

Aus dem Institut für Hirnforschung  
der Universität Tübingen  
Direktor: Professor Dr. R. Meyermann

**Expression des axonalen Lenkungsmoleküls Netrin-1 und  
seines Rezeptors DCC im humanen fetalen Telencephalon**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Patrick Nikolaus Harter  
aus Böblingen  
2008

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. R. Meyermann
2. Berichterstatter:	Frau Professor Dr. I. Krägeloh-Mann



Inhaltsverzeichnis		Seite
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Der Neokortex	5
1.1.1	Entwicklungsschritte und Proliferation im Neokortex	5
1.1.2	Schicksalswege einer radialen Gliazelle	11
1.1.3	Migrationsprozesse neuronaler Vorläufer im Neokortex	12
1.2	Angiogenese im frühen Telencephalon	13
1.3	Axonale Lenkung	16
1.3.1	Die Geschichte der Lenkung neuronaler Ausläufer	16
1.3.2	Das Lenkungssystem: Liganden und deren Rezeptoren	20
1.3.2.1	Netrine und Rezeptoren	20
1.3.2.1.1	„Dependence“-Rezeptoren und Apoptose	25
1.3.2.1.2	Netrin-1 und Angiogenese	26
1.3.2.2	Semaphorine und Neuropiline	27
1.3.2.3	Ephrine und Eph-Rezeptoren	29
1.3.2.4	Slit/Robo System	30
1.4	Ziele der Arbeit und Fragestellung	33
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>35</b>
2.1	Fetale Gehirne	35
2.1.1	Definition der Normalhirnproben	35
2.1.2	Neuropathologische Begutachtung	36
2.1.3	Gehirnregionen	37
2.2	Auswahl einer adulten Normalhirngruppe	37
2.2.1	Das adulte Normalhirn	37
2.2.2	Klinische Daten	38
2.2.3	Gehirnregionen	38
2.3	Anfertigung der histologischen Präparate	39
2.4	Immunhistochemie	39

2.4.1	Die Antikörper	39
2.4.1.1	DCC	40
2.4.1.2	Netrin-1	40
2.4.1.3	Ki-67	40
2.4.2	Das Prinzip der Streptavidin-Biotin-Methode als Detektionssystem	40
2.4.3	Automatisierte Immunhistochemie	41
2.4.3.1	Protokoll für das automatisierte Färbeverfahren	41
2.4.4	Manuelle Färbeverfahren	42
2.4.5	Kontrollen	43
2.5	Lichtmikroskopische Auszählung und Auswertung	43
2.6	Statistische Methoden	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen	45
3.1.1	Proliferation im fetalen Großhirn	45
3.1.1.1	Proliferation in den fetalen Rindenschichten	45
3.1.1.2	Proliferation in den übrigen fetalen Großhirnregionen	50
3.1.1.3	Altersbezogene Proliferation	51
3.1.2	DCC-Expression im fetalen Großhirn	54
3.1.2.1	DCC-Expression in den fetalen Rindenschichten	55
3.1.2.2	DCC-Expression in den übrigen fetalen Großhirnregionen	59
3.1.2.3	Fetales Alter und DCC-Expression	59
3.1.3	Netrin-1-Expression im fetalen Großhirn	67
3.1.3.1	Netrin-1-Expression in den fetalen Rindenschichten	67
3.1.3.2	Netrin-1-Expression in den übrigen fetalen Großhirnregionen	71
3.1.3.3	Fetales Alter und Netrin-1-Expression	71

3.1.4	Vergleich der Expressionsmuster von DCC und Netrin-1 in verschiedenen Regionen des fetalen Großhirns	78
3.1.5	Vergleich der Expressionsmuster von DCC und MIB-1 in verschiedenen Regionen des fetalen Großhirns	80
3.1.6	Vergleich der Expressionsmuster von Netrin-1 und MIB-1 in verschiedenen Regionen des fetalen Großhirns	81
3.1.7	Das Expressionsmuster in Mark und Rinde für DCC und Netrin-1 im adulten Gehirn	81
3.2	Auswertung der Kontrollschnitte	86
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>87</b>
4.1	Proliferation im fetalen Großhirn	87
4.1.1	DCC- und Netrin-1-Expression in zellteilungsreichen fetalen Großhirnbezirken	90
4.2	Migrationsprozesse im fetalen Großhirn	91
4.2.1	Radiale Migration im fetalen Großhirn	91
4.2.2	Tangentiale Migration im fetalen Großhirn	94
4.3	Axonale Lenkung im fetalen Großhirn	96
4.4	Expression von DCC, Netrin-1 und Ki-67 in fetalen Gefäßen	98
4.5	Expression von DCC und Netrin-1 in fetalen und adulten Neuronen	101
4.6	Schlussfolgerung	102
4.7	Ausblick	104
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>109</b>

---

7	Anhang		<b>123</b>
	7.1	Abkürzungen	123
	7.2	Danksagungen	124
	7.3	Lebenslauf	125

## **1 Einleitung**

Auf der Suche nach potentiellen Lenkungsmolekülen für axonale Ausläufer stiessen T. Serafini und M. Tessier-Lavigne im Hühnchenembryo auf die Gruppe der Netrine (Serafini et al. 1994). Ihr wohl berühmtester Vertreter, das Netrin-1-Protein, zeigte dabei attraktive Lenkungseigenschaften auf kreuzende Nervenfasern der Grundplatte im Rückenmark.

Mit DCC („deleted in colorectal cancer“) fand sich etwas später ein Kandidat für einen Netrin-1-Rezeptor, über den Netrin-1 seine anziehende Wirkung auf auswachsende Nervenfasern entfalten konnte (Keino-Masu et al. 1996).

Doch nicht nur die Tatsache, dass DCC und Netrin-1, das einzige attraktive Ligand-Rezeptor-Paar unter den mittlerweile zahlreichen bekannten axonalen Lenkungsfaktoren darstellen, macht sie zu einem interessanten Gegenstand aktueller Forschung, vielmehr erscheint das zunächst axonale Lenkungssystem nun zu einem multimodalen Steuerungselement zu avancieren, dass sowohl Proliferations- und Apoptoseprozesse (Mehlen et al. 1998, Mazelin et al. 2004), als auch die Migration von neuronalen Vorläuferzellen (Alcantara et al. 2000) und die Angiogenese beeinflusst (Park et al. 2004, Wilson et al. 2006).

Die Entwicklung des menschlichen Großhirns beansprucht gerade diese Funktionen, um das wohl komplexeste Organsystem ausbilden zu können. Von der epithelialen Anlage der Neuralplatte, deren Aufrichtung zum Neuralrohr, über die Migration neuronaler Vorläuferzellen, die teilweise transiente Rindenschichten bilden, bis hin zur adulten Großhirnrinde und den langen axonalen Bahnen, die die Basalganglien durchkreuzen.

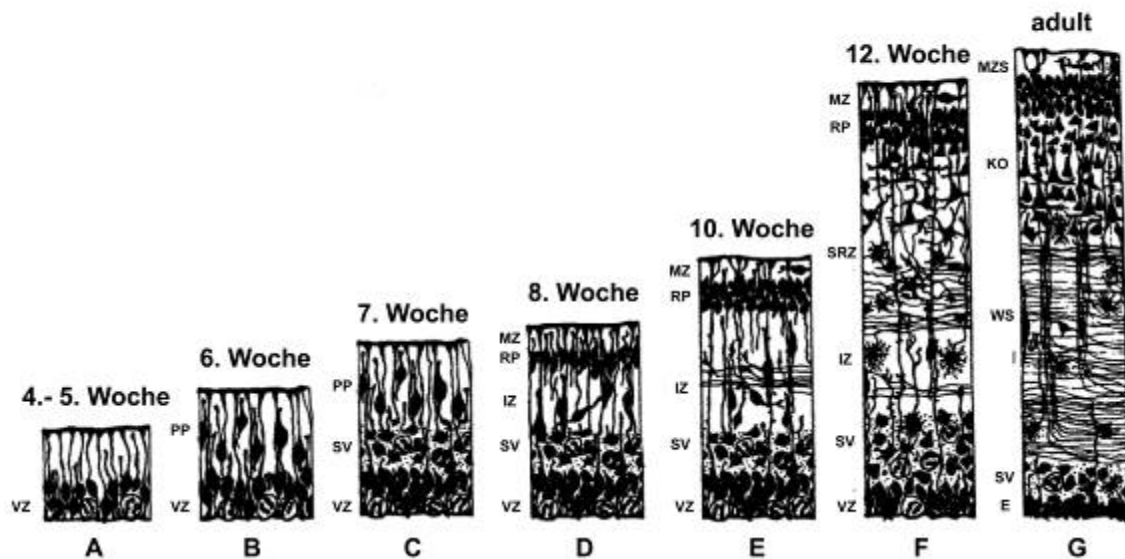
### **1.1 Der Neokortex**

#### **1.1.1 Entwicklungsschritte und Proliferation im Neokortex**

Zellproliferation konnte im Neokortex menschlicher Embryonen bereits in der sechsten Schwangerschaftswoche im Bereich der Ventrikulärzone belegt werden (Choi 1988, Mollgard und Schumacher 1993, Zecevic 1993). Beschreibt man nun diese Ventrikulärzone, so stellt man fest, dass sie aus mehrschichtig erscheinenden, radiär angeordneten Zellen mit lang gestreckten Zytoplasmaausläufern besteht (siehe Abbildung 1). Interessanterweise vollzieht



der Kern dieser Zellen im Laufe seines Zellzyklus eine Wanderung innerhalb dieser Ventrikulärzone. In der S-Phase, DNA-Replikationsphase, befindet sich der Kern im äußeren, das heißt oberflächennahem Drittel, wohingegen er in der G<sub>2</sub>-Phase wieder gen Lumen sinkt, wo er dann eine mitotische Teilung erfährt (Chenn und McConnell 1995). Postmitotische Kerne bewegen sich in Richtung Oberfläche, um entweder wieder in den Proliferationszyklus einzutreten oder um die Ventrikulärzone endgültig verlassen zu können um eine Differenzierungslaufbahn einzuschlagen (Levitt et al. 1983). Die Ventrikulärzone wird nicht ausschließlich von neuronalen Vorläuferzellen gebildet, vielmehr ist sie Aufenthaltsort der Zellkerne so genannter radiärer Glia. Hauptaufgabe dieser Zellen scheint eine wegweisende Funktion für auswandernde neuronale Zellen zu sein (Rakic 1978, Rakic 2003). Sie soll jedoch auch selbst befähigt sein, neuronale Vorläufer bzw. Neurone mittels Mitose hervorzubringen (Noctor et al. 2001). Somit dienen sie also ihrer eigenen Nachkommenschaft als Strickleiter. Radiäre Gliazellen sind während der gesamten Proliferationszeit in der Ventrikulärzone mitotisch aktiv. Zusätzlich zur Ventrikulärzone, zeigt sich ab der 7. Schwangerschaftswoche mit der Subventrikulärzone eine weitere proliferativ aktive Schicht, die aus lockeren Zellverbänden besteht, deren Kerne jedoch während des Zellzyklus keine Wanderungen unternehmen (Mollgard und Schumacher 1993, Zecevic 1993). Die Zellen der Subventrikulärzone haben weder Kontakt zur pialen noch zur ventrikulären Oberfläche. Sie gilt als Bildungsstätte neuronaler und glialer Zellen (Letinic et al. 2002) (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Schematische Illustration der neokortikalen Entwicklung: Ventrikulärzone (VZ), Subventrikulärzone (SV), „Preplate“ (PP) (Valverde et al. 1995; auch als „primordiale plexiforme Schicht“ bezeichnet (Marin-Padilla 1998), Intermediärzone (IZ), Rindenplatte (RP), Marginalzone (MZ), Sekundäre Rindenzone (SRZ), E (Ependym), weiße Substanz (WS), Kortex (KO) und Molekularzellschicht (MZS). (Modifiziert nach Chan et al. 2002)

In den Schwangerschaftswochen 7-8 tritt die Rindenplatte in Erscheinung und liegt nun zwischen Marginalzone und Intermediärzone, deren oberflächlicher, zellärmerer Teil sich zur sekundären Rindenzone ausbildet (Choi 1988; Zecevic 1993) (Abbildung 1). Die nächsten Wochen sind vom Größenwachstum und der Verdichtung der Rindenplatte gekennzeichnet (Choi 1988). Auch die Ventrikulärzone nimmt an Breite zu (Mollgard und Schumacher 1993), was dafür spricht, dass sich wohl mehr Zellen im Proliferationszyklus befinden, als auf dem Weg zur pialen Oberfläche. Die höchste Rate an Proliferation findet sich im menschlichen Neokortex in der 12. Schwangerschaftswoche (Simonati et al. 1999). In den Bereichen der Intermediärzone, sowie in der Sekundären Rindenzone findet sich bis zu dieser Zeit kaum immunhistochemisch detektierbare Proliferationsaktivität (Mollgard und Schumacher 1993, Simonati

et al. 1999). Die Breite und das Volumen der Ventrikulärzone nehmen nun immer weiter ab, die Proliferationsrate in den Keimzonen sinkt (Simonati et al. 1999). Es ist nun die Zeit gekommen in der die Migration die Oberhand über die Proliferation gewinnt.

Zahlreiche Faktoren treiben den Prozess der Migration voran. Der „brain derived neurotrophic factor“, kurz BDNF, sowie das Protein NT4 aus der Neurotrophinfamilie sind befähigt über den gemeinsamen Rezeptor TrkB im Rahmen eines so genannten „chemotaxis assays“ neuronale Vorläuferzellen der Ratte zur gerichteten Migration zu bringen (Behar et al. 1997). Auch Neurotransmitter wie die Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) oder Glutamat über den N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA) scheinen eine migrationsfördernde Funktion in den Proliferationszonen des Großhirns zu erfüllen (Behar et al. 1999, Behar et al. 2000). Es zeigen sich hier jedoch speziesspezifische Unterschiede im Maus- und Rattenmodell bezüglich der Potenz Migrationsprozesse voranzutreiben (Behar et al. 1999). Mäuse, deren Gen für den „epidermal growth factor receptor“ (EGFR) durch ein „Null Allel“ ersetzt wurde, zeigten übermäßige Anhäufungen von Vorläuferzellen in den Proliferationszonen, was manche Autoren als Migrationsdefekt deuten (Threadgill et al. 1995, Marin und Rubenstein 2003).

Es bleibt weiter offen, ob es sich beim Überwiegen der Migration in den Keimzonen dieses Entwicklungsstadiums um einen reinen Prozess gesteigerter Auswanderung handelt, oder ob ein Proliferationsstop bei zunehmender Differenzierung stattfindet.

Überraschenderweise kommt es nach der 16. Schwangerschaftswoche in den Bereichen der Intermediärzone und Sekundären Rindenzonen zu einem kleinen Anstieg der Proliferation (Kendler und Golden 1996, Simonati et al. 1999).

Bis zur 24. Schwangerschaftswoche sind das Volumen und die Aktivität der Keimzonen auf ein Minimum gesunken und es bleiben nur noch einige wenige Reihen von verstreut liegenden Keimzellen zu beobachten (Simonati et al. 1999). In Doppelfärbeexperimenten am fetalen Mäusegroßhirn mit GFAP und Vimentin, einem mesenchyalem Marker, sowie PCNA oder BrdU

(Bromdeoxyuridin) als Proliferationsmarker konnte gezeigt werden, dass Zellen, die sich im Bereich der Keimzonen im Proliferationszyklus befanden, parallel dazu die beiden Gliazellmarker in ihren Zytoplasmata trugen (Gates et al. 1995). Die Neurogenese scheint reduziert. Betrachtet man nun weiter die Rolle der Intermediärzone und Sekundären Rindenzone stellt man fest, dass dort bis zur 20. SSW kaum proliferative Aktivität herrscht, sondern erst in den Schwangerschaftswochen 23-25 kommt es zu einem beachtlichen Anstieg, der dann zwischen SSW 30-37 wieder zu versiegen beginnt (Kendler und Golden 1996). Untersuchungen zeigten, dass viele dieser proliferativ aktiven Zellen in Intermediärzone und sekundärer Rindenzone zur glialen Zelllinie gehören (Kendler und Golden 1996). Nichtsdestotrotz löst sich die Sekundäre Rindenzone gegen Ende der fetalen Periode wieder auf (Kostovic und Rakic 1990). Einige Neurone der Sekundären Rindenzone sollen jedoch bis zum Entwicklungsstand des erwachsenen menschlichen Gehirns als interstitielle Neurone im Bereich der weißen Substanz nachweisbar bleiben, teilweise liegen diese an der Grenze zwischen Schicht VI und der weißen Substanz (Kostovic und Rakic 1990). Im Großhirn der Maus sollen sich neuronale Zellen der Intermediärzone in einer Art „stand-by“-Bereitschaft befinden um dann bei Bedarf in den Proliferationszyklus einzutreten, um den Zellpool der Neurone zu vergrößern (Takahashi et al. 1995). Die Subventrikulärzone verschwindet perinatal fast vollständig. Trotzdem bleibt ein mitotisch aktiver Überrest bis ins reife Großhirn bestehen (Goldman 1998, Bernier et al. 2000). Diese Zellen sind Stammzellen, die sich in gliale oder neuronale Zellen entwickeln können (Goldman 1998) und somit potentiell therapeutisch als Transplantate bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen einsetzbar sind (Alvarez-Buylla et al. 2000).

Während der gesamten pränatalen Periode ist proliferative Aktivität im Bereich der Rindenplatte nicht vorhanden (Simonati et al. 1999).

Mit dem Ganglienhügel findet sich ein weiteres Areal des sich entwickelnden Großhirns, das sich durch eine hohe Proliferationsrate und einen großen Zellpool auszeichnet. Der Ursprung, der hier zu erläuternden Entwicklungsschritte liegt in der Ausbildung des Ganglienhügels in der 6. und 7.

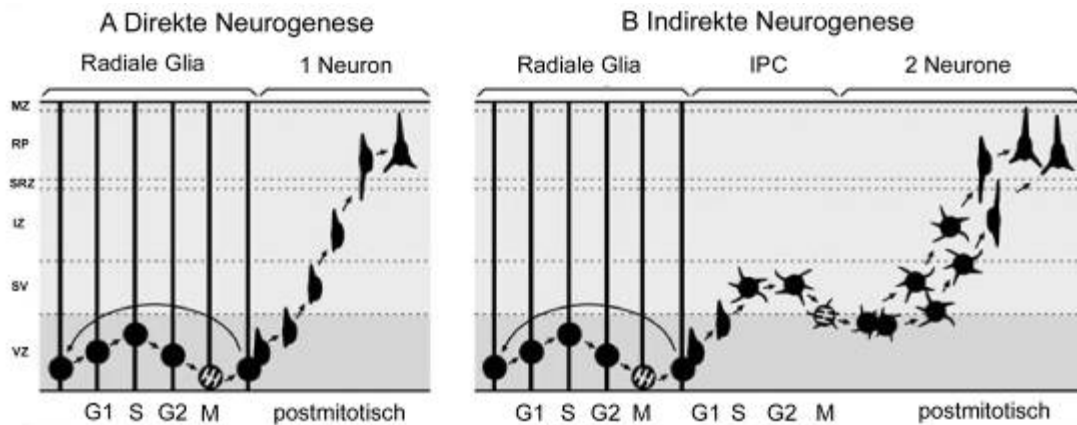
Schwangerschaftswoche am Boden der Seitenventrikel (Hinrichsen 1990). Der Ganglienhügel entspringt der Grundplatte des Neuralrohres im Telenzephalon. Er ist aus dicht gepackten Zellen der Ventrikulärzone und Subventrikulärzone aufgebaut und weist anfangs eine diskrete Furchung, den so genannten Sulcus interstriatus auf, der den Ganglienhügel in eine mediale und laterale striale Leiste unterteilt. Derivate der lateralen strialen Leiste des Ganglienhügels sind das Putamen, der Nucleus caudatus, das Corpus amygdaloideum, der Nucleus basalis Meynert und das Claustrum, während der Nucleus accumbens septi aus der medialen strialen Leiste gebildet wird (an dieser Stelle sei vermerkt, dass das Pallidum dem Diencephalon entspringt, und somit in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wird). Der Nucleus caudatus, und das Putamen stellen vor Ausbildung der Capsula interna in der 8. Entwicklungswoche noch ein gemeinsames Kerngebiet dar (Hinrichsen 1990). Der Ganglienhügel verfügt weiter über eine größere Zelldichte als der Nucleus caudatus, so dass eine histologische Abgrenzung möglich ist. Der Ganglienhügel gilt als Bildungsstätte für Neuronen der Basalganglien, bestimmter thalamischer Neuronen und Interneuronen der Großhirnrinde, die GABA als Neurotransmitter nutzen (Sidman und Rakic 1974, Lavdas et al. 1999). Bei der Aufzucht von neokortikalen Zellen der Maus, die aus Schnittpräparaten gewonnen wurden, denen Teile des Ganglienhügels noch anhafteten, konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu Zellen, die ohne Teile des Ganglienhügels in Kultur gebracht wurden, die Anzahl der GABAergen Interneuronen des Kortex signifikant höher lag (Anderson et al. 1997). Zukünftige kortikale Interneuronen, die dem Ganglienhügel entspringen scheinen dem Striatum unter experimentellen Bedingungen eindeutig während ihrer Migration zum Kortex unter dem Einfluss von Semaphorinen der Klasse 3 und deren Rezeptoren den Neuropilinen auszuweichen (Marin et al. 2001). Neuronen, die spät die Subventrikulärzone des Ganglienhügels verlassen, wandern unter einem repulsiven Einfluss, der offenbar von Netrin-1 ausgeht in das Striatum ein. Dieser Prozess konnte in vitro am Mausmodell durch Blockade des DCC-Rezeptors verhindert werden, so dass eine Migration ausblieb (Hamasaki et al. 2001). Der Einfluss von Netrin-1 auf die Migration neuronaler Vorläuferzellen konnte bereits zuvor von

Alcantara und Mitarbeitern gezeigt werden, die sowohl eine attraktive Wirkung von Netrin-1 auf Neuroblasten, die entlang von Nervenfaszikeln wandern, als auch eine repulsive Wirkung auf tangential wandernde Neuroblasten des Kleinhirns postulierten (Alcantara et al. 2000).

### **1.1.2 Schicksalswege einer radialen Gliazelle**

Das Schicksal einer zukünftigen Pyramidenzelle des Neokortex wird im Wesentlichen von zwei Vorgängen in den Keimzonen besiegelt. Es handelt sich dabei um den Prozess der direkten Neurogenese, wobei ein Neuron und eine selbst erneuerte radiale Gliazelle entstehen, und um den Prozess der indirekten Neurogenese, wobei sich eine radiale Gliazelle wiederum selbst erneuert und eine so genannte IPC („intermediate progenitor cell“) hervorbringt. Diese wiederum wandert in die Subventrikulärzone aus, um dort eine zweite mitotische Teilung zu erfahren. Die Nachkommen sind nun entweder zwei unreife Neuronen, die in Richtung pialer Oberfläche auswandern oder die IPC bringt selber zwei IPCs hervor, die dann zusammen in einer weiteren mitotischen Teilung vier unreife Neuronen ergeben (Noctor et al. 2004, Miyata et al. 2004) (Abbildung 2).

Diese Beobachtungen konnten unter anderem anhand von Zeitrafferaufnahmen neuronaler Vorläuferzellen in der Großhirnrinde der Ratte gemacht werden (Noctor et al. 2004)



**Abbildung 2:** Entwicklungswege radialer Gliazellen. Erläuterung siehe Text. Ventrikulärzone (VZ), Subventrikulärzone (SV), Intermediärzone (IZ), Sekundäre Rindenzone (SRZ), Rindenplatte (RP), Marginalzone (MZ) (Modifiziert nach Hevner 2006)

Der Schicksalsweg radialer Gliazellen ist maßgeblich von zahlreichen Transkriptionsfaktoren abhängig, wobei das „Paired Box“-Gen 6 (Pax6), Tbr2 und Tbr1 (zwei so genannte „T-domaine“-Transkriptionsfaktoren) eine maßgebliche Rolle spielen. Diese Sequenz von aktiven Transkriptionsfaktoren Pax6 → Tbr2 → Tbr1 findet sich auch in den Entwicklungsschritten von radialer Gliazelle → IPC → postmitotisches Neuron wieder (Englund et al. 2005).

### 1.1.3 Migrationsprozesse neuronaler Vorläufer im Neokortex

Unter radialer Migration versteht man, dass neuronale Vorläuferzellen in radialer Richtung an Gliazellen, deren Zellkörper im Bereich der Ventrikulärzone liegen, entlang wandern. Der Prozess der radialen Migration beinhaltet zunächst die Vorbereitung einer Bewegung, dann die Anlagerung des Neuroblasten an die radialen Gliafasern. Dann erfolgt die eigentliche Bewegung, die abschließend in die Abtrennung des gewanderten Neuroblasten übergeht, der sich wiederum in eine entsprechende Position im Zellgefüge in der designierten Rinde begibt (Marin und Rubenstein 2003).

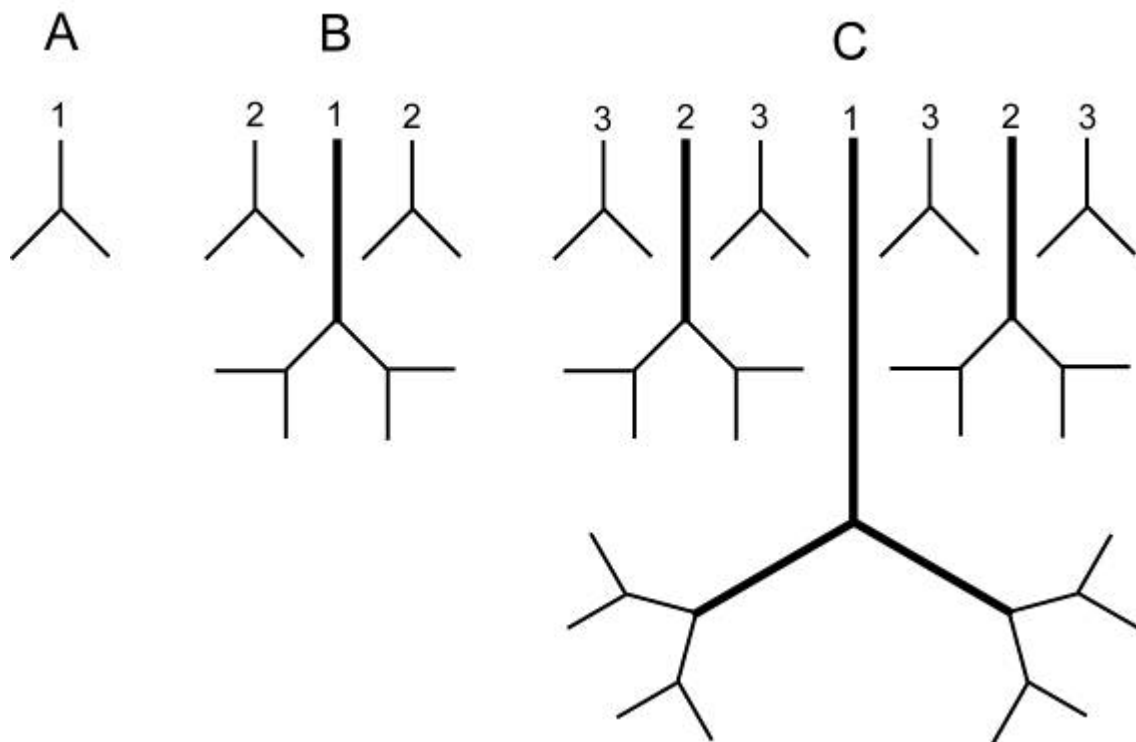
Das Gerüst der radialen Gliazellen stellt das primäre Lenkungssystem der neuronalen Migration im ZNS dar. Dennoch wurde schon früh von

verschiedenen Arbeitsgruppen erkannt, dass sich einige Zellen fern ab dieser radialen „Gliabahn“ im Großhirn ausbreiten (Altman 1969, Austin und Cepko 1990). Schon Tessier-Lavigne und Goodman sprachen in ihrer Arbeit von 1996 davon, dass dieser, nun als tangentielle Migration bezeichnete Vorgang, dieselben Leitmoleküle besitzt wie die Lenkung axonaler Ausläufer (Tessier-Lavigne und Goodman 1996).

## **1.2 Angiogenese im frühen Telencephalon**

Das menschliche Großhirn gilt bis zum Einzug erster endothelialer Kanäle vom primitiven leptomeningealen Gefäßplexus in der siebten Schwangerschaftswoche als blutleiterfrei (Duckett 1971). Die endothelialen Kanäle wachsen von der pialen Oberfläche in Richtung der Seitenventrikel, wo sie ungefähr in der 12. Schwangerschaftswoche die subventrikulären Keimzonen erreichen und dort den so genannten subventrikulären Plexus ausbilden (Duckett 1971). Mit zunehmendem Wachstum des Großhirns begeben sich immer mehr Endothelien auf den radial „angelegten“ Weg in Richtung der Seitenventrikel, doch viele erreichen den subventrikulären Plexus nicht mehr, sondern verzweigen sich schon im Bereich der zukünftigen weißen Substanz. Bär stellte dazu ein Modell am Beispiel des Großhirns der Ratte auf (Bär 1980) (Abbildung 3). Das Modell verdeutlicht die Gewährleistung ausreichender Perfusion in den sich differenzierenden Rindenregionen.





**Abbildung 3:** Modell der Angiogenese im Telencephalon. Abbildung A stellt ein Gefäß (1) dar, das von der Oberfläche in Richtung der Subventrikulärzone wächst und sich dort verzweigt. Während das fetale Gehirn wächst (Abbildung B) verzweigen sich die Äste in der Subventrikulärzone weiter (1), wobei weitere Gefäßäste von der pialen Oberfläche aussprossen (2). Anhaltendes Wachstum des Telencephalons (Abbildung C) führen zu weiteren Verzweigungen der subventrikulär gelegenen Gefäßabschnitte (1). Die tieferen Schichten des Großhirns werden von jüngeren Gefäßstämmen (2) versorgt, die oberflächlichen von zusätzlichen Gefäßsprösslingen (3) (Modifiziert nach Bär 1980).

Die meisten Gefäße, die von der pialen Oberfläche in die Tiefe vordringen bilden bis in späte Schwangerschaftsstadien keine glatte Muskelschicht aus, sondern bestehen nur aus einer feinen Endothelzellschicht (Kuban und Gilles 1985). Dies trifft nicht auf alle Gefäße zu. Die so genannten lateralen strialen Arterien bilden schon während der Mitte der Schwangerschaft eine Muskelschicht aus und es wurde postuliert, dass sie stabiler und somit weniger

anfällig für hohe Drücke seien. Im Gegensatz dazu sind Gefäße im Bereich der Keimzonen eher der Gefahr der Ruptur ausgesetzt (Kuban und Gilles 1985).

Gehen wir davon aus, dass das frühe Neuralrohr im Entwicklungsstand des menschlichen Embryos in sehr frühen Schwangerschaftsstadien eine blutgefäßlose Struktur darstellt, so stellt sich die Frage, mittels welcher Mechanismen die Endothelzellen in das Neurailepithel eindringen.

In der ersten Invasionsphase der Endothelzellen schieben diese ihre Filopodien durch das Neurailepithel hindurch und der Zellkörper folgt dann nach. Zu diesem Zeitpunkt herrscht eine hohe Konzentration des „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) in Bereichen der Grundplatte, sowie im Ependym (Breier et al. 1992, Aitkenhead et al. 1998). Diese Invasion erfolgt in den unterschiedlichen Segmentetagen zufällig, ist sogar segmentunabhängig (Kurz 2000). Etwa 12 Stunden nach dieser initialen Invasion rücken Endothelzellen des perineuralen Gefäßplexus nach und bilden zusehends erste Gefäßschleifen, die im Bereich der motorischen Säule der ventralen Grundplatte arteriell durchflutet werden.

Das Ausreifen und die Migration dieser ursprünglichen Gefäßröhren sind maßgeblich mit dem Auftreten von Perizyten und der Interaktion von Endothelzellen, Perizyten und der Basalmembran vergesellschaftet. Bei diesem Prozess sollen so genannte Matrix Metalloproteinasen (MMP), hier im Speziellen die MMP-2, die von Endothelzellen und Perizyten ausgeschüttet werden, dazu führen, dass sich sowohl Perizyten als auch Endothelzellen einen Weg durch die Basalmembran bahnen und neue Verzweigungen hervorbringen können (Virgintino et al. 2007). Wenn die Basalmembran „durchbrochen“ ist beziehungsweise schon davor kann VEGF, der ubiquitär im fetalen menschlichen Großhirn gebildet wird (Virgintino et al. 2003) den Prozess der Migration von Endothelien vorantreiben.

Proliferation von Endothelzellen im ZNS wurde in Studien an der Wachtel und im Huhn in sehr frühen Entwicklungsphasen des Neuralrohres mittels immunhistochemischer Methoden beschrieben, wobei jedoch in den aussprossenden Anteilen der Gefäße keine, in den restlichen intraneuroepithelialen Anteilen sehr geringe Aktivität herrschte (Cossmann et al.

1997). Es existieren keine Daten, die das Proliferationsverhalten endothelialer Zellen des menschlichen fetalen Großhirns über verschiedene Entwicklungsstadien beschreiben.

