

GENOMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR CORTEXENTWICKLUNG DER MAUS

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Axel Visel

geboren am 20. September 1974 in Karlsruhe

2004

Referent:

Prof. Dr. Walter Müller

Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent:

Prof. Dr. Gregor Eichele

Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie, Hannover

Tag der Promotion: 19. Januar 2004

DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Gregor Eichele für die Gelegenheit, meine Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Neben einer zur Verfügung gestellten exzellenten Ausstattung waren vor allem sein engagiertes persönliches Interesse bei gleichzeitiger Förderung eines selbstständigen wissenschaftlichen Arbeitsstils entscheidend für die erfolgreiche Durchführung meiner Projekte.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Walter Müller für die freundliche Übernahme der Begutachtung und Vertretung meiner Arbeit vor dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover.

Diese Arbeit wurde durch ein Boehringer Ingelheim Fonds Promotionsstipendium gefördert. Neben der finanziellen Unterstützung möchte ich mich beim BIF insbesondere für die gute persönliche Betreuung, die Einladung zu anregenden Seminaren und die Herstellung hilfreicher Kontakte bedanken.

Weiterhin danke ich Dr. Gonzalo Alvarez-Bolado am Max-Planck-Institut sowie Prof. Christina Thaller, Prof. Michael Crair und Dr. Hui-Chen Lu am Baylor College of Medicine (Houston) für zahlreiche stimulierende Diskussionen und technische Ratschläge im Zusammenhang mit meinen Experimenten, sowie Dr. Carsten Möller für seine engagierten Kommentare und konstruktiven Hinweise beim Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Besonderer Dank gebührt allen Mitgliedern des GenePaint-Teams, die durch ihren motivierten Einsatz die Durchführung entscheidender Teile der vorliegenden Arbeit erst möglich gemacht haben, insbesondere Claus Ebert, Barbara Fischer, Uwe Grunenberg, Sarah Herzog, Heike Krause, Kornelia Maslo, Polina Spies und Christine Zwingmann.

Außerhalb des Labors konnte ich im Rahmen der dienstagnachmittäglichen Trainingseinheiten bemerkenswerte Fortschritte im Hinblick auf eine mögliche Alternativkarriere erzielen - vielen Dank an alle aktuellen und früheren Mitglieder der MPI-Soccer-All-Stars!

Schließlich danke ich meiner Familie und Meike für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	8
ABSTRACT	9
1 EINLEITUNG.....	10
1.1 ÜBERSICHT: VOM GENOM ZUR GENFUNKTION.....	10
1.1.1 Meilensteine der Molekularbiologie.....	10
1.1.2 Funktionelle Annotation von Genomsequenzen.....	11
1.1.3 Einsicht in biologische Mechanismen durch Nutzung von Genomdaten.....	12
1.2 STRATEGIEN FÜR GENOMWEITE EXPRESSIONSKARTIERUNGEN	13
1.2.1 Notwendigkeit genomweiter Expressionsanalysen	13
1.2.2 Genomweite Expressionskartierungen erfordern Hochdurchsatz-Verfahren.....	13
1.2.3 Elektronischer Zugang zu Primärdaten eröffnet neue Zugangsmöglichkeiten.....	14
1.3 EXPRESSIONSANALYSE KOMPLETTER GENFAMILIEN - DIE ADENYLATCYCLASEN.....	15
1.3.1 Physiologische Bedeutung der Adenylatcyclasen.....	15
1.3.2 Strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten der Isoformen.....	15
1.3.3 Isoform-spezifische Regulationsmechanismen	16
1.3.4 Phylogenetische Widerspiegelung der Regulationseigenschaften	17
1.3.5 Spezifische Expressionsorte einzelner Isoformen	18
1.3.6 Untersuchung der Expressionsmuster aller Isoformen.....	19
1.4 GENOMISCHE ANSÄTZE ZUR UNTERSUCHUNG DER CORTEXENTWICKLUNG.....	20
1.4.1 Entwicklung des embryonalen Cortex.....	21
1.4.2 Umweltabhängige Entwicklung von Gehirnregionen	22
1.4.3 Fäßchenfelder des somatosensorischen Cortex.....	22
1.4.4 Genetische Grundlagen der Bildung von Fäßchenstrukturen	24
2 MATERIALIEN UND METHODEN.....	26
2.1 TIEREXPERIMENTELLE ARBEITEN	26
2.1.1 Maushaltung und verwendete Stämme.....	26
2.1.2 Genotypisierung von barrelless-Mäusen	26
2.1.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	26
2.1.2.2 PCR-Genotypisierung	27
2.1.3 Entnahme von Gewebe aus dem somatosensorischen Cortex	28
2.2 QUANTITATIVE EXPRESSIONSANALYSEN	28
2.2.1 RNA-Isolierung	28
2.2.1.1 Isolierung von mRNA aus Cortexgewebe	28

2.2.1.1.1	Puffer für die mRNA-Isolation.....	29
2.2.1.1.2	Extraktion, Lagerung und Fällung von mRNA.....	29
2.2.1.2	Isolierung von Komplet-RNA aus Cortexgewebe.....	30
2.2.1.3	Herstellung von cDNA durch reverse Transkription	31
2.2.2	<i>Microarrays</i>	31
2.2.3	<i>Northern-Blot</i>	31
2.2.3.1	Denaturierende Gelelektrophorese.....	32
2.2.3.2	Kapillartransfer auf Membranen.....	32
2.2.3.3	Herstellung radioaktiv markierter Sonden	32
2.2.3.4	Hybridisierung und Datenauswertung	33
2.2.4	<i>Quantitative Real-Time-RT-PCR</i>	33
2.2.4.1	Nachweismethode.....	33
2.2.4.2	Primer	34
2.2.4.3	Ausgangsmaterial	34
2.2.4.4	Versuchsordnung, Normalisierung und Auswertung	34
2.3	AMPLIFIKATION UND SONDENHERSTELLUNG FÜR DIE <i>IN SITU</i> -HYBRIDISIERUNG	35
2.3.1	<i>Allgemeine Prozeduren für Vorlagen- und Sondenherstellung</i>	35
2.3.1.1	Ausgangs-cDNA.....	35
2.3.1.2	Primerkonstruktion	36
2.3.1.3	Gradienten-PCR im 96-Loch-Format	36
2.3.1.4	Präparative PCR	37
2.3.1.5	<i>In vitro</i> -Transkription und Aufreinigung von Ribosonden.....	38
2.3.2	<i>Synthese isoformspezifischer Sonden für die Genfamilie der Adenylatcyclasen</i>	38
2.3.2.1	Identifizierung und Amplifizierung geeigneter cDNA-Abschnitte.....	38
2.3.2.2	Besonderheiten bei der Analyse von Genfamilien	39
2.4	AUTOMATISIERTE <i>IN SITU</i> -HYBRIDISIERUNG AUF GEWEBESCHNITTEN	39
2.4.1	<i>Gewebeeinbettung und Anfertigung von Gefrierschnitten</i>	39
2.4.2	<i>Prähybridisierung und Hybridisierung</i>	40
2.4.3	<i>Posthybridisierungs-Waschschritte und Antikörperinkubation</i>	40
2.4.4	<i>Waschschritte nach der Antikörper-Inkubation und Färbereaktion</i>	41
3	ERGEBNISSE	42
3.1	ENTWICKLUNG VON GENEPAIN.T.ORG	42
3.1.1	<i>Datenmodell</i>	42
3.1.2	<i>GenePaint Hybridisierungssystem und Generierung von Bilddaten</i>	45
3.1.3	<i>Metadaten</i>	47
3.1.4	<i>Annotation von Expressionsmustern</i>	48
3.1.5	<i>Web-Interface</i>	50
3.1.6	<i>Suche nach bestimmten Genen</i>	51
3.1.7	<i>Anzeige von Datensätzen</i>	52
3.1.8	<i>Benutzung des Zoom Viewers</i>	54
3.2	EXPRESSIONSMUSTER ALLER ADENYLATCYCLASEN.....	56

3.2.1	<i>Adcy4- und Adcy7-Expression in nicht-neuronalem Gewebe</i>	56
3.2.2	<i>Schichtspezifische Expression von Adcy1 und Adcy5 im embryonalen Cortex</i>	56
3.2.3	<i>Kombinationen von Isoformen in Subregionen des Hippocampus</i>	60
3.2.4	<i>Schichtspezifische Expression im Bulbus olfactorius</i>	62
3.2.5	<i>Adcy1, Adcy2 und Adcy8 sind auf Subregionen des Thalamus beschränkt</i>	64
3.2.6	<i>Adcy1 und Adcy6 in neuronalen Subpopulationen des Striatums</i>	66
3.2.7	<i>Adcy2- und Adcy8-Expression im embryonalen Rückenmark</i>	68
3.2.8	<i>Komplementäre Adcy1- und Adcy8-Domänen im Mittelhirndach</i>	70
3.3	IDENTIFIKATION ENTWICKLUNGS- UND SCHICHTSPEZIFISCHER MARKER IM CORTEX	72
3.3.1	<i>Selektion von Kandidaten durch Microarray-Analyse</i>	72
3.3.2	<i>Postnatale Entwicklung des somatosensorischen Cortex</i>	72
3.3.2.1	c-Fos ist nicht essentiell für die Entwicklung von Fäßchenfeldern.....	74
3.3.2.2	Charakterisierung von 111331_at	74
3.3.3	<i>Schichtspezifische Marker im embryonalen Cortex</i>	74
4	DISKUSSION	79
4.1	GENEPAINT.ORG, EIN EXPRESSIONSATLAS.....	79
4.1.1	<i>GenePaint.org als Werkzeug für die funktionelle Genomanalyse</i>	79
4.1.2	<i>Identifizierung von Markergenen im embryonalen Cortex</i>	80
4.1.3	<i>Perspektiven</i>	81
4.1.3.1	Durchsatz im Hinblick auf genomweite Expressionsanalysen	81
4.1.3.2	Automatisierte Annotation von Expressionsmustern und dreidimensionale Rekonstruktion	82
4.1.3.3	Identifizierung funktioneller Zusammenhänge durch computergestützte Analyse annotierter Expressionsmuster	83
4.1.3.4	Interoperabilität von GenePaint.org mit anderen Datenbanken.....	83
4.2	EXPRESSIONSMUSTER DER ADENYLATCYCLASEN.....	84
4.2.1	<i>Unterschiede zwischen postnatalen und adulten Expressionsmustern</i>	84
4.2.2	<i>Expression der Gβg-stimulierten Isoformen Adcy4 und Adcy7</i>	84
4.2.3	<i>Koexpression und Komplementierung</i>	85
4.2.3.1	Komplementäre Expressionsmuster der Ca ²⁺ -/CaM-regulierten Adenylatcyclasen.....	86
4.2.3.2	Ca ²⁺ -/CaM-stimulierte und G β g-stimulierte Isoformen	88
4.2.3.3	Gleichzeitige Expression mehrerer Isoformen mit unterschiedlichen Regulationseigenschaften	88
4.3	ADCY1 UND DIE ENTWICKLUNG DES SOMATOSENSORISCHEN CORTEX	89
4.3.1	<i>Identifizierung postnatal regulierter Gene</i>	89
4.3.2	<i>Analyse der Beteiligung von c-Fos an der Entwicklung des somatosensorischen Cortex</i>	91
4.3.3	<i>Identifizierung barrelless-abhängig regulierter Transkripte</i>	93
4.3.4	<i>Einfluss von Adcy1 auf die Cortextwicklung</i>	94
5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	96
6	LITERATURVERZEICHNIS	98

APPENDIX 1.....	110
LEBENS LAUF	114
PUBLIKATIONS LISTE	115

ZUSAMMENFASSUNG

Durch die Sequenzierung der kompletten Genome von Maus und Mensch stehen erstmals nahezu vollständige Listen aller in Säugetieren existierenden Gene zur Verfügung. Der größte Teil dieser ungefähr 30 000-35 000 Gene ist jedoch über die reine Sequenz hinausgehend nicht näher charakterisiert. Ein erster wichtiger Schritt zur Aufklärung ihrer jeweiligen Funktion ist die experimentelle Untersuchung des Expressionsmusters, das heißt der zeitlichen und räumlichen Verteilung von mRNA oder Protein im lebenden Organismus. Durch RNA-*in situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitten kann mRNA-Expression mit Einzelzellauflösung sichtbar gemacht werden. Im Rahmen der Weiterentwicklung von Verfahren für die automatisierte Durchführung dieser Methode wurde hier der Expressionsatlas GenePaint.org in Form einer öffentlich zugänglichen Datenbank konzipiert und implementiert. Er enthält derzeit mehr als 1100 Sätze von hochauflösenden Bilddaten für mehr als 500 Gene. Der Durchsatz der Methode ermöglicht eine Anwendung im genomweiten Maßstab.

Für die Untersuchung der genetischen Grundlagen von Embryonalentwicklung und Entwicklungsstörungen des cerebralen Cortex der Maus, insbesondere der Steuerung der Radialmigration von Neuronen, sind molekulare Marker für einzelne Schichten und Zellpopulationen von grundlegender Bedeutung. Die Hochdurchsatz-*in situ*-Hybridisierung erlaubt die gleichzeitige Analyse zahlreicher Gewebe- und Zelltypen in ihrer natürlichen Umgebung und stellt damit einen komplementären Ansatz zu Expressionsanalysen mit cDNA-Microarrays dar, in denen für nahezu alle bekannten Gene gleichzeitig das Expressionsniveau in einem einzigen Gewebetyp gemessen wird. Eine Kombination dieser beiden Methoden wurde hier verwendet, um im embryonalen Cortex 135 schichtspezifisch exprimierte Markergene zu identifizieren, darunter zahlreiche, die bisher überhaupt nicht oder nur in anderen Zusammenhängen beschrieben wurden.

Eine weitere wichtige Anwendungsmöglichkeit der Hochdurchsatz-*in situ*-Hybridisierung besteht in der detaillierten Analyse von Expressionsmustern kompletter Genfamilien. Die Adenylatcyclasen sind Bestandteil entwicklungsbiologisch, neurobiologisch und pharmakologisch relevanter Signalwege. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Expressionsmuster aller neun membrangebundenen Isoformen im Cortex und anderen Bereichen des Zentralnervensystems untersucht. Neben neuen Expressionsorten während der Embryonalentwicklung wurden dabei markante Beziehungen zwischen den Expressionsdomänen einzelner Isoformen beobachtet, die eine Modulation cAMP-generierender Mechanismen durch kombinatorische Expression einzelner Isoformen nahe legen.

Während der postnatalen Entwicklung des primären somatosensorischen Areal des Cortex bilden sich somatotopische Karten in Abhängigkeit von Sinnesreizen aus. Hier wurden durch Microarray-Analysen sechs während der Entwicklung dieser Strukturen heraufregulierte Gene, darunter zwei neue Gene, identifiziert und durch Real-Time-PCR verifiziert. Eines der vier bekannten Gene, der Transkriptionsfaktor c-Fos, wurde im *knockout*-Modell im Hinblick auf seine Beteiligung an der Ausbildung des somatosensorischen Cortex charakterisiert. Im *barrelless*-Mausstamm bewirkt eine Mutation des Gens für die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Adenylatcyclase Typ 1 eine Fehlbildung der corticalen somatotopischen Karten. In vergleichenden Expressionsanalysen zwischen Wildtyp- und *barrelless*-Mäusen wurde nur ein genotyp-abhängig reguliertes Transkript identifiziert und verifiziert, dessen nähere Charakterisierung in Übereinstimmung mit unabhängig publizierten Ergebnissen eine transkriptions-unabhängige Ursache des *barrelless*-Phänotyps nahe legt.

Die hier vorgelegten Studien zeigen im Zusammenhang mit der Entwicklung des cerebralen Cortex, wie genomische Methoden und insbesondere die Hochdurchsatz-*in situ*-Hybridisierung in Verbindung mit dem Expressionsatlas GenePaint.org zur Bearbeitung biologischer Fragestellungen eingesetzt werden können.

Schlagwörter: Adenylatcyclasen, cerebraler Cortex, *in situ*-Hybridisierung

ABSTRACT

The sequences of the human and mouse genomes provide for the first time a virtually complete list of all mammalian genes. The majority of the estimated 30 000-35 000 genes have, however, not yet been characterized beyond the mere sequence information. A first important step towards a systematic elucidation of the function of these genes will be the determination of their expression patterns, i.e. the spatiotemporal distribution of gene products (mRNA or protein) in the intact organism. RNA *in situ* hybridization on tissue sections is the method of choice for visualizing mRNA expression at single cell resolution. In this thesis, automated *in situ* hybridization was used to create GenePaint.org, which is an atlas of gene expression patterns in the mouse. This web-linked public database currently provides >1100 sets of high-resolution image data, covering more than 500 genes. The throughput of this technology allows for application at a genome-wide scale.

The genetic basis and molecular mechanisms underlying the development of the cerebral cortex, and in particular of radial neuronal migration, are still the subject of intense research. Molecular markers specific for cortical layers and cortical neuron sub-populations are crucial tools for the analysis of corticogenesis and for understanding congenital defects of the cortex. High throughput *in situ* hybridization permits parallel analysis of multiple tissue and cell types residing in their native environment and hence provides an approach complementary to cDNA-microarray-based analyses, which measure expression levels of thousands of genes within a single type of tissue. A combination of these two methods was used to identify 135 genes with layer-specific expression in the embryonic cortex. Many of these are novel genes or genes that were not previously described in the context of cortical development.

The detailed analysis of expression patterns of entire gene families represents another important application of high throughput *in situ* hybridization. Adenylate cyclases are components of several developmentally, neurophysiologically and pharmacologically relevant signalling pathways. This thesis examines the expression patterns of all nine membrane-bound adenylate cyclase isoforms in the cortex as well as in other regions of the central nervous system. Expression domains during embryonic development were identified that had previously not been described. Comparison of expression patterns of all nine isoforms suggests modulation of cAMP-generating mechanisms by combinatorial expression of the individual isoforms.

Somatotopic maps in the primary somatosensory cortex develop postnatally and depend on sensory input from the body periphery. Using a microarray approach, six genes that are upregulated during formation of these maps were identified and verified by real-time-PCR. Two genes were novel, one gene was the transcription factor c-Fos. The significance of c-Fos upregulation was functionally characterized by analysis of somatosensory cortex development in a c-Fos knockout strain. In addition, a second mutant mouse strain, *barrelless*, was examined in which deficiency in Ca²⁺/calmodulin-stimulated type 1 adenylate cyclase results in defects in somatotopic map formation. Comparative expression analyses between wildtype and *barrelless* mice revealed only one differentially expressed transcript, whose closer examination suggests a transcription-independent molecular basis of the *barrelless* phenotype, a possibility consistent with previously published data.

In summary, this thesis uses the development of the cerebral cortex as a model system to demonstrate that genomic approaches, in particular high throughput *in situ* hybridization resulting in an expression atlas (GenePaint.org), can be used to address biological questions.

Keywords: adenylate cyclases, cerebral cortex, *in situ*-hybridization

1 EINLEITUNG

1.1 Übersicht: Vom Genom zur Genfunktion

1.1.1 Meilensteine der Molekularbiologie

Wohl kaum eine andere Disziplin hat während des letzten halben Jahrhunderts durch die Schaffung neuer methodischer Ansätze unser grundlegendes Verständnis der Lebensvorgänge ähnlich stark beeinflusst wie die Molekularbiologie. Ausgehend von den grundsätzlichen Erkenntnissen, dass Erbinformation als DNA weitergegeben wird (Avery et al., 1944) und die Basen der Nucleotide stets in bestimmten Verhältnissen auftreten (Chargaff, 1950) konnte basierend auf Röntgenstrukturanalysen (Franklin und Gosling, 1953) die Doppelhelixstruktur der DNA aufgeklärt werden (Watson und Crick, 1953). Die Entschlüsselung des genetischen Codes zur Umsetzung von Nucleotid- in Aminosäuresequenzen (Crick et al., 1961; Nirenberg und Leder, 1964) in Verbindung mit Methoden zur Sequenzbestimmung von DNA (Sanger und Coulson, 1975; Maxam und Gilbert, 1977) eröffnete schließlich die Möglichkeit, molekulargenetischen Zugang zu biochemischen, zellbiologischen, entwicklungsbiologischen und pathophysiologischen Prozessen zu finden. Mittlerweile steht eine fast unüberschaubare Vielzahl von Techniken zur Verfügung, die *in vitro* wie *in vivo* in Pro- und einfachen Eukaryoten bis hin zu Säugetieren verwendet werden können, um die Funktion einzelner Gene und der von ihnen codierten Proteine zu untersuchen.

Molekularbiologische Ansätze mußten sich lange Zeit darauf beschränken, auf der Basis einzelner Gene einen direkten Zusammenhang zwischen molekularen Grundlagen in Form der Gen- oder Proteinsequenz und der Funktion des jeweiligen Proteins in Zelle oder Organismus herzustellen. Dabei entfiel ein großer Teil des experimentellen Aufwands auf die Analyse der relevanten genetischen Information mithilfe geeigneter biophysikalischer, biochemischer und mikrobiologischer Verfahren, den klassischen Methoden der Molekularbiologie.

Erst mit der Einführung verbesserter Sequenzierungsmethoden, zunehmender Automatisierung von Laborabläufen und vor allem dramatischen Fortschritten in der computergestützten Verarbeitung großer Mengen von Sequenzdaten wurde es möglich, nicht nur einzelne Gene oder Chromosomenabschnitte, sondern die Sequenzinformation kompletter Genome zu entschlüsseln.

Zu Beginn der hier vorgestellten Arbeit waren bereits die vollständigen Genomsequenzen wichtiger prokaryotischer und eukaryotischer Modellorganismen bekannt, darunter *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Drosophila melanogaster* (Goffeau et al., 1996; Blattner et al., 1997; Myers et al., 2000). Erst im Verlauf der letzten drei Jahre wurden annähernd vollständige Genomsequenzen zunächst für den Menschen (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) beschrieben, kurze Zeit später auch für die Maus (Waterston et al., 2002). Hierbei liegt die besondere Bedeutung der Maus darin, dass sie sich als das wichtigste Modell zur Analyse höherer Lebensformen etabliert hat, weil sie unter den im Labormaßstab genetisch manipulierbaren Organismen in Physiologie, Entwicklung und Genomstruktur dem Menschen bei weitem am ähnlichsten ist.

1.1.2 Funktionelle Annotation von Genomsequenzen

Für viele molekularbiologische Arbeiten wie beispielsweise die Charakterisierung genetischer Loci für *knockout*-Experimente oder die Suche nach verwandten Gruppen von Genen sind Genomsequenzen für sich genommen bereits äußerst wertvoll, da sie in wenigen Sekunden bis Stunden und ohne nennenswerten materiellen Aufwand Ergebnisse bereitstellen, die noch vor drei Jahren mehrere Monate Laborarbeit und umfangreiche Ressourcen erfordert hätten.

Ausgehend von den nun vorliegenden Genomsequenzen besteht jedoch eine weitere wichtige Herausforderung darin, eine funktionelle Annotation dieser Daten vorzunehmen. Das heißt, dass zunächst innerhalb der genomischen Sequenz alle Gene identifiziert werden. Angesichts verschiedener existierender Definitionen soll dabei im Rahmen dieser Arbeit unter einem Gen ein chromosomaler Abschnitt verstanden werden, von dem ein einziger RNA-Strang transkribiert wird, der – abgesehen von Ausnahmefällen, in denen die RNA selbst eine Funktion ausübt – als Vorlage zur Proteinbiosynthese dient.

Zu einer vollständigen funktionellen Charakterisierung eines Gens gehören neben der Sequenz des Proteins aber auch Angaben über seine Sekundär- und Tertiärstruktur, die subzelluläre Lokalisation, molekulare Interaktionspartner, Regulationsmechanismen, sein Expressionsmuster im lebenden Organismus und Konsequenzen bei Abwesenheit des Proteins. Jede einzelne dieser Fragen kann in der Regel nur mit gewissem experimentellem Aufwand beantwortet werden. Im Zusammenhang mit Genomdaten ist es daher entscheidend, Verfahren zu entwickeln, mit denen für grosse Zahlen von Genen (insgesamt beispielsweise 30 000-35 000

in der Maus) entsprechende Daten generiert werden können. Mit den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden für die potentiell genomweite Analyse von Expressionsmustern in der Maus soll ein solcher Ansatz vorgestellt werden (vgl. Einleitung “Strategien für genomweite Expressionskartierungen”).

1.1.3 Einsicht in biologische Mechanismen durch Nutzung von Genomdaten

Neben den wesentlichen Erleichterungen bei der Arbeit an einzelnen Genen gewähren die nun verfügbaren Genomsequenzen eine vollständig neue Perspektive bei der Untersuchung biologischer Probleme. Zum einen wird es möglich, sehr schnell alle homologen Proteine einer Familie in einer biologischen Spezies zu identifizieren und mit geeigneten Verfahren parallel zu untersuchen. Ein Beispiel für einen solchen Ansatz wird in dieser Arbeit mit der Analyse der Expressionsmuster aller bekannten Isoformen der Adenylatcyclase im Zentralnervensystem (ZNS) der Maus vorgestellt (vgl. Einleitung “Expressionsanalyse kompletter Genfamilien - die Adenylatcyclasen”).

Des Weiteren ist es erst durch die Verfügbarkeit kompletter Genomsequenzen möglich geworden, annähernd vollständige Abbilder des natürlich auftretenden Spektrums von Transkripten in Form von cDNA-Microarrays herzustellen. Mithilfe dieser Microarrays ist es erstmals möglich, die Expression von zehntausenden Genen in einem bestimmten Gewebe parallel zu analysieren. Ein Beispiel für einen solchen Ansatz stellt die Untersuchung transkriptioneller Veränderungen im somatosensorischen Cortex der Maus im Rahmen dieser Arbeit dar (vgl. Einleitung “Genomische Ansätze zur Untersuchung der Cortexentwicklung”).

1.2 Strategien für genomweite Expressionskartierungen

1.2.1 Notwendigkeit genomweiter Expressionsanalysen

Die molekularen Funktionen und die subzelluläre Lokalisation eines neu identifizierten Proteins kann oftmals durch Vergleiche mit zuvor charakterisierten, strukturell verwandten Proteinen zu einem gewissen Grad vorhersagt werden. Beispielsweise deutet die Anwesenheit von DNA-bindenden Motiven auf einen Transkriptionsfaktor hin, während bestimmte hydrophobe Domänen charakteristisch für Transmembranproteine sind.

Im Gegensatz dazu sind zum Verständnis der Funktion eines Gens auf der Stufe eines Gewebes oder eines Gesamtorganismus in der Regel empirische Ansätze wie die Untersuchung des Expressionsmusters oder gezielte Mutation des Gens notwendig. Zwar sind die Informationen über das *in vivo*-Expressionsmuster eines Gens theoretisch in Form von *cis*-regulatorischen Elementen ebenfalls in der genomischen Sequenzinformation enthalten. Wegen der Komplexität dieser Elemente, insbesondere im Zusammenhang mit den oft mehrstufigen Steuerungskaskaden, ist jedoch nicht damit zu rechnen, dass in naher Zukunft zuverlässige *in silico*-Vorhersagen von Expressionsmustern möglich sein werden.

Eine weitverbreitete und anerkannte Methode zur Bestimmung von Genexpression in Zellen in ihrem natürlichen Gesamtumfeld im Organismus ist die RNA-*in situ*-Hybridisierung (ISH, Spradling et al., 1975).

Ein besonderer Vorteil dieses Verfahrens zum Expressionsnachweis auf mRNA-Ebene sind die einheitlichen Eigenschaften und einfache Herstellung des jeweils genspezifisch eingesetzten Reagenz, der Ribosonden. Ein alternatives Verfahren zum direkten Nachweis von Genprodukten im Gewebe, die Immunhistochemie, detektiert zwar durch spezifische Antikörper das biologisch relevantere Protein, eignet sich jedoch nur bedingt für den Einsatz in genomweiten Ansätzen, da die Produktion von Antikörpern um ein Vielfaches aufwendiger als die von Ribosonden ist.

1.2.2 Genomweite Expressionskartierungen erfordern Hochdurchsatz-Verfahren

Trotz der genannten Vorteile ist die RNA-*in situ*-Hybridisierung ein relativ aufwendiges Verfahren, das zudem - im Gegensatz zu massiv-parallelen Verfahren wie Microarrays - nur ein einzelnes Gen pro Präparat analysiert. Aufgrund des hohen Informationswertes von ISH-Daten auf histologischen Schnitten bis hin zu Einzelzellauflösung ist es jedoch trotzdem

wünschenswert, solche Analysen in einem genomweiten Maßstab durchzuführen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, bereits bestehende Verfahren für die Hochdurchsatz-ISH (Herzig et al., 2001) weiter zu optimieren sowie Werkzeuge für die systematische Auswertung und Publikation dieser Daten bereitzustellen.

Ein Nachteil der *in silico*-Analyse von Genomdaten gegenüber klassisch molekularbiologischen Ansätzen ist, dass in der Regel keine physikalisch vorhandenen Präparate zur Verfügung stehen, wie es beispielsweise bei der Arbeit mit Klonbibliotheken (*libraries*) der Fall ist. Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit war daher die Etablierung und Optimierung eines Verfahrens, um für bestimmte Gene ausschließlich auf Basis vorliegender Sequenzinformation mit möglichst geringem Aufwand für die ISH einsetzbare Ribosonden herzustellen.

1.2.3 Elektronischer Zugang zu Primärdaten eröffnet neue Zugangsmöglichkeiten

Durch die Automatisierung zahlreicher Arbeitsschritte der ISH ergibt sich ein deutlich verringerter manueller Aufwand bei gleichzeitig erhöhtem Durchsatz. Um den trotzdem immensen personellen und materiellen Aufwand eines solchen Ansatzes im größeren Maßstab zu rechtfertigen, bedarf es daher geeigneter Publikationsplattformen, mithilfe derer die gewonnenen Daten einer breiten wissenschaftlichen Öffentlichkeit in möglichst sinnvoll aufbereiteter Form zur Verfügung gestellt werden können. Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war daher die Entwicklung einer Internet-basierten, öffentlich zugänglichen Datenbank, in der Primärdaten mit zellulärer Auflösung sowie systematisch durchsuchbare Annotationen der Expressionsmuster zur Verfügung gestellt werden.

1.3 Expressionsanalyse kompletter Genfamilien - die Adenylatcyclasen

1.3.1 Physiologische Bedeutung der Adenylatcyclasen

Adenylatcyclasen spielen eine entscheidende Rolle für zahlreiche physiologische Funktionen, beispielsweise synaptische Plastizität (Olianas et al., 1998; Baker et al., 1999), neuronale Langzeit-Potenzierung (LTP) (Storm et al., 1998), neuronale Degeneration (Berger et al., 1998; Korswagen et al., 1998), Lernen und Gedächtnis (Cali et al., 1994; Wu et al., 1995; Antoni et al., 1998; Wong et al., 1999), Musterbildung in somatosensorischen und retinalen Projektionskarten (Abdel-Majid et al., 1998; Ravary et al., 2003) und Zellproliferation (Smit et al., 1998). Es wurden bislang insgesamt neun membrangebundene Adenylatcyclasen sowie eine lösliche Isoform beschrieben (Krupinski et al., 1989; Bakalyar und Reed, 1990; Feinstein et al., 1991; Gao und Gilman, 1991; Ishikawa et al., 1992; Katsushika et al., 1992; Krupinski et al., 1992; Premont et al., 1992; Yoshimura und Cooper, 1992; Cali et al., 1994; Watson et al., 1994; Paterson et al., 1995; Buck et al., 1999).

1.3.2 Strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten der Isoformen

Per Definition katalysieren alle Adenylatcyclasen dieselbe chemische Reaktion, nämlich die Umwandlung von ATP in cyclo-AMP (cAMP), welches seinerseits ein potenter intrazellulärer sekundärer Botenstoff (*second messenger*) ist. Der wichtigste cAMP-stimulierte Signalweg führt über Proteinkinase A (PKA) (Taylor et al., 1990), eine Wirkung von cAMP kann jedoch auch über PKA-unabhängige Signalwege stattfinden (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998). Die erste aus einem Säugetier isolierte Adenylatcyclase war Adcy1 des Rindes (Krupinski et al., 1989). Basierend auf Vergleichen der Primärstruktur der restlichen seither aus Mensch, Maus und Ratte isolierten Isoformen kann für alle membrangebundenen Adenylatcyclasen von einer ähnlichen Sekundär- und Tertiärstruktur ausgegangen werden (Abb. 1.1). Es gibt zwei Transmembrandomänen, welche je sechsmal die Membran durchqueren (M1 und M2) sowie zwei intrazelluläre katalytische Domänen (C1 und C2).

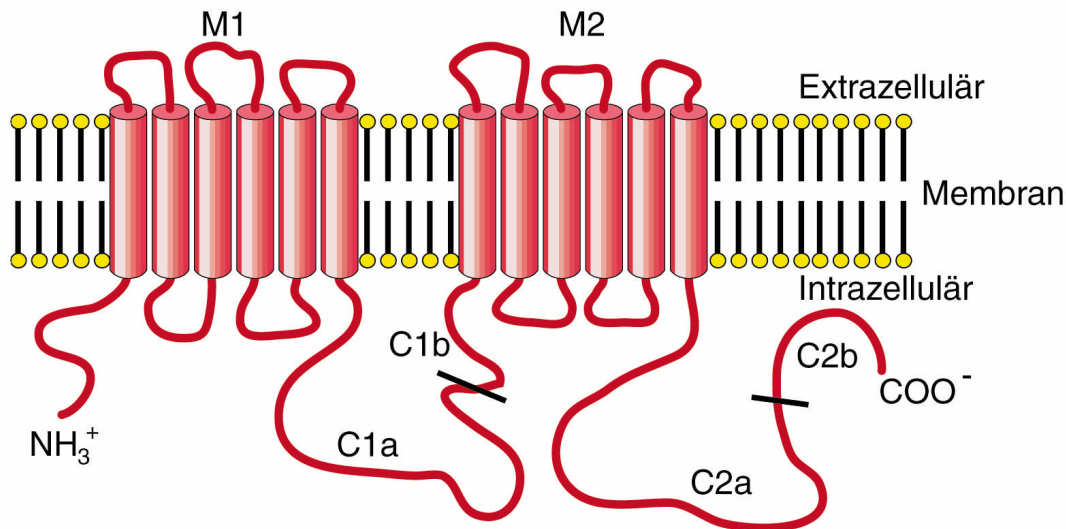


Abb. 1.1: Topologie der membrangebundenen Adenylatcyclasen. Die beiden Transmembrankassetten M1 und M2, jeweils bestehend aus 6 Transmembrandomänen, sind zwischen den einzelnen Isoformen relativ schwach konserviert. ATP-Bindungsstellen und katalytische Zentren liegen vermutlich in den cytosolischen Domänen C1 und C2, die jeweils weiter in die Subdomänen C1a und C1b, bzw. C2a und C2b unterschieden werden können. Dabei sind C1 und C2 zueinander und zwischen den verschiedenen Isoformen mit 50-92% Homologie verhältnismäßig stark konserviert (Cooper et al., 1995). Modifiziert nach Patel et al. (2001).

1.3.3 Isoform-spezifische Regulationsmechanismen

Im Gegensatz zu diesen strukturellen Ähnlichkeiten unterscheiden sich die Adenylatcyclasen beträchtlich in der Art und Weise, wie sie auf Signale aus vorgeschalteten Transduktionswegen reagieren, eine Übersicht findet sich in Hanoune und Defer (2001) und Patel et al. (2001). Die wichtigsten molekularen Modulatoren der Aktivität von Adenylatcyclasen sind die α -Untereinheiten der stimulatorischen ($G_s\alpha$) und inhibitorischen ($G_i\alpha$) GTP-bindenden (G-) Proteine, die $G\beta\gamma$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine, Ca^{2+} , Calmodulin (CaM), CaM Kinasen II und IV, Calcineurin, Forskolin, Proteinkinase A, sowie Mitglieder der Proteinkinase C-Familie.

Ausgehend von einem Vergleich ihrer regulatorischen Eigenschaften (Tab. 1.1) lassen sich die neun membrangebundenen Adenylatcyclasen in vier verschiedene Gruppen einteilen (Cooper et al., 1995; Patel et al., 2001), welche in dieser Arbeit als A, B, C, und D bezeichnet werden (Abb. 1.2). (A) Adcy1, Adcy3 und Adcy8 werden durch Ca^{2+} und CaM stimuliert (Tang et al., 1991; Krupinski et al., 1992; Cali et al., 1996). Adcy3 wird allerdings nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Gpp(NH)p oder Forskolin stimuliert (Choi et al., 1992a), daher sind zumindest im Gehirn *in vivo* Adcy1 und Adcy8 die einzigen Ca^{2+} /CaM-angeregten Adenylatcyclasen (Wong et al., 1999). (B) Adcy2, Adcy4 und Adcy7 sind Calcium-insensitiv, werden jedoch von $G\beta\gamma$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine stimuliert (Feinstein et

al., 1991; Gao und Gilman, 1991; Tang und Gilman, 1991; Yoshimura et al., 1996). (C) Adcy5 und Adcy6 werden sowohl von Ca^{2+} wie auch von $\text{Gi}\alpha$ -Untereinheiten inhibiert (Ishikawa et al., 1992; Katsushika et al., 1992; Premont et al., 1992; Yoshimura und Cooper, 1992; Yoshimura et al., 1996). (D) Adcy9, das einzige Mitglied der Gruppe D, wird im Gegensatz zu anderen Adenylatcyclasen nicht durch Forskolin aktiviert, jedoch durch die Proteinphosphatase Calcineurin stimuliert (Paterson et al., 1995; Antoni et al., 1998).

Isoform	Modulatoren						
	Ca^{2+}	Gbg	PKC	PKA	CamK	PP2A	NO
Adcy1	+ (CaM)	–	i.s.	i.s.	–	u	–
Adcy2	i.s.	+	+	i.s.	u	u	u
Adcy3	+ (CaM)	i.s.	i.s.	u	–	u	u
Adcy4	i.s.	+	–	u	u	u	u
Adcy5	–	i.s.	+	–	u	u	u
Adcy6	–	i.s.	–	–	u	+	–
Adcy7	i.s.	u	+	u	u	u	u
Adcy8	+ (CaM)	i.s.	u	u	u	u	u
Adcy9	– (Caln)	u	u	u	u	u	u

Tab. 1.1: Modulation der verschiedenen Isoformen der Adenylatcyclase durch vorgeschaltete Signalwege. + = Stimulation, – = Hemmung, i.s. = insensitiv, u = unbekannt, $\text{G}\beta\gamma$ = $\beta\gamma$ -Untereinheit von G-Proteinen, PKC = Proteinkinase C, PKA = Proteinkinase A, CaM = Calmodulin-abhängig, Caln = Calcineurin-abhängig, CamK = Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase, PP2A = Proteinphosphatase 2A, NO = Stickstoffmonoxid. Modifiziert nach Chern (2000).

1.3.4 Phylogenetische Widerspiegelung der Regulationseigenschaften

Dieses Klassifikationsschema der Genfamilie der Adenylatcyclasen aufgrund ihrer regulatorischen Eigenschaften befindet sich - wenig überraschend - in Übereinstimmung mit einem phylogenetischen Baumdiagramm (Abb. 1.2), das die Sequenzhomologie der einzelnen Isoformen auf Proteinebene widerspiegelt (Patel et al., 2001). Es soll jedoch trotzdem darauf hingewiesen werden, dass die Regulation einzelner Isoformen durch molekulare Stimuli wie in Tab. 1.1 dargestellt keinesfalls in einem homogenen experimentellen Ansatz untersucht, sondern aus zahlreichen Einzelberichten in der Literatur zusammengestellt wurde. Diese basieren oft auf unterschiedlichen methodischen Ansätzen und berücksichtigen Isoformen aus verschiedenen biologischen Spezies wie Mensch, Maus und Ratte.

Zwar existieren daher in Einzelfällen leicht widersprüchliche Angaben über die genauen Regulationsmechanismen einzelner Isoformen. Unbestritten ist jedoch die Variabilität der Regulation einzelner Isoformen durch molekulare Modulatoren, welche potentiell eine sehr komplexe Steuerung der Rate der cAMP-Generierung eröffnet. Die besondere Fähigkeit der Adenylatcyclasen, auf eine Vielzahl vorgeschalteter Signalwege zu reagieren und diese in einen einzigen sekundären Botenstoff-Signalweg zusammenzuführen, lässt ihnen eine besonders wichtige Rolle bei der Integration verschiedener extra- und intrazellulärer Einflüsse zukommen. Die scheinbare Redundanz innerhalb der Genfamilie der Adenylatcyclasen sollte daher aufgrund der unterschiedlichen Regulationsmechanismen der einzelnen Isoformen als weitere Quelle von Multiplizität für die Modulation der cAMP-Konzentration betrachtet werden (Houslay und Milligan, 1997).

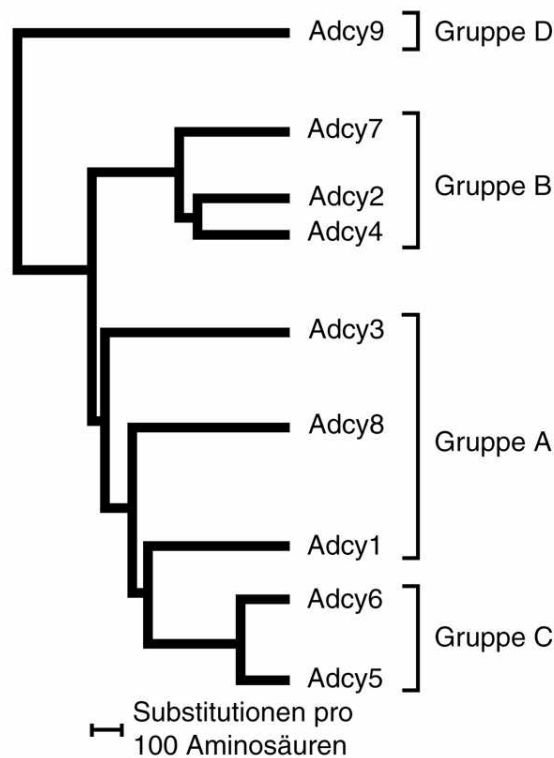


Abb. 1.2: Phylogenetisches Baumdiagramm der membrangebundenen Adenylatcyclasen. Die Länge der einzelnen Äste gibt die Homologie auf Aminosäureebene wieder. Dabei sind Isoformen aus verschiedenen Spezies aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht berücksichtigt. Wie im Text ausgeführt, lassen sich die vier aus den Regulationseigenschaften der Isoformen abgeleiteten Hauptgruppen A-D auch im phylogenetischen Diagramm wiederfinden. Modifiziert aus Patel et al. (2001).

1.3.5 Spezifische Expressionsorte einzelner Isoformen

Zahlreiche Expressionsorte von Adenylatcyclasen im Zentralnervensystem waren bereits zu Beginn dieser Arbeit bekannt (vgl. beispielsweise Chern, 2000). Jedoch gilt auch hier, wie für

die Bestimmung ihrer regulatorischen Eigenschaften, dass diese Daten auf unterschiedlichen Detektionsmethoden, biologischen Spezies und Stämmen und verschiedenen Zeitpunkten der Ontogenese basieren. Für die Fälle, in denen Expressionsdaten bereits existieren, ist ein direkter Vergleich der Daten daher schwierig, wenn nicht sogar unzulässig. Es wurden vor Beginn dieser Arbeit keine Versuche unternommen, systematisch, vollständig und im direkten Vergleich die Expressionsmuster aller Familienmitglieder *in vivo* zu untersuchen.

1.3.6 Untersuchung der Expressionsmuster aller Isoformen

Mit der Verfügbarkeit vollständiger Genome besteht nun die Möglichkeit, in kurzer Zeit Sequenzinformationen für eine gesamte Familie von Genen in einer biologischen Spezies durch *in silico* Analysen zu gewinnen. Eine wichtige Herausforderung der sog. "postgenomischen" Ära wird es sein, genomische Daten durch entsprechende experimentelle Ansätze zu interpretieren. Wie auch an anderer Stelle in dieser Arbeit dargestellt, ist eines der wichtigsten Charakteristika jedes einzelnen Gens sein Expressionsmuster, das heißt eine präzise Analyse, in welchen Organsystemen, Gehirnregionen oder während der Ontogenese transient vorhandenen Strukturen ein Gen tatsächlich transkribiert wird und potentiell das funktionelle Genprodukt vorhanden ist. Solche Expressionsmuster können im Zusammenhang mit funktionellen Daten in vielen Fällen die relative Bedeutung der einzelnen Mitglieder von Genfamilien und ihre Beziehungen untereinander erhellen.

