

Die Rolle des Chemokinrezeptors CXCR4 in der hippokampalen Neurogenese

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biol. Angela Kolodziej, geb. Breme
geb. am 07.03.1980 in Köthen

Gutachter: Privatdozent Dr. Ralf Stumm
Prof. Dr. Petra Wahle

eingereicht am: 27.10.2008

verteidigt am: 24.02.2009

Inhalt

Abkürzungen	IV
Abbildungen	V

1. Einleitung	1
1.1. Chemokine und Chemokinrezeptoren	1
1.1.1. Chemokine	1
1.1.2. Chemokinrezeptoren	2
1.1.3. Das Chemokin SDF-1	4
1.1.4. Der Chemokinrezeptor CXCR4	5
1.1.5. Physiologische Relevanz von SDF-1/CXCR4	7
1.1.6. Pathologische Relevanz von SDF-1/CXCR4	8
1.1.7. Der Chemokinrezeptor CXCR7	8
1.2. Rolle des CXCR4-Rezeptors in der embryonalen Entwicklung neuronaler Strukturen	10
1.3. Adulte Neurogenese	12
1.3.1. Neurogene Nischen im adulten Gehirn	12
1.3.2. Phasen der adulten Neurogenese	14
1.3.3. Beeinflussung der Neurogeneserate im adulten Hippokampus	15
1.3.4. Funktion der Neurogenese im adulten Hippokampus	17
1.4. Fragestellung	18
<hr/>	
2. Methoden	19
2.1. Tiere	19
2.2. Immunhistochemie	19
2.3. mRNA-Expressionsanalyse mittels <i>in-situ</i> -Hybridisierung	22
2.4. Substanzapplikationen	25
2.5. Zellzählungen	28
2.6. Immunocytochemie	29
2.7. Verhaltensuntersuchungen	33

3. Ergebnisse	35
3.1. Expression von CXCR4 und SDF-1 im postnatalen Hippokampus	35
3.1.1. Expression des CXCR4-Proteins	35
3.1.2. Expression der CXCR4-mRNA	37
3.1.3. Expression der SDF-1-mRNA	37
3.2. Regulation des CXCR4-Rezeptors im Hippokampus und in neuronalen Kulturen	39
3.2.1. Regulation des CXCR4-Rezeptors im Hippokampus	39
3.2.2. Regulation des CXCR4-Rezeptors in neuronalen Kulturen	42
3.2.3. Zusammenfassung der Daten zur Regulation	52
3.3. Charakterisierung CXCR4-exprimierender Zellen der SGS	53
3.3.1. Detektion des CXCR4-Rezeptors in GABAergen Zellen des Hilus	53
3.3.2. Detektion des CXCR4-Rezeptors in unreifen Granularzellen	54
3.4. Rolle des CXCR4-SDF-1-Systems in der hippocampalen Neurogenese	58
3.4.1. CXCR4-Aktivierung unterstützt die Neubildung unreifer Granularzellen	58
3.4.2. CXCR4-Aktivierung unterstützt Überleben und funktionelle Integration neuer Granularzellen	60
3.5. Rolle des CXCR4-SDF-1-Systems für hippocampusabhängiges Lernen	61
<hr/>	
4. Diskussion	65
4.1. Diskussion der Ergebnisse	65
4.1.1. SDF-1 induziert Internalisierung, Recycling und Degradation des CXCR4-Rezeptors in primären Neuronen	65
4.1.2. Es existiert ein Ungleichgewicht zwischen CXCR4-mRNA und CXCR4-Protein in der SGS des adulten Hippokampus	66
4.1.3. Der CXCR4-Rezeptor wird in Zellen der SGS tonisch aktiviert	66
4.1.4. Der CXCR4-Rezeptor wird von neuronalen Vorläuferzellen der SGS exprimiert	68
4.1.5. Über den CXCR4-Rezeptor werden Überlebens-Signalwege aktiviert	69
4.1.6. SDF-1 fördert das Überleben neuronaler Zellen möglicherweise durch die Induktion einer erhöhten Erregbarkeit unreifer Granularzellen	70
4.1.7. Die Aktivierung des CXCR4-Rezeptors unterstützt die Reifung neu gebildeter Granularzellen	74
4.1.8. Die Aktivierung des CXCR4-Rezeptors wird für Neurogenese-abhängiges Lernen benötigt	75
4.2. Schlussfolgerungen	76
4.3. Ausblick	77

5. Zusammenfassung	78
---------------------------	-----------

6. Summary	79
-------------------	-----------

Anhang

Literatur

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungen

BrdU	Bromodeoxyuridin
BxTxH	Breite x Tiefe x Höhe
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
E16	Embryonaltag 16
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
FKS	Fötale Kälberserum
GABA	<i>Gamma-amino butyric acid</i> , Gamma-Aminobuttersäure
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> , Saures Gliafaserprotein
IL-1	Interleukin 1
KO	<i>knockout</i> (mittels einer genetischen Manipulation wurde gezielt ein bestimmtes Gen aus dem Genom eliminiert)
P12	Postnatahtag 12, also 12 Tage nach der Geburt
PFA	Paraformaldehyd
PYK2	<i>proline-rich tyrosine kinase 2</i>
SGS	Subgranularschicht

Abbildungen

1. Einleitung

Abbildung 1.1:	<i>Chemokinrezeptoren gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren.</i>	2
Abbildung 1.2:	<i>Endozytose G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.</i>	3
Abbildung 1.3:	<i>Lösungsstruktur des Monomers von SDF-1α, ermittelt durch Kernspinresonanzspektroskopie.</i>	4
Abbildung 1.4:	<i>Schematische Darstellung des Migrationsstroms proliferierender Vorläuferzellen in den Hilus des sich bildenden Gyrus dentatus.</i>	11
Abbildung 1.5:	<i>Nischen adulter Neurogenese am Beispiel der Maus.</i>	13
Abbildung 1.6:	<i>Phasen adulter Neurogenese und Expression charakteristischer Marker.</i>	15

2. Methoden

Abbildung 2.1:	<i>Spezifität des CXCR4-Antiserums [1181].</i>	21
Abbildung 2.2:	<i>Schematische Darstellung der osmotischen Minipumpe mit dem Brain Infusion Kit (ALZET).</i>	25
Abbildung 2.3:	<i>Implantieren einer osmotischen Minipumpe mit Brain Infusion Kit zur intracerebroventrikulären Substanzapplikation.</i>	26
Abbildung 2.4:	<i>Zur Ermittlung der Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen wurden Schnittserien angefertigt und gefärbt.</i>	28
Abbildung 2.5:	<i>Angereicherte Umwelt im Vergleich zur Standardhaltung.</i>	33
Abbildung 2.6:	<i>A: Schema von Aufbau und zeitlichem Ablauf des Objekterkennungstests; B: Ratte im Objekterkennungstest bei der Exploration eines Objektes.</i>	34

3. Ergebnisse

Abbildung 3.1:	<i>Postnatale Herabregulation der CXCR4-Proteinexpression in der SGS des Gyrus dentatus.</i>	36
Abbildung 3.2:	<i>Antagonistapplikation führt zu massiver Erhöhung des CXCR4-Proteinspiegels.</i>	41
Abbildung 3.3:	<i>SDF-1-induzierte Regulation des endogenen CXCR4-Rezeptors in hippocampalen primären Neuronen.</i>	43

Abbildung 3.4:	<i>SDF-1-induzierte Regulation des transfizierten CXCR4-Rezeptors in hippocampalen primären Neuronen.</i>	46
Abbildung 3.5:	<i>SDF-1-induzierte Internalisierung des T7-CXCR4-Rezeptors nach Markierung der Oberflächenrezeptoren lebender Zellen.</i>	48
Abbildung 3.6:	<i>A,B: Quantifizierung der SDF-1-induzierten Regulation des endogenen CXCR4-Rezeptors in hippocampalen primären Neuronen. C,D: Desensibilisierung der SDF-1-induzierten Akt-Phosphorylierung in neuronalen Primärkulturen.</i>	50
Abbildung 3.7:	<i>Endogenes SDF-1 aus primären Neuronenkulturen induziert CXCR4-Internalisierung in stabil transfizierten HEK293-Zellen.</i>	52
Abbildung 3.8:	<i>CXCR4-exprimierende neuronale Zellen im Hilus.</i>	53
Abbildung 3.9:	<i>Charakterisierung der CXCR4-immunreaktiven Zellen in der SGS und im Hilus adulter Ratten (I).</i>	55
Abbildung 3.10:	<i>Charakterisierung der CXCR4-immunreaktiven Zellen in der SGS und im Hilus adulter Ratten (II).</i>	56
Abbildung 3.11:	<i>CXCR4 unterstützt das Überleben neu gebildeter Granularzellen.</i>	59
Abbildung 3.12:	<i>AMD3100 beeinträchtigt die Leistung des Langzeitgedächtnisses im Objekterkennungstest bei Ratten aus einer angereicherten Umwelt.</i>	63

4. Diskussion

Abbildung 4.1:	<i>Unreife Granularzellen zeigen SDF-1-Sensitivität in Form von erhöhter Erregbarkeit.</i>	73
----------------	--	----

1. Einleitung

1.1. Chemokine und Chemokinrezeptoren

1.1.1. Chemokine

Die Chemokine sind kleine chemotaktisch wirkende Zytokine, das heißt ihre Erkennung lässt Zellen gerichtet entlang eines Konzentrationsgradienten wandern. Zur Familie der Chemokine gehören etwa 50 Proteine, die eine Größe zwischen 8 und 10kD besitzen (Murphy *et al.* 2000, Clore & Gronenborn 1995) und die bezüglich ihrer Sequenz, besonders aber bezüglich ihrer Tertiärstruktur große Ähnlichkeiten aufweisen. Die systematische Nomenklatur unterteilt die Chemokine aufgrund der Anzahl konservierter N-terminaler Cysteinreste und der Anzahl dazwischen liegender Aminosäuren in vier Familien. Daneben werden sie auch funktionell in inflammatorische (oder induzierbare) und homöostatische (oder konstitutive) Chemokine klassifiziert (Moser *et al.* 2004). Chemokine sind an unterschiedlichsten gerichteten Zellbewegungen beteiligt, so sind sie zum Beispiel essentiell für die Histogenese in der embryonalen und postnatalen Organentwicklung (Mc Grath *et al.* 1999, Moser *et al.* 2004). Sie regulieren unter anderem die Bildung des kardialen Septums (Nagasawa *et al.* 1996), die Migration von Neuronen und Mikrogliazellen (Lazarini *et al.* 2003) und von Keimzellen während der Embryonalentwicklung (Doitsidou *et al.* 2002) und die Angiogenese und Angiostase (Szekanecz & Koch 2001, Tachibana *et al.* 1998). Die Bildung und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen wird von Chemokinen reguliert (Broxmeyer & Kim 1999, Broxmeyer *et al.* 1999, Ma *et al.* 1999). Sie beeinflussen die angeborene und die adaptive Immunantwort (Hasegawa & Fujita 2001) und die Rekrutierung und die Rezirkulation von Leukozyten. Sie spielen außerdem eine entscheidende Rolle in der Chemotaxis und der Rezirkulation von Lymphozyten (Foxman *et al.* 1997, Müller & Lipp 2003, Rossi & Zlotnik 2000), ebenso sind sie an der Wundheilung beteiligt (Gillitzer & Goebeler 2001). Die Chemokine vermitteln ihre Wirkungen über die heptahelikalen Chemokinrezeptoren (Murphy *et al.* 2000, Neote *et al.* 1993).

1.1.2. Chemokinrezeptoren

Die Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren der Rhodopsin-Familie (Holmes *et al.* 1991, Baggiolini *et al.* 1997) (Abb. 1.1). Sie sind zumeist an pertussistoxin-sensible inhibitorische heterotrimere GTP-bindende Proteine (G_i -Proteine) gekoppelt (Gunn *et al.* 1998, Murphy *et al.* 2000). Nach Aktivierung bilden Chemokinrezeptoren in der Regel dimere Rezeptorkomplexe, um ihre Wirkung zu vermitteln (Rodriguez-Frade *et al.* 1999, Mellado *et al.* 2001a,b). Chemokinrezeptoren können intrazellulär die Adenylatzyklase, Phospholipasen, GTPasen wie Rho, Rac und Cdc42 und Signalwege über die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) oder die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-K) aktivieren (Balkwill 1998, Mellado *et al.* 2001c). Nach der 2002 aktualisierten Nomenklatur der Chemokinrezeptoren (Murphy 2002) werden heute 18 Chemokinrezeptoren unterschieden. Die Chemokinrezeptor-Subtypen weisen gewebes- und zellselektive Expressionsmuster auf. Ein großer Anteil der Chemokinrezeptoren wird von Leukozyten exprimiert, einzelne von Zellen des Endothels, des Epithels und von Neuronen und Gliazellen (Delezay *et al.* 1997, Horuk *et al.* 1997, Gupta *et al.* 1998, Salcedo *et al.* 1999).

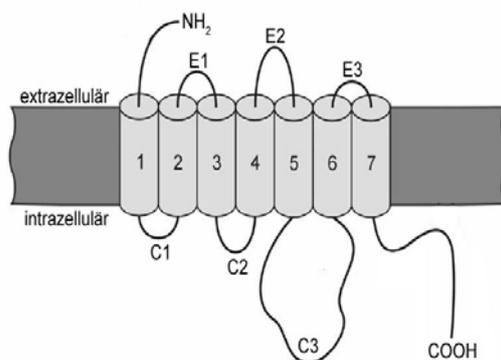


Abbildung 1.1: Chemokinrezeptoren gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren. Allgemeine Strukturmerkmale dieser Rezeptoren sind hier dargestellt. Alle Rezeptoren dieses Typs durchspannen die Membran mit sieben Transmembranhelices. Der N-Terminus befindet sich auf der extrazellulären Seite der Membran, der C-Terminus auf der cytosolischen. E1 bis E3: extrazelluläre Schleifen; C1 bis C3: cytosolische Schleifen.

Die Signaltransduktion durch G-Protein-gekoppelte Transmembranproteine wird unter anderem über die Anzahl der auf der Zelloberfläche verfügbaren Rezeptoren reguliert, und die Menge der Oberflächenrezeptoren hängt entscheidend von der Rezeptor-Endozytose ab (Abbildung 1.2). Nach Aktivierung und Signaltransduktion werden die Rezeptoren phosphoryliert und dadurch

desensibilisiert. Die Rezeptoren steuern dann spezialisierte Abschnitte der Plasmamembran an, so genannte *Clathrin-coated pits*, wo sie internalisiert werden. Die *Clathrin-coated pits* verschmelzen intrazellulär mit frühen Endosomen. Hier werden die Rezeptoren dann entweder zur Degradation in multivesikuläre späte Endosomen sortiert, welche die Rezeptoren zu Lysosomen transportieren, oder sie werden von Recycling-Endosomen zur Plasmamembran zurücktransportiert.

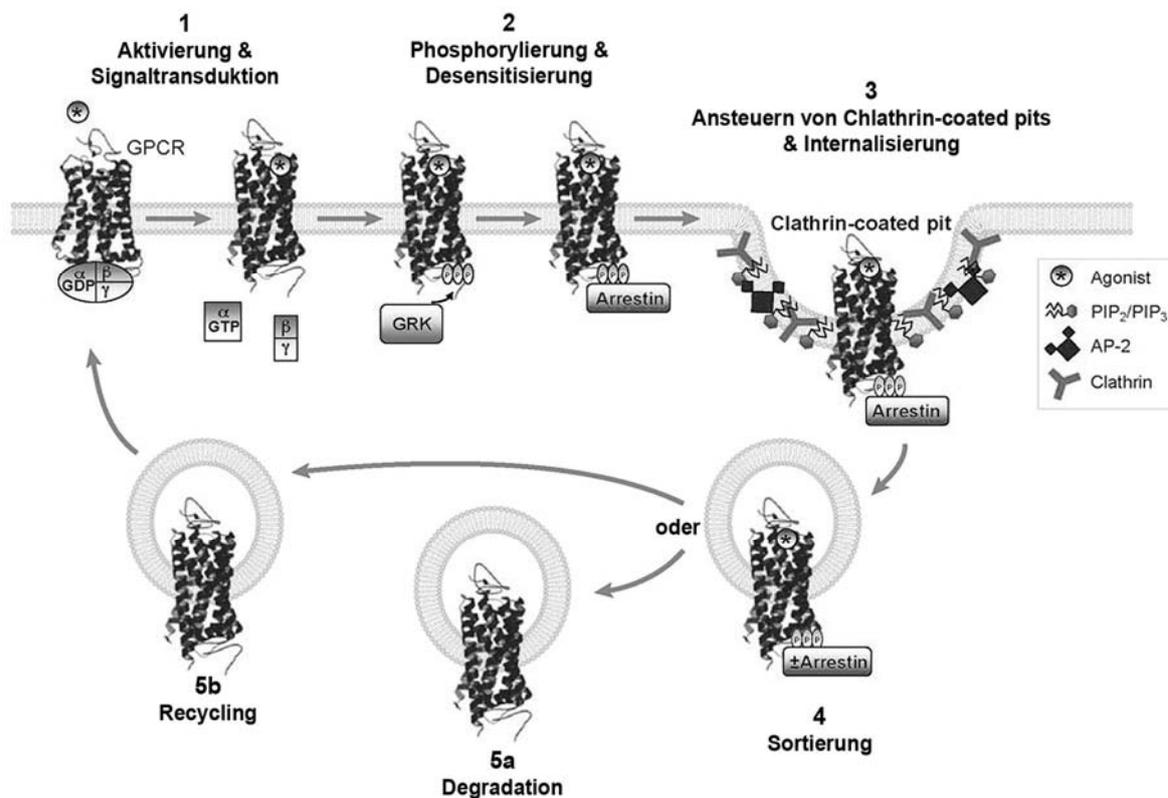


Abbildung 1.2: Endozytose G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Bindung des Agonisten (Stern) führt zur Aktivierung des Rezeptors, zur Bindung von G-Proteinen und zur Signaltransduktion (1). Der aktivierte Rezeptor wird von G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) intrazellulär phosphoryliert, worauf die Bindung von Arrestin die weitere Kopplung an G-Proteine verhindert und damit das Signaling beendet (2). Der Komplex aus Rezeptor und Arrestin steuert *Clathrin-coated pits* an. Arrestin bildet einen Komplex mit Clathrin, Adapterprotein 2 (AP-2) und Phosphatidylinositol-Bisphosphat/-Triphosphat, was zur Internalisierung führt (3). Es erfolgt eine Sortierung (4) der internalisierten Rezeptoren in Kompartimente zur Degradation (5a) oder zum Recycling (5b) (Abbildung aus Moore *et al.* 2007, verändert).

1.1.3. Das Chemokin SDF-1

Untersuchungen der vergangenen Jahre zeigen, dass das Chemokin SDF-1 (*Stromal cell derived factor 1*, systematisches Synonym: CXCL12¹) eine besondere Rolle innehat. Dieses CXC-Chemokin wurde ursprünglich als ein aus Bindegewebszellen des Knochenmarks sezerniertes Peptid beschrieben (Tashiro *et al.* 1993). Das Gen für SDF-1 liegt im Rattengenom auf Chromosom 4. Es sind drei alternativ gespleißte Transkripte von SDF-1 bekannt, SDF-1 α , SDF-1 β und



Abbildung 1.3: Lösungsstruktur des Monomers von SDF-1 α , ermittelt durch Kernspinresonanzspektroskopie (Gozansky *et al.* 2005).

SDF-1 γ (Tashiro *et al.* 1993, Nagasawa *et al.* 1994, Shirozu *et al.* 1995). Gemeinsam sind diesen Transkripten die 5'-untranslatierte Region und eine Sequenz von 89 Aminosäuren, welche die Bindung und die Aktivierung des CXCR4-Rezeptors vermittelt. Aufgrund des unterschiedlichen Spleißens am 3'-Ende besitzt SDF-1 β 4 und SDF-1 γ 30 zusätzliche Aminosäuren (Gleichmann *et al.* 2000). Diese N-terminale Modifikation verändert die Bindung von SDF-1 an Glykosaminoglykane der extrazellulären Matrix, was die Verfügbarkeit von immobilisiertem

SDF-1 im Extrazellulärraum beeinflusst (De La Luz Sierra *et al.* 2004). Die meisten bisherigen Studien sind auf SDF-1 α fokussiert. Da sich die vorliegende Arbeit ebenfalls ausschließlich mit SDF-1 α befasst, wird hier zur Vereinfachung die Bezeichnung „SDF-1“ für diese Isoform verwendet.

Über die Mechanismen der Freisetzung von SDF-1 ist noch relativ wenig bekannt. In hämatopoetischen Zellen werden Chemokine über spezialisierte sekretorische Lysosomen freigesetzt (Griffiths 1996, Lacy *et al.* 1999, Andrews 2000). Bei Nervenzellen scheint es hierfür einen anderen Mechanismus zu geben: Für das Chemokin CCL21 wurde gezeigt, dass es über den Golgi-Apparat in sekretorische Vesikel verpackt wird. Für Nervenzellen sind zwei Sekretionswege beschrieben, die konstitutive und die regulierte Freisetzung (Gerber & Sudhof 2002). Der Golgi-

¹ CXC-Chemokine besitzen zwei Cysteinreste (C), die durch eine Aminosäure getrennt sind (X). 'L' steht für Ligand.

Apparat wird als das Kompartiment gesehen, in dem entschieden wird, welchen der Wege ein sezerniertes Protein einschlägt (Übersichtsartikel von Tekirian 2002). Es ist aber bislang unbekannt, ob Chemokine über die konstitutive oder über die regulierte Sekretion freigesetzt werden. Der Abbau von SDF-1 erfolgt durch eine membrangebundene Aminopeptidase, die Dipeptidyl-dipeptidase IV (DPP IV = CD 26) (Shioda *et al.* 1998; Engel *et al.* 2003).

SDF-1 wird in zahlreichen Organen gebildet, dazu gehören zum Beispiel Herz, Lunge, Leber, Milz und Nieren. Im zentralen Nervensystem wird SDF-1 konstitutiv von Nervenzellen bestimmter Hirnregionen, in Endothelzellen, Mikrogliazellen und in Astrozyten exprimiert (Stumm *et al.* 2002, Banisadr *et al.* 2003, Bajetto *et al.* 2001a, Tanabe *et al.* 1997). SDF-1-exprimierende Neurone wurden hauptsächlich im zerebralen Kortex, in der Substantia innominata, im medialen Septum, im Globus pallidus, im Hippokampus, in den ventrikulären und supraoptischen hypothalamischen Kernen, im lateralen Hypothalamus, in der Substantia nigra, im ventralen Tegmentum und in den okulomotorischen Kernen gefunden (Banisadr *et al.* 2003). SDF-1 vermittelt seine Wirkungen über den Chemokinrezeptor CXCR4. Ein kürzlich beschriebener zweiter SDF-1-Rezeptor (CXCR7) scheint die Signalgebung über den CXCR4-Rezeptor zu modulieren (Tiveron & Cremer 2008).

1.1.4. Der Chemokinrezeptor CXCR4

Zu Beginn der 90er Jahre wurde der Chemokinrezeptor CXCR4¹ (Synonym: Fusin) von verschiedenen Gruppen isoliert und sequenziert. Rimland *et al.* fanden den Rezeptor 1991 im Locus coeruleus des Rindes, Federspiel *et al.* isolierten das CXCR4-Protein 1993 aus der menschlichen Milz. Das Primärtranskript besteht aus 349 Aminosäuren. Vom humanen CXCR4-Rezeptor ist bekannt, dass er auf Chromosom 2 lokalisiert ist (Murphy *et al.* 2000, Hernandez *et al.* 2003). Es wurden zwei N-terminale Spleißvarianten gefunden, die sich aber funktionell nicht unterscheiden (Heesen *et al.* 1997). Der CXCR4-Rezeptor wird in neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, naiven T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Thrombozyten, CD-34⁺-Vorläuferzellen, Langerhanszellen und vaskulären Endothelzellen gebildet (Loetscher *et al.* 1994, Zaitseva *et al.* 1997, Wang *et al.*

¹ Die Nomenklatur der Chemokinrezeptoren richtet sich nach ihren Liganden: CXC-bindende Rezeptoren beginnen mit CXCR, wobei das 'R' für 'Rezeptor' steht.

1998, Förster *et al.* 1998, Gupta *et al.* 1998). Im zentralen Nervensystem wird der CXCR4-Rezeptor kontinuierlich von Gliazellen und von Nervenzellen exprimiert (Bajetto *et al.* 2001a, Bonavia *et al.* 2003). Neuronale Expression wurde hauptsächlich im zerebralen Kortex, im Globus pallidus, im Putamen, im Nucleus caudatus, in der Substantia innominata (Banisadr *et al.* 2002), in hypothalamischen Kernen (Banisadr *et al.* 2003), im lateralen Hypothalamus (Guyon *et al.* 2005), im ventromedialen Thalamus, in der Substantia nigra (Banisadr *et al.* 2002) und im Cerebellum (Ragozzino *et al.* 2002) gefunden.

Nach Bindung von SDF-1 kann der CXCR4-Rezeptor verschiedene intrazelluläre Signalwege aktivieren (Lazarini *et al.* 2003). Die Aktivierung des CXCR4-Rezeptors kann über G_i-Proteine an mindestens zwei unterschiedliche Signalkaskaden gekoppelt sein. Einer dieser Signalwege wurde in Astrozyten, neuronalen Vorläuferzellen und kortikalen Neuronen beschrieben (Bacon & Harrison 2000, Lazarini *et al.* 2000, Bajetto *et al.* 2001, Bonavia *et al.* 2003), hier sind PI-3 (Phosphatidyl-inositol-3-Kinase) und ERK1/2 (*extracellular signal regulated kinase 1/2*) involviert. Im anderen Signalweg wird die Phospholipase C β aktiviert und so der intrazelluläre Kalziumspiegel erhöht. Kalzium aktiviert PYK2 (*proline-rich tyrosine kinase 2*), was möglicherweise wiederum zur Aktivierung von ERK1/2 führt (Bajetto *et al.* 2001b). Diese Kaskade wurde in Astrozyten, kortikalen Neuronen, in Granularzellen des Kleinhirns, in fetalen Neuronen aus Primaten und in Mikroglia gefunden (Bajetto *et al.* 1999, Klein *et al.* 1999, Zheng *et al.* 1999). Zheng *et al.* zeigten auch, dass die CXCR4-Aktivierung in Neuronen direkt Ionenkanäle der Plasmamembran modulieren kann, insbesondere Kalziumkanäle. Hierdurch kann es ebenfalls zum Anstieg des Kalziumspiegels und zur Aktivierung von PYK2 kommen (Lazarini *et al.* 2003). In primären neuronalen Kulturen wurde außerdem nachgewiesen, dass eine Aktivierung des CXCR4-Rezeptors cAMP-Signalwege inhibieren kann (Liu *et al.* 2003). Es ist bekannt, dass der CXCR4-Rezeptor unter Stimulation durch Liganden desensibilisiert und internalisiert wird. Die Signalwirkung und Internalisierung werden durch die Phosphorylierung des Rezeptors reguliert (Haribabu *et al.* 1997). Der CXCR4-Rezeptor wird von dem Bicyklam AMD3100 spezifisch blockiert (Schols *et al.* 1997).

1.1.5. Physiologische Relevanz von SDF-1/CXCR4

SDF-1 ist das einzige bekannte Chemokin, das in der Maus lebensnotwendig ist. Das Entfernen des Gens für SDF-1 oder des Gens für den CXCR4-Rezeptor aus dem Genom ist embryonal letal (Nagasawa *et al.* 1996, Zou *et al.* 1998, Ma *et al.* 1998). SDF-1- und CXCR4-*knockout*-Mäuse (KO-Mäuse) weisen zahlreiche schwerwiegende Defekte in der Entwicklung des Gefäßsystems, des Herzens, des Immunsystems und des zentralen Nervensystems auf, hier besonders im Kortex (Stumm *et al.* 2003) und im Kleinhirn (Nagasawa *et al.* 1996, Zou *et al.* 1998). Die Sequenzen von SDF-1 und CXCR4 sind zwischen den Spezies stark konserviert. Dies deutet darauf hin, dass das SDF-1/CXCR4-System nicht nur in der Maus lebensnotwendig ist. Die Rolle der CXCR4-Signalgebung ist komplex und vom Entwicklungsstadium abhängig (Übersichtsartikel von Miller *et al.* 2008). Sie reguliert bereits sehr früh die Migration und Funktion embryonaler Stammzellen, so ist SDF-1 an der Angiogenese (Übersichtsartikel von Salcedo & Oppenheim 2003) und an der Organogenese beteiligt (Übersichtsartikel von Ratajczak *et al.* 2006). In der weiteren Entwicklung und im adulten Organismus werden gewebespezifische Effekte auf Stammzellen und auf differenzierte Zellen ausgeübt. Die Regeneration von Geweben (Übersichtsartikel von Ratajczak *et al.* 2006) und Überleben, Proliferation, Mobilisierung und Migration von hämatopoetischen Zellen (Übersichtsartikel von Broxmeyer 2008, Pelus *et al.* 2002) wird von SDF-1 beeinflusst. Die Funktion von SDF-1/CXCR4 ist speziell im Nervensystem sehr gut charakterisiert. Während der Entwicklung wird SDF-1 hier stark exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Formation der Granularschicht des Kleinhirns (Ma *et al.* 1998, Klein *et al.* 2001, Reiss *et al.* 2002, Zhu *et al.* 2002), bei der Entwicklung des zerebralen Kortex (Stumm *et al.* 2003, Borell & Marin 2006) und des Gyrus dentatus (Lu *et al.* 2002) und bei der Wegfindung motorischer Axone (Lieberam *et al.* 2005). Im adulten Gehirn wirkt SDF-1 als Neuromodulator (Übersichtsartikel von Lazarini *et al.* 2003, Banisadr *et al.* 2005, Guyon & Nahon 2007), beeinflusst das Überleben von Neuronen und möglicherweise auch die Kommunikation von Gliazellen untereinander und zwischen Nerven- und Gliazellen (Übersichtsartikel von Li & Ransohoff 2008).

1.1.6. Pathologische Relevanz von SDF-1/CXCR4

In das Zentrum des wissenschaftlichen Interesses rückte der CXCR4-Rezeptor, als seine Rolle als Korezeptor bei der Infektion von T-Zellen mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) entdeckt wurde. Die intensiven Untersuchungen dieses Rezeptor-Ligand-Systems zeigten dessen Beteiligung an zahlreichen anderen pathologischen Prozessen des zentralen Nervensystems. Die Aktivierung des CXCR4-Rezeptors ist entscheidend für das Wachstum von Hirntumoren (Sehgal *et al.* 1998a,b, Schuller *et al.* 2005, Liu *et al.* 2006; Woerner *et al.* 2005). Im Schlaganfall wird SDF-1 β im Endothel der Penumbra hochreguliert und vermittelt möglicherweise die Rekrutierung CXCR4-exprimierender Leukozyten. Die neuronale SDF-1 α -Expression der ungeschädigten Kortexareale wird vorübergehend herabreguliert, parallel dazu nimmt hier der neuronale CXCR4-Rezeptor zu. Dies könnte zur ischämie-induzierten neuronalen Plastizität beitragen (Stumm *et al.* 2002, Hill *et al.* 2004). Der CXCR4-Rezeptor und SDF-1 sind auch an der Pathogenese von Multipler Sklerose, Hepatitis und Lungenfibrose beteiligt. In der Therapie der Leukämie stellt der CXCR4-Rezeptor einen potenziellen Ansatzpunkt dar, da Bildung und Überleben der krankhaft veränderten weißen Blutkörperchen durch SDF-1 reguliert werden (Übersichtsartikel von Hildebrandt & Schabath 2008).

1.1.7. Der Chemokinrezeptor CXCR7

Die meisten Chemokine binden an mehrere Rezeptoren. Dies gilt auch für CXCL12/SDF-1, von dem bis vor kurzem angenommen wurde, dass es ausschließlich an den CXCR4-Rezeptor bindet (Bleul *et al.* 1996, Oberlin *et al.* 1996, Bajetto *et al.* 2001a, Bonavia *et al.* 2003). Verschiedene Punkte unterstützten diese Annahme: CXCR4- und SDF-1-KO-Mäuse weisen die gleichen funktionellen Defizite auf und zeigen im gleichen Entwicklungsstadium embryonale Letalität. Der CXCR4 wurde als Korezeptor des HIV identifiziert und SDF-1 blockiert den Eintritt vom HIV in die Wirtszelle. Außerdem wurde sowohl der CXCR4-Rezeptor als auch SDF-1 mit der Metastase und der Proliferation von Tumorzellen in Verbindung gebracht, und CXCR4-Antagonisten blockieren das Wachstum verschiedener Tumoren *in vivo*. Vor kurzem wurde jedoch gezeigt, dass SDF-1 an den „Waisen“- (Orphan) -Rezeptor RDC1 in T-Lymphozyten bindet

und intrazelluläre Signalwege aktiviert (Balabanian *et al.* 2005). Weitere Evidenz für die Existenz eines zweiten SDF-1-Rezeptors ergab sich aus einer Charakterisierung von homo- und heterozygoten CXCR4-KO-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. Hier wurde am Embryonaltag 13 bei allen Genotypen eine vergleichbare SDF-1-Bindung in der Leber gezeigt (Burns *et al.* 2006). Der CXCR7-Rezeptor wurde von Burns *et al.* 2006 charakterisiert. Es handelt sich ebenfalls um einen 7-Transmembrandomänen-Rezeptor, der neben SDF-1 auch CXCL11/I-TAC bindet. Die Daten von Burns *et al.* zeigen, dass der CXCR7-Rezeptor wichtige biologische Funktionen wie zum Beispiel Zelladhäsion, das Überleben von Zellen und Tumorentwicklung im Tiermodell beeinflusst. Der CXCR7-Rezeptor vermittelt keine Chemotaxis und keine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels nach Ligandenbindung, und der CXCR7-Rezeptor wird nicht von AMD3100 blockiert. Weitere Untersuchungen des CXCR7-Rezeptors könnten neue Erkenntnisse bezüglich der Verknüpfung von Entzündung und Krebs bringen und vielleicht neue therapeutische Möglichkeiten in der Onkologie eröffnen.

1.2. Rolle des CXCR4-Rezeptors in der embryonalen Entwicklung neuronaler Strukturen

Die gerichtete Migration von Zellen ist entscheidend für die Entwicklung komplexer Organismen. Während der Entwicklung müssen Stammzellen und Vorläuferzellen vom Ort ihrer Entstehung zu den sich entwickelnden Organen gelangen, wo sie sich teilen und organspezifisch differenzieren. Ein erster Hinweis auf die wichtige Rolle des CXCR4-Rezeptors während der embryonalen Entwicklung des zentralen Nervensystems war die Arbeit von Zou *et al.* (1998), die gezeigt hat, dass die gestörte morphologische Entwicklung des Kleinhirns bei CXCR4-KO-Mäusen auf eine fehlerhafte Migration proliferierender Granularzellvorläufer zurückzuführen ist. Weitere Abweichungen in der neuronalen Entwicklung von CXCR4-KO-Mäusen wurden beschrieben, so zum Beispiel eine geringe Zahl und fehlerhafte Lokalisation von Cajal-Retzius-Zellen im zerebralen Kortex (Stumm *et al.* 2003, Berger *et al.* 2007; Paredes *et al.* 2006). Für CXCR4-exprimierende GABAerge Neurone wurde gezeigt, dass sie während der Entwicklung des Telencephalons entlang eines SDF-1-Gradienten in den Kortex einwandern (Stumm *et al.* 2003, 2007). Die hohe SDF-1-Expression in der embryonalen Leptomeninx reguliert die Migration und die schichtspezifische Integration von CXCR4-exprimierenden Interneuronen in den sich entwickelnden Neocortex.