### **1.3 Axonale Lenkung**

#### **1.3.1 Die Geschichte der Lenkung neuronaler Ausläufer**

Wie können sich einzelne Neurone überhaupt finden?

Ein komplexer Prozess der Biologie stellt die „Verdrahtung“ von Nervenzellen in der Entwicklung des zentralen Nervensystems dar.

Als Pfadfinder dienen dabei keulenförmige, amöbenartig vordringende Zellausläufer an der Spitze der auswachsenden Nervenfasern, die Ramon y Cajal Ende des 19. Jahrhunderts entdeckte und „Wachstumskegel“ nannte. Cajal stellte schon damals die Hypothese in den Raum, dass diese Zellausläufer einen ausgezeichneten chemischen Spürsinn besitzen und ihre Zielstrukturen chemische Erkennungsmerkmale tragen müssten (Cajal 1892). Diese Vorstellung wurde Anfang der sechziger Jahre von Roger Sperry in seiner Chemoaffinitäts-Hypothese weiter ausgearbeitet. Er ging davon aus, dass Mikrofilamente als Vorhut des Wachstumskegels ausgesendet werden, um dann wie die Fühler eines Insekts die Umgebung, sprich die angrenzenden Elemente abzutasten. Die Affinität zum Zielelement bestimmt das Schicksal der Ausrichtung des Wachstumskegels (Sperry 1963).

In neuronalen Zellkulturen konnten diese Vorgänge genau beobachtet werden. Die haarähnlichen Ausläufer des Wachstumskegels, die Filopodien, sind in ständiger Bewegung. Sie strecken sich aus, wandern umher und ziehen sich zurück. Bleibt ein Filopodium fest an einer Oberfläche haften, so kommt es durch eine Kontraktion zu einer starken Zugspannung, die den Wachstumskegel zum Adhäsionspunkt zieht (Bray und Chapman 1985).

Einige Milliarden Nervenzellen, die das menschliche Gehirn besitzt waren für die anstehenden Fragestellungen zunächst nicht geeignet. Das Nervensystem wirbelloser Tiere wie das der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) oder der Heuschrecke (*Schistocerca americana*) erschienen als prädestinierte Modelle.

Das ZNS dieser Insekten besteht aus einem Gehirn mit ungefähr 50000 Neuronen und einer Kette einfacherer Bauchganglien. Die Neuronen der Heuschrecke können aufgrund ihrer Größe einfach mit Mikroelektroden punktiert, und somit stimuliert oder mit Farbstoffinjektionen behandelt werden. Auf diese Weise haben Bastiani und Kollegen Neuronen und deren axonale Ausläufer in den Brustganglien des Heuschreckenembryos untersucht und festgestellt, dass sich bestimmte Axone jedes Individuums dieser Gattung immer einem speziellen Fasertrakt anlagern und nur zu bestimmten Neuronen Kontakt aufnehmen (Bastiani et al. 1984). Schon zuvor stellten sich Goodman und Spitzer die Frage, ob bestimmte identifizierte Neuronen der Heuschrecke immer an festgelegten Orten und Zeitpunkten im ZNS (Brustganglien) persistieren (Goodman und Spitzer 1979). Das Schicksal dieser Zellen schien auf zweierlei Weise festgelegt zu sein. Mittels in vivo Präparation des Neuralepithels von Heuschreckenembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien und selektiven Abtötens von neuronalen Vorläufern zeigten Taghert und Kollegen, dass sowohl die Abstammung einer Zelle, als auch die Wechselwirkung mit der Umgebung zur Determination eines Neurons beitragen (Taghert et al. 1984).

Doch wie können nun Nervenzellen einander erkennen, während ihre Wachstumskegel fortwährend Weg bestimmende Entscheidungen treffen? Die so genannte „Wegmarkierungs-Hypothese“ (Raper et al. 1984) versuchte Licht ins Dunkel dieser Fragestellung zu bringen. Raper und seine Kollegen gingen davon aus, dass jeweils benachbarte Faserstränge im embryonalen Neuropil des Heuschreckenembryos durch „Erkennungsmoleküle“ an ihren Oberflächen markiert sind. Folglich müsse ein Axon, das sich einem weiteren anlagere, und nur mit diesem eine bestimmte Wegstrecke absolviere ein spezifisches Molekül tragen, welches keines der anderen Axone, zu denen kein Kontakt aufgenommen wurde, erkenne. Durch gezieltes Abtöten einer von zwei benachbarter und vorher charakterisierter Neuronen in frühen Entwicklungsstadien der Heuschrecke, die in zukünftigen Stadien gemeinsame Faszikel bildeten, zeigte du Lac, dass das Axon ohne den Nachbarausläufer trotz der Gegenwart weiterer Axone keinerlei Affinität zu irgendeiner axonalen

Struktur zeigte (du Lac et al. 1986). Nun war klar, dass einzelne Axone mit einem spezifischen Molekülbesatz an ihrer Oberfläche ausgestattet sein mussten (Bastiani et al. 1986, du Lac et al. 1986). Durch Injektion von embryonalem Neuralepithel der Heuschrecke in Mäusen konnten zuvor verschiedene monoklonale Antikörper gegen spezielle Oberflächenmoleküle, die nur Strang bildende Axone tragen, gefunden werden (Kotrla und Goodman 1984).

Mit Anfang der Achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts erfuhr die von Sperry beschriebene retinotektale Bahn weitere Beachtung. Bonhoeffer zeigte am Hühnchenmodell, dass nasal gelegene Axone, die die Retina verlassen, zwischen Zellen der Retina und des Tectums differenzieren können, und dass temporale Axone der Retina zwischen Zellen des vorderen (anterioren) und hinteren (posterioren) Tectums unterscheiden können (Bonhoeffer und Huf 1982). Diese Erkenntnisse legten den Grundstein für die Etablierung eines neuen Untersuchungsverfahrens der retinotektalen Bahn, den so genannten „stripe assay“. Dieser zeigte, dass Wachstumskegel retinaler Axone, die mit Oberflächen, der von ihnen nicht bevorzugten Hälfte des Tectums in Kontakt traten, kollabierten (Walter et al. 1987). Die Behandlung der explantierten Bereiche des Tectums mit einer Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C, und dazu das Ausbleiben der gerichteten Axonbewegung, zeigten, dass am ehesten ein Molekül, für diesen Vorgang zuständig war, dass über einen so genannten Glykosylphosphatidylinositol-(GPI) Anker mit der Membran verbunden ist. Dieses Protein (damals noch „repulsive axon guidance signal“ genannt) konnte aus den einzelnen Regionen des Tectums isoliert und später als Ligand für die Rezeptortyrosinkinasen der Eph-Familie (siehe unten) charakterisiert werden (Drescher et al. 1995).

Weitere Methoden zur Präzisierung der Eigenschaften eines Proteins richtungsgebenden Einfluss auf einen Wachstumskegel auszuüben zeigten Raper und Kollegen anhand des so genannten „collapse assays“ (Raper und Kapfhammer 1990). Sie brachten verschiedene Gewebearten aus unterschiedlichen Regionen des embryonalen Hühnchengehirns mit Wachstumskegeln in Kultur und beobachteten den abstoßenden Einfluss auf

den Wachstumskegel. Auf diese Art konnten die ersten Proteine der Semaphorin-Familie identifiziert werden (siehe unten).

In Organismen mit einem bilateral angelegten Nervensystem, ist es unabdingbar, dass die beiden Hälften des zentralen Nervensystems miteinander kommunizieren. Dies geschieht an vordefinierten Kreuzungsstellen, den so genannten Kommissuren, indem axonale Faserzüge die Mittellinie übertreten. Diese Aufgabe erfordert vor allem zwei wichtige Mechanismen vom Lenkungssystem. Zuerst muss ein Faserbündel überhaupt von der Mittellinie angezogen werden, dann aber darf nach der Kreuzung keine Rückkehr zum Ausgangspunkt erfolgen, sondern das Axon muss eher von der Mittellinie abgestoßen werden um die Reise ins kontralaterale Zielgebiet fortzusetzen. Im Rückenmark der Ratte konnte ein Protein isoliert werden, das im Bereich der Grundplatte anziehende Wirkung auf axonale Ausläufer besitzt, deren Faserzüge von dorsolateral nach ventral führen um dort die Mittellinie zu überqueren (Tessier-Lavigne et al. 1988). Dabei handelte es sich um ein Protein der später charakterisierten Netrin-Familie (siehe unten).

Im folgenden Abschnitt werden die vier am besten charakterisierten Lenkungsmolekülklassen beziehungsweise die Wechselwirkungen mit ihren Rezeptoren besprochen. Immer wieder werden weitere Proteine isoliert, denen eine Beteiligung an der Wegfindung axonaler Ausläufer im ZNS zugesprochen wird, so beispielweise „sonic hedgehog“ (Shh), die Gruppe der „wingless-int“-Proteine (Wnt) oder „bone morphogenetic proteins“ (BMPs). Eine genauere Charakterisierung steht hier jedoch noch bevor. Die Familie der Nogo-Proteine, bezieht im Rahmen der axonalen Lenkung eine Sonderstellung. Die physiologische Rolle, vor allem im sich entwickelnden Großhirn ist weitgehend unbekannt. Es zeigte sich bei der Blockierung des Nogo A-Proteins (damals nur als Antigen des IN-1-Antikörpers bekannt) mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, dass die hemmende Funktion des Myelins auf auswachsende Nervenfasern unterdrückt werden konnte (Caroni und Schwab 1988). Mittlerweile gilt die Nogo-Familie als Zielstruktur in Modellen der axonalen Regeneration bei spinalen Querschnittsverletzungen, wobei im Rattenmodell

interessante und erfolgversprechende Ergebnisse erzielt werden konnten (Bregman et al. 1995).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Prozess der axonalen Wegfindung nicht nur darauf beruht, dass ein Gradient eines repulsiv oder attraktiv wirkenden Proteins aufgebaut wird und sich der Wachstumskegel daran orientiert, es kommt vielmehr auch darauf an, dass im Wachstumskegel selbst räumlich und zeitlich präzise Vorgänge aktiviert werden, die dann, einem im Faszikelverbund wandernden Axon ein Signal zur individuellen Ausreifung geben. An dieser Stelle spielen womöglich Moleküle wie der Engrailed-2-Transkriptionsfaktor (En-2) eine Rolle, der lokal appliziert am Wachstumskegel von Ganglienzellen der Retina des Frosches, Einfluss auf die Proteinsynthese im Wachstumskegel nimmt und somit temporal gelegene Axone abstoßen und nasal gelegene anziehen kann (Brunet et al. 2005).

### **1.3.2 Das Lenkungssystem: Liganden und deren Rezeptoren**

Zielsuchende Axone treffen die wegbereitenden Entscheidungen mit Hilfe zahlreicher Lenkungsmoleküle, die auf den Wachstumskegel anziehenden (attraktiv) oder abstoßenden (repulsiv) Einfluss nehmen. Netrine, Slit und einige Semaphorine gehören zur Gruppe diffusionsfähiger Liganden, die sich mit Zellen, bzw. derer extrazellulären Matrix verbinden, wohingegen Ephrine und weitere Semaphorine sich membranständigen Oberflächenmolekülen zuordnen lassen.

#### **1.3.2.1 Netrine und Rezeptoren**

T. Serafini und M. Tessier-Lavigne entdeckten 1994 mit ihrer Arbeitsgruppe eine Gruppe von Molekülen, denen sie den expressiven Namen „Netrine“ gaben (Serafini et al. 1994). „Netrin“ leitet sich von „Netr“ aus dem Sanskrit ab und trägt die Bedeutung „der Führende“. Die gesamte Proteinfamilie besteht aus den Netrinen-1 bis 4, -G1, -G2, Netrin-A und Netrin-B. Die einzelnen Netrine konnten in verschiedenen Spezies nachgewiesen werden, so kommt beispielsweise das Protein Netrin-1 in der Maus, dem Hühnchen und dem Menschen vor, wobei Netrin-A und B Proteine der Taufliede darstellen. Das, zumindest bis jetzt, wohl meist diskutierteste Mitglied dieser Proteinfamilie ist

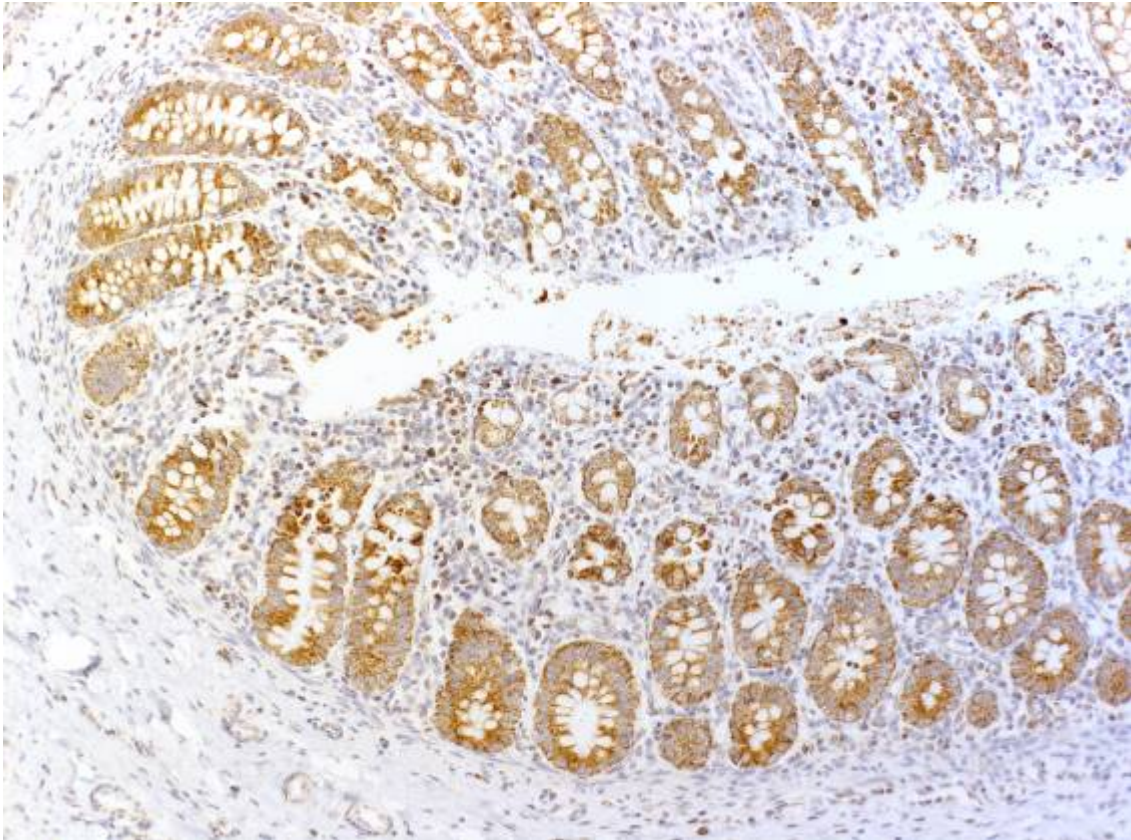
Netrin-1, das im menschlichen Gewebe als NTNL-1 bezeichnet wird (zur Vereinfachung wird in dieser Arbeit nur der Terminus Netrin-1 auch im Zusammenhang mit menschlichem Gewebe benutzt). Strukturell ähnelt Netrin-1 sehr stark dem extrazellulären Matrixprotein Laminin, das zusammen mit Kollagen IV Hauptbestandteil verschiedener Basallaminae ist und an Zelldifferenzierungs-, Migrations- und Proliferationsprozessen in Endothelzellen beteiligt sein soll (Eichmann et al. 2005). Bei Netrin-1 handelt es sich um ein lösliches Protein.

Mögliche Funktionen von Netrin-1 im zellulären Gefüge des ZNS konnten anhand von einer Studie ermittelt werden, indem in Mäusen ein so genanntes „loss of function“-Allel für das Netrin-1 Gen erzeugt wurde, mit dem Ergebnis einer abnormen Anlage von Corpus callosum, hippokampaler Kommissur, vorderer Kommissur und Nervenfaserkreuzungen im Rückenmark (Serafini et al. 1996). Obwohl Netrin-1 zunächst attraktive Eigenschaften als Lenkungsmolekül für auswachsende Nervenfasern zugesprochen wurden, wird auch eine abstoßende Wirkung diskutiert (Colamarino und Tessier-Lavigne 1995). Weitere Funktionen werden Netrin-1 im Rahmen von Morphogeneseprozessen der Lunge und der Brustdrüse zugesprochen (Liu et al. 2004, Srinivasan et al. 2003).

Mit DCC (deleted in colorectal cancer), einem Transmembranrezeptor, dessen genetische Information aufgrund von Allelverlusten in der Mehrheit aller kolorektalen Malignome fehlerhaft ist, und es somit zu einer reduzierten, beziehungsweise komplett aufgehobenen Expression des DCC-Rezeptors kommt (Fearon et al. 1990), konnte ein Rezeptormoleküle für Netrin-1 schon vor dessen eigener Entdeckung detektiert werden (Abbildung 4). Dieser Allelverlust auf Chromosom 18q bei kolorektalen Tumoren führte zur Charakterisierung von DCC als einen möglichen Kandidaten für ein so genanntes „Tumor Suppressor Gen“. Verlust dieses Allels bzw. eine verminderte DCC Expression konnte bei zahlreichen weiteren Tumoren wie beispielsweise des Gastrointestinaltraktes (Uchino et al. 1992), des Endometriums und der Ovarien (Imamura et al. 1992, Enomoto et al. 1995) sowie bei glialen Tumoren (Scheck et al. 1993, Reyes-Mugica et al. 1997)



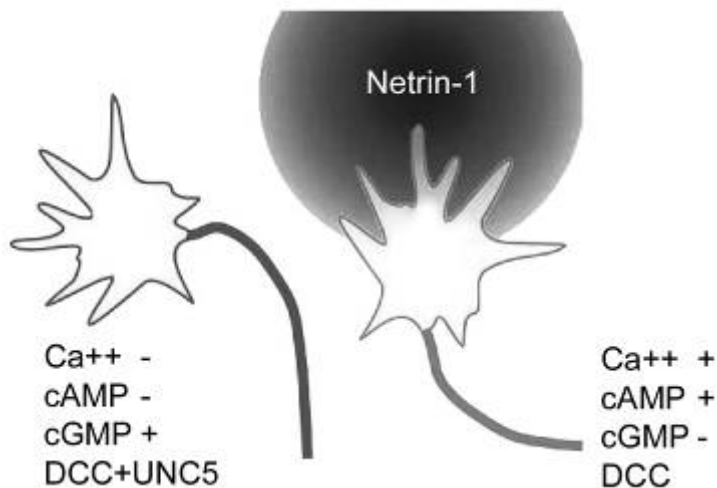
gefunden werden. Trotz dieser Erkenntnisse bleibt die Frage offen, ob es sich beim DCC-Gen wirklich um ein Gen, das der wissenschaftlichen Auffassung eines Tumorsuppressor Gens entspricht, handelt, da noch weitere Gene auf Chromosom 18q liegen, die ebenfalls als Tumorsuppressoren agieren könnten (Thiagalingam et al. 1996). Grund zur Annahme, dass DCC einen möglichen Rezeptor oder Teil eines Rezeptorkomplexes für Netrin-1 verkörpert, ergab sich aus Arbeiten an Mäusen, bei denen entweder das DCC-Gen gelöscht oder das Molekül selbst mit einem Antikörper blockiert wurde (Keino-Masu et al. 1996, Stein et al. 2001, Forcet et al. 2002). Mäuse, die mit einem DCC-Defekt versehen wurden überleben nur wenige Stunden und zeigen im ZNS Fehlentwicklungen, die derer einer Netrin-1 Gen-Abschaltung stark ähneln. Das Auswachsen und die richtige Orientierung von axonalen Fortsätzen sind daher abhängig von der Gegenwart der Moleküle DCC und Netrin-1 (Keino-Masu et al. 1996, Stein et al. 2001, Forcet et al. 2002).



**Abbildung 4:** Immunhistochemische Färbung eines adulten Colons mit einem monoklonalen Antikörper gegen DCC. 100-fache Vergrößerung (Positivkontrolle des immunhistochemischen Verfahrens).

Doch neben DCC existieren noch weitere Rezeptoren für Netrin-1. UNC steht für „uncoordinated“ und findet sich im Namen der Rezeptorfamilie UNC5 wieder. UNC5 ist die Bezeichnung des Rezeptors in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), in Wirbeltieren wird er unter UNC5H geführt. Die Gruppe unterteilt sich in die Rezeptoren UNC5H1 bis UNC5H4, die anstatt 1-4 auch mit den Buchstaben A-D versehen sind. Es konnte in Zellkultursystemen gezeigt werden, dass UNC5H1-H3 den Liganden Netrin-1 binden (Leonardo et al. 1997). Funktionell agiert der UNC5-Rezeptor wohl als Teil eines abstoßend wirkenden Lenkungssystems für auswachsende Nervenfasern (Keleman und Dickson 2001). Untersuchungen des UNC5H3-Rezeptors in Mäusen erbrachten Erkenntnisse über die Abhängigkeit normaler Migrationsprozesse im Kleinhirn (cerebelläre Körner- und Purkinjezellvorläufer), sowie der Ausbildung

kortikospinaler Bahnen vom Netrin-1/UNC5H3-System (Ackerman et al. 1997, Przyborski et al. 1998). Es existieren Hinweise dafür, dass dem Vorgang des axonalen Abstoßens durch Netrin-1 und UNC5H eine Interaktion zwischen DCC und UNC5H zugrunde liegt (Hong et al. 1999) (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Repulsive und attraktive Wirkung von Netrin-1 auf den Wachstumskegel eines Axons. DCC-Expression, hohe intrazelluläre  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration oder hoher cAMP:cGMP-Quotient führen zu Attraktion (rechter Wachstumskegel). DCC und UNC5 Koexpression, sowie niedrige intrazelluläre  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration oder niedriger cAMP:cGMP-Quotient haben eine abstoßende Wirkung (linker Wachstumskegel)(Modifiziert nach Chilton 2006).

Neogenin gilt als weiterer Rezeptor für Netrin-1 und stammt aus der DCC-Familie und gehört ebenso wie DCC zu den „dependence“-Rezeptoren (Matsunaga et al. 2004). Seine Funktion als Rezeptor für Netrin-1 ist jedoch noch unklar. Neogenin scheint selbst über das so genannte „repulsive guidance molecule“ (RGM) repulsiv auf Wachstumskegel zu wirken (Rajagopalan et al. 2004).

Auf der Suche nach weiteren intrazellulären Interaktionspartnern für DCC stieß man auf einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, den  $\text{A}_{2\text{B}}$ -Adenosinrezeptor, der sich mittels einer Domäne am C-terminalen Ende mit DCC in

Wechselwirkung begibt (Corset et al. 2000). Zunächst ging man nur von einer Interaktion von DCC mit dem Adenosinrezeptor aus, doch Experimente erbrachten den Beweis, dass Netrin-1 direkt an den A<sub>2B</sub>-Adenosinrezeptor bindet, mit der Folge eines intrazellulären Anstieges von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) (Corset et al. 2000). Die Rolle des A<sub>2B</sub>-Adenosinrezeptors, von dem übrigens kein Äquivalent in *C. elegans* existiert, wohingegen alle anderen Rezeptoren für Netrin-1 entwicklungsgeschichtlich konserviert sind, bleibt weiter unsicher (Mehlen und Furne 2005).

#### **1.3.2.1.1 „Dependence“-Rezeptoren und Apoptose**

Die traditionelle Auffassung einer Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand sieht bei abgelaufener Rezeptorbindung, die intra- oder extrazellulär erfolgen kann, eine Reaktion auf diesen Reiz vor, die einen Effekt auf die Zelle und somit gegebenenfalls auch auf das gesamte Zellgefüge ausübt. Bedingung für diesen Effekt ist die Bindung eines Agonisten an den Rezeptor. Bei Bindung eines Antagonisten bleibt der Effekt aus. Bei DCC, einem so genannten „dependence“-Rezeptor scheint dieses Verständnis nicht ganz haltbar. Bei unbesetztem Rezeptor startet ein Prozess, in diesem Fall ein Apoptosepfad. Bei Anwesenheit des Liganden bleibt dieser Vorgang aus (Mehlen und Bredesen 2004, Mehlen und Thibert 2004).

In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass in Zellen mit erhöhter DCC-Expression unter Abwesenheit von Netrin-1 diese Zellen Apoptose begingen, wobei Netrin-1-Zusatz diesen Effekt verhinderte (Mehlen et al. 1998). Das selbige Phänomen konnte experimentell auch bei den Rezeptoren UNC5H1-H3 beobachtet werden (Llambi et al. 2001). In der Netrin-1 knock-out-Maus zeigten sich nicht nur neuronale Navigationsprobleme, sondern auch eine erhöhte Zelltodrate im sich entwickelnden Hirnstamm (Llambi et al. 2001). Der genaue Mechanismus, wie eine DCC exprimierende Zelle unter der Abwesenheit von Netrin-1 sich dann in Apoptose begibt ist noch nicht aufgeklärt. Dennoch gibt es Anzeichen dafür, dass die pro-apoptotische Wirkung von DCC die Aktivierung so genannter „cystein aspartate proteases“ (Caspasen) benötigt (Mehlen et al. 1998). Der eingeleitete Apoptosepfad

entspricht weder dem Todesrezeptor-Pfad, noch dem mitochondrialen Pfad, die sich beide bei der Aktivierung der Caspase-3 treffen (Forcet et al. 2001). Einen möglichen Weg zur Apoptoseinduktion über den DCC Rezeptor beschreibt eine Arbeit, bei der unter Abwesenheit von Netrin-1 an seinem Rezeptor DCC über eine Wechselwirkung mit der Caspase-9, direkt die Caspase-3 aktiviert (Forcet et al. 2001). Momentan scheint nur klar, dass es sich bei diesem Apoptosepfad um einen alternativen Weg handelt, der von submembranösen Wechselwirkungen von DCC mit cholesterin- und sphingolipidreichen Membranbestandteilen abhängig ist (Guirland et al. 2004, Herincs et al. 2005, Furne et al. 2006).

Als Beispiel für einen Apoptoseprozess der einer DCC/Netrin-1-Kontrolle unterliegen kann sei die Regulation von Proliferation und Differenzierung in Darmepithelien angeführt. Intestinale Stammzellen verweilen nahe der Krypten des Epithels, der Großteil proliferierender Zellen liegt im unteren Drittel der Krypten. Bei Erreichen des Darmlumens begeht ein Großteil der Zellen Apoptose, bevor sie ins Lumen abschliffen. Interessanterweise exprimieren die tiefer gelegenen, kryptennahen Zellen vorzugsweise Netrin-1 (Mazelin et al. 2004), wohingegen die Zellen nahe der Villi in einem Netrin-1 armen Milieu angesiedelt sind (Hsu et al. 2001). Folglich erhalten die kryptennahen Zellen in der Netrin-1 reichen Umgebung einen Apoptoseschutz bei gleichzeitiger DCC-Expression, wohingegen die Zellen nahe des Lumens bei geringem Angebot an Netrin-1 und gleichzeitiger DCC-Expression diesem Schutzmechanismus nicht mehr unterliegen.

#### **1.3.2.1.2 Netrin-1 und Angiogenese**

Wie alle Mitglieder der 4 Hauptgruppen von axonalen Lenkungsmolekülen haben auch die Netrine die Eigenschaft an der Strukturbildung des Gefäßsystems maßgeblich beteiligt zu sein (Klagsbrun und Eichmann 2005, Eichmann et al. 2005). Netrin-1 nimmt dabei die Rolle eines so genannten proangiogenetischen Faktors ein (Park et al. 2004). Netrin-1, wie übrigens auch Netrin-2 und Netrin-4 stimulieren die Proliferation endothelialer Zellen und üben einen begünstigenden Effekt auf die Migration dieser Zellen beim

Zusammenschluss zur so genannten Röhrenformation aus (Wilson et al. 2006). Trotz der schon oben erwähnten Strukturähnlichkeit von Netrinen und Mitgliedern der „Laminin-Familie“ spielt Netrin-1 im Rahmen der endothelialen Zelladhäsion wohl keine Rolle (Wilson et al. 2006).

Der Rezeptor, über den Netrine ihre angiogenetischen und migratorischen Wirkungen in den Zielzellen entfalten, ist noch nicht eindeutig ermittelt. Einerseits scheint jedoch unwahrscheinlich zu sein, dass einer der bis jetzt bekannten Rezeptoren für Netrin-1 oder der übrigen Netrine diese Funktion erfüllt (Park et al. 2004, Wilson et al. 2006), andererseits existieren Daten, die belegen, dass DCC proangiogenetisch in erwachsenen Endothelzellen wirken kann (Nguyen und Cai 2006). Welche Stellung die in endothelialen Zelllinien sehr stark exprimierten Rezeptormoleküle Robo-4 („roundabout 4“), VEGFR-2 („vascular endothelial growth factor receptor-2“) und die so genannten PECAMs („platelet endothelial cell adhesion molecules“) in dieser Fragestellung einnehmen bleibt weiter Gegenstand aktueller Diskussion (Wilson et al. 2006). Neogenin wurde als möglicher Rezeptor gehandelt, der in glatten Gefäßmuskelzellen eine Netrin-1-Wirkung beeinflusst, aber in Endothelzellen keine proangiogenetische Wirkung ausübt (Park et al. 2004).

Da Netrine sowohl proangiogenetisch als auch im Bereich des auswachsenden Axons als anziehendes oder abstoßendes Molekül wirken, stellen sie auch im Hinblick auf den therapeutischen Einsatz mögliche Werkzeuge dar, ob in Form von Antikörpern gegen das Genprodukt im Kampf gegen maligne Entartungen, oder als stimulierendes Protein, das bei chronisch degenerativ geschädigten Nervenfasern und Gefäßsystemen zu einer Regeneration dieser Strukturen führen könnte (Wilson et al. 2006).

### **1.3.2.2 Semaphorine und Neuropiline**

Semaphorine stellen eine große Gruppe axonaler Lenkungsmoleküle dar, die mindestens 20 verschiedene Mitglieder umfasst (Chen et al. 1997). Sie bewirken wie im wirbellosen Tier, so auch im Wirbeltier die Abstoßung (Repulsion) des Wachstumskegels des Axons (Messersmith et al. 1995). Es existieren Untersuchungen, aus denen hervorging, dass beim Auswachsen

dendritischer Ausläufer Semaphorine anziehende Eigenschaften besitzen können (Polleux et al. 1998, 2000).

Aufgrund entsprechender Strukturmerkmale wurden Semaphorine zunächst in sechs Klassen eingeteilt, wobei Klasse I, IV, V und Klasse VI als transmembranöse Proteine und Klasse II und III als lösliche Formen galten (Mark et al. 1997, Kikuchi et al. 1997). Mittlerweile wird von folgender Aufteilung ausgegangen. Im Menschen existieren 20 verschiedene Semaphorine, in der *Drosophila* fünf und zwei Formen sind aus DNA-Viren bekannt. Es handelt sich dabei um lösliche, transmembranöse Proteine, sowie um Proteine, die mit einem GPI-Anker verbunden sind (Yazdani und Terman 2006). Die Semaphorine wurden in acht Klassen eingeteilt, wobei die Semaphorine der Klasse 3, die für die axonale Lenkung am besten untersucht sind. Bei solch einer großen Zahl an Liganden stellt sich die Frage, ob ähnlich viele Klassen von Rezeptoren zu identifizieren sind. Der erste Rezeptor für ein Semaphorin Molekül der Klasse III wurde 1997 unabhängig von zwei Arbeitsgruppen als Neuropilin identifiziert (He und Tessier-Lavigne 1997, Kolodkin et al. 1997). Nachdem ein zweites „Familienmitglied“ der Semaphorinrezeptoren mit dem Namen Neuropilin-2 und hoher Affinität zum Semaphorin IV identifiziert werden konnte, wurde Neuropilin in Neuropilin-1 umbenannt (Chen et al. 1997, Kolodkin et al. 1997).

Plexine sind bekannt dafür, primäre Bindungsstellen für einige Semaphorine darzustellen, die nicht an Neuropilin-1 oder Neuropilin-2 binden (Tamagnone et al. 1999). Die Rolle der Plexine als reine Rezeptoren für Semaphorine ist noch nicht ganz klar, vielmehr weisen einige wissenschaftliche Ergebnisse darauf hin, dass Plexine Bestandteile der Signaltransduktionskette des Semaphorin-Neuropilin-Komplexes sind (Takahashi et al. 1999, Tamagnone et al. 1999).

Man nimmt an, dass beispielsweise Semaphorine der Klasse III, bei der Strukturierung sensorischer Nervenfasern im ventralen Rückenmark ihre Funktion als repulsive Lenkungsmoleküle ausüben (Behar et al. 1996). Bei Untersuchungen an verschiedenen Säugetieren konnte gezeigt werden, dass die Entfernung der entsprechenden Gene für Semaphorin III die Stärke der

Großhirnrinde stark reduzierte (Behar et al. 1996) und periphere Hirnnerven verschiedenartige Abnormalitäten aufwiesen (Taniguchi et al. 1997). Ähnliche Ergebnisse brachten Studien hervor, die durch Entfernung der Gene für Neuropiline ein unregelmäßiges und ungerichtetes Wachstum verschiedener Hirnnerven verursachten (Kitsukawa et al. 1997). Eine weitere Funktion wurde den Semaphorinen der Klasse II als Hemmstoff der Synaptogenese im Nervensystem der Taufliede zugeschrieben (Matthes et al. 1995). Das Funktionsspektrum der Semaphorine und ihrer Rezeptoren oder Mediatoren ist nicht nur auf das Nervensystem entsprechender Lebewesen begrenzt, sondern spielt wahrscheinlich auch bei der Morphogenese mesodermaler Gewebe eine Rolle (Behar et al. 1996). Auch die Semaphorine spielen eine tragende Rolle in der Entwicklung des Gefäßsystems, sowie bei der Entstehung pathologischer Zustände, wie beispielsweise der Angiogenese verschiedener maligner Tumoren (Klagsbrun und Eichmann 2005, Eichmann et al. 2005).