Bei der Betrachtung der Genfamilie der Adenylatcyclasen ist dabei von besonderem Interesse, inwiefern sich die regulatorische Diversität der einzelnen Isoformen in unterschiedlichen Expressionsmustern manifestiert. Die verschiedenen Eigenschaften der vier Gruppen von Adenylatcyclasen stellen mit höchster Wahrscheinlichkeit eine evolutive Anpassung an die unterschiedlichen funktionellen Bedürfnisse einzelner Zell- (insbesondere Neuronen-) Typen, Organe oder Gehirnregionen dar. Für Isoformen mit ähnlichen regulatorischen Eigenschaften sollte daher in gewissem Umfang eine räumliche Überlappung der Expressionsmuster aufgrund ihrer funktionellen Redundanzen erwartet werden. Andererseits ist es jedoch auch denkbar, dass die gleichzeitige Expression von Isoformen mit unterschiedlichen regulatorischen Eigenschaften die Mechanismen zur Modulation der cAMP-Produktion erweitert. In diesem Fall wären Überschneidungen der Expressionmuster von Isoformen aus verschiedenen funktionellen Gruppen zu erwarten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten auch diese beiden Möglichkeiten durch eine Expressionsanalyse aller neun Adenylatcyclasen untersucht werden.

1.4 Genomische Ansätze zur Untersuchung der Cortexentwicklung

Das Telencephalon und insbesondere der cerebrale Cortex ist ein in Säugetieren besonders weit entwickelter und komplex organisierter Bereich des Gehirns. Sowohl aus klassischer evolutionsbiologischer Sicht wie auch aufgrund jüngerer neurophysiologischer Untersuchungen wird ihm daher in besonderem Maße eine Beteiligung an höheren Hirnfunktionen zugesprochen.

Zwei Aspekte der Entwicklung des Cortex waren Gegenstand der vorliegenden Arbeit: 1. Im pränatalen Cortex sollten schichtspezifische molekulare Marker isoliert werden. 2. Im postnatalen somatosensorischen Cortex sollten Gene identifiziert und charakterisiert werden, die potentiell an der Ausbildung somatotopischer Karten beteiligt sind.

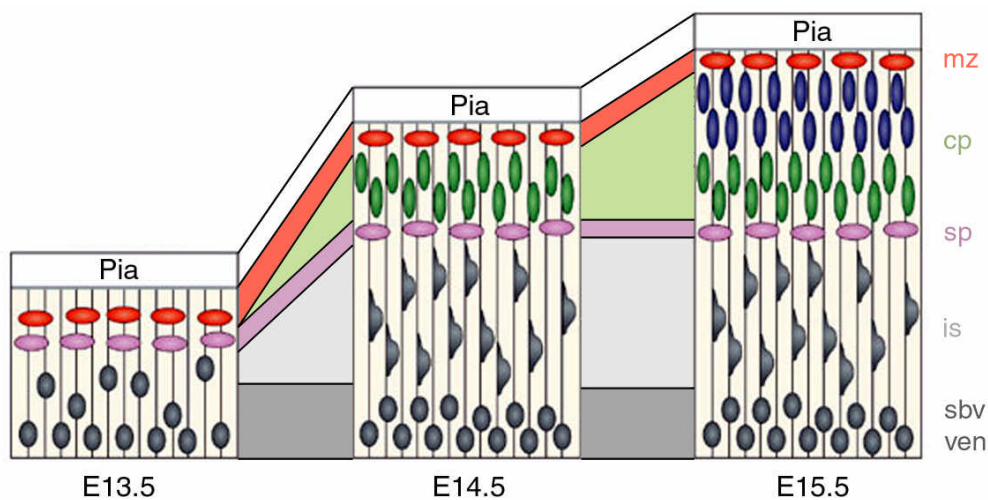


Abb. 1.3: Embryonale Entwicklung der corticalen Schichten. Ab E13.5 (links) wandern aus der ventrikulären und subventrikulären Zone (ven und sbv; schwarze, ovale Zellen) die ersten sogenannten Pionier-Neuronen in Richtung Pia in den Bereich der entstehenden Corticalplatte, wobei sich Reelin-positive Neuronen (rot) und Reelin-negative Neuronen (rosa) unterscheiden lassen. Bei E14.5 (Mitte) hat die Gesamtstärke des Cortex zugenommen, Zellen wandern von der ventrikulären Zone entlang radialer Gliazellen durch die Intermediärschicht (is) nach außen (spindelförmige schwarze Zellen). Sie passieren die aus Reelin-negativen Neuronen bestehende Subplatte (sp) und kommen bei Erreichen Reelin-positiver Neuronen der Marginalzone (mz) zum Stillstand, so dass zwischen Marginalzone und Subplatte die Corticalplatte (cp; grün) entsteht, die bei E14.5 bereits deutlich sichtbar ist. Im weiteren Verlauf der Cortexbildung (E15.5, rechts) migrieren weitere Neuronen in Richtung Pia, passieren dabei die zuvor gebildeten Schichten der Corticalplatte und kommen schließlich zwischen den zuletzt angekommenen Neuronen (grün) und Reelin-positiven Neuronen (rot) zum Stillstand (blau). Weitere Schichten entstehen in analoger Weise, so dass sie im adulten Cortex bezüglich ihrer Entstehungszeitpunkte von innen nach außen angeordnet sind, sich also demnach die jüngsten Neuronen außen befinden. Modifiziert aus Tissir und Goffinet (2003).

1.4.1 Entwicklung des embryonalen Cortex

Die Entwicklung des Cortex ist in Abb. 1.3 von E13.5 (links) über E14.5 (Mitte) bis E15.5 (rechts) schematisch dargestellt. Die beiden Schichten aus Reelin-negativen und Reelin-positiven Pionier-Neuronen werden bei E13.5 noch als Vorplatte bezeichnet. Ab E14.5 bilden sich zwischen diesen beiden Schichten nacheinander von innen nach außen die Schichten der Corticalplatte. Aus der Vorplatte gehen dorsal die Marginalzone, ventral die Subplatte hervor. Ventral der Subplatte unterscheidet man von dorsal nach ventral die Intermediärschicht, die bei E13.5 noch nicht vorhanden ist, die Subventrikulärzone und, direkt an das Ventrikel angrenzend, die Ventrikulärzone.

Es sind mehrere Gene bekannt, die für die korrekte Ausbildung der Schichten im embryonalen Cortex notwendig sind. Bekannte Beispiele sind Reelin oder Pax6, es sind jedoch noch mehrere weitere Mutanten mit Defekten in Migration oder Differenzierung corticaler Neuronenpopulationen bekannt, deren mechanistische Grundlagen nur teilweise bekannt sind (Tissir und Goffinet, 2003; Zaki et al., 2003).

Für die Aufklärung der molekularen Grundlagen solcher Phänotypen ist die Verfügbarkeit von Markergenen eine wichtige Voraussetzung. Als Marker bezeichnet man in der modernen Entwicklungsbiologie allgemein Gene, die spezifisch in einer bestimmten anatomischen Struktur, einer funktionellen Region eines Gewebes, zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt oder in einer bestimmten Subpopulation von Zellen exprimiert sind. Molekulare Marker sind in mehrfacher Hinsicht von Nutzen. In Verbindung mit Detektionsmethoden wie *in situ*-Hybridisierung oder Immunhistochemie ermöglichen sie es, die betreffenden Strukturen oder Zellpopulationen sichtbar zu machen und ihre Entwicklung unter verschiedenen experimentellen Bedingungen zu verfolgen. Neben der Nutzung als reines Werkzeug zur Visualisierung ermöglicht die Verwendung von Promotersequenzen lokalisiert exprimierter Gene auch die gezielte ektopische Expression von Genen in transgenen Ansätzen, beziehungsweise in Verbindung mit Cre/Lox-Methoden das gewebespezifische Deletieren von Genen (Iwasato et al., 2000).

Das Expressionsmuster eines Markergens ist in aller Regel ein Hinweis auf die Beteiligung des codierten Proteins an Vorgängen, die spezifisch für das entsprechende Gewebe oder den entsprechenden Entwicklungszeitpunkt sind. Die Identifizierung von Markergenen liefert daher eine wichtige Grundlage für die Aufklärung entwicklungsbiologischer Abläufe auf molekularer Ebene. So wurde beispielsweise ein großer Anteil der Gene, die für die Ausbildung des Telencephalons und insbesondere der Cortexschichten relevant sind, primär als Marker für bestimmte telencephalische Strukturen oder corticale Schichten identifiziert (Zaki et al., 2003).

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung von schichtspezifisch im embryonalen Cortex bei E14.5 exprimierten Markergenen. Zum einen sind solche neuen schichtspezifischen Marker wichtige Werkzeuge für die nähere Charakterisierung bereits bekannter Gene, deren Deletion einen Phänotyp im Cortex zur Folge hat. Zum anderen sind sie ausgezeichnete Kandidaten für weiterführende Untersuchungen ihrer eigenen Funktion bei der Entwicklung der corticalen Schichten.

1.4.2 Umweltabhängige Entwicklung von Gehirnregionen

Die Entwicklung eines funktionierenden Zentralnervensystems hängt einerseits von der räumlich und zeitlich genau koordinierten Expression spezifischer Gene in vorbestimmten Mustern ab, andererseits jedoch auch vom Einfluß von externen Signalen während bestimmter kritischer Entwicklungsphasen. Die Induktion der Neuralplatte, die Bildung des Neuralrohrs, sowie später die Differenzierung entlang der dorsoventralen und rostrocaudalen Körperachsen werden hauptsächlich von Mechanismen kontrolliert, die unabhängig von äußeren Einflüssen ablaufen. Im Gegensatz dazu werden die spezifischen Verbindungen von Neuronen untereinander in wesentlicher Weise von eintreffenden Informationen aus der Körperperipherie oder anderen Teilen des ZNS beeinflusst. Passende Synapsen werden etabliert und weiter verstärkt, wohingegen nicht passende Synapsen gar nicht erst zustande kommen oder später eliminiert werden. Diese sogenannte neuronale Plastizität stellt die Basis für die Bildung funktionierender neuronaler Netzwerke dar, die hochkomplexe Informationen verarbeiten können, obwohl die zugrundeliegenden einzelnen Einheiten nur über ein jeweils begrenztes Repertoire an molekularen Mechanismen verfügen.

1.4.3 Fäßchenfelder des somatosensorischen Cortex

Im cerebralen Cortex vieler Säugetierspezies findet sich in Regionen zur Verarbeitung sensorischer Informationen eine räumliche Anordnung der funktionellen Bereiche, die die Topographie der zugehörigen sensorischen Organe, insbesondere des Tastsinns auf der Körperoberfläche, widerspiegelt. Ein deutliches Beispiel für solche somatotopischen Karten findet sich in den Fäßchenfeldern (*barrel fields*) der Mäuse und Ratten, einem Teilbereich des primären somatosensorischen Cortex (Woolsey und Van der Loos, 1970). Dieses Modellsystem ist für die Analyse der Ausbildung solcher Karten besonders gut geeignet. Mit relativ einfachen histologischen oder histochemischen Verfahren werden die "barrels" sichtbar, fäßchenähnliche Strukturen in Schicht 4 des somatosensorischen Cortex, die in regelmäßigen Reihen und Spalten angeordnet sind, jeweils eine zellreiche, zylindrische Fäßchenwand besitzen und durch zellarme Septen voneinander abgetrennt sind.

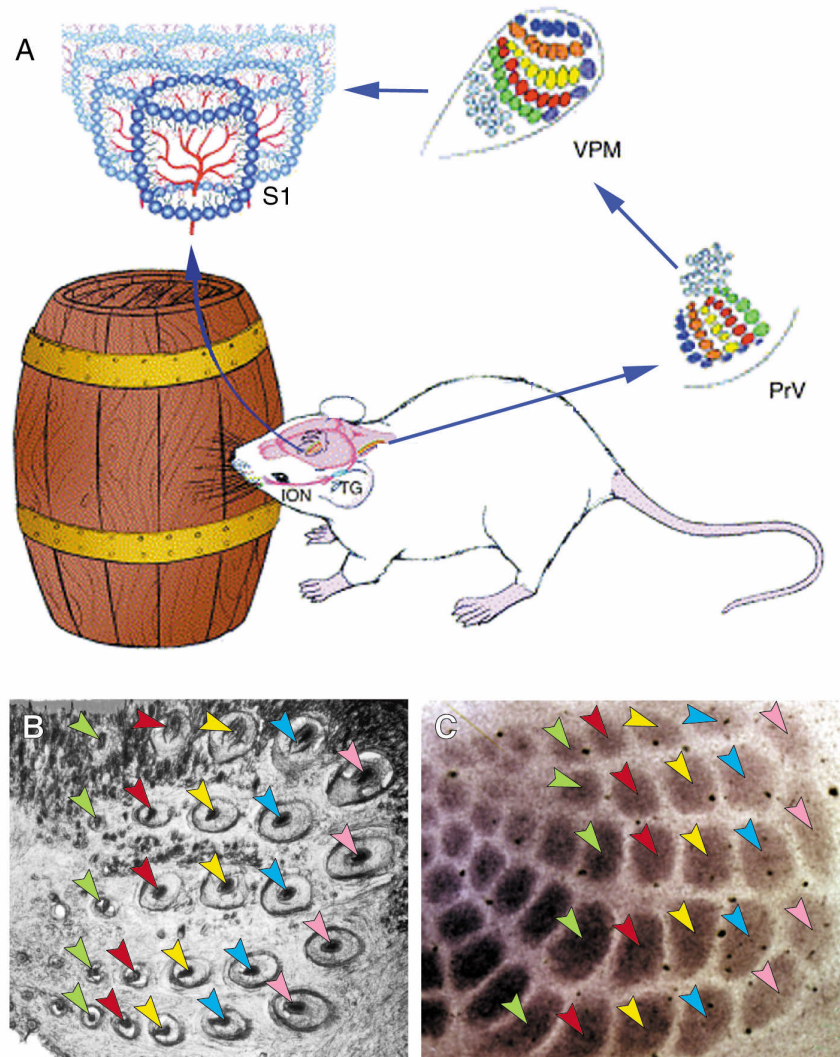


Abb. 1.4: Hauptstationen des zentralen trigeminalen Signalwegs. (A) Afferenzen aus den Tasthaarfollikeln der Maus oder Ratte werden über den Infraorbitalnerv (ION), das trigeminale Ganglion (TG), den sensorischen Hauptnucleus im Hirnstamm (PrV) und den ventroposteromedialen thalamischen Nucleus (VPM) zum primären somatosensorischen Cortex (S1) geleitet. Bereits an den Zwischenstationen im Hirnstamm und Thalamus tritt dabei eine somatotopische Kartenbildung auf, die jedoch weniger stark ausgeprägt als im Cortex (S1) ist, wo corticale Neuronenkörper (blau) und thalamocorticale Afferenzen (rot) räumlich sehr deutlich voneinander getrennt sind. Modifiziert aus Erzurumlu und Kind (2001). (B,C) Die stereotype Anordnung der Tasthaare auf der Schnauze des Nagers (B – tangentialer Schnitt des Tasthaarfeldes einer Maus) ist in tangentialen Schnitten durch Schicht 4 des somatosensorischen Cortex nach Cytochromoxidase-Histochemie (C) deutlich wiederzufinden. Jedes der dunklen Felder in C entspricht dem Inneren eines Fäßchens; farbige Pfeile in B und C markieren sinngemäß die jeweils einander entsprechenden Tasthaare und Fäßchen.

Die Anordnung dieser Fäßchen weist eine auffällige Übereinstimmung mit den Tasthaaren auf der Schnauze der Maus auf (Woolsey und Van der Loos, 1970; Welker, 1976; Rice und Van der Loos, 1977). Taktile Information aus Rezeptoren an den Follikeln der Tasthaare wird entlang der zentralen trigeminalen Afferenzbahn über das Stammhirn und den Thalamus zum Cortex weitergeleitet. Entlang dieser Leitungsbahn, und besonders im Cortex selbst, sind die afferenten Bahnen und Umschaltstationen in einer wohlsortierten Art und Weise angelegt:

Die Neuronen geben in ihrer Anordnung genau das Muster der Tasthaare wieder, deren Sinnesinformationen sie jeweils empfangen und weiterleiten.

Die Fäßchenfelder im somatosensorischen Cortex der Maus bilden sich während der ersten postnatalen Woche. Eine komplette Unterbrechung der Afferenzbahnen während dieser Zeit verhindert die Ausbildung der Fäßchenfelder; die experimentelle Entfernung einzelner Tasthaare führt zu einer entsprechenden Umbildung des corticalen Musters. Damit wird deutlich, dass periphere Signale notwendig sind, um eine normale Fäßchenmorphologie auszubilden (Rice und Van der Loos, 1977).

1.4.4 Genetische Grundlagen der Bildung von Fäßchenstrukturen

Während sich eine große Anzahl von Studien mit der morphologischen Beschreibung der Entwicklung und physiologischen Studien im Fäßchencortex beschäftigt, sind die genauen genetischen Grundlagen des Entwicklungsprozesses nur schlecht definiert. Es gibt jedoch mehrere Gene, die für die Ausbildung der Fäßchen essentiell sind (vgl. Abb 1.5). Dazu gehören unter anderem die Adenylatcyclase Typ 1 (Welker et al., 1996; Abdel-Majid et al., 1998), Monoamin-Oxidase A (Cases et al., 1996), NMDA-Rezeptor Typ 1 (Iwasato et al., 2000) und Phospholipase C- β 1 (Hannan et al., 2001).

Um weitere in die Ausbildung des Fäßchencortex involvierte Gene zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit ein genomischer Ansatz gewählt, in dem mit Hilfe von Microarrays die Expressionsprofile tausender Gene während der kritischen Periode der Fäßchenformierung untersucht wurden. Dabei wurde einerseits nach Genen gesucht, die während der entsprechenden Entwicklungsphase zeitlich stark herauf- oder herunterreguliert werden und zum anderen nach Genen, die in Abhängigkeit von Adenylatcyclase Typ 1 reguliert werden.

Adenylatcyclasen üben ihre Wirkung im Wesentlichen über den sekundären Botenstoff cAMP aus. Der wichtigste nachgeschaltete intrazelluläre Signalweg führt über Proteinkinase A. Im Zusammenhang mit dem verwendeten genomischen Analyseansatz soll hervorgehoben werden, dass über die Proteinkinase A - neben verschiedenen anderen nachgeschalteten Signalwegen - die Transkription bestimmter Gene reguliert werden kann. Diese Gene tragen in ihren regulatorischen Sequenzen cAMP-responsive Elemente (CREs), an welche aktivierte CRE-bindende Proteine (CREBs) binden können. Von zahlreichen neurophysiologischen Prozessen ist bekannt, dass sie von CRE-vermittelter Transkriptionsaktivierung abhängig sind (Silva et al., 1998). In Bezug auf die Entwicklung des somatosensorischen Cortex ist dabei von besonderem Interesse, dass mit Hilfe von CRE-LacZ-Reporterkonstrukten eine CRE-vermittelte Transkriptionsaktivierung in den Fäßchen nach gezielter Stimulation der zugehörigen Tasthaare ausgelöst werden kann (Pham et al., 1999). Eine ähnliche Situation liegt im visuellen Cortex vor, der organisatorisch Parallelen zum somatosensorischen Cortex aufweist (Barth et

al., 2000). Eine mögliche Erklärung für die Abwesenheit von Fäßchen in der Adenylatcyclase 1-Mutante ist daher eine Fehlregulation von Genen, die für die Fäßchenbildung benötigt werden. Neben Genen, die während der Entwicklung des somatosensorischen Cortex ein dynamisches Expressionsprofil aufweisen, eröffnet die Adenylatcyclase 1-Mutante eine weitere Möglichkeit zur Suche nach Kandidatengen, indem ihr Expressionsprofil während der Entwicklung des fehlerhaften Fäßchencortex mit dem Wildtyp verglichen wird.

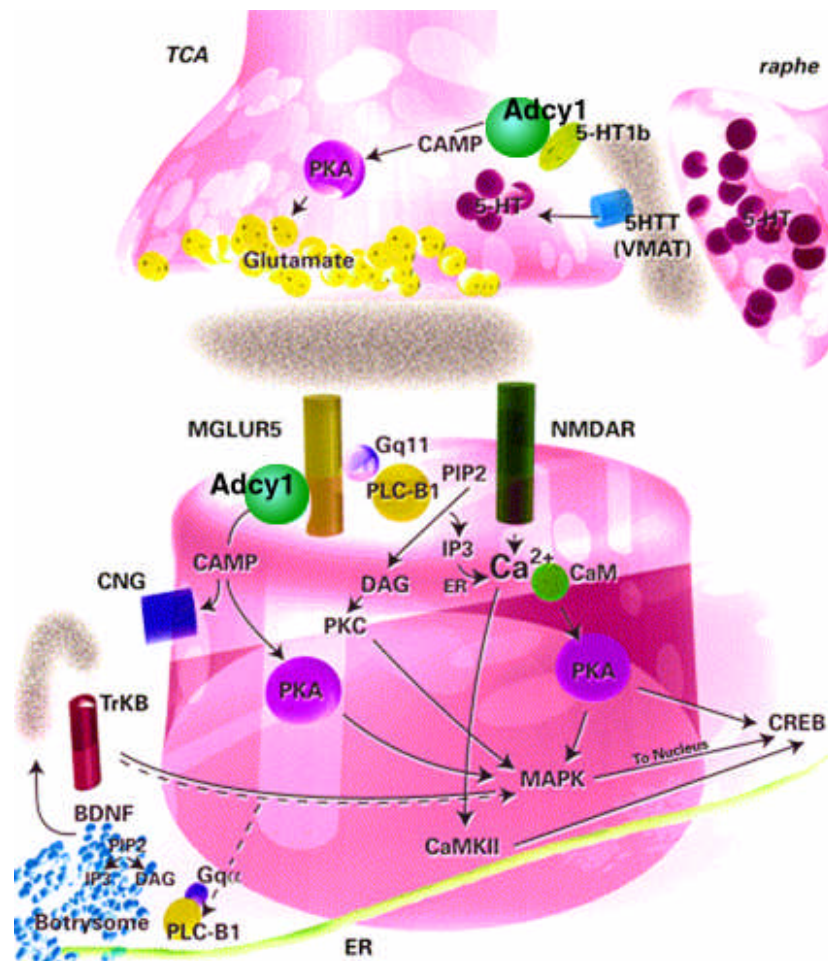


Abb. 1.5: Schematische Übersicht der Bestandteile von Signalwegen, für die genetische Evidenz oder anderweitige experimentelle Hinweise für eine Beteiligung an der Ausbildung von Fäßchenstrukturen im somatosensorischen Cortex vorliegen. Diese können präsynaptisch in den thalamocorticalen Afferenzen (TCA, obere Bildhälfte) oder postsynaptisch in corticalen Neuronen (untere Bildhälfte) lokalisiert sein. Präsynaptisch kann Typ 1 Adenylatcyclase (Adcy1) in Abhängigkeit von Serotonin (5-HT), Serotoninrezeptor 1b (5-HT1b) und Serotonintransporter (5-HTT) cAMP bilden und so über Proteinkinase A (PKA) die Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat regulieren. Postsynaptisch relevante Glutamatrezeptoren sind der metabotrope Glutamatrezeptor 5 (MGLUR5) und NMDA-Rezeptoren (NMDAR), insbesondere Typ 1. Unter den intrazellulären postsynaptischen Signalwegen spielt Adcy1 eine Rolle bei der aktivitätsabhängigen cAMP-Produktion, die über PKA, MAP-Kinase (MAPK) und CRE-bindendes Protein (CREB) Einfluss auf die Transkription nachgeschalteter Gene hat. Weitere abgebildete, für diese Arbeit nur peripher relevante Signalwege sind in Erzurumlu und Kind (2001) näher beschrieben. Abbildung modifiziert aus Erzurumlu und Kind (2001).

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Tierexperimentelle Arbeiten

2.1.1 Maushaltung und verwendete Stämme

Sämtliche Arbeiten mit Tieren wurden entsprechend den Vorschriften des Bundestierschutzgesetzes durchgeführt (BGBI S.1105, ber. S. 181, Abschnitt 2 (§2+3), 5 (§7-9) und 8 (§119)). Zur Analyse von Expressionsmustern wurden die Mausstämme C57BL/6 (postnatale Stadien) und NMRI (Embryonalstadien) verwendet. Des Weiteren wurden Mäuse des Stamms *barrelless* analysiert, der auf eine spontan aufgetretene natürliche Mutation des Typ I Adenylatcyclase-Gens zurückgeht (Van der Loos et al., 1986). *Barrelless*-Mäuse in einem C57BL/6 Hintergrund wurden freundlicherweise von Michael Crair (Baylor College of Medicine, Houston, Texas) zur Verfügung gestellt. Ein Mausstamm mit einer gezielten Deletion von *c-Fos* (Wang et al., 1992) wurde freundlicherweise von Erwin Wagner (Institut für Molekularpathologie, Wien) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Genotypisierung von *barrelless*-Mäusen

2.1.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Es wurden 0,5-1 cm lange Schwanzbiopsien entnommen und in 400 µl Extraktions-Puffer (200 mM Tris/HCl, pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 0,5 mg/ml Proteinase K) über Nacht bei 55°C schüttelnd inkubiert. Nach kurzem Aufschütteln wurden unlösliche Partikel durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 13 000 rpm, RT). Vom Überstand wurden 200µl abgenommen und die darin enthaltene DNA durch Zugabe von 100 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 600 µl 100 % Ethanol ausgefällt (5 min, 13 000 rpm, RT). Anschließend wurde die DNA mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen (3 min, 13 000 rpm, RT)

und final in 400 μ l 10 mM Tris-Cl (pH 7,5) gelöst (schüttelnd über Nacht, RT). Für die PCR-Genotypisierung wurden 1,3 μ l gDNA pro 10 μ l-Reaktion eingesetzt.

2.1.2.2 PCR-Genotypisierung

In der PCR-Genotypisierung wurden zwei verschiedene Primersätze mit je drei von insgesamt fünf spezifischen Primern eingesetzt.

brl-F2 TCCCAACCCAAGTTGCCAGAG
 brl-R3 TACAGTGGACGGACAGTCGA
 brl-R4 AGACCACGATCGATGCTACC
 ETn-2 CGAAGATCCTTTCCTGTGGA
 ETn-5 CAGAGATTATACGGCGGGAA

Primermix „BR2“ enthielt jeweils 1 μ M brl-F2, brl-R4 und ETn-5. Dieses Primerpaar resultiert im Wildtyp in einem 369 bp-Amplifikat, in der *barrelless*-Mutante in einem 288 bp-Amplifikat.

Primermix „BR3“ enthielt jeweils 1 μ M brl-F2, brl-R3 und ETn-2. Dieses Primerpaar resultiert im Wildtyp in einem 380 bp-Amplifikat, in der *barrelless*-Mutante in einem 800 bp-Amplifikat.

Reaktionsansatz (pro Reaktion):

1,3 μ l	genomische DNA (s.o.)
1 μ l	10x Puffer (Advantage 2, Clontech)
0,2 μ l	50x dNTPs (10mM each)
0,2 μ l	50x Advantage 2 polymerase mix (Clontech)
5,3 μ l	Wasser
<hr/>	
10 μ l	Gesamtmenge
<hr/>	

PCR-Programm:

Denaturierung	94°C	2 min
Amplifikation (29 Zyklen)	94°C	30 sec
	61°C	30 sec
	68°C	40 sec
Endschritt	4°C	bis Gelauftrag

Die PCR-Produkte wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese (1,5 % Agarose-Gel in 1x TAE-Puffer) aufgetrennt und der Genotyp der Tiere durch Vergleich mit einem abgestuften Größenstandard ("100 bp DNA ladder", New England Biolabs) bestimmt.

2.1.3 Entnahme von Gewebe aus dem somatosensorischen Cortex

Für die Entnahme von Gewebe aus dem primären somatosensorischen Cortex wurden Mäuse von P0-P7 direkt, ältere Tiere ab P8 nach Betäubung durch das Inhalationsanästhetikum Isofluran (Baxter) dekapitiert. Nach Freilegen beider corticalen Hemisphären wurde ein den Fäßchenfeldern des somatosensorischen Cortex entsprechender Bereich mit einem Mikroskalpell (Microsurgical Knife 15°, 5 mm; Sharpoint) zunächst im Umriß 2-3 mm tief rechteckig umschnitten, anschließend wurde mit einem feinen Spatel der Cortex von den unterliegenden Gehirnbereichen abgetrennt. Das entnommene Gewebe wurde in eiskaltem PBS unter dem Mikroskop inspiziert und ggf. von anhaftendem nichtcorticalen Gewebe gereinigt. Während der überwiegend untersuchten Stadien von P0-P10 weisen die corticalen Hemisphären wenige oberflächliche Orientierungspunkte auf, daher wurde die genaue Lokalisation der Fäßchenfelder in einer Vorstudie experimentell ermittelt. Dabei wurde bei etwas älteren Entwicklungszeitpunkten (P15-P20) mit derselben Methode die entsprechende Region isoliert.

Für die RNA-Gewinnung wurden die entnommenen Gewebeteile sofort auf Trockeneis gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Für tangentielle Schnitte wurde das Gewebe anschließend flach fixiert, mit einem Vibratom in 100 μm -Abständen tangential geschnitten und in Schnitten aus Schicht 4 des Cortex wurde durch Cytochromoxidase-Histochemie die Anwesenheit von Fäßchenstrukturen demonstriert. Für Histologie und Cytochromoxidase-Histochemie wurden Standardmethoden verwendet (Lu et al., 2001).

2.2 Quantitative Expressionsanalysen

2.2.1 RNA-Isolierung

2.2.1.1 Isolierung von mRNA aus Cortexgewebe

Für die Isolierung von mRNA wurden Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (Dyna) verwendet. Die mit (dT)₂₅-Oligomeren beschichteten ferromagnetischen Partikel binden spezifisch an den Poly(A)-Schwanz von mRNA, wodurch diese von anderen RNA-Spezies (insbesondere tRNAs und ribosomale RNA) durch magnetische Auftrennung separiert werden kann. Die isolierte

RNA ist, verglichen mit Total-RNA (s.u.), stark angereicherte mRNA und enthält nur einen geringen Anteil ribosomaler RNA.

2.2.1.1.1 Puffer für die mRNA-Isolation

Lys-bind: 100 mM Tris (pH 7.5), 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% SDS

Wash-SDS: 20 mM Tris (pH 7.5), 1 M LiCl, 2 mM EDTA, 1% SDS

Wash-high: 20 mM Tris (pH 7.5), 1 M LiCl, 2 mM EDTA

Wash-low: 10 mM Tris (pH 7.5), 150 mM LiCl, 1 mM EDTA

Alle Puffer wurden zunächst ohne Tris zubereitet. Nach der Behandlung mit DEPC (500 µl/l) wurden die Puffer autoklaviert und anschließend mit der entsprechenden Menge einer sauberen 1 M Tris-Cl (pH 7.5)-Lösung versetzt.

2.2.1.1.2 Extraktion, Lagerung und Fällung von mRNA

4 ml Lys-bind wurden mit 40 µl DTT (30 mg/ml) versetzt und auf Eis gelagert. Das Gewebe (z.B. somatosensorischer Cortex von insgesamt 5 Tieren bei P0-P10) wurde direkt aus der Lagerung bei -80°C in diese Lösung gegeben und sofort mit einem geeigneten Pistill homogenisiert. Das Homogenat wurde mit einer Spritze aufgezogen, 7-9 mal durch eine 0,9 mm (20 G)-Kanüle auf- und abpassiert und anschließend für 2 min bei Maximalgeschwindigkeit in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Für die anschließende Magnetauftrennung wurden 2 ml der Dynabead-Suspension (Dyna) nach kurzem Aufschütteln auf vier 1,5 ml-Röhrchen verteilt. Ein geeigneter Magnetständer (Dyna) wurde jeweils zum Fixieren der Dynabeads an der seitlichen Gefäßwand verwendet, so dass der Überstand abpipettiert werden konnte.

Zu jedem der vier Dynabead-Röhrchen wurde nach Entfernen des Lagerungspuffers und Resuspendierung mit 400 µl Lys-bind ein 1 ml-Aliquot des Gewebehomogenates zugegeben und nach kurzem Schütteln 5 min zur bei Raumtemperatur inkubiert. Um ein Absetzen der Dynabeads zu verhindern, wurde dabei gelegentlich geschüttelt. Anschließend wurden die Röhrchen im Magnetständer gelagert und der Überstand abpipettiert und verworfen.

Jeder der folgenden Waschschrte beinhaltete eine Resuspendierung der Pellet und abschließende Verwerfung des Überstandes. Die Abfolge der Waschschrte war pro Röhrchen zweimal 400 µl Wash-SDS, einmal Wash-high, einmal Wash-low.

Zur Eluierung der mRNA von den Beads wurden pro Röhrchen 55 µl DEPC-behandeltes H₂O zugegeben (220 µl insgesamt) und unter mehrfachem resuspendieren für 3 min bei 65°C inkubiert. Nach der Auftrennung im Magnetständer wurde ein 10 µl-Aliquot des Überstandes zur spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung verwendet, der restliche Überstand (ca. 200 µl) wurde weiter aufgereinigt. Es wurden 200 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1, Roth) zugegeben und stark geschüttelt. Nach 2 min bei Maximalgeschwindigkeit in einer Tischzentrifuge wurde die obere (wässrige) Phase in ein frisches

Röhrchen überführt. Es wurden 3 Volumen (600 µl) 100% Ethanol zugegeben und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Unmittelbar vor Gebrauch wurden aus den Röhrchen entsprechend der zuvor erfolgten Konzentrationsbestimmung ein entsprechendes Aliquot entnommen und bei Raumtemperatur mit 0,025 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) versetzt. Das Präzipitat wurde 20 min bei 4°C in einer Tischzentrifuge bei Maximalgeschwindigkeit abzentrifugiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in einer geeigneten Menge DEPC-behandelten Wassers oder Northern-Ladepuffer aufgenommen.

2.2.1.2 Isolierung von Komplet-RNA aus Cortexgewebe

Gewebe aus dem somatosensorischen Cortex wurde wie oben beschrieben entnommen und in 1,5 ml-Röhrchen bei -80°C gelagert. Zur Isolierung von Komplet-RNA wurde RNAzol B (WAK Chemie) gemäß Herstellerangaben benutzt.

Zu jedem Röhrchen mit max. 40 mg (entsprechend ~40 µl) gefrorenem Gewebe wurden 800 µl RNAzol B zugegeben und sofort mit einem passenden Mikropistill und/oder durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Es wurden 80 µl Chloroform zugegeben und nach kurzem, vorsichtigem Schütteln (von Hand!) für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 15 min bei 4°C mit Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Die obere klare, wäßrige Phase (ca. 440 µl) wurde abgenommen und in ein frisches Röhrchen transferiert. Nach Zugabe von 440 µl Isopropanol wurde kurz geschüttelt und für 15 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde für 15 min mit Maximalgeschwindigkeit bei 4°C abzentrifugiert, das entstehende Pellet anschließend mit 75% Ethanol gewaschen und für 5-10 min getrocknet. Das Pellet wurde dann mit 87 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen, bei 60°C für 5-10 min inkubiert und kräftig geschüttelt, um die RNA wieder zu lösen. Für die Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl entnommen und nach Verdünnung spektralphotometrisch gemessen. Zu den verbleibenden 86 µl wurden 10 µl 10x PCR-Puffer (z. B. aus Advantage 2-System, Clontech), 2 µl RNase Inhibitor (40 /µl) und 2 µl RNase-freie DNase I (10 U/µl) zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde mit 150 µl DEPC-behandeltem Wasser verdünnt und 250 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, Roth) zugegeben. Zur Extraktion wurde geschüttelt, eine kleine Menge Phase Lock Gel Heavy (Eppendorf) zugegeben und 5 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Die anschließend oberhalb des Gels befindliche Phase (ca. 250 µl) wurde in ein frisches Röhrchen überführt und erneut mit 250 µl Chloroform extrahiert. Die daraus resultierende obere, wäßrige Phase wurde in ein frisches Röhrchen überführt, mit 750 µl Ethanol und 6,25 µl 3M Natriumacetat versetzt. Nach 30 min Zentrifugation bei 4°C wurde das entstandene Pellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in einer geeigneten Menge DEPC-behandelten

Wassers oder Puffers aufgenommen, 5-10 min bei 60°C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.1.3 Herstellung von cDNA durch reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde das SuperScript II System (Invitrogen) benutzt. Pro 20 µl Reaktionsansatz wurden 2 µg Komplet-RNA (s.o.) in 10 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 1 µl Zufallshexanucleotiden (50 ng/µl) und 1 µl dNTPs (je 10 mM) wurde für 5 min bei 65°C denaturiert, anschließend auf Eis gekühlt. Es wurden 4 µl 5x Puffer (SuperScript II System), 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl) zugegeben. Nach 2 min Inkubation bei 25°C wurde 1 µl SuperScript II Reverse Transkriptase zugegeben. Weitere Inkubationsschritte waren 10 min bei 25°C, 50 min bei 42°C, 15 min bei 70°C, dann auf Eis. Es wurde 1 µl RNaseH zugegeben und weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20°C.

2.2.2 Microarrays

Für die Durchführung von Microarrayanalysen wurden kommerziell erhältliche Arrays des Typs GeneChip Mouse Genome Array-U74A-C (Affymetrix) verwendet. Als Ausgangsmaterial diente aus jeweils mehreren Wildtyp- oder *barrelless*-Würfen zusammengefaßte mRNA aus somatotopischem Cortexgewebe, die wie oben beschrieben isoliert wurde. Die Herstellung markierter Sonden, Hybridisierung mit Affymetrix Microarrays und Auswertung mit GeneChip DNA Analysis Software (Affymetrix) erfolgte durch das Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, Berlin).

Die bereitgestellten normalisierten Expressionsdaten wurden mit Excel (Microsoft) und der webbasierten Auswertungssoftware NetAffx Analysis Center (Affymetrix) weiter bearbeitet. Bei der Auswahl von Kandidaten für die weitere Untersuchung wurden zum einen aus der Expressionsanalyse resultierende Parameter wie allgemeine Expressionsstärke und Änderungen des Expressionsverhaltens zwischen den verschiedenen Proben berücksichtigt. Zum anderen wurden funktionelle Daten, bzw. Vorhersagen aus Literaturrecherchen und systematisch annotierten Ontologieangaben mit einbezogen.

2.2.3 Northern-Blot

Die Northern-Blot-Analyse erlaubt gleichzeitig eine Bestimmung der Größe und der Menge bestimmter Transkripte in einer RNA-Präparation. Hier wurden für jede untersuchte Altersstufe mehrere Würfe von entweder homozygoten *barrelless*- oder Wildtyp-Verpaarungen als Gewebequelle genutzt. Das Gewebe wurde wie oben beschrieben isoliert, über Dynabeads die mRNA isoliert und anschließend für jede Altersstufe und Genotyp mRNA aus mehreren

Tieren aus unterschiedlichen Würfen vereinigt. Die Einzelschritte wurden im wesentlichen nach Standardmethoden (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt.

2.2.3.1 Denaturierende Gelelektrophorese

Die Elektrophorese wurde in 1x MOPS-Puffer durchgeführt. Das Gel enthielt 1,5% Agarose, 2,2 M Formaldehyd, sowie 1x MOPS. Pro Spur wurden 6 µg mRNA wie oben beschrieben ausgefällt. Das getrocknete Pellet wurde aufgenommen in einer Mischung aus 2 µl Wasser, 2 µl 10x MOPS-Puffer, 4 µl Formaldehyd, 10 µl Formamid und 1 µl Ethidiumbromidlösung (200 µg/ml). Anschliessend wurde unter gelegentlichem Schütteln für 60 min bei 55°C inkubiert, dann in Eiswasser gekühlt. Die Proben wurden mit je 2 µl 10x-Laufpuffer (50% Glycerol, 10 mM EDTA, 0,25% Bromphenolblau) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei geeigneter Spannung durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande eine Strecke von ca. 8 cm zurückgelegt hatte. In allen Fällen wurde eine Spur des Gels mit einem molekularen RNA-Größenstandard (0,24-9,5 kb RNA Ladder, GibcoBRL) beladen, der in gleicher Weise wie die RNA-Proben denaturiert und aufgetragen wurde. Vor dem Kapillartransfer wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator zusammen mit einem Lineal fotografiert, um später die Größe einzelner Banden bestimmen zu können.

2.2.3.2 Kapillartransfer auf Membranen

Das Gel wurde einmal für 15 min bei Raumtemperatur in DEPC-behandeltem Wasser gewaschen, gefolgt von zwei Inkubationen in 10x SSC. Durch Aufwärts-Kapillartransfer wurde die RNA in 10x SSC auf eine HybondXL-Membran (Amersham, UK) geblottet und durch UV-Quervernetzung auf der Membran immobilisiert.

Nach erfolgter Benutzung (s.u.) wurden radioaktive Sonden von den Membranen entfernt, indem zweimal mit aufgekochtem 0.1%SDS für jeweils einige Minuten auf dem Horizontalschüttler inkubiert wurde. Die vollständige Entfernung der radioaktiven Sonde wurde mit einem Geigerzähler und bei Bedarf durch Abwesenheit von Banden auf einem Röntgenfilm bestätigt. Nach der Sondenentfernung konnten der Northern Blot für weitere Hybridisierungen benutzt werden.

Als Gelbeladungs- und Transferkontrolle wurden alle hybridisierten Membranen mit einer Sonde für das ubiquitär auf gleichmäßigem Niveau exprimierte Haushaltsgen EF1α hybridisiert.

2.2.3.3 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Zur Herstellung radioaktiver DNA-Sonden wurde das Rediprime II Kit (Amersham) nach Herstellerangaben benutzt. Dabei wurden jeweils 50 ng DNA-Vorlage und (α -³²P)dCTP mit einer Gesamtaktivität von 50 µCi eingesetzt. Die Sonde wurde über ProbeQuant G-50 Säulen

(Amersham) aufgereinigt und mit einem Szintillationsmeßgerät bei für ^{32}P geeigneten Parametern gemessen. Es wurde pro ml Hybridisierungspuffer eine Menge von 10^6 counts/min verwendet.

2.2.3.4 Hybridisierung und Datenauswertung

Hybridisierungen wurden in UltraHyb Hybridisierungspuffer (Ambion) durchgeführt. Je nach Größe der Membran wurden 8-15 ml Puffer in einer geeigneten Hybridisierungsröhre verwendet. Nach einer Prähybridisierung (Puffer ohne Sonde) für 1h bei 42° wurde die frisch denaturierte (5 min 100°C , 5 min in Eiswasser) Sonde zugegeben und für mehrere Stunden oder über Nacht bei 42°C hybridisiert.

Die Membran wurde anschließend bei 42°C zweimal je 5 min mit Puffer 1 (2x SSC, 0,1% SDS) und zweimal je 15 min mit Puffer 2 (0,1x SSC, 0,1% SDS) gewaschen. Zur Ergebnisauswertung wurde entweder ein Film (Hyperfilm, Amersham) für eine der Signalstärke entsprechende Zeit belichtet oder ein Phosphoimager verwendet.

2.2.4 Quantitative Real-Time-RT-PCR

2.2.4.1 Nachweismethode

Als schnelle und (verglichen mit Northern-Blot) genauere Quantifizierungsmethode für die mRNA von Kandidatengen in kleinen Gewebemengen (somatosensorischer Cortex aus Einzeltieren) wurde die quantitative Real-Time-PCR eingesetzt. Dabei wurde das iCycler-System (Bio-Rad) mit Exzitations- und Emissionsfiltern verwendet, die auf den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green abgestimmt waren. SYBR-Green ist ein interkalierender Farbstoff zur Detektion doppelsträngiger DNA.