Während der embryonalen Entwicklung des Hippokampus wandern Vorläuferzellen in einer sekundären Keimschicht in den zukünftigen Hilus der Hippokampusanlage ein und etablieren hier eine Population proliferierender Zellen (Altmann & Bayer 1990a,b) (Abb.1.4). Die Zellen dieses Migrationsstroms besitzen den CXCR4-Rezeptor und folgen einem Kurs, der an SDF-1-exprimierende Hirnhäute grenzt. Lu *et al.* zeigten 2002, dass die Anzahl proliferierender Zellen in diesem Migrationsstrom und im Hilus in CXCR4-KO-Mäusen reduziert ist, außerdem differenzieren die unreifen Neurone vorzeitig und erreichen ihre Zielstrukturen, den Hilus und die Granularschicht, nicht. Die Befunde von Lu *et al.* wurden durch die Arbeit von Bagri *et al.* 2002 bestätigt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass SDF-1 über den CXCR4-Rezeptor die Wanderung und Reifung unreifer Neurone während der embryonalen Entwicklung steuert.

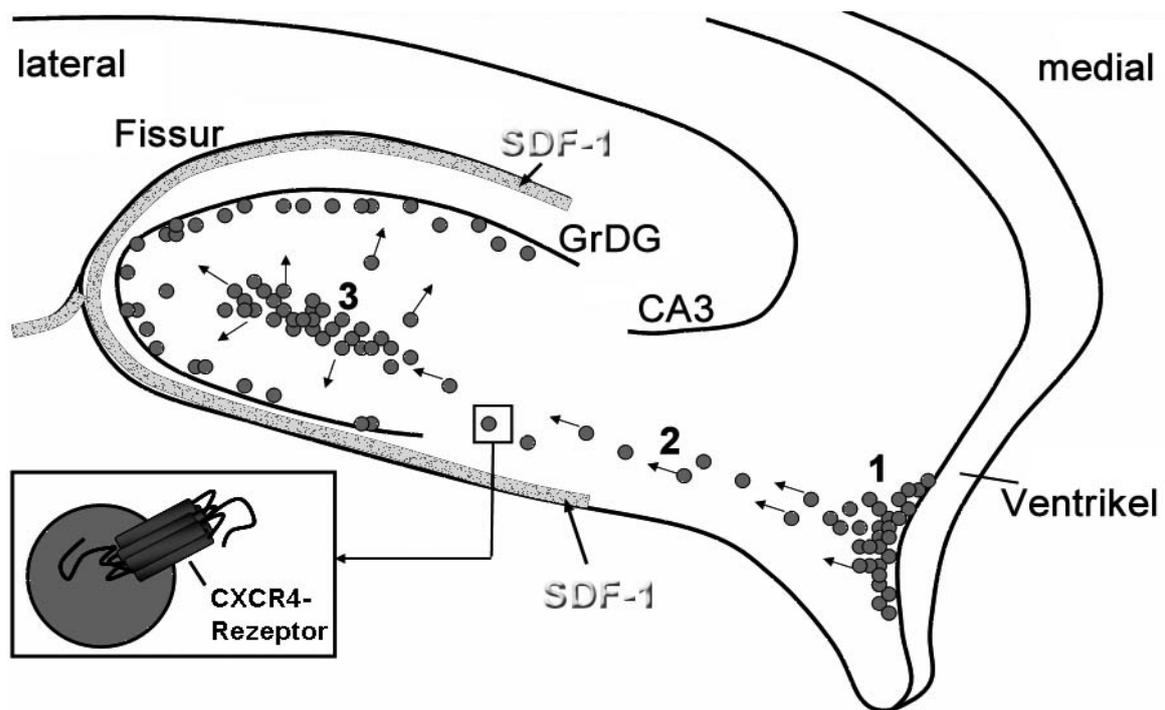


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Migrationsstroms proliferierender Vorläuferzellen in den Hilus des sich bildenden Gyrus dentatus. Vorläuferzellen des primären Neuroepithels am Seitenventrikel (1) bilden als Strom wandernder Zellen eine sekundäre Keimschicht (2) und formieren sich im Hilus zur tertiären Matrix, einer Population proliferierender Zellen (3). Die hier entstandenen Zellen wandern radial in die sich bildende Granularschicht (GrDG) ein. Die Zellen des Migrationsstroms exprimieren den CXCR4-Rezeptor und folgen einem Kurs, der an SDF-1-exprimierende Strukturen grenzt.

In den 1990er Jahren wurde durch die Arbeit verschiedener Gruppen etabliert, dass im adulten Gehirn lebenslang Gruppen proliferierender Stammzellen erhalten bleiben (Seki & Arai 1993, Eriksson *et al.* 1998). Es ist wahrscheinlich, dass viele der Mechanismen, die das Schicksal von Stammzellen während der Embryonalentwicklung des Organismus regulieren, bei der Steuerung adulter Stammzellen rekapituliert werden. Ebenso kann angenommen werden, dass adulte und embryonale Stammzellen zahlreiche gemeinsame Eigenschaften aufweisen. Da das Chemokin SDF-1 in der Embryonalentwicklung Migration und Reifung neuronaler Stammzellen beeinflusst, behält es möglicherweise eine vergleichbare Funktion im adulten Gehirn. Auch die Lokalisation des CXCR4-Rezeptors in einer neurogenen Nische weist auf eine mögliche Rolle des SDF-1/CXCR4-Systems in der Neurogenese hin (Stumm *et al.* 2003, Tran *et al.* 2007).

1.3. Adulte Neurogenese

1.3.1. Neurogene Nischen im adulten Gehirn

Die adulte Neurogenese, die Bildung neuer Nervenzellen im erwachsenen Gehirn, ist im Hippokampus auf eine dünne Gewebeschicht zwischen der Granularschicht und dem Hilus, die Subgranularschicht (SGS) des Gyrus dentatus (Abb. 1.3 A,C), begrenzt. Die neu gebildeten Zellen integrieren sich in die Granularschicht des Gyrus dentatus und differenzieren dort, indem sie Axone und Dendriten in die Zielregionen aussenden (Übersichtsartikel z.B. von Von Bohlen und Halbach 2007, Ehninger & Kempermann 2008). Adulte Neurogenese findet außerdem in der Subventrikularzone statt (Abb. 1.3 A). Die hier gebildeten Neurone wandern im so genannten rostralen Migrationsstrom (*rostral migratory stream*, RMS) in den Bulbus olfactorius (*olfactory bulb*, OB), differenzieren hier zu Interneuronen und etablieren funktionelle Synapsen mit benachbarten Zellen (Luskin 1993, Luskin 1994, Carlen *et al.* 2002, Belluzzi *et al.* 2003). Adulte Neurogenese findet lebenslang und im Gehirn aller bisher untersuchten Säugetiere einschließlich dem des Menschen statt (Eriksson *et al.* 1998), im jungen Organismus jedoch wesentlich intensiver.

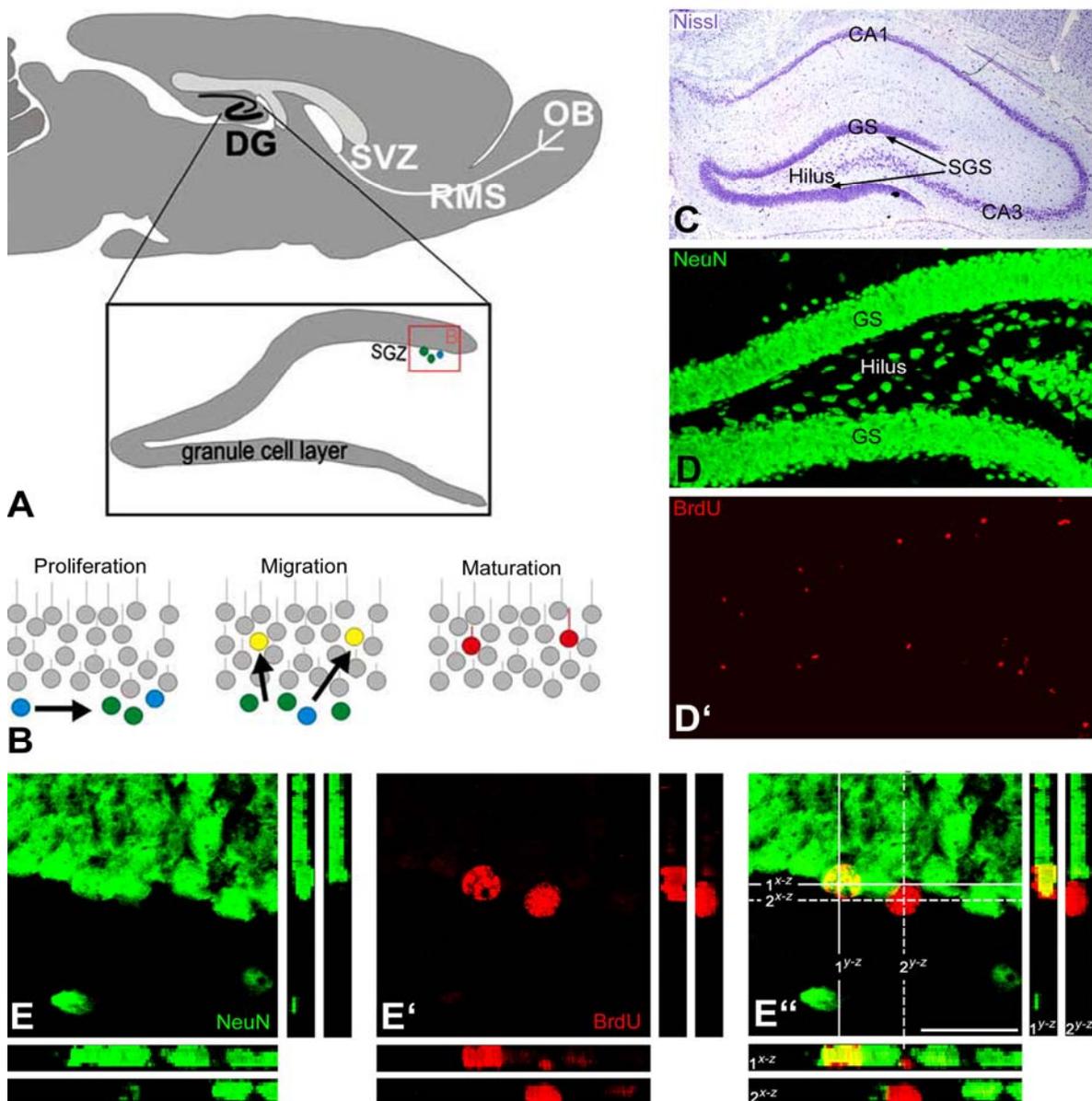


Abbildung 1.5: Nischen adulter Neurogenese am Beispiel der Maus. **A:** Im adulten Gehirn findet Neurogenese hauptsächlich in der Subgranularschicht (SGS) (*subgranular zone, SGZ*) des Gyrus dentatus (*dentate gyrus, DG*) und in der Subventrikularzone (SVZ) statt. Die in der SVZ neu gebildeten Neurone wandern im rostralen Migrationsstrom (*rostral migratory stream, RMS*) in den Bulbus olfactorius (*olfactory bulb, OB*). Im Gyrus dentatus sind die Vorläuferzellen in der SGS lokalisiert. Diese Zellen proliferieren und die hier neu gebildeten Neurone integrieren sich in die Granularschicht (GS) (*granule cell layer*). **B:** Schema adulter Neurogenese in der SGS/GS des Gyrus dentatus. Die Vorläufer (Blau) in der SGS proliferieren und die neu gebildeten Zellen (Grün) wandern in die GS (Gelb). Hier differenzieren sie, werden postmitotisch, senden Axone zur CA3-Region der Pyramidenzellschicht und Dendriten in die Molekularschicht und werden so funktionell in das hippocampale Netzwerk integriert (Rot). A,B leicht verändert aus Von Bohlen und Halbach 2007. **C:** Übersichtsfärbung des Hippokampus einer adulten Maus in einer Kresylviolett-Färbung

nach Nissl. Die Übersicht zeigt die Lokalisation der Granularzellen des Gyrus dentatus innerhalb des Hippokampus. Die SGS ist eine dünne Zellschicht zwischen GS und Hilus. **D,D'**: Neurogenese im Hippokampus einer adulten Maus. Ko-Immunfärbung mit einem Antikörper gegen NeuN (Grün in D), Marker für reife Neurone, und einem Antikörper gegen den Proliferationsmarker Bromodeoxyuridin (BrdU, Rot in D'). NeuN markiert die reifen Neurone der GS und des Hilus. Die BrdU-gefärbten Zellen sind hier etwa zehn Tage alt. **E,E',E''**: Beispiel für eine NeuN-negative BrdU-markierte Zelle und eine NeuN/BrdU-komarkierte Zelle in starker Vergrößerung. Maßstab: E'', 20µm. D,E aus Kolodziej *et al.* 2008a, verändert.

1.3.2. Phasen der adulten Neurogenese

Die gegenwärtig bekannten Prozesse, die zur Neubildung von Neuronen führen, untergliedert man zu deskriptiven Zwecken in fünf Phasen (Kempermann *et al.* 2004, Ming & Song 2005, Von Bohlen und Halbach 2007). Die Zellen exprimieren im jeweiligen Entwicklungsstadium spezifische Proteine, die für die Charakterisierung der Phasen als Marker herangezogen werden. Während der **Proliferationsphase** (Phase I) bilden die neu generierten Zellen GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) und Nestin (Fukuda *et al.* 2003, Filippov *et al.* 2003). Es wird angenommen, dass es sich bei dieser Zellgruppe um Stammzellen und Vorläuferzellen in der SGS handelt, die neue Granularzellen bilden (Seri *et al.* 2001). Diese Zellen weisen zahlreiche charakteristische Merkmale embryonaler Radialgliazellen auf (Levitt & Rakic 1980, Eckenhoff & Rakic 1984), die während der Embryonalentwicklung als neuronale Vorläufer fungieren (Hartfuss *et al.* 2001). Man geht davon aus, dass in der **Differenzierungsphase** (Phase II) der neuronale Charakter der Zellen festgelegt wird. In der frühen Phase II sind die Zellen Nestin-positiv, aber GFAP-negativ und weisen eine hohe Proliferationsrate auf (Kronenberg *et al.* 2003). Im weiteren Verlauf der Phase II wird die Expression von Nestin beendet und die Bildung von Doublecortin (DCX) und von PSA-NCAM beginnt (Kronenberg *et al.* 2003, Fukuda *et al.* 2003). In der **Migrationsphase** (Phase III) wird die Expression von DCX und PSA-NCAM fortgesetzt. Die unreifen Neurone wandern eine kurze Distanz, hinein in die Granularschicht des Gyrus dentatus. In der **axonalen und dendritischen Zielsteuerung** (Phase IV) bilden die unreifen Granularzellen neuronale Fortsätze. Die Zellen werden postmitotisch und senden axonale Projektionen zur CA3-Pyramidenzellschicht des Hippokampus und Dendriten in die Molekularschicht des Gyrus dentatus. Die

unreifen Neurone exprimieren weiterhin noch DCX und PSA-NCAM (Kempermann *et al.* 2004, Ming & Song 2005), außerdem beginnt in diesem Stadium die Bildung des neuronalen Markers NeuN (*neuron-specific nuclear protein*, Brandt *et al.* 2003). Während der **synaptischen Integration** (Phase V) etablieren die jungen Granularzellen dendritische Synapsen für Eingänge aus dem entorhinalen Kortex und axonale Synapsen in der CA3-Region und im Hilus. Die funktionell integrierten Neurone exprimieren konstitutiv NeuN (Kuhn *et al.* 1996). Mit Hilfe dieses Konzepts lassen sich Entstehung, Entwicklung und Schicksal neu gebildeter Neurone detailliert untersuchen, da das Erreichen der einzelnen Entwicklungsstadien mit der Expression verschiedener Marker korreliert ist.

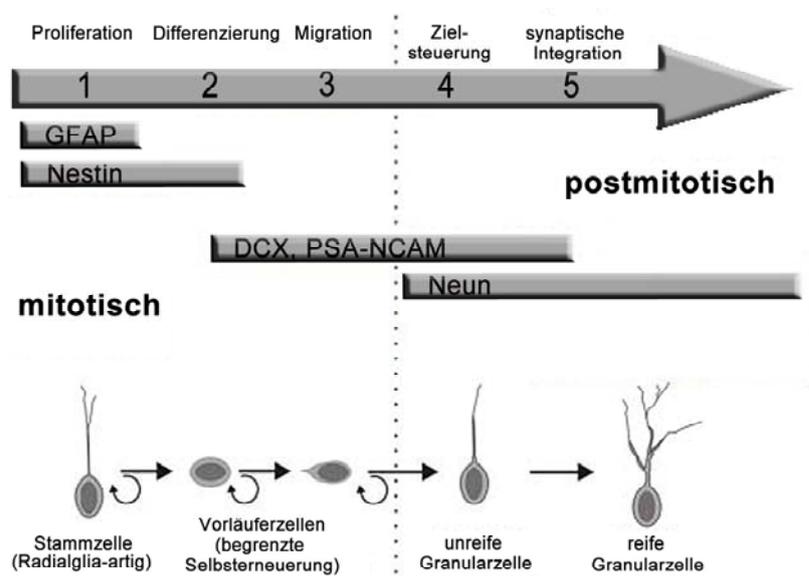


Abbildung 1.6: Phasen adulten Neurogenese und Expression charakteristischer Marker.

Die Bildung neuer Granularzellen kann in fünf Phasen unterteilt werden. Eine Stammzelle teilt sich (1) und die entstehenden Vorläuferzellen beginnen zu proliferieren (2) und weitere Vorläuferzellen zu bilden, die in die Granularschicht einwandern (3). Hier bilden

die unreifen Granularzellen axonale und dendritische Fortsätze, die in die Zielregionen (siehe Text) entsendet werden (4). Die neuen Granularzellen werden anschließend synaptisch in das Netzwerk des Hippokampus integriert (5). In den unterschiedlichen Phasen adulten Neurogenese exprimieren die neu gebildeten Zellen spezifische Moleküle, die als Marker für das jeweilige Stadium verwendet werden können. Abbildung aus Von Bohlen und Halbach 2007, verändert.

1.3.3. Beeinflussung der Neurogeneserate im adulten Hippokampus

Die Neurogeneserate im adulten Hippokampus wird unter physiologischen und pathologischen Bedingungen dynamisch reguliert. Diese Regulation findet auf zwei Ebenen statt. Zum einen kann die Teilungsrate während der Proliferationsphase von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst werden. Kronenberg *et al.* fanden 2003 eine verstärkte Zellteilung bei körperlicher

Betätigung. Auch epileptische Anfälle oder Ischämien können die Proliferation im Gyrus dentatus drastisch erhöhen (Jessberger *et al.* 2005, Arvidsson *et al.* 2001, Zhang *et al.* 2005). Die zweite Ebene, auf der die adulte Neurogenese entscheidend reguliert wird, ist das Überleben und die funktionelle Integration der neu gebildeten Neurone. Die Mehrheit der im erwachsenen Gehirn neu gebildeten Neurone wird, analog zur embryonalen und postnatalen Hirnentwicklung, schnell über Apoptose eliminiert (Biebl *et al.* 2000, Kuhn *et al.* 2005). Diese Eliminierung von Zellen findet postmitotisch, aber innerhalb der ersten 14 Tage, in der Phase der Doublecortinexpression, statt (Ehninger & Kempermann 2008). Für das Überleben der Zellen spielt die Aktivierung von N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Rezeptoren eine Rolle (Tashiro *et al.* 2006). Der Anteil der Zellen, die funktionell integriert werden, ist variabel, aber generell wird ein großer Überschuss an Vorläuferzellen gebildet, und nur ein geringer Prozentsatz dieser Zellen wird für ein Langzeitüberleben selektiert (Kempermann *et al.* 2003). Das Überleben neu gebildeter Neurone wird von kognitiven Stimuli positiv beeinflusst, so erhöht zum Beispiel das Leben in einer angereicherten Umwelt oder hippokampusabhängiges Lernen die Zahl integrierter Neurone (Kempermann *et al.* 1997, Gould *et al.* 1999, Dobrossy *et al.* 2003).

Die molekularen und zellulären Mechanismen, die dieser flexiblen Regulation der Neurogenese zugrunde liegen, sind weitgehend unbekannt. Um die Regulation von Neurogenese und hippokampaler Plastizität besser zu verstehen, müssen Faktoren identifiziert werden, die Generation und Überleben neuer Granularzellen kontrollieren. Aus zwei Gründen erscheint es naheliegend, das CXCR4-SDF-1-System auf eine solche Funktion im adulten Gehirn hin zu untersuchen: Zum einen ist es für die embryonale Entwicklung zahlreicher neuronaler Strukturen unabdingbar, insbesondere auch für die des Gyrus dentatus (Zou *et al.* 1998, Klein *et al.* 2001, Bagri *et al.* 2002, Lu *et al.* 2002, Chalasani *et al.* 2003a,b, Stumm *et al.* 2003, Lieberam *et al.* 2005, Borell & Marin 2006, Stumm & Höllt 2007). Es ist denkbar, dass der CXCR4-Rezeptor, der während der Embryonalentwicklung Migration, Teilung und Differenzierung von Stammzellen steuert, auch für adulte Stammzellen relevant ist. Außerdem wird der CXCR4-Rezeptor im adulten Hippokampus speziell in den Zellen der SGS des Gyrus dentatus exprimiert (Stumm *et al.* 2002, Lu *et al.* 2002), also genau dort, wo auch

die adulte Neurogenese stattfindet. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob der CXCR4-Rezeptor von Granularzellvorläufern und unreifen Granularzellen exprimiert wird und ob er die adulte Neurogenese beeinflusst.

1.3.4. Funktion der Neurogenese im adulten Hippokampus

Zur Funktion der Neurogenese im erwachsenen Hippokampus werden verschiedene Konzepte diskutiert. Da Schädigungen wie Ischämie oder Epilepsie die Neurogenese stark heraufregulieren, wird angenommen, dass sie einerseits zur Regeneration nach Hirnläsionen dient (z.B. Picard-Riera *et al.* 2004). Die kontinuierlich stattfindende Neurogenese stellt jedoch vermutlich hauptsächlich einen adaptiven Prozess dar, der die Kapazität des Hippokampus für die Verarbeitung neuer Informationen optimiert (Kempermann 2002, Doetsch & Hen 2005, Ehniger & Kempermann 2008). In geeigneten Lernparadigmen wie dem Wasserlabyrinth (*Morris water maze*) oder der klassischen Konditionierung wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass für hippokampusabhängiges Lernen scheinbar tatsächlich Neurogenese notwendig ist (Gould *et al.* 1999, Kempermann & Gage 2002, Drapeau *et al.* 2003, Shors *et al.* 2001). Basierend auf der Idee, dass der CXCR4-Rezeptor die Neurogenese beeinflusst, wurde hier geprüft, ob die Aktivität des CXCR4/SDF-1-Systems bei hippokampusabhängigem Lernen eine Rolle spielt.

1.4. Fragestellung

Der CXCR4-Rezeptor steuert die Migration und Proliferation von Granularzellvorläufern während der Embryonalentwicklung. Die Funktion des CXCR4-Rezeptors im postnatalen Hippokampus ist hingegen ungeklärt. Im Vorfeld dieser Arbeit gab es starke Hinweise darauf, dass der CXCR4-Rezeptor im adulten Hippokampus in Granularzellvorläufern gebildet wird (Lu *et al.* 2002, Stumm *et al.* 2002), was auf eine Funktion bei der Neurogenese hindeutet. Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Funktion und die Regulation des CXCR4-Rezeptors in neuronalen Vorläuferzellen im adulten Hippokampus und in neuronalen Primärkulturen zu untersuchen. Im Einzelnen wurden folgende Fragen bearbeitet:

- 1) Wie wird der CXCR4-Rezeptor im Hippokampus exprimiert?

In welchen Strukturen des postnatalen Hippokampus werden CXCR4-mRNA und CXCR4-Protein exprimiert?

Von welcher/n Zellart/en der SGS und des Hilus wird der CXCR4-Rezeptor im adulten Hippokampus exprimiert?

- 2) Wie wird der CXCR4-Rezeptor in neuronalen Vorläuferzellen reguliert?

Zeigt der CXCR4-Rezeptor in neuronalen Primärkulturen agonistinduzierte Internalisierung und Degradation, und ist dies mit einer Desensibilisierung der Signaltransduktion verbunden?

Gibt es Hinweise darauf, dass der CXCR4-Rezeptor im adulten Hippokampus durch den endogenen Liganden aktiviert und reguliert wird?

- 3) Wird die Neurogenese im adulten Hippokampus durch die Aktivität des CXCR4-Rezeptors beeinflusst?

Beeinflusst das Blockieren des CXCR4-Rezeptors die Neurogeneserate im adulten Hippokampus?

Beeinflusst das Blockieren des CXCR4-Rezeptors die Gedächtnisleistung in einem Paradigma für hippocampusabhängiges Lernen?

2. Methoden

Alle hier beschriebenen Experimente wurden gemäß den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland durchgeführt.

2.1. Tiere

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Untersuchungen mit männlichen Wistar-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, D) mit einem Gewicht zwischen 250 und 330g durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden jeweils fünf Tiere in einem Makrolon® Typ IV-Käfig unter standardisierten Laborbedingungen (nach den Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde) bei einer Raumtemperatur von $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, einer Luftfeuchtigkeit von $60\pm 5\%$ und einem 12h/12h Tag/Nacht-Rhythmus bei freier Verfügbarkeit von Pelletfutter und Leitungswasser gehalten.

2.2. Immunhistochemie

Entnahme und Vorbehandlung des Gewebes. Nach intraperitonealer Injektion von 4% Chloralhydrat in 0,9%iger Kochsalzlösung (1ml/100g Körpergewicht) wurde unter tiefer Anästhesie transkardial zunächst mit Tyrodes Lösung und anschließend mit Zambonis Fixativ perfundiert. Das Gehirn wurde entnommen und über Nacht bei Raumtemperatur in Zambonis Fixativ nachfixiert. Dann wurde das Gewebe mittels mehrtägiger Inkubation in 30%iger Sucroslösung bei 4°C gefriereschützt und es wurden am Gefriermikrotom (CM3000, Leica, Bensheim, D) $40\mu\text{m}$ -Schnitte angefertigt, die frei flottierend in TPBS bei 4°C maximal drei Wochen gelagert wurden (*free-floating-Technik*).

Tyrodes Lösung	(160mM NaCl; 2,7mM KCl; 0,5mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,36mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 5,55mM Glucose; 12mM NaHCO_3)
Zambonis Fixativ	(4% PFA und 0,2% Pikrinsäure in Phosphatpuffer mit 18mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 25mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
30%ige Sucroslösung	(30% Sucrose und 0,1% Thimerosal in Phosphatpuffer mit 28mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 2mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
TPBS	(10mM Tris; 155mM NaCl; 1,8mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 7,6mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,05% Thimerosal; pH 7,4)

Immunfärbung. Die Schnitte wurden zunächst in TPBS gewaschen und in 50%igem Ethanol permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit TPBS-T (0,3% Triton x-100 in TPBS) wurden unspezifische Bindungsstellen im Schnitt mit TPBS-TS3% (3% Ziegennormalserum in TPBS-T) geblockt. Über Nacht erfolgte dann die Inkubation mit dem primären Antikörper in TPBS-TS1% (1% Ziegennormalserum in TPBS-T) bei 4°C.

Direkte Detektion: Am folgenden Tag wurde nach vierfachem Waschen in TPBS-T 4h mit dem Cy3-markierten sekundären Antikörper (1:500) in TPBS-TS1% bei Raumtemperatur detektiert. Nach einem abschließenden Waschschriff wurden die Schnitte auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen, mittels einer Alkoholreihe entwässert und eingedeckt.

Indirekte Detektion mit Signalamplifikation: Am folgenden Tag wurde nach vierfachem Waschen in TPBS-T 4h mit dem biotinylierten sekundären Antikörper (1:500) in TPBS-TS1% bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen in TPBS-T, Inkubation in Peroxidase-konjugiertem Avidin/Biotin-Reagenz (Vectastain Elite ABC-Kit, Linaris, Wertheim, D) und erneutem Waschen in TPBS-T folgte eine katalytische Amplifikation des Signals mit biotinyliertem Tyramin (Adams 1992). Dieses wurde nach einem weiteren Waschschriff mit Streptavidin-gekoppeltem Alexa Fluor® 488 oder Alexa Fluor® 555 (MoBiTec, Göttingen, D) in TPBS-T detektiert. Nach abschließendem Waschen wurden die Schnitte auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen, mittels Alkoholreihe entwässert und eingedeckt.

Komarkierungen: Zur Markierung von zwei unterschiedlichen Antigenen im gleichen Schnitt wurde sequenziell vorgegangen: Zunächst wurde mit dem einen Primärantikörper inkubiert und entsprechend dem Protokoll „indirekte Detektion“ biotinyliertes Tyramin im Schnitt abgelagert. Anschließend wurde mit dem anderen Primärantikörper über Nacht inkubiert, und beide Antigene wurden dann mit einem Mix aus Alexa Fluor® 488 und Cy3-markiertem Sekundärantikörper detektiert.

BrdU-Markierung: Bromodeoxyuridin (BrdU¹) wurde immer direkt markiert. Da BrdU bei der Zellteilung in die DNA eingelagert wird, sind vor dem Binden des Primärantikörpers spezielle Schritte nötig, um das Antigen zugänglich zu machen. Die Schnitte werden nacheinander in Formamid/2xSSC (2h, 65°C), 2xSSC (5 min), 2MHCl in ddH₂O (30 min, 37°C) und Boratpuffer (15 min) inkubiert. Bei einfacher Markierung

¹ BrdU ist ein Analogon der Stickstoffbase Thymidin und wird während der Zellteilung im Zuge der DNA-Transkription in die DNA der entstehenden Tochterzellen eingebaut. Da BrdU nach intraperitonealer Injektion nur wenige Stunden verfügbar bleibt, lassen sich damit die Zellen markieren, die sich in einem bestimmten Zeitfenster geteilt haben.

wurden diese Arbeitsschritte vor dem Blockieren in TPBS-TS 3% durchgeführt, bei Komarkierungen nach dem Binden von biotinyliertem Tyramin im Schnitt ins Protokoll eingefügt.

Formamid/2xSSC (50% Formamid in 2xSSC mit 300mM NaCl und 30mM $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)

Boratpuffer (100mM Borsäure in ddH₂O; pH 8,5)

Antikörper. Zur immunhistochemischen Darstellung des CXCR4-Proteins wurden affinitätsgereinigte polyklonale Antiseren aus dem Kaninchen gegen die C-terminale Sequenz des CXCR4-Rezeptors (Maus, Ratte; Aminosäurereste 338-359) verwendet (Stumm *et al.* 2002). Diese Antiseren (2144 und 1181) wurden ausführlich mittels Immuncytochemie, Westernblot und Immunpräzipitation charakterisiert. Die Spezifität der CXCR4-Immunfärbung wurde an CXCR4-*knockout*-Mäusen (Embryonaltag 16 (E16), Abb. 2.1) überprüft. CXCR4 wurde entweder indirekt mit Amplifikation (1µg/ml) oder direkt (10µg/ml) detektiert. Der Proliferationsmarker BrdU wurde mit einem monoklonalen Antikörper aus der Ratte (*Rat monoclonal anti-BrdU*, BU1/75, #SM1667, Acris antibodies, Hiddenhausen, D; 1:1000) dargestellt. Als neuronale Marker wurden Antikörper gegen Doublecortin (DCX) (*Guinea pig polyclonal anti-doublecortin*, AB910, Chemicon, Hofheim, D; 1:1000) und gegen NeuN (*Mouse monoclonal anti-NeuN*, A60, MAB377, Chemicon, Hofheim, D; 1:3000) verwendet. Zur Darstellung des sauren Gliafaserproteins (*Glial fibrillary acidic protein*, GFAP) als Marker für Glia und Stammzellen wurde ein polyklonaler Antikörper aus dem Meerschwein (*Guinea pig polyclonal anti-GFAP*, Gp52, Progen, Heidelberg, D; 1:2000) benutzt. Zwei Antikörper aus der Maus dienten zur Markierung des Stammzellmarkers Nestin (*Mouse monoclonal anti-Nestin*, Rat-401, MAB353, Chemicon, Hofheim, D; 1:50) bzw. von Somatostatin (*Mouse monoclonal anti-Somatostatin*, SOM-14, Biomedica, Burlingame, CA; 1:50) als Markerprotein für GABAerge Neurone.

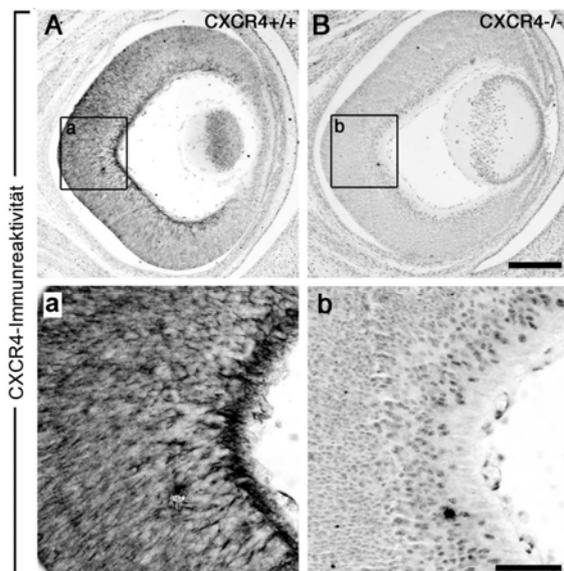


Abbildung 2.1: Spezifität des CXCR4-Antiserums [1181]. Immunfärbung vom Kopf eines Wildtyp-Mausembryos (A) im Vergleich zur CXCR4-*knockout*(KO)-Maus (B) am Embryonaltag 16. Das sich entwickelnde Auge ist jeweils vergrößert dargestellt (a,b). Die Retina des Wildtyps zeigt intensive Immunreaktivität (A,a), in der CXCR4-KO ist eine leichte Hintergrundfärbung zu beobachten (B,b). Maßstäbe: A,B: 200µm; a,b: 70µm.

