

**Aus der Forschungsgruppe
der Neurologischen Klinik
Molekulare Neurobiologie (Leiter: Prof. Dr. H. W. Müller)
Direktor: Prof. Dr. med. H.-P. Hartung, ehemals Prof. Dr. med. H.-J. Freund**

**Charakterisierung der Genexpression des
neuen Chemokines SDF-1_g im
Nervensystem der Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Medizin

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Margarete Czardybon

2002

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität**

**Gezeichnet: Univ-Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch, M.A., Dekan
Referent: Univ-Prof. Dr. H.W. Müller
Korreferent: Univ-Prof. Dr. G. Reifenberger**

INHALTSVERZEICHNIS:

1.	ABKÜRZUNGEN	1
2.	EINLEITUNG	4
3.	MATERIAL UND METHODEN	11
3.1	Chemikalien und Enzyme:	11
3.2	Standardpuffer, Lösungen und Medien:	11
3.2.1	In situ Hybridisierungs-Puffer und -Lösungen.....	13
3.2.2	Qiagen-Puffer.....	14
3.3	Primer:	14
3.3.1	SDF-1.....	14
3.3.2	CXCR-4.....	15
3.4	Antikörper:	15
3.4.1	SDF-1.....	15
3.4.2	CXCR-4.....	15
3.5	Tiere:	15
3.6	Primäre Zellkulturen:	16
3.6.1	Material und Medien.....	16
3.6.2	Neuronale Zellkultur.....	16
3.6.3	Schwanzzellkultur.....	16
3.7	Bakterienstämme:	17
3.8	Vektoren und Plasmide:	17
3.9	Standardmethoden der Molekularbiologie:	17
3.9.1	Ligation.....	17
3.9.2	Kompetente Zellen.....	17
3.9.3	Transformation.....	17
3.9.4	Plasmid-Mini-Präparation nach Qiagen.....	18
3.9.5	Phenol/Chloroform-Extraktion von Plasmid DNA.....	18
3.9.6	EtOH-Präzipitation.....	18
3.9.7	Endonukleolytische Spaltung von Plasmid DNA.....	18
3.9.8	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	19
3.9.9	RNA-Präparation.....	19
3.9.10	Reverse Transkription.....	19
3.9.11	PCR-Amplifizierung.....	20
3.9.12	DNA-Sequenzierung.....	20
3.9.13	Herstellung Digoxigenin-markierter Transkripte.....	20
3.10	Histochemische Methoden:	21
3.10.1	Gewebevorbehandlung.....	21

3.10.2	Paraffineinbettung.....	21
3.10.3	Anfertigung von Mikrotomschnitten.....	22
3.10.4	In situ Hybridisierung auf Paraffinschnitten.....	22
3.10.5	Immunhistochemie.....	24
3.10.6	Immunzytochemie.....	24
4.	ERGEBNISSE.....	26
4.1	RT-PCR-Analyse der gewebespezifischen Expression von SDF-1 und CXCR-4:.....	26
4.2	In situ Hybridisierung zur zellulären Lokalisation der mRNA von SDF-1 und CXCR-4 im PNS:.....	28
4.2.1	Zelluläre Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 im Ischiasnerv der Ratte.....	28
4.2.2	Lokalisierung von SDF-1 in S-100 immunpositiven Schwanzzellen im Ischiasnerv der Ratte.....	30
4.3	In situ Hybridisierung zur zellulären Lokalisation der mRNA von SDF-1 und CXCR-4 im ZNS:.....	32
4.3.1	Zelluläre Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 in der grauen Substanz des Cerebrums.....	32
I)	Zelluläre Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 im Cortex und im Hippocampus während der Entwicklung.....	32
II)	Zelluläre Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 während der Cerebellum Entwicklung.....	38
III)	Zelluläre Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 im Bulbus olfactorius.....	41
4.3.2	Zelluläre Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 in der weißen Substanz des Cerebrums.....	43
I)	Zelluläre Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 im Corpus callosum.....	43
4.3.3	Zelluläre Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 mRNA im Rückenmark.....	45
4.3.4	Kolokalisierung von SDF-1 und CXCR-4 mRNA im Rückenmark.....	45
4.4	Zelluläre Protein Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 im Nervensystem:.....	48
4.4.1	Immunhistochemische Darstellung des SDF-1 und CXCR-4 Proteins auf Kryostatschnitten.....	48
I)	Immunhistochemische Lokalisation des SDF-1 und CXCR-4 Proteins im Cortex.....	48
II)	Immunhistochemische Lokalisation des SDF-1 und CXCR-4 Proteins im Hippocampus.....	49
4.4.2	Immunzytochemische Darstellung des CXCR-4 Proteins in primären Kulturzellen.....	51
I)	Immunzytochemischer Nachweis von CXCR-4 in primären Cortexneuronen.....	51

II)	Immunzytochemischer Nachweis von CXCR-4 in Schwanzzellen.....	51
5.	DISKUSSION.....	54
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	65
7.	LITERATURNACHWEIS.....	66

1. ABKÜRZUNGEN:

Abb.	Abbildung
A_λ	Absorption des Lichts bei angegebener Wellenlänge
Ak	Antikörper
Amp	Ampizillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
as	antisense
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumine
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
cn	cerebellärer Nucleus
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cys	Cystein
DAB	3, 3'-Diaminobenzidin
DAPI	4, 6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	embryonaler Tag
EGS	Externe-Granuläre-Schicht
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenanthridiniumbromide)
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FCS	fötales Kälberserum
FDA	Fluoreszeindiacetat
FITC	Fluoreszein
gs	Granulärschicht
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazimethan]-sulfonsäure
hu	human
H_2O_{DEPC}	Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser
IN	Ischiasnerv
ISH	In situ Hybridisierung
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

LB Medium	Luria Bertani Medium
Lys	Lysin
ma	Maus
Met	Methionin
min	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulfonsäure
mRNA	Boten RNA
ms	Molekularschicht
N.	Nervus
NGS	normales Ziegenserum
NS	Nervensystem
nt	Nukleotide
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
OT	Objekträger
P	postnataler Tag
p.a.	zur Analyse
PAM	Peptidyl-Glycin- α -amidierende-Monooxygenase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDL	poly-D-Lysin
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PKA	Proteinkinase A
PNS	peripheres Nervensystem
Pro	Prolin
PZS	Purkinje-Zell-Schicht
ra	Ratte
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SDF-1	<i>Stromal-cell-derived-factor-1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
se	sense
sek.	Sekunden
ssDNA	einzelsträngige DNA
SSC	Citrat gepufferte Saline
Std.	Stunde
SZ	Schwanzzelle
TBS	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan gepufferte Saline
TE	Tris-HCl/EDTA-Lösung
TEA	Triethanolammoniumhydrochlorid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TESPA	3-Aminopropyl-triethoxysilan
tRNA	Transport RNA
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

2. EINLEITUNG

Chemokine sind kleine Proteine (8-12 kDa), die strukturell und funktionell miteinander verwandt sind. Sie zählen zu den chemotaktischen Cytokinen, die *in vivo* und *in vitro* die Aktivierung und Migration von Immun- (z. B. Leukozyten) und Nicht-Immun-Zellen (z. B. Blutzellen) steuern (Bleul et al., 1996; Oberlin et al., 1996; Baggiolini et al., 1998; Nagasawa et al., 1999).

Im Nervensystem wurde die Cytokinexpression bisher überwiegend im Kontext autoimmunologischer und entzündlicher Prozesse wie der experimentell autoimmunen Enzephalomyelitis und der Multiplen Sklerose gesehen. Die Cytokine sind dort maßgeblich an der Entstehung, Ausbreitung und Limitierung der Entzündungsreaktion beteiligt. Erst seit kurzem ist bekannt, daß Cytokine nicht nur Autoimmunprozesse und klassische Entzündungsreaktionen modulieren (Merril & Benveniste, 1996), sondern auch Signal- und Effektorfunktionen bei primär nicht entzündlichen Prozessen wie ischämischen Hirninfarkten, traumatischen Hirnläsionen, Nervenfaserdurchtrennungen, neurodegenerativen Erkrankungen und in der Entwicklung des Nervensystems ausüben.

Die Klassifikation der chemotaktischen Cytokine ist abhängig von der Anzahl und dem Abstand der ersten Cysteine in der Aminosäuresequenz und erfolgt in vier Gruppen: CC (β -Chemokine), CXC (α -Chemokine), CX₃C und C (Hesselgesser et al., 1997; Hesselgesser et al., 1999).

Der **Stromal cell Derived Factor-1** (SDF-1) zählt aufgrund des Cys(30)-Pro(31)-Cys(32) Motivs zur CXC-Chemokinfamilie (Oppenheim et al., 1991) und beinhaltet insgesamt vier Cysteine, die zwei Disulfidbrücken bilden. Die Aminosäuresequenz von SDF-1 besitzt eine 32%ige Homologie zum Interleukin-8 (Hauptaktivator der neutrophilen Granulozyten) des Menschen und dem MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein*) der Maus.

Ursprünglich wurde SDF-1 aus einer Maus-Knochenmarkszelllinie (Tashiro et al., 1993) isoliert. 1994 konnten Nagasawa et al. im menschlichen Knochenmark SDF-1 nachweisen. Im Gegensatz zu vielen anderen Chemokinen ist die Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz von SDF-1 zwischen Maus und Mensch stark konserviert. Das humane sdf-1 Gen wurde auf Chromosom 10q lokalisiert (Shirozu et al., 1995). Zusätzlich wurde gezeigt, daß durch alternatives Spleißen des sdf-1 Gens zwei alternative Isoformen, SDF-1 α und SDF-1 β (Jiang et al., 1994; Shirozu et al., 1995) entstehen.

Mit dem Bestreben neue Gene zu finden, die während der Ischiasnerv Regeneration reguliert werden, wurde von einem Mitarbeiter (Gillen et al., 1995) aus unserem Labor (Labor für Molekulare Neurobiologie an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf) eine neue SDF-1 Isoform isoliert, das SDF-1 γ . Bei dieser Isoform handelt es sich vermutlich um ein weiteres Spleißprodukt des sdf-1 Gens. Erste Daten, basierend auf Untersuchungen, die Marc Gleichmann durchführte (Gleichmann M., Dissertation, 1996), wurden im Juni 2000 publiziert (Gleichmann et al., 2000).

Die drei SDF-1 Transkripte unterscheiden sich im carboxyterminalen Bereich sowie in der 3'-untranslatierten Region. **SDF-1a** kodiert für 89 Aminosäuren, wobei 19 Aminosäuren als Signalsequenz abgespalten werden, und stellt somit

mit einem Molekulargewicht von 7,8 kDa die kleinste SDF-1 Isoform dar. Nach der kodierenden Sequenz folgt eine ca. 1500 bp lange nicht-kodierende Sequenz, die keine Homologie zu SDF-1 β und SDF-1 γ zeigt. Im Fall von **SDF-1b** wird die SDF-1 α Isoform um 4 Aminosäuren carboxyterminal erweitert, d.h. SDF-1 β kodiert für ein 93 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 8 kDa. Die ersten 19 AS kodieren auch hier für eine sekretorische Signalsequenz (Tashiro et al., 1993). **SDF-1g** ist in den ersten 89 Aminosäuren mit SDF-1 β identisch. Danach folgen, bedingt durch eine 2572 bp große Insertion, 30 Aminosäuren, die keine Homologie zu SDF-1 β aufweisen. Das theoretische Molekulargewicht beträgt 12,5 kD.

Abspaltung putativer Neuropeptide

In der SDF-1 β Aminosäuresequenz der Ratte findet man an Position 89-90 (Lys-Arg) zwei basische Aminosäuren, die ein typisches Motiv für eine proteolytische Peptidabspaltung darstellen könnten. Als Endprodukte würde ein verkürztes SDF-1 β mit 88 AS (Met 1-Asn 88), sowie ein 5 Aminosäuren kurzes Peptid (Lys 89 - Met 93) entstehen.

In der SDF-1 γ Aminosäuresequenz finden sich carboxyterminal, kodiert durch die 2572 bp lange Insertion, mehrere Paare basischer Aminosäuren. Eine mögliche proteolytische Peptidabspaltung würde maximal 6 Peptide ergeben, wovon drei C-Terminal mit einem Glycin enden würden. Dieses Glycin könnte durch die Peptidyl-Glycin- α -amidierende-Monooxygenase (PAM) α -amidiert werden. Bei dieser Reaktion handelt es sich um einen bekannten und weit verbreiteten Mechanismus posttranslationaler Prozessierung von Neuropeptiden. Zu den α -amidierten Peptiden zählen z. B. Gastrin, Oxytocin, Vasopressin und Substanz P, wobei in den meisten Fällen die biologische Aktivität durch die α -Amidierung gewährleistet wird (Eipper et al., 1992a; Eipper et al., 1992b; Eipper et al., 1993).

Über die Funktion und spontane Entstehung der SDF-1 Neuropeptide in vivo ist allerdings nichts bekannt.

SDF-1 Gewebeexpression

In der adulten Maus wird die SDF-1 α/β mRNA in unterschiedlichen Organen exprimiert. Man findet sie in Milz, Niere, Leber, Magen, Verdauungstrakt, Lunge, Herz, Thymus, Knochenmark und Gehirn (Nagasawa et al., 1999). Auch während der Embryogenese von Leber, Herz, Knochenmark und Gehirn scheint SDF-1 α/β eine Rolle zu spielen (McGrath et al., 1999; Nagasawa et al., 1999). Mit Hilfe der Northernblot-Analyse wurde 1996 von M. Gleichmann, im Rahmen seiner Dissertation, die Gewebeverteilung der neuen SDF-1 γ Isoform, vergleichend mit der SDF-1 β Expression, in der adulten Ratte untersucht. So wird die SDF-1 β mRNA vorwiegend in Leber, Milz, Thymus und Niere gefunden, SDF-1 γ dagegen überwiegend in Lunge, Herz, Muskel, Gehirn (Cortex, Hippocampus, subcorticale Kerngebiete, Cerebellum), Ischiasnerv und Schwanzzellen. SDF-1 α mRNA wurde im Nervensystem der adulten Ratte nicht detektiert (Gleichmann M., Dissertation, 1996). Mit dieser Analyse konnten

allerdings die Zelltypen, die spezifisch SDF-1 γ im Nervensystem exprimieren, nicht ermittelt werden.

SDF-1 β/γ Expression während der Nervensystem-Entwicklung und nach Ischiasnerv-Läsion

Die SDF-1 β/γ mRNAs der Ratte werden entwicklungsabhängig unterschiedlich exprimiert. M. Gleichmann zeigte dies zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Ischiasnerv- und Gehirn-Entwicklung mit Hilfe der Northernblot-Analyse.

Postnatal findet man im Ischiasnerv eine initial hohe SDF-1 β Genexpression mit kontinuierlicher Abnahme zu späteren Entwicklungszeitpunkten. SDF-1 γ wird am Tag der Geburt nur schwach exprimiert, allerdings mit stetiger Zunahme während der ersten beiden Wochen, bis ein Maximum am 14. Tag erreicht wird. Anschließend folgt ein Abfall auf das basale Niveau adulter Tiere. Einen ähnlichen Verlauf zeigen die mRNA-Muster während der Gehirnentwicklung: Zunächst (P1) wird fast ausschließlich die SDF-1 β Form exprimiert, bis sich das Expressionsmuster am 17. Postnataltag allmählich umkehrt und es zu einer ausschließlichen SDF-1 γ Genexpression im adulten Tier kommt. Die Zelltypen die spezifisch SDF-1 γ bzw. SDF-1 β exprimieren konnten mit dieser Analyse jedoch nicht ermittelt werden.

Auch nach einer Läsion des Ischiasnervs der Ratte werden die alternativen Transkripte SDF-1 β und SDF-1 γ differentiell reguliert. Bereits am 1. Tag nach der Läsion kommt es zu einem Anstieg der SDF-1 β mRNA Expression mit maximalen Werten am 2. Tag. Parallel hierzu wird die SDF-1 γ Transkription herunter reguliert. Nach einsetzender Regeneration entspricht das Expressionsmuster eine Woche nach Quetschläsion wieder dem eines intakten Nerven.

CXCR-4, der SDF-1 Rezeptor

Der Rezeptor, an den SDF-1 bindet, war lange Zeit unbekannt. 1996 klonierten Oberlin et al. einen Ca²⁺-abhängigen Rezeptor, bestehend aus sieben Transmembrandomänen, der als CXCR-4 klassifiziert wurde. Das *cxcr-4* Gen enthält zwei Exons und kodiert für ein 48 kDa Protein (Caruz et al., 1998). Dieser Rezeptor wurde bereits als Co-Rezeptor (Fusin) auf CD4-exprimierenden Lymphozyten gefunden und trägt genauso wie CD4 und CCR-5 zur HIV-1 Infektion bei (Feng et al., 1996, Oberlin et al., 1996; Samson et al., 1996). Oberlin et al. und Bleul et al. erkannten Ende 1996 in dem CXC-Chemokin SDF-1 α den natürlichen Liganden für diesen CXCR-4/Fusin Rezeptor und zeigten, daß er nach Rezeptorbindung die HIV-1 Permissin in Lymphozyten verhindern kann.

Homologe CXCR-4 Rezeptorsequenzen waren bereits seit Anfang der neunziger Jahre bekannt, allerdings ohne Kenntnis der/des biologischen Liganden, obwohl eine große Anzahl chemotaktischer Cytokine getestet worden waren.

1994 klonierten Loetscher et al. den CXCR-4/Fusin homologen und 352 Aminosäuren langen GTP-bindenden, sieben-transmembran Rezeptor LESTR

(*leucocyte-expressed seven-transmembrane-domain receptor*), indem mit einer Interleukin-8 cDNA Probe eine humane Blut-Lymphozyten cDNA Bank durchsucht wurde. Der gefundene neue Rezeptortyp band kein Il-8 und erstaunlicherweise, obwohl eine 93%ige Homologie zum *bovine neuropeptid Y* (NPY) Rezeptor (Rimland et al., 1991) besteht, auch kein NPY. Weitere homologe Rezeptorsequenzen wurden von Herzog et al. (1993) in humaner Niere und Lunge, sowie von Federspiel et al. (1993) in humaner fötaler Milz und von Jazin et al. (1993) im humanen fötalen Gehirn gefunden.

Im Gehirn wird CXCR-4 von vielen Zelltypen exprimiert, einschließlich Mikroglia, Astrozyten, Neuronen und vaskulären Endothelzellen (Wong et al., 1996; Lavi et al., 1997; Ohtani et al., 1998; Lazarini et al., 2000). CXCR-4 scheint, genauso wie SDF-1, eine wichtige Bedeutung während der Embryogenese vieler Organe, besonders aber im neuronalen Gewebe zu besitzen (Nagasawa et al., 1996b; Jazin et al., 1997; McGrath et al., 1999). CXCR-4 und SDF-1 defiziente Maus Mutanten (*knockout-Mäuse*) zeigen beide eine Vielzahl von multiplen Defekten, unter anderem eine identische, strukturabweichende Architektur des Kleinhirns (Zou et al., 1998; Tachibana et al., 1998), bedingt durch eine abnorme Migration der cerebellären Zellschichten mit ektopisch liegenden Zellen.

Außerhalb des Nervensystems findet man in der embryonalen Leber dieser Tiere eine starke Reduktion der B-Zell Vorläufer. Die Myeloidzell Vorläufer sind nicht im Knochenmark, aber in der embryonalen Leber reduziert (Nagasawa T. et al., 1996a). Zusätzlich findet man im Herzen der Mäuse einen schweren VSD (Ventrikel-Septumsdefekt). Beide *knockout* Mäuse-Stämme sind nicht lebensfähig und sterben perinatal (Nagasawa et al., 1996a; Ma et al., 1998).

SDF-1 und CXCR-4 Funktionen

Über die Rolle der α -Chemokine im Nervensystem ist wenig bekannt, trotz weit verbreiteter Expression verschiedener CXC-Rezeptoren im Gehirn (Horuk et al., 1997; Lavi et al., 1998). Der CXCR-4 Rezeptor ist außerhalb des hämatopoetischen Systems der am weitesten verbreitete funktionelle Chemokinrezeptor (Bleul et al., 1996). Im Immunsystem wirkt das α -Chemokin SDF-1 über CXCR-4 stimulierend auf die Proliferation von B-Vorläuferzellen und wirkt chemoattraktiv auf T-Lymphozyten und andere Leukozyten (Nagasawa et al., 1994; Bleul et al., 1996; Oberlin et al., 1996). Vermutlich ist nur SDF-1 α an der B-Zell Lymphopoese und Knochenmarks-Myelopoese beteiligt.

Neben diesen einfachen immunmodulatorischen Funktionen von SDF-1 und CXCR-4 scheinen beide Proteine eine größere biologische Relevanz zu besitzen als ursprünglich angenommen (Horuk, 1998).

Im Gehirn induziert SDF-1 die Migration von mikroglialen Zellen und Astrozyten (Tanabe et al., 1997a). Zusätzlich kann SDF-1 *in vitro* eine CXCR-4 vermittelte Apoptose in humanen neuronalen Zelllinien induzieren (Hesselgesser et al., 1998a; Hesselgesser et al., 1998b; Kaul & Lipton, 1999). Während der ZNS Entwicklung könnte diese apoptotische Elimination von nicht korrekt migrierten Zellen zum richtigen Gewebeaufbau beitragen. Auch die Induktion von Zell-Migration oder -Chemotaxe kann bei der Morphogenese von Geweben

entscheidend dazu beitragen einen Zellverband zu bilden oder aufrechtzuerhalten. Das Verständnis über die Verteilung von CXCR-4 im Nervensystem könnte daher Aufschluß geben über die Entstehung von neuronalen Mustern im Gehirn. Davor steht allerdings die Identifizierung der Zelltypen, die im zentralen Nervensystem CXCR-4 und SDF-1 exprimieren.

Über die SDF-1 Bindung an den Rezeptor kommt es zu einer Mobilisierung und transienten Erhöhung von intrazellulärem Kalzium

einer immundefizienten Maus durch spezielle CXCR-4 neutralisierende Antikörper verhindert werden (Müller et al., 2001).

An welcher der aufgeführten Funktionen SDF-1 γ ausschließlich bzw. mitbeteiligt ist, bleibt noch zu untersuchen. Zu Beginn der SDF-1 γ Analyse steht die Charakterisierung der Genexpression, die eine Untersuchung der Normalverteilung im Organismus und Bestimmung der Zelltypen, die das Protein exprimieren, beinhaltet.

Problemstellung:

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine eingehende Charakterisierung der Genexpression der neuen SDF-1 γ Isoform der Ratte durchzuführen.

Mit Synthese spezifischer SDF-1 Primer und mit Hilfe der PCR-Analyse, sowie cDNAs aus unterschiedlichen Geweben sollte untersucht werden, ob eine ubiquitäre oder eine gewebespezifische Genexpression von SDF-1 γ vorliegt. Zusätzlich sollte die Transkription der neuen SDF-1 γ Isoform mit der, der übrigen SDF-1 Isoformen verglichen werden und vergleichend sollte auch die Verteilung des CXCR-4 Rezeptors analysiert werden.

Im Zusammenhang mit der SDF-1 β und SDF-1 γ Transkription in bestimmten Geweben sollte vergleichend auch die Gewebeverteilung des PAM-Enzyms (Peptidyl-Glycin- α -amidierende-Monooxygenase), im Hinblick auf die Entstehung putativer Neuropeptide, diskutiert werden.

Die zelluläre Lokalisation der SDF-1 γ Expression sollte mit Hilfe der In situ Hybridisierung im peripheren Nerven und während der Gehirnentwicklung erfolgen.

Während eines Großteils der ZNS-Entwicklung sollte die Expression von SDF-1 γ mit der Rezeptorexpression verglichen werden. Einzelne Hirnregionen, wie z.B. Cortex, Hippocampus, Cerebellum, Bulbus olfactorius sollten während der ontogenetischen Entwicklung und Reifung zu verschiedenen Zeitpunkten mit einer spezifischen SDF-1 γ und CXCR-4 RNA Sonde hybridisiert und das Expressionsmuster vergleichend analysiert werden. Die verschiedenen Zeitpunkte sollten dabei embryonale, postnatale und das adulte Stadium der Ratte umfassen.

Diese schwerpunktmäßige Untersuchung einzelner Hirnregionen mit Identifizierung derjenigen Zelltypen im Nervensystem, die sowohl SDF-1 γ als auch den CXCR-4 Rezeptor exprimieren, sollte Aufschluß geben über das spezifische Verteilungsmuster beider Proteine

Eine Untersuchung der SDF-1 γ und CXCR-4 Proteinexpression sollte die erhaltenen Transkriptionsdaten bestätigen.

Eine Analyse beider Proteine sollte mit spezifischen SDF-1 und CXCR-4 Antikörpern an Gewebeschnitten durchgeführt werden. Eine *in vivo* Analyse an Zelllinien mit beiden Antikörpern schloß sich an.

Die gewonnenen Daten sollten bewertet und im Hinblick auf die Möglichkeit einer Aussage zur Funktion des SDF-1 Gens und dessen Protein beurteilt werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemikalien und Enzyme:

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Chemikalien mit dem Reinheitsgrad p.a. wurden, wenn nicht anders beschrieben, von folgenden Firmen bezogen:

Fluka (Neu-Ulm)

Merck (Heidelberg)

Roth (Karlsruhe)

Sigma (Deisenhofen)

Faust (Köln)

Serva (Heidelberg)

Pharmacia (Schweden)

Promega (Mannheim)

Perkin Elmer (Applied Biosystems Division, USA)

Alle für diese Arbeit notwendigen Enzyme lieferten folgende Firmen:

GIBCO/BRL (Fa. Life Technologie, Eggenstein)

Roche (Basel)

AGS (Heidelberg)

Biolabs (Schwalbach)

3.2 Standardpuffer, Lösungen und Medien

Aufgeführte Puffer, Lösungen und Medien wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit Aqua dest. angesetzt.

Agar/LB_{AMP}-Petrischalen

1,0 % Bactotrypton

0,5 % Bacto-Hefeextrakt

0,5 % NaCl

1,5 % Agar

Nach dem Autoklavieren, wurde das auf ca. 42°C abgekühlte Medium mit Ampizillin bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml versetzt.

Ampizillin

25 mg/ml des Ampizillin Natriumsalzes wurden in Wasser gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C im Dunkeln gelagert.

Ethidium-Bromid-Lösung

1% (w/v) Ethidiumbromid in Wasser

Die Lösung wurde einige Stunden gerührt und lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

HEPES-Puffer

10 mM HEPES

2 mM MgCl₂

Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

LB-Medium

1,0 % (w/v) Bactotrypton

0,5 % Bacto Hefeextrakt

0,5 % NaCl

Das Medium wurde autoklaviert.

PBS für Immunzytochemie

170 mM NaCl

3,35 mM KCl

4,0 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1,84 mM KH_2PO_4

Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt und autoklaviert.

Phenol/Chloroform

Phenol/Tris wurde mit einem gleichen Volumen Chloroform versetzt und lichtgeschützt in einer dunklen Flasche bei 4°C gelagert.

Phenol/Tris

Festes Phenol wurde im 65°C-Wasserbad gelöst. Das flüssige Phenol wurde anschließend durch Ausschütteln mit 1 M Tris, pH 8,0 gesättigt und mit 100 mM Tris, pH 8,0 überschichtet.

RNase A (Fa. Roche)

10 mg/ ml H_2O

Die Lösung wurde 10 min bei 90°C erhitzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Tris 1 M

1 M Tris

Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und autoklaviert.

3.2.1 In situ Hybridisierungs-Puffer und -Lösungen

- **H₂O_{DEPC}**
dH₂O wurde mit 0,1% Diethylpyrocarbonat versetzt, kräftig geschüttelt, nach 12 Std. wurde die Lösung autoklaviert
- **TE**
100 mM Tris-HCl
50 mM EDTA
Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt.
- **PBS für ISH**
120 mM NaCl
2,7 mM KCl
7,0 mM Na₂HPO₄ × 2H₂O
3,0 mM NaH₂PO₄ × H₂O
Die Lösung wurde mit H₂O_{DEPC} angesetzt, auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und autoklaviert.
- **TEA**
0,1 M Triethanolammoniumhydrochlorid
Die Lösung wurde mit 10 N NaOH auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt.
- **Hybridisierungsmix**
50% Formamid
1x Denhardts-Lösung
20 mM Tris-HCl pH 8,0
1 mM EDTA
300 mM NaCl
10 % Dextransulfat 500000
500 µg/ml Bäckerhefe tRNA
Die Lösung wurde mit H₂O_{DEPC} angesetzt.
- **20x SSC**
3 M NaCl
300 mM Natrium-Citrat
Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und anschließend autoklaviert. Für die Prähybridisierung wurde die Lösung mit H₂O_{DEPC} angesetzt.
- **RNase Puffer**
10 mM Tris-HCl pH 8,0
1 mM EDTA
500 mM NaCl
- **TBS für ISH**
100 mM Tris-HCl pH 8,0
150 mM NaCl

- **Blockier Lösung**

2% NGS (normales Ziegenserum)
0,15% Triton X-100
Die Lösung wurde mit TBS angesetzt.

- **Substrat Puffer**

100 mM Tris-HCl pH 9,5
100 mM NaCl
50 mM MgCl₂

3.2.2 Qiagen-Puffer

- **P1 (TE)**

50 mM Tris/HCl
10 mM EDTA
Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt.

