng et al., 1994, 1996) (Review von Song et Poo, 1999). Die interessante Frage im Zusammenhang mit Ephrinen ist, ob die *in vivo* membranverankerten, zum Test *in vitro* aber künstlich löslich gemachten Proteine trotz Verlust ihrer Membranbindung in der Lage sind, eine Lenkungsfunktion *in vitro* zu erfüllen.

Während der gesamten Versuchsdauer wird die Wachstumsrichtung und -länge der Wachstumskegel dokumentiert. Nach Aufnahme der Wachstumstrajektorien lassen sich Winkel-Endpunkt-Diagramme konstruieren. Ein Beispiel eines solchen Diagrammes ist in Abbildung 23 zu sehen. Im Kontrollexperiment liegen die Endpunkte statistisch um den 0°-Winkel verteilt. Wird dagegen ein Neurotrophin, BDNF (brain derived neurotrophic factor, 50 µg/ml), in die Kapillare gefüllt und der Gradient gestartet, reagiert die grösste Anzahl an Wachstumskegeln mit Repulsion, was an der Verschiebung der Endpunkte in Richtung negativer Winkel zu erkennen ist. Dieses Experiment mit BDNF und auch das in der folgenden Kumulationsverteilung auftretende Netrin-1 dienen als Kontrolle, ob die Anlage reproduzierbar arbeitet. Es wurden Experimente durchgeführt, die bereits in der Literatur beschrieben wurden (Höpker et al., 1999). In beiden Fällen zeigten die Axone ein repulsives Verhalten nach Start

des Gradienten. In Kontrollexperimenten, in denen die Kapillare keine lenkende Substanz enthielt, trat keine Richtungsänderung der Axone auf.

Aus den gemessenen Winkeln im Diffusionsgradienten kann eine Kumulationsverteilung der Winkel berechnet werden. Die Tendenz, die bereits im Winkel-Endpunkt-Diagramm zu sehen war, wird jetzt deutlich: die Substanzen BDNF und Netrin-1 bewirken beide eine Verschiebung der Kumulationskurven auf die Seite negativer Winkel und wirken damit repulsiv auf retinale Ganglienzellaxone des Xenopus (Abbildung 24).

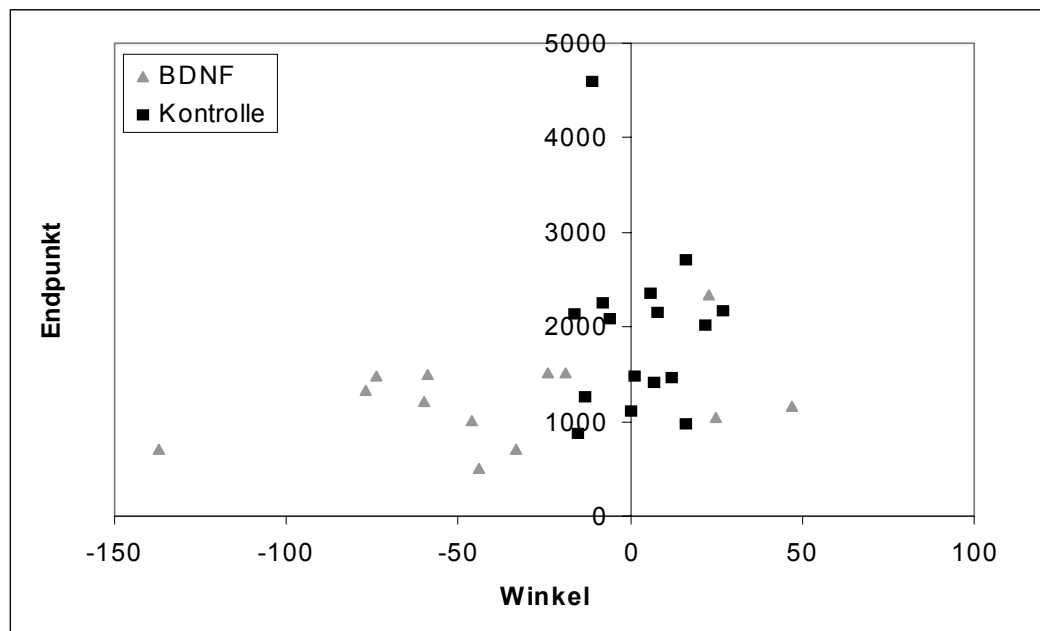


Abb. 23: Beispiel eines Winkel-Endpunkt-Diagramms. Gezeigt sind Kontrollexperimente, in denen keine lenkende Substanz, sondern reines Medium in der Kapillare vorliegt, und BDNF-Versuche. Die Punkte im Diagramm ergeben sich aus den aufgenommenen Trajektorien der Bildsequenzen. Der Winkel, der auf der x-Achse aufgetragen ist, wird zwischen der ursprünglichen Wachstumsrichtung des Axons vor Aufbau des Gradienten und der Wachstumsrichtung nach Versuchsende gemessen. Der Endpunkt ergibt sich aus der zurückgelegten Wachstumsstrecke. In Kontrollexperimenten sind die Endpunkte statistisch um 0° verteilt. Bei Befüllen der Kapillare mit BDNF dagegen liegt der Grossteil der Endpunkte auf Seiten der Repulsion (Signifikanz nach Man-Whitney $p = 0,005$).

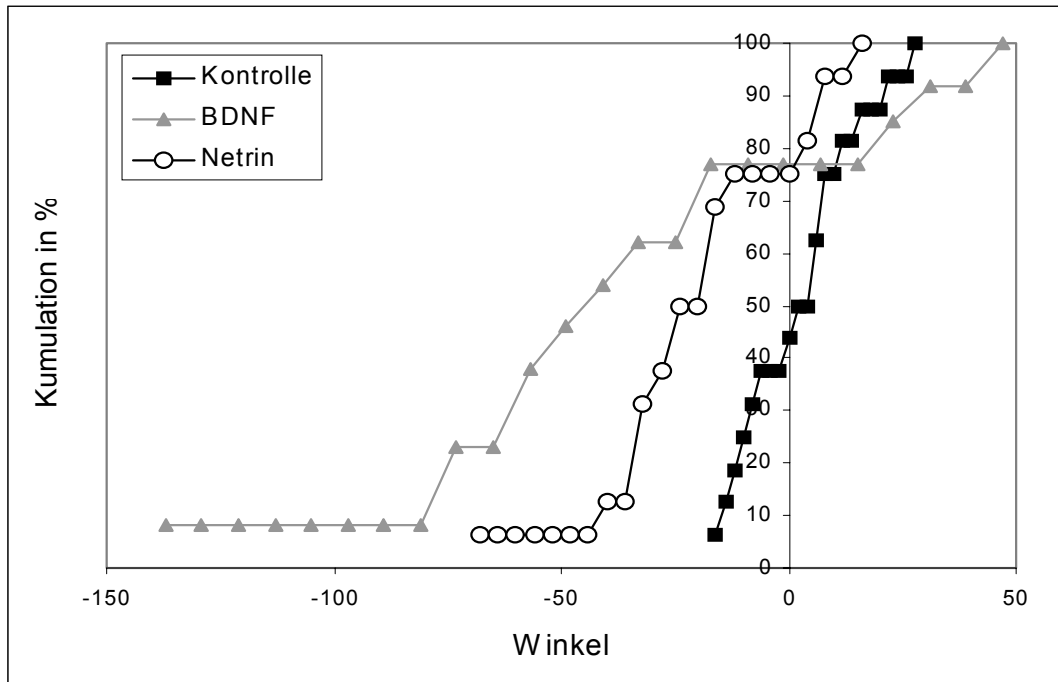


Abb. 24: Kumulationsverteilung der Winkel im Pulsationsgradienten retinaler Ganglienzellaxone des Xenopus im Kontrollversuch und mit BDNF bzw. Netrin in der Kapillare. Die Kumulationskurven ergeben sich aus der Verteilung der Winkel. Die Kontrollkurve liegt symmetrisch um den Winkel 0° . BDNF und Netrin sind repulsiv wirkende Substanzen, die die jeweiligen Verteilungskurven in Richtung negativer Winkel verschieben. (Signifikanz Netrin-Kontrolle nach Man-Whitney $p < 0,001$; BDNF-Kontrolle $p = 0,005$)

Nachdem anhand der Experimente mit BDNF und Netrin-1 gezeigt wurde, dass mit Hilfe der Anlage die Ergebnisse aus der Literatur reproduziert werden konnten, wurde EphrinA5 im Diffusionsgradienten auf seine Lenkungseigenschaften hin untersucht. Es konnte bei einem Kapillarenabstand von $100 \mu\text{m}$ keine Lenkung im Konzentrationsbereich $5 \mu\text{g/ml}$ bis $20 \mu\text{g/ml}$ beobachtet werden. Die einzige Reaktion, die beobachtet wurde, war eine dosisabhängige Kollapsreaktion. Mit steigender EphrinA5-Konzentration erhöhte sich die Kollapshäufigkeit. Zur Steigerung der Aktivität des EphrinA5 wurde es in einigen Experimenten mit einem anti-Fc-Antikörper aggregiert (=“geclustert“). Es zeigte sich jedoch, dass höhere Konzentrationen an EphrinA5 (ab $20 \mu\text{g/ml}$) nach Clustern Aggregate bildeten, die die Kapillarenöffnung blockierten.

Eine andere Möglichkeit, die aktive Konzentration am Wachstumskegel zu erhöhen, ohne die Konzentration an EphrinA5 in der Kapillare zu steigern,

bestand darin, die Kapillare näher an die Wachstumskegel heranzurücken, so dass der Abstand nicht mehr 100 μm , sondern 60 μm beträgt. In der Kapillare befanden sich 20 $\mu\text{g/ml}$ ungeclustertes EphrinA5. Erst nach Verringerung des Abstandes der Kapillare zum Wachstumskegel auf 60 μm konnte ein lenkender Effekt des EphrinA5 beobachtet werden. Das Vorzeichen der Lenkung war dabei substratabhängig: auf Laminin resultierte eine attraktive Antwort, die durch Wechsel des Substrates zu Fibronectin in ein repulsives Verhalten umgewandelt werden konnte. Diese Substratumkehr ist ein in der Literatur bekannter Effekt und konnte erstmals mit retinalen Ganglienzellaxonen in einem Netzingradienten gezeigt werden. Auf Oberflächen, die mit Laminin beschichtet waren, resultierte Repulsion, auf Fibronectin, unbeschichtetem Glas oder Poly-D-Lysin zeigten die Axone Attraktion (Höpker et al., 1999). Auf Fibronectin lag auch im Falle der Kontrollversuche die Kollapshäufigkeit deutlich höher als bei Kultivierung der Axone auf Laminin. Es zeigte sich, dass das Auswachsen der Neurone auf Fibronectin sehr viel schlechter war als auf Laminin und auf Fibronectin eine geringere Adhäsion ans Substrat vorlag. Diese fehlende Adhäsion verursachte vermutlich die vermehrte Kollapshäufigkeit auf Fibronectin auch in Kontrollversuchen.

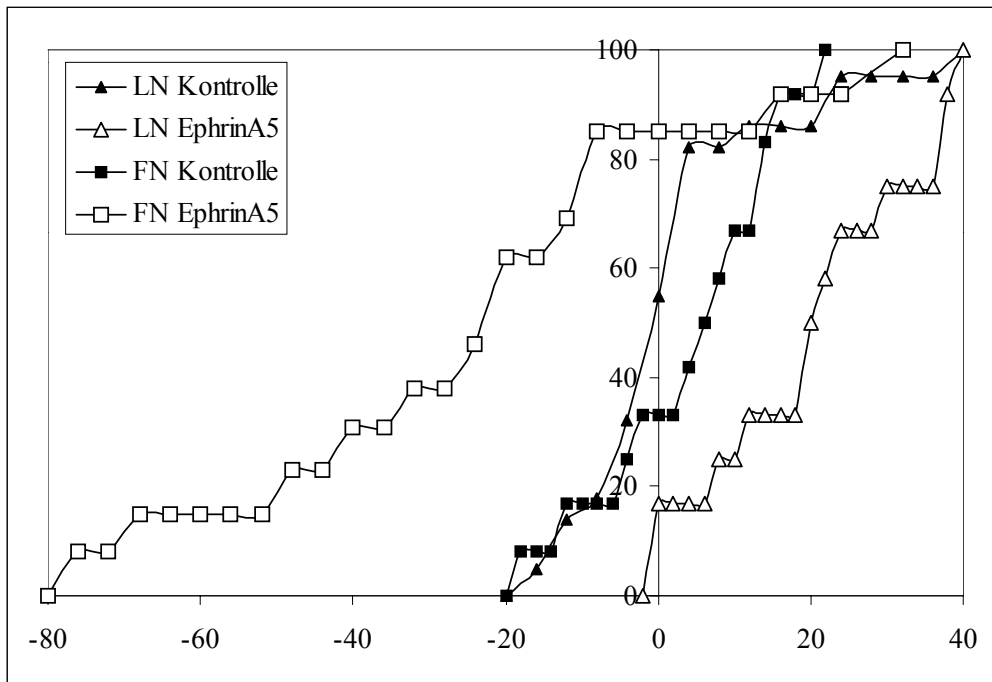


Abb. 25: Kumulationsverteilung der Winkel im Diffusionsgradienten an retinalen Ganglienzellwachstumskegeln des *Xenopus*. EphrinA5 in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ in der Kapillare bewirkt eine Lenkung der Axone, wenn der Abstand zwischen Kapillarenöffnung und Wachstumskegel auf 60 μm verringert wird. Die Richtung der Lenkung ist dabei substratabhängig: auf Laminin resultiert Attraktion, auf Fibronektin Repulsion der Axone. (Signifikanz auf Laminin, Vergleich Kontrolle-EphrinA5 nach Man-Whitney $p = 0,002$; auf Fibronektin nach Man-Whitney $p = 0,003$)

Ein aussagekräftiger Parameter zur Charakterisierung der Lenkungeigenschaften eines Proteins ist der Mittelwert aller gemessenen Winkel im Diffusionsgradienten. Anhand dieser Grösse sollen nun abschliessend alle mit EphrinA5 durchgeführten Diffusionsgradienten in einer Übersicht verglichen werden (siehe Abbildung 26).

Befindet sich kein Lenkungsmolekül, sondern reines Medium in der Kapillare (Kontrolle), tritt keine Lenkung der Axone ein. Vergleichsexperimente, die durchgeführt wurden, um zu zeigen, dass die Anlage ordnungsgemäss arbeitet, konnten die Resultate aus der Literatur bestätigen (Höpker et al., 1999). Im BDNF-Experiment ergab sich ein Winkelmittelwert von -37° , im Fall der Netrinversuche von -21° . Wird ein Gradient mit EphrinA5 im Abstand von 100 μm gestartet, tritt keine Lenkung auf, die Kumulationskurven und Winkelwerte sind nicht signifikant unterschiedlich zu Kontrollexperimenten (in Abbildung 27 nicht gezeigt).

Wird dagegen der Kapillarenabstand zum Wachstumskegel auf 60 μm verkürzt, ist EphrinA5 in der Lage, Axone zu lenken. Die Richtung der Lenkung ist substratabhängig. Dabei deuten die resultierenden Winkelmittelwerte von $+20^\circ$ auf Laminin bzw. von -25° auf Fibronektin auf einen sehr deutlichen Effekt hin. Wie man später in den Diffusionsgradienten mit retinalen Ganglienzellaxone des Hühnchens sehen wird, sind die Effekte dort wesentlich geringer.

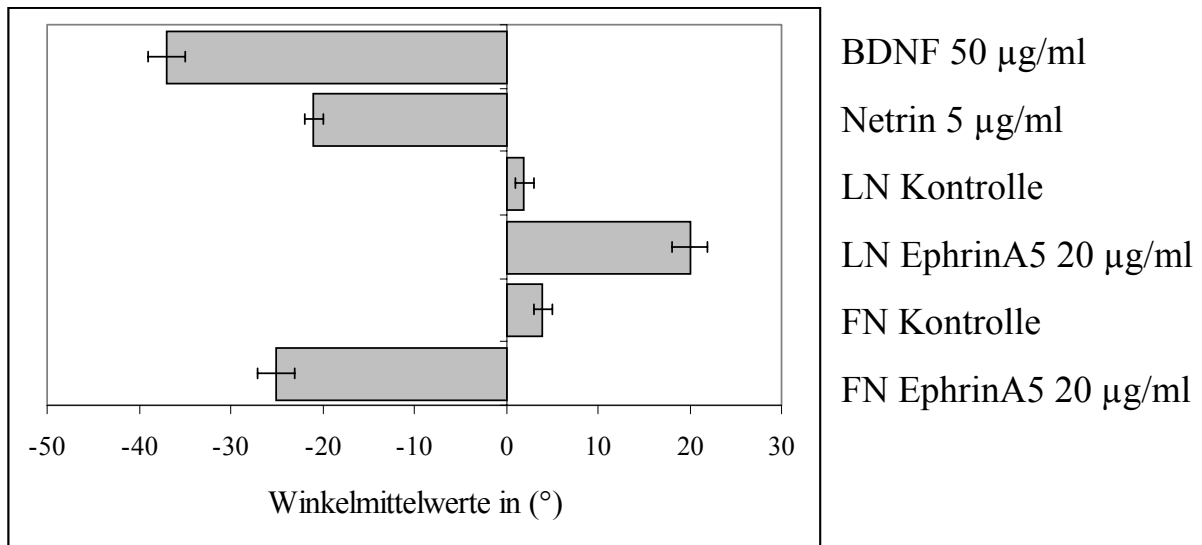


Abb. 26: Mittelwerte aller gemessenen Winkel mit Standardfehler in Experimenten mit retinalen Ganglienzellaxonen des *Xenopus* im Diffusionsgradienten. Als Kontrolle der Funktionstüchtigkeit der Pulsationsanlage wurden Experimente, die in der Literatur beschrieben sind, nachempfunden. BDNF und Netrin bewirken bei einem Kapillarenabstand von 100 μm eine deutliche Repulsion der Axone. Im EphrinA5-Diffusionsgradienten kann nur eine Lenkung beobachtet werden, wenn die Kapillare bis auf einen Abstand von 60 μm an die Wachstumskegel herangerückt wird und die Konzentration des EphrinA5 in der Kapillare 20 $\mu\text{g/ml}$ beträgt. Die Lenkung im EphrinA5-Gradienten ist substratabhängig: auf Laminin (LN) wird Attraktion, auf Fibronektin (FN) wird Repulsion der Axone beobachtet.

Zusammenfassung der Experimente an *Xenopus*axonen

Mit Hilfe eines Konstrukts aus EphrinA5 gekoppelt an alkalische Phosphatase konnte gezeigt werden, dass EphA-Rezeptoren auf den Axonen und Wachstumskegeln exprimiert sind. Damit sollten die Axone prinzipiell sensitiv auf eine Zugabe von EphrinA5 reagieren. Lösliche Fc-Konstrukte des EphrinA5 konnten eine dosisabhängige Kollapsreaktion hervorrufen, die in den meisten

Fällen sehr dramatisch mit Rückzug des gesamten Axonschaftes ausfiel. EphrinA5, an ein Nitrocellulosesubstrat gebunden und in Streifen im Wechsel mit Kontroll-Fc-Protein angeboten, wirkte derart auf die Axone, dass sie die EphrinA5-enthaltenden Bahnen vermieden. Wird EphrinA5 an ein Kügelchen gebunden und der auswachsende Wachstumskegel mit diesem lokalen substratgebundenen EphrinA5 konfrontiert, reagieren die Hälfte der Wachstumskegel mit Kollaps, die anderen mit einer deutlichen Richtungsänderung. Im Diffusionsgradienten war EphrinA5 trotz fehlender Membranverankerung in der Lage, *in vitro* eine Lenkung der Axone hervorzurufen, jedoch nur, wenn die effektive Konzentration am Wachstumskegel dadurch erhöht wurde, dass der Abstand zwischen Kapillare und Wachstumskegel auf 60 μm statt 100 μm verringert wurde.

4.2 Die retinotektale Projektion im Huhn

Lenkung von Axonen des Hühnchens an EphrinA5-beschichteten Kügelchen

Plazierung des Kügelchens vor den auswachsenden Wachstumskegel

Ähnliche Versuche wie bereits für retinale Ganglienzellaxone des *Xenopus* beschrieben wurden auch mit retinalen Ganglienzellaxonen des Hühnchens durchgeführt. Hier wird das Substrat (Laminin, Basallamina) und die Kügelchenbeschichtung (30%, 50% und 80% EphrinA5) variiert.

Bei Verwendung von Laminin als Substrat weisen die Wachstumskegel eine komplexere Morphologie auf im Vergleich zu Basallamina. Sie scheinen weniger stabil, weniger an die Unterlage adhärirt zu sein, was sich in einer erhöhten Kollapshäufigkeit von 22% in Kontakt mit Kontrollkügelchen ausdrückt. Die Axone des Hühnchens wachsen im Vergleich zu *Xenopus*axonen eher gekrümmt, was in der höheren Prozentzahl der gelenkten Axone in Kontrollversuchen von 11% zum Tragen kommt.

Werden Axone auf Laminin mit 80% EphrinA5 beschichteten Kügelchen konfrontiert, zeigen alle Wachstumskegel eine Kollapsreaktion. Bei Verwendung von 50% Ephrin-Beschichtung sinkt die Kollapshäufigkeit auf 71%, der Lenkungsanteil steigt auf 18%. Eine weitere Verringerung auf 30% EphrinA5 Beschichtung senkt die Kollapshäufigkeit auf 38%, die Anzahl der gelenkten Axone steigt weiter auf 43%. Der Anteil der Axone, der nach Berühren der Kügelchen keine Richtungsänderung zeigt, liegt bei 67% in der Kontrolle im Vergleich zu 11% bei 50%iger bzw. 19% bei 30%iger EphrinA5-Beschichtung. Die anfängliche Vermutung, dass bei einer Verringerung der Kügelchenbeschichtung auf 50% und später auf 30% EphrinA5 die Kollapshäufigkeit sinken, dafür der Lenkungsanteil steigen müsste, konnte mit diesen Versuchen bestätigt werden.

Die Tendenz, dass mit sinkender EphrinA5 Beschichtung die Kollapshäufigkeit sinkt und der Lenkungsanteil steigt, kann auch auf Basallamina als Substrat beobachtet werden. Während die Kollapshäufigkeit bei Wechsel von 80% zu 50% Beschichtung von 52% auf 20% fällt, steigt der Lenkungsanteil von 19% auf 60% an.

Auf Basallamina als Substrat, das der *in vivo* Situation sehr viel näher kommt als Laminin, scheinen die Wachstumskegel an sich schon stabiler und besser an den Untergrund adhärirt zu sein, was sich in einer Kollapshäufigkeit in den Kontrollen von 0% zeigt (auf Laminin kollabierten dagegen 22% der Axone in der Kontrolle). 90% der Axone wachsen unbeeinflusst ohne Richtungsänderung an den Kügelchen vorbei.

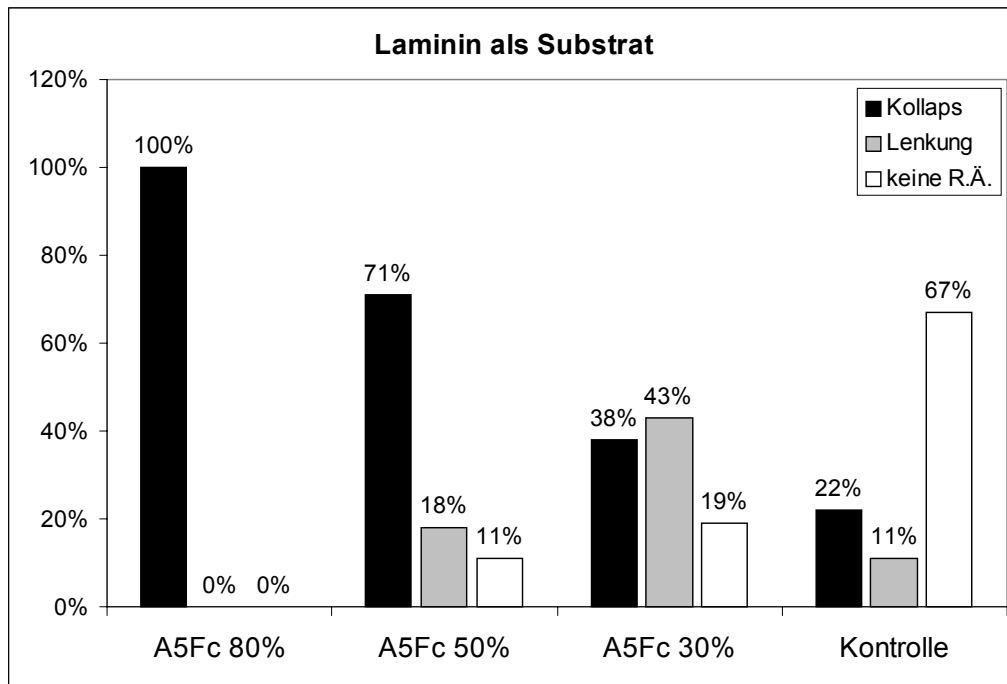


Abb. 27: Lenkungstest mit EphrinA5-beschichteten Kügelchen bzw. unbeschichteten Kontrollkügelchen auf Laminin als Substrat. Variiert wird die EphrinA5-Beschichtung auf den Kügelchen, die einen deutlichen Einfluss auf die resultierende Reaktionen der Wachstumskegel hat. Mit steigender Konzentration an EphrinA5 steigt die Kollapshäufigkeit und sinkt der Lenkungsanteil.

