

Aus dem Anatomischen Institut  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med. B. Tillmann)

---

**Die Bedeutung des von Meningealzellen  
sezernierten Chemokins SDF-1  
(stromal cell-derived factor 1) für die neuronale  
Migration in der Ontogenese**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
Karina Reiß  
Kiel  
2001

Referent: .....

Korreferent: .....

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Zum Druck genehmigt: Kiel, den .....

Der Dekan

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 MECHANISMEN NEURONALER MIGRATION IM CEREBRUM UND CEREBELLUM.....	1
1.2 CHEMOTAKTISCHE KONTROLLE DER NEURONALEN MIGRATION.....	6
1.3 EINFLUSS DER MENINGEALZELLEN AUF DIE CORTICALE ONTOGENESE.....	8
1.4 BEDEUTUNG DES CHEMOKINS SDF-1 FÜR DIE ONTOGENESE.....	11
1.5 FRAGESTELLUNG.....	14
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>16</b>
2.1 MATERIAL.....	16
2.1.1 Chemikalien.....	16
2.1.2 Puffer, Lösungen und Kulturmedien.....	18
2.1.3 Antikörper und Reagenzien.....	20
2.1.4 Geräte.....	24
2.1.5 Labormaterialien.....	25
2.2 ZELLBIOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE METHODEN.....	25
2.2.1 Tiermodell.....	26
2.2.2 Fixierung und Einbettung.....	26
2.2.3 Histologie.....	27
2.2.3.1 Standardhistologie.....	27
2.2.3.2 Immunhistochemie.....	27
2.2.3.3 Fluoreszenzfärbung.....	28
2.2.3.4 Nachweis von HSPG-gebundenem SDF-1 mittels Fluoreszenzfärbung.....	30
2.2.4 Intrazelluläre Immunfluoreszenzmarkierung für die FACS-Analyse.....	31
2.2.5 Zellpräparation und Kultivierung der Zellen.....	32
2.2.5.1 Zellpräparation.....	32
2.2.5.2 Kulturbedingungen.....	32
2.2.6 Fibroblasten.....	33
2.2.6.1 Meningealzellen.....	33
2.2.6.2 Cornea Zellen.....	34

2.2.7 Astrozyten .....	34
2.2.8 Körnerzellen und Isocortex-Neurone.....	35
2.2.9 Zellstimulation.....	36
2.2.10 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität.....	36
2.2.11 Konditionierte Medien .....	36
2.3 CHEMOTAXIS-TEST MITTELS BOYDENKAMMER.....	36
2.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	38
2.4.1 Ultrafiltration .....	38
2.4.2 Quantitative Proteinbestimmung.....	38
2.4.3 Ausfällung der Proteine .....	39
2.4.4 SDS-Polyacrilamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.4.5 Semi-dry Westernblot .....	40
2.4.6 Immunpräzipitation.....	41
2.5 DURCHFÜHRUNG DER REVERSE TRANSKRIPTION UND DER POLYMERASE KETTENREAKTION (RT-PCR) .....	42
2.5.1 Gewinnung der RNA.....	42
2.5.2 RNA-Quantifizierung .....	43
2.5.3 cDNA-Strang-Synthese .....	43
2.5.4 Die PCR.....	44
2.6 AUSWERTUNG UND DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE .....	47
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>49</b>
3.1 MENINGEALZELLEN EXPRIEREN KONSTITUTIV SDF-1 IN VIVO.....	49
3.2 SDF-1-EXPRESSION AUF RNA-EBENE .....	51
3.3 DIE IMMUNHISTOCHEMISCHE EXPRESSION VON HSPG IN DER KLEINHIRNANLAGE.	54
3.4 DIE ÄUßEREN KÖRNERZELLEN EXPRIEREN DEN SDF-1-REZEPTOR CXCR-4.....	59
3.5 CXCR-4 WIRD IN DEN ÄUßEREN KÖRNERZELLEN NACH DEM ENDE DER PROLIFERATION HERUNTERREGULIERT.....	62
3.6 ZUSAMMENFASSENDE ÜBERSICHT ÜBER DIE ZELLTYP-SPEZIFISCHE EXPRESSION VON SDF-1 UND CXCR-4 IN DER KLEINHIRNANLAGE.....	64
3.7 SDF-1 EXPRESSION VON FIBROBLASTEN <i>IN VITRO</i> .....	65

3.8 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNG VON MENINGEALZELLEN UND CORNEA-FIBROBLASTEN .....	68
3.9 SEKRETION VON SDF-1 DURCH MENINGEALZELLEN UND CORNEAFIBROBLASTEN.	70
3.10 SDF-1 INDUZIERT CHEMOTAXIS DER ÄUßEREN KÖRNERZELLEN.....	72
3.11 NACHWEIS DER SPEZIFITÄT DER CHEMOTAKTISCH MIGRIERTEN NEURONE .....	75
3.12 SDF-1 STELLT DEN ENTSCHEIDENDEN CHEMOTAKTISCHEN FAKTOR FÜR DIE ÄUßEREN KÖRNERZELLEN IM MCM DAR.....	76
3.13 EXPRESSION VON SDF-1 IM ISOCORTEX.....	78
3.14 EXPRESSION VON CXCR-4 IM ISOCORTEX.....	79
3.15 ZUSAMMENFASSENDER ÜBERSICHT ÜBER DIE ZELLTYP-SPEZIFISCHE EXPRESSION VON SDF-1 UND CXCR-4 IN DER GROßHIRNANLAGE.....	81
3.16 DIE CHEMOTAKTISCHE WIRKUNG VON SDF-1 AUF ISOCORTIKALE NEURONE .....	82
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>85</b>
4.1 SDF-1 UND CXCR-4 BEEINFLUSSEN DIE NEURONALE MIGRATION IN DER KLEINHIRNANLAGE .....	85
4.2 DER EINFLUSS DES VON MENINGEALZELLEN SEZERNIERTEN SDF-1 AUF DIE NEURONE DES ISOCORTEX.....	94
4.3 AUSBLICK AUF WEITERE POTENZIELLE EFFEKTE .....	99
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>101</b>
<b>6 LITERATUR .....</b>	<b>103</b>
<b>7 ANHANG.....</b>	<b>119</b>
7.1 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN.....	119
7.1.1 <i>Abbildungsverzeichnis</i> .....	119
7.1.2 <i>Tabellenverzeichnis</i> .....	120
7.2 DANKSAGUNG .....	122
7.3 LEBENS LAUF .....	123
7.4 ERKLÄRUNG.....	123

## Abkürzungen

$\alpha$ -	anti- (gegen)
AS	Aminosäuren
Azid-PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit 0,1% NaN <sub>3</sub>
Bisbenzimid	{2-[2-(4-Hydroxyphenyl)-6-benzimidazolyl]-6-[1-methyl-4-piperazyl]-benzimidazol} trihydrochlorid; Farbstoff zur Zellkern-Darstellung
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CCM	Corneazellen-konditioniertes Medium
CP	Cortikalplatte
CXCR-4	CXC-Chemokin-Rezeptor Typ 4
DMEM	<i>Dulbecco's minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Embryonaltag (der Tag nach der Verpaarung wird definiert als Tag 1)
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGL	äußere Körnerzellschicht ( <i>external granular layer</i> )
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FITC	Fluoreszein-isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GFAP	<i>glial fibrillary acid protein</i>
G-Protein	Guanidinnucleotid bindendes Protein
h	human
HBSS	Hanks' gepufferte Salzlösung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N' -2-ethansulfonsäure
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
IGL	innere Körnerzellschicht ( <i>internal granular layer</i> )

## Abkürzungen

MAP 2	<i>microtubule-associated protein-2</i>
mAntikörper	monoklonaler Antikörper
MCM	Meningealzell-konditioniertes Medium
MG	Molekulargewicht
MZ	Magrinalzone
NGF	Nerven-Wachstumsfaktor
NT	Neurotrophin
OD	optische Dichte
6-OHDA	6-Hydroxy-Dopamin
P	Postnataler Tag (der Tag der Geburt wird definiert als P 0)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PZ	Purkinje-Zellen
r	rekombinant
RT	Raumtemperatur
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	`N'N'N'N'-Tetraethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	<i>volume per volume</i>
VZ	Ventrikulärzone
w/v	<i>weight per volume</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1 EINLEITUNG

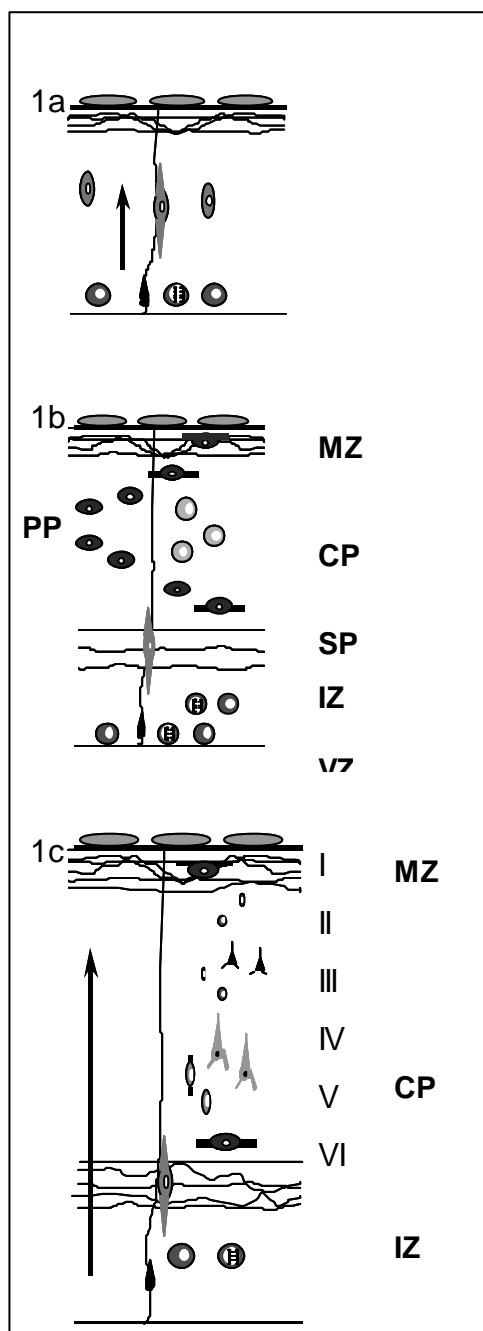
### 1.1 Mechanismen neuronaler Migration im Cerebrum und Cerebellum

Sämtliche Neurone des Gehirns werden an Orten gebildet, die nicht ihrer späteren Position entsprechen. Dieses neurogenetische Prinzip bedingt, dass die sich entwickelnden Zellen zum Teil über beachtliche Strecken (bis zu mehreren Zentimetern in Primaten) aktiv wandern müssen, um an ihre definitive Position zu gelangen. Bislang existieren jedoch nur Hypothesen darüber, wie sich Nervenzellen orientieren, um ihre endgültige Position zu finden, an der sie sich schließlich differenzieren. Zeitlich begrenzt vollzieht sich die Migration der neocorticalen Neurone beim Menschen zwischen der 12ten und der 24ten Gestationswoche (Sidman und Rakic 1973). In den entsprechenden Tiermodellen (Maus, Ratte, Hamster) findet diese Entwicklung zwischen dem Embryonaltag 12 (E 12) und den ersten postnatalen Tagen statt (Hatten 1999).

Sämtliche Zellen des Zentralen Nervensystems (ZNS) stammen von den Stammzellen der Neuralplatte ab. Das Neuroepithel, welches das Ventrikelsystem vom kaudalen Ende des Neuralrohres bis in die Hirnbläschen umgibt, bildet die Grundlage der Hirnanlage (Bayer und Altman 1991). Die Großhirnrinde entwickelt sich aus diesem mehrreihigen Neuraepithel im Dach der Endhirnbläschen. Deren Wandung besteht zu Beginn der Entwicklung nur aus Zellen der ventrikelnahen Hauptproliferationszone, der Ventrikulärzone, deren Fortsätze bis in die oberflächliche zellarme Faserzone, die Marginalzone, reichen. Zwischen diesen primären Schichten entsteht durch das Einwachsen afferenter Axone und die Migration der Neurone eine Intermediärzone (Boulder Committee 1970) (siehe Abb. 1a). Während weitere Zellen und Fortsätze in Richtung Oberfläche wandern, beginnen die Differenzierungsvorgänge, die zur Entstehung der cerebralen Corticalplatte, dem direkten Vorläufer der grauen Substanz der Hirnrinde, und den definitiven Laminae des cerebralen Cortex führen. Die ersten postmitotischen Neurone formen zu Beginn dieses Prozesses die subpiaie „Preplate“ (Marin-Padilla 1971 und 1978). Die nachfolgenden Neurone, die die spätere Corticalplatte bilden, wandern in die Preplate hinein und teilen diese dadurch in zwei



neue Schichten, die superficiale „*Superplate*“ (Cajal-Retzius Neurone der Marginalzone) und die tiefer gelegene nur transient vorhandene „*Subplate*“ (Neurone der Lamina VIb) (siehe Abb. 1b), (Chun et al., 1987). Die sukzessiv aus der germinativen Zone nachfolgenden Neurone migrieren durch die Subplate und formen unterhalb der Marginalzone nach dem „*inside-out*“ Prinzip die weiteren corticalen Schichten VI, V, IV, III und II (siehe Abb. 1c). Dabei lagern sich die aus der Ventrikulärzone stammenden Neurone zuerst an die inneren Schichten an (Marin-Padilla 1971 u. 1978; Angevine und Sidman 1961, Berry und Rogers 1965), während später entstandene Neurone diese Schichten durchwandern.



**Abbildung 1: Schema der Entwicklung des Isocortex.**

Aus dem mitotisch aktiven Neuroepithel (Ⓜ) entsteht durch Abwanderung aus der Ventrikulärzone (VZ) unterhalb der zellarmen Marginalzone (MZ) eine Intermediärzone (IZ) (Abb.1a).

Über der Intermediärzone entwickelt sich die Preplate (PP). Diese wird durch die nachfolgend einwandernden Neurone (Ⓝ) in eine obere *Superplate* der Cajal-Retzius Neurone (Ⓜ) und eine untere *Subplate* (Ⓜ, SP) gespalten. Zwischen diesen beiden Laminae entsteht im folgenden die spätere Corticalplatte (Ⓞ CP), der direkte Vorläufer der grauen Substanz (Abb. 1b).

Durch die „inside out“ Migration der Neurone bilden sich die charakteristischen Laminae des Isocortex (I – VI) (Abb. 1c).

Als Leitstrukturen für die Migration dienen radiale Gliafasern (Ⓝ).

(CP=Corticalplatte; IZ=Intermediärzone;  
LM=Leptomeninx; MZ=Marginalzone; PP=Preplate;  
SP=Subplate; VZ=Ventrikulärzone)

Als Leitstrukturen für ihre Migration dienen den Nervenzellen spezialisierte radiale Gliafasern, welche die embryonale Form von Astroglia darstellen. Diese Gliazellen liegen mit ihrem Nucleus in der Ventrikulärschicht, während ein basaler Ausläufer bis an die ventrikuläre Oberfläche und ein zweiter apikaler Ausläufer bis an die piale Oberfläche reicht (Rakic 1971a). Bei Säugetieren sind diese Fasern in den meisten Hirnregionen nur während der Embryonalentwicklung zu finden. Nach dem Abschluss der Ontogenese kommt es einhergehend mit einer Veränderung des Phänotyps und der Funktion zur Transformation in Astrozyten (Misson et al., 1991, Pixley und de Villes 1984, Culian et al., 1990, Dahl et al., 1981). Daneben wird aber auch der Zelltod (Schmechel und Rakic 1979; Cameron und Rakic 1991) und die Umdifferenzierung zu Oligodendrozyten (Rakic 1988, Misson et al., 1991) oder zu Neuronen diskutiert.

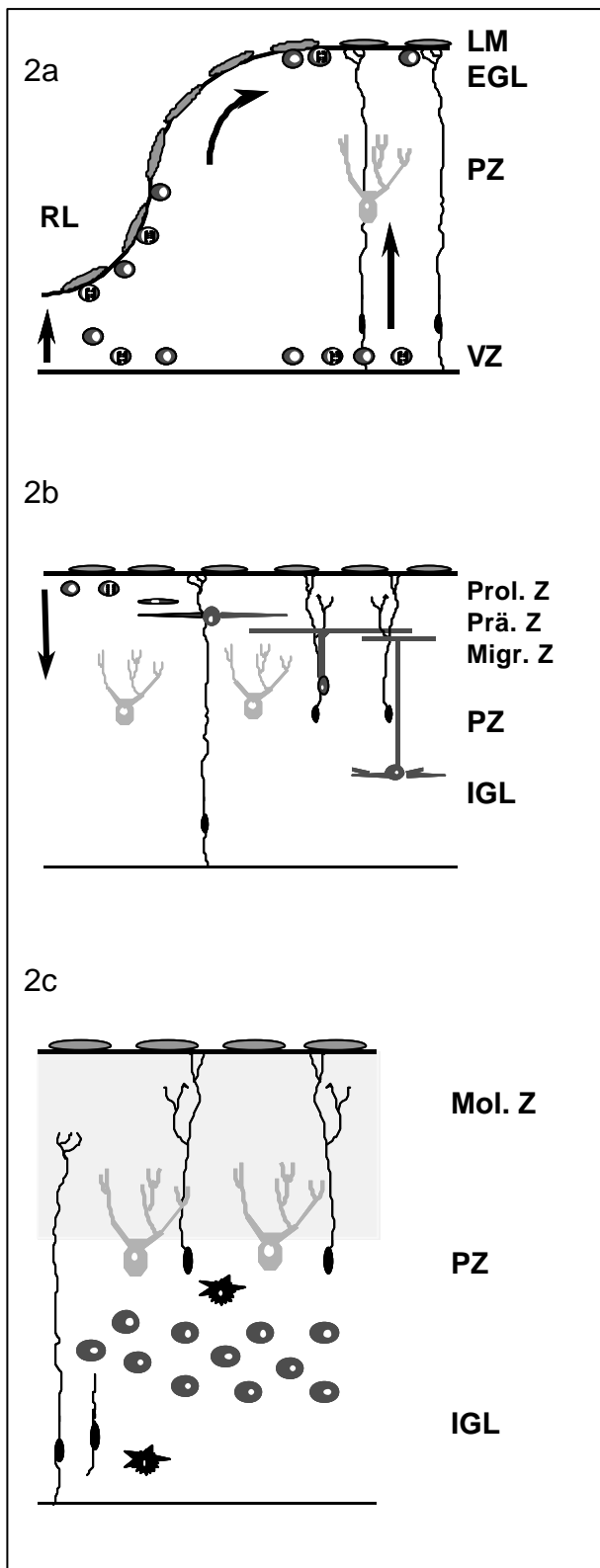
Die Ausbildung des speziellen Phänotyps der radialen Glia scheint durch eine Reihe verschiedener Signale beeinflusst zu werden. Dabei spielen verschiedene humorale Faktoren (Hunter und Hatten 1995), die extrazelluläre Matrix (ECM) (Hausmann und Sievers 1985), aber auch die migrierenden Neurone (Culican et al., 1990) und die von Glia-Zellen exprimierten intrinsischen Faktoren eine Rolle.

Das Kleinhirn unterscheidet sich nicht nur in seiner zellulären Zusammensetzung, sondern auch in seiner Entstehung vom Großhirn.

Die Kleinhirnanlage entwickelt sich aus den oberen Rautenlippen, die sich wulstförmig in den IV. Ventrikel hineinschieben und über dem Dach der Rautengrube ausdehnen. Nach der Fusion der bilateral angelegten Wülste gliedern sich die primären Schichten wie im Cerebrum in eine Ventrikulär- und eine Marginalzone (Hausmann et al., 1987, Wingate 2001).

Charakteristisch für die Corticogenese des Cerebellums ist jedoch die Entstehung von zwei Proliferationszonen. Die primäre Proliferationszone stellt die Ventrikulärzone an der Ependymseite, also im Dach des IV. Ventrikels, dar. Von hier aus migrieren postmitotische Zellen radial auf die Oberfläche zu und führen zur Entstehung der späteren Purkinje-Zellschicht (Altman 1982).

Die zweite Proliferationszone entsteht aus dem als „*germinal trigone*“ bezeichneten Bereich der Rautenlippe, in der das Neuroepithel in das einschichtige Epithel des Plexus Choroideus übergeht (Altman 1982, Altmann u. Bayer 1985). Hier wandern, zeitgleich mit der Entstehung der Purkinje-Zellschicht (Hausmann und Sievers 1985), mitotisch aktive Neurone unter die piale Oberfläche und anschließend tangential an dieser entlang. Dieser Prozess führt zur Entstehung der externen Körnerzellschicht (EGL von *external granular layer*). Die Neurone bleiben dabei in direktem Kontakt zur Leptomeninx, dem Mesenchym des ZNS (Hausman und Sievers 1985) (siehe Abb. 2a). Aus den hier proliferierenden Zellen gehen neben dem Hauptanteil der Körnerzellen auch die Korb- und Sternzellen sowie Gliazellen hervor (Altman 1982; Sievers et al., 1992, 1994a). In der äußeren Körnerzellschicht können zwei Zonen unterschieden werden, die auch durch eine unterschiedliche Expression verschiedener Gene gekennzeichnet sind (Hatten u. Heintz, 1995, Kuhar et al., 1993). In der superficialen „Proliferationszone“ sind die Neurone noch mitotisch aktiv (S-Phase); erst als postmitotische Zellen ordnen sie sich in einer „Prämigratorischen Zone“ an und bilden an gegenüberliegenden Polen zwei Neuriten aus, die beim Absinken der Somata als T-förmige Struktur in der äußeren Körnerzellschicht verbleiben (Kuhar et al., 1993) (siehe Abb. 2b). Der Proliferationsprozess beginnt bei der Maus etwa ab E 14 und hält ungefähr bis P 15 an, während inzwischen (bereits ab P 0 - P 2) die einwärtsgerichtete Migration der Körnerzellen beginnt (Rakic 1972). Die im Gegensatz zum Cerebrum „outside in“ gerichtete Migration der postmitotischen Körnerzellen baut schließlich die innere Körnerzellschicht von innen nach außen auf. Dieser prolongierte Prozess ist bei Nagetieren erst am Ende der dritten postnatalen Woche abgeschlossen. Die Wanderung der äußeren Körnerzellen erfolgt entlang von als Bergmann-Glia bezeichneten radialen Gliafasern (Edmondson und Hatten 1987). Diese Fasern entstehen zum einen aus Vorläuferzellen der Ventrikulärzone (Rakic 1971b), aber auch aus Derivaten der äußeren Körnerzellschicht (Sievers et al., 1994a). Ihre Somata liegen zwischen den Purkinje-Zellen und schicken lange Fasern senkrecht zur Oberfläche, wo diese sich aufzweigen und mit kleinen Endfüßchen eine gliöse Grenzmembran gegen die Leptomeninx bilden.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entwicklung der Kleinhirnanlage.**

Im Kleinhirn entsteht neben der Ventrikulärzone (VZ), aus der die spätere Zellschicht der Purkinje-Zellen (PZ) hervorgeht, eine zweite Proliferationszone im Bereich der Rautenlippe (RL). Hier wandern mitotisch aktive Stammzellen (⊕) zur pialen Oberfläche, um sich anschließend tangential in direktem Kontakt zur Leptomeninx (LM) auszubreiten (Abb. 2a).

Diese äußere Körnerzellschicht (EGL) besteht wiederum aus einer äußeren proliferativen und einer inneren prä-migratorischen und migratorischen Zone von postmitotischen Zellen. Letztere verlassen schließlich die EGL und migrieren durch die Purkinje-Zellschicht hindurch, unterhalb derer sie die innere Körnerzellschicht bilden (IGL ●) (Abb. 2b).

Am Ende der Entwicklung zeigt das Cerebellum die typische Dreischichtung in Molekularzone (Mol. Z), Purkinje-Zellschicht und innerer Körnerzellschicht (Abb. 2c).

Die radialen Bergmann-Glia-Fasern (⌈), die im Cerebellum als Migrationssubstrat dienen, differenzieren zu Astrozyten (★) oder gehen zugrunde.

Die Besonderheit der Bergmann-Glia liegt darin, dass diese Fasern auch nach dem Abschluss der Kleinhirnentwicklung persistieren. Obwohl sie ihre Morphologie behalten, verändern sie allerdings die Expression ihrer Antigene.

Die Neurone der äußeren Körnerzellschicht migrieren entlang der Bergmann-Glia durch die Purkinje-Zellschicht hindurch und bilden direkt unter dieser die innere Körnerzellschicht (IGL). Dort findet die endgültige Differenzierung und die Ausbildung der synaptischen Verbindungen statt. Das adulte Cerebellum zeigt schließlich die typische Dreischichtung mit der äußeren Molekularschicht, der Purkinje-Zellschicht und der Körnerzellschicht (siehe Abb. 2c).

### 1.2 Chemotaktische Kontrolle der neuronalen Migration

Während für die Wanderung der Neurone radiale Glia-Fasern und Moleküle der ECM als Migrationssubstrat entscheidend zu sein scheinen, wird die Kinetik der Migration neuronaler Zellen unter anderem über ihre NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren und über den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in den Neuronen reguliert (Kumoro und Rakic 1993). Wie jedoch die Richtungsselektion im Verlauf der neuronalen Migration gesteuert wird, ist noch nicht vollständig geklärt.

Für die Ontogenese des Isocortex wird zur Zeit das Zusammenwirken zahlreicher redundanter Faktoren diskutiert, zu denen vor allem Wachstumsfaktoren, aber auch die Neurotransmitter Glutamat und Gamma-Aminobuttersäure (GABA), zählen.

So konnten Behar et al. (1999) *in vitro* durch die Gabe von Glutamat Chemotaxis in corticalen Neuronen induzieren. Doch im Gegensatz dazu führte die Injektion eines Glutamat-Analogon im Hamster zur Ausbildung von Heterotopien und intracorticalem Arrest der Neurone (Marret et al., 1996).

Einen Hinweis auf den Einfluss eines Wachstumsfaktors lieferten Forsberg-Nilsson et al. (1998), die zeigen konnten, dass kultivierte Stammzellen aus dem embryonalen Cortex der Ratte chemotaktisch auf den Plättchen-Wachstumsfaktor (*platelet-derived growth factor*, PDGF) reagieren (Forsberg-Nilsson et al., 1998; Erlandsson et al., 2001). Auch Neurotrophine, die in erster Linie eine neurotrophe Wirkung ausüben (Schwartz et al., 1997, Minichiello u. Klein 1996), können neuronale Chemotaxis stimulieren. BDNF

(*brain-derived neurotrophic factor*) und Neurotrophin 4 und 5 (NT4/5) konnten über den hoch affinen Tyrosin-Kinase Rezeptor B (trkB), der von migratorischen Zellen im Isocortex exprimiert wird, eine Chemotaxis dieser Neurone induzieren (Behar et al., 1997). Ein überzeugender direkter Nachweis für diesen Effekt gelang durch die intraventikuläre Injektion von NT4 (Brunstrom et al., 1997). Diese führte, ebenso wie die Überexpression von BDNF, zu Heterotopien im Bereich der Molekularzone (Ringstedt et al., 1998). Neurotrophin 3 (NT3) zeigte in diesem Ansatz jedoch keinen Effekt.

Für die Ontogenese der Kleinhirnanlage sind bislang wenige chemotaktische Faktoren identifiziert. Hier wird unter anderem ein Einfluss von NT3 diskutiert. Dieses Neurotrophin wirkt über seinen Tyrosin-Kinase-Rezeptor C (trkC) und unter bestimmten Umständen auch über trkB, den hoch affinen Bindungsrezeptor für BDNF und NT4/5, oder trkA, den Bindungsrezeptor für NGF (Davies et al., 1995). Exprimiert werden NT3, sein Rezeptor trkC und auch trkB in den differenzierten Zellen der inneren Körnerzellschicht und in den prä migratorischen Zellen der äußeren Körnerzellschicht (Lindholm et al., 1997, Neveu und Arenas 1996). Die Reduktion von trkB und trkC in Doppelknockout-Mäusen führt zu einer erhöhten Zelltodrate in den äußeren Körnerzellen und weist zumindest auf neurotrophe Signale hin (Minichiello u. Klein 1996). Des Weiteren haben Doughty et al. (1998) durch die chronische Applikation von NT3 auf die Oberfläche des Cerebellums *in vivo* zeigen können, dass NT3 die Differenzierung der postmitotischen, prä migratorischen äußeren Körnerzellen fördert und die Migration dieser Zellen in Richtung innere Körnerzellschicht beschleunigt.

Einen sehr wichtigen trophischen Faktor für cerebelläre Körnerzellen stellt der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor (*Insulin-like growth factor I* = IGF-I) dar, der auch als wirksames Mitogen auf die äußeren Körnerzellen Einfluss zu nehmen scheint (Lin und Bulleit 1997). Dieser Wachstumsfaktor induziert zwar die chemotaktische Aktivität einer humanen Neuroblastoma-Zelllinie (Puglianiello et al., 2000), hat jedoch keinen stimulierenden Effekt auf die Neurone des Cerebellums.

Auch die Untersuchungen zur Bedeutung des Nerven-Wachstumsfaktors (*nerve-growth factor*, NGF) lieferten konträre Ergebnisse. Dieser Faktor stimulierte die Chemotaxis von Neuroblasten des Rückenmarks (Behar et al., 1994 und 1996), Untersuchungen weiterer Arbeitsgruppen wiesen jedoch einen eher trophischen Effekt von NGF auf die Neurone der Kleinhirnanlage (Muller et al., 1997) nach.

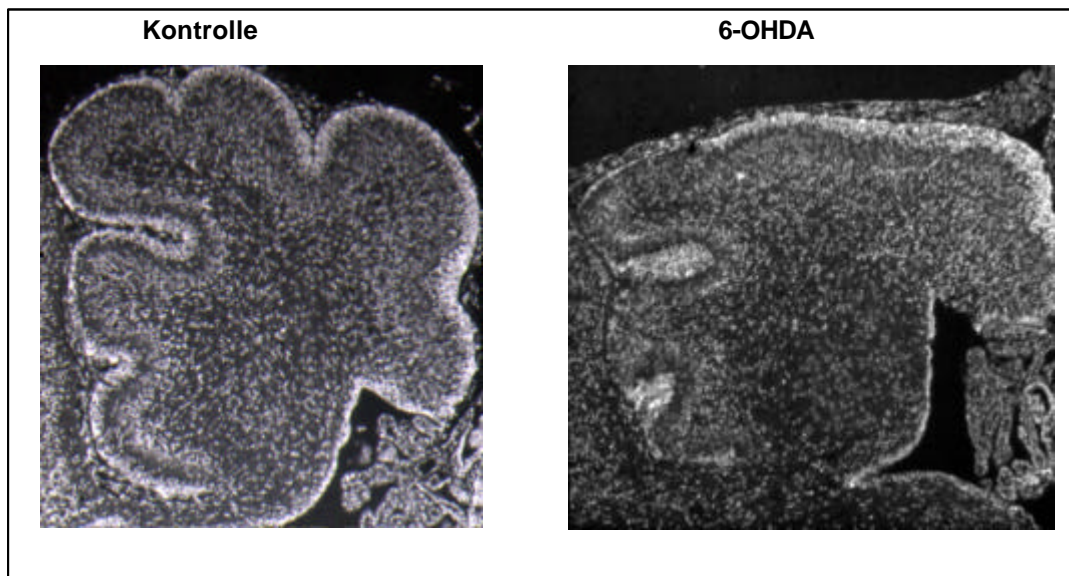
### **1.3 Einfluss der Meningealzellen auf die corticale Ontogenese**

Neben den humoralen Einflüssen spielen für die Migration der Neurone vor allem zelluläre Interaktionen eine entscheidende Rolle. Allerdings wurde dabei sehr lange nur den neuroepithelialen Zellen, den Neuronen und den Gliazellen, eine Bedeutung zugemessen. Inzwischen hat sich jedoch die Ansicht durchgesetzt, dass auch das Mesenchym des ZNS, die Leptomeninx, eine wichtige Funktion für die neuronale Ontogenese ausübt (Pehlemann et al., 1985 und 1987; Sievers und Wolff 1987; Sievers et al., 1985, 1986a und b, 1987, 1994b und c).

Die Fibroblasten der Leptomeninx, die Meningealzellen, entwickeln sich aus dem der Neuralleiste entsprungenen Mesenchym des Kopffortsatzes (Le Douarin et al., 1997). Sie unterscheiden sich allerdings nicht nur in ihrer Herkunft von den morphologisch ähnlichen mesodermalen Fibroblasten, sondern auch in ihren Eigenschaften. Im Unterschied zu anderen Fibroblasten vermögen sie verschiedene ECM-Moleküle wie Laminin, Kollagen Typ IV oder Entactin zu produzieren und haben damit einen entscheidenden Anteil am Aufbau der Basallamina (Sievers et al. 1994c).

Während viele Autoren in erster Linie von neurotrophen Effekten der Meningealzellen auf die Neurone ausgehen (Ishikawa et al., 1995, Junghans et al., 1995), konnten Sievers et al. (1986a, 1987, 1994b, c) einen direkten Einfluss dieser Zellen auf die Corticogenese nachweisen. In Studien dieser Arbeitsgruppe führte die intrathekale Applikation von 6-Hydroxy-Dopamin (6-OHDA) in Hamstern in einer kritischen Periode zu charakteristischen corticalen Laminationsdefekten (Sievers et al., 1985; von Knebel-Döberitz et al., 1986) (siehe Abbildung 3). Die neurotoxische Droge zerstört selektiv zentrale catecholaminerge Neurone, aber auch extraneuronale Gewebe wie Meningealzellen (Sievers et al., 1985). Die kritische Periode, in der diese Beeinflussung nachweisbar war (P0-P5), korrelierte mit dem Aufbau des radialen Gliagerüsts und mit der Anlage cerebellärer Fissuren. Nach der Zerstörung der Meningen kam es zu einem rapiden Abbau der Basallamina und die Ausbreitung der sekundären Proliferationszone unter der pialen Oberfläche wurde unterbrochen (Sievers et al., 1994b). Die neuronalen und glialen Stammzellen migrierten stattdessen in die Kleinhirnanlage hinein und

bildeten dort unregelmäßige Zellcluster. Des Weiteren waren die glialen Vorläufer nicht mehr in der Lage, sich zur Bergmann-Glia zu differenzieren. Stattdessen bildeten sich nur noch multipolare GFAP (*glial fibrillary acid protein*)-exprimierende Zellen.



**Abbildung 3: Laminationsdefekt im Cerebellum eines Hamsters (P2) nach 6OHDA-Behandlung.**

Die Abbildungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Hartmann (KU Leuven, Belgien) zur Verfügung gestellt.