- **P2 (NaOH/SDS)**

0,2 M NaOH
1 % (w/v) SDS

- **P3 (3M Kaliumacetat)**

3 M Kaliumacetat
2 M Eisessig
Die Lösung wurde mit Eisessig auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt.

3.3 Primer:

Die verwendeten Primer wurden von der Fa. MWG Biotech (Ebersberg) bezogen:

SDF-1a:

SDF 1AP1 5'-GCT TCT CAC CTC TGT AGC CTG AC-3'
(nt 998-1020, sense)

SDF 1AP2 5'-GGG TTC CAA TCA GAA ATG GAG AC-3'
(nt 1380-1403, sense)

SDF 1AM1 5'-GCT AGT GCA TAT AAT GTC ACA GTT G-3'
(nt 1731-1707, antisense)

SDF-1b:

SDF 1BP1 5'-CTT TCA CTC TCG GTC CAC CTC GGT G-3'
(nt 1-25, sense)

SDF 1BP2 5'-CAG TCA GCC TGA GCT ACA GAT GC-3'
(nt 122-144, sense)

SDF 1BM1 5'-TGG CCT TGG CCT GTC ACC AAT GAC G-3'
(nt 572-548, antisense)

SDF 1BM2 5'-TCT TCC CTG ACC TCA CAC TCC TG-3'
(nt 758-736, antisense)

SDF-1g:

SDF 1GP1 5'-TCT GCT AAG CTA TGA AGA AAG ATG T-3'
(nt 661-685, sense)

SDF 1GM1 5'-TTG GGA TAT TAG GTA ATT CCA GAG C-3'
(nt 1313-1289, antisense)

CXCR-4:

Lestr P1 5'-ATA ATT ACA CCG AGG ATG ACT TG-3'
(nt 96-118, sense)

Lestr M1 5'-TAG AGG ATG GGA TTC AGG CAG CA-3'
(nt 990-968, antisense)

Fusin P1 5'-GGA TGA AAA CGA AAA CTT CAA CAG G-3'
(nt 159-184, sense)

Fusin M1 5'-CGT GAT GGA GAT CCA CTT GTG CAC G-3'
(nt 946-922, antisense)

3.4 Antikörper:

Alle Antikörper sind unter Angabe der Immunglobulinklasse, des Herstellers und der verwendeten Arbeitskonzentration aufgeführt.

1. AK:

SDF-1b:

Anti-SDF-1 (C19): Ziege polyklonal IgG, 1:100 (Fa. Santa Cruz, Heidelberg)

CXCR-4:

Anti-Fusin (C20): Ziege polyklonal IgG, 1:100 (Fa. Santa Cruz, Heidelberg)

2. AK:

Biotinylierter anti Ziege aus Pferd IgG 1:400 (Fa. Vector Laboratories, USA)

Avidin-Reagenz:

FITC-Streptavidin (Fluoreszein Avidin D) 1:400 (Fa. Vector Laboratories, USA)

3.5 Tiere:

Gewebe und Zellen wurden aus Wistar-Ratten isoliert, die von der Zentralen Tierversuchsanlage (TVA) der Heinrich-Heine-Universität bezogen wurden.

Die Tiere wurden in der TVA unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen (SPF) bei einer Temperatur von 21°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50%+/-5% gezüchtet. Die Haltung erfolgte in zwölfstündigem Hell-Dunkelwechsel.

Die Tötung der Tiere erfolgte gemäß dem geltenden Tierschutzgesetz.

3.6 Primäre Zellkulturen:

3.6.1 Material und Medien

96-Loch-Mikrotiter-Platten stammten von Becton und Dickinson (Heidelberg). Alle anderen für die Zellkultur verwendeten Flaschen und Schalen wurden von Greiner (Solingen) bezogen. Die in der Zellkultur verwendeten Grundmedien Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM) und Hams F12 Medium sowie das fötale Kälberserum (FCS) wurden steril und gebrauchsfertig von der Firma GIBCO/BRL bezogen.

3.6.2 Neuronale Zellkultur

Neocorticale Neurone wurden aus Ratten des Embryonalaltages 15 (E15) gewonnen (Müller, H.W. et al., 1984). Nach Tötung des Muttertieres wurden die Föten entnommen, die anschließende Präparation des Gewebes erfolgte mit Hilfe der Stereolupe unter einer horizontalen, sterilen Werkbank (Gelaire, Flow).

1. Entnahme des Gehirns und Entfernung der Meningen.
2. Die Cortizes wurden abgetrennt und in DMEM gewaschen.
3. Die Cortizes wurden 10 min bei 37°C in 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA Lösung (v/v) (Fa. Roche) inkubiert.
4. Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe von 10% FCS in DMEM gestoppt.
5. Das Gewebe wurde 2x mit DMEM gewaschen und in 2 ml N2-Medium (75% DMEM, 25% Hams F12, 3,9mM L-Glutamin, 5µg/ml Insulin, 100µg/ml Transferrin, 20nM Progesteron, 100µM Putrescin, 30nM Na-Selenit) aufgenommen.
6. Vorsichtiges Scheren des Gewebes mit Pasteurpipetten, deren Öffnungen durch Abflammen zunehmend verengt wurden. Dadurch wurden die Zellen vereinzelt.
7. Entfernung der verbliebenen Zellaggregate durch Filtrieren durch Nylongaze (Porengröße 30 µm, Neolab, Heidelberg).
8. Bestimmung der Viabilität durch Färbung der lebenden Zellen mit Fluoreszeindiacetat (FDA).
9. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen FDA-Lösung (0,042% in Aceton, 1:10 in 10% FCS/DMEM) verdünnt, gemischt und die fluoreszierenden Zellen in einer Thoma-Zählkammer unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt.

3.6.3 Schwanzzellkultur

Schwanzzellen wurden aus Ischiasnerven der adulten Ratten gewonnen. Nach Tötung des Tieres wurden die Ischiasnerven freigelegt und entnommen.

1. Die Ischiasnerven wurden zerkleinert und in DMEM gewaschen.
2. Das Gewebe wurde 5 min bei 2000 Upm zentrifugiert.
3. Der Überstand wurde verworfen.
4. Das Gewebe wurde 60 min bei 37°C mit 2,5% Trypsin/ 0,6% Kollagenase in DMEM Lösung inkubiert.
5. Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe von 10% FCS in DMEM gestoppt.
6. Das Gewebe wurde 5 min bei 1500 Upm zentrifugiert.
7. Der Überstand wurde verworfen.

8. Der Niederschlag wurde in 0,5% FCS in DMEM aufgenommen und mit einer Spritze trituiert.
9. Das Zellhomogenat wurde durch Nylongaze (Porengröße 60 µm, Neolab, Heidelberg) filtriert.
10. Das Filtrat wurde 5 min bei 1500 Upm zentrifugiert.
11. Der Überstand wurde verworfen.
12. Der Niederschlag wurde in 5 ml 0,5% FCS in DMEM aufgenommen und in eine unbeschichtete Kulturflasche gegeben.
13. Der Mediumwechsel erfolgte 1x pro Woche.

3.7 Bakterienstämme:

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden ausschließlich Derivate des *E.coli* Stamms DH5α verwendet.

3.8 Vektoren und Plasmide:

pBluescript II KS +/- (Fa. Stratagene, Niederlande)

Das Plasmid enthält für die Blau-Weiß Selektion die kodierende Region des β-Galaktosidase-Gens von *E.coli*.

3.9 Standardmethoden der Molekularbiologie:

Alle Methoden wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Sambrook et al., 1989 durchgeführt.

3.9.1 Ligation

Ligationen wurden mit dem Rapid DNA Ligations Kit (Fa. Roche) durchgeführt und 5 min bei RT inkubiert.

3.9.2 Kompetente Zellen

Es wurden ausschließlich *E.coli* Bakterien im Top10 One Shot Kit (Fa. Invitrogen, Niederlande) verwendet.

3.9.3 Transformation

Die Transformation von Bakterien wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. 50 µl kompetente Zellen (Top 10) wurden auf Eis aufgetaut.
2. 5 µl Ligationsansatz wurde hinzugefügt und vorsichtig gemischt.
3. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und dann 45 sek. auf 42°C erhitzt.
4. Erneut wurde 2 min auf Eis inkubiert, anschließend 900 µl LB Medium zugegeben und der Ansatz bei 37°C 60 min geschüttelt.
5. 50 bis 100 µl Aliquots wurden auf Agar/LB_{Amp}-Petrischalen ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.9.4 Plasmid-Mini-Präparation

Bei der Präparation wurden die Puffer **P1-P3** der Fa. Qiagen (Hilden) benutzt.

1. Von einer 3 ml über Nacht angewachsenen Bakterienkultur wurde 1,5 ml in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 45 sek. in einer Eppendorftischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert.
2. Der Überstand wurde verworfen und der Bakterienniederschlag in 300 µl TE mit 3 µl RNase A (10 µg/ml) (**P1**) resuspendiert.
3. 300 µl frisch angesetzte NaOH/SDS Lösung (**P2**) wurde zugegeben, gemischt und 5 min bei RT inkubiert.
4. 300 µl kaltes 3M Kaliumacetat (**P3**) wurde zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert.
5. In einer Eppendorftischzentrifuge wurde bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt.
6. 500 µl Isopropanol wurden zugegeben, gut gemischt, 5 min bei RT inkubiert und erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen.
7. Der Niederschlag wurde mit 750 µl 70%igen EtOH (-20°C) gewaschen, erneut wie beschrieben zentrifugiert und der Überstand vorsichtig verworfen.
8. Das Präzipitat wurde unter Vakuum getrocknet und in 50 µl H₂O resuspendiert.

3.9.5 Phenol/Chloroform-Extraktion von Plasmid DNA

Nach Zugabe von 1 Vol Phenol/Chloroform (1:1) zur wässrigen DNA Lösung wurde die Suspension gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch 5 min Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorftischzentrifuge. Die wässrige Phase wurde nach Zugabe von 1 Vol Chloroform erneut extrahiert und 5 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde dann für die EtOH-Präzipitation eingesetzt.

3.9.6 EtOH-Präzipitation

Nach Zugabe von 1 Vol NH₄-Acetat (5 M, pH 7,2) oder 0,1 Vol Na-Acetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Vol EtOH wurde die DNA-haltige Lösung nach der Phenol/Chloroform Extraktion mehrmals gründlich geschüttelt und 30 min bei 4°C in einer Eppendorftischzentrifuge zentrifugiert. Bei geringen DNA-Konzentrationen wurden die Proben für 1-2 Std. bei -80°C oder ÜN bei -20°C inkubiert. Vor Aufnahme des DNA-Präzipitats in TE oder H₂O wurde es getrocknet.

3.9.7 Endonukleolytische Spaltung von Plasmid DNA

Für die Reaktionsansätze wurden die Puffer benutzt, die vom Hersteller zu den Enzymen geliefert wurden und es wurde nach Angabe verfahren.

3.9.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung für nukleinsäurehaltige Lösungen

Die DNA Konzentration wurde durch OD Messung bei 260 und 280 nm (A_{260/280}) bestimmt. Die OD Werte entsprechen folgenden Konzentrationen:

A₂₆₀ = 1,0 OD = 50 µg ds DNA/ml
40 µg RNA/ml
20 µg Oligonukleotid/ml

Das Verhältnis von A₂₆₀ zu A₂₈₀ ist ein Maß für die Reinheit der präparierten Nukleinsäure. Der Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.9.9 RNA-Präparation

Eine RNA-Präparation wurde mit dem RNeasy Mini Kit (50) (Fa. Qiagen, Hilden) durchgeführt.

3.9.10 Reverse Transkription

Aus Gesamt-RNA verschiedener Gewebe wurde mittels einer Reversen Transkriptase (Superscript TM II, Fa. GIBCO/BRL) cDNA gewonnen.

Die Reaktion wurde in einem 20 µl Ansatz nach den unten aufgeführten Mengenangaben durchgeführt.

1 µl RNA (1 µg/µl)
4 µl 5x Puffer (250 mM Tris pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)
2 µl DTT (0,1 M)
4 µl dNTPs (2,5 mM)
1 µl Oligo (dT)₂₀-Primer (0,5 µg/µl)
0,3 µl RNasin (40 U/µl, Fa. Promega)
1 µl Superscript TM II (200 U/µl)
6,7 µl H₂O_{DEPC}

Total: 20µl

Temperaturprofil der cDNA Synthese: 5 min 20°C, 1 Std. 44°C, 5 min 99°C.

Die cDNA kann direkt für eine PCR-Amplifikation eingesetzt werden.

3.9.11 PCR-Amplifizierung

1 µl eines RT-PCR-Ansatzes wurde in einer PCR-Amplifizierung mit einem Primer gegen das 3'- bzw. 5'- Ende der zu amplifizierenden bekannten Ratten-cDNA-Sequenz eingesetzt:

1 µl	RT-PCR-Ansatz (cDNA ca.10-30 ng/µl)
x µl	MgCl ₂ (1,5 mM - 2,0 mM)
3 µl	10x PCR Puffer II (Fa. Perkin Elmer)
3 µl	dNTPs (2,5 mM)
1,5 µl	P (sense)-Primer (20 pmol/µl)
1,5 µl	M (antisense)-Primer (20 pmol/µl)
3 µl	DMSO
0,5 µl	Ampli Taq (5 U/µl, Fa. Perkin Elmer)/ Pfu (3 U/µl, Fa. Promega)
<u>y</u> µl	H ₂ O _{DEPC}

Total: 30µl Ansatz + Mineralöl (ca. 20 µl)

Nähere Bezeichnung der M- P- Primer für SDF-1 und CXCR-4 siehe unter 3.3. Temperaturprofil der PCR-Amplifizierung (modifiziert nach Bajetto et al., 1999): 1x (5 min 94°C); 30-40x (30 sek. 94°C, 30 sek. 60°C, 30 sek. 72°C); 1x (1 min 72°C).

Nach erfolgter PCR wurden 8 µl aus dem Ansatz auf einem 1,5%igem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.9.12 DNA-Sequenzierung

Sequenziert wurde mit dem DNA Sequencing Kit der Fa. Perkin Elmer. Die Aufreinigung der für die Sequenzierung benötigten PCR-Produkte erfolgte über Spin-Säulen nach Angaben des Herstellers (PCR-Purification Kit, Fa. Qiagen, Hilden). Nach der Sequenzreaktion wurde das gesamte Probenvolumen über Centrisep-Säulen (Centrisep Spin Columns; Fa. Perkin Elmer) aufgereinigt und im ABI 310 Genetic Analyzer Sequenzer (Fa. Perkin Elmer) mittels Kapillarelektrophorese vollautomatisch aufgetrennt. Die vom erhaltenden Elektropherogramm abgeleiteten Nukleinsäuresequenzen wurden mit Hilfe der Software DNAsis (Fa. Hitachi, Japan) an einem handelsüblichen PC ausgewertet.

3.9.13 Herstellung Digoxigenin-markierter Transkripte

Die zu untersuchenden SDF-1 α β γ und CXCR-4 cDNAs, mittels PCR generiert, mußten in einen RNA-Expressionsvektor (z.B. pBluescript II KS+/-) kloniert werden.

Um Transkripte in sense- und antisense-Orientierung zu erhalten wurden die Plasmide mit der SDF-1 cDNA (α : nt 998-1731; β : nt 1-572; γ : nt 661-1313) und CXCR-4 cDNA (nt 159-946) mit geeigneten Restriktionsenzymen linearisiert (Die Verwendung von jeweils zwei nebeneinanderliegenden Restriktionsenzymen erhöhte die Wahrscheinlichkeit einer vollständigen Linearisierung. Restriktionsenzyme die 5'-überhängende Enden erzeugen sind ungeeignet, da diese Enden von RNA-Polymerasen auch als Startpunkte der RNA-Synthese benutzt werden können. Hierzu gehören z.B.: Bgl I, BstX I, Kpn I, Pst I, Pvu I, Sac I, Sac II, Sfi I, Sphi I).

Die *in vitro* Transkription wurde mit der T3 bzw. T7 RNA Polymerase unter Verwendung des DIG RNA Labeling Kits (SP6/T7) (Fa. Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt (hierbei wurde Digoxigenin-konjugiertes UTP in die Transkripte eingebaut).

2 µl	10x Transkriptionspuffer
1 µl	RNase Inhibitor (40U/µl)
2 µl	10x Dig RNA Labeling Mix
2 µl	linearisiertes Plasmid (0,5 µg/µl)
11 µl	H ₂ O _{DEPC}
<u>2 µl</u>	T3 bzw. T7 RNA-Polymerase (20 U/µl)

Total: 20µl

Es wurde 2 Std. bei 37°C inkubiert. Die Plasmid DNA wurde mit 2 µl Dnase I (10 U/µl) 15 min bei 37°C abgebaut. Mit 2 µl 0,2 M EDTA pH 8,0 wurde die Reaktion abgestoppt. Nichtinkorporierte Nukleotide wurden durch Gelchromatographie abgetrennt (MicroSpin S-200 HR Columns, Fa. Pharmacia). Die Aliquots wurden UV-spektrometrisch vermessen, mit Hybridisierungsmix auf 20 ng/µl verdünnt und bei -20°C gelagert. Die Digoxigenin markierten SDF- und CXCR-4-Transkripte konnten mit einem Anti-Digoxigenin-Antikörper (Fa. Roche) in der In situ Hybridisierung nachgewiesen werden (siehe 3.10.4).

3.10 Histochemische Methoden:

3.10.1 Gewebepreparation

Das für Kryostatschnitte verwendete Gewebe wurde in Tissue-Tec (Fa. Miles, Naperville, USA) eingebettet und in Methylbutan bei -50°C vorsichtig eingefroren.

Für die Paraffineinbettung von Gehirn und Rückenmark wurden die Tiere zunächst mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 und dann mit einer Formalin-Pikrinsäure-Lösung (5% (v/v) Essigsäure, 4% (w/v) Paraformaldehyd, 0,85% (w/v) Pikrinsäure) transkardial perfundiert und die Organe nach Entnahme für 4 Std. in der gleichen Lösung nachfixiert. Ischiasnerven wurden direkt in der Formalin-Pikrinsäure-Lösung für 4 Std. immersionsfixiert. Anschließend wurden die Gewebe in 70% Ethanol, 0,025% Ammoniaklösung mehrere Tage entfärbt und in 100% Ethanol bei +5°C bis zur Paraffineinbettung gelagert.

3.10.2 Paraffineinbettung

Die in Ethanol gelagerten Gewebe wurden in 5 mm große Stücke zerkleinert und in 80% Ethanol für 30 min, in 90% Ethanol für 30 min und in 98% Ethanol für 3x 30 min. entwässert. Nach Inkubation in Methylbenzoat für 2 Std. und in Benzol für 15 min wurden die Gewebe für 30 min. in ein Benzol/Paraffin-Gemisch (1:10 v/v) bei 60°C überführt. Es folgten Inkubationen in Paraffin (Paraplast plus, Fa. Monoject, St. Louis, USA) bei 60°C für 30 min, 60 min sowie über Nacht bei anschließender Einbettung der Gewebestücke in Silikon-Gußformen (Fa. Reichert-Jung, USA).

3.10.3 Anfertigung von Mikrotomschnitten

Objektträger wurden im Ultraschallbad gereinigt, gespült und in einem Methanol/Azeton-Gemisch (3:1, v/v) für 2 Std. eingelegt. Dann wurde mit Azeton gespült, 15-20 sek. mit TESPA-Lösung (2% 3-Aminopropyl-triethoxysilan in Aceton; Fa. Aldrich, Steinheim) beschichtet, wieder in Azeton gespült und an der Luft getrocknet.

Aus den Paraffinblöcken wurden auf einem Rotationsmikrotom (Autocut, Fa. Reichert-Jung, USA) mit Glasmessern 5-6 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt, auf TESPA beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 45°C getrocknet.

3.10.4 In situ Hybridisierung

Da das ISH Protokoll sehr ausführlich ist und sich über drei Tage erstreckt, wird es nur stichpunktartig aufgeführt.

1.Tag:

1. Entparaffinieren:

- Paraffinschnitte mit Xylol für 10 min entparaffinieren und über eine absteigende Ethanolreihe (100-90-70%) rehydrieren.
- Gewebe 2x in H₂O_{DEPC} spülen.

2. Proteinase-K Behandlung:

- Präparate in TE bei 37°C 1x spülen.
- Schnitte 30 min bei 37°C mit Proteinase K (1µg/ml) in TE inkubieren.
- Reaktion 3 min mit 4%igem Paraformaldehyd/PBS bei RT abstoppen.
- Gewebe 2x in H₂O_{DEPC} spülen.

3. Acetylierung:

- Präparate 1x in TEA spülen.
- 0,25% Essigsäureanhydrid in TEA frisch ansetzen und Präparate bei RT 10 min inkubieren.
- Gewebe 2x in H₂O_{DEPC} spülen.

4. Trocknen:

- Präparate in aufsteigender Ethanolreihe (70-90-100%) entwässern und trocknen.

5. Prähybridisierung:

- Präparate in Hybridisierungsmix (pro OT ca. 150 µl und mit Parafilmstreifen blasenfrei abdecken) bei 55°C für 3 Std. in feuchter Kammer inkubieren.
- Gewebe 1x in 2x SSC_{DEPC} spülen.
- Gewebe 2x in H₂O_{DEPC} spülen.

6. Trocknen:

- Präparate in aufsteigender Ethanolreihe (70-90-100%) entwässern und trocknen.

7. Hybridisierung:

- RNA-Probe (2 ng/ μ l in Hybridisierungsmix verdünnt; siehe 3.9.13) auf OT auftragen.
- Schnitte eindeckeln mit Deckgläschen und mit Best Test Papierleim (USA) verkleben.
- Über Nacht bei 55°C in feuchter Kammer inkubieren.

2.Tag:

1. Nachbehandlung:

- Präparate bei RT in 2x SSC einweichen und Deckgläschen vorsichtig vom OT entfernen.

2. RNase A-Verdau:

- Präparate mit RNase-Puffer (37°C) 1x vorspülen.
- 20 min bei 37°C mit RNase A (20 μ g/ ml in RNase-Puffer) inkubieren.

3. Waschen:

- Präparate 3x 20 min in 2x SSC bei 50°C waschen.
- Präparate 3x 20 min in 0,1x SSC bei 50°C waschen.
- OT 1x in TBS spülen.

4. Blocken:

- Präparate 30 min mit Blockier Lösung bei RT in feuchter Kammer inkubieren (pro OT ca. 150 μ l und mit Parafilmstreifen blasenfrei abdecken).

5. Digoxigenin-Detektion:

- Präparate mit Anti-Digoxigenin/Alkalischem Phosphatase-Konjugat (Fa. Roche; 1:500 in 1% Normal Goat Serum/ 0,15% Triton X-100/TBS) über Nacht bei 4°C inkubieren (pro OT ca.150 μ l und mit Parafilmstreifen blasenfrei abdecken).

3.Tag:

1. Nachbehandlung:

- Präparate 1x in TBS spülen.
- Präparate 1x in Substrat-Puffer vorspülen.

2. Entwicklung:

- Detektion im Dunkeln für 1-6 Std. oder über Nacht in 0,33 mg/ml NBT (Nitroblue-Tetrazolium)/ 0,175 mg/ml BCIP (Bromchlorindolylphosphat) in Substrat-Puffer.
- Unter dem Mikroskop Signalstärke kontrollieren. Durch mehrfaches spülen in H₂O Reaktion abstoppen.
- Präparate mit Aquatex (Fa. Merck) eindeckeln.

Die Hybridisierungen wurden mit antisense orientierten RNA-Transkripten durchgeführt. Zu jeder antisense Hybridisierung wurde das sense RNA-

Transkript des jeweiligen Klons auf dem gleichen Objektträger an benachbarten Gewebeschnitten als Negativ-Kontrolle verwendet.

3.10.5 Immunhistochemie

Das folgende Protokoll diente zur immunhistochemischen Färbung von Paraffin- und Kryostat- Gewebeschnitten.

1. Nur für Paraffinschnitte:
Mit Xylol 10 min entparaffinieren und über eine absteigende Ethanolreihe (100-90-70%) rehydrieren.
Für Kryostatschnitte:
Präparate 5 min mit 4%igem Paraformaldehyd/PBS fixieren.
2. Ab 2. identisches Vorgehen für Paraffin- und Kryostatschnitte:
Gewebe 1x in PBS spülen.
3. Schnitte 30 min bei RT mit 3%igem Serum/PBS (je nach 2. biotinyliertem Ak, z.B. Ziegenserum, Pferdeserum) blocken.
4. Präparate mit 1. Ak in PBS verdünnt 2 Std. bei RT inkubieren.
5. Gewebe 1x in PBS spülen
6. Präparate mit 2. biotinyliertem Ak in PBS verdünnt (1:200 bzw. 1:50) 30 min bei RT inkubieren. Gleichzeitig ABC-Elite-Komplex (Fa. Vector Laboratories, USA) ansetzen.
7. Gewebe 1x in PBS spülen.
8. Präparate mit ABC-Elite-Komplex 30 min bei RT inkubieren.
9. Gewebe 1x in PBS spülen.
10. Präparate mit DAB-Lösung (0,7 mg/ml in PBS), unmittelbar vorher mit 0,3 µl/ml 35%igem H₂O₂ versetzen und 10 min bei RT entwickeln.
11. Durch mehrfaches Spülen in H₂O Reaktion abstoppen.
12. Präparate mit Aquatex (Fa. Merck) eindecken.

3.10.6 Immunzytochemie

Zur immunzytochemischen Färbung wurden Neuronen- und Schwannzellkulturen wie unter 3.6 beschrieben angelegt. Die Zellen wurden in mit 10 mm Deckgläschen bestückten 48-well-Titerplatten in 10% FCS/DMEM ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Es erfolgte alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel bis zur Konfluenz (ca. 4- 5 Tage).

1. Zellen 1x in PBS spülen.
2. Zellen 10 min mit 4%igem Paraformaldehyd/PBS fixieren.
3. Zellen 3x in PBS spülen.
4. Deckgläschen 2 Std. bei RT mit 3%igem Serum/ PBS (je nach 2. biotinyliertem Ak, z.B. Ziegenserum, Pferdeserum) blocken.
5. Zellen mit 1. Ak, in PBS verdünnt, 24Std. bei 4°C inkubieren.
6. Zellen 3x in PBS spülen.
7. Präparate mit 2. biotinyliertem Ak, in PBS verdünnt (1:200 bzw. 1:50), 1 Std. bei RT inkubieren.
8. Zellen 3x in PBS spülen.
9. 1h bei RT Detektion mit FITC- Avidin.
10. Zellen 3x in PBS spülen.
11. Zellen 2 min mit Dapi (20µ/ml PBS, Fa. Roche) färben.

12. Zellen 3x in PBS spülen.
13. Zellen 1x in PBS spülen.
14. Durch mehrfaches Spülen in H₂O Reaktion abstoppen.
13. Präparate mit Mounting Medium (Fa. Vector Laboratories, USA) eindeckeln.

4. ERGEBNISSE

4.1 RT-PCR-Analyse der gewebespezifischen Expression von SDF-1 und CXCR-4:

Um zu ermitteln ob SDF-1, speziell die neue SDF-1 γ Isoform (Gleichmann et al., 2000) und CXCR-4 in den gleichen Geweben exprimiert werden, wurde RNA aus Ischiasnerv, Gehirn zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten und andere relevante Gewebe, in denen eine SDF-1 Expression beschrieben wurde (Zou et al., 1998; Horuk, 1998; McGrath et al., 1999) revers transkribiert und mittels PCR amplifiziert. Spezifische Primer wurden zuvor generiert um möglichst nur eine SDF-1 Isoform zu amplifizieren (Abb.1).

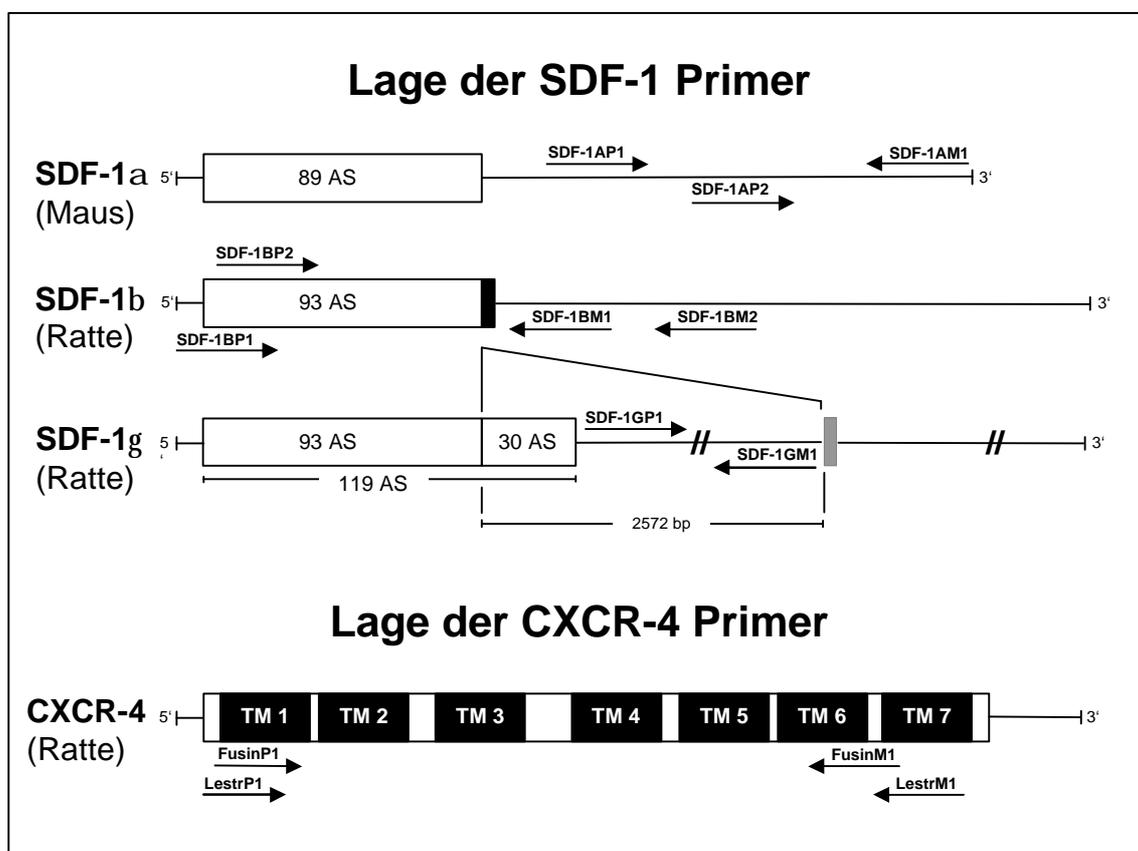


Abb. 1: Schematische Darstellung der Bindungsstellen der verschiedenen SDF-1 und CXCR-4 Primer, die in PCR-Amplifizierungen eingesetzt wurden. Alle dargestellten Primer wurden so ausgewählt, daß sie möglichst spezifisch eine SDF-1 Isoform erkennen. Für SDF-1 α liegt nur eine Maussequenz vor, daher wurden mausspezifische Primer konstruiert und im Rattengewebe getestet.