Durch Messung der Fluoreszenz in der PCR-Reaktion während jedes einzelnen Zyklus läßt sich bei Verwendung geeigneter Kalibrationsverfahren über den Zeitpunkt des Überschreitens eines bestimmten Schwellenwertes (C_T , Threshold Cycle = PCR-Zyklus, in dem die vordefinierte Produktmenge überschritten wird) an dsDNA die im zu messenden Ansatz ursprünglich vorhandene Menge an DNA (z. B. cDNA aus einer reversen Transkription) bestimmen. Das Arbeiten im 96-Loch-Format ermöglicht dabei ein simultanes Messen zahlreicher Proben.

2.2.4.2 Primer

Die Primer für die quantitative Real-Time-PCR wurden für eine Produktgröße von ca. 100 bp ausgewählt.

Name	GenBank	Forward-Primer	Reverse-Primer	Länge (bp)
111331_at	AA184423*	5'-CAACGGACAGGTACACATGC-3'	5'-GCGTTGGGTTAGCACTGATT-3'	108
“Bpc2”	AI837604	5'-CTTTCGCCATAGCCTCTG-3'	5'-ACTCCGAGTGCTCAGCGATA-3'	84
“Bpc3”	AI639670	5'-ACTCCAGCTGGCTGGTTAGA-3'	5'-CAGGCCTTCATGAAAAGGAA-3'	107
c-Fos	NM_010234	5'-GATGTTCTCGGTTTCAACG-3'	5'-GGCTGGGGAATGGTAGTAGG-3'	100
Centg3	AI847394	5'-GGAATGTCCAGAGGTGCTGT-3'	5'-TGTGCCACTGTTCCAACCT-3'	98
EF1 α	XM_203909	5'-GTCCCAGGACACAGAGACTTCA-3'	5'-AATTCACCAACACCAGCAGCAA-3'	100
Lynx1	NM_011838	5'-CCTTTCAGTTGGCTCTTGA-3'	5'-AACACAACCAAGGGAAGTGC-3'	106
Nrgn	AI841709	5'-GGCAAAGGAGACCACGTTA-3'	5'-GTCCCAGAGACTCCCTCTCC-3'	95

* Die Affymetrix-Sonden 111331_at (AA874620) und 160906_i_at (AA184423) lieferten im Microarray identische Ergebnisse und liegen im selben annotierten Transkript, das zunächst als Enc-1, später als ETn-Abschnitt bezeichnet wurde (vgl. Diskussion).

2.2.4.3 Ausgangsmaterial

In der Real-Time-PCR werden wesentlich geringere Ausgangsmengen als für Northern-Analysen benötigt, so dass im Fall von Gewebe aus dem somatosensorischen Cortex Einzeltiere gemessen werden können. Dadurch wird es möglich, Geschwistertiere aus demselben Wurf einer heterozygoten Verpaarung ($brl^{+/-} \times brl^{+/-}$) zu messen, wobei durchschnittlich 25% $brl^{+/+}$ - und 25% $brl^{-/-}$ -Nachkommen auftreten. Für jedes einzelne Tier wurde das Gewebe der beiden corticalen Hemisphären vereinigt, die Komplet-RNA mit RNazol B isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgesetzt (s.o.).

2.2.4.4 Versuchsanordnung, Normalisierung und Auswertung

Es wurde grundsätzlich im 96-Loch-Format gearbeitet, so dass in einem Lauf gleichzeitig 32 cDNA-Proben als Triplikate gemessen werden konnten. Es wurde pro Lauf ein Gen (d.h. ein Primersatz) gemessen. Neben 27 zu testenden cDNAs (Einzeltiere) wurden jeweils 5 Verdünnungsstufen (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000) einer in allen Läufen identischen Referenz-cDNA (vereinigt aus mehreren cDNA-Präparationen mit gemischten Genotypen) als Ausgangsmaterial eingesetzt.

Durch Bestimmung der C_T -Werte der Verdünnungsreihe konnte so für jedes Kandidatengen pro Einzeltier die Menge des Transkripts (SQ = Startquantität) im Verhältnis zur Referenz-cDNA ermittelt werden. Im Gegensatz zur sogenannten $\Delta\Delta C_T$ -Methode kann durch dieses Verfahren unabhängig vom Gesamt-Expressionsniveau eines Transkripts und von der ge-

nauen Effizienz des PCR-Laufes das relative Expressionsniveau eines Gens in den einzelnen cDNA-Präparationen ermittelt werden.

Für jede cDNA-Präparation eines Einzeltiers wurde zunächst das Expressionsniveau des Haushaltsgens EF1 α im Verhältnis zur Referenz-cDNA ermittelt. Anschließend wurden mit weiteren Aliquoten der cDNA die Kandidatengene bestimmt. Vereinfacht ausgedrückt wurde für jedes Kandidatengen (z.B. Gen X) in jedem Einzeltier (z.B. Tier A) aus den ermittelten Startquantitäten von Gen X und EF1 α das relative Expressionsniveau von Gen X wie folgt berechnet:

$$\text{relative Expression (Gen X in Tier A)} = \frac{\left(\frac{\text{SQ (Tier A)}}{\text{SQ (Referenz-cDNA)}} \right)_{\text{Gen X}}}{\left(\frac{\text{SQ (Tier A)}}{\text{SQ (Referenz-cDNA)}} \right)_{\text{EF1}\alpha}}$$

2.3 Amplifikation und Sondenherstellung für die *in situ*-Hybridisierung

2.3.1 Allgemeine Prozeduren für Vorlagen- und Sondenherstellung

Neben der Erstellung einer Datenbank für die Publikation von Ergebnissen aus ISH-Screens war ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit die Optimierung der molekularbiologischen Methoden zur Herstellung der dazu notwendigen Ribosonden. Nachfolgend sind die optimierten Protokolle aller relevanten Schritte zusammengefaßt.

2.3.1.1 Ausgangs-cDNA

Das hier gewählte Verfahren zur Herstellung von Ribosonden basiert auf der Amplifikation geeigneter Abschnitte der genspezifischen cDNA mit geeigneten Primern aus einer cDNA-Präparation. Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erzielen, d.h. einen möglichst hohen Prozentsatz von Genen, die im primären Amplifikationsschritt erfolgreich amplifiziert werden können, ist es dabei entscheidend, eine Ausgangs-cDNA zu verwenden, in der das Gen von Interesse zumindest auf moderatem Niveau exprimiert ist.

Hier wurde in der Regel eine gemischte cDNA verwendet; eine Hälfte war aus Embryonen (E12-E13) extrahiert, die andere Hälfte aus postnatale (P0-P7) Gehirnen.

2.3.1.2 Primerkonstruktion

Zwei wichtige Parameter mit Einfluss auf Sensitivität und Spezifität einer Ribosonde sind ihre Länge und ihre Sequenzähnlichkeit zu anderen als der zu detektierenden mRNA. Grundsätzlich wurde - soweit möglich - bei der Konstruktion von Primern zur Sondenherstellung eine Sondenlänge von 800-1000 Nukleotiden angestrebt. Um Abschnitte mit möglichst niedriger Sequenzhomologie zu anderen Genen zu identifizieren, wurden systematisch durch BLAST-Vergleiche (Altschul et al., 1997) gegen die verfügbaren Datenbanken für Maus-Sequenzen solche Bereiche ausgewählt, die besonders geeignet waren. In Einzelfällen war es notwendig, kürzere Sequenzabschnitte (z.B. 500 bp) zu wählen, um Domänen großer Homologie zwischen einzelnen Mitgliedern von Genfamilien auszuschließen.

Nach Auswahl geeigneter Bereiche wurde das Programm Primer3 (Rozen und Skaletsky, 2000) unter Verwendung der Standardparameter verwendet, um geeignete Primersequenzen zu ermitteln.

Um eine Herstellung von Antisense- und (falls gewünscht) Sense-Sonden zu ermöglichen, wurde an das 5'-Ende des Vorwärts-Primers eine Erkennungsstelle für Sp6- (5'-GCGATTTAGGTGACACTATAG-3') und an das 5'-Ende des Rückwärtsprimers für T7- (5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGG-3') RNA-Polymerase angefügt.

2.3.1.3 Gradienten-PCR im 96-Loch-Format

Die PCR zur Amplifizierung von cDNA-Abschnitten mit genspezifischen Primern wurde im 96-Loch-Format (8 Zeilen \times 12 Spalten) in einem Gradiententhalzyklierer (T-Gradient, Biometra) durchgeführt, so dass gleichzeitig 24 Gene bei je vier verschiedenen Anlagerungstemperaturen amplifiziert wurden. Bei den gewählten Anlagerungsbedingungen ($55,5^{\circ}\text{C} \pm 6,5^{\circ}\text{C}$) beträgt die Temperaturverteilung den Spalten 1 bis 12: 49°C , $49,3^{\circ}\text{C}$, $50,2^{\circ}\text{C}$, $51,6^{\circ}\text{C}$, $53,2^{\circ}\text{C}$, $54,7^{\circ}\text{C}$, $56,3^{\circ}\text{C}$, $57,8^{\circ}\text{C}$, $59,4^{\circ}\text{C}$, $60,8^{\circ}\text{C}$, $61,7^{\circ}\text{C}$ und 62°C .

Der Reaktionsansatz für eine komplette 96-Loch-Platte enthielt 600 μl H_2O ; 135 μl PCR-Puffer (10x, Qiagen); 270 μl Q-Solution (5x, Qiagen); 135 μl dNTP (je 2 mM, Roche); 67,5 μl Ausgangs-cDNA (s.o.); 6,75 μl Taq-Polymerase (Qiagen). Nach Durchmischen wurden in den Spalten 4, 5 und 6 zu 24 einzelnen 45 μl -Aliquoten des Reaktionsansatzes 5 μl genspezifischer Primermix (je 5 μM Vorwärts- und Rückwärtsprimer) gegeben. Jeweils drei Aliquote von 10 μl wurden in derselben Anordnung wie in Reihen 4, 5 und 6 in die Reihen 1-3, 7-9 und 10-12 verteilt.

PCR-Programm:

Denaturierung	94°C	2 min
Amplifikation (35 Zyklen)	94°C	25 sec
	55,5°C ± 6,5°C	25 sec
	72°C	75 sec
Endschritte	72°C	9 min
	4°C	bis Gelauftrag

Aus den Ansätzen der Reihen 4-6 wurden je 10 µl als Reserve bei -20°C gelagert. Die in allen 96 Ansätzen verbleibenden je 10 µl wurden zusammen mit einem Größenstandard auf ein 1,5%-Agarosegel aufgetragen. Für jedes Gen wurden nach Bestätigung der Fragmentgröße durch Vergleich mit dem Größenstandard die jeweils ein oder zwei Banden der stärksten Intensität ausgeschnitten. Die DNA wurde unter Verwendung des Qiaquick Gel Extraction Kits (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert und in 20 µl Volumen eluiert.

2.3.1.4 Präparative PCR

Die Vorlagen für die Ribosondenherstellung wurden durch präparative PCR hergestellt. Reaktionsansatz: 45,5 µl H₂O, 10 µl PCR-Puffer (10x, Qiagen), 20 µl Q-Solution (5x, Qiagen), 10 µl dNTPs (je 2 mM), 0,5 µl Taq-Polymerase (Qiagen), 10 µl genspezifischer oder universeller (Sp6/T7) Primermix (je 5 mM). Je nach geschätzter Intensität der Bande vor Gelextraktion wurden 1 µl bis 6 µl der aus dem Gel extrahierten DNA als Vorlage zugegeben. Die resultierenden ca. 100 µl wurden für die PCR in zwei Aliquote zu je ca. 50 µl aufgeteilt.

PCR-Programm:

Denaturierung	94°C	2 min
Amplifikation (35 Zyklen)	94°C	25 sec
	55°C	25 sec
	72°C	75 sec
Endschritte	72°C	9 min
	4°C	bis Gelauftrag

Nach erfolgter PCR wurden die je zwei 50 µl-Aliquote vereinigt und jeweils 5 µl auf einem Agarosegel auf korrekte Fragmentgröße und Abwesenheit von Nebenprodukten überprüft. Der Rest des Ansatzes wurde unter Verwendung des NucleoSpin Extract Kits (Macherey-Nagel) aufgereinigt und die Konzentration mit dem Spektralphotometer ermittelt.

2.3.1.5 *In vitro*-Transkription und Aufreinigung von Ribosonden

Der Reaktionsansatz für die Herstellung von Ribosonden enthielt: 2 µl Transkriptionspuffer (10x, NEB), Digoxigenin-RNA Labeling Mix (je 10 mM r-ATP, r-CTP, r-GTP; 6,7 mM r-UTP; 3,3 mM DIG-r-UTP; Roche), 300-500 ng Vorlagen-DNA (PCR-Produkt) in geeignetem Volumen, 1 µl Rnasin (Fermentas), 1 µl Sp6-Polymerase (20 U/µl, NEB) oder 0,4 µl T7-Polymerase (50 U/µl, NEB), H₂O ad 20 µl Gesamtvolumen. Nach 150 min Inkubationszeit bei 37°C wurde 1 µl Stoppreagenz zugegeben. 20 µl Stoppreagenz enthielten 16,4 µl DEPC-behandeltes H₂O, 1,6 µl MgCl₂ (0,3 M) und 2 µl DNase I (10 U/µl). Nach weiteren 15 min Inkubation bei 37°C wurden zur Fällung 72 µl NH₄Ac (4 M) und 470 µl EtOH zugegeben. Nach Zentrifugation bei 4°C wurde das Pellet mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet, in einer geeigneten Menge DEPC-behandeltem H₂O aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Als Alternative zur Ethanolfällung wurde nach beendeter Reaktion mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl verdünnt, anschließend über ProbeQuant G-50 Säulen (Amersham) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.3.2 Synthese isoformspezifischer Sonden für die Genfamilie der Adenylatcyclasen

2.3.2.1 Identifizierung und Amplifizierung geeigneter cDNA-Abschnitte

Geeignete cDNA-Abschnitte für die Sondenherstellung wurden durch reverse Transkription und anschließende Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) hergestellt; die einzelnen Protokolle sind dieselben wie im High-Throughput-Verfahren. Total-RNA wurde aus Embryonen (E14.5., Stamm NMRI) und Gehirnen neugeborener Mäuse (Stamm C57BL/6) isoliert, zusammengefasst und für die cDNA-Synthese mit Zufalls-Hexanucleotiden verwendet.

Oligonucleotid-Primer für geeignete cDNA-Abschnitte der Maus-Adenylatcyclasen wurden ausgehend von Genbank-Einträgen ausgewählt. Adcy1: Nukleotide 1158 bis 1770 von Genbank-Eintrag AF053980; Adcy2: 2794-3829 von BC037107; Adcy3: 2317-3410 von NM_138305; Adcy4: 2210-3210 von NM_080435; Adcy6: 3103-4134 von NM_007405; Adcy7: 3669-4673 von NM_007406; Adcy8: 2738-3737 von XM_122935; Adcy9: 3377-4384 von NM_009624. Primer für eine zweite Adcy4-Ribosonde (Adcy4b) umfassten Positionen 35 bis 848 des Eintrags NM_080435. Für Adcy5 wurden in Maus und Ratte identische Regionen durch Vergleich der Ratten-Adcy5-cDNA (NM_022600) mit dem entsprechenden chromosomalen Abschnitt in Mausgenom-Datenbanken ermittelt. Die Primer 5'-TGCTGCA-GATATTCCGCTCT-3' und 5'-CGATCATGTCCATTCCCATC-3' wurden so gewählt, dass sie in der Maus-Adcy5-cDNA einen Sequenzabschnitt enthalten, der Homolog zu den Nukleotiden 1071 bis 2072 von Eintrag NM_022600 ist. Für Adcy8 wurden drei alternative

Transkripte mit Leserahmen-erhaltenden Deletionen von 90 oder 198 Nukleotiden in der Ratte beschrieben (Cali et al., 1996). Die für Adcy8 ausgewählte Region ist homolog zu allen drei Spleiß-Varianten und deckt für jede von ihnen mindestens eine durchgehende Sequenz von 550 Nukleotiden ab.

Die Oligonukleotide hatten, abhängig von der jeweils berechneten Anlagerungstemperatur, eine Länge von 18 bis 24 Gen-spezifischen Nukleotiden. Zusätzlich wurden an die 5'-Enden der Primer Erkennungsstellen für Sp6- (5'-GCGATTTAGGTGACACTATAG-3') oder T7- (5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGG-3') RNA-Polymerase angefügt. Die primäre Amplifikation wurde in einem Gradienten-Thermalzyklierer durchgeführt. PCR-Amplifikate der erwarteten Größe wurden in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel extrahiert und in einer zweiten, präparativen PCR weiter amplifiziert. Nach einer Sequenzierung zur Bestätigung der Identität des Amplifikates mit der erwarteten cDNA wurde Digoxigenin-markierte Ribosonde mit Sp6- oder T7-RNA-Polymerase hergestellt.

2.3.2.2 Besonderheiten bei der Analyse von Genfamilien

Die einzelnen Mitglieder kompletter Genfamilien weisen oft Teilabschnitte der cDNA auf, die konservierte Regionen mit hoher Sequenzhomologie enthalten. Für die Expressionsanalyse kompletter Genfamilien ist es daher essentiell, eine Kreuzreaktivität zwischen Ribosonden für nahe verwandte Gene auszuschliessen. Während manche Adenylatcyclasen ein weiter gestreutes Expressionsmuster aufweisen, andere jedoch scharf auf spezifische Organe oder Gehirnregionen beschränkt sind, so finden sich doch keine zwei Isoformen, deren Expressionsmuster vollständig überlappen. Für jede beliebige Kombination zweier Isoformen lässt sich mindestens ein Expressionsort finden, an dem die eine, aber nicht die andere exprimiert wird. Da also kein Expressionsmuster vollständig von irgend einem anderen abgedeckt wird, sind die Ribosonden mindestens so spezifisch für die jeweilige Isoform, dass eine theoretisch mögliche Kreuzhybridisierung mit anderen Isoformen unterhalb der Detektionsschwelle liegt.

2.4 Automatisierte *in situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitten

Die *in situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitten wurde mit einem in zahlreichen Schritten roboterunterstützten Verfahren durchgeführt (Herzig et al., 2001).

2.4.1 Gewebereinbettung und Anfertigung von Gefrierschnitten

Embryonen und Gehirngewebe wurden nach der Präparation direct in TissueTek OCT Medium (Sakura Finetec, Niederlande) eingebettet und bei -50°C bis -60°C gefroren. Das Gewebe wurde mit einem Kryotom (Leica, Deutschland) in einer Dicke von 20 µm oder

25 µm geschnitten, 20 min mit 4% Paraformaldehyd fixiert, acetyliert (zweimal für 5 min in 0.25% Essigsäure-Anhydrid, 0.1 M Triethanolamin, pH 8.0), über eine Ethanolreihe dehydriert und bis zur Verwendung gefroren gelagert.

2.4.2 Prähybridisierung und Hybridisierung

Alle nachfolgenden Schritte wurden in temperierbaren Durchflußhybridisierungskammern (Herzig et al., 2001; Visel et al., 2003) in einem Genesis Pipettierroboter (Tecan) durchgeführt. Die in der Durchflussskammer eingespannten Gewebeschnitte wurde sechsmal für 5 min mit 0.6% Wasserstoffperoxid in Methanol behandelt. Anschließend wurden die Schnitte sechsmal mit PBT (0.05% Tween-20 in PBS) gespült (als Inkubationsvolumen wurden generell 300 µl eingesetzt). Die Schnitte wurden mit 0.05% Tween-20 in 0.2 N HCl behandelt, gefolgt von einem Waschschrift in PBT. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte 7 min lang mit Proteinase K-Puffer behandelt (die Proteinase K-Konzentration richtete sich hierbei nach der Beschaffenheit des behandelten Gewebes, bei embryonalem Gewebe z.B. 2 µg/ml; Proteinase K-Puffer: 0,05% Tween-20, 50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8.0). Danach wurde sechsmal mit PBT gespült. Anschließend wurde das Gewebe zweimal für 10 min mit 4%PFA in PBT fixiert, gefolgt von sechs Waschschriften in PBT. Hieran schloss sich eine Präinkubation in Hybridisierungspuffer (Ambion, USA) für 30 min bei 65°C an. Final wurden die Schnitte über Nacht bei 60°C in Hybridisierungspuffer inkubiert, der die RNA-Sonde in einer Konzentration von 100 ng/ml enthielt.

2.4.3 Posthybridisierungs-Waschschrifte und Antikörperinkubation

Nach der Hybridisierung wurde unspezifisch gebundene Sonde durch jeweils fünf Inkubationen für 6 min bei 65°C mit Waschlösungen steigender Stringenz entfernt: 1. 5x SSC (20x SSC: 3 M NaCl, 0.3 M NaCitrat, pH 7), 2. 1x SSC, 3. 0.5x SSC und final 0.1x SSC, jeweils in 50% Formamid. Danach wurden die Schnitte mit 250 µl NTE gewaschen (0,05% Tween 20, 5 mM EDTA, 10 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,6), gefolgt von zwei Inkubationsschritten in 20 mM Iodoacetamid in NTE für je 5 min bei RT (im weiteren Verlauf reduzieren sich die Inkubationsvolumina auf 250 µl). Die Kammern wurden dreimal mit NTE gespült. Die Gewebeschnitte wurden dann zweimal 30 min in Hitze-inaktiviertem Schafserum in TNT-Puffer (0,05% Tween 20 in 100 mM Tris/150 mM NaCl, pH 7.6) inkubiert. Anschließend wurden die Kammern achtmal mit NTE gespült. Nach zwei Inkubationen für 30 min in TNB Block-Puffer (0,05% Tween 20 in 100 mM Tris/150 mM NaCl, 0.5% Blocking-Reagenz (PerkinElmer Lifesciences, USA), pH 7.6) (der TNB Block-Puffer wurde vorher durch Filtrieren von festen Bestandteilen gereinigt), wurden die

Kammern zweimal für 45 min mit Roche Anti-Dig-POD (1:500 verdünnt in TNB Block-Puffer) versetzt. Anschließend wurden die Schnitte achtmal für 5 min mit TNT-Lösung gewaschen. Die Kammern wurden zweimal für 30 min bei Raumtemperatur mit Tyramide-Biotin (T/B) versetzt (T/B wurde für die anschließende Verwendung der Tyramid-Signalamplifikation (TSA, PerkinElmer Lifesciences) in NEN Amplifikations-Verdünnungs-Puffer verdünnt). Nach acht Waschschrinen in Maleat-Wasch-Puffer (MWB) (100 mM Maleate, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7,5) wurden die Schnitte final zweimal 30 min mit Neutravidin-AP-Konjugat (Pierce, USA) inkubiert (1:600 Verdünnung in 1% Blocking-Reagenz (Roche, Schweiz) in MWB).

2.4.4 Waschschrine nach der Antikörper-Inkubation und Färbereaktion

Ungebundener Antikörper wurde durch acht Waschschrine mit MWB entfernt. Anschließend wurden die Schnitte durch zwei Inkubationen in TNT äquibriert. Zur Färbung wurden die Kammern dreimal 20 min lang mit Färbelösung versehen (1:250 BCIP; 1:200 NBT (beide Roche, Schweiz), 0,6 µg/ml Levamisol in TMN). Bei Bedarf wurde die Färbereaktion verlängert. Anschließend wurden sie viermal mit 0,05% Tween-20 in Wasser gespült, gefolgt von zwei Inkubationen in TNT. Die gefärbten Schnitte wurden mit 4% PFA, 0.5% Glutardialdehyd in PBT für 20 min fixiert. Nach jeweils vier Waschschrinen in PBT und Wasser wurden die Objektträger dann aus den Durchflussskammern entfernt und über Nacht getrocknet. Zur Analyse und Lagerung wurden sie mit wasserlöslichem Eindeckmedium (HydroMatrix, Micro-Tech-Lab) eingedeckelt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Entwicklung von Genepaint.org

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Expressionsatlas GenePaint.org in Form einer öffentlich zugänglichen Datenbank entwickelt. Hier soll zunächst das zugrundeliegende Datenmodell beschrieben werden. Es folgt ein Überblick über die Gewinnung von Expressionsdaten durch automatisierte *in situ*-Hybridisierung und die Annotation von Expressionsmustern. Schließlich werden die in GenePaint.org zur Verfügung stehenden Funktionen zur Suche und Analyse von Daten erläutert.

3.1.1 Datenmodell

Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Datenbank ist die Abbildung aller darin zu erfassenden Komponenten und der jeweils zugehörigen Daten in Form eines sogenannten Datenmodells. In diesem werden die Art der festzuhaltenden Daten, insbesondere aber ihre jeweiligen Beziehungen zueinander festgelegt. Das Datenmodell ist entscheidend für das Funktionieren einer Datenbank in der ursprünglich gewünschten Weise und ermöglicht erst die Entwicklung sinnvoller Werkzeuge für die Recherche in der Datenbank.

Das hier entwickelte Datenmodell für GenePaint.org wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Orgarat (Essen) unter Verwendung der Entwicklungsumgebung Magic (Magic Software Enterprises, München) als relationale DB2-Datenbank realisiert. Bilddaten und assoziierte Metadaten, Datenbanksysteme, Webserver und Zoomserver werden von der Gesellschaft für wissenschaftliche Datenverarbeitung Göttingen (GWDG) betrieben.

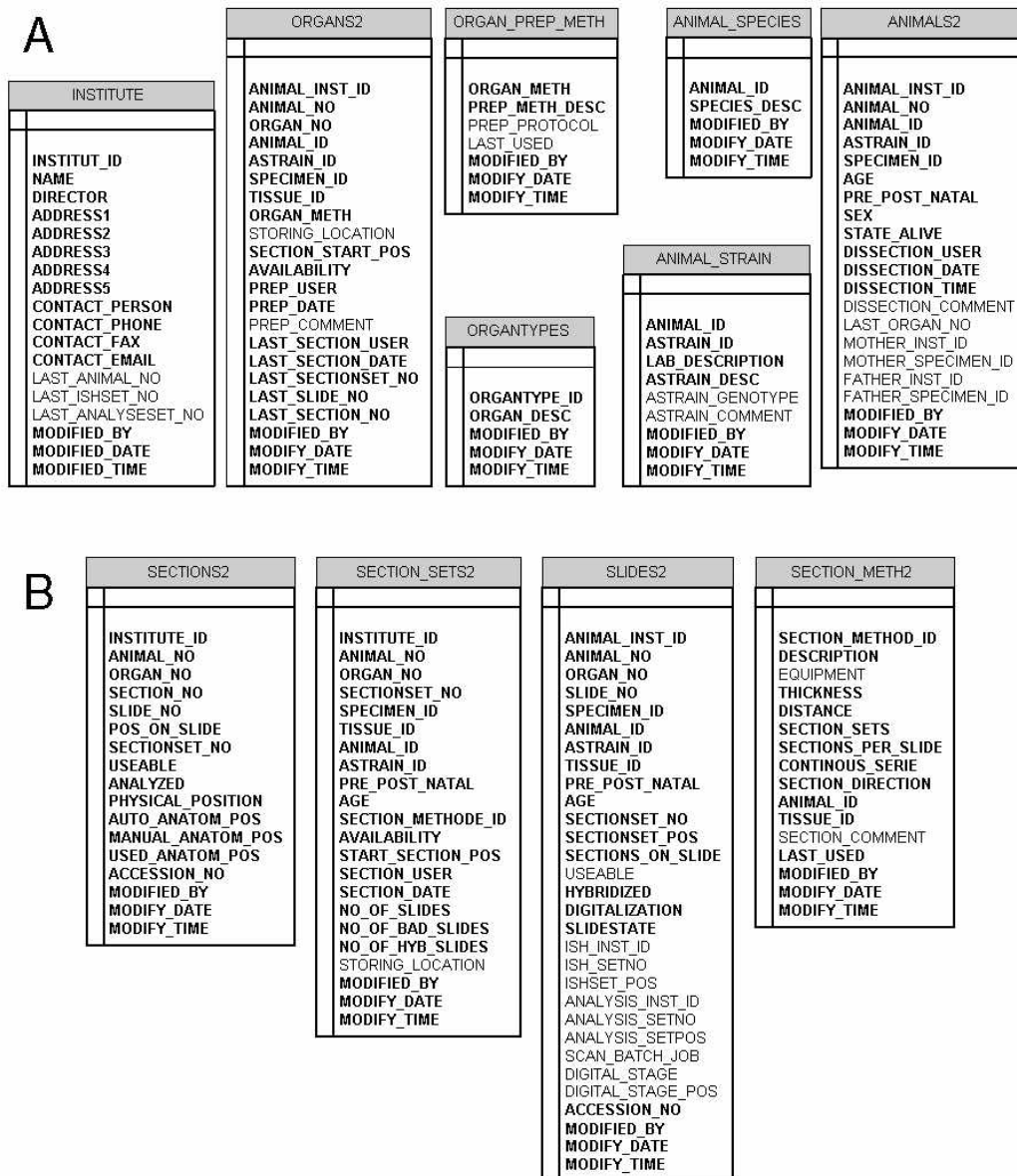


Abb. 3.1: Tabellen des Datenmodells I. (A) Tabellen mit Bezug zur Entnahme und Einbettung von Organen. (B) Tabellen mit Bezug zur Anfertigung von Cryoschnitten. Nähere Erläuterungen im Text.

Es ist nicht das Ziel der vorliegenden Arbeit, eine ausführliche Dokumentation des Datenmodells mit allen erfaßten Parametern und ihren genauen Beziehungen zueinander bereitzustellen. Es soll jedoch der Inhalt der wichtigsten Tabellen der Datenbank beschrieben werden. Darüber hinausgehend gibt es ein Benutzerverwaltungssystem für die Eingabe von Daten und den Zugang zu vorläufigen, noch nicht öffentlichen Daten. Dieses soll hier jedoch ebenfalls nicht näher erörtert werden.

In Abb. 3.1A sind die Tabellen mit Bezug zur Entnahme und Einbettung von Präparaten dargestellt. Für jedes einzelne Tier gibt es einen Eintrag in der Tabelle ANIMALS2, wobei all-

gemeine Angaben zu Tierart und –stamm in den Tabellen ANIMAL_SPECIES und ANIMAL_STRAIN erfaßt sind. Aus jedem Tier können mehrere Organe entnommen werden, so sind im Sinne der Datenbank z.B. einzelne Embryonen als Organe des Muttertiers zu verstehen. Jedes entnommene Organ ist in der Tabelle ORGANS2 erfaßt, wobei Details zur Art des Organs und zur Einbettungsmethode in den Tabellen ORGANTYPES und ORGAN_PREP_METH enthalten sind. Allgemeine Daten zum durchführenden Institut sind in der Tabelle INSTITUTE eingetragen.

In Abb. 3.1B sind die Tabellen mit Bezug zur Anfertigung von Cryoschnitten dargestellt. Die kleinste aus dem Schneideprozess resultierende Einheit sind Einzelschnitte, die in der Tabelle SECTIONS2 erfaßt sind. Mehrere Einzelschnitte sind durch ihre Positionierung auf einem Objektträger untrennbar miteinander verbunden und können beispielsweise nur gemeinsam für eine ISH benutzt werden. Diese Tatsache spiegelt sich in der Tabelle SLIDES2 wider. Weiterhin bilden mehrere Objektträger einen kontinuierlichen Satz von Schnitten desselben Präparates, dieser ist durch einen Eintrag in der Tabelle SECTION_SETS2 repräsentiert. In der Tabelle SECTION_METH2 finden sich technische Angaben zu jedem Satz von Schnitten, die z.B. die Schnitorientierung sowie die Dicke und den Abstand einzelner Schnitte voneinander beschreiben.

Angaben zu einzelnen Genen, insbesondere Accession-Nummern, Gennamen, -symbole und -beschreibungen stehen in der Tabelle GENE_NAMES (Abb. 3.2A). Angaben zu Ribosonden, insbesondere über den verwendeten Teilabschnitt der Sequenz im Referenz-GenBank-Eintrag sind in der Tabelle RIBOPROBES erfaßt. Daten zur eigentlichen *in situ*-Hybridisierung liegen in der Tabelle ISH vor, wobei teilweise auf Standard-Protokolldaten in der Tabelle ISH_METHODES verwiesen wird.

In Abb. 3.2B sind die mit der Annotation von Expressionsmustern zusammenhängenden Tabellen dargestellt. Das Herzstück des hierarchisch aufgebauten Diagramms der anatomischen Strukturen bilden dabei die Tabellen GLOBAL_STRUCTURES und TISSUE_STRUCTURES, auf deren Basis in der Tabelle ANNOTATIONS die Expressionsannotationen festgehalten werden, darunter Expressionsstärke, Muster und jeweiliger Referenzschnitt.

In Abb. 3.2C sind die Tabellen dargestellt, welche die Verbindung zwischen Metadaten und Bilddaten herstellen. IMAGES enthält Angaben zu Pfaden und Dateinamen der TIFF-, JPEG- und FPX-Dateien, ANALYZE_SETS stellt die Zuordnung von einzelnen Bilddateien zu vollständigen GenePaint-Datensätzen her.

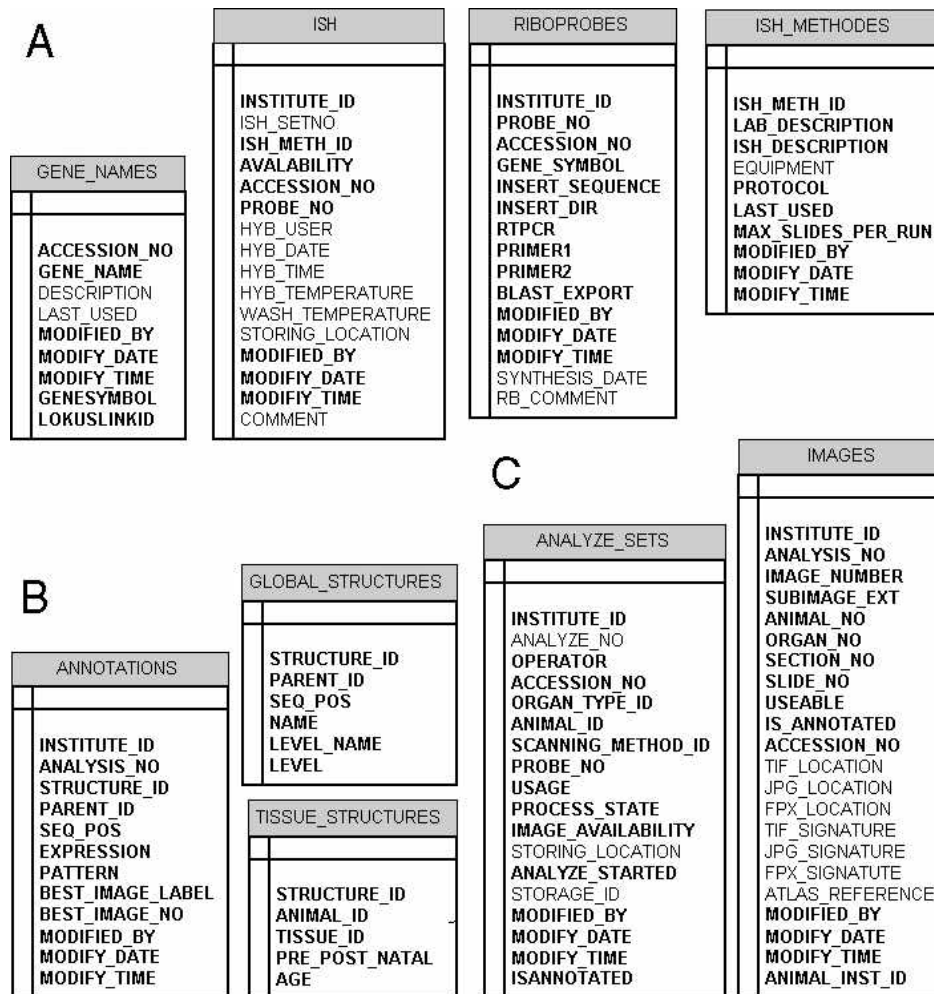


Abb. 3.2: Tabellen des Datenmodells II. (A) Tabellen mit Bezug zu einzelnen Genen, den zugehörigen Ribosonden und den jeweils durchgeführten *in situ*-Hybridisierungen. (B) Tabellen mit Bezug zur Annotation von Expressionsmustern. (C) Tabellen zur Herstellung des Zusammenhangs von Bilddateien und Metadaten. Nähere Erläuterungen im Text.

3.1.2 GenePaint Hybridisierungssystem und Generierung von Bilddaten

Grundlage für die High-Throughput ISH ist die Verwendung von speziell entwickelten Hybridisierungskammern (Abb. 3.3A) in Verbindung mit einem Pipettierroboter (Tecan, Abb. 3.3B), in dem temperierbare Trägergestelle (Abb. 3.3C) eine Hybridisierung bei definierter Temperatur ermöglichen (Herzig et al., 2001).

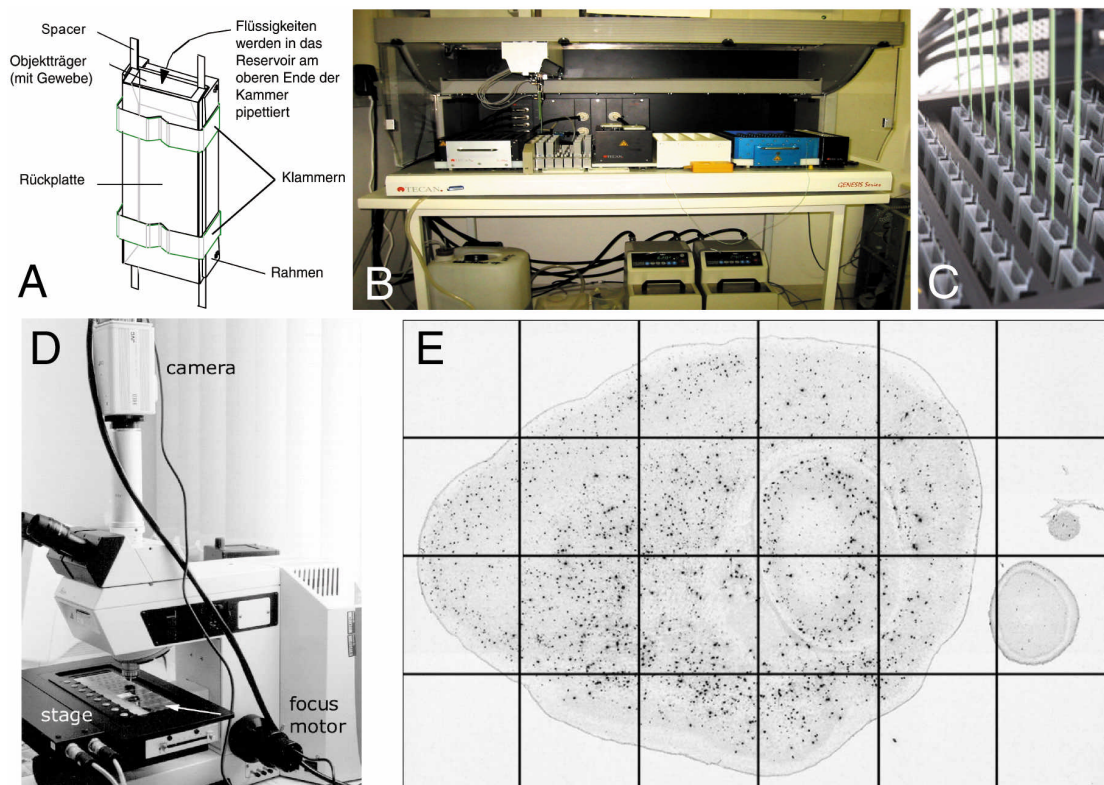


Abb. 3.3: GenePaint Hybridisierungs- und Mikroskopiekomponenten. (A) Hybridisierungskammer. (B) Tecan Genesis Pipettierplattform und -roboter. (C) Temperierbares Trägergestell mit sechs Reihen zu je acht Einzelkammern, die von den Nadeln (grün) des Pipettierroboters befüllt werden können. (D) Digitalkamera mit motorisiertem Objektstisch. (E) Schematische Darstellung eines mosaikförmig zusammengesetzten Gesamtbildes, in diesem Fall ein lateraler Schnitt durch den Cortex eines Gehirns bei P7.

Zur Digitalisierung der Bilddaten wird ein Mikroskop verwendet, das mit einer Digitalkamera und einer motorisierten Bühne ausgestattet ist (Abb. 3.3D). Durch spezielle Steuerungs- und Bildbearbeitungssoftware (Frank Sieckmann, Essen) wird jedes Präparat in zahlreichen Einzelaufnahmen fotografiert, anschließend werden die Einzelaufnahmen zu einem Gesamtbild zusammengesetzt (schematisch gezeigt in Abb. 3.3E; vgl. Visel et al., 2003).

Eine typische Konfiguration zum Erfassen von Bilddaten von E14.5 Embryonen bei einer Auflösung von $1,6 \mu\text{m}/\text{Pixel}$ erfordert 195 Einzelaufnahmen von je 500×668 Pixel bei 24 Bit Farbtiefe. Die Einzelaufnahmen im BMP-Format werden anschliessend automatisch zusammengesetzt. Nach dem Umwandeln in das TIFF-Format und Entfernen leerer, überstehender Randbereiche hat die resultierende Datei für einen einzigen Schnitt typischerweise eine Größe von 50-150 MB.

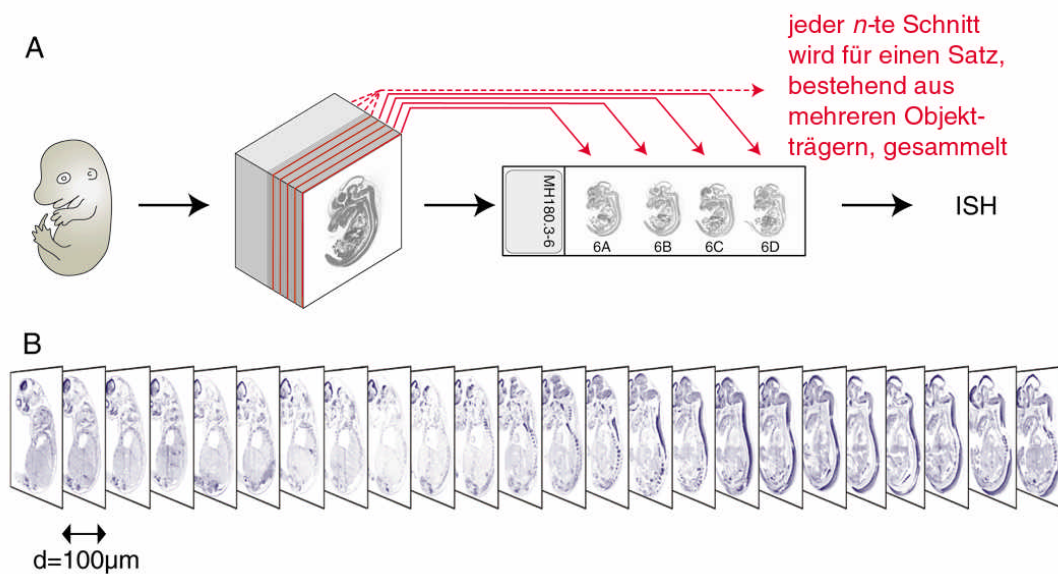


Abb. 3.4: Typischer Umfang der Bilddaten für einen E14.5 Embryo. (A) Nach der Einbettung wird der Embryo geschnitten. Dabei werden die Schnitte aus einem Embryo alternierend auf mehrere Serien von Objektträgern verteilt, die mit jeweils unterschiedlichen Genen hybridisiert werden. (B) Bei einer Schnittstärke von $20\ \mu\text{m}$ und alternierender Verteilung auf fünf Schnittsets haben die einzelnen Schnitte einen Abstand von $100\ \mu\text{m}$. Ein typischer Datensatz für einen E14.5 Embryo umfasst sechs Objektträger mit je vier Schnitten, insgesamt also 24.