Ähnliche Effekte ließen sich im Gyrus dentatus erzielen, der in ähnlicher Weise durch eine subpiaie Proliferationszone generiert wird (Hartmann et al., 1992; Sievers et al., 1992).

Weitere *in vitro* Untersuchungen von Hartmann et al. (1998a, b) konnten zeigen, dass Meningealzellen die Immigration von cerebellären Neuronen aus Scheibenexplantaten stimulieren konnten. Dieser Effekt konnte auch durch Fibroblasten anderer Gewebe (z.B. Corneazellen) ausgelöst werden, jedoch nicht durch nicht-fibroblastische Zellen wie Astroglia. Anschließende *in vitro* Chemotaxis-Tests mit dem zellfreien Kulturüberstand der Meningealzellen (Meningealzell-konditioniertes Medium = MCM) konnten belegen, dass ein von Fibroblasten sezernierter diffusibler Faktor eine chemotaktische Migration der undifferenzierten äußeren Körnerzellschicht-Neurone induziert. Diese Wirkung war dagegen nicht auf die postmigratorischen Zellen der inneren Körnerzellschicht



nachzuweisen (Hartmann et al., 1998 b); sie erwies sich jedoch als unabhängig vom Explantatalter der Fibroblasten. Da letzterer Befund aber auf eine konstitutive Freisetzung des unbekanntes Chemotaxins hindeutete, musste die Inresponsivität dieser Neurone auf eine Regulation der Chemotaxis durch die Rezeptorexpression hinweisen.

Zur Zeit liegen zahlreiche, zum Teil konträre Hinweise, auf den Einfluss verschiedener humoraler Faktoren, darunter insbesondere der Neurotransmitter Glutamat und Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und der Wachstumsfaktoren BDNF, Neurotrophin 4 und 5, auf die neuronale Migration vor. Da die bis heute untersuchten „*knockout*“ Modelle für die bislang diskutierten Faktoren jedoch zu keiner Migrationsstörung in der Kleinhirnanlage führten (Crowley et al., 1994, Asada et al., 1997) konnten diese nicht den von Meningealzellen sezernierten Faktor darstellen.

Auch die Ontogenese des Isocortex wird von Meningealzellen beeinflusst. Obwohl Sievers et al. (1986b) durch die selektive Zerstörung dieser Zellen mittels 6-OHDA in der Isocortexanlage keine dem Cerebellum vergleichbaren Effekte erzielen konnten, wiesen Super et al. (1997) in einem ähnlichen Versuch eine Degeneration der subpial gelegenen Cajal-Retzius Zellen nach, die mit einer architektonischen Veränderung der Corticalplatte einherging.

In vitro Untersuchungen mit dem Boyden-Kammer Chemotaxis-Test konnten eine Beeinflussung der Neurone der Ventrikulärzone, jedoch nicht der postmitotischen Neurone der Corticalplatte aufzeigen.

Auch unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. bei der humanen Lissencephalie Typ 2, wird ein Einfluss der Meningealzellen im Isocortex deutlich. Bei dieser Fehlbildung kommt es zu Migrationsstörungen, die durch eine Übermigration der Neurone über die Corticalplatte hinaus und durch die Bildung von neuronalen Ektopien in der Leptomeninx charakterisiert sind. In dieser Situation scheinen die Meningealzellen ebenfalls die Quelle eines chemotaktischen Stimulus darzustellen, welcher die Neurone in die subarachnoidale Position migrieren lässt.

## 1.4 Bedeutung des Chemokins SDF-1 für die Ontogenese

Die *Chemokine* bezeichnen eine Gruppe von *Zytokinen*, die auf verschiedene Zelltypen einen in erster Linie *chemotaktischen* Effekt ausüben. Diese Polypeptide, zu deren Familie bislang bereits über 40 Mitglieder zählen, spielen als essenzielle Mediatoren bei Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle, indem sie die Chemotaxis inflammatorischer Zellen induzieren oder diese direkt aktivieren. Des Weiteren spielen sie eine fundamentale Rolle bei der Regulation der Proliferation und Mobilisierung hematopoietischer Zellen, für die Angiogenese und auch für die fetale Entwicklung (Kim und Broxmeyer 1999). Gemeinsam ist diesen, mit einem Molekulargewicht von 8-10 kDa relativ kleinen Moleküle, neben dem häufigen Auftreten von Sequenzhomologien eine extreme Konservierung von Cysteinresten, die an der intramolekularen Disulfidbrückenbildung beteiligt sind.

Anhand der Lage dieser Cysteinreste werden zur Zeit vier Gruppen unterschieden, die CXC oder  $\alpha$ -Chemokine, bei denen eine beliebige Aminosäure (X) zwischen den beiden Cysteinresten eingefügt ist, die CC oder  $\beta$ -Chemokine, die C oder  $\gamma$ -Chemokine und die CXXXC oder  $\delta$ -Chemokine.

Das Chemokin SDF-1, der „*stromal cell-derived factor*“, wird der Gruppe der CXC-Chemokine zugerechnet. SDF-1 tritt in drei verschiedenen Spleißvarianten auf: SDF-1 $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  (Gleichmann et al., 2000), die sich in der Anzahl der Aminosäuren unterscheiden. Dabei kommt SDF-1 $\alpha$  (89 Aminosäuren) deutlich häufiger vor als SDF-1 $\beta$  (93 Aminosäuren) und SDF-1 $\gamma$  (67 Aminosäuren) (Shirozu et al., 1995). Im Gegensatz zu dem embryonal prädominanten SDF-1 $\beta$  wird SDF-1 $\gamma$  erst im erwachsenen Stadium stärker exprimiert (Gleichmann et al., 2000). Die Sequenz ist ungewöhnlich stark konserviert zwischen den Spezies mit nur einer Substitution von Isoleucin (Ile) nach Valin (Val) zwischen Maus und Mensch (Shirozu et al., 1995).

SDF-1 erhielt seine Bezeichnung aufgrund seiner ursprünglichen Klonierung aus murinem Knochenmark. Anhand seiner Funktion wurde das Chemokin auch als „*Pre-B-cell growth-stimulating factor*“ charakterisiert (Tashiro et al., 1993, Shirozu et al., 1995, Bleul et al., 1996a, b, Nagasawa et al., 1994, Nagasawa et al., 1996, Aiuti et al., 1997, Sanchez et al., 1997).

Neben dem Effekt auf Prä-B-Zellen stellt SDF-1 einen wichtigen Stimulus für die Migration von Leukozyten und hematopoietischen Vorläuferzellen dar.

Eine chemotaktische Stimulation konnte für Monozyten, T-Lymphozyten, Megakaryozyten und CD34+-humane Vorläuferzellen nachgewiesen werden (Bleul et al., 1996 a, b; Aiuti et al., 1997).

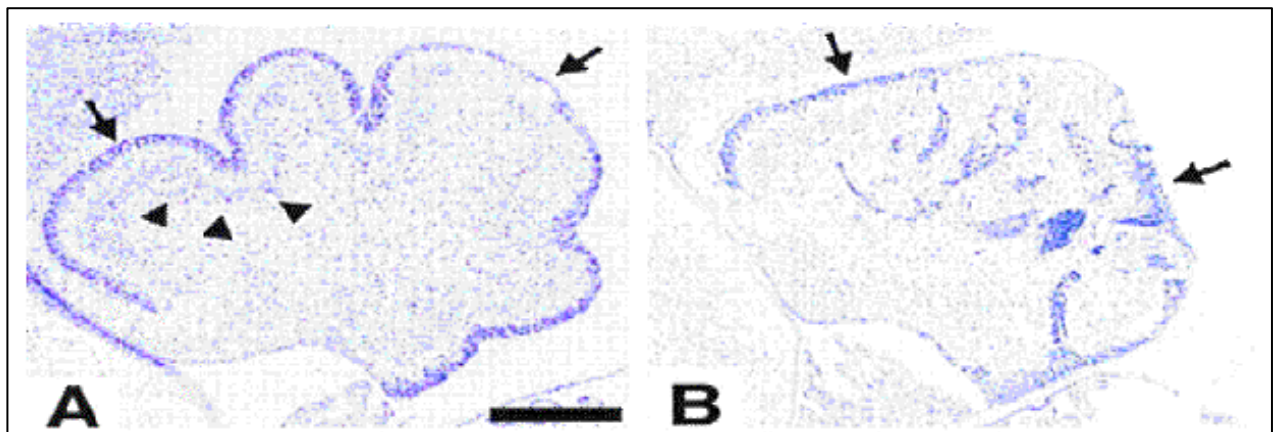
Die biologische Aktivität von SDF-1 wird durch den CXC-Rezeptor 4 (CXCR-4) vermittelt (Bleul et al., 1996a, b), welcher ursprünglich als LESTR/Fusin (Nagasawa et al., 1994) bekannt wurde. Dabei stellt der N-Terminus von SDF-1 die entscheidende Stelle für die Bindung und Aktivierung des Rezeptors dar, während der C-Terminus wahrscheinlich durch die Bindung an Glycosaminoglycane (GAGs) die biologische Aktivität beeinflusst (Lou et al., 1999). Der Rezeptor (352 AS) gehört zur Gruppe der heptahelicalen Transmembran-Rezeptoren und ist G (Guaninnukleotid)-Protein gekoppelt. Er wird auf zahlreichen Zellen des Immunsystems wie den peripheren Blut-Lymphozyten, Monozyten oder auch den Dendritischen Zellen und Endothelzellen (Loetscher et al., 1994, Bleul et al., 1997, Sallusto et al., 1998, Forster et al., 1998, Hesselgesser et al., 1998, Gupta et al., 1998, Yi et al., 1998) exprimiert.

Die Expression von SDF-1 und CXCR-4 im Gehirn konnte auf RNA-Ebene für viele Zellen nachgewiesen werden. Während der Entwicklung wird die CXCR-4 mRNA in proliferierenden Regionen des Gehirns einschließlich des Cerebellums, des cerebralen Cortex, des Hippocampus und des Rückenmarks (Zou et al., 1998, Jazin et al., 1997) exprimiert.

Der CXCR-4 Rezeptor gelangte in letzter Zeit vermehrt in den Fokus aktueller Untersuchungen, da er für einige Stämme des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) als wichtiger Korezeptor für den Eintritt in die Zielzelle dient (Feng et al., 1996).

Studien an CXCR-4- (Zou et al., 1998, Ma et al., 1998, Tachibana et al., 1998) und SDF-1-defizienten Mäusen (Nagasawa et al., 1996, Ma et al., 1998) unterstrichen die essenzielle Bedeutung dieses Chemokins und seines Rezeptors. Die Mäuse sterben bereits intrauterin (E 18) und weisen bei nicht beeinträchtigter T-Lymphopoese eine extrem reduzierte B-Lymphopoese auf. Die Myelopoese findet im Knochenmark nicht mehr statt und ist in der fetalen Leber stark reduziert (Ma et al., 1998).

Da SDF-1- und CXCR-4-defiziente Mäuse identische hematopoietische Unterentwicklungen und Herzfehler entwickeln, geht man davon aus, dass CXCR-4 den einzigen Rezeptor für dieses Chemokin darstellt. Überraschenderweise entwickelten die Tiere zusätzlich einen Defekt in der Kleinhirnentwicklung, bei dem es bereits embryonal zu einer ungerichteten Migration der proliferierenden äußeren Körnerzellen in die Kleinhirnanlage hinein kommt, obwohl die radialen Gliazellen intakt bleiben. Auch die Purkinje-Zellen waren ektopisch lokalisiert und die Bildung der Foliae cerebelli blieb aus (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4: Defekt der Kleinhirnentwicklung einer CXCR-4 defizienten Maus am Embryonaltag E 18,5.**

Dargestellt ist das Cerebellum eines Kontrolltieres in der Abbildung 4A im Vergleich zu einem Cerebellum einer CXCR-4 defizienten Maus in Abbildung 4B. Die Pfeilspitzen deuten auf die Purkinje-Zellen (A), während die Pfeile auf die äußere Körnerzellschicht weisen.

(Aus Ma et al., 1998, Balken = 200µm; Färbung: Nissel)

## 1.5 Fragestellung

Die gerichtete Migration von Nervenzellen stellt eine entscheidende Leistung im Verlauf der Ontogenese dar, über die bislang jedoch nur unzureichende Daten generiert worden sind. Vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben jedoch einen entscheidenden Einfluss der Meningealzellen auf diesen Prozess nachweisen können. Es konnte belegt werden, dass diese Zellen und auch andere Fibroblasten konstitutiv einen diffusiblen Faktor sezernieren, der die chemotaktische Migration der äußeren Körnerzellschicht-Neurone im Cerebellum induziert, wobei jedoch unklar blieb, um welchen Faktor es sich hierbei handelt.

Die Tatsache, dass die spezifische cerebelläre Fehlentwicklung nach der selektiven Zerstörung der Meningealzellen phänotypisch beinahe identisch mit der Fehlentwicklung im Cerebellum von SDF-1 defizienten Mäusen ist, führte zu der Hypothese, dass SDF-1 den entscheidenden von Fibroblasten sezernierten Faktor darstellen könnte. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Bedeutung der Meningealzellen im Hinblick auf die Expression und den funktionellen Einfluss des Chemokins SDF-1 und seines Rezeptors CXCR-4 im Verlauf der neuronalen Ontogenese zu untersuchen.

Um die aufgestellte Hypothese überprüfen zu können, sollte zunächst die Expression des Chemokins und seines Rezeptors im Verlauf der Entwicklung analysiert werden. Um eine funktionelle Relevanz der erhobenen Daten nachzuweisen, mussten die Ergebnisse anschließend auf die *in vitro*-Situation übertragen und weiter charakterisiert werden.

Die vorangegangenen Untersuchungen hatten gezeigt, dass Meningealzellen und auch Fibroblasten anderer Herkunft konstitutiv einen diffusiblen chemotaktischen Faktor sezernieren. Deshalb sollte in einem ersten Schritt die Expression und Sekretion von SDF-1 *in vivo* und *in vitro* untersucht werden. Die Meningealzellen üben ihren chemotaktischen Effekt auf die Neurone der äußeren Körnerzellschicht aus, wohingegen die postmitotischen Neurone der inneren Körnerzellschicht unbeeinflusst bleiben. Deshalb sollte ebenfalls die Expression des SDF-1 Rezeptors CXCR-4 überprüft

werden. Schließlich sollte mittels Chemotaxis-Versuchen nach Boyden ermittelt werden, ob die von den Meningealzellen induzierte chemotaktische Reaktion auf das Chemokin SDF-1 zurückzuführen ist.

In der Isocortexanlage wird der Einfluss zahlreicher, zusammenwirkender Faktoren auf die neuronale Migration diskutiert. Da die vorangegangenen Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe aber auch eine chemotaktische Beeinflussung der isocorticalen Neurone durch Meningealzellen nachweisen konnten, und da eine entscheidende Rolle dieser Zellen auch gerade unter pathologischen Bedingungen gegeben zu sein scheint, sollte auch hier eine potenzielle Funktion von SDF-1 untersucht werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Aceton (*Merck, Darmstadt*)

Acrylamid /Bisacrylamid (*Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg*)

-es wurde eine vorgefertigte Stammlösung (29:1, 30% (w/v)) benutzt

Agarose (*Sigma, Steinheim*)

Ammoniumperoxodisulfat (APS) (*Pharmacia Biotech, Schweden*)

Amphotericin (*Sigma chemical company, St. Louis, Mo, USA*)

Antibiotika-Lösung (*Biochrom KG, Berlin*)

Die Antibiotika-Lösung enthält Penicillin ( $10^4$ E/ml) und Streptomycin ( $10^4$ µg/ml).

Azid-PBS

Azid-PBS ist eine PBS-Lösung (s.u.), die 0,1%  $\text{NaN}_3$  enthält.

Biobond (*BBInternational, Cardiff, UK*)

Bisbenzimid (*Sigma, Steinheim*)

Blotpapier (*Whatman International, UK*)

Brefeldin A (BFA) (*Fluka Chemie Ag, Buchs*)

Das BFA wurde in Methanol gelöst und auf eine Konzentration von 5 mg/ml eingestellt.

Bromphenolblau (*Merck, Darmstadt*)

BSA (Albumin bovine Fraction V, pH 7,0) (*Serva, Heidelberg*)

Chloroform (*Merck, Darmstadt*)

DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium; without Sodium Pyruvat, with

L-Glutamin) (*Life technologies, Paisley, Scotland*)

DNase I (10 mg/ml in PBS) (*Boehringer, Mannheim*)

DEPC (Diethylpyrocarbonat) (*Fluka Chemie Ag, Buchs*)

DePeX (*Serva, Heidelberg*)

ECL-Lösung (*Amersham Buchler, Braunschweig*)

EDTA (Titriplex 2) (*Merck, Darmstadt*)

EGTA (Ethylenglycol-bis-(aminoethyl)-tetraazetische Säure) (*Serva, Heidelberg*)

Eosin (*Merck, Darmstadt*)

Ethanol (*Merck, Darmstadt*)

Ethidiumbromid (3,8 Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthri-diniumbromid)

(*Merck, Darmstadt*), (1%ige Lösung in Wasser)

FDU (5-Fluoro-2`desoxyuridin) (*Sigma chemical company, St. Louis, Mo, USA*)

Fötiales Kälberserum (FKS) (*Life technologies, Paisley, Scotland*)

Zur Komplement-Inaktivierung wurde das FKS 30min auf 56°C erhitzt .

para-Formaldehyd (*Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz*)

Gelatine (*Sigma chemical company, St. Louis, Mo, USA*)

Glukose (*Merck, Darmstadt*)

Glycin (*Roth, Karlsruhe*)

Glycerin (*Merck, Darmstadt*)

Glycerol (*Merck, Darmstadt*)

Hämalaun nach Maier (*Merck, Darmstadt*)

Hanks´ Balanced Salt Solution (HBSS) (*Sigma, Deisenhofen*)

Hepes (*Sigma, Steinheim*)

Kaiser´s Glyceringelatine (*Merck, Darmstadt*)

Kollagenase (*Sigma, Steinheim*)

Laminin (*Sigma, Steinheim*)

Mercaptoethanol (*Sigma, Steinheim*)

Methanol (*Roth, Karlsruhe*)

Molekulargewichtsstandard (Rainbow marker, Low Range 6,5-45kDa)

(*Amersham Buchler, Braunschweig*)

Natriumchlorid (*Merck, Darmstadt*)

Paraffin "Hitocomp-Niedrig-Schmelzpunkt Paraffin" (*Vogel GmbH & Co.Kg, Gießen*)

Penicillin/Streptomycin (100000 U/ml bzw 10000µg/ml), (*Biochrom, Berlin*)

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) (*Life Technologies, Paisley, Scotland*)

Poly-D-Lysin (*Sigma chemical company, St. Louis, Mo, USA*)



Saponin (*Sigma chemical company, St. Louis, Mo, USA*)

SDS (Natrium-Dodecylsulfat) (*Serva, Heidelberg*)

Sucrose (*Roth, Karlsruhe*)

TEMED (*Roth, Karlsruhe*)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (*Serva, Heidelberg*)

Trypanblau (*Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz*)

Trypsin (0,1M in PBS, pH 7,4) (*Sigma, Steinheim*)

Wasserstoffperoxid (30%) (*Merck, Darmstadt*)

Xylol (*Merck, Darmstadt*)

### 2.1.2 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Ablöse-Lösung für adherierende Zellen: 0,037 g EDTA und 0,0025 g Trypsin in 25 ml PBS

Agarose-Lösung (2%): 2 g Agarose in 100 ml Aqua dest.

APS: 10 % in Aqua dest.

Bisbenzimid: 1 mg in 50 ml PBS (0,1M)

Bouin´sche Lösung: 15 Teile Pikrinsäure (wässrig gesättigt) und 5 Teile Formalin (37%ig) werden nach Filtration mit einem Teil Essigsäure (100 %) gemischt.

¼ Bouin-PBS: Für 1 l dieser Lösung wurden 180 ml Pikrinsäure, 60 ml Formalin, 12 ml Eisessig und 756 ml PBS vermischt. Der pH-Wert lag bei 2,5.

BSA: BSA wurde als 1%ige Lösung in PBS (0,1 M) angesetzt

DEPC – H<sub>2</sub>O: 0,1 % DEPC in H<sub>2</sub>O; 12 Stunden Inkubation bei 37°C und anschließendes Autoklavieren

Dissoziationslösung: 24 mg HEPES, 3 mg Trypsin und 125 µl DNase in 10 ml DMEM

DNA-Auftragpuffer: 3,45 ml Glycerin (Endkonz. 30 %), 6,55 ml Aqua bidest., 50 mg Bromphenolblau (Endkonz. 0,5 %)

DNase-Puffer (10 x): Gibco; 200 mM Tris-HCl pH 8,3; 500mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>

Elektrodenpuffer: 15,2 g Tris, 72,0 g Glycin und 5,0 g SDS in 5l H<sub>2</sub>O gelöst, HCl zur Einstellung des pH-Wertes auf 8,2

Gelpuffer 1: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 mit 0,4 % SDS

Gelpuffer 2: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 mit 0,4 % SDS

Heparitinase-Puffer: 0,1 M NaCl; 50 mM HEPES; 50 mM 6-Amino-Capronsäure; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,0

Kulturmedium: Das Standard-Kulturmedium setzt sich zusammen aus DMEM, 10 % FKS, 1 % Antibiotikallösung

para-Formaldehyd (*Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz*)

Eine 4%-ige Lösung in PBS wurde hergestellt, indem das para-Formaldehyd auf einem Magnetrührer bei 60-70 C° gerührt wurde, bis die Lösung klar war. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

PBS enthält 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,7 mM KCl, 140 mM NaCl 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> und 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> gelöst in Aqua dest. (pH 7,4; 265 osm).

PBS-Glycerin: 45 ml Glycerin, 5 ml PBS und 1,25 g Natriumazid wurden gemischt und über Nacht filtriert. Der pH-Wert wurde auf 8,2 eingestellt.

Permeabilisierungspuffer: PBS mit 1 % FKS und 0,1 % Saponin

Probenpuffer für Immunoblot: Proben die wenig Protein enthielten, wurden mit 1 mg SDS, 5 µl Glycerin, 2,5 ml Mercaptoethanol und 0,3 µl Gelpuffer vermischt.

Probenpuffer für PCR: 30 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau in Aqua dest.

Präparationspuffer für Lamina-spezifische Entnahme von Neuronen: *Hanks' s balanced salt solution* (HBSS) mit 6,5 mg% Glukose und 20 mM HEPES;

TAE-Puffer (1l, 50 x): 242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8) in Aqua bidest.

Transferpuffer (25 mM Tris): Für 2,5 l wurden 7,5 g Tris; 36,3 g Glycerin und 250 ml Methanol in Aqua dest. angesetzt und auf pH 9 eingestellt.

Tris-Stammlösung: 24,23 g Tris in 1000 ml Aqua dest.

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)

Für die TBS-Lösung wurden 6,05 g Tris und 43,9 g NaCl ad 5 l Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,4-7,6 eingestellt.

TBST: 20 mM Tris; 0,14 M NaCl; 1 mM EDTA; 0,1 % Tween; pH 7,5

TNT-Puffer für TSA Färbung: 0,1 M Tris/HCl; 0,15 M NaCl; 0,05 % Tween 20; pH 7,5

TNB-Puffer für TSA Färbung: 0,1 M Tris/HCl; 0,15 M NaCl; 0,5 % Blocking Reagenz (*NEN Life Science*); pH 7,5.

Tris/NaCl-Puffer: 250 ml Tris-Stammlösung, 40 ml 1N HCl und 200 ml 9 % NaCl ad 200 ml in Aqua dest., pH 7,4-7,6

Tris-Stammlösung, 0,2 M: 60,6 g Tris in 2,5 l Aqua dest., pH 10,2.

Trypsin: Trypsin wurde als 0,05 %ige Lösung in PBS (0,1 M) angesetzt und der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

2.1.3 Antikörper und Reagenzien

**Tabelle 1: Polyklonale Antikörper**

Erkanntes Antigen	Donor	Spezies	Verdünnung / Besonderheiten	Hersteller
CXCR-4	Kaninchen	Ratte	1:100 30 sec. Trypsin	<i>Torrey Pines Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA</i>
GFAP	Kaninchen	Ratte	1:200 2 Min. Trypsin	<i>DAKO, Hamburg</i>
SDF-1	Ziege	Human, Maus, Ratte	1:100 Immunoblot 1:200 Histologie	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA</i>
SDF-1 $\alpha$	Kaninchen	Ratte	1:100	<i>Torrey Pines Biolabs</i>
SDF-1 $\beta$	Kaninchen	Ratte, Maus	1:100	<i>Torrey Pines Biolabs</i>

Tabelle 2: Monoklonale Antikörper

Erkanntes Antigen	Klon	Isotyp des Antikörpers	Verdünnung/ Besonderheiten	Hersteller
HSPG	10E4	Maus IgM	1:50	Zur Verfügung gestellt von Prof. G. David; KU Leuven
	3G10	Maus IgG	1:100	
MAP 2	HM-	Maus IgG	1:150, 60 sec. Trypsin	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
PCNA	PC-10	Maus IgG	1: 50	<i>Upstate biotechnology, Lake Placid, NY, USA</i>

Für die Spezifitätskontrolle der anti-SDF-1 Kaninchen-Antikörper wurde eine „Rabbit IgG Isotyp Control“ (*Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA*) und Kaninchen Serum (*Vector Laboratories*) verwendet.

**Tabelle 3: Sekundärreagenzien für die Immunfluoreszenzmarkierung und für Immunoblotanalysen**

Donor	Spezifität	Konjugat	Verdünnung/ Besonderheiten	Hersteller
Ziegen-IgG	Maus-IgG	Cy <sup>TM</sup> 3	1:300	<i>Dianova, Hamburg</i>
Kaninchen	Ziegen-IgG	Peroxidase	1:60 000	<i>Sigma</i>
Kaninchen	Ziegen IgG	Biotin	1:300	<i>Vector Laboratories,</i>
Ziege	Maus	Biotin	1:100	<i>Vector Laboratories</i>
Kaninchen	Maus IgM	Biotin	1:300	<i>Vector Laboratories</i>
Ziege	Kaninchen	Biotin	1:300	<i>Vector Laboratories</i>
Ziege	Kaninchen	FITC	1:30	<i>Vector Laboratories</i>

Weitere Reagenzien:

- Rekombinantes humanes SDF-1  $\beta$  (*Peprotech Inc., Rocky Hill, NJ, USA*)
- Normalseren von Maus, Ziege und Pferd (*Vector Laboratories, USA*)
- Oligodesoxynukleotide (*MWG Biotech*)
- Avidin / Biotin Blockierungs – Kit (*Vector Laboratories, USA*)
- TSA Fluorescence System (*NEN Life Science Products, Boston, USA*)
- 100 bp DNA-ladder (*Gibco BRL*)

Gebrauchsfertige Kits:

Qiagen RNeasy Kit (*Qiagen, Hilden*)

### 2.1.4 Geräte

Bio-Imaging Analyser System (Fuji Bas 1000) (*Fuji, Japan*)

Blotapparatur (Trans Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell) (*Biorad, München*)

CO<sub>2</sub>-Brutschrank (*Heraeus Instruments GmbH, Hannover*)

Durchflusszytometer (*Beckton-Dickinson, San Jose, USA*)

Elektrophoresekammer (Mini Protean 3 cell) (*Biorad, München*)

Elektrophoresis Power Supply (*EPS 600, Pharmacia Biotech*)

Flachbettscanner (*Scan Jet 4c/T, Hewlett Packard, USA*)

Fluoreszenzmikroskop (*Photomikroskop Axiophot*) (*Zeiss, Jena*)

Homogenisator (*Xenox, Niersbach*)

Lupenmikroskop (*Zeiss, Jena*)

Neubauer Zählkammer (*Brand, Ludwigshafen*)

Schütteltisch (*Gerhardt, München*)

UV- Illuminator (*INTAS, Göttingen*)

Vibratom (Micro-Cut H1200) (*BioRad, München*)

Zentrifuge (Eppendorf centrifuge 5417 R) (*Eppendorf, Köln*)

Zentrifuge (Sigma 3K12, Sigma Laborzentrifugen) (*Sigma, Deisenhofen*)

Schneidegeräte für Paraffinschnitte ( Leica RM 2155) (*Leica, Bensheim*)

Schneidegeräte für Gefrierschnitte (Kryostat Frigocut 2800) (*Reichert Jung, Wien*)

Thermocycler Gene Amp PCR System 2400 (*Perkin Elmer, CA, USA*)

2.1.5 Labormaterialien

Chemotaxiskammer nach Boyden (*Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD, USA*)

Kryoröhrchen (*Nalge Company, Rochester, USA*)

Deckgläser (*Menzel, Braunschweig*)

Flachbodenplatten (Tissue Culture Plate, 6-well Flat Bottom)

(*Sarstedt Inc., Newton, NC, USA*)

Pasteurpipetten (*Brand, Ludwigshafen*)

Petrischalen (Tissue culture dish 100x20mm) (*Sarstedt, USA*)

Petrischalen (Tissue culture dish 35x10mm) (*Corning, USA*)

Polykarbonatmembran (5µm Porendurchmesser, 25x80 mm, PVP)

(*Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD, USA*)

PVDF-Membran (Roti PVDF Transfermembran) (*Roth, Karlsruhe*)

Röntgenfilm (Hyperfilm ECL), (*Amersham Buchler, Braunschweig*)

Skalpell (Cutfix), (*Braun Surgical GmbH, Melsungen*)

Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) (*Sarstedt, Nümbrecht*)

Zellkulturflaschen (Tissue Culture Flask, 25 cm<sup>2</sup>) (*Sarstedt Inc., Newton NC, USA*)

Zellkulturflaschen (Tissue Culture Flask, 75 cm<sup>2</sup>) (*Sarstedt Inc., Newton NC, USA*)



### 2.2 Zellbiologische und Immunhistochemische Methoden

#### 2.2.1 Tiermodell

Die histologischen Untersuchungen wurden an Wistar-Ratten der Stadien E 15 bis P 30 durchgeführt. Diese Tiere wurden in einem 12h Tag und Nacht Rhythmus gehalten, wobei der Gestationszeitpunkt durch eine begrenzte Verpaarungszeit kontrolliert wurde. Der auf die Verpaarung folgende Tag wird als E (Embryonaltag) 1 angegeben und der Tag der Geburt wird nach einer Gestationsdauer von 20 Tagen als P (postnataler Tag) 0 bezeichnet. Das Cerebellum der Ratten eignet sich aufgrund der hauptsächlich postnatal ablaufenden Ontogenese besonders gut für neurogenetische Untersuchungen. Zur vergleichenden Untersuchung dienten zusätzlich bereits in Paraffin eingebettete, 6-OHDA behandelte Hamster-Gehirne aus vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe.

#### 2.2.2 Fixierung und Einbettung

Für die Entnahme embryonaler Ratten wurde das Muttertier mit 4-prozentiger Tribromethanol-Lösung (i.p.) anästhesiert, bevor die Embryonen dem Uterus entnommen wurden.

Die Fixierung der Tiere erfolgte durch transkardiale Perfusion entweder mit 25%iger Bouin'scher Lösung in PBS oder mittels 4%-igem PFA. Anschließend wurden die Gehirne über Nacht in der Fixierungslösung nachfixiert. Nach einer mehrstündigen Spülung in PBS mussten die Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert werden. Diese begann mit 50 % Ethanol (vergällt), darauffolgend 70, 80, 90 und 100 Prozent, wobei sich die Zeitdauer für die Alkoholbehandlung nach der Größe der Gewebe richtete und zwischen 30 Minuten und zwei Stunden lag. Darauffolgend wurde das Gewebe bis zum Absinken in Methylbenzoat gegeben, welches nochmals gewechselt und für weitere 30 Minuten auf dem Gewebe belassen wurde. Schließlich

wurde das Material über Nacht in Paraffin (low melting point) eingelegt (50 C°) und nach einem Paraffin-Wechsel und vier Stunden Unterdruck in Paraffinblöcke eingebettet. Die Schnitte wurden an einem Rotationsmikrotom in frontaler bzw. sagittaler Ebene in 7µm Dicke geschnitten und auf Biobond beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37°C getrocknet und anschließend entparaffiniert. Dieses geschah durch 2x5 min Inkubation in Xylol und durch weitere je 2x5 min Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe von 100, 90, 70, und 50 Prozent. Da sich die Funktion einiger Antikörper an Paraffinschnitten nicht als optimal erwies, wurden von den fixierten Tieren auch Gefrierschnitte angefertigt. Das Gewebe wurde hierfür im Anschluß an die Nachfixierung und PBS-Spülung in 20%iger Sukrose-Lsg. equilibriert, bevor es in flüssigem Stickstoff in Kryoröhrchen eingefroren und bei -70°C gelagert wurde.

Die Fixierung der auf Deckgläsern kultivierten Zellen erfolgte für zehn Minuten in eisgekühltem Aceton (-20°C). Anschließend wurden die Deckgläser in PBS bei 4°C bis zur Färbung aufbewahrt.

### 2.2.3 Histologie

#### *2.2.3.1 Standardhistologie*

Standardfärbungen wurden zu jeder Schnittreihe mit Hämatoxylin und Eosin durchgeführt. Nach einer 7-minütigen Anfärbung mit Hämalaun nach Maier oder Ehrlich´s Hämatoxylyn wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült, kurz mit HCl-Alkohol differenziert und anschließend 10-15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Färbung mit Eosin erfolgte nach einem weiteren Spülschritt in Aqua dest. für zwei Minuten. Anschließend wurden die Schnitte erneut gespült, in 80 % Alkohol differenziert und durch Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 90 und 100 Prozent zu je 2 x 5 Minuten und weiteren 2 x 5 min Xylol-Behandlung dehydriert. Die Objektträger wurden mit DePeX eingedeckt.

### 2.2.3.2 Immunhistochemie

Für eine immunhistochemische Färbung wurden die Aceton-fixierten Deckgläser bzw. die Paraffin- oder Gefrierschnitte für fünf Minuten in PBS gespült. Diesem Spülschritt folgte eine 30-minütige Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Wasserstoffperoxid 3 % in Methanol), welches die endogenen Peroxidasen inaktiviert. Gewebe bindet aufgrund des Vorhandenseins von endogenem Biotin, Biotin-bindenden Proteinen oder Lektinen häufig Avidin, biotinylierte Meerrettich-Peroxidase oder andere Komponenten des Biotin/Avidin-Systems, ohne dass ein biotinierter Antikörper hinzugefügt wurde. Um diesen unspezifischen Hintergrund zu vermeiden, wurden die Präparate zuerst für 15 Minuten mit Avidin und darauffolgend weitere 15 Minuten mit Biotin überschichtet, um die verbliebenen Biotin-Bindungsstellen des Avidins zu blockieren.