Um mögliche PCR-Artefakte auszuschließen wurde als Negativkontrolle jeweils eine PCR mit einem Primerpaar, aber ohne cDNA amplifiziert. Zur eindeutigen Identifizierung jeder erhaltenen PCR-Bande wurde anschließend sequenziert. Die erhaltenen Ergebnisse (Abb.2) zeigen in Schwannzellen und im Ischiasnerv der Ratte eine gleichzeitige Expression aller SDF-1 Isoformen und des CXCR-4 Rezeptors. Auch zu verschiedenen Zeitpunkten im sich entwickelnden,

transsektierten und gequetschten Nerven kommt es mit den entsprechend eingesetzten Primerpaaren zur Amplifizierung aller untersuchten cDNAs. Im humanen afferenten N. suralis kommt es zu keiner Amplifizierung, weder bei SDF-1 noch bei dem CXCR-4 Rezeptor.

cDNA aus:	SDF-1a	SDF-1b	SDF-1g	CXCR-4	PAM
PNS:					
ra Schwanzzellen	+	+	+	+	+
ra Ischiasserv	+	+	+	+	+
ra Nerv (IN) entw.	+	+	+	+	+
ra Nerv (IN) trans.	+	+	+	+	+
ra Nerv (IN) quet.	+	+	+	+	+
hu Nerv (N. suralis)	-	-	-	-	-
ZNS:					
ra Hirn E17	+	+	+	+	?
ra Hirn adult	+	+	+	+	+
andere:					
ra Herz	-	+	+	+	+
ra Milz	+	+	+	+	?
ra Blut	+	-	+	+	?
ma Blut	+	-	+	+	?
hu Blut	+	-	-	+	?
hu Blut genom.	+	-	-	+	?

Abb. 2: PCR Analyse der SDF-1 und CXCR-4 Gewebeverteilung. Die PCR-Amplifizierung wurde mit rattenspezifischen SDF-1 α (Fragmentlängen: 351 bp; 733 bp), SDF-1 β (Fragmentlängen: 450 bp; 571 bp; 636 bp; 757 bp), SDF-1 γ (Fragmentlänge: 652 bp) und CXCR-4 (Fragmentlängen: 787 bp; 894 bp) Primern durchgeführt. entw., Entwicklung; genom., genomisch; hu, human; ma, Maus; PAM, Peptidyl-Glycin- α -amidierende-Monooxygenase, quet., Quetschung; ra, Ratte; trans., Transsektion; (?), hierzu liegen für das betroffene Gewebe keine Literaturdaten vor.

Die zwei Zeitpunkte in der Rattenhirnentwicklung (E17/adult) zeigen die Expression aller SDF-1 Isoformen und des Rezeptors. Im Rattenherz ist die SDF-1 α Isoform nicht nachzuweisen. Im Blut der Ratte, der Maus und des Menschen fehlt die SDF-1 β Form. Im Blut des Menschen fehlt zusätzlich die SDF-1 γ Isoform. In der Milz der Ratte findet man alle SDF-1 Isoformen und den CXCR-4 Rezeptor. Zusätzlich ist die Verteilung des PAM Enzyms in den einzelnen Geweben aufgeführt (Schafer et al., 1992; Rhodes et al., 1990; Rhodes et al., 1991;). Mit einem Fragezeichen sind die Gewebe gekennzeichnet, die auf das Vorhandensein des Enzyms noch nicht untersucht wurden.

Um festzustellen in welchen Arealen bzw. Zelltypen im Nervensystem SDF-1 und der CXCR-4 Rezeptor exprimiert werden, wurden In situ Hybridisierungen durchgeführt.

4.2 In situ Hybridisierung zur zellulären Lokalisation der mRNA von SDF-1 und CXCR-4 im PNS:

4.2.1 Zelluläre Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 im Ischiasnerv der Ratte

Der periphere Nerv (hier am Beispiel des Ischiasnerven dargestellt) bietet eine Reihe verschiedener Zelltypen (z.B. Nervenfasern, Schwannzellen, Fibroblasten, Endothelzellen) in denen eine SDF-1 γ bzw. eine CXCR-4 mRNA Expression möglich wäre. Die zelluläre Lokalisation wurde an 6 μ m dicken Querschnitten eines Ratten-Ischiasnerven mit verschiedenen SDF-1 und CXCR-4 Transkripten (Abb.3) untersucht.

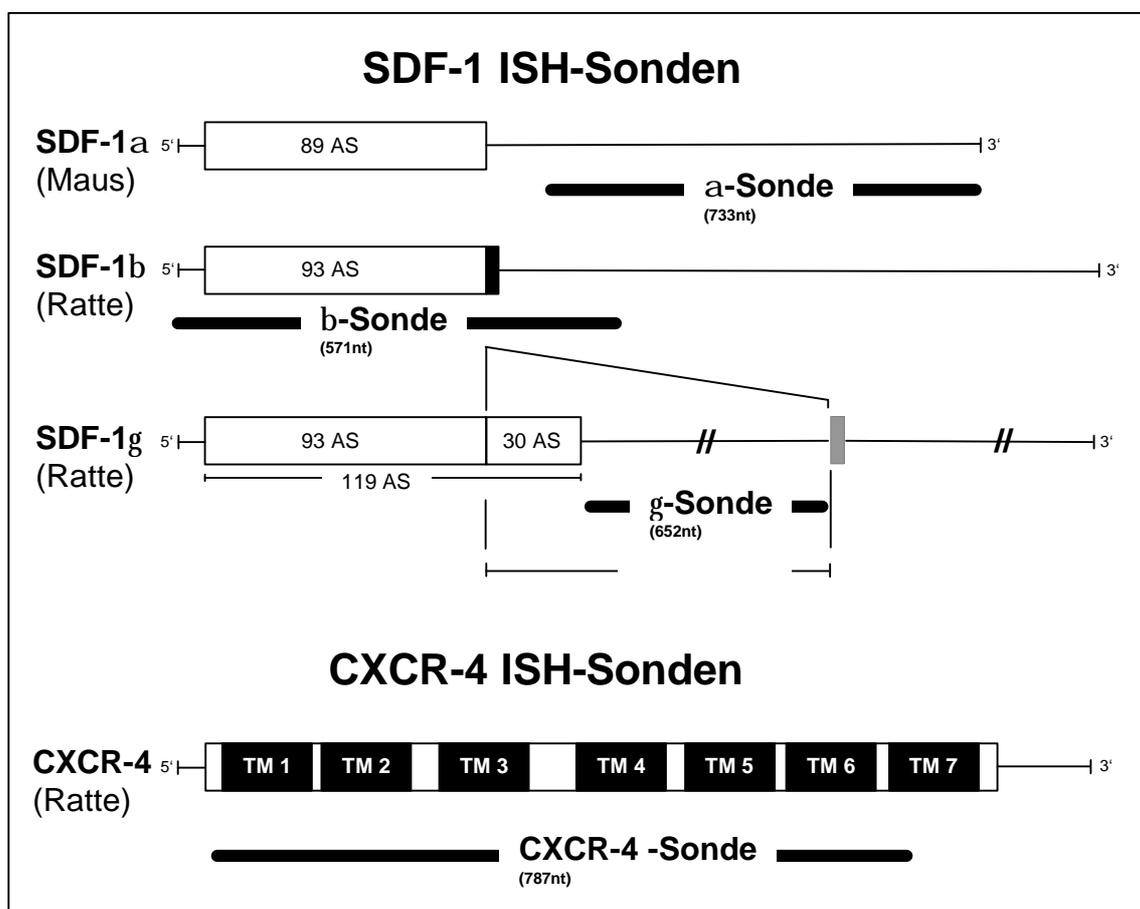


Abb.3: Schematische Darstellung der ISH Sonden. Synthese der spezifischen α -Sonde durch PCR-Amplifizierung mit dem Primerpaar SDF-1AP1/SDF-1AM1 unter Verwendung von Ischiasnerv cDNA der Ratte. SDF-1 Sonde (da komplementär zum kodierenden Bereich aller SDF-1 Proteine): Ratten-Ischiasnerv cDNA, SDF-1BP1/SDF-1BM1-Primerpaar. Spezifische γ -Sonde: Ratten Ischiasnerv cDNA, SDF-1GP1/SDF-1GM1-Primerpaar. Spezifische CXCR-4 Sonde: adulte Rattenhirn cDNA, FusinP1/FusinM1-Primerpaar. Um den Einbau durch falsche Basen zu minimieren, wurde die PCR-Amplifizierung mit Pfu-Polymerase (*prove reading activity*) anstelle von Taq-Polymerase durchgeführt.

Die Abbildung 4 zeigt eine ISH mit einer sichelförmige Anfärbung von Zellen, sowohl mit der SDF-1 β/γ Sonde, als auch mit der CXCR-4 Sonde. Diese sichelförmige Anfärbung entspricht dem Zytoplasma der Schwannzelle, das sich sichelförmig den Myelinringen im Nervenquerschnitt anlagert (vgl. 4.2.2). Es kann somit von einer Zelltyp identischen Expression des SDF-1 β/γ Gens und des CXCR-4 Gens im peripheren Nerven ausgegangen werden. Zusätzlich findet sich eine Expression der SDF-1 γ und CXCR-4 Transkripte in Gefäßendothelien.

Ob SDF-1 β im Ischiasnerv vorkommt, läßt sich mit der SDF-1 Sonde nicht aussagen. Die α - und γ -Sonden sind spezifisch für die entsprechende SDF-1 Isoform. Die β -Sonde erkennt zusätzlich zu dem β -Bereich (nur 12 spezifische SDF-1 β Basenpaare sind in der Sequenz vorhanden) auch den für alle 3 Isoformen identischen kodierenden Bereich (89 AS) und ist daher nicht SDF-1 β spezifisch, sondern könnte auch als Allgemeine-, bzw. Familien-SDF-1 Sonde bezeichnet werden (vgl. Abb.3).

Ein SDF-1 α Transkript ist im peripheren Nerv nicht nachweisbar. SDF-1 α zeigt kein signifikantes Hybridisierungssignal (nicht gezeigt) und entspricht damit dem Ergebnis der Untersuchungen mit allen übrigen sense Proben. Die Spezifität aller In situ antisense Signale wurde durch Hybridisierung mit der jeweiligen sense Probe überprüft.

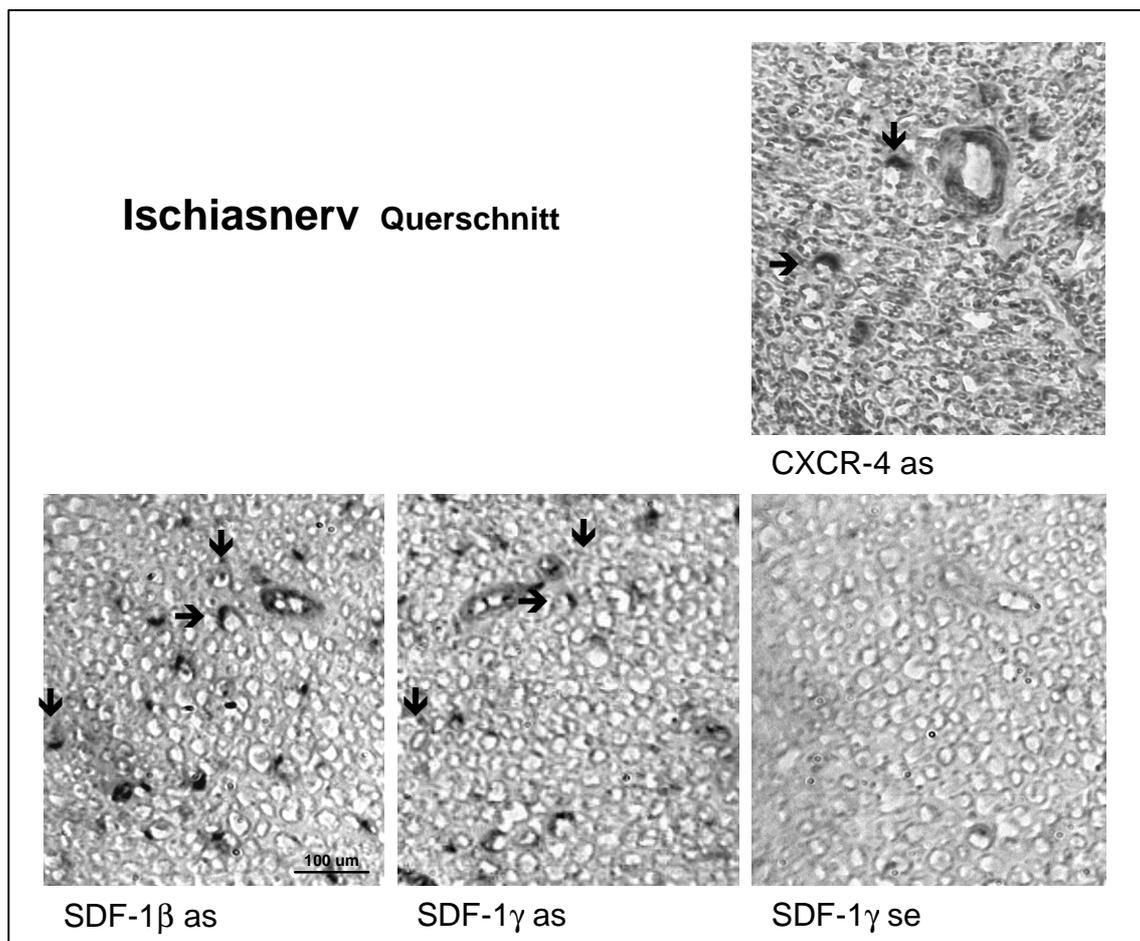


Abb.4: Zelluläre Lokalisation von SDF-1 β/γ und des CXCR-4 Transkripts in Paraffin-Querschnitten des Ischiasnerven der adulten Ratte. Bei der In situ Hybridisierung mit Digoxigenin-UTP-markierten antisense SDF-1 β/γ und CXCR-4 RNA-Proben erkennt man ein deutliches Hybridisierungssignal des Schwanzzellzytoplasmas und eine Markierung der Gefäßendothelien. SDF-1 γ se als Negativkontrolle ohne signifikantes Hybridisierungssignal. SDF-1 β se und CXCR-4 se entsprechen der SDF-1 γ se Probe. Skalierungsbalken 100 μ m.

4.2.2 Lokalisierung von SDF-1 in S-100 immunpositiven Schwanzzellen im Ischiasnerv der Ratte

Das SDF-1 und das CXCR-4 Gen werden im selben Zelltyp exprimiert, aber handelt es sich bei der sichelförmigen Anfärbung auch um Schwanzzellzytoplasma? Zum Nachweis wurden direkt benachbarte Gewebeschnitte des Ratten-Ischiasnervs angefertigt und mit einem Ak gegen das S-100 Protein inkubiert, das im peripheren Nerv spezifisch das Zytoplasma der Schwanzzellen färbt. Zusätzlich wurden direkt benachbarte Gewebeschnitte mit den entsprechenden SDF-1 β/γ Sonden hybridisiert (vgl. Abb.3).

Die Größe einer Schwanzzelle ermöglicht die Verfolgung einer Zelle über mehrere Schnitte hinweg. In Abbildung 5 markieren Kreise Hybridisierungssignale identischer Zellen, die sich über alle vier Schnitte verfolgen lassen. Quadrate markieren entsprechende Zellen in Schnitt #1 und #2. Dreiecke zeigen gleiche Zellen in Schnitt #3 und #4 an.

Die SDF-1 β/γ Hybridisierungssonden markieren die selben Zellbereiche wie der Ak gegen das schwanzzellspezifische S-100 Protein. Da S-100 ein Schwanzzell-Markerprotein ist, kann somit von einer schwanzzellspezifischen Expression des SDF-1 γ Gens im peripheren Nerven ausgegangen werden. Ob SDF-1 β im Ischiasnerv vorkommt läßt sich durch Hybridisierung mit der SDF-1 Sonde nicht aussagen (vgl. Abb.3).

Eine Kolokalisierung mit CXCR-4 war bisher nicht möglich, aber aufgrund der erhaltenen Ergebnisse unter 4.2.1 ist auch hier von einer spezifischen Schwanzzellexpression auszugehen. Ob allerdings CXCR-4 in der selben Zelle exprimiert wird wie SDF-1 γ bleibt noch zu zeigen.

Kolokalisierung: SDF-1 γ / -1 β / S-100

Serienschnitte Ischiasnerv

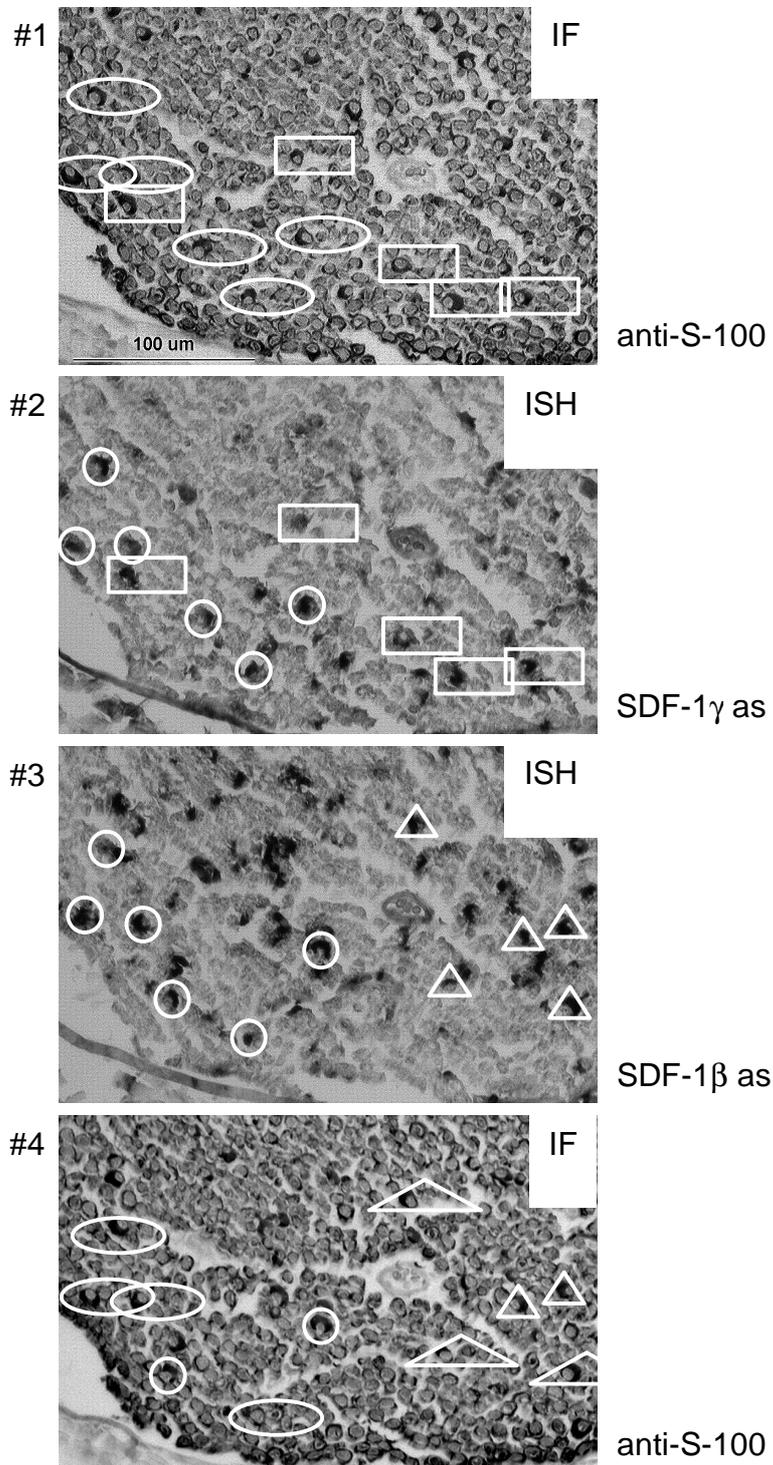


Abb.5: Zelluläre Kolokalisierung vom S100-Protein und SDF-1 β / γ mRNA in Paraffin-Serienquerschnitten (#1-#4) eines Ischiasnerven der adulten Ratte. (#1 und #4) Immunhistochemische Identifizierung des Schwannzellzytoplasmas unter Verwendung eines Antikörpers gegen das S-100 Protein. (#2 und #3) In situ Hybridisierung mit Digoxigenin-UTP-

markierten antisense SDF-1 β/γ RNA Proben an zu #1 und #4 direkt benachbarten Gewebeschnitten. Die SDF-1 β/γ Hybridisierungssignale sind auf das Zytoplasma von S-100 positiven Schwannzellen beschränkt. Kreise: Zellen durchgehend in Schnitt #1-#4 angeschnitten. Quadrate: Zellen nur in Schnitt #1-#2 angeschnitten. Dreiecke: Zellen nur in Schnitt #3-#4 angeschnitten. Die Hybridisierung mit einer Digoxigenin-UTP-markierten sense SDF-1 β/γ Probe als Negativkontrolle ergab kein signifikantes Hybridisierungssignal. IF, Immunfärbung; ISH, In situ Hybridisierung; Skalierungsbalken 100 μm .

4.3 In situ Hybridisierung zur zellulären Lokalisation der mRNA von SDF-1 und CXCR-4 im ZNS:

Untersucht wurde die CXCR-4 (Federspiel et al., 1993) und SDF-1 (Tashiro et al., 1993) mRNA Verteilung während der Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) der Ratte. Um zu ermitteln, ob und in welchen Arealen des ZNS CXCR-4 und SDF-1 exprimiert werden, wurden aus verschiedenen Bereichen und zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten Gewebeschnitte der Ratte untersucht. Analysiert wurde das Großhirn (graue und weiße Substanz), das Kleinhirn und das Rückenmark.

Die mRNA Expression von CXCR-4 und SDF-1 wurde in verschiedenen 10 μm Schnitten sowohl embryonaler als auch verschiedener postnataler Stadien und im adulten Rattenhirnschnitt untersucht.

Für die ISH wurden Digoxigenin-UTP-markierte antisense Transkripte, wie in Abb.3 beschrieben, konstruiert. Im gesamten ZNS konnte mit der spezifischen α -Sonde keine SDF-1 α mRNA detektiert werden. Die korrespondierenden sense Transkripte dienten als Negativkontrolle.

4.3.1 Zelluläre Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 in der grauen Substanz des Cerebrums

l) Zelluläre Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 im Cortex und im Hippocampus während der Entwicklung

SDF-1 und CXCR-4 mRNAs werden konstitutiv in verschiedenen Geweben (siehe 4.1), einschließlich des Gehirns (Bajetto et al., 1999a), exprimiert. Im Gehirn der Ratte bleibt aber noch zu zeigen in welchem Areal bzw. Zelltyp die mRNA des neuen SDF-1 Chemokins und des CXCR-4 Rezeptors exprimiert wird.

Die CXCR-4 und SDF-1 mRNA Expression wurde daher mit Hilfe der ISH Methode im Bereich des sich entwickelnden Cortex und Hippocampus untersucht. Abb.6 zeigt die CXCR-4 und SDF-1 mRNA Expression während verschiedener Entwicklungsstadien des Rattengehirns. Am embryonalen Tag 17 (E17), ein früher Zeitpunkt der corticalen Entwicklung, findet man mit allen antisense Proben ein starkes Hybridisierungssignal in der corticalen Platte (cp), in der sekundären Rindenzone (*cortical subplate*, sp) und im Neuroepithel (ne).

Ein reduziertes Signal findet sich in der Marginalschicht (ms) und in der Intermediärschicht (im). Zusätzlich finden sich starke Signale in den Zellen der periventriculären Teilungszone. In der weiteren Entwicklung, am postnatalen Tag 4 (P4), findet man deutliche Hybridisierungssignale in dem sich weiter ausdifferenzierenden Neocortex. Alle neocorticalen Schichten (I-IV) zeigen mit den verschiedenen antisense Proben ein vergleichbares Signal. Besonders Schicht II und IV sind deutlich zu erkennen.

Zum Entwicklungszeitpunkt E17 werden die Vorläuferzellen der Pyramidalneurone im Hippocampus durch alle antisense Proben genauso markiert wie die Hippocampusneurone am postnatalen Tag 4.

Vom Entwicklungszeitpunkt E17 bis P4 findet sich ein identisches Expressionsmuster der mRNA von SDF-1 und CXCR-4. Das Verteilungsmuster und die Charakteristik des Hybridisierungssignals aller antisense Proben ändert sich nicht während der weiteren Entwicklung. Abb.7 zeigt den Neocortex und den Hippocampus der Ratte zum Entwicklungszeitpunkt P14. Neurone in allen corticalen Schichten (I-VI) zeigen ein deutliches Signal. Im Hippocampus markieren alle antisense Proben selektiv Pyramidalneurone und granuläre Neurone. In Abb.8 sind ausdifferenzierte neocorticale Bereiche, sowohl frontolateral (SDF-1 β as) als auch mediolateral (SDF-1 γ as/ CXCR-4 as) zum Zeitpunkt P21 hybridisiert worden. Vergleichbare Signale finden sich hier in allen corticalen Schichten (I-VI). Im weiteren Verlauf der Hippocampusentwicklung (Abb.9) zeigt sich keine Veränderung der Expressionsmuster von SDF-1 und CXCR-4. Pyramidalneurone als auch granuläre Neurone werden sowohl am Tag P21, als auch im adulten Rattengroßhirn mit allen antisense Proben erkannt.

Die Untersuchung von embryonalen (E17) und postnatalen (P4 bis Adult) Bereichen des Großhirns zeigt, daß während der gesamten Cortex und Hippocampus Entwicklung eine ubiquitäre, überwiegend neuronale Expression von SDF-1 und CXCR-4 vorliegt.

Das stärkste Signal erzeugt immer die SDF-1 β antisense Sonde, die alle Isoformen von SDF-1 detektieren kann (siehe 4.3), so daß sich dadurch keine spezifische Aussage zur Expression von SDF-1 β machen läßt.