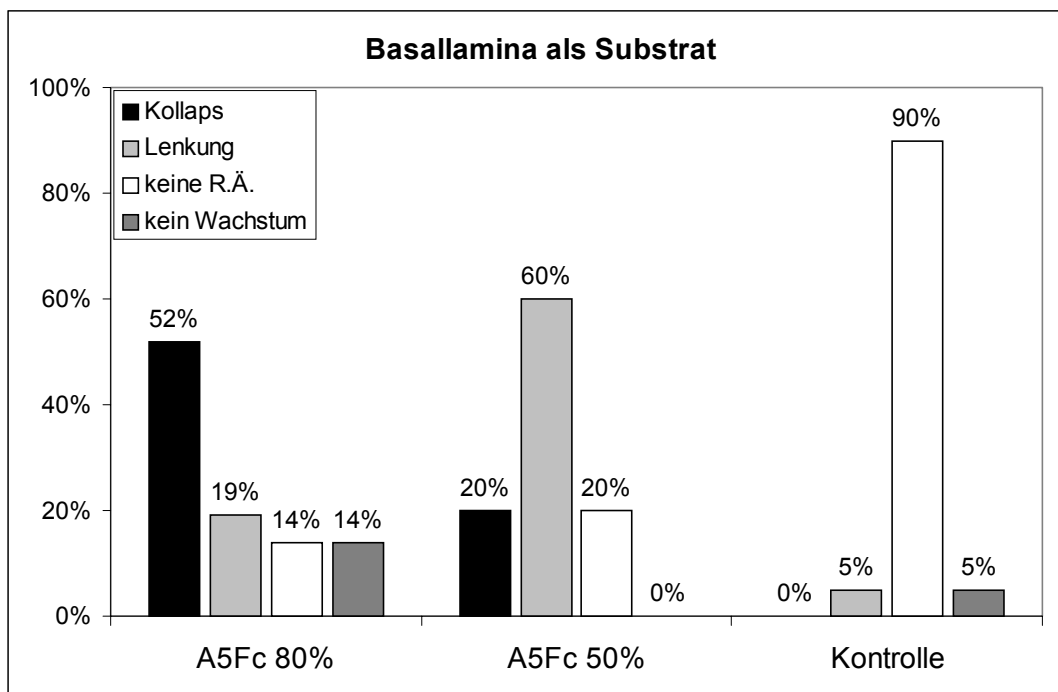


Abb. 28: Lenkungstest mit EphrinA5-beschichteten Kügelchen bzw. unbeschichteten Kontrollkügelchen auf Basallamina als Substrat. Variiert wird die EphrinA5-Beschichtung auf den Kügelchen. Auf Basallamina als Substrat kann die gleiche Tendenz verfolgt werden wie auf Laminin als Substrat: mit steigender Konzentration an EphrinA5 steigt die Kollapshäufigkeit und sinkt der Lenkungsanteil.

Betrachtet man die Mittelwerte der Winkel, ergibt sich in den Kontrollen ein Wert von 11° auf Laminin, auf Basallamina ein Wert von 13° . Im Vergleich mit der Xenopuskontrolle von 6° sind diese Werte deutlich erhöht, was sich an der Tendenz der Hühnchenaxone, gekrümmt auszuwachsen, zeigt im Vergleich zum stetigeren Geradeauswachsen der Xenopusaxone.

Die Mittelwerte bei Konfrontation mit 50% EphrinA5-beschichteten Kügelchen resultiert im gleichen Winkelwert von 30° auf Laminin und Basallamina. Interessanterweise konnte auf Basallamina durch Erhöhung der Beschichtung der Kügelchen auf 80% die Ablenkung auf 36° verstärkt werden. Ebenso kann durch Erhöhung der Konzentration von 30% auf 50% der Winkelmittelwert auf Laminin von 20° auf 30° gesteigert werden (siehe Abbildung 29). Eine höhere EphrinA5-Beschichtung führt also zu einem grösseren Lenkungswinkel.

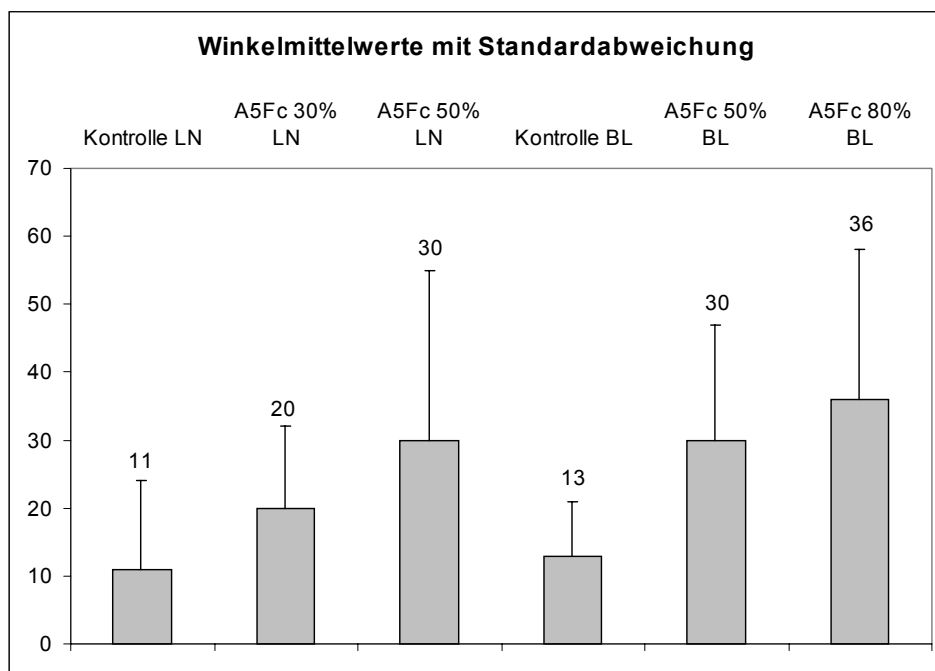


Abb. 29: Diagramm der Winkelmittelwerte, die sich aus den Lenkungsversuchen mit beschichteten bzw. in Kontrollversuchen unbeschichteten Kügelchen temporaler Hühnchenaxone auf Laminin (LN) und Basallamina (BL) als Substrat ergeben.

Zusammenfassend kann über die Versuche bei Positionierung der beschichteten Kügelchen direkt vor auswachsende Wachstumskegel folgendes festgestellt werden: bei Einsatz EphrinA5-beschichteter Kügelchen resultiert eine Ablenkung von der ursprünglichen Wachstumsrichtung, in Kontroll-

experimenten wächst der Wachstumskegel unbeeinflusst weiter, ohne seine Richtung zu ändern. Dieses Verhalten ist sowohl auf Laminin als auch auf Basallamina als Substrat zu beobachten. Neben Lenkung kann auch eine Kollapsreaktion beobachtet werden, deren Prozentsatz vom Substrat und der verwendeten Beschichtungskonzentration abhängt. Bei Variation der EphrinA5-Konzentration auf den Kügelchen ändern sich der Kollaps- und Lenkungsanteil. Mit sinkender EphrinA5-Konzentration sinkt die Kollapshäufigkeit und steigt der Lenkungsanteil. Auf Basallamina kann bei 50% iger EphrinA5-Konzentration Lenkung in 60% der Fälle beobachtet werden, auf Laminin bei 30% iger Konzentration in 43% der beobachteten Wachstumskegel. Die Kollapshäufigkeit ist auf Laminin als Substrat allgemein höher als auf Basallamina. Vermutlich hängt dies mit einer grösseren Adhäsion auf Basallamina und damit einer verminderten Kollapsanfälligkeit der Axone zusammen. Auf Laminin sinkt die Kollapshäufigkeit von 100% bei 80% iger Beschichtung über 71% bei 50% iger Beschichtung bis auf 38% bei 30% iger Beschichtung. Auf Basallamina liegen die Kollapshäufigkeiten allgemein niedriger: bei 80% iger Beschichtung bei 52%, bei Verringerung der Beschichtung auf 50% bei 20%.

Plazierung des Kügelchens seitlich des auswachsenden Wachstumskegels

Bei den bisher diskutierten Versuchen war das Kügelchen direkt in die Wachstumsrichtung vor den Wachstumskegel abgelegt worden. Der Wachstumskegel hatte die Möglichkeit, dem Kügelchen auszuweichen und damit seine Wachstumsrichtung zu ändern, oder unbeeinflusst ohne Änderung der Wachstumsrichtung das Kügelchen zu passieren. Bei dieser Art der Plazierung machen die Ausdrücke Attraktion/Repulsion wenig Sinn, da sich der Wachstumskegel immer weg vom Kügelchen bewegt, wenn er eine Richtungsänderung durchführt (siehe Abbildung 30,1).

Wird allerdings das Kügelchen seitlich des auswachsenden Wachstumskegels plaziert, kann jetzt zwischen repulsiver bzw. attraktiver Antwort unterschieden werden. Wächst der Wachstumskegel weg von der vom Kügelchen berührten

Seite, liegt Repulsion vor, wendet er sich nach Kontakt mit dem Kügelchen auf die Seite, an der das Kügelchen liegt, spricht man von Attraktion. Das Kügelchen wird jeweils so plaziert, dass der Wachstumskegel es mit seinen langen Filopodien gerade noch erreichen kann (siehe Abbildung 30,2).

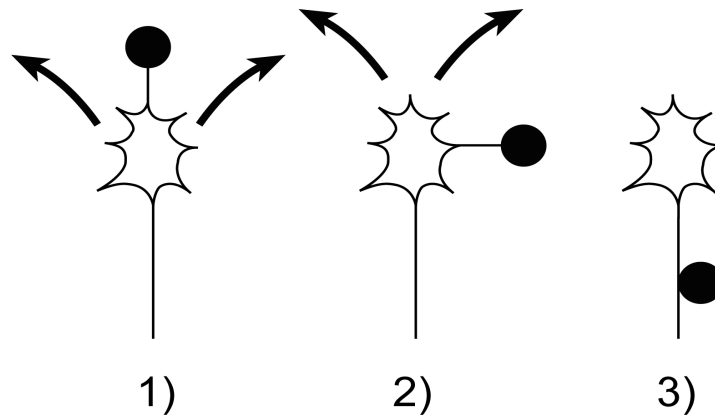


Abb. 30: Lenkungstest mit beschichteten Kügelchen an retinalen Ganglienzellaxonen des Hühnchens. Das Kügelchen wird an verschiedenen Stellen am Wachstumskegel und am Axonschaft abgelegt. 1) Das Kügelchen wird direkt vor den auswachsenden Wachstumskegel gelegt. Er hat nun die Möglichkeit, gerade ohne Richtungsänderung weiterzuwachsen, oder mit Richtungsänderung zu reagieren. Es ist schwierig, in dieser Anordnung zwischen Attraktion oder Repulsion zu unterscheiden. 2) Das Kügelchen wird seitlich am Wachstumskegel abgelegt, so dass er das Kügelchen gerade noch mit seinen Filopodien erreichen kann. Nach Reaktion des Wachstumskegels kann in dieser Anordnung zwischen Attraktion (in Richtung des Kügelchens) und Repulsion (Richtung weg vom Kügelchen) unterschieden werden. 3) Die Reizung des Axonschaftes mit einem Kügelchen soll Aufschluss darüber geben, ob diese Art der Reizung hinreichend ist für eine Richtungsänderung des Wachstumskegels.

Die Experimente werden auf Laminin als Substrat durchgeführt, da auf Laminin im Gegensatz zu Basallamina Filopodien besser beobachtet werden können. Als Beschichtung werden 30% EphrinA5-beschichtete Kügelchen gewählt, da hier wie in anderen Versuchen bereits gezeigt das optimale Verhältnis zwischen hohem Lenkungs- und geringem Kollapsanteil liegt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Abbildungen 31 und 32 zu sehen. Die Intervalleinteilung erfolgte folgendermassen: ein Wachstumskegel gilt als gelenkt, wenn er um $+10^\circ$ oder -10° von seiner ursprünglichen Wachstumsrichtung abweicht.

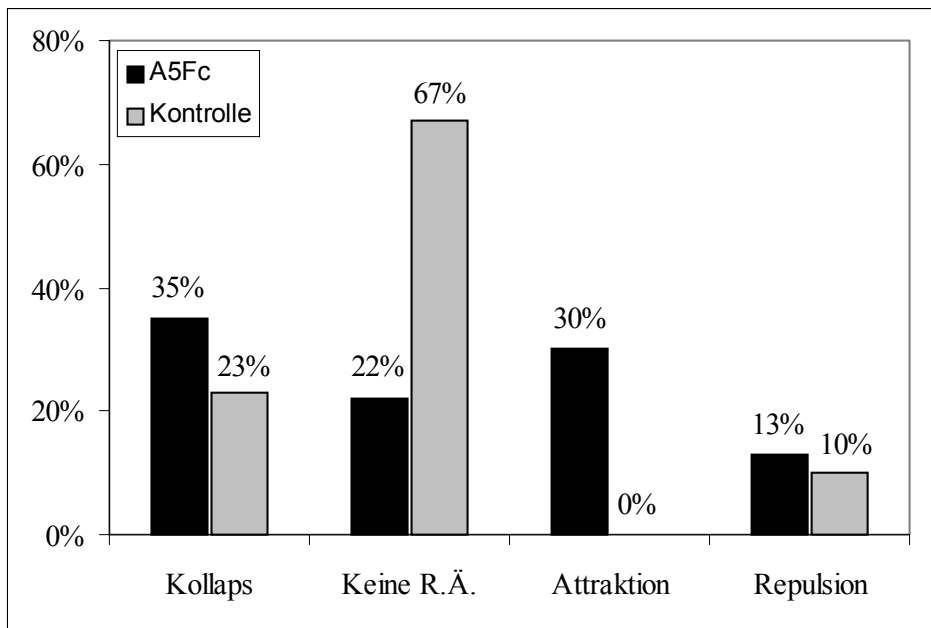


Abb. 31: Quantitative Auswertung bei Plazieren des Kugelchens seitlich von auswachsenden Wachstumskegeln. Ein Wachstumskegel gilt als gelenkt, wenn er um $+10^\circ$ oder -10° von seiner ursprünglichen Wachstumsrichtung abweicht. Die Einteilung der Reaktionen erfolgt in Attraktion, Repulsion, Kollaps und keine Richtungsänderung (R.Ä.).

Im Vergleich beschichteter Kugelchen mit Kontrollkugelchen fällt auf, dass die Rate der Repulsion nahezu identisch ist, also kein spezifischer Effekt des EphrinA5 darstellt. Die Kollapshäufigkeit ist bei EphrinA5-beschichteten Kugelchen im Gegensatz zur Kontrolle deutlich erhöht. Ohne Richtungsänderung wachsen die Axone hauptsächlich in Kontrollversuchen (67%) am Kugelchen vorbei, bei EphrinA5-Beschichtung liegt der Anteil deutlich verringert bei 22%. Interessant ist der Effekt bei Richtungsänderung in Richtung Attraktion: während in Kontrollversuchen kein einziger Wachstumskegel derart reagiert, liegt der Prozentsatz an attraktiv reagierenden Wachstumskegeln bei EphrinA5-Beschichtung bei 30%. Mit Repulsion reagierten 13%. Dieser Anteil ist aber mit der Kontrolle von 10% vergleichbar und damit kein Effekt des EphrinA5.

Auch in der Kumulationsverteilung der gemessenen Winkel kommt die Bevorzugung attraktiver Winkel deutlich zum Ausdruck (siehe Abbildung 32).

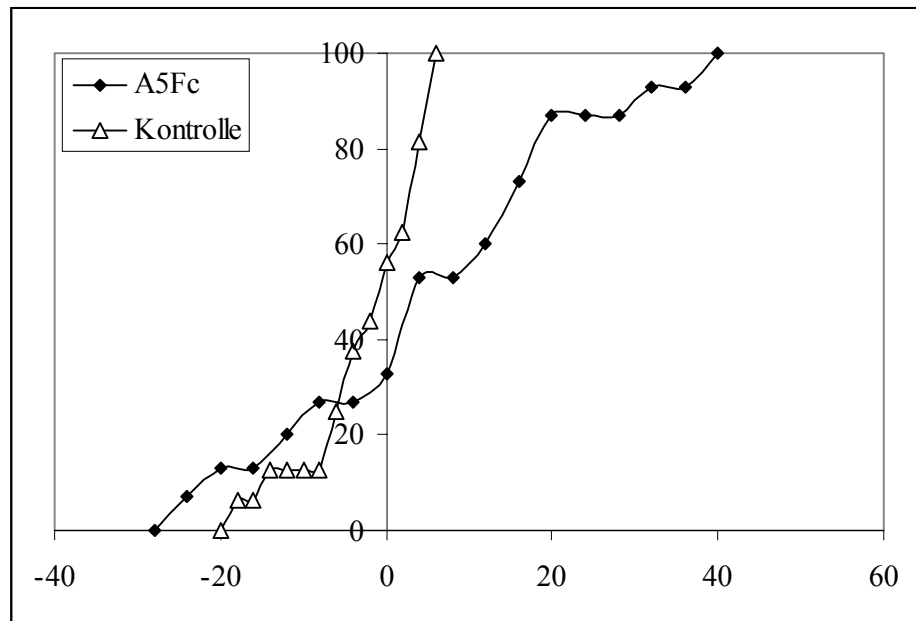


Abb. 32: Positionieren beschichteter bzw. unbeschichteter Kügelchen seitlich des auswachsenden Wachstumskegels retinaler Ganglienzellaxone des Hühnchens. Die EphrinA5-Beschichtung beträgt 30%, die Axone wachsen auf Laminin als Substrat. Die Kumulationskurve bei EphrinA5-Beschichtung ist im Vergleich mit der Kontrollkumulation auf die Seite attraktiver Winkel verschoben. (Signifikanz nach Man-Whitney $p = 0,167$, bedingt durch ein Überschneiden der Kumulationskurven im negativen Bereich)

Dass Axone, die seitlich mit lokal gebundenem EphrinA5 konfrontiert werden, bevorzugt attraktiv reagieren, ist ein unerwarteter Befund. Erwartet war eine ebensolche Repulsion, wie die Axone z.B. im Streifentest zeigen, denn es wurde in beiden Experimenten diesselbe Axonart und Beschichtung mit Laminin gewählt. Doch werden im Streifentepich wie bereits erwähnt, langfristige Effekte im fixierten Zustand beobachtet, während beim Lenkungstest mit beschichteten Kügelchen die Effekte in Zeitrafferaufnahmen während der Reaktion untersucht werden können.

Plazierung des Kügelchens am Axonschaft

Eine weitere interessante Frage ist, ob eine Reizung am Axonschaft eine Richtungsänderung des Wachstumskegels induzieren kann. Die Kügelchen werden ca. $30\ \mu\text{m}$ vom Wachstumskegel entfernt direkt am Axonschaft abgelegt (siehe Abbildung 30,3). Ein Wachstumskegel gilt als gelenkt, wenn er um $+10^\circ$ oder -10° von seiner ursprünglichen Wachstumsrichtung abweicht. In

Abbildung 33 ist die quantitative Auswertung dieser Winkeleinteilung dargestellt.

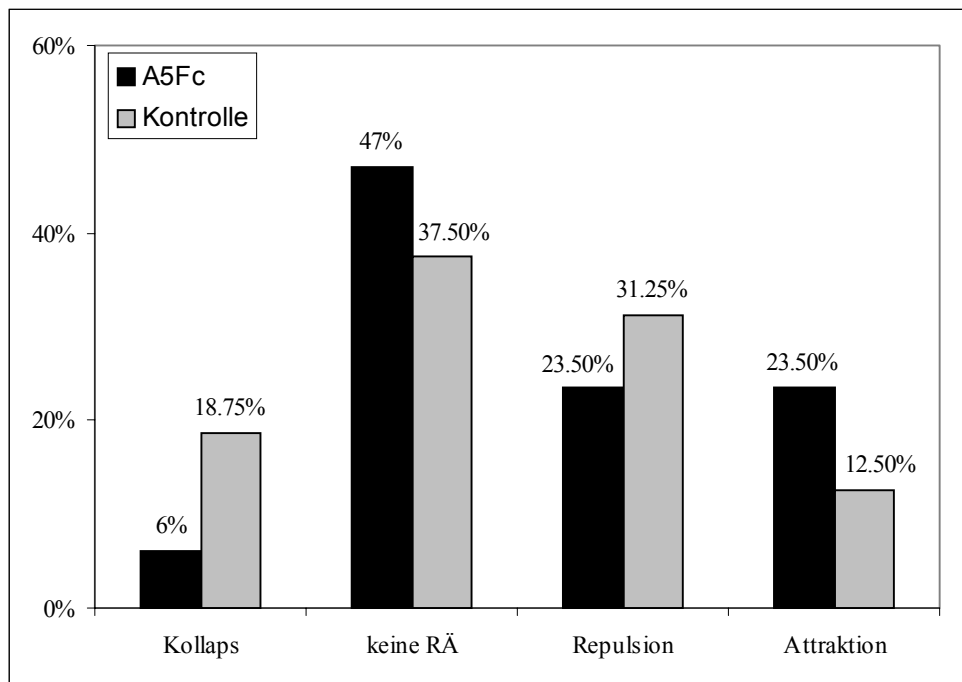


Abb. 33: Quantitative Auswertung bei Platzieren des Kugelchens am Axonschaft von auswachsenden Axonen. Ein Wachstumskegel gilt als gelenkt, wenn er um $+10^\circ$ oder -10° von seiner ursprünglichen Wachstumsrichtung abweicht. Die Einteilung der Reaktionen erfolgt in Attraktion, Repulsion, Kollaps und keine Richtungsänderung.

Es sind keine eindeutigen Effekte erkennbar, die jeweiligen Kontroll- und EphrinA5-Experimente zeigen vergleichbare Prozentzahlen bei den einzelnen Reaktionen. Auch bei EphrinA5-beschichteten Kugelchen wachsen viele Axone ohne Richtungsänderung weiter, Attraktion und Repulsion treten mit gleicher Häufigkeit auf, ohne Bevorzugung einer Richtung. Betrachtet man das Kumulationsdiagramm in Abbildung 34, so liegen die Kumulationskurven nicht deutlich separiert voneinander.

Vergleicht man die Winkelmittelwerte aller gemessenen Winkel in den Experimenten, in denen die Kugelchen seitlich neben den Wachstumskegeln bzw. $30\ \mu\text{m}$ entfernt von den Wachstumskegeln am Axonschaft platziert werden, resultiert nur bei seitlicher Positionierung ein von der Kontrolle verschiedener Effekt (siehe Abbildung 35).

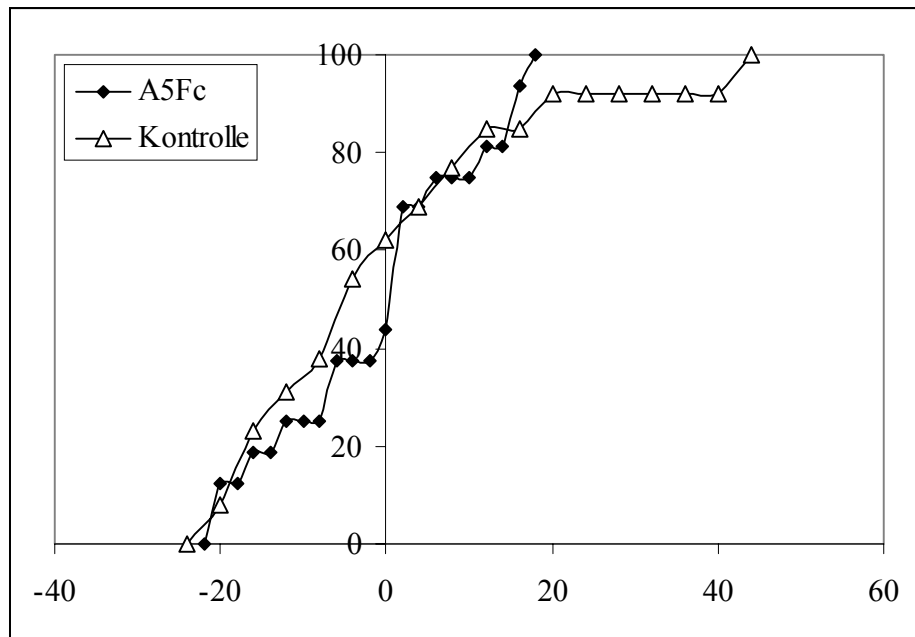


Abb. 34: Kumulationsverteilung der Winkel bei Positionieren beschichteter bzw. unbeschichteter Kügelchen am Axonschaft von auswachsenden retinalen Ganglienzellaxonen des Hühnchens. Die EphrinA5-Beschichtung beträgt 30%, die Axone wachsen auf Laminin als Substrat. Es ergibt sich kein von der Kontrolle signifikanter Effekt (Signifikanz nach Man-Whitney $p = 0,866$).

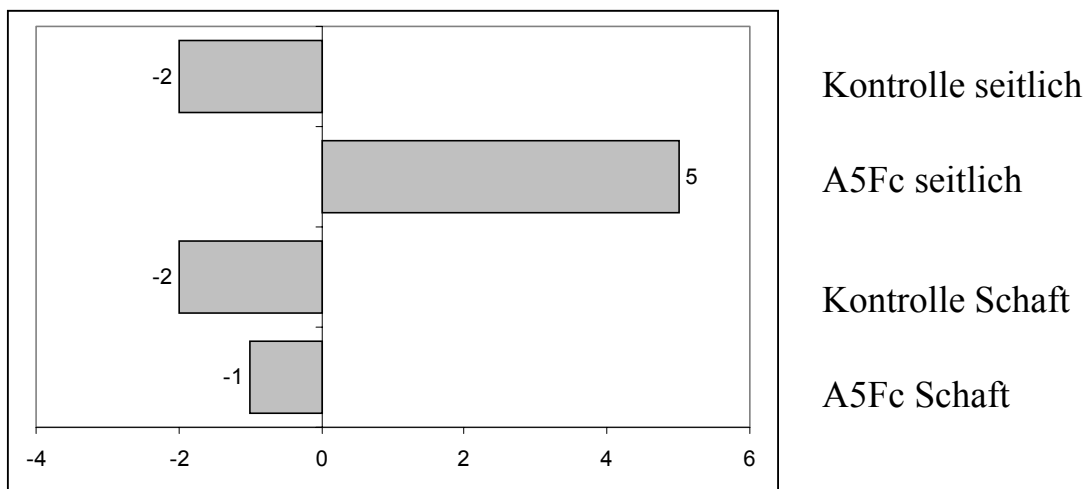


Abb. 35: Vergleich der Winkelmittelwerte aus Lenkungstests mit beschichteten Kügelchen, die seitlich am Wachstumskegel bzw. am Axonschaft abgelegt wurden. Ein deutlich lenkender Effekt ergibt sich nur bei seitlicher Reizung des Wachstumskegels. Interessanterweise resultiert ein attraktiver Effekt. Wird dagegen das Kügelchen am Axonschaft abgelegt, ist kein lenkender Einfluss des EphrinA5 sichtbar.

Interessanterweise reagieren die temporalen Axone mit Attraktion, wenn sie eine Richtungswahl treffen können. Bei Experimenten mit Reizung am Axonschaft

ist kein Effekt zwischen beschichteten und unbeschichteten Kügelchen zu erkennen. D.h. die Rezeptoren zur Reizaufnahme befinden sich ausschliesslich im Wachstumskegel selbst, der Axonschaft ist nicht mehr sensitiv gegenüber Reizung mit EphrinA5.

Reizung mit zwei gleich beschichteten Kügelchen auf verschiedenen Seiten des Wachstumskegels

In den bisher beschriebenen Versuchen war nur mit einem Kügelchen gereizt worden. In weiteren Versuchen soll der Einfluss von zwei gleich beschichteten Kügelchen auf das Verhalten der Wachstumskegel untersucht werden.

Zuerst werden zwei Kügelchen auf verschiedene Seiten des Wachstumskegels gelegt (siehe Abbildung 36,4a). In einem weiteren Versuch werden zwei Kügelchen auf die gleiche Seite der Wachstumskegel positioniert (siehe Abbildung 36,4b). Beide Kügelchen sind mit 15% EphrinA5 beschichtet.