### **1.3.2.3 Ephrine und Eph-Rezeptoren**

Eine weitere Gattung von axonalen Lenkungssystemen bildet die Gruppe um die Rezeptorenfamilie Eph und deren Liganden, der Ephrine. Der Name „Eph“ leitet sich von einer Zell-Linie ab, in der erstmals ein Eph-Rezeptor kloniert werden konnte (Hirai et al. 1987), der „erythropoietin producing hepatoma“ Zell-Linie. Eph-Rezeptoren stellen das größte Kontingent an so genannten Rezeptortyrosinkinasen (RTKs). Rezeptortyrosinkinasen sind Transmembranproteine, die nach Eingang eines externen Stimulus dieses Signal ins Zellinnere weiterleiten (sog. „forward signalling“), jedoch auch in der Lage sind eine reverse Signaltransduktion auszuführen (sog. „reverse signalling“) (Brückner et al. 1997). Dies bedeutet, dass das Signal nicht nur in die Rezeptor-exprimierende Zelle geleitet, sondern auch über den Liganden in die Zelle zurückgesendet wird. Das gemeinsame Auftreten beider Signalarten nennt man bidirektionale Signalleitung. Damit wird die klassische Definition von Liganden und Rezeptoren in Frage gestellt, da bei der bidirektionalen Signalweiterleitung Ephrine und Eph- Rezeptoren sowohl als Liganden, als auch als Rezeptoren agieren können. Die Ephrine werden in zwei Untergruppen eingeteilt: Die Ephrine der Gruppe A (EphrinA1-A5) sind



Glycosylphosphatidylinositol- (GPI) verankerte Proteine, die Gruppe B (EphrinB1-B3) besitzt eine Transmembrandomäne. Bei den Eph-Rezeptoren gibt es ebenfalls zwei Untergruppierungen, die entsprechend der Liganden mit A und B bezeichnet werden (EphA1-A8 und EphB1-EphB4, EphB6). Die Unterteilung rührt hierbei aus Sequenzanalogien und Ligandenaffinitäten hervor (Drescher et al. 1997). Rezeptoren der Klasse A binden A-Klasse Ephrine, Rezeptoren der Klasse B entsprechend B-Klasse Ephrine. Eine Ausnahme bildet dabei der EphA4-Rezeptor, der sowohl A-Ephrine als auch B-Ephrine binden kann.

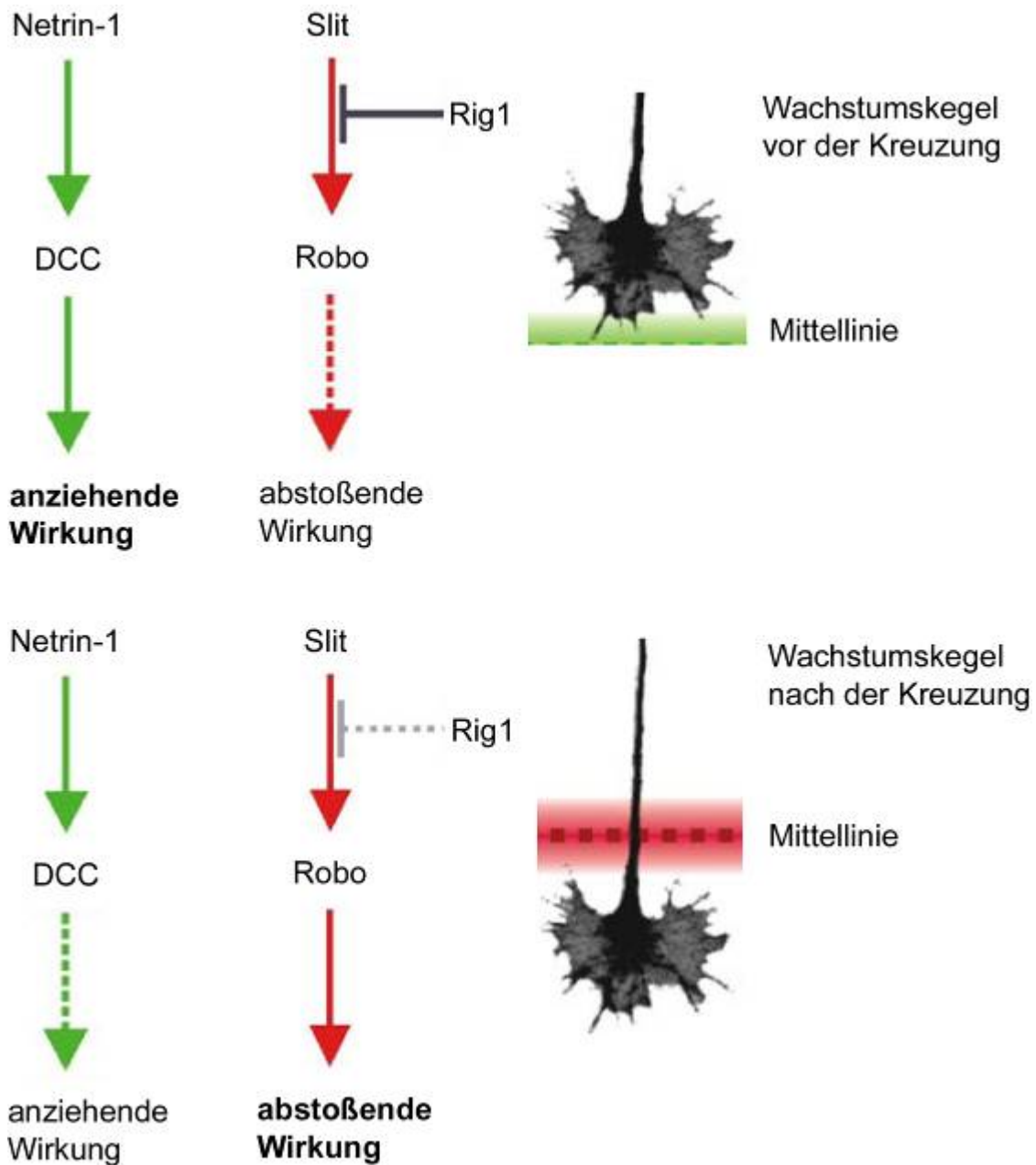
Neben der Funktion Axone im sich entwickelnden Gehirn zu leiten ist das Eph-Ephrin-System noch an verschiedenen Prozessen in der Entwicklung des Organismus beteiligt. Dazu gehören unter anderem die Ausbildung von Axonbündeln, die Bildung verschiedener Kommissuren (Henkemeyer et al. 1996, Park et al. 1997), die Entwicklung des Vorderhirns und des Rautenhirns (Xu et al. 1995), sowie die Ausbildung topographischer Projektionen und Formationen (Cheng et al. 1995, Drescher et al. 1995). Während der Entwicklung spielen Ephrine eine Rolle in der Entstehung des Blutgefäßsystems (Klagsbrun und Eichmann 2005, Eichmann et al. 2005), eine Funktion, die bis zum Stadium des reifen Gehirns und darüber hinaus bestehen bleibt (adulte Angiogenese) (Frisen et al. 1999).

#### **1.3.2.4 Slit/Robo System**

Auch dieses Lenkungssystem konnte erstmals in der Tauflyge gefunden werden (Seeger et al. 1993). Funktionell ist es im Wesentlichen am Aufbau der Bilateralsymmetrie des Körpers beteiligt, sprich bei der Ausbildung der Kommissuren. Die Entscheidung, welche Axone die Mittellinie passieren dürfen, wird maßgeblich von diesem System getroffen. Der Ligand Slit ist ein, von Mittelliniestrukturen sezerniertes, repulsiv wirkendes Molekül, der über Wechselwirkungen mit dem Robo-Rezeptor (Roundabout) wirkt. Interessanterweise kommt es zu Interaktionen zwischen DCC und Robo (Stein et al. 2001), mit der Folge, dass unter Anwesenheit von Slit die DCC-Wirkung abgedämpft wird. Dieses Verhalten könnte erklären, wie longitudinal

verlaufende Axone von der Mittellinie angezogen werden, diese überqueren, aber nicht mehr zurückkreuzen.

Bei diesem Mechanismus spielt das Protein Rig1 (Robo3 genannt, eine weiterer Rezeptor für Slit), eine entscheidende Rolle. Rig1 bindet Slit und wird von kreuzenden Fasern vor der eigentlichen Kreuzung in hohem Maße exprimiert, wobei es nach der Kreuzung zu einer verminderten Expression von Rig1 kommt (Sabatier et al. 2004). Rig1 dämpft dabei über die Bindung von Slit die repulsive Robo-Wirkung ab. Axonale Ausläufer in Rig1 „knock-out“-Mäusen kreuzen die Mittellinie nicht (Marillat et al. 2004). Abbildung 6 verdeutlicht diesen Sachverhalt an axonalen Kreuzungsstellen unter Einbeziehung der attraktiven Wirkung von DCC und Netrin-1.



**Abbildung 6:** Verschiedene Rezeptoren modulieren das „Kreuzen“ des Wachstumskegels zur kontralateralen Seite des ZNS. Netrin-1 wirkt anziehend auf den Wachstumskegel über den Rezeptor DCC. Erläuterung siehe Text (Modifiziert nach Chilton 2006).

## 1.4 Ziele der Arbeit und Fragestellung

Die „Verdrahtung“ von Neuronen im Großhirn von Menschen und Tieren legt die Grundlage für Prozesse, die das Leben in seiner Form so prägen, dass schon bei geringfügigen pathologischen Begebenheiten ein oftmals mit dem Leben unvereinbares Ereignis eintritt.

Präzise Modulation der Zellpopulation in den Keimzonen des Telencephalons erzielt der Körper über die Prozesse der Proliferation und Apoptose.

Das Auswachsen von Nervenfasern im zentralen Nervensystem ist ein Prozess der sehr eng mit der Entwicklung beziehungsweise der Vernetzung des Gefäßsystems vergesellschaftet ist, so dass sich die Frage stellt, ob die selben Akteure wie bei der axonalen Lenkung auch bei der Aussprossung und Erhaltung des zentral nervösen Gefäßbaumes eine Rolle spielen.

Migrationsprozesse neuronaler Vorläuferzellen im Großhirn verlaufen in radialer oder tangentialer Richtung. Dabei orientieren sie sich an radial angelegten Gliapfaden, oder an Gradienten verschiedener Lenkungsmoleküle.

DCC und Netrin-1 gelten als Proteine, deren multimodale Funktion gerade diese Vorgänge im fetalen Telencephalon maßgeblich beeinflussen können.

Diese Arbeit untersucht verschiedene Entwicklungsstadien des fetalen Großhirns, wobei hier der Fokus auf der Verteilung des DCC-Rezeptors und Netrin-1 in den fetalen Rindenschichten, dem Striatum und dem Ganglien Hügel liegt. Grundlage für die Auswahl dieser Areale bildet die funktionelle Verbindung der Gebiete im Telencephalon.

Werden sich in axonalen Faserzügen, die entscheidende Richtungsänderungen durchführen die Moleküle Netrin-1 und DCC nachweisen lassen?

Existieren in der sich entwickelnden fetalen Rinde regionale Unterschiede der DCC- oder Netrin-1-Expression? Sind diese Unterschiede mit Arealen in denen eine hohe Proliferationsrate herrscht assoziiert?

Wie ist das Umfeld migrierender Vorläuferzellen bezüglich der DCC- und Netrin-1-Expression determiniert?

Wie stellt sich das Expressionsmuster von DCC und Netrin-1 für Kerngebiete, wie beispielsweise das Striatum dar, das von axonalen Faserzügen durchdrungen wird?

Können DCC und Netrin-1 in Endothelzellen präformierter Gefäße des Telencephalons nachgewiesen werden?

Neben der Rolle im fetalen Großhirn soll durch die Experimente am nicht-fetalen Großhirn die Expression von DCC und Netrin-1 dort in Mark und Rinde untersucht werden, wobei hier das Augenmerk auf Neuronen der Rinde liegt, die bei Assoziation der Expressionsmuster für DCC und Netrin-1 einen Apoptoseschutz erfahren können.

Bis dato existieren noch keine Daten, die die Verteilung des DCC-Rezeptors und des Liganden Netrin-1 über unterschiedliche Entwicklungsstadien im menschlichen fetalen Großhirn belegen. An dieser Stelle soll ein Beitrag zum Verständnis geleistet werden, der die multimodale Funktion dieses Rezeptor-Ligand-Paares unter Berücksichtigung regionaler Assoziation mit proliferativ aktiven Arealen, Kerngebieten des Telencephalons, Gefäßen und axonalen Faserzügen beschreibt.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Fetale Gehirne**

#### **2.1.1 Definition der Normalhirnproben**

Als Studienmaterial für diese Arbeit wurden 21 fetale Gehirne aus den Schwangerschaftswochen (SSW) 12 bis SSW 28 aus dem anonymisierten Gewebearchiv des Institutes für Hirnforschung der Universität Tübingen ausgewählt (Tabelle 1). Die fetalen Gehirne wurden dem Institut für Neuropathologie initial zur neuropathologischen Routinediagnostik übersandt. Eine positive Stellungnahme der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät (Vorsitzender: Prof. Dr. D. Luft) liegt vor. Es wurden ausschließlich Gehirne in die Studie aufgenommen, deren neuropathologische Begutachtungen einen neuropathologisch unauffälligen Befund hervorbrachten. Sowohl makroskopisch (beispielsweise der Ausschluss von dorsalen Schlussstörungen), als auch mikroskopisch durften keinerlei Anhaltspunkte für Entwicklungsstörungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) gegeben sein. Feten mit bekannten Chromosomenaberrationen, die in der gynäkologisch-humangenetischen Routinediagnostik auffielen, wurden ebenso von der Arbeit ausgeschlossen, wie auch solche mit infektiösen Erkrankungen des ZNS. Insbesondere wurde bei mütterlichen Infektionskrankheiten sowie inflammatorischen Prozessen im Bereich der Plazenta darauf geachtet, dass das ZNS-Gewebe nicht von den entzündlichen Veränderungen betroffen war. Außerdem wurde darauf geachtet, dass der gewebliche Erhaltungszustand der fetalen Gehirne nicht zu sehr durch autolytische Prozesse beeinträchtigt war.

**Tabelle 1:** Alter und Todesursache

<b>Fetus</b>	<b>Alter in SSW</b>	<b>Todesursache</b>
1	26	Vorzeitige Plazentalösung, postpartaler Tod nach Sectio
2	13	Intrauteriner Fruchttod bei Chorioamnionitis und Plazentitis
3	18	Intrauteriner Fruchttod bei Chorioamnionitis
4	19	Intrauteriner Fruchttod bei Chorioamnionitis und Plazentitis
5	21	Intrauteriner Fruchttod bei Chorioamnionitis und Plazentitis
6	19	Interruptio bei Anhydramnion und Geminigravidität
7	19	Interruptio bei Anhydramnion und Geminigravidität
8	17	Intrauteriner Fruchttod bei vorzeitigem Plazentalösung
9	13	Intrauteriner Fruchttod bei vorzeitigem Plazentalösung
10	14	Interruptio auf Wunsch der Eltern
11	28	Intrauteriner Fruchttod bei Transfusionssyndrom
12	21	Interruptio bei Anhydramnion und Verdacht auf Nierenagenesie
13	22	Interruptio nach vorzeitigem Blasensprung und Anhydramnion
14	18	Interruptio nach vorzeitigem Blasensprung
15	14	Interruptio nach vorzeitigem Blasensprung
16	13	Ausstoßung
17	22	Frühgeburt, postpartal verstorben
18	12	Intrauteriner Fruchttod bei rupturierter Gravidität
19	14	Interruptio nach vorzeitigem Blasensprung
20	16	Intrauteriner Fruchttod bei kollabierter Fruchtblase
21	20	Interruptio bei kardialen Fehlbildungen

### 2.1.2 Neuropathologische Beurteilung

Zur neuropathologischen Begutachtung gehörte neben der makroskopischen auch die mikroskopische Beurteilung (Hämatoxylin-Eosin Färbung) des zu untersuchenden Gewebes, wobei alle ausgewählten Feten keine Hinweise auf pathologische Alterationen des ZNS zeigten. Leichte, präterminal-hypoxische Schädigungen des Gewebes wurden im Rahmen der im Verlauf des Todes eintretenden hypoxischen Ereignisse als natürlich auftretende Prozesse angesehen und somit wurden diese Präparate nicht von der Studie ausgeschlossen. Alle Präparate wurden von zwei Fachärzten für

Neuropathologie begutachtet. Anschließend erfolgte eine zweite Sichtung und Evaluation der Präparate unter Berücksichtigung der anatomischen Strukturen.

### **2.1.3 Gehirnregionen**

Als zentraler Punkt der Arbeit galt die Demonstration eines möglichst genauen Verteilungsmusters von axonalen Lenkungsfaktoren in den einzelnen Rindenschichten des Großhirns und im Striatum. Zusätzlich wurden noch folgende Strukturen, soweit diese auf den jeweiligen Präparaten zu beurteilen waren betrachtet und in die Auswertung mit aufgenommen: Leptomeningen, Plexus choroideus, Ependym, Endothelien.

Folgende Regionen des Großhirns gingen in die Auswertung ein:

- o Marginalzone
- o Rindenplatte
- o Sekundäre Rindenzone
- o Intermediärzone
- o Subventrikulärzone
- o Ventrikulärzone
- o Ganglienhügel
- o Striatum

(Da sich definitionsgemäß nicht alle Areale in allen Altersstufen nachweisen lassen, wurde altersadaptiert ausgewertet.)

## **2.2 Auswahl einer adulten Normalhirngruppe**

### **2.2.1 Das adulte Normalhirn**

Als Vergleichsgruppe dienten nicht-fetale Normalgehirne (Tabelle 2) aus dem Gewebearchiv des Institutes für Hirnforschung der Universität Tübingen (Mittelbronn et al. 2001), die im Folgenden aus Vereinfachungsgründen als adulte Normalhirngruppe bezeichnet werden. Es wurden ausschließlich Gehirne in die Studie aufgenommen, deren neuropathologische Begutachtungen einen neuropathologisch unauffälligen Befund hervorbrachten. Alle Präparate wurden einer Referenzbegutachtung im Neuropathologischen Institut der Ludwig-



Maximilians-Universität München (Professor Dr. Kretschmar) unterzogen und als neuropathologisch unauffällig eingestuft.

### 2.2.2 Klinische Daten

**Tabelle 2:** Adulte Großhirne

Fall	Alter in Jahren	Gehirnregionen
1	26	Rinde und Mark jeweils frontal
2	49	Rinde und Mark jeweils frontal
3	39	Rinde und Mark jeweils frontal
4	56	Rinde und Mark jeweils frontal
5	76	Rinde und Mark jeweils frontal
6	21	Rinde und Mark jeweils frontal
7	32	Rinde und Mark jeweils frontal
8	72	Rinde und Mark jeweils frontal
9	92	Rinde und Mark jeweils frontal
10	1	Rinde und Mark jeweils frontal
11	64	Rinde und Mark jeweils frontal
12	58	Rinde und Mark jeweils frontal
13	42	Rinde und Mark jeweils frontal
14	75	Rinde und Mark jeweils frontal
15	66	Rinde und Mark jeweils frontal
16	77	Rinde und Mark jeweils frontal
17	71	Rinde und Mark jeweils frontal
18	55	Rinde und Mark jeweils frontal
19	75	Rinde und Mark jeweils frontal
20	55	Rinde und Mark jeweils frontal
21	77	Rinde und Mark jeweils frontal
22	43	Rinde und Mark jeweils frontal
23	45	Rinde und Mark jeweils frontal

### 2.2.3 Gehirnregionen

Um einen Eindruck vom Verteilungsmuster der zu untersuchenden Faktoren im adulten Großhirn, beziehungsweise in definierten Arealen zu bekommen wurden Proben aus der Rinde sowie des Marklagers (Frontalhirn) ausgesucht, die sozusagen den Endzustand der fetalen Großhirnrindenenwicklung darstellen.

### **2.3 Anfertigung der histologischen Präparate**

Die Gehirne wurden mit 4%-igem Formalin, in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (pH 7.4) fixiert. Die entnommenen Proben wurden nach Fixierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 70%, 80%, 96%) zweimal in einem Gemisch aus 100%-igem Alkohol und Chloroform, sowie zweimal in unverdünntem Chloroform entwässert und in Paraffin eingebettet. Von den, so entstanden Paraffinblöcken wurden anschließend an einem Mikrotom (Microm HM 355 S, Walldorf, Germany) ca. 3,5µm dicke Schnitte gefertigt, auf Objektträger (SuperFrost Plus, Langenbrinck, Germany) aufgezogen und für ca. 24 Stunden in einem Brutschrank (Memmert, Germany) bei 60°C angetrocknet, um bessere Haftung des Gewebes am Objektträger zu erzielen.

### **2.4 Immunhistochemie**

Die, in dieser Arbeit verwendeten immunhistochemischen Färbeverfahren beruhen allesamt auf dem Prinzip der Streptavidin-Biotin-Methode (siehe 2.4.2). Die Färbeprozedur der histologischen Präparate für die Untersuchung der Faktoren DCC, Netrin-1 und Ki-67 wurde zunächst mit einem Verfahren manuell durchgeführt. Es erfolgte ebenso ein automatisierter Färbeprozess, der Farbniederschläge zeigte, die gerade bei löslichen Proteinen wie dem Netrin-1 eine exaktere Auswertung (siehe Score) ermöglichen. Die Auswertung aller Präparate erfolgte mit den automatisch gefärbten Gewebeproben (siehe 2.4.3 und 2.4.4).

#### **2.4.1 Die Antikörper**

Die, in der Arbeit verwendeten Antikörper wurden entsprechend der Funktion ihrer Antigene als axonale Lenkungsfaktoren und Proliferationsmarker ausgewählt. Die immunhistochemischen Verfahren wurden an allen, oben aufgelisteten fetalen Präparaten durchgeführt. Die adulten Präparate wurden dabei nur der Behandlung mit den Antikörpern gegen DCC und Netrin-1 zugeführt und ausgewertet. Die nachfolgenden Proteine dienten als Antigene für die entsprechenden Antikörper.

#### **2.4.1.1 DCC**

Beim Antikörper gegen DCC handelt es sich um ein monoklonales Immunglobulin aus der Maus, dass der Klasse IgG1 kappa angehört. Als Primärantikörperlösung wurde eine 1:20 Verdünnung des Antikörpers in TBS angefertigt und entsprechend des Protokolls für den automatisierten Färbevorgang eingesetzt. Der Antikörper gegen DCC stammte aus dem Klon DM51 der Firma Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, Großbritannien.

#### **2.4.1.2 Netrin-1**

Beim Antikörper gegen Netrin-1 handelt es sich um ein polyklonales Immunglobulin, dass im Hasen gezüchtet wurde. Zur Untersuchung wurde der Klon H-104 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA) in einer 1:20 Verdünnung eingesetzt, der gegen die Aminosäuresequenzen zwischen Position 501 und 604 des menschlichen Netrin-1 gerichtet ist.

#### **2.4.1.3 Ki-67**

Ki-67 als Kernprotein, wurde mittels des monoklonalen Antikörpers MIB-1 (DAKO, Glostrup, Dänemark) detektiert. Es handelt sich dabei um ein Immunglobulin der Klasse IgG1 kappa aus der Maus, dass gegen menschliches Ki-67 gerichtet ist. Das Ki-67-Antigen ist ein Proliferationsmarker, d.h. er färbt die Zellen im Gewebe an, die sich im Proliferationszyklus befinden, die so genannte Wachstumsfraktion. Während des Zellzyklus wird dieses Antigen in der G1-, in der S-, in der G2- und in der M-Phase exprimiert. Ruhende Zellen, also Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, exprimieren das Ki-67-Antigen nicht. Entsprechend des Protokolls für den automatisierten Färbevorgang wurde für die Färbung der Schnitte eine 1:100 Verdünnung des Antikörpers in TBS in Gebrauch genommen.

#### **2.4.2 Das Prinzip der Streptavidin-Biotin-Methode als Detektionssystem**

Das zu detektierende Antigen wird mit dem entsprechenden Antikörper (unkonjugierter Primärantikörper), der entweder gegen verschiedene Epitope

(Polyklonalität) oder bestimmte Epitope (Monoklonalität) des Antigens gerichtet ist, markiert. Ein zweiter, biotinmarkierter Sekundärantikörper wird aufgetragen, der gegen den Primärantikörper (jetzt das Antigen) gerichtet ist. Der Sekundärantikörper muss dabei gegen Immunglobuline der Gattung des Primärantikörpers gerichtet sein. In einem weiteren Schritt wird ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugeführt, das sich aufgrund hoher Affinität von Streptavidin für Biotin an den biotinmarkierten Sekundärantikörper anlagert. Diese Reaktion ist die Grundlage des immunhistochemischen Verfahrens. Um die so entstandenen Immunglobulin-Enzym-Konjugate farblich darzustellen wird ein so genanntes Substratchromogen (beispielsweise 3,3'-Diaminobenzidin) zugesetzt, das in einer Oxidationsreaktion mit der Peroxidase zu unlöslichen, farbigen Produkten reagiert. Durch die Zugabe von Metallen kann die optische Dichte des Farbniederschlags erhöht werden und erzeugt somit einen Verstärkereffekt.

### **2.4.3 Automatisierte Immunhistochemie**

Mit dem automatisierten, immunhistochemischen Färbesystem Benchmark (Ventana, Strasbourg, France), wurden alle histologischen Präparate mit Antikörpern gegen DCC, Netrin-1, und Ki-67 gefärbt. Sowohl Negativkontrollen, die als Kontrolle monoklonaler und polyklonaler Antikörper dienen, als auch Isotypenkontrollen, deren Einsatz im Gebrauch von monoklonalen Antikörpern unumstößlich ist (siehe 2.4.5 Kontrollen), wurden ebenfalls mit der automatisierten Immunhistochemie durchgeführt. Der Färbevorgang wurde spezifisch den Antikörper angepasst. Die Entparaffinierung der histologischen Präparate erfolgte mittels Wärmebehandlungen maschinell. Zur Dehydrierung durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe sowie 3 mal 10 Minuten Xylol und wurden anschließend mit einem Deckglas versehen.

#### **2.4.3.1 Protokoll für das automatisierte Färbeverfahren**

Dieses Protokoll wurde für die Antikörper gegen DCC, Netrin-1 und Ki-67 optimiert. Die Entparaffinierungsphase des Färbevorgangs wurde in Form von Wärmebehandlungen, Waschvorgängen und so genanntem „cell-conditioning“ (Zellvorbehandlung) durchgeführt. Die Objektträger wurden dabei zunächst für

4 Min. auf 75°C, danach auf 76°C, dann für 8 Min. auf 95°C erwärmt und zuletzt für 4 Min. bei 100°C inkubiert. Zellvorbehandlungen wurden durch 8 Min. (standard) und 30 Min. (mild) andauernde Inkubationszyklen umgesetzt.

Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte mittels Vorbehandlung der Gewebepräparate durch 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 100% Methanol über 14 Minuten. Der Blockierung folgte die Auftragung des entsprechenden Primärantikörpers, der dann 30 Min. einwirkte. Zwei Wasch-, sowie zwei 8 Min. andauernde Verstärkerzyklen wurden vor der Auftragung des Avidin-Biotin-Blockersystems (A-B-Blocker, jeweils 4 Minuten) vollzogen, bevor eine 8 Min. andauernde Inkubation des Gewebes mit einem Tropfen I-View-Biotin Ig (Ventana, Strasbourg, France) maschinell von statten ging. Der vorletzte Schritt im Färbeprozess zur Visualisierung der Reaktionsprodukte begann mit der Zugabe eines Tropfens I-View SA-HRP (Ventana, Strasbourg, France), der 8 Min. inkubierte, dann folgte das eigentliche Farbchromogen 3,3'-Diaminobenzidin (I-View DAB, Ventana, Strasbourg, France), welches parallel mit I-View H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ventana, Strasbourg, France) aufgetragen wurde und weitere 8 Minuten auf den Präparaten verweilte. Letztendlich sorgte die 4 Min. andauernde Behandlung mit einem Kupferverstärkersystem (I-View Copper, Ventana, Strasbourg, France) für die Erhöhung der optischen Dichte des Farbniederschlags.

#### **2.4.4 Manuelles Färbeverfahren**

Zur Vorbereitung der Schnitte für immunhistochemische Methoden erfolgte die Entparaffinierung zuerst in Chloroform (30 min.), danach eine Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 70 %, destilliertes Wasser, jeweils 2 min.).

Außerdem war eine Vorbehandlung zur Freilegung der Antigene notwendig. Diese erfolgte über 20 Minuten in Zitratpuffer (pH 6,0) in einem Mikrowellenofen bei 750 Watt. Die endogene Peroxidase wurde mit 6ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid) in 250 ml 100% Methanol geblockt (15 Min.). Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurden die Gewebe für 15 Min. mit einer 1:10 in Tris-gepufferter Salzlösung verdünntem

Standardschweineserum inkubiert. Danach folgte die Inkubation des in TBS verdünnten Primärantikörpers über Nacht in einer Kühlkammer bei 4°C. Nach dem Spülen mit TBS-Lösung inkubierten die Gewebe für 30 Minuten mit biotinierten anti-Hase F(ab)<sub>2</sub> bzw. anti-Ziege F(ab')<sub>2</sub>- Brückenantikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark), je nach Klonalität des Primärantikörpers. Nach einem Spülgang wurden die Gewebe mit dem Peroxidase-gekoppelten Streptavidin-Biotin-Komplex (DAKO, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten inkubiert und nach einem weiteren Spülgang mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma Aldrich, Germany) als Chromogen die spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen sichtbar gemacht (Hsu et al. 1981). Eine Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Zur Dehydrierung durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe sowie 3 mal 10 Minuten Xylol und wurden anschließend mit einem Deckglas versehen.

#### **2.4.5 Kontrollen**

Bei Negativkontrollen ersetzte eine Pufferlösung den primären Antikörper. Bei Isotypenkontrollen (IgG1 kappa, Dako, Glostrup, Dänemark) wurde der Primärantikörper durch ein Immunglobulin der gleichen Spezies und Klasse ersetzt, dessen variable Region jedoch ein nicht im Menschen vorkommendes Epitop erkennt. Hiermit können unspezifische Bindungen des Fc-Teils der jeweiligen Antikörperklasse ausgeschlossen werden. Die Konzentration entsprach dabei der, des zu kontrollierenden Antikörpers.

#### **2.5 Lichtmikroskopische Auszählung und Auswertung**

Die Auswertung erfolgte an einem Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland). Als positive Farbreaktion wurden Zellen gewertet, die das jeweilige Antigen, mit dazugehörigem Farbniederschlag entweder im Zytoplasma oder auf der Zellmembran erscheinen ließen. Netrin-1 als lösliches Protein wurde dabei, so fern eine Reaktion stattgefunden hat in beiden Kompartimenten gewertet. DCC wird in den Zytoplasmata der Zellen angetroffen, Ki-67 gilt als Kernprotein und wurde auch nur dort gewertet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines histologischen Scores (Tabelle 3), wobei die Intensität der Zellfärbung und die Frequenz, d.h. der Anteil positiv gewerteter

Zellen an der Gesamtheit der ausgewerteten Zellpopulation, auswertbare Größen darstellten. Die Präparate, die der MIB-1-Färbung unterzogen wurden, erhielten in der Auswertung nur eine Zuordnung zur Frequenz der angefärbten Zellen.

**Tabelle 3:** Histologischer Score

	0	1	2	3	4
Intensität	keine	schwach	mittel	stark	
Frequenz	0-1%	1-10%	10-25%	25-50%	>50%

Die Auszählung wurde an allen ausgewählten Regionen der fetalen, sowie der adulten Gruppe vorgenommen. Bei den fetalen Gehirnen konnte nicht immer eindeutig entschieden werden, ob die positiv erscheinenden Zellen neuronalen oder glialen Ursprungs waren. Intravaskuläre Zellen wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

## 2.6 Statistische Methoden

In einem linearen Regressionsmodell wurden die Zielvariablen (Frequenz und Intensität) in Abhängigkeit von der erklärenden Variablen (Region) beschrieben und mittels einer anschließenden einfaktoriellen Varianzanalyse auf Unterschiede getestet. Als Schätzmethode wurde die Methode der kleinsten Quadrate angewandt und anschließend individuelle paarweise Vergleiche für die Mittelwerte der kleinsten Quadrate mittels Tukey-Kramer-Test durchgeführt. Um eine Assoziation des fetalen Alters mit der Zielvariablen (Frequenz und Intensität) zu untersuchen, wurde eine ordinale logistische Regression durchgeführt. Anschließend wurde mittels des likelihood-ratio Chi-Quadrat Tests die Hypothese überprüft, dass die x-Variable (Schwangerschaftswoche) keinen Effekt auf die Zielvariable hat. Der Vergleich des Expressionslevels der untersuchten Faktoren in verschiedenen Regionen wurde mittels Kontingenz-Analyse und nachfolgendem likelihood-ratio Chi-Quadrat Test durchgeführt. Für alle Untersuchungen wurde ein alpha-Signifikanzniveau von 0,05 gewählt. Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms JMP 7.0.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen**

Immunhistochemische Färbungen wurden mit dem Antikörper MIB-1 als Proliferationsmarker gegen das Kernprotein Ki-67, sowie Antikörpern gegen das axonale Lenkungsmolekül Netrin-1 und dessen Rezeptor DCC durchgeführt.