Eine anschließende 30-minütige Behandlung mit BSA (0,75% in PBS) diene der Abblockung unspezifischer Eiweißbindungsstellen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte anschließend für 45–60 Min. bei RT, worauf sich wiederholte Spülschritte in PBS anschlossen. Auch vor der 45-60-minütigen Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper der entsprechenden Spezies wurden wiederum unspezifische Bindungsstellen durch eine 30-minütige Überschichtung mit serumhaltigem PBS (1% Normalserum der entsprechenden Spezies) blockiert. Nach einem abschließenden Spülgang wurde durch die Überschichtung mit einem Komplex aus Streptavidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase (Strept-AB-Komplex, DAKO, Hamburg) in PBS-Puffer die Enzymbindung und Entwicklung ausgelöst.

Zur Identifizierung von Astrogliazellen (Antikörper GFAP) und Neuronen (Antikörper MAP 2) erfolgte die Entwicklung nach einer abschließenden Spülung in PBS mit Wasserstoffperoxid, 3,3-Diamino-benzidin-hydrochlorid (DAB) und Puffer (pH 7,5 in Aqua dest.) für 10 Min. Nach dem Stoppen der Reaktion und einem Spülschritt in Aqua dest. wurden die Objekte mit AquaTex mit 2,5% Natriumazidzusatz oder Kaiser's Glyceringelatine (Merck) eingedeckelt.

### 2.2.3.3 Fluoreszenzfärbung

Für die Fluoreszenzfärbungen fanden entweder FITC- (Fluoresceinisothiocyanat) bzw. Cy3-konjugierte Sekundärantikörper oder eine empfindlichere Tyramid-Fällungsreaktion (TSA, *NEN-Dupont*) Verwendung. Bei der einfachen Immunfluoreszenzfärbung wurden die Deckgläser bzw. Objektträger für fünf Minuten in PBS gespült und anschließend für eine Stunde bei RT unter Lichtausschluss mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach wiederholten Waschschritten in PBS (5 Min.) erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper. Weiteren PBS-Waschschritten folgte anschließend eine Kernfärbung durch eine fünfminütige Behandlung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid. Nachdem die Deckgläser bzw. Objektträger wiederholt in PBS gespült worden waren, wurden diese kurz in Aqua dest. getaucht und mit PBS-Glycerin mit 2,5% Natrium-Azid eingedeckelt.

Die TSA-Färbung ist bis zur Blockierung der endogenen Peroxidase mit den Einfachfärbungen identisch. Nach diesem Schritt erfolgte eine zusätzliche Blockierung unspezifischer Avidin/Biotin-Bindungsstellen mittels eines Avidin-Biotin-Blockierungs-Kits. Dafür wurden die Präparate für 15 Minuten mit Avidin und für 15 weitere Minuten mit Biotin überschichtet. Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte ebenfalls ein weiterer Blockierungsschritt durch die Inkubation mit Blockierungspuffer (PBS mit 0,75 % BSA) für weitere 30 Minuten. Der Primärantikörper wurde ebenfalls im Blockierungspuffer angesetzt und für 45 Minuten auf dem Präparat belassen. Nach einigen Waschschritten in PBS erfolgte eine 45-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper, welcher in PBS mit 1 % Normalserum auf die entsprechende Konzentration eingestellt worden war. Sämtliche weiteren Spülschritte wurden nicht mit PBS, sondern mit TNT-Puffer durchgeführt. Nach einem ersten Spülschritt in diesem Puffer wurden die Präparate für 30 Minuten mit TNB-Blockpuffer blockiert. Auch die Enzymkoppelung mit einer Streptavidin gekoppelten Meerrettichperoxidase wurde in TNB-Puffer durchgeführt (1:500) und dauerte 30 Minuten. Nach weiteren Spülungsschritten folgte die Entwicklungsreaktion mit Tetramethylrhodamin-Tyramid (rot) oder Fluorescein Tyramide Reagent (grün) in der Verdünnung 1:50 in

Amplifizierungspuffer für 4 Minuten. Anschließend wurde wiederum eine Kernfärbung mit Bisbenzimid durchgeführt.

Bei Doppelimmunfluoreszenzen wurde ein Primärantikörper mit der TSA-Methode detektiert, während der zweite Primärantikörper einer anderen Spezies mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper einer anderen Farbe markiert wurde.

Bei verschiedenen Nachweisen mussten die Bindungsstellen im Gewebe erst durch Andauung der Proteine den Antikörpern zugänglich gemacht werden. Deshalb wurden die Paraffinschnitte (je nach Antikörper) für 30 oder 60 sec. Sekunden mit Trypsin vorbehandelt.

Sämtliche Inkubationsschritte, die 30 Minuten und länger andauerten, wurden in einer feuchten, abgedunkelten Kammer bei RT durchgeführt.

Um die Farbtintensität zu erhalten, wurde für das Eindeckeln sämtlicher Fluoreszenzfärbungen PBS/Glyzerin verwandt. Die Präparate wurden anschließend bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

### *2.2.3.4 Nachweis von HSPG-gebundenem SDF-1 mittels Fluoreszenzfärbung*

Bouin-fixierte Gehirne wurden nach der Standardmethode in Paraffin eingebettet und in Scheiben geschnitten. Nach der Entparaffinierung wurden unspezifische Bindungsstellen durch BSA (10 mg/ml) blockiert. Anschließend erfolgte eine Überschichtung der Gewebe mit rekombinantem SDF-1 (500 ng/ml) bei 37° C für 60 Minuten. Ungebundenes SDF-1 konnte durch gründliches Spülen in PBS entfernt werden. Der Nachweis des gebundenen Chemokins erfolgte durch 60-minütige Inkubation mit anti-SDF-1 Antikörpern (C 19) und einer TSA-Fluoreszenzfärbung (wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben).

Um eine spezifische HSPG-Bindung nachweisen zu können, wurde dieser Versuch an Heparitinase-behandelten Schnitten wiederholt. Dafür wurden die deparaffinierten Schnitte für zweimal fünf Minuten in Heparitinase-Puffer gespült und dann mit Heparitinase (zur Verfügung gestellt von Prof. G. David, KU Leuven), welche 1:10 in Heparitinase-Puffer verdünnt wurde, überschichtet. Die Inkubation erfolgte für drei

Stunden bei 37° C. Nach zweimaligem Spülen in 0,5x PBS-Puffer wurden die Schnitte für anschließende Färbungen bzw. für eine Behandlung mit rekombinantem SDF-1 und einen darauf folgenden SDF-1-Nachweis verwendet.

Als Positivkontrolle für einen gelungenen Abbau der Heparanreste, wurde eine immunhistochemische Färbung mit zwei gegen HSPG gerichteten Antikörpern (10E4; 3G10) durchgeführt, die freundlicherweise von Prof. G. Davids (KU Leuven, Belgien) zur Verfügung gestellt worden waren. Während der Antikörper 10E4 die äußeren Glykanreste des HSPG erkennt, ist der Antikörper 3G10 gegen das Core-Protein gerichtet und zeigt nur bei erfolgreicher Heparitinase-Behandlung eine Immunreaktion. Eine Fluoreszenzfärbung wurde mit beiden Antikörpern jeweils bei unbehandelten- und bei Heparitinase-behandelten Schnitten durchgeführt.

### 2.2.4 Intrazelluläre Immunfluoreszenzmarkierung für die FACS-Analyse

Für intrazelluläre Immunfluoreszenzmarkierungen ist es nötig, die Zellmembran für die Antikörper durchlässig zu machen. Dafür wurde bei der intrazellulären SDF-1 Färbung Saponin benutzt. Die kultivierten Meningealzellen und Corneafibroblasten wurden für vier Stunden bei 37° C in Gegenwart des Proteintransportinhibitors Brefeldin A (10 µg/ml, Fluka) vorinkubiert. Die Markierung erfolgte in Kunststoffröhrchen (Falcon Tubes, *Becton Dickinson, Heidelberg*) mit 10<sup>6</sup> Zellen in einem Gesamtvolumen von 100 µl Färbepuffer (PBS mit 1 % FKS) für 30 Minuten bei 4° C. Nach zweimaligem Waschen (1 ml Färbepuffer) wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 100 µl para-Formaldehydlösung (4 % in PBS, pH 7,4) für 20 Minuten bei 4° C fixiert. Anschließend wurden die Zellen in Permeabilisierungspuffer (PBS mit 1 % FCS und 0,1 % Saponin) gewaschen und dann für 15 min in 100 µl dieses Puffers bei 4° C inkubiert. In diesem Medium erfolgte bei gleichem Volumen auch die 30-minütige Färbung mit dem SDF-1 Antikörper (rabbit anti-rat SDF-1 β, *Torrey Pines Biolabs*) in einer 1:100 Verdünnung. Nach einem weiteren Waschschrift im Permeabilisierungspuffer (1 ml) erfolgte die Markierung mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper in wiederum 100 µl Gesamtvolumen des Puffers für 20 Minuten bei 4° C. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 200 µl Azid-PBS aufgenommen und durch Zugabe von 200 µl para-

Formaldehyd (3 %) fixiert. Die Spezifität der Färbung wurde durch den Einsatz der entsprechenden Isotypkontrolle überprüft.

Die Fluoreszenzanalyse erfolgte mit einem FACSstar flow cytometer (*Beckton-Dickinson, San Jose, USA*).

### 2.2.5 Zellpräparation und Kultivierung der Zellen

#### *2.2.5.1 Zellpräparation*

Die Fibroblasten wurden ebenso wie die Zellen der äußeren Körnerzellschicht und die Zellen des Isocortex aus Wistar-Ratten präpariert. Für Versuchsansätze, bei denen nur mausspezifische Antikörper zur Verfügung standen, wurden Astrozyten und Meningealzellen aus Mäusen des Stammes C 57 entnommen. Für die Zellpräparation der äußeren Körnerzellen wurden nur Tiere der Altersstadien P 0 – P 4 verwendet, während für die Untersuchungen der Isocortex-Neurone auch Tiere zwischen E 16 und E 21 Verwendung fanden. Die Tötung dieser Tiere geschah durch rasche Dekapitierung.

#### *2.2.5.2 Kulturbedingungen*

Alle Zellen wurden in einer feuchten Atmosphäre bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Basis-Kulturmedium diente DMEM mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (*FKS, Sigma*), L-Glutamin in einer Konzentration von 6 mM, Penicillin (*Seromed*) in einer Konzentration von 100 Einheiten/ml und Streptomycin (*Seromed*) in einer Konzentration von 100 mg/ml. Als Anzuchtmedium für die Meningealzellen und die Corneazellen diente Basismedium, das anstelle der 10 % FKS, 50 % des Serums enthielt. Im Laufe der ersten zwei Wochen wurden die Zellen durch weiter absinkende Konzentrationen an FKS bis an 10 % adaptiert.

Die Kultur der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen (75 oder 25 cm<sup>2</sup>, Sarstedt, USA), wobei eine erste Subkultur durchgeführt wurde, nachdem die Zellen den Boden der Kulturflasche konfluent bedeckten. Dafür wurden die Zellen, sobald das Kulturmedium abgesaugt war, für 20 Sekunden mit 3 ml einer Lösung aus 25 mg Trypsin, 37 mg HEPES (Serva, Heidelberg) in 25 ml PBS (Dulbecco's) überschichtet. Anschließend wurde diese Lösung wieder entfernt und die Zellen wurden für 3 min bei 37° C inkubiert. Durch kräftiges Schlagen der Kulturflaschen wurden die Zellen abgelöst, in 3 ml Basismedium aufgenommen, mittels einer Pasteurpipette dissoziiert und in neue Kulturflaschen oder auf beschichtete Deckgläser (4 cm<sup>2</sup>) in 6-Napf-Flachbodenplatten verteilt.

Als Beschichtung der Deckgläser diente Laminin (Sigma, München) oder Poly-D-Lysin (PDL). Diese wurden für eine Laminin-Beschichtung mit 20 µg/ml Laminin in DMEM für 1-2 h bei 37° C überschichtet und anschließend mit DMEM gespült. Eine Beschichtung mit PDL erfolgte durch zweistündige Inkubation der Deckgläser mit einer 0,002%igen wässrigen PDL-Lösung.

### 2.2.6 Fibroblasten

#### *2.2.6.1 Meningealzellen*

Für die Anlage einer Meningeal-Kultur wurden Cerebrum und Cerebellum entnommen und in sterilem PBS aufgefangen. Die Ablösung der Meningen erfolgte mechanisch unter sterilen Bedingungen. Die Zellen wurden ebenfalls mechanisch mit einem Skalpell dissoziiert. Anschließend wurden die Hirnhäute in 3 ml DMEM aufgenommen und in eine Kulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) überführt. Das Absaugen von überschüssigem Medium ermöglichte es den Zellen, auf dem Boden der Flasche zu adherieren. Als Anzuchtmedium diente Basismedium, welches 50% FKS enthielt.



### 2.2.6.2 Cornea Zellen

Für die Präparation der Cornea-Fibroblasten wurden die Augen junger Wistar-Ratten entnommen, in sterilem PBS aufgefangen und von anhaftenden Epithel- und Endothelzellen befreit. Die abgelösten Corneae wurden mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und in eine Kulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) überführt. Als Anzuchtmedium diente wie bei den Meningealzellen Basismedium, welches 50 % FKS enthielt.

Nach 24h wurden die Zellen an Kulturmedium mit 25% FKS und nach weiteren 24h an das Standardkulturmedium adaptiert. Weitere Medienwechsel erfolgten alle 3-4 Tage. Nachdem sich konfluente Zellrasen gebildet hatten, erfolgte die Subkultur der Zellen.

Es wurden nur Zellen bis zur sechsten Subkultur verwendet, da in Kultur gehaltene Fibroblasten zwischen achter und zehnter Subkultur dedifferenzieren (Freshney 1987).

### 2.2.7 Astrozyten

Die Maus- und Rattenastrozyten wurden nach einer leicht abgewandelten Standardmethode (McCarthy und de Vellis, 1980) gewonnen. Dafür wurden von den Großhemisphären der P 0 bis P 2 Tiere unter dem Binokular die Hippokampusformationen und die Meningen in Ca<sup>2+</sup>-und Mg- freiem PBS entfernt. Die Hemisphären wurden mechanisch zerkleinert und anschließend enzymatisch dissoziiert, indem sie mit 2 ml einer Dissoziationslösung (20 mg Trypsin (*Sigma*), 24 mg Hepes (*Sigma*) und 2 mg EDTA (*Merck*) in 10ml DMEM mit einem Zusatz von 25µl einer Desoxyribonukleasezubereitung, die 1 mg Desoxyribonuklease/ml PBS enthielt) überschichtet und für zweimal 15 Minuten im Brutschrank bei 37° C inkubiert wurden. Darauf folgend wurde das Dissoziationsmedium abgesaugt und durch Basismedium ersetzt. Einer weiteren mechanischen Dissoziation mittels enggeschmolzener Pasteurpipette folgte eine Vereinzelung der Zellen durch Filtration durch einen Nylon-

Filter mit 24 µm Porengröße. Die Zellsuspension wurde nach einer Zentrifugation (1000 U/min, 5 min) zu je 5 Millionen Zellen in 8 ml Basismedium in Kulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) überführt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage. Um Neurone und Oligodendrozyten zu entfernen, wurden die Kulturflaschen nach zehn Tagen Primärkultur über Nacht auf einem Rotationsschüttler (*Gerhard, Bonn*) geschwenkt. Die Abtötung von Fibroblasten gelang durch den Zusatz von 5-Fluoro-2`desoxyuridin (*FDU, Sigma*) in einer Konzentration von 10<sup>-5</sup> M und die Reduktion des Mikroglia-Wachstums durch Amphotericin. Die Subkultur erfolgte am sechzehnten Tag. Für die Versuche dienten nur Zellen der ersten und zweiten Subkultur.

### 2.2.8 Körnerzellen und Isocortex-Neurone

Die Gehirne von Wistar-Ratten der Altersstufen P0 bis P4 wurden in steriles, eiskaltes PBS (angereichert mit 6,5% Glukose) überführt; die Cerebelli wurden von den Cerebri abgetrennt. Um die Zellen schichtspezifisch entnehmen zu können, wurden die entsprechenden Gehirnabschnitte mit einer 2-prozentigen Agarose-Lösung in einem Hoch-Frequenz-Vibrator (*BioRad, München*) fixiert und mit einem eiskalten Präparationspuffer, bestehend aus Hanks´s balanced salt solution (HBSS) mit 6,5 mg% Glukose und 20 mM Hepes, bedeckt. Das Cerebrum wurde frontal und das Cerebellum sagittal in Scheiben von 400 µm Dicke geschnitten, die dann in eine Petrischale mit frischem Präparationspuffer überführt wurden. Aus diesen Scheiben konnten unter einem Lupenmikroskop die entsprechenden Regionen präpariert werden. Bei der Isolierung der migratorischen Neurone des Isocortex wurde die Abtrennung der Ventrikulärzone innerhalb der Intermediärzone durchgeführt. Anschließend erfolgte die mechanische und enzymatische Dissoziation. Zur enzymatischen Dissoziation wurden die Gewebestücke für 2 x 15 Minuten in einer Dissoziationslösung bei 37° C inkubiert und anschließend mechanisch zerkleinert (siehe auch 2.2.7).

### 2.2.9 Zellstimulation

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 6Napf-Flachbodenplatten auf beschichtete (Laminin bzw. PDL) oder unbeschichtete Deckgläschen ausgesät und mit 2 ml Medium überschichtet, welches den entsprechenden Stimulus enthielt. Die Kultur erfolgte über einen Zeitraum von vier Tagen.

### 2.2.10 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität

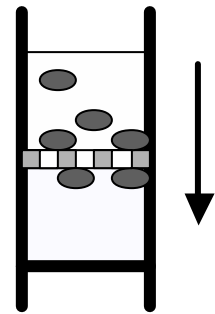
Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Probe der jeweiligen Zellen im Verhältnis 1:20 mit dem Farbstoff Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer (*Brand, Ludwigshafen*) lichtmikroskopisch ausgezählt. Tote Zellen konnten aufgrund ihrer Anfärbbarkeit mit dem Farbstoff identifiziert werden.

### 2.2.11 Konditionierte Medien

Zur Gewinnung von konditioniertem Medium wurden die entsprechenden Zellen über einen Zeitraum von drei Tagen in einem immer gleichgroßen Volumen ihres Kulturmediums (DMEM mit 1% Antibiotikallösung und 10 % FKS) inkubiert. Das konditionierte Medium wurde anschließend durch einen Filter (*Sarsted*) der Porengröße 0,24 filtriert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Verwendung fanden nur Zellkulturen, in denen die Zellen einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten und die sich maximal in der fünften Subkultur befanden.

### 2.3 Chemotaxis-Test mittels Boydenkammer

Die Durchführung von Chemotaxisversuchen erfolgte in Chemotaxiskammern (*Neuropore Corp.*) nach Boyden (Boyden 1962). Diese Kammern stellen ein Zwei-Kompartiment-System dar, in welchem in das untere Kompartiment die zu untersuchende potenziell-chemotaktische Substanz und in das obere Kompartiment die zu untersuchenden Zellen gefüllt werden. Getrennt werden die beiden Kammern durch eine Polykarbonatmembran (*Nucleopore, PC-membrane 25x80 mm, Porengröße 5 µm, PVP*), welche Poren (5 µm) besitzt, die es nur chemotaktisch aktiv migrierenden Zellen ermöglicht in diese einzuwandern (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5:**  
Schematische  
Darstellung der  
Boydenkammer.

Um die Zelladhäsion zu ermöglichen, wurden die Filter mit Laminin beschichtet. Dafür wurde der Filter für 1h in 0,5 mol Essigsäure gewaschen, mehrmals mit Aqua bidest. gespült und in 0,01 % Gelatine-Lösung (*Sigma*) eingelegt. Nach einer Stunde wurde der Filter auf saugfähigem Papier getrocknet und anschließend in einer Petrischale mit Laminin je 20 Minuten beidseitig beschichtet.

Die unteren, 25µl fassenden Kompartimente der Chemotaxiskammer wurden mit Basismedium, MCM oder SDF-1 versetztem Basismedium gefüllt und mit einem beschichteten Filter abgedeckt. Der obere Teil der Kammer wurde aufgesetzt, fingerfest verschlossen und für 30 min. bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die oberen Kompartimente mit 50 µl Zellsuspension (4 Mio/ml) pro Öffnung befüllt. Die Inkubation der Chemotaxiskammer erfolgte für 48h in einem Brutschrank bei 37 C° und 5% CO<sub>2</sub>.

Zur Auswertung der Experimente wurde der obere Teil der Kammer abgenommen und der Filter abgehoben und umgedreht, so dass die Zellen, die auf der dem Stimulus abgewandten Filterseite liegen geblieben waren (also nicht durch den Filter migrierten), abgestreift werden konnten. Der Filter wurde nun für zehn Minuten in Methanol fixiert und anschließend entweder einer Routinefärbung mit Hämalaun oder einer immunhistochemischen Färbung unterzogen (siehe 2.2.3). Letztere diente zum Nachweis dafür, dass tatsächlich nur Neurone und keine Astrozyten migriert waren und

wurde mit den Antikörpern gegen MAP 2 (Neuronen-spezifisch) und GFAP (Glia-spezifisch) durchgeführt. Die Auswertung der Migration erfolgte durch die Aufnahme der Filter mit einem Hochauflösungsscanner bei 1200 dpi. Der Hintergrund wurde definiert durch die Aufnahme eines Filters ohne migrierte Zellen; dieser Wert wurde von der gemessenen Farbintensität der Versuchsfiler abgezogen. Anschließend wurde die relative Farbintensität pro Fläche, die mit der Anzahl migrierter Zellen korrespondiert, für jede einzelne Kammer bestimmt. Die Daten mehrerer Kammern mit identischen Ansätzen wurden zusammen statistisch ausgewertet.

Ein Teil der präparierten Zellsuspension wurde zusätzlich auf Laminin-beschichtete Deckgläser in Basismedium ausgesät. Dadurch war eine zusätzliche optische und immunhistochemische Kontrolle der Viabilität der Zellen und der Reinheit der gewonnenen Population möglich.

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1 Ultrafiltration

Um Medien durch Ultrafiltration ankonzentrieren bzw. nach Größe der Proteine trennen zu können, wurden diese in einer Ultrafiltrations-Kammer (Amicon 8400;  $P_{\max}$  75 psi; 5,3 kg/cm<sup>3</sup>; Amicon, Danvers, USA) durch Filter (DIAFLO Ultrafiltrations-membran: YM10 u. YM 30, Amicon) mit nominalen Trenngrenzen von 30, 10 und 3 kDa mittels geringem Druck (Stickstoff; 3,7 atm) passiert. Ein in der Kammer integrierter Magnetrührer sorgte dabei für eine ständige Umwälzung des Mediums. Das gewonnene Medium wurde nach der Filtration sterilfiltriert und bei -20° C gelagert.

### 2.4.2 Quantitative Proteinbestimmung

Um die quantitative Menge an Proteinen bestimmen zu können, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) durchgeführt. Dieser Nachweis beruht auf der spezifischen Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffes *Coomassie Brilliant G* an Proteine. Dieser Farbstoff weist in seiner kationischen Form ein Absorptionsmaximum von 470 nm (rot) auf, während bei der Bildung eines anionischen

Farbstoff-Proteinkomplexes ein Absorptionsmaximum von 595 nm auftritt (blau). Zur Erstellung einer Eichkurve wurde als Proteinstandard 10 % Rinderserumalbumin (BSA :10 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O) eingesetzt. Die Extinktion des BSA-Farbreagenzkomplexes wurde bei 595 nm für verschiedene Proteinkonzentrationen gemessen und lieferte die Werte für eine Eichkurve. Die Proteinmenge der unbekanntes Probe wurde anhand dieser Eichkurve durch Interpolation bestimmt.

### 2.4.3 Ausfällung der Proteine

Das Medium wurde in einem Mikrolitergefäß mit 4 Vol. Methanol und 1 Vol. Chloroform intensiv geschüttelt, bevor 3 Vol. ddH<sub>2</sub>O hinzugefügt und ebenfalls gründlich gemischt wurden (ca. 1 min.). Die obere wässrige Phase wurde nach Zentrifugation (5000 x g für 5 Min.) abgehoben und verworfen. Das restliche Medium wurde abermals mit 3 Vol. Methanol kräftig gemischt und zentrifugiert. Das Sediment wurde getrocknet (Stickstoff) und in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

### 2.4.4 SDS-Polyacrilamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Page wurde mit einer *Mini Protean 3 cell* Elektrophoresekammer (*Biorad, München*) durchgeführt. Die Trenngele und die Sammelgele hatten folgende Zusammensetzung:

Stammlösung zum Ansatz	Acrylamidkonz. im Gel 10%	4%	
Acrylamid-Bis (39% T, 0,5% C)	7,5	1,67	ml
dd H <sub>2</sub> O	3,6	5,79	ml
Trenngelpuffer (4x)	3,75		
Sammelgelpuffer	-----	2,6	ml
Ammoniumpersulfat (10%)	0,15	60	µl
TEMED	0,015	30	µl

Das Trenngel wurde mit 60 µl TEMED und 30 µl APS-Lösung versetzt und in die Gelkassette gegossen. Nachdem es über 1 h auspolymerisiert war, wurde das Sammelgel wiederum mit 60µl TEMED und 30µl APS-Lösung versetzt und über das Trenngel gegeben. Anschließend wurden die Probenaschen eingesteckt und das Gel polymerisierte für mindestens eine Stunde bei RT aus.

Die Proben wurden wie beschrieben in Probenpuffer aufgenommen und für 4 min gekocht, bevor sie in die Gelkammern eingefüllt wurden. Zur Kenntlichmachung des jeweiligen Molekulargewichts der Proteine wurde bei jedem Lauf zusätzlich ein vorgefärbter Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 400 V und 70 mA unter Benutzung eines *Elektrophoresis Power Supply (Pharmacia Biotech)* durchgeführt und beendet, sobald die Lauffront, die durch Bromphenolblau sichtbar gemacht worden war, das Ende des Gels erreicht hatte.

### 2.4.5 Semi-dry Westernblot

Nach dem Ende der Elektrophorese wurden die Gele für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Währenddessen wurden für jedes Gel vier Stücke Blotpapier und eine PVDF-Membran in der Größe des Gels zurechtgeschnitten. Das Blotpapier wurde ebenfalls im Transferpuffer-Puffer äquilibriert, während die PVDF-Membran für 30 sec in Methanol und anschließend in Transferpuffer gelegt wurde. Nun wurden zwei Lagen des feuchten Blotpapiers, die PVDF-Membran, das Gel und erneut zwei Lagen des Blotpapiers übereinander auf die Anodenplatte der Blot-Apparatur (*Transblot SD, Biorad München*) geschichtet.

Anschließend wurde die Apparatur durch das Auflegen der Kathodenplatte geschlossen und die Proteine wurden bei RT (25 V, 200 mA, 20 W) für 1h transferiert.

### 2.4.6 Immunpräzipitation

Um spezifische Proteine aus komplexen Mischungen anzureichern bzw. zu entfernen, kann man die Proteinantigene mit einem Überschuß an Antikörpern zu Immunkomplexen reagieren lassen. Diese Immunkomplexe werden durch die Bindung an bakterielle Ig- Rezeptoren des Protein A aus *Staphylococcus Aureus* (Kessler 1975, 1981; Moks et al., 1986) und daran gekoppelte Agarose oder Sepharose präzipitiert. Der Überstand der kultivierten Fibroblasten (500 µl) wurde mit anti-SDF-1β Antikörpern (*Torrey Pines Biolabs, San Diego, USA*) für zwei Stunden bei 4° C inkubiert und die Immunkomplexe wurden durch den Zusatz von 50 µl Protein A Agarose (*Sigma, Deisenhofen*) (Inkubation über Nacht bei 4° C auf einem Rotationsschüttler) präzipitiert. Nach einer Zentrifugation (4° C, 10000 x g, 1 min) wurde der Überstand geerntet und durch zwei weitere Zentrifugationen gesäubert, um anschließend im Boydenkammer Chemotaxistest oder im Western Blot verwendet zu werden. Das Sediment wurde durch dreimaliges Waschen in eiskaltem PBS gereinigt, in SDS-Probenpuffer gelöst, anschließend für vier Minuten auf 100° C erhitzt und zentrifugiert (10000 x g, 5 min). Der Überstand und das Präzipitat wurden durch SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert (siehe 2.4.4 u. 2.4.5).



### 2.5 Durchführung der Reversen Transkription und der Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, „polymerase chain reaction“) stellt eine Technik zur Vermehrung eines spezifischen Genomfragmentes aus DNA mit bekannter Nukleotidsequenz dar (Mullis 1985). Auch RNA kann mit Hilfe der PCR amplifiziert werden, sobald diese durch eine Reverse Transkription (RT) in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben worden ist (RT-PCR).

#### 2.5.1 Gewinnung der RNA

Die Extraktion der zellulären Gesamt-RNA erfolgte mittels eines RNeasy Kits (*Qiagen, Hilden*). Dafür wurde das Gewebe in einen Lysis-Puffer aufgenommen, welcher denaturierendes Guanidin-Isothiocyanat zur Inaktivierung von RNasen enthielt, und mit einem Stab-Homogenisator (*Xenox, Niersbach*) homogenisiert. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Röhrchen transferiert und zentrifugiert (10000x g). Der Überstand wurde abgenommen, mit einem Volumenanteil Ethanol (70 %) gemischt und in ein RNeasy Zentrifugenröhrchen überführt. Die in diesem Röhrchen integrierte Membran auf Silica-Gel-Basis band selektiv die RNA der Probe, während andere Bestandteile durch mehrfaches Waschen entfernt werden konnten. Schließlich wurde die RNA durch Zugabe von 50 µl RNase freiem Wasser eluiert und bei -70° C aufbewahrt.

### 2.5.2 RNA-Quantifizierung

Die Konzentration und die Reinheit der RNA können mittels eines Spektrometers bestimmt werden. Der Absorptionskoeffizient ( $A_{260} / A_{280}$ ) reiner RNA beträgt 1,8. Aus der Absorption bei 260 nm ergibt sich die Menge an RNA ( $40 \mu\text{g/ml RNA} = 1 \text{ OD}$ ).

### 2.5.3 cDNA-Strang-Synthese

Um RNA zu amplifizieren, muss mit dem Enzym Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) zuerst eine komplementäre DNA synthetisiert werden, die als Ausgangsmaterial für die PCR dient. Hierfür fand die Superscript Transkriptase (*Gibco*) Verwendung, die sich aus der von Retroviren stammenden Moloney-Mausleukämievirus-Reversen-Transkriptase (MMLV-RT) (Byrne et al., 1988) ableitet. Dieses Enzym benötigt ähnlich wie die DNA-Polymerase einen Primer (Random-Hexamer Primer) in Form eines kurzen Oligonukleotids.

#### Reaktionsansatz zur Herstellung von cDNA:

RNA

10 x PCR Puffer	200 mM Tris-Hcl, pH 8,4 500 mM KCl
Random Hexamer Primer	50 ng/ $\mu\text{l}$
Nukleotide (A, C, G, T)	10 mM dNTP-Mix
Reverse Transkriptase	200 U/ $\mu\text{l}$ (Superscript II RT, <i>Gibco</i> )
25 mM MgCl	
0,1 M Dithiothreitol (DTT)	
DEPC-behandeltes Wasser	

Die Herstellung der cDNA erfolgte in einem Thermocycler (Gene Amp PCR System 2400) (Perkin Elmer, CA, USA). Die isolierte Gesamt-RNA (5 µg) und die Primer (2 µl) wurden auf ein Volumen von 10 µl mit DEPC-behandeltem Wasser aufgefüllt und zusammen in einem Eppendorfgefäß für fünf Minuten auf 65° C erhitzt um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen. Beim langsamen Auskühlen bei RT hybridisieren die Primer an die RNA. Danach wurde ein Reaktionsgemisch aus 4 µl 5x Reverse Transkriptase Puffer, 2 µl MgCl<sub>2</sub>, 2 µl dNTP und 2 µl DTT hinzugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT und Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase wurde der Reaktionsansatz für 1 h bei 37° C inkubiert, anschließend für 15 Minuten auf 70° C erhitzt und zum Beenden der Reaktion wiederum fünf Minuten bei 4° C gekühlt.

Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung für die PCR bei -20° C aufbewahrt.

### 2.5.4 Die PCR

Die PCR stellt eine wiederholte Abfolge von Zyklen dar, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht. In einem ersten Denaturierungs-Schritt werden durch das Erhitzen auf 90°C die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA zerstört und die Doppelstränge voneinander getrennt. Im „Annealing“-Schritt wird das Reaktionsgemisch auf 37° C abgekühlt. Dabei lagern sich zwei synthetisierte Primer an die DNA-Einzelstränge (sDNA) an. Diese Oligonukleotide sind komplementär zum 5'- bzw. 3'-Ende der Zielstränge und begrenzen die zu vermehrende Region. Die Anlagerungstemperatur ( $T_m$ ) berechnet sich aus der Anzahl der einzelnen Basen des Primers [ $T_m = 4 \text{ (Anzahl G und C)} + 2 \text{ (Anzahl A und T)}$ ] und ergab für den SDF-1 Nachweis 55° C. Die Primer für SDF-1 (Accession Number: NM 022177) und  $\beta$ -Aktin (Accession Number: V01217 J00691) wurden von der Firma MWG AG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Der dritte Schritt der PCR besteht aus der Verlängerung der Primer durch eine DNA-Polymerase (Elongationsschritt), die die matritzenabhängige Synthese des komplementären zweiten Stranges, ausgehend vom 3' Ende der gebundenen Primer,

katalysiert. Die temperaturstabile Taq-DNA-Polymerase, die aus *Thermus aquaticus* isoliert wurde besitzt ein Temperaturoptimum bei 72° C. Mit diesem Enzym können DNA-Fragmente von einer Länge bis zu 5 kbp amplifiziert werden. Da die Polymerasen ein pH-Optimum oberhalb von 8 besitzen, wurde ein Tris-Puffer von pH 9 verwendet. Magnesiumionen beeinflussen sowohl die Bindung der Primer als auch die Aktivität der DNA-Polymerase. Eine Magnesiumchlorid-Konzentration von 0,5 mM hat sich in diesem Ansatz als erfolgreich erwiesen.

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Thermocycler, mit dem der Zyklus standardmäßig 40 mal wiederholt wird, wobei sich theoretisch bei jedem Zyklus die Zahl der DNA-Moleküle exponentiell vermehrt. Nach dem letzten Zyklus wird zur Beendigung der DNA-Syntheseschritte das Reaktionsgemisch für fünf Minuten bei 94° C erhitzt.