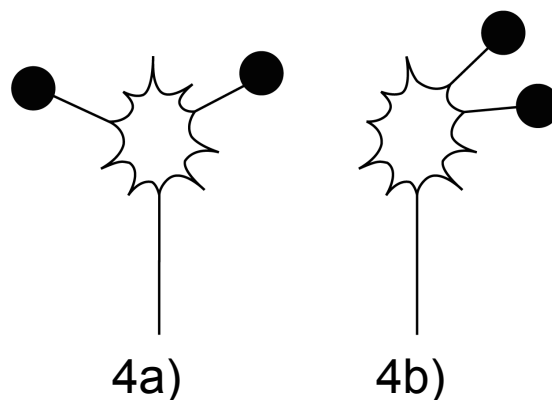


Abb. 36: Lenkungstest mit beschichteten Kügelchen an retinalen Ganglienzellaxonen des Hühnchens (in Fortsetzung von Abbildung 30). 4a) Je ein Kügelchen wird auf verschiedene Seiten des Wachstumskegels abgelegt. Der Wachstumskegel hat Kontakt zu beiden Kügelchen über die motilen Filopodien. 4b) Der Wachstumskegel bekommt Kontakt zu zwei gleich beschichteten Kügelchen, die auf der gleichen Seite seines Lamellipodiums liegen. Hier soll untersucht werden, ob ein Kügelchen mit 30% EphrinA5-Beschichtung (siehe Abbildung 30,2) den gleichen Effekt ausübt wie zwei mit 15% EphrinA5 beschichtete Kügelchen.

Im folgenden sind zwei ausgewählte Sequenzen der Reaktion von Wachstumskegeln auf zwei Kügelchen zu sehen, die auf verschiedenen Seiten des Wachstumskegels positioniert sind.

Sind die Kügelchen beide mit 15% EphrinA5 beschichtet, resultiert in den meisten Fällen eine Kollapsreaktion, nachdem Filopodien beide Kügelchen abgetastet hatten (siehe Abbildung 37).

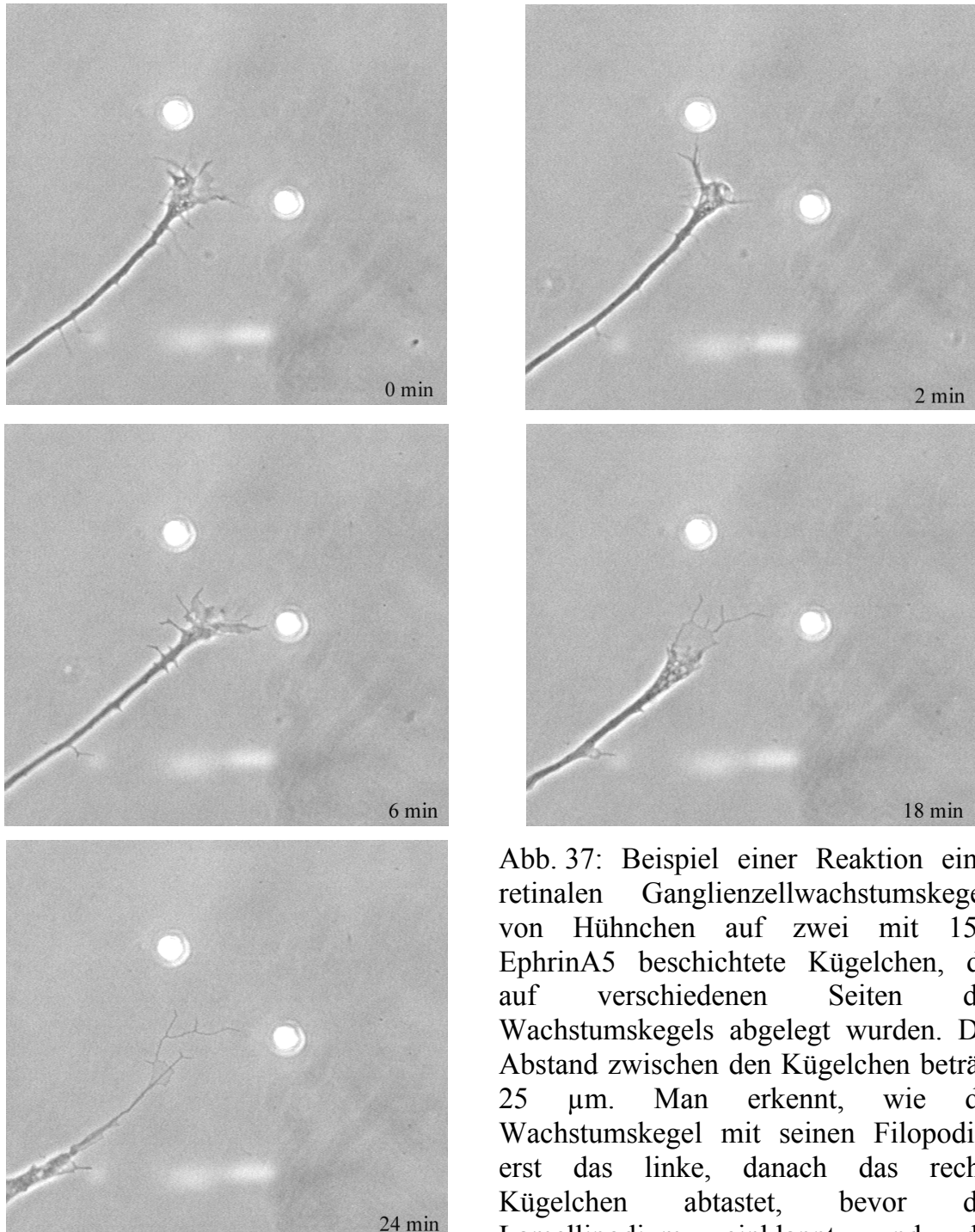


Abb. 37: Beispiel einer Reaktion eines retinalen Ganglienzellwachstumskegels von Hühnchen auf zwei mit 15% EphrinA5 beschichtete Kügelchen, die auf verschiedenen Seiten des Wachstumskegels abgelegt wurden. Der Abstand zwischen den Kügelchen beträgt 25 μm . Man erkennt, wie der Wachstumskegel mit seinen Filopodien erst das linke, danach das rechte Kügelchen abtastet, bevor das Lamellipodium einklappt und das gesamte Axon sich nach 24 Minuten in einer Kollapsreaktion zurückziehen beginnt.

In Kontrollversuchen mit unbeschichteten Kügelchen überwiegt ein Vorbeiwachsen an beiden Kügelchen ohne Kollapsreaktion (73% der beobachteten Wachstumskegel). Auch in Kontrollversuchen tastet der Wachstumskegel zuerst beide Kügelchen ab (siehe Abbildung 38).

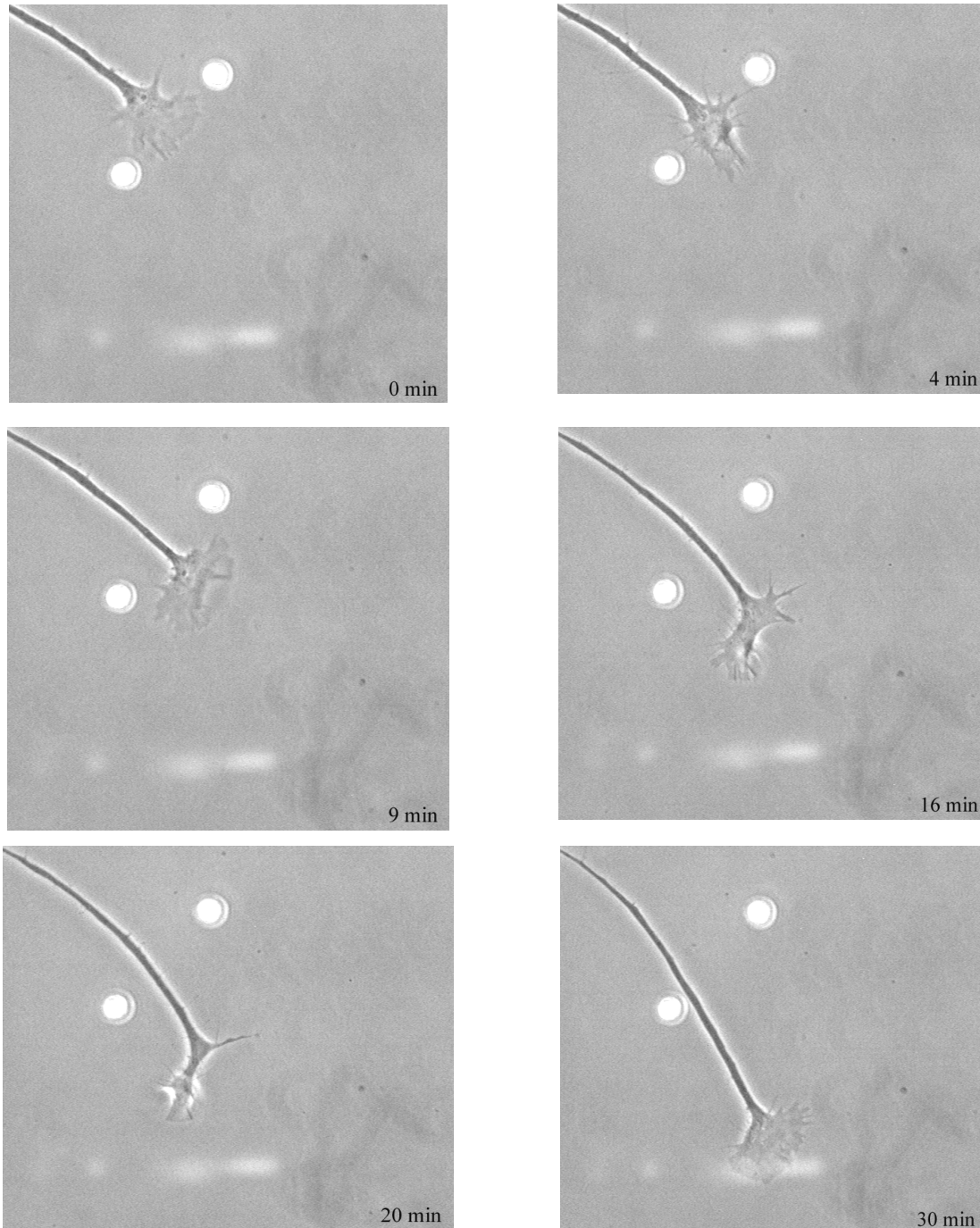


Abb. 38: Beispiel einer Reaktion eines retinalen Ganglienzellwachstumskegels auf ein unbeschichtetes Kontrollkügelchen. Anfangs sind deutlich lamellipodiale und filopodiale Kontakte erkennbar. Zuerst wächst der Wachstumskegel gerade an den Kügelchen vorbei. Nach 8 Minuten erscheint das Lamellipodium unsymmetrisch, der Wachstumskegel schlägt eine neue Richtung ein, wobei ein Teil des Lamellipodiums eingezogen wird. Nach Streckung des Axons wächst der Wachstumskegel in der neuen Richtung weiter.

Nach quantitativer Auswertung der Reaktionen ergibt sich folgendes Bild: EphrinA5 beschichtete Kügelchen induzieren in 66% der Wachstumskegel Kollaps. 34% der Axone können die EphrinA5-beschichteten Kügelchen passieren. Der Mittelwert aller Winkel, gemessen zwischen der Ursprungsrichtung und der Wachstumsrichtung nach Passieren der Kügelchen, beträgt 11° .

In Kontrollversuchen mit unbeschichteten Kügelchen wachsen 73% der Axone ungehindert vorbei, 27% reagieren mit Kollaps. Der Mittelwert aller gemessenen Winkel liegt ein wenig höher bei 19° , ist aber nicht signifikant unterschiedlich zu Winkelwerten aus EphrinA5-Versuchen (t-Test $p = 0,113$).

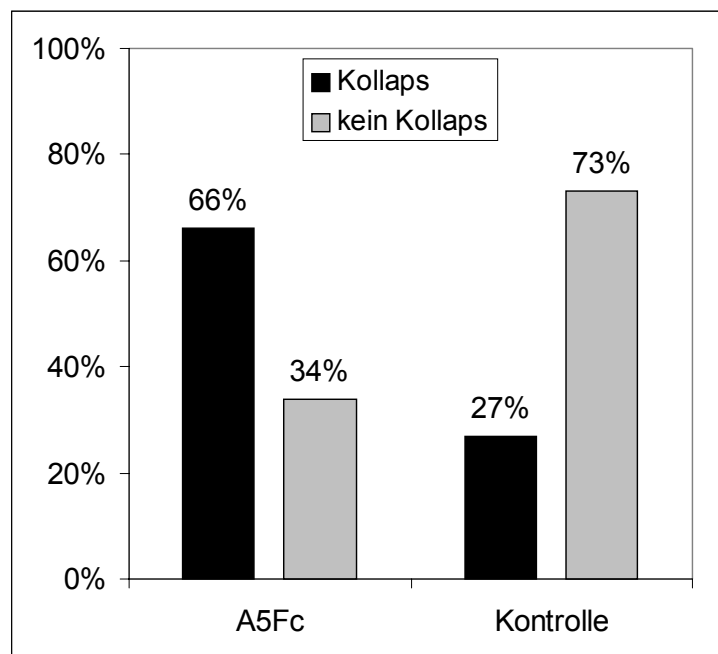


Abb. 39: Lenkungstest mit zwei 15% EphrinA5 beschichteten bzw. unbeschichteten Kontrollkügelchen, die auf verschiedenen Seiten des Wachstumskegels abgelegt werden. Im Falle EphrinA5 beschichteter Kügelchen überwiegt Kollaps nach beidseitigem Kontakt. 34% der Axone können beide Kügelchen passieren. Werden dagegen unbeschichtete Kontrollkügelchen verwendet, kommt es in 27% der Fälle zu einer Kollapsreaktion, 73% können die Kügelchen passieren. Die Winkelmittelwerte mit 11° in EphrinA5-Versuchen und 19° in Kontrollexperimenten sind nicht signifikant unterschiedlich (t-Test $p = 0,113$).

Der Vergleich EphrinA5 mit Kontrollkügelchen zeigt nur im Hinblick auf die Kollapshäufigkeit einen Unterschied. Eine „vermeintliche“ Richtungsänderung trat in Kontroll- und EphrinA5-Versuchen gleich häufig auf und ist daher nicht spezifisch. Nach Passieren beider Kügelchen ist es schwer zu unterscheiden, ob der Wachstumskegel mit Attraktion oder Repulsion reagiert. In den meisten Experimenten tastete der Wachstumskegel erst das eine, dann das andere Kügelchen ab und wuchs anschliessend in Richtung des zweiten Kügelchens in einer neuen Richtung weiter. Es kann aber so nicht entschieden werden, ob diese neue Richtungswahl auf einer Repulsion durch das erste Kügelchen oder eine Attraktion an das zweite Kügelchen beruht. Da dieser Effekt jedoch in Kontroll- als auch in EphrinA5-Versuchen gleich häufig zu beobachten war, ist es zumindest kein EphrinA5-spezifischer Effekt (siehe auch Abbildung 38).

Reizung mit zwei gleich beschichteten Kügelchen auf der gleichen Seite des Wachstumskegels

Die zwei gleich beschichteten Kügelchen mit jeweils 15% EphrinA5-Beschichtung wurden im folgenden Versuchsteil auf die gleiche Seite des Wachstumskegels abgelegt.

Ähnlich den Versuchen mit zwei beschichteten Kügelchen, die beidseitig des Wachstumskegels abgelegt worden waren, resultiert auch in den Experimenten, in denen zwei Kügelchen auf die gleiche Seite des Wachstumskegels positioniert werden, in den meisten Fällen eine Kollapsreaktion (63%), wenn die Kügelchen mit EphrinA5 beschichtet waren. 37% der Wachstumskegel können nach Abtasten der Kügelchen ohne Kollapsreaktion weiterwachsen. In Kontrollversuchen reagieren nur 15% der Wachstumskegel mit Kollaps, 85% passieren die Kügelchen ohne Kollaps (siehe Abbildung 40).

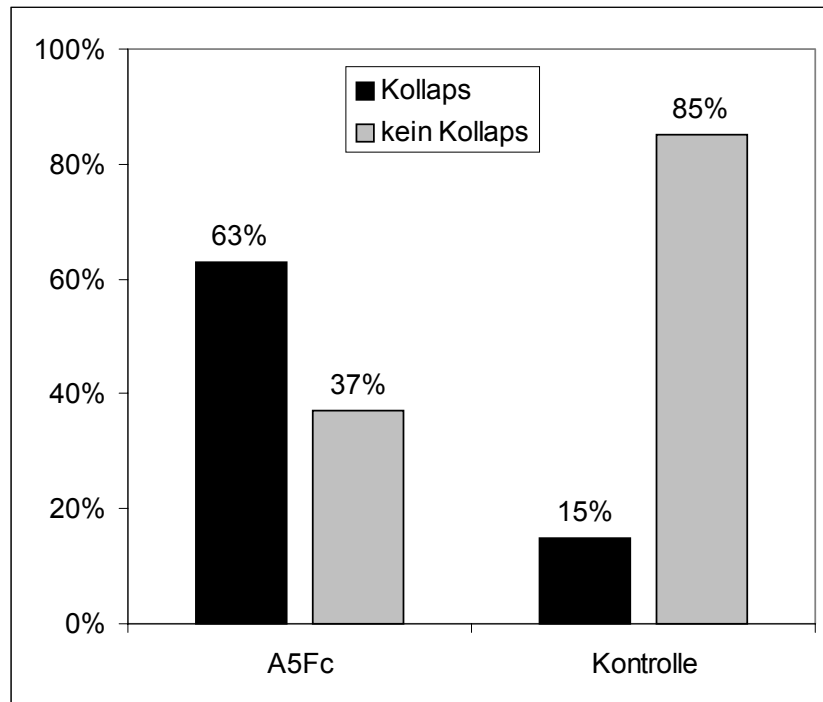


Abb. 40: Lenkungstest mit zwei 15% EphrinA5 beschichteten bzw. unbeschichteten Kontrollkügelchen, die auf der gleichen Seite der retinalen Ganglienzellwachstumskegel des Hühnchens abgelegt werden. Vergleichbar mit den Ergebnissen aus Experimenten, bei denen zwei 15% beschichtete Kügelchen auf beiden Seiten des Wachstumskegels abgelegt wurden, resultiert auch im Falle von Kontakt mit 15% beschichteten Kügelchen auf der gleichen Seite des Wachstumskegels überwiegend eine Kollapsreaktion (63%). In 37% der EphrinA5-beschichteten Kügelchen können die Wachstumskegel an den zwei Kügelchen vorbeiwachsen. In Kontrollversuchen mit unbeschichteten Kügelchen wachsen 85% der Wachstumskegel ohne Kollaps an den Kügelchen vorbei, 15% reagieren mit Kollaps.

Im Vergleich mit Versuchen, in denen ein Kügelchen mit 30% EphrinA5-Beschichtung seitlich der auswachsenden Wachstumskegel positioniert worden war, resultierte eine dreimal häufigere Attraktion wie Repulsion, die in Kontrolleexperimenten nie zu beobachten war und deshalb als EphrinA5 spezifisch gedeutet werden muss. Werden dagegen zwei mit jeweils 15% EphrinA5 beschichtete Kügelchen seitlich der Wachstumskegel plaziert, kann kein lenkender Effekt von EphrinA5 beobachtet werden, der von Kontrolleexperimenten verschieden wäre. Die Mittelwerte aller gemessenen Winkel ergeben sich im Falle der EphrinA5-Beschichtung zu 5° und in Kontrolleexperimenten zu 7° und sind nicht signifikant unterschiedlich (t-Test $p=0,622$). Nur ein kollapsinduzierender Effekt ist deutlich unterschiedlich bei Reizung mit einem Kügelchen (35% Kollaps) im Gegensatz zur Reizung mit

zwei Kügelchen, die mit 63% fast doppelt so hoch ist. Die Kollapshäufigkeit bei Reizung mit zwei Kügelchen, die auf verschiedenen Seiten des Wachstumskegels plaziert wurden, lag jedoch auch bei 66%, so dass die Kollapshäufigkeit bei Reizung mit zwei Kügelchen allgemein höher zu liegen scheint.

Nach Reizung mit zwei Kügelchen kann eine deutlich erhöhte Kollapsreaktion beobachtet werden. Sie ist ähnlich hoch, unabhängig davon, ob die Kügelchen auf der gleichen oder auf verschiedenen Seiten der Wachstumskegel plaziert worden waren. Im Vergleich mit einem 30% beschichteten Kügelchen und zwei mit 15% beschichteten Kügelchen liegt eine deutlich grössere Kollapshäufigkeit, aber keine Lenkung vor.

Wachstum retinaler Axone des Huhns im Diffusionsgradienten löslicher Proteine

Wahl eines geeigneten Substrates

Um einen erfolgreichen Versuch mit löslichen Proteinen im Diffusionsgradienten durchführen zu können, war es notwendig, ein Substrat zu finden, auf dem die retinalen Ganglienzellaxone derart wachsen, dass nach 24 Stunden in Kultur einzelne frei liegende Wachstumskegel vorhanden sind. Die Standardbeschichtung der Videoschalen mit Poly-D-Lysin und Laminin konnte nicht verwendet werden, da hier die Axone zu dicht auswuchsen, so dass keine freiliegenden Wachstumskegel zu finden waren. Eine Beschichtung von nur Laminin erwies sich als die beste, da hier das Verhältnis von wachsenden Axonen, ihrer Länge und ihrer Dichte optimal war. Eine Beschichtung mit nur Poly-D-Lysin führte zu sehr kurzen, hochfaszikulierten Axonen. Unbeschichtetes Glas war nicht wachstumsfördernd für die Axone, und das Auswachsen war zeitlich sehr verzögert (siehe Abbildung 41).

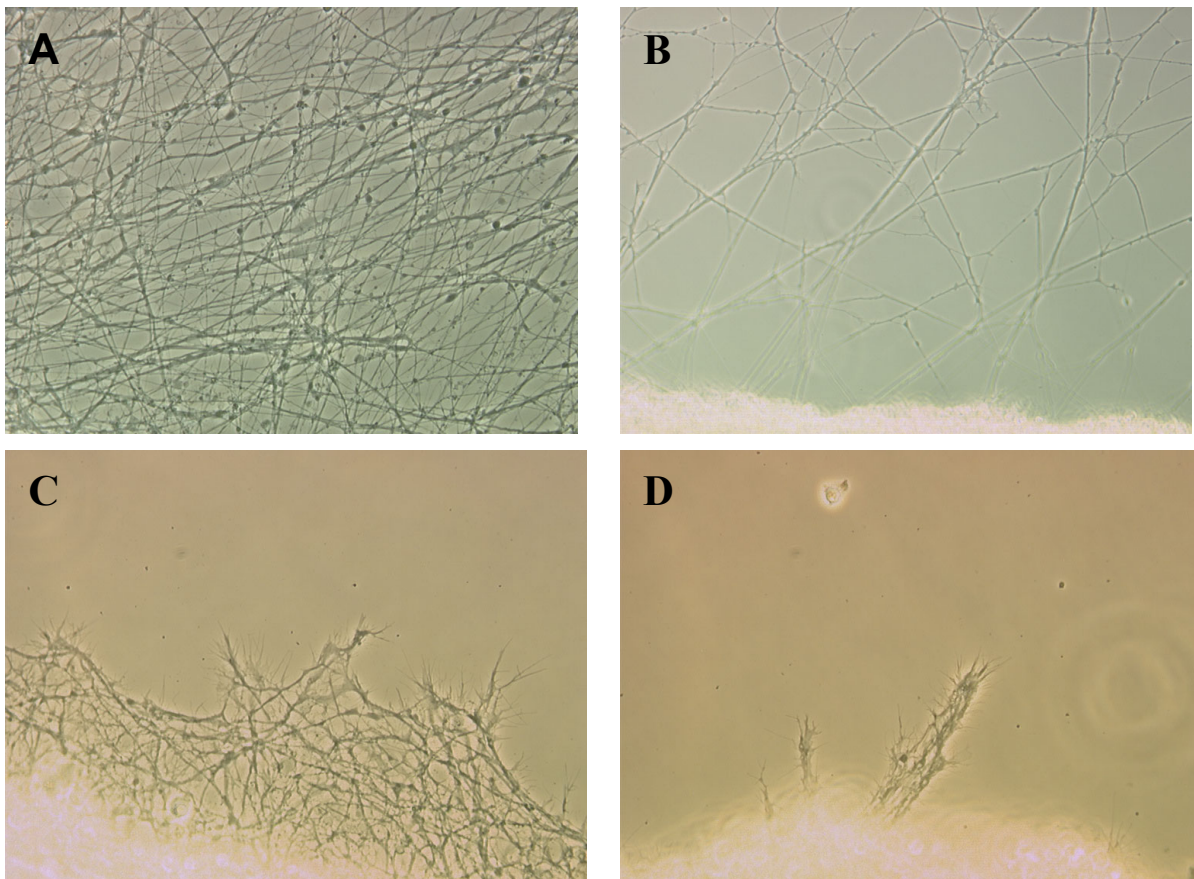


Abb. 41: Auswachsverhalten retinaler Ganglienzellaxone des Huhns auf verschiedenen Substraten. Auf Poly-D-Lysin kombiniert mit Laminin (A) ist die Dichte der Axone zu hoch, um freiliegende Wachstumskegel zu finden. Laminin alleine (B) eignet sich am besten. Nur Poly-D-Lysin (C) führte zu einer hohen Faszikulation der Axone, und unbeschichtetes Glas (D) erwies sich als nicht wachstumsfördernd für die Axone.

Als Substrat für die Versuche im Diffusionsgradienten wird im folgenden Laminin verwendet, falls nicht anders angegeben.

Reagieren temporale oder nasale Axone sensitiv auf EphrinA5 im Diffusionsgradienten? Welche Konzentration an EphrinA5 in der Kapillare muss angeboten werden, um eine Lenkung der Axone zu bewirken?

Im Fall der Xenopusversuche im Diffusionsgradienten ist nicht zwischen temporalen bzw. nasalen Axonen unterschieden worden. Beim Hühnchensystem ist diese Unterscheidung möglich. Die Konzentration an EphrinA5-Fc in der Kapillare wird zwischen 0 $\mu\text{g/ml}$ (Kontrollexperiment mit reinem Medium) und 10 $\mu\text{g/ml}$ variiert, wobei das EphrinA5 zunächst ungeclustert eingesetzt wird.

Temporale Axone reagieren mit steigender Konzentration an EphrinA5 mit zunehmendem Kollaps. Nur bei 1 µg/ml tritt zusätzlich eine eindeutige Lenkung der Axone auf (Winkelmittelwert von 7°, Signifikanz im Vergleich zu Kontrollexperimenten nach Man-Whitney $p = 0,015$). In den anderen Konzentrationsbereichen kann keine Lenkung beobachtet werden, die signifikant unterschiedlich von Kontrollwerten wäre.