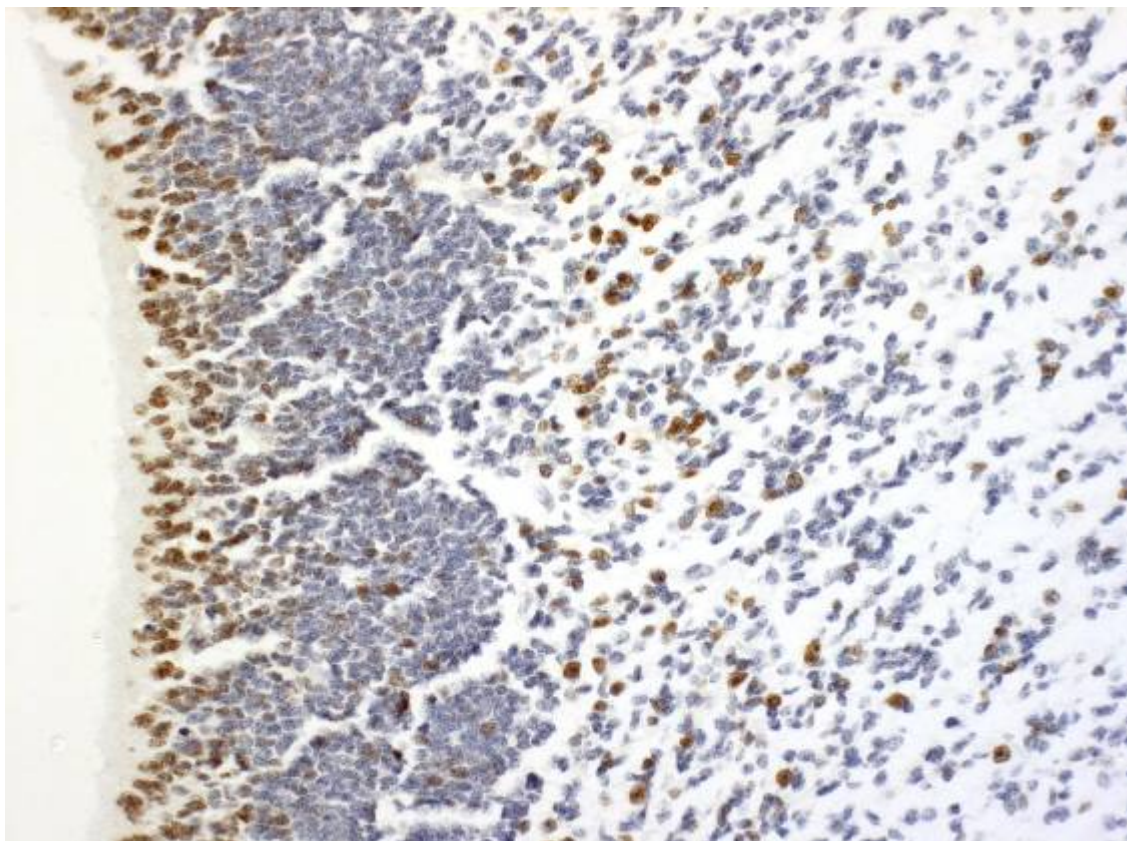
##### **3.1.1 Proliferation im fetalen Großhirn**

Das Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung mit dem Antikörper MIB-1 gegen das Ki-67-Antigen stellte sich als feingranuläre Färbung im Bereich des Kerns dar. Aktivität des Ki-67-Kernproteins konnte vor allem in der Ventrikulärzone, Subventrikulärzone, sowie in Intermediärzone und Ganglienhügel beobachtet werden (Abbildung 7-9 zeigen jeweils Beispiele sehr hoher Expression). Das Ependym und der Plexus choroideus zeigen ebenfalls sehr hohe Proliferationsraten, wobei Gefäße und Leptomeningen nur vereinzelt proliferative Aktivität zeigten.

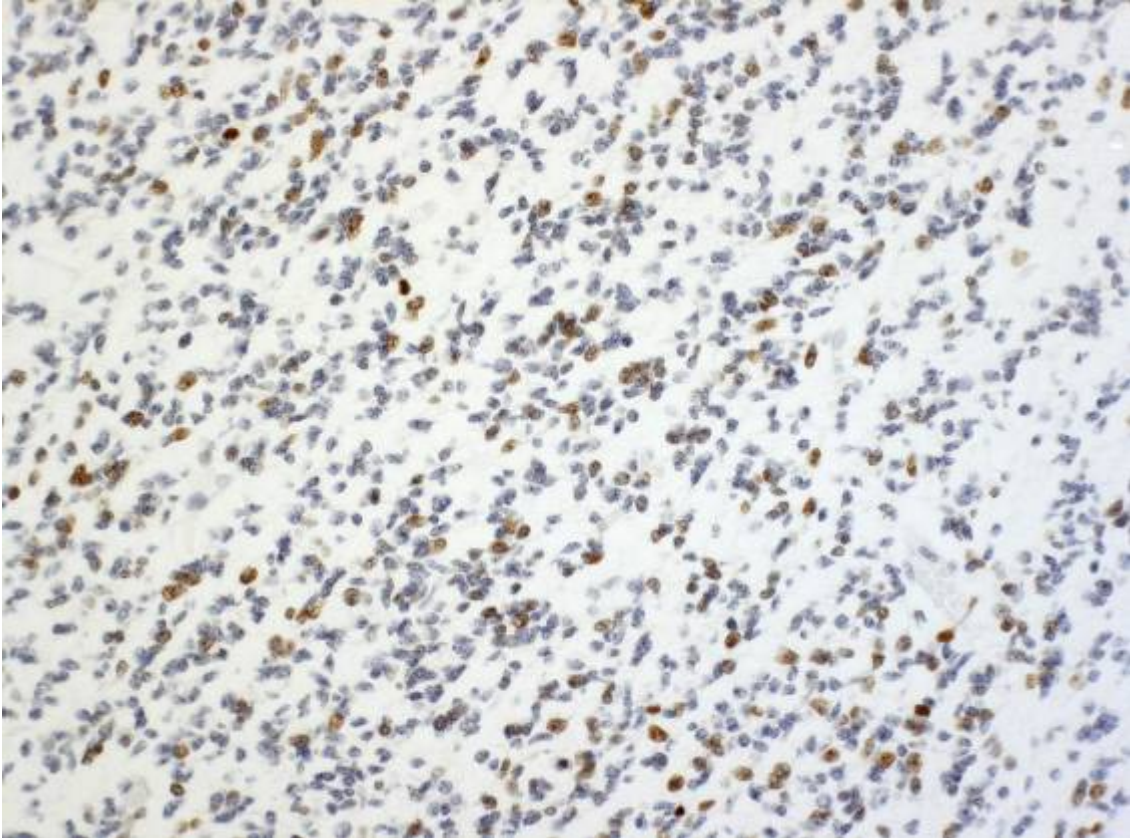
##### **3.1.1.1 Proliferation in den fetalen Rindenschichten**

Zunächst werden die fetalen Rindenschichten Ventrikulärzone, Subventrikulärzone, Intermediärzone, sowie Sekundäre Rindenzone, Rindenplatte und Marginalzone besprochen. Danach folgt die Betrachtung der restlichen Großhirnregionen, die in die Auswertung eingingen; der Ganglienhügel, der Plexus choroideus der Seitenventrikel, das Ependym, die Gefäße, die Leptomeningen und das Striatum.

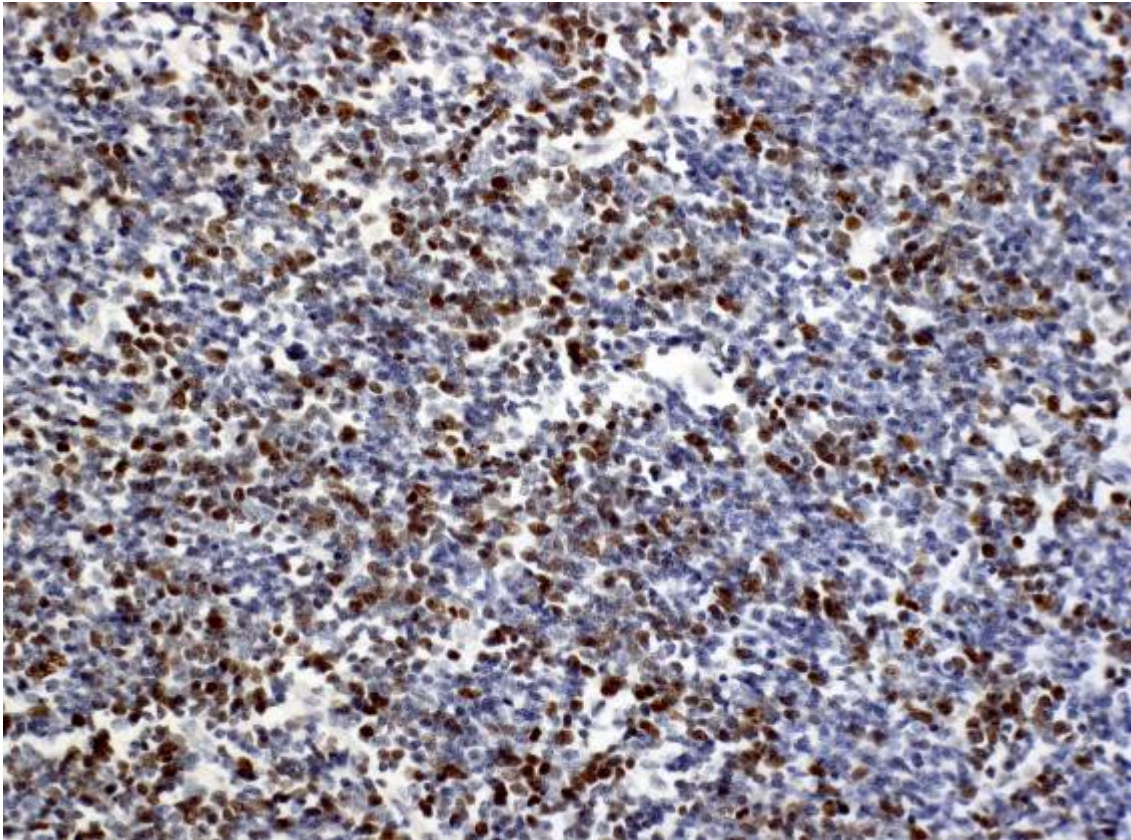




**Abbildung 7:** MIB-1-Färbung in Ventrikulärzone und Subventrikulärzone des fetalen Großhirns (14. SSW). 200-fache Vergrößerung.



**Abbildung 8:** MIB-1-Färbung in der Intermediärzone des fetalen Großhirns (14. SSW). 200-fache Vergrößerung.



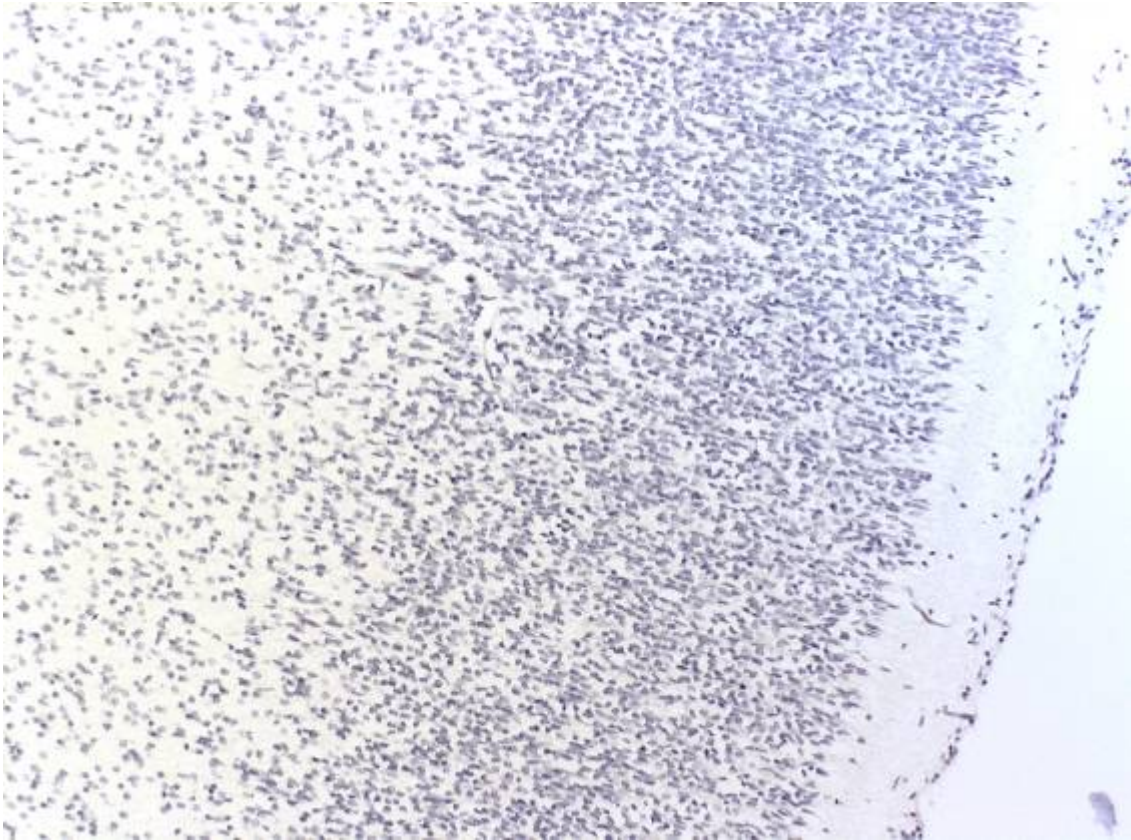
**Abbildung 9:** MIB-1-Färbung Ganglienhügel fetales Großhirn (16. SSW). 200-fache Vergrößerung.

Bei der Auswertung für MIB-1 erfolgte lediglich die Beurteilung der Frequenz, das heißt der prozentuale Anteil positiver Zellen, bezogen auf das Score-System.

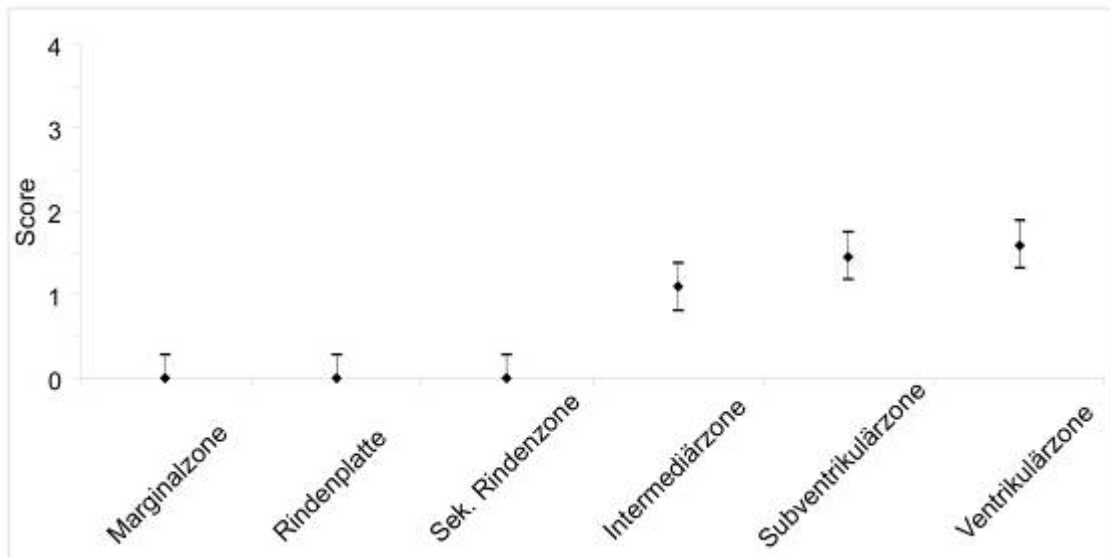
Beginnt man nun die Zonen der sich entwickelnden Großhirnrinde, Ventrikulärzone, Subventrikulärzone, Intermediärzone, Sekundäre Rindenzone, Rindenplatte und Marginalzone isoliert zu betrachten, so konnten folgende Werte ermittelt werden (siehe dazu auch Diagramm 1).

Die Ventrikulärzone erreichte mit 1,59 als Mittelwert (KI 1,31 bis 1,87) den höchsten Wert, Subventrikulärzone (1,45 mit KI 1,17 bis 1,74) und Intermediärzone (1,09 mit KI 0,81 bis 1,37) lagen dahinter. Die Mittelwerte beziehen sich auf den erstellten Score, und entsprechen somit übertragen einer durchschnittlichen Proliferationsrate zwischen 10% und 25%. Die Sekundäre

Rindenzone, Rindenplatte und Marginalzone, zeigten keine proliferative Aktivität (Abbildung 10)



**Abbildung 10:** MIB-1-Färbung von Teilen der Sekundären Rindenzone, Rindenplatte und Marginalzone eines fetalen Großhirns (16. SSW) als Beispiel für Rindenschichten ohne Proliferationsaktivität. 100-fache Vergrößerung.



**Diagramm 1:** Mittelwerte mit zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen für die Frequenz der MIB-1-Färbung einzelner Rindenschichten im fetalen Großhirn.

Die Gegenüberstellung der einzelnen Mittelwerte für die Rindenschichten erbrachte folgende Ergebnisse. Die Ventrikulärzone, Subventrikulärzone und Intermediärzone zeigten dabei jeweils eine signifikant höhere Proliferationsrate im Vergleich mit der Sekundären Rindenzone ( $p < 0,0001$ ), Rindenplatte ( $p < 0,0001$ ) und Marginalzone ( $p < 0,0001$ ). Der Vergleich der Mittelwerte für die MIB-1 Frequenz der Ventrikulärzone, Subventrikulärzone und Intermediärzone untereinander zeigte keinen signifikanten Unterschied.

Die Sekundäre Rindenzone, Rindenplatte und Marginalzone zeigten keine proliferative Aktivität (Abbildung 10) und somit untereinander verglichen keinen statistischen Unterschied ( $p = 1$ ).

### 3.1.1.2 Proliferation in den übrigen fetalen Großhirnregionen

Das Striatum zeigte in allen Exemplaren keine, Gefäße und Leptomeningen nur minimale MIB-1-Aktivität. Der Plexus choroideus erreichte im Mittel einen Score von 1, was einer Proliferationsrate zwischen 1% und 10% entspricht. Der Mittelwert für das Ependym lag bei 2,5 (KI 2,11 bis 2,9).

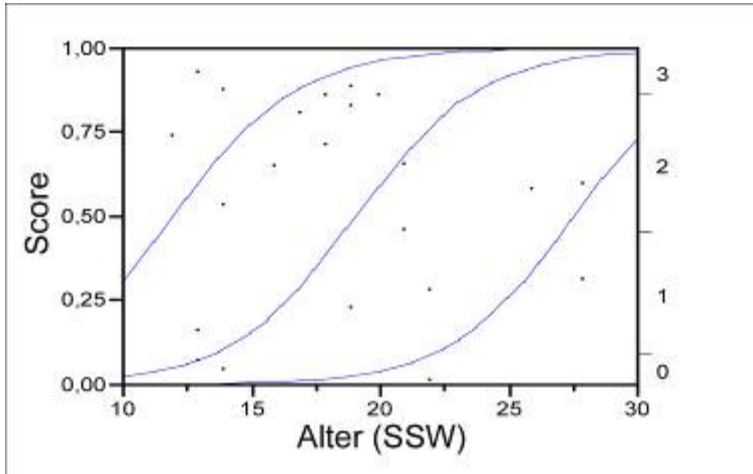
Der Ganglienhügel zeigte sich als proliferativ aktivstes Areal im fetalen Großhirn mit einem Mittelwert von 3,2 (KI 2,8 bis 3,6) und somit einer durchschnittlichen Proliferationsrate zwischen 25% und 50%.

### 3.1.1.3 Altersbezogene Proliferation

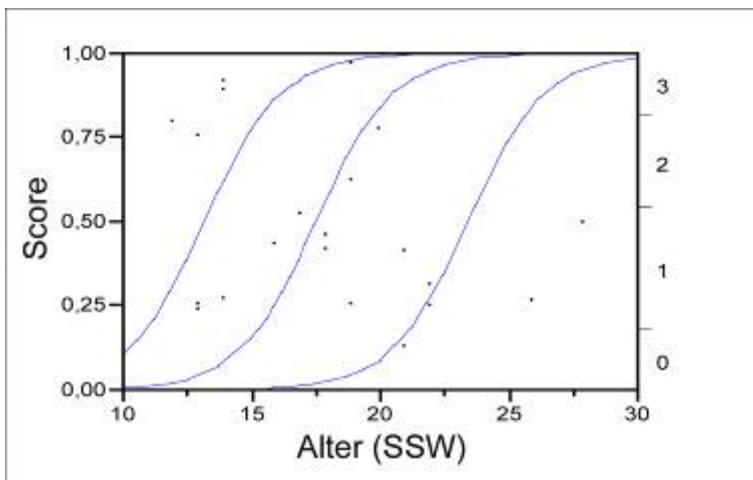
Bei der Überprüfung einer möglichen Assoziation zwischen proliferativer Aktivität (Frequenz) und Alter des Feten, wurden alle Bereiche des fetalen Großhirns, die zuvor Ki-67 Expression zeigten beurteilt.

Hierbei zeigte sich ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Alter und der MIB-1 Frequenz, im Sinne einer Aktivitätsabnahme in den Proliferationszonen Ventrikulärzone ( $p=0,0002$ ), Subventrikulärzone ( $p<0,0001$ ) und Intermediärzone ( $p=0,0009$ ), sowie im Ependym ( $p<0,0001$ ) und den Leptomeningen ( $p=0,0411$ ) (siehe dazu Diagramme 2 bis 6). Keinen statistischen Zusammenhang ergaben dabei die p-Werte für Ganglienhügel ( $p=0,7773$ ), Plexus ( $p=0,1430$ ) und Gefäße ( $p=0,5588$ ).

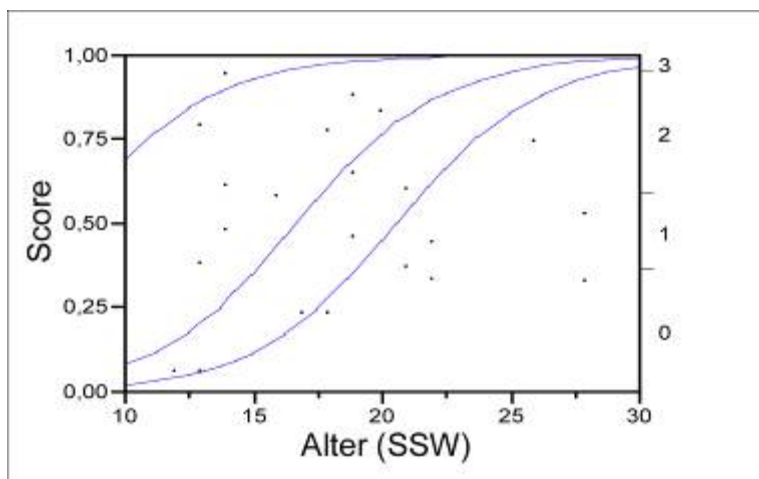
Die folgenden Diagramme stellen die kumulative logistische Wahrscheinlichkeit für unterschiedliche Score-Werte in Bezug auf das Alter für verschiedene Großhirnregionen und Antikörper dar. Um die logistische Regression darzustellen wurde der Score als nominale und das Alter als kontinuierliche Variable gewählt. Die linke y-Achse stellt die Wahrscheinlichkeit dar, der rechte y-Achsenabschnitt die relativen Anteile der Scores in Bezug auf die Gesamtpopulation. Für jeden x-Wert teilt sich die Wahrscheinlichkeitsskala (y-Achse) in die verschiedenen Wahrscheinlichkeiten für jeden einzelnen Score Wert. Die vertikalen Abstände zwischen den einzelnen Kurven summieren sich für jeden x-Wert zu einer Gesamtwahrscheinlichkeit von 1.



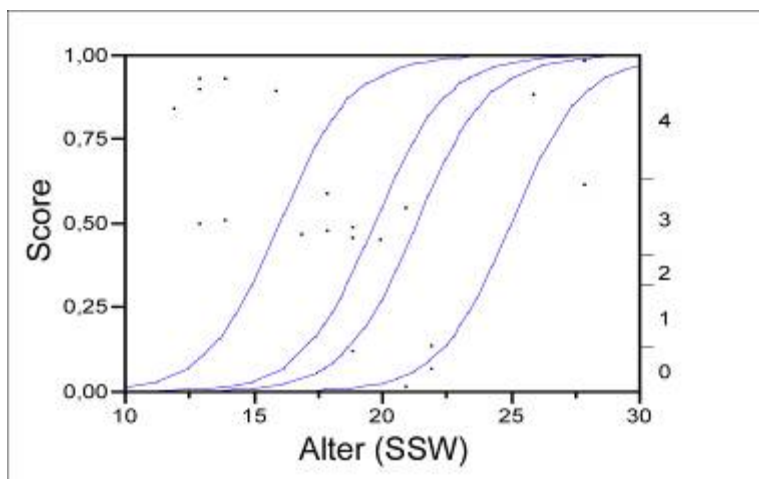
**Diagramm 2:** Frequenz für MIB-1 in der Ventrikulärzone: Mit zunehmendem Alter der Feten zeigt sich eine Abnahme der Wahrscheinlichkeit hoher Score-Werte zugunsten einer Zunahme niedriger Score-Werte. Weitere Erläuterungen siehe Text.



**Diagramm 3:** Frequenz für MIB-1 in der Subventrikulärzone

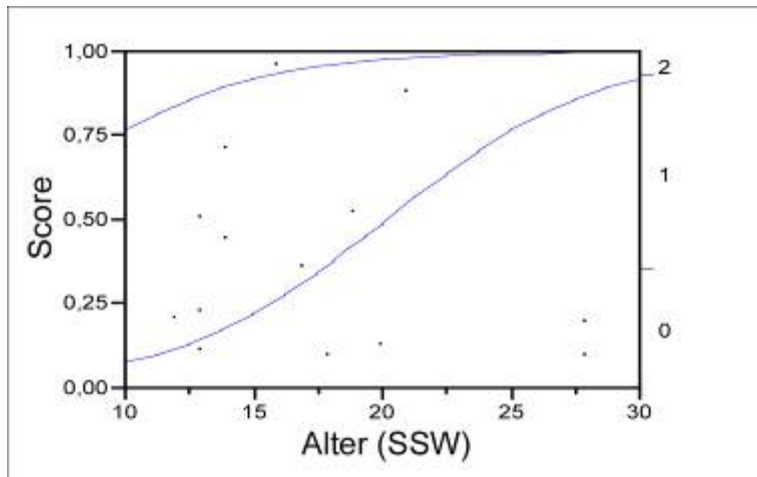


**Diagramm 4:** Frequenz für MIB-1 in der Intermediärzone



**Diagramm 5:** Frequenz für MIB-1 im Ependym

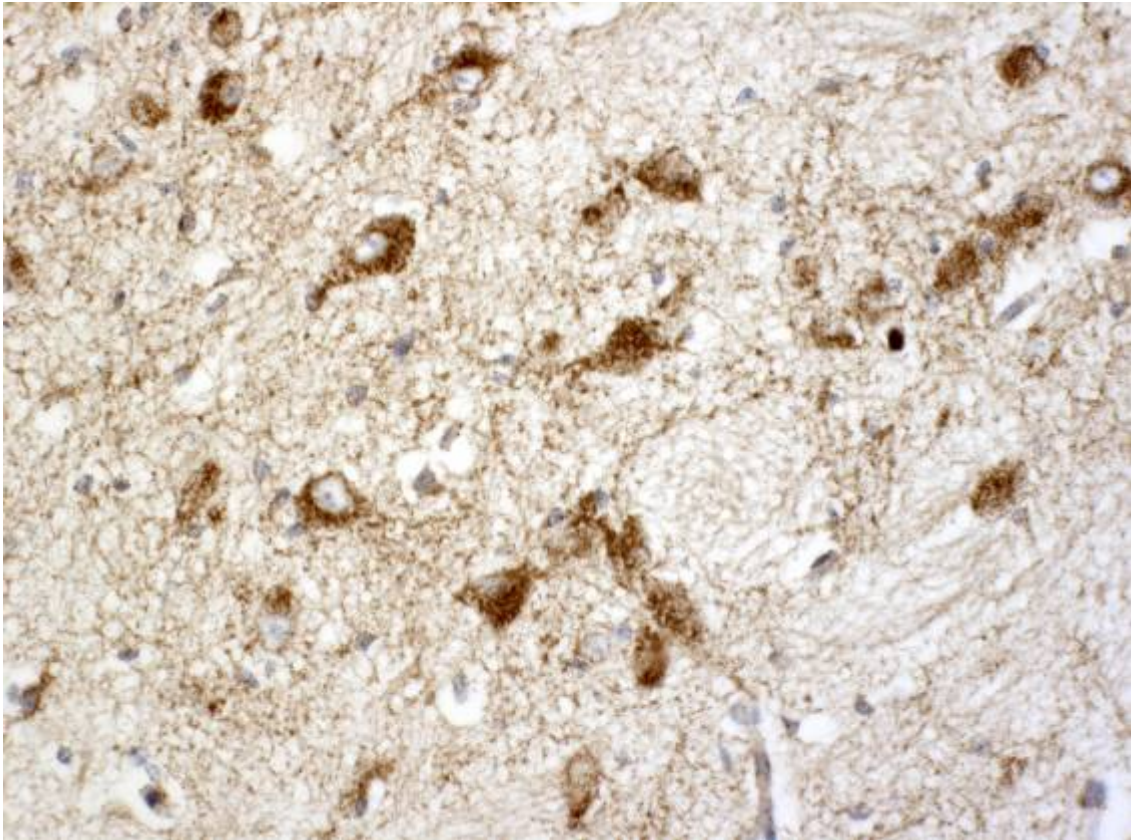




**Diagramm 6:** Frequenz für MIB-1 in den Leptomeningen

### 3.1.2 DCC-Expression im fetalen Großhirn

Zellen, die DCC exprimierten zeigten eine grobe, granuläre Anfärbung im Bereich des Zytoplasmas, sowie eine eher feine, granuläre Anfärbung in Zellfortsätzen (Abbildung 11).



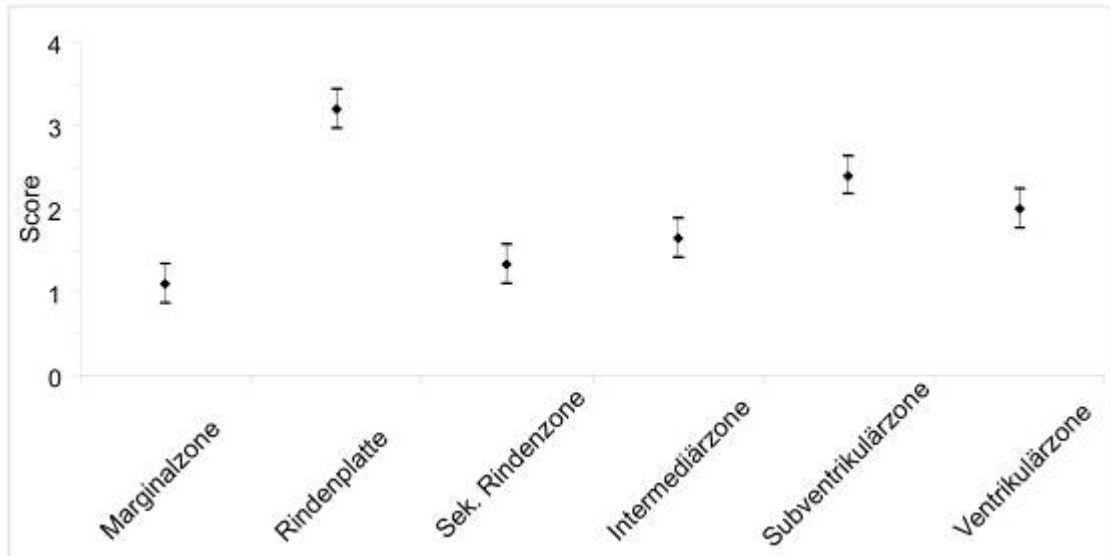
**Abbildung 11:** DCC-Färbung im fetalen Großhirn (28. SSW). Abgebildet sind Neurone im Bereich des Putamens. 400-fache Vergrößerung.