2.3. mRNA-Expressionsanalyse mittels *in-situ*-Hybridisierung

Generierung von RNA-Sonden für die in-situ-Hybridisierung. cDNA Fragmente der Gene (*Rattus norvegicus*) für CXCR4 (U90610, Nukleotide 1-1050) (Stumm *et al.* 2002), SDF-1 α (GI:76496502, Nukleotide 492-1002) (Stumm *et al.* 2007), GAD Mr 67.000 (GI:204229, Nukleotide 1200-2041) (Stumm *et al.* 2001), Pre-prosomatostatin (GI:207030, Nukleotide 32-307) (Stumm *et al.* 2002) und VGLUT1 (GI:507414, Nukleotide 1644-2000) (Stumm *et al.* 2004) wurden durch RT-PCR generiert. Laut Genbank (BLAST-Search auf der Internetseite des *National Center for Biotechnology Information*, NCBI) sind diese cDNA-Fragmente spezifisch für das jeweilige Gen. Diese Fragmente wurden in den Vector pGEM[®] T Easy (Promega, Mannheim, D) mit Promotoren für die RNA-Polymerasen T7 und SP6 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D) ligiert und die rekombinanten Plasmide wurden in *Escherichia coli* (XL1 blue, Stratagene, Amsterdam, NL) transformiert. Mittels Blau-Weiß-Selektion wurden positive Klone identifiziert und in Vorkulturen vermehrt, die DNA wurde in Minipräparationen (Qiagen[®] Plasmid Mini Kit (100); Qiagen GmbH, Hilden, D) isoliert und die Konstrukte wurden durch Restriktionsverdau charakterisiert. Rekombinante Plasmide wurden wiederum in Bakterien transfiziert und vermehrt, in Maxipräparationen (EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit (10); Qiagen GmbH, Hilden, D) aufbereitet und durch Sequenzanalyse überprüft. Von den oben genannten und hier untersuchten Genen standen in der Arbeitsgruppe Stumm Vektorkonstrukte mit partiellen cDNA-Matrizen zur Verfügung und die daraus resultierenden Sonden waren bereits charakterisiert.

Zur run-off-*in-vitro*-Transkription (Melton *et al.* 1984) wurden die Plasmide mit geeigneten Restriktionsendonukleasen linearisiert und gereinigt. Zur *in-vitro*-Transkription durch die RNA-Polymerasen T7 bzw. SP6 wurde 1 μ g linearisierte Plasmid-DNA in 10 μ l eingesetzt. Der Transkriptionsansatz zur Herstellung radioaktiv markierter Sonden enthielt außerdem 10mM DTT, je 0,5mM unmarkiertes ATP und GTP und jeweils 15pm/ μ l [³⁵S-UTP] und [³⁵S-CTP] (1000 Ci/mmol; 10mCi/ml, GE Healthcare, Freiburg, D). Zur Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter Sonden wurde dem Ansatz 1:10 DIG RNA-Labeling-Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D) zugesetzt. Bei beiden Arten der Markierung wurden außerdem 15 Einheiten RNase-Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot, D) zugegeben. Nach der Transkription wurden die Ansätze von 10 μ l mit ddH₂O auf 20 μ l aufgefüllt und zur alkalischen

Hydrolyse nach Angerer *et al.* (1987) 1+1 mit 0,2M Na₂CO₃ (pH10,2) versetzt. Die Hydrolysezeiten wurden nach folgender Formel berechnet: $t=(l_0-l_f)/(k \cdot l_0-l_f)$; (l_0 : Ausgangslänge in kb; $l_f=0,25$ kb; $k=0,11\text{min}^{-1}\text{kb}^{-1}$). Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 10%iger Essigsäure (1:20) gestoppt und die Sonden wurden über Gelsäulen (*RNase-Free Micro Bio-Spin Columns mit Bio-Gel P-30 in Tris Buffer*, BIO-RAD, München, D) aufgereinigt. Radioaktive Sonden wurden mit Hybridisierungspuffer auf 50000 dpm/μl eingestellt, DTT wurde dem Hybridisierungsmix ad 20mM zugegeben. DIG-markierte Sonden wurden zur Lagerung (-70°C) mit ddH₂O auf 50ng/μl eingestellt.

Hybridisierungspuffer

(600mM NaCl; 10mM TrisCl pH7,5; 1mM di-Na-EDTA; 0,05% (w/v) tRNA; 1xDenhardt's; 50% Dextransulfat; 100μg sonicated salmon sperm DNA; 50% Formamid)

Entnahme und Vorbehandlung des Gewebes. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Chloralhydrat-Injektion anästhesiert und dekapitiert. Das Gehirn wurde zügig entnommen und sofort in Isopentan bei -35±5°C eingefroren. Anschließend wurden die Präparate kurz auf Trockeneis gelegt, bis anhaftendes Isopentan verdunstet war, in Aluminiumfolie eingeschlagen und bei -70°C aufbewahrt. Im Kryostaten (CM3000, Leica, Bensheim, D) wurden bei -22°C 25μm-Schnitte direkt auf adhäsive Objektträger aufgezogen; diese wurden bei -70°C aufbewahrt. Die Gefrierschnitte wurden vor der Hybridisierung kurz luftgetrocknet, 1h in 4%PFA in PBS fixiert, in PBS gewaschen, 10 min mit 0,4% Triton-X100 in PBS permeabilisiert, in ddH₂O gewaschen, 10 min in neutralem 1,5% tri-Ethanolamin +0,25% Essigsäureanhydrid in ddH₂O azetyliert, in 1xPBS und ddH₂O gewaschen und in Isopropanol entwässert. Die prähybridisierten Präparate wurden bei -20°C gelagert.

PBS

(150mM NaCl, 8mM Na₂HPO₄·12H₂O, 2mM NaH₂PO₄·H₂O; pH7,4)

Radioaktive in-situ-Hybridisierung. Die prähybridisierten Gefrierschnitte wurden getrocknet und mit etwa 40μl der radioaktiven Sonde („Hybridisierungsmix“) betropft, welche durch ein aufgelegtes Deckglas verteilt wurde. Die Hybridisierung fand über Nacht in einer feuchten Kammer (50% Formamid in ddH₂O) statt. Anschließend wurde in absteigenden Salzkonzentrationen für jeweils 20min gewaschen (2xSSC, 1x SSC, 0,5xSSC, 0,2xSSC, ddH₂O). Zwischen diesen

Waschschritten wurde eine RNase-Behandlung (nach 1xSSC, 30min, 37°C) und eine Stringenzwäsche (in 0,2xSSC, 1h, 60°C) durchgeführt. Die Präparate wurden in Isopropanol entwässert. Zur Detektion wurden Röntgenfilme (KodakBioMax-MR1, GE Healthcare, Freiburg, D) verwendet, die nach einer Expositionszeit von 3 Tagen entwickelt wurden. Für Abbildungen wurden die Filme gescannt (MRS-1200TP, Microtek Intern. Inc.).

2xSSC (300mM NaCl; 30mM $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)

RNase (10mM Tris-Cl; 0,5M NaCl; 1mM EDTA; 40µg/ml RNase A (Roche); 1U/ml RNase T1 (Roche); pH 8,0)

Kombination der radioaktiven mit der DIG-in-situ-Hybridisierung. Die Doppel-*in-situ*-Hybridisierung wurde an 20µm-Schnitten durchgeführt. Die jeweilige DIG-markierte Sonde wurde dem fertigen Hybridisierungsmix mit der radioaktiven Sonde ad 1µg/ml zugesetzt. Die Hybridisierung und die Waschprozedur wurden wie beschrieben durchgeführt, am Ende wurde jedoch nicht entwässert, sondern die Präparate wurden für eine Stunde in Puffer 1 (100mM Tris; 150mM NaCl; pH7,5) äquilibriert und für eine Stunde mit Blockierungspuffer (5% normales Lammserum und 0,05% Tween 20 in Puffer 1) behandelt. Anschließend wurden die Schnitte für 1h mit Anti-Digoxigenin-Fab (gekoppelt an alkalische Phosphatase) (Roche), 1:500 in Blockierungspuffer inkubiert und dann mit Puffer 1 gewaschen. Die Detektion der Anti-Digoxigenin-Fab erfolgte nach Herstellerangaben mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat und Nitroblautetrazoliumchlorid. Die Präparate wurden entwässert und mit einer Photoemulsion (50% K5-Emulsion, Ilford, Dreieich, D) beschichtet. Die Beschichtung wurde nach einer Expositionszeit von 3-4 Wochen entwickelt. Bilder wurden mit einer Kamera (SV MICRO, USA) aufgenommen.

2.4. Substanzapplikationen

Implantieren osmotischer Minipumpen über ein Brain Infusion Kit. Zur intracerebroventrikulären (icv.) Applikation von 5mg/ml AMD3100 oder Saline wurden osmotische Minipumpen (Modelle 1007d und 2002, Flussrate 0,5µl/h, ALZET, Palo Alto, CA, USA) mit dem *Brain Infusion Kit II* (Abb. 2.2) subkutan implantiert.

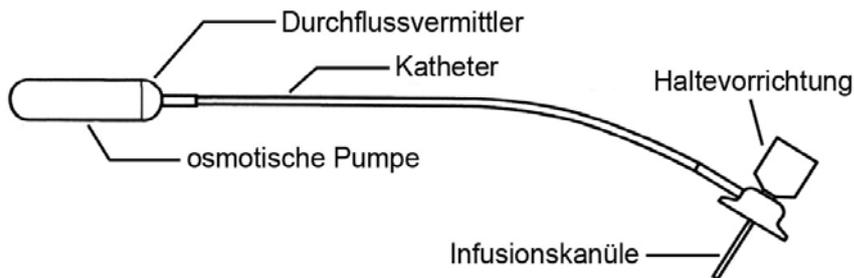


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der osmotischen Minipumpe mit dem Brain Infusion Kit (ALZET). Pumpe und Infusionssystem (Durchflussvermittler, Katheter, Kanüle) werden luftblasenfrei mit der Substanzlösung befüllt, anschließend wird beides zusammengesteckt. Eine Vorinkubation für 24h in steriler Kochsalzlösung bei 37°C stellt eine gleichmäßige Substanzabgabe zum Zeitpunkt der OP sicher.

Die Tiere wurden hierzu mit 1,5% Isofluran in einem Gemisch aus Lachgas und Sauerstoff (70:30) narkotisiert und in einem stereotaktischen Apparat fixiert. Die Kornea wurde während des Eingriffs mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe vor dem Austrocknen geschützt. Nach Schneiden des Fells und Desinfektion der Haut wurde mit einem Skalpell ein etwa 2,5 cm langer Hautschnitt beginnend zwischen den Augen und endend zwischen den Ohren geführt. Mit Hilfe einer Aesculapschere wurde stumpf zwischen den Schulterblättern eine subkutane Tasche für die Pumpe gebildet. Mit Operationshäkchen wurde der Schädelknochen exponiert, mit 3%igem H₂O₂ und 70%igem Ethanol wurde gründlich gesäubert und desinfiziert (Abb. 2.3 A). Nach dem Stillen eventueller Blutungen wurde mit Hilfe eines Zahnarztbohrers (Ø 0,45mm) 0,9mm posterior und 1,7mm lateral vom Bregma eine Öffnung für die Kanüle des Brain Infusion Kits gebohrt (Außendurchmesser 0,36mm) und die Dura wurde mit einer dünnen, Kanüle vorsichtig durchstoßen. Anschließend wurde die Pumpe zwischen den Schulterblättern implantiert und die Kanüle wurde mit Hilfe der Haltevorrichtung platziert und mit Histoacryl (Braun Aesculap AG, Tuttlingen, D) fixiert. In eine weitere Bohrung

wurde eine kleine Schraube zur Verankerung des Zementsockels gedreht, ohne die Dura zu verletzen (Abb. 2.3 B). Der Schädelknochen wurde nochmals gründlich gesäubert und getrocknet und Schraube und Kanüle wurden dann mit Zahnzement umgeben. Mit einer Schere wurde die Haltevorrichtung vorsichtig entfernt (Abb. 2.3 C). Vor dem Verschließen der Wunde mit einer Einzelknopfnah (Abb. 2.3 D) wurde Xylocainspray aufgesprüht.

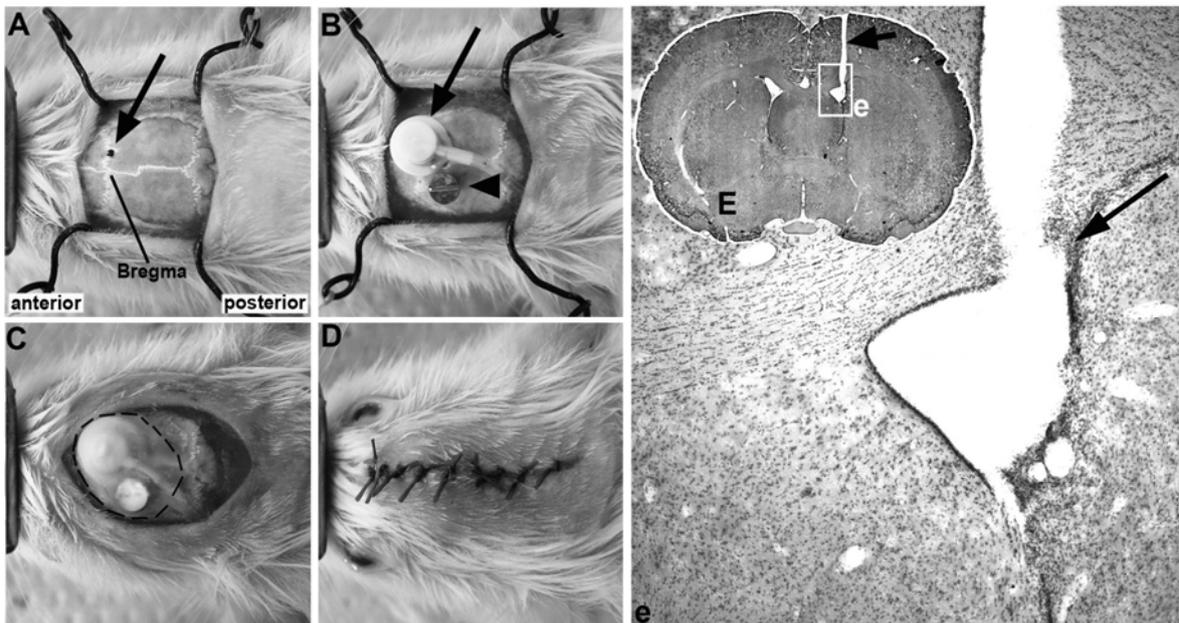
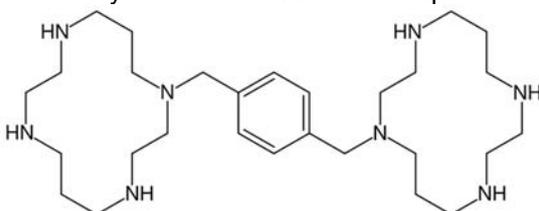


Abbildung 2.3: *Implantieren einer osmotischen Minipumpe mit Brain Infusion Kit zur intracerebroventrikulären Substanzapplikation.* **A:** Unter Isoflurannarkose wurde die Schädeldecke freigelegt und gereinigt, die Lokalisation der Kanüle (Bregma -0,9mm posterior; -1,7mm lateral) wurde stereotaktisch ermittelt und markiert (Pfeil). **B:** Mit einem Feinbohrer wurde je ein Loch für die Kanüle und eine Halteschraube gebohrt, und beides wurde platziert (Pfeil: Haltevorrichtung der Kanüle, Pfeilspitze: Schraube zur Fixierung). **C:** Die Haltevorrichtung (vgl. Abb. 2.2 und Abb. 2.3b) wurde entfernt. Die Infusionskanüle und die Schraube wurden mit einem Sockel aus Zahnzement auf dem Schädelknochen fixiert. **D:** Die Wunde wurde mit einer Einzelknopfnah verschlossen. **E:** Beispiel eines Stichkanals (Pfeil), gezeigt in einer Kresylviolett-Übersicht (Frontalschnitt). Die Vergrößerung zeigt den Einstich in den rechten Seitenventrikel (e).

icv.-Applikation von AMD3100, BrdU-Injektionen. Die Expression des CXCR4-Rezeptors wurde nach 13 Tagen *icv.-Applikation* von AMD3100¹ oder physiologischer Kochsalzlösung mittels Immunhistochemie (NaCl, n=5; AMD3100, n=6) und *in-situ*-Hybridisierung (NaCl, n=6; AMD3100, n=7) quantifiziert. Qualitative Expressionsanalysen wurden immunhistochemisch nach 6 Tagen (osmotische Minipumpe, n=7), nach 2 Tagen, nach 1 Tag AMD3100-Applikation (jeweils 3xtäglich über implantierte Führungskanüle, n=3) und 4h nach einer einmaligen Applikation (n=3) durchgeführt. Um den Einfluss von AMD3100 auf das Überleben neu gebildeter Granularzellen im *Gyrus dentatus* zu untersuchen, wurde der Proliferationsmarker BrdU verwendet. Vor der Behandlung mit AMD3100 wurde in 48h fünfmal jeweils 100mg/kg BrdU appliziert. Anschließend wurde über 13 Tage AMD3100 oder Kochsalz *icv.* infundiert und dann nach 13 bzw. nach 23 Tagen analysiert (vergleiche Abb. 3.10; Versuch über 13d: NaCl, n=5, AMD3100, n=6; Versuch über 23d: NaCl, n=10, AMD3100, n=10). Um weiterhin zu untersuchen, ob AMD3100-induzierte Veränderungen in der Neurogenese mit Veränderungen im hippokampalen Lernen korreliert sind, wurde ein geeigneter Lerntest durchgeführt (Objekterkennungstest nach Bruel-Jungerman *et al.* 2005). Hierzu wurden Ratten während der *icv.-Infusion* von AMD3100 bzw. Kochsalz unter Standardbedingungen (STD) oder in einer angereicherten Umwelt (ANG) gehalten und anschließend im Objekterkennungstest geprüft (NaCl/STD, n=10; NaCl/ANG, n=10; AMD3100/STD, n=10; AMD3100/ANG, n=10).

¹ Das Bizyklam AMD3100 wirkt als spezifischer Antagonist am CXCR4-Rezeptor. Strukturformel:



2.5. Zellzählungen

Alle Auswertungen wurden verblindet vorgenommen. Zur Ermittlung der Anzahl CXCR4-positiver Zellen nach Behandlung mit AMD3100 bzw. NaCl wurde zwischen Bregma -2,8 und Bregma -4,4 in jedem achten Schnitt (Abb. 2.4) der CXCR4-Rezeptor gefärbt. Auswertungen erfolgten an einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM IRBE, Leica, Bensheim), ausgestattet mit einem Argon/Krypton-Laser, und der *Confocal Software* von Leica. Gezählt wurden stark CXCR4-positive Zellen in der Subgranular- und Granularschicht in der bezüglich der Infusionskanüle kontralateralen Hippokampushälfte (vergleiche Ergebnisse, Abb. 3.2 G). Auf analoge Weise wurde die Gesamtzahl neu gebildeter Zellen in Subgranular- und Granularschicht anhand einer BrdU-Färbung ermittelt (Ergebnisse, Abb. 3.10, B,E).

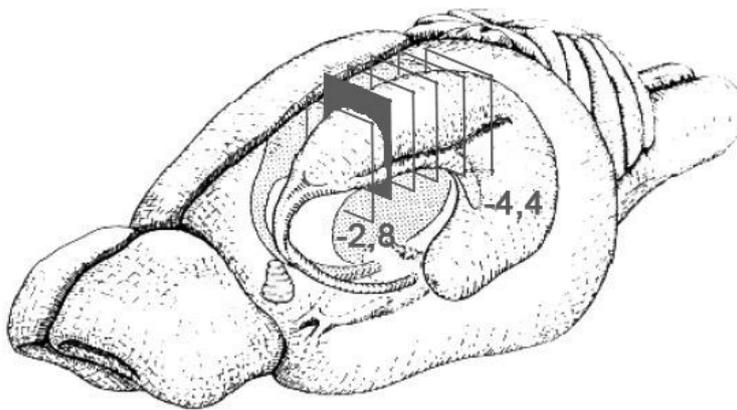


Abbildung 2.4: Zur Ermittlung der Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen wurden Schnittserien angefertigt und gefärbt. Zwischen Bregma -2,8 und -4,4 wurde jeder achte Schnitt gefärbt (6 Schnitte pro Tier). Die grauen Kästen verdeutlichen die Schnittführung und die Lokalisation der untersuchten Schnitte.

Der Anteil neuronaler Zellen an den BrdU-positiven Zellen wurde pro Tier an 50 zufällig ausgewählten BrdU-Zellen in unterschiedlichen Schnittebenen anhand der Komarkierung mit Doublecortin bzw. mit NeuN ermittelt. Hierzu wurde für jede Zelle die Kolo-kalisation beider Signale in einem Stapel von mindestens 5 konfokalen Aufnahmen entlang der z-Achse ausgewertet (Abschnitt Ergebnisse, Abb. 3.10, A,C,G,F).

2.6. Immuncytochemie

Primärkultur von Neuronen. Primäre Neuronenkulturen wurden aus Ratten-Embryonen (Wistar, E17) gewonnen. Terminlich angepaarte trüchtige Weibchen (Anpaarung im Tierlabor des Instituts; Elterntiere: CharlesRiver, Sulzfeld, D) wurden mit 4%Chloralhydrat (1ml/100g Körpergewicht) anästhesiert, der Uterus wurde entnommen und in eine sterile Kulturschale überführt. Alle weiteren Schritte wurden unter sterilen Bedingungen (*Microflow Laminar Flow Workstation*, Nunc, Wiesbaden-Biebrich, D und Sicherheits-Werkbank BDK-S1500, BDK, Sonnenbühl, D) durchgeführt. Die Amnionsäcke wurden aus dem Uterus entnommen und in das Dissektionsmedium (*Hank's Balanced Salt Solution*, ohne Ca und Mg, Lonza, Verviers, Belgien) HBSS+HEPES überführt. Die Embryonen wurden dekapitiert und das Gehirn wurde herauspräpariert. Mit Hilfe einer kleinen Schere wurden beide Kortexhälften abgetrennt, anschließend konnte der Hippokampus isoliert werden. Das Gewebe wurde in kleine Stücke zerteilt ($<1\text{mm}^3$) und für 15 min bei 36°C trypsinisiert (0,05%Trypsin, 5mM EDTA*2Na in HBSS). Anschließend wurde kurz in Trypsininhibitor/DNase (0,3% Rinderserum, Soybeaninhibitor (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) und DNase I (Sigma-Aldrich) in HBSS/HEPES) inkubiert und danach mit 5ml HBSS gewaschen. Die Zellen wurden dann durch Triturieren (Kanülen: 21G, 25G) vereinzelt und mit Hilfe einer feinen Gaze ($30\mu\text{m}$ Maschenweite) wurde die Zellsuspension gefiltert. Die Zahl der Zellen pro Milliliter wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und es wurden 500.000 Zellen pro Well einer 12-Well-Platte in NeurobasalTM Medium (ohne Glutamin, invitrogenTM Gibco, Karlsruhe, D; +Glutamin, +B27-Supplement, +Penicillin/Streptomycin) ausgesät.

Transfektion primärer Neurone. Etwa 5Mill. Zellen wurden durch Zentrifugieren pelletiert und nach Abnehmen des Überstandes in Transfektionslösung (aus *Rat Nucleofector® Kit*, amaxa GmbH, Köln, D) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in eine Küvette überführt, es wurde nach Instruktionen des Herstellers mit dem Nucleofector II (amaxa) transfiziert und in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* mit 4,5g/l Glucose und L-Glutamin; Lonza; +FKS, +Penicillin/Streptomycin) ausgesät. Nach dem Adhären der Zellen wurde DMEM gegen NeurobasalTM Medium ausgetauscht.

Subzelluläre Lokalisation des endogenen und des transfizierten CXCR4-Rezeptors. Die Charakterisierung der subzellulären Lokalisation des endogenen

CXCR4-Rezeptors oder des transfizierten CXCR4 mit T7-Epitop (CXCR4-T7) erfolgte anhand von Immunfärbungen am Konfokalmikroskop (Leica DM IRBE, Leica, Bensheim, D). Die Zellen wurden mit 10nM SDF-1 (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, D), 6µM AMD3100 (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D) oder einer Kombination aus beidem wie im Ergebnisteil beschrieben behandelt. Die Kulturen wurden mit Zambonis Fixativ fixiert, in TPBS gewaschen und mit Methanol permeabilisiert. Nach weiterem Waschen und Blockieren in TPBS-TS 3% wurde der endogene CXCR4-Rezeptor mit einem anti-CXCR4 [1181] und der T7-CXCR4 mit einem anti-T7 Antikörper (beide affinitätsgereinigt, Gramsch Laboratories, Schwabhausen, D) markiert und mit Cy3-markiertem sekundärem Antikörper detektiert. Zur semiquantitativen Analyse der T7-CXCR4-Internalisierung wurden primäre Neurone mit zwei Plasmiden mit T7-CXCR4 bzw. EGFP im Verhältnis 1:10 kotransfiziert. Anhand der grünen Fluoreszenz wurden transfizierte Zellen ausgewählt und kategorisiert wie im Ergebnisteil beschrieben. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit je 20 ausgewerteten Zellen pro Behandlungsgruppe wurden gemittelt.

Internalisierungsuntersuchungen. Die Internalisierung des CXCR4-Rezeptors wurde mit Hilfe von Oberflächenmarkierungen quantifiziert. Es wurden mit T7-CXCR4 transfizierte neuronale Zellen verwendet oder stabil mit T7-CXCR4 transfizierte HEK293¹-Zellen. Die lebenden Kulturen wurden vor oder nach der Behandlung mit 1µg/ml anti-T7-Antikörper inkubiert. Zur quantitativen Auswertung der Oberflächenrezeptoren wurde ein ELISA (Pfeiffer *et al.* 2003) wie folgt durchgeführt: Die Zellen wurden fixiert und mit Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (1:1000, GE Healthcare, Freiburg) inkubiert. Es wurde gewaschen und mit 250µl ABTS-Lösung (Roche Applied Science, Mannheim, D) pro Well wurde die Enzymreaktion gestartet. Nach 15 min wurden 200µl des gefärbten Substrates aus jedem Well auf eine 96-Well-Platte übertragen und mit einem Mikroplatten-Leser (ASYS, Expert Plus UV, Hightech GmbH, A) bei 405nm analysiert. Als Referenz dienten unbehandelte Kulturen, die direkt nach der Markierung fixiert wurden (100% Oberflächenrezeptor). Für mikroskopische Analysen wurden die Rezeptoren vor der Stimulation markiert, anschließend wurde fixiert, permeabilisiert und mit einem Cy3-gekoppelten Antikörper detektiert.

¹ *Human embryonic kidney*, HEK, humane Zelllinie aus embryonalen Nierenzellen

Analyse des CXCR4-Rezeptors im Westernblot. Alle Stimulationen mit SDF-1 (10nM) und AMD3100 (6µM) wurden in Neurobasal-Medium etwa 24h nach dem Aussäen der Zellen durchgeführt. Die Zellen (15×10^6 pro Spur) wurden nach der Behandlung in 500µl kochendem SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die im Lysat enthaltenen Glykoproteine wurden an Agarosekügelchen („beads“) aus Weizenkeim-Agglutinin (*wheat germ lectin agarose*, WGA; Vector Laboratories, Burlingame, CA) gebunden. Die Kügelchen mit den adsorbierten Glykoproteinen wurden durch Zentrifugieren sedimentiert, gewaschen, und die Glykoproteine wurden mit SDS-Probenpuffer für 20 min bei 60°C eluiert. Die so konzentrierten Membranproteine wurden einer 10% SDS-PAGE unterzogen und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Blots wurden über Nacht mit 1µg/ml affinitätsgereinigtem anti-CXCR4 [1181] inkubiert. Die Signale wurden über einen Peroxidase-gebundenen Sekundärantikörper (*anti-rabbit horseradish peroxidase-linked IgG*, GE Healthcare, Freiburg, D) und Chemilumineszenz (*ECL Western Blotting Kit*, GE Healthcare) detektiert. Um die geladene Proteinmenge zu kontrollieren, wurden die gebundenen Antikörper nach der Detektion von der Membran abgelöst (in Ablösepuffer, 1h, 60°C) und der Transferrin-Rezeptor (TFR) wurde mit 1µg/ml Maus anti-Human-TFR Antikörper (Invitrogen) detektiert. Der Quotient aus CXCR4- und TFR-Signal wurde densitometrisch bestimmt und dann gegen den entsprechenden Quotienten der Kontrollgruppe normalisiert. Diese normalisierten Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Experimenten gemittelt.

SDS-Probenpuffer (150mM NaCl; 5mM EDTA; 3mM EGTA; 20mM HEPES (pH 7,4; 4mg/ml dodecyl-β-maltosidose); Proteinase-Inhibitoren: 1mM Phenylmethylsulfonylfluoride; 1µM pepstatin; 10µg/ml Leupeptin; 2µg/ml Aprotinin)

Ablösepuffer (60mM Tris, 100mM Mercaptoethanol, 70mM SDS)

Desensibilisierung der SDF-1-induzierten Akt-Phosphorylierung in neuronalen Primärkulturen. Um die Phosphorylierung von Akt zu messen, wurde das Kulturmedium gegen BSS getauscht und die Zellen wurden mit 10nM SDF-1 behandelt wie im Ergebnisteil beschrieben. Pro Spur wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in 500µl kochendem SDS-Probenpuffer lysiert. Die Lysate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Mit einem monoklonalen Antikörper aus dem Kaninchen (#193H12, Cell Signaling Technology / New England

Biolabs, Frankfurt am Main, D; 1:1000) wurde Ser-473-phosphoryliertes Akt (pAkt) detektiert. Der Antikörper wurde abgelöst und es wurde außerdem das gesamte Akt-Protein (phosphoryliert und unphosphoryliert) detektiert (*anti-Akt rabbit polyklonal IgG*, #07-416 Biomol, Hamburg, D; 0,125µg/ml). Der Quotient aus pAkt- und Akt-Signal wurde ermittelt und gegen den Wert der Kontrollgruppe normalisiert. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Wiederholungen wurden gemittelt.

BSS (*balanced salt solution, (in mM: 143 Na; 5,5 Ka; 1,8 Ca₂; 1,8 Mg₂; 125 Cl; 26 HCO₃; 1 PO₄; 0,8 SO₄; pH7,4; außerdem 4,5g/l Glucose)*)

2.7. Verhaltensuntersuchungen

Angereicherte Umwelt. Ratten, die in einer angereicherten Umwelt gehalten wurden, lebten in Gruppen von fünf Tieren in einer großen Box (120x80x80cm) mit Schlafhäuschen, Nistmaterial, Etagen, Röhren und verschiedenen Kletter- und Versteckmöglichkeiten, die mindestens jeden zweiten Tag variiert wurden (Abb. 2.5) Alle weiteren Umweltbedingungen waren mit denen der Standardhaltung identisch.

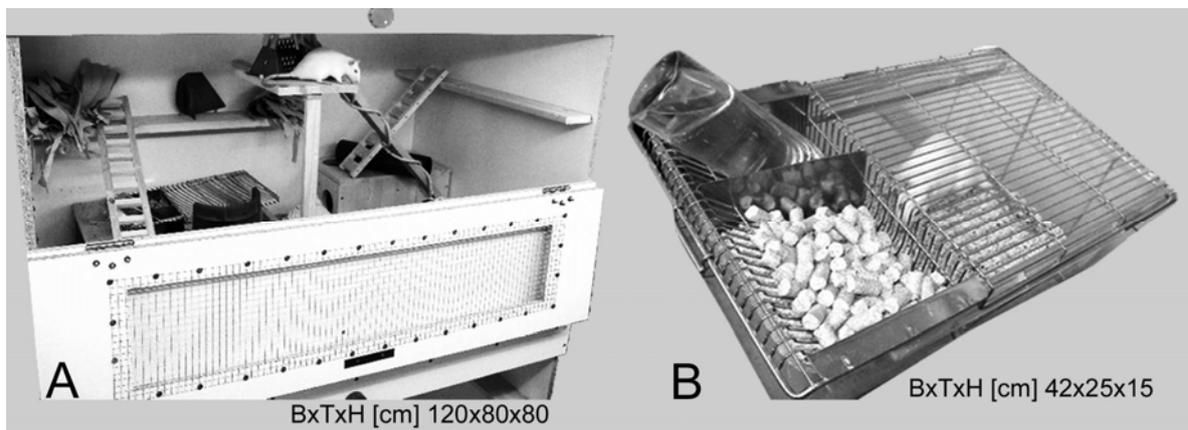


Abbildung 2.5: Angereicherte Umwelt (A) im Vergleich zur Standardhaltung (B).

Objekterkennungstest (novel object recognition task). In diesem Lerntest nach Bruel-Jungerman *et al.* (2005) wurden 9 verschiedene Objekte verwendet, die in Voruntersuchungen bei naiven Ratten vergleichbare spontane Exploration auslösten. Der Test wurde in einem separaten Raum bei einer Beleuchtung von 30Lux durchgeführt, das Explorationsverhalten wurde über eine Kamera vom benachbarten Raum aus beobachtet. Nach Habituation wurden in einer ersten Sitzung dem Tier in einem Offenfeld zwei unbekannte Gegenstände präsentiert, die 4 Minuten lang exploriert werden konnten. In der zweiten Sitzung wurde einer der Gegenstände gegen einen neuen ausgetauscht, und es wurde verblindet gemessen, wie lange der bekannte und wie lange der unbekannte Gegenstand in 4 Minuten untersucht wurde. Ein Tier mit einer Gesamtexplorationszeit unter 20s wurde ausgeschlossen. Es wurde genau die Zeit gemessen, in der sich die Nase der Ratte in unmittelbarer Nähe des Gegenstandes (<1cm) befand und das Tier deutliches Explorationsverhalten zeigte. Der zeitliche Abstand zwischen beiden Sitzungen betrug für jedes Tier einmal 1h, einmal 24h und einmal 48h. Die

Reihenfolge der drei Tests mit unterschiedlichem zeitlichem Abstand wurde variiert, ebenso die Platzierung der Gegenstände im Offenfeld und die Verwendung jedes Gegenstandes als „bekannt“ oder „neu“. Nach jeder Sitzung wurden das Offenfeld und die Gegenstände gründlich gereinigt, um den Einfluss von Geruchsspuren zu minimieren.