Als Negativkontrollen wurden Ansätze nur mit Wasser anstelle der cDNA bearbeitet. Als Positivkontrolle zur Sicherstellung einer korrekten RNA-Isolierung und zur Überprüfung eines möglichen Abbaus durch RNasen wurde ebenfalls eine Amplifikation der im Probenmaterial immer vorhandenen mRNA, die für sogenannte Housekeeping-Gene wie  $\beta$ -Aktin oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) kodiert, durchgeführt. Um sicherzustellen, dass keine genomische DNA amplifiziert wird, wurde ein DNA-Verdau mit 10000 Units einer RNase freien DNase 1 (*Böhringer*) für 20 Minuten bei 25° C durchgeführt. Deren Inaktivierung wurde im folgenden bei 65° C für 15 Minuten in Gegenwart von 20 mM EDTA durchgeführt.

Reaktionsansatz für die PCR:

10 x PCR-Puffer	200mM Tris-HCl, pH 8,4
	500mM KCl
50mM MgCl	
10 mM dNTP-Mix	

<i>Primer:</i>	<i>Sense</i>	<i>Antisense</i>
SDF-1	5'-CATGGACGCCAAGGT-3'	5'-TGCTTACTTGTTTAAGGC-3'
$\beta$ -Aktin	5'-AGAGGCAAATCGTGCGTGACA- 3'	5'-CACTGTGTTGGCATAGAGGTC-3'

cDNA-Matritze

thermostabile Taq-Polymerase (5 U/ml)

Für die PCR-Reaktion zur Amplifikation der cDNA-Sequenz wurde zuerst eine als Master-Mix bezeichnete Stammlösung hergestellt, welche alle für die Reaktion benötigten Reagenzien außer der cDNA-Matritze enthält. Dazu gehörten pro Versuchsansatz:

5 µl 10 x PCR-Puffer

4 µl MgCl<sub>2</sub>

1 µl dNTP-Mix

0,5 µl Taq-Polymerase (wurde erst zum Schluß zugefügt)

Zu dieser Stammlösung wurde je Reaktion 3 µl cDNA Matritze / Primer-Gemisch (2,5 µl 5' Primer; 2,5 µl 3'Primer; 10 pM) pipettiert. Das Gemisch wurde mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Nachdem das Reaktionsgemisch kurz abzentrifugiert worden war, wurde es im Thermocycler mit dem folgenden Temperaturprofil inkubiert:

Denaturierung

5 min	94° C
-------	-------

Elongationszyklen (30)

	<b>SDF-1</b>	<b>β-Aktin</b>
30 sec	94° C	94° C
30 sec	55° C	58° C
90 sec	72° C	72° C

Finale Elongation :

5 min	94° C
-------	-------

Die amplifizierten Produkte wurden bis zur weiteren Auswertung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert

### Auswertung der PCR

Die Auftrennung der erhaltenen DNA-Fragmente erfolgte nach unterschiedlicher Größe in einem Agarose-Gel (1,5 % in TAE-Elektrophoresepuffer). Die bei pH 7 negativ geladene DNA wandert in Abhängigkeit von der Fragmentgröße zur Anode. Als Standard wurden DNA-Fragmente bekannter Größe eingesetzt.

Zur Herstellung eines 1%igen, nicht denaturierenden Gels wurde 1 g Agarose mit 10 ml 10xTAE-Puffer gemischt und mit Aqua dest. auf ein Endvolumen von 100 ml aufgefüllt. Die Agarose wurde unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach kurzem Abkühlen der Lösung wurde diese in den vorbereiteten Gelträger gegossen.

Zur Vorbereitung der Proben wurde 10  $\mu\text{l}$  cDNA mit 2  $\mu\text{l}$  des DNA-Farbmarkers gemischt. Nach Verfestigung des Gels wurden die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer für eine Stunde bei 70 V und 110 mA.

Anschließend wurde das Gel in ein Ethidiumbromid-Bad (EtBr 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\text{H}_2\text{O}$ ) überführt und für 30 Minuten gefärbt. Der Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und die entstandenen Banden können anschließend unter UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht werden. Der durch die SDF-1 Primer amplifizierte DNA-Strang hatte eine aus der Sequenz abgeleitete Länge von 274 bp. Das Ergebnis wurde als Photo festgehalten.

## 2.6 Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Alle Experimente wurden, wenn nicht anders vermerkt, mindestens dreimal durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse entstammen jeweils einem repräsentativen Experiment.

Für die Boydenkammer-Chemotaxistests wurden Vier- bzw. Sechsfachbestimmungen der jeweiligen Proben (abhängig von der durch Präparation gewonnenen Zellzahl) ausgewertet. Die Daten der Mittelwerte und zugehörigen Standardabweichungen wurden mit den Computerprogrammen Excel, Sigma-Plot und PcBAS generiert. Die Bilder der immunhistochemischen Untersuchungen wurden an einem Zeiss Axiophot Epifluoreszenz-Mikroskop mit einer digitalen Kamera (Axiophot-Cam) und dem dazugehörigen Softwareprogramm (Axiovision) aufgenommen.

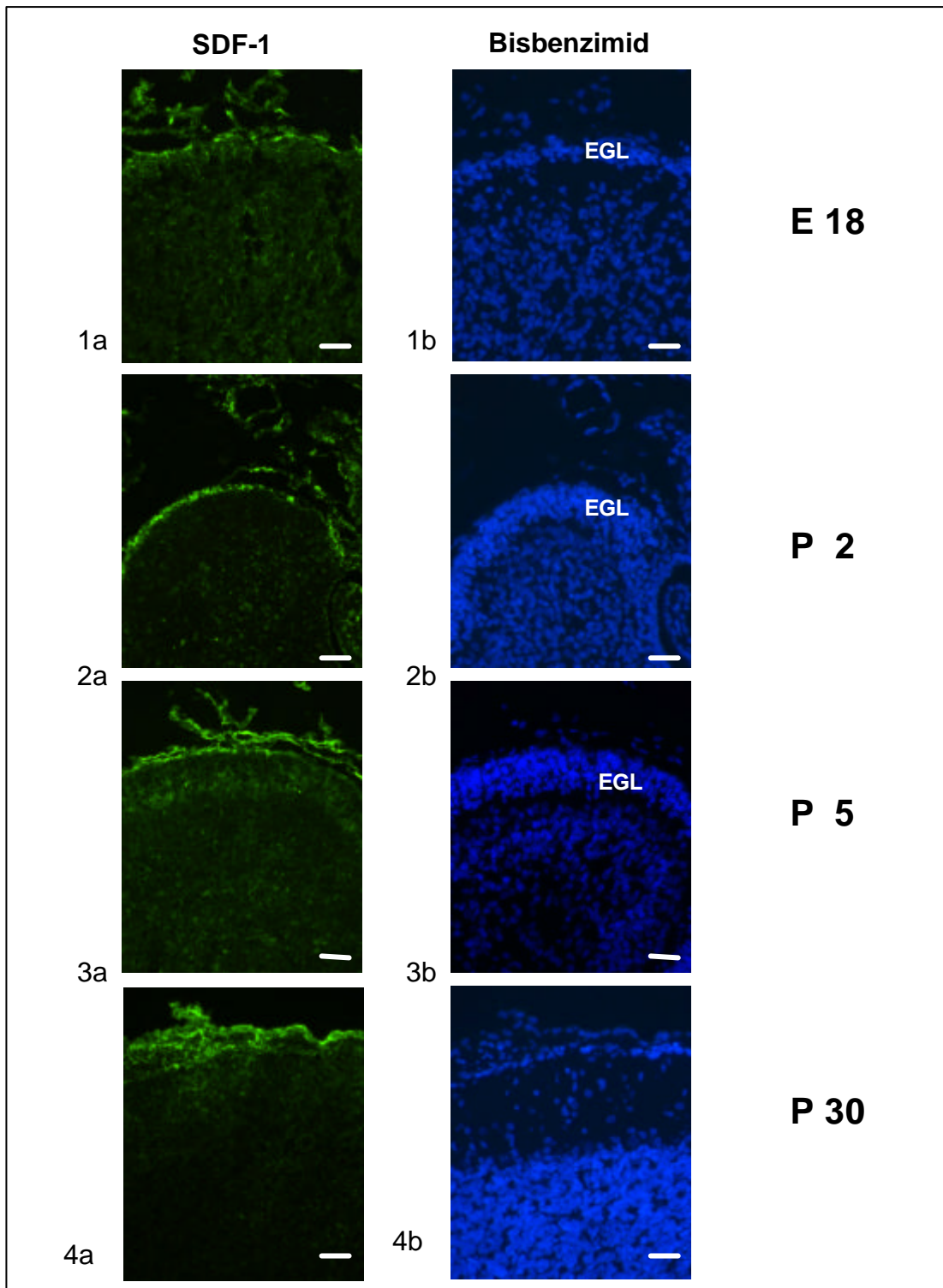
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Meningealzellen exprimieren konstitutiv SDF-1 *in vivo*

Die vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe Sievers hatten zeigen können, dass Meningealzellen *in vitro* konstitutiv diffusible Faktoren sezernieren, die die Chemotaxis der äußeren Körnerzellschicht-Neurone zu induzieren vermögen (Hartmann et al., 1998 a,b). Um zu überprüfen, ob SDF-1 einen dieser Faktoren darstellen könnte, der womöglich in der Lage ist, die Stammzellen der Proliferationszone zur leptomeningealen Oberfläche zu orientieren und an dieser entlang zu leiten, wurde in einem ersten Schritt die Expression von SDF-1 in der Kleinhirnanlage im Verlauf der Entwicklung *in situ* untersucht. Hierbei fanden Tiere Verwendung, deren Altersstadien zwischen E 14 und P 30 lagen. Die für diese Untersuchung verwendeten Ratten wurden durch Perfusionsfixierung mit Bouin'scher Lösung fixiert und die entnommenen Gehirne wurden zu Kryo- bzw. Paraffinpräparaten aufgearbeitet. Für den Nachweis von SDF-1 erwiesen sich jedoch Paraffinschnitte am geeignetsten. Diese wurden mittels einer immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung, die durch eine Tyramid-verstärkte Reaktion intensiviert wurde, gefärbt. Für die Darstellung der Zellkerne wurde eine Färbung mit dem blau fluoreszierenden, in den Zellkern interkalierenden Farbstoff Bisbenzimid gewählt.

Wie der Abbildung 6 zu entnehmen ist, fand sich eine SDF-1 Immunreaktivität bereits im Embryonalstadium in den Zellen der Leptomeninx, während andere Bereiche des Gehirns keine Färbung aufwiesen. Diese Immunreaktivität blieb auch in allen weiteren untersuchten Entwicklungsstadien erhalten (hier dargestellt für P 2 und P 5) und war sogar nach dem Abschluss der Kleinhirnentwicklung (P30) nachweisbar (siehe Abb. 6). Eine leichte punktförmige Färbung war auch in den Zellen der äußeren Körnerzellschicht zu erkennen.





**Abbildung 6: Immunhistochemischer Nachweis von SDF-1 im Kleinhirn der Ratte.**

An Sagittalschnitten von Kleinhirnanlagen unterschiedlicher Altersstadien der Ratte wurde ein immunhistochemischer Nachweis für SDF-1 durchgeführt, welcher hier zusammen mit der

entsprechenden Bisbenzimid-Kernfärbung dargestellt ist. Die Abbildungen zeigen in allen Stadien eine Färbung der Leptomeninx. Eine leichte, punktförmig-gesprenkelte Färbung ist auch im Bereich der äußeren Körnerzellschicht (EGL) erkennbar. Der Balken entspricht 100µm.

### 3.2 SDF-1-Expression auf RNA-Ebene

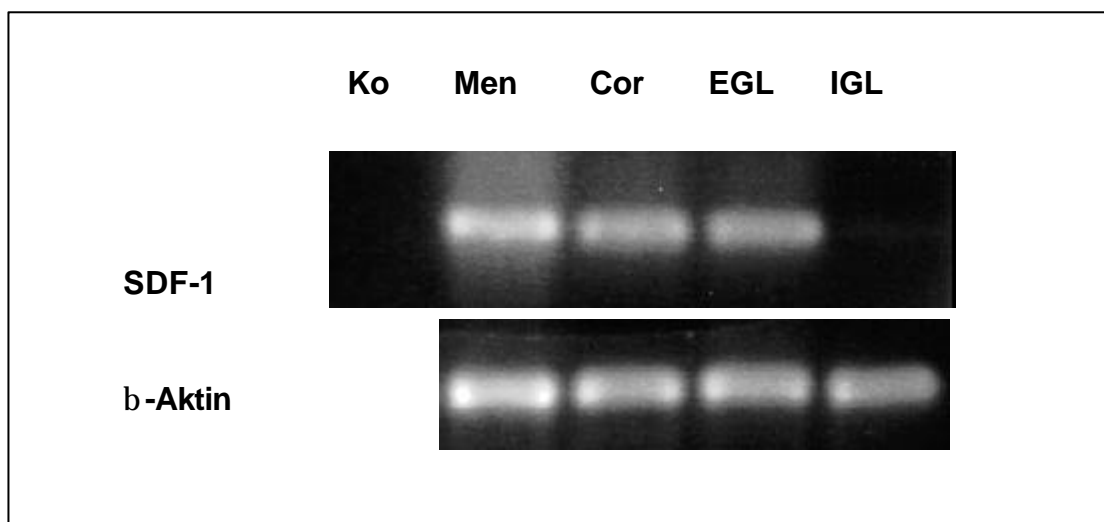
Die immunhistochemische Untersuchung gibt Aufschluss über die Expression des Proteins, welche meistens, jedoch nicht immer gleichzusetzen ist mit der Expression der RNA, die dieses Protein translatiert. Um für die untersuchten Zellen die Expression auf RNA-Ebene bestimmen zu können, wurden verschiedene Zellgruppen aus dem frisch entnommenen Gehirn der Ratte präpariert und einer RT-PCR unterzogen. Die Zellen wurden mit einem Homogenisator homogenisiert und die RNA wurde mit einem Qiagen RNeasy Kit isoliert. Die präparierten Meningealzellhäutchen, die, wie in der vorangegangenen Abbildung gezeigt, auch das Protein exprimieren, dienten als Kontrolle und wurden verglichen mit homogenisierter Cornea als weiteres Beispiel für Fibroblasten und den schichtspezifisch präparierten Zellen der inneren und äußeren Körnerzellzone.

Während sich die Präparation der RNA aus Meningealzellen quantitativ als unproblematisch erwies, gelang die Separation der RNA aus den anderen untersuchten Zelltypen nur in relativ geringen Mengen, die mittels Messung der optischen Dichte kaum nachweisbar waren. Dieses war bei der Cornea in der äußerst hohen Stabilität dieses Gewebes und bei den Neuronen des Kleinhirns in der geringen sicher selektiv präparierbaren Zellzahl begründet. Trotzdem zeigte die über die photometrische Messung (E258/ E280) errechnete Reinheit der isolierten Gesamt-RNA stets einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 und entsprach somit den geforderten Mindestanforderungen (siehe auch 2.5.2).

Das ubiquitär vorkommende  $\beta$ -Aktin diene als Positiv-Kontrolle für eine RNase-freie PCR und sollte zusätzlich als Referenz-Mengenstandard einen Vergleich für die einzelnen RNA-Isolate bieten.

Wie Abbildung 7 zeigt, ergab die RT-PCR eine Expression der SDF-1 RNA nicht nur für die Meningealzellen, sondern ebenfalls für die Corneafibroblasten und für die äußere Körnerzellschicht. Die innere Körnerzellschicht zeigte hingegen eine sehr schwache Bande für SDF-1. Diese stellt sich als spezifisches Einzelamplifikat mit einer Länge von 278 Basenpaaren dar. Als Kontrolle wurde die PCR anstelle der cDNA mit Wasser durchgeführt. Die  $\beta$ -Aktin-RT-PCR lieferte für sämtliche Proben eine prominente Bande des Amplifikates, welches einer aus der Sequenz ermittelten Länge von 281 Basenpaaren entsprach. Die Stärke der  $\beta$ -Aktin-Bande war im Vergleich zu allen anderen Proben bei den Meningealzellen etwas stärker und bei den inneren Körnerzellen etwas schwächer ausgeprägt.

Die Sequenz und die Länge der Amplifikate wurden aus der NCBI Gen-Datenbank ermittelt (SDF-1 *Accession No: NM 022177*;  $\beta$ -Aktin *Accession no.: V01217 J00691*).



**Abbildung 7: RT-PCR für SDF-1 und  $\beta$ -Aktin in Gewebe der Ratte.**

Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate für SDF-1 von Meningealzellen (Men), Cornea-Fibroblasten (Cor), Zellen der äußeren Körnerzellschicht (EGL) und Zellen der inneren Körnerzellschicht (IGL). Die SDF-1-Amplifikate wiesen eine Länge von 278 bp, die  $\beta$ -Aktin-Amplifikate eine Länge von 281bp auf und entsprachen damit der aus der Gendatenbank ermittelten Sequenz. Als Kontrolle diente hier ein PCR-Amplifikat, welches mit Wasser anstelle der cDNA hergestellt worden war.

Alle untersuchten Gewebe zeigten eine SDF-1 Expression, wobei die Zellen der inneren Körnerzellschicht nur ein extrem schwach ausgeprägtes Amplifikat aufwiesen.

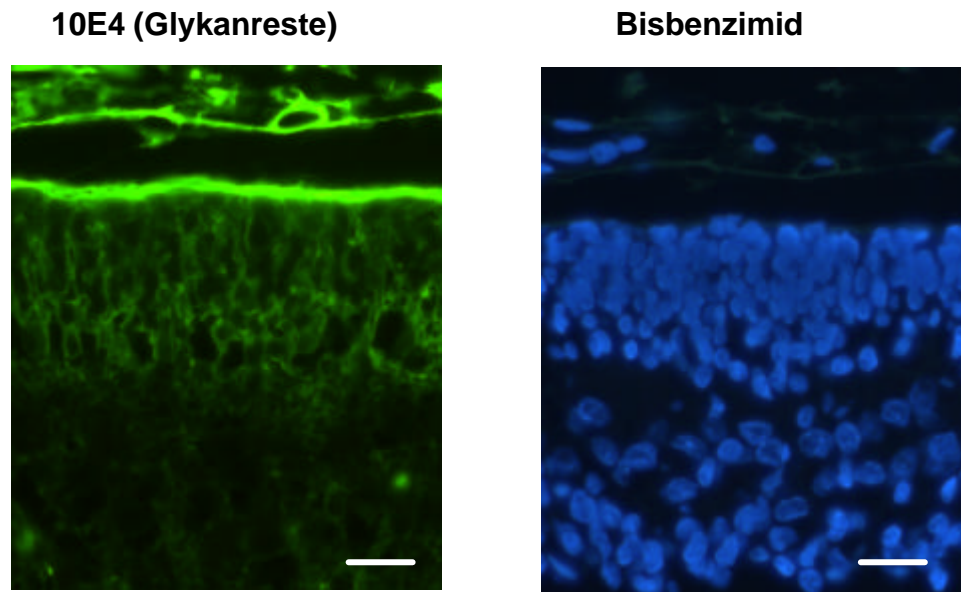


### **3.3 Die immunhistochemische Expression von HSPG in der Kleinhirnanlage**

Proteoglykane wie das Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) bilden eine Gruppe von hoch glykosylierten Makromolekülen, die in der neuronalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielen (Yamaguchi 2001). Die Heparinreste der extrazellulären Matrix stellen wichtige Bindungsstellen für Chemokine dar, die diese im extrazellulären Raum konzentrieren und dadurch einen chemotaktischen Gradienten entstehen lassen. Auch die Intensität der Aktivierung rezeptortragender Zellen wird nachweislich durch Bindung der Chemokine an Heparansulfat- oder Heparinreste beeinflusst (z.B. IL8).

Auch für SDF-1 ist eine Bindung an Heparansulfat (HS) mit relativ hoher Affinität gezeigt worden, z.B. an endotheliale Zellen (Luster 1998; Murdoch und Finn 2000b). Die Bindungsstelle für CXCR-4 bleibt dabei frei (Amara et al., 1999). Membranassoziiertes HS vermag somit funktionales oligomerisiertes SDF-1 anzureichern und es damit in verstärkter Konzentration CXCR-4-exprimierenden Zellen zur Verfügung zu stellen (Amara et al., 1999). Da HSPG für die funktionelle Wirkung von SDF-1 eine wichtige Rolle zu spielen scheint, wurde die Expression mittels immunhistochemischer Färbung untersucht.

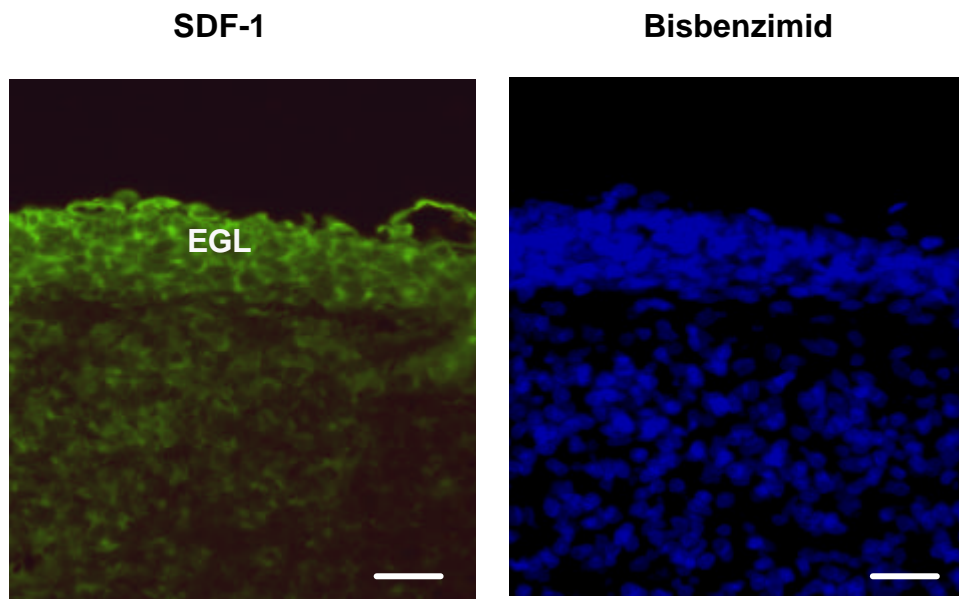
Das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung von Kleinhirnanlagen mit einem HSPG-Antikörper, der von Herrn Professor David (KU Leuven, Belgien) etabliert (David et al., 1992) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden ist, ist in der folgenden Abbildung (Abb. 8) dargestellt. Hier zeigte sich eine prominente Lokalisation des Proteoglykans in der Basallamina. Aber auch in der äußeren Körnerzellschicht war im Gegensatz zur Molekularzone und zur inneren Körnerzellschicht eine Immunreaktivität zu verzeichnen. Diese Befunde weisen zusammen mit der punktförmigen Verteilung der SDF-1-Immunreaktivität und einhergehend mit den in der Literatur veröffentlichten Daten auf eine Bindung des Chemokins an HSPG hin und lassen auch hier den Aufbau eines chemotaktischen Gradienten als wahrscheinlich erscheinen.



**Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis von HSPG an Sagittalschnitten der Kleinhirnanlage der Ratte.**

An Sagittalschnitten von Paraffin-eingebetteten Kleinhirnanlagen der Ratte (P5) wurde ein immunhistochemischer Nachweis für HSPG durchgeführt. Der hierfür verwendete Antikörper (10E4), der freundlicherweise von Professor Davids (KU, Leuven) zur Verfügung gestellt wurde, detektiert die äußeren Glykanreste des HSPG. Eine Immunreaktivität war in erster Linie in der Basallamina, aber auch in den Zellen der äußeren Körnerzellschicht (EGL) zu verzeichnen. Der Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Um direkt eine Bindungsfähigkeit des SDF-1 an die Glykanreste des HSPG nachweisen zu können, wurden die entparaffinierten Schnitte mit rekombinantem SDF-1 überschichtet. Nach anschließenden Spülschritten wurde eine Fluoreszenzfärbung mit anti-SDF-1 Antikörpern durchgeführt. Das Ergebnis ist in der Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von HSPG-gebundenem SDF-1.**

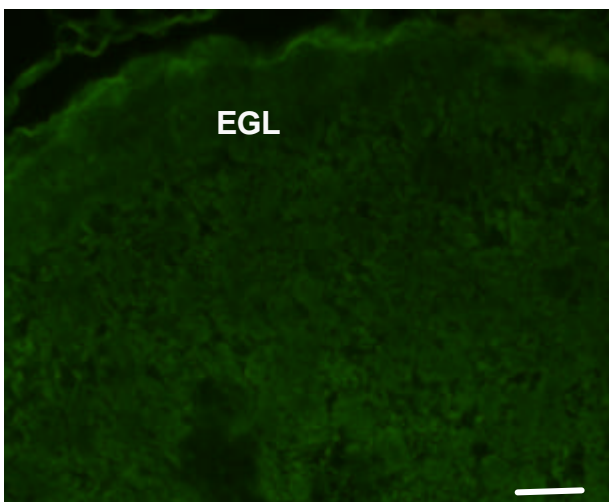
An Sagittalschnitten von Paraffin-eingebetteten Kleinhirnanlagen der Ratte wurde ein immunhistochemischer Nachweis für HSPG-gebundenes SDF-1 durchgeführt. Die deparaffinierten Schnitte wurden mit rekombinantem SDF-1 für 60 Minuten überschichtet, anschließend in PBS gespült und einer Fluoreszenzfärbung mit anti-SDF-1 Antikörpern unterzogen. Die Immunreaktion blieb nicht auf die bereits in den vorangegangenen Experimenten als SDF-1-positiv charakterisierten Meningealzellen beschränkt, sondern war über die gesamte äußere Körnerzellschicht verbreitet. (Balken = 100 µm)

Hier zeigte sich in der Tat neben der zu erwartenden Reaktivität der Meningealzellen ebenfalls eine Farbreaktion im HSPG-positiven Bereich der äußeren Körnerzellschicht. Zur Kontrolle der HSPG-Bindung wurden Gehirnschnitte einem Verdau mit einer Heparitinase unterzogen. Dieses Enzym baut die äußeren Glykanreste des HSPG ab und legt gleichzeitig das Polypeptidrückgrat, das Core-Protein, frei.

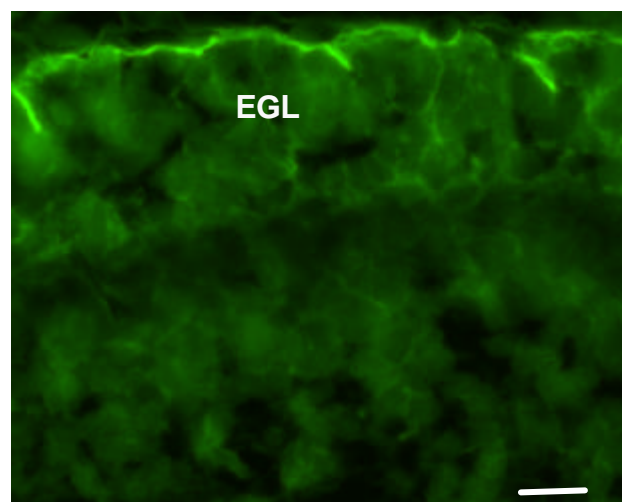
Um einen erfolgreichen Abbau nachweisen zu können wurden die Schnitte anschließend mit dem Antikörper 10E4 gefärbt, der nun keine Reaktion zeigte. Desweiteren wurden

die Schnitte einer Färbung mit dem HSPG-Core-Protein-Antikörper 3G5 unterzogen, welcher ebenfalls freundlicherweise von Herrn Professor David zur Verfügung gestellt worden war. Dieser zeigte die in der Literatur beschriebene Immunreaktion in der Basallamina und lieferte damit den Nachweis für einen erfolgreichen Abbau der Heparanreste (siehe Abbildung 10).

**10E4 (Glykanreste)**



**3G10 (Core-Protein)**

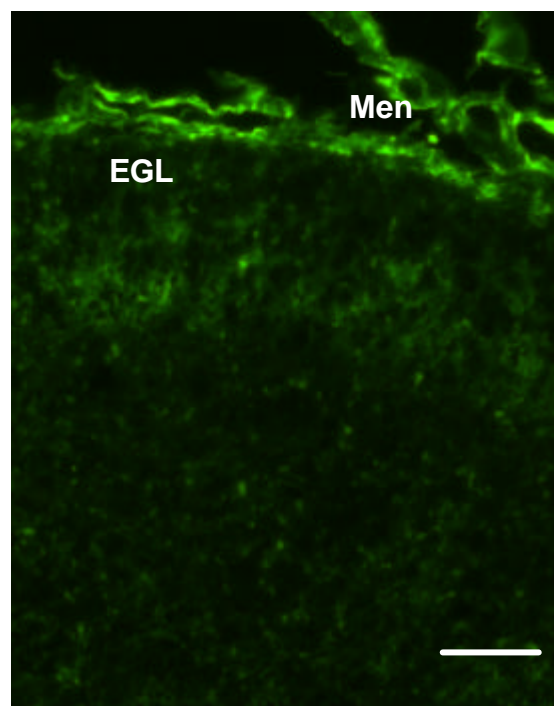


**Abbildung 10: Positivkontrolle der Heparitinase-Behandlung.**

Paraffinschnitte der Kleinhirnanlage der Ratte (P 5) wurden einer Heparitinase-Behandlung unterzogen (siehe auch 2.2.3.4). Nach erfolgreichem Abbau lassen sich die äußeren Glykanreste des HSPG durch den spezifischen Antikörper 10E4 in der äußeren Körnerzellschicht (EGL) nicht mehr nachweisen, wohingegen Antikörper gegen das HSPG Core-Protein (3G10) eine Immunreaktion zeigen, welche nur nach erfolgreicher Abdaureaktion auftritt. Der Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .



Parallel zu diesen Kontrollversuchen wurden die Paraffinschnitte nach der Heparitinase Behandlung wiederum mit rekombinantem SDF-1 überschichtet und anschließend mit anti-SDF-1 Antikörpern gefärbt. Wie die Abbildung 11 erkennen lässt, beschränkte sich nun die Immunreaktivität allein auf die Meningealzellen. Die Lamina der äußeren Körnerzellen zeigte hingegen keine Färbung, so dass man auf eine selektive Bindung des Chemokins an die HSPG-Reste schließen kann.



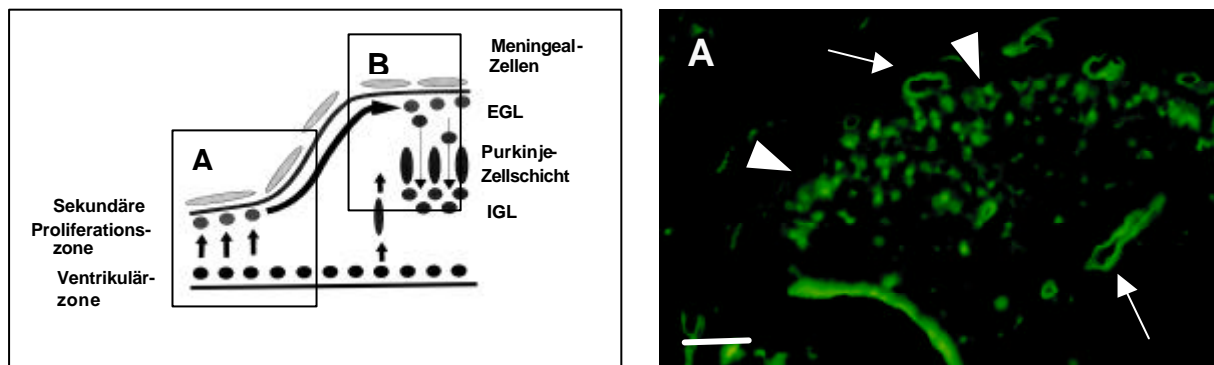
**Abbildung 11: Nach Abdau der HSPG-Reste kann rekombinantes SDF-1 nicht mehr im Bereich der äußeren Körnerzellschicht (EGL) binden.**

Deparaffinierte Sagittalschnitte des Kleinhirns der Ratte wurden nach einer Behandlung mit Heparitinase mit rekombinantem SDF-1 überschichtet und nach anschließenden Waschschrinen mit anti-SDF-1 Antikörpern fluoreszenzgefärbt. Im Gegensatz zu den nicht-Heparitinase behandelten Schnitten (siehe Abb. 9) zeigte sich keine Immunreaktivität im Bereich der äußeren Körnerzellschicht. Eine Reaktion war nur für die Meningealzellen zu verzeichnen. (Balken = 100 µm)

### 3.4 Die äußeren Körnerzellen exprimieren den SDF-1-Rezeptor CXCR-4

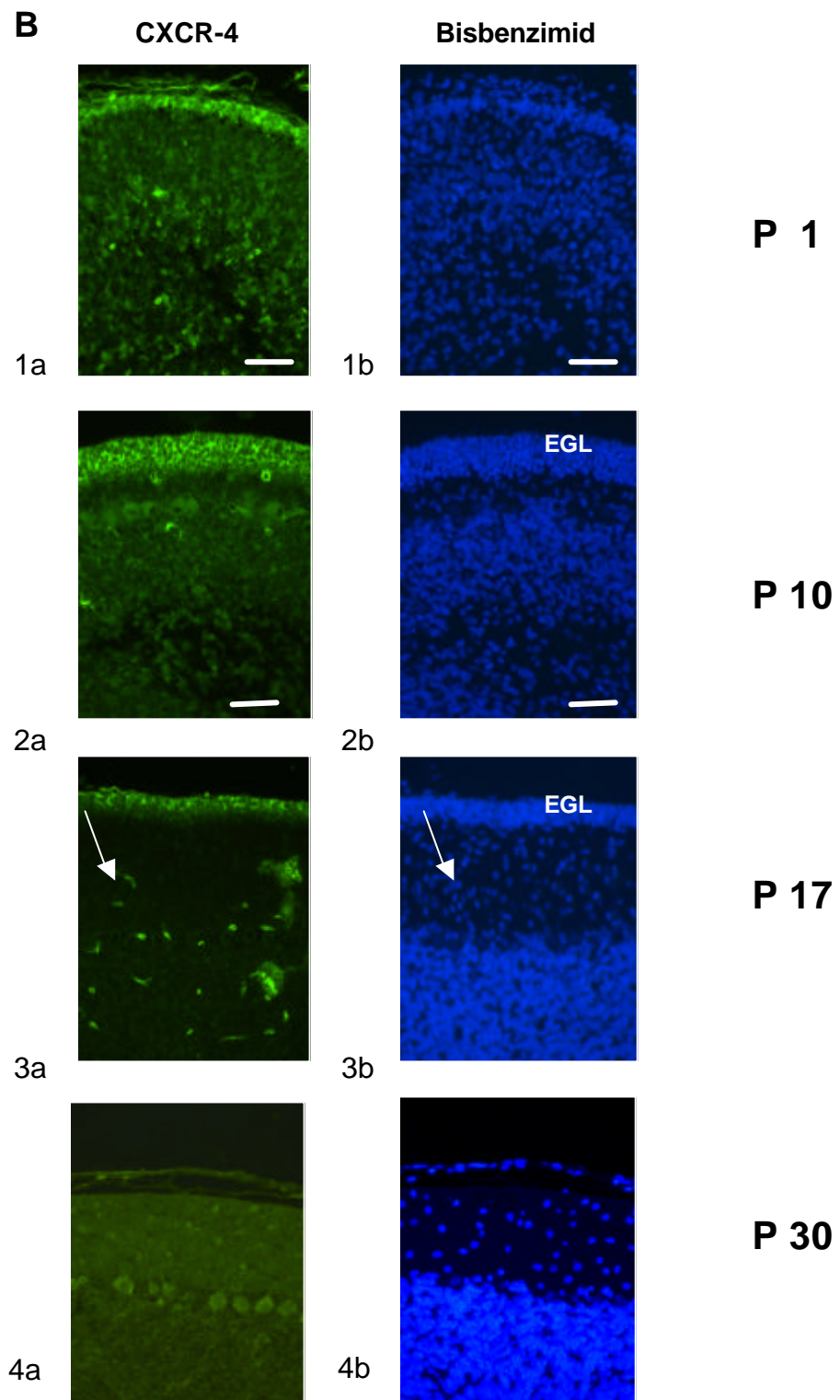
Die nachgewiesene Expression von SDF-1 in den Meningealzellen lieferte Grund zur Annahme, dass dieses Chemokin auf die Migration der späteren Körnerzellschicht-Neurone Einfluss nehmen könnte. Dafür müssten jedoch diese Zellen auch den SDF-1 Rezeptor CXCR-4 exprimieren. Um diese Frage zu klären, wurde die Kleinhirnanlage mittels Immunhistochemie auf eine CXCR-4-Expression untersucht.