### 3.1.2.1 DCC-Expression in den fetalen Rindenschichten

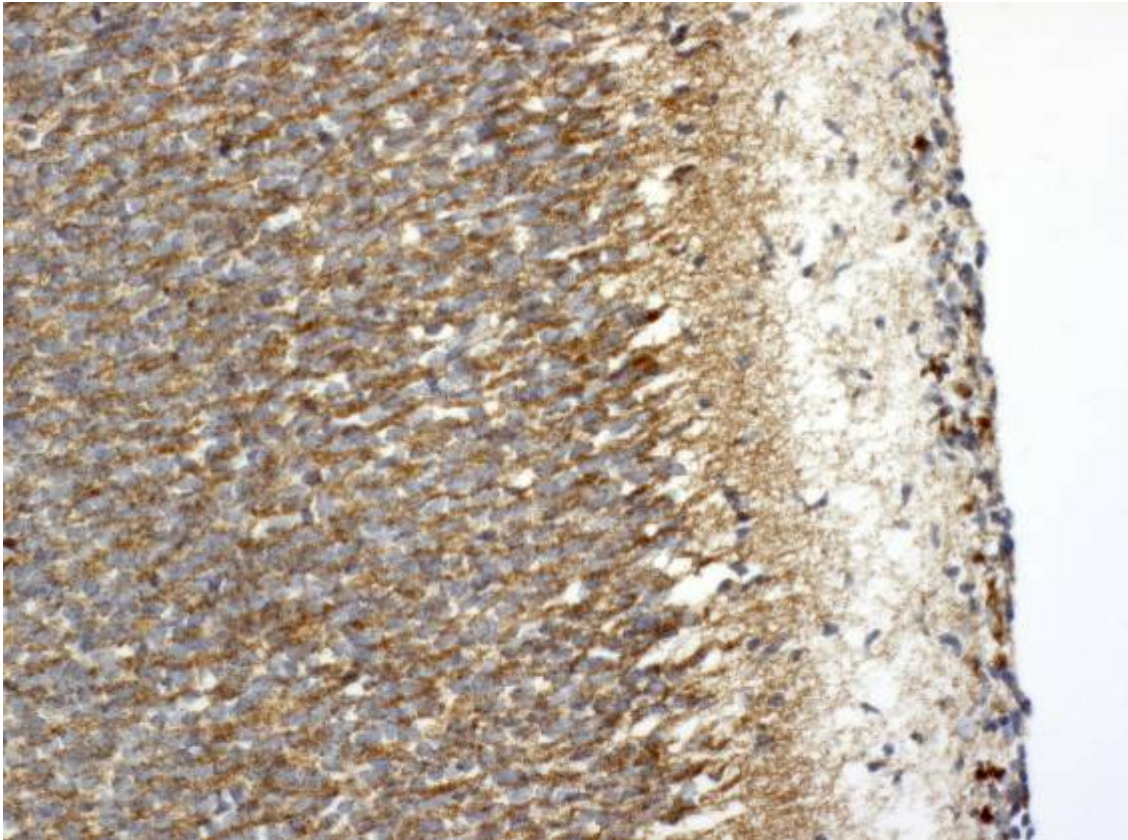
Zunächst erfolgt die Betrachtung der Rindenschichten isoliert (vergleiche MIB-1). Im Anschluss daran wird das Augenmerk auf die restlichen Großhirnregionen gelegt (Ganglien Hügel, Plexus choroideus der Seitenventrikel, Ependym, Gefäße, Leptomeningen und Striatum), die in die Auswertung mit eingingen. Bei der Auswertung wurden die Frequenz und die Intensität der Färbung beurteilt.

Der höchste Mittelwert für die ermittelte Frequenz der DCC-Expression (Diagramm 7) im Bereich der sechs beurteilten Rindenschichten lag dabei mit 3,2 (KI 2,97 bis 3,43) in der Rindenplatte (Abbildung 12). Die Subventrikulärzone (2,4 mit KI 2,17 bis 2,63) und die Ventrikulärzone (2,0 mit KI 1,77 bis 2,23) folgten. Die Intermediärzone zeigte einen Mittelwert von 1,65 (KI

1,42 bis 1,88). Zonen mit dem niedrigsten Mittelwert bildeten die Sekundäre Rindenzone (1,33 mit KI 1,09 bis 1,58) und die Marginalzone (1,1 mit KI 0,87 bis 1,33).



**Diagramm 7:** Mittelwerte mit zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen für die Frequenz der DCC-Färbung einzelner Rindenschichten im fetalen Großhirn.

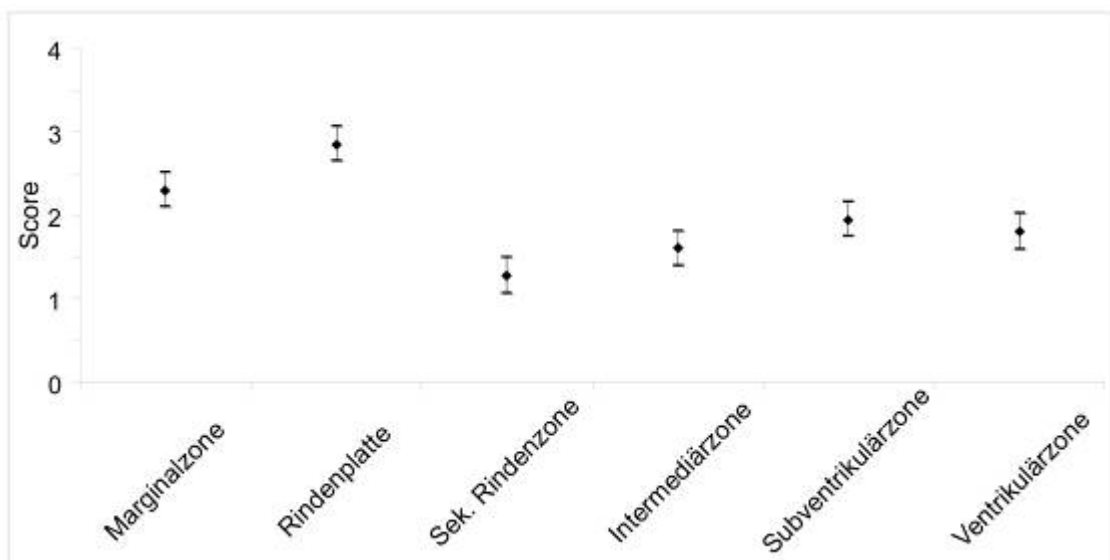


**Abbildung 12:** DCC-Färbung der fetalen Rindenplatte mit Marginalzone (16. SSW). 200-fache Vergrößerung.

Anschließend, paarweise Vergleiche für die Mittelwerte der kleinsten Quadrate zeigten folgende Unterschiede bezogen auf die Frequenz der DCC-Expression. Die Ventrikulärzone zeigte nur gegenüber der Marginalzone eine signifikant höhere DCC-Frequenz ( $p < 0,0001$ ), wohingegen die Subventrikulärzone sowohl der Marginalzone gegenüber, als auch der Sekundären Rindenzone gegenüber höhere DCC-Frequenzen zeigte (jeweils  $p < 0,0001$ ). Die Intermediärzone, die Sekundäre Rindenzone, sowie die Marginalzone zeigten keine signifikant höheren Mittelwerte für die DCC-Frequenz verglichen mit den restlichen Rindenschichten. Die Rindenplatte erreichte als einzige Rindenschicht gegenüber allen weiteren fünf Rindenschichten statistisch signifikant höhere Werte (jeweils  $p < 0,0001$ ).

Bezüglich der Intensität der DCC-Färbung zeigte sich in den sechs Rindenschichten folgendes Bild. In den drei Keimzonen konnten keine signifikanten Unterschiede untereinander ermittelt werden. Die Subventrikulärzone erzielte als einzige der drei Keimzonen einen signifikant höheren Wert gegenüber einer Rindenschicht. Im Vergleich mit der Sekundären Rindenzone zeigte sich  $p < 0,0001$ . Die bezüglich der Frequenz der DCC-Färbung eher schwache Marginalzone zeigte in der Ausprägung Intensität signifikant höhere Werte im Vergleich mit der Intermediärzone ( $p < 0,0001$ ) und der Sekundären Rindenzone ( $p < 0,0001$ ). Die Rindenplatte zeigte wiederum gegenüber den drei Keimzonen, sowie gegenüber der Sekundären Rindenzone jeweils signifikant höhere Werte ( $p < 0,0001$ ).

Betrachtet man die Mittelwerte des Scores für die Intensität der DCC-Expression isoliert für jede einzelne Rindenschicht (Diagramm 8), so zeigt sich auch hier der größte Wert in der Rindenplatte (2,85 mit KI 2,64 bis 3,06). Marginalzone (2,3 mit KI 2,09 bis 2,51), Subventrikulärzone (1,95 mit KI 1,74 bis 2,16), Ventrikulärzone (1,8 mit KI 1,59 bis 2,01) sowie Intermediärzone (1,6 mit KI 1,39 bis 1,81) und die Sekundäre Rindenzone (1,28 mit KI 1,06 bis 1,5) folgen.



**Diagramm 8:** Mittelwerte mit zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen für die Intensität der DCC-Färbung einzelner Rindenschichten im fetalen Großhirn.

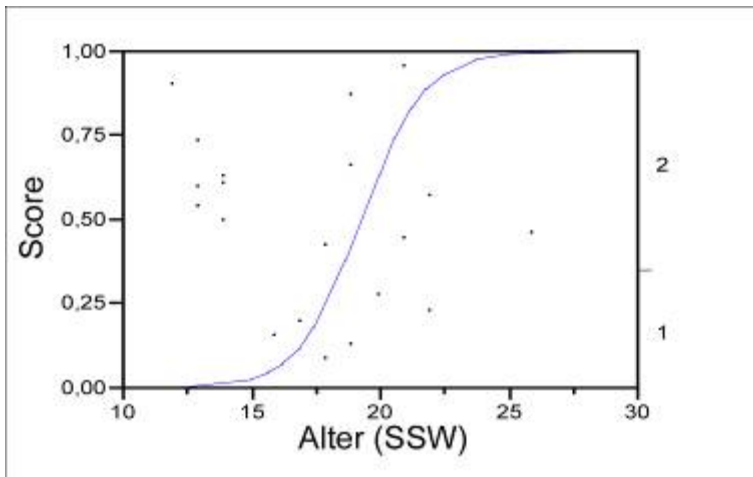
### 3.1.2.2 DCC-Expression in den übrigen fetalen Großhirnregionen

Die, darüber hinaus betrachteten Regionen des fetalen Großhirns zeigten folgende Mittelwerte bezüglich Frequenz und Intensität.

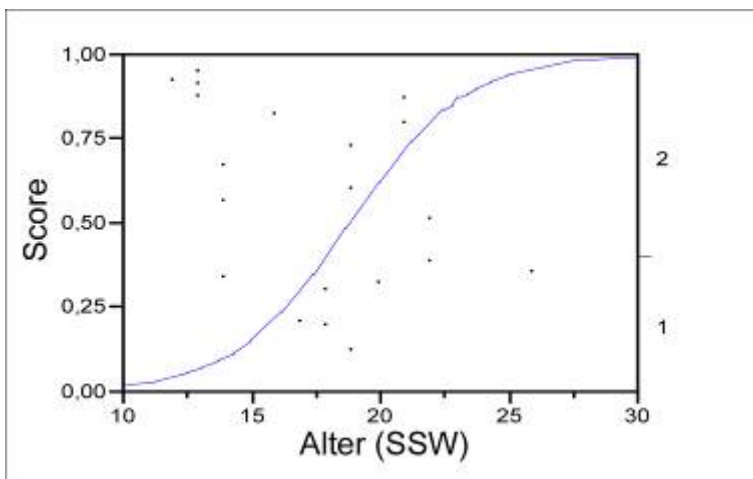
Den höchsten prozentualen Anteil an gefärbten Zellen brachten dabei der Plexus choroideus (Score-Mittelwert 4,00 mit KI 3,66 bis 4,33) und das Ependym (4,00 mit KI 3,75 bis 4,25) hervor. Die Intensitäten der beiden Regionen zeigten sich ebenfalls sehr stark (Mittelwerte: Plexus 3,00 mit KI 2,73 bis 3,27; Ependym 2,64 mit KI 2,44 bis 2,84). Der Ganglienhügel (Mittelwert Frequenz 2,26 mit KI 1,99 bis 2,53; Mittelwert Intensität 2,05 mit KI 1,84 bis 2,27) und das Striatum (Mittelwert Frequenz 2,08 mit KI 1,75 bis 2,40; Mittelwert Intensität 1,69 mit KI 1,43 bis 1,95), das mit geringerer Intensität auffiel, folgten. Die Leptomeningen zeigten eine eher niedrige Frequenz (1,31 mit KI 0,98 bis 1,63) und eine eher schwache Intensität (1,31 mit KI 1,05 bis 1,57). Interessanterweise boten begutachtete Gefäße eine durchaus hohe Frequenz (2,41 mit KI 2,16 bis 2,66) mit aber schwacher bis mittlerer Intensität (1,55 mit KI 1,35 bis 1,74).

### 3.1.2.3 Fetales Alter und DCC-Expression

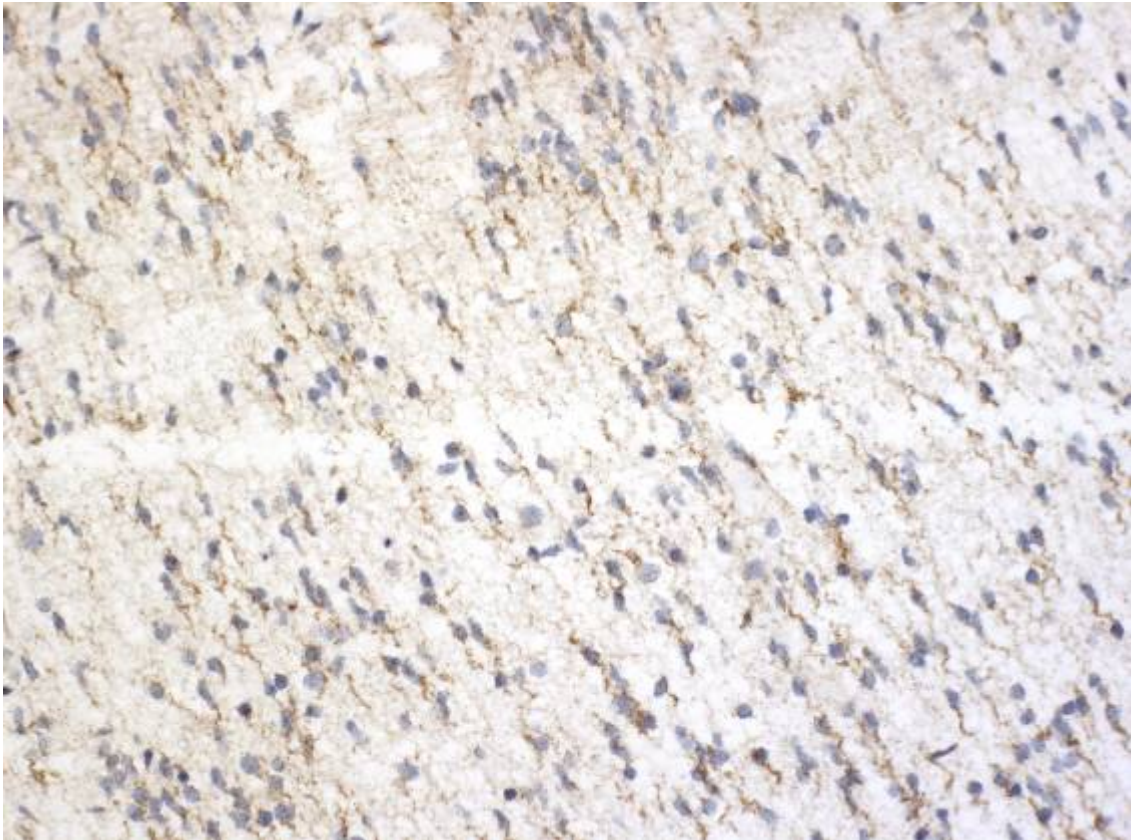
Die Frequenz und Intensität der DCC-Expression bezogen auf das Alter des Feten zeigte innerhalb der verschiedenen begutachteten Großhirnbereiche für einzelne Areale statistisch signifikante Veränderungen. Für Frequenz und Intensität konnte eine signifikante Abnahme für DCC in der Intermediärzone ermittelt werden ( $p=0,0003$ ;  $p=0,0046$ ) (Diagramm 9 +10) (Abbildung 13). In der Sekundären Rindenzone zeigte sich ein ähnliches Muster mit signifikanten p-Werten für Frequenz und Intensität ( $p=0,0030$ ;  $p=0,0037$ ) (Diagramm 11 + 12). Weitere Größen, die eine signifikante Abnahme der DCC-Expression aufzeigten sind die Intensität der Marginalzone ( $p=0,0319$ ) und die Frequenz der Subventrikulärzone ( $p=0,0072$ ) (Diagramm 13 + 14). Das Striatum zeigte in dieser Beurteilung ebenfalls eine signifikante Abnahme in Frequenz ( $p=0,0103$ ) und Intensität ( $p=0,0239$ ) (Diagramme 15 + 16). In den restlichen fetalen Großhirnregionen hat das Alter des Feten keinen Einfluss auf die Frequenz und Intensität der DCC-Expression.



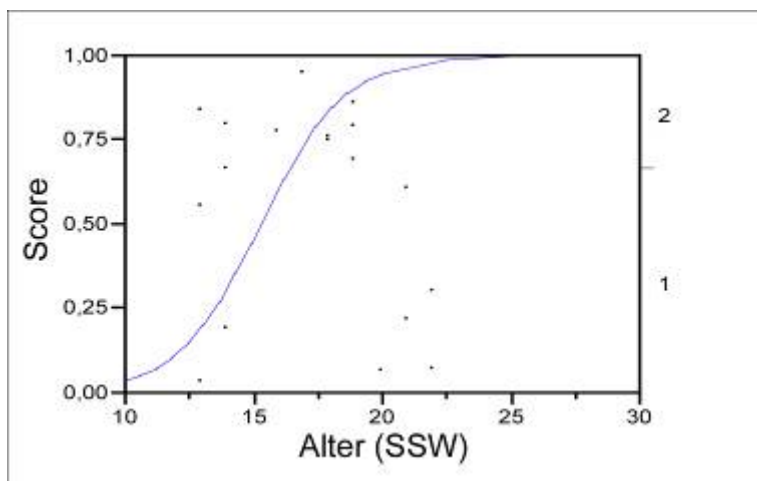
**Diagramm 9:** Frequenz der DCC-Expression in der Intermediärzone bezogen auf das Alter.



**Diagramm 10:** Intensität der DCC-Expression in der Intermediärzone bezogen auf das Alter.

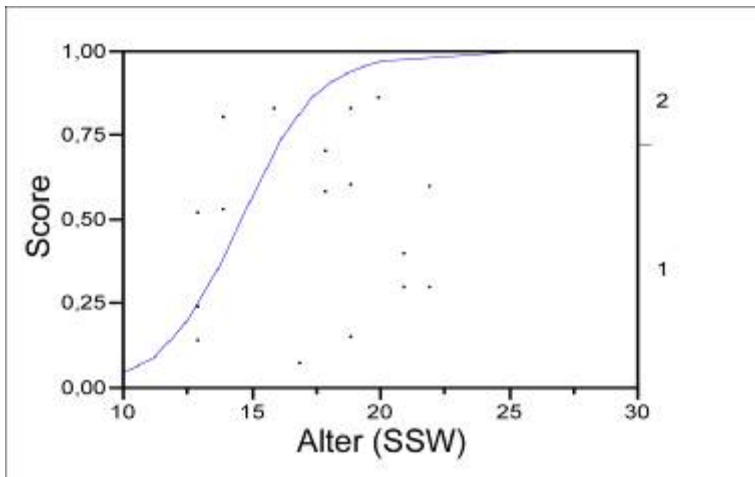


**Abbildung 13:** DCC-Färbung der Intermediärzone eines fetalen Gehirns (16. SSW). 200-fache Vergrößerung.

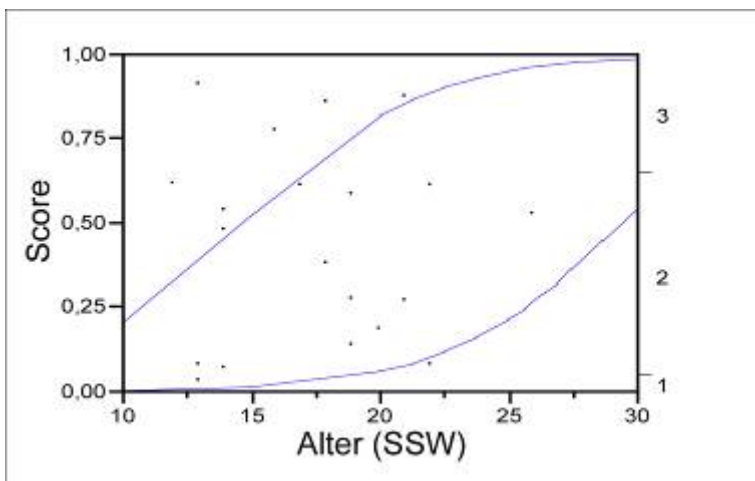


**Diagramm 11:** Frequenz der DCC-Expression in der Sekundären Rindenzone bezogen auf das Alter.

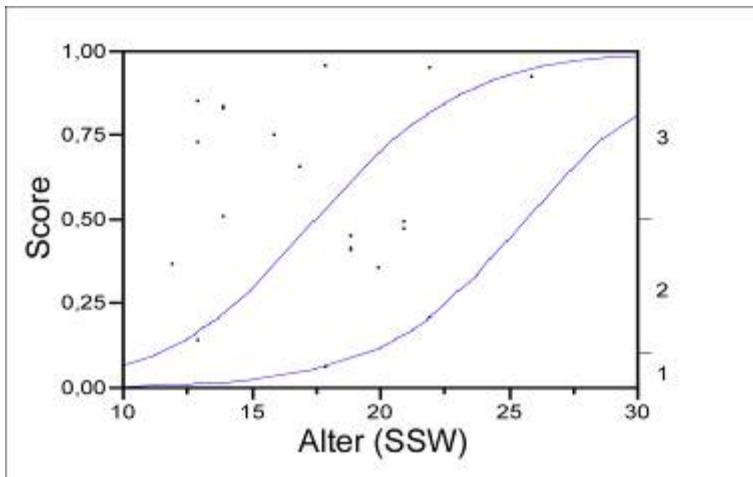




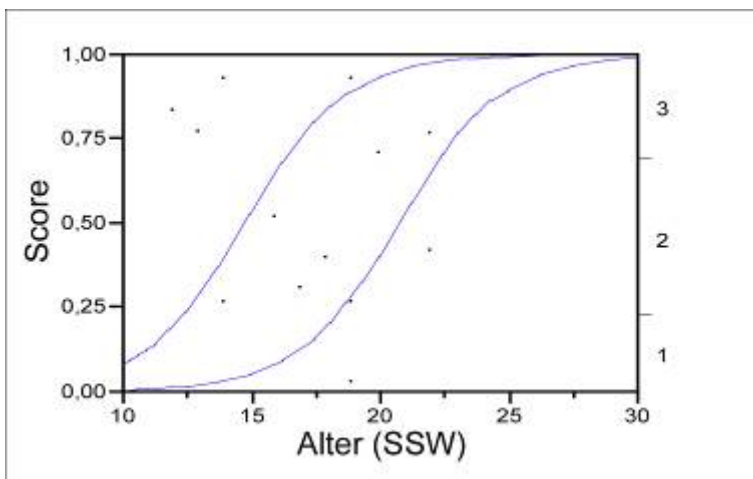
**Diagramm 12:** Intensität der DCC-Expression in der Sekundären Rindenzone bezogen auf das Alter.



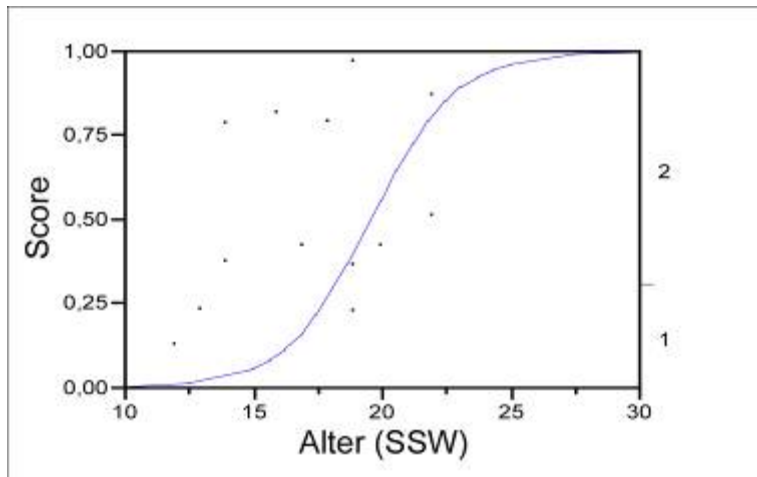
**Diagramm 13:** Intensität der DCC-Expression in der Marginalzone bezogen auf das Alter.



**Diagramm 14:** Frequenz der DCC-Expression in der Subventrikulärzone bezogen auf das Alter.

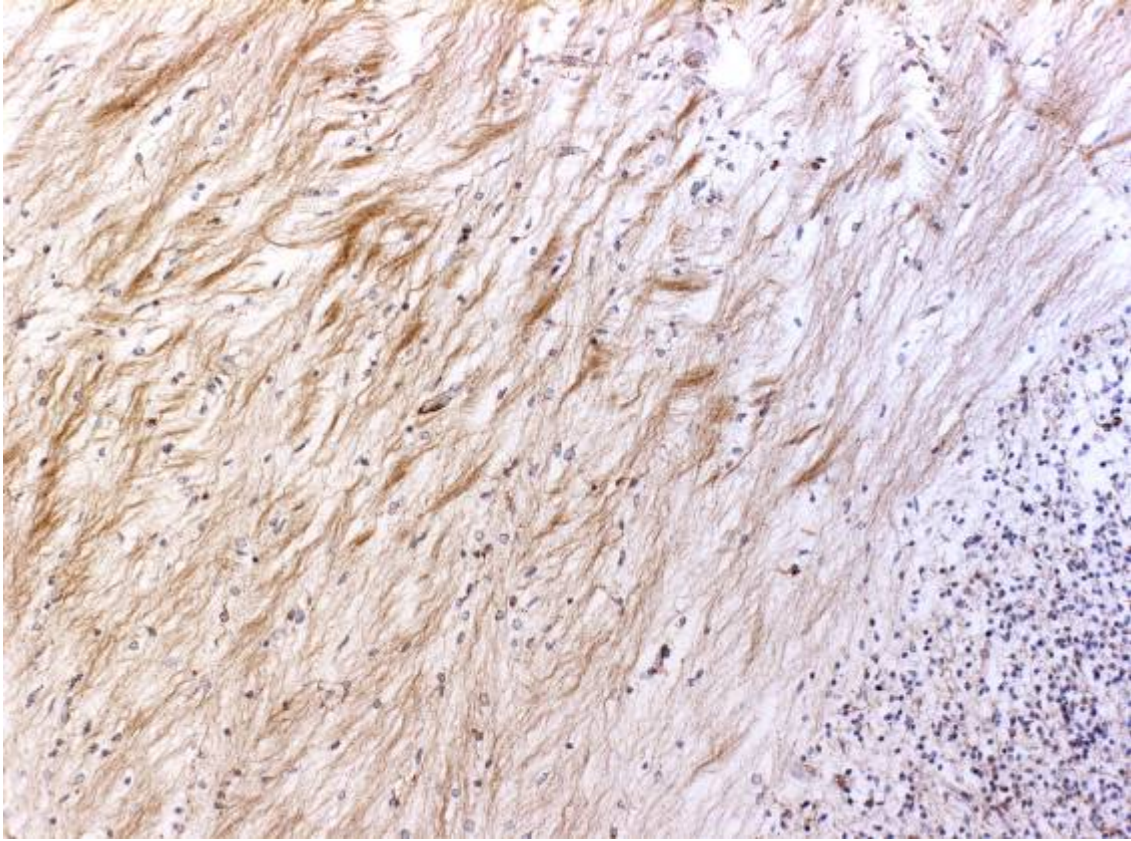


**Diagramm 15:** Frequenz der DCC-Expression im Striatum bezogen auf das Alter.

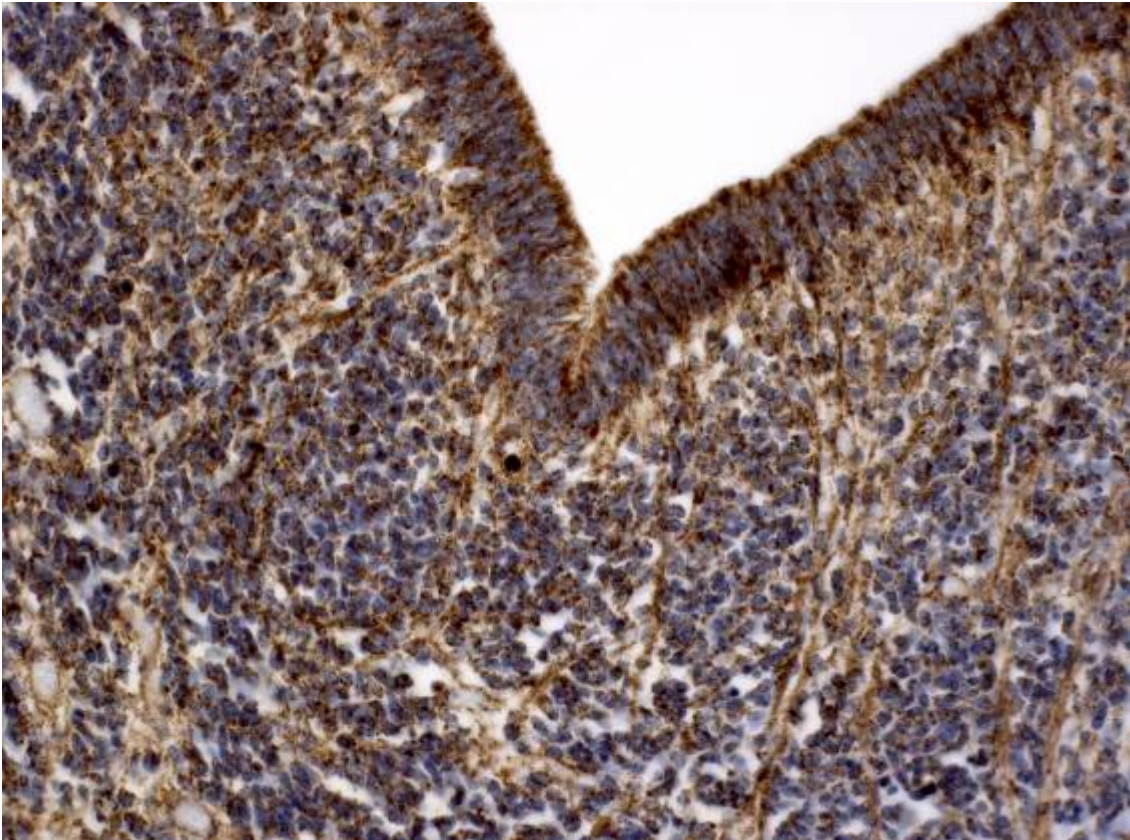


**Diagramm 16:** Intensität der DCC-Expression im Striatum bezogen auf das Alter.

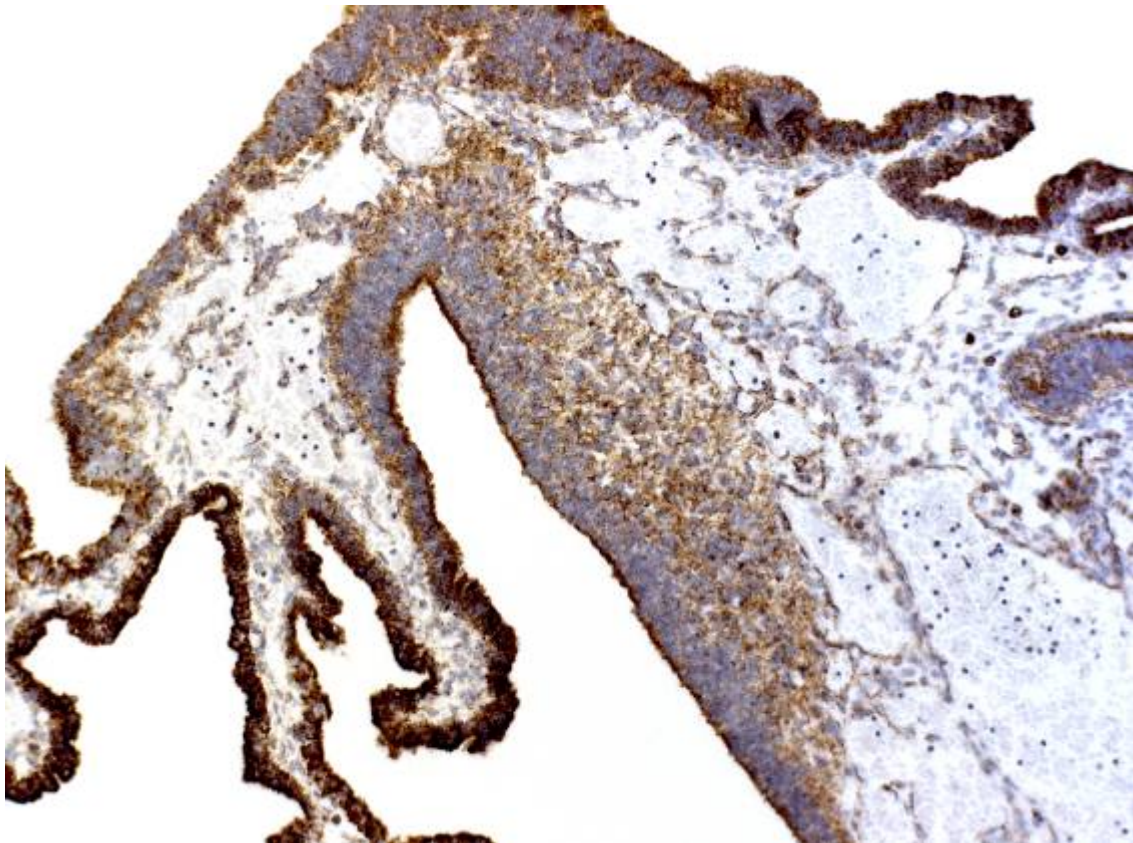
Bei der Auswertung für DCC imponierten darüber hinaus, neben Faserzügen im Bereich der Inneren Kapsel (Abbildung 14), auch der Ganglienhügel mit starker DCC-Expression, vor allem an Zellausläufern, die Richtung pialer Oberfläche gerichtet sind (Abbildung 15), sowie der Plexus choroideus der Seitenventrikel und das Ependym (Abbildung 16).