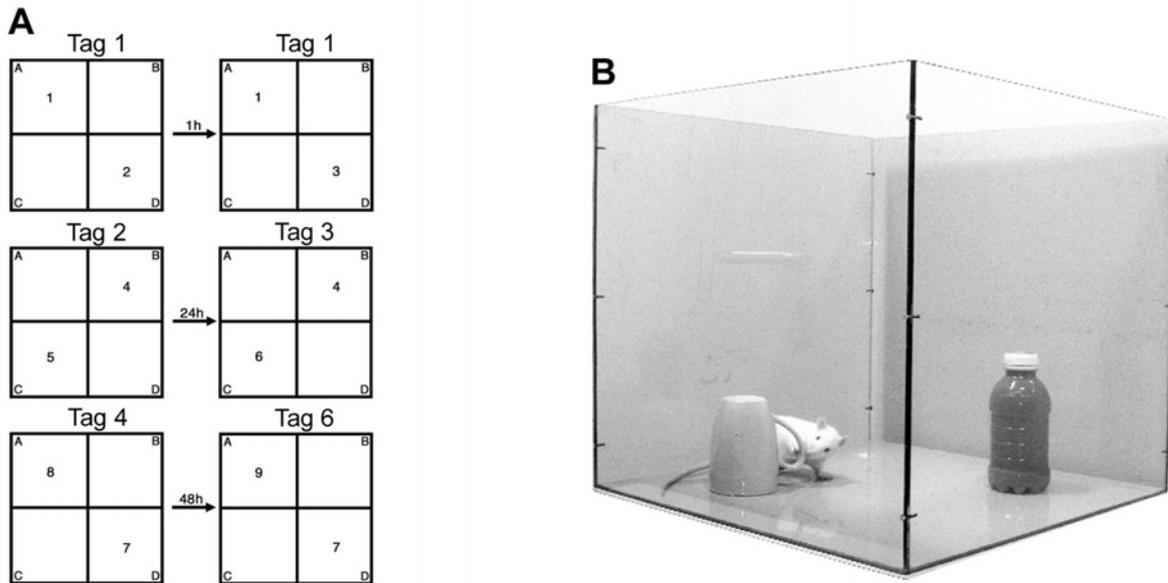


Abbildung 2.6: **A:** Schema von Aufbau und zeitlichem Ablauf des Objekterkennungstests. Die großen Quadrate symbolisieren das Offenfeld (0,5x0,5m), gedanklich in vier Quadranten unterteilt, in denen die Objekte 1-9 präsentiert wurden. Der Test, jeweils bestehend aus einer Akquisitionsphase (symbolisiert durch das rechte Quadrat, zwei unbekannte Objekte, 4 min) und einer Testphase (symbolisiert durch das linke Quadrat, ein bekanntes und ein unbekanntes Objekt, 4 min) wurde dreimal mit unterschiedlich langem Retentionsintervall (Pfeile) wiederholt. **B:** Ratte im Objekterkennungstest bei der Exploration eines Objektes. Die Nase der Ratte befindet sich in weniger als 1cm Abstand zum Gegenstand und das Tier zeigt deutliches Explorationsverhalten.

3. Ergebnisse

3.1. Expression von CXCR4 und SDF-1 im postnatalen Hippokampus

3.1.1. Expression des CXCR4-Proteins

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Frage, ob das CXCR4/SDF-1-System an der Regulation der Neurogenese im adulten Gyrus dentatus beteiligt ist. Zur Bearbeitung dieser Frage wurde zunächst geklärt, in welchen Strukturen des Hippokampus das Rezeptor-Ligand-System exprimiert wird. Hierbei war insbesondere die Regulation der Expression während der postnatalen Entwicklung in der für die Neurogenese relevanten Subgranularschicht (SGS) des Gyrus dentatus von Interesse.

Zehn Tage nach der Geburt ließ sich mittels Immunhistochemie eine starke CXCR4-Proteinexpression in verschiedenen Strukturen im und um den Hippokampus nachweisen: Im Corpus callosum und in der Wand des Seitenventrikels zeigte sich intensive CXCR4-Immunreaktivität, ebenso in Stratum oriens, Stratum pyramidale und Stratum lacunosum moleculare. Im Gyrus dentatus wurde der Rezeptor von Zellen der Molekularschicht, der inneren Granularschicht und des Hilus exprimiert (Abb. 3.1 A). Am Postnataltag 18 (P18) zeigte sich in der Molekularschicht eine leichte Abschwächung der intensiven Expression des CXCR4-Proteins, während die Immunreaktivität in den anderen oben genannten Strukturen stark vermindert bzw. völlig verschwunden war (Abb. 3.1 B). Besonders massiv war diese Reduktion in der Granularschicht des Gyrus dentatus, wo immunhistochemisch kein CXCR4-Protein mehr nachweisbar war. In der SGS und im Hilus waren noch einzelne CXCR4-positive Zellen zu finden (Pfeile in Abb. 3.1 b). Dieses Expressionsmuster des CXCR4-Proteins änderte sich im weiteren Verlauf der postnatalen Entwicklung nicht, das hier gezeigte Stadium P18 ist also repräsentativ für das adulte Expressionsmuster im Hippokampus. Kurz zusammengefasst kann gesagt werden, dass zehn Tage nach der Geburt in zahlreichen Strukturen des Hippokampus eine intensive CXCR4-Proteinexpression zu finden ist, die im Verlauf der Entwicklung zum jungadulten Gehirn stark abnimmt. Im adulten Gyrus dentatus bleibt eine deutliche CXCR4-Immunreaktivität in der Molekularschicht erhalten, außerdem exprimieren einzelne Zellen der SGS das Protein.

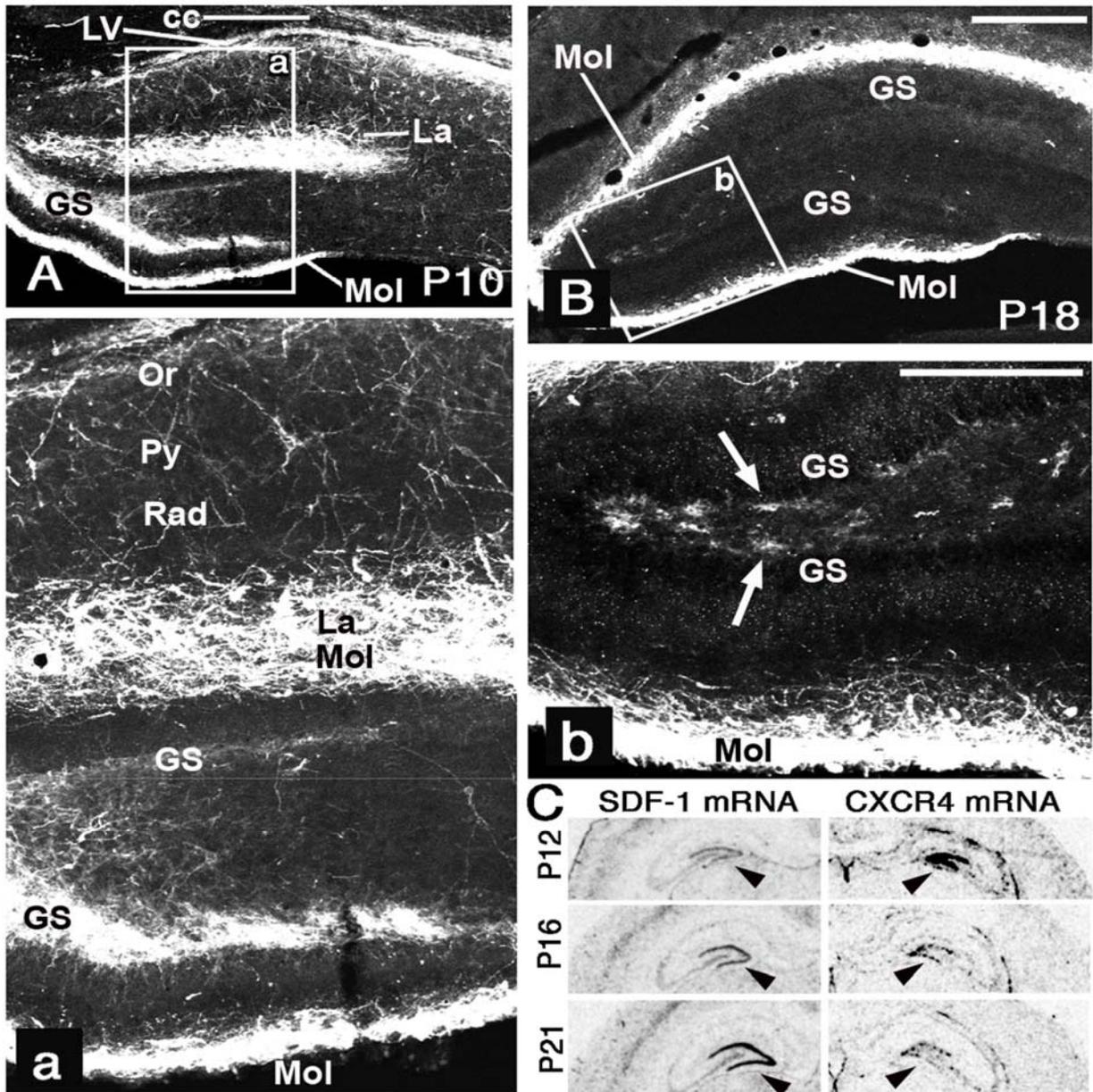


Abbildung 3.1: Postnatale Herabregulation der CXCR4-Proteinexpression in der SGS des Gyrus dentatus. **A,B:** Konfokale Aufnahmen vom Rattenhippokampus (frontal) an P10 (A) und P18 (B). **A:** In der Übersicht ist eine starke CXCR4-Immunreaktivität im Corpus callosum (cc) und in der Wand des Seitenventrikels (LV) erkennbar. **a:** Die Vergrößerung zeigt den Rezeptor im Stratum oriens (Or), im Stratum pyramidale (Py) und im Stratum lacunosum moleculare (La). Im Gyrus dentatus sind die Molekularschicht (Mol), das innere Drittel der Granularschicht (GS) und Neurone im Hilus markiert. **B:** Am P18 zeigt die Übersicht des Gyrus dentatus nur in der Molekularschicht eine intensive CXCR4-Immunfärbung. In der SGS und im Hilus sind hingegen nur einzelne Zellen markiert (Pfeile). **C:** Vergleich der SDF-1- und CXCR4-mRNA-Expression im Gyrus dentatus an P12, P16 und P21 nach *in-situ*-Hybridisierung mit ³⁵S-markierten Sonden. Die Expression der SDF-1-mRNA beginnt am Postnataltag 12 und steigt bis P21 massiv an. Die CXCR4-mRNA-Expression in der Granularschicht nimmt zwischen P12 und P16 stark ab und zeigt dann bis P21 nur noch eine geringe Abnahme. Maßstäbe: A,B: 400µm; a,b: 200µm.

3.1.2. Expression der CXCR4-mRNA

Zusätzlich zum CXCR4-Protein wurde mit Hilfe der *in-situ*-Hybridisierung auch die regionale Verteilung der CXCR4-mRNA-Expression untersucht. In Abbildung 3.1 C (rechte Seite) ist die mRNA-Expression zu drei Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung gezeigt. Am P12 wurde eine starke Expression in der Granularschicht des Gyrus dentatus und in der Molekularschicht beobachtet, schwächere Signale zeigten sich im Hilus. Von P16 bis P21 reduzierte sich diese mRNA-Expression deutlich. Am P21 war in der Granularschicht keine mRNA mehr detektierbar. In Zellen der SGS und des Hilus und in der Molekularschicht fand sich hingegen weiterhin eine deutliche Expression. Diese Verteilung der CXCR4-mRNA-Expression in Zellen der Molekularschicht, der SGS und des Hilus blieb bis ins adulte Stadium erhalten. Insgesamt fand also auch auf mRNA-Ebene im Verlauf der postnatalen Entwicklung eine Reduktion der CXCR4-Expression statt. Auffällig war jedoch, dass in den späten postnatalen Stadien zahlreiche Zellen der SGS eine intensive mRNA-Expression des Rezeptors aufwiesen (Abb. 3.1 C), obwohl hier nur sehr wenig CXCR4-Protein dargestellt werden konnte. Offensichtlich stimmen die beobachteten Expressionsmuster von mRNA und Protein in der SGS nicht überein.

3.1.3. Expression der SDF-1-mRNA

Um die Expressionsmuster von Rezeptor und Ligand zueinander in Beziehung setzen zu können, wurde mittels *in-situ*-Hybridisierung auch die Verteilung der SDF-1-mRNA im postnatalen Hippokampus ermittelt. Am P12 wurde SDF-1 in der Leptomeninx, im CA3-Feld der Pyramidenzellschicht des Hippokampus und in der Granularschicht detektiert (Abb. 3.1 C, linke Seite). Von P12 bis P21 nahm die mRNA-Menge in der Leptomeninx ab, während die Expression in den anderen genannten Strukturen verstärkt wurde. Besonders ausgeprägt war diese Zunahme in den Granularzellen des Gyrus dentatus. Der hohe Expressionsspiegel von SDF-1 in der Granularschicht blieb im adulten Hippokampus erhalten. Zusammengefasst ergeben sich aus diesen Expressionsmustern folgende Verhältnisse im adulten Hippokampus: Die Granularzellen bilden große Mengen an SDF-1-mRNA (Stumm *et al.* 2002, diese Arbeit). In den Subgranularzellen wird CXCR4-mRNA exprimiert (Stumm *et al.* 2003, Tran *et al.* 2007, diese Arbeit),

CXCR4-Protein ist jedoch nicht detektierbar. Es stellt sich die Frage, wie es zu dem Ungleichgewicht zwischen der Expression von CXCR4-Protein und CXCR4-mRNA in der SGS kommt. Der Verlust des CXCR4-Proteins entwickelt sich zeitlich parallel zur ausgeprägten Heraufregulation der SDF-1-Expression in den Granularzellen. Die Vermutung liegt nahe, dass Granularzellen lokal einen hohen SDF-1-Spiegel erzeugen. Hierdurch könnte es zu permanenter Aktivierung und anschließendem Abbau des in den Subgranularzellen exprimierten CXCR4-Rezeptors kommen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die Mechanismen der CXCR4-Regulation näher untersucht.

3.2. Regulation des CXCR4-Rezeptors im Hippokampus und in neuronalen Kulturen

3.2.1. Regulation des CXCR4-Rezeptors im Hippokampus

Basierend auf der Hypothese, dass das beobachtete Ungleichgewicht zwischen CXCR4-mRNA und CXCR4-Protein durch den endogenen Agonisten verursacht wird, wurde überprüft, ob sich der vermutete agonistinduzierte Abbau des Rezeptors durch den CXCR4-spezifischen Antagonisten AMD3100 blockieren lässt. Adulten Ratten wurde über einen Zeitraum von 13 Tagen der CXCR4-Antagonist AMD3100 über osmotische Minipumpen *icv.* appliziert. Der Effekt der Rezeptorblockade auf die mRNA- und Proteinspiegel im Hippokampus wurde anschließend mittels *in-situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie analysiert. Auf der mRNA-Ebene wurden keine Veränderungen gefunden (Abb. 3.2 A,B). Im Gegensatz dazu zeigte sich eine massive Zunahme des CXCR4-Proteins in der SGS von AMD3100-behandelten Tieren (Abb. 3.2 C,c₁). Die quantitative Auswertung ergab hier 627% mehr CXCR4-positive Zellen als bei Kontrolltieren (5512 Zellen gegen 758 Zellen zwischen Bregma -2,8 und -4,4, $p < 0,0001$, T-Test) (Abb. 3.2 G). Dieser starke Anstieg der CXCR4-Immunreaktivität wurde auch nach kürzerer Applikation (6d, 2d, 1d) und in geringerem Umfang auch bereits nach vierstündiger Infusion von AMD3100 gefunden. Durch die Behandlung mit AMD3100 wurde das CXCR4-Protein in den Somata und in den proximalen Anteilen dendritischer und axonaler Fortsätze von Zellen der SGS detektierbar (Abb. 3.2 c₁). Außerdem wurde der Rezeptor in multipolaren, vermutlich GABAergen Neuronen im Hilus (Abb. 3.2 C, Pfeil) und in der CA3-Pyramidenzellschicht (Abb. 3.2 C, Pfeilköpfe) sichtbar. In den Kontrolltieren waren in der SGS nur einzelne Zellen und im Hilus keine Zellen markiert. Die Analyse einzelner konfokaler Ebenen ergab, dass der CXCR4-Rezeptor in den Zellen der SGS von Kontrolltieren sowohl in der Plasmamembran als auch in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert war (Abb. 3.2 F), was auf eine Internalisierung hindeutet. Die Infusion von AMD3100 scheint diese Internalisierung zu verhindern, da sich der Rezeptor danach fast ausschließlich an der Plasmamembran befand (Abb. 3.2 E). Die massive Erhöhung des CXCR4-Proteinspiegels nach Rezeptorblockade fand selektiv in der SGS und im Hilus statt, andere

Hippokampusstrukturen zeigten keine starken Veränderungen. Als Beispiel wird die Molekularschicht betrachtet. Hier ist der CXCR4-Rezeptor in Kontrollen gut markierbar und AMD3100 bewirkt nur eine leichte Verstärkung der Immunreaktivität (Abb. 3.2 C,D,c₂,d₂). Wie die anfänglichen Expressionsanalysen gezeigt haben, gibt es in der Molekularschicht auch kein Ungleichgewicht zwischen CXCR4-mRNA und CXCR4-Protein, gleichzeitig wird hier sehr wenig SDF-1 exprimiert. Dies stützt die Hypothese, dass der CXCR4-Rezeptor in Subgranularzellen konstitutiv durch die Wirkung des lokal stark exprimierten Liganden SDF-1 ständiger Degradation unterliegt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Blockieren des CXCR4-Rezeptors mit dem Antagonisten das oben beschriebene Ungleichgewicht zwischen detektierter CXCR4-mRNA und CXCR4-Immunreaktivität in der adulten SGS aufhebt, indem der Expressionsspiegel des Rezeptors auf Proteinebene deutlich ansteigt.

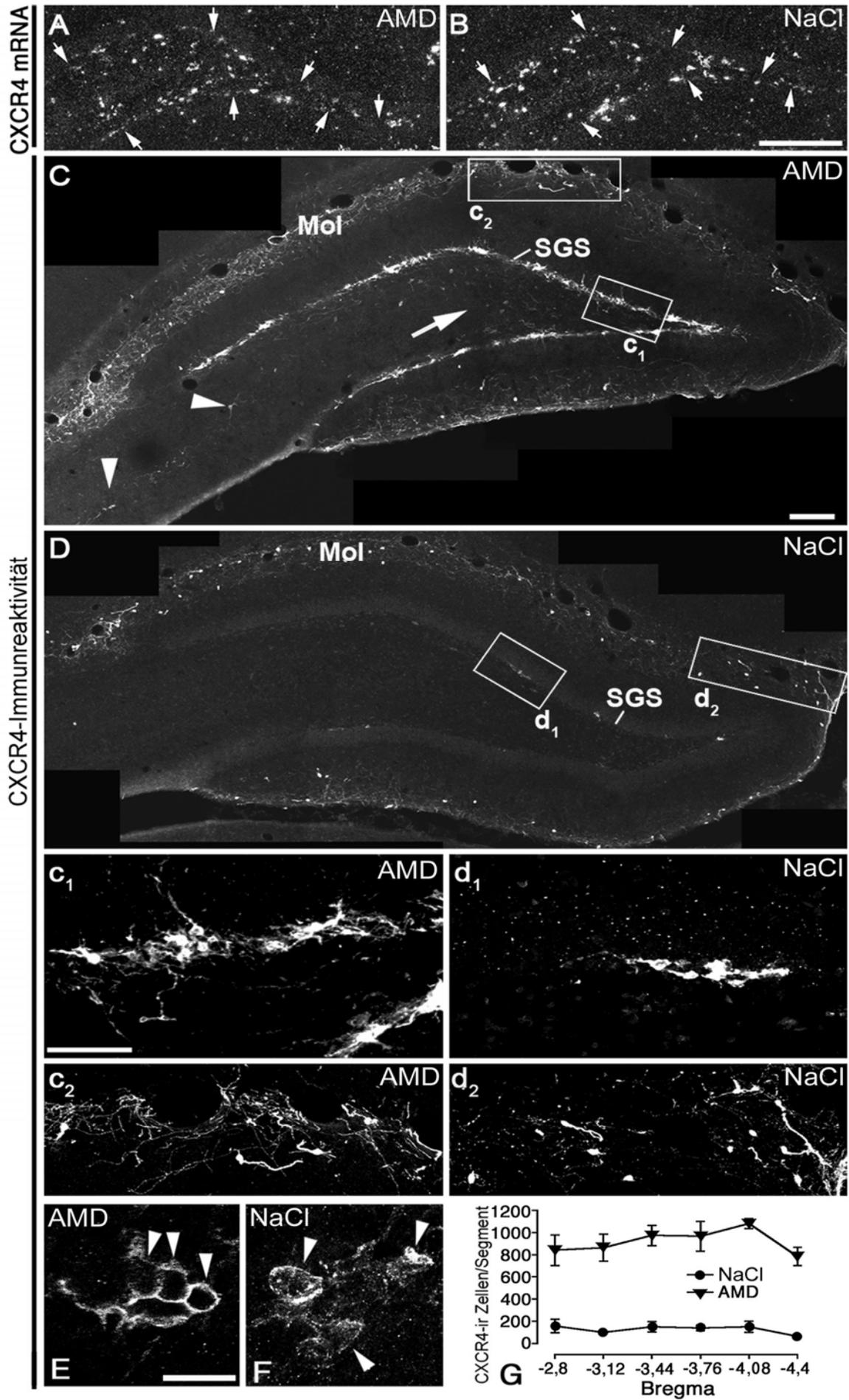


Abbildung 3.2: *Antagonistapplikation führt zu massiver Erhöhung des CXCR4-Proteinspiegels.* Ratten erhielten 13 Tage lang intracerebroventrikuläre Infusionen von AMD3100 (A,C,E) oder physiologischer Kochsalzlösung (B,D,F) über osmotische Minipumpen. **A,B:** Dunkelfeldaufnahmen der CXCR4-mRNA-Expression im Gyrus dentatus nach *in-situ*-Hybridisierung mit ³⁵S-markierten Sonden: Die Applikation des CXCR4-Antagonisten AMD3100 verursacht keine sichtbare Veränderung der mRNA-Expression in der SGS (Pfeile). **C,D:** Aus konfokalen Aufnahmen zusammengesetzte Übersicht des Gyrus dentatus nach Immunfärbung des CXCR4-Rezeptors. Nach der Infusion von AMD3100 zeigt sich eine massiv verstärkte Immunreaktivität in der SGS (c₁,d₁) und im Hilus (C, Pfeil). Eine leichte Erhöhung der CXCR4-Protein-Expression ist auch in der Molekularschicht (Mol, c₂,d₂) und in der CA3 (C, Pfeilköpfe) zu verzeichnen. **E,F:** Subzelluläre Lokalisation der CXCR4-Immunoreaktivität in Zellen der SGS (Aufnahmen aus jeweils einer einzelnen konfokalen Ebene). In der Kontrolle befindet sich der Rezeptor sowohl in der Plasmamembran als auch in intrazellulären Kompartimenten, was für eine partielle Internalisierung spricht (F). Nach Behandlung mit AMD3100 ist das CXCR4-Protein in der Zellmembran konzentriert und intrazellulär nicht mehr detektierbar (E). **G:** Die Anzahl der CXCR4-immunreaktiven (ir) Zellen in der SGS pro 320µm-Segment (Bregma -2,8 bis Bregma -4,4) ist nach AMD-Behandlung signifikant erhöht (Effekt von AMD3100: p<0,0001; Zwei-Wege-ANOVA mit Messwertwiederholung). Werte dargestellt als MW±SEM. Maßstäbe: A,B, 300µm; C,D, 125µm; c₁,c₂,d₁,d₂, 50µm; E,F, 10µm.

3.2.2. Regulation des CXCR4-Rezeptors in neuronalen Kulturen

Qualitative Immunocytochemie: Internalisierung, Abbau und Recycling des CXCR4-Rezeptors. Über die Regulation des endogenen Rezeptors in unreifen Neuronen ist nur wenig bekannt. Als Modell für neuronale Vorläuferzellen wurden Primärkulturen aus dem embryonalen Rattenhippocampus (E17) nach 24h *in vitro* untersucht. Insbesondere sollte geklärt werden, wie sich der endogene CXCR4-Rezeptor in den unreifen Neuronen unter SDF-1-Wirkung bezüglich Internalisierung, Degradation und Recycling verhält. Der CXCR4-Antagonist AMD3100 wurde verwendet, um die Wirkungen von endogenem oder appliziertem SDF-1 zu blockieren. In unbehandelten Kulturen zeigten 23% der Zellen CXCR4-Immunreaktivität an der somatischen Plasmamembran, im Wachstumskegel von Fortsätzen und in intrazellulären Kompartimenten (Abb. 3.3 A). Nach 18h Inkubation mit AMD3100 erhöhte sich der Anteil CXCR4-positiver Zellen auf 35% und der Rezeptor akkumulierte in der Plasmamembran (Abb. 3.3 B), was auf eine konstitutive Aktivierung des CXCR4-Rezeptors in Kontrollkulturen durch endogenes SDF-1 hinweist. 30 Minuten nach Applikation von 10nm SDF-1

verschwand der Rezeptor vollständig von der Plasmamembran und bildete intrazelluläre Akkumulate (Abb. 3.3 C). Die rasche und effektive Internalisierung konnte durch die gleichzeitige Zugabe von AMD3100 vollständig blockiert werden; nach längerer Inkubation mit SDF-1 (1h, 2h) konnte der CXCR4-Rezeptor nicht mehr detektiert werden (nicht gezeigt). Wurde der Agonist nach 30 min ausgewaschen und die Kultur für 2h mit AMD3100 inkubiert, konnte der CXCR4-Rezeptor in 20% der Zellen wiederum an der Plasmamembran detektiert werden (Abb. 3.3 D).

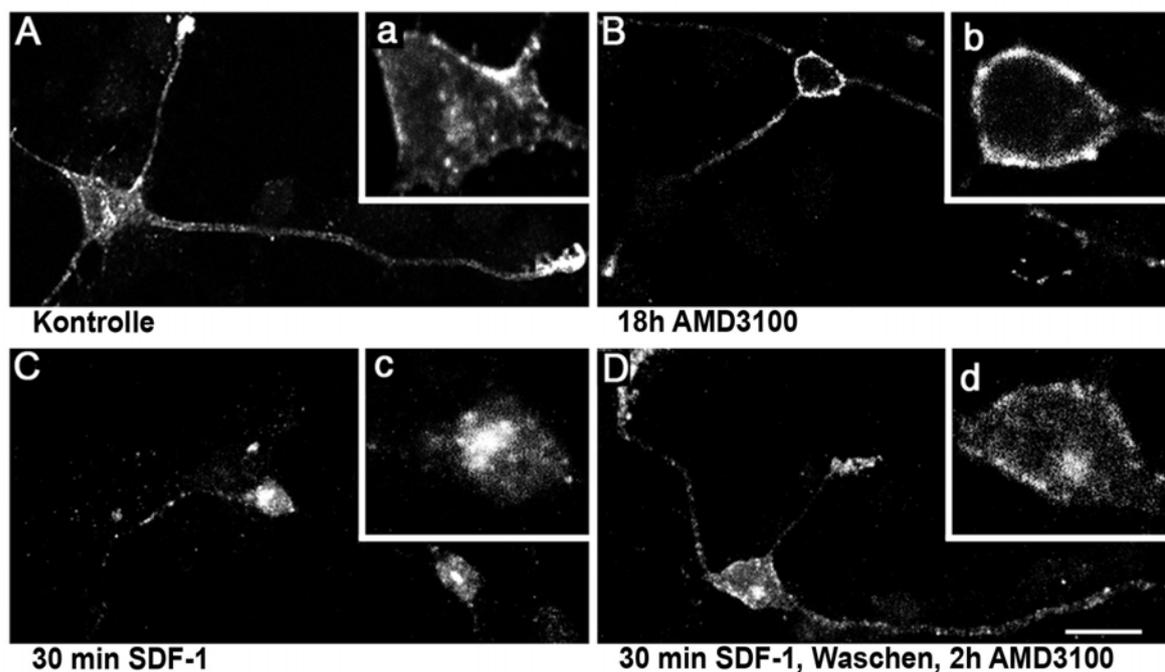


Abbildung 3.3: SDF-1-induzierte Regulation des endogenen CXCR4-Rezeptors in hippokampalen primären Neuronen. **A-D:** Konfokale Aufnahmen primärer Neurone zeigen die charakteristische subzelluläre Verteilung der CXCR4-Immunreaktivität nach unterschiedlichen Stimulationen. **a-d:** Vergrößerung des jeweiligen Zellkörpers in A-D. **A:** Die Kontrollkultur zeigt sowohl an der Plasmamembran als auch intrazellulär CXCR4-Immunreaktivität, was auf eine konstitutive Internalisierung des Rezeptors durch in der Kultur freigesetzten endogenen Liganden hinweist. **B:** Eine 18h Inkubation mit dem spezifischen Antagonisten AMD3100 führt zu einer Akkumulation der CXCR4-IR in der Plasmamembran. **C:** 30 min nach exogener Applikation von 10nM SDF-1 ist ein vollständiges Verschwinden des Rezeptors von der Membran zu beobachten, es kommt zu einer intrazellulären Anhäufung der CXCR4-IR. **D:** Wird der CXCR4-Rezeptor nach einer 30 min SDF-1-Aktivierung durch AMD3100 blockiert, zeigt sich ein Teil der CXCR4-Immunreaktivität intrazellulär und ein Teil in der Zellmembran, was auf ein Recycling schließen lässt. Maßstab: A-D, 10µm.

Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, dass der CXCR4-Rezeptor in naiven neuronalen Hippokampuskulturen durch endogenes SDF-1 geringfügig konstitutiv aktiviert und internalisiert wird. Dies wird dadurch gestützt, dass AMD3100 ein Ansammeln des Proteins in der Plasmamembran bewirkt. Durch kurzzeitige Applikation von SDF-1 wird eine ausgeprägte Internalisierung ausgelöst. Nach längerer Inkubation kann kein Protein detektiert werden, was möglicherweise eine Degradation des Proteins anzeigt. Nach Internalisierung des CXCR4-Rezeptors durch SDF-1 zeigt sich nach Zugabe des Antagonisten ein teilweiser Rücktransport des Rezeptors in die Membran. Das Blockieren der Rezeptoraktivierung nach der vollständigen Internalisierung ermöglicht scheinbar die Detektion von Recycling. Diese ersten Hinweise auf die Regulationsmöglichkeiten des CXCR4-Rezeptors wurden in weiteren Experimenten an transfizierten Neuronen und im Westernblot untersucht.

Qualitative Immunocytochemie: Internalisierung, Abbau und Recycling des transfizierten CXCR4-Rezeptors. Die Ergebnisse bezüglich Internalisierung und Recycling des endogenen CXCR4-Rezeptors wurden anhand des transfizierten Rezeptors überprüft. Untersuchungen an CXCR4-transfizierten neuronalen Zellen haben den Vorteil eines sehr viel höheren Expressionsspiegels, wodurch sich Internalisierung und insbesondere Degradation besser verfolgen lassen. Primäre Neurone wurden mit einem T7-Epitop-markierten CXCR4-Rezeptor und EGFP transfiziert. Der Rezeptor wurde mit einer Immunfärbung gegen das T7-Epitop detektiert. Die Kotransfektion mit EGFP wurde bei der Auswertung dazu genutzt, transfizierte Zellen anhand der grünen Fluoreszenz von nicht transfizierten Zellen zu unterscheiden. EGFP-markierte Zellen wurden zufällig ausgewählt und bezüglich der subzellulären Rezeptorverteilung einer der folgenden Kategorien zugeordnet: (P) Intensive Markierung der Plasmamembran; (I, internalisiert) geringe Markierung der Plasmamembran und starkes intrazelluläres Signal; (N, nicht markiert) keine Immunreaktivität. In unbehandelten Kontrollkulturen zeigten 80% der EGFP-positiven Zellen Plasmamembranfärbung, 8% Internalisierung und 12% keine Immunfärbung (Abb. 3.4 A). Nach 30 min Inkubation mit SDF-1 stieg die Zahl der Zellen mit Internalisierung auf 85%, nur noch 5% zeigten eine Membranmarkierung (Abb. 3.4 B). Bei 6-stündiger Behandlung mit SDF-1 ergaben

sich vergleichbare Ergebnisse wie nach 30 min, die CXCR4-Immunreaktivität im Zellinnern war jedoch mehr an einem Ort konzentriert als nach 30 min, wo zahlreiche CXCR4-immunreaktive Vesikel beobachtet wurden (Abb. 3.4 C). Die Ergebnisse aus diesen drei Behandlungsgruppen zeigen wiederum eine leichte konstitutive Internalisierung in unbehandelten Kulturen und eine effiziente Verstärkung dieser Internalisierung durch den exogen applizierten Agonisten. Wurde SDF-1 nach 6h ausgewaschen und dann für 2h mit AMD3100 inkubiert, konnte in zahlreichen Zellen eine Rückkehr des CXCR4-Rezeptors an die Plasmamembran beobachtet werden (Abb. 3.4 D), was für ein Recycling des Rezeptors spricht. Nach 18h Behandlung mit SDF-1 stieg der Anteil nicht markierter Zellen auf 77% an (Abb. 3.4 E). Dieses Ergebnis indiziert erneut eine Degradation des CXCR4-Rezeptorproteins unter anhaltender Agonistwirkung. Die SDF-1-induzierte Internalisierung und Herabregulation des CXCR4-Rezeptors wurde durch AMD3100 vollständig blockiert (Abb. 3.4 F).