Nasale Axone zeigen keine Dosisabhängigkeit der Kollapshäufigkeit. Die Kollapsreaktion schwankt auch bei steigender Konzentration an EphrinA5 in der Kapillare weiter um Kontrollwerte. Lenkung durch EphrinA5 kann bei nasalen Axonen in keinem Konzentrationsbereich beobachtet werden.

Die Diffusionsgradienten mit unterschiedlichen Ephrinkonzentrationen in der Kapillare verdeutlichen, dass nur temporale Axone bei 1 µg/ml EphrinA5 sensitiv sind und durch EphrinA5 gelenkt werden können. Ob nasale Axone ausserhalb des verwendeten Konzentrationsbereiches bei höheren EphrinA5-Konzentrationen sensitiv reagieren würden, wurde nicht weiter untersucht.

Einfluss des „Clusterns“ und Substratabhängigkeit der Richtungswahl der Axone im EphrinA5-Gradienten

Das in Diffusionsgradienten eingesetzte EphrinA5 ist ein Fc-Konstrukt, d.h. der *in vivo* vorhandene GPI-Anker ist durch einen Fc-Teil eines IgG-Immunoglobulins ersetzt. Diese Fc-Konstrukte dimerisieren in Lösung spontan. Es konnte gezeigt werden, dass monomere EphrinA5 Moleküle, z.B. ein myc-gekoppeltes EphrinA5, zwar an die Eph-Rezeptoren binden, aber keine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst wird (Davis et al., 1994). Somit blockieren monomere Ephrinkonstrukte die Signalweiterleitung und wirken als dominant negative Konstrukte. Setzt man höher aggregierte Komplexe des EphrinA5 ein, die z.B. durch Aggregation (=„Clustern“) des EphrinA5 mit einem anti-Fc-Antikörper im 10-fachen Überschuss entstehen, könnte eine Modulation in der Signaltransduktion eintreten. Jetzt soll im Diffusionsgradienten untersucht werden, ob eine Bildung höherer Komplexe die Richtungswahl der Axone oder die Grösse des Effekts beeinflusst.

Die Wahl des Substrates hat einen Einfluss auf die Richtungswahl der Axone im Gradienten, wie bereits mit retinalen Ganglienzellaxonen des *Xenopus* gezeigt worden war. Auf Laminin war eine attraktive Antwort der Axone zu beobachten, die auf Fibronektin in eine Repulsion umschlug. Diese Substratabhängigkeit und damit Effekturnkehr kann auch dazu benutzt werden, um die im Hühnchensystem auftretenden sehr geringen Effekte abzusichern. Tabelle 2 zeigt die erhaltenen Winkelmittelwerte im Diffusionsgradient in Abhängigkeit von Clustern des EphrinA5 und in Anhängigkeit des Substrates. In Abbildung 42 sind die entsprechenden Kumulationskurven aufgetragen.

Clustern des EphrinA5-Fc mit einem anti-Fc-Antikörpers bewirkt eine betragsmässig grössere Attraktion im Diffusionsgradienten als ungeclustertes EphrinA5. Durch einen Substratwechsel kann die Richtungswahl der temporalen Axone beeinflusst werden. EphrinA5 wirkt auf Axone, die auf Laminin wachsen, attraktiv, auf auf Fibronektin wachsende Axone repulsiv.

Verwendetes Substrat und Abhängigkeit vom Clustern des EphrinA5	Kollapshäufigkeit in Prozent %	Winkelmittelwerte im Diffusionsgradienten
Laminin ohne Clustern	31%	7°
Laminin mit Clustern	52%	12°
Fibronektin ohne Clustern	-	-
Fibronektin mit Clustern	22%	-7°
Kontrolle (kein Lenkungsmolekül)	0%	0°

Tabelle 2: Einfluss des Substrates und des Clusters im EphrinA5-Gradienten. Auf Laminin resultiert Attraktion, die durch Wechsel des Substrates zu Fibronektin in eine repulsive Reaktion der Axone umgewandelt werden kann. Verwendet wurden ausschliesslich temporale Axone.

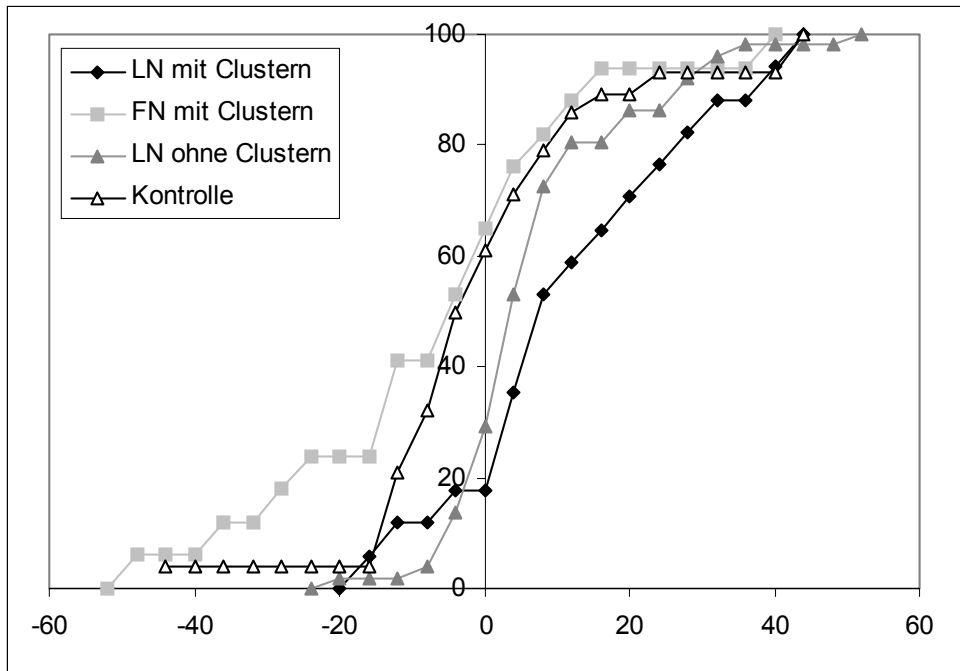


Abb. 42: Abhängigkeit der Lenkung vom verwendeten Substrat und der Einfluss des Clusters des EphrinA5-Fc mit einem anti-Fc-Antikörper. EphrinA5 in der Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ ungeclustert bewirkt eine Attraktion im Diffusionsgradienten. Durch Clustern des EphrinA5 mit einem anti-Fc-Antikörper (im 10-fachen Überschuss) wird der Betrag der Attraktion vergrößert, der Effekt wird deutlicher. Durch Substratwechsel von Laminin zu Fibronectin kann die Attraktion in eine Repulsion umgewandelt werden. In Kontrollexperimenten wird reines Medium ohne Lenkungsmolekül in der Kapillare verwendet.

Verhalten temporaler Axone im EphrinA2-Gradienten

Neben EphrinA5 ist auch EphrinA2 im optischen Tektum des Hühnchens exprimiert. EphrinA2 bildet *in vivo* einen flacheren Gradienten aus als EphrinA5, in dem die Konzentration von anterior nach posterior ansteigt. Untersucht werden soll, ob die zwei Gradienten aus EphrinA5 und EphrinA2 gleiche Funktionen bei der Zielgebietsfindung ausüben, d.h. redundant in ihrer Funktion sind, oder ob sie unterschiedliche Aufgaben bei der Axonlenkung haben. Dazu wird EphrinA2 in verschiedenen Konzentrationen getestet (siehe Tabelle 3).

Eingesetzte Konzentration an EphrinA2	Kollapshäufigkeit in Prozent	Winkelmittelwert
5 µg/ml	89%	-
2,5 µg/ml	90%	-
1 µg/ml	25%	6°

Tabelle 3: Temporale Axone im EphrinA2-Gradienten. Werden 2,5 bzw. 5 µg/ml EphrinA2 in der Kapillare eingesetzt, resultieren Kollapshäufigkeiten bis zu 90%. Bei Verringerung der Konzentration auf 1 µg/ml erniedrigt sich der Kollapsanteil auf 25%, und es wird Lenkung (Attraktion) beobachtet, im gleichen Ausmass (gemessen anhand der Winkelmittelwerte und Kumulationskurven, Daten nicht gezeigt) wie im EphrinA5-Gradienten mit derselben Konzentration von 1 µg/ml.

Die Kollapshäufigkeit bei 1 µg/ml im EphrinA2-Gradienten ist mit derjenigen im EphrinA5-Gradienten vergleichbar, steigt dann aber bei Erhöhung der Konzentration an EphrinA2 sprunghaft an auf 90 %, während die Kollapshäufigkeit bei vergleichbarer Konzentration von 5 µg/ml im EphrinA5-Gradienten nur 69% beträgt. Der Betrag und die Richtung der Lenkung bei 1 µg/ml ist allerdings vergleichbar zwischen EphrinA2 bzw. EphrinA5.

Wachstum temporaler Axone auf Basallamina im EphrinA5-Gradienten

In den bisherigen Versuchen war Laminin als Substrat für die auswachsenden Axone verwendet worden. Laminin stellt jedoch ein Substrat dar, dem viele der *in vivo* vorhandenen Bestandteile fehlen. Ein eher der *in vivo* Situation entsprechendes Substrat ist Basallamina, die neben dem Hauptbestandteil Laminin noch andere Proteine wie Kollagen, Nidogen, Agrin und Perlecan beinhaltet (Halfter et al., 2000). Sie wird aus Hühnchenretinae E7 präpariert.

Auf Basallamina weisen die Wachstumskegel eine andere Morphologie auf als auf Laminin. Sie sind keulenförmig, besitzen kein ausgeprägtes Lamellipodium und wenige kurze Filopodien. Die Wachstumskegel sind weniger kollapsanfällig als auf Laminin. Wie schon im Kapitel über Kügelchenversuche auf verschiedenen Substraten diskutiert, ist sowohl die Kollapshäufigkeit als auch die Stärke der Kollapsreaktion deutlich reduziert, d.h. der Kollaps fällt weniger

dramatisch aus, der Wachstumskegel stellt sein Wachstum ein, aber es kommt nur in den seltensten Fällen zu einem Rückzug des gesamten Axonschaftes, wie es auf Laminin sehr häufig zu beobachten ist.

Getestet wird, ob EphrinA5 auf temporale Axone kultiviert auf Basallamina attraktiv wirkt. Zuerst wurde EphrinA5 in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Es resultierte eine Kollapsreaktion in 11% aller beobachteter Wachstumskegel, die mit 7% in Kontrollexperimenten ohne Lenkungsmolekül vergleichbar ist, und ein Winkelmittelwert von +5°, dessen Kumulationsverteilung nicht signifikant verschieden von Kontrollexperimenten war (Man-Whitney Test, $p = 0,333$). Bei Erhöhung der Konzentration von EphrinA5 in der Kapillare auf 5 µg/ml zeigte sich ein signifikanter Effekt. Die Kollapshäufigkeit lag bei 32%, es resultierte ein Winkelmittelwert von +9° (Signifikanz nach Man-Whitney $p = 0,07$).

EphrinA5 wirkt auf temporale Axone, die auf Basallamina wachsen, attraktiv. Die Attraktion im EphrinA5-Gradienten ist also kein Artefakt auf Laminin, sondern kann auf Basallamina als Substrat reproduziert werden.

Verhalten temporaler und nasaler Axone im BDNF-Diffusionsgradienten

BDNF (brain derived neurotrophic factor) in der Konzentration von 50 µg/ml wird analog den Xenopusversuchen an retinalen Ganglienzellaxonen des Hühnchens auf seine Lenkungseigenschaften hin getestet. Verglichen werden temporale und nasale Axone.

Temporale Axone reagieren mit Attraktion auf einen BDNF-Gradienten (es resultiert ein Winkelmittelwert von 7°, Signifikanz im Vergleich mit Kontrollversuchen nach Man-Whitney $p = 0,054$). Nasale Axone zeigen keine durch BDNF induzierte Richtungsänderung. Die Richtungswahl temporaler Axone ist entgegengesetzt zur Richtungswahl retinaler Ganglienzellaxone des Xenopus, die im BDNF-Gradienten eine deutlich repulsive Reaktion aufweisen. Es wird deutlich, dass die Effekte geringer ausfallen als bei Verwendung von Xenopusneuronen, wie es schon im EphrinA5-Gradienten der Fall war.

Auswirkung verschiedener Entwicklungsstadien auf die Reaktion im Netrin-Diffusionsgradienten

Im optischen Wachstumspfad ist eine Netrinquelle bei Verlassen des Auges bekannt. Hier könnte eine altersabhängige Reaktion der Axone beteiligt sein. Deshalb werden retinale Ganglienzellaxone des Hühnchens an verschiedenen Tagen nach der Befruchtung präpariert und ihr Verhalten nach 24 Stunden in Kultur im Diffusionsgradienten untersucht. Die Experimente ergeben einen altersabhängigen Effekt (siehe Tabelle 4 und Abbildung 43).

Präparationsalter der retinalen Ganglienzellaxone mit Angabe des jeweiligen Substrates <i>in vitro</i>	Winkelmittelwerte im Diffusionsgradienten
E5 auf Laminin	13°
E5 auf Fibronectin	-8°
E6 auf Laminin	-3°
E6 auf Fibronectin	2°

Tabelle 4: Einfluss des Alters der präparierten retinalen Ganglienzellaxone des Hühnchens auf ihre Sensitivität gegenüber Netrin-1 (5 µg/ml). Retinale Ganglienzellaxone, die am Tag 6 nach Befruchtung präpariert wurden, zeigen keine Sensitivität mehr gegenüber einem Netringradienten. E5-Axone dagegen reagieren mit Richtungsänderung, die abhängig vom verwendeten Substrat ist. Auf Laminin resultiert Attraktion, auf Fibronectin Repulsion.

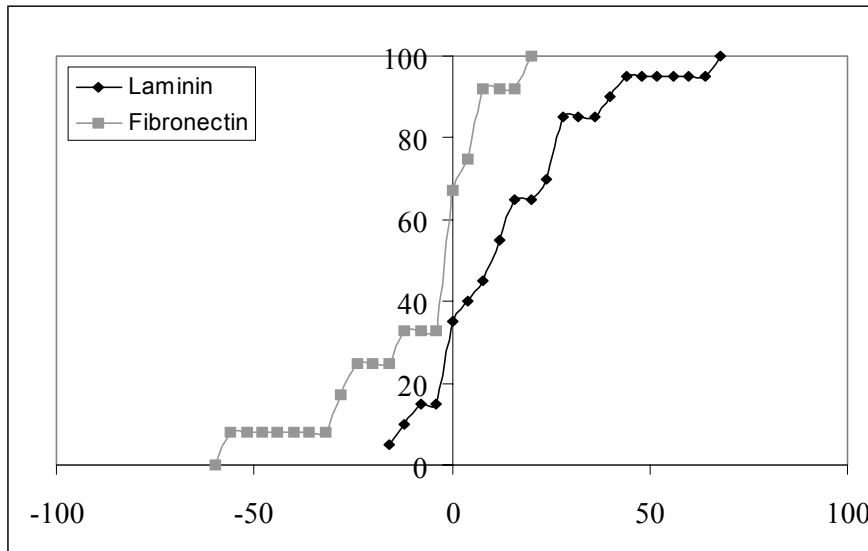


Abb. 43: Kumulationsverteilung der Winkel im Netrin-Diffusionsgradienten (5 µg/ml) in der Kapillare. Gezeigt sind ausschliesslich Versuche mit E5 (Embryonaltag 5) präparierten retinalen Ganglienzellaxonen des Hühnchens (Signifikanz t-Test $p = 0,007$). Werden E6 alte Hühnchen zur Präparation verwendet, sind die Kumulationsverteilungen auf den Substraten Laminin bzw. Fibronectin nicht mehr signifikant unterschiedlich (Signifikanz t-Test $p = 0,157$) (Daten nicht gezeigt).

Netrin wirkt auf Laminin als Substrat attraktiv, auf Fibronectin repulsiv auf retinale Ganglienzellaxone von Hühnchen, die im Alter E5 präpariert waren. Wie im Falle des BDNF-Gradienten, ist im Netringradient der Effekt verglichen mit den Resultaten aus Xenopusversuchen umgekehrt und die resultierenden Winkelmittelwerte sind betragsmässig kleiner.

Zusammenfassung der Experimente an Hühnchenaxonen

Wird EphrinA5 an Kügelchen gebunden und werden auswachsende Wachstumskegel mit diesem lokal gebundenen EphrinA5 konfrontiert, reagieren temporale Axone abhängig vom Substrat und der Beschichtung der Kügelchen: mit sinkender EphrinA5-Beschichtung sinkt der Kollaps- und steigt die Lenkungsanteil. Auf Basallamina und Laminin sind ähnliche Tendenzen zu beobachten.

Werden EphrinA5-beschichtete Kügelchen seitlich der Wachstumskegel platziert, reagieren die Axone bevorzugt mit Richtungsänderung in Richtung des Kügelchens („Attraktion“). Eine „Reizung“ am Axonschaft 30 µm vom Wachstumskegel entfernt hat keinen Einfluss auf die Richtungswahl temporaler

Axone. Werden die Wachstumskegel mit zwei Kügelchen gleichzeitig gereizt, tritt im Vergleich zu der Reizung mit nur einem Kügelchen eine stark erhöhte Kollapsreaktion auf. In Experimenten, in denen die Wachstumskegel auf zwei verschiedenen Seiten mit Kügelchen gereizt werden, wird keine Richtungsänderung induziert. Werden zwei Kügelchen mit jeweils 15% EphrinA5-Beschichtung auf die gleiche Seite der Wachstumskegel plaziert, wird eine erhöhte Kollapsreaktion, aber keine Lenkung wie im Falle der Reizung mit einem 30% beschichteten Kügelchen beobachtet werden.

Werden Wachstumskegel mit zwei 30% beschichteten Kügelchen zeitlich versetzt gereizt, reagieren die Wachstumskegel auf das erste Kügelchen und das zweite Kügelchen mit Attraktion. Erfolgt jedoch eine Repulsion nach Kontakt mit dem ersten Kügelchen, tritt in allen beobachteten Fällen eine Kollapsreaktion nach Berühren des zweiten Kügelchens ein. In Kontrollexperimenten wuchsen die Wachstumskegel an beiden Kügelchen ohne Richtungsänderung vorbei.

Im Diffusionsgradienten ergab sich nur eine Sensitivität temporaler Axone bei Verwendung von 1 µg/ml EphrinA5 in der Kapillare. EphrinA2 zeigte eine ähnliche Wirkung auf temporale Axone. Durch Aggregation des EphrinA5-Fc mit einem anti-Fc-Antikörper konnte die Lenkungseigenschaft des EphrinA5 verstärkt werden. Durch Wechsel des Substrates von Laminin zu Fibronectin konnte die Richtungswahl der Axone beeinflusst werden. Weitere bekannte Lenkungsmoleküle wie Netrin-1 und BDNF konnten eine Richtungsänderung temporaler Axone induzieren. In Netrinversuchen ergab sich eine Altersabhängigkeit in der Sensitivität der Axone, nur am Embryonaltag 5 präparierte Axone reagierten auf Netrin-1.

4.3 Die retinotektale Projektion im Zebrafisch

Wachstum retinaler Axone des Zebrafisches im Streifentest

Begonnen wurde mit dem Streifentest, bei dem Proteine in Streifen an eine Substratoberfläche gebunden den Axonen angeboten wurden. EphrinA5 bewirkte ein gestreiftes Auswachsen der retinalen Ganglienzellaxone des Zebrafisches, wobei die Axone die EphrinA5-enthaltenden Bahnen meiden. In Kontrollexperimenten, in denen beide Streifen von Fc-Kontrollprotein gebildet werden, war keine Bevorzugung einer Bahn zu erkennen (siehe Abbildung 44).

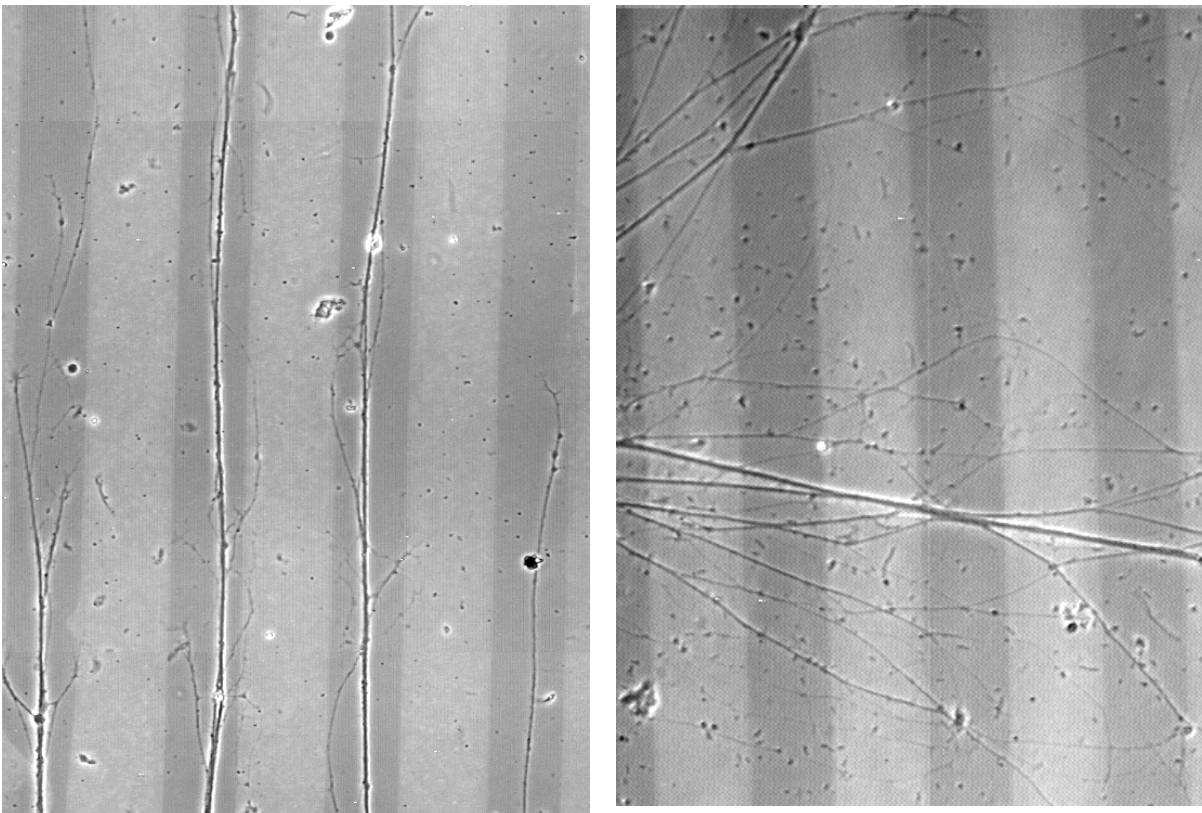


Abb. 44: Streifentepich mit retinalen Ganglienzellaxonen des Zebrafisches. Hellgraue Bahnen markieren die Streifen, in denen EphrinA5-Fc vorhanden ist. Der dunkelgraue Streifen enthält Fc-Protein. Es wird deutlich, dass retinale Ganglienzellaxone EphrinA5-enthaltende Bahnen meiden. In Kontrollversuchen ist keine Bevorzugung zu beobachten.

Wachstum retinaler Axone des Zebrafisches im EphrinA5-Diffusionsgradienten

EphrinA5-Gradienten bewirken eine Attraktion der Wachstumskegel des Zebrafisches in Richtung der Kapillare, wie bereits an retinalen Ganglienzellaxonen des Huhns und des Xenopus gezeigt werden konnte. In Kontrollversuchen wachsen die Axone ohne Richtungsänderung im Gradienten in ihrer ursprünglichen Richtung weiter (siehe Tabelle 5). Auffallend sind die häufig auftretenden Kollapsreaktionen, sowohl in Kontroll- als auch in EphrinA5-Versuchen. Vermutlich ist die Adhäsion dieser Axonart auf dem Substrat Laminin sehr schwach, so dass derart hohe Kollapshäufigkeiten resultieren.

Experiment	Kollapshäufigkeit in (%)	Winkelmittelwert (°)
EphrinA5 (5 µg/ml in der Kapillare)	91%	19°
Kontrolle (Medium ohne lenkende Substanz)	67%	-2°

Tabelle 5: Ergebnisse des Diffusionsgradienten mit retinalen Ganglienzellaxonen des Zebrafisches. Befindet sich EphrinA5 in der Kapillare, reagieren die meisten Axone mit Attraktion in Richtung der Kapillare. In Kontrollversuchen wird Medium ohne lenkende Substanz in die Kapillare gefüllt. Die Axone zeigen keine Richtungsänderung in diesem Gradienten. Auffällig ist die hohe Kollapshäufigkeit in Kontroll- und EphrinA5-Gradienten, die auf eine schwache Adhäsion der Axone ans Substrat zurückgeführt wird.

Vergleicht man die Effekte untereinander, die sich im EphrinA5-Diffusionsgradienten der verschiedenen Spezies ergeben, so resultieren im Fisch und im Frosch vergleichbare Winkelmittelwerte (Xenopus +20°, Zebrafisch +19°, während im Huhn geringere Effekte von nur +7° auftreten.

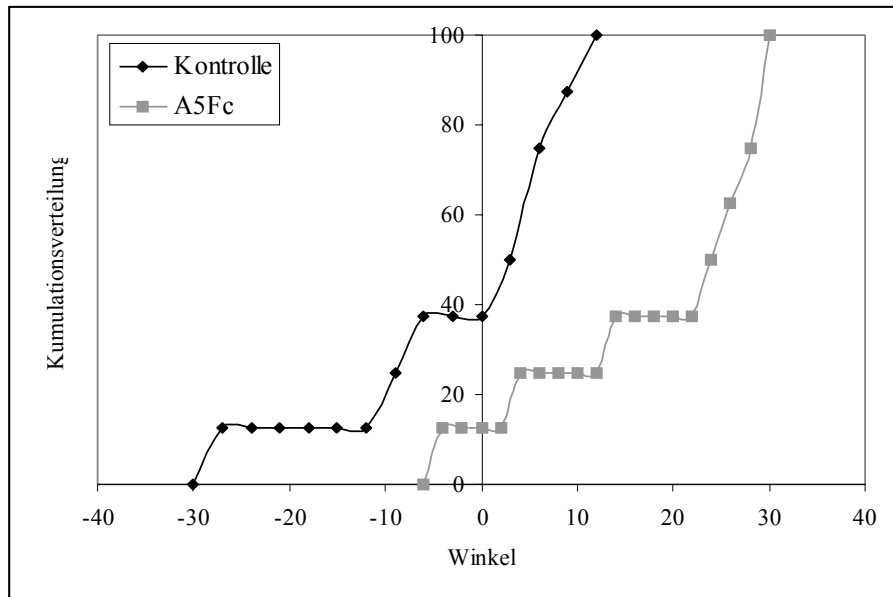


Abb. 45: Kumulationsverteilung der Winkel im Diffusionsgradienten mit retinalen Ganglienzellaxonen des Zebrafisches. Gezeigt sind die Kurven, die sich in Kontrollexperimenten ohne lenkende Substanz und in Versuchen mit 5 µg/ml EphrinA5-Fc in der Kapillare ergeben. Die Verteilungen sind signifikant unterschiedlich (t-Test $p = 0,007$).