**Abbildung 14:** DCC-Färbung im fetalen Großhirn. Abgebildet sind Faserzüge in der Inneren Kapsel eines Feten (19. SSW). 100-fache Vergrößerung.



**Abbildung 15:** DCC-Färbung im fetalen Ganglienhügel mit Übergang zur Ventrikulärzone (28. SSW). 200-fache Vergrößerung. Es lassen sich im Bereich der Ventrikulärzone zahlreiche radiäre Ausläufer mit positivem DCC-Signal ausmachen.



**Abbildung 16:** DCC-Färbung im Bereich des fetalen Seitenventrikel (12. SSW). 100-fache Vergrößerung. Abgebildet ist der Übergang des Ependyms auf den Plexus choroideus des Seitenventrikels, mit jeweils starker DCC-Expression.

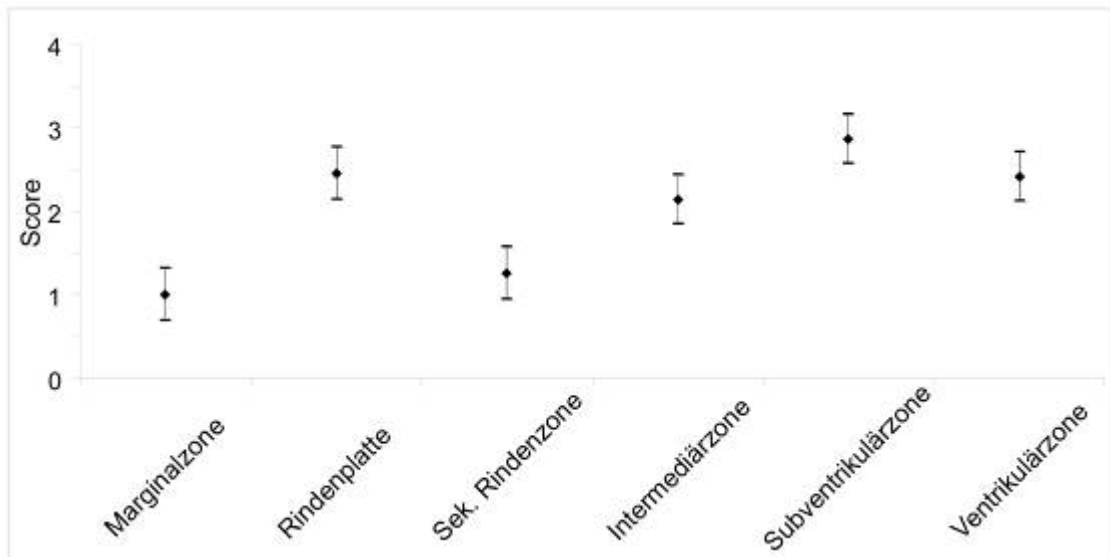
### **3.1.3 Netrin-1-Expression im fetalen Großhirn**

Netrin-1 als lösliches Molekül zeigte ein diffuseres Expressionsverhalten im fetalen Großhirn als der DCC-Rezeptor. Sowohl radiäre Zellausläufer aus den Keimzonen, Gefäßendothelien, sowie Faserzüge im Bereich der Inneren Kapsel imponierten mit klarer Farbreaktion. In den Bereichen der Rindenplatte und Marginalzone überwog eine eher diffuse Anfärbung, die Netrin-1 mehr interzellulär lokalisiert sah.

#### **3.1.3.1 Netrin-1-Expression in den fetalen Rindenschichten**

Bei der Ermittlung von Mittelwerten zeigte sich folgendes Verteilungsmuster für die Frequenz der als positiv gewerteten Zellen in den einzelnen Rindenschichten. Höchste Werte fanden sich hierbei in der Subventrikulärzone

(2,86 mit KI 2,57 bis 3,16) (Abbildung 17), Rindenplatte (2,45 mit KI 2,14 bis 2,76), Ventrikulärzone (2,41 mit KI 2,11 bis 2,71) (Abbildung 17) und Intermediärzone (2,14 mit KI 1,84 bis 2,43) (Abbildung 17). Die Marginalzone (1,00 mit KI 0,69 bis 1,31), sowie die Sekundäre Rindenzon (1,25 mit KI 0,94 bis 1,56) zeigten die schwächsten Expressionen (Diagramm 17).



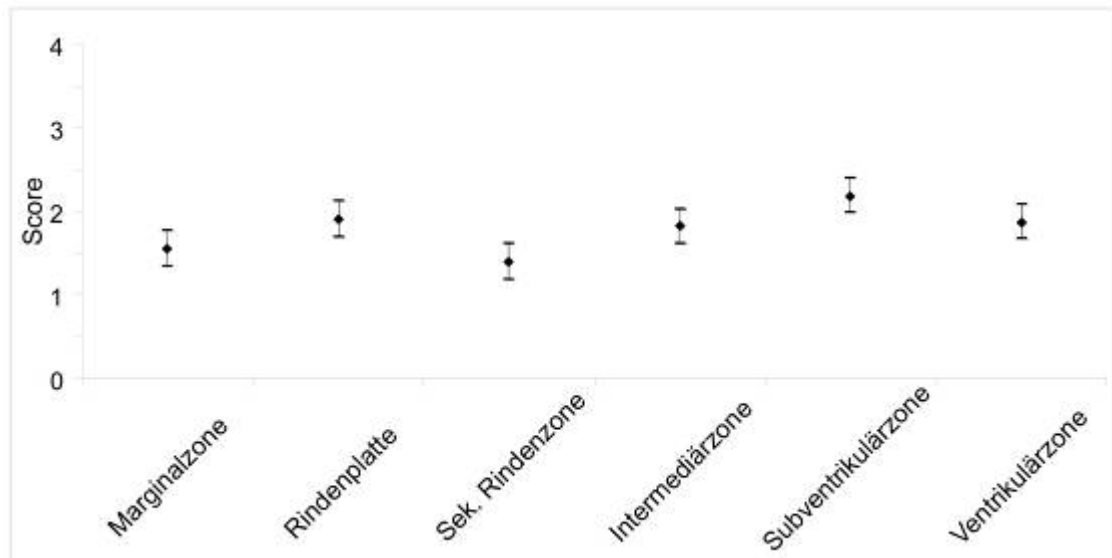
**Diagramm 17:** Mittelwerte mit zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen für die Frequenz der Netrin-1-Färbung einzelner Rindenschichten im fetalen Großhirn.



**Abbildung 17:** Netrin-1-Färbung Übergang Ventrikulärzone, Subventrikulärzone in Intermediärzone (18. SSW). 200-fache Vergrößerung.

Die Analyse der Intensität brachte ähnliche Ergebnisse hervor, die im Einzelnen wie folgt lauten. Höchste Mittelwerte fanden sich wieder in Subventrikulärzone (2,18 mit KI 1,98 bis 2,39), Rindenplatte (1,9 mit KI 1,68 bis 2,12), Ventrikulärzone (1,86 mit KI 1,66 bis 2,07) und Intermediärzone (1,81 mit KI 1,61 bis 2,02). Auch hier zeigten die Marginalzone (1,55 mit KI 1,33 bis 1,77) und die Sekundäre Rindenzone (1,40 mit KI 1,18 bis 1,62) die niedrigsten Mittelwerte für die Intensität (Diagramm 18).





**Diagramm 18:** Mittelwerte mit zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen für die Intensität der Netrin-1-Färbung einzelner Rindenschichten im fetalen Großhirn.

Anschließend paarweise Vergleiche für die Mittelwerte der kleinsten Quadrate zeigten folgende Unterschiede, zunächst bezogen auf die Frequenz der Netrin-1-Expression.

Die Marginalzone zeigte gegenüber allen weiteren vier Rindenschichten (außer gegenüber der Sekundären Rindenzone) eine signifikant niedrigere Frequenz ( $p < 0,0001$ ), ebenso zeigten sich die Vergleiche der Sekundären Rindenzone mit den restlichen vier Rindenschichten ( $p < 0,0001$ ). Die Subventrikulärzone brachte einen signifikant höheren Wert als die Intermediärzone hervor ( $p = 0,0008$ ), ansonsten fielen die Vergleiche zwischen den Rindenschichten nicht signifikant aus.

Die Analyse der einzelnen Intensitäten zeigte nur signifikant höhere Intensitäts-Mittelwerte für die Subventrikulärzone im Vergleich mit der Sekundären Rindenzone ( $p < 0,0001$ ) und der Marginalzone ( $p = 0,0001$ ). Die übrigen Vergleiche fielen nicht signifikant aus.

### 3.1.3.2 Netrin-1-Expression in den übrigen fetalen Großhirnregionen

Die darüber hinaus betrachteten Regionen des fetalen Großhirns zeigten folgende Mittelwerte bezüglich Frequenz und Intensität.

Die höchsten Mittelwerte erreichten dabei, sowohl in der Ausprägung Frequenz als auch in der Intensität der Färbung erneut das Ependym (Frequenz: 4,00 mit KI 3,77 bis 4,23; Intensität: 2,86 mit KI 2,67 bis 3,05), der Plexus choroideus (Frequenz: 4,00 mit KI 3,68 bis 4,32; Intensität: 2,58 mit KI 2,33 bis 2,84), sowie das Gefäßendothel (Frequenz: 3,95 mit KI 3,72 bis 4,19; Intensität: 2,91 mit KI 2,72 bis 3,10).

Der Ganglien Hügel (Frequenz: 3,14 mit KI 2,90 bis 3,38; Intensität: 2,24 mit KI 2,04 bis 2,43), aber auch das Striatum (Frequenz: 2,20 mit KI 1,92 bis 2,48; Intensität: 1,87 mit KI 1,64 bis 2,10) und die Leptomeningen (Frequenz: 2,29 mit KI 1,99 bis 2,58; Intensität: 1,43 mit KI 1,19 bis 1,67) zeigten Netrin-1-Expression, jedoch mit niedriger Frequenz und Intensität.

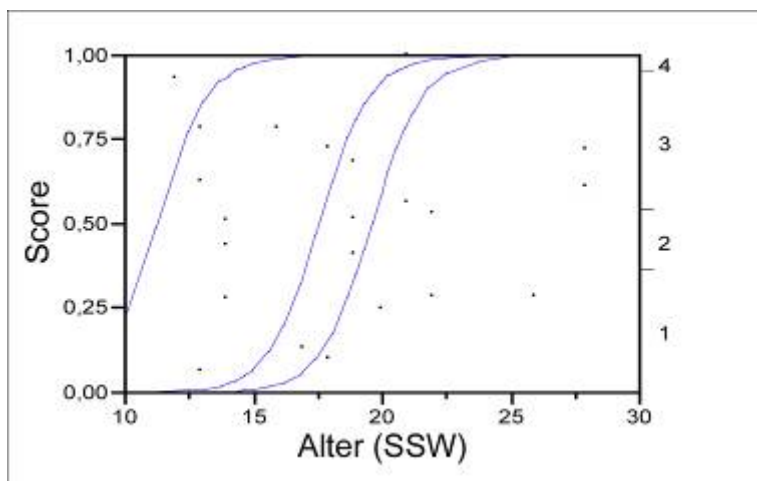
### 3.1.3.3 Fetales Alter und Netrin-1-Expression

Die Messung der Netrin-1-Expression in den Ausprägungen Intensität und Frequenz bezogen auf das Alter der Feten ergab folgende signifikante Ergebnisse, wobei die Analyse mit allen fetalen Großhirnregionen durchgeführt wurde:

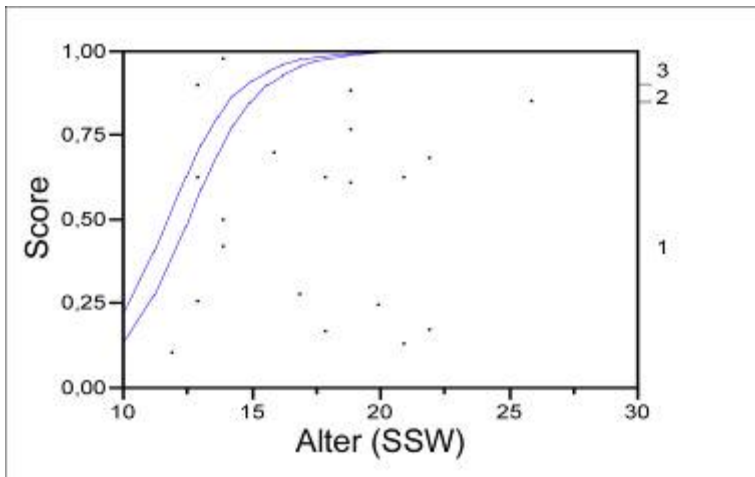
Die Frequenz der Intermediärzone (siehe auch Abbildung 18) nahm mit höchstem Signifikanzniveau ( $p < 0,0001$ ) mit dem Alter ab (Diagramm 19). Auch im Bereich der Sekundären Rindenzone ließ sich dieses Abnahmeverhalten für Frequenz ( $p = 0,0138$ ) und Intensität ( $p < 0,0001$ ) messen (Diagramm 20 + 21). Die Subventrikulärzone zeigte nur für die Frequenz ( $p = 0,0089$ ) (Diagramm 22), die Ventrikulärzone nur für die Intensität ( $p = 0,0099$ ) eine statistisch signifikante Reduktion mit zunehmendem Alter (Diagramm 23). In den restlichen fetalen Großhirnregionen hat das Alter des Feten keinen Einfluss auf die Frequenz und Intensität der Netrin-1-Expression.



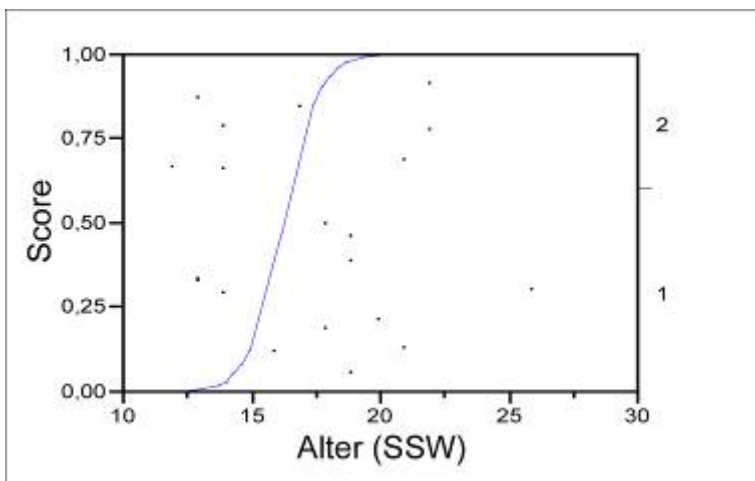
**Abbildung 18:** Netrin-1-Färbung in fetaler Intermediärzone (21. SSW). 200-fache Vergrößerung.



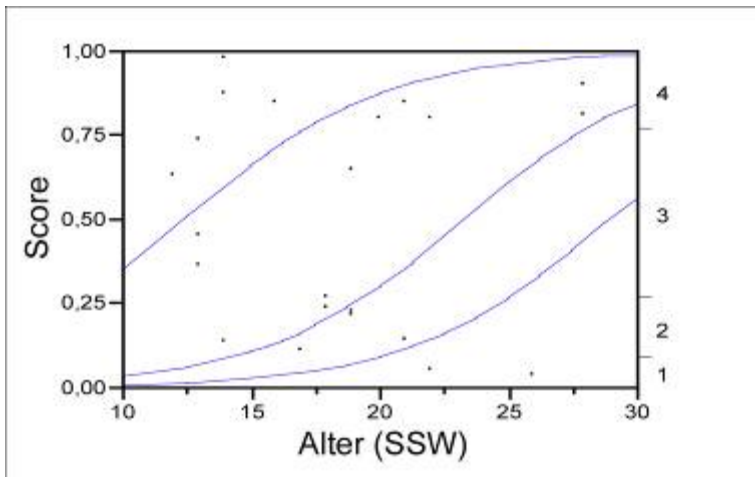
**Diagramm 19:** Frequenz der Netrin-1-Expression in der Intermediärzone bezogen auf das Alter.



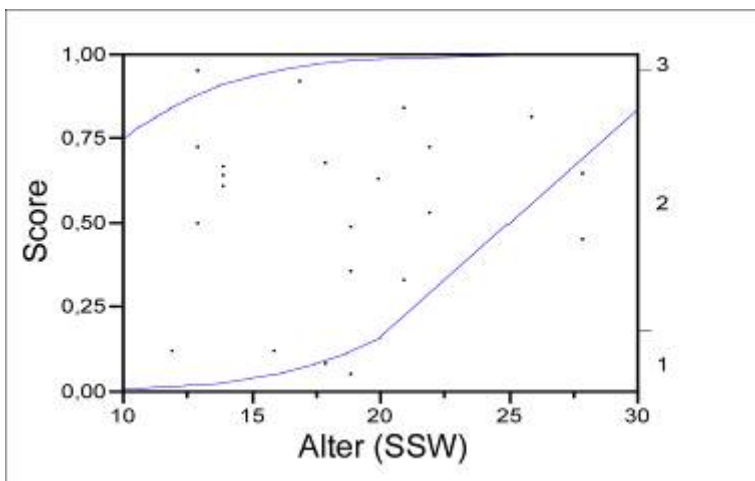
**Diagramm 20:** Frequenz der Netrin-1-Expression in der Sekundären Rindenzone bezogen auf das Alter.



**Diagramm 21:** Intensität der Netrin-1-Expression in der Sekundären Rindenzone bezogen auf das Alter.



**Diagramm 22:** Frequenz der Netrin-1-Expression in der Subventrikulärzone bezogen auf das Alter.

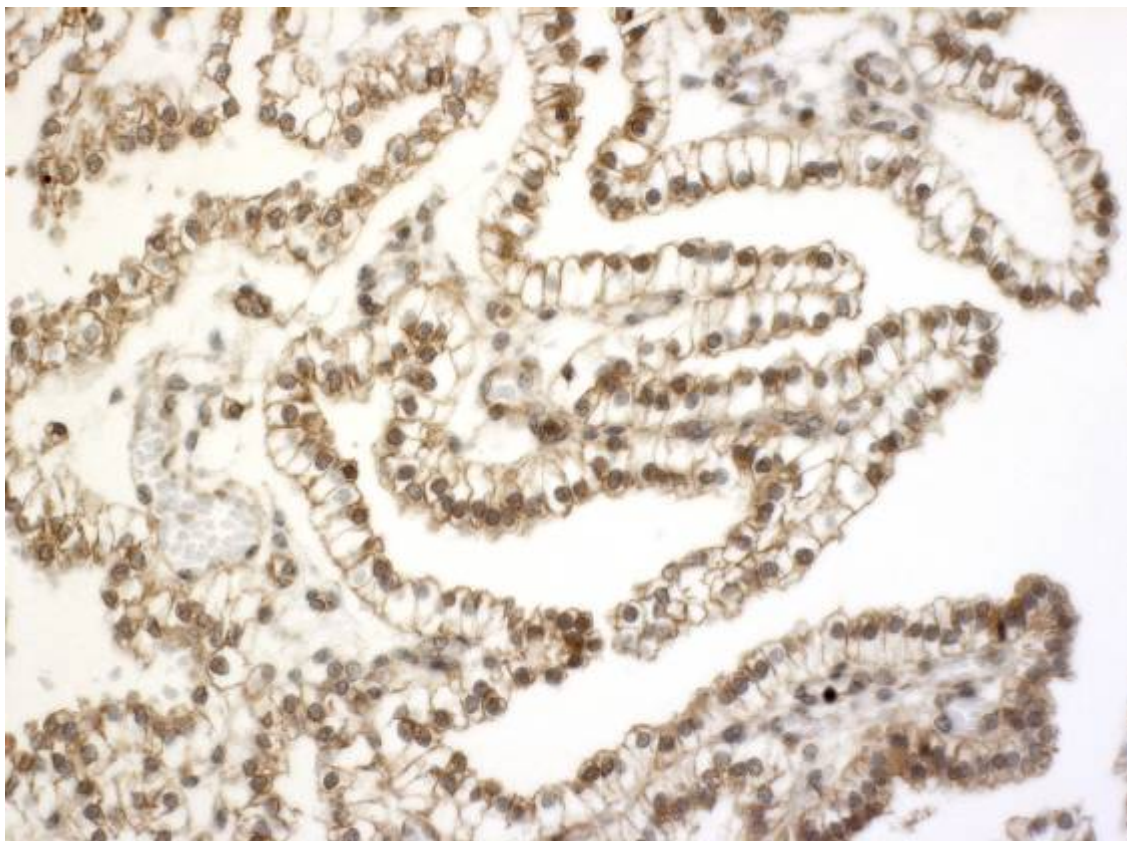


**Diagramm 23:** Intensität der Netrin-1-Expression in der Ventrikulärzone bezogen auf das Alter.

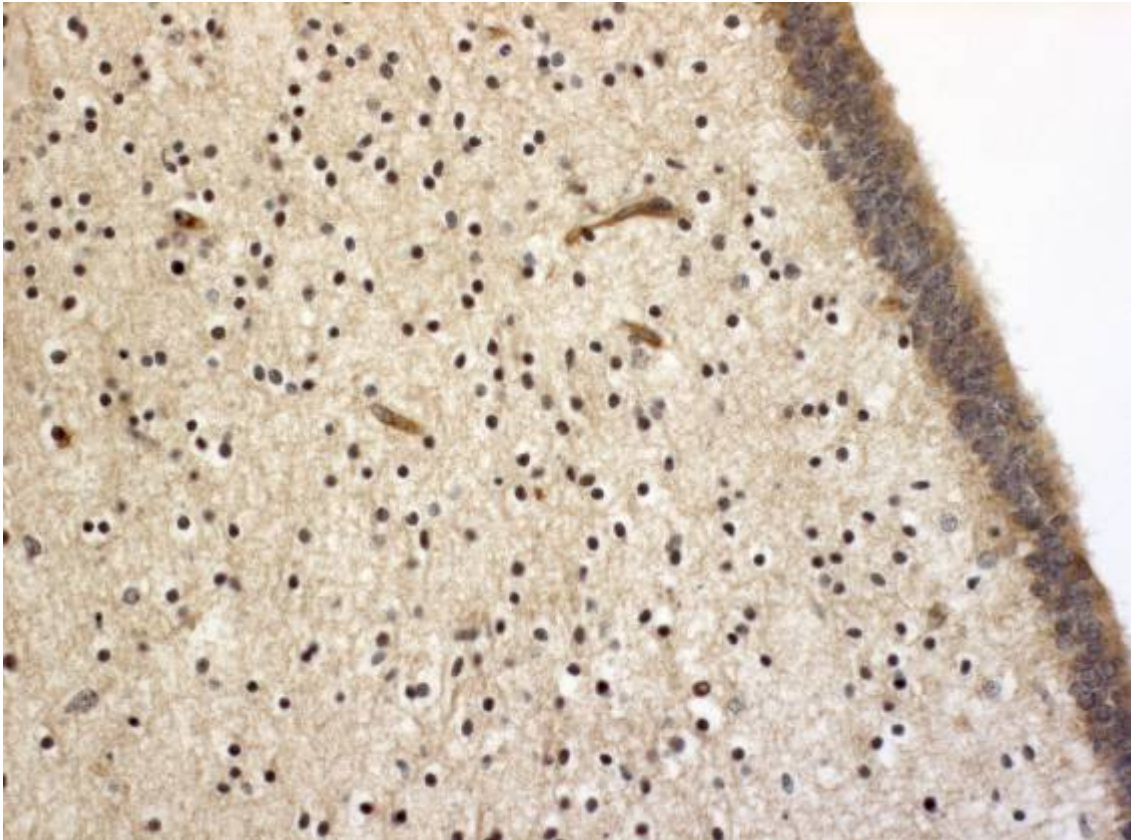
Exemplarisch für Bereiche mit starker Netrin-1-Expression folgen nun einige Abbildungen. Es handelt sich dabei um Aufnahmen aus der Inneren Kapsel (Abbildung 19), des Plexus choroideus (Abbildung 20), sowie des Ependyms (Abbildung 21) und der Gefäße (Abbildung 22). Des weiteren konnte die vordere Kommissur mit starker Netrin-1-Expression imponieren (ohne Abbildung).



**Abbildung 19:** Netrin-1-Färbung im fetalen Großhirn. Abgebildet sind Faserzüge in der Inneren Kapsel eines Feten (16. SSW). 20-fache Vergrößerung.

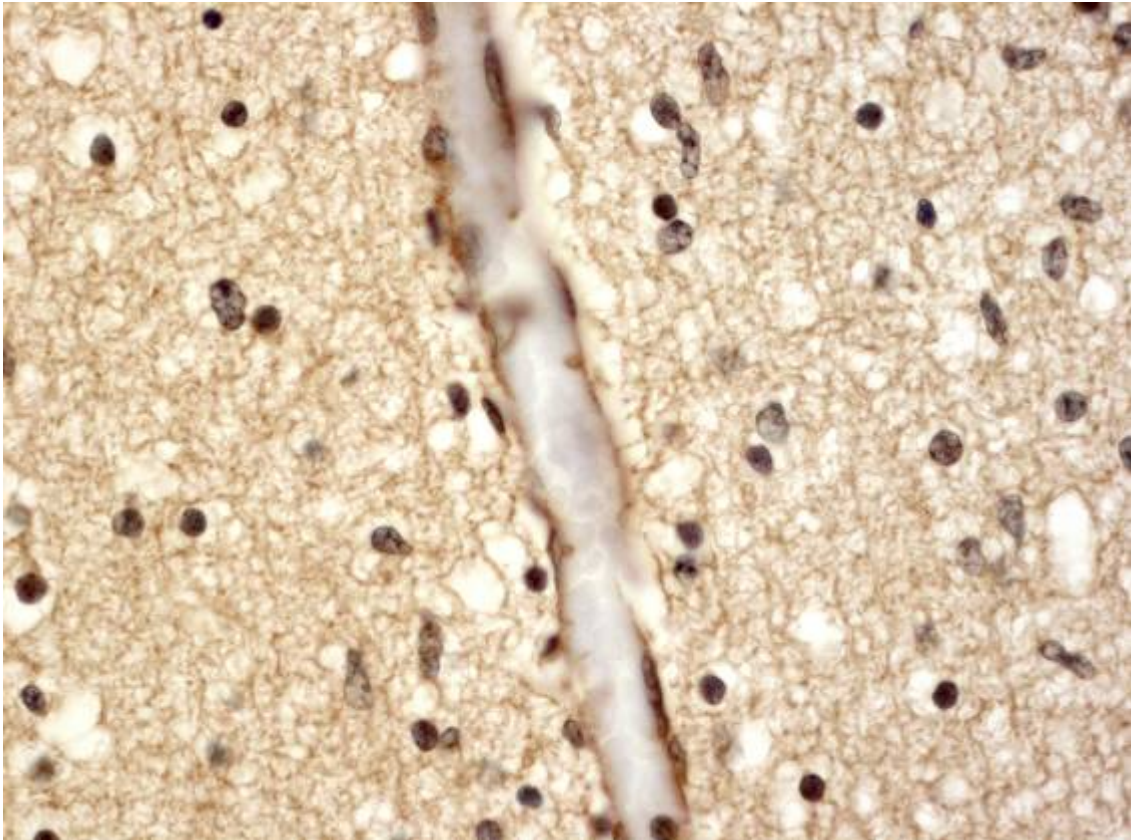


**Abbildung 20:** Netrin-1-Färbung des fetalen Plexus choroideus der Seitenventrikel (13. SSW). 200-fache Vergrößerung.



**Abbildung 21:** Netrin-1-Färbung des fetalen Ependyms (16. SSW). 200-fache Vergrößerung.





**Abbildung 22:** Netrin-1-Färbung fetaler Gefäße im Bereich der Sekundären Rindenzone (21. SSW). 400-fache Vergrößerung.

### 3.1.4 Vergleich der Expressionsmuster von DCC und Netrin-1 in verschiedenen Regionen des fetalen Großhirns

Die Kontingenz-Analyse mit nachfolgendem likelihood-ratio Chi-Quadrat Test brachte folgende Ergebnisse hervor, wobei zunächst das Augenmerk auf die Proliferationszonen der Rindenschichtung und den Ganglienhügel gelegt wird.

Im Ganglienhügel herrschen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Frequenzen ( $p=0,9408$ ) und Intensitäten ( $p=0,7350$ ) bei der Gegenüberstellung der Werte für DCC und Netrin-1. In den Vergleichen der Expression für die Ventrikulärzone (Frequenz  $p=0,5037$ ; Intensität  $p=0,8806$ ) und Subventrikulärzone (Frequenz  $p=0,0745$ ; Intensität  $0,4198$ ) zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Expressionslevel.

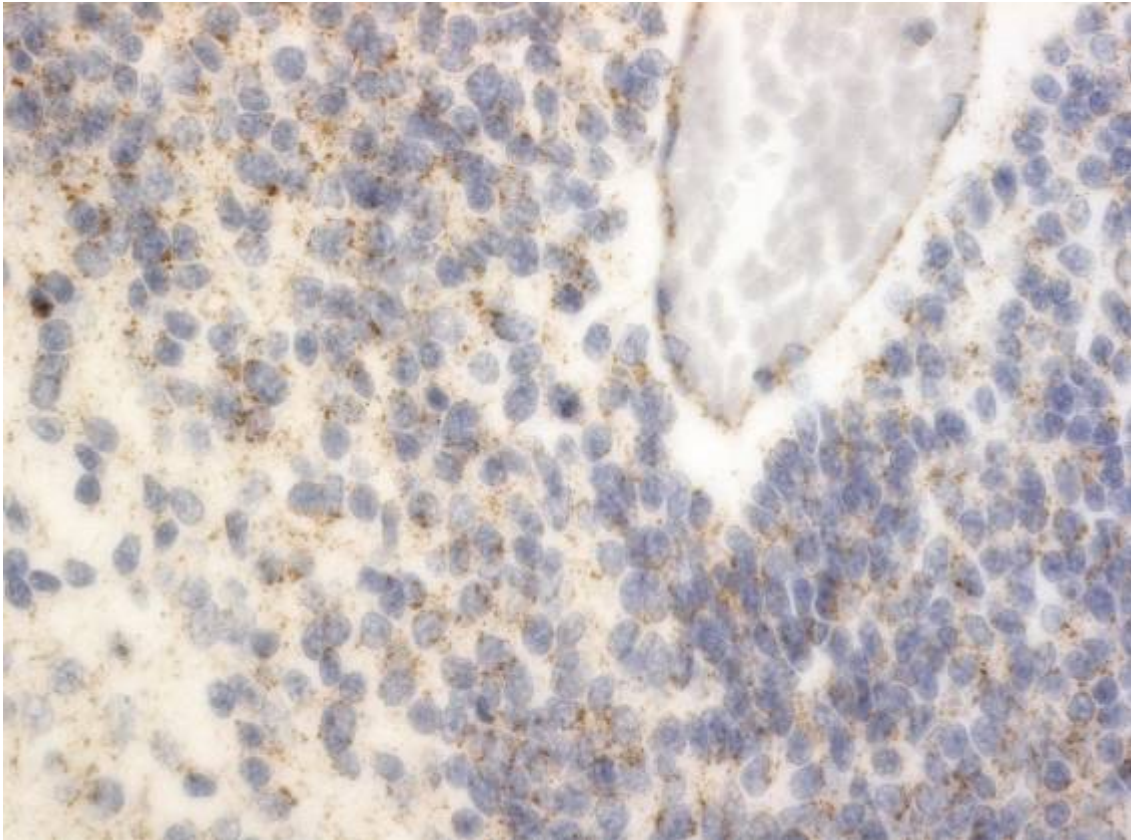
In der Intermediärzone bietet sich dagegen ein anderes Bild. Sowohl in Frequenz ( $p=0,0008$ ) und Intensität ( $p=0,0062$ ) gibt es signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten für DCC und Netrin-1, mit höheren Mittelwerten auf der Seite der Netrin-1 Expression.