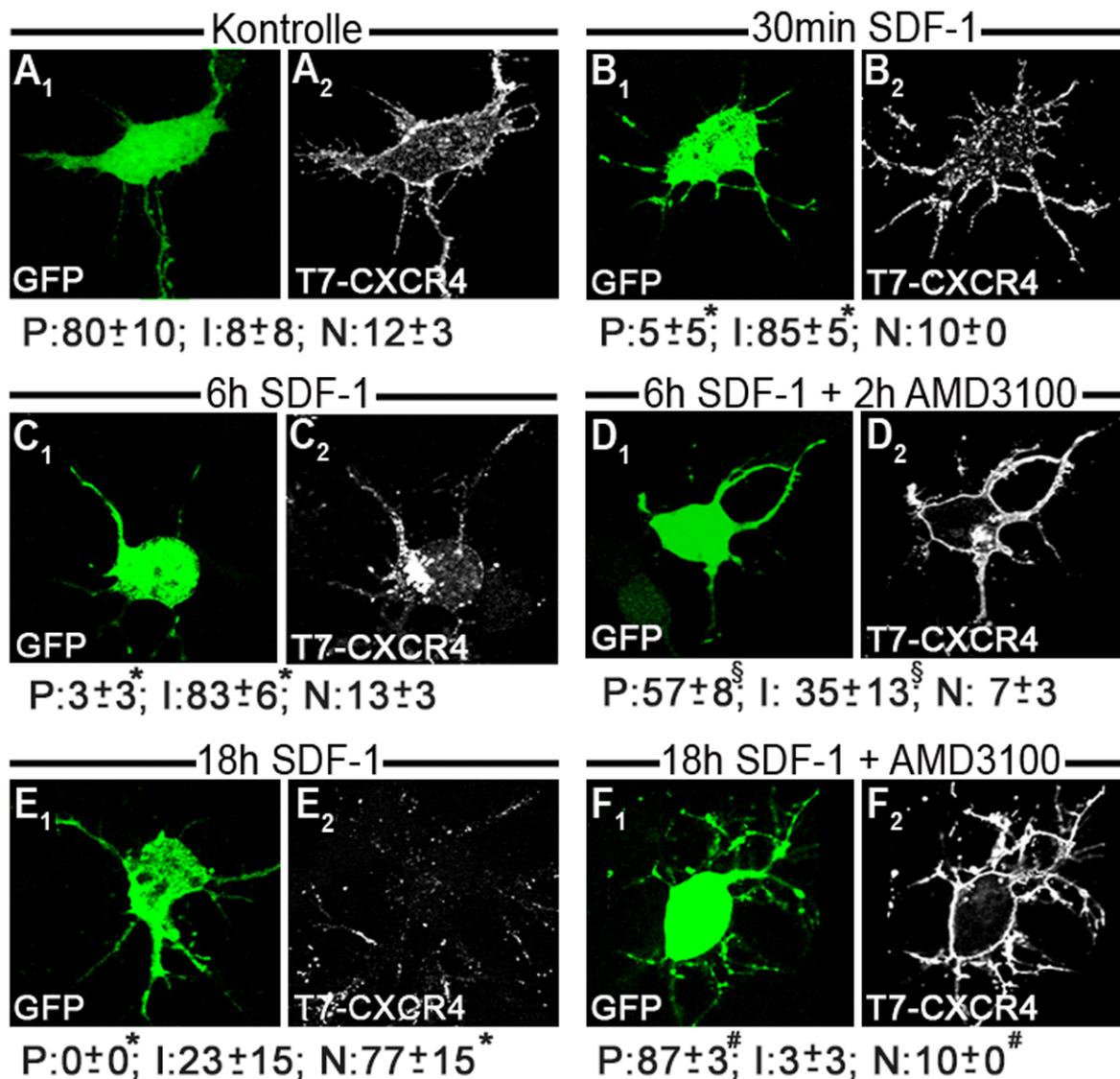


Abbildung 3.4: SDF-1-induzierte Regulation des transfizierten CXCR4-Rezeptors in hippocampalen primären Neuronen **A-D:** Konfokalaufnahmen primärer Neurone (1 Tag *in vitro*) nach Kotransfektion von EGFP (A₁-F₁) und T7-CXCR4 (CXCR4-Protein mit aminoterminal gebundenem T7-Epitop, A₂-F₂). Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde das T7-Epitop immunocytochemisch gefärbt, um den transfizierten T7-CXCR4-Rezeptor intrazellulär und in der Membran sichtbar zu machen. Die Kulturen wurden unbehandelt (A), nach 30 min SDF-1 (B), nach 6h SDF-1 (C), nach 6h SDF-1, auswaschen, 2h AMD3100 (D), nach 18h SDF-1 (E) oder nach 18h SDF-1 + AMD3100 (F) fixiert. EGFP-markierte Zellen wurden nach ihrer intrazellulären Verteilung des T7-CXCR4 kategorisiert: P, intensive Markierung der Plasmamembran; I (internalisiert), intensive intrazelluläre und geringe Plasmamembranmarkierung; N (nicht markiert), Zellen mit sehr schwacher oder ohne Immunreaktivität. Der relative Anteil jeder Gruppe ist jeweils unter der Abbildung angegeben (T-Test: *vs. Kontrolle, # vs. 18h SDF-1, § vs. 6h SDF-1).

Quantifizierung von Internalisierung und Recycling des transfizierten Rezeptors. Um zweifelsfrei nachzuweisen, dass es unter SDF-1-Stimulation zur Internalisierung von CXCR4-Oberflächenrezeptoren kommt, und um Internalisierung und Recycling quantitativ zu erfassen, wurde das T7-Epitop-Tag des T7-CXCR4-Rezeptors genutzt. Wiederum wurden primäre hippokampale Neurone mit T7-CXCR4-Rezeptoren transfiziert. Das Medium der lebenden Kulturen wurde 18 h nach Transfektion mit einem T7-Antikörper versetzt. Da sich das T7-Epitop am extrazellulären Aminoterminus des Rezeptors befindet, war es so möglich, selektiv die Oberflächenrezeptoren zu markieren (Abb.3.5 A₂,B₂). Eine Kotransfektion mit EGFP erlaubte eine Übersicht über die gesamte Zelle auch nach Rezeptorinternalisierung (Abb.3.5 A₁,B₁). Im ELISA wurde die Menge der Oberflächenrezeptoren einer vollkommen unbehandelten Kultur direkt nach der Immunmarkierung als 100% gesetzt. Um den Effekt von endogenem SDF-1 zu kontrollieren, wurde für 30 Minuten NaCl zugegeben. Wie erwartet zeigte sich hier eine leichte Internalisierung (Abb. 3.5 C: NaCl). Wurde exogenes SDF-1 für 30 min zugegeben, waren 21% der vorher markierten Oberflächenrezeptoren internalisiert (Abb. 3.5 C: SDF-1). Es konnte quantitativ belegt werden, dass die SDF-1-induzierte Internalisierung durch AMD3100 vollständig verhindert wird (Abb. 3.5 C: SDF-1 + AMD). Wurde das Recycling internalisierter Rezeptoren mit Monensin (50µm) unterbunden, nahm die SDF-1-induzierte Internalisierung des CXCR4-Rezeptors zu (Abb. 3.5 C: SDF-1 + Monensin im Vergleich zu SDF-1). Dies ist ein Hinweis darauf, dass während der Behandlung mit dem Agonisten fortlaufend Rezeptoren zur Zellmembran recycelt werden. Deshalb wurde das Ausmaß des CXCR4-Recycling ermittelt (Abb. 3.5 D). Die Oberflächenrezeptoren T7-CXCR4-transfizierter Neurone wurden entweder direkt nach 30-minütiger SDF-1-Behandlung (0 min ohne SDF-1) oder 1h nach Auswaschen des Agonisten (1h ohne SDF-1) markiert. Als Referenz dienten unbehandelte Kontrollkulturen (100% Oberflächenrezeptor). Von den Rezeptoren, die unter SDF-1 internalisiert waren (0 min ohne SDF-1), wurden nach Auswaschen des Liganden innerhalb von einer Stunde 36% zur Plasmamembran recycelt. Die Zugabe von Monensin während der Auswaschphase verhinderte dieses Recycling.

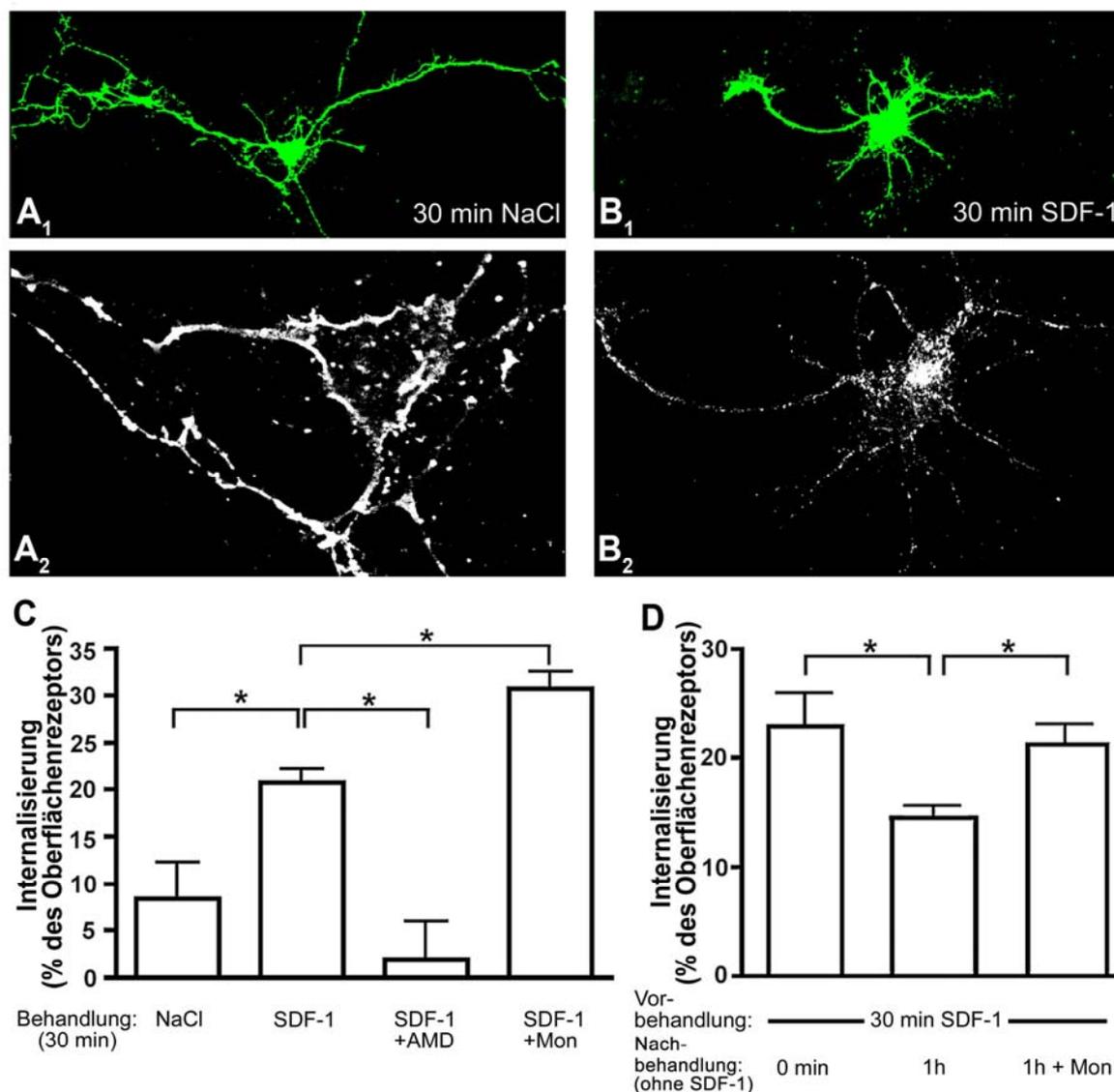


Abbildung 3.5: SDF-1-induzierte Internalisierung des T7-CXCR4-Rezeptors nach Markierung der Oberflächenrezeptoren lebender Zellen. **A,B:** An lebenden Zellen einer neuronalen Primärkultur wurde der membranständige T7-CXCR4-Rezeptor durch einen Puls mit T7-Antikörper vor der Behandlung markiert, die Detektion wurde dann an fixierten Zellen durchgeführt. Die Übersicht (A₁, B₁) zeigt jeweils die EGFP-Markierung der Zelle, in der Vergrößerung in B₂ ist die subzelluläre Umverteilung des Rezeptors 30 min nach SDF-1-Applikation im Vergleich zur Kontrolle (A₂) erkennbar: Es kommt zur Internalisierung der an der Oberfläche markierten Rezeptoren. Ein geringfügiges intrazelluläres Signal in A₂ lässt eine geringe konstitutive Internalisierung durch endogenes SDF-1 erkennen. **C,D:** Quantifizierung der T7-CXCR4-Internalisierung mittels ELISA. **C:** Primärkulturen wurden mit NaCl, SDF-1, SDF-1+AMD3100 oder mit SDF-1+Monensin für 30 min behandelt. Die Menge der vor der Behandlung detektierten Oberflächenrezeptoren wurde 100% gesetzt. Im Diagramm ist dargestellt, welcher Anteil von Hundert nach der jeweiligen Behandlung internalisiert ist. **D:** Die Kulturen wurden hier für 30 min mit SDF-1 vorbehandelt (hierbei wurde in den letzten zehn Minuten der Vorbehandlung der T7-Antikörper zur Markierung

extrazellulärer Rezeptoren zugegeben), gewaschen und dann sofort, nach einer Stunde oder nach einer Stunde unter Monensin analysiert. Die Internalisierung ist als prozentuale Reduktion der Oberflächenrezeptoren im Vergleich zu unbehandelten Kulturen dargestellt. Die Verminderung der Zahl internalisierter Rezeptoren nach einer einstündigen Auswaschphase wird durch die Anwesenheit von Monensin blockiert, was ein Recycling des Rezeptors zur Zelloberfläche belegt. (* in C und D entsprechen $p < 0,05$, *T*-Test.).

Quantifizierung der Degradation des CXCR4-Rezeptors. Um den immunocytochemisch beobachteten Rezeptorabbau nach anhaltender SDF-1-Wirkung quantitativ zu erfassen, wurden die CXCR4-Proteinspiegel in Zellen hippokampaler Kulturen in Westernblot-Experimenten ermittelt. In den in Abb. 3.6 A und B gezeigten Blots wurde der endogene CXCR4-Rezeptor und als Ladekontrolle der Transferrin-Rezeptor (TFR) detektiert. Im ersten Experiment wurde der Effekt des Antagonisten auf die CXCR4-Proteinmenge ermittelt. Nach 18-stündiger Inkubation mit AMD3100 zeigten neuronale Primärkulturen eine um 70% erhöhte CXCR4-Expression (Abb. 3.6 A). Dies spricht für konstitutive Aktivierung und konstitutiven Abbau des Rezeptors durch endogenes SDF-1. Im zweiten Versuch wurde ermittelt, wie lange SDF-1-Aktivierung stattfinden muss, um eine signifikante Degradation des CXCR4-Rezeptors zu verursachen. Dazu wurde ein erstes Inkubationsintervall mit SDF-1 mit einem zweiten, komplementären Inkubationsintervall mit AMD3100 so kombiniert, dass jeweils eine Behandlungszeit von insgesamt 6h resultierte. Unter diesen Bedingungen verursachte eine 30minütige SDF-1-Exposition nur eine leichte Reduktion des CXCR4-Proteins. Längere SDF-1-Exposition über 3h und 6h führte zu einer fortschreitenden Reduktion des Rezeptorproteins (Abb. 3.6 B). Diese Ergebnisse belegen, dass die kontinuierliche Aktivierung des CXCR4-Rezeptors durch SDF-1 die Herabregulation des CXCR4-Proteins zur Folge hat. Ein kurzer SDF-1-Puls von 30 min löst zwar eine nahezu vollständige Internalisierung der endogenen Rezeptoren aus (vergleiche Abb. 3.3), die Pulsdauer genügt jedoch nicht für einen ausgeprägten intrazellulären Abbau des Rezeptors. Signifikante Degradation wird im Blot erst nach agonistischer Stimulation für 3 bzw. 6h deutlich.

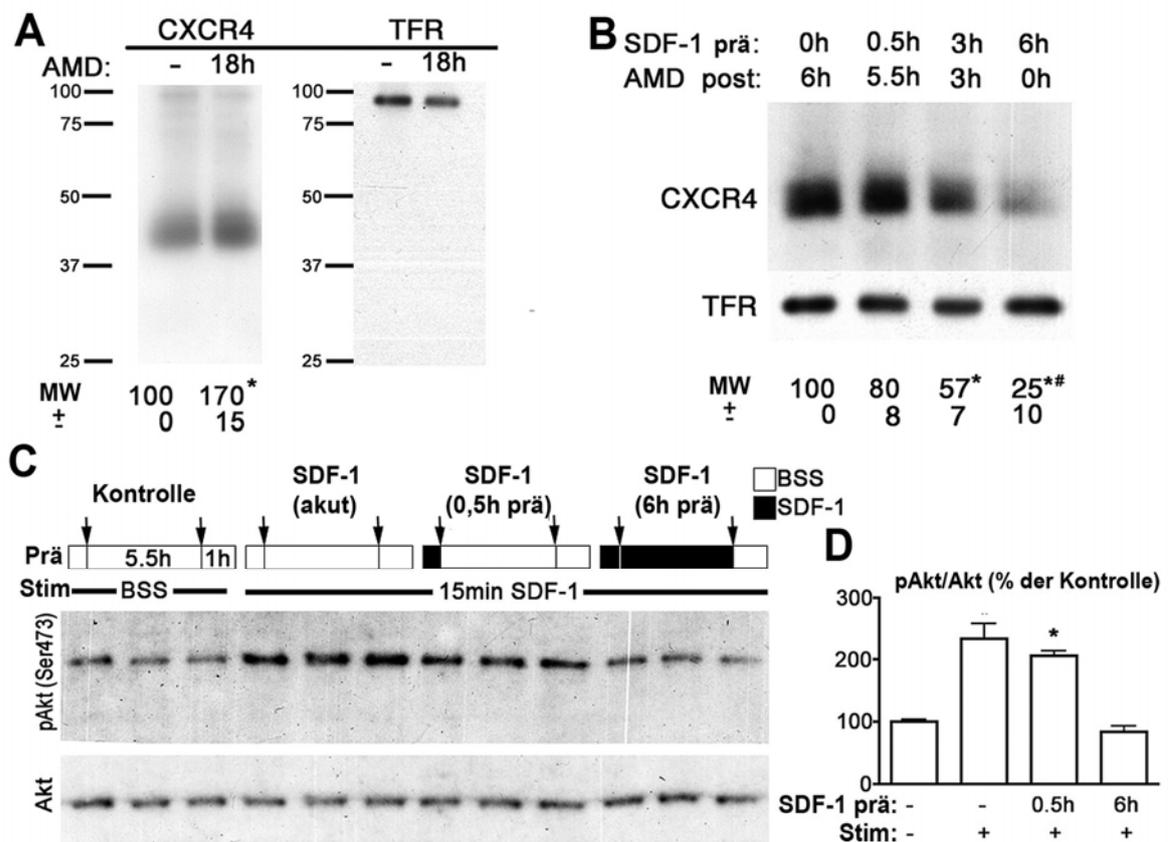


Abbildung 3.6: A,B: Quantifizierung der SDF-1-induzierten Regulation des endogenen CXCR4-Rezeptors in hippocampalen primären Neuronen. **A,B:** Westernblots für den CXCR4-Rezeptor und nach Ablösung für den Transferrin-Rezeptor (TFR). Der Quotient aus dem CXCR4- und dem TFR-Signal ist jeweils unter dem Blot angegeben (Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten nach Normalisierung mit der entsprechenden Kontrolle). **A:** 18h Behandlung mit AMD3100 (AMD) bewirkt eine Zunahme des CXCR4-Proteins um 70% (*, $p < 0,05$, T-Test). **B:** Nach einer SDF-1-Vorbehandlung (SDF-1 prä) wurde gewaschen und dann mit AMD3100 behandelt (AMD post) wie angegeben. SDF-1 verursacht mit zunehmender Inkubationszeit eine fortschreitende Herabregulation des CXCR4-Rezeptors (* vs. 0h SDF-1, # vs. 0,5h und vs. 3h SDF-1, $p < 0,05$; ANOVA und Bonferroni's post test). **C,D:** Desensibilisierung der SDF-1-induzierten Akt-Phosphorylierung in neuronalen Primärkulturen. **C:** Im Westernblot wurde hier Ser473-phosphoryliertes Akt (pAkt) und nach Ablösung dieses Antikörpers Akt detektiert. In der Vorbehandlung (Prä) wurde für 30 min entweder in BSS (*balanced salt solution*) als Kontrolle oder in BSS+SDF-1 inkubiert, gewaschen (Pfeile), 5 ½ Stunden mit BSS oder BSS+SDF-1 inkubiert und nach nochmaligem Waschen eine weitere Stunde in BSS. Zur Stimulation (Stim) wurde für 15 min SDF-1 appliziert. **D:** Der Quotient aus pAkt und Akt aus der unbehandelten Kontrolle (BSS) wurde 100% gesetzt, die prozentualen Angaben für die behandelten Gruppen beziehen sich hierauf (*vs. Kontrolle, $p < 0,05$; T-Test). **A-D:** Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

SDF-1-induzierte Desensibilisierung der CXCR4-Signaltransduktion. In einem weiteren Experiment wurde untersucht, inwieweit die Herabregulation des CXCR4-Proteins mit einer Desensibilisierung der intrazellulären Transduktionskaskade verknüpft ist (Abb. 3.6 C,D). Exemplarisch wurde die SDF-1-induzierte Phosphorylierung der Kinase Akt ermittelt. Hierzu wurde im Westernblot das Signalverhältnis von Ser473-phosphoryliertem Akt (pAkt) und Gesamt-Akt bestimmt. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen erhöhte ein 15 min SDF-1-Stimulus das Verhältnis von pAkt zu Akt um 143%. Wurden Kulturen für 6h mit SDF-1 vorbehandelt, so zeigte nach einer einstündigen Auswaschphase ein 15 min SDF-1-Stimulus keinen sichtbaren Effekt. Nach 30 min SDF-1-Vorbehandlung und 6,5h Auswaschphase erhöhte eine SDF-1-Stimulation das pAkt/Akt-Verhältnis um 105%. Diese Daten belegen, dass eine anhaltende SDF-1-Exposition eine zunehmende Desensibilisierung der CXCR4-vermittelten Akt-Phosphorylierung verursacht.

Endogen sezerniertes SDF-1 im Medium primärer hippocampaler Neuronenkulturen. Die Untersuchungen zur Regulation des CXCR4-Rezeptors gaben wiederholt Hinweise darauf, dass in den verwendeten hippocampalen Kulturen von E17-Rattenembryonen endogenes SDF-1 produziert und freigesetzt wurde. An stabil mit dem T7-CXCR4-Rezeptor transfizierten HEK293-Zellen wurde deshalb geprüft, ob neuronales Medium aus hippocampalen Kulturen, das für einen Tag *in vitro* konditioniert wurde, tatsächlich ausreichend SDF-1 enthält, um den CXCR4-Rezeptor zu aktivieren. Als Parameter für die Rezeptoraktivierung wurde die Internalisierung des CXCR4-Rezeptors bestimmt. Das Kulturmedium der Hippokampuskulturen wurde auf HEK293-Zellkulturen überführt und nach 30 min wurde die CXCR4-Rezeptorinternalisierung mit einem T7-Antikörper detektiert. Im Vergleich zu Kontrollkulturen, die nicht-konditioniertes neuronales Medium erhielten, verursachte das konditionierte Medium eine partielle, exogen appliziertes SDF-1 eine vollständige Internalisierung des CXCR4-Rezeptors (Abb. 3.7). Dieses Experiment stützt die Vermutung, dass hippocampale Neuronenkulturen ausreichend endogenes SDF-1 ins Medium sezernieren, um CXCR4-Rezeptoren zu aktivieren.

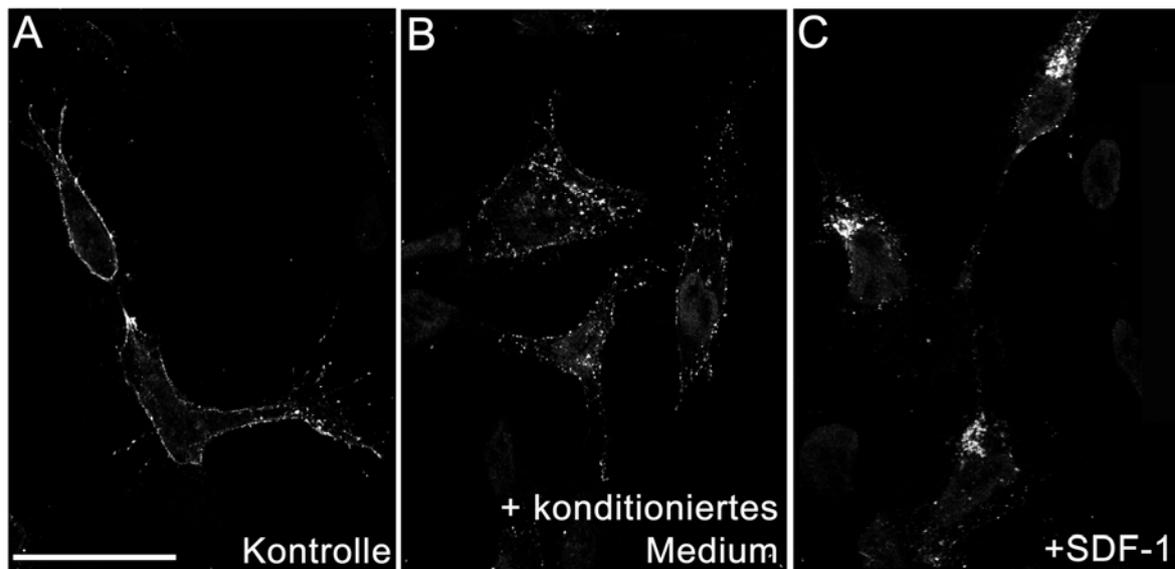


Abbildung 3.7: Endogenes SDF-1 aus primären Neuronenkulturen induziert CXCR4-Internalisierung in stabil transfizierten HEK293-Zellen. **A-C:** Konfokale Aufnahmen von HEK293-Zellen, die stabil mit dem T7-Epitop-markierten CXCR4-Rezeptor transfiziert wurden. Die Zellen wurden für 30 min mit frischem neuronalem Kulturmedium versetzt (A), mit neuronalem Kulturmedium, das für 18h von hippocampalen Primärkulturen konditioniert wurde (B) oder mit frischem neuronalem Medium + 10nm SDF-1. Der CXCR4-Rezeptor wurde mit einem T7-Antikörper detektiert. Das konditionierte Medium verursachte eine partielle und exogenes SDF-1 eine vollständige Internalisierung, was die Anwesenheit von endogenem SDF-1 in hippocampalen Primärkulturen anzeigt. Maßstab: 15µm.

3.2.3. Zusammenfassung der Daten zur Regulation

Zusammengenommen konnte in den Experimenten an primären hippocampalen Kulturen demonstriert werden, dass der CXCR4-Rezeptor durch SDF-1 effektiv internalisiert wird. Anhaltende Rezeptoraktivierung durch SDF-1 führt zur Desensibilisierung der CXCR4-Signaltransduktion und zu progressiver Degradation des CXCR4-Proteins. Gleichzeitige Anwesenheit des CXCR4-Antagonisten AMD3100 blockiert die Aktivierung, Internalisierung und den Abbau des Rezeptors. Wird der Agonist ausgewaschen und AMD3100 zur Verhinderung weiterer Rezeptoraktivität appliziert, kann Rezeptorrecycling beobachtet werden. Das Recycling wird von Monensin inhibiert. Diese Befunde stützen die oben aufgestellte Hypothese, dass die unter Antagonistbehandlung verzeichnete Zunahme des CXCR4-Proteins in der hippocampalen SGS eine konstitutive Rezeptoraktivierung widerspiegelt.

3.3. Charakterisierung CXCR4-exprimierender Zellen der SGS

3.3.1. Detektion des CXCR4-Rezeptors in GABAergen Zellen des Hilus

In der SGS des adulten Hippokampus sind Stammzellen und Vorläuferzellen vorhanden, durch die eine Neurogenese realisiert wird. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Expression des CXCR4-Rezeptors in einer Beziehung zu diesen Zellen steht. Es wurde deshalb bestimmt, von welchen Zellarten der CXCR4-Rezeptor in der SGS und im Hilus des adulten Hippokampus exprimiert wird. Hierzu wurden Koexpressionsstudien auf mRNA-Ebene durchgeführt. Die meisten der CXCR4-mRNA-positiven Zellen im Hilus exprimierten Marker für GABAerge Neurone (mRNA für Glutamatdecarboxylase/GAD und mRNA für Somatostatin). Die CXCR4-mRNA-positiven Zellen der SGS waren dagegen nicht GABAerg. Es gab keinerlei Koexpression von CXCR4-mRNA und VGLUT1 mRNA in der SGS und im Hilus, der Rezeptor wird also nicht in reifen Granularzellen und nicht in Mooszellen gebildet (Abb. 3.8).

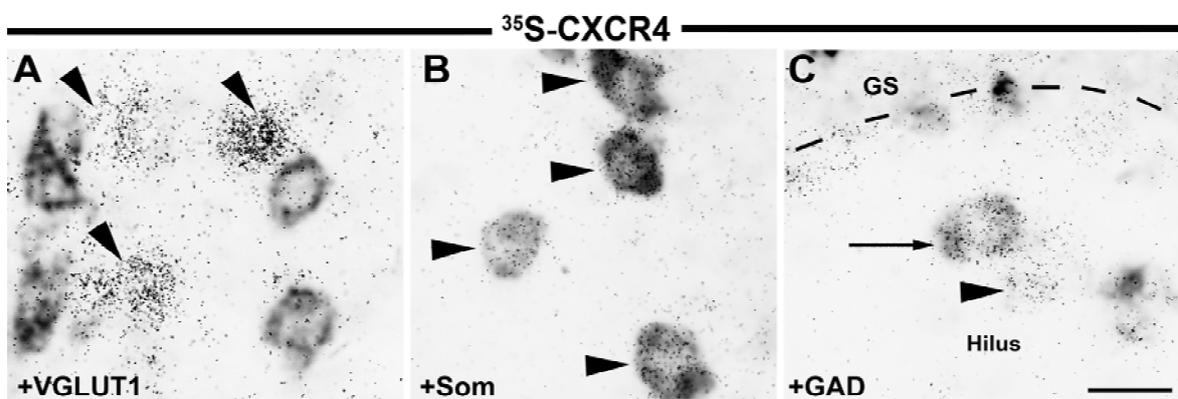


Abbildung 3.8: CXCR4-exprimierende neuronale Zellen im Hilus. In adulten Ratten wurden mittels dualer *in-situ*-Hybridisierung CXCR4-exprimierende Neurone charakterisiert. Zur Detektion der CXCR4-mRNA wurde eine ^{35}S -markierte Sonde verwendet (schwarze Körner in A-C), für den vesikulären Glutamat-Transporter (VGLUT1, A), Somatostatin (Som, B) und die Glutaminsäure-Decarboxylase (glutamic acid decarboxylase, GAD, C) Dig-markierte Sonden (graues Reaktionsprodukt). **A:** Die Hybridisierungssignale für CXCR4 (Pfeilköpfe) überlappen nicht mit denen für VGLUT1. **B:** Neurone des Hilus zeigen eine Koexpression von Somatostatin- und CXCR4-mRNA. **C:** Gezeigt ist hier eine GAD/CXCR4 kopositive Zelle (Pfeil) und eine nur CXCR4-exprimierende Zelle im Hilus sowie CXCR4-Signale ohne Überlappung mit GAD in der SGS. Die gestrichelte Linie markiert die Grenze zwischen Granularschicht (GS) und Hilus. Expositionszeiten: A,56d; B,C,28d.

3.3.2. Detektion des CXCR4-Rezeptors in unreifen Granularzellen

Für immunhistochemische Doppelmarkierungen wurde die Detektierbarkeit des CXCR4-Proteins mit Hilfe einer 24-stündigen icv.-Infusion des Antagonisten AMD3100 erleichtert. Um zunächst zu untersuchen, ob der CXCR4-Rezeptor in neu gebildeten Zellen exprimiert wird, erhielten Ratten 4h, 30h, 7d oder 14d vor der Analyse eine einmalige Injektion von BrdU, und es wurden BrdU-positive Zellen auf CXCR4-Immunreaktivität untersucht. Die Auswertung ergab, dass 4h bzw. 30h nach BrdU-Inkorporation etwa 60% der BrdU-positiven Zellen den CXCR4-Rezeptor exprimierten. Nach 7d zeigten noch 36%, nach 14d noch 11% der am Tag Null gebildeten Zellen CXCR4-Immunreaktivität. (Ein Beispiel für eine Komarkierung von CXCR4 und BrdU ist für den Zeitpunkt 30h nach BrdU-Applikation in Abb. 3.9 A gezeigt.) Diese Ergebnisse belegen, dass der CXCR4-Rezeptor in einem großen Anteil der neu gebildeten Zellen der SGS vorübergehend exprimiert wird.

Die Ko-Immunfärbung des CXCR4-Proteins mit dem Marker Doublecortin identifizierte den Rezeptor in unreifen Granularzellen. Etwa 30% der Doublecortin-positiven Zellen zeigten eine starke und weitere 30% eine schwächere CXCR4-Immunreaktivität (Abb. 3.9 B). Der Rezeptor konnte in den unreifen Granularzellen am Zellkörper, in proximalen Dendriten und am Ursprung der in den Hilus gerichteten Axone sichtbar gemacht werden. Die Kollokalisierung des Rezeptors mit PSA-NCAM, einem weiteren Marker für junge Granularzellen, bestätigte die Bildung des CXCR4-Rezeptors in diesen Zellen (nicht gezeigt). Es ist bekannt, dass Somatostatin-exprimierende Zellen des Hilus zur Klasse GABAerger Neurone gehören, die von Granularzellen angesteuert werden und die selektiv die Molekularschicht innervieren (Freund & Buzsaki 1996). Die bereits in der *in-situ*-Hybridisierung gezeigte CXCR4-Expression in GABAergen Neuronen im Hilus konnte auf Proteinebene durch eine Kollokalisierung mit Somatostatin bestätigt werden (Abb. 3.9 C). Bei starker Vergrößerung einzelner Zellen und Darstellung einzelner konfokaler Ebenen (Abb. 3.9 a-c) ist zu erkennen, dass die CXCR4-Immunreaktivität vorrangig in der Plasmamembran lokalisiert ist, was dem erwarteten Muster einer Rezeptorfärbung in antagonistbehandelten Tieren entspricht.

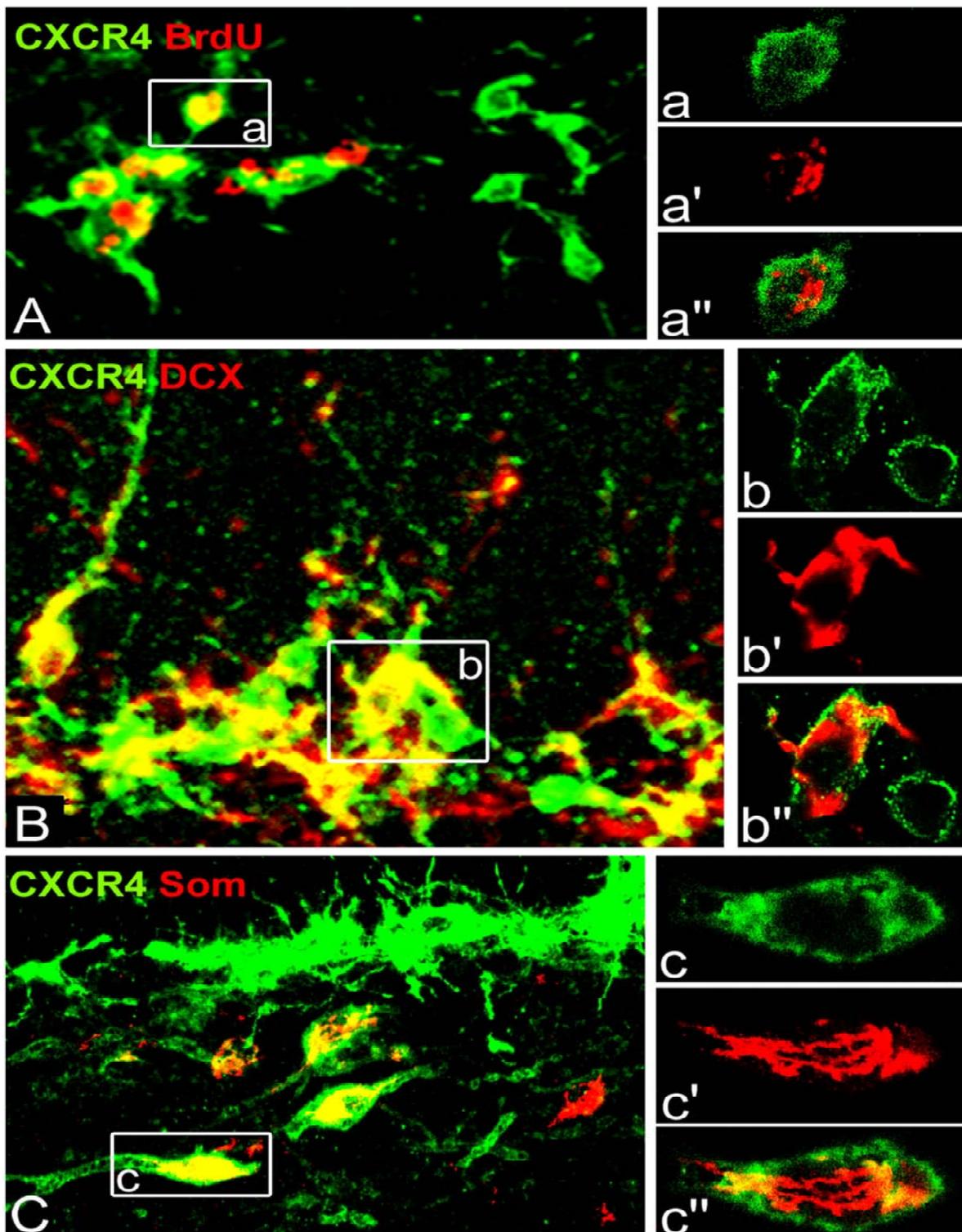


Abbildung 3.9: Charakterisierung der CXCR4-immunreaktiven Zellen in der SGS und im Hilus adulter Ratten (I). **A-C:** Die Darstellung des CXCR4-Proteins wurde mit intraventrikulärer Infusion von AMD3100 unterstützt. Die Abbildungen zeigen Überlagerungen mehrerer konfokaler Ebenen entlang der z-Achse, CXCR4-IR ist in Grün, der jeweilige Zellmarker in Rot dargestellt. **A:** Hier ist eine weitgehende Überlappung beider Antigene zu beobachten. Die BrdU-markierten Zellen sind hier 30 Stunden alt, der CXCR4-Rezeptor wird also von neu gebildeten Zellen exprimiert. **B:** Die

Komarkierung von CXCR4 und Doublecortin belegt eine Expression des Rezeptors in unreifen Granularzellen. **C:** Die Abbildung zeigt CXCR4 in Somatostatin (Som)-exprimierenden GABAergen Neuronen im Hilus. In den CXCR4-positiven Zellen der SGS wird kein Somatostatin detektiert. **a-c:** Aufnahmen der markierten Zellen in A-C aus einer einzigen konfokalen Ebene demonstrieren, dass die CXCR4-Immunreaktivität zum größten Teil an der Plasmamembran lokalisiert ist. Maßstäbe: A,B, 25µm; C, 50µm; a, 6,5µm; b, 5µm; c, 10µm.