Zusammenfassung der Experimente an Zebrafischaxonen

Erste Versuche mit retinalen Ganglienzellaxonen des Zebrafisch zeigen, dass EphrinA5 in substratgebundener Form von den Axonen gemieden wird. Im Diffusionsgradienten ergibt sich vergleichbar mit Ergebnissen aus Versuchen mit retinalen Ganglienzellaxonen von Huhn und Frosch eine Attraktion im EphrinA5-Gradienten.

5. Diskussion

Seit Entdeckung des EphrinA5 (Drescher et al., 1995) werden Ephrine als Lenkungsmoleküle diskutiert. Es gibt erste Hinweise auf eine Lenkungsfunktion des EphrinA5 *in vitro*. In dieser Arbeit soll die Rolle des EphrinA5 bei der Entstehung der retinotektalen Projektion dreier Spezies (Frosch *Xenopus laevis*, Huhn und Fisch *Brachydanio rerio*) untersucht werden und weitere Einblicke in den Mechanismus der Lenkung durch EphrinA5 gewonnen werden.

5.1 Die retinotektale Projektion in *Xenopus*

Expressionsanalyse der EphA-Rezeptoren in *Xenopus*

Die retinotektale Projektion in *Xenopus* ist in Bezug auf die Rolle des EphrinA5 noch wenig untersucht. Deshalb war die erste Aufgabe zur Aufklärung der Rolle des EphrinA5 in der retinotektalen Projektion in *Xenopus* eine Expressionsanalyse der EphA-Rezeptoren. Denn nur wenn die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung zustande kommen kann, d.h. die entsprechenden Rezeptoren für die Ephrin-Liganden auf den retinalen Ganglienzellaxonen und deren Wachstumskegeln vorhanden sind, können die Axone prinzipiell sensitiv auf Kontakt mit dem Ligand EphrinA5 reagieren.

In der Literatur ist eine Expression von EphA-Rezeptoren in der ventrotemporalen Retina des *Xenopus* beschrieben, die in Richtung ventronasal abnimmt und eine scharfe Grenze an der Fissur bildet. Diese Daten wurden aus intakten Gewebe-Färbungen erhalten (Nakagawa et al., 2000). Durch eine Färbung von Axonen und Wachstumskegeln in Kultur sollten diese Daten komplettiert werden. Diese Färbung auf Axonen und Wachstumskegeln zeigte das Vorhandensein der Rezeptoren ähnlich dem Hühnchen, nachdem die Axone 24 Stunden in Kultur auf Matrigel gewachsen waren.

Das heisst, EphA-Rezeptoren sind auf den retinalen Ganglienzellaxonen des *Xenopus* vorhanden und die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung kann stattfinden.

In den nächsten Experimenten können die Reaktionen der retinalen Ganglienzellaxone in den etablierten *in vitro* Testsystemen untersucht werden.

Verhalten retinaler Ganglienzellaxone des *Xenopus* im Kollapstest mit löslichem EphrinA5

Vergleicht man Resultate aus Kollapsexperimenten mit *Xenopus*neuronen mit den Ergebnissen gewonnen aus Versuchen mit Hühnchenaxonen, scheinen die Axone des *Xenopus* weniger sensitiv gegenüber Zugabe von löslichem EphrinA5 zu sein als die Hühnchenaxone (Kollapshäufigkeit temporaler Axone des Hühnchens 80-90%, *Xenopus* 44% im ganzen Explantat bei Zugabe von 1µg/ml EphrinA5). Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass im *Xenopus* Ganglienzellen aus allen Bereichen des Auges als Explantat ausgesät wurden und nicht zwischen temporalen und nasalen Axonen unterschieden wurde. Es ist aber gezeigt worden, dass temporale und nasale Axone im Huhn unterschiedlich auf EphrinA5 reagieren (Monschau et al., 1998). Die fehlende Unterscheidung im *Xenopus* könnte deshalb den Effekt durch die fehlende Sensitivität der nasalen Axone, die trotzdem bei der Analyse berücksichtigt wurde, verwässern.

Wachstum retinaler Ganglienzellaxone des *Xenopus* im Streifentest

Ein erster Hinweis, dass es sich bei EphrinA5 um ein Lenkungsprotein handeln könnte, wurde im Streifentest gewonnen. Dabei wurden native Tektemembranen aufgesaugt. Hier kann jedoch nicht der alleinige Einfluss des EphrinA5 studiert werden, da EphrinA5 im Gemisch mit anderen Proteinen vorkommt wie EphrinA2 oder RGM (*repulsive guidance molecule*).

Um den Effekt reinen EphrinA5-Proteins untersuchen zu können, wird ein modifizierter Streifentest mit reinen Proteinen, die an eine Glasoberfläche adsorbieren, verwendet. Diesem EphrinA5 fehlt der *in vivo* vorhandene GPI-Anker, der durch den Fc-Teil eines IgG-Antikörpers ersetzt wurde. Bereits im Kollapstest zeigte dieses Konstrukt seine kollapsinduzierende Aktivität. Auch im Streifentest ist das Fc-Konstrukt des EphrinA5 in der Lage, Axone zu lenken: die Axone meiden die EphrinA5-enthaltenden Streifen.

Welcher Mechanismus dem gestreiften Auswachsen zugrunde liegt, ist ein bislang ungeklärtes Problem. Eine mögliche Vorstellung beruht auf einem wiederholten Kollaps bei Auftreffen auf eine Streifenkante. Nach einem Rückzug beginnt die Wegfindung in einer klein wenig anderen Richtung, bis der Wachstumskegel erneut auf eine Kante stösst. Erst am Ende streckt sich das gesamte Axone, und das Ergebnis nach Fixierung ergibt das Bild des gestreiften Auswachsens. Die andere denkbare Möglichkeit der Wegfindung innerhalb der Bahnen ist die einer „echten“ Lenkung mit kontinuierlichem Wachstum ohne Rückzug und kleinen Winkeländerungen an den Kanten. Betrachtet man nur das Endergebnis, das gestreifte Auswachsen, kann nicht zwischen diesen Modellvorstellungen unterschieden werden.

Ein erster tieferer Einblick in den Mechanismus der Reaktion auf substratgebundenes EphrinA5 kann durch Anbieten von lokal an Kügelchen gebundenem EphrinA5 erhalten werden, indem die Reaktion des Wachstumskegels vor, während und nach Kontakt mit EphrinA5-beschichteten Kügelchen beobachtet und ausgewertet wird wie im folgenden Kapitel beschrieben.

Lenkung von retinalen Ganglienzellaxonen des *Xenopus* an EphrinA5-beschichteten Kügelchen

Direkt vor einen auswachsenden Wachstumskegel wird mit Hilfe einer optischen Pinzette (laser tweezer) ein mit EphrinA5-beschichtetes oder in Kontrollversuchen ein unbeschichtetes Kügelchen plaziert.

Versuche mit EphrinA5-beschichteten Kügelchen im *Xenopus*system führten zu Kollaps und Richtungsänderung der Axone. In der Literatur konnten ähnliche Ergebnisse mit einer anderen Neuronklasse und anderem repulsivem Material auf den Kügelchen gefunden werden. Fan und Raper (1995) benutzten Wachstumskegel von Hinterwurzelganglienzellen und Kügelchen mit repulsivem Material (brain derived collapsing factor). Beschichtete Kügelchen führten dort zu einer durchschnittlichen Richtungsänderung weg vom Kügelchen von 13°, im Falle des *Xenopus*systems war diese mittlere Richtungsänderung deutlicher mit 41°. Ähnliche Experimente (Shibata et al., 1998) mit

beschichteten Kügelchen wurden mit MAG (myelin associated protein) durchgeführt. Hippokampale Pyramidalneuronen reagierten in 72% der Fälle mit Kollaps, Lenkung konnte in diesem Fall nicht beobachtet werden.

In der Arbeit von Fan und Raper (1995) wurde vorgeschlagen, dass das Auftreten einer Kollaps- oder Lenkungsreaktion abhängt von der Dauer des Kontaktes mit den beschichteten Kügelchen. Nach dieser Vorstellung erzeugt ein lokaler kollapsinduzierender Stimulus ein Signal, das sich über den Wachstumskegel hinweg ausbreitet, dabei aber an Signalstärke verliert. Erfolgt nun ein kurzer oder schwacher Stimulus, verliert dieser schnell an Stärke und kann nur eine kurze Distanz im Wachstumskegel überbrücken. Die Folge ist eine lokale Erniedrigung des Lamellipodiumwachstums und damit Lenkung. Ist der Stimulus dagegen stark bzw. wird der Kontakt zum Kügelchen lange aufrecht erhalten, kann sich das Signal über den ganzen Wachstumskegel hinweg ausbreiten und es kommt zum vollständigen Kollaps. Aufgrund dieser Vorstellung kann das parallele Auftreten von Kollaps und Lenkung in ein und demselben Experiment leicht erklärt werden.

Die Wechselwirkung Eph-Rezeptor/Ephrinligand wird als hochaffin beschrieben. Eph-Rezeptor exprimierende Zellen bilden eine feste Bindung zu Ephrin-exprimierenden Zellen aus. Wie kann es dann überhaupt zu einem Rückzug des gesamten Axons kommen? Guthrie und Hattori (Guthrie, 2000; Hattori et al., 2000) konnten zeigen, dass am Rückzug Metalloproteasen (z.B. Kuzbanian) beteiligt sind, die den Ephrinliganden von der Zelloberfläche abspalten. Erst nach dieser Spaltung kommt es zum Rückzug des Axonschaftes. Wurde dagegen eine durch Mutation hergestellte nicht spaltbare Form eines Ephrinliganden auf Zellen exprimiert und Wachstumskegel damit konfrontiert, zeigten die Wachstumskegel zwar einen Einzug ihrer motilen Strukturen, konnten sich aber nicht zurückziehen, was sie im Falle eines Kontaktes mit Wildtyp-Ephrin innerhalb kürzester Zeit taten. Wäre diese Bindung durch Eph/Ephrin und Ablösung vom Substrat durch die Metalloproteasen der einzig denkbare Mechanismus, wäre eine Attraktion nicht erklärbar. In anderen

Projektionen konnte jedoch eindeutig eine attraktive Funktion der Ephrine nachgewiesen werden (Knöll et al., 2001; Mann et al., 2002). Es müssen also noch andere Faktoren wie vielleicht Integrine eine Rolle bei der Substratbindung eine Rolle spielen.

Verhalten retinaler Ganglienzellaxone des *Xenopus* im Diffusionsgradient löslicher Proteine

In der Literatur sind zahlreiche Experimente veröffentlicht, in denen die verschiedensten Proteine im Diffusionsgradienten getestet worden sind: Netrine (Torre et al., 1997, Ming et al., 1997, Höpker et al., 1999 and Hong et al., 2000), Semaphorine (Song et al., 1998, Tamagnone et al., 1999), Neurotrophine (Ming et al., 1997, 1999) und Neurotransmitter (Zheng et al., 1994, 1996) (vgl. den Review von Song und Poo, 1999). Nun sollte auch EphrinA5 als ein Vertreter der Ephrin-Proteinfamilie getestet werden.

Besonders interessant ist die Frage, ob die *in vivo* membranverankerten, zum Test *in vitro* aber künstlich löslich gemachten Ephrine trotz Verlust ihrer Membranbindung in der Lage sind, ihre Lenkungsfunktion *in vitro* zu erfüllen. Eine Aggregation des EphrinA5 mit Hilfe eines Antikörpers („Clusterung“) kann die fehlende Membranverankerung teilweise imitieren (Davis et al., 1994). Das Fc-Konstrukt des EphrinA5 kann mit einem anti-Fc-Antikörper aggregiert und im Diffusionsgradienten eingesetzt werden.

Nicht völlig zu klären war, ob der Diffusionsgradient tatsächlich diffusibel ist oder ob vielmehr die Proteine nach Verlassen der Kapillare an das Substrat adsorbieren und so in Wirklichkeit einen substratgebundenen Gradienten bilden. In der Literatur wird dieser Punkt zwar angedeutet, aber nicht untersucht (Ming et al., 1997). Zur Klärung wurden Versuche in der aktuellen Arbeit durchgeführt (Daten nicht gezeigt): ein Gradient aus EphrinA5 gekoppelt mit einem Fluorochrom-konjugierten Antikörper wird ohne Axone für eine Stunde auf Laminin als Substrat hergestellt, das überschüssige Medium abgenommen und die Substratoberfläche gewaschen, um nicht gebundenes Protein zu entfernen.

Anschliessend wird die Fluoreszenz des eventuell ans Substrat gebundene EphrinA5 gemessen. Es konnte keine Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Nach diesen Versuchen kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass Proteine im Diffusionsgradienten einen substratgebundenen Gradienten bilden, denn die Mengen an Protein könnten zu gering für eine verlässliche Detektion durch Fluoreszenz gewesen sein.

Verhalten retinaler Ganglienzellaxone des *Xenopus* im Netrin-Diffusionsgradient

Es zeigte sich, dass Netrine in der Lage sind, retinale Axone von *Xenopus in vitro* zu lenken. *In vitro* ergab sich eine Substratabhängigkeit der Richtungswahl, die im Zusammenhang mit zyklischen Nukleotiden erklärt werden kann. Auf dem Substrat Laminin, das den cAMP-Spiegel erniedrigt, reagieren die Axone der *Xenopus*retina mit Repulsion. Auf Fibronektin dagegen, das den cAMP-Spiegel nicht beeinflusst, erfolgt Attraktion (Höpker et al., 1999). Auch andere Lenkungsmoleküle können über Modulation des cAMP-Spiegels bzw. cGMP-Spiegels Richtungswechsel in Neuronen auslösen (Lohof et al., 1992, Ming et al., 1997, Song et al., 1997, Song et al., 1998). Aufgrund der Sensitivität gegenüber cAMP oder cGMP werden die Lenkungsmoleküle in zwei Gruppen eingeteilt (definiert von Song und Poo, 1999): cAMP-abhängige Richtungsänderungen führen Gruppe I Lenkungsmoleküle aus, cGMP abhängig sind Gruppe II Lenkungsmoleküle.

Diese *in vitro* Beobachtungen können eine mögliche Erklärung liefern, wie Netrin die Axone *in vivo* auf ihren korrekten Pfad leitet (Dingwell et al., 2000). Nach der Vorstellung der Autoren wachsen die Axone auf ihrem Weg vom Auge zum Gehirn zu einem definierten Zwischenziel (dem sogenannten optic nerve head, ONH), an dem sie eine Richtungsänderung durchführen müssen. Auf dem Weg sind Netrin und Laminin exprimiert, am ONH dagegen nur Netrin. Laminin bewirkt eine Modulation des cAMP-Spiegels. Das Netrinsignal am ONH erhöht die Konzentration an cAMP, exprimiertes Laminin wirkt diesem Netrinsignal entgegen und erniedrigt den cAMP-Spiegel, so dass ein

cAMP-Gradient im Wachstumskegel entsteht. Hohe cAMP-Konzentrationen bewirken Aktinpolymerisation und Wachstumskegellenkung zum ONH hin, während eine niedrige cAMP-Konzentration zu Aktindepolymerisation und damit Repulsion der Wachstumskegel zum ONH hin führt. So ergeben *in vitro* Beobachtungen und das *in vivo* Modell ein konsistentes Bild.

Verhalten retinaler Ganglienzellaxone des *Xenopus* im BDNF-Diffusionsgradient

Ein BDNF-(brain derived neurotrophic factor) Gradient bewirkt bei retinalen Ganglienzellaxonen des *Xenopus* kultiviert auf Laminin eine repulsive Antwort (Höpker et al., 1999).

In den beschriebenen Versuchen musste BDNF in einer unphysiologisch hohen Konzentration von 50 µg/ml eingesetzt werden, um einen Effekt zu induzieren. Dies ist in Übereinstimmung mit anderen in der Literatur beschriebenen Versuchen, bei denen mit retinalen Ganglienzellaxonen (RGZs) und Hinterwurzelganglienzellaxonen (dorsal root ganglion, DRGs) des Hühnchens gearbeitet worden war (Ernst et al., 2000). Um einen Effekt bei DRGs auszulösen, waren nur geringe Konzentrationen an BDNF notwendig, bei retinalen Ganglienzellaxonen dagegen sehr hohe Konzentrationen. Das könnte auf der unterschiedlichen Ausstattung der Axone mit trkB-Rezeptoren beruhen, die von BDNF aktiviert werden. RGZs exprimieren eine hohe Konzentration an sogenannten „*truncated*“ (verkürzten) trkB-Rezeptoren, die die Signalweiterleitung durch die „*full length*“ Rezeptoren (Rezeptoren mit vollständiger Aminosäuresequenz) inhibieren. DRGs dagegen exprimieren wenig „*truncated*“ Rezeptoren. Um also eine optimale BDNF-Signalstärke zu erhalten, müsste im Falle der RGZs eine höhere Konzentration an BDNF angeboten werden als bei DRGs. Diese Vorstellung könnte erklären, warum so unphysiologisch hohe Konzentrationen an BDNF im Versuch mit retinalen Ganglienzellaxonen eingesetzt werden musste.

Verhalten retinaler Ganglienzellaxone des *Xenopus* im EphrinA5-Diffusionsgradient

Die wichtigste Erkenntnis aus Experimenten mit retinalen Ganglienzellaxonen des *Xenopus* im Diffusionsgradienten ist: EphrinA5 kann retinale Axone lenken, und zwar auch in löslicher Form (Fc-Konstrukt).

Bemerkenswert ist, dass die Lenkung erst auftritt, wenn die Kapillare näher an die Wachstumskegel herangerückt wird. Durch Näherücken der Kapillare wird die effektive Konzentration am Wachstumskegel und die Steilheit des Gradienten erhöht. Bei einem Abstand von 100 μm , der in allen anderen Experimenten verwendet wurde, zeigte sich ausser einer mit steigender EphrinA5-Konzentration erhöhten Kollapshäufigkeit kein Lenkungseffekt. Die dosisabhängige Kollapsreaktion zeigte jedoch, dass das EphrinA5 aus der Kapillare am Wachstumskegel aktiv sein musste und auch von den Wachstumskegeln als ein kollapsinduzierendes Protein erkannt werden konnte. Die Kollapsreaktion ist in Übereinstimmung mit Daten gewonnen im Kollapstest: das lösliche Fc-Konstrukt des EphrinA5 führte auch im Kollapstest zu einer dosisabhängigen Kollapsreaktion. Im Kollapstest war die Kollapshäufigkeit im *Xenopus*system im Vergleich mit Hühnchenaxonen vergleichsweise niedrig (1 $\mu\text{g/ml}$: Hühnchen 80-90% Kollapsreaktion, *Xenopus* 44%). Deshalb besteht die Vermutung, dass im *Xenopus*system die retinalen Ganglienzellaxone unempfindlicher sind gegen EphrinA5 und deshalb die Konzentration an löslichem EphrinA5 allgemein höher sein muss, um gleiche Effekte auszulösen, wie im Hühnchensystem. EphrinA5 in substratgebundener Form dagegen kann im *Xenopus* und im Hühnchen im gleichen Konzentrationsbereich eine vergleichbare Reaktion hervorrufen. Gleiche Konzentrationen im Streifentest z.B. führen sowohl bei *Xenopus* als auch im Hühnchen zu gestreiftem Auswachsen der Axone. Die unterschiedlich benötigte Konzentration an EphrinA5 bezieht sich also nur auf die lösliche Form, was auf einen unterschiedlichen Signaltransduktionsweg bei löslichen und substratgebundenen Formen hinweisen oder auf eine stärkere Wirksamkeit des EphrinA5 in substratgebundener Form hindeuten könnte.

Höhere effektive Konzentrationen am Wachstumskegel hätten theoretisch auch durch eine Erhöhung der Konzentration in der Kapillare erreicht werden können. Bei Verwendung von höheren Konzentrationen mit Clustern der löslichen Konstrukte bildeten sich jedoch Aggregate, die die Kapillare blockieren, so dass es nicht möglich war, einen stabilen Gradienten aufzubauen. Die höchste Konzentration, die ohne Clustern eingesetzt werden konnte, waren 20 µg/ml, mit Clustern 5 µg/ml. Diese hohen Konzentrationen führten erwartungsgemäss zu einer Kollapshäufigkeit bis zu 80%. In den restlichen 20 % der Versuche trat Lenkung ein, die im Gegensatz zum Hühnchensystem auch deutlich erkennbar ausfiel (grosse Abweichungen der Winkelmittelwerte im Vergleich mit der Kontrolle). Das parallele Auftreten von Kollapsreaktion und Lenkung der Axone konnte auch in anderen *in vitro* Experimenten gefunden werden. Eine mögliche Erklärung wird bei der Diskussion des Lenkungsmodells von EphrinA5 angesprochen.

Das Vorzeichen der Lenkung (Attraktion versus Repulsion) war substratabhängig: auf Laminin resultierte eine attraktive Antwort; durch Wechsel des Substrates zu Fibronectin konnte ein repulsives Verhalten der Axone hervorgerufen werden. Diese substratabhängige Lenkungsumkehr ist ein aus der Literatur bekannter Effekt: auf Oberflächen mit Lamininbeschichtung resultierte in einem Netringradienten Repulsion, während auf Fibronectin, unbeschichtetem Glas oder Poly-D-Lysin die Axone Attraktion zeigten (Höpker et al., 1999).

Unerwartet war die Beobachtung, dass EphrinA5 in löslicher Form eine Attraktion der retinalen Wachstumskegel bewirkt, wo doch seine bisherige Wirkung hauptsächlich als repulsiv beschrieben worden war. Viele der bisher durchgeführten *in vitro* Versuche deuten auf eine repulsive Eigenschaft des EphrinA5 hin: im Kollapstest eingesetzt führt lösliches EphrinA5 zu einer Kollapsreaktion, im Streifentest meiden Axone die Bahnen, die EphrinA5 enthalten, und im Lenkungstest mit beschichteten Kügelchen bewirkt EphrinA5 eine Richtungsänderung der Axone nach Kontakt mit substratgebundenem EphrinA5. In den beschriebenen Experimenten wurden fast alle

Versuchsbedingungen konstant gehalten: gleiche Art von Axone (retinale Ganglienzellaxone und –wachstumskegel des *Xenopus*) im gleichen Stadium, die wachstumsfördernde Unterlage bildete Laminin, und das untersuchte Protein war EphrinA5 als Fc-Konstrukt. Die offensichtlichen Unterschiede liegen in verschiedenen langen Versuchszeiten und damit unterschiedlich langer EphrinA5-Exposition der Axone und in verschiedenen Aggregationszuständen des Proteins (durch Antikörper geclustert oder ungeclustert, in löslicher oder substratgebundener Form).

Die unterschiedlichen Versuchszeiten und damit die Dauer der EphrinA5-Exposition könnten eine Rolle zu spielen. Im Diffusionsgradienten werden Axone eine Stunde lang beobachtet, es resultiert ein attraktiver Effekt. Wie schon in Experimenten mit EphrinA5-beschichteten Kügelchen an Hühnchenaxonen beschrieben tritt Attraktion als bevorzugte Reaktion auf ein seitlich vom Wachstumskegel plaziertes Kügelchen auf. Auch in diesem Experiment werden Axone nur ein bis zwei Stunden beobachtet. Haben Axone dagegen die Möglichkeit, länger mit EphrinA5 in Kontakt zu stehen wie etwa im Streifenfest für 24 Stunden, resultiert ein Vermeiden der EphrinA5-enthaltenden Bahnen. Diese Beobachtungen werden jedoch genauer in der Diskussion des Lenkungsmodells von EphrinA5 diskutiert und sollten hier nur erwähnt werden.

Ein in der Literatur ebenfalls bekannter Effekt ist, dass je nach Aggregation der Liganden zu Dimeren, Tetrameren oder höheren Multimeren unterschiedliche Antworten hervorgerufen werden können (Stein et al., 1998). Dass das Clustern einen Einfluss auf die Signaltransduktion haben könnte, geht aus folgenden eigenen Ergebnissen hervor. Im Kollapstest und im Diffusionsgradienten wurden zwei Proteinkonstrukte verglichen: EphrinA5 5 $\mu\text{g/ml}$ geclustert und EphrinA5 20 $\mu\text{g/ml}$ ungeclustert. Im Kollapstest resultierten vergleichbare Kollapshäufigkeiten bis zu 88%. Im Diffusionsgradienten lagen die Kollapshäufigkeiten ähnlich hoch, jedoch konnten 20 $\mu\text{g/ml}$ EphrinA5 ungeclustert eine Lenkung induzieren, 5 $\mu\text{g/ml}$ EphrinA5 geclustert nicht. Das könnte dafür sprechen, dass durch unterschiedliche Aggregate verschiedene Signaltransduktionswege angeschaltet werden. Das ungeclusterte Fc-Konstrukt

bildet Dimere, während durch Clustern mit einem anti-Fc-Antikörper höhere Aggregate entstehen.

Auch im Streifentest und im Lenkungstest mit beschichteten Kügelchen wird das EphrinA5 vor der Immobilisierung auf dem Substrat bzw. Kügelchen mit einem Antikörper vorgeclustert. Welche Aggregate dort entstehen und welche räumliche Anordnung diese Aggregate auf der Substratoberfläche einnehmen, ist unbekannt. Es wird aber davon ausgegangen, dass die aktiven Proteindomänen den Axonen frei zugänglich vorliegen, da spezifische Reaktionen wie Kollaps oder Lenkung beobachtet werden können.

Man könnte weiterhin mutmassen, dass zwei verschiedene Rezeptorarten existieren, deren eine Art Kollaps, die andere Lenkung vermittelt. In der Literatur wurden jedoch nie unterschiedliche Rezeptortypen erwähnt.

5.2 Die retinotektale Projektion im Hühnchen

Die retinotektale Projektion im Hühnchen stellt die bestuntersuchte Projektion der in dieser Arbeit beschriebenen Modellsysteme dar. Bereits 1995 wurde von Drescher und Mitarbeitern die Aufreinigung eines Proteins beschrieben, das zu damaliger Zeit RAGS (*repulsive axon guidance signal*) genannt wurde. Nachdem später eine Reihe ähnlicher Proteine entdeckt worden waren, wurde eine einheitliche Nomenklatur vereinbart, so dass RAGS in EphrinA5 umbenannt wurde (Eph Nomenclature Committee, 1997). Gleichzeitig wurden Expressionsdaten und *in vitro* Experimente wie der Kollaps- und der Streifentest mit retinalen Ganglienzellaxonen des Hühnchens veröffentlicht (Drescher et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass EphrinA5 ein kollapsinduzierendes Protein ist, das ein gestreiftes Auswachsen der Axone bewirken kann. Es ist gradiert im Tektum exprimiert, wenn die retinalen Axone ihr Zielgebiet erreichen. Dies liess vermuten, dass es sich bei EphrinA5 um ein Lenkungsmolekül handelt, wie z.B. Netrin oder Semaphorin.