Eine Expression von CXCR-4 fand sich zu Beginn der Entwicklung ab E 14 an in dem Bereich der Kleinhirnanlage, in dem die sekundäre Proliferationszone entsteht (Rautenlippe) (siehe Abb. 12 A). Die hier aus der Ventrikulärzone in Richtung Leptomeninx emigrierenden Neurone weisen, ebenso wie die bereits in der äußeren Körnerzellschicht angelangten Zellen, diesen Rezeptor auf.



**Abbildung 12 A: Immunhistochemische Darstellung der CXCR-4 Expression an einem Sagittalschnitt der Kleinhirnanlage einer Ratte im Entwicklungsstadium E 18.**

Mittels immunhistochemischer TSA-Färbung (siehe 2.2.3) wurde eine CXCR-4 Expression in den Zellen der Rautenlippe detektiert (Ratte E 18). Neben den Neuronen der äußeren Körnerzellschicht (Pfeilspitzen) sind CXCR-4 positive Endothelien angefärbt (Pfeile). Der dargestellte Ausschnitt entspricht dem mit „A“ gekennzeichneten Bereich der schematischen Übersicht. (Balken = 50 µm)



### **Abbildung 12 B: Immunhistochemische Darstellung der CXCR-4 Expression an Sagittalschnitten der Kleinhirnanlage in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Ratte.**

Die Kleinhirne von Tieren unterschiedlicher Entwicklungsstadien wurden in Paraffin eingebettet. Von den anschließend hergestellten Sagittalschnitten wurde mittels immunhistochemischer Nachweisreaktion eine Färbung des CXCR-Rezeptors 4 durchgeführt. Eine Färbung zeigt sich in den Zellen der äußeren Körnerzellschicht (EGL) und im Parenchym auf den Gefäßen. Auch die Purkinje-Zellen zeigen eine Immunreaktivität, wie z.B. für P30 zu erkennen ist. Dargestellt sind ebenfalls die entsprechenden Kernfärbungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid. (Balken = 100 µm)

Die Expression blieb im Verlauf der Ausbreitung der äußeren Körnerzellschicht, die in der Abbildung 12 B für P 2 und P 10 dargestellt ist, erhalten. Am Ende der ersten postnatalen Woche erreicht die äußere Körnerzellschicht ihre mächtigste Ausbreitung. In diesem Stadium beginnt die einwärtsgerichtete Migration der äußeren Körnerzellen in Richtung innerer Körnerzellschicht. Der Vergleich mit der histochemischen Kerndarstellung durch den Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid zeigt, dass für die Neurone, die bereits die äußere Körnerzellschicht verlassen haben, keine CXCR-4 Expression mehr nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 8 B, Pfeile in 3a und b). Dieser Befund deutet auf eine Herunterregulation des Rezeptors hin. Nach dem Abschluss der Kleinhirnentwicklung, hier beispielhaft für P 30 dargestellt, war keine Färbung der Körnerzellschicht-Neurone mehr erkennbar. Eine leichte Färbung zeigte sich andeutungsweise in den Purkinjezellen. Eine weitere positive Immunreaktion fand sich in diesen Kleinhirnschnitten nur noch auf den in der Literatur bereits als CXCR-4-exprimierend beschriebenen vaskulären Endothelien (Berger et al., 1999). Diese Expression ließ sich im ganzen Verlauf der Entwicklung sowohl im Gehirnparenchym als auch im leptomeningealen Gewebe nachweisen.

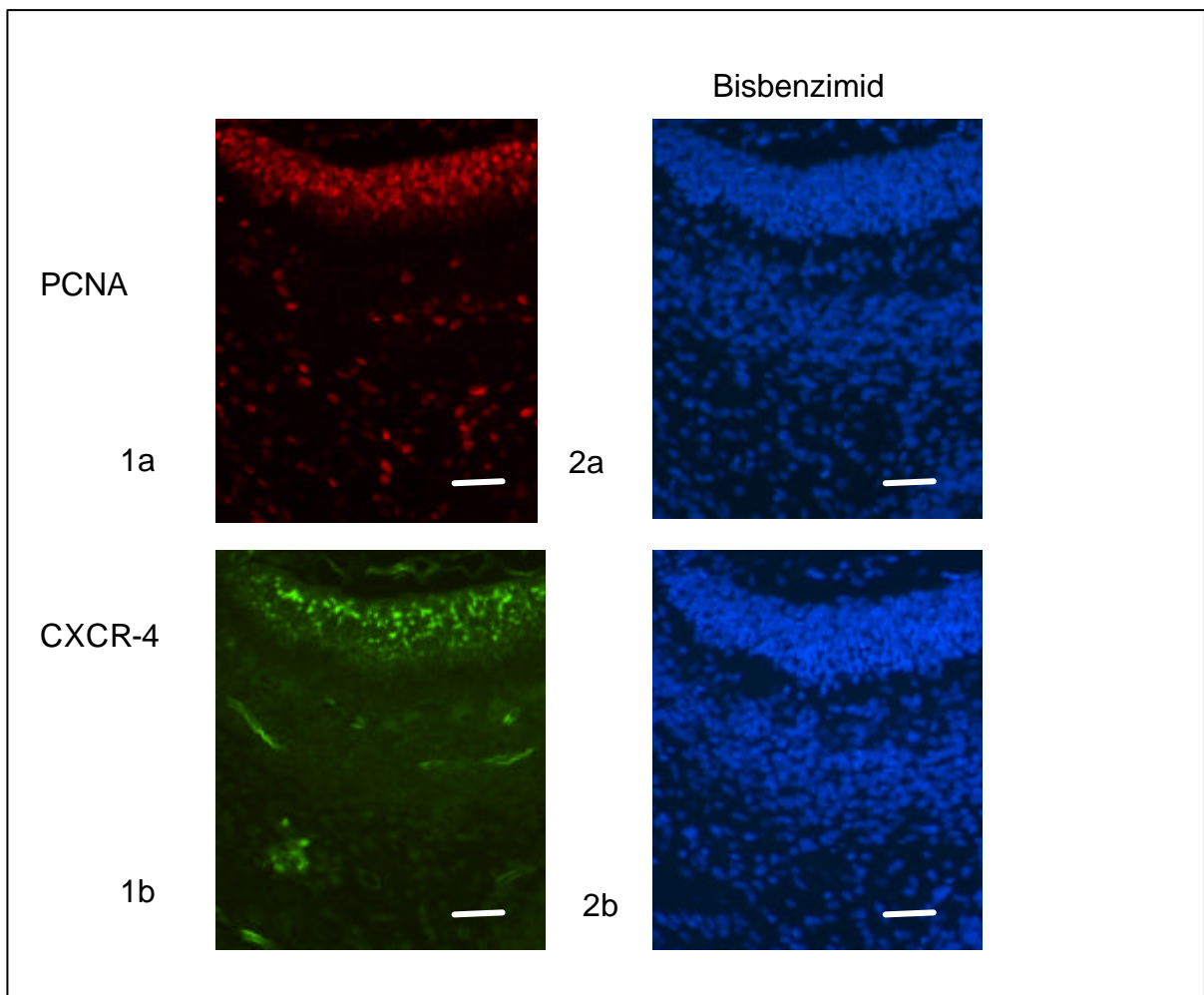
### **3.5 CXCR-4 wird in den äußeren Körnerzellen nach dem Ende der Proliferation herunterreguliert**

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, wie die Expression des CXCR-4-Rezeptors im Verlauf der Entwicklung der äußeren Körnerzellschicht-Neurone reguliert wird, wurde in einem nächsten Schritt die Expression von CXCR-4 mit der Expression des Proliferationsmarkers PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) verglichen.

PCNA ist essenziell für die Funktion der DNA-Polymerasen Delta und Epsilon. Da PCNA für die DNA-Replikation und Reparatur benötigt wird, findet man das Antigen in proliferierenden Zellen wieder (Iatropoulos und Williams 1996).

Die äußere Körnerzellschicht, die sich in eine mitotisch aktive äußere und eine postmitotische innere Lamina gliedern lässt, zeigte eine PCNA-Reaktion, welche auf die proliferierende äußere Schicht beschränkt war.

Wie in Abbildung 13 dargestellt, lieferte der Vergleich der PCNA-Färbung mit der Expression des SDF-1-Rezeptors CXCR-4 den Nachweis, dass sich die Rezeptorexpression ebenfalls auf die innere Lamina der äußeren Körnerzellschicht beschränkte, also auf den Bereich, der die mitotisch aktiven Zellen enthält. Die postmitotischen Zellen, die sich bereits in der prä-migratorischen und migratorischen Zone angeordnet haben, zeigten hingegen keine immunhistochemische Reaktion.



**Abbildung 13: Immunhistochemischer Vergleich der Expression von CXCR-4 mit der Expression des Proliferationsmarkers PCNA.**

Dargestellt ist eine immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von CXCR-4 und PCNA an Sagittalschnitten der Kleinhirnanlage einer Ratte. Die Färbung erfolgte an zwei Folgeschnitten des Gehirns und zeigt CXCR-4 (Abb. 1b) nach einer Tyramid-verstärkten Immunreaktion in der Grünfluoreszenz, während PCNA mit einer einfachen Fluoreszenzfärbung mit dem rot-fluoreszierenden Cy-3-markierten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde. Ebenfalls dargestellt sind die entsprechenden Zellkernbilder, die mit dem Zellkernmarker Bisbenzimid sichtbar gemacht wurden. Die Immunreaktion beschränkte sich sowohl für PCNA als auch für CXCR-4 auf die proliferative Sublamina der äußeren Körnerzellzone. (Balken = 100 µm)

### 3.6 Zusammenfassende Übersicht über die Zelltyp-spezifische Expression von SDF-1 und CXCR-4 in der Kleinhirnanlage

Aufgrund der immunhistochemischen Untersuchungen konnte eine SDF-1 Expression nur in den Zellen der Leptomeninx eindeutig nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch ebenfalls eine punktförmige Färbung im Bereich der äußeren Körnerzellschicht. Die Ergebnisse der RT-PCR stimmen mit diesen Befunden überein. Sie legen eine Expression des Chemokins auf RNA-Ebene insbesondere für die Meningealzellen, aber auch für die äußere Körnerzellschicht nahe, wobei die einzelnen Laminae dieser Schicht nicht gesondert untersucht wurden. Die Immunhistochemische Untersuchung der CXCR-4-Expression wies eine Expression in den Meningealzellen und in der proliferativen Zone der äußeren Körnerzellschicht nach. Während die inneren Körnerzellen keine Immunreaktion zeigten, ließ sich eine leicht Färbung ebenfalls in den Purkinje-Zellen detektieren.

**Tabelle 4: Zusammenfassende Übersicht über die Ergebnisse der immunhistochemischen (IH) Untersuchungen und der RT-PCR im Cerebellum**

Die Nachweisbarkeit des Chemokins bzw. seines Rezeptors wurden für die Meningealzellen (Men), die proliferative und die prä migratorische Lamina der äußeren Körnerzellschicht (EGL), die Purkinje-Zellen (PZ), die innere Körnerzellschicht (IGL) und die Ventrikulärzone (VZ) in drei Bewertungsgruppen eingeteilt: + : ausgeprägt; +/- : wenig ausgeprägt; - : nicht nachweisbar.

		SDF-1		CXCR-4
		IH	RT-PCR	IH
<b>Men</b>		+	+	+
<b>EGL</b>	<b>Prol.</b>	+/-	+	+
	<b>Präm.</b>	+/-	+	-
<b>PZ</b>		-		+/-
<b>IGL</b>		-	+/-	-

VZ	-		+/- (Rautenlippe)
----	---	--	-------------------

### 3.7 SDF-1 Expression von Fibroblasten *in vitro*

Die bisher dargestellten *in situ*-Befunde lieferten ein erstes Indiz dafür, dass die Hypothese der Meningealzell-induzierten Beeinflussung der äußeren Körnerzellschicht mittels SDF-1 durchaus zutreffen könnte. Um eine funktionelle Bedeutung des SDF-1/CXCR-4-Systems untersuchen zu können, musste zunächst die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die *in vitro*-Situation überprüft werden. Die dieser Arbeit vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten durch Zellkultur-Experimente bereits eine Interaktion zwischen den Meningealzellen einerseits und den äußeren Körnerzellen andererseits nachweisen können. Der Befund, dass durch Meningealzell-konditioniertes Medium (MCM) eine Chemotaxis der äußeren Körnerzellen induziert werden konnte, legte eine konstitutive Expression und Sekretion eines Chemotaxins nahe. Um zu überprüfen, ob dieser Befund auch für SDF-1 zutreffen würde, wurde in einem nächsten Schritt die Expression und Sekretion dieses Chemokins in Meningealzellen *in vitro* untersucht.

In den vorangegangenen Untersuchungen hatte ebenfalls gezeigt werden können, dass der von Meningealzellen induzierte chemotaktische Effekt kein Spezifikum dieser Zellen ist, sondern auch auf andere Zellen mesenchymaler Herkunft (Cornea-Fibroblasten, Tenocyten) übertragen werden konnte.

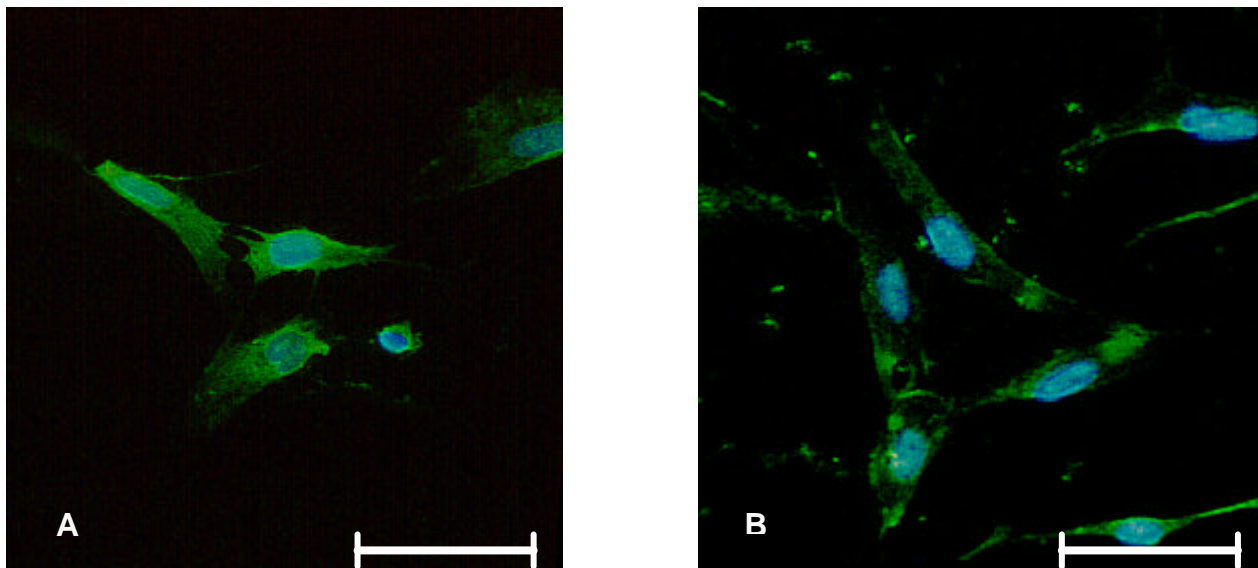
In einem weiteren Ansatz sollte deshalb geklärt werden, ob die SDF-1-Sekretion der Meningealzellen ebenfalls auf andere Fibroblasten übertragbar ist. Hierfür wurden beispielhaft Cornea-Fibroblasten untersucht.

Kultivierte Meningealzellen, die durch die Präparation von der Gehirnoberfläche mehrerer Wistar-Ratten (P2) eines Wurfes gewonnen worden waren, wurden in Zellkultur überführt und nach längerer Kulturzeit auf Deckgläsern ausgesät. Nach vier Tagen



Kultivation in einer 6-Napf-Platte wurden die Zellen für vier Stunden mit dem Golgi-Transport-Inhibitor Brefeldin A inkubiert, anschließend fixiert und immunhistochemisch gefärbt. Die Meningealzellen entwickelten in Zellkultur ein polymorphes und polygones Aussehen und bildeten Fortsätze untereinander aus.

Ihre Somata zeigten ein granuläres Färbemuster für SDF-1. Um zu überprüfen, ob sich dieser Befund auch auf andere Fibroblasten übertragen lässt, wurden ebenfalls Corneafibroblasten, die aus den Augen älterer Fischer-Ratten (P 10) isoliert und in Zellkultur überführt wurden, auf eine SDF-1-Expression getestet. Diese Zellen besitzen in Zellkultur eine den Meningealzellen ähnliche polymorphe Morphologie. Ihre Somata zeigten ein vergleichbares Färbemuster wie die Meningealzellen.



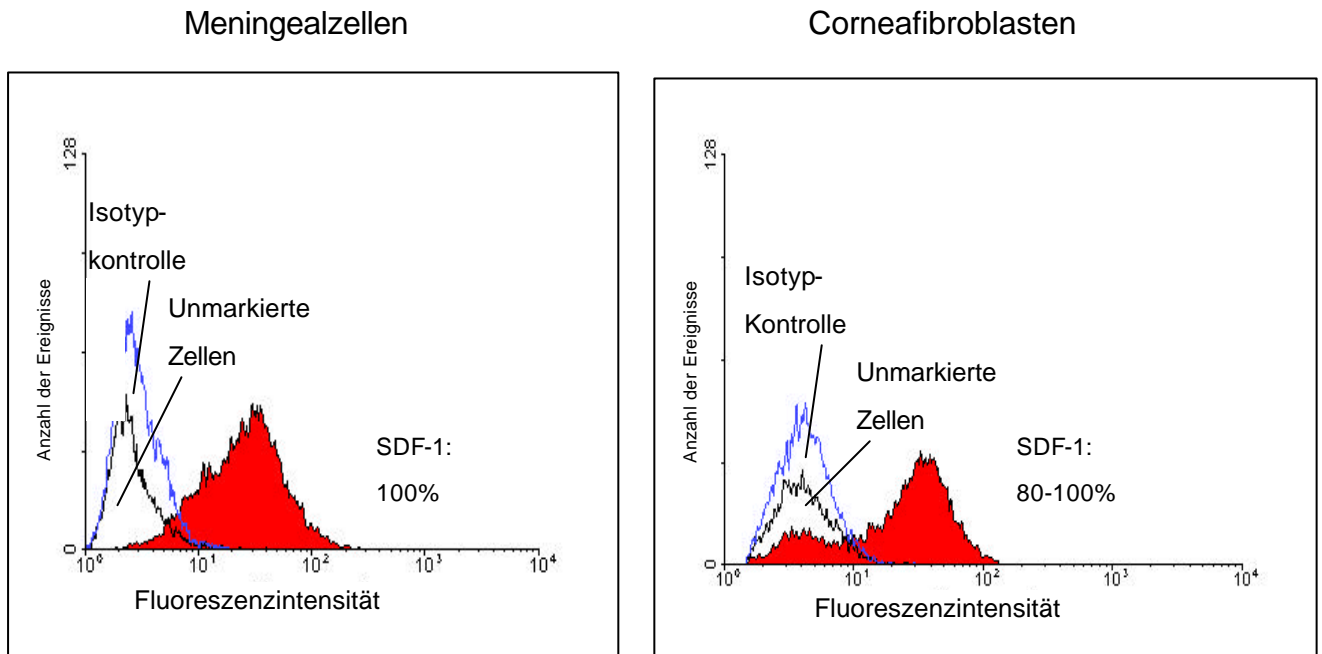
**Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von SDF-1 in kultivierten Meningealzellen und Corneafibroblasten.**

Kultivierte Meningealzellen (Abbildung A) und Corneafibroblasten (Abbildung B) wurden auf Deckgläsern in 6-Napf Platten ausgesät und für 4 Tage in Basalmedium inkubiert. Vor der Fixierung wurden die Zellen für 4 Stunden mit Brefeldin A behandelt und anschließend durch eine Tyramid-Fluoreszenzfärbung gefärbt. Die Zellkerne wurden durch Bisbenzimid blau gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.



### **3.8 Durchflusszytometrische Untersuchung von Meningealzellen und Cornea-fibroblasten**

Mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen sollten die bisher dargestellten Befunde bestätigt werden und zusätzlich einen Einblick in die Verteilung des Chemokins in der Gesamtzellpopulation vermitteln. Um jedoch intrazelluläre Proteine nachweisen zu können, müssen die Zellen nach der Fixierung mit Detergenzien permeabilisiert werden. Für diesen Versuchsansatz ist 0,1 %iges Saponin verwendet worden. So vermag der Antikörper in die Zelle einzudringen und kann das entsprechende Antigen detektieren. Nach Inkubationen der Zellen mit einem gegen SDF-1 gerichteten Antikörper bzw. mit einem Kontrollantikörper des gleichen Isotyps, erfolgte der Nachweis mit einem Fluoreszein-konjugierten Sekundärantikörper. Ebenfalls untersucht wurden unmarkierte Zellen, welche als zusätzliche Kontrolle dienten. Sowohl die Meningealzellen als auch die Corneazellen zeigten ein wesentlich höheres Fluoreszenzsignal als die Isotypkontrolle. Des Weiteren zeigte die mehrfache Auswertung verschiedener kultivierter Populationen von Meningeal- und Corneazellen im Vergleich zu dem Kontrollsignal, dass alle Zellen der Meningealzell-Population für SDF-1 positiv waren. Die Corneazellen wiesen ein differenzierteres Bild auf, in dem die Population der SDF-1 exprimierenden Zellen zwischen 80 und 100% schwankten (in Abbildung 15 beispielhaft dargestellt).



**Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären SDF-1 Expression in Meningealzellen und in Corneafibroblasten (Anzahl der Ereignisse gegen die Fluoreszenzintensität).**

Die Meningealzellen und die Corneazellen wurden mittels Saponin-Behandlung perforiert und anschließend intrazellulär mit einem Antikörper bzw. dessen Isotyp gegen SDF-1 markiert. Der Nachweis gebundener Primärantikörper erfolgte nach Inkubation mit Fluoreszeinkonjugiertem Sekundärantikörper. Das Histogramm stellt die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität der Zellen dar. Während bei den Meningealzellen die gesamte Zellpopulation SDF-1 exprimiert, lag der Anteil der SDF-1-positiven Corneafibroblasten in der hier dargestellten Abbildung bei 80 Prozent. Dieser Anteil schwankte jedoch in den einzelnen Untersuchungen und lag dabei stets zwischen 80-100%.

### 3.9 Sekretion von SDF-1 durch Meningealzellen und Corneafibroblasten

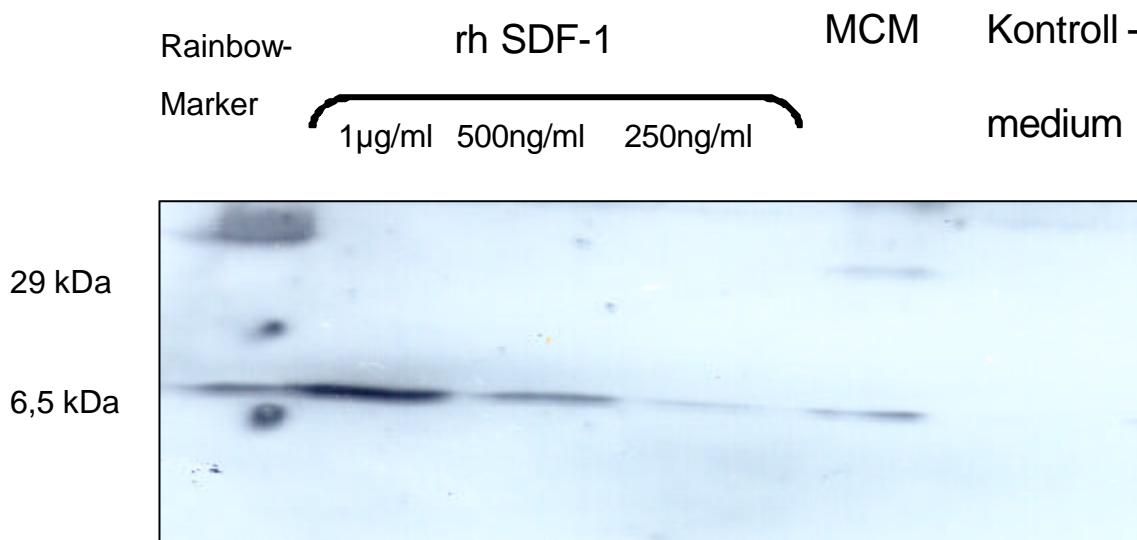
Nachdem gezeigt worden war, dass die Meningealzellen und die Corneafibroblasten das Chemokin SDF-1 exprimierten, sollte in einem nächsten Schritt mit biochemischen Methoden überprüft werden, ob und in welchen Konzentrationen das Chemokin auch in das Medium freigesetzt werden würde. Das Medium dieser Zellen wurde dementsprechend für drei Tage konditioniert. Da mit einer relativ geringen Konzentration von SDF-1 im MCM zu rechnen war, wurden zur besseren Ausbeute sämtliche Proteine mittels der Methanol/Chloroform-Methode ausgefällt. Die Proteine wurden anschließend einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) unterzogen, um auf Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF) übertragen werden zu können. Auf dieser Membran konnten die Proteine mit einem primären SDF-1 Antikörper (C19), einem Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper und einer enzymatischen Chemolumineszenzreaktion detektiert werden. Aus der Aminosäuresequenz ergab sich für SDF-1 ein zu erwartendes Molekulargewicht von 7,8 kDa. Zur zusätzlichen Überprüfung wurde rekombinantes humanes SDF-1 aufgetragen. Als Negativkontrolle diente nicht-konditioniertes natives Zellkulturmedium.

Im Gegensatz zu dem nicht-konditioniertem Medium markierte der SDF-1-Antikörper im MCM eine Bande in dem zu erwartenden Bereich und belegte dadurch die Sekretion des Chemokins durch die Fibroblasten in das sie umgebende Medium.

Um eine ungefähre Aussage über die im konditionierten Medium enthaltene Menge an SDF-1 zu erhalten, wurden ebenfalls verschiedene Proben mit bekannten Konzentrationen von rekombinantem humanen SDF-1 eingesetzt. Der Vergleich dieser unterschiedlichen Mengen mit der durch das konditionierte Medium erhaltenen Bande wurde mit einem Bio-analyser durchgeführt. Hierbei wurde zuerst eine Eichgerade durch die bekannten Werte erstellt, anhand derer die Konzentration im Meningealzell-konditioniertem Medium bestimmt wurde.

Das Ergebnis des in dieser Abbildung dargestellten Western Blots zeigt drei Standards mit rekombinantem SDF-1 im Vergleich zu MCM. Alle vier Proben wiesen eine spezifische Bande im Bereich von 7,8 kDa auf. Die Probe des unkonditionierten Mediums hingegen zeigte keine Reaktion.

Durch die Analyse anhand der erstellten Standardkurve ergab sich in diesem Fall eine Konzentration von 250 ng SDF-1 pro ml konditioniertem Kulturmedium.



**Abbildung 16: Nachweis von sezerniertem SDF-1 im Meningealzell-konditioniertem Medium (MCM) mittels Immunoblot.**

Die Proteine des MCM und des nativen Kontrollmediums wurden durch eine Methanol/Chloroform Fällung ausgefällt und in einer reduzierten SDS-Page aufgetrennt. Nach der Überführung auf eine PVDF-Membran konnten die Proteine mit einem gegen SDF-1 gerichteten Antikörper markiert werden, welcher wiederum von einem Kaninchen anti-Ziege Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper und durch eine von dem Enzym katalysierte Chemilumineszenzreaktion detektiert werden konnte.

Zur Ermittlung der Konzentration des im MCM enthaltenen Chemokins wurden unterschiedliche Konzentrationen von rekombinantem SDF-1 aufgetragen. Während im Kontrollmedium kein SDF-1 nachzuweisen war, zeigte sich im MCM eine Bande, die sowohl aufgrund ihrer Größe als auch durch den direkten Vergleich mit dem rekombinantem SDF-1 als spezifische Bande gelten konnte.

### 3.10 SDF-1 induziert die Chemotaxis der äußeren Körnerzellen

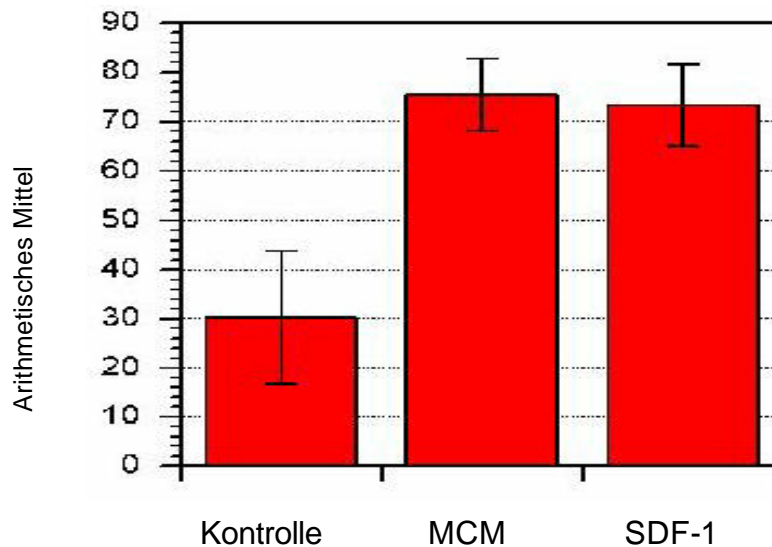
Wie in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, exprimieren und sezernieren Meningealzellen und Corneafibroblasten das Chemokin SDF-1. Die Meningealzellen erwiesen sich dadurch potenziell in der Lage, einen chemotaktischen Effekt auf andere Zellen auszuüben. Um zu überprüfen, inwieweit ein dementsprechender Einfluss auf die äußeren Körnerzellen des Cerebellums wirken könnte, sollte die Wirksamkeit des Chemotaxins in einem chemotaktischen Migrationsversuch nach Boyden untersucht werden. Hierbei stellte sich insbesondere die Frage, ob die durch den Westernblot (siehe oben) im MCM detektierte Konzentration an SDF-1 in der Lage sein würde, einen chemotaktischen Effekt zu stimulieren.

Für diesen Versuchsansatz wurden steril entnommene Cerebelli mit Hilfe eines Vibratoms in 400 µm dicke Scheiben geschnitten, von denen wiederum unter sterilen Bedingungen unter dem Binokular die äußere Körnerzellschicht präpariert wurde.

Diese Zellen wurden suspensiert und in einer Konzentration von 4 Mio/ml eingesetzt. In dem im folgenden abgebildeten Versuch wurde die Stimulation chemotaktischer Aktivität dieser Zellen durch MCM im Vergleich zu unkonditioniertem nativem Medium und im Vergleich zu unkonditioniertem Medium, welches mit rekombinantem SDF-1 angereichert worden war, untersucht. Die in dieser Untersuchung eingesetzte Menge an SDF-1 betrug 200 ng/ml.

Wie die Graphik 17 A erkennen lässt, vermochte SDF-1 in der Tat eine chemotaktische Migration der äußeren Körnerzellschicht-Neurone zu induzieren. Diese lag in einer dem MCM vergleichbaren Stärke. Das unkonditionierte Medium zeigte hingegen nur eine basale Stimulation.

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus sechs Einzelansätzen mit der entsprechenden Standardabweichung.

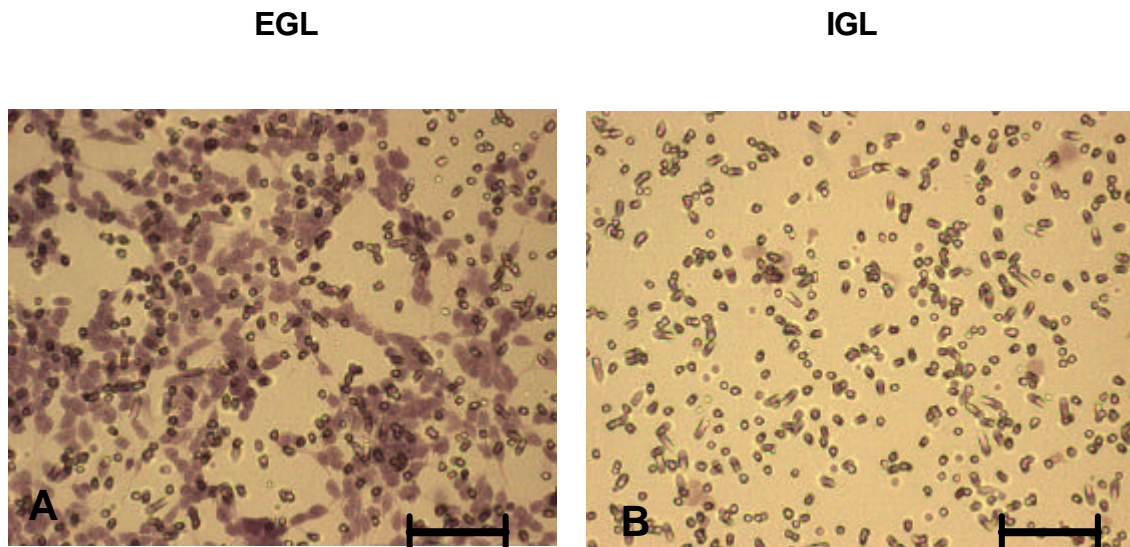


**Abbildung 17 A: Chemotaktische Reaktion von Neuronen der äußeren Körnerzellschicht des Cerebellums auf das Chemokin SDF-1.**

In einem Boydenkammer-Chemotaxisversuch wurde die Wirkung des Chemokins SDF-1 auf Neurone der äußeren Körnerzellschicht untersucht, die aus Scheibenpräparaten des Cerebellums einer postnatalen Ratte (P2) präpariert worden waren. Das obere Kompartiment der Boydenkammer wurde mit 4 Mio Zellen/ml befüllt, während das untere Kompartiment die Testsubstanzen enthielt. Als Filter diente eine Laminin-beschichtete Polykarbonat-Membran mit Poren von 5 µm Größe. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37° C wurde mittels einer HE-Färbung und einer densitometrischen Auswertung bestimmt, wieviele Neurone durch die Poren eines Laminin-beschichteten Polykarbonatfilters gewandert waren. Untersucht wurde das chemotaktische Verhalten der Zellen gegenüber nicht-konditioniertem Kontrollmedium, Meningealzellkonditioniertem Medium (MCM) und Kontrollmedium, welches mit 200 ng/ml SDF-1 angereichert worden war.