Der Nachweis von CXCR4-Immunreaktivität in Nestin-positiven Zellen in der SGS weist auf eine CXCR4-Expression in Vorläuferzellen hin (Abb. 3.10 A). Eine generelle Überlappung der CXCR4-Immunreaktivität und dem Gliamarker GFAP wurde nicht gefunden (Abb. 3.10 B), was jedoch eine Expression des CXCR4-Rezeptors in einer Subpopulation Nestin/GFAP-exprimierender Vorläuferzellen (gesehen in CXCR4-EGFP BAC-transgenen Mäusen von Tran *et al.* 2007) nicht ausschließt.

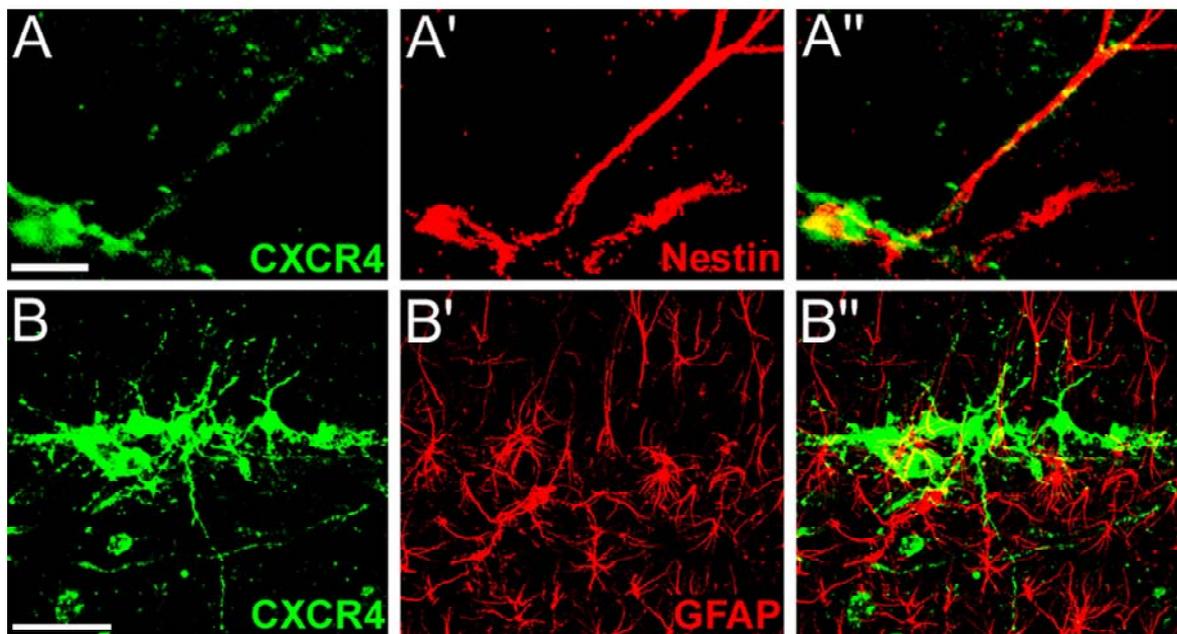


Abbildung 3.10: Charakterisierung der CXCR4-immunreaktiven Zellen in der SGS und im Hilus adulter Ratten (II). **A,B:** Die Darstellung des CXCR4-Proteins wurde mit intraventrikulärer Infusion von AMD3100 unterstützt. Die Abbildungen zeigen Überlagerungen mehrerer konfokaler Ebenen entlang der z-Achse, CXCR4-Immunreaktivität ist in Grün, die beiden Zellmarker in Rot dargestellt. **A:** Die Abbildung zeigt eine Kolokalisation von CXCR4 und Nestin in einer Zelle der SGS. **B:** Es gibt keine generelle Überlappung der Immunreaktivität für CXCR4 und GFAP in der SGS. Maßstäbe: A, 12,5µm; B, 50µm.

Zusammenfassend kann aus den durchgeführten Komarkierungen mit den unterschiedlichen Markern geschlussfolgert werden: Die CXCR4-positiven Zellen der SGS sind (1) neu gebildete Zellen (BrdU); (2) neuronal determinierte unreife Zellen (DCX, PSA-NCAM); (3) Stammzellen/Neuroblasten (Nestin). Die verwendeten Marker sind charakteristisch für verschiedene Stadien der Neurogenese, es ergibt sich klare Evidenz dafür, dass der CXCR4-Rezeptor in unreifen Granularzellen gebildet wird. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die CXCR4-positiven Zellen im Hilus zu den GABAergen Neuronen gehören.

3.4. Rolle des CXCR4-SDF-1-Systems in der hippocampalen Neurogenese

3.4.1. CXCR4-Aktivierung unterstützt die Neubildung unreifer Granularzellen

Es ist bekannt, dass der CXCR4-Rezeptor für die adäquate Entwicklung vieler neuronaler Strukturen während der Ontogenese notwendig ist. In den oben beschriebenen immunhistochemischen Studien zeigte sich, dass der CXCR4-Rezeptor in neu gebildeten, unreifen Granularzellen vorübergehend exprimiert und durch endogenes SDF-1 aktiviert wird. Es stellte sich nun die Frage, ob CXCR4-Rezeptoren bei der Neurogenese im adulten Hippokampus eine Rolle spielen. Deshalb wurde untersucht, ob die kontinuierliche Aktivierung des CXCR4-Rezeptors für das Überleben neu gebildeter Granularzellen benötigt wird. Dazu wurden in einem Zeitfenster von 48h sich teilende Zellen mit insgesamt 5 BrdU-Injektionen markiert. Anschließend wurde die Aktivität des CXCR4-Rezeptors durch icv.-Infusion des Antagonisten AMD3100 über osmotische Minipumpen für 13d blockiert (Behandlungsschema Abb. 3.11 D). Die Anzahl der BrdU-markierten Zellen zwischen Bregma -2,8 und Bregma -4,4 wurde für ein Hippokampus-Segment von jeweils 320µm ermittelt (Abb. 3.11 B). Die Auswertung ergab, dass nach AMD3100-Behandlung die Zahl der BrdU-markierten Zellen in der SGS im Vergleich zur Kontrollgruppe um 31% reduziert war (Gesamtzahl der BrdU-markierten Zellen zwischen Bregma -2,8 und Bregma -4,4: NaCl, 2662 ± 420; AMD3100, 1851 ± 509; $p < 0,05$). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Zahl neu gebildeter Zellen in der SGS durch das Blockieren des CXCR4-Rezeptors deutlich reduziert wird.

Der Proliferationsmarker BrdU wird von allen Zelltypen, die sich zum Zeitpunkt der Injektion teilen, in die DNA integriert. Um zu beantworten, wie hoch der Anteil neuronaler Vorläufer an den ermittelten Gesamtzahlen BrdU-positiver Zellen ist, wurden Ko-Immunfärbungen von BrdU und dem neuronalen Marker Doublecortin angefertigt (Abb. 3.11 A). Die konfokale Analyse von 50 zufällig ausgewählten BrdU-positiven Zellen pro Tier zeigte, dass nach AMD3100 nur 65% der Zellen zu Granularzellen determiniert waren, im Vergleich zu 78% in der Kontrollgruppe (-13%, $p < 0,05$). Dies bedeutet, dass AMD3100 erstens die absolute Anzahl neuer Zellen vermindert hat (BrdU allein) und dass zweitens in dieser verminderten Anzahl neuer Zellen ein geringerer Anteil von Neuronen enthalten ist (BrdU+/DCX+). Aus der Kombination beider Ergebnisse resultiert nach 13d eine

Verminderung der unreifen Neurone um 42% durch Blockieren des CXCR4-Rezeptors (Abb. 3.11 C).

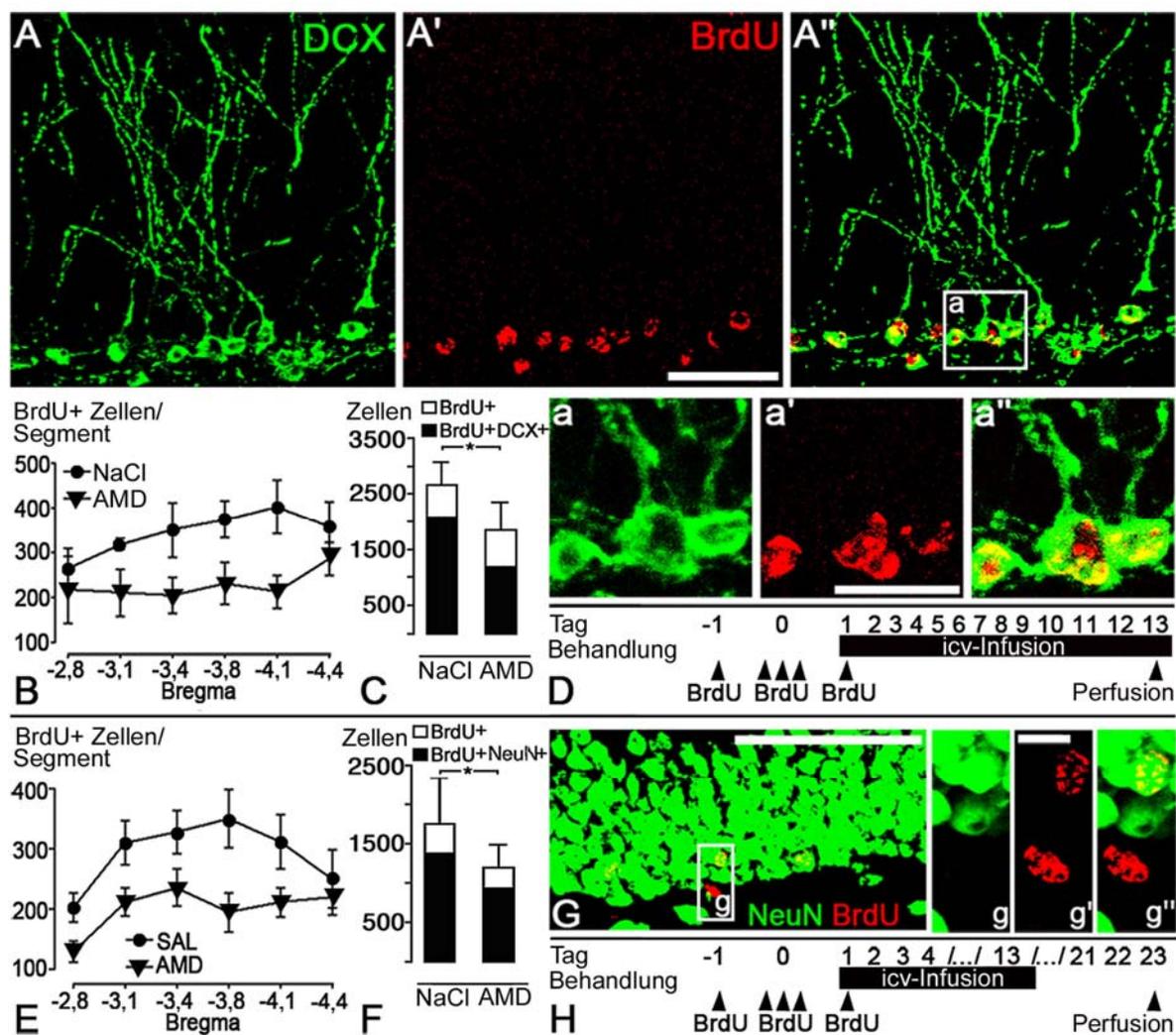


Abbildung 3.11: CXCR4 unterstützt das Überleben neu gebildeter Granularzellen. **D,H:** Adulte Ratten erhielten 13 Tage lang AMD3100 über eine icv.-Infusion mit osmotischen Minipumpen. An den Tagen -1, 0 und 1 wurde BrdU injiziert und an Tag 13 (A,B,C,D) oder an Tag 23 (E,F,G,H) wurden die Tiere perfundiert. **A,G:** Diese konfokalen Aufnahmen zeigen Doppelmarkierungen von BrdU mit Doublecortin (DCX,A) und NeuN (G) in der SGS von Kontrolltieren, die nach 13d (A) bzw. nach 23d (G) perfundiert wurden. **B,E:** Die Diagramme zeigen die Anzahl der BrdU-positiven Zellen in der SGS pro 320µm-Segment des Hippokampus (Bregma -2,8 bis Bregma -4,4) bei Analyse an Tag 13 (B) bzw. an Tag 23 (E). Eine Zwei-Wege-ANOVA mit Messwertwiederholung belegt für beide Untersuchungszeiträume eine signifikante Reduktion der BrdU-markierten Zellen unter AMD3100-Behandlung. **C,F:** Der Anteil neuronaler Zellen an den BrdU-positiven Zellen wurde an 50 zufällig ausgewählten BrdU-Zellen pro Tier anhand der Komarkierung mit Doublecortin (C) bzw. mit NeuN (F) ermittelt. Die Diagramme zeigen die errechnete Menge einfach

BrdU-positiver Zellen (weiße Balken) und BrdU/DCX-kopositiver Zellen (schwarze Balken in C) bzw. BrdU/NeuN-kopositiver Zellen (Schwarze Balken in F) zwischen Bregma -2,8 und -4,4. Verglichen mit der dazugehörigen Kontrollgruppe reduziert die AMD3100-Infusion die Anzahl BrdU/DCX-markierter unreifer Granularzellen an Tag 13 um 42%, die Anzahl BrdU/NeuN-markierter reifer Granularzellen an Tag 23 um 32% ($p < 0,05$; T-Test). **D,H:** Zeitliche Behandlungsschemata der zwei Experimente. Maßstäbe: A, 50 μ m; a, 20 μ m; G, 50 μ m; g, 5 μ m.

3.4.2. CXCR4-Aktivierung unterstützt Überleben und funktionelle Integration neuer Granularzellen

Es ergab sich als weitere Fragestellung, ob sich der AMD3100-induzierte Verlust unreifer Granularzellen in einer Verminderung der Zellen wieder finden würde, die das Stadium einer reifen, funktionell integrierten Granularzelle erreichen und damit den Marker NeuN exprimieren. Zur Bearbeitung dieser Frage wurden BrdU, AMD3100 und 0,9%ige Kochsalzlösung analog zum obigen Schema appliziert, jedoch wurden die Analysen nach einem 10-tägigen substanzfreien Intervall durchgeführt, um das Reifen der markierten Neurone und damit deren Erreichen des NeuN-Stadiums abzuwarten (Behandlungsschema Abb. 3.11 H). In der AMD3100-behandelten Gruppe war die Zahl der BrdU-markierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen um 32% vermindert (Gesamtzahl der BrdU-markierten Zellen zwischen Bregma -2,8 und Bregma -4,4: NaCl, 1748 \pm 587; AMD3100, 1199 \pm 287; $p < 0,05$). Der Anteil der NeuN-exprimierenden Zellen war in beiden Gruppen gleich, demnach steht die Verminderung der BrdU-markierten Zellen um 32% direkt für eine um 32% verminderte Neurogenese (Abb. 3.11 F). Die verminderte Neubildung junger Granularzellen durch die pharmakologische Inaktivierung des CXCR4-Rezeptors schlägt sich also tatsächlich in einer verminderten Neurogenese nieder.

3.5. Rolle des CXCR4-SDF-1-Systems für hippocampusabhängiges Lernen

Es gilt als gesichert, dass die hippocampale Neurogenese bei Nagetieren bestimmte Gedächtnisformen unterstützt (Shors *et al.* 2001, Saxe *et al.* 2006). Beispielsweise speichern Ratten neue Objekte nur dann im Langzeitgedächtnis, wenn die hippocampale Neurogenese auf hinreichend hohem Niveau stattfindet (Bruel-Jungerman *et al.* 2005). Die von der Arbeitsgruppe Bruel-Jungerman beschriebenen Versuche belegen, dass Ratten aus einer angereicherten Umwelt eine bessere Leistung des Langzeitgedächtnisses zeigen als Ratten aus Standardhaltung, und dass die verbesserte Gedächtnisleistung von der hippocampalen Neurogenese abhängt. Dieser experimentelle Ansatz wurde verwendet, um zu klären, ob die Beeinträchtigung der hippocampalen Neurogenese in CXCR4-antagonist-behandelten Tieren mit einer Beeinträchtigung Neurogenese-abhängiger Formen des Lernens verbunden ist.

Ratten erhielten 13d lang icv.-Infusionen von AMD3100 oder physiologischer Kochsalzlösung über osmotische Minipumpen und wurden während dieser Zeit entweder in Gruppen von fünf Tieren in einer angereicherten Umwelt oder einzeln im Standardkäfig gehalten. Die Minipumpen wurden entfernt und Kurz- und Langzeitgedächtnisleistung wurden im Objekterkennungstest (*novel object recognition task*, Bruel-Jungerman *et al.* 2005) ermittelt. Zunächst hatte die Ratte die Möglichkeit, zwei unbekannte Gegenstände 4 min lang zu untersuchen (Akquisition). Eine Stunde später (Kurzzeitgedächtnis) wurde einer der Gegenstände gegen einen neuen ausgetauscht und in einem 4-minütigen Test wurde die Gedächtnisleistung bewertet: Verbrachte das Tier mehr Zeit mit der Exploration des neuen Objekts als mit der Exploration des bekannten, galt dies als Wiedererkennen des bekannten Objektes aus der Akquisition. Das Langzeitgedächtnis wurde nach einem analogen Schema mit längeren Retentionsintervallen von 24h und 48h untersucht. Bei den Tieren aller Gruppen ließ sich ein intaktes Kurzzeitgedächtnis nachweisen, sie explorierten den jeweils unbekanntes Gegenstand signifikant länger als den bekannten ($p < 0,05$; T-Test; Abb. 3.12 A). Nach den langen Retentionsintervallen von 24 oder 48h konnte nur bei den NaCl-behandelten Tieren aus der angereicherten Umwelt eine Bevorzugung des neuen Gegenstandes und damit die Ausbildung einer

Langzeiterinnerung gezeigt werden ($p < 0,05$; T-Test; Abb. 3.12 A). In Abb. 3.12 B werden die Effekte der angereicherten Umwelt und der AMD3100-Behandlung deutlich. Sowohl die Länge des Retentionsintervalls ($p < 0,01$) als auch die Haltungsbedingungen ($p < 0,01$) hatten einen signifikanten Einfluss auf die Exploration des neuen Objekts und damit auf die Fähigkeit, sich zu erinnern. Außerdem hatten die Haltungsbedingungen Einfluss auf den Effekt des Retentionsintervalls: Die Länge des Retentionsintervalls veränderte zwar die Leistung der NaCl-Tiere aus Standardhaltung, jedoch nicht die der NaCl-Tiere aus angereicherter Umwelt ($p < 0,05$; Zwei-Wege-ANOVA mit Messwertwiederholung). Im Test nach Bonferroni zeigte ein Vergleich der vier Gruppen untereinander, dass die Tiere aus der NaCl-Gruppe nach 24h und 48h signifikant länger den unbekanntem Gegenstand explorierten, wenn sie in einer angereicherten Umwelt gehalten wurden ($p < 0,05$; Abb. 3.12 B). Die Behandlung von Tieren aus der angereicherten Umwelt mit AMD3100 verhinderte die Ausbildung einer Erinnerung über einen Zeitraum von 48h ($p < 0,05$). Insgesamt konnte bestätigt werden, dass eine angereicherte Umwelt die Gedächtnisleistung von Ratten im Objekterkennungstest verbessert. Außerdem scheint die Aktivität des CXCR4-Rezeptors für diesen gedächtnisfördernden Einfluss der Umwelt nötig zu sein, da ein Blockieren des CXCR4-Rezeptors diese Neurogenese-abhängige Form des Langzeitgedächtnisses beeinträchtigt.

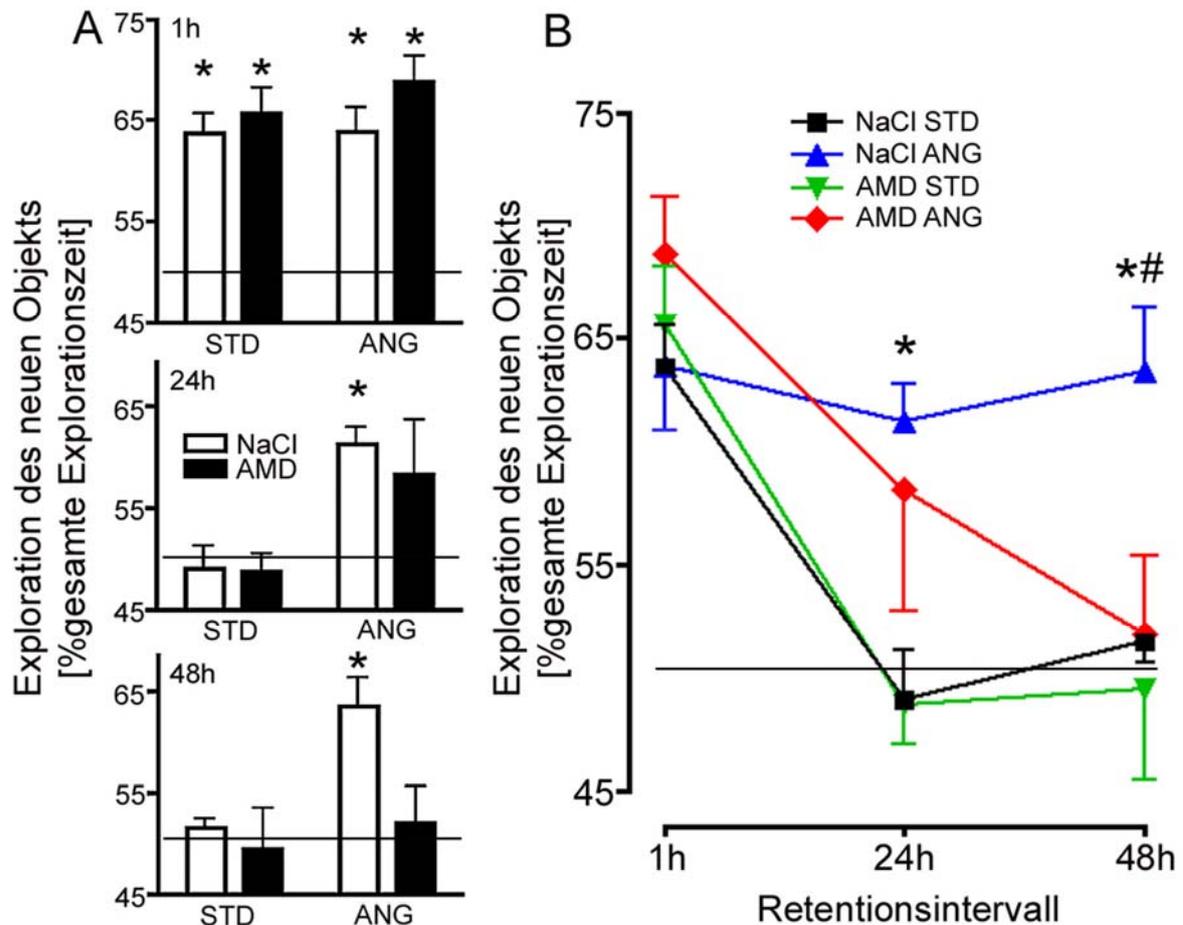


Abbildung 3.12: AMD3100 beeinträchtigt die Leistung des Langzeitgedächtnisses im Objekterkennungstest bei Ratten aus einer angereicherten Umwelt. Ratten aus Standardhaltung (STD) oder aus einer angereicherten Umwelt (ANG) erhielten physiologische Kochsalzlösung (NaCl, weiße Balken) oder AMD3100 (AMD, schwarze Balken) für 13d icv. Es wurde ein vollkommen „neues“ und ein bereits einmal vor 1h, vor 24h oder vor 48h untersuchtes, „bekanntes“ Objekt gleichzeitig in einem Offenfeld präsentiert. Die Zeit, die zur Exploration des neuen Objektes genutzt wurde, ist als prozentualer Anteil der gesamten Explorationszeit dargestellt. **A:** Wurde für das neue Objekt signifikant mehr Explorationszeit verwendet als für das bekannte (schwarze Linie, Präferenz des unbekanntes Objektes), wurde dies als Wiedererkennen des bekannten Objektes gewertet. Nach dem einstündigen Retentionsintervall zeigen alle Behandlungsgruppen eine solche Präferenz für das unbekanntes Objekt. Nach 24 und 48h lässt sich nur noch bei den NaCl-Tieren aus angereicherter Umwelt eine Bevorzugung des neuen Objektes nachweisen (* vs. Explorationszeit des bekannten Objektes, $p < 0,05$, gepaarter einseitiger T-Test). **B:** Hier wird der Effekt der angereicherten Umwelt und der AMD3100-Behandlung deutlich. Der Anteil der Explorationszeit des neuen Objektes ist gegen das Retentionsintervall aufgetragen, um den Verlauf für die verschiedenen Gruppen und das Verhältnis der Gruppen zueinander im direkten Vergleich zu verdeutlichen. Eine Zwei-Wege-ANOVA mit Messwertwiederholung zeigt, dass die Objekterkennung vom Retentionsintervall ($p < 0,01$) und von den Haltungsbedingungen ($p < 0,01$)

beeinflusst wird, wobei der Effekt des Retentionsintervalls von den Haltungsbedingungen abhängig ist ($p < 0,05$). Von der NaCl-behandelten Gruppe aus der angereicherten Umwelt wurde das neue Objekt nach 24h und nach 48h länger exploriert als von der NaCl-Gruppe aus Standardhaltung (*, $p < 0,01$). Diese Gruppe zeigt nach 48h auch gegenüber der AMD-behandelten Gruppe aus angereicherter Umwelt eine intensivere Exploration des neuen Objektes (#, $p < 0,05$) (*,#, Bonferroni's *post-Test*).

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Ergebnisse

4.1.1. SDF-1 induziert Internalisierung, Recycling und Degradation des CXCR4-Rezeptors in primären Neuronen.

Internalisierung, Recycling und Degradation sind grundlegende Regulationsmechanismen, welche die Signaltransduktion über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beeinflussen. Für den Chemokinrezeptor CXCR4 konnte in transfizierten HEK293-Zellen gezeigt werden, dass SDF-1 Internalisierung und rasche Herabregulierung des Rezeptors bewirkt (Marchese & Benovic 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden die genannten Regulationsmechanismen an neuronalen Zellen *in vivo* und *in vitro* untersucht. Indem primäre hippocampale Neuronenkulturen als Modell verwendet wurden konnte etabliert werden, dass der CXCR4-Proteinspiegel in SDF-1-stimulierten Neuronen unter dualer Kontrolle von Recycling und Degradation des internalisierten Rezeptors steht. Ein kurzer SDF-1-Puls war ausreichend für eine vollständige Internalisierung des endogenen CXCR4-Rezeptors. Nach der Internalisierung gelangten mindestens 30% der internalisierten Rezeptoren durch Recycling zurück in die Zellmembran. Wenn die SDF-1-Stimulation über sechs Stunden erfolgte, wurden 75% des Proteins degradiert. Es wird geschlussfolgert, dass der CXCR4-Rezeptor unter anhaltender SDF-1-Exposition wiederholten Internalisierungs- und Recycling-Zyklen unterliegt, wobei nach jeder Internalisierung ein geringer Anteil des Rezeptorproteins abgebaut wird. Damit unterscheidet sich die Regulation des CXCR4-Rezeptors in Neuronen von der anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wie dem neuromodulatorischen Somatostatinrezeptor 2, der nach agonistischer Internalisierung so gut wie vollständig zur Membran recycelt wird (Tulipano *et al.* 2004).

Die Behandlung primärer Neurone mit dem spezifischen Antagonisten AMD3100 verursachte eine deutliche Erhöhung der CXCR4-Proteinmenge in der Plasmamembran. Der Antagonist verhinderte offenbar eine SDF-1-induzierte Internalisierung, wodurch recycelte und neu gebildete CXCR4-Rezeptoren in der Membran akkumulierten (Hatse *et al.* 2002). Außerdem erhöhte sich unter AMD3100 die Menge des CXCR4-Proteins im Westernblot, vermutlich weil der

agonistinduzierte Abbau des Rezeptors blockiert wurde. Diese Effekte lassen darauf schließen, dass in das Medium primärer hippocampaler Neuronenkulturen endogenes SDF-1 sezerniert wird. Dies konnte an stabil mit dem T7-CXCR4-Rezeptor transfizierten HEK293-Zellen belegt werden: Medium aus hippocampalen Kulturen enthält nach einem Tag *in vitro*-Konditionierung ausreichend SDF-1, um eine Internalisierung des CXCR4-Rezeptor in den HEK293-Zellen zu bewirken.

4.1.2. Es existiert ein Ungleichgewicht zwischen CXCR4-mRNA und CXCR4-Protein in der SGS des adulten Hippokampus.

Ein Ziel dieser Arbeit war, die Expressionsmuster des Chemokinrezeptors CXCR4 und seines Liganden SDF-1 im postnatalen Hippokampus zueinander in Beziehung zu setzen, um eine mögliche Beteiligung des Systems an der hippocampalen Neurogenese im adulten Hippokampus zu untersuchen. Es zeigte sich, dass die Expression von CXCR4 während der postnatalen Entwicklung in den meisten hippocampalen Zellen auf Protein- und mRNA-Ebene deutlich abnimmt. Selektiv in der SGS bleibt im erwachsenen Tier eine starke CXCR4-mRNA-Expression erhalten. Dies wurde bereits 2003 von Stumm *et al.* berichtet und kürzlich durch andere Arbeiten bestätigt (Tran *et al.* 2007, Berger *et al.* 2007). Es war deshalb überraschend, dass in der vorliegenden Arbeit nur ein sehr geringer CXCR4-Protein-Spiegel in der SGS nachgewiesen werden konnte.

4.1.3. Der CXCR4-Rezeptor wird in Zellen der SGS tonisch aktiviert.

In diesem Zusammenhang war die Beobachtung interessant, dass während der postnatalen Hippokampusentwicklung das CXCR4-Protein in den Subgranularzellen ab dem Zeitpunkt nicht mehr detektiert werden konnte, zu dem der SDF-1-Expressionsspiegel in den unmittelbar benachbarten Granularzellen anstieg. Das Ungleichgewicht zwischen CXCR4-Protein und CXCR4-mRNA entwickelte sich also parallel zur ausgeprägten Heraufregulation der SDF-1-Expression in den Granularzellen. Es wurde deshalb vermutet, dass eine lokal hohe SDF-1-Konzentration den CXCR4-Rezeptor in den Subgranularzellen tonisch aktiviert. Da die Aktivierung des CXCR4-Rezeptors durch SDF-1 zur Internalisierung und Degradation des Moleküls führt, würde dieses Konzept

erklären, dass in der SGS zwar viel CXCR4-mRNA aber nur wenig CXCR4-Protein nachweisbar ist. Gestützt wird diese Hypothese von der Beobachtung, dass in der Molekularschicht, in der nur sehr wenig SDF-1 exprimiert wird (Stumm *et al.* 2002, diese Arbeit), kein augenfälliger Unterschied zwischen CXCR4-Protein und CXCR4-mRNA vorhanden war. Im Verlauf der Arbeit fanden sich weitere starke Hinweise auf eine permanente Aktivierung und anschließende Degradation des CXCR4-Rezeptors in den Subgranularzellen. Zwei wichtige Anhaltspunkte hierfür erbrachte die chronische Blockade des CXCR4-Rezeptors durch den spezifischen Antagonisten AMD3100. Zum einen führte die intraventrikuläre Infusion des Antagonisten zu einer massiven Erhöhung des CXCR4-Protein-Spiegels in der SGS und im Hilus, ohne den CXCR4-mRNA-Spiegel zu beeinflussen. In der Molekularschicht dagegen war die CXCR4-Immunreaktivität nach chronischer AMD3100-Infusion nur leicht erhöht. Zweitens wurde der CXCR4-Rezeptor nach der chronischen Applikation von AMD3100 fast ausschließlich in der Plasmamembran der Granularzellvorläufer beobachtet, während in Kontrolltieren ein erheblicher Anteil des CXCR4-Proteins intrazellulär lokalisiert war. Dieser Effekt wurde auch in Primärkulturen hippocampaler Neurone gefunden: Sowohl am endogenen als auch am transfizierten CXCR4-Rezeptor konnte immunocytochemisch gezeigt werden, dass die SDF-1-induzierte Internalisierung des CXCR4-Rezeptors durch AMD3100 blockiert wird. Dies wurde im ELISA quantitativ bestätigt. Westernblot-Experimente zeigten, dass das CXCR4-Protein unter dauerhafter Agoniststimulation degradiert wird. Fasst man die Ergebnisse bezüglich der Regulation des CXCR4-Rezeptors zusammen, lässt sich schlussfolgern, dass die CXCR4-Rezeptoren der Subgranularzellen höchstwahrscheinlich vom endogenen Liganden SDF-1 kontinuierlich aktiviert und nach Internalisierung zum Teil abgebaut werden. Der Rezeptor befindet sich hierdurch konstitutiv in einem Fließgleichgewicht zwischen Intrazellulärraum und Plasmamembran. Die starke Expression der CXCR4-mRNA legt eine ständige Neubildung des CXCR4-Proteins nahe. Es ist anzunehmen, dass das neu gebildete CXCR4-Protein in den Zyklus von Internalisierung und anschließendem Abbau/Recycling einmündet. Vor diesem Hintergrund wäre es verständlich, dass zu einem gegebenen Zeitpunkt nur eine geringe Proteinmenge mittels Antikörper

detektiert werden kann. Dennoch wäre zu erwarten, dass Zellen der SGS von einem permanenten Signal des CXCR4-Rezeptors beeinflusst werden.