Die TIFF-Dateien werden archiviert und dienen als Grundlage für die Herstellung von FPX-Dateien zur Verwendung durch den Zoomserver (vgl. Abschnitt "Benutzung des Zoom Viewers") sowie von sog. Thumbnail-Dateien im JPG-Format. Die Bilddaten für einen kompletten Datensatz eines E14.5 Embryos (Abb. 3.4) umfassen gewöhnlich 1,5-3 GB.

3.1.3 Metadaten

Jeder Datensatz in GenePaint.org besteht neben den Bilddaten aus den zugehörigen experimentellen Metadaten. Die wichtigsten dieser Daten sind neben der "GenePaint Set ID", die eine eindeutige Bezeichnung für den jeweiligen Datensatz darstellt (z.B. MH99), der Name und das Symbol des Gens, seine Accession-Nummer in GenBank, die Sequenz der Ribosonde, die Hybridisierungs- und Waschttemperaturen, und Angaben zum verwendeten Präparat wie Entwicklungsstadium, Schnittrichtung und -parameter. Die Bezeichnungen für Gennamen und -symbole orientieren sich an der von NCBI betriebenen LocusLink-Datenbank (Pruitt und Maglott, 2001) und der Mouse Genome Database (Blake et al., 2003), deren Nomenklatur den Regeln des International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice (Maltais et al., 2002) entspricht.

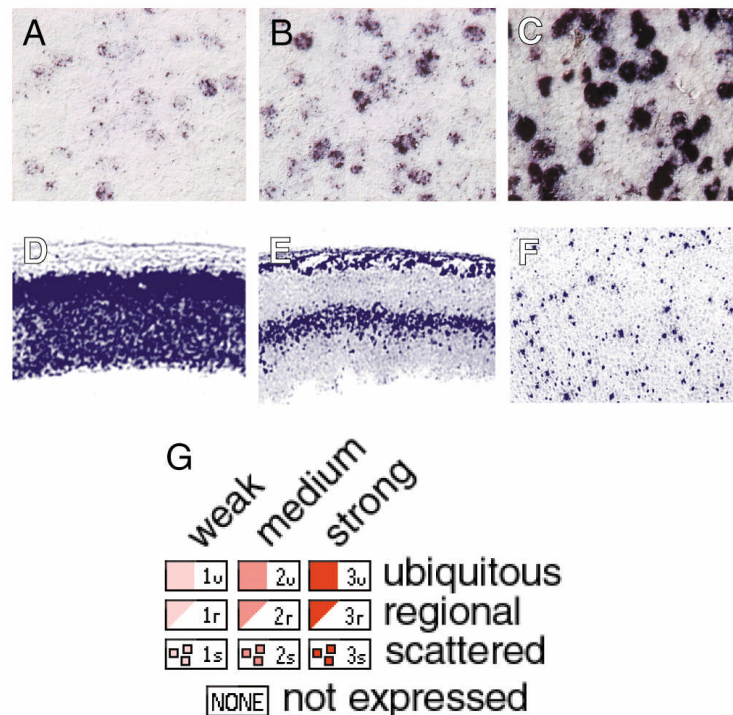


Abb. 3.5: Annotation von Expressionsmustern. (A-C) Beispiele für schwache, mittlere und starke Expression. (D-F) Beispiele für ubiquitäre, regionale und gestreute Expression aus GenePaint-Datensätzen MH224, MH428 und HB244. (D) Der Transkriptionsfaktor *Foxg1* ist bei E14.5 im Cortex ubiquitär, d.h. in allen Schichten exprimiert. (E) Die Expression des Chemokin-Liganden *Cxcl12* im sich entwickelnden Cortex bei E14.5 wird als regional bezeichnet, da sie auf die intermediäre Schicht und die Marginalzone beschränkt ist. (F) Neuropeptid Y (*Npy*) ist im adulten Cortex auf eine Subpopulation von Zellen beschränkt und wird als gestreut (*scattered*) bezeichnet. (G) In GenePaint verwendete graphische Symbole für die Annotation von Expressionsstärke und -muster.

3.1.4 Annotation von Expressionsmustern

Für die Annotation von Expressionsmustern wurde eine Strategie gewählt, bei der für jeden einzelnen Datensatz anhand einer hierarchisch gegliederten Liste von ca. 100 anatomischen Strukturen (Abb. 3.6) die jeweilige Expressionsstärke und das lokale Verteilungsmuster der exprimierenden Zellen manuell erfasst wird. Hinsichtlich der Expressionsstärke (Abb. 3.5A-C) wird dabei zwischen schwacher (*weak*), mittlerer (*medium*) und starker (*strong*) Expression unterschieden. Diese Einteilung erfolgt nach der Menge von Farbstoffpräzipität, welche in der chromogenen Detektionsreaktion in den einzelnen Zellen gebildet wird. Das lokale Expressionsmuster (Abb. 3.5D-F) wird in die Kategorien ubiquitär (*ubiquitous*), regional und gestreut (*scattered*) unterschieden. Ubiquitär bedeutet in diesem Zusammenhang, dass alle Teilbereiche einer Struktur und die überwiegende Mehrzahl aller Zellen ein Gen exprimieren. Regionale Expression ist auf Teilbereiche der zu annotierenden anatomischen Struktur beschränkt, während andere Teilbereiche das Gen nicht exprimieren. Bei gestreuter Expression exprimieren nur wenige, jeweils einzeln liegende Zellen das Gen, während die Mehrzahl aller Zellen in der entsprechenden anatomischen Struktur das Gen nicht exprimiert.

I	Nervous System (and sensory organs)	II.G	Palatal Shelf
I.A	Central Nervous System	II.H	Pharynx
I.A.1	Telencephalon	II.I	Oesophagus
I.A.1.a	Cerebral Cortex	II.J	Stomach
I.A.1.a.i	Neocortex	II.K	Liver
I.A.1.a.ii	Olfactory Cortex	II.L	Pancreas
I.A.1.a.ii.1	Olfactory Bulb	III	Respiratory System
I.A.1.a.ii.2	Piriform Cortex	III.A	Pharynx
I.A.1.a.iii	Hippocampus	III.B	Larynx
I.A.1.b	Basal Ganglia	III.C	Trachea
I.A.1.b.i	Corpus Striatum (Caudate + Putamen)	III.D	Main Bronchus
I.A.1.b.ii	Ventral Striatum (Olfactory Tubercle, N.Accumbens)	III.E	Lung
I.A.1.b.ii.1	Globus Pallidus	IV	Genito-Urinary System
I.A.1.b.iii	Basal Forebrain	IV.C	Kidney
I.A.1.b.iv	Amygdala	IV.D	Ureter
I.A.1.b.v	Septum	IV.E	Bladder
I.A.2	Diencephalon	IV.F	Urethra
I.A.2.a	Thalamus	IV.G	Reproductive System
I.A.2.b	Hypothalamus	IV.G.1	Genital Tubercle
I.A.4	Mesencephalon (Midbrain)	IV.G.2	Gonads
I.A.4.a	Pretectum	V	Endocrine System
I.A.4.b	Superior Colliculus	V.A	Thyroid
I.A.4.c	Inferior Colliculus	V.B	Pituitary
I.A.4.d	Tegmentum	V.C	Pancreas
I.A.5	Rhombencephalon (Hindbrain)	V.D	Adrenal Gland
I.A.5.b	Cerebellum	V.E	Neurohypophysis
I.A.5.c	Pons	VI	Cardiovascular System
I.A.5.d	Medulla Oblongata	VI.B	Heart
I.A.6	Spinal Cord	VI.B.1	Atrium
I.A.7	Other	VI.B.2	Ventricle
I.A.7.a	Choroid Plexus	VI.C	Arterial System
I.A.7.b	Meninges	VI.D	Red Bone Marrow
I.B	Peripheral Nervous System	VII	Immune System
I.B.1	Cranial Ganglia	VII.A	Spleen
I.B.2	Dorsal Root Ganglia	VII.B	Thymus primordium
I.B.3	Parasympathetic Ganglia	VIII	Muscle and Bone, Limbs and Appendages
I.C	Eye	VIII.A	Skeleton
I.C.2	Retina	VIII.B	Vertebral Axis Muscle System
I.C.3	Lens	VIII.D	Face / Soft Tissues
I.C.4	Cornea	VIII.E	Face / Bone
I.C.5	Optic Nerve	VIII.G	Skull (Base + Vault)
I.D	Nose	VIII.H	Axial Skeleton
I.D.1	Olfactory Epithelium	VIII.I	Tail
I.E	Ear	VIII.K	Forelimb
I.E.2	Inner Ear	VIII.L	Hindlimb
I.E.2.a	Organ of Corti	IX	Integuments
I.E.2.b	Vestibular Component	IX.B	Skin
I.E.3	Middle Ear	IX.C	Hair
II	Digestive System	IX.C.1	Whisker Follicle
II.C	Intestine	IX.C.2	Hair Follicle
II.D	Salivary Glands		
II.E	Tongue		
II.F	Teeth		

Abb. 3.6: Hierarchisches Verzeichnis der anatomischen Strukturen. Die zu annotierenden anatomischen Strukturen sind hierarchisch entsprechend den entwicklungsbiologischen, physiologischen und funktionellen Zusammenhängen gegliedert. Die Bezeichnungen und die Gliederung (erstellt in Zusammenarbeit mit G. Alvarez-Bolado) orientieren sich dabei an einer vereinfachten Version des Mouse Atlas Project (Bard et al., 1998).

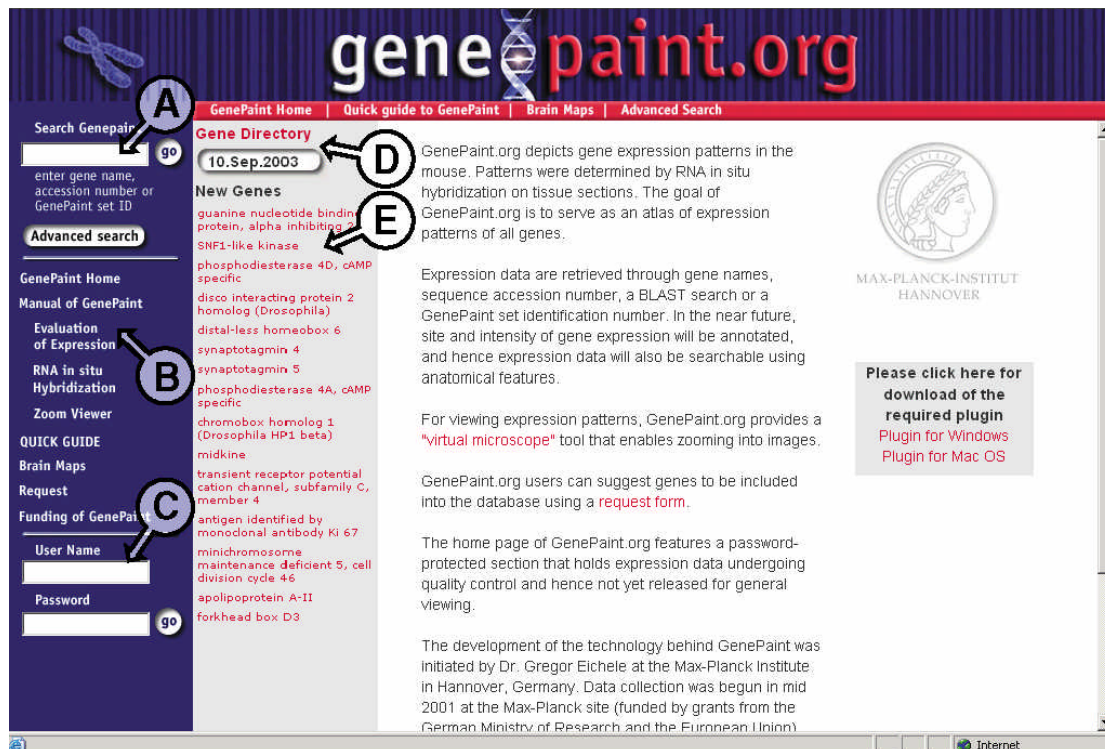


Abb. 3.7: Eingangsseite von GenePaint.org. (A) Eingabefeld zur direkten Suche in der Datenbank und Link zur ausführlicheren Query-Seite. Das Eingabefeld hat dieselbe Funktionalität wie die Text-Suche auf der Query-Seite. (B) Links zu verschiedenen Informationen für Benutzer, darunter ein ausführliches Benutzermanual, eine Kurzreferenz (Quickguide), annotierte Karten von Standardschnitt-ebenen des Gehirns (Brains Maps) und ein Formular für Anfragen (Request). (C) Zugang zu geschützten Bereichen der Datenbank für Eingabe und Bearbeitung neuer Daten. (D) Zugang zum "Gene Directory", einer vollständigen Liste aller verfügbaren Datensätze. (E) Zuletzt hinzugefügte Datensätze.

Während des Annotationsprozesses wird entsprechend der genannten Einteilung jeder Struktur ein Symbol zugeordnet, das sowohl Expressionsstärke wie auch lokales Expressionsmuster bezeichnet (Abb. 3.5G). Für Strukturen, in denen keine Expression vorliegt, kann dies explizit als "not expressed" vermerkt werden.

Das annotierte Expressionsmuster bezieht sich jeweils auf einen kompletten Datensatz, der mehr als zwanzig Einzelschnitte umfassen kann (Abb. 3.4B), deshalb kann für jede annotierte Struktur ein Referenzschnitt angegeben werden, um das spätere Auffinden der entsprechenden Struktur zu erleichtern.

3.1.5 Web-Interface

Alle Funktionen für Dateneingabe und -verwaltung (mit Ausnahme der Übertragung von Bilddaten zum Server) sowie alle öffentlich zugänglichen Bereiche sind per Internet mit Standard-Webbrowsern (beispielsweise Internet Explorer) zu verwenden. Eine Benutzerregistrierung ist nur für die Eingabe von Daten und die Arbeit an vorläufigen Datensätzen im nichtöffentlichen Bereich der Datenbank notwendig. Die Eingangsseite von GenePaint.org

bietet die Möglichkeit zu einfachen Suchanfragen, Zugang zum Benutzermanual und weiteren Teilen der Datenbank (Abb. 3.7).

3.1.6 Suche nach bestimmten Genen

Eine Gesamtübersicht über alle verfügbaren Datensätze wird mit dem "Gene Directory" bereitgestellt, das über die Eingangsseite zugänglich ist (ohne Abbildung). Es handelt sich dabei um eine Liste aller Gene, für die Datensätze in GenePaint.org vorhanden sind. In jeder Zeile der Tabelle sind die relevanten Informationen zu einem Gen zusammengefaßt und es ist ein direkter Zugriff auf die jeweiligen Datensätze sowohl innerhalb von GenePaint.org wie auch auf die zugehörigen Einträge in den externen Datenbanken GenBank (Benson et al., 2003) und LocusLink (Pruitt und Maglott, 2001) möglich.

Es stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, um GenePaint.org gezielt nach Datensätzen von Interesse zu durchsuchen.

Eine textbasierte Suche nach Bestandteilen von Gennamen, -abkürzungen, Accession-Nummern, LocusLink- und GenePaint-ID ist sowohl von der Eingangsseite wie auch über das "Text Search" Feld der "Query"-Seite möglich. Dabei können mehrere Suchargumente über Boolesche Operatoren ("AND", "OR" sowie Verwendung von Klammern) kombiniert werden.

Eine zweite Möglichkeit ist die Suche nach bestimmten Expressionsmustern (Abb. 3.8B). Das entsprechende Auswahlwerkzeug kann über den "Open"-Knopf im Abschnitt "Expression Pattern Search" aktiviert werden. Im Auswahlfenster (ohne Abbildung) können dann eine oder mehrere Strukturen aus dem anatomischen Katalog gewählt werden. Jeder Struktur wird ein Expressionsmuster und eine Expressionsstärke zugeordnet. Aufgrund der hierarchischen Organisation des Kataloges kann zwischen einer stringenten und einer toleranten Suchstrategie gewählt werden. Dabei muß für die stringente Suchstrategie die gesuchte Struktur exakt die definierten Bedingungen erfüllen, während bei der toleranten Suchstrategie entweder die Struktur selber oder eine der annotierten Unterstrukturen die Bedingungen erfüllen muß.

Eine dritte Möglichkeit ist die sequenzbasierte Suche. Dabei kann eine Suchsequenz in das entsprechende Feld der "Query"-Seite (Abb. 3.8C) gegeben werden, die über eine BLAST-Suche (Altschul et al., 1997) mit dem BlastN-Algorithmus mit allen in GenePaint.org vorhandenen SONDENSEQUENZEN verglichen wird.

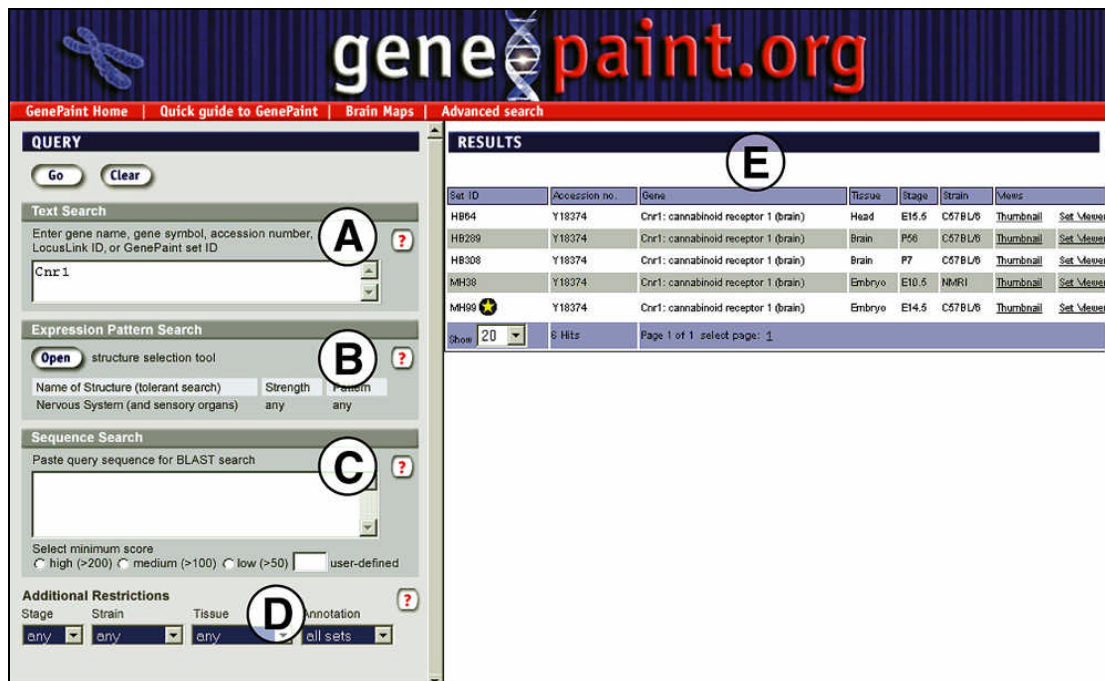


Abb. 3.8: Suchfunktionen und Anzeige von Suchergebnissen auf der “Query and Results”-Seite. (A) Direkte Textsuche innerhalb der Datenbank, (B) Suche nach annotierten Expressionsmustern, (C) Eingabefeld für sequenzbasierte BLAST-Suchen in den Ribosondendaten, (D) übergeordnete Einschränkungen für die drei Suchstrategien A-C, (E) Anzeige von Datensätzen, die den Suchbedingungen entsprechen.

Alle drei beschriebenen Arten von Suchanfragen können mit zusätzlichen Filteroptionen auf Teilmengen der Datensätze im Hinblick auf das entsprechende Alter/Entwicklungsstadium, den Mausstamm, das Präparat oder den Annotationsstatus beschränkt werden (Abb. 3.8D).

Die Ergebnisse jeder der beschriebenen Suchmöglichkeiten werden in Form einer Tabelle im rechten Bereich derselben Seite (“Results”, Abb. 3.8E) angezeigt. Dabei entspricht jede Zeile einem Datensatz und enthält die entsprechende GenePaint Set ID, GenBank Accession, Genesymbol und –name, sowie Metadaten zum Präparat. Jeder einzelne der angezeigten Datensätze kann durch die Funktionen “Thumbnail” oder “Set Viewer” im Detail aufgerufen werden.

3.1.7 Anzeige von Datensätzen

Für die Anzeige vollständiger Datensätze stehen zwei Funktionen zur Verfügung: Der “Thumbnail Viewer” (ohne Abbildung) besteht aus verkleinerten Versionen der zu einem Set gehörigen Bilddaten und bietet einen schnellen Überblick.

Eine ausführlichere Ansicht steht mit dem “Set Viewer” (Abb. 3.9) zur Verfügung, der in einer Seite die wichtigsten zu einem Datensatz gehörenden Metadaten, eine Liste der zur Verfügung stehenden Bilddaten sowie gegebenenfalls das annotierte Expressionsmuster anzeigt.

Im Bereich “Info Box” (Abb. 3.9A) werden Metadaten zum jeweiligen Gen, zu Sonde und Hybridisierungsbedingungen und zum Präparat angezeigt. Dabei stehen wiederum direkte Links zu den zugehörigen Einträgen in GenBank und LocusLink zur Verfügung. Über die Sondennummer können auf einer weiteren Seite (ohne Abbildung) Details zur Ribosonde, darunter die vollständige Sequenz des codierenden cDNA-Strangs angezeigt werden.

Zu jedem Datensatz gehört eine Anzahl von hybridisierten Schnitten in unterschiedlichen Ebenen, von denen jeweils einer in verkleinerter Form angezeigt wird (Abb. 3.9B). Das Blättern innerhalb der Bilddaten eines Datensatzes ist entweder über die Pfeiltasten möglich oder durch direkte Anwahl eines Schnittes in der Liste aller verfügbaren Schnitte (Abb. 3.9C), in der auch die jeweilige Position des Schnittes aufgeführt ist, was den Vergleich mit anatomischen Standardatlanten erleichtert. Für annotierte Schnittsets wird in einem weiteren Bereich der Seite (Abb. 3.9D) in Form eines hierarchischen, expandierbaren Diagramms die Annotation unter Verwendung der Annotationssymbole (Abb. 3.5G) angezeigt. Hinter dem Namen jeder Struktur wird die Nummer des jeweiligen Referenzschnittes angezeigt; bei Aktivierung wird der jeweilige Schnitt als aktueller Schnitt gewählt.

The screenshot displays the GenePaint.org interface. At the top, the logo 'gene paint.org' is visible. Below it, a navigation bar contains links for 'GenePaint Home', 'Quick guide to GenePaint', 'Brain Maps', and 'Advanced Search'. The main content area is divided into several sections:

- Info Box (A):** Contains metadata for the dataset:
 - GENEPAINT Set ID: MH99
 - Gene: Cnr1: cannabinoid receptor 1 (brain)
 - Description: cannabinoid receptor 1 (brain); CB1, CB>1<
 - Accession number: GenBank Y18374
 - LocusLink ID: LocusLink 12801
 - RNA probe: 32
 - Orientation: Antisense
 - Hybridization Temp.: 64.0
 - Washing Temp.: 64.0
 - Stage: E14.5
 - Strain: C57BL/6
 - Sectioning Plane: sagittal
 - Resolution: 3.2 µm/pixel (5x objective)
 - Date of Dissection: 31.Oct.2001
 - Time of Dissection: 13:50
- Image Directory (C):** A table listing available image slices:

in Viewlist	Label	Position
<input checked="" type="checkbox"/>	Embryo_MH180_3_1A	0.000
<input checked="" type="checkbox"/>	Embryo_MH180_3_1B	0.100
<input checked="" type="checkbox"/>	Embryo_MH180_3_1C	0.200
<input checked="" type="checkbox"/>	Embryo_MH180_3_1D	0.300
<input checked="" type="checkbox"/>	Embryo_MH180_3_2A	0.400
<input checked="" type="checkbox"/>	Embryo_MH180_3_2B	0.500
<input checked="" type="checkbox"/>	Embryo_MH180_3_2C	0.600
<input checked="" type="checkbox"/>	Embryo_MH180_3_2D	0.700
<input checked="" type="checkbox"/>	Embryo_MH180_3_3A	0.800
<input checked="" type="checkbox"/>	Embryo_MH180_3_3B	0.900
- Annotation (D):** A hierarchical tree structure showing anatomical regions:
 - Nervous System (and sensory organs) see(5D)
 - Central Nervous System
 - Telencephalon see(5D)
 - Diencephalon see(5A)
 - Thalamus see(5A)
 - Hypothalamus see(5A)
 - Mesencephalon (Midbrain) see(5A)
 - Preteclum see(6B)
 - Superior Colliculus see(5A)
 - Inferior Colliculus see(5A)
 - Tegmentum see(6B)
 - Rhombencephalon (Hindbrain) see(5A)
 - Cerebellum see(5A)

Abb. 3.9: Ansicht eines Datensatzes im “Set Viewer” (A) Infobox mit Metadaten zu Gen, Ribosonde, Hybridisierungsbedingungen und Präparat, (B) verkleinerte Ansicht des aktuell gewählten Schnittes und Zugang zum Zoom Viewer, (C) Liste aller im Datensatz zur Verfügung stehenden Schnitte, (D) Annotation des Expressionsmusters anhand des hierarchischen Katalogs anatomischer Strukturen.

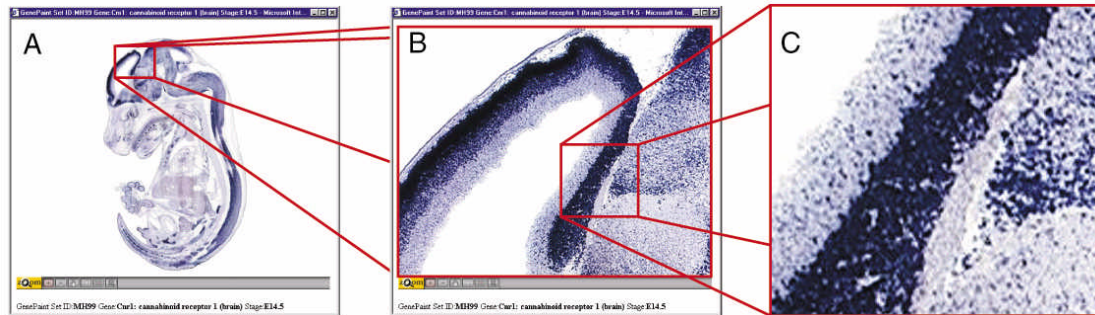


Abb. 3.10: Benutzung des Zoom Viewers (A) Ein Schnitt durch einen Embryo wurde im Set Viewer ausgewählt und im Java-basierten Zoom Viewer geöffnet. Durch Anwählen eines beliebigen Bildausschnitts wird eine vergrößerte Ansicht des entsprechenden Bereichs mit höherer Auflösung angezeigt. (B) Über mehrere Zwischenstufen wird schließlich die Originalauflösung gezeigt, bei welcher der Schnitt digitalisiert wurde. (C) Vergrößerter Teilausschnitt der in B dargestellten maximalen Vergrößerung ohne zusätzliche Bildbearbeitung. Es können Einzelzellen unterschieden werden.

3.1.8 Benutzung des Zoom Viewers

Die primär erstellten Bilddateien einzelner Schnitte können im TIFF-Format eine Größe von über 100 MB erreichen, und auch unter Verwendung von Kompressionsalgorithmen wie dem JPEG-Format liegen typische Dateigrößen bei 5-10 MB pro Einzelschnitt. Dateien in dieser Größenordnung lassen sich gegenwärtig nur mit erheblichem Zeitaufwand über das Internet übertragen und stehen damit einem raschen Zugriff auf hochauflösende Primärbilddaten entgegen. Daher wird in GenePaint.org für jeden Einzelschnitt eine Datei im FlashPix (FPX)-Format generiert. Es handelt sich dabei um ein Speicherformat, das mehrere grafische Auflösungsstufen in einer einzigen Datei zusammenfasst. Durch Verwendung geeigneter Server ("Zoomserver")- und gegebenenfalls Client ("Zoom Viewer")- Programme (www.isee-media.com) wird von einem hochauflösenden Bild nur die jeweils vom Benutzer benötigte Auflösung des Gesamtbildes oder eines Teilausschnittes generiert und über das Netzwerk übertragen. Durch Auswahl beliebiger Teilausschnitte eines Bildes wird vom Zoomserver ein höher auflösendes Bild des entsprechenden Ausschnittes generiert und übertragen. Auf diese Weise kann der Benutzer jeden beliebigen Bereich eines hybridisierten Schnitts bis hin zur maximalen Auflösung vergrößern.

Es stehen drei verschiedene Möglichkeiten zur Benutzung der Zoom-Funktion zur Verfügung, die im Set Viewer durch die entsprechenden Auswahlknöpfe für den jeweils aktuellen Schnitt oberhalb der Schnittliste (Abb. 3.9C) gewählt werden können. Der HTML-Viewer generiert eine Standard-Webseite, die mit allen gebräuchlichen Webbrowsern kompatibel ist. Der Applet- (Abb. 3.10) und Plugin-Viewer basieren auf einem Java-Applet, bzw. auf einem lokal zu installierenden Plugin, das von der GenePaint.org-Seite heruntergeladen werden kann. Diese beiden Viewer sind nur mit den gebräuchlichsten Client-Systemen kompatibel, stellen

aber komfortablere Funktionen wie direkte Ausschnittswahl, stufenloses horizontales Verschieben und ein “Lupen”-Werkzeug zur Verfügung.

Es ist möglich, ein gesamtes Bild als hochauflösende JPEG-Datei herunterzuladen, der entsprechende Zugang befindet sich mit dem “i”-Knopf auf der HTML-Viewer-Seite.

3.2 Expressionsmuster aller Adenylatcyclasen

Die Expressionsmuster aller neun membrangebundenen Adenylatcyclasen wurden durch ISH in E14.5 Embryonen und im postnatalen (P7) und erwachsenen (P56) Gehirn untersucht. Nachfolgend werden zunächst die Muster von zwei Isoformen, Adcy4 und Adcy7, beschrieben, die überwiegend in nicht-neuronalem Gewebe exprimiert sind. Anschließend konzentriert sich die vergleichende Expressionsanalyse auf Strukturen des ZNS, in denen mehrere Isoformen gleichzeitig exprimiert werden, darunter Neocortex, Hippocampus, Bulbus olfactorius, Thalamus, Corpus striatum, sowie embryonales Rückenmark und Mittelhirndach.

3.2.1 Adcy4- und Adcy7-Expression in nicht-neuronalem Gewebe

Adcy4 wird in Neuronen des Gehirns nicht oder nur sehr schwach exprimiert (Abb. 3.11D-G). Jedoch ist in allen untersuchten Gehirnregionen Expression im Vaskularsystem des Gehirns vorhanden (Abb. 3.11F,G). In Übereinstimmung mit diesem Signal, welches vermutlich in Endothelzellen lokalisiert ist, wird Adcy4 im embryonalen Endokard und in den Blutgefäßen des Myokards exprimiert (Abb. 3.11C). Ein ähnliches Signal in den Blutgefäßen wird für keine andere Isoform beobachtet, was ein durch die Detektionsmethode verursachtes Artefakt ausschließt.

Um die Möglichkeit einer Kreuzhybridisierung mit Nicht-Adenylatcyclasen-mRNAs zu überprüfen, wurde eine zweite Ribosonde für Adcy4 hergestellt. Diese Sonde, als Adcy4b bezeichnet, deckt einen anderen Teilbereich der Adcy4-mRNA ohne Überschneidungen mit Sonde Adcy4 ab. Die Ergebnisse der ISH sind identisch (Abb. 3.11D-G).

Adcy7 ist allgemein nicht oder nur sehr schwach im Gehirn exprimiert, sowohl im Embryo (Abb. 3.11A) wie auch in späteren Stadien. Diese Abwesenheit von Signal ist jedoch nicht die Folge einer grundsätzlich wenig sensitiven Sonde, da im Embryo starkes spezifisches Signal in der Leber und mehreren weiteren Organen außerhalb des ZNS beobachtet wird, darunter Lunge und Niere (Abb. 3.11A,B).

3.2.2 Schichtspezifische Expression von Adcy1 und Adcy5 im embryonalen Cortex

An Embryonaltag 14.5 besteht der sich entwickelnde Neocortex von innen nach außen aus Ventrikulär- und Subventrikulärschicht, Intermediärschicht, Subplatte, Corticalplatte und Marginalzone. Neuronen werden in der Ventrikulärzone geboren, migrieren während der anschließenden Cortextentwicklung in radialer Richtung nach außen in die Corticalplatte und beenden ihre Wanderung schließlich, nachdem sie durch die zuvor generierte corticale Schicht hindurchgewandert sind (vgl. Abb. 1.3).

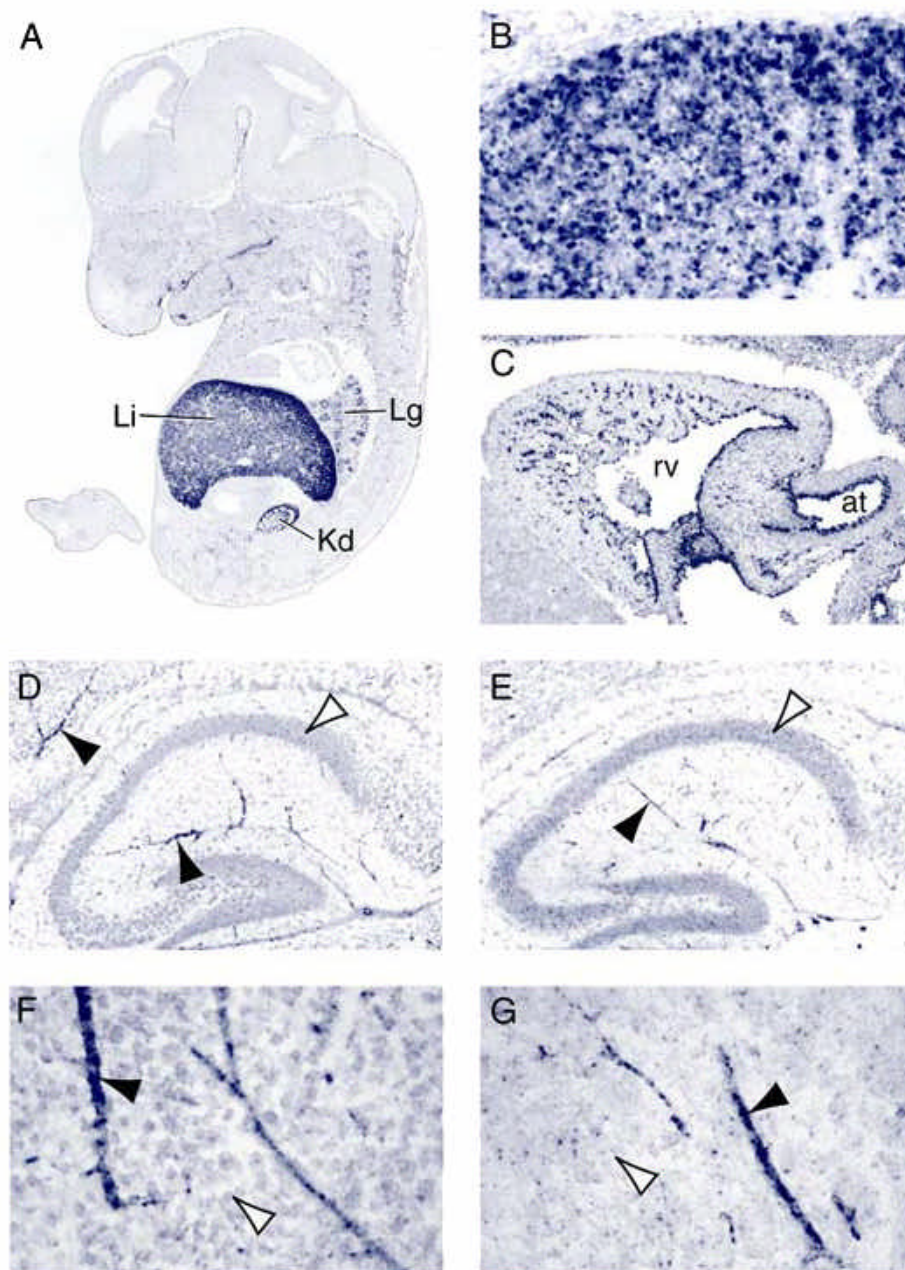


Abb. 3.11: Expression von Adcy7 und Adcy4 in nicht-neuronalen Geweben. (A,B) Expression von Adcy7 in einem Sagittalschnitt eines E14.5-Embryos. (A) Im ZNS ist keine Adcy7-Expression vorhanden. Adcy7 ist jedoch in zahlreichen peripheren Organen exprimiert, darunter die Leber, die Lunge und die Niere. (B) In der Leber ist die Expression von Adcy7 auf eine Subpopulation von Zellen beschränkt. (C-G) Adcy4 wird im Blutgefäßsystem exprimiert. (C) Adcy4-Expression im Herz eines E14.5-Embryos. Die Expression ist auf das Endocard und die Gefäße des Myocards beschränkt. (D,E) Hippocampus und (F,G) Thalamus bei P7, hybridisiert mit der Ribosonde Adcy4 (D,F) oder der zweiten, nicht-überlappenden Ribosonde Adcy4b (E,G). Starke Expression von Adcy4 beschränkt sich auf das Gefäßsystem (schwarze Pfeile). Wie in anderen Gehirnregionen (ohne Abbildung) exprimieren die Neuronen des Hippocampus und Thalamus Adcy4 nicht oder nur sehr schwach (weisse Pfeile). Li - Leber, Lg - Lunge, Kd - Niere, rv - Lumen des rechten Herzventrikels, at - Aortenstamm (Ausflusstrakt des linken Ventrikels).

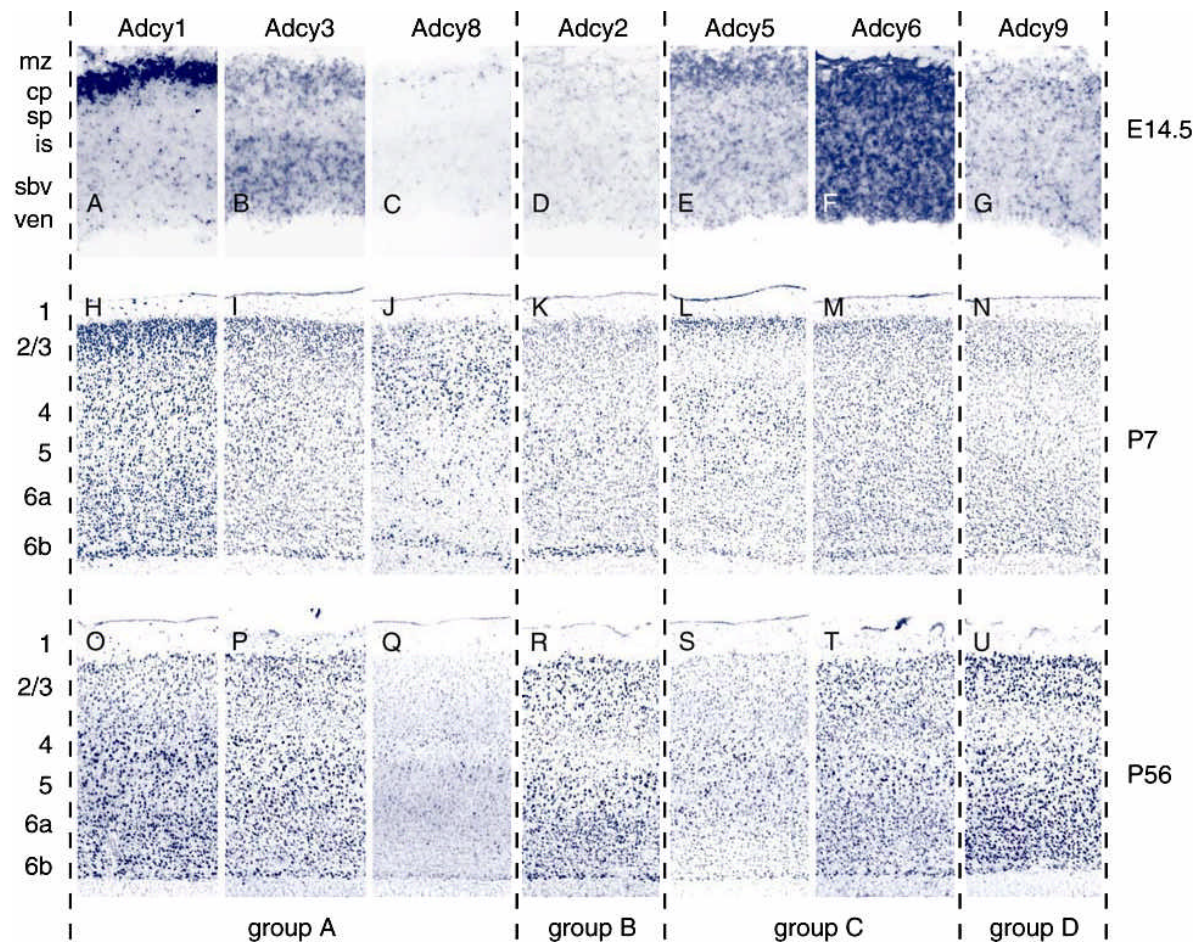


Abb. 3.12: Schichtspezifische Expression der Adenylatcyclasen im Cortex. (A-G) Expressionsmuster in sagittalen Schnitten des Cortex bei E14.5 (H-N) Expressionsmuster in sagittalen Schnitten des Gehirns an P7. (O-U) Expressionsmuster in sagittalen Schnitten des erwachsenen Gehirns. Ausführliche Beschreibung im Text. mz – Marginalzone, cp – Corticalplatte, sp – Subplatte, is – Intermediärschicht, sbv – Subventrikulärzone, ven - Ventrikulärzone, 1, 2/3, 4, 5, 6a, 6b - Schichten des postnatalen Cortex. Eine vergrößerte Ansicht der Abbildung befindet sich in Appendix 1.

Bei E14.5 weist Adcy1 (Gruppe A) von allen Isoformen die räumlich am stärksten eingeschränkte Expression auf. Sie ist auf den dorsalen Bereich der Corticalplatte beschränkt, während kein Signal in der Intermediär- und Ventrikulärzone beobachtet wird (Abb. 3.12A). Das zweite Mitglied von Gruppe A, Adcy3, wird in der Corticalplatte bei mittlerer Intensität exprimiert und etwas stärker in der Ventrikulärzone, wobei die Intermediärzone eine Lücke zwischen diesen beiden Expressionsorten darstellt (Abb. 3.12B). Adcy8 (Gruppe A) wird nur schwach in wenigen, verstreuten Zellen in der Corticalplatte exprimiert (Abb. 3.12C). Adcy2 (Gruppe B) wird generell nur schwach exprimiert (Abb. 3.12D). Beide Mitglieder von Gruppe C, Adcy5 und Adcy6, werden in allen Schichten auf mittlerem bis hohem Niveau exprimiert, wobei die Expression von Adcy5 in der Corticalplatte am stärksten ist (Abb. 3.12E,F). Adcy9 (Gruppe D) wird in allen Schichten mit mittlerer Intensität exprimiert (Abb. 3.12G). Für keine der neun Isoformen werden offensichtliche rostrocaudale oder mediolaterale Verteilungsgra-

dienten oder verstärkte Expression in bestimmten funktionellen Regionen des sich entwickelnden Cortex beobachtet.

Bei P7 und im adulten Gehirn besteht der größte Teil des Cortex aus den sechs Corticalschichten 1-6, wobei in den Schichten 2 bis 6a die neuronalen Zellkörper residieren, die während der vorangegangenen Entwicklung die Ventrikulärzone verlassen haben und sich von innen nach außen angesiedelt haben. Am postnatalen Tag 7 ist das zwischenneuronale Verbindungsnetzwerk des Cortex noch nicht ausgereift, sondern wird noch entwickelt und verfeinert. Es ist daher zu erwarten, dass das Expressionsprofil der einzelnen Isoformen sich vom adulten Cortex unterscheidet, in welchem die neuronalen Verbindungen gefestigt sind.

Alle Isoformen mit Ausnahme von Adcy8 sind sowohl bei P7 als auch im adulten Cortex in mehreren Schichten mindestens auf mittlerem, teilweise auf hohem Niveau exprimiert (Abb. 3.12H-U). Es gibt jedoch, spezifisch für jede Isoform, deutliche Unterschiede in der relativen Expressionsintensität der einzelnen Schichten.