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob EphrinA5 auch eine Richtungsänderung des Wachstums retinaler Ganglienzellaxonen des Hühnchens induzieren kann analog den Resultaten dieser Arbeit an

Xenopusaxonen. Neben EphrinA5 (und EphrinA2) wurden andere Lenkungsmoleküle an retinalen Ganglienzellaxonen des Hühnchens getestet, die bereits an retinalen Ganglienzellaxonen oder Axonen von Rückenmark-neuronen des Xenopus ihre Lenkungseigenschaften gezeigt hatten (Netrin, BDNF). Ein besseres Verständnis des Axonlenkungsmechanismus wird in Experimenten mit EphrinA5-beschichteten Kügelchen gewonnen. Axone werden an verschiedenen Stellen mit diesen Kügelchen gereizt und ihre Reaktionen ausgewertet.

Lenkung von retinalen Ganglienzellaxonen des Hühnchens an EphrinA5-beschichteten Kügelchen (Kügelchen direkt vor dem Wachstumskegel plaziert)

Zwei Substrate, Laminin und Basallamina, werden bei Positionierung der EphrinA5-beschichteten Kügelchen direkt vor die auswachsenden Wachstumskegel verglichen. Zusätzlich wird die Kügelchenbeschichtung mit EphrinA5 variiert. Unabhängig vom Substrat ist bei den Versuchen auf Laminin und Basallamina die gleiche Tendenz zu erkennen: mit sinkender EphrinA5-Konzentration sinkt der Kollapsanteil, während der Lenkungsanteil steigt. Nach einer Modellvorstellung von Fan und Raper (1995) ist die Reaktion bei Kontakt mit EphrinA5-beschichteten Kügelchen von der Stärke des Kontaktes abhängig. In den beschriebenen Hühnchenexperimenten mit verschiedenen Konzentrationen an EphrinA5 auf den Kügelchen könnte die Stärke des Signals nicht über eine zeitliche Dauer, sondern über die Konzentration moduliert werden. Je höher die Konzentration an EphrinA5, umso besser kann sich das Signal über den gesamten Wachstumskegel verteilen, und desto wahrscheinlicher wird ein Kollaps. Je kleiner dagegen die Konzentration, umso früher verliert das Signal an Stärke, und desto lokaler bleibt die induzierte Repulsion auf der Seite des Wachstumskegels, an der das Signal ausgelöst worden war, so dass es zu einer Lenkung weg von der auslösenden Quelle kommt. Genau diese Tendenz ist in unseren Experimenten zu erkennen: je kleiner die EphrinA5-Konzentration auf den Kügelchen ist, desto wahrscheinlicher wird eine Lenkung. Je höher jedoch die Konzentration an EphrinA5 ist, desto häufiger kommt es zu einer

Kollapsreaktion. Die im Hühnchensystem gewonnenen Ergebnisse stimmen sehr gut mit dem vorgeschlagenen Modell überein.

Im Vergleich der beiden Substrate scheinen die Wachstumskegel auf Basallamina stabiler gegen Kollaps zu sein, denn bei Betrachtung gleicher Kügelchenbeschichtung bzw. in Kontrollversuchen sind die jeweiligen Kollapshäufigkeiten in jedem Fall auf Basallamina geringer. Z.B. reagieren bei 80% Kügelchenbeschichtung alle Wachstumskegel auf Laminin mit Kollaps, während es auf Basallamina nur 52% sind. Auch in Kontrollversuchen liegt die Wahrscheinlichkeit für eine (unspezifische) Kollapsreaktion auf Laminin höher (22%) als auf Basallamina (0%).

Lenkung von retinalen Ganglienzellaxonen des Hühnchens an EphrinA5-beschichteten Kügelchen (Kügelchen seitlich plaziert)

Während bei Plazierung des Kügelchens direkt vor dem auswachsenden Wachstumskegel schlecht zwischen Repulsion oder Attraktion im herkömmlichen Sinne unterschieden werden kann (denn der Wachstumskegel hat nur die Möglichkeit, „gerade“ ohne Richtungsänderung weiterzuwachsen, oder seine Richtung zu ändern, und das muss in diesem Fall immer weg vom Kügelchen passieren, wobei die beiden denkbaren Richtungen symmetrisch zum Kügelchen liegen), kann bei seitlichem Ablegen des Kügelchens das Vorzeichen der Richtungsänderung bestimmt werden. Bei einer Attraktion würde sich das Axon dem Kügelchen zuwenden, um das Kügelchen herumwachsen und mit seinen Filopodien in ständigem Kontakt mit dem Kügelchen bleiben. Erwartet war ein Vermeiden des EphrinA5-beschichteten Kügelchens und damit Richtungsänderung in Richtung Repulsion. Überraschenderweise wurde aber Attraktion bevorzugt beobachtet.

Die beschriebene Reaktion auf EphrinA5-beschichtete Kügelchen ist jedoch von anderen Reaktionen zu unterscheiden, die beispielsweise bei Gallo et al., 1997 beschrieben sind. Die Autoren definierten den Mechanismus der Kügelchenattraktion an NGF-beschichteten Kügelchen wie folgt: die Filopodien

des Wachstumskegels suchen ihre Umgebung nach Stimuli ab. Nach einem ersten Kontakt mit dem attraktiven Kügelchen über ihre Filopodien wird dieser anfängliche Kontakt stabilisiert und verdickt. Es kommt zu einer längeren Verweildauer des Wachstumskegels unter dem Kügelchen (bis zu 14 Minuten), im Weiterwachsen schlägt der Wachstumskegel eine neue, von der ursprünglichen Richtung abweichenden Orientierung ein. Ähnlich läuft die Reaktion von Axonen der Hinterwurzelganglienzellen des Hühnchens an Lamininkügelchen ab (Kuhn et al., 1998). Eine derartige Reaktion konnte mit EphrinA5-beschichteten Kügelchen jedoch nicht beobachtet werden. Hier war das berührende Filopodium niemals verdickt oder hatte längeren Kontakt zum Kügelchen. Auch kam es zu keiner Verzögerung in der Wachstumsgeschwindigkeit, was ein Fehlen eines Verweilens am Kügelchen beweist.

Abhängigkeit der Lenkung vom Reizort (Kügelchen am Axonschaft)

Ein Platzieren von EphrinA5-beschichteten Kügelchen direkt vor und seitlich der Wachstumskegel führte zu einer Ablenkung von der ursprünglichen Wachstumsrichtung der Axone. Interessant ist die Frage, ob auch eine Reizung am Axonschaft weiter entfernt vom Wachstumskegel eine Richtungsänderung auslösen kann. In Experimenten mit temporalen Axonen des Hühnchens war eine Reizung 30 μm vom Wachstumskegel entfernt nicht ausreichend für eine Lenkung. Das könnte bedeuten, dass die Informationsverarbeitung der Signale der Lenkungsmoleküle (vielleicht aus Zeitersparnis) hauptsächlich im Wachstumskegel stattfindet. Ein Informationsaustausch zwischen Soma und Wachstumskegel scheint nicht nötig, die Information über Richtungsänderungen liegt allein im Wachstumskegel.

Ein anderer Grund für die fehlende Sensitivität könnte ein Fehlen der zur Reizaufnahme benötigten Rezeptoren sein. Durch Färbungen mit alkalischer Phosphatase konnte gezeigt werden, dass die Färbung der Eph-Rezeptoren in Richtung Axonschaft abnimmt. Die höchste Konzentration an Rezeptoren konnte im Wachstumskegel sichtbar gemacht werden (Dr. Uwe Drescher, persönliche Mitteilung). Im Eph/Ephrinsystems scheint der Wachstumskegel alleine für die Richtungsänderung verantwortlich zu sein.

Gleiche Ergebnisse haben auch andere Studien ergeben, bei denen die Wachstumskegel von ihren Somata durch einen Schnitt getrennt worden waren. Die isolierten Wachstumskegel konnten bis zu 3 Stunden normal weiterwachsen und starben erst dann einen plötzlichen Tod. Diese Experimente wurden zum einen *in vivo* durchgeführt, in denen Axone, die schon nahe ihres Zielgebietes waren, normal ins Tektum einwachsen konnten (Harris et al., 1987), zum anderen *in vitro*, wo zumindest eine Stunde lang noch Kollaps- und Lenkungsexperimente mit vom Soma getrennten Axonen durchgeführt werden konnten (Davenport et al., 1993; Campbell und Holt, 2001).

Die Abhängigkeit anderer Reaktionen vom Reizort konnte auch von anderen Gruppen gezeigt werden. BDNF-beschichtete Kügelchen konnten z.B. einen durch NO-ausgelösten Kollaps verhindern, allerdings nur, wenn sie direkt am Wachstumskegel plaziert worden waren. Lagen die Kügelchen dagegen 20-40 μm hinter dem Wachstumskegel am Axonschaft, trat Kollaps nach NO-Zugabe ein (Ernst et al., 2000). Eine andere Arbeit zeigt eine Reizortabhängigkeit bei der durch FGF2 ausgelösten Bildung von Seitenästen am Axonschaft. Je weiter weg vom Wachstumskegel die Reizung stattfand, desto geringer war die Wahrscheinlichkeit eines Seitenzweigs (60 μm vom Wachstumskegel entfernt 20%), bzw. umgekehrt, je näher das Kügelchen am Wachstumskegel plaziert wird, umso höher wird die Wahrscheinlichkeit (60%), dass sich dort ein Seitenast bildet (Szebenyi et al., 2001). Dies deckt sich mit den hier gewonnenen Ergebnissen.

Andere Studien zeigen, dass der Axonschaft von Neuronen sehr wohl noch sensitiv gegenüber Signalen von aussen sein kann. Diese Sensitivität konnte bei der Entstehung von Seitenverzweigungen beobachtet werden. Eine Reizung mit BDNF- oder NGF-beschichteten Kügelchen am Axonschaft von Axonen der Hinterwurzelganglienzellen führte zur Entstehung filopodiale Aktivität am Ort der Reizung, bei der letztendlich stabile Filopodien mit einer Länge bis zu 60 μm entstanden (Gallo und Letourneau, 1998). Davenport und Mitarbeiter stellten nach einem Kollaps temporaler Axone nach Kontakt mit posterioren Tektummembranen eine Neubildung lateraler Seitenäste fest, die sich bis zu 300

um weit vom Wachstumskegel entfernt bildeten (Davenport et al., 1999). Verzweigung und die Bildung lateraler Seitenäste kann auch durch Anlegen eines elektrischen Feldes am Axonschaft induziert werden (McCaig, 1990; Williams et al., 1995). In neueren Studien von Yates et al., 2001 wurde der Bildung von Seitenästen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der retinotektalen Projektion im Hühnchen zugesprochen.

Das Entstehen von Verzweigungen weit entfernt vom Wachstumskegel kann in unseren Versuchen nicht ausgeschlossen werden, da nur ein Bereich bis 100 µm Entfernung von der Spitze des Axons beobachtet werden konnte. Es kann aber festgehalten werden, dass am Axonschaft plazierte EphrinA5-beschichtete Kügelchen keine Richtungsänderung im Wachstum des Wachstumskegels und im beobachteten Zeitfenster lokal keine Bildung von Seitenverzweigungen hervorrufen.

Reizung retinaler Ganglienzellwachstumskegel des Hühnchens mit zwei Kügelchen gleichzeitig

Neben Experimenten mit Reizung durch ein Kügelchen wurden auch Versuche mit Reizung durch zwei Kügelchen an retinalen Ganglienzellwachstumskegeln von Hühnchen auf Laminin durchgeführt. Generell führte eine simultane Reizung mit zwei Kügelchen zu einer stark erhöhten Kollapsreaktion im Vergleich zur Reizung mit nur einem Kügelchen; Lenkung kann jedoch weder bei Platzierung der Kügelchen auf der gleichen Seite des Wachstumskegels noch bei Platzierung auf verschiedenen Seiten beobachtet werden.

Bei Platzierung der Kügelchen auf der gleichen Seite des Wachstumskegels könnte man sich vorstellen, dass zwei mit 15% EphrinA5 beschichtete Kügelchen den gleichen Effekt auf das Verhalten der Wachstumskegel haben könnten wie ein Kügelchen mit 30% EphrinA5-Beschichtung. Bei Reizung mit zwei Kügelchen stieg die Kollapshäufigkeit ungewöhnlich hoch an, Lenkung konnte jedoch nicht beobachtet werden. Im Falle der 30% igen Beschichtung war bevorzugt Lenkung in Richtung Attraktion zu erkennen gewesen.

Eine mögliche Erklärung für die ungewöhnlich hohe Kollapshäufigkeit bei Kontakt mit zwei Kügelchen könnte sein, dass zwei Kügelchen eine grössere Fläche und damit mehr Rezeptoren auf dem Wachstumskegel stimulieren können als ein Kügelchen.

Das Ausbleiben einer Lenkung könnte dadurch erklärt werden, dass die beiden Stimuli nicht derart lokal wirken können wie bei einem Kügelchen, d.h. die Reizung erfolgt mehr diffus. Der Wachstumskegel kann in diesem Fall die Signalstärken zweier 15%iger Kügelchen nicht aufaddieren, sondern sieht die 15% EphrinA5-Beschichtung isoliert. Dann besitzen 15% beschichtete Kügelchen eine zu geringe Konzentration, um eine Lenkung auszulösen. Weiter denkbar wäre der Fall, dass die beiden Stimuli an einem Wachstumskegel sich gegenseitig inhibieren könnten, so dass kein Nettosignal resultiert (vgl. den Review von Meinhardt und Gierer, 2000, Stichwort laterale Inhibition).

Verhalten retinaler Ganglienzellaxone des Hühnchens im EphrinA5-Diffusionsgradienten

EphrinA5 in löslicher Form besitzt die Fähigkeit, temporale Axone des Hühnchens zu lenken, wie es bereits für Xenopusneurone beschrieben wurde. Auffällig ist der wesentlich geringere Betrag der Lenkung beim Hühnchen im Vergleich mit Xenopus. Wie im Xenopussystem treten im Diffusionsgradienten sowohl Kollaps als auch Lenkung auf. Die Kollapsreaktion temporaler Axone ist dosisabhängig, je höher die Konzentration an EphrinA5 in der Kapillare ist, desto höher wird die Wahrscheinlichkeit für eine Kollapsreaktion. Nasale Axone zeigen diesen dosisabhängigen Anstieg der Kollapsreaktion nicht. Interessant ist die Beobachtung, dass mit steigender Konzentration zwar die Kollapshäufigkeit, aber nicht der Lenkungsanteil stieg. Nasale Axone blieben bei höheren Konzentrationen insensitiv, sie zeigten weder einen dosisabhängigen Kollaps noch Richtungsänderung im EphrinA5-Diffusionsgradienten. Deshalb wurden weitere Experimente mit Proteinen aus anderen Lenkungsmolekülklassen und Tests der Substratabhängigkeit fast ausschliesslich mit temporalen Axonen durchgeführt.

Die vorherrschende Antwort der Wachstumskegel im Diffusionsgradienten (auf Laminin als Substrat) war Attraktion. Man hätte Repulsion erwartet, denn EphrinA5 wirkte auf Axone, die ebenfalls auf Laminin kultiviert waren, kollapsinduzierend im Kollapstest und repulsiv im Streifentest in der Hinsicht, dass Axone EphrinA5-enthaltende Streifen mieden. Der Effekt konnte jedoch durch verschiedene Versuche abgesichert werden:

- (1) durch Clustern des EphrinA5, wodurch höhere Komplexe und damit aktivere Einheiten des EphrinA5 entstehen, konnte der Betrag der Attraktion verdoppelt werden,
- (2) nach Kultivierung auf Basallamina als Substrat trat ebenfalls Attraktion ein,
- (3) diese Attraktion auf Basallamina konnte durch Verwendung höherer EphrinA5-Konzentrationen gleichfalls gesteigert werden,
- (4) die attraktive Antwort auf Laminin konnte durch Wechsel des Substrats zu Fibronektin in eine Repulsion umgekehrt werden,
- (5) auch in anderen Experimenten kann Attraktion beobachtet werden, z.B. bei seitlicher Positionierung EphrinA5-beschichteter Kügelchen.

Vergleich des Verhaltens von Axonen im EphrinA5- und EphrinA2-Diffusionsgradienten

Nachdem EphrinA5 seine Lenkungseigenschaften im Diffusionsgradienten unter Beweis gestellt hatte, lag die Vermutung nahe, dass auch EphrinA2, das ebenfalls einen Gradienten im Tektum bildet, die Fähigkeit zu lenken zeigen würde. Es wurde analog EphrinA5 eine Konzentrationsabhängigkeit der Lenkung untersucht. EphrinA2 zeigte im gleichen Konzentrationsbereich Lenkung wie EphrinA5 und der Betrag der Lenkung war ähnlich dem des EphrinA5, ein Einsatz höherer Konzentrationen bewirkte jedoch einen überproportionalen Anstieg der Kollapsreaktion.

Dieses Resultat ist in gewissem Sinne unerwartet. Nach den *in vivo* Verteilungen der Ephrine im Tektum würde man eine Lenkungsfunktion von EphrinA2 und eine Stoppfunktion von EphrinA5 erwarten. In der Literatur sind diese Effekte

beschrieben. EphrinA2 bildet einen flachen, EphrinA5 dagegen einen steilen Gradienten in Richtung posteriorer Grenze des Tektums. EphrinA5 wirkte im Streifenteppich repulsiv für temporale und nasale Axone, während EphrinA2 nur bei temporalen Axonen eine Wirkung zeigte, nasale Axone dagegen nicht in ihrem Wachstum beeinflusste (Brennan et al., 1997; Monschau et al., 1998). *In vivo* Studien an Zebrafischmutanten (*acerebellar*) ergaben ein Überschiessen der Axone über die posteriore Tektengrenze hinweg, weil die repulsive Grenze, die dort normalerweise von EphrinA5 gebildet wurde, fehlte (Picker et al., 1999). Auch im Vergleich der Einzelmutanten für EphrinA2 und EphrinA5 fällt der Phänotyp bei Fehlen der EphrinA5-Funktion deutlicher aus als der EphrinA2-Phänotyp (Frisen et al., 1998; Feldheim et al., 2000). Der Doppelknockout zeigt im Gegensatz zu den Einzelmutanten einen klar erkennbaren Effekt, was darauf hindeutet, dass Ephrine teilweise redundante und additive Funktionen haben (Feldheim et al., 2000). Weshalb im Diffusionsgradienten die Funktionen von EphrinA5 bzw. EphrinA2 vertauscht zu sein scheinen, ist unverständlich.

Auswirkung verschiedener Entwicklungsstadien auf die Sensitivität temporaler Axone gegenüber Netrin im Diffusionsgradienten

Werden temporale Axone des Hühnchens mit einem Netrin-Diffusionsgradient konfrontiert, reagieren nur Axone mit Lenkung, die aus am Tag 5 präparierten Hühnchenretinae ausgewachsen waren. Werden am Tag 6 präparierte Hühnchenretinae verwendet, sind diese insensitiv gegenüber dem Lenkungsmolekül Netrin. Diese Altersabhängigkeit stellt ein in der Literatur bekanntes Phänomen dar und wurde in den verschiedensten Experimenten beobachtet. BDNF kann z.B. in 6-8 Stunden alten Rückenmarksneuronen des *Xenopus* eine Kollapsreaktion induzieren, in 24 Stunden alten Kulturen gelingt dies nicht mehr (Wang et al., 1998). Campbell et al., 2001 konnten am durch Sema3A induzierten Kollaps zeigen, dass auch eine Alterung der Explantate in Kultur erfolgt und die Axone dann die gleiche Ausstattung mit Rezeptoren besitzen wie Axone, die erst in späteren Stadien präpariert worden waren. Eine ähnliche Untersuchung mit Alterung in Kultur ist an retinalen

Ganglienzellaxonen des Hühnchens nicht möglich, da Ganglienzellaxonen präpariert aus E4-Retinae keine Axone aussenden (Halfter et al., 1983).

Die unterschiedliche Sensitivität der Axone gegenüber den Lenkungsmolekülen rührt wahrscheinlich von der altersabhängigen Expression der Rezeptoren her. Am Beispiel der Mittellinie in *Drosophila* kann diese dynamische Regulation der Rezeptorexpression sehr anschaulich verdeutlicht werden (Stöckli und Landmesser, 1998). Axone, die auf die kontralaterale Gehirnseite wachsen müssen, werden von einer sekretierten Netrinquelle zur Mittellinie gelenkt. Während diese Axone kreuzen, verlieren sie ihre Sensitivität gegenüber Netrin durch Erniedrigung ihrer Netrinrezeptorexpression. Von der Mittellinie wird zusätzlich ein sekretierter Gradient von Slitprotein abgegeben, der mit Hilfe der Robo-Rezeptoren auf den Axonen repulsiv wirkt und die Axone von der Mittellinie weg auf die lateralen Pfade bringt. Gleichzeitig verhindert eine ständig hohe Expression des Robo-Rezeptors ein nochmaliges Kreuzen der Mittellinie. Durch das Zusammenspiel von Attraktion und Repulsion in Zusammenhang mit altersabhängiger Expression der Rezeptoren wird gewährleistet, dass die Axone einerseits ihr Zwischenziel finden, es andererseits aber auch wieder verlassen können. Die hier beschriebene altersabhängige Sensitivität bzw. Insensitivität steht also im Einklang mit den Ergebnissen aus Netrin-Diffusionsgradienten an Hühnchenaxonen.

Werden retinale Ganglienzellaxone des *Xenopus* im Netrin-Diffusionsgradienten beobachtet, resultierte auf Laminin als Substrat eine Repulsion der Axone, die mit dem *in vivo* Verhalten übereinstimmt. Die gleiche Axonart, nur aus einem anderen Tier, dem Huhn, präpariert, zeigt die genau entgegengesetzte Reaktion, nämlich Attraktion auf Laminin. Eine unterschiedliche Verteilung des Laminin *in vivo* und damit ein Einschlagen verschiedener Wege könnte für die von *Xenopus*- oder Hühnchenneuronen benutzten Pfade verantwortlich sein.

Das Beispiel des Netringradienten wie auch des BDNF-Gradienten, der die gleiche entgegengesetzte Richtungswahl im Vergleich *Xenopus*-Huhn zeigte,

verdeutlichen, dass unterschiedliche Mechanismen in den verschiedenen Tieren existieren. Im Falle der Ephrinlenkung scheint jedoch der Mechanismus in den unterschiedlichen Tierarten Frosch, Fisch und Huhn hochkonserviert zu sein, da in allen drei Spezies eine Attraktion als Antwort auf einen EphrinA5-Gradienten auftritt.

5.3 Die retinotektale Projektion im Zebrafisch

Der Zebrafisch als Modellsystem für Wirbeltiere war das Tier der Wahl bei der genetischen Suche nach Mutationen. Nachdem in einer gross angelegten Suche am MPI in Tübingen Mutanten mit abnormaler retinotektaler Projektion gefunden wurden, ist das Interesse, diese Projektion auch im Zebrafisch zu untersuchen, gestiegen (Haffter et al., 1996; Karlstrom et al. 1997; Trowe et al., 1996; Baier et al., 1996; Karlstrom et al., 1996). Viele Zebrafischphänotypen, die in derartigen Versuchsreihen gefunden wurden, erinnern an bestimmte Krankheiten im Menschen, so dass durch Studien am Fischmodell Einsichten für die Humanmedizin gewonnen werden können (Dooley und Zon, 2000; Malicki et al., 2002). In einer Mutante (*acerebellar*) sind die EphrinA5 und EphrinA2-Gradienten im Tektum des Zebrafisches gestört, so dass es zu überlappenden Terminationszonen und zu einem Überschliessen der Axone über ihr Zielgebiet hinaus kommt (Picker et al., 1999). Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass auch im Zebrafisch Ephrine und Eph-Rezeptoren an der Entstehung der retinotektalen Projektion beteiligt sind.

Im Zebrafisch wurden die Hühnchen-Homologe zu EphrinA5 (L4) und EphrinA2 (L3) gefunden (Brennan et al., 1997). L3 ist gradiert im ganzen Tektum verteilt, L4 bildet eine scharfe Grenze am anterioren Ende des Tektums. Die Expression des L3 ist vergleichbar mit der Expression des EphrinA2 in Hühnchen, L4 ist dagegen wesentlich restriktiver exprimiert als EphrinA5 im Hühnchen. Die Vermutung liegt nahe, dass L3 an der Axonlenkung beteiligt ist, L4 dagegen die Tektumgrenze markiert, die die Axone nicht überwachsen dürfen und damit als Stoppsignal fungiert. Auch muss die Wechselwirkung mit

den Eph-Rezeptoren eine andere sein als im Hühnchen, da im Zebrafisch EphA4 gar nicht, und EphA3 nicht gradiert, sondern homogen auf der temporalen Retina exprimiert sind. Es konnten keine Eph-Rezeptoren auf der nasalen Retina gefunden werden (Brennan et al., 1997, Bovenkamp and Greer, 1997). In dieser Studie wurden ausserdem Kollapsexperimente und Streifentests durchgeführt, wobei die Ephrinproteine in Zellkultur in Zell-Linien exprimiert wurden. Als Kulturtestsystem wurden retinale Ganglienzellaxone des Hühnchens verwendet, da die Technik der Kultivierung retinaler Ganglienzellaxone des Zebrafisches zu dieser Zeit noch nicht zur Verfügung stand. Temporale und nasale Axone des Hühnchens zeigten eine Kollapsreaktion nach Kontakt mit EphrinA5- bzw. L4-exprimierenden Zellen und vermieden die L4-enthaltenden Streifen.

Erst kürzlich gelang es, retinale Ganglienzellaxone des Zebrafisches zu kultivieren (Dr. Suresh Jesuthasan, persönliche Mitteilung). Daraufhin wurden die bereits vorgestellten *in vitro* Tests auch mit dieser Axonart durchgeführt.

Im Streifentest mit alternierenden EphrinA5- gegen Kontrollprotein-enthaltende Bahnen entschieden sich die retinalen Ganglienzellaxone des Zebrafisches gegen die EphrinA5-Bahnen, dasselbe Verhalten, das schon die retinalen Ganglienzellaxone von Huhn und Frosch zeigten. Im Diffusionsgradienten reagierten die Wachstumskegel kultiviert auf Laminin in einem EphrinA5-Gradienten mit Attraktion, während im Kontrollgradienten keine bevorzugte Richtungsänderung zu beobachten war. Der Effekt, gemessen am Mittelwert aller gemessenen Winkel, ist betragsmässig vergleichbar mit dem der Xenopusexperimente.