4.1.4. Der CXCR4-Rezeptor wird von neuronalen Vorläuferzellen der SGS exprimiert.

Da die SGS des Gyrus dentatus eine der neurogenen Nischen im adulten Gehirn ist, stellte sich die Frage, ob CXCR4-Rezeptoren von Stammzellen und neu gebildeten Nervenzellen exprimiert werden. Die immunhistochemische Darstellung der CXCR4-Rezeptormoleküle wurde durch Blockieren der CXCR4-Aktivierung wesentlich vereinfacht. Es zeigte sich, dass das Expressionsmuster des CXCR4-Proteins in antagonistbehandelten Tieren sehr gut mit dem etablierten Expressionsmuster der CXCR4-mRNA übereinstimmte (Stumm *et al.* 2002, 2003, Tran *et al.* 2007, Berger *et al.* 2007). Von der Arbeitsgruppe Tran *et al.* wurde 2004 die Expression von Chemokinrezeptoren, insbesondere vom CXCR4-Rezeptor, auf proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen beschrieben. Der CXCR4-Rezeptor wurde immunocytochemisch in Neurosphären¹ aus der Subventrikularschicht adulter Mäuse gezeigt, außerdem demonstrierte die Gruppe eine SDF-1-Sensitivität dieser Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurden die CXCR4-exprimierenden Zellen der SGS in Komarkierungen immunhistochemisch charakterisiert. Mit Hilfe des Proliferationsmarkers BrdU konnte gezeigt werden, dass der CXCR4-Rezeptor in neu gebildeten, wenige Stunden alten Zellen exprimiert wird. Diese Zellen wurden in Doppelmarkierungen näher charakterisiert. Ausgehend von der Hypothese, dass der CXCR4-Rezeptor Proliferation und Differenzierung von Granularzellvorläufern beeinflusst, orientierte sich die Wahl der spezifischen Zellmarker an der etablierten Unterteilung der hippokampalen Neurogenese in verschiedene Phasen (Kempermann *et al.* 2004, Von Bohlen und Halbach 2007). Die Determination der neuen Zellen zu Nerven- oder Gliazellen erfolgt in der Differenzierungsphase der Neurogenese. Neuronal differenzierende Zellen beginnen zu diesem Zeitpunkt mit der Produktion des Markers Doublecortin. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass ein großer Anteil der

¹ 1992 wurde von zwei Arbeitsgruppen gezeigt, dass im adulten Mausgehirn Zellen vorhanden sind, die *in vitro* proliferieren können, und die Zellen hervorbringen, die für neuronale Markerproteine positiv sind (Reynolds & Weiss 1992, Richards *et al.* 1992). Diese Zellen proliferieren in Kultur, ohne zu adhären, sie bilden flottierende Zellcluster, die Neurosphären genannt werden.

Doublecortin-exprimierenden Zellen der SGS gleichzeitig eine Expression des CXCR4-Rezeptors aufweist. Der Chemokinrezeptor CXCR4 wird also tatsächlich von neu gebildeten Granularzellen gebildet. Als ein weiterer Marker wurde das Protein Nestin detektiert, das während der Proliferationsphase der Neurogenese nachweisbar ist. Die Immunfärbungen zeigen eine Koexpression von CXCR4 und Nestin in Zellen der SGS, der Rezeptor wird also auch in Stammzellen/Vorläuferzellen der SGS gebildet. Um zu überprüfen, ob der Chemokinrezeptor in reifen Neuronen exprimiert wird, wurde eine Komarkierung mit VGlut1, einem Marker für reife Granularzellen, ausgewertet. Diese zeigte keine Überlappung mit der CXCR4-Expression. Demzufolge wird der CXCR4-Rezeptor kaum in reifen Granularzellen gebildet. Die hier erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Charakterisierung CXCR4-positiver Zellen stimmen mit denen der Arbeitsgruppe Tran *et al.* überein, die in CXCR4-EGFP BAC-transgenen Mäusen ebenfalls eine Kolokalisation von CXCR4 mit Doublecortin und Nestin zeigte, ebenso fand diese Gruppe sehr wenig CXCR4-Protein in Calbindin-positiven reifen Granularzellen (Tran *et al.* 2007). Zusammengefasst belegen die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit und aus der aktuellen Literatur eine Expression des CXCR4-Rezeptors in jungen Granularzellen während der Proliferation, Differenzierung und Reifung.

4.1.5. Über den CXCR4-Rezeptor werden Überlebens-Signalwege aktiviert.

Fasst man die bis hierher dargelegten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen, verdichteten sich die Hinweise auf eine wichtige Rolle des CXCR4-Rezeptors in den neuen Granularzellen des adulten Hippokampus: Der Chemokinrezeptor CXCR4 wird in Stammzellen der SGS und in unreifen Granularzellen exprimiert und wird in diesen Zellen offenbar permanent aktiviert. Unmittelbar angrenzende reife Granularzellen weisen konstitutiv einen hohen SDF-1-Expressionsspiegel auf, versorgen also möglicherweise die CXCR4-exprimierenden Zellen der SGS mit dem endogenen Liganden SDF-1. Es stellte sich nun die Frage, welche Funktion die ständige Aktivierung des CXCR4-Rezeptors in diesen Zellen ausübt. *In-vitro*-Untersuchungen zur intrazellulären Signaltransduktion an hippokampalen Neuronen zeigten, dass SDF-1 ein potenter Aktivator von Akt ist. Diese Kinase stellt eine Schlüsselkomponente für

neuronales Überleben dar (Datta *et al.* 1999, Yamaguchi *et al.* 2001). Außerdem ist bekannt, dass Erk1/2 (*extracellular signal regulated kinases 1/2*) an CXCR4-vermittelten neurotrophen Signalen beteiligt ist (Lazarini *et al.* 2000, Chalasani *et al.* 2003). Arbeiten mit Opioiden lieferten einen indirekten Hinweis auf eine Rolle der CXCR4-Signaltransduktion für das Überleben von Zellen: SDF-1-induzierte neurotrophe Erk- und Akt-Signale werden durch Opioide unterbrochen (Patel *et al.* 2006) und es wurde gezeigt, dass die Neurogenese von Opioiden unterdrückt wird (Eisch *et al.* 2000, Harburg *et al.* 2007, Kolodziej *et al.* 2008a). Möglicherweise wird das Überleben neu gebildeter Granularzellen über antagonistische Regulation der Erk- und Akt-Signalwege vom Opioidsystem gehemmt und von SDF-1 unterstützt. Zahlreiche Belege aus der Literatur weisen in die gleiche Richtung. Für das Chemokin SDF-1 wurde bereits in verschiedenen neuronalen Zellkultur-Modellen eine überlebensfördernde Wirkung nachgewiesen. Meucci *et al.* (1998) induzierten in einer Kultur hippocampaler Neurone Apoptose (durch Entzug der *glial feeder layer*¹ oder durch Zugabe von gp120²), die durch Zugabe von SDF-1 ins Kulturmedium deutlich vermindert wurde. SDF-1 unterstützte auch das Überleben kultivierter retinaler Ganglienzellen, selbst in Abwesenheit anderer neurotropher Faktoren (Chalasani *et al.* 2003a). Odemis *et al.* berichteten 2005 eine massiv verringerte Neuronenzahl im dorsalen Wurzelganglion in CXCR4-KO-Mäusen und eine damit einhergehende Beeinträchtigung der Innervation der Gliedmaßen.

4.1.6. SDF-1 fördert das Überleben neuronaler Zellen möglicherweise durch die Induktion einer erhöhten Erregbarkeit unreifer Granularzellen.

Es ist etabliert, dass das Chemokin SDF-1 auf bestimmte Zellpopulationen eine neuromodulatorische Wirkung ausübt (Übersichtsartikel von Guyon & Nahon 2007). Vor diesem Hintergrund führte ein kooperierendes Labor (Arbeitsgruppe Guyon, Université de Nice Sophia Antipolis-CNRS, Valbonne, Frankreich) parallel zu den hier beschriebenen Untersuchungen elektrophysiologische Experimente durch. Es sollte der Einfluss von SDF-1 auf die Erregbarkeit unreifer

¹ Primäre Neurone sind auf einem Deckglas adheriert, welches in einer Kulturschale auf einer Astrozytenschicht platziert wird. Die Neurone sind auf diese Weise räumlich getrennt von den Gliazellen, befinden sich aber im selben Medium, wodurch die Kultur länger stabil bleibt.

² neurotoxisches Glykoprotein auf der Oberfläche der HIV-Hülle (Meucci & Miller 1996)

Granularzellen untersucht werden, um möglicherweise weitere Anhaltspunkte für den Einfluss der CXCR4-Signaltransduktion auf die Nervenzelle zu erhalten. Ausgehend von der postnatalen Abnahme des CXCR4-Proteinspiegels in der SGS wurde der Effekt von exogen appliziertem SDF-1 auf die Erregbarkeit von Granularzellen an 250µm-Hippokampusschnitten zwischen P11 und P21 mit der *Patch-Clamp*-Methode analysiert. Die Granularzellen wurden anhand ihrer elektrischen Aktivität als reif oder unreif klassifiziert (Schmidt-Hieber *et al.* 2004, Couillard-Despres *et al.* 2006). Die Muster der Ableitungen von reifen Granularzellen wurden von SDF-1-Applikationen nicht beeinflusst, während durchschnittlich 32% der unreifen Zellen mit erhöhter Erregbarkeit reagierten. Dieser exzitatorische Effekt von SDF-1 war von einer verkürzten Latenz des Aktionspotentials und einer erhöhten Anzahl induzierter Aktionspotentiale durch einen bestimmten Strompuls gekennzeichnet. Die Effekte waren durch Auswaschen reversibel und mit AMD3100 blockierbar. Der Anteil unreifer Granularzellen mit Sensitivität für SDF-1 nahm während der postnatalen Entwicklung von 61% auf 18% ab und blieb dann konstant. Insgesamt demonstrieren die *Patch-Clamp*-Untersuchungen der Arbeitsgruppe Guyon, dass der CXCR4-Rezeptor die Erregbarkeit unreifer Granularzellen erhöht. Es ist denkbar, dass dieser Effekt zur überlebensfördernden Wirkung von SDF-1 beiträgt: In der aktuellen Literatur wird berichtet, dass die Aminosäure GABA, die allgemein als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter betrachtet wird, im zentralen Nervensystem extrazellulär in geringen Konzentrationen vorhanden ist und für eine tonische Inhibition sorgt (Farrant & Nusser 2005, Glykys & Mody 2007). Im Gegensatz dazu jedoch werden unreife Granularzellen aufgrund ihrer abweichenden intrazellulären Cl⁻-Konzentration von GABA depolarisiert, was über spannungsabhängige Kanäle zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt (Übersichtsartikel unter anderem von Owens & Kriegstein 2002). Einen weiteren GABAergen Einfluss üben Korbzellen auf proliferierende Vorläuferzellen der SGS aus. Interessanterweise haben jüngste Studien gezeigt, dass hier SDF-1 und GABA gemeinsam freigesetzt werden. Hierbei war die GABAerge Transmission abhängig von der SDF-1-Freisetzung (Bhattacharyya *et al.* 2008). Die GABA-induzierte Depolarisation der unreifen Granularzellen und der Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration sind als wichtige Faktoren zur

Verstärkung hippokampaler Neurogenese etabliert (Tozuka *et al.* 2005, Ge *et al.* 2006, Übersichtsartikel von Jagasia *et al.* 2006). Tozuka *et al.* zeigten 2005, dass hierbei die Expression des neurotrophen Transkriptionsfaktors NeuroD induziert wird. Möglicherweise bewirkt ein aktiviertes CXCR4/SDF-1-System eine Verstärkung der GABAergen Transmission, was sich in den Untersuchungen der Arbeitsgruppe Guyon in einer erhöhten Erregbarkeit unreifer Granularzellen zeigt. Daraus ergibt sich ein wichtiger Anhaltspunkt für eine Rolle des CXCR4-Rezeptors bei der Reifung neuer Granularzellen.

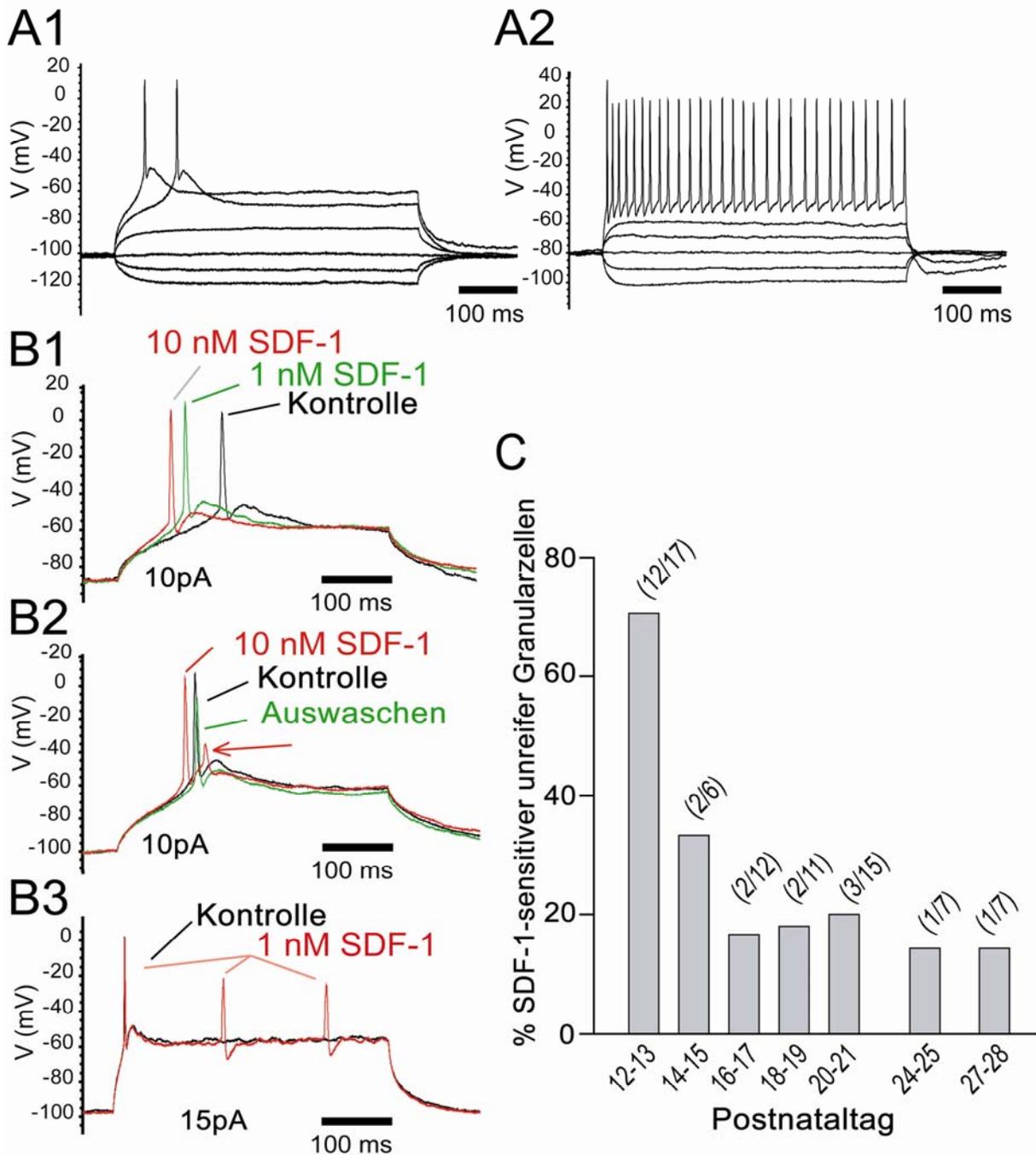


Abbildung 4.1: Unreife Granularzellen zeigen SDF-1-Sensitivität in Form von erhöhter Erregbarkeit. **A:** Unterschiedliche elektrische Eigenschaften reifer und unreifer Granularzellen. **A1:** Antworten einer unreifen Granularzellen, induziert von Strompulsen von -10, -5, 0, 10, 20 und 25pA. Charakteristisch ist der „low threshold spike“¹, gefolgt von einem einzelnen Aktionspotential. **A2:** Folge von Aktionspotentialen in einer reifen Granularzelle, induziert von Strompulsen von -40, -20, 0, 20, 40 und 100pA. **B:** SDF-1 verursacht eine erhöhte Erregbarkeit unreifer Granularzellen. **B1:** Zunehmende Konzentrationen von SDF-1 verringern die Latenz des Aktionspotentials. **B2:** SDF-1 induziert ein zweites, kleines Aktionspotential (Pfeil). **B3:** Unter SDF-1 werden zwei zusätzliche Aktionspotentiale vom gleichen Strompuls ausgelöst. **C:** Anteil unreifer Granularzellen, die auf 1-10nm SDF-1 mit erhöhter Erregbarkeit reagiert haben (reagierende Zellen / getestete Zellen). Abbildung aus Kolodziej *et al.* 2008b, verändert.

¹ Der Begriff *Spike* bezeichnet die rasche Depolarisation der Zellmembran als Antwort auf einen überschwelligen Reiz. „Low threshold“ weist auf die vergleichsweise niedrige Reizschwelle bei unreifen Neuronen hin.

4.1.7. Die Aktivierung des CXCR4-Rezeptors unterstützt die Reifung neu gebildeter Granularzellen.

Die verschiedenen Anhaltspunkte aus den eigenen Versuchen und aus der Literatur forcierten letztlich die Frage, ob das CXCR4/SDF-1-System Proliferation und Überleben von Granularzellvorläufern und damit die Neurogenese im adulten Hippokampus beeinflusst. Folglich wurde die neurotrophe Wirkung von CXCR4/SDF-1 hier *in vivo* am Gyrus dentatus der Ratte untersucht. Die Markierung sich teilender Zellen mit BrdU und die unmittelbar darauf folgende chronische intraventrikuläre Infusion des CXCR4-Antagonisten AMD3100 sollten zeigen, ob die Unterbrechung der CXCR4-Signaltransduktion eine veränderte Neurogeneserate verursacht. Die Ergebnisse belegen sehr klar, dass eine verminderte Neurogenese resultiert. Bedingt durch das zeitliche Versuchsdesign kann hierbei nicht unterschieden werden, ob Effekte auf die Proliferation von Vorläuferzellen oder auf das Überleben neu gebildeter Granularzellen gemessen wurden. Mit der Immunfärbung von BrdU können prinzipiell auch Zellen erfasst werden, die sich nach der Inkorporation von BrdU nochmals geteilt haben. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass ohnehin primär ein beträchtlicher Überschuss an neuen Nervenzellen gebildet wird, aus dem dann wenige Zellen selektiert und integriert werden, ist es jedoch unwahrscheinlich, dass der gefundene beträchtliche Unterschied auf eine verminderte Proliferation unter AMD3100 zurückzuführen ist. Vielmehr spiegelt das Ergebnis vermutlich eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit für junge Granularzellen mit aktivem CXCR4-Rezeptor wider.

Durch adulte Neurogenese wird im Hippokampus kontinuierlich ein Überschuss an neuronalen Vorläuferzellen gebildet (Cameron & McKay 2001). Nur ein geringer Anteil dieser neuen Zellen überlebt und reift zu funktionellen Granularzellen, die Mehrheit der adult gebildeten Zellen wird, so wie in der embryonalen und früh postnatalen Entwicklung, schnell durch Apoptose eliminiert (Young *et al.* 1999, Gould *et al.* 1999, Kempermann *et al.* 2003). Dies ist möglicherweise ein vielversprechender Ansatzpunkt, um die physiologische Potenz der Neurogenese therapeutisch auszunutzen. Es ist bekannt, dass der Anteil der überlebenden Neurone von exogenen Stimuli dynamisch beeinflusst wird, zahlreiche systemische Faktoren auf physiologischer und pathologischer Ebene wurden

charakterisiert. Es gibt jedoch noch wenig Kenntnis über intrazelluläre Regulationsprozesse, die vielleicht neue Therapieansätze zur kausalen Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen eröffnen könnten. Welche assoziierten Mechanismen bestimmen, ob eine neue Nervenzelle in der SGS überlebt und sich in das hippocampale Netzwerk integriert, oder ob sie degeneriert? Denkbar ist eine kritische Abhängigkeit von neurotrophen Faktoren, die für unreife Granularzellen anti-apoptotische Signale übermitteln. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse identifizieren das SDF-1-induzierte intrazelluläre Signal über den CXCR4-Rezeptor als ein solches Überlebenssignal für unreife Granularzellen im Hippokampus.

4.1.8. Die Aktivierung des CXCR4-Rezeptors wird für Neurogenese-abhängiges Lernen benötigt.

Um die Bedeutung der CXCR4-vermittelten Unterstützung der Neurogenese bewerten zu können, sollte die funktionelle Relevanz der verminderten Neurogenese unter AMD3100 ermittelt werden. Aktuelle Arbeiten belegen, dass die Gedächtnisleistung in bestimmten Lernparadigmen von hippocampaler Neurogenese abhängig ist (Shors *et al.* 2001, Snyder *et al.* 2005, Winocur *et al.* 2006, Fan *et al.* 2007, Seigers *et al.* 2008). Die Arbeitsgruppe Bruel-Jungerman *et al.* demonstrierte in einer Arbeit von 2005, dass verminderte Neurogenese die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses beeinträchtigt. In der dort beschriebenen Versuchsanordnung wurde die hippocampale Neurogenese durch eine angereicherte Umwelt verstärkt (Kempermann *et al.* 1997, 1998, Fan *et al.* 2007, Llorens-Martin *et al.* 2007). Im anschließenden Objekterkennungstest zeigten Tiere aus einer angereicherten Umwelt eine verbesserte Leistung des Langzeitgedächtnisses im Vergleich zu Tieren, die unter reizarmen Standardbedingungen gehalten wurden. Vergleichbare Resultate sind aus zahlreichen anderen Arbeiten bekannt (Kempermann *et al.* 1997, van Praag *et al.* 2000, Komitova *et al.* 2005). Die Untersuchungen von Bruel-Jungerman *et al.* belegen jedoch erstmalig, dass diese Leistung des Langzeitgedächtnisses an die erhöhte Neurogenese geknüpft ist. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Versuchsaufbau aus angereicherter Umwelt und anschließendem Objekterkennungstest als Neurogenese-abhängiges Paradigma für

hippokampales Lernen übernommen, um die funktionelle Bedeutung der verminderten Neurogenese unter AMD3100 zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass eine chronische Blockade der CXCR4-Signaltransduktion durch intraventrikuläre Infusion des Antagonisten AMD3100 die Ausbildung des Neurogenese-abhängigen Langzeitgedächtnisses verhindert, was mit dem Neurogenese-hemmenden Effekt des CXCR4-Antagonisten übereinstimmt. Das Neurogenese-unabhängige Kurzzeitgedächtnis zur Wiedererkennung neuer Objekte war dagegen intakt, was eine Beeinträchtigung der Gedächtniskonsolidierung durch die vorangegangene Hemmung der Neurogenese anzeigt.

4.2. Schlussfolgerungen

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten belegen, dass CXCR4-Rezeptoren nach Aktivierung durch SDF-1 in Neuronen rasch internalisiert und effektiv recycelt werden. Chronische Agonisteinwirkung führt zur Herabregulation des Rezeptors. Das Ungleichgewicht zwischen hoher CXCR4-mRNA-Expression und geringer CXCR4-Proteinexpression in unreifen Neuronen der SGS spiegelt eine tonische CXCR4-Aktivierung und die damit verbundene Internalisierung und Degradation des Rezeptors wider. Die massive Erhöhung der Zahl CXCR4-positiver Zellen in der SGS und die Akkumulation der CXCR4-Immunreaktivität in der Plasmamembran nach Blockade des Rezeptors mit AMD3100 bestätigen diese Annahme. Die chronische Infusion des Antagonisten führte zu einer verminderten Anzahl neuer Granularzellen und verhinderte die Ausbildung einer Langzeiterinnerung in einem Neurogenese-abhängigen Test. Dies indiziert eine wichtige Rolle des tonischen CXCR4-Signaling in der hippocampalen Neurogenese und in der Funktion des neurogenese-abhängigen Langzeitgedächtnisses.

4.3. Ausblick

Die Funktion des Chemokins SDF-1 im sich entwickelnden Nervensystem wurde in den vergangenen zehn Jahren gut definiert: SDF-1 steuert die neuronale Migration und die axonale Wegfindung. Die Funktion des Rezeptor-Ligand-Systems im erwachsenen Gehirn ist dagegen relativ unklar. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass der CXCR4-Rezeptor die adulte Neurogenese quantitativ beeinflusst. Naheliegend ist nun die Frage, ob SDF-1 die Neurogenese auch qualitativ reguliert, also auf die morphologische Differenzierung neuer Granularzellen einwirkt. Verschiedene Arbeiten haben Hinweise darauf geliefert, dass der CXCR4-Rezeptor die Entwicklung von Zellen auch nach Proliferation und Migration beeinflusst: Die Axone von Motoneuronen werden von SDF-1 an ihr Ziel dirigiert (Lieberam *et al.* 2005), und auch das axonale Wachstum von Granularzellen des Cerebellums, von retinalen Ganglienzellen und von sympathischen Neuronen wird über den CXCR4-Rezeptor moduliert (Arakawa *et al.* 2003, Chalasani *et al.* 2003). Möglicherweise moduliert SDF-1 während der Neurogenese im adulten Hippokampus ebenfalls das Auswachsen axonaler Fortsätze, oder auch Zahl und Morphologie der Synapsen oder Anzahl und Länge dendritischer Verzweigungen. Ein Indiz dafür ist die subzelluläre Umverteilung des Rezeptorproteins während der Reifung kultivierter Neurone (Pujol *et al.* 2005, Peng *et al.* 2007). Dies wiederum hätte sehr wahrscheinlich Auswirkungen auf die funktionelle Integration der neuen Granularzellen in hippokampale Schaltkreise. Ein tieferes Verständnis für die molekularen Mechanismen, die dem Überleben und der Integration neuer Neurone zugrundeliegen, könnte einen wesentlichen Fortschritt auf dem Weg zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen darstellen. Dabei ist es durchaus denkbar, dass prinzipielle Mechanismen auch auf die Transplantation von Stammzellen übertragbar sind.

Zusammenfassung

Das Chemokin SDF-1 und sein Rezeptor CXCR4 steuern Migration und Proliferation von hippocampalen Granularzellvorläufern während der Embryonalentwicklung. Die Rolle des CXCR4-Rezeptors im postnatalen Hippokampus ist hingegen ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Funktion und Regulation des CXCR4-Rezeptors in neuronalen Vorläuferzellen des adulten Hippokampus und in hippocampalen Primärkulturen untersucht werden. *In-situ*-Hybridisierungen zeigten intensive CXCR4-mRNA-Expression in zahlreichen Zellen der Subgranularschicht (SGS) des adulten Hippokampus, obwohl dort nur sehr wenig CXCR4-Protein dargestellt werden konnte. Dieses Ungleichgewicht zwischen starker mRNA-Expression und schwacher Proteinexpression entwickelte sich während der postnatalen Reifung des Hippokampus. Gleichzeitig nahm die SDF-1-Expression in den Granularzellen stark zu. Dies legte die Vermutung nahe, dass ein lokal sehr hoher SDF-1-Spiegel permanente Aktivierung und anschließende Degradation des in den Subgranularzellen exprimierten CXCR4-Rezeptors verursachte. Diese Hypothese wurde von dem Befund gestärkt, dass ein chronisches Blockieren des CXCR4-Rezeptors durch intraventrikuläre Infusion des Antagonisten AMD3100 eine massive Erhöhung des CXCR4-Proteinspiegels verursachte und damit das oben beschriebene Ungleichgewicht zwischen Rezeptor-mRNA und Rezeptorprotein aufhob. Vor diesem Hintergrund wurden die Mechanismen der CXCR4-Regulation an Primärkulturen aus dem embryonalen Hippokampus näher untersucht. Der CXCR4-Rezeptor wurde durch SDF-1 effektiv internalisiert. Anhaltende Rezeptoraktivierung führte zur Desensibilisierung der CXCR4-Signaltransduktion und zu progressiver Degradation des CXCR4-Proteins. Gleichzeitige Anwesenheit des CXCR4-Antagonisten AMD3100 blockierte Aktivierung, Internalisierung und Degradation des Rezeptors. Diese Ergebnisse stützen die oben aufgestellte Hypothese, dass der geringe CXCR4-Proteinspiegel in der hippocampalen SGS, der unter Antagonistbehandlung stark zunimmt, eine konstitutive Rezeptoraktivierung widerspiegelt. Der CXCR4-Rezeptor konnte in BrdU-, Nestin-, und Doublecortin-positiven Zellen detektiert werden. Es zeigte sich, dass die Mehrheit der adult gebildeten Granularzellen vorübergehend den CXCR4-Rezeptor exprimiert. Die chronische Applikation von AMD3100 inhibierte die Bildung neuer Granularzellen, ebenso wurde die Ausbildung einer Langzeiterinnerung im Objekterkennungstest unterdrückt. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass der CXCR4-Rezeptor in neu gebildeten Granularzellen durch endogenes SDF-1 tonisch aktiviert wird. Der CXCR4-Rezeptor unterstützt das Überleben und die funktionelle Integration neu gebildeter Granularzellen und fördert so neurogenese-assoziierte Formen neuronaler Plastizität, die an der Ausbildung des Langzeitgedächtnisses beteiligt sind.

Summary

Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and its receptor CXCR4 play a well-established role during embryonic development of dentate gyrus granule cells. However, little is known about the regulation and function of CXCR4 in the postnatal dentate gyrus. This study investigated function and regulation of the CXCR4-receptor in neuronal precursors of the adult hippocampus and in neuronal primary cultures. In-situ-hybridization showed intensive CXCR4-mRNA-expression in numerous cells of the subgranular layer in the adult hippocampus, although little CXCR4-protein was detectable there. This striking mismatch between intense CXCR4 mRNA and limited CXCR4 protein expression developed during the postnatal maturation of the hippocampus simultaneously with a distinct upregulation of SDF-1-expression in the granule cells. This suggested that a high local SDF-1-level caused activation and subsequent downregulation of the CXCR4-receptor in subgranular layer neurons. This hypothesis was corroborated by the finding that a chronic blockade of the CXCR4-receptor by intracerebroventricular infusion of the antagonist AMD3100 induced a dramatic increase of the CXCR4-protein level and thus abolished the described mismatch between receptor mRNA and receptor protein. On this background, the mechanisms of CXCR4-regulation were analyzed in detail in primary cultures out of the embryonic hippocampus. SDF-1-stimulation induced effective internalization of the CXCR4-receptor. Sustained receptor activation lead to a desensitization of CXCR4-signalling and caused a progressive degradation of the CXCR4 protein. The antagonist AMD3100 inhibited activation, internalization and degradation of the receptor. These results suggest that the low CXCR4 protein level in the hippocampal subgranular layer which was increased by AMD3100 does reflect a tonic activation of the receptor. Infusion of AMD3100 also facilitated detection of CXCR4 protein in bromodeoxyuridine-, nestin-, and doublecortin-labeled cells and showed that the vast majority of adult-born granule cells transiently expressed CXCR4. Chronic AMD3100 administration impaired formation of new granule cells as well as neurogenesis-dependent long-term recognition of novel objects. Therefore, these findings suggest that tonic activation of CXCR4 in newly formed granule cells by endogenous SDF-1 is essential for the survival and functional integration of new granule cells and thus enhances neurogenesis-associated neuronal plasticity that participates in the formation of long-term memory.

Literatur

- ADAMS JC. Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J.Histochem.Cytochem.*, 40: 1457-1463, 1992.
- ALTMAN J and BAYER SA. Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J.Comp Neurol.*, 301: 325-342, 1990a.
- ALTMAN J and BAYER SA. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J.Comp Neurol.*, 301: 365-381, 1990b.
- ANDREWS NW. Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends Cell Biol.*, 10: 316-321, 2000.
- ANGERER LM, COX KH, and ANGERER RC. Demonstration of tissue-specific gene expression by in situ hybridization. *Methods Enzymol.*, 152: 649-661, 1987.
- ARAKAWA Y, BITO H, FURUYASHIKI T, TSUJI T, TAKEMOTO-KIMURA S, KIMURA K, NOZAKI K, HASHIMOTO N, and NARUMIYA S. Control of axon elongation via an SDF-1alpha/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. *J.Cell Biol.*, 161: 381-391, 2003.
- ARVIDSSON A, KOKAIA Z, and LINDVALL O. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur.J.Neurosci.*, 14: 10-18, 2001.
- BACON KB and HARRISON JK. Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. *J.Neuroimmunol.*, 104: 92-97, 2000.
- BAGGIOLINI M, DEWALD B, and MOSER B. Human chemokines: an update. *Annu.Rev.Immunol.*, 15: 675-705, 1997.
- BAGRI A, GURNEY T, HE X, ZOU YR, LITTMAN DR, TESSIER-LAVIGNE M, and PLEASURE SJ. The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. *Development*, 129: 4249-4260, 2002.
- BAJETTO A, BONAVIA R, BARBERO S, PICCIOLI P, COSTA A, FLORIO T, and SCHETTINI G. Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1. *J.Neurochem.*, 73: 2348-2357, 1999.
- BAJETTO A, BARBERO S, BONAVIA R, PICCIOLI P, PIRANI P, FLORIO T, and SCHETTINI G. Stromal cell-derived factor-1alpha induces astrocyte proliferation through the activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway. *J.Neurochem.*, 77: 1226-1236, 2001b.
- BAJETTO A, BONAVIA R, BARBERO S, FLORIO T, and SCHETTINI G. Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol.*, 22: 147-184, 2001a.
- BALABANIAN K, LAGANE B, INFANTINO S, CHOW KY, HARRIAGUE J, MOEPPS B, RENZANA-SEISDEDOS F, THELEN M, and BACHELERIE F. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J.Biol.Chem.*, 280: 35760-35766, 2005.
- BALKWILL F. The molecular and cellular biology of the chemokines. *J.Viral Hepat.*, 5: 1-14, 1998.