Bei P7 (Abb. 3.12H-N) wird in Schicht 1 nur Adcy1 (Gruppe A) in einzelnen, verstreuten Zellen in Schicht 1 exprimiert, die aufgrund ihrer Größe, Lokalisierung und Dichte Cajal-Retzius-Zellen sein könnten. Adcy1-, Adcy3- (beide Gruppe A), Adcy5- und Adcy6- (beide Gruppe C) positive Zellen sind in Schicht 2/3 nicht gleichmäßig verteilt, sondern ganz überwiegend im direkt an Schicht 1 angrenzenden Bereich lokalisiert. Bemerkenswerterweise sind dies auch die Neuronen, die zuletzt ihren finalen Bestimmungsort im Cortex erreicht haben. Dieses Expressionsmuster steht im Gegensatz zu Adcy8 (A), welche ebenfalls in Schicht 2/3 exprimiert ist, sich dabei jedoch auf eine kleinere Subpopulation von Zellen beschränkt, die ein zu Adcy1, Adcy3, Adcy5 und Adcy6 gegenläufiges Verteilungsmuster aufweist; am dorsalen Rand von Schicht 2/3 sind nur sehr wenige Adcy8-positive Zellen vorhanden. Adcy2 (B) und Adcy9 (D) werden mit mittlerer Stärke und ohne markantes Verteilungsmuster in Schicht 2/3 exprimiert. In den Schichten 4 bis 6a sind Adcy1, Adcy3 (beide A), Adcy2 (B), Adcy5 und Adcy6 (beide C) weitgehend gleichförmig verteilt. Im Gegensatz dazu sind Adcy8 (Gruppe A, ansteigend von ventral nach dorsal) und Adcy9 (Gruppe D, ansteigend von dorsal nach ventral) in entgegengesetzt verteilten Zellpopulationen exprimiert, wobei Adcy8 auf wenige, stärker verstreute Zellen als Adcy9 beschränkt ist. In Schicht 6b ist die Expression in den meisten Fällen sehr ähnlich wie in Schicht 6a. Eine Ausnahme bilden Adcy8 (A) und Adcy2 (B), die deutlich stärker als in der darüberliegenden Schicht 6a exprimiert sind.

Die auffälligste Veränderung im adulten Cortex (Abb. 3.12O-U) verglichen mit P7 ist die Abwesenheit spezifischer lokaler Verteilungsmuster in Schicht 2/3. Adcy1, Adcy3 (beide A), Adcy5 und Adcy6 (beide C) werden weiterhin exprimiert, die Expression ist jedoch in allen Fällen deutlich schwächer oder, im Falle von Adcy5, kaum detektierbar und von gleichmäßiger Verteilung in Schicht 2/3. Die Expression von Adcy8 (A) ist im adulten Cortex nicht mehr

nachweisbar. In Schicht 4 ist die Expression von Adcy1 (A) stärker als in den angrenzenden Schichten 2/3 und 5, wohingegen Adcy3 (A), Adcy2 (B), Adcy6 (C) und Adcy9 (D) in Schicht 4 deutlich schwächer als in den angrenzenden Schichten exprimiert sind.

3.2.3 Kombinationen von Isoformen in Subregionen des Hippocampus

Im Hippocampus werden vier funktionelle Teilbereiche unterschieden: Die drei Felder des Ammonshorns (*cornu ammonis*, CA1, CA2, CA3) sowie der Gyrus dentatus (Abb. 3.13O). Für mehrere Adenylatcyclasen wurde bereits eine Expression im Hippocampus oder einzelnen seiner Subregionen beschrieben (Xia et al., 1991; Cali et al., 1994; Villacres et al., 1995; Matsuoka et al., 1997; Antoni et al., 1998; Baker et al., 1999; Wong et al., 1999). Mit Ausnahme von Adcy4 und Adcy7 werden alle neun Isoformen in hippocampalen Neuronen sowohl bei P7 wie auch im adulten Gehirn nachgewiesen. Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich jedoch deutlich sowohl in ihrer Expressionsstärke wie auch in ihrer räumlichen Verteilung. Die Expression wurde auf sagittalen Schnitten untersucht (Abb. 3.13A-N) und zusätzlich auf coronalen Schnitten bestätigt (ohne Abbildung). Die Expressionsstärken in allen vier Regionen wurden anhand der Primärdaten bewertet und zum besseren Vergleich in tabellarischer Form zusammengefasst (Abb. 3.13P,Q).

Bei P7 (Abb. 3.13A,C,E,G,I,K,M) werden Adcy3 (Gruppe A), Adcy2 (Gruppe B), Adcy5 und Adcy6 (Gruppe C) mindestens schwach bis mittelstark, Adcy9 (Gruppe D) mittelstark bis stark in allen vier betrachteten Regionen exprimiert. Im Gegensatz dazu ist die Expression von Adcy1 und Adcy8 (beide Gruppe A) räumlich stark eingeschränkt. Adcy1 wird nur in CA2 und im Gyrus dentatus stark exprimiert, wohingegen Adcy8 auf CA1 beschränkt ist. Infolgedessen werden in allen drei CA-Regionen wie auch im Gyrus dentatus spezifische Kombinationen von Isoformen der Gruppe A exprimiert. CA1 ist die einzige Region mit Adcy8-Expression, CA2 und Gyrus dentatus sind die einzigen Regionen mit starker Adcy1-Expression, und in CA3 sind sowohl Adcy1 wie auch Adcy8 abwesend. Bei P7 kann der sich noch entwickelnde Gyrus dentatus weiter in eine äußere und eine innere Schicht unterschieden werden. Während mehrere Isoformen in der äußeren Schicht exprimiert werden, ist in der inneren Schicht einzig Adcy6 (C) vorhanden.

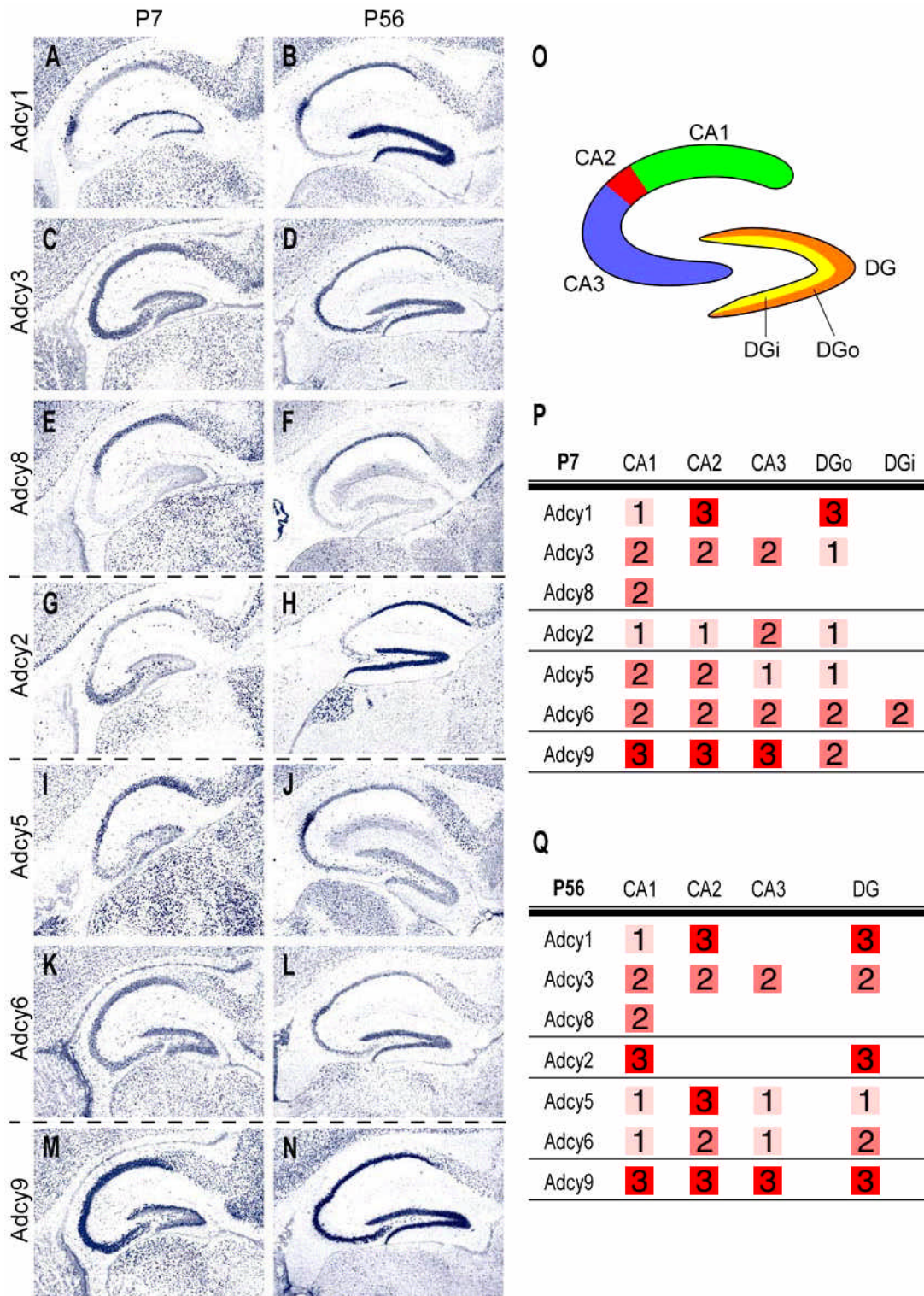


Abb. 3.13: Jede Region des Hippocampus exprimiert eine spezifische Kombination von Adenylyl cyclasen-Isoformen. Expression von Adcy1 (A,B), Adcy3 (C,D), Adcy8 (E,F), Adcy2 (G,H), Adcy5 (I,J), Adcy6 (K,L) und Adcy9 (M,N) in sagittalen Schnitten von P7 (A,C,E,G,I,K,M) und erwachsenem (B,D,F,H,J,L,N) Hippocampus. (O) Schematische Aufteilung des Hippocampus in die wichtigsten funktionellen Regionen, in denen die Expression bewertet wurde. (P,Q) Übersicht der regionspezifischen Kombinationen von Isoformen. CA1, CA2, CA3 - Felder 1, 2 und 3 des Ammons-horns (*Cornu ammonis*), DG - Gyrus dentatus, DGi - innere Schicht des sich entwickelnden Gyrus dentatus, DGo - äußere Schicht des sich entwickelnden Gyrus dentatus, 3 = starke Expression, 2 = mittlere Expression, 1 = schwache Expression, ohne Symbol = keine Expression nachweisbar.

Im adulten Hippocampus (Abb. 3.13B,D,F,H,J,L,N) werden Adcy3 (A) und Adcy6 (C) weiterhin schwach bis mittelstark und Adcy9 (D) unverändert zu P7 stark in allen vier Teilbereichen exprimiert. Ähnlich wie bei P7 und in Übereinstimmung mit bereits bekannten Daten (Xia et al., 1991; Schaefer et al., 2000; Wei et al., 2002) werden Adcy1 und Adcy8 (beide A) bevorzugt in CA2 und Gyrus dentatus, beziehungsweise in CA1 exprimiert. Neben Mitgliedern der Gruppe A wird eine Beschränkung auf bestimmte Teilbereiche des adulten Hippocampus auch für Mitglieder der Gruppen B und C beobachtet. Adcy2 (B) wird stark in CA1 und Gyrus dentatus, aber nicht in CA2 und CA3 exprimiert. Adcy5 (C) hingegen ist stark in CA2, aber nur schwach in allen anderen Regionen exprimiert. Während bei P7 der Unterschied zwischen den einzelnen Regionen hauptsächlich auf Adcy1 und Adcy8, also Mitglieder der Gruppe A beschränkt ist, hat die räumlich eingeschränkte Expression von Mitgliedern der Gruppen B und C eine für jede Region einzigartige Kombination von Adenylatcyclase-Isoformen zur Folge. In CA1 dominiert Adcy2 (B), während Adcy5 und Adcy6 (beide C) nur schwach exprimiert sind. In CA2 werden Adcy1 (A) und Adcy5 (C) stark exprimiert, während Adcy8 (A) und Adcy2 (B) abwesend sind. In CA3 wird keines der Mitglieder der Gruppen A, B und C stark exprimiert. Im Gyrus dentatus sind hauptsächlich Adcy1 (A) und Adcy2 (B) zu finden.

3.2.4 Schichtspezifische Expression im Bulbus olfactorius

Der Bulbus olfactorius ist der Entstehung nach ein ausgestülpter, spezialisierter Bereich des Cortex und, wie auch Neocortex und Hippocampus, in mehreren Schichten organisiert. Die fünf wichtigsten, auf die sich die hier vorliegenden Untersuchungen beschränken, sind die glomeruläre Schicht, die externe plexiforme Schicht, die Mitralzellschicht, die interne plexiforme Schicht und die granuläre Schicht.

Adcy1 (A) und Adcy7 (B) werden sehr schwach oder nicht exprimiert und die Expression von Adcy4 beschränkt sich, wie in anderen Gehirnregionen auf das Gefäßsystem (ohne Abbildung). Trotzdem werden im Bulbus olfactorius Mitglieder aller vier Gruppen exprimiert (Abb. 3.14A-L). Die schichtspezifische Expression der einzelnen Isoformen wurde bewertet und in einer Tabelle zusammengefaßt (Abb. 3.14M).

Adcy3 und Adcy8 (beide A), Adcy2 (B), Adcy5 und Adcy6 (beide C), und Adcy9 (D) werden in der glomerulären Schicht exprimiert. Das Signal beschränkt sich jedoch auf die dem Kern des Bulbus olfactorius zugewandte Region und ist in distalere Teile der glomerulären Schicht abwesend, so dass es sich bei den Adenylatcyclase-exprimierenden Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit um Pinselzellen (*tufted cells*), nicht jedoch um die eher distal lokalisierten periglomerulären Zellen handelt.

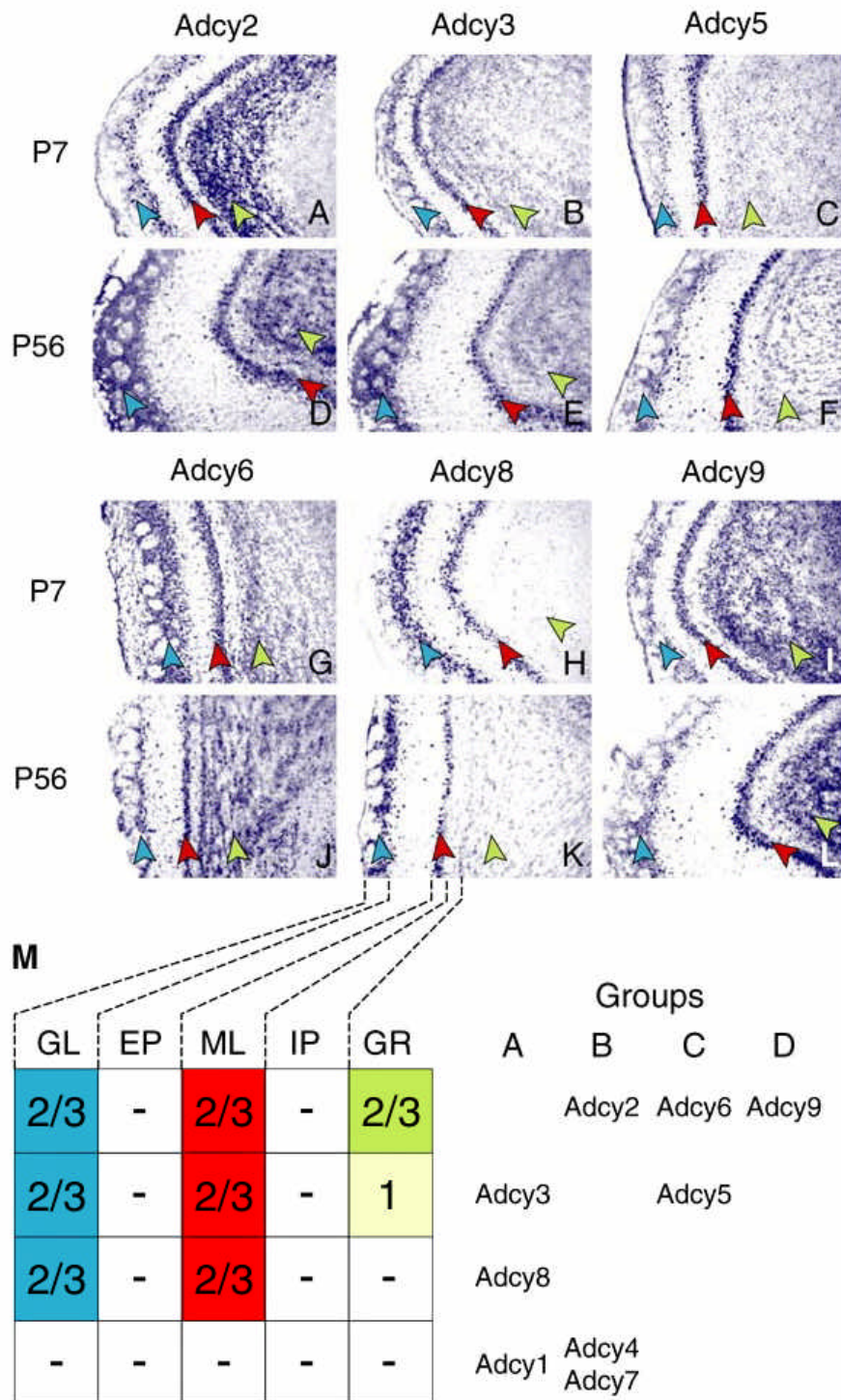


Abb. 3.14: Zahlreiche Adenylatcyclase-Isoformen werden im Bulbus olfactorius exprimiert. Expression von Adcy2 (A,D), Adcy3 (B,E), Adcy5 (C,F), Adcy6 (G,J), Adcy8 (H,K) und Adcy9 (I,L) in sagittalen Schnitten des Bulbus olfactorius bei P7 (A-C,G-I) und in adulten Tieren (D-F,J-L). Mehrere Isoformen werden in der glomerulären Schicht (blaue Pfeilköpfe), der Mitralzellschicht (rote Pfeilköpfe) und der granulären Schicht (grüne Pfeilköpfe) exprimiert. (M) Übersicht über die Expression einzelner Isoformen in den verschiedenen Schichten des Bulbus olfactorius. GL - glomeruläre Schicht, EP - externe plexiforme Schicht, ML - Mitralzellschicht, IP - interne plexiforme Schicht, GR - granuläre Schicht. 2/3 = mittlere bis starke Expression, 1 = schwache Expression, - = keine Expression.

In der externen und internen plexiformen Schicht wurde keinerlei Expression von Adenylatcyclasen gefunden. In der Mitralzellschicht werden die gleichen sechs Isoformen wie in der glomerulären Schicht mit ähnlicher Stärke exprimiert. In der granulären Schicht hingegen gibt es deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke der einzelnen Isoformen. Adcy2 (*B*), Adcy6 (*C*) und Adcy9 (*D*) werden mittelstark bis stark exprimiert, während Adcy3 (*A*) und Adcy5 (*C*) deutlich schwächer und Adcy8 (*A*) überhaupt nicht nachweisbar sind.

3.2.5 Adcy1, Adcy2 und Adcy8 sind auf Subregionen des Thalamus beschränkt

Der Thalamus ist eine entscheidende Schaltstation für die Verbindung zwischen dem Neocortex und anderen Hirnregionen. Innerhalb des Thalamus findet sich ein komplexes dreidimensionales Arrangement von Hauptregionen, von denen jede ihrerseits wiederum aus einzelnen neuronalen Aggregaten, den Nuclei (Kernen) besteht. Jeder dieser Nuclei hat gut definierte Verbindungen zu anderen Gehirnregionen und kann oftmals mit bestimmten Funktionen assoziiert werden. Die komplexe räumliche Anordnung der Nuclei des Thalamus stellt jedoch eine besondere Herausforderung für die Analyse und Kartierung von Expressionsmustern dar. Es wurde daher die Expression aller Adenylatcyclasen in sagittalen Schnitten im Bereich des Thalamus in allen relevanten Schnittebenen untersucht. Hauptregionen und einzelne Nuclei wurden dabei durch Vergleich mit bekannten neuroanatomischen Orientierungspunkten identifiziert. Für alle Bereiche wurde die Expressionsstärke anhand einer Skala von 0-3 (keine bis starke Expression) tabellarisch erfasst. Zur übersichtlichen Darstellung dieser Werte wurde auf der Grundlage von Studien von Swanson (1992) eine Karte des Thalamus entwickelt, die in zweidimensionaler Projektion die untersuchten Regionen in ihrer ungefähren räumlichen Anordnung zueinander wiedergibt (Abb. 3.15A).

Bei E14.5 wird starke Expression nur für Adcy1 und Adcy8 (beide Gruppe *A*) beobachtet. Adcy1 ist im Thalamus weithin exprimiert, die Expressionsstärke erstreckt sich dabei von mittelstarker Expression im ventralen Thalamus bis hin zu starker Expression im dorsalsten Teil des dorsalen Thalamus (Abb. 3.15B). Die Expression von Adcy8 ist räumlich scharf auf eine dorsale Subregion des dorsalen Thalamus beschränkt, wo eine Domäne starker Expression eingebettet in ansonsten vollständig Adcy8-negative Bereiche zu finden ist (Abb. 3.15F,G). Bei E14.5 wird keine der Isoformen aus Gruppe *B* (Adcy2, Adcy4, Adcy7) exprimiert (Abb. 3.15A). Alle Mitglieder von Gruppen *C* und *D* (Adcy5, Adcy6, Adcy9) sowie Adcy3 (*A*) werden nur schwach und mit gleichförmiger Verteilung sowohl im ventralen wie auch im dorsalen Thalamus exprimiert (Abb. 3.15A).

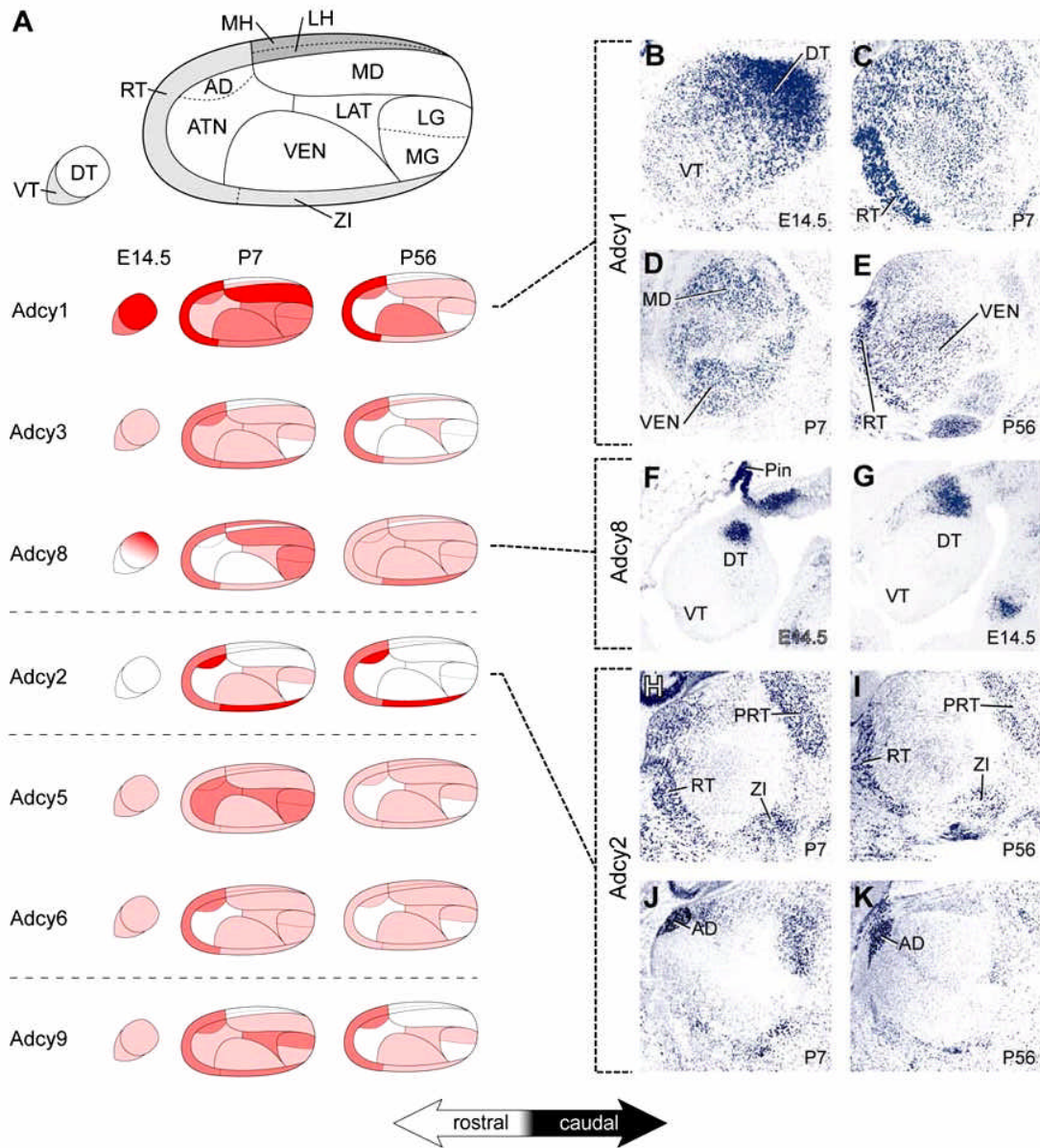


Abb. 3.15: Kartierung der Expression einzelner Isoformen im Thalamus. Die Expression der einzelnen Adenylyl cyclasen wurde auf sagittalen Schnitten analysiert und für die wichtigsten Unterregionen und Nuclei bewertet. (A) Eine zweidimensionale Karte des Thalamus gibt die ungefähre räumliche Anordnung der Hauptregionen wieder. Die jeweilige Bewertung der Expressionsstärke ist durch verschiedene Farbintensitäten dargestellt. (B-K) Regionen mit besonders auffälligem Expressionsmuster. (B) Zunahme der Adcy1-Expression von ventral nach dorsal bei E14.5. (C) Expression von Adcy1 im retikulären Nucleus in einem lateralen Sagittalschnitt bei P7. (D) Adcy1-Expression im ventralen und mediodorsalen thalamischen Nucleus in einer mehr medialen Schnittebene. (E) Adcy1-Expression in den ventralen thalamischen Nuclei und im retikulären Nucleus hält auch im erwachsenen Tier an. (F,G) Scharf begrenzte Expression von Adcy8 im dorsalen Thalamus bei E14.5. (H,I) Adcy2-Expression im retikulären Nucleus, in der Zona incerta und im dorsal vom Thalamus lokalisierten Prätectum. (J,K) In weiter medialen Schnitten beschränkt sich die Expression von Adcy2 auf den anterodorsalen thalamischen Nucleus. Farbcodierung in (A): rot - starke Expression, rosa - mittlere Expression, hellrosa - schwache Expression, weiß - keine Expression. AD - anterodorsaler thalamischer Nucleus, ATN - anteriore Nuclei des dorsalen Thalamus, DT - dorsaler Thalamus, LAT - laterale Nuclei des dorsalen Thalamus, LG - lateraler Corpus geniculatus, LH - laterale Habenula, MD - mediodorsale thalamische Nuclei, MG - medialer Corpus geniculatus, MH - mediale Habenula, Pin - Pinealdrüse, PRT - Prätectum, RT - retikulärer Nucleus, VEN - ventrale Nuclei des dorsalen Thalamus, VT - ventraler Thalamus, ZI - Zona incerta.

Bei P7 werden alle Adenylatcyclasen außer Adcy4 und Adcy7 zumindest bei mittlerer Stärke im Thalamus exprimiert. Adcy3 und Adcy8 (beide *A*), Adcy5 und Adcy6 (beide *C*) sowie Adcy9 (*D*) werden in verschiedenen thalamischen Regionen auf schwachem bis mittlerem Niveau exprimiert (Abb. 3.15A). Im adulten Gehirn persistiert diese Expression in den meisten Fällen mit ähnlicher Verteilung, wenn auch auf leicht niedrigerem Niveau. Besonders auffällige regionalisierte Expressionsmuster werden jedoch für Adcy1 (*A*) und Adcy2 (*B*) beobachtet. Adcy1 wird bei P7 stark im mediodorsalen (Abb. 3.15D) und sowohl bei P7 wie auch im adulten retikulären Nucleus exprimiert (Abb. 3.15C,E). Adcy2 (*B*) wird stark in der Zona incerta und, wenngleich etwas schwächer, im retikulären Nucleus exprimiert (Abb. 3.15H,I). Außerdem wird Adcy2 stark im anterodorsalen thalamischen Nucleus exprimiert, wohingegen die umliegenden Regionen des dorsalen Thalamus Adcy2 höchstens schwach exprimieren (Abb. 3.15J,K).

3.2.6 Adcy1 und Adcy6 in neuronalen Subpopulationen des Striatums

Der Corpus striatum ist als Hauptexpressionsort der Adcy5 (Gruppe *C*) bekannt (Glatt und Snyder, 1993), welche für die Funktion des D₂-Dopaminrezeptors benötigt wird (Lee et al., 2002). Gleichzeitig wurde jedoch mit verschiedenen Methoden die Präsenz mehrerer anderer Adenylatcyclasen im Striatum gezeigt (Glatt und Snyder, 1993; Cali et al., 1994; Mons und Cooper, 1994; Matsuoka et al., 1997; Antoni et al., 1998; Mons et al., 1998).

Im direkten Vergleich der Expression aller neun Isoformen wurden sechs davon sowohl bei P7 wie auch im adulten Striatum nachgewiesen (Abb. 3.16). Dabei treten jedoch zwei grundsätzlich verschiedene Typen von Expressionsverteilung auf. In einigen Fällen ist Expression in der großen Mehrzahl aller Zellen vorhanden, wohingegen in anderen nur eine sehr kleine, verstreute Subpopulation von Zellen positiv ist.

Bei P7 werden Adcy1 und Adcy3 (beide *A*), Adcy5, Adcy6 (beide *C*) und Adcy9 (*D*) weitläufig exprimiert, wobei Adcy5 die am stärksten exprimierte Isoform ist (Abb. 3.16A,C,G,I,J). Im Gegensatz dazu ist die Expression von Adcy2 (*B*) auf eine kleine Subpopulation von Zellen beschränkt (Abb. 3.16E). Im erwachsenen Gehirn halten die weitläufige Expression von Adcy3 (*A*), Adcy5 (*C*) und Adcy9 (*D*) sowie die verstreute Expression von Adcy2 (*B*) nahezu unverändert an (Abb. 3.16D,F,H,L). Im Gegensatz dazu verändern sich die Verteilungsmuster von Adcy1 (*A*) und Adcy6 (*C*) während des Heranwachsens: Bei P7 noch weitläufig exprimiert, ist ihre Verteilung im adulten Striatum ähnlich wie die von Adcy2 (*B*) auf eine kleine Subpopulation einzelner Zellen beschränkt, während die Mehrzahl aller Zellen die Expression von Adcy1 und Adcy6 einstellt.

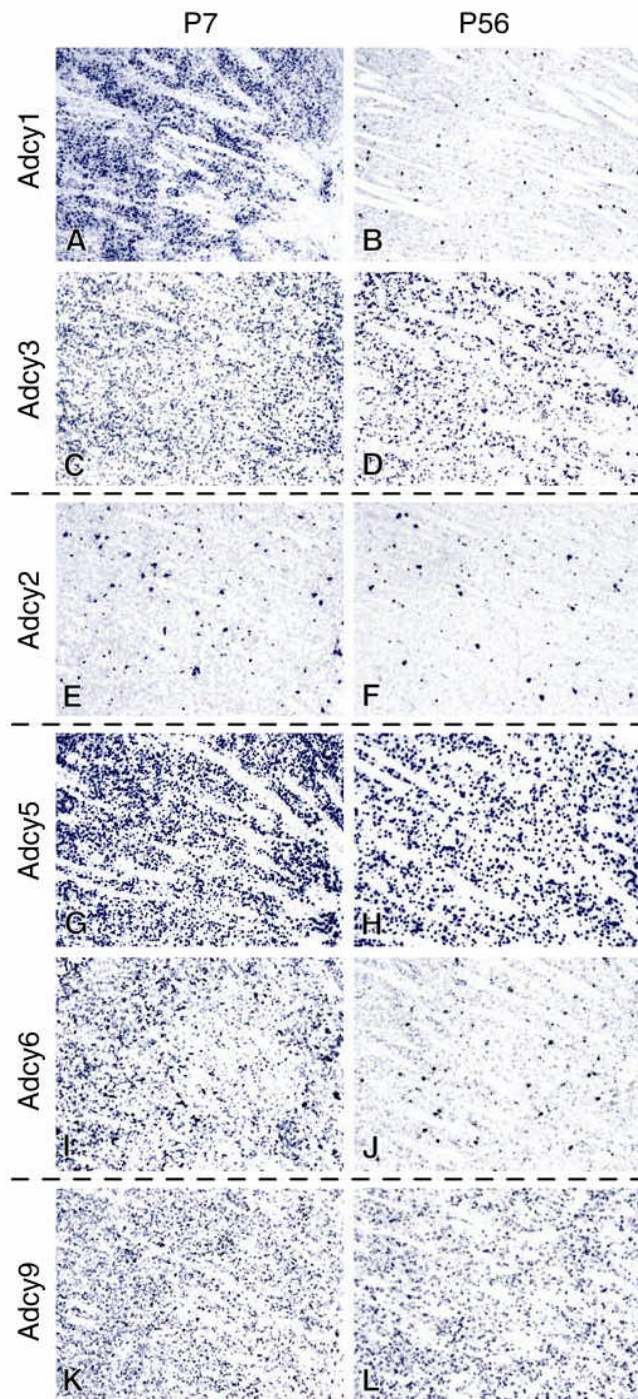


Abb. 3.16: Subpopulationen von Zellen des Corpus striatum exprimieren unterschiedliche Kombinationen von Adenylyl cyclase-Isoformen. Expression von Adcy1 (A,B), Adcy3 (C,D), Adcy2 (E,F), Adcy5 (G,H), Adcy6 (I,J) und Adcy9 (K,L) in sagittalen Schnitten des Corpus striatum bei P7 (A,C,E,G,I,K) und in adulten Mäusen (B,D,F,H,J,L). Ausführliche Beschreibung im Text.

Eine Abnahme der Adcy1-Expression während der postnatalen Entwicklung wurde auch für Ratten berichtet (Matsuoka et al., 1997). Die Größe, Form und Verteilung der einzelnen Zellen mit Adcy1-, Adcy2-, und Adcy6-Expression ist sehr ähnlich, was nahe legt, dass es sich um dieselbe Subpopulation handelt. Adcy8 (A) wird nicht im Striatum exprimiert.

Weiterhin ist am Expressionsmuster von Adcy1 (A) im Striatum bemerkenswert, dass die Expression weit verteilt ist, dabei jedoch nicht so gleichmäßig wie Adcy3, Adcy5 und Adcy9

(Abb. 3.16A). Eingebettet zwischen Adcy1-positiven Zellen liegen Gruppen Adcy1-negativer Zellen. Dieses Muster erinnert stark an die Aufteilung des Striatums in "Flicker" (*patches*) und "Grundsubstanz" (*matrix*), zwei unterschiedliche striatale Kompartimente mit jeweils spezifischen neurochemischen Eigenschaften und Verbindungen in andere Hirnregionen (Gerfen, 1984). Interessanterweise wurden bereits früher separate Flicker-/Grundsubstanz-spezifische Expressionsdomänen des cAMP-generierenden und -abbauenden Systems mit der perinatalen Entwicklung des Striatums der Ratte in Zusammenhang gebracht (Sakagami et al., 1995).

3.2.7 Adcy2- und Adcy8-Expression im embryonalen Rückenmark

Die Expression im Rückenmark und den dorsalen Wurzelganglien bei E14.5 wurde auf transversalen Schnitten auf Höhe der sich entwickelnden Brust- und Lendenwirbelsäule betrachtet. Adcy1-, Adcy3- (beide A) und Adcy9- (D) positiven Zellen weisen in dorsoventraler Richtung eine gradientenähnliche Verteilung auf (Abb. 3.17A-D,M,N). Adcy1 ist überwiegend im dorsalen Rückenmark exprimiert, wo sich die sensorischen Neuronen entwickeln. Die Expression nimmt in ventraler Richtung ab und ist im ventralen Rückenmark nur noch schwach. Adcy9 und, auf insgesamt schwächerem Niveau, Adcy3 weisen ein entgegengesetztes Verteilungsmuster auf. Die Expression ist im ventralen Bereich am stärksten und nimmt in dorsaler Richtung auf schwaches (Adcy9) bzw. nicht detektierbares (Adcy3) Niveau ab. Adcy5 und Adcy6 (beide C) werden gleichmäßig in allen Regionen des Rückenmarks exprimiert (Abb. 3.17I-L).

Die auffälligsten Expressionsmuster im sich entwickelnden Rückenmark weisen Adcy2 (B) und Adcy8 (A) auf: Beide bilden deutliche räumliche Muster aus, deren äußere Abgrenzungen teilweise identisch sind, teilweise jedoch aber auch exakt komplementäre Domänen bilden (Abb. 3.17E-H). In den sich bildenden Dorsalhörnern sind sowohl Adcy2 wie auch Adcy8 abwesend, wohingegen im ventralen Bereich zahlreiche Zellen beide Isoformen auf mittlerem Niveau exprimieren und starke Expression in den ventralen Motorneuronen beobachtet wird. Zusätzlich gibt es lateral des Zentralkanal je eine starke Expressionsdomäne in longitudinaler Richtung auf der Grenze zwischen ventralem (Adcy2/Adcy8-positivem) und dorsalem (Adcy2/Adcy8-negativem) Rückenmark. Diese zylindrische Struktur, vermutlich eine spezifische Subpopulation von Interneuronen, ist stark Adcy8-positiv. Ein Vergleich der Expression von Adcy2 und Adcy8 auf alternierend gesammelten Schnitten desselben Präparates zeigt, dass in der gleichen Subregion Adcy2 exprimiert wird, wenn auch etwas schwächer. Ein ähnliches Schema überlappender Adcy2/Adcy8-Expression wird in der Dachplatte (*roof plate*) des Rückenmarks beobachtet, wo Adcy8 stark und Adcy2 schwach exprimiert ist.

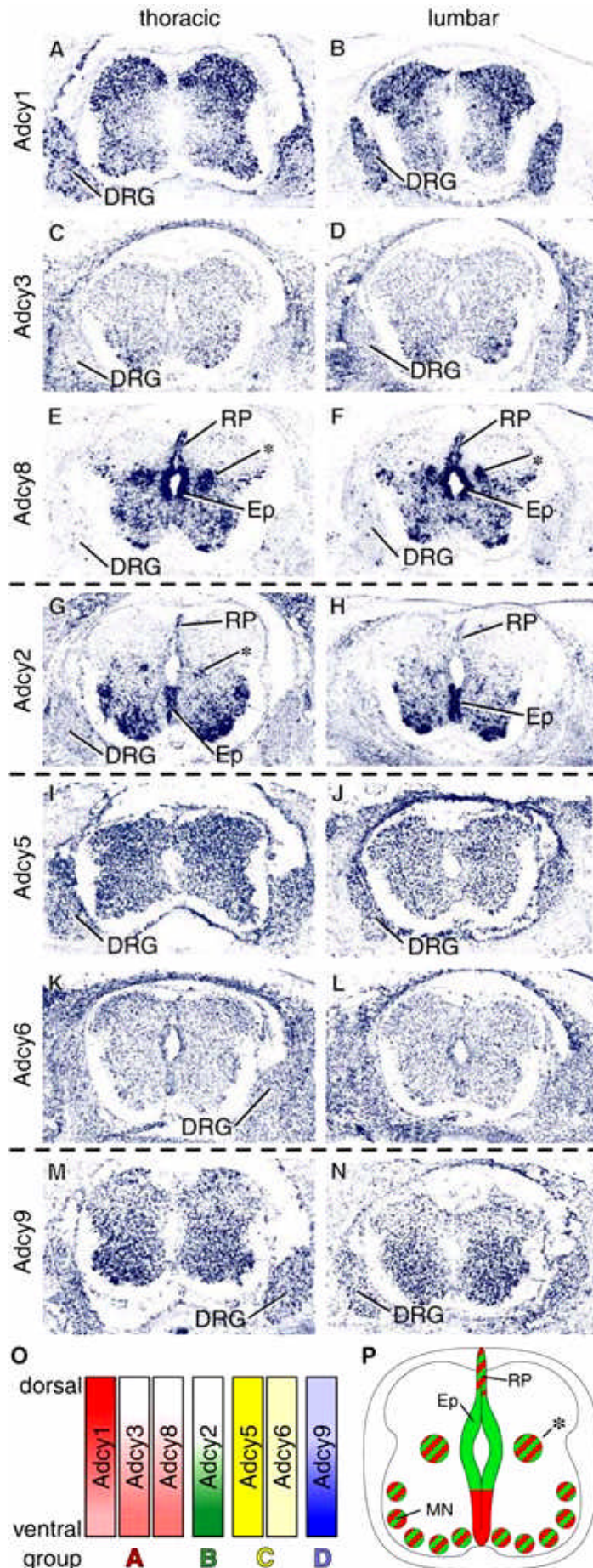


Abb. 3.17: Adenylatcyclasen sind in definierten Regionen des embryonalen Rückenmarks exprimiert. Adcy1 (A,B), Adcy3 (C,D), Adcy8 (E,F), Adcy2 (G,H), Adcy5 (I,J), Adcy6 (K,L) und Adcy9 (M,N) wurden auf Transversalschnitten durch das Rückenmark auf Höhe der zukünftigen Brust- (A,C,E, G,I,K,M) und Lendenwirbel (B,D,F,H,J,L,N) untersucht. Ausführliche Beschreibung im Text. (O) Schematische Repräsentation der Expressionsverteilung in dorsoventraler Richtung. Mitglieder der Gruppen A, B und D weisen dorsoventrale Unterschiede in der Expressionsstärke auf, während Mitglieder der Gruppe C in allen Regionen gleich stark exprimiert sind. (P) Schematische Repräsentation der verschiedenen Expressionsdomänen von Adcy2 (grün), Adcy8 (rot) und Koexpression von Adcy2 und Adcy8 (rot-grün schraffiert). * - Subpopulation spinaler Zellen, vermutlich Interneuronen, DRG - dorsale Wurzelganglien, Ep - Ependymalschicht/ventrikuläre Zone um den Zentralkanal, MN - ventrale Motorneuronen, RP - Dachplatte des sich entwickelnden Rückenmarks.

Im Gegensatz zu diesen Orten überlappender Adcy2/Adcy8-Expression kann die ventrikuläre Zone, welche den Zentralkanal umgibt, ausgehend von der Expression dieser beiden Isoformen in zwei Bereiche eingeteilt werden. Auf alternierend gesammelten Schnitten stimmt die ventrale Grenze der dorsalen, Adcy8-positiven Domäne präzise mit der dorsalen Grenze der ventralen Adcy2-positiven Domäne überein. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch, dass Adcy1 (A) in den meisten Bereichen des dorsalen und ventralen Rückenmarks exprimiert ist, jedoch keine Expression in der Dachplatte und der ventrikulären Zone detektierbar ist.

In den dorsalen Wurzelganglien werden Adcy1 (A) und Adcy5 (C) am stärksten exprimiert, Adcy6 (C) und Adcy9 (D) deutlich schwächer und Adcy2 (B) und Adcy3 (A) sind nicht detektierbar. Die Expression von Adcy8 (A) in den Wurzelganglien beschränkt sich auf einzelne Zellen.