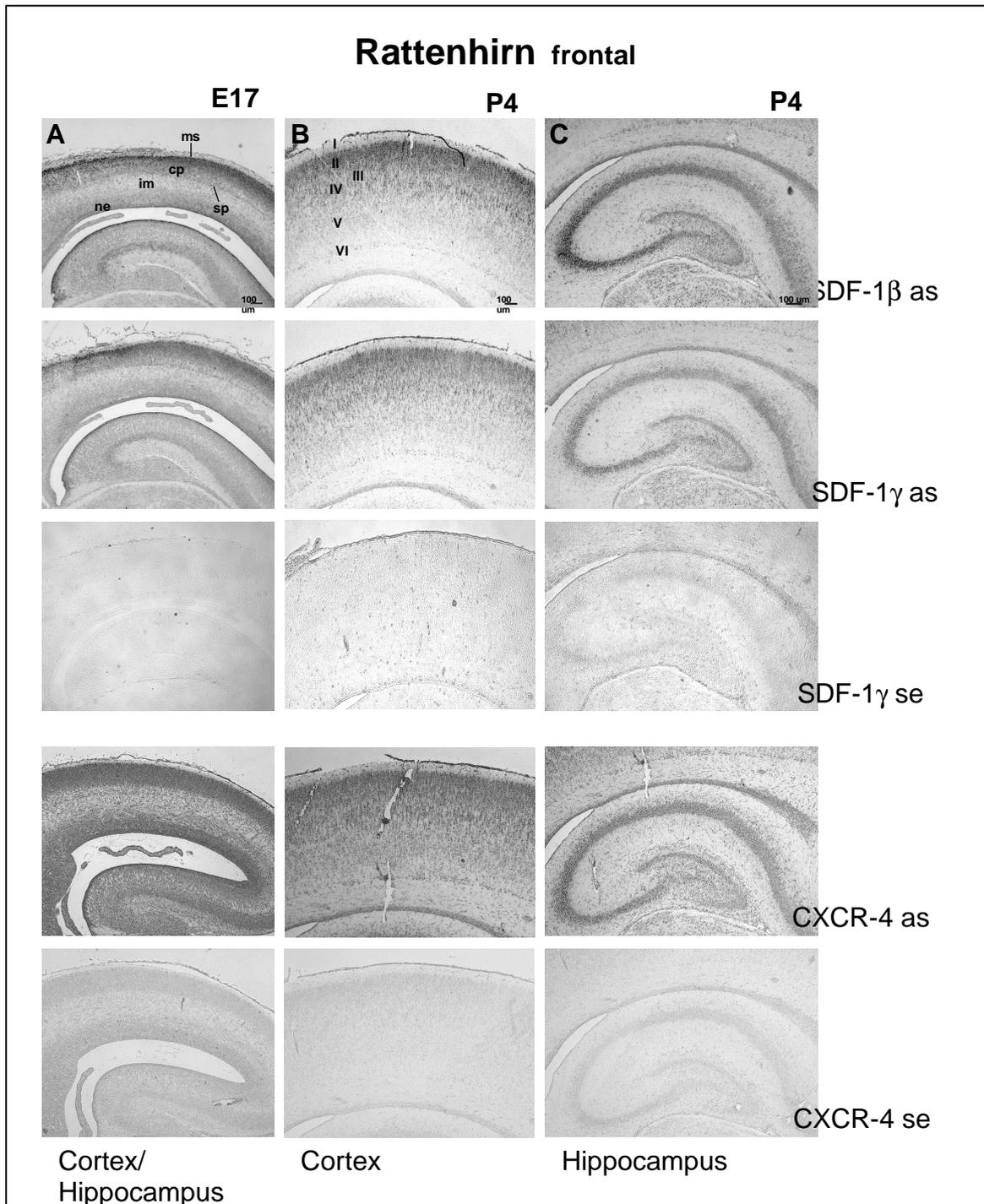


Abb.6: Zelluläre Lokalisation von SDF-1 β/γ und CXCR-4 mRNA im Embryo an Tag 17 und am postnatalen Tag 4 in frontalen Paraffinschnitten. (A-C) In situ Hybridisierung mit Digoxigenin-UTP-markierten antisense SDF-1 β/γ und CXCR-4 RNA Proben. (A-B) Zum Zeitpunkt E17 erkennt man ein Signal in der corticalen Platte (cp) und der sekundären Rindenzone (*cortical subplate* (sp)). P4 zeigt ein deutliches Signal aller corticalen Schichten (I-VI). Alle antisense Proben zeigen bei E17 ein Hybridisierungssignal in den Vorläufern der Pyramidenzellen des Hippocampus. (C) Deutliche Markierung durch antisense SDF-1 β/γ und CXCR-4 Proben in den Pyramidenzellen des Hippocampus. SDF-1 γ se und CXCR-4 se sind Negativkontrollen ohne signifikantes Hybridisierungssignal. Skalierungsbalken 100 μm . cp, corticale Platte; im, Intermediärschicht; ms, Marginalschicht; ne, Neuroepithel; sp, *cortical subplate*.

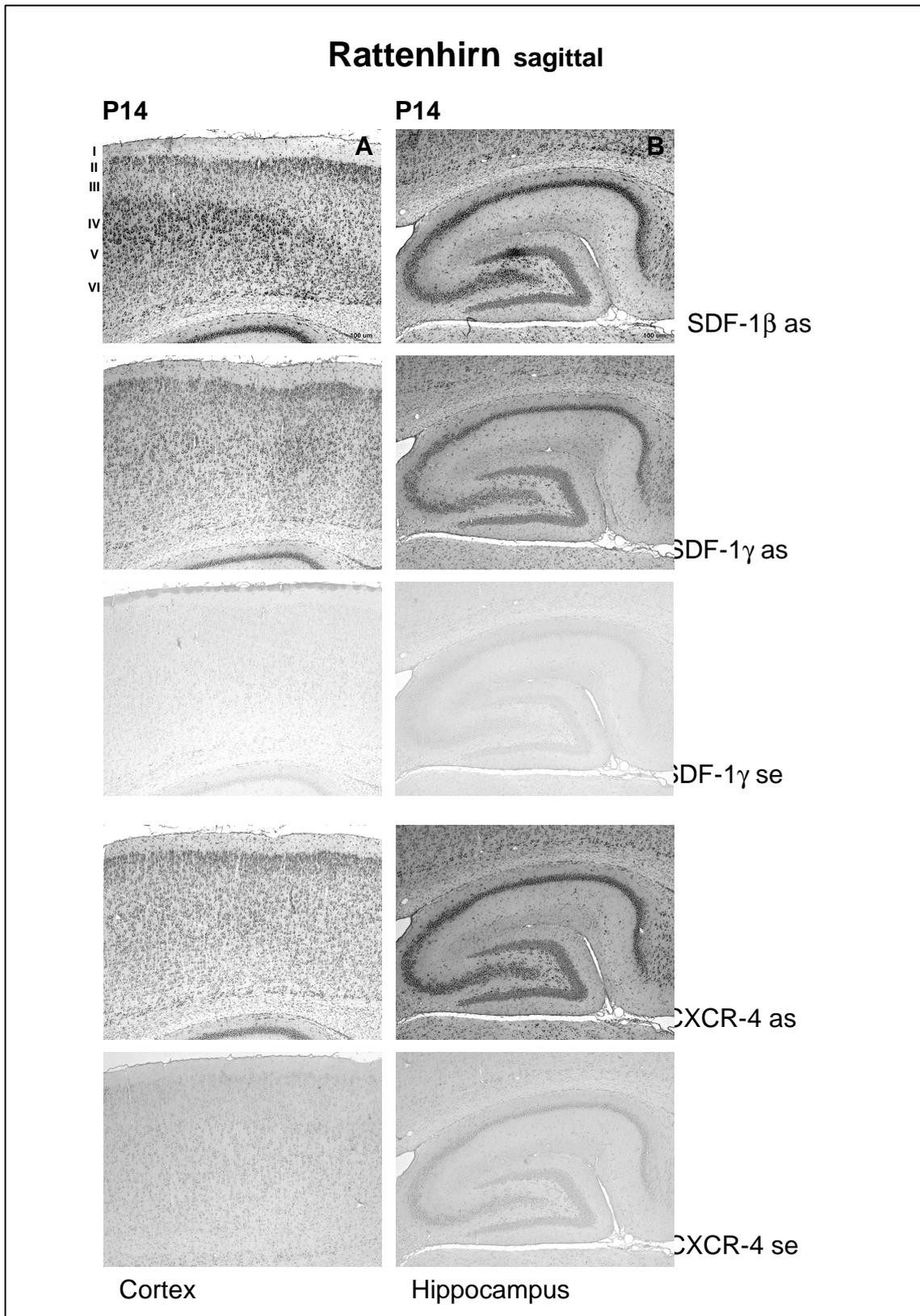


Abb.7: Zelluläre Lokalisation von SDF-1 β/γ und CXCR-4 mRNA am postnatalen Tag 14 in sagittalen Paraffinschnitten. (A-B) In situ Hybridisierung mit Digoxigenin-UTP-markierten antisense SDF-1 β/γ und CXCR-4 RNA Proben. (A) Die SDF-1 β/γ und CXCR-4 antisense Hybridisierungssignale sind auf die neuronalen Schichten im Cortex begrenzt. Man erkennt bei

allen antisense Proben ein deutliches Hybridisierungssignal der Schichten II-VI. (B) Deutliches Hybridisierungssignal in den Pyramidal- und Granulärneuronen des Hippocampus. SDF-1 γ se und CXCR-4 se sind Negativkontrollen mit keiner signifikanten Hybridisierung der Proben. Skalierungsbalken 100 μ m.

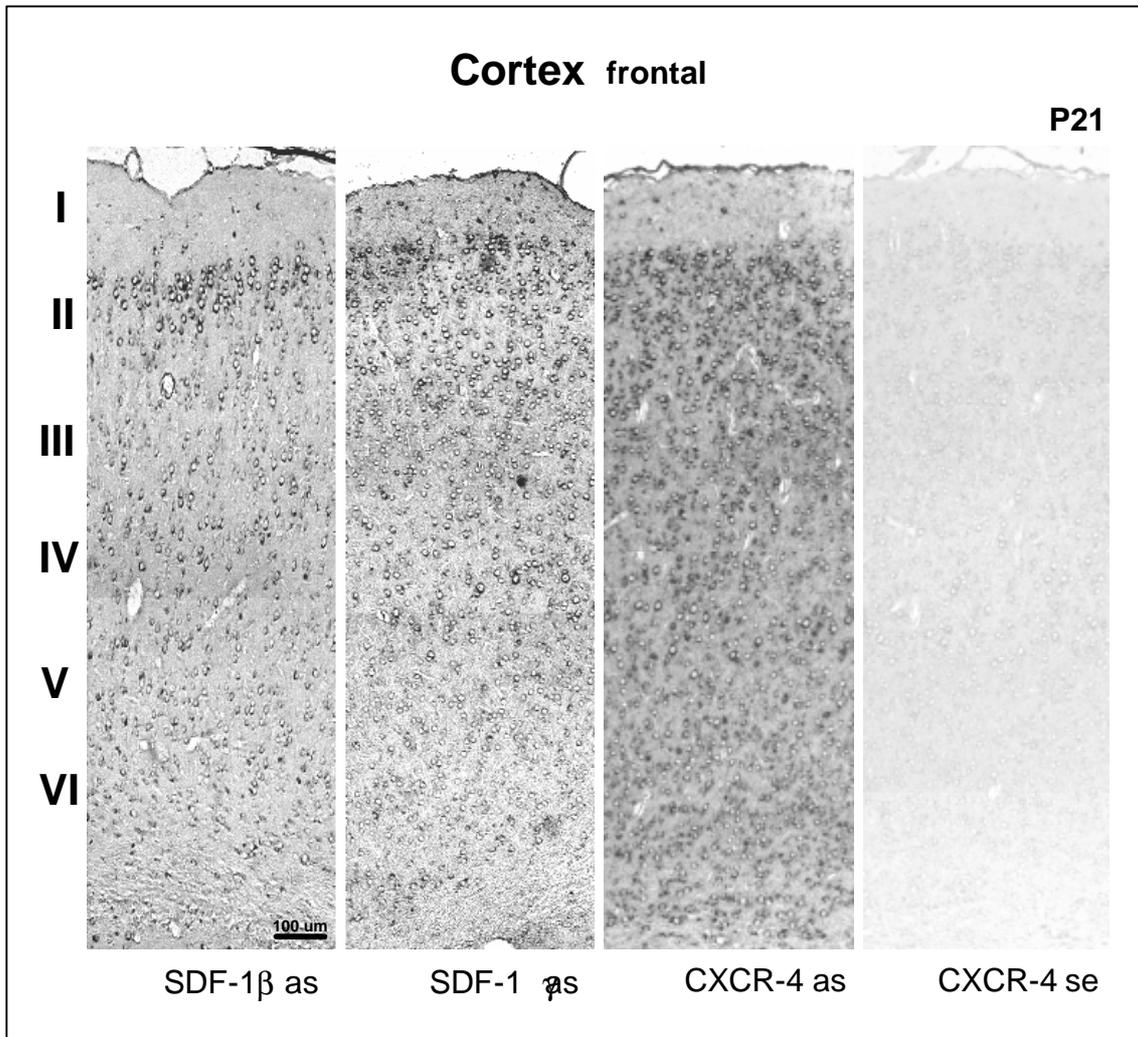


Abb.8: Zelluläre Lokalisation von SDF-1 β/γ und CXCR-4 mRNA im Neocortex der Ratte, postnataler Tag 21 (P21) in frontalen Paraffinschnitten. Bei den In situ Hybridisierungen mit Digoxigenin-UTP-markierten antisense SDF-1 β/γ und CXCR-4 RNA Proben erkennt man deutliche Hybridisierungssignale der Neurone in den neocorticalen Schichten II-VI. CXCR-4 se als Negativkontrolle mit keiner signifikanten Hybridisierung. SDF-1 β/γ se entsprechen der CXCR-4 se Probe. Skalierungsbalken 100 μ m.

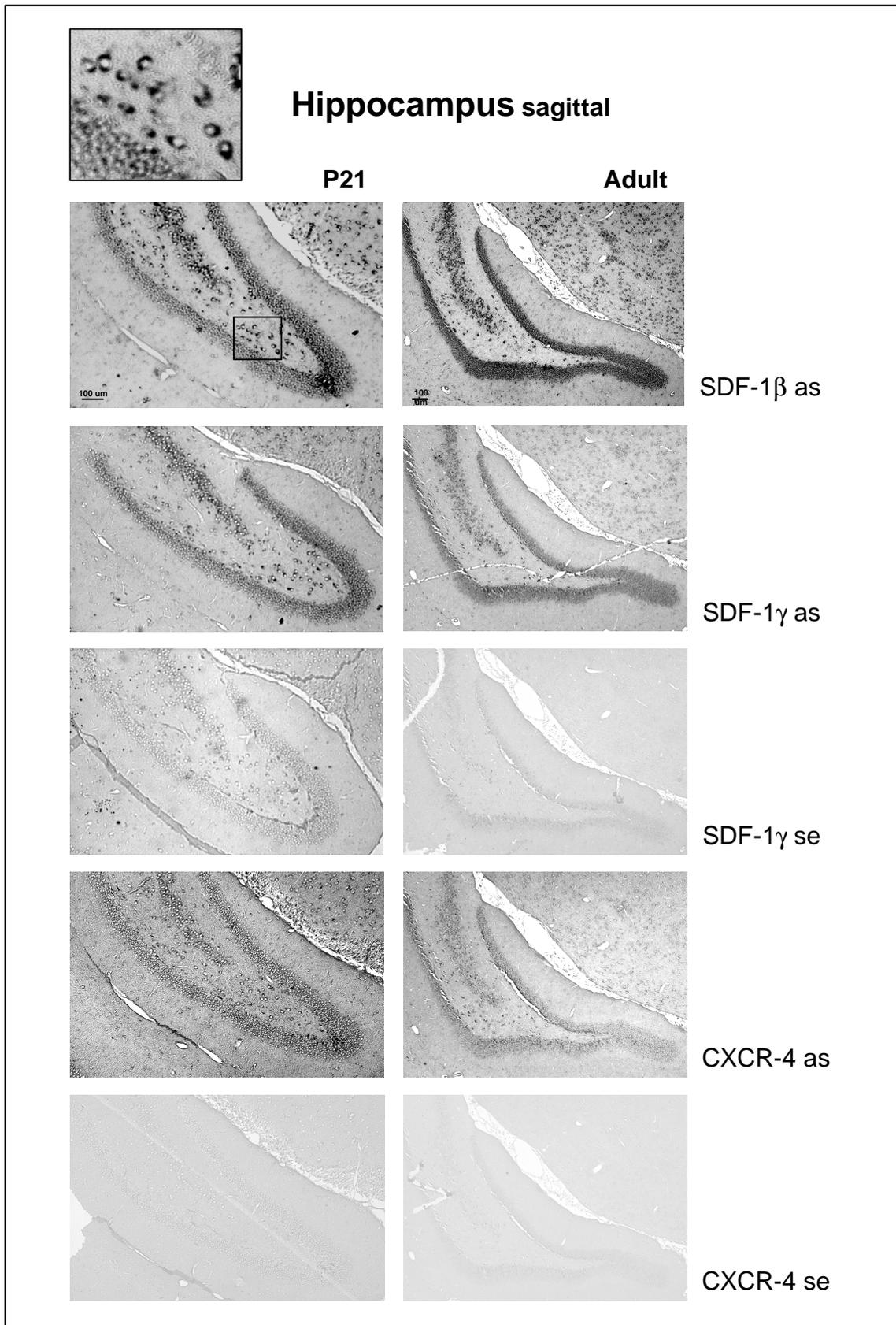


Abb.9: Zelluläre Lokalisation der SDF-1β/γ und CXCR-4 mRNA im Hippocampus der adulten Ratte und am postnatalen Tag 21 (P21) in sagittalen Paraffinschnitten. Bei der In situ Hybridisierung mit Digoxigenin-UTP-markierten antisense SDF-1β/γ und CXCR-4 RNA Proben

erkennt man ein starkes Hybridisierungssignal in Pyramidal- und granulären Neuronen des Hippocampus. SDF-1 γ se und CXCR-4 se sind Negativkontrollen, die keine signifikanten Hybridisierungssignale zeigen. Skalierungsbalken 100 μ m.

II) Zelluläre Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 während der Cerebellum Entwicklung

Die CXCR-4, genauso wie die SDF-1 mRNA wird während der Embryogenese in zahlreichen Geweben exprimiert (Nagasawa et al., 1996a; Jazin et al., 1997). Auch in sich entwickelnden neuronalen Geweben (McGrath et al., 1999) findet man beide Transkripte. Im Kleinhirn läuft eine komplexe Entwicklung ab und CXCR-4 und SDF-1 defiziente Maus Mutanten zeigen beide eine identische, strukturabweichende Architektur des Kleinhirns (Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998).

In diesem Zusammenhang wurde daher hier das Kleinhirn-Expressionsmuster von SDF-1 γ und dem CXCR-4 Rezeptor vom Embryonalstadium bis zur adulten Ratte miteinander verglichen.

Abb.10 zeigt das Kleinhirn vom Entwicklungszeitpunkt E17 bis P14. Am Tag E17 findet man mit allen as Proben ein deutliches Hybridisierungssignal in der Externen-Granulären-Schicht (EGS), einer transienten proliferativen Zone des Kleinhirns, aus der durch Migration die innere Granulärschicht entsteht. Bedingt durch die Schnittlage werden mit der SDF-1 γ Sonde auch Neurone des cerebellären Nucleus (cn) markiert. Im Stadium P4 findet man zusätzlich ein Signal in der deutlich ausgebildeten Purkinje-Zell-Schicht PZS, darunter findet man immer noch die markierte Externe-Granuläre-Schicht (EGS). Alle antisense Proben markieren hier den cerebellären Nucleus. Zum Zeitpunkt P14 ist bereits die Migration der EGS durch die Purkinje-Zell-Schicht abgeschlossen und man findet den typischen dreischichtigen, neuronalen Kleinhirnaufbau, wie er auch im adulten Tier vorliegt. Hier finden sich mit allen antisense Proben sehr starke Hybridisierungssignale in den Purkinjezellen. In der darüberliegenden Granulärschicht (gs) zeigen sich markierte Körnerzellen. Unterhalb der Purkinjezellen befinden sich in der Molekularschicht (ms) vereinzelt Signale, wahrscheinlich in Korb- bzw. Sternzellen. Deutliche Signale findet man auch weiterhin im cerebellären Nucleus (cn).

Abb.11 zeigt Kleinhirnausschnitte zum Zeitpunkt P21 und im adulten Tier. Es dominieren auch hier neuronale Hybridisierungssignale der as Proben mit sehr deutlicher Markierung der Purkinjezellen und beim adulten Tier findet man eine zunehmende Signalgebung in der Molekularschicht. Vermutlich handelt es sich um Korb- und Sternzellen. Zusätzlich erkennt man zu beiden Zeitpunkten eine deutliche Färbung der Granulärschicht.

Zusammenfassend kommt es während der gesamten Kleinhirn-Entwicklung (E17 bis Adult) zu einer ubiquitären, überwiegend neuronalen Expression, einschließlich in den neuronalen Vorläuferzellen. Im Kleinhirn findet man zu keinem Zeitpunkt eine Markierung der weißen Substanz.

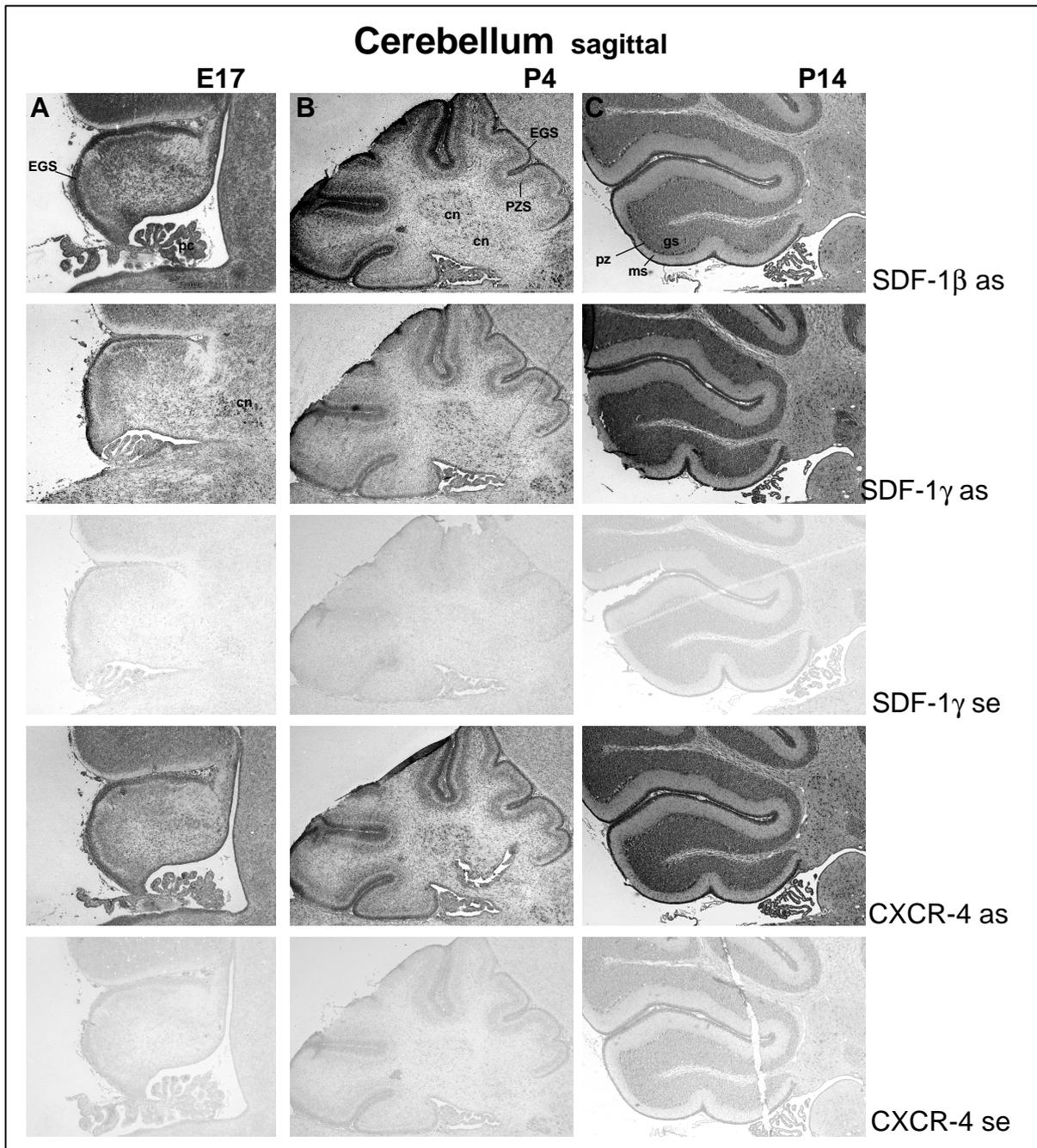


Abb.10: Zelluläre Lokalisation von SDF-1β/γ und CXCR-4 mRNA vom embryonalen Tag 17 bis zum postnatalen Tag 14 in sagittalen Paraffinschnitten. (A-C) In situ Hybridisierung mit Digoxigenin-UTP-markierten antisense SDF-1β/γ und CXCR-4 RNA Proben. (A) Alle as Proben zeigen ein deutliches Signal in der Externen-Granulären-Schicht (EGS). Die SDF-1γ as Probe zeigt zusätzlich ein Hybridisierungssignal in Zellen des cerebellären Nucleus (cn). (B) Deutliches Signal aller as Proben in der Externen-Granulären-Schicht (EGS) und zusätzlich in der gesamten Purkinje-Zell-Schicht (PZS). Starke Markierung auch des cerebellären Nucleus (cn). (C) Sehr starkes Hybridisierungssignal der as SDF-1β/γ und CXCR-4 RNA Proben in den Purkinjezellen (pz). Zusätzliche Signale findet man in der Molekularschicht (ms) und in der Granulärschicht (gs). Kein Signal in der weißen Substanz. SDF-1γ se und CXCR-4 se sind Negativkontrollen, die keine signifikanten Hybridisierungssignale zeigen. Skalierungsbalken 1 mm. cn, cerebellärer Nucleus; EGS, Externe-Granuläre-Schicht; gs, Granulärschicht; ms, Molekularschicht; pc, plexus choroideus; pz Purkinjezellen; PZS, Purkinje-Zell-Schicht.

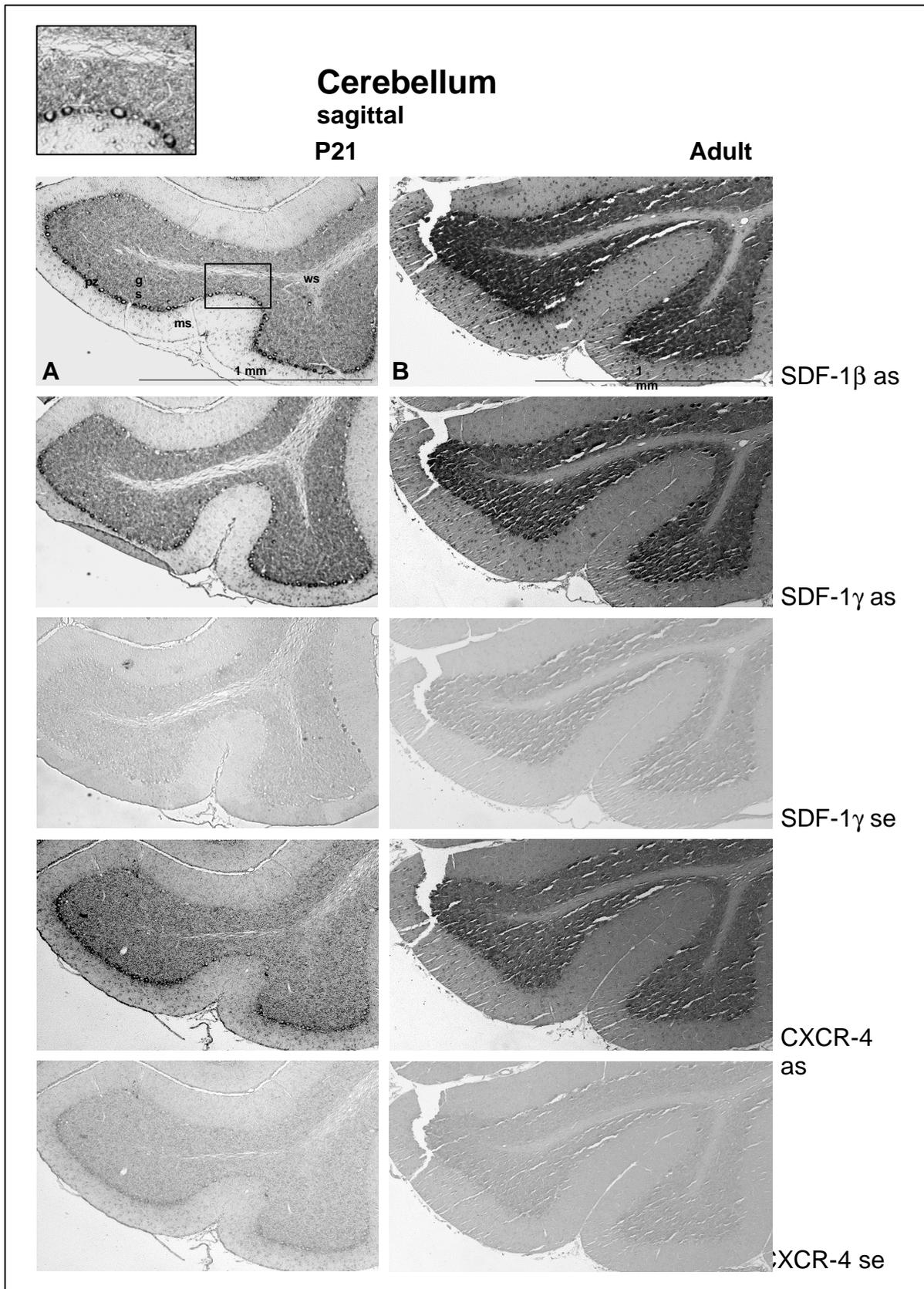


Abb.11: Zelluläre Lokalisation von SDF-1 β/γ und CXCR-4 mRNA im Kleinhirn der Ratte zum Zeitpunkt P21 und im adultem Tier in sagittalen Paraffinschnitten. (A-B) In situ Hybridisierung mit Digoxigenin-UTP-markierten antisense SDF-1 β/γ und CXCR-4 RNA Proben. (A-B) Starkes

Hybridisierungssignal aller as Proben sowohl zum Zeitpunkt P21 als auch im adulten Tier. Das stärkste Signal zeigen die Purkinjenzellen (pz). In der Molekularschicht (ms) sind vereinzelt Zellen markiert. In der Granulärschicht (gs) findet man Signale in den Körnerzellen. Kein Signal in der weißen Substanz (ws). SDF-1 γ se und CXCR-4 se sind Negativkontrollen, die keine signifikanten Hybridisierungssignale zeigen. Skalierungsbalken 1 mm. gs, Granulärschicht; ms, Molekularschicht; pz Purkinjenzellen; ws, weiße Substanz.