5.4 Zusammenfassender Vergleich der verschiedenen Spezies (Frosch, Fisch und Huhn)

Beim Vergleich der Ergebnisse, gewonnen aus *in vitro* Experimenten mit retinalen Ganglienzellwachstumskegeln dreier Spezies (Frosch *Xenopus laevis*, Zebrafisch *Brachydanio rerio*, und Huhn), fällt eine Tatsache besonders auf: bei Betrachtung der Ergebnisse des Diffusionsgradienten wird deutlich, dass unabhängig davon, ob nun EphrinA5, Netrin oder BDNF eingesetzt worden

waren, der Betrag der Lenkung im *Xenopus* (und im Falle des EphrinA5 auch im Zebrafisch) immer erheblich grösser ist als im Huhn. Dieser Befund könnte mit der unterschiedlichen Entstehung der retinotektalen Projektionen in den verschiedenen Spezies in Zusammenhang stehen (Chien et al., 1995).

Korrekte Retinotopie scheint universell zu Beginn des Sehvorgangs vorhanden zu sein, d.h. sobald Säugetiere ihre Augen öffnen bzw. Amphibien, Fische und Vögel schlüpfen. Trotzdem entwickelt sich die retinotektale Projektion in Amphibien und Fischen verschieden von der von Vögeln und Säugetieren. In Amphibien und Fischen entsteht die Projektion in einem einzigen Schritt (single stage). In *Xenopus*, Goldfisch und Zebrafisch navigieren die retinalen Ganglienzellaxone direkt zu ihrem korrekten Zielgebiet und arborisieren dort. Tektum und Retina wachsen während des ganzen Lebens, die retinalen Verzweigungen vergrössern sich langsam und verschieben sich mit wachsendem Tektum, um eine korrekte Topographie aufrecht zu erhalten.

In Ratte und Huhn dagegen entwickelt sich die retinotektale Projektion in zwei Stufen. Retinale Ganglienzellaxone bilden anfänglich eine diffuse Projektion und verfeinern diese grobe Projektion durch selektives Verzweigen zu Seitenästen und Elimination der falsch terminierten Axone. Zur Zeit der Augenöffnung sind die Axone präzise in ihren richtigen Terminationszonen verteilt. Vermutlich sind anschliessend am Verfeinerungsvorgang auch aktivitätsabhängige Prozesse beteiligt.

Diese unterschiedlichen Entwicklungsvorgänge in den verschiedenen Spezies könnten die Erklärung für den beobachteten Effekt im Vergleich *Xenopus*/Zebrafisch/Huhn liefern. Im *Xenopus* und im Zebrafisch müsste EphrinA5 einen grösseren Effekt und einen stärkeren Einfluss auf die Richtungswahl der Axone haben, da die Entwicklung in nur einem Schritt erfolgt und deshalb die EphrinA5-Verteilung einen grösseren Anteil am Aufbau der anfänglichen retinotektalen Projektion zu haben scheint. Deshalb sind die Effekte *in vitro* von Beginn an grösser als im Huhn. Im Huhn dagegen folgt nach der anfänglichen Bildung einer groben Projektion noch ein zweiter

ausdrücklicher Verfeinerungsschritt, so dass die anfängliche Projektion weniger scharf sein darf als im *Xenopus* und im Zebrafisch. Deshalb sind vielleicht die Effekte im Huhn *in vitro* kleiner als im *Xenopus* und im Zebrafisch.

5.5 Modell der Lenkung durch EphrinA5

Bisher war die gängige Meinung, dass EphrinA5 ein repulsiv wirkendes Axonlenkungsmolekül sein könnte. Die repulsive Eigenschaft wurde aufgrund kollapsinduzierender Eigenschaften im Kollapstest in löslicher Form vermutet. Anhand von Streifentestversuchen, in denen EphrinA5 substratgebunden eingesetzt wird, wurde auf einen repulsiven Mechanismus geschlossen, da Axone die EphrinA5-enthaltenden Bahnen meiden. Ebenfalls als Indiz für Axonlenkung wurde derselbe Streifentest herangezogen, obwohl immer noch nicht klar ist, wie die „Lenkung“ im Streifentest zustande kommt. Da die *in vivo* Projektion in knockout-Mäusen durch Fehlen des EphrinA5 gestört war, wurde EphrinA5 eine Rolle bei der Entstehung der retinotektalen Projektion *in vivo* zugesprochen.

In dieser Arbeit konnte nun erstmals ein unabhängiger Hinweis dafür gefunden werden, dass EphrinA5 in der Lage ist,

- *in vitro* Axone zu lenken, d.h. eine Richtungsänderung zu induzieren, und
- auch in löslicher Form Axone zu lenken.

Beide Aussagen beinhalten bisher unerforschtes Terrain. Diffusionsgradienten wurden bisher nur mit *in vivo* diffusiblen Proteinen durchgeführt. EphrinA5 dagegen, das *in vivo* membranverankert existiert, musste erst künstlich löslich gemacht werden durch Ersatz des GPI-Ankers durch einen Fc-Teil eines IgG-Antikörpers.

Das System der Wahl, mit Hilfe dessen man Lenkung im Sinne einer Richtungsänderung nachweisen kann, ist der Diffusionsgradient löslicher Proteine. Die Fähigkeit des EphrinA5, Axone zu lenken, konnte an drei verschiedenen Spezies, Fisch, Frosch und Huhn, gezeigt werden. Die Richtungswahl der Axone, unabhängig von der Tierart, war in Richtung Attraktion. Erwartet gewesen wäre Repulsion, wenn man das Vermeiden der

EphrinA5-enthaltenden Bahnen und die kollapsinduzierende Wirkung des EphrinA5 berücksichtigt.

Eine Modellvorstellung kann hier vielleicht eine Erklärung liefern: es gibt Hinweise darauf, dass EphrinA5 zwei Aufgaben bei der Entstehung der retinotektalen Projektion erfüllt: eine Lenkungsfunktion und eine Stoppfunktion. Besonders wird das deutlich im Zebrafisch, der zwei Kopien von EphrinA5 (nämlich EphrinA5a und EphrinA5b) exprimiert. Beide EphrinA5-Proteine weisen unterschiedliche Expressionsmuster auf, die ihrerseits Hinweise auf ihre Funktion geben können: EphrinA5a ist gradiert im Tektum verteilt, während EphrinA5b einen hoch exprimierten Streifen an der posterioren Grenze an der Mittelhirn-Hinterhirngrenze ausbildet. Das lässt vermuten, dass EphrinA5a eine Lenkungsfunktion ausübt, während EphrinA5b eine Grenze oder ein Stoppsignal bildet, so dass die Axone nicht über ihr eigentliches Zielgebiet hinauschiessen. Untersuchungen an *acerebellar* Mutanten, denen beide Kopien des EphrinA5 fehlen, deuten auf eine gestörte retinotektale Projektion und ein Überschiessen der Axone über das eigentliche Ziel hinaus hin und legen damit die duale Funktion des EphrinA5 als Lenkungs- und Stoppmolekül nahe (Picker et al., 1999; Drescher 2002).

Basierend auf der Vermutung, dass EphrinA5 zwei Funktionen, nämlich Lenkungs- und Stoppfunktion ausübt, kann folgendes Modell vorgeschlagen werden: je nach Dauer der Exposition bzw. der Grösse der Konzentrationen im Gradienten wirkt EphrinA5 attraktiv (Lenkungsfunktion am Beginn des Gradienten *in vivo*) oder repulsiv, indem es das Weiterwachsen verhindert (Stoppfunktion am Ende des Gradienten *in vivo*).

Im Diffusionsgradienten ergibt sich Attraktion, obwohl Repulsion erwartet werden würde: aber der Gradient wird nur eine Stunde lang beobachtet, d.h. *in vivo* befindet sich der Wachstumskegel am Anfang des Tektumgradienten, EphrinA5 wirkt attraktiv, es übt seine Lenkungsfunktion aus. Der Streifenfest dagegen wird nach 24 Stunden in fixiertem Zustand beobachtet, hier hatten Axone während des 24-stündigen Wachstums ständig Kontakt mit EphrinA5, waren dem EphrinA5 demzufolge lange ausgesetzt, so dass hier EphrinA5 seine

Stoppfunktion ausübt, d.h. die Axone vermeiden die EphrinA5-enthaltenden Bahnen. Zeitrafferaufnahmen im Streifenteppich zeigten, dass Axone sehr wohl eine gewisse Zeitdauer auf den EphrinA5-Streifen wachsen können (Daten nicht gezeigt) und erst nach längerer Exposition EphrinA5 vermeiden.

Im Diffusionsgradienten löslicher Proteine kann nun das gemeinsame Auftreten von Kollaps und Lenkung mit Hilfe des Modells einfach erklärt werden. Axone, die schon zu weit den Gradienten hinaufgewachsen waren, müssen mit Kollaps reagieren. Axone, die noch am Anfang des Gradienten stehen, werden von EphrinA5 angezogen.

Das gemeinsame Auftreten von Lenkungs- und Stoppfunktion kann sehr anschaulich in einem diskontinuierlichen substratgebundenen EphrinA5-Liniengradienten gezeigt werden. Durch eine von Dr. Andre Bernard und Prof. Martin Bastmeyer etablierte Methode kann mit Hilfe einer Stempeltechnik ein Proteinmuster auf eine Glasoberfläche übertragen werden, die Muster im Mikrometerbereich erzeugt. In dem hier gezeigten Fall entsteht der diskontinuierliche Gradient durch unterschiedlich dicke EphrinA5-Linien, die über Antikörper gekoppelte Fluoreszenz sichtbar gemacht werden können (siehe Abbildung 46b). Man erkennt deutlich eine Zone, an der die temporalen Axone anhalten (siehe Abbildung 46a und 46b). EphrinA5 übt seine Stoppfunktion aus. Beobachtet man die Axone innerhalb des Liniengradienten im Detail, ist ein deutliches *Backbranching* zu erkennen in der Art, dass die kleinen Seitenästchen die EphrinA5-Linien nachzubilden scheinen (siehe Abbildung 47). Das könnte auf einer anfänglichen attraktiven Wirkung des EphrinA5 beruhen. Wird die Konzentration mit steigender Zahl an EphrinA5-Linien zu hoch, d.h. ist das Axon *in vivo* zu weit in den Gradienten hineingewachsen, muss die Stoppfunktion des EphrinA5 eingreifen und die Axone zum Anhalten bringen, um sie wie *in vivo* auf ihr korrektes Zielgebiet zu begrenzen.

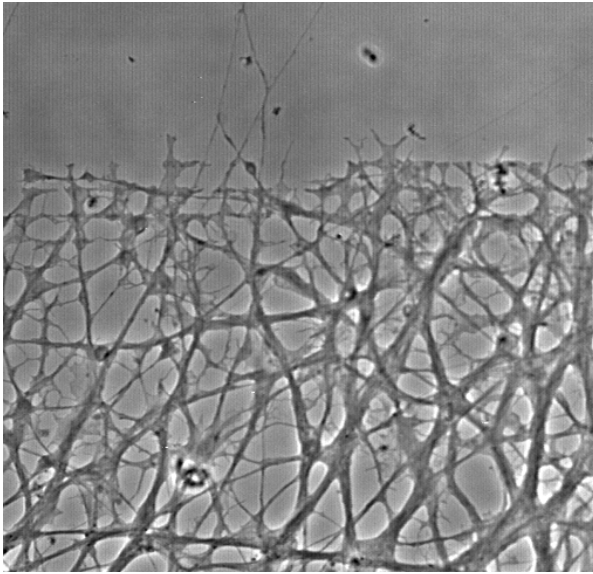


Abb. 46a: Phasenkontrastaufnahme von Axonen, die in einem (nicht sichtbar gemachten) diskontinuierlichen Gradienten aus EphrinA5-Linien wachsen. Deutlich erkennbar ist die Stoppzone, an der die meisten Axone anhalten. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Susanne Lang)

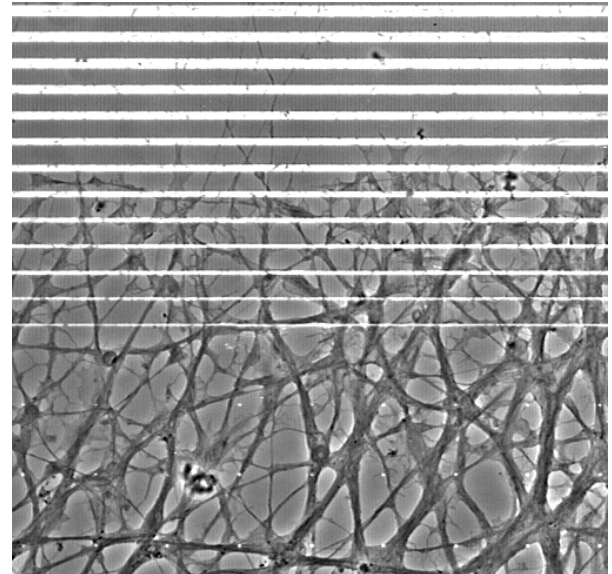


Abb. 46b: Die gleichen Axone wie in Abbildung 46a mit dem durch Fluoreszenz sichtbar gemachten Gradienten aus EphrinA5-Linien. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Susanne Lang)

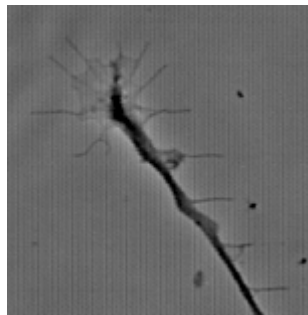


Abb. 47: Durch einen EphrinA5-Liniengradienten ausgelöstes *Backbranching*. Deutlich erkennbar sind kleine Seitenästchen am Axonschaft, die die EphrinA5-Linien nachzufahren scheinen. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Susanne Lang)

Weshalb die temporalen Axone nicht einheitlich auf die Reizung in den verschiedenen *in vitro* Tests reagieren, könnte dem beschriebenen Modell zufolge daran liegen, dass sie unterschiedliche Schwellenwerte für diese Stoppreaktionen besitzen, da sie an unterschiedlichen Positionen in der anterioren Tektumhälfte terminieren müssen. D.h. es existieren verschiedene Subpopulationen an Axonen, die eine unterschiedliche Ausstattung mit Rezeptoren und Liganden besitzen. Manche temporalen Axone stoppen gleich zu Beginn des Gradienten im ersten Drittel des anterioren Teiles zu Beginn des Tektums, diese Axone reagieren mit Repulsion und Kollaps. Andere temporale

Axone, die mehr im mittleren Drittel der anterioren Hälfte oder sogar an der Grenze zu posterior terminieren, reagieren mit zweifacher Attraktion, da sie den Gradienten noch hinaufwachsen müssen. Welche Reaktion der Wachstumskegel als seine „erste“ Reaktion wählt, hängt also vom internen Zustand des Wachstumskegels und seiner Position in der Retina ab. Ein zweiter Grund für diese Subpopulationen könnte die unterschiedliche Rezeptorverteilung auf den Axonen sein, die verschiedene Reaktionen auslösen können. Gleiche Rezeptoren sind in der Lage, je nach Aggregation der Liganden unterschiedliche Reaktionen zu induzieren. Nun variiert auf den Axonen zusätzlich die Rezeptor- und Ligandenexpression, so dass unterschiedliche Reaktionen leicht einsichtig sind. Im Lenkungstest mit beschichteten Kügelchen und im Diffusionsgradienten können sowohl Kollaps als auch Lenkung im gleichen Testsystem beobachtet werden, im Streifentest ist ein Auftreten von sowohl Kollaps als auch Lenkung an den Streifengrenzen beobachtet worden, abhängig vom Kontaktwinkel, in dem das Axon auf die Streifengrenzen trifft (Müller 1988).

All diese Befunde sprechen für eine Stopp- und Lenkungsfunktion des EphrinA5. Ob allerdings Kollaps und Lenkung ähnliche Mechanismen oder durch verschiedene Rezeptoren ausgelöst werden, bleibt weiterhin eine offene Frage.

Das hier vorgestellte Modell kann jedoch nicht alle beobachteten Effekte erklären. So ist seit längerem bekannt, dass temporale Axone auf einem homogenen Substrat posteriorer Membranen sehr wohl auswachsen können, obwohl sie dieses Substrat *in vivo* meiden (Baier und Bonhoeffer, 1992). Nach dem Modell sollte vermutet werden, dass diese Axone am Einwachsen in dieses homogene repulsive Gebiet gehindert werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind jedoch Adaptationsprozesse beteiligt und den Kollaps- und Lenkungsreaktionen überlagert.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Rolle von EphrinA5 beim Aufbau der retinotektalen Projektion untersucht werden. Seit langem sind sogenannte Lenkungsmoleküle bekannt, die Axonen bei der Wegfindung in ihre korrekten Terminationszonen helfen. 1995 wurde als erstes EphrinA5 charakterisiert (Drescher et al., 1995), das zu einer grossen Familie von Proteinen gehört, die an Lenkungsprozessen beteiligt zu sein scheinen. In der vorliegenden Arbeit sollte getestet werden, ob EphrinA5 *in vitro* Axone in ihrer Wachstumsrichtung beeinflussen kann. Beobachtet wurden die Reaktionen retinaler Ganglienzellaxone und deren Wachstumskegel dreier Spezies: Huhn, Frosch (*Xenopus laevis*) und Fisch (*Brachydanio rerio*) in vier *in vitro* Testsystemen: Kollapstest, Streifentest, Lenkungstest mit beschichteten Kügelchen, Lenkungstest im Diffusionsgradienten.

In allen drei Spezies, Fisch, Frosch und Huhn, konnte EphrinA5 eine Richtungsänderung der Axone induzieren, d.h. EphrinA5 ist in der Lage, retinale Axone *in vitro* zu lenken. Nachgewiesen werden konnte diese Lenkungsfunktion in drei verschiedenen *in vitro* Experimenten: im Streifentest, im Lenkungstest mit beschichteten Kügelchen und im Diffusionsgradienten löslicher Proteine. Wie auch in Versuchen anderer Autoren ist die Richtung der Lenkung substratabhängig, Attraktion kann durch Substratwechsel in Repulsion verwandelt und damit der Effekt abgesichert werden.

Zur Aufklärung des Lenkungsmechanismus durch EphrinA5 wurden Experimente mit EphrinA5-beschichteten Kügelchen durchgeführt. Auch hier ergab sich eine konzentrations- und substratabhängige Lenkung. Weitere Versuche dieser Art zeigten, dass der Axonschaft bei der Lenkung des Wachstumskegels kaum oder nicht beteiligt zu sein scheint, denn eine Reizung des Axonschaftes war nicht ausreichend, eine Richtungsänderung der Wachstumskegel zu induzieren. Eine gleichzeitige Reizung mit zwei Kügelchen

auf der gleichen Seite des Wachstumskegels oder auf verschiedenen Seiten führte jeweils zu einer stark erhöhten Kollapsreaktion, Lenkung konnte jedoch nicht beobachtet werden.

In allen Testsystemen traten sowohl Kollaps als auch Lenkung auf. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde ein Lenkungsmechanismus für EphrinA5 während der Bildung der retinotektalen Projektion des Hühnchens vorgeschlagen. Er beruht auf der Bifunktionalität des EphrinA5: es kann sowohl eine Lenkungs- als auch eine Stoppfunktion ausüben, je nach Ephrin-Konzentration und der zeitlichen Dauer der Exposition. Mit Hilfe dieses Modells können viele der *in vitro* gewonnenen Ergebnisse erklärt werden. Eine Relevanz dieses Modells *in vivo* muss noch bestätigt werden. Die anfängliche Entstehung der Projektion kann jedoch damit erklärt werden.

7. Literaturverzeichnis

- Ashkin A (1997) Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 13: 4853-4860.
- Bagnard D, Thomasset N, Lohrum M, Püschel AW, Bolz J (2000) Spatial distributions of guidance molecules regulate chemorepulsion and chemoattraction of growth cones. *Journal of Neuroscience* 20: 1030-1035.
- Baier H, Bonhoeffer F (1992) Axon guidance by gradients of a target-derived component. *Science* 255: 472-475.
- Baier H, Klostermann S (1994) Axon guidance and growth cone collapse *in vitro*. *Neuroprotocols: A companion to Methods in Neuroscience* 4: 96-105.
- Baier H, Klostermann S, Trowe T, Karlstrom RO, Nüsslein-Volhard C, Bonhoeffer F (1996) Genetic dissection of the retinotectal projection. *Development* 123: 415-425.
- Banker G, Goslin K (1993) *Culturing nerve cells*. MIT Press, Cambridge, MA.
- Bashaw GJ, Goodman CS (1999) Chimeric axon guidance receptors: the cytoplasmic domains of slit and netrin receptors specify attraction versus repulsion. *Cell* 97: 917-926.
- Birgbauer E, Oster SF, Severin CG, Sretavan DW (2001) Retinal axon growth cones respond to EphB extracellular domains as inhibitory axon guidance cues. *Development* 128: 3041-3048.
- Bixby JL (2000) Receptor tyrosine phosphatases in axon growth and guidance. *NeuroReport* 11: R5-R10.
- Bonhoeffer F, Gierer A (1984) How do retinal axons find their target on the tectum? *Trends in Neuroscience* 7: 378-381.
- Bonhoeffer F, Huf J (1982) *In vitro* experiments on axon guidance demonstrating an anterior-posterior gradient on the tectum. *EMBO Journal* 1: 427-431.
- Bovenkamp DE, Greer P (1997) Novel Eph-family receptor tyrosine kinase is widely expressed in the developing zebrafish nervous system. *Developmental Dynamics* 209: 166-181.
- Boyd AW, Lackmann M (2001) Signals from Eph and ephrin proteins: a developmental tool kit. *Science STKE* 112: 1-6.

Brennan C, Monschau B, Lindberg R, Guthrie B, Drescher U, Bonhoeffer F, 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.

Campbell D, Holt CE (2001) Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* 32: 1013-1026.

Campbell D, Regan AG, Lopez JS, Tannahill D, Harris WA, Holt CE (2001) Semaphorin 3A elicits stage-dependent collapse, turning and branching in *Xenopus* retinal growth cones. *Journal of Neuroscience* 21: 8538-8547.

Castellani V, Yue Y, Gao PP, Zhou R, Bolz J (1998) Dual action of a ligand for Eph receptor tyrosine kinases on specific populations of axons during development of cortical circuits. *Journal of Neuroscience* 18: 4663-4672.

Cheng HJ, Flanagan JG (1994) Identification and cloning of ELF-1, a developmentally expressed ligand for the Mek4 and Sek receptor tyrosine kinases. *Cell* 79: 157-168.

Chien CB, Cornel EM, Holt CE (1995) Absence of topography in precociously innervated tecta. *Development* 121: 2621-2631.

Chien CB, Rosenthal DE, Harris WA, Holt CE (1993) Navigational errors made by growth cones without filopodia in the embryonic *Xenopus* brain. *Neuron* 11: 237-251.

Ciossek T, Monschau B, Kremoser C, Löschinger J, Lang S, Müller BK, Bonhoeffer F, Drescher U (1998) Eph receptor-ligand interactions are necessary for guidance of retinal ganglion cell axons *in vitro*. *European Journal of Neuroscience* 10: 1574-1580.

Cox EC, Müller B, Bonhoeffer F (1990) Axonal guidance in the chick visual system: posterior membranes induce collapse of growth cones from the temporal retina. *Neuron* 2: 31-37.

Davenport RW, Dou P, Rehder V, Kater SB (1993) A sensory role for neuronal growth cone filopodia. *Nature* 361: 721-724.

Davenport RW, Thies E, Cohen ML (1999) Neuronal growth cone collapse triggers lateral extensions along trailing axons. *Neuroscience* 2: 254-259.

- Davis S, Gale NW, Aldrich TH, Maisonpierre PC, Lhotak V, Pawson T, Goldfarb M, Yancopoulos GD (1994) Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* 266: 816-819.
- Davy A, Gale NW, Murray EW, Klinghoffer RA, Soriano P, Feuerstein C, Robbins SM (1999) Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes and Development* 13: 3125-3135.
- Davy A, Robbins SM (2000) Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner. *EMBO Journal* 19: 5396-5405.
- Diefenbach TJ, Guthrie PB, Kater SB (2000) Stimulus history alters behavioral responses of neuronal growth cones. *Journal of Neuroscience* 20: 1484-1494.
- Dingwell KS, Holt CE, Harris WA (2000) The multiple decisions made by growth cones of RGCs as they navigate from the retina to the tectum in *Xenopus* embryos. *Journal of Neurobiology* 44: 246-259.
- Donoghue MJ, Lewis RM, Merlie JP, Sanes JR (1996) The Eph kinase ligand AL-1 is expressed by rostral muscles and inhibits outgrowth from caudal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 8: 185-198.
- Dooley K, Zon LI (2000) Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics & Development* 10: 252-256.
- Drescher U (1997) The Eph family in the patterning of neural development. *Current Biology* 7: R799-R807.
- Drescher U (2002) Eph family functions from an evolutionary perspective. *Current Opinion in Genetics & Development* 12: 397-402.
- Drescher U, Kremoser C, Handwerker C, Löschinger J, Noda M, Bonhoeffer F (1995) *In vitro* guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82: 359-370.
- Dütting D, Handwerker C, Drescher U (1999) Topographic targeting and pathfinding errors of retinal axons following overexpression of ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Developmental Biology* 216: 297-311.
- Ernst AF, Gallo G, Letourneau PC, McLoon SC (2000) Stabilization of growing retinal axons by the combined signaling of nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Neuroscience* 20: 1458-1469.

Fan J, Raper JA (1995) Localized collapsing cues can steer growth cones without inducing their full collapse. *Neuron* 14: 263-274.

Feldheim DA, Kim YI, Bergemann AD, Frisen J, Barbacid M, Flanagan JG (2000) Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron* 25: 563-574.

Feucht A (1997) Expressionsanalyse zweier Transkriptionsfaktoren in der embryonalen Hühnchenretina. Diplomarbeit, Tübingen.

Flanagan JG, Vanderhaegen P (1998) The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annual Reviews of Neuroscience* 21: 309-345.

Frisen J, Holmberg J, Barbacid M (1999) Ephrins and their Eph receptors: multitasking directors of embryonic development. *The EMBO Journal* 18: 5159-5165.

Frisen J, Yates PA, McLaughlin T, Friedmann GC, O'Leary DDM, Barbacid M (1998) Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian system. *Neuron* 20: 235-243.

Gallo G, Lefcort FB, Letourneau PC (1997) The trkA receptor mediates growth cone turning toward a localized source of nerve growth factor. *Journal of Neuroscience* 15: 5445-5454.

Gallo G, Letourneau PC (1998) Localized sources of neurotrophins initiate axon collateral sprouting. *Journal of Neuroscience* 18: 5403-5414.