3.2.8 Komplementäre Adcy1- und Adcy8-Domänen im Mittelhirndach

Wie im Rückenmark, so finden sich dynamische Expressionsmuster einzelner Adenylatcyclasen auch im Dach des sich entwickelnden Mittelhirns (Abb. 3.18). Auf sagittalen Schnitten von E14.5 Embryonen zeigt sich eine auffällige separate Domäne von Adcy8 (A)-Expression, die auf sehr mediale Schnitte beschränkt ist (Abb. 3.18E). Im Gegensatz dazu werden Adcy1 (A), Adcy5 und Adcy6 (beide C) sowohl in medialen wie auch in weiter lateralen Schnitten durch das Mittelhirndach exprimiert. Eine Untersuchung dieser vier Isoformen auf horizontalen Schnitten (Abb. 3.18A-D) zeigt, dass die Expression von Adcy8 (A) scharf auf den ventralen Bereich der Dachplatte des Mittelhirns (*midbrain roof plate*) beschränkt ist, sowie weiter lateral auf eine Subpopulation von Zellen in der Mantelschicht, aber nicht im darunterliegenden Neuroepithel (Abb. 3.18B).

In deutlichem Kontrast dazu wird Adcy1 (ebenfalls A) ausschließlich im dorsalen Bereich der Dachplatte exprimiert (Abb. 3.18A). Lateral dieses medialen Streifens findet sich ebenfalls Adcy1-Expression, die jedoch mit zunehmender Entfernung von der Mittellinie deutlich schwächer wird. Die Muster von Adcy1 und Adcy8 (beide A) komplementieren sich daher sowohl in dorsoventraler Richtung innerhalb der Mittellinie wie auch in mediolateraler Richtung im Neuroepithel.

Eine zweite, wenn auch weniger drastische Komplementation wird für die beiden Mitglieder der Gruppe C, Adcy5 und Adcy6 beobachtet. Beide Isoformen werden auf schwachem bis mittlerem Niveau in der Mantelschicht und im Neuroepithel des dorsalen Mittelhirns exprimiert. Während jedoch Adcy5 in der Mantelschicht deutlich stärker als im Neuroepithel exprimiert wird (Abb. 3.18C), ist die Expression von Adcy6 im an den mesencephalischen

Vesikel angrenzenden Neuroepithel am stärksten und wird in dorsaler Richtung schwächer (Abb. 3.18D).

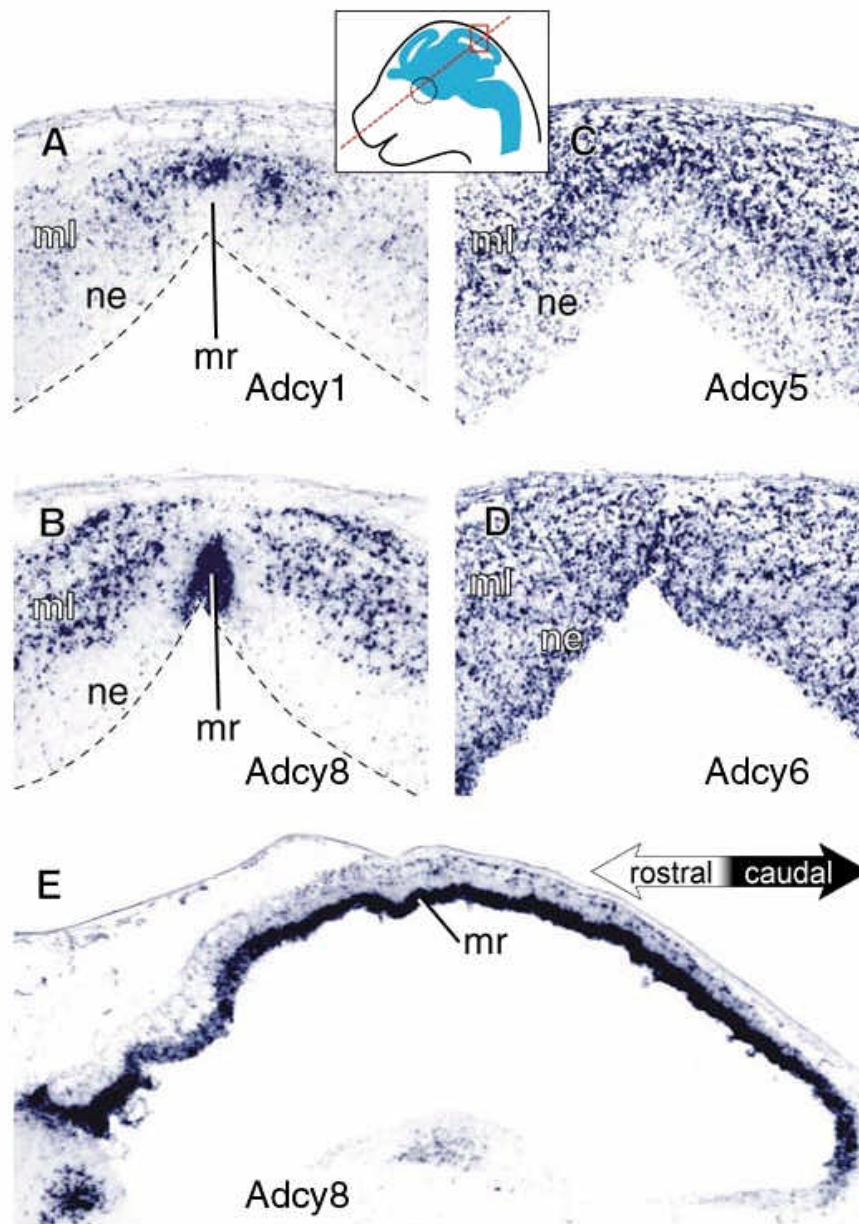


Abb. 3.18: Komplementäre Expressionsdomänen während der Mittelhirnentwicklung. Eingesetzt: Schnittebene durch den Kopf eines E14.5 Embryos wie in A-D gezeigt. (A) Entlang der Mittellinie ist die Expression von Adcy1 auf den dorsalen Bereich des Mittelhirndachs beschränkt. Adcy1 ist weiter lateral auch in der Mantelschicht exprimiert, jedoch läßt diese Expression mit zunehmender Entfernung von der Mittellinie nach. (B) Die Expression von Adcy8 ist auf den ventralen Bereich des Mittelhirndachs beschränkt und bildet somit eine zu Adcy1 komplementäre Expressionsdomäne. Adcy8 ist außerdem in weiter lateralen Bereichen der Mantelschicht exprimiert, nicht jedoch im unterliegenden Neuroepithel. Gestrichelte Linien in (A) und (B) markieren den Umriss des mesencephalischen Vesikels. (C) Adcy5 und (D) Adcy6 werden sowohl in der Mantelschicht wie auch im Neuroepithel des sich entwickelnden Mittelhirns exprimiert. Dabei ist jedoch Adcy5 hauptsächlich in der Mantelschicht exprimiert, während die Adcy6-Expression im Neuroepithel am stärksten ist. (E) Adcy8-Expression in einem sagittalen Schnitt entlang der Mittellinie. Adcy8 wird auf der gesamten Länge des Mittelhirndachs ohne offensichtlichen rostrocaudalen Gradienten exprimiert. ml - Mantelschicht, mr - Mittelhirndach, ne - Neuroepithel.

3.3 Identifikation entwicklungs- und schicht-spezifischer Marker im Cortex

3.3.1 Selektion von Kandidaten durch Microarray-Analyse

Zu den Zielen der vorliegenden Arbeit gehörte die Identifizierung von Genen, die in die Entwicklung des cerebralen Cortex und insbesondere in die Ausbildung der Fäßchenfelder des primären somatosensorischen Cortex involviert sind. Zu diesem Zweck wurden, wie im Methodenteil beschrieben, Microarrays (Affymetrix) mit mRNA-Proben aus dem entsprechenden Bereich des somatosensorischen Cortex hybridisiert. Es wurden dabei sowohl Wildtyp- wie auch *barrelless*-Gewebe verwendet. Die Ergebnisse dieser Hybridisierungen (nicht dargestellt) erlauben Aussagen über die relativen Expressionsstärken der ca. 36 000 auf dem Chipsatz enthaltenen cDNA-Abschnitte.

3.3.2 Postnatale Entwicklung des somatosensorischen Cortex

Durch vergleichende Analyse der Expressionsstärken in unterschiedlichen Quellgeweben wurden Kandidatengene identifiziert, die entweder im Wildtyp-Cortex während der postnatalen Cortex-Entwicklung zeitlich reguliert werden oder die ein unterschiedliches Expressionsniveau zwischen Wildtyp- und *barrelless*-Cortex aufweisen. Als primäre Validierungsstrategie für diesen Ansatz wurde eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt, die aufgrund der geringen benötigten Gewebemenge eine genaue Messung der Expressionsstärke in Einzeltieren ermöglicht.

Für insgesamt sieben der getesteten Kandidatengene wurde eine differentielle Expression bestätigt (Abb. 3.19). In sechs Fällen wurde eine Heraufregulation von P5 bis P13 sowohl im Wildtyp wie auch in der *barrelless*-Mutante beobachtet. Neben den vier bereits zuvor bekannten Genen *c-Fos* (cellular FBJ osteosarcoma oncogene), *Lynx1* (Ly6/neurotoxin1), *Centg3* (Centaurin γ 3) und *Nrgn* (Neurogranin) wurden zwei bisher nur als *expressed sequence tags* bekannte neue Gene identifiziert, AI837604 und AI639670. Diese sind in GenePaint.org auch unter den Alternativnamen *Bpc2* bzw. *Bpc3* (*barrel pattern candidates*) verzeichnet.

Für eines der Kandidatengene, nach der Affymetrix-Sondennummer als 111331_at bezeichnet, wurde im Wildtyp-Cortex ein konstantes Expressionsniveau von P5 bis P13 beobachtet. Im Gegensatz dazu ist 111331_at in der *barrelless*-Mutante bei P5 ca. 2-fach höher exprimiert als im Wildtyp. In der *barrelless*-Mutante, nicht jedoch im Wildtyp, wird während der an-

schließenden Entwicklungswoche eine weitere Heraufregulation beobachtet, bis hin zu einem 6-fach erhöhten Expressionsniveau bei P13.

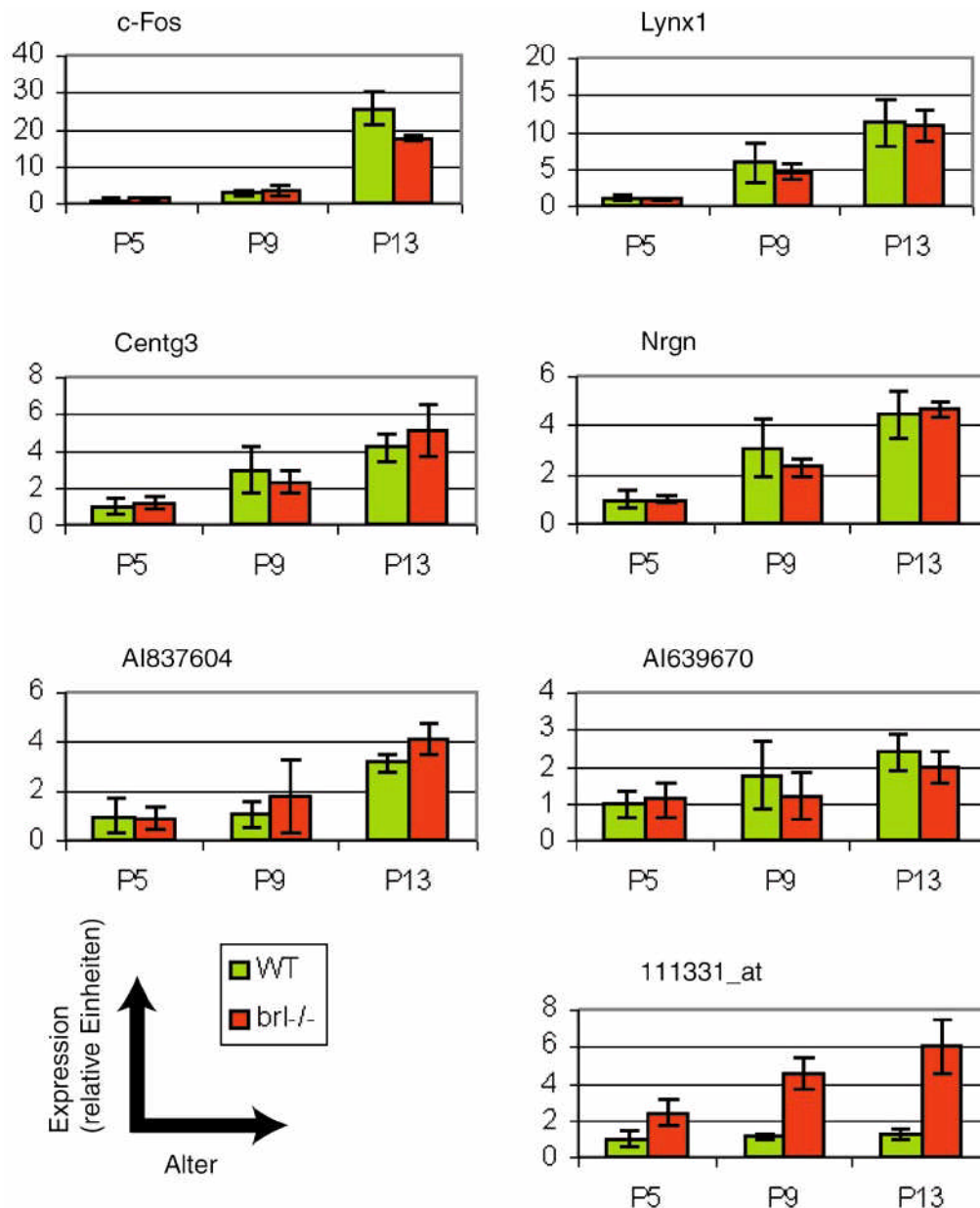


Abb. 3.19: Quantitative PCR von entwicklungsbiologisch und *barrelless*-abhängig regulierten mRNAs. Die mRNAs für c-Fos (cellular FBJ osteosarcoma oncogene), Lynx1 (Ly6/neurotoxin1), Centg3 (Centaurin gamma 3), Nrgn (Neurogranin), sowie die beiden neuen Gene AI837604 und AI639670 werden während der Ausbildung der Fäbchenfelder von P5 bis P13 um einen Faktor von 2,5- bis 25-fach heraufreguliert, die Unterschiede zwischen Wildtyp- und *barrelless*-Cortex sind jedoch nicht signifikant. Für Sequenz 111331_at ist im Wildtyp keine signifikante Regulation zwischen den untersuchten Altersstufen vorhanden, jedoch ist diese mRNA in der *barrelless*-Mutante deutlich heraufreguliert.

3.3.2.1 c-Fos ist nicht essentiell für die Entwicklung von Fäßchenfeldern

Der am stärksten altersabhängig regulierte Kandidat, c-Fos, wurde nach weiterer Bestätigung des in der quantitativen PCR vorgefundenen Regulationsschemas durch eine Northern-Blot-Analyse (nicht gezeigt) näher im Hinblick auf seine Rolle in der Entwicklung der Fäßchenfelder charakterisiert. In einem Mausstamm (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von E. Wagner, Wien) mit einer gezielten Mutation des c-Fos-Lokus (Wang et al., 1992) wurde mit histologischen und histochemischen Methoden das Vorhandensein von Fäßchenfeldern überprüft. Sowohl mit Nissl- wie auch mit Cytochrom-Oxidase-Färbungen von verflachten Cortex-Schnitten (Lu et al., 2001) wurden dabei keine Unterschiede zwischen homozygot c-Fos-defizienten, heterozygoten und Wildtyp-Tieren festgestellt (nicht gezeigt). Durch Ablation einzelner Tasthaare bei P0, P2 und P5 und anschließende Vermessung der relativen Fäßchengrößen an P20 (Lu et al., 2001) wurde ein möglicher Einfluß von c-Fos auf die Plastizität der Fäßchenfelder und die zeitliche Begrenzung der kritischen Periode überprüft. Dabei wurden jedoch wiederum keine signifikanten Abweichungen vom Wildtyp festgestellt (nicht gezeigt).

3.3.2.2 Charakterisierung von 111331_at

Die Sequenz 111331_at wurde ursprünglich in der NetAffx-Datenbank als nicht-codierender Bereich der cDNA des Gens Enc-1 (Ectodermal-neural cortex 1) ausgezeichnet. Enc-1 ist embryonal und adult in mehreren Bereichen des ZNS exprimiert, darunter auch im Cortex (Hernandez et al., 1997). In der quantitativen PCR wurde ein kurzes (~100bp) Teilstück der Sequenz gemessen, die für die Herstellung der Microarray-Sonde 111331_at verwendet worden war. Für eine unabhängige Bestätigung des Expressionsunterschiedes für Enc-1 wurde anhand der ursprünglich publizierten Sequenz (Hernandez et al., 1997) eine Sonde für den proteincodierenden Bereich der Enc-1-cDNA für die Northern-Analyse hergestellt. Im Northern-Blot konnte zwar eine corticale Expression von Enc-1, nicht jedoch eine alters- oder *barrelless*-Genotyp-abhängige Regulation bestätigt werden (nicht gezeigt).

Sequenzvergleiche von 111331_at mit der zwischenzeitlich verfügbaren Genomsequenz der Maus ergaben, dass sich auf zahlreichen Chromosomen Abschnitte mit hoher Ähnlichkeit zu Sonde 111331_at befinden (vgl. Diskussion). Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die unter 111331_at verzeichnete Sequenz nicht für Enc-1, sondern für eines repetitives, jedoch trotzdem exprimiertes Element spezifisch ist.

3.3.3 Schichtspezifische Marker im embryonalen Cortex

Eine wichtige Anwendungsmöglichkeit der Hochdurchsatz-ISH ist die einfache Identifizierung molekularer Marker in einem bestimmten Gewebe von Interesse. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung neuer molekularer Marker für die Analyse der em-

bryonalen Entwicklung des Cortex. Im Hinblick auf die Anwendung in der Analyse von genetischen Defekten in der Ausbildung der corticalen Schichten sind dabei insbesondere solche Marker von Interesse, deren Expression auf einzelne Schichten, das heißt also bestimmte Subregionen beschränkt ist.

Für die Identifizierung solcher Marker wurden drei verschiedene Strategien genutzt: (1) Alle bereits in GenePaint.org deponierten Expressionsdatensätze, z.B. aus Reymond et al. (2002), wurden im Hinblick auf das Expressionsmuster im Cortex bei E14.5 erneut ausgewertet. (2) Durch Literaturrecherchen wurden Gene ausgewählt und mit ISH untersucht, für die aufgrund ihres globalen Expressionsmusters, ihrer molekularen Eigenschaften oder aus sonstigen Gründen Hinweise auf eine mögliche schichtspezifische corticale Expression vorlagen. (3) Über genomweite Microarray-Analysen (Chipsatz Affymetrix U74) von mRNA aus Cortexgewebe wurden Gene mit corticaler Expression ausgewählt und in der ISH auf mögliche schichtspezifische Expression getestet.

Insgesamt wurden ca. 900 Gene durch ISH im Hinblick auf ihre Expression im Cortex untersucht, wobei die im Zusammenhang mit diesem Projekt neu generierten Daten aus Strategien (2) und (3) ebenfalls in GenePaint.org hinterlegt wurden.

Insgesamt wurden mehr als 200 Gene mit schichtspezifischer Expression identifiziert. Eine Auswahl von 135, geordnet nach der Schicht mit der stärksten Expression von dorsal nach ventral ist in Abb. 3.20 dargestellt, eine nach Gensymbolen sortierte alphabetische Liste findet sich in Tab. 3.1.

Für alle Schichten des embryonalen Cortex wurden molekulare Marker identifiziert, die von dorsal nach ventral in folgende Klassen eingeteilt werden können: Marginalzone (Abb. 3.20aa-cf), Corticalplatte (Abb. 3.20cg-fd), Corticalplatte und Subplatte (Abb. 3.20fe-gb), Corticalplatte, Subplatte und Intermediärschicht (Abb. 3.20gc), Intermediärschicht, zumeist in Kombination mit Marginalzone (Abb. 3.20gd-gi), Intermediär- und/oder Subventrikulärzone (Abb. 3.20gj-hj), Subventrikulär- und Ventrikulärzone (Abb. 3.20ia-mg) sowie ventraler Bereich der Ventrikulärzone (Abb. 3.20mh-mi). Des Weiteren wurden Marker identifiziert, die sich durch die selektive Abwesenheit von Expression in einzelnen Schichten auszeichnen (Abb. 3.20na-nf). Die genaue Definition der Expressionsdomänen in Relation zu den histologisch beschriebenen Schichten erfordert in Einzelfällen detailliertere Untersuchungen, z.B. durch Kolokalisationsstudien mit bekannten Referenzmarkern. Es wird jedoch deutlich, dass von dorsal bis ventral ein kontinuierliches Spektrum von Markern alle vorhandenen Schichten abdeckt.

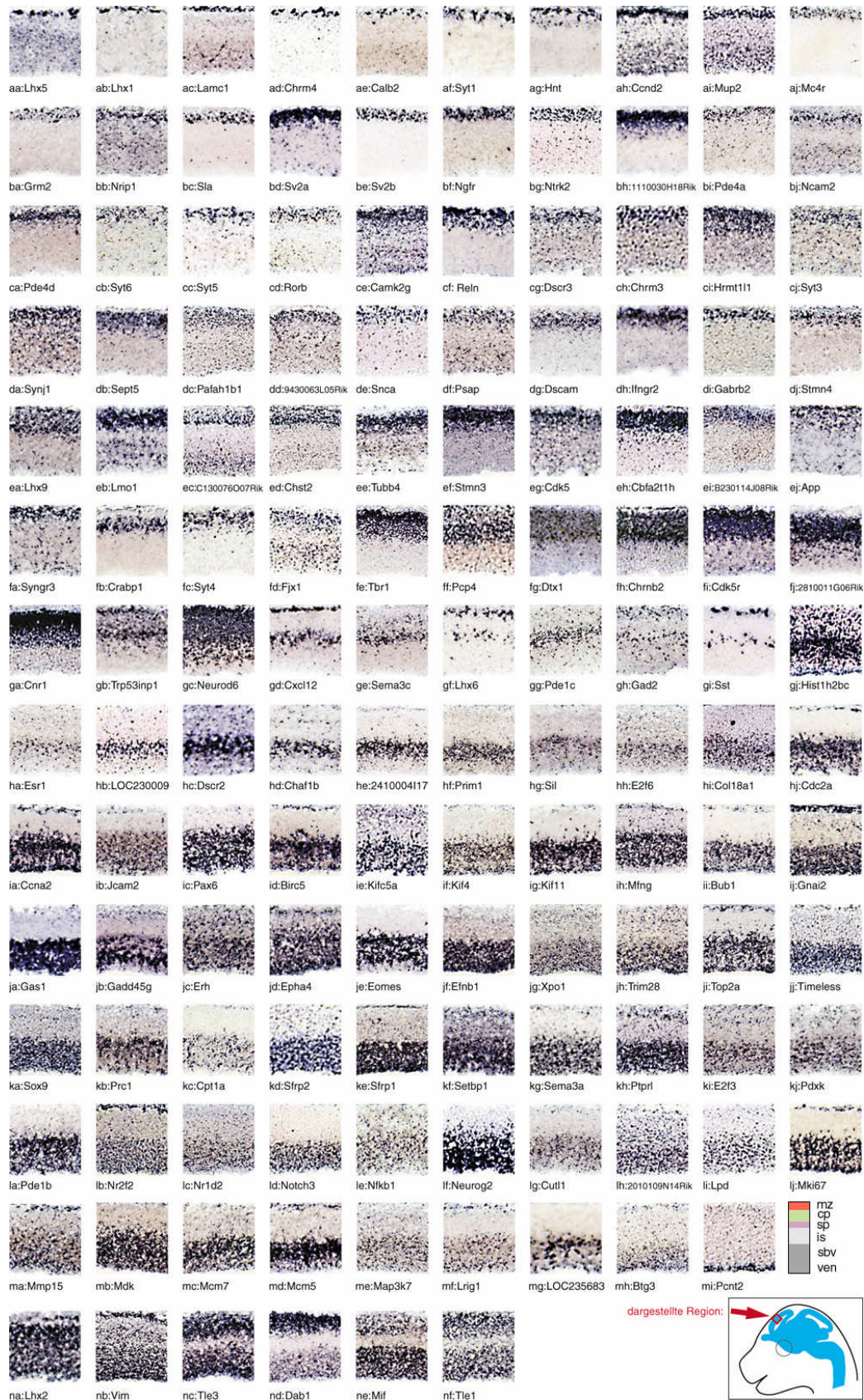


Abb. 3.20: Schichtspezifische molekulare Marker im Cortex bei E14.5. Vollständige Gennamen in Tab. 3.1. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt des Cortex in sagittaler Schnittebene. mz – Marginalzone, cp – Corticalplatte, sp – Subplatte, is – Intermediärschicht, sbv – Subventrikulärzone, ven - Ventrikulärzone. Eine vergrößerte Ansicht dieser Abbildung befindet sich in Appendix 1.

	Symbol	Locus Link	Name
bh	1110030H18Rik	68666	RIKEN cDNA 1110030H18 gene
bh	2010109N14Rik	69895	RIKEN cDNA 2010109N14 gene
he	2410004I17Rik	71988	RIKEN cDNA 2410004I17 gene
fj	2810011G06Rik	75426	insulin-like growth factor binding protein-like 1
dd	9430063L05Rik	229622	RIKEN cDNA 9430063L05 gene
ej	App	11820	amyloid beta (A4) precursor protein
ei	B230114J08Rik	77975	RIKEN cDNA B230114J08 gene
id	Birc5	11799	baculoviral IAP repeat-containing 5
mh	Btg3	12228	B-cell translocation gene 3
ii	Bub1	12235	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog
ec	C130076O07Rik	319504	RIKEN cDNA C130076O07 gene
ae	Calb2	12308	calbindin 2
ce	Camk2g	12325	calcium/calmodulin -dependent protein kinase II gamma
eh	Cbfa2t1h	12395	CBFA2T1 identified gene homolog
ia	Ccna2	12428	cyclin A2
ah	Ccnd2	12444	cyclin D2
hj	Cdc2a	12534	cell division cycle 2 homolog A
eg	Cdk5	12568	cyclin-dependent kinase 5
fi	Cdk5r	12569	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit (p35)
hd	Chaf1b	110749	chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)
ch	Chrm3	12671	cholinergic receptor, muscarinic 3, cardiac
ad	Chrm4	12672	cholinergic receptor, muscarinic 4
fh	Chrb2	11444	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2
ed	Chst2	54371	carbohydrate sulfotransferase 2
ga	Cnr1	12801	cannabinoid receptor 1 (brain)
hi	Col18a1	12822	procollagen, type XVIII, alpha 1
kc	Cpt1a	12894	carnitine palmitoyltransferase 1, liver
fb	Crabp1	12903	cellular retinoic acid binding protein I
lg	Cutl1	13047	cut-like 1
gd	Cxcl12	20315	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
nd	Dab1	13131	disabled homolog 1
dg	Dscam	13508	Down syndrome cell adhesion molecule
hc	Dscr2	56088	Down syndrome critical region homolog 2
cg	Dscr3	13185	Down syndrome critical region gene 3
fg	Dtx1	14357	deltex 1 homolog
ki	E2f3	13557	E2F transcription factor 3
hh	E2f6	50496	E2F transcription factor 6
jf	Efnb1	13641	ephrin B1
je	Eomes	13813	eomesodermin homolog
jd	Epha4	13838	Eph receptor A4
jc	Erh	13877	enhancer of rudimentary homolog
ha	Esr1	13982	estrogen receptor 1 (alpha)
fd	Fjx1	14221	four jointed box 1
di	Gabbr2	14401	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit beta 2
gh	Gad2	14417	glutamic acid decarboxylase 2
jb	Gadd45g	23882	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma
ja	Gas1	14451	growth arrest specific 1
ij	Gnai2	14678	guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 2
ba	Grm2	108068	G protein-coupled receptor, family C, group 1, member B
gj	Hist1h2bc	68024	histone 1, H2bc
ag	Hnt	235106	neurotrimin
ci	Hrmt1l1	15468	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein methyltransferase-like 1
dh	Ifngr2	15980	interferon gamma receptor 2
ib	Jcam2	67374	junction adhesion molecule 2
ig	Kif11	16551	kinesin family member 11
if	Kif4	16571	kinesin family member 4
ie	Kif5a	16572	kinesin family member 5A
ac	Lamc1	226519	laminin, gamma 1
ab	Lhx1	16869	LIM homeobox protein 1
na	Lhx2	16870	LIM homeobox protein 2
aa	Lhx5	16873	LIM homeobox protein 5
gf	Lhx6	16874	LIM homeobox protein 6
ea	Lhx9	16876	LIM homeobox protein 9
eb	Lmo1	109594	LIM domain only 1
hb	LOC230009	230009	similar to RAD54B homolog, isoform 1
mg	LOC235683	235683	similar to kinesin-like 7; kinesin-like protein 2

	Symbol	Locus Link	Name
li	Lpd	94180	lipidosin
mf	Lrig1	16206	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1
me	Map3k7	26409	mitogen activated protein kinase kinase kinase 7
aj	Mc4r	17202	melanocortin 4 receptor
md	Mcm5	17218	minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46
mc	Mcm7	17220	minichromosome maintenance deficient 7
mb	Mdk	17242	midkine
ih	Mfng	17305	manic fringe homolog
ne	Mif	17319	macrophage migration inhibitory factor
lj	Mki67	17345	antigen identified by monoclonal antibody Ki 67
ma	Mmp15	17388	matrix metalloproteinase 15
ai	Mup2	17841	major urinary protein 2
bj	Ncam2	17968	neural cell adhesion molecule 2
gc	Neurod6	11922	neurogenic differentiation 6
lf	Neurog2	11924	neurogenin 2
le	Nfkb1	18033	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105
bf	Ngfr	18053	nerve growth factor receptor
ld	Notch3	18131	Notch gene homolog 3
lc	Nr1d2	353187	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
lb	Nr2f2	11819	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2
bb	Nrip1	268903	nuclear receptor interacting protein 1
bg	Ntrk2	18212	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
dc	Pafah1b1	18472	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, beta1 subunit
ic	Pax6	18508	paired box gene 6
mi	Pcnt2	18541	pericentrin 2
ff	Pcp4	18546	Purkinje cell protein 4
la	Pde1b	18574	phosphodiesterase 1B, Ca2+-calmodulin dependent
gg	Pde1c	18575	phosphodiesterase 1C
bi	Pde4a	18577	phosphodiesterase 4A, cAMP specific
ca	Pde4d	238871	phosphodiesterase 4D, cAMP specific
kj	Pdxk	216134	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase
kb	Prc1	233406	protein regulator of cytokinesis 1
hf	Prim1	19075	DNA primase, p49 subunit
kh	Ptprl	19273	protein tyrosine phosphatase, receptor type, L
df	Psap	19156	prosaposin
cf	Reln	19699	reelin
cd	Rorb	225998	RAR-related orphan receptor beta
de	Snca	20617	synuclein, alpha
kg	Sema3a	20346	semaphorin 3A
ge	Sema3c	20348	semaphorin 3C
db	Sept5	18951	septin 5
kf	Setbp1	240427	SET binding protein 1
ke	Sfrp1	20377	secreted frizzled-related sequence protein 1
kd	Sfrp2	20319	secreted frizzled-related sequence protein 2
hg	Sil1	20460	Tal1 interrupting locus
bc	Sla	20491	src-like adaptor
ka	Sox9	20682	SRY-box containing gene 9
gi	Sst	20604	somatostatin
dj	Stmn4	56471	stathmin-like 4
ef	Stmn3	20262	stathmin-like 3
bd	Sv2a	64051	synaptic vesicle glycoprotein 2 a
be	Sv2b	64176	synaptic vesicle glycoprotein 2 b
fa	Syng3	20974	synaptogyrin 3
da	Synj1	104015	synaptojanin 1
af	Syt1	20979	synaptotagmin 1
cj	Syt3	20981	synaptotagmin 3
fe	Syt4	20983	synaptotagmin 4
ce	Syt5	53420	synaptotagmin 5
cb	Syt6	54524	synaptotagmin 6
fe	Tbr1	21375	T-box brain gene 1
jj	Timeless	21853	timeless homolog
nf	Tle1	21885	transducin-like enhancer of split 1
nc	Tle3	21887	transducin-like enhancer of split 3
ji	Top2a	21973	topoisomerase (DNA) II alpha
jh	Trim28	21849	tripartite motif protein 28
gb	Trp53inp1	60599	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1
ee	Tubb4	22153	tubulin, beta 4
nb	Vim	22352	vimentin
jg	Xpo1	103573	exportin 1, CRM1 homolog

Tab. 3.1: Molekulare Marker mit schichtspezifischer Expression im Cortex bei E14.5.

Bezüglich der bereits in der Literatur vorliegenden Angaben lassen sich die hier beschriebenen schichtspezifisch exprimierten Gene in drei Gruppen untergliedern: (1) Gene, deren schichtspezifische Expression bereits bekannt ist und für die in einigen Fällen auch eine funktionelle Bedeutung bei der Entwicklung des Cortex beschrieben wurde. Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise *Reln* (Ogawa et al., 1995), *Dab1* (Howell et al., 1997) und *Pax6* (Stoykova et al., 1997). (2) Gene, die zwar in anderen Zusammenhängen beschrieben wurden, deren schichtspezifische Expression im embryonalen Cortex jedoch nicht bekannt war. Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise *Cutl1* (Andres et al., 1992), *Pde1c* (Yan et al., 1995) und *Mup2* (Krauter et al., 1982). (3) Gene, die bisher nicht in der Literatur beschrieben sind. Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise die Gene 2410004I17Rik, LOC235683 und 2810011G06Rik. Es existieren derzeit keine Datenbanken, welche die wissenschaftliche Literatur zu Expressionsstudien einzelner Gene vollständig erfassen, daher wäre eine systematische Einordnung der hier beschriebenen 135 Marker in die genannten Gruppen nur mit erheblichem Aufwand möglich. Für eine grobe Abschätzung wurde die derzeit umfangreichste Datenbank für Expressionsdaten in der Maus, Gene Expression Database GXD (Ringwald et al., 2001), benutzt. Hier sind nur für 45 der beschriebenen 135 Gene Expressionsdaten der Kategorie “RNA *in situ*” vorhanden.

4 DISKUSSION

4.1 GenePaint.org, ein Expressionsatlas

4.1.1 GenePaint.org als Werkzeug für die funktionelle Genomanalyse

Aus der Verfügbarkeit des kompletten Genoms der Maus (Waterston et al., 2002) und nahezu vollständiger Listen aller proteincodierenden Gene (Pruitt und Maglott, 2001; Okazaki et al., 2002) ergibt sich die Herausforderung, jedes einzelne dieser Gene im Hinblick auf seine biologische Funktion zu charakterisieren. Wie in der Einleitung dargelegt, sind verschiedene Aspekte einer solchen funktionellen Annotation in unterschiedlichem Ausmaß einer Durchführung auf genomweiter Ebene zugänglich. Der erste wichtige Schritt für die Funktionsanalyse eines Gens ist die Bestimmung seines Expressionsmusters im Organismus, das nur experimentell ermittelt werden kann. Unter den verschiedenen zur Verfügung stehenden Techniken (vgl. Einleitung) vereint einzig die *in situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitten gleichzeitig (a) eine Übersicht über die räumliche Verteilung des Transkripts in Gewebe, (b) ein Auflösungsvermögen bis auf die Ebene von Einzelzellen, sowie (c) durch die Verwendung von Riboproben ein mit relativ geringem Aufwand für jedes beliebige Gen verfügbares spezifisches Detektionsreagenz.

Bei Verwendung konventioneller, manueller Protokolle steht diesen Vorteilen jedoch der hohe zeitliche Aufwand der *in situ*-Hybridisierung entgegen. Um eine Anwendung in der Größenordnung des Säugetiergenoms von 30 000-35 000 Genen realistisch erscheinen zu lassen, wurden daher Technologien entwickelt, die durch weitgehende Automatisierung der Abläufe den Durchsatz der Methode vervielfachen (Herzig et al., 2001).

Die Produktion qualitativ hochwertiger ISH-Daten auf Gewebeschnitten im Hochdurchsatzverfahren hängt dabei insbesondere von der Etablierung von Protokollen und Technologien für die Histologie, die Herstellung von Ribosonden und die robotergestützte Durchführung

der ISH ab. Um die Ergebnisse in Form von hybridisierten Schnitten dauerhaft dokumentieren zu können, wurden weiterhin entsprechende Hard- und Software zur Erstellung hochauflösender mikroskopischer Aufnahmen von Gewebeschnitten entwickelt (Herzig et al., 2001; Visel et al., 2003).

Trotz der Automatisierung und Optimierung zahlreicher Aspekte des Verfahrens erfordert die Hochdurchsatz-ISH einen hohen personellen und materiellen Aufwand, der nur gerechtfertigt erscheint, wenn die gewonnenen Daten einer breiten wissenschaftlichen Öffentlichkeit in geeigneter Form zugänglich gemacht werden können. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit war ein besonderer Schwerpunkt daher die Entwicklung einer entsprechenden Datenbank, GenePaint.org. In ihr werden hochauflösende ISH-Bilddaten zusammen mit experimentellen Parametern und systematischen Annotationen der einzelnen Expressionsmuster archiviert und für öffentliche Benutzer zugänglich gemacht. Zusätzlich stehen verschiedene Suchwerkzeuge zur Verfügung. Eine entsprechende Datenbank wurde implementiert und stellt Expressionsdaten für eine wachsende Anzahl von Genen zur Verfügung. Nachfolgend soll zunächst eine wichtige Anwendungsmöglichkeit von GenePaint, nämlich die gezielte Identifizierung molekularer Marker für bestimmte Strukturen am Beispiel des embryonalen Cortex aufgezeigt werden. Weiterhin werden Perspektiven zum möglichen weiteren Ausbau von GenePaint.org diskutiert, die sich insbesondere aus der parallel erfolgenden Entwicklung anderer Werkzeuge und Datenbanken ergeben.

4.1.2 Identifizierung von Markergenen im embryonalen Cortex

Die Identifizierung von 135 Genen mit schichtspezifischer Expression im embryonalen Cortex zeigt, wie GenePaint.org verwendet werden kann, um in kurzer Zeit zahlreiche Gene mit komplexem Expressionsmuster innerhalb einer bestimmten anatomischen Struktur zu identifizieren. Für einen Teil dieser molekularen Marker existieren bereits Expressionsdaten in der Literatur. Die umfangreichste Datenbank, in welcher Expressionsdaten aus Publikationen gesammelt und verfügbar gemacht werden, ist die Gene Expression Database (Ringwald et al., 2001). Dort sind jedoch nur für 45 der hier beschriebenen 135 Gene überhaupt Expressionsdaten aus RNA *in situ*-Hybridisierungen verfügbar, darunter in vielen Fällen nur für andere Entwicklungsstadien oder Organsysteme. Eine gezielte Suche nach Genen, welche zwischen E13.5 und E15 im Cortex exprimiert sind, ergibt nur 33 Treffer, wobei dies auch Gene einschließt, die gleichermaßen in allen Schichten des Cortex exprimiert werden. Es wird zwar davon ausgegangen, dass für einige weitere Gene Expressionsdaten in der Literatur vorliegen, diese sind jedoch weder in der Gene Expression Database noch in Literaturdatenbanken wie PubMed (Wheeler et al., 2000) gezielt abrufbar. Die hier vorgelegten Daten stellen damit die bisher umfangreichste Zusammenstellung von Genen mit schichtspezifischer Expression im

embryonalen Cortex bei E14.5 dar. Sie bilden eine wichtige Grundlage für weitere Untersuchungen zur Embryonalentwicklung des Cortex, insbesondere im Hinblick auf die Ausbildung der einzelnen Schichten. Im Menschen und im Mausmodell sind mehrere für die Ausbildung der corticalen Schichten essentielle Gene beschrieben worden, darunter beispielsweise Reelin oder Pax6 (Schuermans und Guillemot, 2002; Tissir und Goffinet, 2003), die Ansatzpunkte für molekulargenetische Untersuchungen der damit verbundenen Signalwege und Mechanismen liefern. Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Arsenal an neuen schichtspezifischen Markern legt die Untersuchung der entsprechenden Expressionsmuster in vorhandenen Knockout-Stämmen mit corticalen Entwicklungs- bzw. Migrationsdefekten nahe, um Rückschlüsse auf mechanistische Ursachen für die beobachteten Phänotypen zu erlangen.

4.1.3 Perspektiven

4.1.3.1 Durchsatz im Hinblick auf genomweite Expressionsanalysen

Mithilfe der durchsatzoptimierten Methoden für die ISH auf Gewebeschnitten ist es möglich, in kurzer Zeit für eine große Anzahl von Genen Expressionsmuster zu bestimmen. Im August 2003 standen allein für das Entwicklungsstadium E14.5 Expressionmuster von 390 Genen öffentlich zur Verfügung, insgesamt umfaßte der Datenbestand ~15 000 Einzelschnitte (Visel et al., 2004). Bei Fertigstellung dieser Arbeit im November 2003 standen insgesamt 1139 Datensätze in GenePaint.org öffentlich zur Verfügung, wobei für das Entwicklungsstadium E14.5 Datensätze für 524 verschiedene Gene öffentlich vorlagen. Für weitere 390 Gene wurden bereits ISH bei E14.5 und (bis auf wenige Ausnahmen) Digitalisierung der Bilddaten durchgeführt, für mindestens weitere 90 Gene liegen Ribosonden vor. Bis Ende 2003 werden damit ca. 1000 Datensätze für das Stadium E14.5 vorliegen. Diese Zahl ist gleichbedeutend mit ca. 3% aller existierenden Gene der Maus, wenn von einem Umfang des Mausgenoms von insgesamt ca. 30 000 Genen (Waterston et al., 2002) ausgegangen wird. Basierend auf Erfahrungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit kann eine einzelne Arbeitsgruppe von 5-10 Personen unter Zuhilfenahme der entwickelten Protokolle und Technologien in einem Jahr für ca. 1000 Gene Ribosonden herstellen, die Expressionsmuster in E14.5 Embryonen bestimmen und die Daten in digitalisierter Form zur Verfügung stellen.

Eine genomweite Analyse, das heißt die Bestimmung der Expressionsmuster aller Gene, rückt damit in greifbare Nähe. Durchsatz und die Funktionalität der Technologie wurden im Rahmen dieser Arbeit demonstriert; ein genomweiter Ansatz stellt somit weniger eine technologische als vielmehr eine Herausforderung an die Infrastruktur dar.

Im vorliegenden Ansatz wurden Expressionsanalysen hauptsächlich an E14.5 Embryonen durchgeführt. In diesem Stadium sind bereits die meisten wichtigen Organsysteme der Maus ähnlich wie im adulten Tier angelegt, so dass in einem einzigen Präparat ein umfassender Überblick über zahlreiche potentielle Expressionsorte gegeben wird.

Als weiterer Schwerpunkt genomweiter Expressionsanalysen wird hier das adulte Gehirn der Maus vorgeschlagen. Die anatomische und funktionelle Komplexität des Gehirns übertrifft die aller anderen Organsysteme, und auch das Transkriptom des ZNS ist besonders heterogen (Wurmbach et al., 2002), das heißt eine größere Anzahl von Genen als in irgend einem anderen Organsystem wird gleichzeitig exprimiert. In GenePaint.org sind für zahlreiche Gene neben embryonalen Expressionsmustern auch solche in adulten und postnatalen (P7) Gehirnen verfügbar. Dabei zeigt sich – wie in dieser Arbeit am Beispiel des embryonalen Cortex deutlich wird – dass die mRNA vieler Gene gerade innerhalb des Gehirns ein komplexes Verteilungsmuster aufweist, das mit Methoden ohne räumliche Auflösung (z.B. Microarrays) nur schwer erfaßbar ist. Die Herstellung eines genomweiten Expressionsatlas des Gehirns, unter Verwendung der hier vorgestellten Technologien, wurde bereits früher vorgeschlagen (Carson et al., 2002). Bei Realisierung wird ein solcher Atlas ein wertvolles Werkzeug für die Neurowissenschaften darstellen, um die molekularen Grundlagen der Entwicklung und Funktion des menschlichen Gehirns besser zu verstehen.