III) Zelluläre Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 im Bulbus olfactorius

Bereits 1998 untersuchten Zou et al. die Expression von CXCR-4 in Mäusehirnen zu verschiedenen embryonalen Zeitpunkten. Im Stadium E13, E15 und E18 fanden sie mit der ISH Methode CXCR-4 Transkripte in Cortex, Hippocampus, Cerebellum, Retina und Bulbus olfactorius. Jazin et al. (1997) zeigten eine ähnliche CXCR-4 mRNA Expression in embryonalen Rattenhirnen.

Hier soll nun anhand von zwei postnatalen Entwicklungszeitpunkten die CXCR-4 mit der SDF-1 γ Expression im Bulbus olfactorius verglichen werden. Im adulten Tier ist die Darstellung des Bulbus olfactorius durch die enorme Größenzunahme schwierig, daher wurde ein früher postnataler Zeitpunkt (P4) mit dem Zeitpunkt P21 verglichen.

Abb.12 zeigt einen sagittal geschnittenen Bulbus olfactorius im Stadium P4 und P21. Am postnatalen Tag 4 zeigen sich mit der SDF-1 γ und CXCR-4 as Probe vergleichbare neuronale Hybridisierungssignale in der mitralen Zellschicht (mz). Zum Entwicklungszeitpunkt P21 werden selektiv Neurone im Bulbus olfactorius angefärbt. Vereinzelt sind Strukturen im lateralen olfactorischen Trakt gefärbt. Der primäre olfactorische Cortex ist frei von Signal. Ob SDF-1 β im Bulbus olfactorius vorkommt läßt sich durch Hybridisierung mit der SDF-1 as Sonde nicht aussagen (vgl. Abb.3).

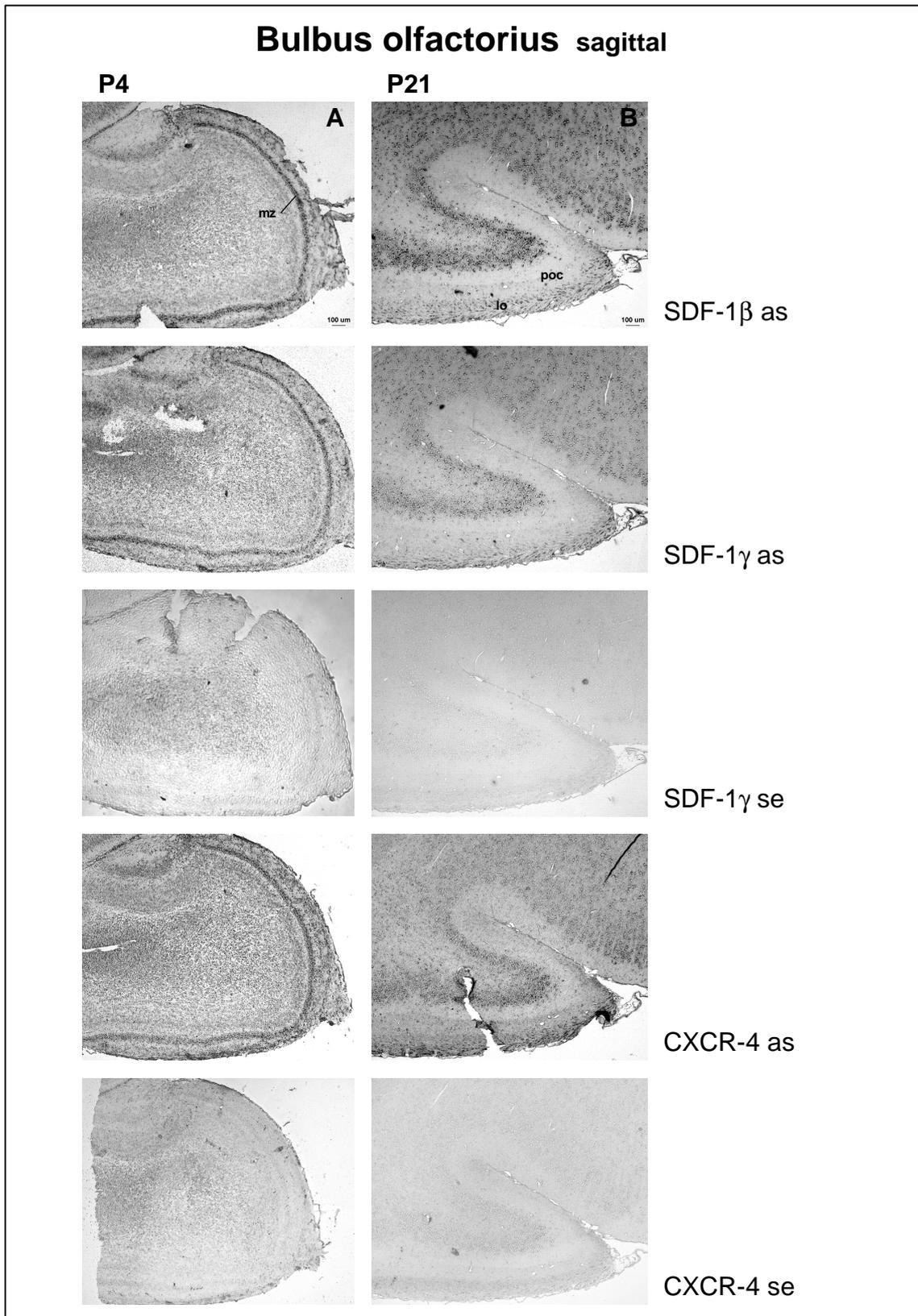


Abb.12: Zelluläre Lokalisation von SDF-1 β/γ und CXCR-4 mRNA im Bulbus olfactorius der Ratte zum Zeitpunkt P4 und P21 in sagittalen Paraffinschnitten. (A-B) In situ Hybridisierung mit Digoxigenin-UTP-markierten antisense SDF-1 β/γ und CXCR-4 RNA Proben. (A) Starkes Hybridisierungssignal der mitralen Zellschicht. (B) Markierung der Bulbus olfactorius Neurone

und Strukturen im lateralen olfactorischen Trakt. SDF-1 γ se und CXCR-4 se sind Negativkontrollen mit keiner signifikanten Hybridisierung der Proben. Skalierungsbalken 100 μ m. lo, lateraler olfactorischer Trakt; mz, mitrale Zellschicht; poc, primärer olfactorischer Cortex.

4.3.2 Zelluläre Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 in der weißen Substanz des Cerebrums

I) Zelluläre Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 im Corpus callosum

Neben Strukturen in der grauen Substanz des ZNS (vgl. 4.3.1) zeigt auch die weiße Substanz deutliche Hybridisierungssignale mit den SDF-1 γ und CXCR-4 antisense Sonden.

In der weißen Substanz wurden SDF-1 und CXCR-4 mRNA Transkripte in stark myelinisierten Regionen, wie dem subcortikalen Marklager und dem Corpus callosum (Abb.13) gefunden. Im Corpus callosum zeigt sich mit allen verwendeten as Sonden eine perlschnurartige Anordnung der signalgebenden Zellen, die als Oligodendrozyten-spezifisch vorbeschrieben ist (Fleischhauer & Wartenberg, 1967; Berger & Frotscher, 1994).

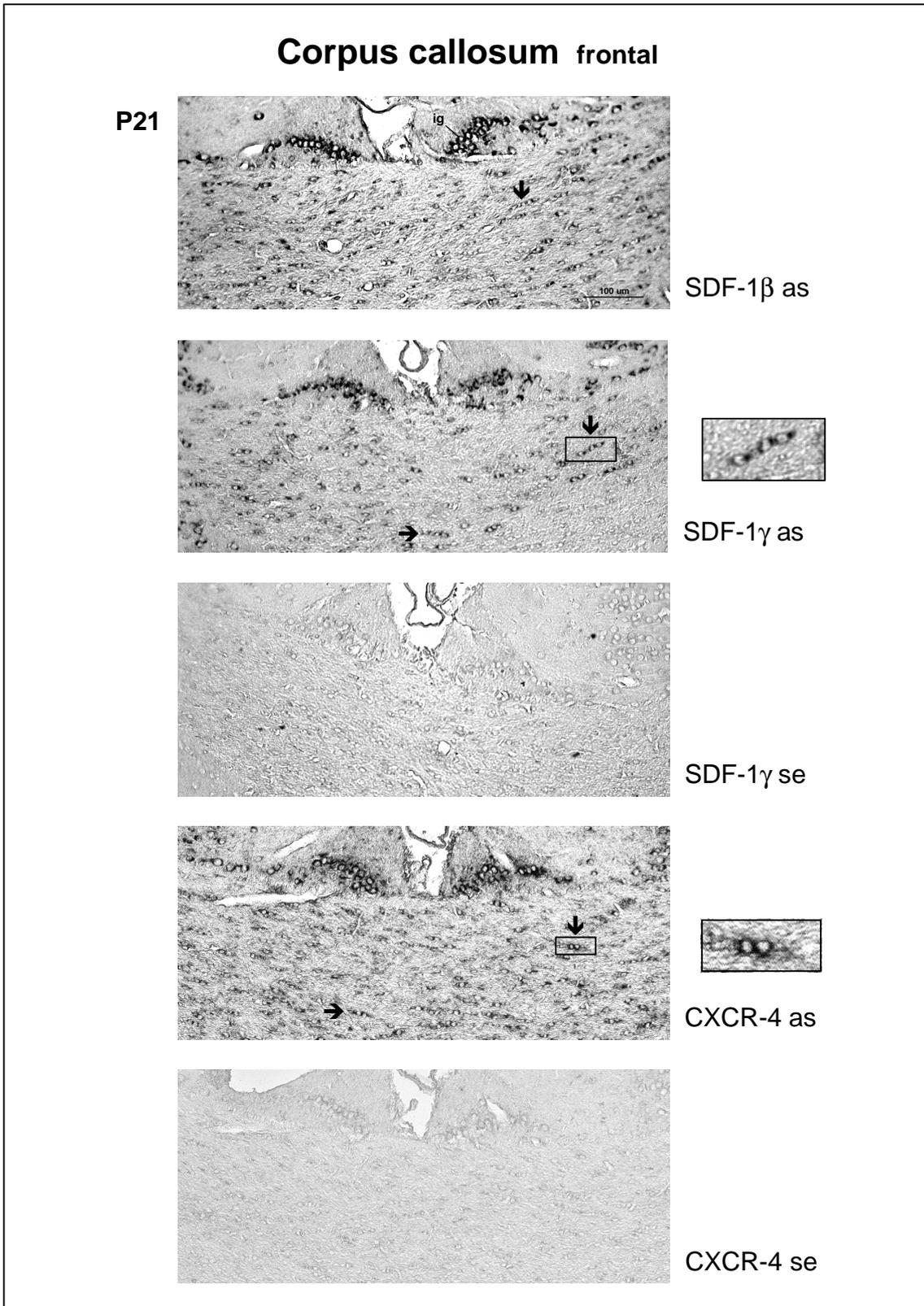


Abb.13: Zelluläre Lokalisation der SDF-1 β/γ und CXCR-4 mRNA im Corpus callosum der Ratte zum Zeitpunkt P21 in sagittalen Paraffinschnitten. In situ Hybridisierung mit Digoxigenin-UTP-markierten as SDF-1 β/γ und CXCR-4 RNA Proben. Im Corpus callosum findet man eine perlchnurartige Anordnung der signalgebenden Oligodendrozyten (Pfeile). Oberhalb des

Corpus callosum intensive Markierung der Induseum griseum (ig) Neurone. SDF-1 γ se und CXCR-4 se sind Negativkontrollen ohne Hybridisierungssignal. Skalierungsbalken 100 μ m.

4.3.3 Zelluläre Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 mRNA im Rückenmark

Im Rückenmark der adulten Maus wurde 1998 von Sehgal et al. eine CXCR-4 Expression beschrieben (Sehgal et al., 1998a). Über die CXCR-4 Expression im Rückenmark der Ratte ist nichts bekannt. SDF-1 Expression konnte im Rückenmark der adulten Ratte von M. Gleichmann (1996) im Rahmen seiner Dissertation nachgewiesen werden. Er benutzte ein 300nt Transkript (nt 1758-2199 in SDF-1 β) aus dem gemeinsamen 3'-UTR von SDF-1 β/γ , das jedoch keine Aussage über die gefundene SDF-1 Isoform erlaubte.

Hier wurde daher mit einem spezifischen SDF-1 γ bzw. CXCR-4 *in vitro* Transkript das Expressionsmuster der neuen SDF-1 Isoform und des Rezeptors vergleichend untersucht. Zusätzlich wurde mit der SDF-1 β Sonde hybridisiert. Diese Sonde erkennt nicht nur SDF-1 β sondern auch alle übrigen SDF-1 Isoformen (siehe Abb.3).

In Abb.14 ist der Querschnitt eines adulten Ratten-Rückenmarks in Höhe des cervicalen Segments 5 (C5) dargestellt. Die Querschnitte, die mit einem SDF-1 β , SDF-1 γ bzw. CXCR-4 antisense Transkript hybridisiert wurden, zeigen deutliche Signale in Neuronen der grauen Substanz. Die kräftigste Markierung zeigen dabei die Motoneurone. In der weißen Substanz findet man vereinzelt angefärbte Zellen. Allerdings war eine genaue Zuordnung dieser Zellen zu einem Zelltyp nicht möglich.

4.3.4 Kolokalisierung von SDF-1 und CXCR-4 mRNA im Rückenmark

Im Rückenmark der adulten Ratte werden SDF-1 γ und CXCR-4 Transkripte gefunden (vgl. 4.3.3). Zusätzlich zeigen beide Gene ein vergleichbares Expressionsmuster, d.h. sowohl SDF-1 γ als auch der Rezeptor werden im selben Zelltyp, z.B. in Motoneuronen transkribiert.

Durch die Größe der 2. Motoneurone im Rückenmark konnten direkt benachbarte Gewebeschnitte angefertigt und mit SDF-1 und CXCR-4 Sonden hybridisiert werden. Anhand dieser 6 μ m dicken Serienschnitte (#1-#3) konnte SDF-1 γ mit CXCR-4 in Motoneuronen kolokalisiert werden (Abb.15).

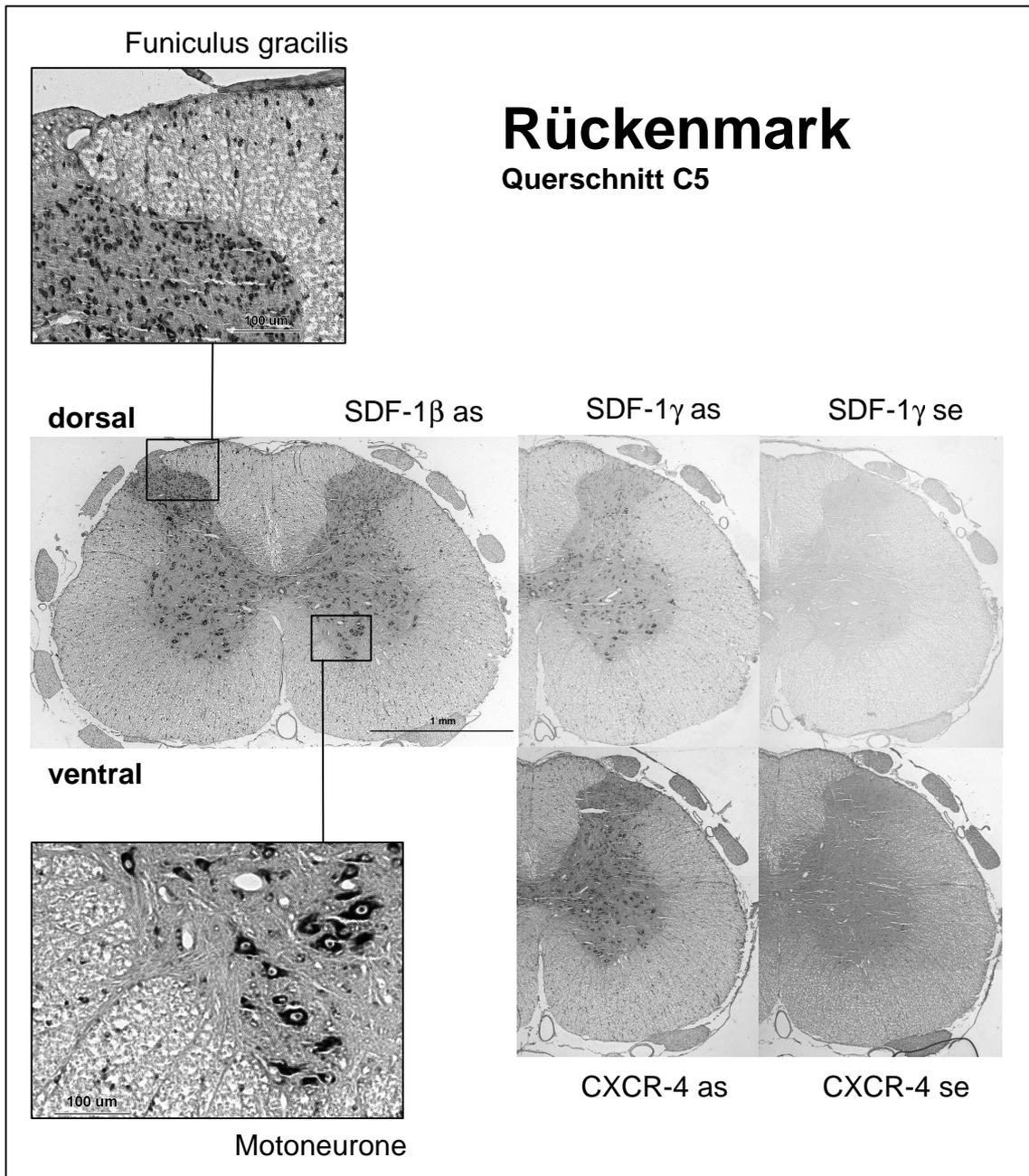


Abb.14: Zelluläre Lokalisation von SDF-1 β/γ und CXCR-4 mRNA im Rückenmark (C5) der adulten Ratte in Paraffinschnitten. In situ Hybridisierung mit Digoxigenin-UTP-markierten antisense SDF-1 β/γ und CXCR-4 RNA Proben. Mit allen antisense Proben erhält man ein starkes Hybridisierungssignal in den Neuronen der grauen Substanz, speziell die Motoneurone in den Vorderhörnern zeigen eine sehr deutliche Markierung. Einzelne signalgebende Zellen finden sich in der weißen Substanz. Im Funiculus gracilis Ausschnitt sind diese Zellen vergrößert dargestellt. SDF-1 γ se und CXCR-4 se sind Negativkontrollen mit keiner signifikanten Hybridisierung der Proben. Skalierungsbalken 1 mm, in den Ausschnitt-Vergrößerungen 100 μ m.

Kolokalisierung: SDF-1 β / -1 γ / CXCR-4 Serienschnitte Rückenmark

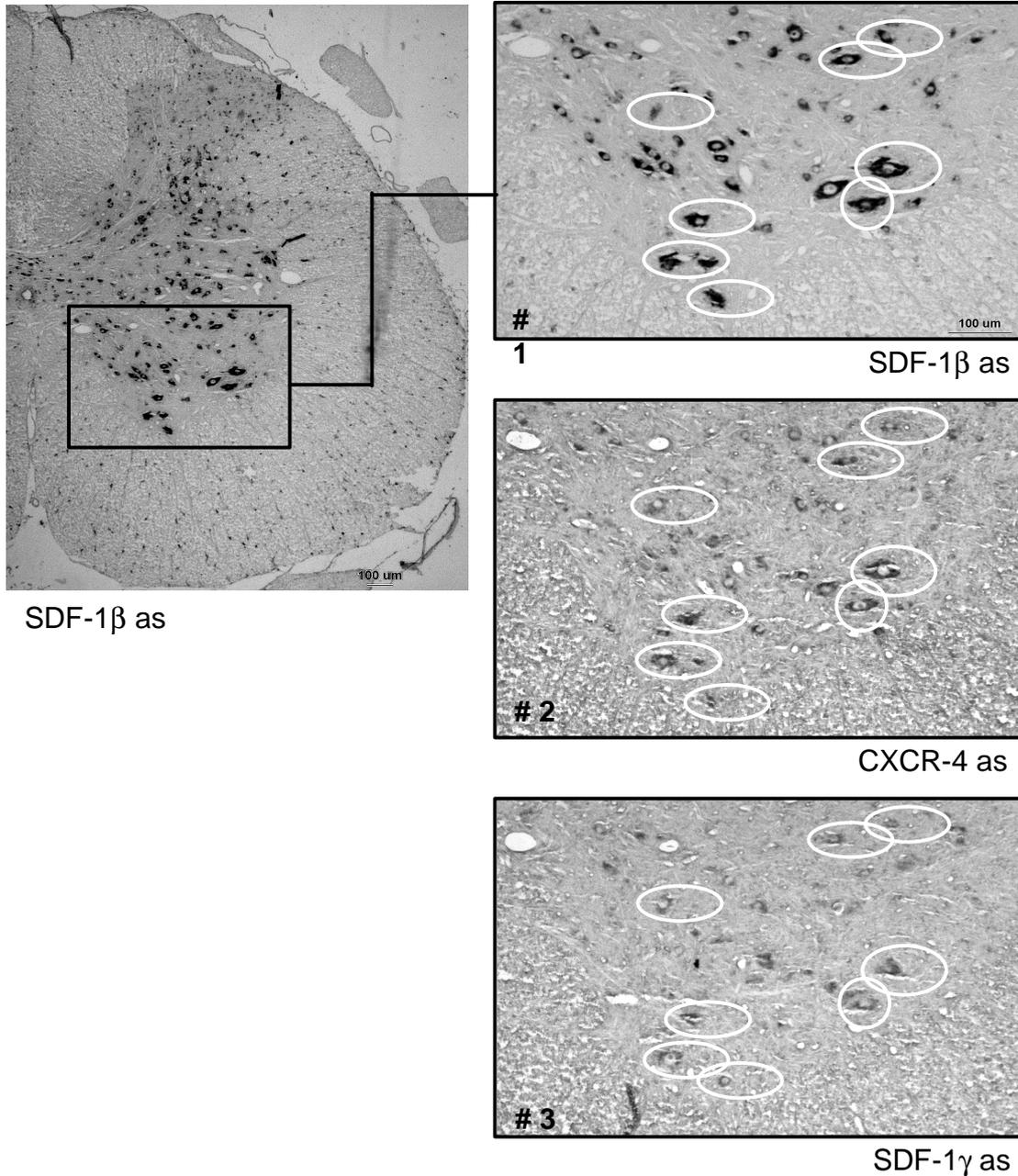


Abb.15: Zelluläre Kolokalisierung von SDF-1 β/γ und CXCR-4 mRNA in Paraffin-Serienquerschnitten (#1-#3) eines Rückenmarks der adulten Ratte in Höhe C5. In situ Hybridisierung mit Digoxigenin-UTP-markierten antisense SDF-1 β/γ und CXCR-4 RNA Proben an direkt benachbarten Gewebeschnitten. Die eingekreisten Hybridisierungssignale markieren identische Motoneurone. Die Hybridisierung mit einer Digoxigenin-UTP-markierten sense SDF-1 β/γ und CXCR-4 Probe als Negativkontrolle ergab kein signifikantes Hybridisierungssignal. Skalierungsbalken 100 μ m.

4.4 Zelluläre Protein Lokalisation von SDF-1 und CXCR-4 im Nervensystem:

In vielen Bereichen des ZNS der Ratte findet man ein starkes, neuronales SDF-1 γ und CXCR-4 mRNA Signal (4.3.1). Im PNS wird diese mRNA spezifisch in Schwanzzellen detektiert (4.2.1). Zusätzlich findet man im ZNS und PNS ein zusätzliches SDF-1 Signal mit der SDF-1 β as Sonde.

Mit Hilfe von Antikörpern sollten die unter 4.2.1 und 4.3.1 erhaltenen Ergebnisse auf Proteinebene bestätigt werden. Zum SDF-1 Nachweis wurde ein polyklonaler IgG Antikörper verwendet, der den C-Terminus (C19) von SDF-1 α/β und somit auch SDF-1 γ erkennen sollte. Dieser Antikörper könnte somit alle Isoformen detektieren. SDF-1 α und SDF-1 β unterscheiden sich nur in 4 Aminosäuren, daher ist die Synthese eines spezifischen Antikörpers, der nur eine Isoform erkennt, problematisch. Für den spezifischen C-Terminus von SDF-1 γ existiert bislang kein Antikörper.

Zur CXCR-4 Detektion wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet, der gegen den intrazellulären C-Terminus (C20) des Rezeptors gerichtet ist (Bajetto et al., 1999a).

4.4.1 Immunhistochemische Darstellung des SDF-1 und CXCR-4 Proteins auf Kryostatschnitten

I) Immunhistochemische Lokalisation des SDF-1 und CXCR-4 Proteins im Cortex

Auf mRNA Ebene wurde mehrfach eine neuronale SDF-1 γ und CXCR-4 Expression gezeigt (vgl. 4.3). Hier wurde nun die Protein Expression von SDF-1 und CXCR-4 im Neocortex der adulten Ratte mit Hilfe immunhistochemischer Methoden (3.10.5) untersucht.

Die Abbildung 16 zeigt das Ergebnis der immunhistochemischen Lokalisation beider Proteine. Verteilt über den gesamten Cortex zeigen beide Antikörper ein identisches Immunreaktivitätsmuster. Bis auf Schicht I werden Neurone in allen neocorticalen Schichten homogen angefärbt. Besonders deutlich wird dies in Schicht IV, in der große Pyramidenzellen mit Soma und Fortsätzen markiert sind. Eine Aussage, um welche SDF-1 Isoform es sich handelt, ist durch den verwendeten Antikörper nicht möglich.

Als Kontrollfärbung wurden Kortexschnitte nur mit dem 2. Antikörper inkubiert, was zu keiner Signalgebung führte (nicht gezeigt).

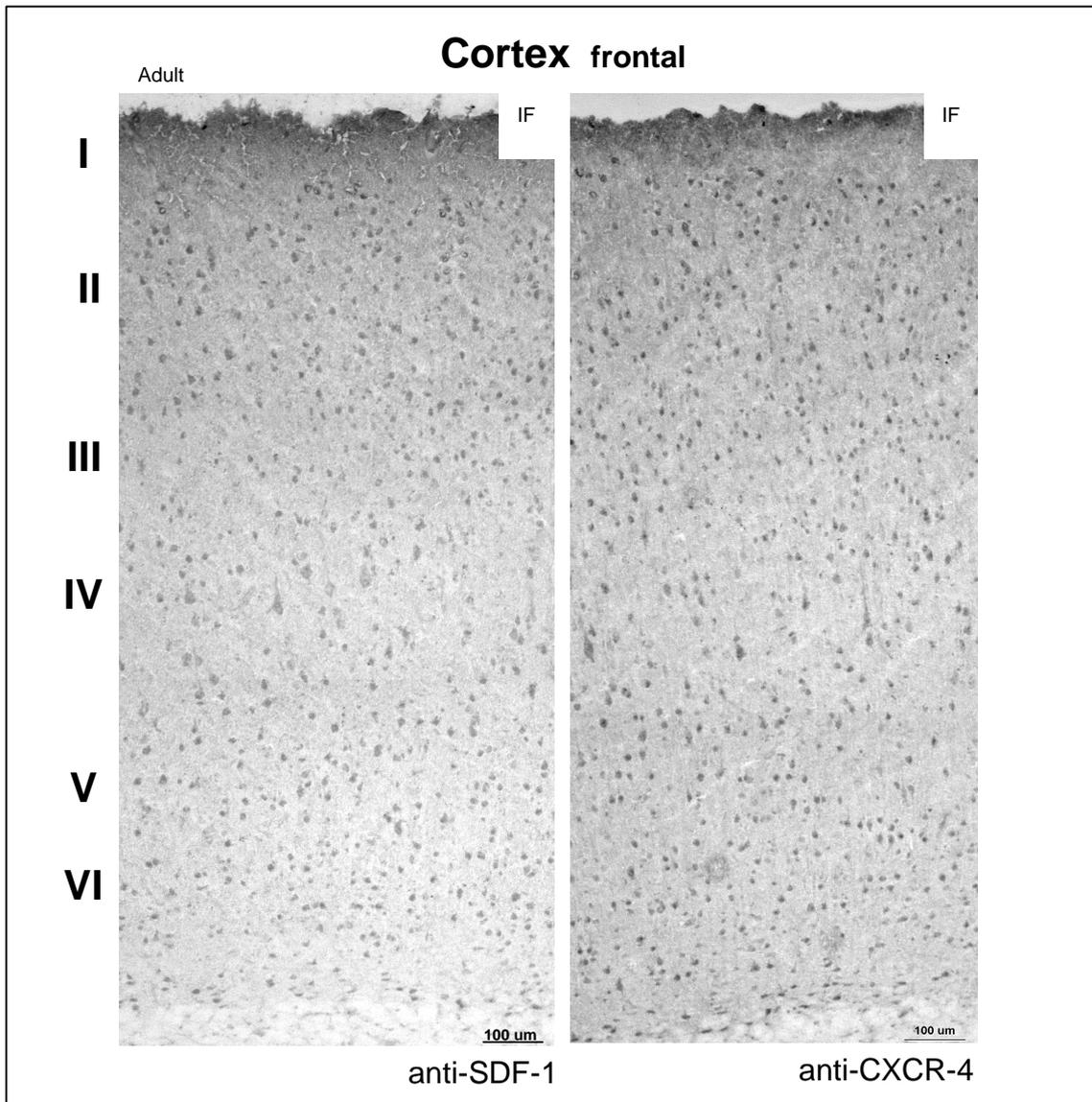


Abb.16: Immunhistochemischer Nachweis des CXCR-4 Rezeptors und des SDF-1 Proteins im Cortex der adulten Ratte. Frontale 10 µm dicke Kryostatschnitte aus dem Gehirn adulter Ratten wurden mit dem polyklonalen anti-CXCR-4 Ak bzw mit dem polyklonalen anti-SDF-1 Ak markiert. Beide Proben wurden mit einem Pferd-anti-Ziege IgG als 2. Ak inkubiert und mit DAB entwickelt. Alle neocorticalen Schichten (I-VI) zeigen ein deutliches neuronales Signal. Schicht IV zeigt deutlich gefärbte Pyramidalneurone. Skalierungsbalken 100 µm. IF, Immunfärbung.