Ähnliches gilt für das Expressionsmuster im Bereich der Sekundären Rindenzone. Frequenz ( $p=0,0273$ ) und Intensität ( $p=0,0265$ ) zeigen signifikante Unterschiede, ebenfalls mit höheren Mittelwerten auf der Seite der Netrin-1 Expression.

Vergleiche von Rindenplatte und Marginalzone zeigten keine signifikanten Unterschiede im Expressionsmuster.

Gefäße (Frequenz  $p=0,3128$  und Intensität  $p=0,3998$ ; Vergleiche Abbildung 22 mit Abbildung 23), der Plexus choroideus, Leptomeningen und Striatum zeigten keine weiteren signifikanten Unterschiede, weder in Frequenz noch Intensität.

Ein signifikanter Unterschied lag dagegen in ependymalen Zellen bei der Messung des p-Wertes für die Intensität ( $p=0,0137$ ) vor, der höhere Intensitätswerte ebenfalls auf Seiten der Netrin-1 Expression sah.



**Abbildung 23:** DCC-Färbung im Bereich des Ganglienhügels mit Gefäßanschnitt (20. SSW). 400-fache Vergrößerung.

### **3.1.5 Vergleich der Expressionsmuster von DCC und MIB-1 in verschiedenen Regionen des fetalen Großhirns**

Ebenfalls wurde die Analyse im Sinne des oben erläuterten Vergleichs für die Expressionslevels der Antikörper DCC und MIB-1 durchgeführt. Im Ganglienhügel, der Ventrikulärzone und Subventrikulärzone zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, wobei erneut in der Intermediärzone ein Unterschied im Sinne eines p-Wertes von 0,0296 gemessen werden konnte. Die verglichenen Werte für die Frequenz ergaben höhere Werte auf Seiten der Expression von MIB-1.

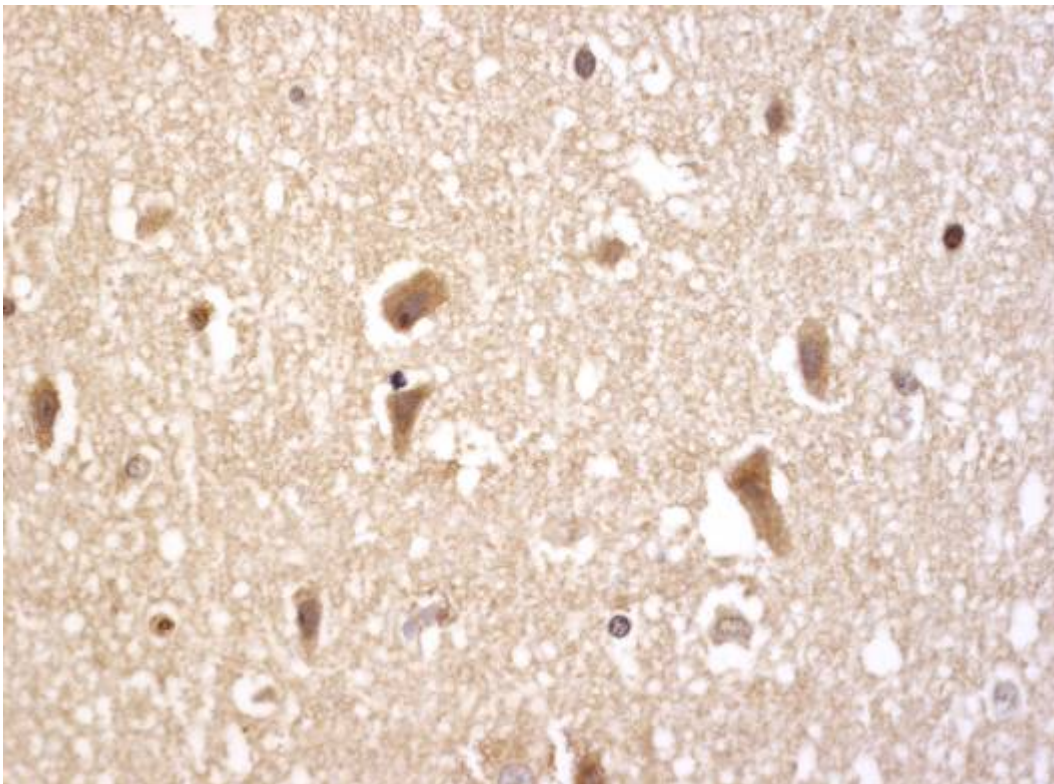
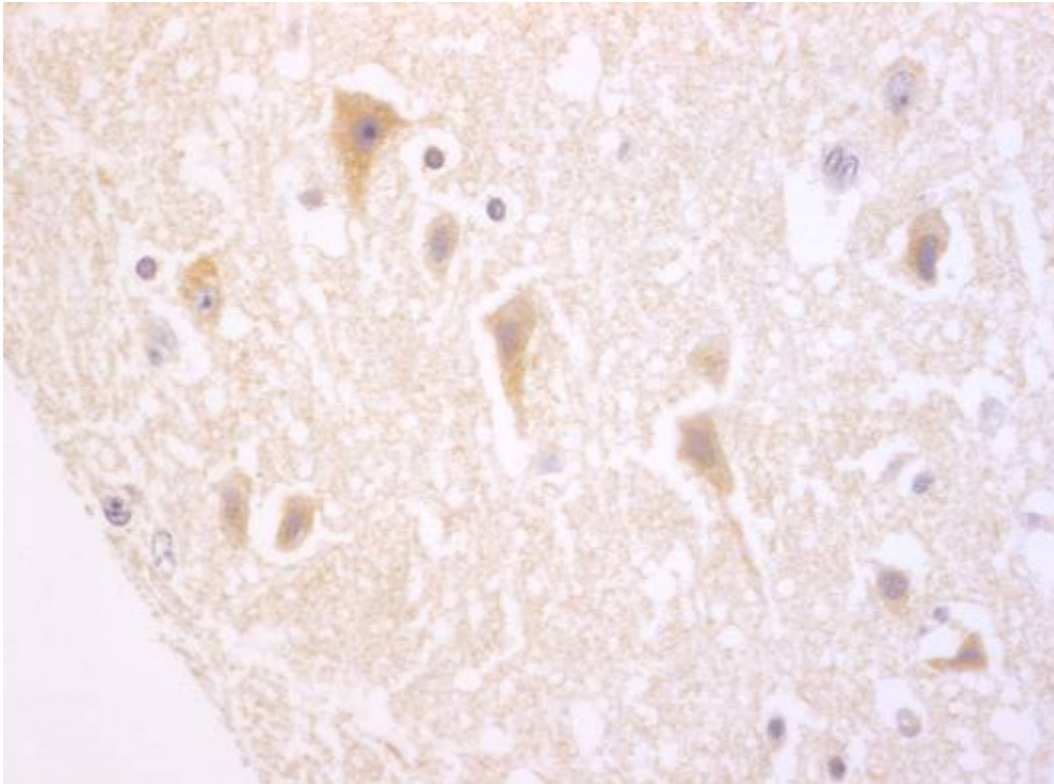
In den übrigen fetalen Großhirnregionen zeigten sich erwartungsgemäß signifikante Unterschiede, da hier keine MIB-1 Expression beobachtet wurde.

### **3.1.6 Vergleich der Expressionsmuster von Netrin-1 und MIB-1 in verschiedenen Regionen des fetalen Großhirns**

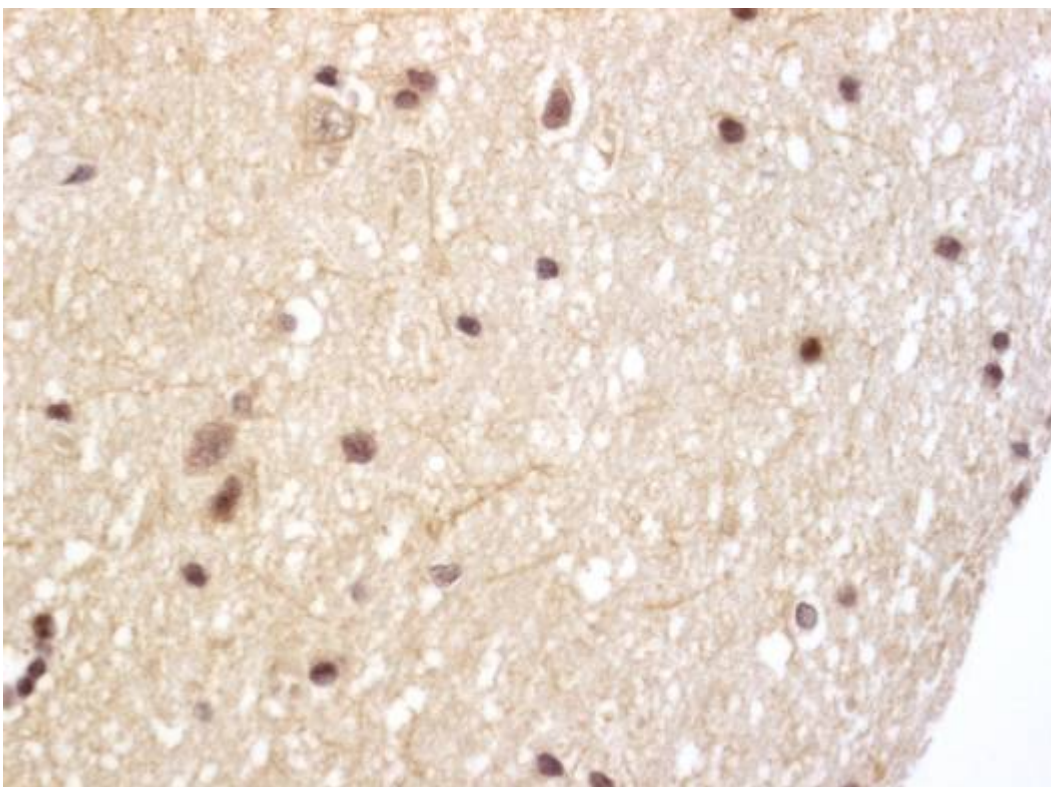
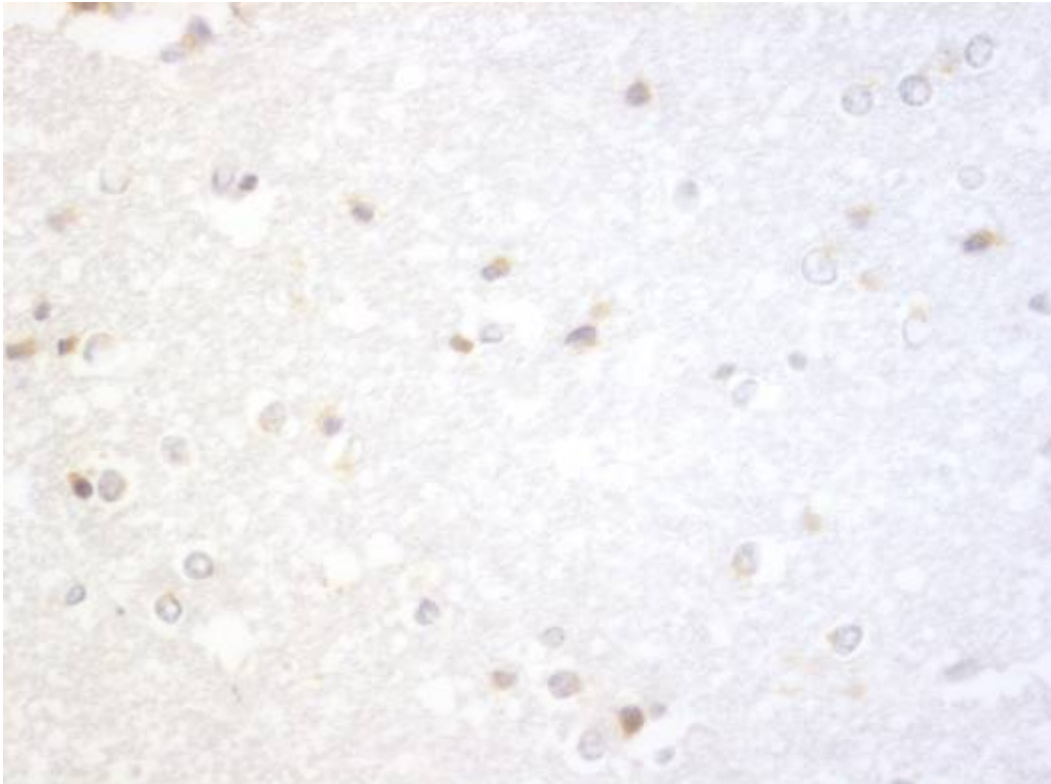
Diese Betrachtung erbrachte signifikante Unterschiede zwischen den Expressionslevels der Frequenzen für Netrin-1 und MIB-1 im Ganglienhügel ( $p=0,0044$ ), der Subventrikulärzone ( $p=0,0013$ ) und der Intermediärzone ( $p=0,0037$ ), wobei im Ganglienhügel höhere Werte für MIB-1, in der Subventrikulärzone und der Intermediärzone höhere Werte für Netrin-1 gemessen wurden. Die Ventrikulärzone zeigte keinen statistischen Unterschied. Auch hier zeigten sich die erheblichen Unterschiede im Bereich der restlichen fetalen Rindenschichten, die bekanntermaßen keine MIB-1 Expression zeigten.

### **3.1.7 Das Expressionsmuster in Mark und Rinde für DCC und Netrin-1 im adulten Gehirn**

Beschreibt man die Art der Netrin-1- und DCC-Färbung im adulten Großhirn, so fällt auf, dass die grobe granuläre Färbung, wie sie sich für DCC im Feten zeigte, im adulten Großhirn nicht zu erblicken ist. Das gesamte Muster für Netrin-1 scheint an Intensität zu verblassen. Dennoch lässt sich klar erkennen, dass sowohl im Bereich der Rinde als auch im Mark DCC und Netrin-1 zu detektieren sind. In der Rinde erkennt man sehr gut als positiv gewertete Neurone für beide Antikörper, die zytoplasmatische Färbung aufweisen (Abbildung 24). Im Bereich des Marks stellen sich teilweise Zellen mit rundem Kern und perinukleären Höfen als positiv für Netrin-1 und DCC dar, am ehesten passend zu Zellen mit oligodendroglialer Differenzierung (Abbildung 25 unten zeigt Anschnitt Mark mit Teilen der Rinde). Auch hier zeigt sich das diffuse Bild der Netrin-1 Färbung mit flächigen Anteilen im interzellulären Raum, sowie im Bereich mancher Kerne.



**Abbildung 24:** Oben: DCC Unten: Netrin-1; adulte Rinde; Vergrößerung: 400-fach

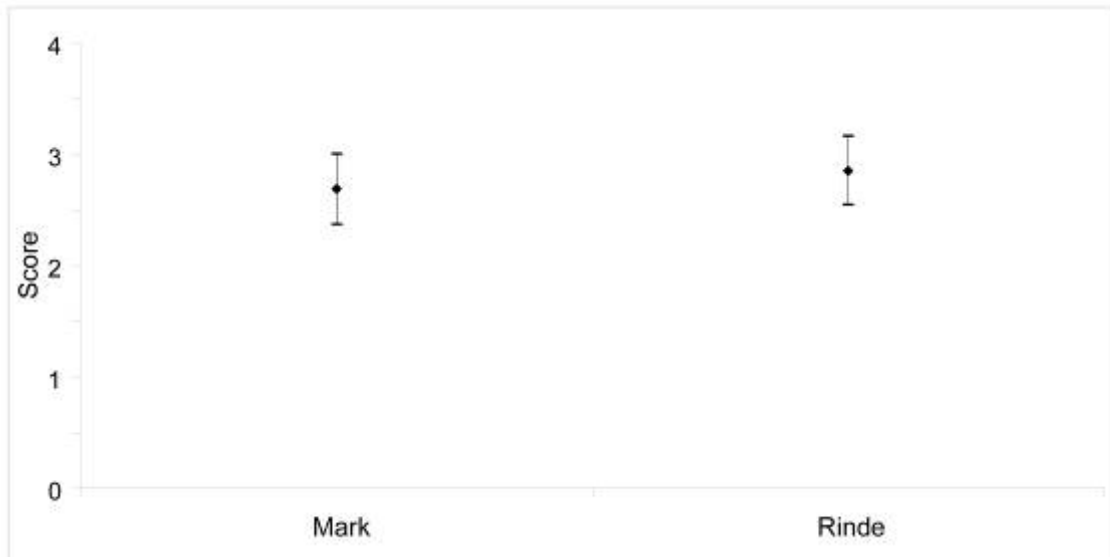


**Abbildung 25:** Oben: DCC Unten: Netrin-1; adultes Mark mit Anschnitt der Rinde; Vergrößerung: 400-fach

Die Mittelwerte der DCC-Expression in den Ausprägungen Frequenz und Intensität zeigten sich wie folgt:

Rinde: Frequenz 2,85 mit KI 2,54 bis 3,16; Intensität: 1,90 mit KI 1,66 bis 2,14

Mark: Frequenz 2,68 mit KI 2,37 bis 3,00; Intensität: 2,11 mit KI 1,86 bis 2,35



**Diagramm 24:** Frequenz der DCC-Expression mit zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen im adulten Mark und der adulten Rinde.



**Diagramm 25:** Intensität der DCC-Expression mit zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen im adulten Mark und der adulten Rinde.

Die Mittelwerte der Netrin-1-Expression in den Ausprägungen Frequenz und Intensität zeigten sich wie folgt:

Rinde: Frequenz 3,57 mit KI 3,27 bis 3,87; Intensität: 1,81 mit KI 1,58 bis 2,04

Mark: Frequenz 1,87 mit KI 1,51 bis 2,22; Intensität: 1,80 mit KI 1,53 bis 2,07



**Diagramm 26:** Frequenz der Netrin-1-Expression mit zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen im adulten Mark und der adulten Rinde.



**Diagramm 27:** Intensität der Netrin-1-Expression mit zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen im adulten Mark und der adulten Rinde.

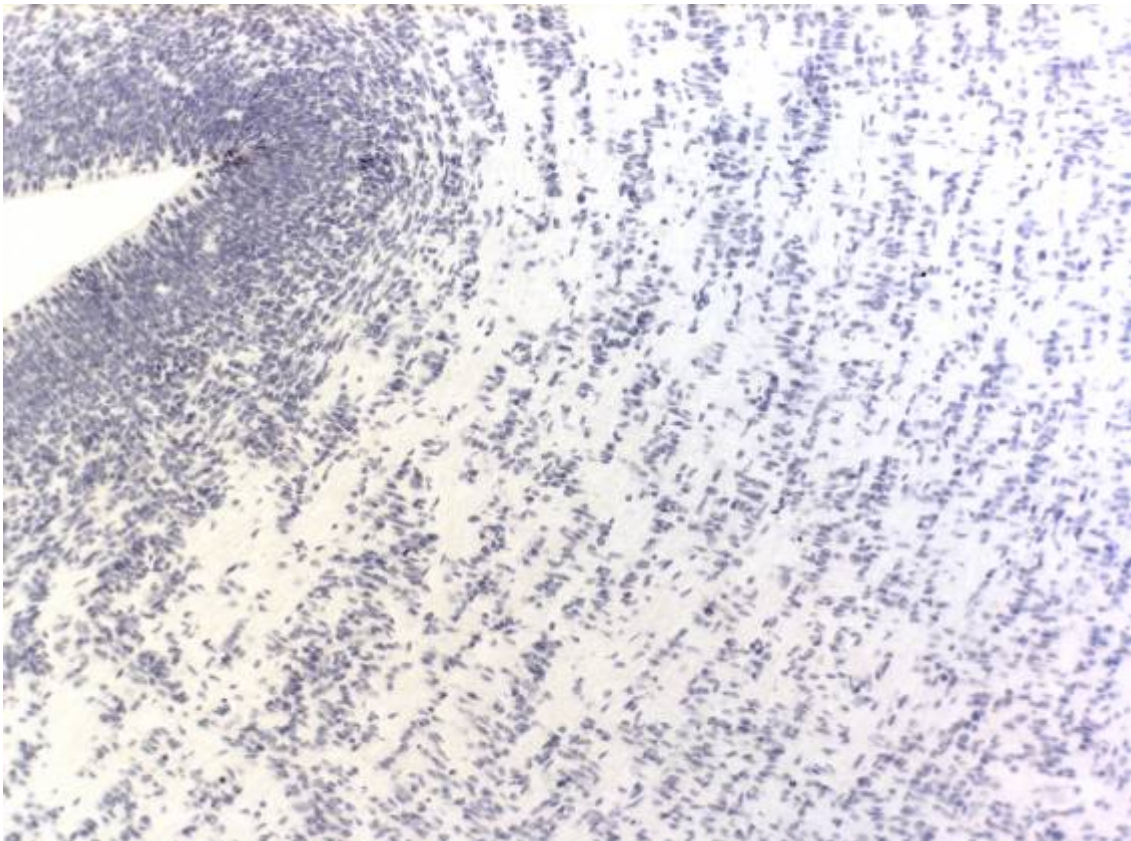


Anschließend paarweise Vergleiche für die Mittelwerte der kleinsten Quadrate zeigten eine signifikant höhere Netrin-1-Frequenz in der Rinde gegenüber dem Mark ( $p < 0,0001$ ). Die übrigen Analysen erbrachten keine signifikanten Unterschiede.

Weiter zeigte sich, dass das Alter des adulten Gehirns keinen Einfluss auf die DCC oder Netrin-1-Expression hat.

### 3.2 Auswertung der Kontrollschnitte

Sowohl angefertigte Negativkontrollen (Abbildung 26) für DCC, Netrin-1 und MIB-1, als auch Isotypenkontrollen für die monoklonalen Antikörper DCC und MIB-1 zeigten keine Farbreaktion auf den Kontrollschnitten.



**Abbildung 26:** Negativkontrolle. Abgebildet: Proliferationszonen eines fetalen Großhirns (16. SSW). 100-fache Vergrößerung.

## 4 Diskussion

DCC und Netrin-1, mit ihren multimodalen Eigenschaften, als einziges attraktives Lenkungssystem axonaler Zellausläufer, als Rezeptor-Ligand-Paar, dass mit Hilfe der „Dependence“-Rezeptorfunktion antiapoptotisch wirksam ist, die proangiogenetische Funktion von Netrin-1, sowie das Zusammenspiel der beiden Moleküle bei Migrationsprozessen im fetalen Großhirn bilden die Grundlage für die Diskussion der ermittelten Ergebnisse.

### 4.1 Proliferation im fetalen Großhirn

Das Ki-67-Antigen ist ein Kernprotein, das abgesehen vom G<sub>0</sub>-Stadium in allen Stadien des Zellzyklus sich teilender Zellen anzutreffen ist (MacCallum und Hall 2000) und sich somit als geeigneter Proliferationsmarker zur Ermittlung der Zellteilungsrate in den fetalen Keimzonen präsentierte.

Die Bestimmung der Proliferationsrate in den einzelnen Zonen der heranwachsenden Rinde, sowie in den übrigen fetalen Großhirnregionen diente hierbei als Mess- und Vergleichsgröße bezüglich der später diskutierten Expressionslevels für DCC und Netrin-1.

Als keinesfalls überraschend zeigten sich die Ventrikulärzone, Subventrikulärzone und Intermediärzone als proliferativ aktivste Regionen in der fetalen Rindenschichtung, die mit zunehmendem Alter der Feten ihre proliferative Tätigkeit signifikant reduzierten. (An dieser Stelle sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass sich diese Regionen allesamt nahe dem Ventrikel befinden, somit am Rand des Gewebestückes liegen, und dadurch auch störanfälliger für Farbreaktionen sind.) Soweit stehen diese Erkenntnisse im Konsens mit Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen, die sich mit der Proliferation im humanen, nicht-pathologischen embryonalen bzw. fetalen Großhirn auseinandersetzten. Choi zeigte dies anhand „gewöhnlicher“, lichtmikroskopischer Bestimmung mitotischer Figuren 1988 (Choi 1988), Mollgard und Schumacher setzten 1993 bereits immunhistochemische Verfahren mit Antikörpern gegen das Ki-67-Kernprotein an gefrorenem fetalen Material, sowie Antikörper gegen das „proliferating cell nuclear antigen“

(PCNA), in Paraffin eingebettetem fetalen Gewebe ein (Mollgard und Schumacher 1993). Simonati kombinierte diese beiden Methoden 1999 mit ebenfalls entsprechenden Ergebnissen für die drei Keimzonen (Simonati et al. 1999).

In der Sekundären Rindenzone, sowie in Rindenplatte und Marginalzone konnte keine Ki-67-Expression gezeigt werden.

Im Ganglienhügel zeigte sich die höchste Proliferationsrate aller fetaler Großhirnbereiche, wobei mit zunehmendem Alter keine Regression des Expressionslevels auftrat.

Mit dem Ependym fand sich ein weiteres Gebiet, im sich entwickelnden Großhirn, das in dieser Arbeit hohe Werte für die Frequenz der MIB-1-Färbung aufzeigte.

Das fetale Ependym ist Hinblickend auf immunhistochemische Färbungen und zytomorphologische Beurteilung ein mit Vorsicht zu betrachtender Bereich. Die Problematik der Beurteilung des fetalen Ependyms liegt darin, ausdifferenziertes ependymales Epithel von undifferenzierten neuroepithelialen Zellen zu unterscheiden. Sarnat spricht in einer Arbeit von 1998 davon, dass das Ependym weder unter physiologischen, noch pathologischen Bedingungen proliferative Aktivität aufzeige (Sarnat 1998). Nichts desto trotz zeigen die vorliegenden Ergebnisse eine hohe Proliferationsrate im Bereich des Ependyms. Proliferation wurde bereits 1988 von Del Bigio und Bruni im humanen Ependym beschrieben (Del Bigio und Bruni 1988). Diese Arbeit bzw. die detektierte Proliferation wurde von Sarnat als Fehlinterpretation, der als proliferativ aktiv bewerteten Zellen, die seines Erachtens am ehesten undifferenzierte neuroepitheliale Zellreste oder astrozytäre Vorläufer seien (Sarnat 1998) gedeutet. In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Beurteilung auf morphologische Kriterien geachtet, das heißt basal gelegener Zellkern und apikaler Zilienbesatz.

Die, mit zunehmendem Alter signifikante Abnahme der Zellteilungsrate in den hier bewerteten fetalen Ependymabschnitten zeigt die Tendenz zur

Ausdifferenzierung, die sich bis hin zu frühen postnatalen Lebensabschnitten erstrecken kann (Spassky et al. 2005).

Ein dem Ependym verwandtes Gewebe, der Plexus choroideus wurde ebenfalls als Ort fetaler Proliferation ausgemacht. Trifft ependymales Epithel in frühen embryonalen Entwicklungsstadien auf Gewebe des mesodermalen Keimblatts, so entstehen Pseudorosetten aus neuroepithelialelem und mesodermalem Gewebe, die dann wiederum die fingerförmigen Ausstülpungen des Plexus mit den zentral gelegenen Kapillaren ausbilden. Im fetalen Gehirn füllt der Plexus fast das gesamte Volumen der Ventrikel aus, wobei er bei Erwachsenen nur bis zu 25% des ventrikulären Raumes einnimmt. In einer Arbeit zur Proliferation in Ependym und Plexus der Ratte konnte mittels radioaktiv markierter Nukleotidanaloga gezeigt werden, dass die Proliferationsrate beider Gewebe im Bereich der Seitenventrikel höhere Werte erreichte als im dritten Ventrikel, wobei die Zellteilungsrate im Ependym jeweils der, des Plexus überlegen war (Chauhan und Lewis 1979).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwar ausnahmslos Zellen der Seitenventrikel betrachtet, so dass keine Aussage über einen Gradienten über die Ventrikel hinweg gemacht werden kann, doch konnte ebenfalls ein Unterschied in Proliferation zwischen Ependym und Plexus mit höheren Proliferationsraten auf Seiten des Ependyms gezeigt werden. Man könnte sich vorstellen, dass dieser Vergleich zwar zu Ungunsten der Proliferation des Plexus choroideus ausfällt, jedoch so eine etwaige höhere Differenzierung im Plexus erreicht werden kann.

Die Möglichkeit des Plexus als Reservoir für neuronale und astrozytäre Vorläuferzellen zu dienen konnte eine tierexperimentelle Arbeit an der Ratte bereits zeigen (Itokazu et al. 2006). Durch die fehlende Regression der Proliferationsrate am humanen fetalen Plexus könnte diese Option für Zellen, die sich im Proliferationszyklus befinden, weiter bestehen.

Die Proliferationsrate in den Leptomeningen und Gefäßen lag jeweils unter 1%, im Striatum konnte keine Proliferation gemessen werden. Auch hier befindet sich die Differenzierung in fortgeschrittenem Stadium.

#### **4.1.1 DCC- und Netrin-1-Expression in zellteilungsreichen fetalen Großhirnbezirken**

Kurz gesagt lassen sich die Keimzonen Ventrikulärzone, Subventrikulärzone und Intermediärzone, sowie der Ganglienhügel, das Ependym und der Plexus choroideus der Seitenventrikel als zellteilungsreiche Großhirnbezirke ausmachen.

Betrachtet man an dieser Stelle das Expressionsmuster für DCC und Netrin-1, so zeigt sich, dass abgesehen von der Intermediärzone (wird später besprochen) in den statistischen Vergleichen gerade in diesen fetalen Großhirnregionen keine signifikanten Unterschiede zwischen der DCC- und der Netrin-1-Frequenz gegeben sind.

Dieses Expressionsverhalten im Bereich der Ventrikulärzone, Subventrikulärzone und im Ganglienhügel ließe sich mit der von Mehlen und Bredesen aufgestellten Theorie der „Dependence“-Rezeptor-Funktion vereinbaren (Mehlen und Bredesen 2004). Wenig differenzierte Zellen, die den DCC-Rezeptor exprimieren unterliegen in Netrin-1-reichem Milieu einem Apoptoseschutz. Dieser könnte wiederum mit zugehöriger Zellteilungsbereitschaft, das letztendliche Versiegen der Proliferation hinauszögern, damit gerade diese benötigte Zellvermehrung nicht der Ausdifferenzierung ventrikulärer Zellen zu endyemalem Epithel zum Opfer fällt. Es gilt als elementarer Prozess, die Differenzierung eines echten Ependyms aufzuschieben, da eine verfrühte Ependym-Formation die Zellproduktion in der Ventrikulärzone einzuschränken droht (Sarnat 1992), und es unmöglich macht den großen Bedarf an Neuronen, der für die reife physiologische Funktion benötigt wird zu erreichen (Smart 1972).

Die Frequenz der DCC- und Netrin-1-Expression zeigte im Bereich des Ependyms und des Plexus choroideus ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, sowie keine Regression mit zunehmendem Alter der Feten. Der daraus resultierende Apoptoseschutz für diese Regionen müsste im fetalen Großhirn ein Abschilfern dieser Zellpopulation in den Liquor verhindern. Dieses Verhalten konnte im Kolon der Maus bereits gezeigt werden, wobei eine

verstärkte Netrin-1-Expression sogar zur Tumorprogression beitrug (Mazelin et al. 2004).

Abbildung 15 (Seite 66) zeigt eine Aufnahme aus dem Ganglienhügel eines Feten in der 28. SSW, der mit einem Antikörper gegen DCC gefärbt wurde.

Es zeigt sich hier sowohl eine starke Expression im Ependym, als auch in der Ventrikulärzone und im Ganglienhügel selbst. Interessanterweise zeigen radiär angeordnete Zellausläufer hier eine sehr starke Expression des DCC-Moleküls. Es muss hierbei von radialen Gliazellen ausgegangen werden, die die Strickleiter für migrierende Zellpopulationen darstellen. Die DCC-Expression in Netrin-1-reichem Milieu, und der somit resultierende Apoptoseschutz garantiert die Integrität der Migration entlang radialer „Gliabahnen“.

## **4.2 Migrationsprozesse im fetalen Großhirn**

### **4.2.1 Radiale Migration im fetalen Großhirn**

Das Expressionsmuster für DCC und Netrin-1 in den Bereichen der sechs fetalen Rindenschichten zeigte eine sehr starke regionale Ähnlichkeit, so dass hier von einer Assoziation der Expression ausgegangen werden kann (keine signifikanten Unterschiede der Expressionslevels in Ventrikulärzone, Subventrikulärzone, Rindenplatte und Marginalzone).

Die radiale Migration findet flächendeckend über alle fetalen Rindenschichten statt. Bei diesen Interaktionen zwischen Neuronen und Gliazellen spielen Zelladhäsionsmoleküle, wie beispielsweise die Familie der Integrine (Marin und Rubenstein 2003) eine große Rolle. Eine Arbeit konnte zeigen, dass Netrin-1 mit den Integrinen  $\alpha 6\beta 4$  und  $\alpha 3\beta 1$  interagiert, wobei es sich hier um das Migrationsverhalten pankreatischer Zellen handelte. Die Blockierung des DCC-Rezeptors konnte die Bindung von Netrin-1 an die verwendeten fetalen Zelllysate nicht verhindern. Die Integrine  $\alpha 6\beta 4$  und  $\alpha 3\beta 1$  zeigten in den Zellen eine starke Affinität zu Netrin-1 und ließen die Autoren somit auf die Interaktion von Netrin-1 und den Integrinen  $\alpha 6\beta 4$  und  $\alpha 3\beta 1$  im Hinblick auf Migrations- und Zelladhäsionsprozesse schließen (Yebra et al. 2003).