4.1.3.2 Automatisierte Annotation von Expressionsmustern und dreidimensionale Rekonstruktion

Die hier vorgestellte Methode zur Annotation von Expressionsmustern anhand einer standardisierten Nomenklatur anatomischer Strukturen bietet eine gute Grundlage für die Suche nach Expressionsmustern, für einfache Vergleiche von Expressionsmustern und die computergestützte Identifizierung von Genen mit ähnlichen Expressionsmustern (s.u.). Die manuelle Annotation von Expressionsmustern ist jedoch zeitaufwendig und hat aufgrund des Interpretationsspielraums des annotierenden Experten eine gewisse Schwankungsbreite. Langfristig wäre es daher wünschenswert, eine computergestützte Erkennung von Expressionssignalen und anatomischen Strukturen sowie Werkzeuge für die dreidimensionale Rekonstruktion von Präparaten aus zweidimensionalen Schnitten zu implementieren. Eine ausführliche Diskussion der hierfür notwendigen Voraussetzungen ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Es soll jedoch zum einen auf Arbeiten zur Projektion experimenteller ISH-Ergebnisse auf Standardkarten des Mausgehirns verwiesen werden, die eine weitgehend automatisierte Erkennung des ISH-Farbsignals und die Annotation auf der Basis entsprechender neuroanatomischer Referenzschnitte erlauben (Carson et al., 2002; www.geneatlas.org). Zum anderen werden ähnliche Strategien für verschiedene Stadien des

Mausembryos verfolgt (Davidson und Baldock, 2001). Da die Anatomie eines Embryos jedoch weniger stereotyp als die des Gehirns ist, werden weitgehend automatisierte Annotationswerkzeuge voraussichtlich zunächst nur für das Gehirn zur Verfügung stehen.

4.1.3.3 Identifizierung funktioneller Zusammenhänge durch computergestützte Analyse annotierter Expressionsmuster

Eine wichtige Anwendung von GenePaint.org wird die reine Bereitstellung von Expressionsdaten für einzelne Gene sein. Darüber hinaus eröffnet sich durch die Annotation der Expressionsmuster entsprechend einer standardisierten anatomischen Nomenklatur die Möglichkeit, durch noch zu entwickelnde entsprechende Algorithmen Expressionsmuster direkt miteinander zu vergleichen. Die systematische Untersuchung von annotierten Expressionsdaten im Hinblick auf übereinstimmende Expressionsmuster kann Hinweise auf biologische Zusammenhänge zwischen einzelnen Genen liefern, indem beispielweise Synexpressionsgruppen identifiziert werden, das heißt Gruppen von Genen mit übereinstimmendem Expressionsmuster (Gawantka et al., 1998). Im Gegensatz zu Sequenzvergleichen auf Proteinebene können dadurch neu entdeckte Gene unabhängig von ihrer Sequenz Signalwegen zugeordnet werden, die beispielsweise in Entwicklung, Differenzierung oder Physiologie eine Rolle spielen. Das Potential der Identifizierung von Synexpressionsgruppen zur Einordnung von Genen in einen funktionellen Zusammenhang wurde bereits früher am Beispiel des *Xenopus*-Embryos demonstriert (Gawantka et al., 1998). GenePaint.org eröffnet mit der Maus die Möglichkeit eines ähnlichen Ansatzes im Säugetiermodell.

4.1.3.4 Interoperabilität von GenePaint.org mit anderen Datenbanken

GenePaint.org verfügt bereits über direkte Verknüpfungen der einzelnen Datensätze mit entsprechenden Einträgen in GenBank (Benson et al., 2003) und LocusLink (Pruitt und Maglott, 2001). Für umfassendere Informationen zu den jeweiligen Genen wird neben diesen beiden hauptsächlich sequenzorientierten Datenbanken die Integration direkter Verknüpfungen mit weiteren Bioinformatik-Ressourcen vorgeschlagen. Wichtige Beispiele sind Informationen zum Phänotyp von Mutanten- bzw. *knockout*-Linien (Blake et al., 2003), Informationen und Atlanten zur entwicklungsbiologischen Anatomie (Bard et al., 1998), Ressourcen zur Ontologie von Genen, also der systematischen Annotation von Eigenschaft und Funktion der jeweiligen Genprodukte (Ashburner et al., 2000), sowie die Kartierung von Proteinexpressionsmustern durch transgene Ansätze (Gong et al., 2003).

4.2 Expressionsmuster der Adenylatcyclasen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Expressionsmuster aller neun membrangebundenen Adenylatcyclasen, einer Familie von pharmakologisch wichtigen Zielmolekülen, untersucht. Besondere Schwerpunkte bildete dabei die Untersuchung der Muster auf zeitliche (postnatal vs. adult) und räumliche (Koexpression und Komplementierung) Charakteristika der Expressionsmuster, insbesondere unter Berücksichtigung der regulatorischen Eigenschaften der einzelnen Isoformen.

4.2.1 Unterschiede zwischen postnatalen und adulten Expressionsmustern

Im Cortex treten zwischen P7 und P56 nur für Adcy8 und Adcy9 deutliche Unterschiede auf. Im Hippocampus sind die Expressionsmuster bei P7 und P56 nur minimal unterschiedlich, die einzige Ausnahme bildet Adcy2, welche bei P56 nicht mehr in CA2 und CA3, jedoch stark in CA1 und Gyrus dentatus exprimiert ist. Im Bulbus olfactorius sind alle bei P7 exprimierten Isoformen mit ähnlicher Intensität und Lokalisation auch bei P56 exprimiert. Auch im Thalamus sind die Expressionsmuster bei P7 und P56 ähnlich, eine Ausnahme bildet jedoch die deutliche Abnahme von Adcy1-Expression im mediodorsalen Nucleus. Im Corpus striatum ist nur für zwei der exprimierten Isoformen, Adcy1 und Adcy6, eine Veränderung des Expressionsmusters zwischen P7 und P56 zu beobachten, nämlich eine Beschränkung auf eine kleine Subpopulation von Zellen.

Die überwiegend nur geringen Unterschiede zwischen P7 und P56 deuten darauf hin, dass die Adenylatcyclasen in den untersuchten Gehirnregionen ihre definitive Funktion und ggf. vorhandene wechselseitige Beziehungen bereits zu einem frühen postnatalen Zeitpunkt übernommen haben.

4.2.2 Expression der G β γ-stimulierten Isoformen Adcy4 und Adcy7

Für zwei Mitglieder der Gruppe *B* (G β γ-stimulierte Isoformen), Adcy4 und Adcy7, unterstützen die hier gewonnenen Ergebnisse frühere Berichte nur teilweise, in denen eine Expression dieser beiden Isoformen in Neuronen beobachtet oder nahegelegt wurde (Watson et al., 1994; Hellevuo et al., 1995; Olanas et al., 1998; Baker et al., 1999). Auf der Grundlage der in dieser Arbeit ermittelten Daten kann zwar die Anwesenheit geringer Mengen von Adcy4- und Adcy7-mRNA in Neuronen nicht ausgeschlossen werden. Die hauptsächlichen Expressionsorte dieser beiden Isoformen sind jedoch die Blutgefäße im ZNS für Adcy4, bzw. Organe außerhalb des ZNS im Fall von Adcy7.

Ein möglicher Grund für diese Divergenz ist die Verwendung anderer Detektionsmethoden als ISH, darunter RT-PCR und Immunhistochemie. In der RT-PCR ist keine räumliche Auflösung gegeben, und so wäre beispielsweise eine Expression in Blutgefäßen des ZNS nicht von der in Neuronen unterscheidbar. Die Immunhistochemie beruht auf Isoform-spezifischen Antikörpern, die in Einzelfällen jedoch eine Kreuzreaktivität mit anderen, strukturell ähnlichen Proteinen derselben Familie aufweisen können. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass ISH und Immunhistochemie unterschiedliche Genprodukte, nämlich mRNA und Protein detektieren. Daher können die subzelluläre Lokalisation und Unterschiede in den Abbau-mechanismen und damit der zeitlichen Stabilität von mRNA- bzw. Protein-Konzentration ebenfalls scheinbare Diskrepanzen hervorrufen.

4.2.3 Koexpression und Komplementierung

Um Aussagen über das möglicherweise gleichzeitige Vorhandensein mehrerer Isoformen in der gleichen Zellpopulation zu treffen, wurden die Expressionsdomänen der einzelnen Adenylatcyclasen verglichen.

Koexpression bezeichnet in diesem Zusammenhang die gleichzeitige Expression von zwei oder mehr Isoformen in derselben Region, die mit einer Kolokalisation des Transkripts in einem bestimmten Zelltyp einhergehen kann. Eine definitive Aussage bezüglich zellulärer Kolokalisation kann mit den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht getroffen werden. Vergleiche von Zellformen und Verteilungsmustern bei höherer Vergrößerung (nicht gezeigt) legen jedoch in vielen Fällen nahe, dass dieselbe Zellpopulation mehr als eine Isoform gleichzeitig exprimiert. Regionale Koexpression innerhalb einer Gruppe von Isoformen mit ähnlichen regulatorischen Eigenschaften kann einerseits auf eine funktionelle Redundanz innerhalb dieser Gruppe hindeuten, andererseits auf subtile funktionelle Unterschiede zwischen Isoformen innerhalb einer Gruppe.

Im Gegensatz zur Koexpression wurde in vielen Fällen auch eine komplementäre Beziehung zwischen einzelnen Isoformen vorgefunden. Räumliche Komplementierung bezeichnet hier das Vorhandensein von sich gegenseitig ausschließenden Expressionsdomänen einzelner Isoformen.

Bezüglich des Auftretens von Koexpression, beziehungsweise Komplementierung in den Expressionsmustern der einzelnen Isoformen wurden mehrere generelle Tendenzen beobachtet. Von diesen lassen sich zwar jeweils einzelne Ausnahmen finden, so dass sie keine absoluten Regeln darstellen, sie sind jedoch nützlich für die Untersuchung und weitere Diskussion möglicher Zusammenhänge zwischen den Expressionsmustern der einzelnen Isoformen. Die drei wichtigsten, nachfolgend näher diskutierten Grundtendenzen lassen sich wie folgt zusammenfassen. (1) *Komplementation*: Die Ca^{2+} -/CaM-regulierten Adenylatcyclasen bilden

sich gegenseitig ausschließende Expressionsdomänen; (2) *Alternative Koexpression und Komplementation*: Ca^{2+} -/ CaM -regulierte und $\text{G}\beta\gamma$ -stimulierte Isoformen bilden Expressionsdomänen, die zwar in einer offensichtlichen Beziehung zueinander stehen, die sich jedoch in einigen Fällen in Koexpression, in anderen in Komplementierung äußert; (3) *Koexpression*: In vielen Fällen sind Isoformen mit unterschiedlichen oder sogar scheinbar gegensätzlichen regulatorischen Eigenschaften in derselben Region und vermutlich im selben Zelltyp exprimiert, wodurch potentiell die Möglichkeiten zur Modulation cAMP-generierender Mechanismen deutlich erweitert werden.

4.2.3.1 Komplementäre Expressionsmuster der Ca^{2+} -/ CaM -regulierten Adenylatcyclasen

Adcy1 und Adcy8 sind *in vivo* die einzigen beiden Isoformen, die durch Ca^{2+} / CaM stimuliert werden (Choi et al., 1992a; Wayman et al., 1995; Wei et al., 1996; Wei et al., 1998). Die hier vorliegenden Daten zeigen in der Mehrzahl aller Fälle eine gegenseitige Komplementation von Adcy1 und Adcy8, das heißt eine räumliche Ergänzung der Expressionsdomänen, die am markantesten in Cortex, embryonalem Rückenmark und Mittelhirndach sowie im Hippocampus ausgeprägt ist. Im Neocortex sind bei P7 in Schicht 2/3 gegensätzliche Verteilungsmuster von Adcy1- (dorso-ventral) und Adcy8- (ventro-dorsal) Expression vorhanden. Eine ähnliche Situation findet sich im Rückenmark bei E14.5, wo Adcy1-Expression in dorsoventraler Richtung abnimmt und nicht im Neuroepithel exprimiert wird, während Adcy8-Expression in ventrodorsaler Richtung abnimmt und Expression im Neuroepithel zu finden ist. In der Mittellinie des Mittelhirndachs bei E14.5 sind die Expressionsdomänen von Adcy1 und Adcy8 in dorsoventraler Richtung deutlich voneinander abgegrenzt, außerdem finden sich in der Mantelschicht lateral von der Mittellinie gegenläufige Verteilungsmuster von Adcy1 und Adcy8. In Übereinstimmung mit früheren Berichten (Xia et al., 1991; Schaefer et al., 2000; Wei et al., 2002) ist Adcy1 im adulten Hippocampus am stärksten in CA2 und im Gyrus dentatus exprimiert, wohingegen sich die Expression von Adcy8 auf CA1 beschränkt. In Striatum und Bulbus olfactorius ist jeweils nur eine der beiden Isoformen überhaupt exprimiert, was als extreme Form von räumlichem Ausschluss bewertet werden kann. Lediglich im Thalamus wurde in einigen Fällen eine Koexpression von Adcy1 und Adcy8 beobachtet.

Adcy1 und Adcy8 weisen grundsätzlich ähnliche regulatorische Eigenschaften im Hinblick auf Ca^{2+} , CaM und G-Protein-Komponenten auf. Ca^{2+} und CaM stimulieren die cAMP Bildung *in vivo* und *in vitro* (Tang et al., 1991; Choi et al., 1992b; Choi et al., 1992a; Wu et al., 1993; Cali et al., 1996). Während dabei jedoch die halb-maximale Stimulation von Adcy1 bei Konzentrationen von 150nM freiem Ca^{2+} und 20nM CaM erreicht wird, ist die Ca^{2+} -Sensitivität von Adcy8 vier- bis fünffach geringer (Villacres et al., 1995). Die demzufolge höhere

Aktivierungsschwelle für Adcy8 könnte auf eine Beteiligung an unterschiedlichen neurophysiologischen Signalprozessen hindeuten. Ein zweiter wichtiger Unterschied zwischen Adcy1 und Adcy8 besteht in der *in vivo*-Stimulation durch G_s-Untereinheiten in Anwesenheit von Ca²⁺/CaM. Adcy1, nicht jedoch Adcy8 wird in synergistischer Weise durch diese beiden Signalwege aktiviert (Nielsen et al., 1996). Daher ist Adcy1 in weit größerem Umfang als Adcy8 in der Lage, die gleichzeitige Aktivität beider Signalwege wahrzunehmen und zu integrieren. Die aus diesen biochemischen Befunden resultierende Wahrnehmung von Adcy1 als “neuronaalem Koinzidenzdetektor” und Adcy8 als “reinem Ca²⁺-Detektor” (Xia und Storm, 1997) wird, wenngleich in differenzierterer Form, durch genetische Manipulationsstudien in der Maus unterstützt. *Knockout*-Untersuchungen belegen, dass Adcy1 und Adcy8 in unterschiedlicher Weise an neurophysiologischen Prozessen wie Spätphasen-LTP, Langzeitgedächtnis oder chronischem Schmerz beteiligt sind (Abdel-Majid et al., 1998; Wong et al., 1999; Schaefer et al., 2000; Wei et al., 2002). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten, sehr unterschiedlichen Expressionmuster unterstützen die Hypothese, dass Adcy1 und Adcy8 trotz ihrer grundsätzlich ähnlichen strukturellen und regulatorischen Eigenschaften *in vivo* sehr unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen.

Bezüglich möglicherweise vorhandener Zusammenhänge zwischen der Regulation von Adcy1- und Adcy8-Expression wurde nach gezielter Deletion des Adcy8-Gens keine kompensatorische Heraufregulation von Adcy1 beobachtet (Schaefer et al., 2000). Die hier beobachteten zahlreichen Beispiele für sich gegenseitig ausschließende Expression von Adcy1 und Adcy8 unterstützen zwar die Annahme, dass Adcy1 und Adcy8 nicht-redundante Rollen wahrnehmen, deuten jedoch auf einen negativen expressionsregulatorischen Zusammenhang hin, da in keiner der untersuchten Regionen eine gleichzeitige starke Expression von Adcy1 und Adcy8 in derselben Region oder Subregion beobachtet wurde.

Phänotypen von Adcy1- und Adcy8-defizienten Mäusen wurden bisher überwiegend auf biochemischer, elektrophysiologischer und verhaltensbiologischer Ebene erkannt. Die einzige bekannte neuroanatomische Manifestation einer Defizienz stellt die Abwesenheit von Fäßchenfeldern in der Adcy1-Mutante dar (Abdel-Majid et al., 1998). Die in dieser Arbeit neu identifizierten Expressionsdomänen, insbesondere im embryonalen Rückenmark und Mittelhirndach, eröffnen die Möglichkeit, dass Ca²⁺-/CaM-stimulierte Adenylatcyclaseaktivität neben dem somatosensorischen Cortex auch in anderen Gehirnbereichen an der Ausbildung bestimmter Regionen oder Zelltypen beteiligt ist und legen daher nahe, entsprechende Mausstämme, z.B. die Adcy1-Mutante *barrelless* (Welker et al., 1996), auf diesbezügliche Defekte hin zu untersuchen.

4.2.3.2 Ca²⁺-/CaM-stimulierte und Gβγ-stimulierte Isoformen

Zwischen den Expressionsmustern von Adcy1 und Adcy8, den *in vivo* Ca²⁺-/CaM-stimulierten Isoformen der Gruppe A einerseits und Adcy2 (Gβγ-stimulierte Gruppe B) andererseits ist aufgrund der vorliegenden Daten ebenfalls eine Beziehung zu erkennen, die jedoch ambivalenter Natur ist. Diese tritt besonders deutlich im sich entwickelnden Rückenmark hervor, wo sowohl Adcy8 wie auch Adcy2 differenzierte Expressionsdomänen bilden. Dabei werden jedoch in einigen Bereichen, nämlich den Motoneuronen und einer weiteren Population spinaler Neuronen, vermutlich einer Subpopulation von Interneuronen, Adcy2 und Adcy8 gleichzeitig exprimiert. Andererseits schließen sich die Adcy2- und Adcy8-exprimierenden Bereiche im den Zentralkanal umgebenden Neuroepithel gegenseitig aus, wobei die sehr scharfe dorsale Begrenzung der Adcy2-Expressionsdomäne in alternierend gesammelten Schnitten exakt mit der ebenfalls scharfen ventralen Grenze der Adcy8-Expressionsdomäne übereinstimmt.

4.2.3.3 Gleichzeitige Expression mehrerer Isoformen mit unterschiedlichen Regulationseigenschaften

Ein systematischer und direkter Vergleich der Expressionmuster aller neun Isoformen ergibt, dass die gleichzeitige Expression mehrerer Isoformen in derselben Region nicht ungewöhnlich ist, sondern vielmehr in zahlreichen Fällen auftritt. Dabei ist besonders überraschend, dass diese Beobachtung nicht nur auf Isoformen zutrifft, die ähnliche regulatorische Eigenschaften haben, sondern in vielen Fällen auch auf Isoformen mit sehr unterschiedlichen oder sogar gegensätzlichen Regulationsmechanismen.

Von den zahlreichen vorgefundenen Beispielen sollen hier nur die markantesten hervorgehoben werden. Im Hippocampus werden in jeder der untersuchten Regionen Isoformen aus wenigstens drei der vier Gruppen exprimiert. In der granulären, glomerulären und der Mitralzell-Schicht des Bulbus olfactorius sind Mitglieder aller vier Gruppen A, B, C und D exprimiert. Im Striatum sind mit Ausnahme von Gruppe B Mitglieder aller anderen drei Gruppen weithin exprimiert. Eine sehr auffällige Überschneidung der Expressionsmuster unterschiedlich regulierter Adenylatcyclasen wird während der Entwicklung des Rückenmarks beobachtet, wo - wie im vorangehenden Abschnitt dargelegt - Adcy2 und Adcy8 trotz ihrer sehr unterschiedlichen Regulationseigenschaften in mehreren Strukturen koexprimiert werden. Auch Mitglieder der Gruppen C und D werden zu diesem Zeitpunkt im Rückenmark exprimiert.

Ein Vergleich der Expressionsmuster bei zellulärer Auflösung liefert in vielen Fällen starke Anhaltspunkte dafür, dass die verschiedenen Isoformen nicht nur in derselben Region, sondern in denselben Zellen koexprimiert sind. Was könnte der Zweck einer solchen gleichzeiti-

gen Expression mehrerer Isoformen sein? Eine höchst bemerkenswerte Eigenschaft der Adenylatcyclasen ist ihre Fähigkeit, als molekulare Integratoren zu agieren. Jede Isoform ist potentiell in der Lage, den Zustand verschiedener vorgeschalteter Signalwege wahrzunehmen. Intrazelluläre Ca^{2+} /CaM-Konzentration, Untereinheiten der G-Proteine und weitere Informationswege werden so durch die Produktion von cAMP in einen einzigen sekundären Botenstoff-Signalweg (*second-messenger pathway*) zusammengeführt. Dabei reagiert jedoch jede Isoform unterschiedlich auf die verschiedenen vorgeschalteten Signalwege, das heißt die Art der Regulation (Stimulation oder Inhibition) wie auch der relative Einfluss der einzelnen Signalwege unterscheiden sich. So sind von den bekannten neun membrangebundenen Isoformen keine zwei vollkommen identisch in ihren regulatorischen Eigenschaften (Cooper et al., 1995; Chern, 2000). Diese Unterschiede könnten eine Anpassung einzelner Isoformen an unterschiedliche funktionelle Bedürfnisse einzelner Zelltypen oder Gehirnregionen darstellen. Da jede einzelne Adenylatcyclase für sich genommen bereits auf mehrere vorgelagerte Signalwege reagieren kann, liegt die Vorstellung nahe, dass jede Isoform in einem einzigen Enzym die Regulationseigenschaften vereint, die von einem bestimmten Zelltyp benötigt werden. Die Beobachtung, dass häufig Isoformen mit unterschiedlichen Regulationseigenschaften koexprimiert werden, eröffnet jedoch eine alternative Möglichkeit: Die gleichzeitige kombinierte Expression mehrerer Isoformen stellt einen zusätzlichen Weg dar, die Integration verschiedener vorgeschalteter Signalwege zu beeinflussen. Diese Art der Feinabstimmung wurde bereits früher für Komponenten des cAMP-bildenden und -abbauenden Systems vorgeschlagen (Houslay und Milligan, 1997). Die hier vorliegenden Daten eröffnen die Möglichkeit, dass die Modulation cAMP-generierender Mechanismen durch gleichzeitige Expression mehrerer Adenylatcyclasen nicht nur einen theoretischen Mechanismus oder eine seltene Ausnahme darstellt, sondern in der Tat *in vivo* in zahlreichen Gehirnregionen vorzufinden ist.

4.3 Adcy1 und die Entwicklung des somatosensorischen Cortex

4.3.1 Identifizierung postnatal regulierter Gene

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Analyse von Genen, deren mRNA im zeitlichen Verlauf der Entwicklung der Fäßchenfelder reguliert wird und die daher vielversprechende Kandidaten für eine Beteiligung an der Ausbildung dieser Strukturen sind. Nach einer genomweiten Vorselektion von Kandidatengenen durch Microarray-Analysen konnte für insgesamt sechs Gene eine Heraufregulation im somatosensorischen Cortex

während der Ausbildung der neuroanatomisch sichtbaren Fäßchen (P5-P13) durch quantitative Real-Time-PCR bzw. Northern-Blot-Analyse bestätigt werden. Diese sechs Kandidatengene sind *c-fos*, *Nrgn*, *Centg3*, *Lynx1*, sowie die beiden ESTs AI837604 und AI639670.

Von diesen sechs Kandidaten war **c-fos** mit einem >25fachen Anstieg der mRNA-Menge von P5 bis P13 das am stärksten regulierte Gen. Zudem legen frühere Befunde eine mögliche Beteiligung von *c-fos* an der Ausbildung der corticalen Fäßchenfelder nahe, weshalb *c-fos* als Kandidat für die nähere funktionelle Charakterisierung ausgewählt wurde (siehe nachfolgender Abschnitt).

Nrgn (Neurogranin, auch bekannt als RC3) ist ein CaM-bindendes PKC-Substrat (Represa et al., 1990). Eine Expression und postnatale Heraufregulation in mehreren Hirnregionen, darunter insbesondere Schicht 4 des somatosensorischen Cortex wurde bereits früher beobachtet (Alvarez-Bolado et al., 1996). Verschiedene weitere Hinweise legen eine Beteiligung von *Nrgn* an der Entwicklung der Fäßchenfelder nahe. (1) *Nrgn* ist wie GAP-43 (growth-associated protein 43) ein im Cortex exprimiertes primäres PKC-Substrat. Gezielte Zerstörung des GAP-43-Gens führt zu Störungen bei der Ausbildung somatotopischer Karten und hat insbesondere das Fehlen von Fäßchen im somatosensorischen Cortex zur Folge (Maier et al., 1999). (2) *Nrgn* bindet CaM und wirkt als Modulator der CaMKII, die ihrerseits an Mechanismen der erfahrungsabhängigen Neuroplastizität im Cortex beteiligt ist (Glazewski et al., 1996). (3) Die Auswirkungen einer gezielten Zerstörung des *Nrgn*-Gens auf die Neuroanatomie des Fäßchencortex sind nicht bekannt. Es gibt jedoch bemerkenswerte Parallelen zwischen den in *Nrgn*^{-/-}-Mäusen beschriebenen Beeinträchtigungen der synaptischen Plastizität und des räumlichen Lernens (Pak et al., 2000; Krucker et al., 2002) und dem Phänotyp des *barrelless*-Stamms, bzw. einer gezielten Ausschaltung des Gens für die CaM-regulierten *Adcy1* (Wu et al., 1995). Im Zusammenhang mit der in der vorliegenden Studie bestätigten entwicklungspezifischen Heraufregulation von P5 bis P13 sollte daher ein Zusammenhang zwischen *Nrgn* und der Fäßchenentwicklung in weiteren Studien näher untersucht werden. Ein wichtiger erster Schritt wäre die Charakterisierung der Ausbildung von Fäßchenfeldern in existierenden *Nrgn*-defizienten Stämmen.

Centaurine agieren als Mediatoren zwischen Phosphoinositid-3-Kinase und Arf-abhängigen Signalwegen (Jackson et al., 2000). Centaurin $\gamma 3$ (**Centg3**) als Mitglied dieser Genfamilie wurde bisher funktionell nicht näher charakterisiert, sondern ist nur als Eintrag in Sequenzdatenbanken vorhanden und ist damit streng genommen den neuen Genen zuzurechnen. Jedoch erscheint grundsätzlich eine Beteiligung von Centaurinen an der Entwicklung des somatosensorischen Cortex nicht unwahrscheinlich, denn durch Fehlentwicklung des Fäßchencortex in Phospholipase C- $\beta 1$ -defizienten Mäusen wurde die Notwendigkeit einer funktionsfähigen Phosphoinositidkaskade für die korrekte Ausbildung der Fäßchenstrukturen

demonstriert (Hannan et al., 2001). Nach vorläufigen Ergebnissen (nicht gezeigt, GenePaint Set MH477) wird *Centg3* im embryonalen Cortex schichtspezifisch exprimiert und liefert damit ebenfalls einen guten Ausgangspunkt für weitere Studien.

Lynx1 ist ein endogenes Protoneurotoxin, das strukturelle Ähnlichkeiten mit bestimmten Schlangentoxinen aufweist und mit hoher Affinität an nicotinische Acetylcholinrezeptoren bindet (Miwa et al., 1999; Ibanez-Tallon et al., 2002). Es wird jedoch überwiegend in Projektionsneuronen der corticalen Schicht 5 exprimiert, weshalb es vermutlich höchstens indirekt an der Ausbildung der Fäßchenfelder beteiligt ist.

Zwei vollständig neue Gene, **AI837604** und **AI639670** wurden ebenfalls als postnatal heraufreguliert bestätigt. AI837604 ist nur als *expressed sequence tag* mit einer Sequenzlänge von 265 nt beschrieben und wäre daher weiteren Analysen nur nach näherer molekularbiologischer Charakterisierung zugänglich. Ein Vergleich von AI639670 mit Sequenzdatenbanken ergibt, dass auf einer Länge von 327 Nukleotiden eine Ähnlichkeit von 86% zur mRNA des Proteins Myomegalin der Ratte besteht. In der Maus ist das entsprechende Gen bisher nicht beschrieben, so dass davon ausgegangen wird, dass es sich um das entsprechende Ortholog oder ein mit Myomegalin nahe verwandtes paralogenes Gen handelt. Myomegalin interagiert mit der cAMP-spezifischen Phosphodiesterase Pde4d (Verde et al., 2001), die ebenfalls im Cortex exprimiert wird (Iona et al., 1998). Wegen der aus der *barrelless*-Maus bekannten wichtigen Rolle des cAMP-Signalweges und der einfacheren experimentellen Zugänglichkeit wird von den beiden identifizierten neuen Genen AI837604 als der vielversprechendere Kandidat für weitere Untersuchungen bewertet.

4.3.2 Analyse der Beteiligung von c-Fos an der Entwicklung des somatosensorischen Cortex

In der vorliegenden Arbeit wurde, ausgehend von der beobachteten postnatalen Heraufregulation im Cortex, eine mögliche Beteiligung von c-Fos an der Ausbildung von Fäßchenstrukturen untersucht.

c-Fos ist ein Transkriptionsfaktor aus der Gruppe der IEGs (*immediate early genes*), der über eine bZIP-Domäne Heterodimere mit Transkriptionsfaktoren der Jun-Familie bildet und eine Hauptkomponente des AP (*activator protein*)-1-Transkriptionsfaktorkomplexes darstellt (Chiu et al., 1988; Glover und Harrison, 1995). Ursprünglich wurde c-Fos als humanes Homolog des viralen Onkogens *v-fos* des Finkel-Biskis-Jinkins(FBJ)-Osteosarkom-Virus identifiziert und wird daher auch als Protoonkogen bezeichnet (Barker et al., 1984). Molekulargenetische Analysen in der Maus zeigen eine wichtige Rolle für c-Fos in der Knochenentwicklung und Hämatopoese (Wang et al., 1992). In Neuronen ist c-Fos-vermittelte Transkriptionsaktivierung an der Umsetzung transienter Signale aus Oberflächenrezeptoren in dauerhafte

biochemische und cytoarchitektonische Änderungen beteiligt, indem die Expression von Struktur-, Wachstums- oder synaptischen Proteinen vermittelt wird (Herdegen und Leah, 1998). Eine Abwesenheit von c-Fos hat so beispielsweise Beeinträchtigungen von Langzeitgedächtnis und bestimmten Formen synaptischer Plastizität zur Folge (Fleischmann et al., 2003).

Im Hinblick auf die Entwicklung des somatosensorischen Cortex ist hervorzuheben, dass c-Fos aktivitätsabhängig im Fäßchenfeld von erwachsenen Ratten induziert werden kann (Melzer und Steiner, 1997) und die postnatale Entwicklung der Fäßchenfelder durch taktile Stimulation der Tasthaare wesentlich beeinflusst wird (Rice und Van der Loos, 1977). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab eine histologische Analyse durch Auswertung Nisslgefärbter Tangentialschnitte eine grundsätzlich nicht vom Wildtyp unterscheidbare Organisation der Fäßchen mit zellarmen inneren Bereichen und zellreichen Wänden. Auch die Topographie des gesamten Fäßchenfeldes war nicht verändert, das heißt die relative Größe einzelner Fäßchen und ihre Lage zueinander war nicht vom Wildtyp unterscheidbar.

Angesichts der beschriebenen Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von c-Fos an der Ausbildung des somatosensorischen Cortex überrascht die Beobachtung, dass die Abwesenheit von c-Fos phänotypisch ohne offensichtliche Folgen für die Entwicklung der Fäßchenfelder bleibt. Ein möglicher Grund hierfür liegt in der Redundanz innerhalb der Fos- und Jun-Proteinfamilien, deren Mitglieder die Hauptkomponenten der dimeren AP-1-Transkriptionsfaktorkomplexe stellen. Die Fos-Proteinfamilie hat mindestens vier, die Jun-Familie mindestens drei Mitglieder, und trotz einer großen Anzahl von molekularen Prozessen, an welchen AP-1-Komplexe beteiligt sind, weisen mehrere der bekannten *knockout*-Stämme unerwartet milde Phänotypen auf (Jochum et al., 2001). Ein bezeichnendes Beispiel im Hinblick auf c-Fos ist hier die Beobachtung, dass c-Fos einerseits durch Aktivierung in T-Zellen des Immunsystems induzierbar ist und die Expression wichtiger Cytokine wie Interleukin-2 reguliert, andererseits jedoch eine c-Fos-Defizienz die Differenzierung von Thymocyten und die Aktivität peripherer T-Zellen nicht beeinträchtigt (Jain et al., 1994). Im Rattenmodell gibt es Hinweise, dass im visuellen Cortex, der strukturell und funktionell Parallelen zum somatosensorischen Cortex aufweist, neben c-Fos mindestens ein weiteres Mitglied der Fos-Familie, FosB, aktivitätsabhängig exprimiert wird (Kaminska et al., 1996).

Zusammenfassend wird festgehalten, dass die Redundanz innerhalb der Genfamilie der Fos-Proteine eine besondere Herausforderung bei der Definition der genauen Funktion der einzelnen Mitglieder darstellt. Bezüglich der Entwicklung des somatosensorischen Cortex in c-Fos-defizienten Mäusen sollte daher eine mögliche kompensatorische Rolle weiterer Fos-Proteine näher untersucht werden.

4.3.3 Identifizierung *barrelless*-abhängig regulierter Transkripte

Im Gegensatz zu mehreren entwicklungsabhängig regulierten Genen konnte mit Sequenz 111331_at nur für ein Transkript eine Regulation in Abhängigkeit vom *barrelless*-Genotyp bestätigt werden. Ausgehend von der Annahme, dass im *barrelless*-Stamm eine transkriptionelle Fehlregulation nachgeschalteter Gene durch eine defekte *Adcy1* verursacht wird, erstaunt das für 111331_at beobachtete Regulationsschema. Für ein aktiv an der Bildung der Fäßchenstrukturen beteiligtes Gen wurde eine verminderte Expression in der Mutante erwartet. Das in *barrelless*-Mäusen bis zu sechsfach (P13) erhöhte Expressionsniveau deutet jedoch, falls es ursächlich für den Phänotyp sein sollte, auf ein Genprodukt hin, das störend in die Entwicklung eingzugreifen vermag.

Der Sequenzabschnitt 111331_at wurde in Datenbanken ursprünglich als nicht-codierender mRNA-Abschnitt des Gens *Enc-1* (Hernandez et al., 1997) interpretiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch experimentell widerlegt werden, dass *Enc-1* entsprechend dem für 111331_at beobachteten Schema reguliert wurde.

Insgesamt finden sich bei einem BLAST-Vergleich (Altschul et al., 1997) mit dem Mausgenom allein 198 Abschnitte, die über eine Länge von mindestens 240 Nukleotiden mehr als 90% Übereinstimmung mit 111331_at aufweisen, so dass eine Zuordnung des Transkripts zu einem bestimmten Locus schwierig erscheint. Ein Vergleich mit bekannten repetitiven DNA-Elementen ergibt, dass 111331_at über die gesamte Länge mehr als 96% Sequenzidentität mit GenBank-Eintrag X15598 hat, einem *early transposon* (ETn), das in zahlreichen Kopien im Mausgenom vorhanden ist (Shell et al., 1990).

Die *barrelless*-Mutation ist auf eine ETn-Insertion in das *Adcy1*-Gen zurückzuführen, die in der Abwesenheit von *Adcy1*-Enzymaktivität resultiert (Abdel-Majid et al., 1998). In der *barrelless*-Maus sind jedoch mindestens zwei mRNA-Spezies vorhanden, die Hybridsequenzen aus verkürzten Teilabschnitten der *Adcy1*-mRNA und ETn-Sequenz sind (Abdel-Majid et al., 1998; Leong et al., 2000).

Aufgrund der hier vorliegenden Daten wird davon ausgegangen, dass es sich bei 111331_at um einen Teilabschnitt einer ETn-Sequenz handelt. Das im Wildtyp konstant vorhandene Expressionsniveau wird auf anderweitig exprimierte ETn-Abschnitte zurückgeführt. Der postnatale Expressionsanstieg von 111331_at im *barrelless*-Cortex kann naheliegend durch die vorhandenen aberranten *Adcy1*-mRNA-Spezies erklärt werden. Zwar ist in der Mutante eine entwicklungspezifische Heraufregulation vorhanden, jedoch ohne direkte funktionelle Relevanz, da die natürlich entstandene *barrelless*-Mutation in allen untersuchten Aspekten phänotypisch identisch mit einer gezielten Mutation des *Adcy1*-Locus ist (Abdel-Majid et al., 1998). Es gibt daher mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen Zusammenhang zwischen der Expression von 111331_at und der Fäßchenentwicklung, Schwerpunkte einer weiteren experi-

mentellen Bearbeitung sollten daher die in dieser Arbeit identifizierten entwicklungsbiologisch regulierten Kandidaten bilden.

4.3.4 Einfluss von Adcy1 auf die Cortexentwicklung

Wie in der Einleitung dargelegt, ist Adcy1 im Cortex sowohl prä- wie auch postsynaptisch einerseits an der Integration mehrerer vorgeschalteter Signalwege beteiligt, andererseits übt cAMP potentiell vielfältige Effektorfunktionen aus. Insbesondere die Fähigkeit von Adcy1, über cAMP, PKA, MAP-Kinasen und CREB die gezielte Transkription von nachgeschalteten Genen zu steuern, eröffnet die Möglichkeit, dass der *barrelless*- bzw. *Adcy1*^{-/-}-Phänotyp auf die transkriptionelle Fehlregulation nachgeschalteter Effektorgene zurückzuführen ist. Diese Idee wurde bereits im Zusammenhang mit der ursprünglichen Entdeckung von *Adcy1*^{br1} als Auslöser des *barrelless*-Phänotyps formuliert (Abdel-Majid et al., 1998). Gleichzeitig wurden jedoch alternative Mechanismen vorgeschlagen. Beispielsweise kann PKA neben dem MAP-Kinase-Signalweg durch Phosphorylierung auch andere Signalwege direkt beeinflussen. cAMP kann, vermutlich ohne Beteiligung transkriptioneller Mechanismen, direkt das Auswachsen neuronaler Fortsätze stimulieren (Song et al., 1997) und könnte so die Konnektivität im entstehenden Fäßchenfeld entscheidend beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen genomischer Untersuchungen, abgesehen von einer ETn-Sequenz (vgl. voriger Abschnitt), keine *Adcy1*-abhängigen Änderungen des Expressionsprofils im *barrelless*-Cortex bestätigt, welche den von Abdel-Majid et al. (1998) vorgeschlagenen transkriptionsbasierten Mechanismus unterstützen könnten, so dass weiterhin offen bleibt, ob und inwiefern *Adcy1*-vermittelte Expression nachgeschalteter Gene für die Entwicklung des Fäßchencortex relevant ist. Unabhängig von dieser Arbeit veröffentlichte Ergebnisse liefern jedoch Hinweise, dass vor allem transkriptionsunabhängige Ereignisse wichtig für die Ausbildung des Fäßchencortex sind.

Im Zusammenhang mit synaptischer Plastizität spielen neben Glutamatrezeptoren vom NMDA-Typ vor allem solche vom AMPA-Typ eine wichtige Rolle für LTP und LTD, die wichtigsten zellulären Modelle für Lernen und Gedächtnis (Zamanillo et al., 1999). Ein für das Zustandekommen synaptischer Plastizität entscheidender Schritte ist dabei die Rekrutierung von AMPA-Rezeptoren zur Synapse (Ehlers, 2000), die durch gezielte Phosphorylierung der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR1 bewirkt wird (Lee et al., 2003). Der entscheidende Phosphorylierungsschritt wird seinerseits durch die cAMP-aktivierte Proteinkinase PKA vermittelt (Esteban et al., 2003), so dass hier ein möglicher Zusammenhang zwischen Adenylatcyclasen und synaptischer Plastizität naheliegt. Eine Überprüfung der *barrelless*-Mutante ergab, dass in der Tat die PKA-abhängige Phosphorylierung der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR1 in der Mutante deutlich reduziert ist. In Folge ist, wahrschein-

lich bedingt durch das Ausbleiben phosphorylierungsabhängiger Rekrutierung von AMPA-Rezeptoren zur Synapse, die Menge an oberflächenexprimiertem GluR1 in Synapsen der *barrelless*-Maus ebenfalls reduziert (Lu et al., 2003). Die resultierende Abweichung im Verhältnis von synaptischen NMDA- und AMPA-Rezeptoren spielt vermutlich eine wesentliche Rolle bei den bereits früher beobachteten Beeinträchtigungen von LTP in Abwesenheit von *Adcy1* (Wu et al., 1995; Storm et al., 1998). Im Hinblick auf die fehlerhafte Ausbildung des somatosensorischen Cortex in der *barrelless*-Maus zeigt die Arbeit von Lu et al. (2003) jedoch vor allem eine wichtige Möglichkeit auf, wie auch ohne ursächliche Beteiligung transkriptionsabhängiger Ereignisse die Neuroplastizität des Fäßchenfeldes beeinflusst werden kann.

5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
Adcy	Adenylatcyclase
AMPA	a-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AP-1	Aktivatorprotein-1-Komplex
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	<i>bitmap</i> -Format
brl	<i>barrelless</i>
CA	<i>cornu ammonis</i> (Ammonshorn)
Caln	Calcineurin
CaM	Calmodulin
CamK	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
Centg3	Centaurin $\gamma 3$
c-Fos	<i>cellular FBJ-osteosarcoma oncogene</i>
µCi	Mikro-Curie
CRE	cAMP-responsives Element
CREB	CRE-bindendes Protein
C _T	<i>threshold cycle</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
E	embryonaler Tag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF1 α	Elongationsfaktor 1 α
Enc-1	<i>ectodermal-neural cortex 1</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
EtOH	Ethanol
ETn	<i>early transposon</i>
FBJ	Finkel-Biskis-Jinkins
FPX	<i>FlashPix</i> -Format
G $\beta\gamma$	$\beta\gamma$ -Untereinheit der G-Proteine
GB	Gigabyte

gDNA	genomische DNA
Gi α	inhibitorische α -Untereinheit der G-Proteine
GluR1	Glutamatrezeptor-Untereinheit 1
Gpp(NH)p	5'-Guanylyl-imido-diphosphate
G-Proteine	GTP-bindende Proteine
Gs α	stimulatorische α -Untereinheit der G-Proteine
GTP	Guanosintriphosphat
HTML	<i>hypertext mark-up language</i>
ID	Identifikationsnummer
IEG	<i>immediate early gene</i>
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
JPEG	<i>Joint Photographers Expert Group</i> -Format
LacZ	Teilabschnitt des β -Galaktosidasegens
LTP	Langzeitpotenzierung
Lynx1	Ly6/neurotoxin 1
M	Mol pro Liter
MAPK	Mitogen-aktivierte Kinase
MB	Megabyte
Min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	3-[N-Morpholino]Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
ng	Nanogramm
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
Nrgn	Neurogranin
P	postnataler Tag
PBS	Phosphatpuffer, salzhaltig
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PP2A	Proteinphosphatase 2A
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender PCR
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Sp6	Sp6-Bakteriophagen-Promoter
SQ	Startquantität
SSC	Natrium-Citratpuffer, salzhaltig
T/B	Tyramide/Biotin
T7	T7-Bakteriophagen-Promoter
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Puffer, EDTA-haltig
TIFF	<i>tagged image file</i> -Format
U	<i>unit</i> (Einheit)
vs.	versus
ZNS	Zentralnervensystem

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdel-Majid RM, Leong WL, Schalkwyk LC, Smallman DS, Wong ST, Storm DR, Fine A, Dobson MJ, Guernsey DL, Neumann PE (1998) Loss of adenylyl cyclase I activity disrupts patterning of mouse somatosensory cortex. *Nat Genet* 19:289-291.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
- Alvarez-Bolado G, Rodriguez-Sanchez P, Tejero-Diez P, Fairen A, Diez-Guerra FJ (1996) Neurogranin in the development of the rat telencephalon. *Neuroscience* 73:565-580.
- Andres V, Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1992) Clox, a mammalian homeobox gene related to *Drosophila cut*, encodes DNA-binding regulatory proteins differentially expressed during development. *Development* 116:321-334.
- Antoni FA, Palkovits M, Simpson J, Smith SM, Leitch AL, Rosie R, Fink G, Paterson JM (1998) Ca²⁺/calcineurin-inhibited adenylyl cyclase, highly abundant in forebrain regions, is important for learning and memory. *J Neurosci* 18:9650-9661.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25:25-29.
- Avery OT, Macleod CM, McCarty M (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J Exp Med* 79:137-158.
- Bakalyar HA, Reed RR (1990) Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science* 250:1403-1406.