II) Immunhistochemische Lokalisation des SDF-1 und CXCR-4 Proteins im Hippocampus

Die Expression von SDF-1 und CXCR-4 wurde im Hippocampus der adulten Ratte untersucht (Abb.17). Mit dem SDF-1 und mit dem CXCR-4 Antikörper findet man eine deutliche Markierung der Hippocampalneurone. Besonders deutlich lassen sich mit beiden Antikörpern die großen Pyramidalneurone des Hippocampus (siehe Vergrößerungsausschnitt) anfärben. Man findet eine Somafärbung und eine Ansatzmarkierung der Zellfortsätze.

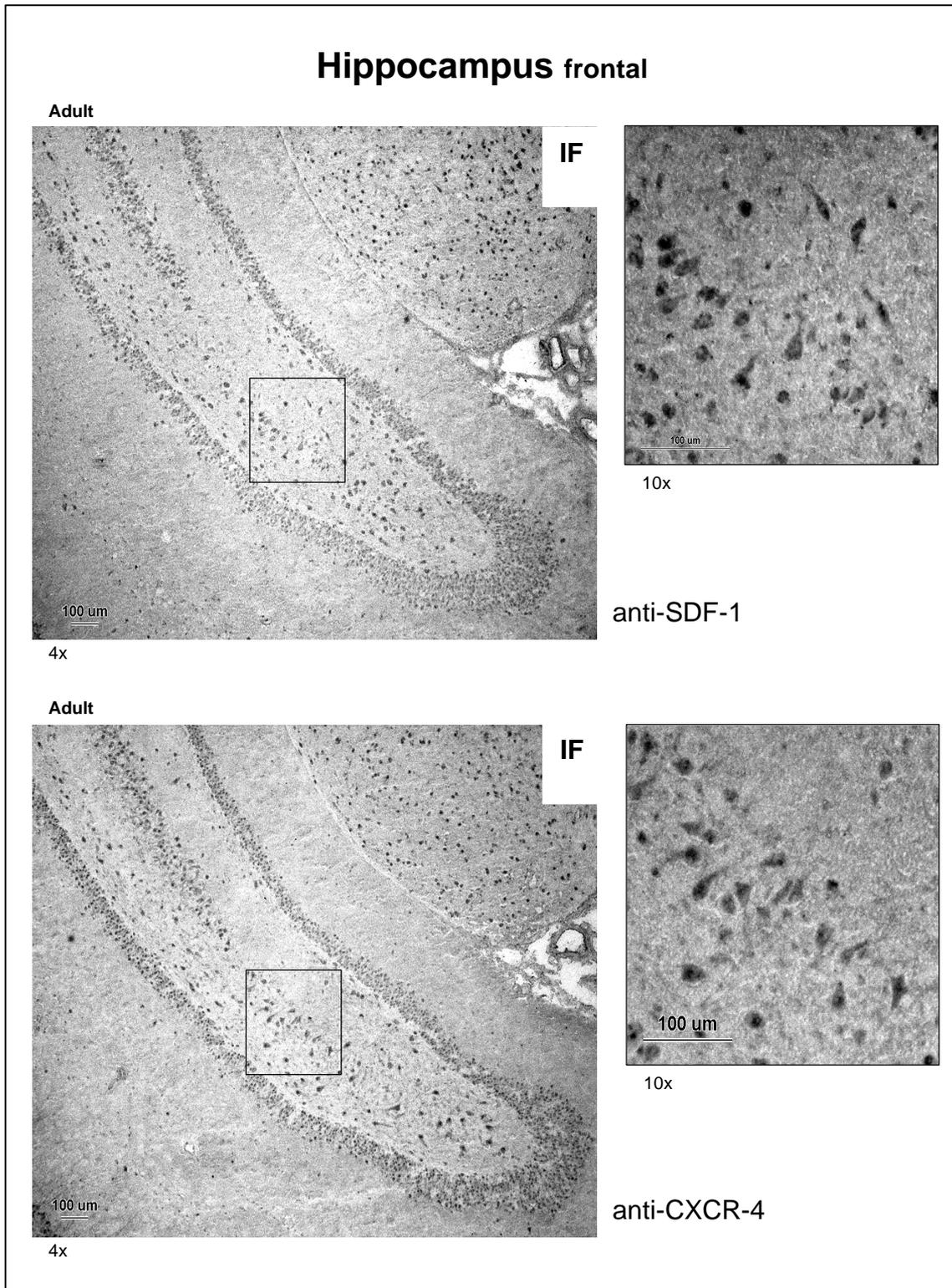


Abb.17: Immunhistochemischer Nachweis des CXCR-4 Rezeptors und des SDF-1 Proteins im Hippocampus der adulten Ratte. Frontale 10 µm dicke Kryostatschnitte aus dem Gehirn adulter Ratten wurden mit einem polyklonalen anti-CXCR-4 Ak bzw mit dem polyklonalen anti-SDF-1 Ak markiert. Beide Proben wurden mit einem Pferd-anti-Ziege IgG als 2. Ak inkubiert und mit DAB entwickelt. Beide Ak markieren selektiv Neurone im Hippocampus. Die Vergrößerung zeigt angefärbte Pyramidalneurone. Skalierungsbalken 100 µm.

4.4.2 Immunzytochemische Darstellung des CXCR-4 Proteins in primären Kulturzellen

Die Charakterisierung von kultivierten Cortexneuronen und von Schwannzellen *in vitro* erfolgte nach immunzytochemischen Gesichtspunkten unter Verwendung der indirekten Immunfluoreszenztechnik (3.10.6).

I) Immunzytochemischer Nachweis von CXCR-4 in primären Cortexneuronen

Mit Hilfe der ISH Methode wurde unter 4.3.1 mehrfach eine neuronale SDF-1 γ und CXCR-4 mRNA Expression beschrieben, speziell Cortexneurone zeigen ein deutliches Signal (vgl. 4.3.1; 4.4.1). Hier wurde nun die CXCR-4 Expression mit Hilfe der Immunfluoreszenz Methode in kultivierten Cortexneuronen untersucht.

Primäre Cortexneurone aus 15 Tage alten Rattenembryonen wurden auf PDL- und Laminin- vorbeschichteten Deckgläschen in einer Dichte von 4×10^4 Zellen/cm² kultiviert und nach 5 Tagen mit einem anti-CXCR-4 Antikörper markiert. Das Fluoreszenzsignal wurde nach Inkubation mit einem biotinyliertem 2. Ak und FITC gekoppelten Streptavidin Reagenz freigesetzt.

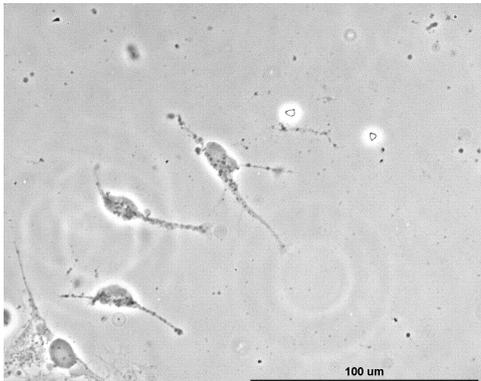
Die primären Cortexneurone der Ratte zeigen ein deutliches, grünes CXCR-4 Fluoreszenzsignal (Abb.18), das in der Kontrolle nur mit dem 2. Antikörper (Pferd-anti-Ziege IgG) bzw. nur Streptavidin nicht zu detektieren war. Das grüne CXCR-4 Signal verteilt sich inhomogen über das Neuron und färbt vorwiegend Neuriten an. Der Zellkörper mit dem Zellkern werden weniger stark markiert. Das wird besonders im Vergleich mit dem Dapi-Kernsignal deutlich.

II) Immunzytochemischer Nachweis von CXCR-4 in Schwannzellen

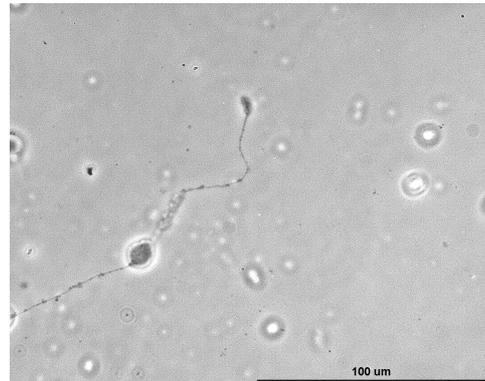
Unter 4.2.1 wird in Schwannzellen ein SDF-1 und CXCR-4 mRNA Signal beschrieben. Hier wurde nun die Expression der CXCR-4 Immunreaktivität mit Hilfe der Immunfluoreszenz Methode in kultivierten Schwannzellen untersucht.

Schwannzellen aus Rattenischiasnerven wurden auf PDL-vorbeschichteten Deckgläschen in einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/cm² kultiviert und nach Erreichen der Konfluenz mit einem anti-CXCR-4 Antikörper markiert.

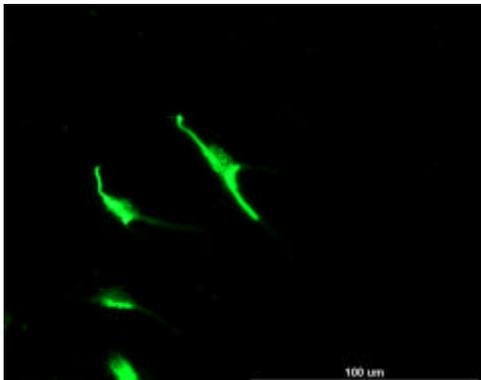
Der anti-CXCR-4 Antikörper färbt in Schwannzellen hauptsächlich die Perikarien und flächenförmige Bereiche der Zellfortsätze an. Der Vergleich mit dem Dapi Kernsignal macht deutlich, daß anti-CXCR-4 den Zellkern nicht anfärbt (Abb.19).

primäre Cortexneurone (E15)

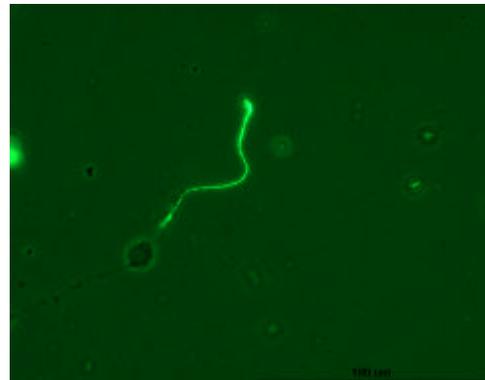
Phase



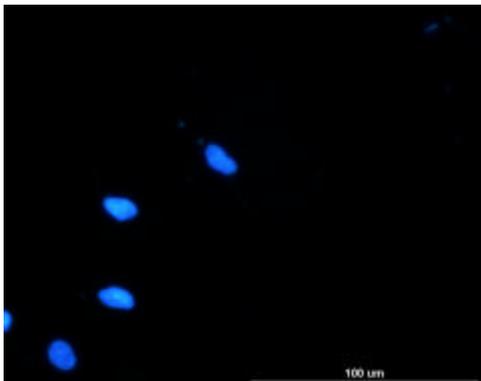
Phase



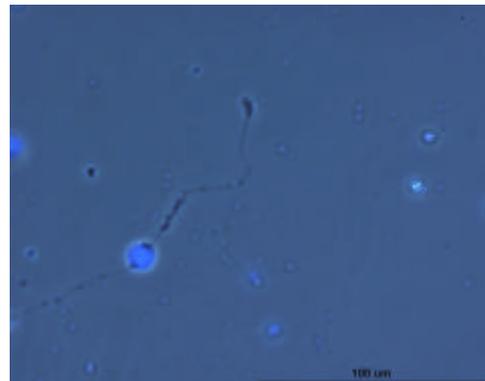
Anti-CXCR-4



Phase + Anti-CXCR-4



Dapi



Phase + Dapi

Abb.18: Immunfluoreszenznachweis des CXCR-4 Rezeptors auf primären Cortexneuronen der Ratte. Die Neurone wurden mit Paraformaldehyd fixiert und indirekt mit dem polyklonalen anti-CXCR-4 Antikörper immunzytochemisch gefärbt. Zusätzlich erfolgte eine Kernfärbung mit Dapi (blaues Signal). Grünes Fluoreszenzsignal in Perikarien und in den Zellfortsätzen der Neurone. Skalierungsbalken 100 µm.

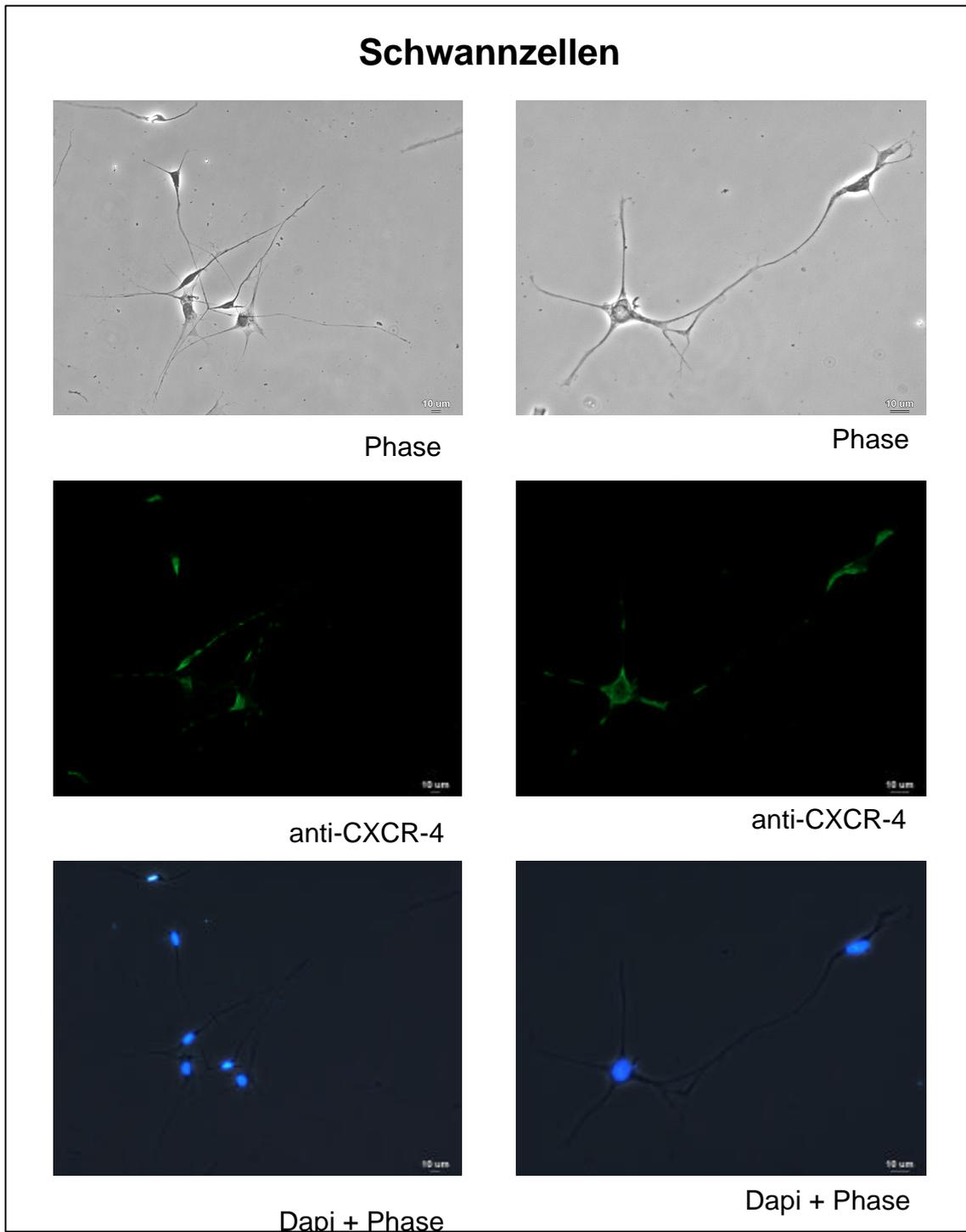


Abb.19: Immunfluoreszenznachweis des CXCR-4 Rezeptors auf Schwannzellen der Ratte. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert und indirekt mit einem polyklonalen anti-CXCR-4 Antikörper immunzytochemisch gefärbt. Zusätzlich erfolgte eine Kernfärbung mit Dapi (blaues Signal). Grünes, inhomogenes Fluoreszenzsignal in den Perikarien und Zellfortsätzen der Zellen. Skalierungsbalken 10 µm.

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Charakterisierung der Genexpression der neuen SDF-1 γ Isoform der Ratte durchgeführt. Neben einer gewebespezifischen Untersuchung stand die Analyse der zellulären Lokalisation von SDF-1 γ und dem CXCR-4 Rezeptor im Nervensystem der Ratte im Vordergrund.

Gewebespezifische Expression von SDF-1 γ und CXCR-4

Bei der gewebespezifischen mRNA Expression in Nervensystem, Herz, Milz und Blut zeigte sich, mit Ausnahme von menschlichem Blut und humanem N. suralis, eine ubiquitäre Expression von SDF-1 γ und CXCR-4.

In dieser Arbeit konnte durch RT-PCR Analyse gezeigt werden, daß im **PNS** nicht nur alle SDF-1 Isoformen, sondern auch der CXCR-4 Rezeptor sowohl in Schwanzzellen, als auch im peripheren Ischiasnerv exprimiert werden. Somit konnte das erste Mal der Nachweis der Rezeptor mRNA im PNS erbracht werden. Aus der Literatur war bereits die SDF-1 β und SDF-1 γ Expression im PNS der Ratte bekannt. Es wurde gezeigt, daß im Ischiasnerv der Ratte SDF-1 β und SDF-1 γ entwicklungs- sowie läsionsbedingt mit gegenläufiger Regulation exprimiert werden (Gleichmann et al., 2000). Passend dazu konnte in der hier durchgeführten RT-PCR-Analyse zu verschiedenen Zeitpunkten in sich entwickelndem, transsektierten und gequetschten Ischiasnerven SDF-1 γ und SDF-1 β nachgewiesen werden. Erstmals wurde im PNS auch CXCR-4 mRNA detektiert.

Allerdings war eine quantitative Aussage über die einzelnen vorliegenden Isoformen mit der RT-PCR-Analyse nicht möglich, so daß eine zeitliche Regulation, wie sie für SDF-1 β und SDF-1 γ bereits gezeigt wurde (Gleichmann et al., 2000), auch für SDF-1 α und für den Rezeptor durchaus möglich wäre. Problematisch ist, daß die meisten Untersuchungen über SDF-1 und CXCR-4 sich ausschließlich auf das ZNS beschränken, so daß in dieser Arbeit, aufbauend auf den Untersuchungen von Gleichmann et al., Grundzüge der Expression dargestellt wurden und über die funktionelle Bedeutung von SDF-1 und CXCR-4 im PNS nur spekuliert werden kann.

Im humanen, rein afferenten N. suralis konnte weder SDF-1 noch CXCR-4 mRNA nachgewiesen werden, was einerseits an den Kulturbedingungen der Schwanzzellen liegen konnte oder andererseits mit dem Fehlen des PAM Enzym erklärbar ist (siehe Diskussionspunkt: SDF-1 γ und PAM Expression: Entstehung von Neuropeptiden?).

Im Gehirn der Ratte wurde eine entwicklungsabhängige SDF-1 γ und SDF-1 β Expression gezeigt (Gleichmann et al., 2000). Die hier durchgeführte Untersuchung ergab im **ZNS** der Ratte zu zwei Zeitpunkten, E17 und im adulten Gehirn, neben einer schon vorbekannten SDF-1 β/γ mRNA Expression auch einen SDF-1 α und CXCR-4 cDNA Nachweis.

Im Nervensystem der Ratte zeigten sich somit keine Expressionsunterschiede der einzelnen SDF-1 Isoformen. Es wurde eine gleichzeitige Expression aller

SDF-1 Transkripte und des CXCR-4 Rezeptors gezeigt. Gut vereinbar sind diese Ergebnisse damit, daß in kultivierten Astrozyten und corticalen Neuronen der Ratte mittels PCR- und Northernblot-Analyse eine SDF-1 α , SDF-1 β und CXCR-4 mRNA Expression beschrieben wurde (Ohtani et al., 1998; Dorf et al., 2000). Bajetto et al. konnten mit den gleichen Analyseverfahren SDF-1 α und CXCR-4 in kultivierten granulären Zellen des Ratten-Kleinhirns nachweisen (Bajetto et al., 1999).

In dieser Arbeit konnte allerdings *in vivo*, mit Hilfe der ISH Methode, keine SDF-1 α mRNA Expression gezeigt werden. Auch Gleichmann et al. konnten keine SDF-1 α mRNA durch Northernblot-Analyse detektieren (Gleichmann et al., 2000).

Eine neuronale Expression des CXCR-4 Rezeptors ist mehrfach gezeigt worden (Horuk et al., 1997; Jazin et al., 1997; Lavi et al., 1997; Lavi et al., 1998; Hesselgesser et al., 1999; Bajetto et al., 1999a; Bajetto et al., 1999b; Lazarini et al., 2000; McManus et al., 2000) und bestätigt die hier erzielten Ergebnisse.

Außerhalb des Nervensystems war in den weiteren Untersuchungen auffällig, daß nur im Herzen die SDF-1 α Form fehlte. SDF-1 β , SDF-1 γ und CXCR-4 mRNA konnten im Herzen nachgewiesen werden. Durch Northernblot-Analyse war bekannt, daß SDF-1 γ die dominierende SDF-1 Isoform im Herzen ist (Gleichmann et al., 2000). Außerdem wurde während der Embryonalentwicklung eine sehr frühe CXCR-4 Expression im Herzseptum der Ratte beschrieben (McGrath et al., 1999).

Trägt man all diese Daten zusammen, so könnten sie jetzt zum besseren Verständnis der SDF-1 und CXCR-4 defizienten Maus Mutanten beitragen, die neben multiplen Defekten auch einen schweren Ventrikel-Septumsdefekt (VSD) am Herzen aufweisen (Nagasawa et al., 1996a; Ma et al., 1998). Zusätzlich fand man eine identische, strukturabweichende Kleinhirnarchitektur, die durch eine abnorme Migration der cerebellären Zellschichten verursacht wurde. Vermutet wird daher, daß der schwere Herzscheidewanddefekt durch Ausfall von SDF-1 bzw. CXCR-4 zu einer embryonalen Migrationstörung des Herzseptums führt (McGrath et al., 1999).

Die erhaltenen Daten dieser Arbeit lassen vermuten, daß es sich wahrscheinlich um den Ausfall der im Herzen gefundenen, dominierenden SDF-1 γ Form handeln könnte. Zusätzlich ist SDF-1 γ auch die Hauptform im adulten Nervensystem (Gleichmann et al., 2000). Auffällig ist daher, daß SDF-1 defiziente Maus Mutanten in beiden Geweben, Herz und Kleinhirn, die schwersten Defekte aufweisen und perinatal versterben.

Wir vermuten daher, daß der Ausfall der SDF-1 γ Isoform maßgeblich zu den letalen Defekten führt. In beiden Geweben konnte auch eine CXCR-4 mRNA Expression gezeigt werden. Ob SDF-1 γ an diesen Rezeptor bindet, wird zur Zeit untersucht. Welche Funktion SDF-1 γ und der Rezeptor nach abgeschlossener Embryonalentwicklung am Herzen haben, ist allerdings nicht bekannt.

Aus der Literatur war bekannt, daß im menschlichen Blut SDF-1 α die dominierende Isoform ist. In dieser Arbeit konnte im Blut der Maus und der Ratte zusätzlich SDF-1 γ mRNA nachgewiesen werden. SDF-1 β mRNA konnte im Blut des Menschen, der Ratte und der Maus nicht amplifiziert werden.

Eine SDF-1 α und CXCR-4 Expression im Blut und im hämatopoetischen System ist seit langem bekannt (Kowalska et al., 2000; Onai et al., 2000; Nagasawa et al., 1996a; Nagasawa et al., 1996b, Loetscher et al., 1994; Nomura et al., 1993). Ursprünglich wurde SDF-1 aus dem Knochenmark der Maus isoliert (Tashiro et al., 1993; Nagasawa et al., 1994). Für die SDF-1 α Form wurde ein Funktionszusammenhang mit der B-Zellreifung beobachtet (Nagasawa et al., 1994). Beschrieben sind auch Funktionen in der Hämatopoese, Lympho- und Myelopoese (Bleul et al., 1996; Oberlin et al., 1996; Durig et al., 2000). Die neue SDF-1 γ Isoform ließ sich in der vorliegenden Arbeit im humanen Blut nicht nachweisen, so daß SDF-1 γ nicht maßgeblich an der Modulation von klassischen, humoralen Entzündungsreaktionen beteiligt sein kann.

Bekannt war, daß durch Northernblot-Analysen SDF-1 α/β Transkripte in Leber, Niere und Milz nachweisbar sind (Shirozu et al., 1994; Gleichmann et al., 2000). Passend dazu konnten in der Milz Transkripte aller SDF-1 Isoformen und des CXCR-4 Rezeptors nachgewiesen werden.

Der in dieser Arbeit geführte RT-PCR Nachweis von SDF-1 γ in multiplen Geweben läßt auf die Existenz eines weiteren Exons des SDF-1 Gens schließen. Lokalisiert wurde das humane sdf-1 Gen auf Chromosom 10q11.1. Vier Exons (I-IV) kodieren durch alternatives Spleißen für die SDF-1 α und SDF-1 β Isoform (Jiang et al., 1994; Shirozu et al., 1995). Durch Insertion eines neuen alternativen Exons IIIa zwischen das Exon III und IV, könnte es zur Bildung der dritten Isoform kommen.

Welche Funktionen die drei SDF-1 Isoformen haben und welche Form jeweils dominant für ein bestimmtes Gewebe ist, müssen weitere Northernblot-Analysen und Funktionsuntersuchungen zeigen. Möglich wäre auch eine zeitliche Regulation in der SDF-1 Expression. Gezeigt wurde das bereits für SDF-1 β und SDF-1 γ während der Gehirnentwicklung und nach Ischiasnerv-Läsion (Gleichmann et al., 2000).

SDF-1 γ und CXCR-4 Expression im Nervensystem (PNS/ZNS) der Ratte

Durch In situ Hybridisierung konnte hier gezeigt werden, daß SDF-1 γ und CXCR-4 im **PNS** der Ratte in myelinisierenden Schwannzellen exprimiert wird. Zusätzlich fand sich eine Expression beider Transkripte in Gefäßendothelien (Abb.4). Durch Kolokalisierung von SDF1 γ mit dem Schwannzell-Markerprotein S-100 konnte das sichelförmige Signal der ISH eindeutig dem Zytoplasma der Schwannzelle zugeordnet werden, das sich sichelförmig den Myelinringen im Nervenquerschnitt anlagert (Abb. 5). Ob CXCR-4 in denselben Schwannzellen exprimiert wird wie SDF-1 γ , konnte durch Kolokalisierung nicht ermittelt werden und bleibt noch zu zeigen. Allerdings konnte CXCR-4 mit Hilfe der Immunzytochemie zusätzlich in kultivierten Schwannzellen nachgewiesen werden. Das CXCR-4 Protein fand sich hauptsächlich in Perikarien und in flächenförmigen Bereichen der Zellfortsätze. Das spricht für eine zusätzliche Proteinlokalisierung außerhalb der Zellmembran und wurde von anderen Arbeitsgruppen ähnlich beobachtet (Bajetto et al., 1999b).

Ob SDF-1 β im Ischiasnerv vorkommt, konnte in der vorliegenden Arbeit durch ISH nicht eindeutig ermittelt werden. Durch die SDF-1 Sonde (SDF-1 β as) konnte das Vorkommen von SDF-1 β im Ischiasnerv nicht bestätigt, aber auch nicht ausgeschlossen werden. Die Problematik lag in der Generierung einer selektiven SDF-1 β Sonde, die bei einer Länge von 600-700nt komplementär zu allen SDF-1 Isoformen wird, so daß nur eine ISH mit Oligonukleotiden aus dem spezifischen β -Bereich wirklich Aufschluß bringen könnte. Vergleichend und als Kontrolle sollten hierbei auch Oligonukleotide aus spezifischen SDF-1 α , SDF-1 γ und CXCR-4 Bereichen untersucht werden.

In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte ein SDF-1 α Transkript im PNS nicht nachgewiesen werden, so daß die Hauptfunktion von SDF-1 α nicht im Nervensystem, sondern höchstwahrscheinlich im hämatopoetischen System zu vermuten ist (Kowalska et al., 2000; Onai et al., 2000; Nagasawa et al., 1996a; Nagasawa et al., 1996b; Loetscher et al., 1994; Nomura et al., 1993).