Im Gegensatz zu den äußeren Körnerzellen zeigten die Neurone der inneren Körnerzellschicht keine Reaktion auf SDF-1, in der Abbildung 17 B dargestellt an einer Filtervergrößerung.



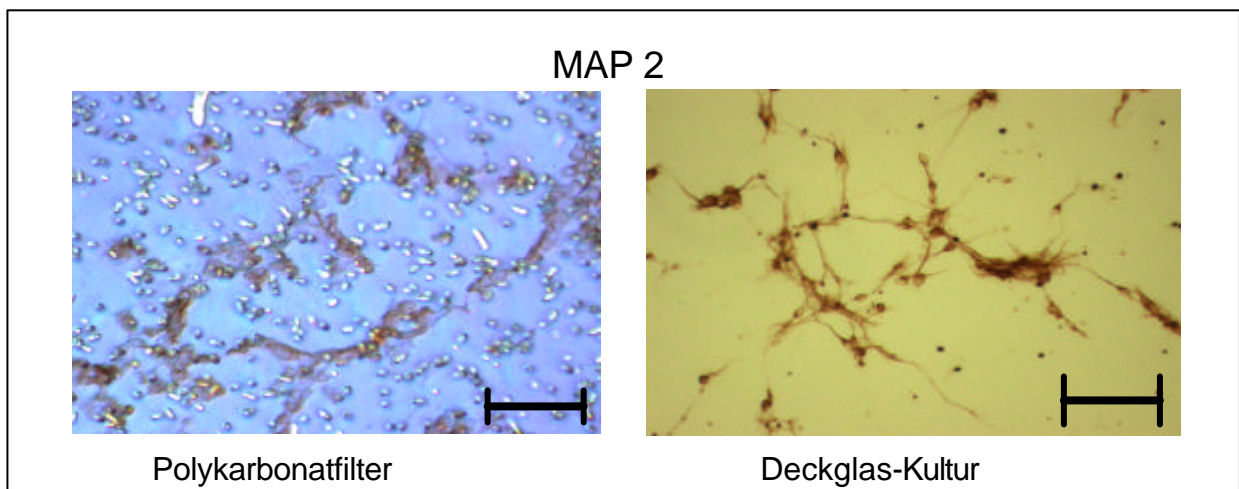


**Abbildung 17 B: SDF-1 stimuliert keine chemotaktische Reaktion der Neurone der inneren Körnerzellschicht.**

Zellen der inneren und der äußeren Körnerzellschicht wurden schichtspezifisch aus dem Cerebellum junger Wistar-Ratten präpariert (siehe 2.2.8) und im Boydenkammer-Chemotaxistest auf ihre Aktivität gegenüber 200 ng/ml rekombinantem SDF-1 in Standard-Kulturmedium getestet. Die Abbildung zeigt exemplarische mikrophotographische Aufnahmen eines Boydenkammer- Polycarbonatfilters nach 48 Stunden Inkubation für äußere Körnerzellen (A) und innere Körnerzellen (B). Während bei den inneren Körnerzellen keine Chemotaxis zu verzeichnen war, kam es bei den äußeren Körnerzellen zu einer Immigration in den Filter. In beiden Abbildungen sind die Filterporen deutlich zu erkennen. Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.11 Nachweis der Spezifität der chemotaktisch migrierten Neurone

Neuronale Zellen lassen sich von Fibroblasten oder glialen Zellen bereits anhand ihrer Morphologie unterscheiden. Während Fibroblasten oder Astroglia beispielsweise eine epitheloide, polymorphe Gestalt ausbilden, weisen die Neurone einen abgerundeteren Zellkörper auf. Um nach der Präparation dieser Zellen auch die Reinheit der isolierten Population überprüfen zu können, wurde ein Teil dieser Zellen bei jedem Versuch auch auf laminin-beschichtete Deckgläser ausgesät und durch Zelltyp-spezifische Antikörper gefärbt. Um jedoch auch eindeutig sicherstellen zu können, dass es sich bei den im Chemotaxis-Test migrierten Zellen um neuronale Zellen handelt, wurden die Filter nach dem Versuch ebenfalls mit spezifischen Markern gefärbt. Für den Nachweis neuronaler Zellen diente ein gegen das Mikrotubuli assoziierte Protein 2 (MAP-2) gerichteter Antikörper. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



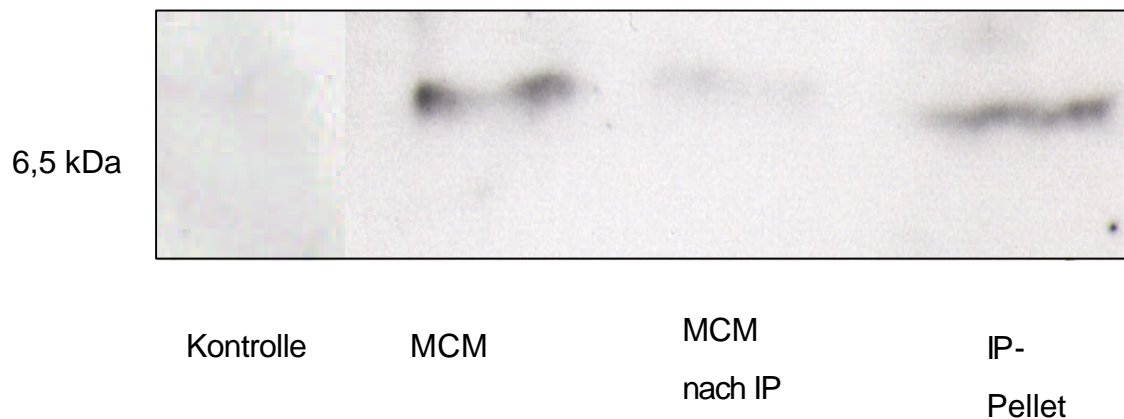
**Abbildung 18: Immunhistochemische Spezifizierung der für die Boyden-Kammer eingesetzten Zellen.**

Dargestellt ist ein immunhistochemischer Nachweis (siehe 2.2.3) mit DAB für den Neuronen-spezifischen Marker MAP 2 (*Mikrotubuli assoziiertes Protein 2*). Die aus der äußeren Körnerzellschicht präparierten Neurone wurden teilweise für den Chemotaxisversuch und teilweise für eine Kontrolle auf Deckgläsern eingesetzt und nach 48 h fixiert. Sowohl die Färbung des Polycarbonatfilters als auch die Analyse der Deckglas-Kultur zeigten, dass der Hauptteil der isolierten Zellen Neurone darstellte.

Diese ließen sich auch nach dem Chemotaxistest auf dem Filter detektieren. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.12 SDF-1 stellt den entscheidenden chemotaktischen Faktor für die äußeren Körnerzellen im MCM dar

Angesichts des tatsächlichen chemotaktischen Einflusses von SDF-1 auf die Neurone der äußeren Körnerzellschicht sollte in einem nächsten Schritt überprüft werden, ob SDF-1 auch im Meningealzell-konditioniertem Medium den entscheidenden Faktor darstellen würde. Dazu wurde das Chemokin mittels Immunpräzipitation aus dem MCM entfernt und der chemotaktische Effekt des verbleibenden Mediums bestimmt. Die Kontrolle für die erfolgreiche Präzipitation erfolgte anschließend mittels Immunoblot.



**Abbildung 19: Nachweis der Immunpräzipitation von SDF-1 aus MCM mittels Immunoblot.**

Durch die Bildung von Sepharose-gebundenen Immunkomplexen wurde das im MCM enthaltene SDF-1 mittels einer Immunpräzipitation (IP) präzipitiert. Die Proteine von Kontrollmedium, MCM, MCM nach der Immunpräzipitation und dem präzipitierten Pellet wurden ausgefällt und im Immunoblot aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem gegen SDF-1 gerichteten Antikörper (C19, *Santa Cruz*).

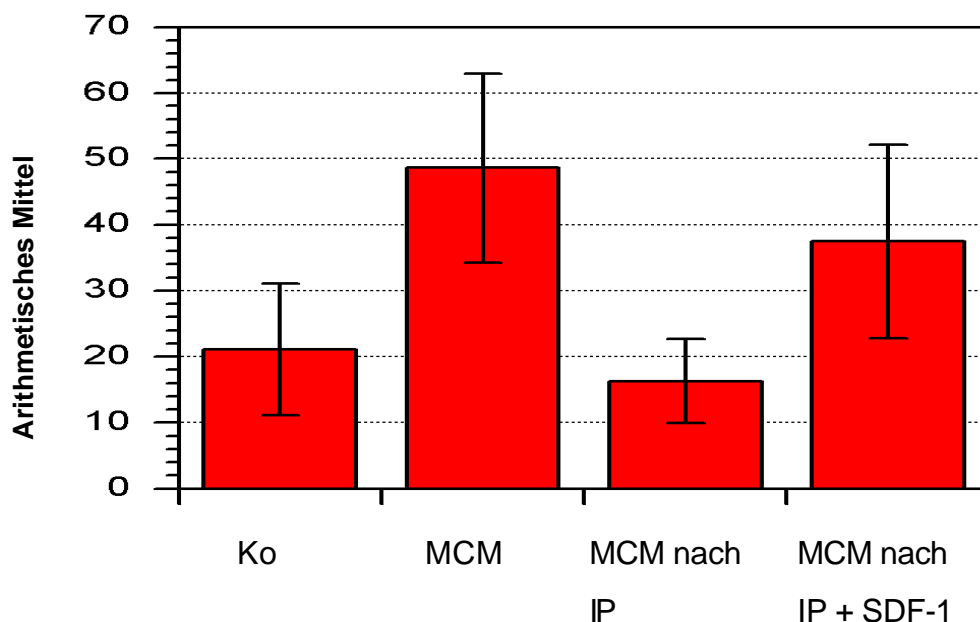
Im Immunoblot zeigte sich, dass das SDF-1 beinahe vollständig durch die Immunpräzipitation entfernt worden war. Die Bande für SDF-1, die für das Meningealzell-konditionierte Medium noch deutlich zu erkennen ist, verschwindet nach der Immunpräzipitation fast vollständig. Nur eine kaum sichtbare Spur einer Bande zeigte sich im Bereich von 7,8 kDa. Die Auftragung des im Probenpuffer gelösten

Pellets, in dem sich das aus dem MCM entfernte SDF-1 anreichern sollte, zeigte eine in ihrer Stärke dem ursprünglichen MCM entsprechende Bande.

Die funktionelle Auswirkung der SDF-1-Immunpräzipitation wurde wiederum mit dem Boydenkammer Chemotaxis-Versuch überprüft.

Die Chemotaxis der äußeren Körnerzellen wurde bis auf den Hintergrundwert des unkonditionierten Mediums supprimiert. Dabei musste jedoch sichergestellt sein, dass der Einfluss der Immunpräzipitation auch wirklich auf ein Fehlen bzw. einen Konzentrationsrückgang des Chemotaxins und nicht auf einen unspezifischen Präzipitationseffekt zurückzuführen war.

Deshalb wurde in einem zusätzlichen Ansatz das immunpräzipitierte MCM wiederum mit rekombinantem humanen SDF-1 angereichert (200 ng/ml). Diese Anreicherung führte zu einer Re-Induktion der ursprünglichen Chemotaxis, welche bis nahe an den Ausgangswert des MCM heranreichte.



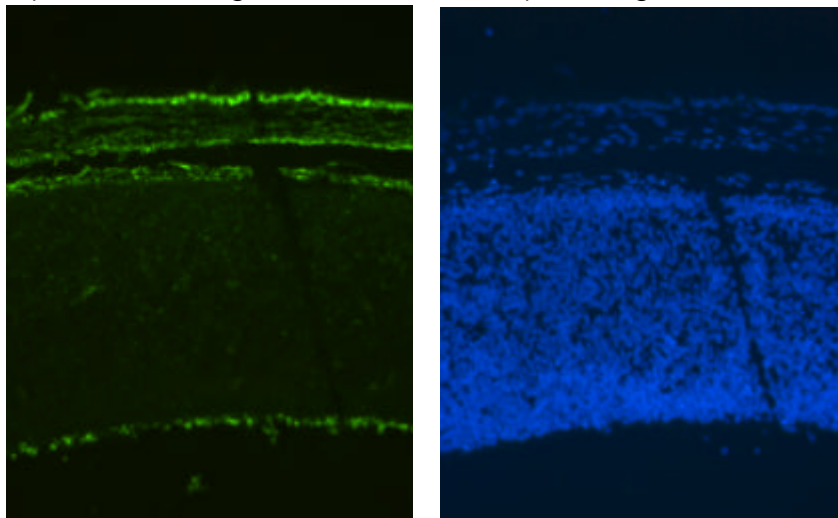
**Abbildung 20: Reduktion der Chemotaxis nach Immunpräzipitation von SDF-1.**

Nachdem mittels Immunoblot sichergestellt worden war, dass das im MCM vorhandene SDF-1 durch die Immunpräzipitation reduziert war, wurde das hierbei gewonnene Medium im Chemotaxistest nach Boyden eingesetzt. Die chemotaktische Wirkung von Kontrollmedium, MCM, immunpräzipitiertem MCM und immunpräzipitiertem MCM, welches mit rekombinantem SDF-1 angereichert worden war, wurde für die Neurone der äußeren Körnerzellschicht bestimmt.

### 3.13 Expression von SDF-1 im Isocortex

Schädigungen der Leptomeninx führen auch im Isocortex zu Fehlbildungen in Form von corticalen Ektopien. Hierbei migrieren Neurone der Ventrikulärzone in Richtung auf pathologische Ansammlungen von Meningealzellen. Passend zu diesen Beobachtungen hatten die dieser Arbeit vorangegangenen Untersuchungen *in vitro* einen chemotaktischen Einfluss der Meningealzellen auf die Zellen der Ventrikulärzone des Isocortex nachweisen können. Die nun für das Cerebellum erhobenen Befunde führten zu der Frage einer potenziellen Übertragbarkeit auf diese Hirnregion. Auch hier sollten in einem ersten Schritt immunhistochemische *in situ*-Untersuchungen Aufschluss über die Expression von SDF-1 und CXCR-4 geben.

Die Untersuchung der SDF-1-Expression zeigte ein dem Cerebellum ähnliches Bild. Eine Immunreaktivität ließ sich in allen Stadien der untersuchten Entwicklungsreihe (E15- P30) in den Meningealzellen darstellen (hier dargestellt für E 15).



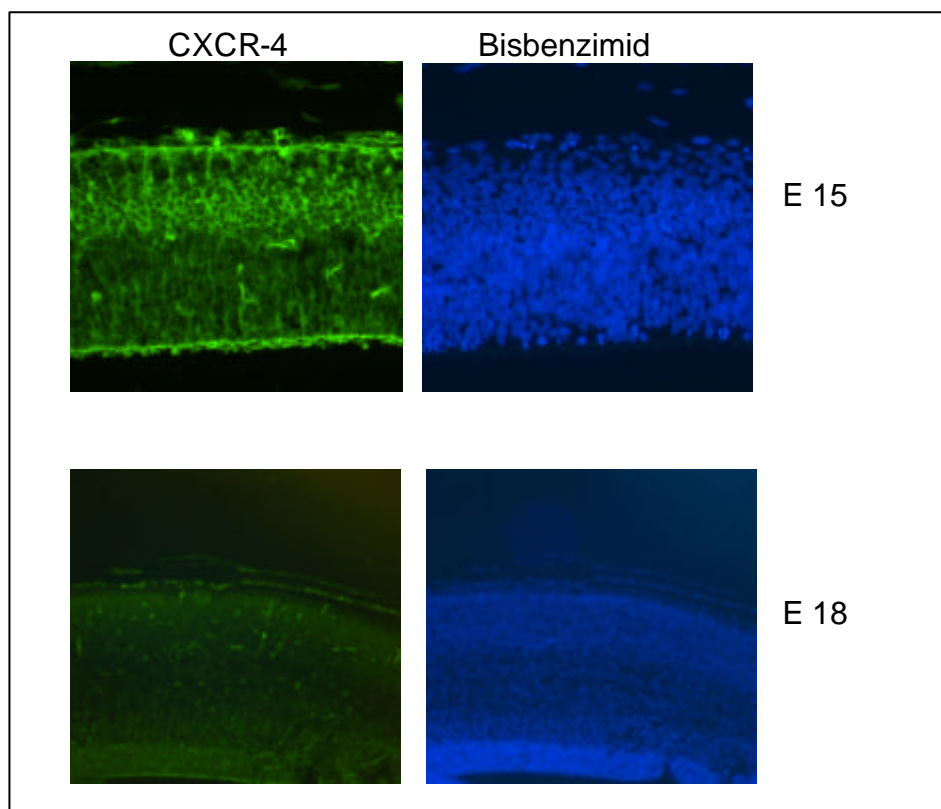
**Abbildung 21: Nachweis der Expression von SDF-1 in den Meningealzellen des Isocortex (E15).**

Paraffinschnitte der Isocortexanlage der Ratte wurden einer Immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung gegen SDF-1 unterzogen (siehe auch 2.2.3). Eine Immunreaktion zeigte sich selektiv in den Zellen der Leptomeninx.

### 3.14 Expression von CXCR-4 im Isocortex

In einem nächsten Schritt sollte die immunhistochemische Untersuchung der CXCR-4-Expression über eine potenziell funktionelle Relevanz Aufschluss geben.

Eine CXCR-4 Immunreaktivität war jedoch in kaum einem der untersuchten Entwicklungsstadien detektierbar. Stattdessen zeigte die Untersuchung nur ein transientes Vorkommen des Rezeptors, welches auf die frühen Embryonalstadien beschränkt war. Die Immunreaktivität lokalisierte sich hier in den Zellen der sich formenden Corticalplatte, aber auch in den endothelialen Gefäßen des Parenchyms und der Leptomeninx. Ab dem Entwicklungsstadium E 17 war kein immunhistochemischer Nachweis für CXCR-4 mehr möglich.



**Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis der CXCR-4-Expression in der Isocortex-Anlage.**

An Paraffinschnitten der Isocortexanlage der Ratte wurde eine immunhistochemische Fluoreszenzfärbung gegen den SDF-1 Rezeptor CXCR-4 durchgeführt. Dieser Rezeptor ließ sich nur transient in den Stadien E 15 bis E 17 nachweisen und war auf die Zellen der sich formenden Corticalplatte beschränkt.

### **3.15 Zusammenfassende Übersicht über die Zelltyp-spezifische Expression von SDF-1 und CXCR-4 in der Großhirnanlage**

Die immunhistochemischen Untersuchungen konnten eine konstitutive Expression von SDF-1 in den Meningealzellen darstellen. Die Expression des SDF-1 Rezeptors CXCR-4 trat jedoch nur transient in den Stadien E 15- E 17 auf und war auf den Bereich der entstehenden Cortikalplatte beschränkt.

**Tabelle 5: Zusammenfassende Übersicht über die Ergebnisse der immunhistochemischen (IH) Untersuchungen im Cerebrum.**

Die Nachweisbarkeit des Chemokins bzw. seines Rezeptors wurde für die Meningealzellen (Men), die Cortikalplatte (CP) und die Ventrikulärzone in drei Bewertungsgruppen eingeteilt: + ausgeprägt; +/- transient ausgeprägt; - nicht nachweisbar.

	<b>SDF-1</b>	<b>CXCR-4</b>
<b>Men</b>	+	+
<b>CP</b>	-	+ (E15-E17) / - (ab E17)
<b>VZ</b>	-	-

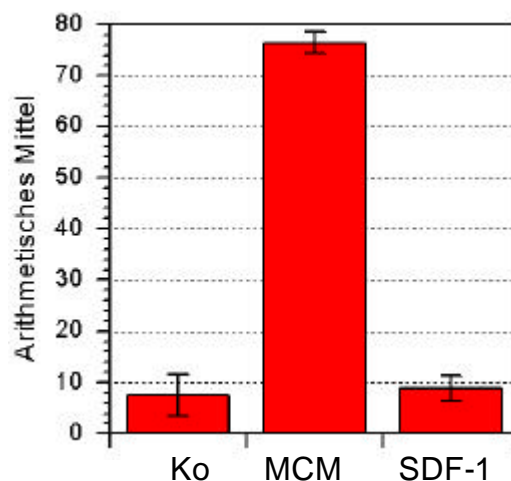


### 3.16 Die chemotaktische Wirkung von SDF-1 auf isocortikale Neurone

Mittels einer immunhistochemischen Untersuchung ist ab dem Embryonaltag 17 keine Expression des CXCR4-Rezeptors mehr darstellbar gewesen. Trotzdem hatten vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen können, dass Meningealzellen auch auf die Neurone der isocortikalen Ventrikulärzone einen chemotaktischen Effekt auslösen konnten, insbesondere auch bei Tieren im Altersstadium P0 bis P2. Deshalb sollte in einem nächsten Schritt überprüft werden, ob hier womöglich ein anderer Faktor als SDF-1 eine Rolle spielen könnte.

Die stärkste Migrationswelle corticaler Neurone findet in der Ratte in der letzten Gestationswoche (E 15-E 21) statt (Bayer und Altman 1991a, b). Deshalb wurden für die *in vitro* Untersuchungen in erster Linie Tiere der Altersstadien E 17 bis P 1 verwendet.

Aus den vom Cerebrum angefertigten Schnitten wurde unter dem Binokular die Ventrikulärzone präpariert. Die chemotaktische Reaktivität der Zellen für SDF-1 wurde im Vergleich zu Meningealzell-konditioniertem Medium und unkonditioniertem Basalmedium gemessen.



**Abbildung 23: SDF-1 induziert keine chemotaktische Aktivität der isocortikalen Ventrikulärzonen-Neurone.**

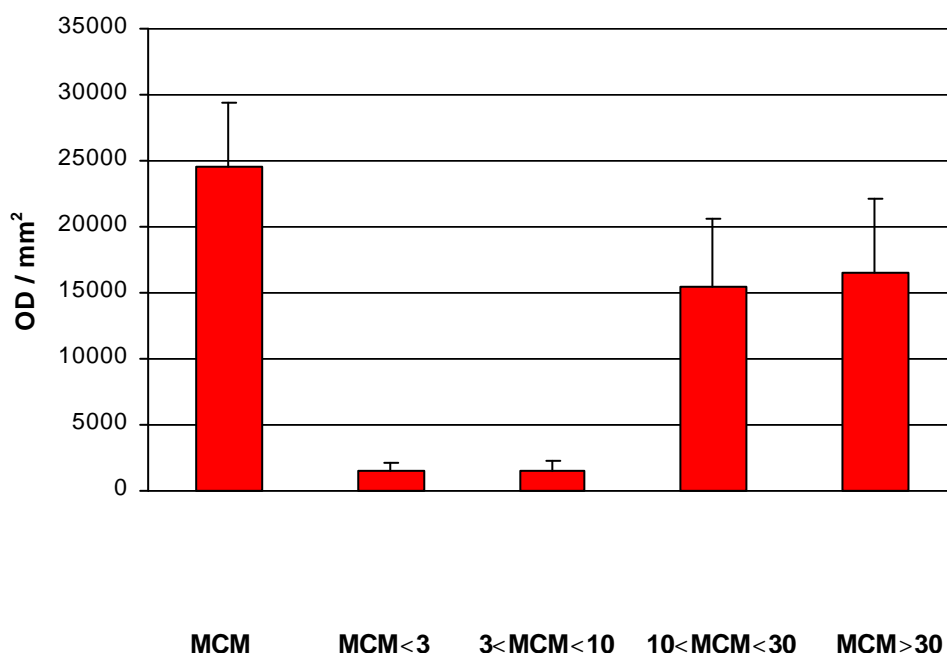
Großhirne der Ratte (E20) wurden mittels eines Vibratoms in 400 µm dicke Scheiben geschnitten, aus denen unter dem Binokular die Zellen der Ventrikulärzone abgetrennt wurden. Diese Zellen wurden suspendiert und im Chemotaxistest nach Boyden eingesetzt.

Die chemotaktische Aktivität wurde für Kontrollmedium, MCM und für Kontrollmedium mit rekombinantem SDF-1 (200 ng/ml) bestimmt.

Die Spezifität der migrierten Zellen wurde wie bei den Kontrollversuchen zur Migration der äußeren Körnerzellen der Kleinhirnanlage in Parallelansätzen untersucht und zeigte wiederum eine selektive Migration von neuronalen Zellen (Daten nicht gezeigt).

Der Befund, dass MCM eine Chemotaxis in den Zellen der Ventrikulärzone zu stimulieren vermag, konnte hier bestätigt werden. Im Gegensatz dazu wiesen die Zellen im Hinblick auf SDF-1 keinerlei Reaktion auf.

Das Ergebnis bestärkte die Vermutung, dass die Meningealzellen neben SDF-1 noch ein weiteres oder mehrere weitere wirksame Chemotaxine produzieren würden. Um diese Frage eindeutiger beantworten zu können, wurde in einem folgenden Experiment das MCM mittels sequentieller Ultrafiltration in vier Fraktionen unterteilt, die jeweils Proteine einer bestimmten Größe enthielten. Die nominalen Trenngrenzen der einzelnen Fraktionen wurden dabei auf 3 kDa, 10 kDa und 30 kDa festgelegt und die erhaltenen Medien wurden ebenfalls in einem Chemotaxistest nach Boyden eingesetzt.



**Abbildung 24: Meningealzellen sezernieren noch weitere chemotaktisch-aktive Faktoren neben SDF-1.**

Meningealzell-konditioniertes Medium wurde mittels Ultrafiltration in Fraktionen mit den Trenngrenzen von 3 kDa, 10 kDa und 30 kDa unterteilt. Die chemotaktische Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde im Boydenkammer-Chemotaxistest im Vergleich zu dem ursprünglichen Gesamtmedium bestimmt. Die für diesen Versuch eingesetzten Zellen wurden aus der Ventrikulärzone der Isocortexanlage junger Ratten (P 0) präpariert.

Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem errechneten Standardfehler von vier Ansätzen.

Hier zeigte sich, dass die Fraktion mit den kleinsten Proteinen (MCM<3) im Vergleich zu dem MCM-Gesamtmedium (MCM) keine Chemotaxis induzieren konnte. Auch die Fraktion, die SDF-1 enthielt (3<MCM<10) war nicht in der Lage eine chemotaktische Reaktion der Ventrikulärzonen-Neurone zu stimulieren. Im Gegensatz dazu induzierte sowohl die Fraktion, die MCM-Proteine größer als 10 kDa und kleiner als 30 kDa enthielt als auch die Fraktion, die sämtliche Proteine über der Trenngrenze von 30 kDa beinhaltete, eine positive chemotaktische Reaktion.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 SDF-1 und CXCR-4 beeinflussen die neuronale Migration in der Kleinhirnanlage

Die neuronale Migration stellt ein entscheidendes Prinzip für die Entwicklung des zentralen Nervensystems dar. Während für die Migration postmitotischer Neurone bereits zahlreiche Befunde vorliegen, gibt es wenige Erkenntnisse über die Migration mitotisch aktiver Stammzellen, wie sie in der Kleinhirnanlage anzutreffen sind. Hier entsteht im Gegensatz zu den meisten anderen Hirnregionen neben der Ventrikulärzone eine „sekundäre“ Proliferationszone. Diese wird durch die Migration mitotisch aktiver Zellen im Bereich der Rautenlippe aus der Ventrikulärzone bis hin zur leptomeningealen Oberfläche gebildet und breitet sich im weiteren Verlauf entlang dieser Oberfläche als sekundäre Körnerzellschicht aus. Dieser prolongierte Prozess setzt sich bis in die erste postnatale Woche fort. Obwohl die grundsätzlichen Mechanismen der neuronalen Migration bereits seit einiger Zeit bekannt sind, stellt sich insbesondere in der Kleinhirnanlage die Frage nach dem Mechanismus, der die migrierenden Neurone in ihre subpiaie Position führt und die Ausbreitung und Integrität der äußeren Körnerzellschicht aufrecht erhält.

Vorangegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe haben bereits belegen können, dass den Zellen der Leptomeninx, den Meningealzellen, in diesem komplexen Prozess eine entscheidende Rolle zukommt. So führte die pharmakologische Zerstörung der Meningealzellen zur Unterbrechung der tangentialen Ausbreitung der sekundären Proliferationszone entlang der Basallamina. Die Stammzellen entfernten sich von der Oberfläche und bildeten irreguläre Zellnester im inneren der Kleinhirnanlage, aber auch subarachnoidale Ektopien. Insbesondere legten diese Befunde eine konstitutive chemotaktische Beeinflussung der neuronalen Migration sowohl im Kleinhirn als auch im Isocortex durch Meningealzellen nahe, ohne Aufschluss über den entscheidenden chemotaktischen Faktor zu geben.

Einen konkreten Hinweis auf einen solchen Faktor lieferten erst die Untersuchungen von Ma et al. (2000) und Zou et al. (2000), denen ein direkter Nachweis für eine Involvierung des Chemokins SDF-1 in der neuronalen Migration der Kleinhirnanlage gelang.

Beide Arbeitsgruppen haben zeitgleich durch *knockout*-Modelle für SDF-1 und CXCR-4 zum ersten Mal die Entwicklung eines spezifischen Laminationsdefektes in der Kleinhirnanlage nachweisen können. Trotzdem blieb die Frage nach der Freisetzung von SDF-1 auf zellulärer Ebene und nach der potenziellen Interaktion mit CXCR-4 exprimierenden Zellen ungeklärt.

Dieser Frage, insbesondere unter Einbindung der Rolle der Meningealzellen, sollte nun in dieser Arbeit nachgegangen werden.

Für den Nachweis der zellulären Lokalisation des Chemokins *in situ* bot sich die Immunhistochemie als Methode der Wahl an. Die durch diese Versuche generierten Daten lieferten den ersten Nachweis für eine Expression von SDF-1 in den Meningealzellen.

Sowohl die für die immunhistochemischen als auch die für die biochemischen Untersuchungen verwendeten Antikörper detektierten SDF-1 $\alpha$  und SDF-1 $\beta$ . Auf eine Unterscheidung zwischen den insgesamt drei bekannten Isotypen von SDF-1 wurde im Rahmen dieser Experimente kein Wert gelegt, da bislang keine funktionellen Unterschiede zwischen diesen Isoformen aufgezeigt werden konnten.

Die Expression des Chemokins war in den Meningealzellen bereits im Embryonalstadium zu erkennen und blieb während des Ablaufes der Ontogenese erhalten. Sogar nachdem die äußeren Körnerzellen bereits in die innere Körnerzellschicht emigriert waren (P 30), war eine Immunreaktivität in den Meningealzellen nachweisbar. Dieser Befund bestätigte eine konstitutive Expression des Chemokins und stand damit in Einklang mit den vorangegangenen Daten, die einen chemotaktischen Einfluss dieser Zellen unabhängig vom Explantatalter beschrieben hatten (Hartmann et al., 1998).

Eine leichte Immunreaktivität war auch in den Zellen der äußeren Körnerzellzone nachweisbar. Diese Färbung könnte entweder auf eine Eigenproduktion der Neurone oder auf einen durch Extrazellulär-Matrix (ECM) gebundenen Faktor hinweisen.

Eine Eigenproduktion auf Proteinebene ist aufgrund der Ergebnisse der RT-PCR nicht auszuschließen. Bei der RT-PCR wurde die RNA der Meningealzellen mit der RNA der Corneazellen und mit denen der schichtspezifisch entnommenen Zellen der äußeren und der inneren Körnerzellschicht verglichen. Die von Hartmann et al. (1998) publizierten Daten hatten einen chemotaktischen Einfluss auf Neurone der äußeren Körnerzellschicht nicht nur für Meningealzellen, sondern auch für Fibroblasten anderer Herkunft beschrieben. Der Vergleich der RNA-Expression der Meningealzellen mit dem der Corneazellen lieferte ebenfalls einen Nachweis dafür, dass die Expression von SDF-1 kein Spezifikum der Meningealzellen darstellt, sondern anscheinend auch von anderen Fibroblasten durchgeführt wird. Der Vergleich mit den beiden Laminae der Kleinhirnanlage führte zu dem Ergebnis, dass die äußere Körnerzellschicht ebenso wie die innere eine SDF-1-Expression auf RNA-Ebene aufweist. Allerdings war das Amplifikat für die innere Körnerzellschicht nur sehr schwach ausgeprägt. Obwohl die Methode der RT-PCR keine Quantifizierung erlaubt, lässt sich aus dem Vergleich mit den in etwa bei allen Proben gleichstark ausgebildeten Banden für das *House-keeping* Gen  $\beta$ -Aktin ableiten, dass eine SDF-1-Expression in der inneren Körnerzellschicht nur in extrem geringen Maße vorhanden sein kann.

Die immunhistochemische Untersuchung der CXCR-4-Expression zeigte in der Kleinhirnanlage eine auf die äußere Körnerzellschicht begrenzte Immunreaktivität. Dieses Ergebnis korreliert mit den Befunden anderer Autoren, die in dieser Lamina durch Northern Blot und *in situ* Hybridisierung ebenfalls eine CXCR-4 Expression nachweisen konnten (Bajetto et al., 1999). Vorangegangene Befunde unserer Arbeitsgruppe hatten durch Chemotaxis-Versuche darstellen können, dass nur die äußeren, nicht aber die inneren Körnerzellen in der Lage waren, auf den bislang unbekanntem, von den Meningealzellen sezernierten, Faktor reagieren zu können. Die Tatsache, dass sich in der inneren Körnerzellschicht kein CXCR-4-Rezeptor detektieren ließ, lieferte weitere Hinweise für die in der Fragestellung aufgestellte Arbeitshypothese, die eine Regulation der SDF-1-Wirkung auf Seite der Rezeptor-tragenden Zellen nahe legte.