- BANISADR G, FONTANGES P, HAOUR F, KITABGI P, ROSTENE W, and MELIK PS. Neuroanatomical distribution of CXCR4 in adult rat brain and its localization in cholinergic and dopaminergic neurons. *Eur.J.Neurosci.*, 16: 1661-1671, 2002.
- BANISADR G, SKRZYDELSKI D, KITABGI P, ROSTENE W, and PARSADANIANTZ SM. Highly regionalized distribution of stromal cell-derived factor-1/CXCL12 in adult rat brain: constitutive expression in cholinergic, dopaminergic and vasopressinergic neurons. *Eur.J.Neurosci.*, 18: 1593-1606, 2003.
- BANISADR G, GOSSELIN RD, MECHIGHHEL P, KITABGI P, ROSTENE W, and PARSADANIANTZ SM. Highly regionalized neuronal expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in rat brain: evidence for its colocalization with neurotransmitters and neuropeptides. *J.Comp Neurol.*, 489: 275-292, 2005.
- BELLUZZI O, BENEDUSI M, ACKMAN J, and LOTURCO JJ. Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J.Neurosci.*, 23: 10411-10418, 2003.
- BERGER O, LI G, HAN SM, PAREDES M, and PLEASURE SJ. Expression of SDF-1 and CXCR4 during reorganization of the postnatal dentate gyrus. *Dev.Neurosci.*, 29: 48-58, 2007.
- BHATTACHARYYA BJ, BANISADR G, JUNG H, REN D, CRONSHAW DG, ZOU Y, and MILLER RJ. The chemokine stromal cell-derived factor-1 regulates GABAergic inputs to neural progenitors in the postnatal dentate gyrus. *J.Neurosci.*, 28: 6720-6730, 2008.
- BIEBL M, COOPER CM, WINKLER J, and KUHN HG. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci.Lett.*, 291: 17-20, 2000.
- BLEUL CC, FARZAN M, CHOE H, PAROLIN C, CLARK-LEWIS I, SODROSKI J, and SPRINGER TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, 382: 829-833, 1996.
- BONAVIA R, BAJETTO A, BARBERO S, PIRANI P, FLORIO T, and SCHETTINI G. Chemokines and their receptors in the CNS: expression of CXCL12/SDF-1 and CXCR4 and their role in astrocyte proliferation. *Toxicol.Lett.*, 139: 181-189, 2003.
- BORRELL V and MARIN O. Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. *Nat.Neurosci.*, 9: 1284-1293, 2006.
- BRANDT MD, JESSBERGER S, STEINER B, KRONENBERG G, REUTER K, BICK-SANDER A, VON DER BW, and KEMPERMANN G. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol.Cell Neurosci.*, 24: 603-613, 2003.
- BROXMEYER HE, KIM CH, COOPER SH, HANGOC G, HROMAS R, and PELUS LM. Effects of CC, CXC, C, and CX3C chemokines on proliferation of myeloid progenitor cells, and insights into SDF-1-induced chemotaxis of progenitors. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 872: 142-162, 1999.
- BROXMEYER HE and KIM CH. Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activities. *Exp.Hematol.*, 27: 1113-1123, 1999.
- BROXMEYER HE. Chemokines in hematopoiesis. *Curr.Opin.Hematol.*, 15: 49-58, 2008.
- BRUEL-JUNGERMAN E, LAROCHE S, and RAMPON C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur.J.Neurosci.*, 21: 513-521, 2005.
- BURNS JM, SUMMERS BC, WANG Y, MELIKIAN A, BERAHOVICH R, MIAO Z, PENFOLD ME, SUNSHINE MJ, LITTMAN DR, KUO CJ, WEI K, MCMASTER BE, WRIGHT K, HOWARD MC,

- and SCHALL TJ. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J.Exp.Med.*, 203: 2201-2213, 2006.
- CAMERON HA and MCKAY RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J.Comp Neurol.*, 435: 406-417, 2001.
- CARLEN M, CASSIDY RM, BRISMAR H, SMITH GA, ENQUIST LW, and FRISEN J. Functional integration of adult-born neurons. *Curr.Biol.*, 12: 606-608, 2002.
- CHALASANI SH, SABELKO KA, SUNSHINE MJ, LITTMAN DR, and RAPER JA. A chemokine, SDF-1, reduces the effectiveness of multiple axonal repellents and is required for normal axon pathfinding. *J.Neurosci.*, 23: 1360-1371, 2003.
- CHALASANI SH, BARIBAUD F, COUGHLAN CM, SUNSHINE MJ, LEE VM, DOMS RW, LITTMAN DR, and RAPER JA. The chemokine stromal cell-derived factor-1 promotes the survival of embryonic retinal ganglion cells. *J.Neurosci.*, 23: 4601-4612, 2003.
- CLORE GM and GRONENBORN AM. Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines. *FASEB J.*, 9: 57-62, 1995.
- COUILLARD-DESPRES S, WINNER B, KARL C, LINDEMANN G, SCHMID P, AIGNER R, LAEMKE J, BOGDHANN U, WINKLER J, BISCHOFBERGER J, and AIGNER L. Targeted transgene expression in neuronal precursors: watching young neurons in the old brain. *Eur.J.Neurosci.*, 24: 1535-1545, 2006.
- DATTA SR, BRUNET A, and GREENBERG ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.*, 13: 2905-2927, 1999.
- DE LA LUZ SM, YANG F, NARAZAKI M, SALVUCCI O, DAVIS D, YARCHOAN R, ZHANG HH, FALES H, and TOSATO G. Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood*, 103: 2452-2459, 2004.
- DELEZAY O, KOCH N, YAHYI N, HAMMACHE D, TOURRES C, TAMALET C, and FANTINI J. Co-expression of CXCR4/fusin and galactosylceramide in the human intestinal epithelial cell line HT-29. *AIDS*, 11: 1311-1318, 1997.
- DOBROSSY MD, DRAPEAU E, AUROUSSEAU C, LE MM, PIAZZA PV, and ABROUS DN. Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol.Psychiatry*, 8: 974-982, 2003.
- DOETSCH F and HEN R. Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 15: 121-128, 2005.
- DOITSIDOU M, REICHMAN-FRIED M, STEBLER J, KOPRUNNER M, DORRIES J, MEYER D, ESGUERRA CV, LEUNG T, and RAZ E. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell*, 111: 647-659, 2002.
- DRAPEAU E, MAYO W, AUROUSSEAU C, LE MM, PIAZZA PV, and ABROUS DN. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100: 14385-14390, 2003.
- ECKENHOFF MF and RAKIC P. Radial organization of the hippocampal dentate gyrus: a Golgi, ultrastructural, and immunocytochemical analysis in the developing rhesus monkey. *J.Comp Neurol.*, 223: 1-21, 1984.
- EHNINGER D and KEMPERMANN G. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.*, 331: 243-250, 2008.

- EISCH AJ, BARROT M, SCHAD CA, SELF DW, and NESTLER EJ. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97: 7579-7584, 2000.
- ENGEL M, HOFFMANN T, WAGNER L, WERMANN M, HEISER U, KIEFERSAUER R, HUBER R, BODE W, DEMUTH HU, and BRANDSTETTER H. The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100: 5063-5068, 2003.
- ERIKSSON PS, PERFILIEVA E, BJORK-ERIKSSON T, ALBORN AM, NORDBORG C, PETERSON DA, and GAGE FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat.Med.*, 4: 1313-1317, 1998.
- FAN Y, LIU Z, WEINSTEIN PR, FIKE JR, and LIU J. Environmental enrichment enhances neurogenesis and improves functional outcome after cranial irradiation. *Eur.J.Neurosci.*, 25: 38-46, 2007.
- FARRANT M and NUSSER Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat.Rev.Neurosci.*, 6: 215-229, 2005.
- FEDERSPIEL B, MELHADO IG, DUNCAN AM, DELANEY A, SCHAPPERT K, CLARK-LEWIS I, and JIRIK FR. 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, 1993.
- FILIPPOV V, KRONENBERG G, PIVNEVA T, REUTER K, STEINER B, WANG LP, YAMAGUCHI M, KETTENMANN H, and KEMPERMANN G. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol.Cell Neurosci.*, 23: 373-382, 2003.
- FORSTER R, KREMMER E, SCHUBEL A, BREITFELD D, KLEINSCHMIDT A, NERL C, BERNHARDT G, and LIPP M. Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *J.Immunol.*, 160: 1522-1531, 1998.
- FOXMAN EF, CAMPBELL JJ, and BUTCHER EC. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J.Cell Biol.*, 139: 1349-1360, 1997.
- FREUND TF and BUZSAKI G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6: 347-470, 1996.
- FUKUDA S, KATO F, TOZUKA Y, YAMAGUCHI M, MIYAMOTO Y, and HISATSUNE T. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J.Neurosci.*, 23: 9357-9366, 2003.
- GE S, GOH EL, SAILOR KA, KITABATAKE Y, MING GL, and SONG H. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439: 589-593, 2006.
- GERBER SH and SUDHOF TC. Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes*, 51 Suppl 1: S3-11, 2002.
- GILLITZER R and GOEBELER M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J.Leukoc.Biol.*, 69: 513-521, 2001.
- GLEICHMANN M, GILLEN C, CZARDYBON M, BOSSE F, GREINER-PETTER R, AUER J, and MULLER HW. 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, 2000.
- GLYKYS J and MODY I. The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus. *J.Physiol*, 582: 1163-1178, 2007.

- GOULD E, BEYLIN A, TANAPAT P, REEVES A, and SHORS TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat.Neurosci.*, 2: 260-265, 1999.
- GOZANSKY EK, LOUIS JM, CAFFREY M, and CLORE GM. Mapping the binding of the N-terminal extracellular tail of the CXCR4 receptor to stromal cell-derived factor-1alpha. *J.Mol.Biol.*, 345: 651-658, 2005.
- GRIFFITHS GM. Secretory lysosomes - a special mechanism of regulated secretion in haemopoietic cells. *Trends Cell Biol.*, 6: 329-332, 1996.
- GUNN MD, NGO VN, ANSEL KM, EKLAND EH, CYSTER JG, and WILLIAMS LT. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature*, 391: 799-803, 1998.
- GUPTA SK, LYSKO PG, PILLARISSETTI K, OHLSTEIN E, and STADEL JM. Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J.Biol.Chem.*, 273: 4282-4287, 1998.
- GUYON A, BANISADR G, ROVERE C, CERVANTES A, KITABGI P, MELIK-PARSADANIANTZ S, and NAHON JL. Complex effects of stromal cell-derived factor-1 alpha on melanin-concentrating hormone neuron excitability. *Eur.J.Neurosci.*, 21: 701-710, 2005.
- GUYON A and NAHON JL. Multiple actions of the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha on neuronal activity. *J.Mol.Endocrinol.*, 38: 365-376, 2007.
- HARBURG GC, HALL FS, HARRIST AV, SORA I, UHL GR, and EISCH AJ. Knockout of the mu opioid receptor enhances the survival of adult-generated hippocampal granule cell neurons. *Neuroscience*, 144: 77-87, 2007.
- HARIBABU B, RICHARDSON RM, FISHER I, SOZZANI S, PEIPER SC, HORUK R, ALI H, and SNYDERMAN R. Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *J.Biol.Chem.*, 272: 28726-28731, 1997.
- HARTFUSS E, GALLI R, HEINS N, and GOTZ M. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev.Biol.*, 229: 15-30, 2001.
- HASEGAWA H and FUJITA S. Chemokines and lymphocytes: the role of chemokines and their receptors in the immune system. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)*, 47: 599-607, 2001.
- HATSE S, PRINCEN K, BRIDGER G, DE CE, and SCHOLS D. Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett.*, 527: 255-262, 2002.
- HEESEN M, BERMAN MA, HOPKEN UE, GERARD NP, and DORF ME. Alternate splicing of mouse fusin/CXC chemokine receptor-4: stromal cell-derived factor-1alpha is a ligand for both CXC chemokine receptor-4 isoforms. *J.Immunol.*, 158: 3561-3564, 1997.
- HERNANDEZ PA, GORLIN RJ, LUKENS JN, TANIUCHI S, BOHINJEC J, FRANCOIS F, KLOTMAN ME, and DIAZ GA. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat.Genet.*, 34: 70-74, 2003.
- HILDEBRANDT M and SCHABATH R. SDF-1 (CXCL12) in haematopoiesis and leukaemia: impact of DPP IV/CD26. *Front Biosci.*, 13: 1774-1779, 2008.
- HILL WD, HESS DC, MARTIN-STUDDARD A, CAROTHERS JJ, ZHENG J, HALE D, MAEDA M, FAGAN SC, CARROLL JE, and CONWAY SJ. SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, 63: 84-96, 2004.

- HOLMES WE, LEE J, KUANG WJ, RICE GC, and WOOD WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*, 253: 1278-1280, 1991.
- HORUK R, MARTIN AW, WANG Z, SCHWEITZER L, GERASSIMIDES A, GUO H, LU Z, HESSELGESSER J, PEREZ HD, KIM J, PARKER J, HADLEY TJ, and PEIPER SC. Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system. *J.Immunol.*, 158: 2882-2890, 1997.
- JAGASIA R, SONG H, GAGE FH, and LIE DC. New regulators in adult neurogenesis and their potential role for repair. *Trends Mol.Med.*, 12: 400-405, 2006.
- JESSBERGER S, ROMER B, BABU H, and KEMPERMANN G. Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells. *Exp.Neurol.*, 196: 342-351, 2005.
- KEMPERMANN G, KUHN HG, and GAGE FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386: 493-495, 1997.
- KEMPERMANN G, BRANDON EP, and GAGE FH. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr.Biol.*, 8: 939-942, 1998.
- KEMPERMANN G. Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J.Neurosci.*, 22: 635-638, 2002.
- KEMPERMANN G and GAGE FH. Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *Eur.J.Neurosci.*, 16: 129-136, 2002.
- KEMPERMANN G, GAST D, KRONENBERG G, YAMAGUCHI M, and GAGE FH. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*, 130: 391-399, 2003.
- KEMPERMANN G, JESSBERGER S, STEINER B, and KRONENBERG G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.*, 27: 447-452, 2004.
- KLEIN RS, WILLIAMS KC, VAREZ-HERNANDEZ X, WESTMORELAND S, FORCE T, LACKNER AA, and LUSTER AD. Chemokine receptor expression and signaling in macaque and human fetal neurons and astrocytes: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *J.Immunol.*, 163: 1636-1646, 1999.
- KLEIN RS, RUBIN JB, GIBSON HD, DEHAAN EN, VAREZ-HERNANDEZ X, SEGAL RA, and LUSTER AD. SDF-1 alpha induces chemotaxis and enhances Sonic hedgehog-induced proliferation of cerebellar granule cells. *Development*, 128: 1971-1981, 2001.
- KOŁODZIEJ A, STUMM R, BECKER A, and HOLLT V. Endogenous opioids inhibit ischemia-induced generation of immature hippocampal neurons via the mu-opioid receptor. *Eur.J.Neurosci.*, 27: 1311-1319, 2008a.
- KOŁODZIEJ A, SCHULZ S, GUYON A, WU DF, PFEIFFER M, ODEMIS V, HOLLT V, and STUMM R. Tonic activation of CXC chemokine receptor 4 in immature granule cells supports neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J.Neurosci.*, 28: 4488-4500, 2008b.
- KOMITOVA M, MATTSSON B, JOHANSSON BB, and ERIKSSON PS. Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke*, 36: 1278-1282, 2005.

- KRONENBERG G, REUTER K, STEINER B, BRANDT MD, JESSBERGER S, YAMAGUCHI M, and KEMPERMANN G. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J.Comp Neurol.*, 467: 455-463, 2003.
- KUHN HG, CKINSON-ANSON H, and GAGE FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J.Neurosci.*, 16: 2027-2033, 1996.
- KUHN HG, BIEBL M, WILHELM D, LI M, FRIEDLANDER RM, and WINKLER J. Increased generation of granule cells in adult Bcl-2-overexpressing mice: a role for cell death during continued hippocampal neurogenesis. *Eur.J.Neurosci.*, 22: 1907-1915, 2005.
- LACY P, MAHMUDI-AZER S, BABLITZ B, HAGEN SC, VELAZQUEZ JR, MAN SF, and MOQBEL R. Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon-gamma in human eosinophils. *Blood*, 94: 23-32, 1999.
- LAZARINI F, CASANOVA P, THAM TN, DE CE, RENZANA-SEISDEDOS F, BALEUX F, and DUBOIS-DALCQ M. 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, 2000.
- LAZARINI F, THAM TN, CASANOVA P, RENZANA-SEISDEDOS F, and DUBOIS-DALCQ M. Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia*, 42: 139-148, 2003.
- LEVITT P and RAKIC P. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J.Comp Neurol.*, 193: 815-840, 1980.
- LI M and RANSOHOFF RM. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. *Prog.Neurobiol.*, 84: 116-131, 2008.
- LIEBERAM I, AGALLIU D, NAGASAWA T, ERICSON J, and JESSELL TM. A Cxcl12-CXCR4 chemokine signaling pathway defines the initial trajectory of mammalian motor axons. *Neuron*, 47: 667-679, 2005.
- LIU G, YUAN X, ZENG Z, TUNICI P, NG H, ABDULKADIR IR, LU L, IRVIN D, BLACK KL, and YU JS. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol.Cancer*, 5: 67, 2006.
- LIU Z, GENG L, LI R, HE X, ZHENG JQ, and XIE Z. Frequency modulation of synchronized Ca²⁺ spikes in cultured hippocampal networks through G-protein-coupled receptors. *J.Neurosci.*, 23: 4156-4163, 2003.
- LOETSCHER M, GEISER T, O'REILLY T, ZWAHLEN R, BAGGIOLINI M, and MOSER B. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J.Biol.Chem.*, 269: 232-237, 1994.
- LU M, GROVE EA, and MILLER RJ. Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99: 7090-7095, 2002.
- LUSKIN MB. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, 11: 173-189, 1993.
- LUSKIN MB. Neuronal cell lineage in the vertebrate central nervous system. *FASEB J.*, 8: 722-730, 1994.
- MA Q, JONES D, BORGHESANI PR, SEGAL RA, NAGASAWA T, KISHIMOTO T, BRONSON RT, and SPRINGER TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95: 9448-9453, 1998.

- MA Q, JONES D, and SPRINGER TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity.*, 10: 463-471, 1999.
- MARCHESE A and BENOVIC JL. Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J.Biol.Chem.*, 276: 45509-45512, 2001.
- MCGRATH KE, KONISKI AD, MALTBY KM, MCGANN JK, and PALIS J. Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Dev.Biol.*, 213: 442-456, 1999.
- MELLADO M, VILA-CORO AJ, MARTINEZ C, and RODRIGUEZ-FRADE JM. Receptor dimerization: a key step in chemokine signaling. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)*, 47: 575-582, 2001a.
- MELLADO M, RODRIGUEZ-FRADE JM, VILA-CORO AJ, FERNANDEZ S, MARTIN DE AA, JONES DR, TORAN JL, and MARTINEZ A. Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *EMBO J.*, 20: 2497-2507, 2001b.
- MELLADO M, RODRIGUEZ-FRADE JM, MANES S, and MARTINEZ A. Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu.Rev.Immunol.*, 19: 397-421, 2001c.
- MELTON DA, KRIEG PA, REBAGLIATI MR, MANIATIS T, ZINN K, and GREEN MR. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.*, 12: 7035-7056, 1984.
- MEUCCI O and MILLER RJ. gp120-induced neurotoxicity in hippocampal pyramidal neuron cultures: protective action of TGF-beta1. *J.Neurosci.*, 16: 4080-4088, 1996.
- MEUCCI O, FATATIS A, SIMEN AA, BUSHELL TJ, GRAY PW, and MILLER RJ. Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95: 14500-14505, 1998.
- MILLER RJ, BANISADR G, and BHATTACHARYYA BJ. CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development. *J.Neuroimmunol.*, 198: 31-38, 2008.
- MING GL and SONG H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu.Rev.Neurosci.*, 28: 223-250, 2005.
- MOORE CA, MILANO SK, and BENOVIC JL. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu.Rev.Physiol*, 69: 451-482, 2007.
- MOSER B, WOLF M, WALZ A, and LOETSCHER P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.*, 25: 75-84, 2004.
- MURPHY PM, BAGGIOLINI M, CHARO IF, HEBERT CA, HORUK R, MATSUSHIMA K, MILLER LH, OPPENHEIM JJ, and POWER CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol.Rev.*, 52: 145-176, 2000.
- MURPHY PM. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol.Rev.*, 54: 227-229, 2002.
- MÜLLER G and LIPP M. Shaping up adaptive immunity: the impact of CCR7 and CXCR5 on lymphocyte trafficking. *Microcirculation.*, 10: 325-334, 2003.
- NAGASAWA T, KIKUTANI H, and KISHIMOTO T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 91: 2305-2309, 1994.

- NAGASAWA T, HIROTA S, TACHIBANA K, TAKAKURA N, NISHIKAWA S, KITAMURA Y, YOSHIDA N, KIKUTANI H, and KISHIMOTO T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 382: 635-638, 1996.
- NEOTE K, DIGREGORIO D, MAK JY, HORUK R, and SCHALL TJ. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell*, 72: 415-425, 1993.
- OBERLIN E, AMARA A, BACHELERIE F, BESSIA C, VIRELIZIER JL, RENZANA-SEISDEDOS F, SCHWARTZ O, HEARD JM, CLARK-LEWIS I, LEGLER DF, LOETSCHER M, BAGGIOLINI M, and MOSER B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, 382: 833-835, 1996.
- ODEMIS V, LAMP E, PEZESHKI G, MOEPPS B, SCHILLING K, GIERSCHIK P, LITTMAN DR, and ENGELE J. Mice deficient in the chemokine receptor CXCR4 exhibit impaired limb innervation and myogenesis. *Mol.Cell Neurosci.*, 30: 494-505, 2005.
- OWENS DF and KRIEGSTEIN AR. Developmental neurotransmitters? *Neuron*, 36: 989-991, 2002.
- PAREDES MF, LI G, BERGER O, BARABAN SC, and PLEASURE SJ. Stromal-derived factor-1 (CXCL12) regulates laminar position of Cajal-Retzius cells in normal and dysplastic brains. *J.Neurosci.*, 26: 9404-9412, 2006.
- PATEL JP, SENGUPTA R, BARDI G, KHAN MZ, MULLEN-PRZEWORSKI A, and MEUCCI O. Modulation of neuronal CXCR4 by the micro-opioid agonist DAMGO. *J.Neurovirol.*, 12: 492-500, 2006.
- PELUS LM, HOROWITZ D, COOPER SC, and KING AG. Peripheral blood stem cell mobilization. A role for CXC chemokines. *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, 43: 257-275, 2002.
- PENG H, KOLB R, KENNEDY JE, and ZHENG J. Differential expression of CXCL12 and CXCR4 during human fetal neural progenitor cell differentiation. *J.Neuroimmune.Pharmacol.*, 2: 251-258, 2007.
- PFEIFFER M, KIRSCHT S, STUMM R, KOCH T, WU D, LAUGSCH M, SCHRODER H, HOLLT V, and SCHULZ S. Heterodimerization of substance P and mu-opioid receptors regulates receptor trafficking and resensitization. *J.Biol.Chem.*, 278: 51630-51637, 2003.
- PICARD-RIERA N, NAIT-OUESMAR B, and BARON-VAN EA. Endogenous adult neural stem cells: limits and potential to repair the injured central nervous system. *J.Neurosci.Res.*, 76: 223-231, 2004.
- PUJOL F, KITABGI P, and BOUDIN H. The chemokine SDF-1 differentially regulates axonal elongation and branching in hippocampal neurons. *J.Cell Sci.*, 118: 1071-1080, 2005.
- RAGOZZINO D, RENZI M, GIOVANNELLI A, and EUSEBI F. Stimulation of chemokine CXC receptor 4 induces synaptic depression of evoked parallel fibers inputs onto Purkinje neurons in mouse cerebellum. *J.Neuroimmunol.*, 127: 30-36, 2002.
- RATAJCZAK MZ, ZUBA-SURMA E, KUCIA M, RECA R, WOJAKOWSKI W, and RATAJCZAK J. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*, 20: 1915-1924, 2006.
- REISS K, MENTLEIN R, SIEVERS J, and HARTMANN D. Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer. *Neuroscience*, 115: 295-305, 2002.
- REYNOLDS BA and WEISS S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255: 1707-1710, 1992.

- RICHARDS LJ, KILPATRICK TJ, and BARTLETT PF. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 89: 8591-8595, 1992.
- RODRIGUEZ-FRADE JM, VILA-CORO AJ, DE ANA AM, ALBAR JP, MARTINEZ A, and MELLADO M. The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96: 3628-3633, 1999.
- ROSSI D and ZLOTNIK A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu.Rev.Immunol.*, 18: 217-242, 2000.
- SALCEDO R, WASSERMAN K, YOUNG HA, GRIMM MC, HOWARD OM, ANVER MR, KLEINMAN HK, MURPHY WJ, and OPPENHEIM JJ. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am.J.Pathol.*, 154: 1125-1135, 1999.
- SALCEDO R and OPPENHEIM JJ. Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation.*, 10: 359-370, 2003.
- SAXE MD, BATTAGLIA F, WANG JW, MALLERET G, DAVID DJ, MONCKTON JE, GARCIA AD, SOFRONIEW MV, KANDEL ER, SANTARELLI L, HEN R, and DREW MR. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 103: 17501-17506, 2006.
- SCHMIDT-HIEBER C, JONAS P, and BISCHOFBERGER J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 429: 184-187, 2004.
- SCHOLS D, STRUYF S, VAN DJ, ESTE JA, HENSON G, and DE CE. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J.Exp.Med.*, 186: 1383-1388, 1997.
- SCHULLER U, KOCH A, HARTMANN W, GARRE ML, GOODYER CG, CAMA A, SORENSEN N, WIESTLER OD, and PIETSCH T. Subtype-specific expression and genetic alterations of the chemokinereceptor gene CXCR4 in medulloblastomas. *Int.J.Cancer*, 117: 82-89, 2005.
- SEHGAL A, KEENER C, BOYNTON AL, WARRICK J, and MURPHY GP. CXCR-4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells. *J.Surg.Oncol.*, 69: 99-104, 1998.
- SEHGAL A, RICKS S, BOYNTON AL, WARRICK J, and MURPHY GP. Molecular characterization of CXCR-4: a potential brain tumor-associated gene. *J.Surg.Oncol.*, 69: 239-248, 1998.
- SEIGERS R, SCHAGEN SB, BEERLING W, BOOGERD W, VAN TO, VAN DAM FS, KOOLHAAS JM, and BUWALDA B. Long-lasting suppression of hippocampal cell proliferation and impaired cognitive performance by methotrexate in the rat. *Behav.Brain Res.*, 186: 168-175, 2008.
- SEKI T and ARAI Y. Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci.Res.*, 17: 265-290, 1993.
- SERI B, GARCIA-VERDUGO JM, MCEWEN BS, and VAREZ-BUYLLA A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J.Neurosci.*, 21: 7153-7160, 2001.
- SHIODA T, KATO H, OHNISHI Y, TASHIRO K, IKEGAWA M, NAKAYAMA EE, HU H, KATO A, SAKAI Y, LIU H, HONJO T, NOMOTO A, IWAMOTO A, MORIMOTO C, and NAGAI Y. 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, 1998.

- SHIROZU M, NAKANO T, INAZAWA J, TASHIRO K, TADA H, SHINOHARA T, and HONJO T. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*, 28: 495-500, 1995.
- SHORS TJ, MIESEGAES G, BEYLIN A, ZHAO M, RYDEL T, and GOULD E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, 410: 372-376, 2001.
- SNYDER JS, HONG NS, MCDONALD RJ, and WOJTOWICZ JM. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience*, 130: 843-852, 2005.
- STUMM R, CULMSEE C, SCHAFER MK, KRIEGLSTEIN J, and WEIHE E. Adaptive plasticity in tachykinin and tachykinin receptor expression after focal cerebral ischemia is differentially linked to gabaergic and glutamatergic cerebrocortical circuits and cerebrovenular endothelium. *J.Neurosci.*, 21: 798-811, 2001.
- STUMM R and HOLLT V. CXC chemokine receptor 4 regulates neuronal migration and axonal pathfinding in the developing nervous system: implications for neuronal regeneration in the adult brain. *J.Mol.Endocrinol.*, 38: 377-382, 2007.
- STUMM R, KOLODZIEJ A, SCHULZ S, KOHTZ JD, and HOLLT V. Patterns of SDF-1alpha and SDF-1gamma mRNAs, migration pathways, and phenotypes of CXCR4-expressing neurons in the developing rat telencephalon. *J.Comp Neurol.*, 502: 382-399, 2007.
- STUMM RK, RUMMEL J, JUNKER V, CULMSEE C, PFEIFFER M, KRIEGLSTEIN J, HOLLT V, and SCHULZ S. A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. *J.Neurosci.*, 22: 5865-5878, 2002.
- STUMM RK, ZHOU C, ARA T, LAZARINI F, DUBOIS-DALCQ M, NAGASAWA T, HOLLT V, and SCHULZ S. CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J.Neurosci.*, 23: 5123-5130, 2003.
- STUMM RK, ZHOU C, SCHULZ S, and HOLLT V. Neuronal types expressing mu- and delta-opioid receptor mRNA in the rat hippocampal formation. *J.Comp Neurol.*, 469: 107-118, 2004.
- SZEKANECZ Z and KOCH AE. Chemokines and angiogenesis. *Curr.Opin.Rheumatol.*, 13: 202-208, 2001.
- 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. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*, 393: 591-594, 1998.
- TANABE S, HEESSEN M, YOSHIZAWA I, BERMAN MA, LUO Y, BLEUL CC, SPRINGER TA, OKUDA K, GERARD N, and DORF ME. Functional expression of the CXC-chemokine receptor-4/fusin on mouse microglial cells and astrocytes. *J.Immunol.*, 159: 905-911, 1997.
- TASHIRO A, SANDLER VM, TONI N, ZHAO C, and GAGE FH. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature*, 442: 929-933, 2006.
- TASHIRO K, TADA H, HEILKER R, SHIROZU M, NAKANO T, and HONJO T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science*, 261: 600-603, 1993.
- TEKIRIAN TL. The central role of the trans-Golgi network as a gateway of the early secretory pathway: physiologic vs nonphysiologic protein transit. *Exp.Cell Res.*, 281: 9-18, 2002.

- TIVERON MC and CREMER H. CXCL12/CXCR4 signalling in neuronal cell migration. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 2008.
- TOZUKA Y, FUKUDA S, NAMBA T, SEKI T, and HISATSUNE T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, 47: 803-815, 2005.
- TRAN PB, REN D, VELDHUSE TJ, and MILLER RJ. Chemokine receptors are expressed widely by embryonic and adult neural progenitor cells. *J.Neurosci.Res.*, 76: 20-34, 2004.
- TRAN PB, BANISADR G, REN D, CHENN A, and MILLER RJ. Chemokine receptor expression by neural progenitor cells in neurogenic regions of mouse brain. *J.Comp Neurol.*, 500: 1007-1033, 2007.
- TULIPANO G, STUMM R, PFEIFFER M, KREIENKAMP HJ, HOLLT V, and SCHULZ S. Differential beta-arrestin trafficking and endosomal sorting of somatostatin receptor subtypes. *J.Biol.Chem.*, 279: 21374-21382, 2004.
- VAN PH, KEMPERMANN G, and GAGE FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat.Rev.Neurosci.*, 1: 191-198, 2000.
- VON BOHLEN UND HO. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.*, 329: 409-420, 2007.
- WANG JF, LIU ZY, and GROOPMAN JE. The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion. *Blood*, 92: 756-764, 1998.
- WINOCUR G, WOJTOWICZ JM, SEKERES M, SNYDER JS, and WANG S. Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus*, 16: 296-304, 2006.
- WOERNER BM, WARRINGTON NM, KUNG AL, PERRY A, and RUBIN JB. Widespread CXCR4 activation in astrocytomas revealed by phospho-CXCR4-specific antibodies. *Cancer Res.*, 65: 11392-11399, 2005.
- YAMAGUCHI A, TAMATANI M, MATSUZAKI H, NAMIKAWA K, KIYAMA H, VITEK MP, MITSUDA N, and TOHYAMA M. Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. *J.Biol.Chem.*, 276: 5256-5264, 2001.
- YOUNG D, LAWLOR PA, LEONE P, DRAGUNOW M, and DURING MJ. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat.Med.*, 5: 448-453, 1999.
- ZAITSEVA M, BLAUVELT A, LEE S, LAPHAM CK, KLAUS-KOVTUN V, MOSTOWSKI H, MANISCHEWITZ J, and GOLDING H. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat.Med.*, 3: 1369-1375, 1997.
- ZHANG RL, ZHANG ZG, and CHOPP M. Neurogenesis in the adult ischemic brain: generation, migration, survival, and restorative therapy. *Neuroscientist.*, 11: 408-416, 2005.
- ZHENG J, THYLIN MR, GHORPADE A, XIONG H, PERSIDSKY Y, COTTER R, NIEMANN D, CHE M, ZENG YC, GELBARD HA, SHEPARD RB, SWARTZ JM, and GENDELMAN HE. Intracellular CXCR4 signaling, neuronal apoptosis and neuropathogenic mechanisms of HIV-1-associated dementia. *J.Neuroimmunol.*, 98: 185-200, 1999.
- ZHU Y, YU T, ZHANG XC, NAGASAWA T, WU JY, and RAO Y. Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons. *Nat.Neurosci.*, 5: 719-720, 2002.

ZOU YR, KOTTMANN AH, KURODA M, TANIUCHI I, and LITTMAN DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 393: 595-599, 1998.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Volker Höllt für die Möglichkeit, die beschriebenen Untersuchungen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Ralf Stumm für die intensive Betreuung meiner Arbeit. Er hat mich mit seinem theoretischen und praktischen Know-how, mit lebhaftem Interesse und immerwährender Diskussionsbereitschaft stets unterstützt. Von ihm etablierte Methoden und Materialien standen mir zur Verfügung, und es blieb immer Handlungsspielraum für eigene Ideen. Anke Schmidt und Karina Schäfer danke ich für die vielfältigen technischen Anleitungen im Labor, für ihre ständige Hilfsbereitschaft und für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Ich möchte vielen weiteren Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie meinen persönlichen Dank aussprechen. Die unkomplizierte und freundliche Zusammenarbeit mit Kathrin Freke hat meine Arbeiten im Bereich des Tierlabors sehr unterstützt. Die Mitarbeiter der Abteilung Verhaltenspharmakologie, hier besonders Prof. Dr. Gisela Grecksch, PD Dr. Axel Becker, Petra Dehmel und Beate Reuter, standen mir bei den Verhaltensuntersuchungen und anderen Dingen stets mit Rat und oft auch mit Tat zur Seite. Uwe Disterheft hat mir mit seinen handwerklichen Fähigkeiten vielfach weitergeholfen. Ich danke auch allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie, die hier nicht namentlich erwähnt sind. Viele von ihnen habe ich schätzen gelernt, und für Probleme verschiedenster Art fand sich immer ein offenes Ohr und eine helfende Hand.

Ganz herzlichen Dank meiner ganzen Familie, meinen Eltern und Schwiegereltern, meinem Mann und meinen Kinder für Unterstützung, Geduld und Liebe und für die vielen großen Kleinigkeiten.