Die Funktion von SDF-1 γ bzw. SDF-1 β und CXCR-4 im PNS ist bislang unbekannt. Neben einer entwicklungsabhängigen und nach Ischiasnerv-Läsion regulierten SDF-1 β/γ Expression (Gleichmann et al., 2000) sind keine weiteren Daten zu SDF-1 im PNS bekannt. In dieser Arbeit wurde erstmalig durch ISH CXCR-4 mRNA in Schwannzellen nachgewiesen. Über eine Verteilung bzw. Funktion des CXCR-4 Rezeptors im PNS waren bisher noch keine Literaturdaten vorhanden. Denkbar ist, daß die funktionelle Bedeutung dieses SDF-1 Rezeptors nicht nur darin bestehen kann, Autoimmunprozesse und klassische Entzündungsreaktionen zu modulieren, sondern auch Signal- und Effektorfunktionen bei primär nicht entzündlichen Prozessen im Nervensystem auszuüben.

Beide Proteine, SDF-1 und CXCR-4, bieten somit genügend interessante Anhaltspunkte für weitere Analysen.

Im gesamten **ZNS** der Ratte konnte eine konstitutive und ubiquitäre, überwiegend neuronale SDF-1 γ und CXCR-4 Expression gezeigt werden. Ob SDF-1 β im ZNS transkribiert wird, konnte nicht eindeutig gezeigt werden. Ein SDF-1 α Transkript konnte erneut nicht nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der In situ Hybridisierung wurden Cortex, Hippocampus, Cerebellum, Bulbus olfactorius, Rückenmark und Corpus callosum untersucht.

Verschiedene Arbeiten (Nagasawa et al., 1996; Zou et al., 1998; Bajetto et al., 1999a) beschrieben bereits eine Expression von CXCR-4 in Retina, Hippocampus, Bulbus olfactorius, Cerebellum und Rückenmark, aber nie vergleichend mit dem einzigen Liganden des Rezeptors SDF-1. Speziell die neue Isoform SDF-1 γ ist in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht worden. Zusätzlich blieb im Gehirn der Ratte noch zu zeigen in welchem Zelltyp bzw. Zelltypen die mRNA des SDF-1 γ Chemokins und des CXCR-4 Rezeptors exprimiert wird.

Im adulten Gehirn zeigte sich eine ubiquitäre SDF-1 γ und CXCR-4 Expression in den Gebieten der grauen Substanz, mit der stärksten Expression in den Neuronen von Cortex, Hippocampus, den subcorticalen Kerngebieten (z.B. Induseum griseum), sowie im Cerebellum, hier besonders in den Purkinje Zellen. Die SDF-1 γ und CXCR-4 mRNA Expressionsmuster waren unabhängig vom untersuchten Hirnareal identisch. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse konnten Cortex- und Hippocampus-Neurone immunhistochemisch mit einem CXCR-4 Antikörper, bzw. einem Antikörper gegen den kodierenden Bereich von SDF-1, markiert werden. Das für SDF-1 und CXCR-4 ermittelte immunhistochemische Verteilungsmuster glich sich und entsprach zusätzlich dem des SDF-1 γ /CXCR-4 mRNA Verteilungsmusters der ISH. Eine Aussage, welche SDF-1 Isoform durch den Antikörper markiert wurde, konnte allerdings nicht gemacht werden. Ein spezifischer SDF-1 γ Antikörper existiert bislang nicht. Aufgrund der hier erhaltenen mRNA Daten sollte es sich um die SDF-1 γ Form handeln. Allerdings konnte eine zusätzliche Markierung des SDF-1 β Proteins nicht ausgeschlossen werden.

Ob CXCR-4 und SDF-1 γ gleichzeitig in derselben Zelle exprimiert werden und somit autoregulativ wirken könnten, bleibt noch zu zeigen.

CXCR-4 konnte zusätzlich mit Hilfe der Immunzytochemie in kultivierten Cortexneuronen nachgewiesen werden. Ohtani et al. (1998) fanden in Cortexneuronen nicht nur CXCR-4, sondern auch eine SDF-1 Expression. Auch in kultivierten Astrozyten der Ratte konnten beide Proteine nachgewiesen werden (Ohtani et al., 1998). Eine Astrozytenexpression des CXCR-4 Rezeptors wurde in der Literatur mehrfach erwähnt (Bajetto et al., 1999a; Dorf et al., 2000).

In dieser Arbeit konnte *in vivo* weder auf mRNA, noch auf Proteinebene eine SDF-1 γ und CXCR-4 Lokalisation in Astrozyten gezeigt werden.

Über eine SDF-1 bzw. CXCR-4 Expression im Rückenmark der Ratte war bisher nichts bekannt. Es gab nur Daten über eine CXCR-4 Expression im Rückenmark der Maus (Sehgal et al., 1998a) und erste Untersuchungen von M. Gleichmann zur SDF-1 Expression mit einer unspezifischen SDF-1 γ / β Sonde, so daß keine Rückschlüsse über die gefundene SDF-1 Isoform gemacht werden konnten.

Mit einer spezifischen SDF-1 γ und CXCR-4 Sonde wurden in dieser Arbeit erstmalig deutliche Hybridisierungssignale in Neuronen der grauen Substanz gefunden. Die kräftigste Markierung zeigten dabei die Motoneurone. Auffällig war, daß die SDF-1 γ und CXCR-4 mRNA Sonden ein identisches

Hybridisierungsmuster im Rückenmark der adulten Ratte zeigten. In weiteren Untersuchungen konnte SDF-1 γ und CXCR-4 mRNA in Motoneuronen kolokalisiert werden. Der Chemokin Rezeptor CXCR-4 wird in derselben Zelle transkribiert wie die neue Isoform SDF-1 γ . In Motoneuronen läßt dies somit auf eine cis Wirkung von SDF-1 γ auf den CXCR-4 Rezeptor schließen, falls diese Isoform an den Rezeptor binden sollte.

Auch in der weißen Substanz des Rückenmarks zeigten sich zahlreiche Signale mit der entsprechenden SDF-1 und CXCR-4 Sonde. Allerdings war eine genaue Zuordnung dieser Zellen zu einem Zelltyp nicht möglich. Wahrscheinlich handelte es sich um Gliazellen und/oder Interneurone.

In der weißen Substanz des Gehirns konnten SDF-1 γ und CXCR-4 Transkripte in Oligodendroglia nachgewiesen werden. Im Corpus callosum konnte SDF-1 γ und CXCR-4 mRNA in Oligodendrozyten nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß das Chemokin SDF-1 γ und der CXCR-4 Rezeptor mehrfach zellulären Ursprungs sind und somit ganz verschiedene Zielzellen und Strukturen beeinflussen müssen.

Beobachtet wurde, daß SDF-1 γ immer zeitgleich mit dem CXCR-4 Rezeptor exprimiert wird, was auf eine Autoregulation hinweisen könnte. Die funktionelle Bedeutung der gleichzeitigen Expression ist jedoch bislang unklar.

Wahrscheinlich wirkt SDF-1 γ einerseits sukzessiv in Signalkaskaden (Signalvermittlung), andererseits werden verschiedene Chemokine bzw. Isoformen häufig zeitgleich induziert. All dies erschwert die Beurteilung des funktionellen Beitrags des neuen SDF-1 γ Chemokins in einem komplexen Zusammenhang wie dem des Nervensystems erheblich. Bislang gab es keine vergleichenden oder funktionellen Untersuchungen zu SDF-1 und CXCR-4 im Nervensystem.

Interessant wären zusätzlich weiterführende SDF-1 γ und CXCR-4 Experimente in einem pathologischen Zusammenhang, z.B. in ischämischen bzw. traumatischen Hirnläsionen, Nervenfaserdurchtrennungen und neurodegenerativen Erkrankungen.

Ein Vergleich mit der Expression anderer Chemokine ist schwierig, da die überwiegende Cytokinexpression im Nervensystem bisher meist im Kontext autoimmunologischer und entzündlicher Erkrankungen wie der experimentell autoimmunen Enzephalomyelitis gesehen wurde. Erst seit kurzem ist bekannt, daß auch nicht-immunologische Läsionsparadigmen, wie Nervenfaserdurchtrennungen, ischämische Hirninfarkte und neurodegenerative Erkrankungen zu einer erhöhten Chemokinexpression im Nervensystem führen.

Entwicklungsabhängige SDF-1 γ und CXCR-4 Expression im ZNS der Ratte

Im Gegensatz zu vielen anderen funktionellen Chemokinrezeptoren wird der sieben-transmembran Rezeptor CXCR-4 bereits sehr früh während der Embryonalentwicklung der Ratte exprimiert (Jazin et al., 1997). In dieser Arbeit wurde daher für die ISH ein möglichst frühes embryonales Stadium des Rattenhirns untersucht. Begonnen wurde die Analyse am embryonalen Tag 17. Zusätzlich ist eine sehr weite Verbreitung von CXCR-4 während der Immunsystem- und während der Hirn-Entwicklung in proliferierenden Bereichen beschrieben worden. Kein anderer Chemokinrezeptor weist eine derartige Verteilung auf (Bleul et al., 1996) und ist so stark konserviert (Jazin et al., 1993). Das legt die Vermutung nahe, daß dieses ausgeprägte Verteilungsmuster des CXCR-4 Rezeptors während der Entwicklung für eine multiple biologische Funktion von SDF-1 sprechen könnte (Nagasawa et al., 1996a).

Daher wurden hier die mRNA Verteilungsmuster von CXCR-4 und SDF-1 γ im sich entwickelnden ZNS der Ratte miteinander verglichen. Eine ubiquitäre, neuronale SDF-1 Verteilung in der Hirnentwicklung der Ratte wurde in der Literatur bereits mit einer Familiensonde aus dem kodierenden SDF-1 Bereich beschrieben (Tham et al., 2001), allerdings ohne einen CXCR-4 Rezeptor-Expressionsvergleich und ohne Aussage zur betreffenden SDF-1 Isoform.

Die hier durchgeführten Untersuchung von embryonalen (E17) und postnatalen (P4 bis Adult) Cortex-Hippocampus Bereichen zeigte, daß während der gesamten Entwicklung eine ubiquitäre, überwiegend neuronale Expression von SDF-1 γ und CXCR-4 vorlag. Dieses Expressionsmuster herrschte auch im adulten Tier vor (Abb: 6 bis 9). Zusätzlich konnten mit der SDF-1 γ und CXCR-4 Sonde in den Cortex-Hippocampus Strukturen identische mRNA Verteilungsmuster gefunden werden. Eine Expression von SDF-1 und CXCR-4 in derselben Zelle könnte dadurch möglich sein.

Tanabe et al. konnten 1997 zeigen, daß im Kleinhirn die Migration von mikroglialen Zellen und Astrozyten durch SDF-1 induziert wird (Tanabe et al., 1997a). CXCR-4, der einzige bis heute bekannte Rezeptor für SDF-1 (Bleul et al., 1996; Oberlin et al., 1996) wird auf einer Vielzahl von Zellen im Gehirn exprimiert, einschließlich Mikroglia, Astrozyten und Neuronen (Wong et al., 1996; Lavi et al., 1997; Banisadr et al., 2000; Lazarini et al., 2000). Daher ist es nicht verwunderlich, daß eine Expression von SDF-1 und CXCR-4 während der Embryogenese für die Ausbildung der korrekten Kleinhirnanatomie zwingend notwendig ist. CXCR-4 und SDF-1 defiziente Maus Mutanten (*knockout* Mäuse) zeigen beide eine Vielzahl multipler Defekte, unter anderem eine identische, strukturabweichende Architektur des Kleinhirns (Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998). Zou et al. fanden eine abnorme Migration der cerebellären Externen-Granulären-Schicht (EGS) mit ektopisch liegenden granulären Zellen, die als dislozierte Zellaggregate unterhalb der Purkinje-Zell-Schicht (PZS) zu finden waren. Die abnorm liegenden Zellaggregate wurden durch Antikörpermarkierung gegen das Math 1 Protein, Marker für externe granuläre Zellen, detektiert. Beide Typen von *knockout* Mäusen waren nicht lebensfähig und starben perinatal.

In diesem Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit die normale Verteilung von SDF-1 und CXCR-4 während der gesamten Kleinhirnentwicklung gezeigt werden. Von besonderem Interesse war hier das physiologische Expressionsmuster der neuen SDF-1 γ Isoform, Hauptisoform im adulten Nervensystem, und des putativen SDF-1 γ Rezeptors, CXCR-4.

Während der gesamten Kleinhirn Entwicklung und im adulten Tier (E17 bis Adult) konnte, genauso wie in der Cortex-Hippocampus Entwicklung, eine ubiquitäre, überwiegend neuronale SDF-1 γ und CXCR-4 mRNA Expression gezeigt werden (Abb: 10 bis 11). Das gleiche Verteilungsmuster schloß auch neuronale Vorläuferzellen mit ein. Im Kleinhirn konnte zu keinem Zeitpunkt eine Markierung der weißen Substanz gezeigt werden. Auffällig war auch hier, daß erneut die mRNA Expressionsmuster von SDF-1 und CXCR-4 identisch waren. Dieses gleichbleibende und einheitliche Expressionsmuster läßt sicherlich auf eine, auch nach der abgeschlossenen Kleinhirnentwicklung, wichtige Rolle von SDF-1, besonders aber von SDF-1 γ und CXCR-4, schließen.

Unabhängig von der Ausbildung der Kleinhirnarchitektur und der Cortex-Hippocampus Entwicklung scheint das SDF-1 Chemokin auch über das Entwicklungsstadium hinaus für andere, unbekannte Prozesse verantwortlich zu sein.

Das stärkste Signal in der ISH erzeugte immer die SDF-1 β antisense Sonde, die alle Isoformen von SDF-1 detektieren konnte, so daß sich dadurch keine Aussage zur Expression von SDF-1 β machen ließ.

Möglich ist, daß diese Sonde, die im kodierenden Bereich aller SDF-1 Isoformen liegt, nur SDF-1 γ erkannte, falls dies die einzige Isoform war, die exprimiert wurde. Möglich ist noch eine zeitlich versetzte Expression beider SDF-1 Isoformen während der Entwicklung (Gleichmann et al., 2000).

Rezeptorbindung zwischen CXCR-4 und SDF-1 γ

Für SDF-1 γ und CXCR-4 konnte in der hier vorliegenden Arbeit ein identisches Expressionsmuster im Nervensystem der Ratte gezeigt werden. Kolo-kalisierung von SDF-1 γ und CXCR-4 war in denselben Zellen des 2. Motoneurons im Rückenmark der Ratte möglich. CXCR-4 ist der einzige bekannte Rezeptor für SDF-1. SDF-1 α und SDF-1 β Bindung an den Rezeptor konnte durch Bindungs-Analysen gezeigt werden (Crump et al., 1997; Loetscher et al., 1998). Auch im Gehirn der Ratte konnte eine SDF-1 α Bindung an den CXCR-4 Rezeptor gezeigt werden (Banisadr et al., 2000).

Ob SDF-1 γ an den Rezeptor bindet, wird zur Zeit in unserem Labor untersucht. Weiterhin wäre von Interesse, ob SDF-1 γ autoregulatorisch auf den CXCR-4 Rezeptor wirken kann.

Für die Rezeptorbindung ist der N-Terminus des SDF-1 Proteins verantwortlich. Struktur-Aktivitätsanalysen zeigten, daß die ersten acht Aminosäuren des N-Terminus für die Rezeptorbindung verantwortlich sind. Für die Rezeptoraktivierung sind allerdings nur die ersten beiden Aminosäuren verantwortlich (Crump et al., 1997; Loetscher et al., 1998; Elisseeva et al., 2000). Bei allen SDF-1 Isoformen ist der N-Terminus identisch, so daß eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, daß auch SDF-1 γ an den Rezeptor bindet und ihn aktiviert. Im Nervensystem haben SDF-1 γ und CXCR-4 zusätzlich ein identisches Expressionsmuster, und SDF-1 γ ist hier die dominante SDF-1 Isoform (Gleichmann et al., 2000).

Der N-Terminus des CXCR-4 Rezeptors bindet SDF-1. Eine Aktivierung erfolgt durch Interaktion mit der zweiten extrazellulären Schleife des sieben-transmembran Rezeptors (Doranz et al., 1999; Brelot et al., 2000). Nach der Aktivierung kommt es zur Auslösung einer Signaltransduktion mit Induktion der Proteinkinase B und einer Internalisierung des Rezeptors (Haribabu et al., 1997; Ganju et al., 1998; Tilton et al., 2000).

Der CXCR-4 Rezeptor ist zusätzlich ein Korezeptor für das HIV-1 (Feng et al., 1996; Dealwis et al., 1998; Willett et al., 1998). Allerdings kann die native SDF-1 α/β Form die HIV-1 Permissivität in verschiedene Zielzellen inhibieren (Bleul et al., 1996; Oberlin et al., 1996). SDF-1 Agonisten, nach Modifizierung der ersten beiden Aminosäuren bzw. kurze Peptide aus dem N-Terminus (Rest: 3-8), zeigten das auch, so daß dadurch eine HIV-1 Infektion, ohne Rezeptoraktivierung, verhindert werden konnte. Dies bietet eine weitere Möglichkeit der HIV-1 Prävention und wird daher intensiv erforscht (Hoffman et al., 2000).

Ob SDF-1 γ agonistisch oder antagonistisch auf den Rezeptor wirkt, z.B. im Hinblick auf eine mögliche Prävention einer HIV-1 Infektion, könnte weitere Aufschlüsse zur Rezeptorbindung und Hinweise für die Herstellung neuer Antagonisten geben. Welche Auswirkung der zusätzliche C-Terminus auf die Rezeptorbindung und -aktivierung hat, bleibt daher noch zu untersuchen.

SDF-1 γ und PAM Expression: Entstehung von Neuropeptiden?

Bei der gewebespezifischen SDF-1 mRNA Expression zeigte ein Vergleich mit der PAM (Peptidyl-Glycin- α -amidierende-Monooxygenase) Expression, als katalysierendem Enzym und SDF-1 γ als möglichem Substrat der α -Amidierung und Bildung von Neuropeptiden, viele Übereinstimmungen im Expressionsmuster.

Im peripheren Nervensystem erfolgt die PAM Expression in Schwannzellen und im Ischiasnerv (Rhodes et al., 1990; Schafer et al., 1992; Eipper et al., 1992a; Eipper et al., 1992b). In beiden Zelltypen wurden in dieser Arbeit auch SDF-1 und der CXCR-4 Rezeptor nachgewiesen. In rein afferenten Neuronen konnte keine PAM Expression gezeigt werden (Schafer et al., 1992). Dieses Ergebnis korreliert gut mit den hier erhaltenen Daten im humanen, rein afferenten N. suralis. In diesem peripheren Nerven konnte weder SDF-1 noch CXCR-4 cDNA amplifiziert werden.

Im zentralen Nervensystem findet sich das PAM Enzym in vielen Hirnbereichen der adulten Ratte, mit Ausnahme der fehlenden PAM Expression im Kleinhirn (Schafer et al., 1992).

Die durchgeführte PCR-Analyse zeigte, daß SDF-1 und CXCR-4 mRNA im adulten Gehirn der Ratte exprimiert werden. Schafer et al. konnten 1992 durch In situ Hybridisierung und Immunhistochemie ein detailliertes Verteilungsmuster für das PAM Enzym veröffentlichen, das weitgehend mit dem erhaltenen SDF-1 γ und CXCR-4 mRNA Expressionsmuster in dieser Arbeit übereinstimmt. Eine starke PAM Expression findet sich im ZNS überwiegend in Neuronen des Neocortex, Hippocampus und Bulbus olfactorius. Aber auch Oligodendroglia enthalten das PAM Enzym (Rhodes et al., 1990; Rhodes et al., 1991). Eine besonders starke PAM Expression findet sich in Hippocampusneuronen, für die zum Teil noch keine entsprechenden α -amidierten Peptide bekannt sind (Schafer et al., 1992).

Außerhalb des Nervensystems konnte im Herzen SDF-1 β , SDF-1 γ und CXCR-4 Rezeptor RNA nachgewiesen werden. Im Vorhof und in der Herzkammer ist eine hohe PAM Expression beschrieben worden, ohne daß bekannte α -amidierte Peptide in diesen Bereichen lokalisiert sind (Stoffers et al., 1989). Im Herzgewebe finden sich somit zwei Liganden (SDF-1 β / SDF-1 γ) für eine Proteolyse und SDF-1 γ als mögliches Substrat der α -Amidierung. Zusätzlich wird auch der Rezeptor CXCR-4 im Herzen exprimiert. Gut vereinbar sind diese Daten mit den SDF-1 und CXCR-4 defizienten Maus Mutanten, die neben multiplen Defekten auch einen schweren Ventrikel-Septumsdefekt (VSD) am Herzen aufweisen (Nagasawa et al., 1996a; Ma et al., 1998). Über eine SDF-1 Funktion im Herzen ist allerdings nichts bekannt.

Neben einer PAM Expression in der Lunge (Saldise et al., 1996), gibt es keine weiteren Literaturdaten über eine PAM Expression außerhalb des Nervensystems.

Ob eine Proteolyse von SDF-1 β / γ im Nervensystem stattfindet, basiert bislang nur auf Vermutungen. Es handelt sich hier lediglich um eine hypothetische Annahme, daß SDF-1 γ ein Vorläuferprotein für α -amidierte Neuropeptide ist.

Um eine Aussage über diese putativen Neuropeptide machen zu können, ist es unerlässlich die mögliche Peptidabspaltung von SDF-1 β/γ und die Amidierung von SDF-1 γ auf Proteinebene nachzuweisen. Dadurch könnten sich deutliche Unterscheidungsmerkmale zwischen den drei bekannten SDF-1 Proteinen ergeben. Allerdings bedarf das noch der Bestätigung durch weitere Experimente.

Ausblicke

In der vorliegenden Arbeit wurden erste Evidenzen für wichtige regulatorische Funktionen von SDF-1 und CXCR-4 im Nervensystem aufgeführt, die weit über Entstehung, Ausbreitung und Limitierung von Entzündungsreaktionen, für die Chemokine ursächlich verantwortlich gemacht werden, hinausgehen. Die Tatsache, daß SDF-1 γ und CXCR-4 in jeder Hirnregion ubiquitär neuronal exprimiert werden, unterstreicht ihre breite Bedeutung, gestaltet aber andererseits die Evaluierung ihrer spezifischen Funktionen in der Physiologie und Pathophysiologie schwierig.

SDF-1, speziell aber SDF-1 γ und CXCR-4 könnten im Nervensystem für eine Reihe interessanter Interaktionen zwischen Neuronen und Gliazellen, Pathogenen und dem Immunsystem verantwortlich sein.

Eine weitere Funktionsaufklärung könnte z.B. zum Verständnis der Hirnpathologie während der HIV assoziierten Demenz beitragen. Sie könnte helfen, die pathologischen Prozesse der neurologischen Dysfunktionen zu verstehen und zu therapieren. Die hohe CXCR-4 Dichte im Gehirn kann zu einer HIV-1 Infektion jedes Hirnbereichs führen. Gleichzeitig bietet der CXCR-4 Rezeptor durch Rezeptorblockadestrategien eine neue Form der HIV-1 Prävention, z.B. durch SDF-1 γ modifizierte Proteine an.

Die weitverbreitete Expression des CXCR-4 Rezeptors im adulten Gehirn der Ratte läßt außerdem auf eine wichtige Funktion von SDF-1 im gesunden Hirngewebe, wahrscheinlich aber auch während einer Infektion oder Hirnläsion, schließen. Die Erforschung der α -Chemokine und des CXCR-4 Rezeptors bietet daher eine Reihe interessanter Ansatzpunkte, so z.B. zu Fragen nach der SDF-1 Funktion während der Regeneration postläsionaler Nervenzellen und mögliche Therapieansätze.

Eine zusätzliche Entstehung neuer Neuropeptide könnte zu einer Reihe ganz neuer biologischer Funktionen der α -Chemokine führen, die sich z.B. in einer synaptischen Modulation (Modulation der neuronalen, synaptischen Erregungsübertragung) äußern könnten. Allerdings muß die Neuropeptid-entstehung noch *in vivo* gezeigt werden. Wo und an welchen Rezeptoren diese Peptide wirken und binden bliebe zusätzlich noch zu zeigen.

Die α -Chemokine, speziell die SDF-1 Isoformen haben sich so zunehmend aus dem ausschließlich immunologischen Betrachtungswinkel entfernt und sind zu einem wichtigen Gegenstand auch der neurobiologischen Grundlagenforschung geworden. Die Tatsache, daß SDF-1 und der CXCR-4 Rezeptor fast in jeder Hirnregion exprimiert werden, unterstreicht ihre breite Bedeutung, gestaltet aber die Evaluierung ihrer spezifischen Funktionen im Nervensystem schwierig.

6. ZUSAMMENFASSUNG

SDF-1 gehört zur Familie der α -Chemokine und wird genauso wie der CXCR-4 Rezeptor in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. CXCR-4 ist der einzige bekannte Rezeptor für SDF-1. Drei SDF-1 Isoformen, SDF-1 α , SDF-1 β und SDF-1 γ sind bekannt.

Durch die Methode der In situ Hybridisierung wurde gezeigt, daß SDF-1 γ und CXCR-4 mRNA im peripheren Nerv in Schwannzellen und im zentralen Nervensystem ubiquitär vorkommt. Am stärksten wurde die mRNA in Neuronen in der grauen Substanz exprimiert. In den Motoneuronen des Rückenmarks wurde SDF-1 γ mit CXCR-4 kolokalisiert.

Das für SDF-1 γ und CXCR-4 ermittelte immunhistochemische Verteilungsmuster im Cortex und Hippocampus entsprach dem des mRNA Musters, das mit der ISH Methode ermittelt wurde. Der Rezeptor wurde zusätzlich immunzytochemisch in Cortexneuronen nachgewiesen.

In der weißen Substanz zeigten sich SDF-1 γ und CXCR-4 Transkripte in Oligodendroglia. Die SDF-1 γ und Rezeptor mRNA Expressionsmuster waren identisch.

Embryonale, postnatale und adulte Hirnbereiche zeigten, daß auch während der gesamten Entwicklung eine ubiquitäre, überwiegend neuronale Expression von SDF-1 γ und CXCR-4 vorlag. Auch während der gesamten Cortex-Hippocampus- und Kleinhirn-Entwicklung konnten, wie im adulten Nervensystem, identische mRNA Verteilungsmuster zwischen SDF-1 γ und CXCR-4 gefunden werden. Die Bindung von SDF-1 γ an den CXCR-4 Rezeptor muß allerdings durch weitere Experimente belegt werden.

Die ubiquitäre Expression von SDF-1 γ und CXCR-4 mRNA bzw. Rezeptorprotein im Nervensystem der Ratte läßt entweder auf eine grundlegende SDF-1 γ Funktion oder auf mehrere, durch mögliche Rezeptordiversität vermittelte Funktionen schließen.

Eine Funktion im Zusammenhang mit entzündungsvermittelnden Reaktionen ist für SDF-1 als Chemokinfamilien-Mitglied zwar auch grundsätzlich denkbar, wegen der ubiquitären Genexpression im Gehirn aber eher unwahrscheinlich. Wahrscheinlich sind die α -Chemokine für das Nervensystem genauso essentiell wie für die Funktion des Immunsystem. Darüber hinaus scheinen sie auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems zu spielen.

Ein Vergleich mit der PAM (Peptidyl-Glycin- α -amidierende-Monooxygenase) Expression als katalysierendem Enzym und SDF-1 γ als möglichem Substrat der α -Amidierung zeigte viele Übereinstimmungen im Expressionmuster. Eine ubiquitäre SDF-1 γ Expression im adulten Gehirn läßt sich gut mit einem möglichen Vorläuferprotein der α -Amidierung vereinbaren. Allerdings bedarf die Hypothese von SDF-1 γ als Vorläuferprotein von Neuropeptiden noch der Bestätigung durch weitere Experimente, die einen direkten Peptidnachweis auf Proteinebene einschließen.

7. LITERATURNACHWEIS

- Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**:565-568.
- Bajetto, A., Bonavia, R., Barbero, S., Florio, T., Costa, A., and Schettini, G. (1999a). Expression of chemokine receptors in the rat brain. *Ann N Y Acad Sci* **876**:201-209.
- Bajetto, A., Bonavia, R., Barbero, S., Piccioli, P., Costa, A., Florio, T., and Schettini, G. (1999b). Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1. *J Neurochem* **73**:2348-2357.
- Bandres, J. C., Wang, Q. F., O'Leary, J., Baleaux, F., Amara, A., Hoxie, J. A., Zolla-Pazner, S., and Gorny, M. K. (1998). Human immunodeficiency virus (HIV) envelope binds to CXCR4 independently of CD4, and binding can be enhanced by interaction with soluble CD4 or by HIV envelope deglycosylation. *J Virol* **72**:2500-2504.
- Banisadr, G., Dicou, E., Berbar, T., Rostene, W., Lombet, A., and Haour, F. (2000). Characterization and visualization of [¹²⁵I] stromal cell-derived factor-1alpha binding to CXCR4 receptors in rat brain and human neuroblastoma cells. *J Neuroimmunol* **110**:151-160.
- Berger, T. and Frotscher, M. (1994). Distribution and morphological characteristics of oligodendrocytes in the rat hippocampus in situ and in vitro: an immunocytochemical study with the monoclonal Rip antibody. *J Neurocytol* **23**:61-74.
- Berson, J. F., Long, D., Doranz, B. J., Rucker, J., Jirik, F. R., and Doms, R. W. (1996). A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T- cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol* **70**:6288-6295.
- Bleul, C. C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T. A. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* **382**:829-833.
- Brelot, A., Heveker, N., Montes, M., and Alizon, M. (2000). Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities. *J Biol Chem* **275**:23736-23744.
- Burger, J. A., Tsukada, N., Burger, M., Zvaifler, N. J., Dell'Aquila, M., and Kipps, T. J. (2000). Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* **96**:2655-2663.
- Caruz, A., Samsom, M., Alonso, J. M., Alcami, J., Baleux, F., Virelizier, J. L., Parmentier, M., and Arenzana-Seisdedos, F. (1998). Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene. *FEBS Lett* **426**:271-278.