Eine Expression des CXCR-4-Rezeptors war dementsprechend auch nicht auf den Neuronen nachweisbar, die bereits die äußere Körnerzellschicht verlassen hatten und entlang der Bergmann-Glia in Richtung innerer Körnerzellschicht migrierten. Eine genauere Untersuchung erfolgte durch den Vergleich der Expression von CXCR-4 und dem Proliferationsmarker PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). PCNA ist essenziell für die Funktion der DNA-Polymerasen Delta und Epsilon. Da PCNA für die DNA-Replikation und Reparatur benötigt wird, findet man das Antigen in proliferierenden Zellen wieder. Die vergleichende Untersuchung zeigte, dass der CXCR-4-Rezeptor ebenso wie PCNA in der proliferierenden Sublamina und nicht in der prä-migratorischen Sublamina der äußeren Körnerzellschicht exprimiert wurde. Dieser Befund lässt auf eine Herunterregulation des Rezeptors mit dem Ende der Proliferationsphase der Zellen schließen. Insgesamt lassen die Untersuchungen der CXCR-4-Expression vermuten, dass die Funktion des Rezeptors in erster Linie in der Aufrechterhaltung der äußeren Körnerzellschicht und womöglich in der tangential erfolgenden Migration dieser Zellen liegt.

Im ZNS wird das Vorkommen zahlreicher Proteoglykane beschrieben, deren differenzierte räumliche und zeitliche Expression im Verlauf neuronaler Entwicklung Hinweise auf eine regulatorische Beteiligung an Prozessen wie der Zellmigration oder der Synaptogenese liefern (Yamaguchi 2001, Bandtlow und Zimmermann 2000). Eine Bindungsfähigkeit konnte insbesondere für Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsmoleküle und Chemokine gezeigt werden, wobei letztere aufgrund ihrer positiven Ladung an sulfatierte Proteoglykane der Zelloberflächen oder der ECM binden (Webb et al., 1993). Da in der Literatur auch für SDF-1 eine Bindung an Proteoglykane beschrieben wird (Luster 1998) und diese durch die lokale Konzentration eine entscheidende Rolle für den Erhalt der äußeren Körnerzellschicht darstellen könnte, wurde die Expression von HSPG immunhistochemisch untersucht.

Der Nachweis von HSPG, der nicht nur eine Immunreaktivität in der Basallamina, sondern auch in den Zellen der äußeren Körnerzellschicht zeigte, korrelierte mit dieser Theorie. Auch hier könnte HSPG in ähnlicher Art und Weise; wie sie für die Anheftung von Leukozyten an endotheliale Zellen beschrieben ist (Murdoch und Finn 2000a,b);

wirken und dadurch einen Konzentrationsgradienten zwischen der Basallamina und der Grenze zur Molekularzone aufbauen. Diese Annahme konnte durch weitere Untersuchungen bestärkt werden, in denen ein direkter Nachweis für die Bindungsfähigkeit von SDF-1 an das in der äußeren Körnerzellschicht lokalisierte HSPG gezeigt werden konnte. Dieser Nachweis lässt eine wesentliche Bedeutung der Bindung von SDF-1 an HSPG der äußeren Körnerzellschicht für die Aufrechterhaltung und die Integrität dieser Schicht als wahrscheinlich erscheinen.

Die *in situ* Untersuchungen hatten zahlreiche Hinweise dafür geliefert, dass SDF-1 tatsächlich den bislang unbekanntem von den Meningealzellen sezernierten Faktor darstellen könnte. Ausgehend von diesen Befunden erfolgte eine weitere Untersuchung *in vitro*, um einen Vergleich mit den dieser Arbeit vorangegangenen Ergebnissen zu ermöglichen. Hierbei musste zuerst die Expression von SDF-1 in den Fibroblasten *in vitro* bestätigt werden. Doch sowohl die Meningealzellen als auch die Corneazellen zeigten auch *in vitro* eine SDF-1-Immunreaktion. Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen bestätigte dieses Ergebnis und lieferte zusätzlich einen Aufschluss über den Anteil der SDF-1-exprimierenden Zellen der jeweils untersuchten Populationen. Während die Meningealzellen in allen Versuchen eine homogene SDF-1-exprimierende Population darstellten, zeigten sich bei den Corneafibroblasten jedoch unterschiedliche Zusammensetzungen der Population. Der Anteil der nicht-SDF-1-exprimierenden Zellen lag dabei zwischen 0 und 20 Prozent. Diese Varianzen könnten durch die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Zellen bedingt sein.

Da die Untersuchung der Expression keinen Hinweis über die Sekretion eines Proteins liefert, wurde das Medium von Meningealzellen konditioniert und mittels Immunoblot untersucht. Ziel dieser Analyse war zusätzlich, einen annähernden Wert für die Konzentration des sezernierten Chemokins im Meningealzell-konditioniertem Medium (MCM) zu erhalten. Hierbei war es möglich, anhand unterschiedlicher, bekannter Konzentrationen des rekombinanten Chemokins eine Standardkurve zu erstellen, mit deren Hilfe man einen Annäherungswert für die Konzentration des im MCM vorhandenen SDF-1 ermitteln konnte. Die im Medium detektierte Konzentration lag bei erstaunlich hohen Werten von bis zu 250 ng/ml.



Der nächste kritische Schritt bestand darin, zu überprüfen, ob die im MCM detektierte Menge an SDF-1 in der Lage war, eine chemotaktische Reaktion in den Neuronen der äußeren Körnerzellschicht zu induzieren.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde der Chemotaxisversuch nach Boyden eingesetzt, in dem Kontrollmedium mit MCM und mit Kontrollmedium, welches mit den im Immunoblot detektierten Konzentrationen an SDF-1 angereichert worden war, verglichen wurde. Während durch das Kontrollmedium keine Aktivität in den äußeren Körnerzellen induziert werden konnte, erwies sich SDF-1 als potenter Induktor neuronaler Chemotaxis. Die chemotaktische Wirkung des Chemokins war mit der Wirkung des Meningealzellmediums vergleichbar.

Dieser Nachweis steht im Gegensatz zu Daten von Bajetto et al. (1999), der zeigte, dass SDF-1 Stimulation in den CXCR-4 mRNA-exprimierenden Körnerzellen den intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegel nicht veränderte, und damit keine funktionelle Bedeutung nachweisen konnte.

Wie aufgrund der nicht nachweisbaren CXCR-4-Rezeptorexpression zu erwarten, ließ sich weder durch MCM noch durch SDF-1 in den Zellen der inneren Körnerzellschicht eine chemotaktische Aktivität induzieren. Dieses Ergebnis stand damit in Einklang mit den vorausgegangenen Befunden.

Da die bei der Präparation der äußeren Körnerzellschicht gewonnene Zellpopulation neben den Neuronen auch gliale Stammzellen enthält, wurden zu den Boydenkammer-Versuchen Parallelansätze immunhistochemisch auf die Expression verschiedener zelltypspezifischer Antigene untersucht. Diese Kontrollversuche wurden sowohl auf Polykarbonatfiltern als auch auf Deckglas-Kulturen durchgeführt, wobei letztere auch eine Kontrolle der Viabilität der Zellen ermöglichten. Für den Nachweis neuronaler Zellen fanden Antikörper gegen das bereits früh exprimierte Mikrotubulli-assoziierte Protein 2 (MAP 2) Verwendung, während der Nachweis astroglialer Zellen mit Antikörpern gegen das für diese Zellen charakteristische Intermediärfilamentprotein GFAP durchgeführt wurden (hier nicht dargestellt). Diese Kontrollversuche belegten eine selektive Migration von Neuronen, während gliale Zellen im Chemotaxistest auf der Oberfläche der Polykarbonatfilter zurückblieben und nicht anfärbbar waren.

Obwohl aufgrund der immunhistochemischen Daten und der Erkenntnisse der Boydenkammer eine analoge Schlussfolgerung auf der Hand lag, lieferten die Untersuchungen aber noch keinen direkten Hinweis darauf, dass SDF-1 den entscheidenden und vielleicht einzigen chemotaktischen Faktor im MCM darstellen würde.

Um diese Frage auf direkte Weise zu klären, wurde die Methode der Immunpräzipitation gewählt, bei der das im MCM vorhandene SDF-1 mittels Sepharose-gekoppelter Antikörper aus dem Medium entfernt wurde. Die Bestätigung für die erfolgreich durchgeführte Präzipitation lieferte wiederum der Immunoblot, durch den die Reduktion von SDF-1 auf eine in diesem Versuchsansatz nicht mehr nachweisbare Menge zu erkennen war. Das erhaltene Medium wurde mittels Boydenkammer-Chemotaxistest wiederum mit Kontrollmedium und MCM verglichen. Tatsächlich ergaben diese Untersuchungen eine drastische Reduktion der in den Körnerzellen induzierten Chemotaxis. Trotzdem musste sichergestellt werden, dass dieser Effekt nicht auf der Methode der Immunpräzipitation an sich beruhte, die z.B. durch Verunreinigungen die Viabilität oder die Migrationsfähigkeit der Zellen beeinflusst haben könnte. Deshalb wurde das SDF-1-immunpräzipitierte Medium mit rekombinantem SDF-1 angereichert und ebenfalls im Chemotaxis-Test eingesetzt. Diese Untersuchung ergab, dass durch die Zugabe des rekombinanten SDF-1 der Präzipitationseffekt wieder aufgehoben werden konnte.

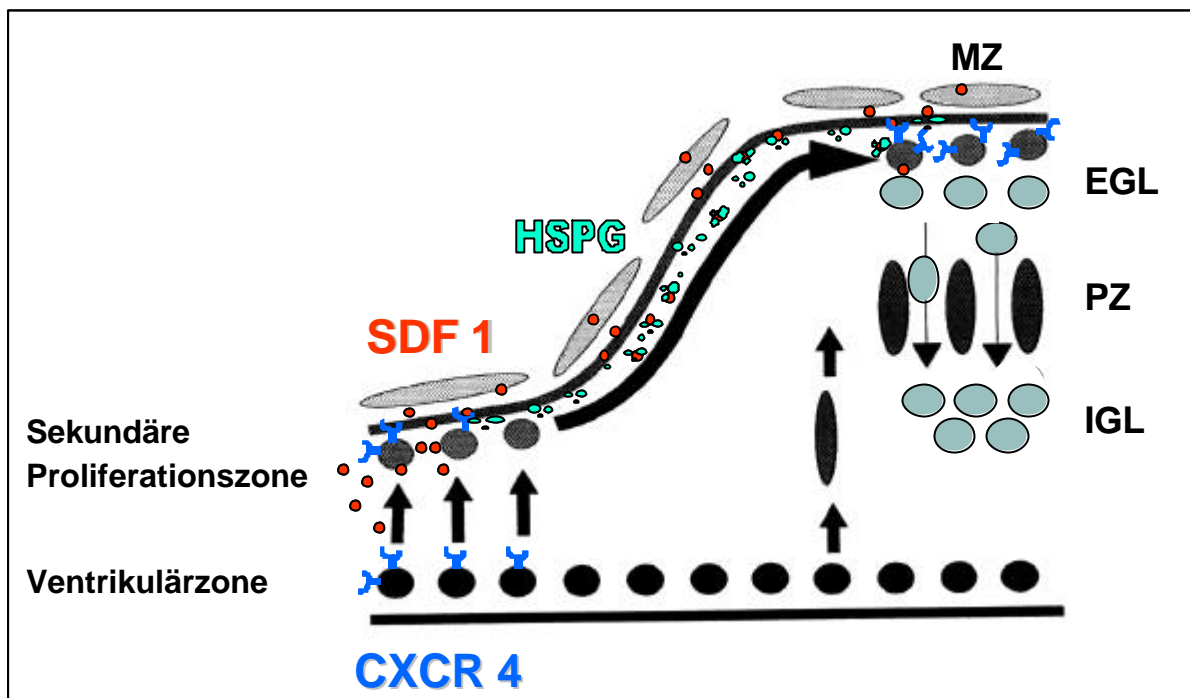
Dieses Experiment lieferte für die Kleinhirnanlage den eindeutigen Hinweis auf die Identität von SDF-1 mit dem bislang unbekanntem von Meningealzellen sezernierten chemotaktischen Faktor. Durch die Verifizierung der eingangs aufgestellten Hypothese lässt sich die Entwicklung des Defekts bei den SDF-1 *knockout*-Mäusen mit der Fehlbildung nach der selektiven Zerstörung der Meningealzellen in Einklang bringen.

Eine bislang jedoch noch ungeklärte Frage betrifft die ersten Schritte in der Entstehung der sekundären Proliferationszone. Auch hier könnten SDF-1 und CXCR-4 eine Rolle spielen. Dafür spricht die zu Beginn der Bildung der äußeren Körnerzellschicht im embryonalen Stadium erkennbare CXCR-4-Expression. Diese erstreckt sich im Bereich der Rautenlippe nicht nur auf die ersten äußeren Körnerzellen, sondern ist hier

auch im Bereich der Ventrikulärzone ausgeprägt, also in dem Bereich, aus dem die Stammzellen in ihre subpiaie Position rekrutiert werden. Möglicherweise spielt das SDF-1 / CXCR-4 System deshalb auch in der initialen Bildung dieser Lamina eine Rolle.

Aufgrund der bislang publizierten Daten über die Laminationsdefekte der SDF-1 bzw. CXCR-4 *knockout*-Tiere, muss man jedoch davon ausgehen, dass in diesen Tieren trotz ihres Defektes ursprünglich eine äußere Körnerzellschicht generiert wird. Erst zu einem späteren Zeitpunkt scheinen die Zellen ihren Kontakt zur Oberfläche zu verlieren und bilden die von den Autoren beschriebenen Defekte. Deshalb scheint das SDF-1 / CXCR-4 System nicht die einzige Möglichkeit zur ursprünglichen Rekrutierung der Stammzellen unter die piaie Oberfläche zu sein, sondern könnte vielmehr ein zusätzliches, ergänzbares System darstellen. Die von Ma et al. (1998) publizierten Daten, die zeigen, dass die Ektopien der Körnerzellen sich über den größten Teil des Cerebellums erstrecken, weisen eher auf eine Hauptfunktion für die Erhaltung der äußeren Körnerzellschicht hin.

Diese Annahme korreliert ebenfalls mit der zeitlichen Begrenztheit der Chemotaxisversuche, in denen nur im Altersstadium zwischen E 18 und P 4 eine Aktivität induziert werden konnte. Es stellt sich dabei jedoch die Frage, warum die äußeren Körnerzellen trotz ihrer *in vivo* etwa bis zum Stadium P18 andauernden CXCR-4 Expression *in vitro* im Boydenkammer-Chemotaxistest nicht mehr auf MCM reagieren. Auch diese Tatsache könnte auf die Bedeutung womöglich zahlreicher weiterer Faktoren für die tangentielle Migration der Neurone hinweisen.



**Abbildung 25 : Schematische Zusammenfassung der Kleinhirnbefunde.**

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene zeigen können, dass Meningealzellen und Fibroblasten anderer Herkunft konstitutiv SDF-1 exprimieren und sezernieren. Das von den Meningealzellen (MZ) *in vitro* sezernierte Chemokin ist in der Lage, eine Chemotaxis der äußeren Körnerzellschicht-Neurone (EGL) zu induzieren. Nur diese Zellen exprimieren im Gegensatz zu den inneren Körnerzellen (IGL) den SDF-1 Rezeptor CXCR-4. Die Expression von Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) und der Nachweis, dass SDF-1 an diese Glykanreste zu binden vermag, lässt den Aufbau eines Konzentrationsgradienten im Bereich der äußeren Körnerzellschicht als wahrscheinlich erscheinen. Sobald die Neurone der äußeren Körnerzellschicht ihre Proliferationsphase abgeschlossen haben, kommt es zu einer Herabregulation des CXCR-4-Rezeptors, wodurch sich die Zellen der Wirkung des konstitutiv sezernierten Stimulus der Meningealzellen entziehen und ihre in Richtung innere Körnerzellschicht (IGL) gerichtete Migration entlang der Bergmann-Glia-Fasern durch die Purkinje-Zellschicht (PZ) beginnen.

### 4.2 Der Einfluss des von Meningealzellen sezernierten SDF-1 auf die Neurone des Isocortex

Für die Ontogenese des Isocortex spielen die Cajal-Retzius-Zellen eine besonders wichtige Rolle. Sie stellen die ersten gereiften Neurone der Großhirnanlage dar und beeinflussen über dualistische Mechanismen die Positionierung der in die Corticalplatte einwandernden Neurone. Nach jüngsten Erkenntnissen sezernieren diese Zellen Chemotaxine wie GABA und NGF (Behar et al. 1994a,b; 1996), welche die nachfolgenden Neurone in ihre spätere Position rekrutieren. So führt eine Ablation der Cajal-Retzius-Zellen zur Unterbrechung der neuronalen Migration (Super et al., 2000).

Darüber hinaus stellen sie wahrscheinlich durch die Produktion von spezieller extrazellulärer Matrix wie Chondroitinsulfat-Proteoglykan (CSPG) und Reelin den migrierenden Zellen ein Stoppsignal zur Verfügung, über welches die Neurone unter normalen Bedingungen nicht hinaus wandern (Del Rio et al., 1995; Frotscher, 1997, d'Árcangelo et al., 1995, Ogawa et al., 1995). In diesem Zusammenhang konnte anhand der sogenannten MARCKS (*myristoylated alanine-rich C kinase substrate*)-defizienten Maus (Blackshear et al., 1997) gezeigt werden, dass eine Reduktion von CSPG in der Marginalzone (Grumet et al., 1996) zu einer Übermigration der Neurone der Corticalplatte führt.

Es gibt eine große Anzahl neuronaler Migrationsstörungen, die mit einer fehlerhaften Ausbildung der Laminae im Verlauf der Corticogenese verbunden sind. Ein Beispiel für solch eine neuronale Fehlmigration aus dem humanen Bereich ist die Lissencephalie (von „lissos“= glatt und „encephalos“= Gehirn), von der zwei Formen beschrieben sind (Dambaska et al., 1983). Bei der vorwiegend familiären Form der Typ I Lissencephalie, bei der sowohl agyrische als auch pachygyrische Regionen auftreten, kommt es zu einem vorzeitigen Abbruch der Migration der corticalen Neurone. Dieser wird auf einen Defekt der intrazellulären Signaltransduktionswege bzw. des Zytoskeletts zurückgeführt. Die Lissencephalie vom Typ 2 geht hingegen mit einer über das Ziel hinaus schießenden Migration corticaler Neurone einher und ist mit verschiedenen erblich bedingten Syndromen assoziiert (Walker-Warburg, Neu-Laxova). Auffällig ist dabei eine fibrotische Verdickung der Leptomeninx, eine defekte Basallamina und die Entstehung ektopter Gruppen von corticalen Neuronen in der Marginalzone und im

Subarachnoidalraum. Hierbei handelt es sich um ein Phänomen, welches auch in der experimentellen Neuropathologie (Choi und Matthias 1987) und anhand von Presenilin 1 (PS1)-*knockout*-Mäusen beschrieben wird (Saftig et al., 1999). Die Tatsache, dass die Zellen über ihr eigentliches Ziel hinauswandern, legt zum einen die Annahme nahe, dass hier ebenfalls ein unter normalen Bedingungen vorhandenes Stoppsignal der extrazellulären Matrix fehlt (Lyon et al., 1993). Da die migrierenden Neurone dabei über die Cajal-Retzius-Zellen, die zur Zeit als wichtigste Quelle chemotaktischer Neurotransmitter diskutiert werden, hinauswandern, stellt sich die Frage nach dem neuen Stimulus für diese Migration bzw. nach dessen zellulärer Herkunft. In diesem Zusammenhang könnte ein von den Meningealzellen abgegebener Faktor ein Erklärungsmodell für diese Wanderung liefern.

Diese Theorie wird unterstützt durch Befunde, die bei Schädigungen der Leptomeninx eine Migration der Neurone in Richtung pathologisch angehäufter Meningealzellnester beschreiben. Desweiteren passen zu diesem Model die von Squier (1993) beobachtete räumliche Korrelation zwischen ausgeprägter leptomeningealer Proliferation und dysplastischen Cortexabschnitten.

Die bisher über die Defekte CXCR-4 bzw. SDF-1 defizienter Mäuse publizierten Daten (Ma et al., 1998) berichteten einstimmig über eine Fehlentwicklung der cerebellären Corticogenese. Hingegen wurde für die Entwicklung der Großhirnanlage keine Unregelmäßigkeit beschrieben. Aufgrund dessen war anzunehmen, dass SDF-1 im Cerebrum nicht die essenzielle Funktion ausübt wie im Cerebellum. Diese Annahme ist insofern nicht überraschend, da für die Ontogenese des Großhirns nach aktuellen Erkenntnissen ein Zusammenspiel zahlreicher redundanter Faktoren diskutiert wird (s. a. Abschnitt 1.2). Auch wenn SDF-1 einen dieser Faktoren darstellen würde, dürfte es andere Faktoren geben, welche die Funktion dieses Chemokins unter normalen Bedingungen ebenfalls abdecken.

Die dieser Arbeit vorangegangenen *in vitro* Untersuchungen konnten jedoch belegen, dass Meningealzellen einen Faktor sezernieren, der auch die Migration isocorticaler Ventrikulärzonen-Neurone zu induzieren vermochte. Deshalb sollte überprüft werden, ob SDF-1 auch hier einen potenziellen Stimulus darstellen würde.

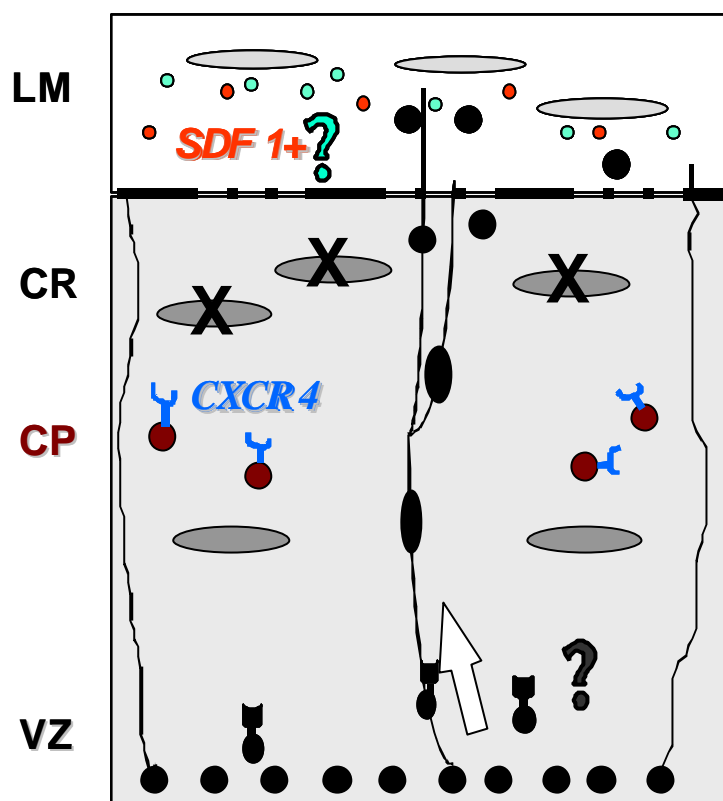
Die immunhistochemische Auswertung der SDF-1 und der CXCR-4 Expression im Isocortex lieferte jedoch erste Hinweise dafür, dass SDF-1 nicht den entscheidenden Faktor im MCM darstellen würde. Während die Meningealzellen wiederum in der gesamten untersuchten Zeitserie konstitutiv SDF-1 produzierten, konnte eine CXCR-4-Expression nur transient festgestellt werden. Diese war ab dem Entwicklungsstadium E17 bereits wieder verschwunden. Des Weiteren war diese transiente Expression von CXCR-4 auf die Neurone der sich formenden Cortikalplatte beschränkt und in der Ventrikulärzone nur marginal vertreten. Da jedoch die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente eine induzierbare Chemotaxis der ventrikulären Neurone bis zur Entwicklungsstufe P 2 sicher nachgewiesen hatten, schien SDF-1 nicht den Faktor im MCM darzustellen, der diese Migration induziert hatte.

Um jedoch sicher Aufschluss über diese Frage zu erlangen, war es notwendig, wiederum einen Boydenkammer-Chemotaxistest durchzuführen. Für diesen Versuch wurden Neurone eingesetzt, die aus Ratten unterschiedlicher Altersstufen (E 17-P 1) gewonnen worden waren. Die durch SDF-1 induzierte chemotaktische Aktivität wurde im Vergleich zu Kontrollmedium und zu MCM bestimmt. Im Gegensatz zu den cerebellären Neuronen war jedoch durch SDF-1 keine Chemotaxis induzierbar. Hingegen stellte Meningealzell-konditioniertes Medium wiederum einen deutlichen Stimulus für die Neurone dar. Diese Befunde lieferten einen direkten Hinweis darauf, dass Meningealzellen neben SDF-1 einen weiteren oder mehrere weitere chemotaktisch aktive Faktoren sezernieren mussten. Dieser Befund konnte durch einen weiteren Chemotaxistest bestätigt werden, in dem MCM eingesetzt worden war, welches mittels Ultrafiltration in Fraktionen unterteilt wurde, die jeweils einen unterschiedlichen Molekulargewichtsbereich abdeckten. Auch in diesem Ansatz zeigten die isocorticalen Neurone eine durch das Gesamt-MCM induzierte chemotaktische Aktivität, während die SDF-1 enthaltene Fraktion, die Proteine unterhalb der Grenze von 10 kDa enthielt, keine Chemotaxis anregen konnte. Im Gegensatz dazu zeigten die Fraktionen, die Proteine mit einem Molekulargewicht von über 10 kDa enthielten, eine positiv-stimulative Wirkung. Dieses Ergebnis legt ebenfalls nahe, dass Meningealzellen weitere chemotaktisch aktive Faktoren sezernieren und liefert Hinweise für weitere Untersuchungsschritte. Eine genaue Aussage über die Größe des unbekannt

chemotaktischen Faktors ist durch die Methode der Ultrafiltration nicht möglich. Es könnte durchaus sein, dass Meningealzellen mehrere Chemotaxine sezernieren, von denen einige im Bereich von 10 bis 30 kDa anzutreffen sind, während weitere Faktoren, die deutlich größer als 30 kDa sind, ebenfalls eine chemotaktische Aktivität induzieren könnten. Aufgrund der relativen Ungenauigkeit der Methode der Ultrafiltration könnte es sich ebenso nur um einen Faktor handeln, der direkt im Bereich der Trenngrenze von 30 kDa liegt und damit in beiden Fraktionen wirkt.

Die interessante Fragestellung, welcher bzw. welche chemotaktischen Stimuli im Meningealzell-konditioniertem Medium die neuronale Migration im Isocortex beeinflussen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden. Die hier dargestellten Befunde liefern jedoch neue Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen. Die Aufklärung der Frage nach den Migrationsmechanismen könnte dabei das Verständnis für die Entstehung corticaler Dysplasien wesentlich erweitern.





**Abbildung 26: Schematische Darstellung einer neuronalen Übermigration in der Großhirnanlage (Lissencephalie 2 – Modell).**

Unter bestimmten pathogenen Bedingungen (z.B. humane Lissencephalie 2) migrieren die Neurone der Ventrikulärzone (VZ), die für die Corticalplatte (CP) des Isocortex bestimmt sind, über ihr Ziel hinaus bis in den Subarachnoidalraum. Diese Übermigration scheint auf einem fehlenden „Stopp-Signal“ degenerierter Cajal-Retzius-Zellen (CR) zu beruhen. Die Neurone folgen dabei einem bislang unbekanntem Chemotaxin, dessen Quelle die leptomeningealen Fibroblasten (LM) darstellen könnten.

Vorangegangene Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe hatten *in vitro* bereits eine chemotaktische Stimulation der Neurone der Ventrikulärzone durch Meningealzellen nachweisen können. Die hier dargestellten Untersuchungen zur Bedeutung des Chemokins SDF-1 konnten eine Expression und die Sezernierung dieses Faktors durch Meningealzellen zeigen. Einhergehend mit einer nur transient in den Zellen der Corticalplatte ausgeprägten Expression des CXCR4 (E14-E17) fanden sich jedoch keine Hinweise auf einen chemotaktischen Einfluss dieses Chemokins auf die migrierenden Neurone der Ventrikulärzone. Vielmehr lassen die Ergebnisse dieser Arbeit den Schluss zu, dass Meningealzellen neben SDF-1 noch einen weiteren bzw. mehrere weitere chemotaktisch aktive Faktoren sezernieren, die auf die neuronale Migration Einfluss nehmen können.

### 4.3 Ausblick auf weitere potenzielle Effekte

Nach aktuellen Erkenntnissen geht man in der Ontogenese des Isocortex und des Rückenmarks von einem Zusammenwirken zahlreicher Faktoren wie GABA oder NGF aus (Behar et al., 1994, 1996). Dementsprechend zeigen Tiermodelle, in denen diese Faktoren nicht zur Wirkung kommen, keine Defekt der neuronalen Migration (Crowley et al., 1994; Asada et al., 1997).

In Anbetracht dieser Tatsache stellen die drastischen Defekte der neuronalen Migration, wie sie von Ma et al. (1998) und Zou et al. (1998) für SDF-1 bzw. CXCR-4-defiziente Mäuse beschrieben werden, einen eher ungewöhnlichen Befund dar.

Deshalb stellt sich die Frage, ob die bei den SDF-1-*knockout*-Tieren beobachteten Defekte allein auf das Ausbleiben des Chemokins zurückzuführen sein können. Möglicherweise spielen neben diesem Effekt noch weitere sekundäre Effekte eine wichtige Rolle. Zu diesen könnte unter anderem der Einfluss von SDF-1 auf die Expression von Zelladhäsionsmolekülen gehören. Denn für dieses Chemokin konnte bereits in verschiedenen Veröffentlichungen gezeigt werden, dass es die Expression von Zelladhäsionsmolekülen in Lymphozyten induzieren kann. Diese Induktion spielt im Immunsystem eine besonders wichtige Rolle, um die Zellen der Immunabwehr nicht nur chemotaktisch an den Ort der Entzündung zu rekrutieren, sondern auch dort zu halten, indem ihre selektive Adhesivität erhöht wird (Rossi und Zlotnik 2000).

Ähnliche Prinzipien wären auch für den Prozess der neuronalen Migration in der Kleinhirnanlage vorstellbar. Insbesondere deshalb, weil im Kleinhirn eine Lamina-spezifische Expression von bestimmten Zelladhäsionsmolekülen aus zahlreichen Untersuchungen bekannt ist (Chuong 1990), und die transiente Expression bestimmter Moleküle mit dem Migrationsverhalten der Zellen zu korrelieren scheint. Für SDF-1 wäre auch in der Kleinhirnanlage neben der chemotaktischen Attraktion der äußeren Körnerzellen ein Einfluss auf die Expression von Zelladhäsionsmolekülen und damit auf die Integrität dieser proliferativen Lamina vorstellbar. Insofern wäre ebenfalls denkbar, dass die relativ schnell erfolgende, ungerichtete Migration der Neurone in die Kleinhirnanlage hinein und die Auflösung des Zellverbandes der äußeren Körnerzellschicht, die nach der selektiven Zerstörung der Meningealzellen bzw. nach der

Zerstörung des SDF-1–Gens auftritt, nicht nur aufgrund des ausbleibenden Stimulus, sondern zusätzlich durch die sekundäre Herabregulation der entsprechenden Zelladhäsionsmoleküle forciert sein könnte.

Desweiteren ist anzunehmen, dass die Funktion von SDF-1 und seines Rezeptors CXCR-4 insbesondere im Hinblick auf die zahlreichen Wirkungsweisen im Organismus auch im Gehirn nicht nur auf die neuronale Migration beschränkt sein könnte. Die in allen untersuchten Entwicklungsstadien detektierte Immunreaktivität für CXCR-4 auf endothelialen Zellen wirft die Frage nach einer potenziellen Rolle für die Angiogenese in den Gehirnanlagen auf. Defekte der Blutgefäßbildung sind bei den *knockout*-Modellen bislang nur für den Verdauungstrakt beschrieben worden (Tachibana et al., 1998), während über die Vaskularisierung des Gehirns keine Daten vorliegen.

Während einige Autoren SDF-1 in erster Linie eine angiostatische Wirkung zuschreiben (Murdoch und Finn 2000b), konnten andere Autoren zeigen, dass dieses Chemokin durchaus *in vitro* und *in vivo* angiogenetische Aktivität induziert (Mirshahi 2000) und für eine Hochregulation des CXCR-4 Rezeptors auf Endothelien sorgt. Insbesondere für das Wachstum und die Ausbreitung von Tumoren wird SDF-1 als wichtiger angiogenetischer Faktor diskutiert. Eine wichtige Bedeutung von SDF-1 konnte bereits für die Angiogenese und die Migration der Tumorzellen bei Pankreas-Tumoren gezeigt werden (Koshiba et al., 2000). Ebenso konnte in humanen Glioblastomen eine gesteigerte Expression von SDF-1 und CXCR-4 in den Angiogenese- und Nekrose-Regionen nachgewiesen werden, wobei die Zunahme dieser Expression mit der Höhe des Tumorgades korrelierte (Rempel et al., 2000).

Aufgrund dieser Befunde ist zu vermuten, dass SDF-1 auch für die Angiogenese im Verlauf der Entwicklung des Gehirns eine wichtige Funktion ausüben könnte.

### 5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Laufe der Corticogenese des ZNS müssen neuronale Zellen zum Teil erhebliche Strecken durch aktive Migration zurücklegen, um an ihren definitiven Bestimmungsort zu gelangen, doch die Mechanismen dieser Migration konnten bislang nur unzureichend geklärt werden. Vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten zeigen können, dass die selektive Zerstörung der Meningealzellen zu spezifischen Fehlentwicklungen in der Kleinhirnanlage führte, bei der die Ausbreitung der äußeren Körnerzellschicht, einer sekundären Stammzell-zone, zum Erliegen kam. Weitere *in vitro* Untersuchungen belegten, dass Meningealzellen über einen diffusiblen Faktor eine selektive Chemotaxis der äußeren Körnerzellschicht-Neurone zu induzieren vermochten, ohne dass die Herkunft dieses Faktors geklärt werden konnte. Vor kurzem von Ma et al. (1998) publizierte Daten zeigten in einem Maus-*knockout*-Modell für das Chemokin SDF-1 und dessen Rezeptor CXCR-4, dass es bei diesen Tieren neben verschiedenen Defizienzen auch zu einer cerebellären Fehlbildung kam, deren Phänotyp deutliche Ähnlichkeit mit dem Bild der Meningealzell-Zerstörung aufwies. Diese Tatsache führte zu der Hypothese, dass SDF-1 den bislang unbekanntem diffusiblen Faktor der Meningealzellen darstellen könnte, der für die Migration der Neurone so essenziell war. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Expression des Chemokins SDF-1 und seines Rezeptors CXCR-4 im Verlauf der Corticogenese des Cerebellums und Cerebrums zu untersuchen und deren funktionelle Bedeutung zu charakterisieren.