- Baker LP, Nielsen MD, Impey S, Hacker BM, Poser SW, Chan MY, Storm DR (1999) Regulation and immunohistochemical localization of betagamma-stimulated adenylyl cyclases in mouse hippocampus. *J Neurosci* 19:180-192.
- Bard JL, Kaufman MH, Dubreuil C, Brune RM, Burger A, Baldock RA, Davidson DR (1998) An internet-accessible database of mouse developmental anatomy based on a systematic nomenclature. *Mech Dev* 74:111-120.
- Barker PE, Rabin M, Watson M, Breg WR, Ruddle FH, Verma IM (1984) Human c-fos oncogene mapped within chromosomal region 14q21----q31. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:5826-5830.
- Barth AL, McKenna M, Glazewski S, Hill P, Impey S, Storm D, Fox K (2000) Upregulation of cAMP response element-mediated gene expression during experience-dependent plasticity in adult neocortex. *J Neurosci* 20:4206-4216.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2003) GenBank. *Nucleic Acids Res* 31:23-27.
- Berger AJ, Hart AC, Kaplan JM (1998) G alphas-induced neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 18:2871-2880.
- Blake JA, Richardson JE, Bult CJ, Kadin JA, Eppig JT (2003) MGD: the Mouse Genome Database. *Nucleic Acids Res* 31:193-195.
- Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1474.
- Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR (1999) Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:79-84.
- Cali JJ, Parekh RS, Krupinski J (1996) Splice variants of type VIII adenylyl cyclase. Differences in glycosylation and regulation by Ca^{2+} /calmodulin. *J Biol Chem* 271:1089-1095.
- Cali JJ, Zwaagstra JC, Mons N, Cooper DM, Krupinski J (1994) Type VIII adenylyl cyclase. A Ca^{2+} /calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain. *J Biol Chem* 269:12190-12195.
- Carson JP, Thaller C, Eichele G (2002) A transcriptome atlas of the mouse brain at cellular resolution. *Curr Opin Neurobiol* 12:562-565.
- Cases O, Vitalis T, Seif I, De Maeyer E, Sotelo C, Gaspar P (1996) Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron* 16:297-307.
- Chargaff E (1950) Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymic degradation. *Experientia* 6:201.

- Chern Y (2000) Regulation of adenylyl cyclase in the central nervous system. *Cell Signal* 12:195-204.
- Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M (1988) The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54:541-552.
- Choi EJ, Xia Z, Storm DR (1992a) Stimulation of the type III olfactory adenylyl cyclase by calcium and calmodulin. *Biochemistry* 31:6492-6498.
- Choi EJ, Wong ST, Hinds TR, Storm DR (1992b) Calcium and muscarinic agonist stimulation of type I adenylyl cyclase in whole cells. *J Biol Chem* 267:12440-12442.
- Cooper DM, Mons N, Karpen JW (1995) Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* 374:421-424.
- Crick FHC, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin RJ (1961) General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192:1227-1232.
- Davidson D, Baldock R (2001) Bioinformatics beyond sequence: mapping gene function in the embryo. *Nat Rev Genet* 2:409-417.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396:474-477.
- Ehlers MD (2000) Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28:511-525.
- Erzurumlu RS, Kind PC (2001) Neural activity: sculptor of 'barrels' in the neocortex. *Trends Neurosci* 24:589-595.
- Esteban JA, Shi SH, Wilson C, Nuriya M, Huganir RL, Malinow R (2003) PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat Neurosci* 6:136-143.
- Feinstein PG, Schrader KA, Bakalyar HA, Tang WJ, Krupinski J, Gilman AG, Reed RR (1991) Molecular cloning and characterization of a Ca²⁺/calmodulin-insensitive adenylyl cyclase from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10173-10177.
- Fleischmann A, Hvalby O, Jensen V, Strekalova T, Zacher C, Layer LE, Kvello A, Reschke M, Spanagel R, Sprengel R, Wagner EF, Gass P (2003) Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. *J Neurosci* 23:9116-9122.
- Franklin RE, Gosling RG (1953) Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* 171:740-741.
- Gao BN, Gilman AG (1991) Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10178-10182.

- Gawantka V, Pollet N, Delius H, Vingron M, Pfister R, Nitsch R, Blumenstock C, Niehrs C (1998) Gene expression screening in *Xenopus* identifies molecular pathways, predicts gene function and provides a global view of embryonic patterning. *Mech Dev* 77:95-141.
- Gerfen CR (1984) The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature* 311:461-464.
- Glatt CE, Snyder SH (1993) Cloning and expression of an adenylyl cyclase localized to the corpus striatum. *Nature* 361:536-538.
- Glazewski S, Chen CM, Silva A, Fox K (1996) Requirement for alpha-CaMKII in experience-dependent plasticity of the barrel cortex. *Science* 272:421-423.
- Glover JN, Harrison SC (1995) Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 373:257-261.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274:546, 563-547.
- Gong S, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, Schambra UB, Nowak NJ, Joyner A, Leblanc G, Hatten ME, Heintz N (2003) A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425:917-925.
- Hannan AJ, Blakemore C, Katsnelson A, Vitalis T, Huber KM, Bear M, Roder J, Kim D, Shin HS, Kind PC (2001) PLC-beta1, activated via mGluRs, mediates activity-dependent differentiation in cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4:282-288.
- Hanoune J, Defer N (2001) Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:145-174.
- Hellevoet K, Yoshimura M, Mons N, Hoffman PL, Cooper DM, Tabakoff B (1995) The characterization of a novel human adenylyl cyclase which is present in brain and other tissues. *J Biol Chem* 270:11581-11589.
- Herdegen T, Leah JD (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* 28:370-490.
- Hernandez MC, Andres-Barquin PJ, Martinez S, Bulfone A, Rubenstein JL, Israel MA (1997) ENC-1: a novel mammalian kelch-related gene specifically expressed in the nervous system encodes an actin-binding protein. *J Neurosci* 17:3038-3051.
- Herzig U, Cadenas C, Sieckmann F, Sierralta W, Thaller C, Visel A, Eichele G (2001) Development of high-throughput tools to unravel the complexity of gene expression patterns in the mammalian brain. *Novartis Found Symp* 239:129-146.

- Houslay MD, Milligan G (1997) Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci* 22:217-224.
- Howell BW, Hawkes R, Soriano P, Cooper JA (1997) Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 389:733-737.
- Ibanez-Tallon I, Miwa JM, Wang HL, Adams NC, Crabtree GW, Sine SM, Heintz N (2002) Novel modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by association with the endogenous prototoxin lynx1. *Neuron* 33:893-903.
- Iona S, Cuomo M, Bushnik T, Naro F, Sette C, Hess M, Shelton ER, Conti M (1998) Characterization of the rolipram-sensitive, cyclic AMP-specific phosphodiesterases: identification and differential expression of immunologically distinct forms in the rat brain. *Mol Pharmacol* 53:23-32.
- Ishikawa Y, Katsushika S, Chen L, Halnon NJ, Kawabe J, Homcy CJ (1992) Isolation and characterization of a novel cardiac adenylylcyclase cDNA. *J Biol Chem* 267:13553-13557.
- Iwasato T, Datwani A, Wolf AM, Nishiyama H, Taguchi Y, Tonegawa S, Knopfel T, Erzurumlu RS, Itohara S (2000) Cortex-restricted disruption of NMDAR1 impairs neuronal patterns in the barrel cortex. *Nature* 406:726-731.
- Jackson TR, Kearns BG, Theibert AB (2000) Cytohesins and centaurins: mediators of PI 3-kinase-regulated Arf signaling. *Trends Biochem Sci* 25:489-495.
- Jain J, Nalefski EA, McCaffrey PG, Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou V, Rao A (1994) Normal peripheral T-cell function in c-Fos-deficient mice. *Mol Cell Biol* 14:1566-1574.
- Jochum W, Passegue E, Wagner EF (2001) AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* 20:2401-2412.
- Kaminska B, Kaczmarek L, Chaudhuri A (1996) Visual stimulation regulates the expression of transcription factors and modulates the composition of AP-1 in visual cortex. *J Neurosci* 16:3968-3978.
- Katsushika S, Chen L, Kawabe J, Nilakantan R, Halnon NJ, Homcy CJ, Ishikawa Y (1992) Cloning and characterization of a sixth adenylyl cyclase isoform: types V and VI constitute a subgroup within the mammalian adenylyl cyclase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8774-8778.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM (1998) A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282:2275-2279.
- Korswagen HC, van der Linden AM, Plasterk RH (1998) G protein hyperactivation of the *Caenorhabditis elegans* adenylyl cyclase SGS-1 induces neuronal degeneration. *Embo J* 17:5059-5065.

- Krauter K, Leinwand L, D'Eustachio P, Ruddle F, Darnell JE, Jr. (1982) Structural genes of the mouse major urinary protein are on chromosome 4. *J Cell Biol* 94:414-417.
- Krucker T, Siggins GR, McNamara RK, Lindsley KA, Dao A, Allison DW, De Lecea L, Lovenberg TW, Sutcliffe JG, Gerendasy DD (2002) Targeted disruption of RC3 reveals a calmodulin-based mechanism for regulating metaplasticity in the hippocampus. *J Neurosci* 22:5525-5535.
- Krupinski J, Lehman TC, Frankenfield CD, Zwaagstra JC, Watson PA (1992) Molecular diversity in the adenylyl cyclase family. Evidence for eight forms of the enzyme and cloning of type VI. *J Biol Chem* 267:24858-24862.
- Krupinski J, Coussen F, Bakalyar HA, Tang WJ, Feinstein PG, Orth K, Slaughter C, Reed RR, Gilman AG (1989) Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter- like structure. *Science* 244:1558-1564.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
- Lee HK, Takamiya K, Han JS, Man H, Kim CH, Rumbaugh G, Yu S, Ding L, He C, Petralia RS, Wenthold RJ, Gallagher M, Haganir RL (2003) Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* 112:631-643.
- Lee KW, Hong JH, Choi IY, Che Y, Lee JK, Yang SD, Song CW, Kang HS, Lee JH, Noh JS, Shin HS, Han PL (2002) Impaired d2 dopamine receptor function in mice lacking type 5 adenylyl cyclase. *J Neurosci* 22:7931-7940.
- Leong WL, Dobson MJ, Logsdon JM, Jr., Abdel-Majid RM, Schalkwyk LC, Guernsey DL, Neumann PE (2000) ETn insertion in the mouse *Adcy1* gene: transcriptional and phylogenetic analyses. *Mamm Genome* 11:97-103.
- Lu HC, Gonzalez E, Crair MC (2001) Barrel cortex critical period plasticity is independent of changes in NMDA receptor subunit composition. *Neuron* 32:619-634.
- Lu HC, She WC, Plas DT, Neumann PE, Janz R, Crair MC (2003) Adenylyl cyclase I regulates AMPA receptor trafficking during mouse cortical 'barrel' map development. *Nat Neurosci* 3:3.
- Maier DL, Mani S, Donovan SL, Soppet D, Tessarollo L, McCasland JS, Meiri KF (1999) Disrupted cortical map and absence of cortical barrels in growth-associated protein (GAP)-43 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9397-9402.
- Maltais LJ, Blake JA, Chu T, Lutz CM, Eppig JT, Jackson I (2002) Rules and guidelines for mouse gene, allele, and mutation nomenclature: a condensed version. *Genomics* 79:471-474.

- Matsuoka I, Suzuki Y, Defer N, Nakanishi H, Hanoune J (1997) Differential expression of type I, II, and V adenylyl cyclase gene in the postnatal developing rat brain. *J Neurochem* 68:498-506.
- Maxam AM, Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:560-564.
- Melzer P, Steiner H (1997) Stimulus-dependent expression of immediate-early genes in rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 380:145-153.
- Miwa JM, Ibanez-Tallon I, Crabtree GW, Sanchez R, Sali A, Role LW, Heintz N (1999) lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. *Neuron* 23:105-114.
- Mons N, Cooper DM (1994) Selective expression of one Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclase in dopaminergically innervated rat brain regions. *Brain Res Mol Brain Res* 22:236-244.
- Mons N, Decorte L, Jaffard R, Cooper DM (1998) Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclases, key integrators of cellular signalling. *Life Sci* 62:1647-1652.
- Myers EW, Sutton GG, Delcher AL, Dew IM, Fasulo DP, Flanigan MJ, Kravitz SA, Mobarry CM, Reinert KH, Remington KA, Anson EL, Bolanos RA, Chou HH, Jordan CM, Halpern AL, Lonardi S, Beasley EM, Brandon RC, Chen L, Dunn PJ, Lai Z, Liang Y, Nusskern DR, Zhan M, Zhang Q, Zheng X, Rubin GM, Adams MD, Venter JC (2000) A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science* 287:2196-2204.
- Nielsen MD, Chan GC, Poser SW, Storm DR (1996) Differential regulation of type I and type VIII Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclases by Gi-coupled receptors in vivo. *J Biol Chem* 271:33308-33316.
- Nirenberg MW, Leder P (1964) RNA codewords and protein synthesis. *Science* 145:1399-1407.
- Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K (1995) The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzus neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14:899-912.
- Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, Adachi J, Bono H, Kondo S, Nikaido I, Osato N, Saito R, Suzuki H, Yamanaka I, Kiyosawa H, Yagi K, Tomaru Y, Hasegawa Y, Nogami A, Schonbach C, Gojobori T, Baldarelli R, Hill DP, Bult C, Hume DA, Quackenbush J, Schriml LM, Kanapin A, Matsuda H, Batalov S, Beisel KW, Blake JA, Bradt D, Brusic V, et al. (2002) Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature* 420:563-573.
- Olianas MC, Ingianni A, Onali P (1998) Role of G protein betagamma subunits in muscarinic receptor-induced stimulation and inhibition of adenylyl cyclase activity in rat olfactory bulb. *J Neurochem* 70:2620-2627.
- Pak JH, Huang FL, Li J, Balschun D, Reymann KG, Chiang C, Westphal H, Huang KP (2000) Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependent protein

- kinase II, synaptic plasticity, and spatial learning: a study with knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11232-11237.
- Patel TB, Du Z, Pierre S, Cartin L, Scholich K (2001) Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* 269:13-25.
- Paterson JM, Smith SM, Harmar AJ, Antoni FA (1995) Control of a novel adenylyl cyclase by calcineurin. *Biochem Biophys Res Commun* 214:1000-1008.
- Pham TA, Impey S, Storm DR, Stryker MP (1999) CRE-mediated gene transcription in neocortical neuronal plasticity during the developmental critical period. *Neuron* 22:63-72.
- Premont RT, Chen J, Ma HW, Ponnappalli M, Iyengar R (1992) Two members of a widely expressed subfamily of hormone-stimulated adenylyl cyclases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9809-9813.
- Pruitt KD, Maglott DR (2001) RefSeq and LocusLink: NCBI gene-centered resources. *Nucleic Acids Res* 29:137-140.
- Ravary A, Muzerelle A, Herve D, Pascoli V, Ba-Charvet KN, Girault JA, Welker E, Gaspar P (2003) Adenylate cyclase 1 as a key actor in the refinement of retinal projection maps. *J Neurosci* 23:2228-2238.
- Represa A, Deloulme JC, Sensenbrenner M, Ben-Ari Y, Baudier J (1990) Neurogranin: immunocytochemical localization of a brain-specific protein kinase C substrate. *J Neurosci* 10:3782-3792.
- Reymond A, Marigo V, Yaylaoglu MB, Leoni A, Ucla C, Scamuffa N, Caccioppoli C, Dermitzakis ET, Lyle R, Banfi S, Eichele G, Antonarakis SE, Ballabio A (2002) Human chromosome 21 gene expression atlas in the mouse. *Nature* 420:582-586.
- Rice FL, Van der Loos H (1977) Development of the barrels and barrel field in the somatosensory cortex of the mouse. *J Comp Neurol* 171:545-560.
- Ringwald M, Eppig JT, Begley DA, Corradi JP, McCright IJ, Hayamizu TF, Hill DP, Kadin JA, Richardson JE (2001) The Mouse Gene Expression Database (GXD). *Nucleic Acids Res* 29:98-101.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (Krawetz S, Misener S, eds), pp 365-386. Totowa, NJ: Humana Press.
- Sakagami H, Sawamura Y, Kondo H (1995) Synchronous patchy pattern of gene expression for adenylyl cyclase and phosphodiesterase but discrete expression for G-protein in developing rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 33:185-191.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanger F, Coulson AR (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94:441-448.
- Schaefer ML, Wong ST, Wozniak DF, Muglia LM, Liauw JA, Zhuo M, Nardi A, Hartman RE, Vogt SK, Luedke CE, Storm DR, Muglia LJ (2000) Altered stress-induced anxiety in adenylyl cyclase type VIII-deficient mice. *J Neurosci* 20:4809-4820.
- Schuermans C, Guillemot F (2002) Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr Opin Neurobiol* 12:26-34.
- Shell BE, Collins JT, Elenich LA, Szurek PF, Dunnick WA (1990) Two subfamilies of murine retrotransposon ETn sequences. *Gene* 86:269-274.
- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S (1998) CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:127-148.
- Smit MJ, Verzijl D, Iyengar R (1998) Identity of adenylyl cyclase isoform determines the rate of cell cycle progression in NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15084-15089.
- Song HJ, Ming GL, Poo MM (1997) cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* 388:275-279.
- Spradling A, Penman S, Pardue ML (1975) Analysis of drosophila mRNA by in situ hybridization: sequences transcribed in normal and heat shocked cultured cells. *Cell* 4:395-404.
- Storm DR, Hansel C, Hacker B, Parent A, Linden DJ (1998) Impaired cerebellar long-term potentiation in type I adenylyl cyclase mutant mice. *Neuron* 20:1199-1210.
- Stoykova A, Gotz M, Gruss P, Price J (1997) Pax6-dependent regulation of adhesive patterning, R-cadherin expression and boundary formation in developing forebrain. *Development* 124:3765-3777.
- Swanson LW (1992) *Brain maps: structure of the rat brain*. Amsterdam: Elsevier.
- Tang WJ, Gilman AG (1991) Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science* 254:1500-1503.
- Tang WJ, Krupinski J, Gilman AG (1991) Expression and characterization of calmodulin-activated (type I) adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 266:8595-8603.
- Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W (1990) cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* 59:971-1005.
- Tissir F, Goffinet AM (2003) Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci* 4:496-505.
- Van der Loos H, Welker E, Dorfl J, Rumo G (1986) Selective breeding for variations in patterns of mystacial vibrissae of mice. Bilaterally symmetrical strains derived from ICR stock. *J Hered* 77:66-82.

- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351.
- Verde I, Pahlke G, Salanova M, Zhang G, Wang S, Coletti D, Onuffer J, Jin SL, Conti M (2001) Myomegalin is a novel protein of the golgi/centrosome that interacts with a cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J Biol Chem* 276:11189-11198.
- Villacres EC, Wu Z, Hua W, Nielsen MD, Watters JJ, Yan C, Beavo J, Storm DR (1995) Developmentally expressed Ca(2+)-sensitive adenylyl cyclase activity is disrupted in the brains of type I adenylyl cyclase mutant mice. *J Biol Chem* 270:14352-14357.
- Visel A, Ahdidan J, Eichele G (2003) A gene expression map of the mouse brain. Genepaint.org - A database of gene expression patterns. In: *Neuroscience Databases* (Koetter R, ed), pp 19-36. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Visel A, Thaller C, Eichele G (2004) GenePaint.org: An Atlas of Gene Expression Patterns in the Mouse Embryo. *Nucleic Acids Res.* (*in press*)
- Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Mohle-Steinlein U, Ruther U, Wagner EF (1992) Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* 360:741-745.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, et al. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-562.
- Watson JD, Crick FHC (1953) Molecular structure of Nucleic Acids. *Nature* 171:737-738.
- Watson PA, Krupinski J, Kempinski AM, Frankenfield CD (1994) Molecular cloning and characterization of the type VII isoform of mammalian adenylyl cyclase expressed widely in mouse tissues and in S49 mouse lymphoma cells. *J Biol Chem* 269:28893-28898.
- Wayman GA, Impey S, Storm DR (1995) Ca²⁺ inhibition of type III adenylyl cyclase in vivo. *J Biol Chem* 270:21480-21486.
- Wei F, Qiu CS, Kim SJ, Muglia L, Maas JW, Pineda VV, Xu HM, Chen ZF, Storm DR, Muglia LJ, Zhuo M (2002) Genetic elimination of behavioral sensitization in mice lacking calmodulin-stimulated adenylyl cyclases. *Neuron* 36:713-726.

- Wei J, Wayman G, Storm DR (1996) Phosphorylation and inhibition of type III adenylyl cyclase by calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *J Biol Chem* 271:24231-24235.
- Wei J, Zhao AZ, Chan GC, Baker LP, Impey S, Beavo JA, Storm DR (1998) Phosphorylation and inhibition of olfactory adenylyl cyclase by CaM kinase II in Neurons: a mechanism for attenuation of olfactory signals. *Neuron* 21:495-504.
- Welker C (1976) Receptive fields of barrels in the somatosensory neocortex of the rat. *J Comp Neurol* 166:173-189.
- Welker E, Armstrong-James M, Bronchti G, Ourednik W, Gheorghita-Baechler F, Dubois R, Guernsey DL, Van der Loos H, Neumann PE (1996) Altered sensory processing in the somatosensory cortex of the mouse mutant barrelless. *Science* 271:1864-1867.
- Wheeler DL, Chappey C, Lash AE, Leipe DD, Madden TL, Schuler GD, Tatusova TA, Rapp BA (2000) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 28:10-14.
- Wong ST, Athos J, Figueroa XA, Pineda VV, Schaefer ML, Chavkin CC, Muglia LJ, Storm DR (1999) Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron* 23:787-798.
- Woolsey TA, Van der Loos H (1970) The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* 17:205-242.
- Wu Z, Wong ST, Storms DR (1993) Modification of the calcium and calmodulin sensitivity of the type I adenylyl cyclase by mutagenesis of its calmodulin binding domain. *J Biol Chem* 268:23766-23768.
- Wu ZL, Thomas SA, Villacres EC, Xia Z, Simmons ML, Chavkin C, Palmiter RD, Storm DR (1995) Altered behavior and long-term potentiation in type I adenylyl cyclase mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:220-224.
- Wurmbach E, Gonzalez-Maeso J, Yuen T, Ebersole BJ, Mastaitis JW, Mobbs CV, Sealton SC (2002) Validated genomic approach to study differentially expressed genes in complex tissues. *Neurochem Res* 27:1027-1033.
- Xia Z, Storm DR (1997) Calmodulin-regulated adenylyl cyclases and neuromodulation. *Curr Opin Neurobiol* 7:391-396.
- Xia ZG, Refsdal CD, Merchant KM, Dorsa DM, Storm DR (1991) Distribution of mRNA for the calmodulin-sensitive adenylyl cyclase in rat brain: expression in areas associated with learning and memory. *Neuron* 6:431-443.
- Yan C, Zhao AZ, Bentley JK, Loughney K, Ferguson K, Beavo JA (1995) Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9677-9681.

- Yoshimura M, Cooper DM (1992) Cloning and expression of a Ca(2+)-inhibitable adenylyl cyclase from NCB-20 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6716-6720.
- Yoshimura M, Ikeda H, Tabakoff B (1996) mu-Opioid receptors inhibit dopamine-stimulated activity of type V adenylyl cyclase but enhance dopamine-stimulated activity of type VII adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 50:43-51.
- Zaki PA, Quinn JC, Price DJ (2003) Mouse models of telencephalic development. *Curr Opin Genet Dev* 13:423-437.
- Zamanillo D, Sprengel R, Hvalby O, Jensen V, Burnashev N, Rozov A, Kaiser KM, Koster HJ, Borchardt T, Worley P, Lubke J, Frotscher M, Kelly PH, Sommer B, Andersen P, Seeburg PH, Sakmann B (1999) Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* 284:1805-1811.

APPENDIX 1

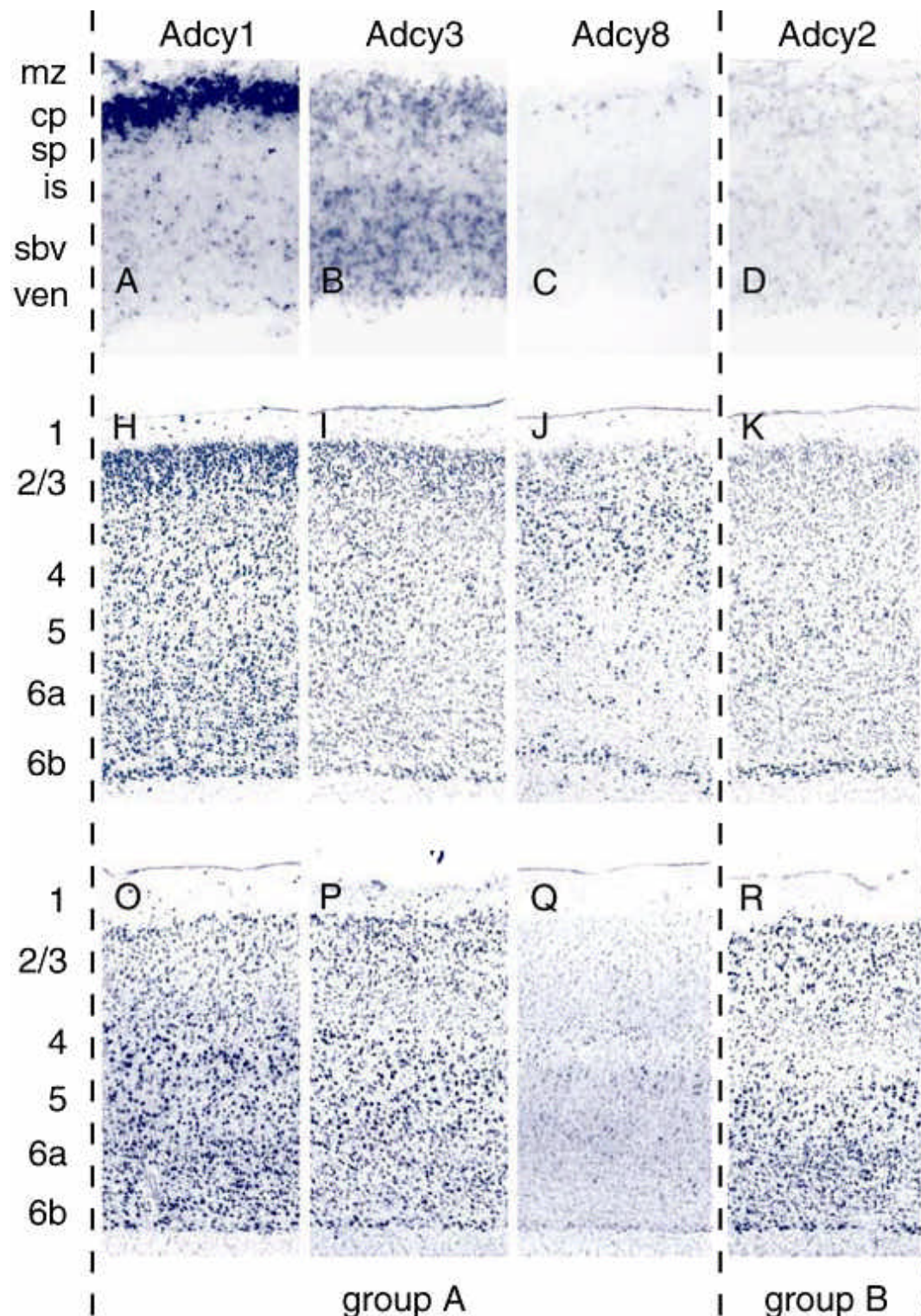
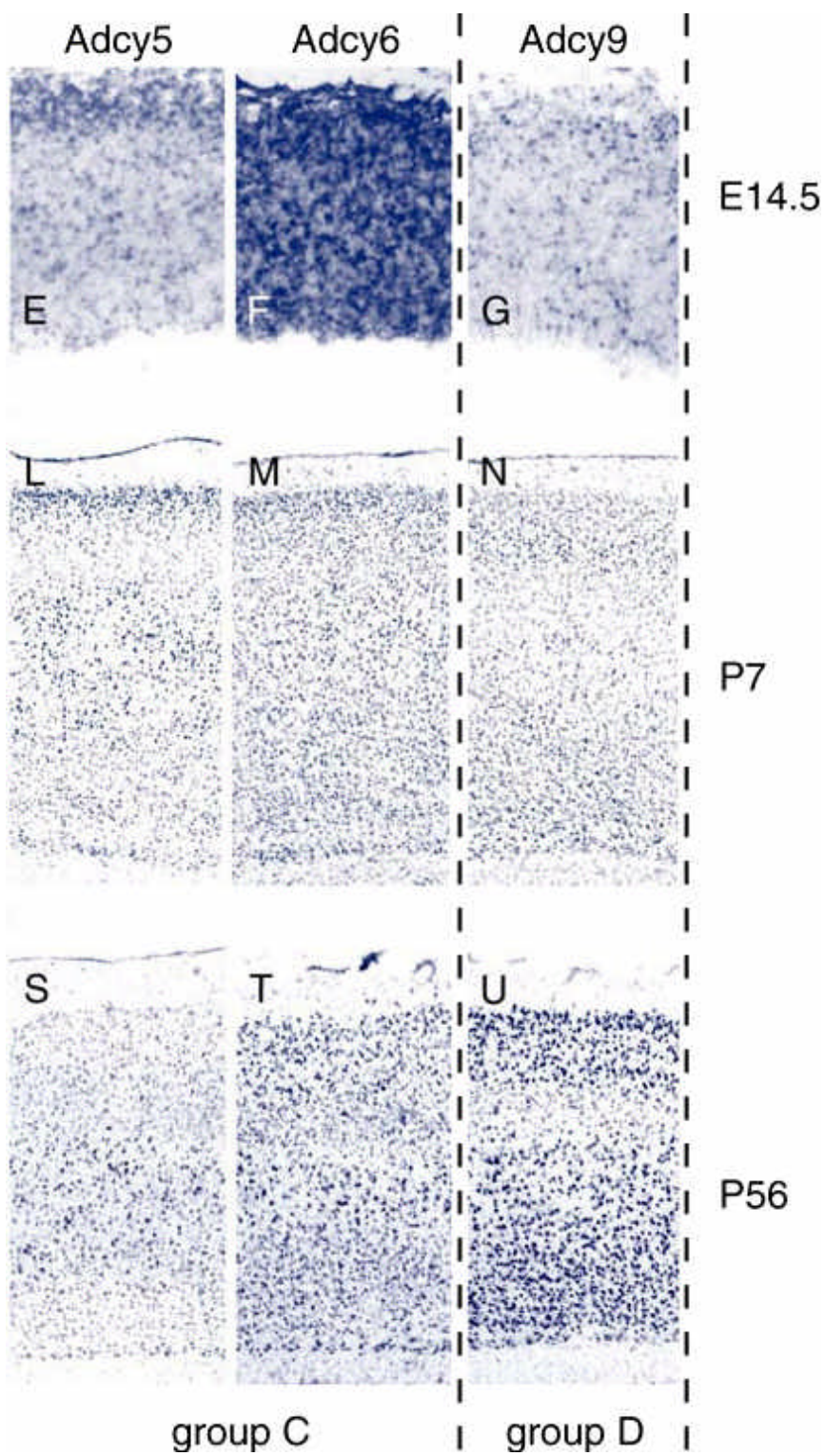


Abb. 3.12 (vergrößerte Darstellung): Schichtspezifische Expression der Adenylatcyclasen im Cortex. (A-G) Expressionsmuster in sagittalen Schnitten des Cortex bei E14.5 (H-N) Expressionsmuster in sagittalen Schnitten des Gehirns an P7. (O-U) Expressionsmuster in sagittalen Schnitten des erwachsenen Gehirns. Ausführliche Beschreibung im Text. mz – Marginalzone, cp – Corticalplatte, sp – Subplatte, is – Intermediärschicht, sbv – Subventrikulärzone, ven - Ventrikulärzone, 1, 2/3, 4, 5, 6a, 6b - Schichten des postnatalen Cortex. (Abbildung fortgesetzt auf Seite 111)



(anzufügen an Seite 110)

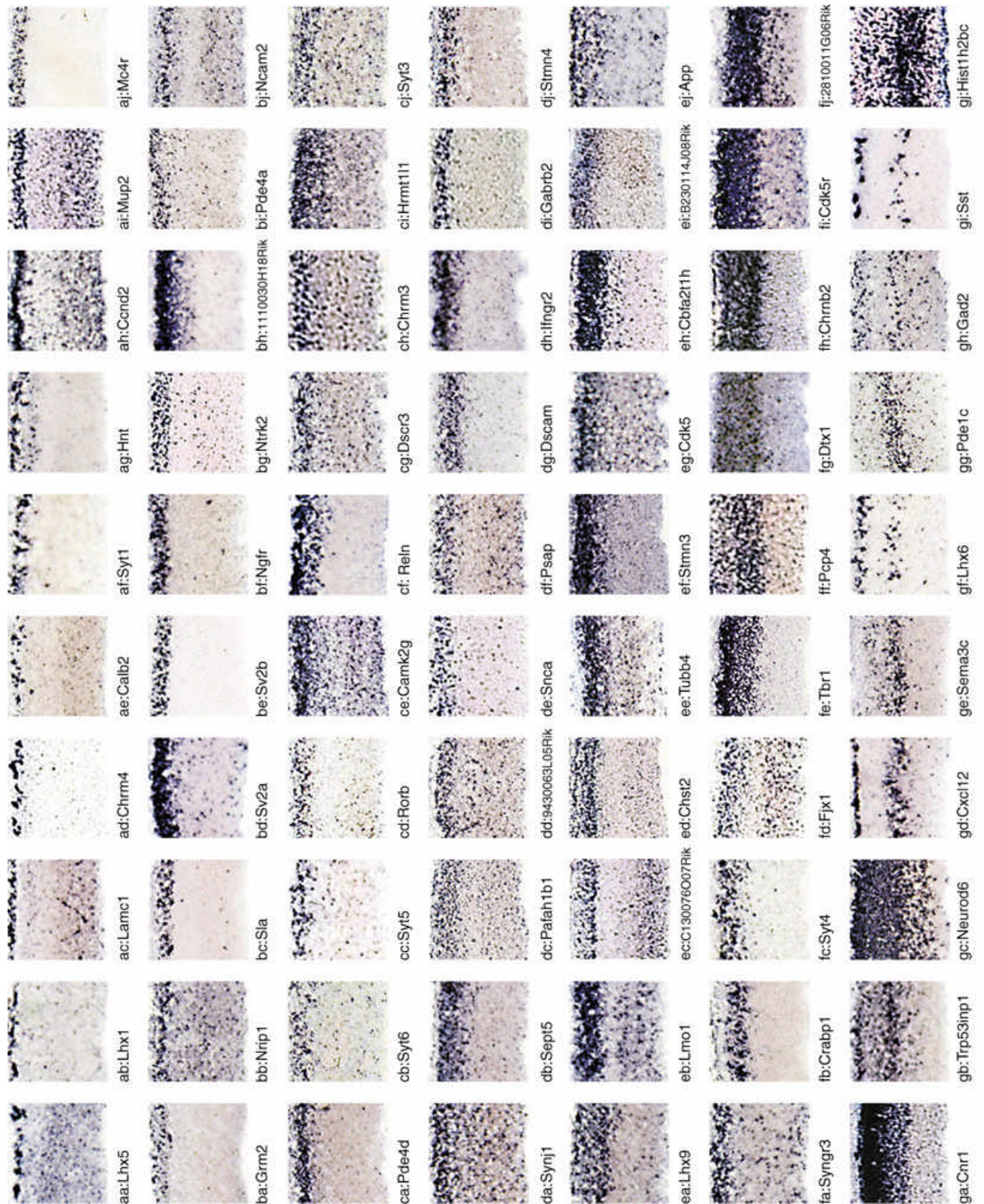
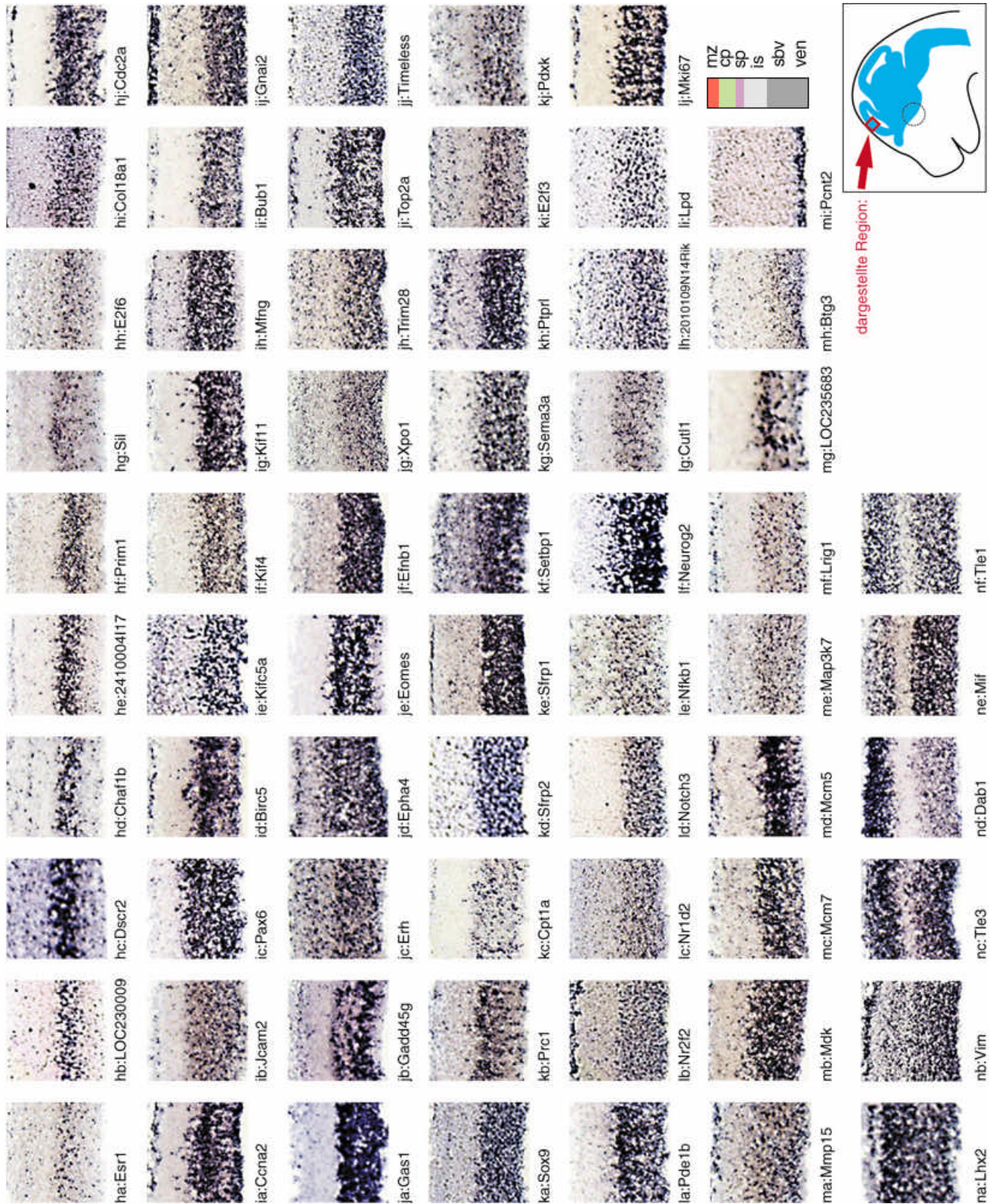


Abb. 3.20 (vergrößerte Darstellung): Schichtspezifische molekulare Marker im Cortex bei E14.5. Vollständige Gennamen in Tab. 3.1. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt des Cortex in sagittaler Schnittebene. mz – Marginalzone, cp – Corticalplatte, sp – Subplatte, is – Intermediärschicht, sbv – Subventrikulärzone, ven - Ventrikulärzone.

(Abbildung fortgesetzt auf Seite 113)



(anzufügen an Seite 112)

LEBENS LAUF

Name	Axel Visel * 20. 9. 1974 in Karlsruhe ledig
Adresse	Tiestestr. 32 30171 Hannover
Schule	1980-1984 Grundschule Kleinburgwedel 1984-1993 Integrierte Gesamtschule Langenhagen, Abitur 1993
Zivildienst	8/1993-11/1994 Annastift e.V., Hannover
Studium	1994-1999 Universität Hannover, Studiengang Biologie (Dipl.) Abschluss: Diplom, Note: Sehr gut mit Auszeichnung Fächer: Genetik, Biochemie, Immunologie
	9/1997-6/1998 Northeastern University, Boston, USA Biology Special Graduate Student
	2/1999-12/1999 Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA Diplomarbeit: Expression of the <i>winged-helix nude (whn)</i> gene during organogenesis of the zebrafish thymus Labor: Prof. Dr. Lisa Steiner
Promotion	Seit 2/2000 Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie, Hannover Abteilung Funktionelle Genomanalyse Labor: Prof. Dr. Gregor Eichele

PUBLIKATIONSLISTE

Originalartikel

A. Visel, C. Thaller, G. Eichele. GenePaint.org: an atlas of gene expression patterns in the mouse embryo. 2004, *Nucleic Acids Research* 32, D552-556.

Buchkapitel

A. Visel, J. Ahdidan, G. Eichele. A gene expression map of the mouse brain: Genepaint.org - a database of gene expression patterns. In: *Neuroscience Databases*. 2003, pp. 19-36, ed. R. Koetter, Kluwer Academic Publishers, Boston.

U. Herzig, C. Cadenas, F. Sieckmann, W. Sierralta, C. Thaller, A. Visel, G. Eichele. Development of high-throughput tools to unravel the complexity of gene expression patterns in the mammalian brain. *Novartis Found Symp*. 2001, 239:129-46.

Konferenzbeiträge

A. Visel, J. Ahdidan, G. Alvarez-Bolado, S. Kruse, G. Eichele. Genepaint.org - A Database of Gene Expression Maps. German Human Genome Meeting, 29 Sep - 02 Oct 2002, Leipzig (Abstract).

A. Visel, J. Ahdidan, F. Sieckmann, S. Kruse, U. Herzig, C. Thaller, G. Eichele. A Gene Expression Map of the Mouse Brain. 3rd Forum of European Neuroscience (13-17 July 2002, Paris), Abstract 069.17

M. B. Yaylaoglu, A. Visel, J. Ahdidan, G. Eichele. Systematic Gene Expression Pattern Analysis on a Large Scale Using Automated High-Throughput in situ Hybridization. 5th German Human Genome Meeting, 7-9 November 2001, Braunschweig (Abstract).

A. Visel, C. E. Willett, N. P. Danilova, and L. A. Steiner: The Whn Gene is Expressed in Zebrafish Brain as Well as in Thymus (Abstract). 39th Midwinter Conference of Immunologists (January 22-25, 2000, Pacific Grove, CA) and Joint Annual Meeting of the American Association of Immunologists and the Clinical Immunology Society (May 12-16, 2000, Seattle, WA), *FASEB J*. 14:A918.

N. Danilova, **A. Visel**, C.E. Willett, and L.A. Steiner: The Whn Gene is Expressed in the Zebrafish Nervous System During Early Development (Abstract). 2nd European Conference on Zebrafish Genetics and Development (April 19-22 2001, London) and 11th International Congress of Immunology (July 22-27 2001, Stockholm).

Sonstige Veröffentlichungen

A. Visel. The mechanism of developmental neuroplasticity in the mammalian somatosensory cortex. (PhD project proposal invited and published by Boehringer Ingelheim Fonds) 2001, *FUTURA* 16:103-4.