Gao PP, Sun CH, Zhou XF, DiCicco-Bloom E, Zhou R (2000) Ephrins stimulate or inhibit neurite outgrowth and survival as a function of neuronal cell type. *Journal of Neuroscience Research* 60: 427-436.

Gao PP, Yue Y, Zhang JH, Cerretti DP, Levitt P, Zhou R (1998) Regulation of thalamic neurite outgrowth by the Eph ligand ephrinA5: implications in the development of thalamocortical projections. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 5329-5334.

Gao PP, Zhang JH, Yokoyama M, Racey B, Dreyfus CF, Black IB, Zhou R (1996) Regulation of topographic projection in the brain: Elf-1 in the hippocamposeptal system. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 93: 11161-11166.

Gierer A (1981) Development of projections between areas of the nervous system. *Biological Cybernetics* 42: 69-78.

Gierer A (1983) Model for the retino-tectal projection. Proceedings of the Royal Society of London-Series B: Biological Sciences 218: 77-93.

Gierer A (1987) Directional cues for growing axons forming the retinotectal projection. Development 101: 479-489.

Gnügge L, Schmid S, Neuhauss SCF (2001) Analysis of the activity-deprived Zebrafish mutant *macho* reveals an essential requirement of neuronal activity for the development of a fine-grained visuotopic map. Journal of Neuroscience 21: 3542-3548.

Guthrie S (2000) Ephrin cleavage: a missing link in axon guidance. Trends in Neuroscience 23: 592.

Guthrie S (2001) Robos makes the rules. Current Biology 11: R300-R303.

Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, Van Eden FJM, Jiang YJ, Heisenberg CP, Kelsh RN, Furutani-Seiki M, Vogelsang E, Beuchle D, Schach U, Fabian C, Nüsslein-Volhard C (1996) The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. Development 123: 1-36.

Halfter W, Dong S, Schurer B, Osanger A, Schneider W, Ruegg M, Cole GJ (2000) Composition, synthesis and assembly of the embryonic chick retinal basal lamina. Developmental Biology 220: 111-128.

Halfter W, Newgreen DF, Sauter J, Schwarz U (1983) Oriented axon outgrowth from avian embryonic retinae in culture. Developmental Biology 95: 56-64.

Halfter W, Reckhaus W, Kröger S (1997) Nondirectional axonal growth on basal lamina from avian embryonic neural retina. Journal of Neuroscience 7: 3712-3722.

Harris WA, Holt CE, Bonhoeffer F (1987) Retinal axons with and without their somata, growing to and arborizing in the tectum of *Xenopus* embryos: a time-lapse video study of single fibres *in vivo*. Development 101: 123-133.

Harris WA, Holt CE, Smith TA, Gallenson N (1985) Growth cones of developing retinal cells *in vivo*, on culture surfaces, and in collagen matrices. Journal of Neuroscience Research 13:101-122.

Hattori M, Osterfield M, Flanagan JG (2000) Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. Science 289:1360-1365.

He Z, Wang KC, Koprivica V, Ming G, Song H (2002) Knowing how to navigate: mechanisms of semaphorin signaling in the nervous system. *Science STKE* 119: RE1-10.

Hindges R, McLaughlin T, Genoud N, Henkemeyer M, O'Leary DDM (2002) EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron* 35: 475-487.

Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, Takaku F (1987) A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the Eph gene. *Science* 238: 1717-1720.

Holmberg J, Clarke DL, Frisen J (2000) Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* 408: 203-206.

Holmberg J, Frisen J (2002) Ephrins are not only unattractive. *Trends in Neuroscience* 25: 239-243.

Holt CE (1984) Does timing of axon outgrowth influence initial retinotectal topography in *Xenopus*? *Journal of Neuroscience* 4: 1130-1152.

Holt CE, Harris WA (1993) Position, guidance, and mapping in the developing visual system. *Journal of Neurobiology* 24: 1400-1422.

Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E (1999) A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97: 927-941.

Hong K, Nishiyama M, Henley J, Tessier-Lavigne M, Poo MM (2000) Calcium signalling in the guidance of nerve growth by netrin-1. *Nature* 403: 93-98.

Höpker VH, Shewan D, Tessier-Lavigne M, Poo MM, Holt C (1999) Growth cones attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401: 69-73.

Hornberger MR (1999) Die retinotektale Projektion: Charakterisierung von Mitgliedern der Eph-Familie hinsichtlich der axonalen Lenkung. Dissertation, Tübingen.

Hornberger MR, Dütting D, Ciossek T, Yamada T, Handwerker C, Lang S, Weth F, Huf J, Wessel R, Logan C, Tanaka H, Drescher U (1999) Modulation of EphA receptor function by coexpressed ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Neuron* 22: 731-742.

- Huai J, Drescher U (2001) An ephrin-A-dependent signaling pathway controls integrin function and is linked to the tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *Journal of Biological Chemistry* 276: 6689-6694.
- Hutson LD, Chien CB (2002) Pathfinding and error correction by retinal axons: the role of astray/robo2. *Neuron* 33: 205-217.
- Johnson KG, Holt CE (2000) Expression of CRYP- α , LAR, PTP- δ , and PTP- ρ in the developing *Xenopus* visual system. *Mechanisms of Development* 92: 291-294.
- Johnson KG, McKinnell I, Stoker AW, Holt CE (2001) Receptor protein tyrosine phosphatases regulate retinal ganglion cell axon outgrowth in the developing *Xenopus* visual system. *Journal of Neurobiology* 49: 99-117.
- Kalo MS, Pasquale EB (1999) Signal transfer by Eph receptors. *Cell Tissue Research* 298: 1-9.
- Kaprielan Z, Imondi R, Runko E (2000) Axon guidance at the midline of the developing CNS. *Anatomical Record* 261: 176-197.
- Kaprielan Z, Runko E, Imondi R (2001) Axon guidance at the midline choice point. *Developmental Dynamics* 221: 154-181.
- Karlstrom RO, Trowe T, Bonhoeffer F (1997) Genetic analysis of axon guidance and mapping in the zebrafish. *Trends in Neuroscience* 20: 3-8.
- Karlstrom RO, Trowe T, Klostermann S, Baier H, Brand M, Crawford AD, Grunewald B, Haffter P, Hoffmann H, Meyer SU, Müller BK, Richter S, Van Eeden FJM, Nüsslein-Volhard C, Bonhoeffer F (1996) Zebrafish mutations affecting retinotectal pathfinding. *Development* 123: 427-438.
- Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78: 425-435.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203: 253-310.
- Knöll B, Drescher U (2002) Ephrin-As as receptors in topographic projections. *Trends in Neuroscience* 25: 145-149.
- Knöll B, Zarbalis K, Wurst W, Drescher U (2001) A role for the EphA family in the topographic targeting of vomeronasal axons. *Development* 128: 895-906.

Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS (1993) The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75: 1389-1399.

Kuhn TB, Schmidt MF, Kater SB (1995) Laminin and fibronectin guideposts signal sustained by opposite effects to passing growth cones. *Neuron* 14: 275-285.

Kuhn TB, Williams CV, Dou P, Kater SB (1998) Laminin directs growth cone navigation via two temporally and functionally distinct calcium signals. *Journal of Neuroscience* 18: 184-194.

Kullander K, Klein R (2002) Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Molecular Cell Biology* 3: 475-486.

Ledig MM, Haj FH, Bixby JL, Stoker AW, Müller BK (1999) The receptor tyrosine phosphatase CRYP α promotes intraretinal axon growth. *Journal of Cell Biology* 147: 375-388.

Livesey FJ (1999) Netrins and netrin receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56: 62-68.

Lohof AM, Quillan M, Dan Y, Poo MM (1992) Asymmetric modulation of cytosolic cAMP activity induces growth cone turning. *Journal of Neuroscience* 12: 1253-1261.

Magal E, Holash JA, Toso RJ, Chang D, Lindberg RA, Pasquale EB (1996) B61, a ligand for the Eck receptor protein-tyrosine kinase, exhibits neurotrophic activity in cultures of rat spinal cord neurons. *Journal of Neuroscience Research* 43: 735-744.

Malicki JJ, Pujic Z, Thisse C, Thisse B, Wie X (2002) Forward and reverse genetic approaches to the analysis of eye development in zebrafish. *Vision Research* 42: 527-533.

Mann F, Holt CE (2001) Control of retinal growth and axon divergence at the chiasm: lessons from *Xenopus*. *BioEssays* 23: 319-326.

Mann F, Ray S, Harris WA, Holt CE (2002) Topographic mapping in dorsoventral axis of the *Xenopus* retinotectal system depends on signaling through ephrin-B ligands. *Neuron* 35: 461-473.

McCaig CD (1990) Nerve branching is induced and oriented by a small applied electric field. *Journal of Cell Science* 95: 605-615.

- Meinhardt H, Gierer A (2000) Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition. *Bioessays* 22: 753-760.
- Menzel P, Valencia F, Godement P, Dodelet VC, Pasquale EB (2001) Ephrin-A6, a new ligand for Eph receptors in the developing visual system. *Developmental Biology* 230: 74-88.
- Mey J, Thanos S (1992) Development of the visual system of the chick – a review. *Journal für Hirnforschung* 33: 673-702.
- Mey J, Thanos S (2000) Development of the visual system of the chick I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Research Reviews* 32: 343-379.
- Mey J, Thanos S (2000) Development of the visual system of the chick II. Mechanisms of axonal guidance. *Brain Research Reviews* 35: 205-245.
- Ming G, Henley J, Tessier-Lavigne M, Song H, Poo MM (2001) Electrical activity modulates growth cone guidance by diffusible factors. *Neuron* 29: 441-452.
- Ming G, Lohof AM, Zheng JQ (1997) Acute morphogenic and chemotropic effects of neurotrophins on cultured embryonic *Xenopus* spinal neurons. *Journal of Neuroscience* 17: 7860-7871.
- Ming G, Song H, Berninger B, Inagaki N, Tessier-Lavigne M, Poo MM (1999) Phospholipase C- γ and phosphoinositide 3-kinase mediate cytoplasmic signalling in nerve growth cone guidance. *Neuron* 23: 139-148.
- Ming G, Song HJ, Berninger B, Holt CE, Tessier-Lavigne M, Poo MM (1997) cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* 19: 1225-1235.
- Ming G, Wong ST, Henley J, Yuan XB, Song H, Spitzer N, Poo MM (2002) Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. *Nature* 417: 411-418.
- Monnier PP, Sierra A, Macchi P, Deitinghoff L, Andersen JS, Mann M, Flad M, Hornberger MR, Stahl B, Bonhoeffer F, Müller BK (2002) RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons. *Nature* 419: 392-395.
- Monschau B, Kremoser C, Ohta K, Tanaka H, Kaneko T, Yamada T, Handwerker C, Hornberger MR, Löschinger J, Pasquale EB, Siever DA, Verderame MF, Müller BK, Bonhoeffer F, Drescher U (1997) Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *The EMBO Journal* 16: 1258-1267.

Müller BK (1988) Untersuchungen zum Wachstumsverhalten retinaler Ganglienzellaxone des Hühnchens auf Membranen des Zielgewebes. Diplomarbeit, Tübingen.

Müller BK (1999) Growth cone guidance: First steps towards a deeper understanding. *Annual Reviews in Neuroscience* 22: 351-388.

Müller BK, Jay DG, Bonhoeffer F (1996) Chromophore-assisted laser inactivation of a repulsive axonal guidance molecule. *Current Biology* 6: 1497-1502.

Müller WA, Hassel M (1999) *Entwicklungsbiologie der Tiere und des Menschen*. 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Nakagawa S, Brennan C, Johnson KG, Shewan D, Harris WA, Holt CE (2000) Ephrin-B regulates the ipsilateral routing of retinal axons at the optic chiasm. *Neuron* 25: 599-610.

Nakamoto M, Cheng HJ, Friedman GC, McLaughlin T, Hansen MJ, Yoon CH, O'Leary DDM, Flanagan JG (1996) Topographically specific effects of ELF-1 on retinal axon guidance *in vitro* and retinal axon mapping *in vivo*. *Cell* 86: 755-766.

Niclou SP, Jia L, Raper JA (2000) Slit2 is a repellent for retinal ganglion cell axons. *Journal of Neuroscience* 20: 4962-4974.

Nieuwkoop PD, Faber J (1956) *Normal table of Xenopus laevis (Daudin)*. North Holland Publishing Company, Amsterdam.

Pandey A, Shao H, Marks RM, Polverini PJ, Dixit VM (1995) Role of B61, the ligand for the Eck receptor tyrosine kinase, in TNF- α -induced angiogenesis. *Science* 268: 567-569.

Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Current Opinion in Neurobiology* 11: 272-280.

Picker A, Brennan C, Reifers F, Clarke JDW, Holder N, Brand M (1999) Requirement for the zebrafish mid-hindbrain boundary in midbrain polarisation, mapping and confinement of the retinotectal projection. *Development* 126: 2967-2978.

Polleux F, Giger RJ, Ginty DD, Kolodkin AL, Ghosh A (1998) Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 282: 1904-1906.

- Polleux F, Morrow T, Ghosh A (2000) Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404: 567-573.
- Rajagopalan SR, Vivancos V, Nicolas E, Dickson BJ (2000) Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the *Drosophila* CNS. *Cell* 103: 1033-1045.
- Raper JA, Kapfhammer J (1990) The enrichment of a neuronal growth cone collapsing activity from embryonic chick brain. *Neuron* 4: 21-29.
- Rosentreter SM, Davenport RW, Löschinger J, Huf J, Jung J, Bonhoeffer F (1998) Response of retinal ganglion cell axons to striped linear gradients of repellent guidance molecules. *Journal of Neurobiology* 37: 541-562.
- Sakurai T, Wong E, Drescher U, Tanaka H, Jay DG (2002) Ephrin-A5 restricts topographically specific arborization in the chick retinotectal projection *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Science* 99: 10795-10800.
- Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS (1993) Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: Genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 10: 409-426.
- Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78:409-424.
- Shibata A, Wright MV, David S, McKerracher L, Braun PE, Kater SB (1998) Unique responses of differentiating neuronal growth cones to inhibitory cues presented by oligodendrocytes. *Journal of Cell Biology* 142: 191-202.
- Simpson JH, Kidd T, Bland KS, Goodman CS (2000) Short-range and long-range guidance by slit and its Robo receptors: Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron* 28: 753-766.
- Song H, Ming G, He Z, Lehmann M, McKerracher L, Tessier-Lavigne M, Poo MM (1998) Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science* 281: 1515-1518.
- Song H, Ming G, Poo MM (1997) cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* 388: 275-279.
- Song H, Poo MM (1999) Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Current Opinion in Neurobiology* 9: 355-363.
- Song H, Poo MM (2001) The cell biology of neuronal navigation. *Nature Cell Biology* 3: E81-E88.

Sperry R (1963) Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 50: 703-750.

Stein E, Lane AA, Cerretti DP, Schoecklmann HO, Schroff AD, Van Etten RL, Daniel TO (1998) Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes and Development* 12: 667-678.

Stepanek L, Sun QL, Wang J, Wang C, Bixby JL (2001) CRYP-2/cPTPRO is a neurite inhibitory repulsive guidance cue for retinal neurons *in vitro*. *Journal of Cell Biology* 154: 867-878.

Stöckli ET, Landmesser LT (1998) Axon guidance at choice points. *Current Opinion in Neurobiology* 8: 73-79.

Stoker AW (2001) Receptor tyrosine phosphatases in axon growth and guidance. *Current Opinion in Neurobiology* 11: 95-102.

Strittmatter SM (2000) Dendrites go up, axons go down. *Nature* 404: 557-559.

Stürmer CA, Rohrer B, Munz H (1990) Development of the retinotectal projection in zebrafish embryos under TTX-induced neural-impulse blockade. *Journal of Neuroscience* 10: 3615-3626.

Stürmer CAO (1988) Retinotopic organization of the developing retinotectal projection in the zebrafish embryo. *Journal of Neuroscience* 8: 4513-4530.

Sun QL, Wang J, Bookman RJ, Bixby JL (2000) Growth cone steering by receptor tyrosine phosphatase δ defines a distinct class of guidance molecules. *Molecular and Cellular Neuroscience* 16: 686-695.

Szebenyi G, Dent EW, Callaway JL, Seys C, Lueth H, Kalil K (2001) Fibroblast growth factor-2 promotes axon branching of cortical neurons by influencing morphology and behavior of the primary growth cone. *Journal of Neuroscience* 21: 3932-3941.

Tamagnone L, Artigiani S, Cheng H, He Z, Ming G, Song H, Chedotal A, Winberg ML, Goodment CS, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Comoglio PM (1999) Plexins are a large family for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99: 71-80.

Tear G, Harris R, Sutaria S, Kilomanski K, Goodman CS (1996) *commissureless* controls growth cone guidance across the CNS midline in *Drosophila* and encodes a novel membrane protein. *Neuron* 16: 501-514.

- Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274: 1123-1133.
- Torre JR, Höpker VH, Ming G, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Hemmati-Brivanlou A, Holt C (1997) Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. *Neuron* 19:1211-1224.
- Trowe T, Klostermann S, Baier H, Granato M, Crawford AD, Grunewald B, Hoffmann H, Karlstrom RO, Meyer SU, Müller B, Richter S, Nüsslein-Volhard C, Bonhoeffer F (1996) Mutations disrupting the ordering and topographic mapping of axons in the retinotectal projection of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123: 439-450.
- Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J, Johnson EM (2002) Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends in Neuroscience* 25: 412-417.
- Vielmetter J, Stolze B, Bonhoeffer F, Stürmer CA (1990) *In vitro* assay to test differential substrate affinities of growing axons and migratory cells. *Experimental Brain Research* 81: 283-287.
- Walter J, Henke-Fahle S, Bonhoeffer F (1987) Avoidance of posterior tectal membranes by temporal retinal axons. *Development* 101: 909-913.
- Walter J, Kern-Veits B, Huf J, Stolze B, Bonhoeffer F (1987) Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axon *in vitro*. *Development* 101: 685-696.
- Wang Q, Zheng JQ (1998) cAMP-mediated regulation of neurotrophin-induced collapse of nerve growth cones. *Journal of Neuroscience* 18: 4973-4984.
- Wendl T (2000) *In vitro* Versuche zur Untersuchung der Wirkung von Ephrinen auf die axonale Lenkung von retinalen Ganglienzellen des Huhns. Zulassungsarbeit, Tübingen.
- Westerfield M (1994) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). Institute of Neuroscience, University of Oregon, Edition 2.1.
- Wilkinson DG (2000) Eph receptors and ephrins: regulators of guidance and assembly. *International Review of Cytology* 196: 177-244.
- Williams CV, Davenport RW, Dou P, Kater SB (1995) Developmental regulation of plasticity along neurite shafts. *Journal of Neurobiology* 27: 127-140.

Willshaw DJ, von der Malsburg C (1976) How patterned neural connections can be set up by self-organization. *Proceedings of the Royal Society London B* 194: 431-445.

Yates PA, Roskies AL, McLaughlin T, O'Leary DDM (2001) Topographic-specific axon branching controlled by ephrin-As is the critical event in retinotectal map development. *Journal of Neuroscience* 21: 8548-8563.

Yue Y, Chen ZY, Gale NW, Blair-Flynn J, Hu TJ, Yue X, Cooper M, Crockett DP, Yancopoulos GD, Tessarollo L, Zhou R (2002) Mistargeting hippocampal axons by expression of a truncated Eph receptor. *Proceedings of the National Academy of Science* 99: 10777-10782.

Yue Y, Widmer DAJ, Halladay AK, Cerretti DP, Wagner GC, Dreyer JL, Zhou R (1996) Specification of distinct dopaminergic neural pathways: roles of the Eph family receptor EphB1 and ligand ephrin-B2. *Journal of Neuroscience* 19: 2090-2101.

Zheng JQ, Wan J, Poo MM (1996) Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient. *Journal of Neuroscience* 16: 1140-1149.

Zheng JQ., Felder M, Connor JA, Poo MM (1994) Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature* 368: 140-144.

8. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

a	anterior
Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BL	Basallamina
BP	Bandpass
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CALI	chromophore assisted laser inactivation
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCD	charge coupled device
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNTF	ciliar neurotrophic factor
d.h.	das heisst
DCC	deleted in colorectal cancer
DRG	dorsal root ganglion
E	Tage der Embryonalentwicklung
Eph	erythropoietin producing human hepatocellular carcinoma cell line
Fc	Invarianter Teil des humanen ImmunoglobulinG Proteins
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FT	Farbteiler
g	Gramm
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HBHA	Hanks-BSA-HEPES-Natriumazid

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
kDa	kilo Dalton
l	Liter
LN	Laminin
LP	Langpass
LTP	long term potentiation
μ	micro
m	milli
M	Molarität
MAG	myelin associated glycoprotein
MZ	Methylzellulose
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NGF	nerve growth factor
nm	nanometer
NO	nitric oxide
NT	Neurotrophin
OD	Optische Dichte
ONH	optic nerve head
p	posterior
PBS	Phosphate buffered saline
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PTP	Phosphatase
R.Ä.	Richtungsänderung
RAGS	repulsive axon guidance signal
RGM	repulsive guidance molecule
RGZ	Retinale Ganglienzellen
Robo	Roundabou
RTKs	Rezeptortyrosinkinasen
RTPTs	Rezeptortyrosinphosphatasen
Trk	Tropomyosin related kinase
UNC	Uncoupled Gene in <i>Caenorhabditis elegans</i>
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Friedrich Bonhoeffer und Dr. Jürgen Löschinger am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Bonhoeffer möchte ich sehr herzlich danken für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor durchführen zu können, für die vielen Anregungen und Diskussionen und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz ein sehr grosses Dankeschön für die unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens und die freundliche Aufnahme in seinem Arbeitskreis am IPC.

Herrn Dr. Jürgen Löschinger ein sehr grosses Danke für die Hilfe bei Computer- und Auswertefragen und die tolle Betreuung und anregenden Diskussionen (nicht nur über Wissenschaft !) während dieser drei Jahre.

Danke an Prof. Dr. Peter Hausen und die gesamte Abteilung V des MPI, besonders Dr. Herbert Steinbeisser, Rajeeb Kumar Swain, Klaus-Michael Kürner, Dr. Aracelly Medina-Morales, Dr. Francois Fagotto, Dr. Wolfgang Reintsch und Anne Schohl für die Bereitstellung der Xenopusembryonen.

Danke an Prof. Dr. Christiane Nüsslein-Volhard und die gesamte Abteilung III des MPI, besonders Maria Buhl, für die Bereitstellung der Zebrafischembryonen.

Ein ganz besonders grosses Dankeschön an Susanne Lang für ihre Hilfe bei allen Problemen im Präparieren, Mikroskopieren und Experimentieren, für ihre Unterstützung, wenn's mal wieder hektisch wurde und für die schöne Zeit im Labor, in dem ich mich so wohl fühlte.

Ein ganz besonderer Dank an die Lasertweezertruppe Jan Pelka und Nadine Becker, die so meisterhaft die Kügelchen manipulierten und so viele schöne Ergebnisse produzierten.

Elisabeth Huberle ein ganz besonderer Dank für ihren unermüdlichen Einsatz im Zebrafischpräparieren und Auswerten.

Ein herzlicher Dank allen ständigen und ehemaligen Mitarbeitern unseres Labors Susanne Lang, Nadine Becker, Elisabeth Huberle, Jan Pelka, Thomas Wendl, Cornelia Preidl, Zhe Zhou für die tolle und ausserordentlich angenehme Arbeitsatmosphäre.

Der Mittagessen- und Kafferaumgruppe Susanne Lang, Dr. Jürgen Löschinger, Lars Knoch, Jasmin Ehrismann, Anke Deitinghoff für die nette Ablenkung von wissenschaftlichen Problemen während der Mittagspause und die vielen lustigen Unterhaltungen und Diskussionen über „wichtige“ Probleme ausserhalb des Instituts.

Ein besonderer Dank an alle ständigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der ehemaligen Abteilung I für die verschiedensten Hilfestellungen: Elvira Wulf in der Medienküche, Elpida Gotiani in der Spülküche, Heinz Pachowski im Lager und bei Bestellungen, Karin Lehmann und Anna-Maria Entian im Sekretariat, Stefan Tauber im Elektroniklabor, Manfred Klein in der Werkstatt, Thomas Helle für Hilfe beim Posterdruck, Dietmar Wurster für Fahr- und Abholdienste und die Butterbrezeln zum Frühstück.

Allen Freunden in Tübingen und Ulm danke für die gemeinsam verbrachten Abende und Ausflüge in die nähere Umgebung Tübingens und in diverse Freilichtmuseen.

Ein ganz grosses Dankeschön an Michael Wandel für seine Hilfe bei Computerfragen und bei der letzten Formatierung der Arbeit und sein Verständnis für lange Arbeitszeiten und Wochenendexperimente.

Der grösste Dank gilt meiner Familie für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung während des gesamten Studiums.

Meine akademischen Lehrer an der Univeristät Ulm waren:

K. Ballschmiter, R. Baltin, H.-K. Bodenseh, M. Dakkouri, H.-G. Kilian, W.A. Kreiner, V. Krivan, A. Lentz, G. Maas, M. Rothe, W. Sawodny, G. Taubmann, U. Thewalt, T. Welsch, W. Witschel

Meine akademischen Lehrer an der Univeristät Tübingen waren:

K. Albert, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, N. Kuhn, E. Lindner, M.E. Maier, H.-J. Meyer, H. Oberhammer, D. Oelkrug, G. Reinhardt, V. Schurig, E. Schweda, F.F. Seelig, J. Strähle, U. Weimar, C. Ziegler

Lebenslauf

Name:	Christine Weini
Geboren am:	09.08.1973 in Ulm
1980-1984	Grundschule Ludwigsfeld
1984-1993	Lessing-Gymnasium Neu-Ulm
09.07.1993	Allgemeine Hochschulreife
ab 10/1993	Grundstudium im Diplomstudiengang Chemie an der Universität Ulm
19.10.1995	Diplomvorprüfung an der Universität Ulm
ab 10/1995	Hauptstudium im Diplomstudiengang Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
bis 11/1998	Diplomhauptprüfungen in den Fächern Anorganische Chemie, Biochemie, Organische Chemie, Physikalische Chemie
ab 12/1998	Diplomarbeit am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Tübingen unter der Anleitung von PD Dr. Christiane Ziegler „Optimierung der Zelladhäsion und des Axonwachstums auf biokompatiblen Polymeren“
28.05.1999	Abschluss: Diplom-Chemikerin
ab 11/1999	Promotion am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen, Abteilung Physikalische Biologie, unter der Anleitung von Prof. Dr. Friedrich Bonhoeffer und Prof. Dr. Günter Gauglitz „Charakterisierung der Lenkungseigenschaften von EphrinA5 <i>in vitro</i> in verschiedenen Spezies (Frosch, Fisch, Huhn)“
2003	Post-doc am Department of Anatomy, University of Cambridge, Cambridge, UK, im Labor von Dr. Christine Holt