- Catani, M. V., Corasaniti, M. T., Navarra, M., Nistico, G., Finazzi-Agro, A., and Melino, G. (2000). gp120 induces cell death in human neuroblastoma cells through the CXCR4 and CCR5 chemokine receptors. *J Neurochem* **74**:2373-2379.
- Crump, M. P., Gong, J. H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J. L., Baggiolini, M., Sykes, B. D., and Clark-Lewis, I. (1997). Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J* **16**:6996-7007.
- Davis, C. B., Dikic, I., Unutmaz, D., Hill, C. M., Arthos, J., Siani, M. A., Thompson, D. A., Schlessinger, J., and Littman, D. R. (1997). Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J Exp Med* **186**:1793-1798.
- Dealwis, C., Fernandez, E. J., Thompson, D. A., Simon, R. J., Siani, M. A., and Lolis, E. (1998). Crystal structure of chemically synthesized [N33A] stromal cell-derived factor 1alpha, a potent ligand for the HIV-1 "fusin" coreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:6941-6946.
- Doranz, B. J., Orsini, M. J., Turner, J. D., Hoffman, T. L., Berson, J. F., Hoxie, J. A., Peiper, S. C., Brass, L. F., and Doms, R. W. (1999). Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine receptor functions. *J Virol* **73**:2752-2761.
- Dorf, M. E., Berman, M. A., Tanabe, S., Heesen, M., and Luo, Y. (2000). Astrocytes express functional chemokine receptors [In Process Citation]. *J Neuroimmunol* **111**:109-121.
- Durig, J., Rosenthal, C., Elmaagacli, A., Heyworth, C., Halfmeyer, K., Kasper, C., Novotny, J., and Duhrsen, U. (2000). Biological effects of stroma-derived factor-1 alpha on normal and CML CD34+ haemopoietic cells. *Leukemia* **14**:1652-1660.
- Eipper, B. A., Green, C. B., Campbell, T. A., Stoffers, D. A., Keutmann, H. T., Mains, R. E., and Ouafik, L. (1992b). Alternative splicing and endoproteolytic processing generate tissue-specific forms of pituitary peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase (PAM). *J Biol Chem* **267**:4008-4015.
- Eipper, B. A., Stoffers, D. A., and Mains, R. E. (1992a). The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. *Annu Rev Neurosci* **15**:57-85.
- Eipper, B. A., Milgram, S. L., Husten, E. J., Yun, H. Y., and Mains, R. E. (1993). Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase: a multifunctional protein with catalytic, processing, and routing domains. *Protein Sci* **2**:489-497.
- Elisseeva, E. L., Slupsky, C. M., Crump, M. P., Clark-Lewis, I., and Sykes, B. D. (2000). NMR studies of active N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1. Structural basis for receptor binding. *J Biol Chem* **275**:26799-26805.

Endres, M. J., Clapham, P. R., Marsh, M., Ahuja, M., Turner, J. D., McKnight, A., Thomas, J. F., Stoebenau-Haggarty, B., Choe, S., Vance, P. J., Wells, T. N., Power, C. A., Sutterwala, S. S., Doms, R. W., Landau, N. R., and Hoxie, J. A. (1996). CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* **87**:745-756.

Federspiel, B., Melhado, I. G., Duncan, A. M., Delaney, A., Schappert, K., Clark-Lewis, I., and Jirik, F. R. (1993). Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen. *Genomics* **16**:707-712.

Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**:872-877.

Fleischhauer, K. and Wartenberg, H. (1967). [Electron microscopic studies of the growth of nerve fibers and of the appearance of myelin sheath in the corpus callosum of the cat]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **83**:568-581.

Ganju, R. K., Brubaker, S. A., Meyer, J., Dutt, P., Yang, Y., Qin, S., Newman, W., and Groopman, J. E. (1998). The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* **273**:23169-23175.

Gendelman, H. E., Orenstein, J. M., Martin, M. A., Ferrua, C., Mitra, R., Phipps, T., Wahl, L. A., Lane, H. C., Fauci, A. S., Burke, D. S., and . (1988). Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1-treated monocytes. *J Exp Med* **167**:1428-1441.

Gillen, C., Gleichmann, M., Spreyer, P., and Muller, H. W. (1995). Differentially expressed genes after peripheral nerve injury. *J Neurosci Res* **42**:159-171.

Glass, J. D., Fedor, H., Wesselingh, S. L., and McArthur, J. C. (1995). Immunocytochemical quantitation of human immunodeficiency virus in the brain: correlations with dementia. *Ann Neurol* **38**:755-762.

Gleichmann M., Dissertation, 1996 (Medizinische Fakultät der Universität Düsseldorf). Klonierung und Charakterisierung postläsional regulierter cDNA im Ischiasnerv der Ratte.

Gleichmann, M., Gillen, C., Czardybon, M., Bosse, F., Greiner-Petter, R., Auer, J., and Muller, H. W. (2000). Cloning and characterization of SDF-1gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. *Eur J Neurosci* **12**:1857-1866.

Gupta, S. K., Lysko, P. G., Pillarisetti, K., Ohlstein, E., and 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.

Haribabu, B., Richardson, R. M., Fisher, I., Sozzani, S., Peiper, S. C., Horuk, R., Ali, H., and Snyderman, R. (1997). Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *J Biol Chem* **272**:28726-28731.

Herbein, G., Mahlkecht, U., Batliwalla, F., Gregersen, P., Pappas, T., Butler, J., O'Brien, W. A., and Verdin, E. (1998). Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature* **395**:189-194.

Herzog, H., Hort, Y. J., Shine, J., and Selbie, L. A. (1993). Molecular cloning, characterization, and localization of the human homolog to the reported bovine NPY Y3 receptor: lack of NPY binding and activation. *DNA Cell Biol* **12**:465-471.

Hesselgesser, J., Halks-Miller, M., DeVecchio, V., Peiper, S. C., Hoxie, J., Kolson, D. L., Taub, D., and Horuk, R. (1997). CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Curr Biol* **7**:112-121.

Hesselgesser, J., Taub, D., Baskar, P., Greenberg, M., Hoxie, J., Kolson, D. L., and Horuk, R. (1998a). Neuronal apoptosis induced by HIV-1 gp120 and the chemokine SDF-1 alpha is mediated by the chemokine receptor CXCR4. *Curr Biol* **8**:595-598.

Hesselgesser, J., Liang, M., Hoxie, J., Greenberg, M., Brass, L. F., Orsini, M. J., Taub, D., and Horuk, R. (1998b). Identification and characterization of the CXCR4 chemokine receptor in human T cell lines: ligand binding, biological activity, and HIV-1 infectivity. *J Immunol* **160**:877-883.

Hesselgesser, J. and Horuk, R. (1999). Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *J Neurovirol* **5**:13-26.

Hoffman, T. L., Canziani, G., Jia, L., Rucker, J., and Doms, R. W. (2000). A biosensor assay for studying ligand-membrane receptor interactions: binding of antibodies and HIV-1 env to chemokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:11215-11220.

Horuk, R., Martin, A. W., Wang, Z., Schweitzer, L., Gerassimides, A., Guo, H., Lu, Z., Hesselgesser, J., Perez, H. D., Kim, J., Parker, J., Hadley, T. J., and Peiper, S. C. (1997). Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system. *J Immunol* **158**:2882-2890.

Horuk, R. (1998). Chemokines beyond inflammation. *Nature* **393**:524-525.

Jazin, E. E., Yoo, H., Blomqvist, A. G., Yee, F., Weng, G., Walker, M. W., Salon, J., Larhammar, D., and Wahlestedt, C. (1993). A proposed bovine neuropeptide Y (NPY) receptor cDNA clone, or its human homologue, confers neither NPY binding sites nor NPY responsiveness on transfected cells. *Regul Pept* **47**:247-258.

Jazin, E. E., Soderstrom, S., Ebendal, T., and 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.

Jiang, W., Zhou, P., Kahn, S. M., Tomita, N., Johnson, M. D., and Weinstein, I. B. (1994). Molecular cloning of TPAR1, a gene whose expression is repressed by the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA). *Exp Cell Res* **215**:284-293.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., and Jessell, T. M. (1991). Principles of Neural Science. 3rd edit. Elsevier, New York.

Kaul, M. and Lipton, S. A. (1999). Chemokines and activated macrophages in HIV gp120-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:8212-8216.

Kolson, D. L., Lavi, E., and Gonzalez-Scarano, F. (1998). The effects of human immunodeficiency virus in the central nervous system. *Adv Virus Res* **50**:1-47.

Kowalska, M. A., Ratajczak, M. Z., Majka, M., Jin, J., Kunapuli, S., Brass, L., and Poncz, M. (2000). Stromal cell-derived factor-1 and macrophage-derived chemokine: 2 chemokines that activate platelets. *Blood* **96**:50-57.

Lapham, C. K., Ouyang, J., Chandrasekhar, B., Nguyen, N. Y., Dimitrov, D. S., and Golding, H. (1996). Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* **274**:602-605.

Lavi, E., Strizki, J. M., Ulrich, A. M., Zhang, W., Fu, L., Wang, Q., O'Connor, M., Hoxie, J. A., and Gonzalez-Scarano, F. (1997). CXCR-4 (Fusin), a co-receptor for the type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1), is expressed in the human brain in a variety of cell types, including microglia and neurons. *Am J Pathol* **151**:1035-1042.

Lavi, E., Kolson, D. L., Ulrich, A. M., Fu, L., and Gonzalez-Scarano, F. (1998). Chemokine receptors in the human brain and their relationship to HIV infection. *J Neurovirol* **4**:301-311.

Lazarini, F., Casanova, P., Tham, T. N., De Clercq, E., Arenzana-Seisdedos, F., Baleux, F., and Dubois-Dalcq, M. (2000). Differential signalling of the chemokine receptor CXCR4 by stromal cell-derived factor 1 and the HIV glycoprotein in rat neurons and astrocytes. *Eur J Neurosci* **12**:117-125.

Limatola, C., Giovannelli, A., Maggi, L., Ragozzino, D., Castellani, L., Ciotti, M. T., Vacca, F., Mercanti, D., Santoni, A., and Eusebi, F. (2000). SDF-1alpha-

mediated modulation of synaptic transmission in rat cerebellum. *Eur J Neurosci* **12**:2497-2504.

Littman, D. R. (1998). Chemokine receptors: keys to AIDS pathogenesis? *Cell* **93**:677-680.

Loetscher, M., Geiser, T., O'Reilly, T., Zwahlen, R., Baggiolini, M., and Moser, B. (1994). Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem* **269**:232-237.

Loetscher, P., Gong, J. H., Dewald, B., Baggiolini, M., and Clark-Lewis, I. (1998). N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1 with CXC chemokine receptor 4 agonist and antagonist activities. *J Biol Chem* **273**:22279-22283.

Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P. R., Segal, R. A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R. T., and Springer, T. A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:9448-9453.

Maniatis, T., Goodbourn, S., Fischer, J. A. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* **236**, 1237-1245.

McGeer, P. L. and McGeer, E. G. (1995). The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* **21**:195-218.

McGrath, K. E., Koniski, A. D., Maltby, K. M., McGann, J. K., and Palis, J. (1999). Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Dev Biol* **213** :442-456.

McManus, C. M., Weidenheim, K., Woodman, S. E., Nunez, J., Hesselgesser, J., Nath, A., and Berman, J. W. (2000). Chemokine and chemokine-receptor expression in human glial elements: induction by the HIV protein, Tat, and chemokine autoregulation. *Am J Pathol* **156**:1441-1453.

Merril, J. E. and Benveniste, E. N. (1996). Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends in Neurosciences* **19**: 331-338.

Miller, R. J. and Meucci, O. (1999). AIDS and the brain: is there a chemokine connection? *Trends Neurosci* **22**:471-479.

Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verastegui, E., and Zlotnik, A. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**:50-56.

Müller, H. W., Beckh, S., and Seifert, W. (1984). Neurotrophic factor for central neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:1248-1252.

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

Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1996a). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* **382**:635-638.

Nagasawa, T., Nakajima, T., Tachibana, K., Iizasa, H., Bleul, C. C., Yoshie, O., Matsushima, K., Yoshida, N., Springer, T. A., and Kishimoto, T. (1996b). 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 U S A* **93**:14726-14729.

Nagasawa, T., Tachibana, K., and Kawabata, K. (1999). A CXC chemokine SDF-1/PBSF: a ligand for a HIV coreceptor, CXCR4. *Adv Immunol* **71**:211-228.

Nomura, H., Nielsen, B. W., and Matsushima, K. (1993). Molecular cloning of cDNAs encoding a LD78 receptor and putative leukocyte chemotactic peptide receptors. *Int Immunol* **5**:1239-1249.

Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J. M., Clark-Lewis, I., Legler, D. F., Loetscher, M., Baggiolini, M., and Moser, B. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1 [published erratum appears in *Nature* 1996 Nov 21;384(6606):288]. *Nature* **382**:833-835.

Ohtani, Y., Minami, M., Kawaguchi, N., Nishiyori, A., Yamamoto, J., Takami, S., and Satoh, M. (1998). Expression of stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 chemokine receptor mRNAs in cultured rat glial and neuronal cells. *Neurosci Lett* **249**:163-166.

Onai, N., Zhang, Y., Yoneyama, H., Kitamura, T., Ishikawa, S., and Matsushima, K. (2000). Impairment of lymphopoiesis and myelopoiesis in mice reconstituted with bone marrow-hematopoietic progenitor cells expressing SDF-1-intrakin. *Blood* **96**:2074-2080.

Oppenheim, J. J., Zachariae, C. O., Mukaida, N., and Matsushima, K. (1991). Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* **9**:617-648.

Pandey, V. and Bolsover, S. R. (2000). Immediate and neurotoxic effects of HIV protein gp120 act through CXCR4 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **274**:212-215.

Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.

Reeves, J. D., Heveker, N., Brelot, A., Alizon, M., Clapham, P. R., and Picard, L. (1998). The second extracellular loop of CXCR4 is involved in CD4-independent entry of human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol* **79** (Pt 7):1793-1799.

Rempel, S. A., Dudas, S., Ge, S., and Gutierrez, J. A. (2000). Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin Cancer Res* **6**:102-111.

Rhodes, C. H., Xu, R. Y., and Angeletti, R. H. (1990). Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase (PAM) in Schwann cells and glia as well as neurons. *J Histochem Cytochem* **38**:1301-1311.

Rhodes, C. H., Angeletti, R. H., and McMorris, F. A. (1991). Peptidylglycine amidating monooxygenase (PAM), an enzyme required for neuropeptide biosynthesis, is present in Schwann cells and some glia. *Ann N Y Acad Sci* **633**:623-625.

Rimland, J., Xin, W., Sweetnam, P., Saijoh, K., Nestler, E. J., and Duman, R. S. (1991). Sequence and expression of a neuropeptide Y receptor cDNA. *Mol Pharmacol* **40**:869-875.

Rubbert, A., Combadiere, C., Ostrowski, M., Arthos, J., Dybul, M., Machado, E., Cohn, M. A., Hoxie, J. A., Murphy, P. M., Fauci, A. S., and Weissman, D. (1998). Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as coreceptors for HIV entry. *J Immunol* **160**:3933-3941.

Saldise, L., Martinez, A., Montuenga, L. M., Treston, A., Springall, D. R., Polak, J. M., and Vazquez, J. J. (1996). Distribution of peptidyl-glycine alpha-amidating mono-oxygenase (PAM) enzymes in normal human lung and in lung epithelial tumors. *J Histochem Cytochem* **44**:3-12.

Sambrook, F. W., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd Edition.

Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Doms, R. W., Vassart, G., and Parmentier, M. (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**:722-725.

Sanders, V. J., Pittman, C. A., White, M. G., Wang, G., Wiley, C. A., and Achim, C. L. (1998). Chemokines and receptors in HIV encephalitis. *AIDS* **12**:1021-1026.

Schafer, M. K., Stoffers, D. A., Eipper, B. A., and Watson, S. J. (1992). Expression of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase (EC 1.14.17.3) in the rat central nervous system. *J Neurosci* **12**:222-234.

- Sehgal, A., Ricks, S., Boynton, A. L., Warrick, J., and Murphy, G. P. (1998b). Molecular characterization of CXCR-4: a potential brain tumor-associated gene. *J Surg Oncol* **69**:239-248.
- Sehgal, A., Keener, C., Boynton, A. L., Warrick, J., and Murphy, G. P. (1998a). CXCR-4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells. *J Surg Oncol* **69**:99-104.
- Shi, B., De Girolami, U., He, J., Wang, S., Lorenzo, A., Busciglio, J., and Gabuzda, D. (1996). Apoptosis induced by HIV-1 infection of the central nervous system. *J Clin Invest* **98**:1979-1990.
- Shioda, T., Kato, H., Ohnishi, Y., Tashiro, K., Ikegawa, M., Nakayama, E. E., Hu, H., Kato, A., Sakai, Y., Liu, H., Honjo, T., Nomoto, A., Iwamoto, A., Morimoto, C., and Nagai, Y. (1998). Anti-HIV-1 and chemotactic activities of human stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) and SDF-1beta are abolished by CD26/dipeptidyl peptidase IV-mediated cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:6331-6336.
- Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., and Honjo, T. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* **28**:495-500.
- Staudinger, R. and Bandres, J. C. (2000). Solubilization of the chemokine receptor CXCR4. *Biochem Biophys Res Commun* **274**:153-156.
- Stoffers, D. A., Green, C. B., and Eipper, B. A. (1989). Alternative mRNA splicing generates multiple forms of peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase in rat atrium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:735-739.
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., Kishimoto, T., and Nagasawa, T. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract [see comments]. *Nature* **393**:591-594.
- Takamune, N., Misumi, S., and Shoji, S. (2000). Cyclic zinc-dithiocarbamate-S,S'-dioxide blocks CXCR4-mediated HIV-1 infection. *Biochem Biophys Res Commun* **272**:351-356.
- Tanabe, S., Heesen, M., Berman, M. A., Fischer, M. B., Yoshizawa, I., Luo, Y., and Dorf, M. E. (1997b). Murine astrocytes express a functional chemokine receptor. *J Neurosci* **17**:6522-6528.
- Tanabe, S., Heesen, M., Yoshizawa, I., Berman, M. A., Luo, Y., Bleul, C. C., Springer, T. A., Okuda, K., Gerard, N., and Dorf, M. E. (1997a). Functional expression of the CXC-chemokine receptor-4/fusin on mouse microglial cells and astrocytes. *J Immunol* **159**:905-911.

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

Tham, T. N., Lazarini, F., Franceschini, I. A., Lachapelle, F., Amara, A., and Dubois-Dalcq, M. (2001). Developmental pattern of expression of the alpha chemokine stromal cell- derived factor 1 in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci* **13**:845-856.

Tilton, B., Ho, L., Oberlin, E., Loetscher, P., Baleux, F., Clark-Lewis, I., and Thelen, M. (2000). Signal transduction by CXC chemokine receptor 4. Stromal cell-derived factor 1 stimulates prolonged protein kinase B and extracellular signal- regulated kinase 2 activation in T lymphocytes. *J Exp Med* **192**:313-324.

Willett, B. J., Adema, K., Heveker, N., Brelot, A., Picard, L., Alizon, M., Turner, J. D., Hoxie, J. A., Peiper, S., Neil, J. C., and Hosie, M. J. (1998). The second extracellular loop of CXCR4 determines its function as a receptor for feline immunodeficiency virus [published erratum appears in *J Virol* 1998 Oct;72(10):8460]. *J Virol* **72**:6475-6481.

Winkler, C., Modi, W., Smith, M. W., Nelson, G. W., Wu, X., Carrington, M., Dean, M., Honjo, T., Tashiro, K., Yabe, D., Buchbinder, S., Vittinghoff, E., Goedert, J. J., O'Brien, T. R., Jacobson, L. P., Detels, R., Donfield, S., Willoughby, A., Gomperts, E., Vlahov, D., Phair, J., and O'Brien, S. J. (1998). Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). *Science* **279**:389-393.

Wong, M. L., Xin, W. W., and Duman, R. S. (1996). Rat LCR1: cloning and cellular distribution of a putative chemokine receptor in brain. *Mol Psychiatry* **1**:133-140.

Zheng, J., Thylin, M. R., Ghorpade, A., Xiong, H., Persidsky, Y., Cotter, R., Niemann, D., Che, M., Zeng, Y. C., Gelbard, H. A., Shepard, R. B., Swartz, J. M., and Gendelman, H. E. (1999a). Intracellular CXCR4 signaling, neuronal apoptosis and neuropathogenic mechanisms of HIV-1-associated dementia. *J Neuroimmunol* **98**:185-200.

Zheng, J., Ghorpade, A., Niemann, D., Cotter, R. L., Thylin, M. R., Epstein, L., Swartz, J. M., Shepard, R. B., Liu, X., Nukuna, A., and Gendelman, H. E. (1999b). Lymphotropic virions affect chemokine receptor-mediated neural signaling and apoptosis: implications for human immunodeficiency virus type 1-associated dementia. *J Virol* **73**:8256-8267.

Zou, Y. R., Kottmann, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D. R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development [see comments]. *Nature* **393**:595-599.

LEBENS LAUF

Name: Margarete Czardybon
Adresse: Aachenerstr.123
40223 Düsseldorf
Geburtsdatum: 31.07.1968
Geburtsort: Kattowitz (Oberschlesien)
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

03. Juni 1988 Abitur Gymnasium Koblenzer Str. in Düsseldorf
1988 - 93 Studium der Biologie an der Universität zu Köln
29. November 1993 Diplom in Biologie
Thema der Diplomarbeit: Untersuchungen zur neuronalen Regulation des menschlichen Synaptobrevin-2 Gens und des Chromogranin B Gens der Maus.
1993 - 95 Vorklinisches Studium der Medizin an der Universität Bochum
1995 - 99 Klinisches Studium der Medizin an der Gesamthochschule Essen
21. November 1999 - 21. Mai 2001 ÄIP an der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Prof. Dr. H.-J. Freund)
Seit Juni 2001 Assistenzärztin an der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Prof. Dr. H.-J. Freund)

Praktika:

15. März 1990 - 06. April 1990 TFB-Biotechnologie, Dr. Schindler, Henkel KGaA, Henkelstr. 67, 40589 Düsseldorf
01. März 1992 - 30. April 1992 Institut für Hirnforschung der Universität Zürich, Prof. Dr. M. Schwab, August Forel Str.1, 8029 Zürich, **Schweiz**

Famulaturen:

30. August 1995 - 01. Oktober 1995 Department of Medical Genetics, David E. Comings, M.D., City of Hope Medical Center, Duarte, California 91010, **U.S.A.**
13. Juli 1996 - 27. August 1996 Institut für Innere Krankheiten der Universität Danzig, Prof. Dr. B. Krupa, ul. Debinki 7, Gdansk-Wrzeszcz, **Polen**
03. September 1996 - 01. Oktober 1996 Department of Surgery, Dr. Boeke, Windhoek State Hospital Complex, **Namibia**
26. September 1997 - 10. Oktober 1997 Bezirksklinik für Neurologie der Medizinischen Akademie in Nishnij - Nowgorod, **Russland**

Praktisches Jahr: (19.10.1998- 17.09.1999)

1.Terzial : Wahlfach Neurologie: Chefarzt Prof. Dr. Berlitz
Alfried Krupp Krankenhaus Essen, Alfried-Krupp-Str.21

2.Terzial: Chirurgie: Chefarzt Dr. Furrer
Ospidal Val Müstair, 7536 Sta. Maria (Graubünden),
Schweiz

3.Terzial: Innere: Chefarzt Prof. Dr. Loew (Nephrologie)
Alfried Krupp Krankenhaus Essen, Alfried-Krupp-Str.21

Graduiertenkolleg: (1997 - 2001)

April 1997 - August 1997 Stipendiatin des Graduiertenkollegs: Pathologische Prozesse des Nervensystems : "Vom Gen zum Verhalten", Prof. Dr. Heiko J. Luhmann, Institut für Neurophysiologie, Universität Düsseldorf.

August 1997.- Mai 2001 Kollegiatin des Graduiertenkollegs

Publikationen:

Pott, U., Czardybon, M. and Schwab, M.E., Isolation of cDNA clones from rat oligodendrocytes coding for zinc finger proteins. *Experientia*. 24th Annual Meeting of the Swiss Societies for Experimental Biology, 222 (19./20.03.1992)

Jüngling, S., Cibelli, G., Czardybon, M., Gerdes, H., Thiel, G.,(1994). Differential regulation of Chromogranin B and Synapsin I gene promoter activity by cAMP and cAMP dependent protein kinase. *Eur. J. Biochem.* 226, 925-935

Gleichmann, M., Gillen, C., Czardybon, M., Bosse, F., Greiner-Petter R., Auer, J., Müller, H. W., (2000). Cloning and characterization of SDF-1 γ , a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. *Eur J Neurosci* 12: 1857-1866

Czardybon, M., Bosse, F., Greiner-Petter R., Müller, H. W., (2000). Distribution of the novel chemokine SDF-1 γ and CXCR-4 (Lestr/Fusin) receptor transcripts in the nervous system of rat during development. 30th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (04.-09.11.2000)

Sonstiges:

Oktober 1992 - Januar 1999 Freie Mitarbeiterin bei RTL Television, Medienforschung, Aachenerstr.1036, 50858 Köln

Düsseldorf, den 10. Mai 2002

Charakterisierung der Genexpression des neuen Chemokines SDF-1 γ im Nervensystem der Ratte

Dipl. Biol. Margarete Czardybon

Aus der Forschungsgruppe der Neurologischen Klinik

Molekulare Neurobiologie (Leiter: Prof. Dr. H. W. Müller)

Direktor: Prof. Dr. med. H.-P. Hartung, ehemals Prof. Dr. med. H.-J. Freund

ABSTRACT:

Die Chemokine SDF-1 α und SDF-1 β sind zwei alternativ gespleißte Varianten der CXC-(α)-Chemokinfamilie, die zwischen den Spezies hoch konserviert sind. Der **Stromal cell Derived Factor-1 (SDF-1)** ist ein wichtiger Regulator für die Aktivierung und Migration von Leukozyten und hämatopoetischen Stammzellen. Zusätzlich wird die Proliferation von B-Vorläuferzellen stimuliert.

SDF-1 bindet an CXCR-4, einen Chemokin-Rezeptor, der als Co-Rezeptor für das HIV-1 Oberflächenprotein gp120 zum apoptotischen Zelluntergang von neuronalen Zellen führt. Nach Blockade des Rezeptors mit CXCR-4 Antikörpern oder SDF-1 kann eine HIV-Infektion verhindert werden.

In unserem Labor (Labor für Molekulare Neurobiologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) wurde SDF-1 γ , eine neue SDF-1 Isoform isoliert. Hier wird eine eingehende Charakterisierung der Genexpression dieser neuen SDF-1 γ Isoform im Nervensystem der Ratte durchgeführt.

Bei der gewebespezifischen mRNA Expression in Nervensystem, Herz, Milz und Blut der Ratte zeigt sich, mit Ausnahme von menschlichem Blut und humanem N. suralis, eine ubiquitäre Expression von SDF-1 γ und CXCR-4. SDF-1 α kann im Nervensystem der Ratte nicht nachgewiesen werden.

Mit der In situ Hybridisierungsmethode wird vergleichend die Verteilung von SDF-1 β/γ und CXCR-4 mRNA während der Entwicklung und im adulten Stadium des Ratten-Nervensystems beschrieben. Während der Entwicklung zeigen die Transkripte ein vergleichbares Expressionsmuster. Im zentralen Nervensystem sind SDF-1 β/γ und CXCR-4 in den Nervenzellen des Neocortex, Kleinhirns, Hippocampus und Rückenmarks weit verbreitet. In Trakten der weißen Substanz, einschließlich Corpus callosum finden sich in Oligodendroglia starke Hybridisierungssignale. Im peripheren Ischiasnerv wird ein intensives Hybridisierungssignal in Schwannzellen gefunden. SDF-1 β/γ mRNAs werden während der Nervensystementwicklung invers reguliert, während SDF-1 β mRNA die dominante Isoform in der embryonalen und frühen postnatalen Phase der Nerv-Entwicklung ist, wird SDF-1 γ im adulten Stadium höher exprimiert.

Der immunhistochemische und -zytochemische Nachweis der SDF-1 γ und CXCR-4 Proteinexpression in Neuronen des Cortex, Hippocampus und Schwannzellen bestätigt die erhaltenen Transkriptionsdaten.

Computer gestützte Analysen zeigen, daß die SDF-1 β und SDF-1 γ Transkripte für Proteine von ca. 9-13 kDa kodieren, die mehrere putative proteolytische Schnittstellen aufweisen, die nach Amidierung zur Entstehung neuer Neuropeptide führen könnten.