Die vorliegenden Untersuchungen konnten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine konstitutive Expression des Chemokins SDF-1 in Meningealzellen und in anderen Fibroblasten wie den Corneazellen auf RNA- und auf Protein-Ebene nachweisen. Einhergehend mit den dieser Arbeit vorangegangenen Befunden ließ sich eine CXCR-4-Immunreaktivität in der Kleinhirnanlage nur in den proliferierenden Neuronen der äußeren Körnerzellschicht, jedoch nicht in den postmitotischen Zellen, die bereits diese Lamina verließen, und auch nicht in den Zellen der inneren Körnerzellschicht detektieren. Die Befunde zur Expression des Chemokins und seines Rezeptors ließen sich sowohl durch immunhistochemische als auch durch durchfluss-zytometrische Untersuchungen auf die *in vitro* Situation übertragen. Desweiteren zeigte der Nachweis der Expression von Heparansulfatproteoglykan (HSPG) eine Immunreaktion im Bereich der äußeren Körnerzellschicht. Weitere Untersuchungen konnten die in der Literatur beschriebene

Bindung von Chemokinen an HSPG für SDF-1 bestätigen und legen den Aufbau eines chemotaktischen Konzentrationsgradienten nahe. Um zu überprüfen, ob Meningealzellen SDF-1 nicht nur exprimieren, sondern auch sezernieren, wurde Meningealzell-konditioniertes Medium (MCM) mittels Immunoblot analysiert. Die hierbei detektierte SDF-1 Konzentration wurde in Form von rekombinantem SDF-1 Kontrollmedium zugesetzt und in einem Boydenkammer-Chemotaxistest untersucht. Dieses Medium induzierte eine dem MCM vergleichbare chemotaktische Aktivität der äußeren Körnerzellschicht-Neurone, wohingegen die Zellen der inneren Körnerzellschicht unbeeinflusst blieben. Ein direkter Nachweis dafür, dass SDF-1 der für die neuronale Migration im Kleinhirn entscheidenden Faktor aus dem MCM darstellt, gelang durch weitere Chemotaxistests. Hierbei wurde MCM eingesetzt, aus dem SDF-1 durch Immunpräzipitation entfernt worden war. Die dadurch nachweisbare Reduktion der Migrationsaktivität, die durch Zugabe von rekombinantem SDF-1 wieder aufgehoben werden konnte, lieferte schließlich die direkte Evidenz für die essenzielle Bedeutung des von Meningealzellen sezernierten Chemokins SDF-1 für die neuronale Migration in der Kleinhirnanlage.

Da Meningealzellen insbesondere unter pathogenen Bedingungen im Isocortex eine entscheidende Rolle als Quelle chemotaktischer Faktoren spielen könnten, wurde eine potenzielle Bedeutung des SDF-1/CXCR-4-Systems auch hier untersucht. Doch obwohl die Meningealzellen der Großhirnanlage ebenfalls konstitutiv SDF-1 sezernieren, konnte eine Expression des CXCR-Rezeptors 4 nur in den Zellen der Cortikalplatte nachgewiesen werden, nicht jedoch in den Zellen der Ventrikulärzone. Dementsprechend war in Chemotaxistests keine Migration der Neurone der Ventrikulärzone zu verzeichnen. Da diese Zellen jedoch eine chemotaktische Aktivität gegenüber Meningealzell-konditioniertem Medium zeigten, lassen die Befunde dieser Arbeit den Schluss zu, dass Meningealzellen neben SDF-1 noch einen weiteren, bzw. noch weitere chemotaktisch aktive Faktoren sezernieren, die auf die neuronale Migration Einfluss nehmen. Insgesamt zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass Meningealzellen in der Kleinhirnanlage durch die Sekretion von SDF-1 einen essentiellen Einfluss auf die neuronale Migration ausüben, während sie die Migration der isocortikalen Neurone nicht über SDF-1, sondern über einen weiteren oder weitere bislang unbekannte Chemotaxine beeinflussen.

## 6 LITERATUR

Aiuti, A., Webb, I.J., Bleul, C., Springer, T., Gutierrez-Ramos, J.C. (1997): The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J. Exp. Med.* 185, 111-20.

Altman, J. (1982): Morphological development of the rat cerebellum and some of its mechanisms. *Exp. Brain Res.* 6, 8-49.

Altman, J., Bayer, S.A. (1985): Embryonic development of the rat cerebellum. I. Delineation of cerebellar primordium and early cell movements. *J. Comp. Neurol.* 231, 1-26.

Amara, A., Lorthioir, O., Valenzuela, A., Magerus, A., Thelen, M., Montes, M., Virelizier, J.L., Delepierre, M., Baleux, F., Lortat-Jakob, H., Arenzana-Seisdedos, F. (1999): Stromal cell-derived factor-1 $\beta$  associates with heparan sulfates through the first  $\beta$ -strand of the chemokine. *J. Biol. Chem.* 274, 23916-23925.

Angevine, J.B., Sidman, R.L. (1961): Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of the cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192, 766-768.

Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R.G., Kanbara, N., Kuzume, H., Sanbo, M., Yagi, T., Obata, K. (1997): Cleft palate and decreased brain GABA in mice lacking the 67 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6496-6499.

Bajetto, A., Bonavia, R., Barbero, S., Florio, T., Costa, A., Schettini, G. (1999): Expression of chemokine receptors in the rat brain. *Ann. NY Acad. Sci.* 876, 201-9.

Bandtlow, C., Zimmermann, R. (2000): Proteoglycans in the Developing Brain: New Conceptual Insights for old proteins. *Phys. Rev.* 80, 1267-1290.

Bayer, S.A., Altman, J. (1991a). Neocortical development. *Raven Press*, New York.

Bayer, S.A., Altman, J., Russo, R.J., Dai, X.F., Simmons, J.A. (1991b): Cell migration in the rat embryonic neocortex. *J. Comp. Neurol.* 307, 499-516.

Behar, T.N, Schaffner, A.E., Colton, C. A., Somogyi, R., Olah, Z, Lehel, C., Barker, J.L. (1994): GABA-induced chemokinesis and NGF-induced chemotaxis of embryonic spinal cord neurons. *J. Neurosci.* 14, 1808-1818.

Behar,TN., Li, YX., Tran, HT., Dunlap, V., Scott, V., Barker, JL. (1996): GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *J. Neurosci.* 16, 1808-1818.

Behar, TN., Dugich-Djordjevic, MM., Li, YX., Ma, W., Somogyi, R., Wen, X., Brown, E., Scott, C., McKay, R.D., Barker, J.L. (1997): Neurotrophins stimulate chemotaxis of embryonic cortical neurons. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2561-70.

Behar,TN.,Scott, C.A., Green, C.L., Wen, X., Smith, S.V., Maric, D., Liu, Q-Y., Colton, C.A., Barker, J.L. (1999): Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. *J. Neurosci.* 19, 4449-4461.

Berger, O., Gan, X., Gujuluva, C., Burns, A.R., Sulur, G., Stins, M., Way, D., Witte, M., Weinand, M., Said, J., Kim, K.S., Taub, D., Graves, M.C., Fiala, M. (1999): CXC and CC chemokine receptors on coronary and brain endothelia. *Mol. Med.* 5, 795-805.

Berry, M., Rogers, A.W. (1965): The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *J. Anat.* 99, 691-709.

Blackshear, P.J., Silver, J., Nairn, A.C., Sulik, K.K., Squier, M.V., Stumpo, D.J., Tuttle, J.S. (1997): Widespread neuronal ectopia associated with secondary defects in cerebrocortical chondroitin sulfate proteoglycans and basal lamina in MARCKS-deficient mice. *Exp. Neurol.* 145, 46-61.

Bleul, C.C., Fuhlbrigge, C., Casasnovas, R.C., Aiuti, J.M., Springer, T.A. (1996a): A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med.* 184, 1101-9.

Bleul, C.C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., Springer, T.A. (1996 b). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829-835.

Bleul, C.C., Wu, L., Hoxie, J.A., Springer, T.A., Mackay, C.R. (1997): The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 1925-1930.

Boulder Committee. (1970): Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. *Anat. Rec.* 166, 257-261.

Boyden, S. (1962): The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 115, 453-446.

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brunstrom, J.E., Gray-Swain, M.R., Osborne, P.A., Pearlman A.L. (1997): Neuronal heterotopias in the developing cerebral cortex produced by neurotrophin-4. *Neuron* 18, 505-517.



Cameron, R.S., Rakic, P. (1991): Glial cell lineage in the cerebral cortex: review and synthesis. *Glia* 4, 124-137.

Choi, B.H., Matthias, S.C. (1987): Cortical dysplasia associated with massive ectopia of neurons and glial cells within the subarachnoid space. *Acta Neuropatho.* 73, 105-109.

Chun, J.J., Nakamura, M.J., Shatz, C.J. (1987): Transient cells of the developing mammalian telencephalon are peptide-immunoreactive neurons. *Nature* 325, 617-620.

Chuong, C.M. (1990): Differential roles of multiple adhesion molecules in cell migration: granule cell migration in cerebellum. *Experientia* 46, 892-899.

Crowley, C., Spencer, S.D., Nishimura, M.C., Chen, K.S., Pitts-Meeks, S., Armani, M.P., Ling, L.H., MacMahon, S.B., Shelton, D.L., Levinson, A.D. (1994): Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurones yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 76, 1001-1011.

Culican, S.M., Baumrind, N.L., Yamamoto, M., Pearlman, A.L. (1990): Cortical radial glia: identification in tissue culture and evidence for their transformation to astrocytes. *J. Neurosci.* 10, 684-92.

Dahl, D., Rueger, D.C., Bignami, A., Weber, K., Osborn, M. (1981): Vimentin, the 57000 molecular weight protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeletal component in immature glia. *Eur. J. Cell Biol.* 24, 191-196.

Dambaska, M., Wisniewski, K., Sher, J.H. (1983): Lissencephaly: two distinct clinicopathological types. *Brain Dev.* 5, 302-310.

David, G., Bai, X.M., Van der Schueren, B., Cassiman, J.J., Van den Berghe, H. (1992): Developmental changes in heparan sulfate expression: *in situ* detection with mAbs. *J. Cell Biol.* 119, 961-75.

Davies, AM., Minichillo, L., Klein, R. (1995): Developmental changes in NT3 signalling via TrkA and TrkB in embryonic neurons. *EMBO J.* 14: 4482-9.

Del Rio, J., Martinez, A., Fonseca, M., Auladell, C., Soriano, E. (1995): Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody. *Cereb. Cortex* 5, 13-21.

Doughty, M.L., Lohof, A., Campana, A., Delhay-Bouchaud, N., Mariani, J. (1998): Neurotrophin 3 promotes cerebellar granule cell exit from the EGL. *Eur. J. Neurosci.* 10, 3007-3011.

Edmondson, J.C., Hatten, M.E. (1987): Glial-guided granule neuron migration *in vitro*: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *J. Neurosci.* 7, 1928-34.

Erlandsson, A., Enarsson, M., Forsberg-Nilsson, K. (2001): Immature neurons from CNS stem cells proliferate in response to platelet-derived growth factor. *J. Neurosci.* 21, 3483-3491.

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., Berger, E.A. (1996): HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-7.

Forsberg-Nilsson, K., Behar, TN., Afrakhte, M., Barker, JL., McKay, R.D. (1998): Platelet-derived growth factor induces chemotaxis of neuroepithelial stem cells. *J. Neurosci. Res.* 53, 521-30.

Forster, R., Kremmer, E., Schubel, A., Breitfeld, D., Kleinschmidt, A., Nerl, C., Bernhardt, G., Lipp, M. (1998): Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *J. Immunol.* 160, 1522-1531.

Freshney, R.I. (1987): Culture of animal cells: a manual of basic technique. Wiley & Liss, New York, second edition.

Frotscher, M. (1997): Dual role of Cajal-Retzius cells and reelin in cortical development. *Cell Tissue Res.* 290, 315-22.

Gensburger, C., Labourdette, G., Sensenbrenner, M. (1986): Influence of meningeal cells on the proliferation and maturation of rat neuroblasts in culture. *Exp. Cell Res.* 63, 321-330.

Gleichmann, M., Gillen, C., Czarybon, M., Bosse, F., Greiner-Petter, R., Auer, J., Muller, H.W. (2000): Cloning and characterisation of SDF-1 gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1857-66.

Grumet, M., Friedlander, D.R., Sakurai, T. (1996): Functions of brain chondroitin sulfate proteoglycans during developments: interactions with adhesion molecules. *Perspect Dev. Neurobiol.* 3, 319-30.

Gupta, S.K., Lysko, P.G., Pillarisetti, K., Ohlstein, E., Stadel, J.M. (1998): Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* 273, 4282-4287

Hartmann, D., Sievers, J., Pehlemann, F.W., Berry, M. (1992): Destruction of meningeal cells over the medial cerebral hemisphere of newborn hamsters prevents the formation of the infrapyramidal blade of the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 320, 33-61.

Hartmann, D., Ziegenhagen, M.W., Sievers, J. (1998 a): Meningeal cells stimulate neuronal migration and the formation of radial glial fascicles from the cerebellar external granular layer. *Neurosci. Lett.* 244, 129-32.

Hartmann, D., Schulze, M., Sievers, J. (1998 b): Meningeal cells stimulate and direct the migration of cerebellar external granule cells *in vitro*. *J. Neurocytol.* 27, 395-409.

Hatten, M.E., Heintz, N. (1995): Mechanisms of neuronal patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 385-408.

Hatten, M.E. (1999): Central nervous system neuronal migration. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 511-39.

Hausmann, B., Sievers, J. (1985): Cerebellar external granule cells are attached to the basal lamina from the onset of the migration to the end of their proliferative activity. *J. Comp. Neurol.* 241, 50-62.

Hausmann, B., Hartmann, D., Sievers, J. (1987): Secondary neuroepithelial stem cells of the cerebellum and the dentate gyrus are attached to the basal lamina during their migration and proliferation. In: Wolff, J.R., Sievers, J., Berry, M. Mesenchymal-Epithelial Interactions in Neural Development, NATO ASI Series H, Bd. 5, Springer (Berlin): 279-291.

Hesselgesser, J., Liang, M., Hoxie, J., Greenberg, M., Brass, L.F., Orsini, M.J., Taub, D., Horuk, R. (1998): Identification and characterization of the CXCR4 chemokine receptor in human T cell lines: ligand binding, biological activity, and HIV-1 infectivity. *J. Immunol.* 15, 877-83.

Hunter, K.E., Hatten, M.E. (1995): Radial glial cell transformation to astrocytes is bidirectional: regulation by a diffusible factor in embryonic forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 2061-65.

Iatropoulos, M.J., Williams, G.M. (1996): Proliferation markers. *Exp Toxicol Pathol.* 48, 175-181.

Ishikawa, K., Kabeya, K., Shinoda, M., Katakai, K., Mori, M., Tatemoto, K. (1995): Meninges play a neurotrophic role in the regeneration of vasopressin nerves after hypophysectomy. *Brain Res.* 677, 20-8.

Jazin, E.E., Soderstrom, S., Ebendal, T., Larhammar, D. (1997): Embryonic expression of the mRNA for the rat homologue of the fusin/CXCR-4 HIV-1 co-receptor. *J. Neuroimmunol.* 79, 148-154.

Junghans, U., Koops, A., Westmeyer, A., Kappler, J., Meyer, H.E., Müller, H.W. (1995): Purification of a meningeal cell derived chondroitin sulphate proteoglycan with neurotrophic activity for brain neurons and its identification as biglycan. *Eur. J. Neurosci.* 7, 2341-2350.

Kessler, S.W. (1975): Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J. Immunol.* 115, 1617-24.

Kessler, S.W. (1981): Use of protein A-bearing staphylococci for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells. *Methods Enzymol.* 1, 442-59.

Kim, C.H., Broxmeyer, H.E., (1999): Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J. Leukocyte Biol.* 65-6.

Knebel-Döberitz, C. von, Sievers, J., Sadler, M., Pehlemann, F.W., Berry, M., Halliwell, P. (1986): Destruction of meningeal cells over the newborn hamster cerebellum with 6-Hydroxydopamine prevents foliation and lamination in the rostral cerebellum. *Neuroscience* 17, 409-426.

Koshiba, T., Hosotani, R., Miyamoto, Y., Ida, J., Tsuji, S., Nakajima, S., Kawaguchi, M., Kobayashi, H., Doi, R., Hori, T., Fujii, N., Imamura, M. (2000): Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin. Cancer Res.* 3530-5.

Kuhar, S.G., Feng, L., Vidan, S., Ross, M.E., Hatten, M.E. Heintz, N. (1993): Changing patterns of gene expression define four stages of cerebellar granule neuron differentiation. *Development*. 117, 97-104.

Kumoro, H., Rakic, P. (1993): Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260, 95-97.

Le Dourain, N.M., Catala, M., Batini, C. (1997): Embryonic neural chimeras in the study of vertebrate brain and head development. *Int. Rev. Cytol.* 175, 241-309.

Lindholm, D., Hamner, S., Zirrgiebel, U. (1997): Neurotrophins and cerebellar development. *Perspect Dev Neurobiol.* 5, 83-94.

Lin, X., Bulleit, R.F. (1997): Insulin-like growth factor I (IGF-I) is a critical trophic factor for developing cerebellar granule cells. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 99: 234-42.

Loetscher, M., Geiser, T., O'Reilly, T., Zwahlen, R., Baggiolini, M., Moser, B. (1994): Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J. Biol. Chem.* 269, 232-7.

Lou, J., Lou, Z., Zhou, N., Hall, J.W., Huang Z. (1999): The role of positively charged residues in CXCR4 recognition probed with synthetic peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14, 42-7.

Luster, A.D. (1998): Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338, 436-45.

Lyon, G. Raymond, G., Mogami, K. Gadisseux, J.F., DellaGiustina, E. (1993): Disorder of cerebellar foliation in Walker's lissencephaly and Neu-Laxova syndrome. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 52, 633-639.

Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P.R., Segal, R.A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R.T., Springer, T. (1998): Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR-4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 9448-9453.

Marin-Padilla, M. (1971): Early prenatal ontogenesis of the cerebral cortex (neocortex) of the cat (*Felis domestica*). A Golgi study. I. The primordial neocortical organisation. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 134, 117-145.

Marin-Padilla, M. (1978): Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat. Embryol.* (Berlin), 152, 109-26.

Marret, S., Gressens, P., Evrard, P. (1996): Neuronal migration disorders induced by ibotenate in the neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15463-15468.

McCarthy, K.D., de Villes, J. (1980): Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* 85, 890-892.

Minichiello, L., Klein, R. (1996): TrkB and TrkC neurotrophin receptors cooperate in promoting survival of hippocampal and cerebellar granule neurons. *Genes Dev.* 10, 2849-58.

Mirshahi, F., Pourtau, J., Li, H., Muraine, M., Trochon, V., Legrand, E., Vannier, J., Soria, J., Vasse, M., Soria, C. (2000): SDF-1 activity on microvascular endothelial cells: consequences on angiogenesis in in vitro and in vivo models. *Thromb. Res.* 99, 587-94.

Misson, J.P., Takahashi, T., Caviness, V.S. (1991): Ontogeny of radial and other astroglial cells in murine cerebral cortex. *Glia* 4, 138-148.

Moks, T., Abrahmsen, L., Nilsson, B., Hellman, U., Sjoquist, J., Uhlen, M. (1986): Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur. J. Biochem.* 156, 637-43.

Muller, Y., Tangre, K., Clos, J. (1997): Autocrine regulation of apoptosis and bcl-2 expression by nerve growth factor in early differentiating cerebellar granule neurons involves low affinity neurotrophin receptor. *Neurochem. Int.* 31, 177-91.

Murdoch, C. (2000): CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunol. Rev.* 177, 175-84.

Murdoch, C., Finn, A. (2000a): Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood.* 95, 3032-43.

Murdoch, C., Finn, A. (2000b): Chemokine receptors and their role in vascular biology. *J. Vasc. Res.* 31, 1-7.

Nagasawa, T., Kikutani, H., Kishimoto, T. (1994): Molecular cloning and structure of a pre-B cell growth stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 2305-2309.

Nagasawa, T., Nakajima, T., Tachibana, K., Iizasa, H., Bleul, C.C., Yoshie, O., Matsushima, K., Yoshida, N., Springer, T.A., Kishimoto, T. (1996): Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 14726-9.

Neveu, I., Arenas, E. (1996): Neurotrophins promote the survival and development of neurons in the cerebellum of hypothyroid rats *in vivo*. *J. Cell. Biol.* 133, 631-646.

Ogawa, M., Miyata, T., Nakajima, K., Yagyu, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H., Mikoshiba, K. (1995). The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14, 899-912.



Pehlemann, F.W., Sievers, J., Berry, M. (1985): Meningeal cells are involved in foliation, lamination, and neurogenesis of the cerebellum: evidence from 6-hydroxydopamine-induced destruction of meningeal cells. *Dev. Biol.* 110, 136-46.

Pehlemann, F.W., Mohr, S., Korr, H., Sievers, J. (1987): Einfluß der Meningealzellen auf die Zellproliferation im postnatalen Rattenkleinhirn. *Verh. Anat.Ges.* 81, 529-531.

Pixley, S.K.R., De Vellis, J. (1984): Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with monoclonal antibody to vimentin. *Dev. Brain Res.* 15, 201-209.

Puglianiello, A., Geermani, D., Rossi, P., Cianfarani, S. (2000): IGF-I stimulates chemotaxis of human neuroblasts. Involvement of type 1 IGF receptor, IGF binding proteins, phosphatidylinositol-3 kinase pathway and plasmin system. *J. Endocrinol.* 165, 123-31.

Rakic, P. (1971a): Guidance of neurons migrating to the fetal monkey cortex. *Brain Res.* 33, 471-476.

Rakic, P. (1971b): Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex: A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacua rhesus*. *J. Comp. Neurol.* 141, 283-312.

Rakic, P. (1972): Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 145: 61-83.

Rakic, P. (1988): Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations. *Prog. Brain Res.* 73, 15.

Rempel, S.A., Dudas, S., Ge, S., Gutierrez, J.A. (2000): Identification and localisation of the cytokine SDF-1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastomas. *Clin. Cancer Res.* 6: 102-111.

Ringsted, T., Linnarsson, S., Wagner, J., Lendhal, U., Kokaia, Z., Arenas, E., Ernfors, P., Ibanez, CF., (1998): BDNF regulates reelin expression and Cajal-Retzius cell development in the cerebral cortex. *Neuron* 21, 305-315.

Rossi, D., Zlotnik, A. (2000): The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 338, 436-445.

Saftig, P., Hartmann, D., DeStrooper, B. (1999): The function of presenilin-1 in amyloid beta-peptide generation and brain development. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 249, 271-9.

Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Mackay, C.R. (1998): Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol. Today.* 19, 568-74.

Sanchez, X., Cousins-Hodges, B., Aguilar, T., Gosselink, P., Lu, Z., Navarro, J. (1997): Activation of HIV-1 coreceptor (CXCR4) mediates myelosuppression. *J Biol. Chem.* 272, 27529-27531.

Schmechel, D.E., Rakic, P. (1979): A Golgi study of radial glia cells in developing monkey telencephalon: Morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat. Embryol.* 156, 115-152.

Schwartz, P.M., Borghesani, P.R., Levy, R.L., Pomeroy, S.L., Segal, R.A. (1997): Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF<sup>-/-</sup> mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. *Neuron.* 2, 269-81.

Segal, R.A., Rua, L., Schwartz, P. (1997): Neurotrophins and programmed cell death during cerebellar development. *Adv. Neurol.* 72, 79-86.

Shirozu, M., Nakano T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., Honjo, T. (1995): Structure and chromosomal localisation of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) gene. *Genomics* 28, 495-500.

Sidman, R.L., Rakic, P. (1973): Neuronal migration, with special references to developing human: a review. *Brain Research* 62, 1-35.

Sievers, J., Pehlemann, F.W., Baumgarten, H.G., Berry, M. (1985): Selective destruction of meningeal cells by 6-hydroxydopamine: a tool to study meningeal-neuroepithelial interaction in brain development. *Dev. Biol.* 110, 127-35.

Sievers, J., v. Knebel-Döberitz, Ch., Pehlemann, F.W., Berry, M. (1986a): Meningeal cells influence cerebellar development over a critical period. *Anat. Embryol.* 175, 91-100.

Sievers, J., Pehlemann, F.W., Berry, M. (1986b): Influences of meningeal cells on brain development: Findings and hypothesis. *Naturwissenschaften.* 73, 188-194.

Sievers, J., Hartmann, D., Gude, S., Pehlemann, F.W., Berry, M. (1987): Influences of meningeal cells on the development of the brain. In „Mesenchymal-Epithelial Interactions in Neural Development.“ Wolff, J.R., Sievers, J. and Berry, M., eds., Springer, Berlin:171-188.

Sievers, J., Wolff, J.R.(1987): Mesenchymal-Epithelial interactions in neural development. NATO ASI Series H, Bd. 5, Springer, Berlin.

Sievers, J., Hartmann, D., Pehlemann, F.W., Berry, M. (1992): Development of astroglial cells in the proliferative matrices, the granule cell layer and the hippocampal fissure of the hamster dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 320, 1-33.

Sievers, J., Pehlemann, F.W, Gude, S., Hartmann, D., Berry, M. (1994a): The development of the radial glia scaffold of the cerebellar cortex from GFAP -positive cells in the external granular layer. *J. Neurocytol.* 2, 97-115.

Sievers, J., Pehlemann, F.W, Gude, S., Berry, M. (1994b): A time course study of the alterations in the development of the hamster cerebellar cortex after destruction of the overlying meningeal cells with 6-hydroxydopamine on the day of birth. *J. Neurocytol.* 23, 117-34.

Sievers, J., Pehlemann, F.W, Gude, S., Berry, M. (1994c): Meningeal cells organize the superficial glia limitans of the cerebellum and produce components of both the interstitial matrix and the basement membrane. *J. Neurocytol.* 23(2):135-49.

Squier, M.V. (1993): Fetal type II lissencephaly: a case report. *Childs Nerv. Syst.* 9, 400-02.

Super, H., Martinez, A., Soriano, E. (1997): Degeneration of Cajal-Retzius cells in the developing cerebral cortex of the mouse after ablation of meningeal cells by 6-hydroxydopamine. *Dev. Brain Res. Cev. Res.* 2; 98, 15-20.

Super, H., Del Rio, J.A., Martinez, A., Perez-Sust, P., Soriano, E. (2000): Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cereb. Cortex* 10, 602-13.

Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, K., Kawabeta, Y., Kataoka, Y., Kitamura, K., Matsushima, N., Yoshida, N., Nishikawa. (1998): The chemokine receptor CXCR-4 is essential for vascularisation of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591-4.

Tashiro, K., Tada, H., Heilker, R., Shirozu, M., Nakano, T., Honjo, T. (1993): Signal Sequence Trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261, 600-603.

Webb, L.M., Ehrenguber, M.U., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Rot, A. (1993): Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7158-62.

Wingate, R.J. (2001): The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 82-88.

Yamaguchi, Y. (2001): Heparan sulfate proteoglycans in the nervous system: their diverse roles in neurogenesis, axon guidance, and synaptogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 99-106.

Yi, Y., Rana, S., Turner, J.D., Gaddis, N., Collman, R.G. (1998): CXCR-4 is expressed by primary macrophages and supports CCR5-independent infection by dual-tropic but not T-tropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72, 772-7.

Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., Littman, D.R. (1998): Function of the chemokine receptor CXCR-4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 11; 393, 595-9.

## 7 ANHANG

## 7.1 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

7.1.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Schema der Entwicklung des Isocortex</i>	2
<i>Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entwicklung der Kleinhirnanlage</i>	5
<i>Abbildung 3: Laminationsdefekt im Cerebellum eines Hamsters (P2) nach 6-OHDA-Behandlung.</i>	9
<i>Abbildung 4: Defekt der Kleinhirnentwicklung einer CXCR-4 defizienten Maus am Embryonaltag E 18,5.</i>	13
<i>Abbildung 5: Schematische Darstellung der Boydenkammer.</i>	37
<i>Abbildung 6: Immunhistochemischer Nachweis von SDF-1 im Kleinhirn der Ratte.</i>	50
<i>Abbildung 7: RT-PCR für SDF-1 und <math>\beta</math>-Aktin in Gewebe der Ratte.</i>	52
<i>Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis von HSPG an Sagittalschnitten der Kleinhirnanlage der Ratte.</i>	55
<i>Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von HSPG-gebundenem SDF-1.</i>	56
<i>Abbildung 10: Positivkontrolle der Heparitinase-Behandlung.</i>	57
<i>Abbildung 11: Nach Abdau der HSPG-Reste kann rekombinantes SDF-1 nicht mehr im Bereich der äußeren Körnerzellschicht (EGL) binden.</i>	58
<i>Abbildung 12 A: Immunhistochemische Darstellung der CXCR-4 Expression an einem Sagittalschnitt der Kleinhirnanlage einer Ratte im Entwicklungsstadium E 18.</i>	59
<i>Abbildung 12 B: Immunhistochemische Darstellung der CXCR-4 Expression an Sagittalschnitten der Kleinhirnanlage in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Ratte.</i>	61
<i>Abbildung 13: Immunhistochemischer Vergleich der Expression von CXCR-4 mit der Expression des Proliferationsmarkers PCNA.</i>	63
<i>Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von SDF-1 in kultivierten Meningealzellen und Corneafibroblasten.</i>	66
<i>Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären SDF-1 Expression in Meningealzellen und in Corneafibroblasten (Anzahl der Ereignisse gegen die Fluoreszenzintensität).</i>	69
<i>Abbildung 16: Nachweis von sezerniertem SDF-1 im MCM und CCM mittels Immunoblot.</i>	71

<i>Abbildung 17 A: Chemotaktische Reaktion von Neuronen der äußeren Körnerzellschicht des Cerebellums auf das Chemokin SDF-1.</i>	73
<i>Abbildung 17 B: SDF-1 stimuliert keine chemotaktische Reaktion der Neurone der inneren Körnerzellschicht.</i>	74
<i>Abbildung 18: Immunhistochemische Spezifizierung der für die Boyden-Kammer eingesetzten Zellen.</i>	75
<i>Abbildung 19: Nachweis der Immunpräzipitation von SDF-1 aus MCM mittels Immunoblot.</i>	77
<i>Abbildung 20: Reduktion der Chemotaxis nach Immunpräzipitation von SDF-1.</i>	78
<i>Abbildung 21: Nachweis der Expression von SDF-1 in den Meningealzellen des Isocortex (E15).</i>	79
<i>Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis der CXCR-4-Expression in der Isocortex Anlage.</i>	80
<i>Abbildung 23: SDF-1 induziert keine chemotaktische Aktivität der isocortikalen Ventrikulärzonen-Neurone.</i>	82
<i>Abbildung 24: Meningealzellen sezernieren noch weitere chemotaktisch-aktive Faktoren neben SDF-1.</i>	83
<i>Abbildung 25 : Schematische Zusammenfassung der Kleinhirnbefunde.</i>	93
<i>Abbildung 26: Schematische Darstellung einer neuronalen Übermigration in der Großhirnanlage (Lissencephalie 1 – Modell).</i>	98

### 7.1.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Polyklonale Antikörper</i>	21
<i>Tabelle 2: Monoklonale Antikörper</i>	22
<i>Tabelle 3: Sekundärreagenzien für die Immunfluoreszenzmarkierung und für Immunoblotanalysen</i>	22
<i>Tabelle 4: Zusammenfassende Übersicht über die Ergebnisse der immunhistochemischen (IH) Untersuchungen und der RT-PCR im Cerebellum</i>	64
<i>Tabelle 5: Zusammenfassende Übersicht über die Ergebnisse der immunhistochemischen (IH) Untersuchungen im Cerebrum</i>	81





## 7.2 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Dieter Hartmann für die ausgesprochen gute Betreuung, die zahlreichen Anregungen, die ständige Diskussionsbereitschaft und die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Prof. Rolf Mentlein möchte ich ebenfalls für die zahlreichen Anregungen und die methodischen Einweisungen meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Sievers möchte ich recht herzlich danken für die kritische Durchsicht dieser Abhandlung und für die Möglichkeit, diese Arbeit am Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Monika Grell, Frau Gundel Jopp und Frau Marion Köln für die große Hilfsbereitschaft und die technische Unterstützung, die ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ebenfalls Bedanken möchte ich mich bei Frau Rosemarie Sprang und Frau Martina Burmester für die methodischen Hilfestellungen.

Ferner möchte ich allen Kollegen vom Anatomischen Institut, insbesondere Dr. Simone Meffert und Dr. Ralf Lucius, für die wissenschaftliche Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

### 7.3 Lebenslauf

#### Persönliche Daten:

Name, Vorname:	Reiß, Karina
Wohnhaft:	Böker Str. 19, 24613 Aukrug
Geburtsdatum:	04.12.1974
Geburtsort:	Neustadt in Holstein
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

#### Schulbildung:

07.1981-06.1985	Grundschule in Grube
07.1985-06.1994 1994	Freiherr vom Stein Gymnasium in Oldenburg - Abitur

#### Hochschulstudium:

10. 1994-05.1999	Biologiestudium an der Christian-Albrechts- Universität zu Kiel
Oktober 1996	Diplomvorprüfung in den Fächern Zoologie, Botanik, Chemie und Mathematik
April 1998	Diplomhauptprüfung in den Fächern Zoologie, Mikrobiologie und Biochemie
05. 1998-05. 1999	Diplomarbeit am Forschungszentrum für Medizin und Biowissenschaften in Borstel mit dem Thema : "Cytokin- und BCG- induzierte Tötung von Blasen-tumor-zellen"

#### Promotionsarbeit:

seit 06. 1999	Promotionsarbeit am Anatomischen Institut der der CAU Kiel mit dem Thema: „Die Bedeutung des von Meningealzellen sezernierten Chemokins SDF- 1 ( <i>stromal cell derived factor 1</i> ) für die neuronale Migration in der Ontogenese“
---------------	--

#### 7.4 Erklärung

Hiermit erkläre ich,

-dass die Abhandlung –abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Betreuer- nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist.

-dass die Abhandlung noch nicht an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen hat.

-dass Teilergebnisse der vorliegenden Abhandlung zur Veröffentlichung eingereicht wurden.

-dass es keine Promotionsversuche in der gleichen Fakultät oder vergleichbaren Fachbereichen gab.

-dass ich für die mündliche Prüfung die Form der Disputation wähle.

-dass ich der Zulassung von Zuhörern-/ innen bei der mündlichen Prüfung widerspreche.

Kiel, den \_\_\_\_\_

---

(Karina Reiß)