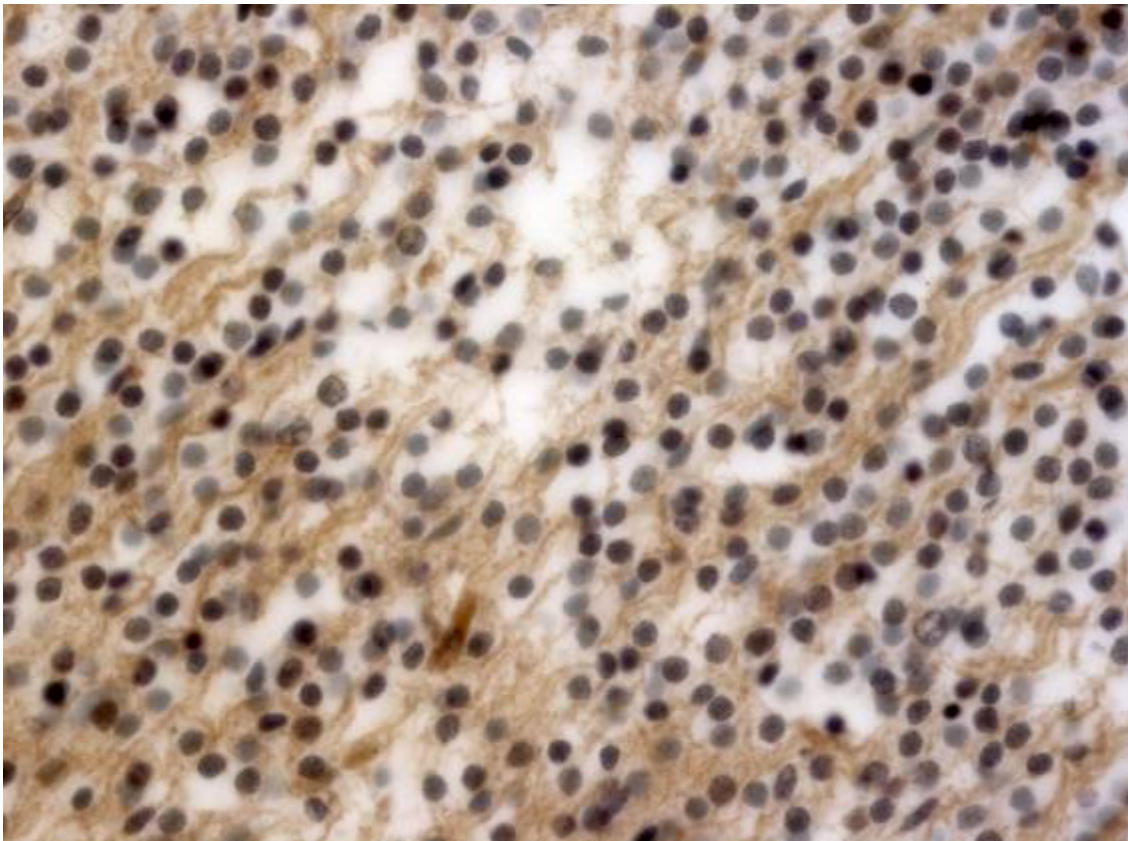
Gerade diese Klasse der Integrine spielt laut verschiedener Autoren eine wichtige Rolle bei Interaktionen zwischen neuronalen und glialen Zellen. Dies zeigen in vitro Untersuchungen neuronaler und glialer Zellen (Anton et al. 1999), sowie Experimente an Mäusen, deren Gen für  $\beta 1$  Integrin inaktiviert wurde, mit dem Ergebnis kortikaler Fehlbildungen (Graus-Porta et al. 2001). Ein ähnliches Ergebnis wurde durch eine Mausmutante für das  $\alpha 6$  Integrin erzielt (Georges-Labouesse et al. 1998).

Inwieweit die Ergebnisse für die starke Expression von Netrin-1 in den oben genannten Zonen mit Migrationsprozessen, die Integrin-vermittelt ablaufen zusammenhängen und welche Rolle der DCC- Rezeptor dabei einnimmt ist noch nicht geklärt. In Bereichen mit den höchsten Netrin-1 Expressionsraten, sprich in der Ventrikulärzone und Subventrikulärzone, sowie in der Rindenplatte finden gerade diese entscheidenden Zelladhäsionsvorgänge der Migration statt (Anlagerung und Ablösung), so dass hier ein Zusammenhang zwischen Netrin-1- und Integrin-vermittelter Migration vermutet werden darf.

In der Sekundären Rindenzone und der Marginalzone, den beiden ältesten Zonen der fetalen Rinde (Kostovic und Rakic 1980, Chun et al. 1987) zeigten sich sowohl für DCC als auch für Netrin-1 die niedrigsten Expressionsraten. Diese beiden Schichten entstehen durch eine Art Teilungsprozess aufgrund der Bildung der Rindenplatte im Rahmen der zweiten Welle der Migration (Marin-Padilla 1971). Im Fall der Sekundären Rindenzone konnte mit zunehmendem Alter der Feten eine signifikante Abnahme der DCC- und Netrin-1-Expression gezeigt werden. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass in früheren Entwicklungsstadien, die in dieser Arbeit nicht miteinbezogen wurden, die ältesten Neuronen (die damals näher an der pialen Oberfläche angesiedelt waren, und somit sozusagen den „Ablösungspunkt“ migrierender Neuronen von radialer Glia darstellten; „Inside-Out-Layering“) ebenfalls starke DCC- und Netrin-1-Expression zeigten, die dann mit zunehmender Reife der Rinde zu versiegen begann.

Die Rindenplatte (Abbildung 27) gilt für beide Moleküle als Ort maximaler Expression und zeigt wie auch die Marginalzone, die im Vergleich zur

Rindenplatte mit niedrigen Expressionsraten auffiel, keine Regression beider Moleküle mit zunehmendem Alter der Feten. Man könnte sich vorstellen, dass in Analogie zum Reelin, einem extrazellulären Matrixprotein, das von Cajal-Retzius-Zellen in der Marginalzone exprimiert wird und bei Mutation im humanen Genom komplexe neuronale Migrationsstörungen zur Folge hat (Hong et al. 2000), DCC und Netrin-1 ebenso von der Rindenplatte und der Marginalzone aus agieren könnten. Über Netrin-1 modulierte Zell-Zell-Interaktion wird dabei „herbeiwandernden“ Neuroblasten der Weg in die eventuell vorbestimmte, oder dann erst festgelegte Position in der zukünftigen Rinde gewiesen.



**Abbildung 27:** Netrin-1-Färbung in fetaler Rindenplatte (21. SSW). 400-fache Vergrößerung.



#### 4.2.2 Tangentiale Migration im fetalen Großhirn

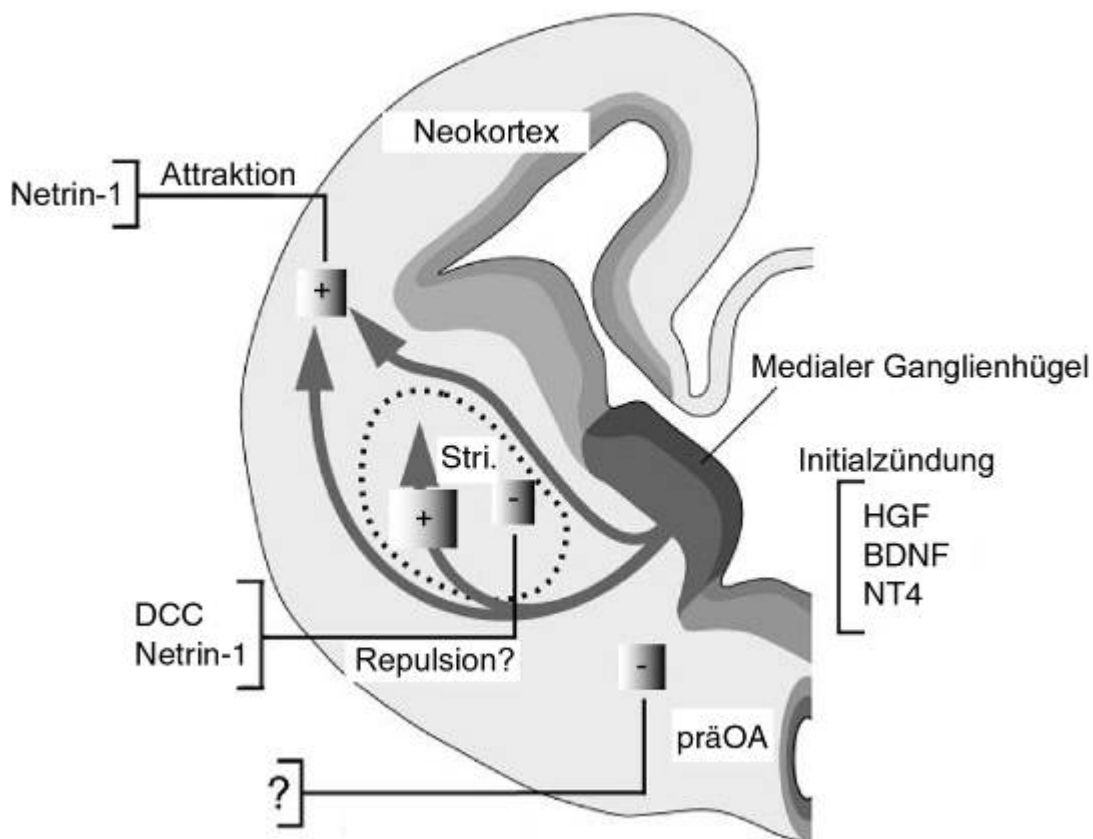
Neben dem Prozess der radialen Migration steht dem fetalen Großhirn mit der tangentialen Migration ein weiteres Werkzeug zur Verfügung, um Vorläuferzellen aus den Keimzonen in Richtung Kortex oder anderer neuronaler Zellnester zu befördern.

Schon früh wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen erkannt, dass sich einige Zellen fern ab der radialen „Gliabahn“ im Großhirn ausbreiten (Altman 1969, Austin und Cepko 1990). Dabei orientieren sich die auswandernden Zellen an verschiedenen Leitstrukturen. In einigen Fällen folgen Neuronengruppen einfach einander und bilden so ihren eigenen Pfad bis ins Zielgebiet, was zum Beispiel bei der Migration von interneuronalen Vorläuferzellen des Bulbus olfactorius beobachtet werden kann. In weiteren Fällen folgen tangential wandernde Zellen auswachsenden Axonen um ihren Bestimmungsort zu erreichen, schlussendlich gibt es unter den Neuronen einzelne, die auf der Wanderschaft keinen speziellen zellulären Strukturen folgen, sondern sich frei ihren Weg aus der Tiefe des Großhirns bis in die oberflächlichen Schichten bahnen (Marin und Rubenstein 2003). Auf diesem Weg können die Zellen unterschiedliche Bereiche des Großhirns durchwandern (Heffron und Golden 2000, Letinic und Rakic 2001) und sogar lange axonale Bahnen durchqueren (Spassky et al. 2002, Wray 2001).

Überträgt man ein bestehendes Modell der tangentialen Migration (Marin und Rubenstein 2003) auf die Ergebnisse dieser Arbeit so sähe dies wie folgt aus. Eckpfeiler stellen dabei der mediale Ganglienhügel, das Striatum und der Kortex dar. Als Protagonisten zeigen sich interneuronale Vorläuferzellen aus dem medialen Ganglienhügel, die das Striatum, oder die Rindenplatte als Zielstruktur haben (Marin et al. 2000).

Zunächst kommt es zu einem initialen Signal aus dem Ganglienhügel, der in unserem Fall stark Netrin-1 und DCC exprimiert. Der weitere Weg dieser zukünftigen Interneurone führt vorbei am Striatum, das in diesem Modell repulsive Wirkung haben soll. Das Striatum selbst exprimiert stark DCC und Netrin-1 und kann somit sowohl repulsiv als auch attraktiv wirken (Alcantara et

al. 2000). Vorläufer der Interneurone gelangen nun durch die attraktive Wirkung der Rindenplatte an die Oberfläche dieser, oder sie schlagen schon vorher den Weg ins Striatum ein, um dort weitere Verknüpfungen zu bilden (Abbildung 28). Nach dem initialen Signal im Ganglienhügel, das im Übrigen dem Einfluss von HGF („hepatocyte growth factor“), BDNF („brain derived neurotrophic factor“) und NT4 (Neurotrophin 4) untersteht, muss eine repulsive Wirkung auf die wandernden Zellen eintreten, die eine Migration nach ventral verhindert. Ob dies nun ein Effekt von Netrin-1 und DCC ist vermag man nicht zu postulieren.



**Abbildung 28:** Modell der tangentialen Migration von Vorläuferzellen aus dem medialen Ganglienhügel unter dem Einfluss von DCC und Netrin-1 ins Striatum (Stri.) und den Kortex. Einen repulsiven Effekt übt voraussichtlich das präoptische Areal (präOA) aus. (Modifiziert nach Marin und Rubenstein 2003)

Sowohl die Frequenz, als auch die Intensität der DCC-Expression im Striatum zeigte eine signifikante Regression mit zunehmendem Alter der Feten. Im Gegensatz dazu zeigte das Alter keinen Einfluss auf die Netrin-1-Expression im

Striatum. Dies würde bedeuten, dass die vom Striatum postulierte sowohl repulsive, als auch attraktive Kraft auf interneuronale Vorläufer DCC-unabhängig aufgebracht wird, wie es für interneuronale Vorläufer der cerebellären Körnerzellschicht bereits gezeigt wurde (Guijarro et al. 2006). Eine repulsive Wirkung für Netrin-1 auf Neuronen, die das Striatum als Zielstruktur hatten, konnte bereits im Zellkultorexperiment an der Ratte gezeigt werden (Hamasaki et al. 2001).

### **4.3 Axonale Lenkung im fetalen Großhirn**

Eine Idee für diese Arbeit bestand darin, die mögliche Darstellung von aussprossenden Axonen mittels immunhistochemischer Verfahren zu realisieren. Inspiriert wurde das Vorhaben dabei von klassischen Modellen axonaler Projektionen. Dazu zählten die Modelle Sperrys (Sperry 1963) mit der Projektion retinaler Ganglienzellen ins Tectum von Amphibien, die Mitte des Jahrhunderts für Aufmerksamkeit sorgten, sowie in vitro Untersuchungen von Bonhoeffer, die dieselbe Projektionsbahn erforschten (Bonhoeffer et al. 1982, Walter et al. 1987).

Tierexperimentell zeigte sich in Netrin-1 „knock-out“-Mäusen die bereits angesprochene Mausmutante mit einer abnormen Anlage von Corpus callosum, hippokampaler Kommissur, vorderer Kommissur und Nervenfaserkreuzungen im Rückenmark (Serafini et al. 1996). Mäuse mit einem DCC-Defekt zeigen stark ähnliche ZNS-Fehlentwicklungen. Das Auswachsen und die richtige Orientierung von axonalen Fortsätzen gelten daher als abhängig von der Gegenwart beider Moleküle (Keino-Masu et al. 1996, Stein et al. 2001, Forcet et al. 2002).

Netrin-1 als lösliches Molekül, kann sowohl attraktive, als auch repulsive Kräfte auf auswachsende Nervenfasern ausüben. Dies hängt von der Rezeptorkonstellation auf dem Wachstumskegel ab. Alleinige Expression von DCC führt zu hoher intrazellulärer  $Ca^{++}$ -Konzentration mit folgender attraktiver Wirkung (Keino-Masu et al. 1996; *C. elegans* und *D. melanogaster* Modell), die Rezeptorkombination DCC+UNC5 hat eine erniedrigte intrazelluläre  $Ca^{++}$ -

Konzentration zur Folge und resultiert in einer repulsiven Wirkung auf den Wachstumskegel (Hong et al. 1999; Krallenfrosch-Modell).

Im Zusammenspiel mit Slit, Robo und Rig1 findet die Kreuzung von Kommissurenfasern statt, die unter dem attraktiven Einfluss von Netrin-1 stehen, das im Bereich der Mittellinie von glialen Zellen exprimiert wird (Sabatier et al 2004, Charron et al. 2003) (siehe Abbildung 6 Seite 32). Diese Ergebnisse basieren auf Studien an Säugetieren. Axonale Ausläufer in Rig1 „knock-out“-Mäusen kreuzen die Mittellinie nicht (Marillat et al. 2004). Grundvoraussetzung für physiologisches Verhalten ist jedoch die bereits postulierte Interaktion von DCC und Robo, die in einer gedämpften Attraktion für Netrin-1 resultiert (Stein und Tessier-Lavigne 2001; Krallenfrosch-Modell).

Mittellinienüberschreitungen oder Bereiche, in denen Faserbündel wichtige wegbereitende Entscheidungen treffen sind beispielsweise die vordere und hintere Kommissur des Großhirns, der Balken, sowie Anteile der Inneren Kapsel.

Anhand einzelner fetaler Großhirn Schnittpräparate konnten Teile dieser Strukturen dargestellt werden, und zeigten sowohl starke DCC- als auch Netrin-1-Expression. Sehr eindrücklich wirkt in diesem Zusammenhang die Präsenz der Inneren Kapsel, die durch massive Netrin-1-Färbung und etwas geringer ausgeprägte DCC-Färbung imponierte (siehe dazu Abbildung 19 Seite 75).

Die verstärkte Anwesenheit dieser beiden Moleküle suggeriert eine maßgebliche Beteiligung von DCC und Netrin-1 an der Wegfindung axonaler Ausläufer durch das Striatum „hinab“ zu den Kreuzungsstellen des fetalen Großhirns.

Der Anteil der DCC- und Netrin-1-positiven Zellen lag im Striatum in beiden Fällen zwischen 10% und 25%. Der direkte Vergleich der DCC- und Netrin-1-Expression erbrachte keine signifikanten Unterschiede, so dass von einer regionalen Assoziation des Expressionsmusters ausgegangen werden darf. Wie bereits oben beschrieben, zeigte nur die DCC-Expression einen Rückgang mit zunehmendem Alter der Feten.

Wachsen nun axonale Ausläufer, die DCC auf der Oberfläche exprimieren von der Rinde aus, so könnte das attraktiv wirkende Striatum (Netrin-1-Expression) ein erstes Etappenziel für die Wachstumskegel darstellen. Das Striatum wird jedoch von der Inneren Kapsel durchdrungen und somit in Putamen und Nucleus caudatus getrennt, so dass keinesfalls alle Axone hier endgültige Verknüpfungen ausbilden werden, vielmehr muss eine enorm attraktive Kraft diese Ausläufer in Richtung Pyramide führen, wo die meisten Fasern endgültig kreuzen. Dies wiederum würde aber auch bedeuten, dass eine repulsive Kraft die Axone, vor der Rückkehr ins Striatum hindern müsste. Im Grunde genommen zeigt sich hier eine ähnliche Konstellation wie an der Mittellinie von Kommissuren. Es stellt sich hier natürlich die Frage ob sowohl Robo, als auch Slit und Rig1 von striatalen Zellen exprimiert werden.

DCC erfährt mit zunehmendem Alter der Feten eine Regression im Expressionsverhalten. Dies hätte in unserem Kortiko-striatalen Projektionsmodell zur Folge, dass durch den Wegfall der DCC-Wirkung auch eine mögliche Dämpfung der attraktiven Wirkung für Netrin-1 über Robo wegfallen könnte, so dass das Striatum für erst später auswachsende neuronale Ausläufer zum attraktiven Endpunkt der Zielsuche wird.

#### **4.4 Expression von DCC, Netrin-1 und Ki-67 in fetalen Gefäßen**

Bei der Beurteilung der Ergebnisse für die fetalen Gefäße zeigt sich, dass sowohl in der Ausprägung Frequenz (>50%) als auch in der Intensität (stark) die Werte für Netrin-1 konstant hoch für alle Feten ausfallen, und auch im Hinblick auf das Alter der Feten die Gefäße keinen Expressionseinbruch mit zunehmendem Alter durchmachen. Eine DCC-Expression zeigten dabei durchschnittlich zwischen 10% und 25% der Zellen, jedoch mit schwacher Intensität.

Bei der Auswertung wurden ausschließlich Endothelzellen bewertet, die sich in einem komplett geschlossenen Zellgefüge (Röhrenformation) aufhielten und im Bereich der heranwachsenden sechs fetalen Rindenschichten lokalisiert waren.

Zwei wichtige Studien zum angiogenetischen Verhalten von Netrin-1 wurden mittels Zellkulturexperimenten an humanen Endothelzellen unterschiedlichen

Ursprungs durchgeführt (Park et al. 2004, Wilson et al. 2006), die sich jeweils noch nicht in der Röhrenformation befanden und somit nicht mit den Gefäßen dieser Arbeit zu vergleichen sind. Beide Arbeiten zeigten, dass Netrin-1 einen, die Proliferation stimulierenden Effekt auf die Endothelien ausübte und darüber hinaus noch die Migration dieser beim Zusammenschluss zur Röhrenformation fördere. Beide Autoren fanden jedoch bei ihren Experimenten keinerlei Anhalt für das Vorkommen des DCC-Rezeptors in diesen Zellkulturen. Ganz im Gegenteil zeigten sich bei beiden sehr hohe Aktivitäten von Robo-4 (Park et al. 2004, Wilson et al. 2006), in der Arbeit von Wilson zusätzlich eine hohe Aktivität für VEGFR-2 und PECAMs. Das UNC5-Protein konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu präsentierte sich die angiogenetische Funktion von Netrin-1 in Endothelzellen aus der Aorta von adulten Rindern im Zellkulturexperiment als durchaus DCC-abhängig (Nguyen et al. 2006). Lu und Kollegen zeigten jedoch ebenfalls, dass in Endothelzellen des Mausembryos der DCC-Rezeptor fehlte, dafür aber der UNC5B-Rezeptor einen repulsiven Effekt auf aussprossende Endothelzellen bei Netrin-1-Präsenz ausübte (Lu et al. 2004). Die UNC5B-Knockout-Maus zeigte ungewöhnliche Auswüchse an den Filopodien von Endothelzellen, sowie eine abnormale Navigation und abnormales Verzweigungsverhalten der Gefäße (Lu et al. 2004).

Die durchaus schwache Intensität der DCC-Färbung in fetalen Gefäßen lässt vermuten, dass ein oder mehrere Rezeptoren auf den Endothelzellen die Netrin-1-Wirkung auslösen. Zu berücksichtigen sind dabei aber auch die unterschiedlichen Rezeptorkonstellationen auf adulten und embryonalen Endothelzellen. Womöglich wird der DCC-Rezeptor im Feten bereits herunterregelt.

Durch die unterschiedlichen Versuchsvoraussetzungen sind die Ergebnisse der Arbeiten von Park, Wilson, Nguyen und Lu nicht ohne weiteres mit den Ergebnissen dieser Arbeit zu vergleichen, da die ausgewerteten Endothelzellen bereits einen Gefäßbaum ausgebildet haben und in einer geschlossenen Röhrenformation angeordnet waren. Dennoch können aufgrund der bekannten Physiologie aussprossender Endothelzellen, die vom primitiven

leptomeningealen Gefäßplexus aus in Richtung subventrikulärer Keimzonen wandern (Bär 1980; Modell an der Ratte), der Einfluss regionaler Netrin-1-Gradienten in den fetalen Großhirnabschnitten diskutiert werden.

Die höchsten Netrin-1-Expressionsraten bezogen auf die sechs fetalen Rindenzonen zeigten sich bekanntermaßen in der Rindenplatte und in der Subventrikulärzone. Endothelien, die in sehr frühen Entwicklungsstadien des Embryos in das Neuralepithel einwandern, versuchen sehr tief in dieses einzudringen, um dort subependymal gelegen einen subventrikulären Gefäßplexus auszubilden (Duckett 1971). Mit zunehmendem Wachstum des Großhirns, begeben sich immer mehr Endothelien auf den ebenfalls radial angelegten Weg in Richtung der Seitenventrikel, doch viele erreichen den subventrikulären Plexus nicht mehr, sondern verzweigen sich schon im Bereich der zukünftigen Weißen Substanz. Die hohen Netrin-1-Expressionsraten in der Rindenplatte könnten hier einerseits attraktiv auf einzelne Endothelzellen wirken, die sich gerade auf den Weg machen auszusprossen, andererseits vermögen sie die Verzweigung in Form von Proliferation und Aussprossung in dieser Schicht voranzutreiben, um die Perfusion der neuronalen Vorläuferzellen zu gewährleisten. Das selbe Szenario ist in der tiefen Subventrikulärzone denkbar, wo die ältesten Gefäßabschnitte der fetalen Rindenzonen lokalisiert sind. Auch hier mit dem Ziel eine adäquate Perfusion zu gewährleisten. Interessanterweise nimmt gerade in dieser Zone sowohl die Netrin-1-Expression als auch die Proliferationsrate signifikant mit zunehmendem Alter der Feten ab, so dass mit abnehmender Stoffwechselaktivität unter Auflösung der Zone eine weitere Verzweigung oder Proliferation der Endothelzellen überflüssig erscheint.

Im Übrigen konnte in Endothelzellen eine Proliferationsrate, die weit unter 1% lag ermittelt werden. Proliferation von Endothelzellen im ZNS wurde in Studien an der Wachtel und im Huhn in sehr frühen Entwicklungsphasen des Neuralrohres mittels immunhistochemischer Methoden beschrieben, wobei jedoch in den aussprossenden Anteilen der Gefäße keine, in den restlichen intraneuroepithelialen Anteilen sehr geringe Aktivität herrschte (Cossmann et al. 1997). Es existieren keine Daten, die das Proliferationsverhalten endothelialer

Zellen des menschlichen fetalen Großhirns über verschiedene Entwicklungsstadien beschreiben.

#### **4.5 Expression von DCC und Netrin-1 in fetalen und adulten Neuronen**

DCC- und Netrin-1-Expression konnte sowohl in fetalen Neuronenverbänden (Rindenplatte, Striatum), als auch in der adulten Rinde, als Beispiel für ausgereifte Neuronenverbände nachgewiesen werden. Die Intensität der Färbung in der adulten Rinde zeigte dabei jeweils durchschnittlich niedrigere Expressionsraten für beide Moleküle. Im Konsens dazu zeigte eine Arbeit von Livesey und Hunt an Säugetieren, dass die Konzentrationen der mRNA für DCC und Netrin-1 im adulten Gehirn geringer ist als die in frühen Entwicklungsstadien des Gehirns (Livesey und Hunt 1997). Man kann also davon ausgehen, dass mit dem Ende der eigentlichen Ontogenese des Gehirns eine Herunterregulierung für beide Moleküle stattfindet. Die begutachteten adulten Großhirne der vorliegenden Arbeit befanden sich im Alter zwischen einem und 92 Jahren, wobei das durchschnittliche Alter bei 55,1 Jahren lag. Es konnte unter dieser Gruppe kein Einfluss des Alters auf das Expressionsverhalten gezeigt werden.

Die regionale Assoziation beider Molekül-Expressionsmuster in der adulten Rinde wirft unterschiedliche Fragen bezüglich eines Netrin-1-DCC-Effektes auf. Dabei stehen folgende Aspekte im Vordergrund. Persistiert eine mögliche Lenkungsfunktion für neuronale Ausläufer, und wird somit die Plastizität des neuronalen Netzwerkes gewährleistet? Untersteht ein DCC-exprimierendes Neuron bei lokal anwesendem Netrin-1 einem „dependence“-Rezeptor-abhängigen Apoptoseschutz?

Die Netrin-1-Expression liegt in der adulten Rinde signifikant höher als im angrenzenden Mark, so dass beide Szenarien denkbar wären. Interessanterweise zeigten Livesey und Hunt, dass die höchsten Expressionslevels für Netrin-1-mRNA in der Substantia nigra sowohl des adulten, als auch des embryonalen Gehirns von Säugetieren zu finden sind, wobei auch der DCC-Rezeptor in dieser Region zu detektieren war (Livesey



und Hunt 1997). Die anatomische Beziehung von Netrin-1 und DCC wird seitdem im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen, die eine Dysfunktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems zeigen diskutiert (Hu et al. 1997, Osborne et al. 2005). DCC und Netrin-1 zeigten auch in einem Ischämie-Modell an der Ratte einen Anstieg der Expressionsraten für Netrin-1 und DCC in Neuronen in Nachbarbezirken der Ischämie, für DCC auch zusätzlich in astrozytären Fortsätzen (Tsuchiya et al. 2007). Diese Ergebnisse unterstreichen eine mögliche Rolle für DCC und Netrin-1 am so genannten „remodelling“ des pathologischen Gehirns. Die physiologische Funktion von DCC und Netrin-1 in adulten Neuronen ist nicht klar, könnte jedoch sowohl in einem möglichen Apoptoseschutz via „dependence“-Rezeptor-Funktion, als auch in der persistierenden Lenkungsfunktion und somit Gewährleistung der Plastizität liegen.

#### **4.6 Schlussfolgerung**

Als wichtige Schlussfolgerungen dieser Arbeit gelten:

- o Netrin-1 und DCC konnten bei den Untersuchungen vor allem sowohl in proliferativ aktiven Arealen des fetalen Großhirns und in den fetalen Rindenschichten, sowie auch im Striatum nachgewiesen werden. Sie konnten dabei in allen beobachteten Entwicklungsstadien detektiert werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass DCC und Netrin-1 über die gesamte Fetalperiode an der Ausdifferenzierung des menschlichen Gehirns beteiligt sind und durch den Nachweis im adulten Gehirn noch über den fetalen Zeitraum hinaus Einfluss auf die Integrität des zentralnervösen Zellgefüges ausüben.
- o Die Assoziation der DCC- und Netrin-1-Expression in zellteilungsreichen Großhirnbereichen könnte ein Hinweis auf regionale „dependence“-Rezeptor-Funktion und somit resultierendem Apoptoseschutz sein. Dieser könnte das letztendliche Versiegen der Proliferation hinauszögern, damit gerade diese benötigte Zellvermehrung nicht der Ausdifferenzierung ventrikulärer Zellen zu ependymalem Epithel zum Opfer fällt.

- o DCC und Netrin-1 könnten durch assoziierte Expression im Ependym und Plexus choroideus das Abschliffen dieser Zellen in den fetalen Liquor, aufgrund des bereits erläuterten Apoptoseschutzes verhindern. Dem selben Mechanismus folgend zeigen radiale Gliazellen starke DCC- und Netrin-1-Expression um das Wegegerüst radial migrierender neuronaler Vorläufer zu garantieren.
- o In Bereichen mit den höchsten Netrin-1 Expressionsraten, sprich in der Ventrikulärzone und Subventrikulärzone, sowie in der Rindenplatte finden entscheidende Zelladhäsionsvorgänge der radialen Migration statt (Anlagerung und Ablösung), so dass hier eventuell ein Zusammenhang zwischen Netrin-1- und Integrin-vermittelter Migration vermutet werden darf.
- o Tangentiale Migrationsprozesse vom medialen Ganglienhügel bis ins Striatum könnten durch die rückläufige DCC-Expression mit zunehmendem Alter der Feten, bei konstant hoher Netrin-1-Expression, DCC-unabhängig ablaufen.
- o An Kreuzungsstellen und Knotenpunkten, wo Axonbündel wegbereitende Entscheidungen treffen, wie beispielsweise im Bereich der Inneren Kapsel oder der vorderen Kommissur, zeigt sich verstärkte Präsenz des Lenkungsmoleküls Netrin-1 und des Rezeptors DCC, so dass hier von einer weichenstellenden Funktion ausgegangen werden darf. DCC erfährt im Striatum mit zunehmendem Alter der Feten eine Regression im Expressionsverhalten. Dies hätte im Kortiko-striatalen Projektionsmodell zur Folge, dass durch den Wegfall der DCC-Wirkung auch eine mögliche Dämpfung der attraktiven Wirkung für Netrin-1 über Robo wegfallen könnte, so dass das Striatum für erst später auswachsende neuronale Ausläufer zum attraktiven Endpunkt der Zielsuche werden könnte.
- o Die durchaus schwache Intensität der DCC-Färbung in fetalen Gefäßen lässt vermuten, dass ein oder mehrere Rezeptoren auf den Endothelzellen die Netrin-1-Wirkung auslösen. Zu berücksichtigen sind dabei aber auch die unterschiedlichen Rezeptorkonstellationen auf adulten und embryonalen Endothelzellen. Womöglich wird der DCC-Rezeptor im Feten bereits herunterregelt.

- o Die hohen Netrin-1-Expressionsraten in der Rindenplatte könnten attraktiv auf einzelne Endothelzellen wirken, die sich gerade auf den Weg machen vom leptomeningealen Gefäßplexus auszusprossen, um die Perfusion der neuronalen Vorläuferzellen zu gewährleisten. Ebenso vermögen Endothelzellen in der tiefen Subventrikulärzone agieren, die über die starke Netrin-1-Expression zur Verzweigung und Proliferation angehalten werden, auch hier mit dem Ziel der adäquaten Perfusion. DCC kann hierbei nicht eindeutig als Rezeptor ausgeschlossen werden.
- o DCC und Netrin-1 konnten in Assoziation in neuronalen Zellverbänden sowohl des fetalen als auch des adulten Großhirns nachgewiesen werden. Ein möglicher Apoptoseschutz, sowie eine, die Plastizität des Gehirns gewährleistende Funktion können diskutiert werden.

#### **4.7 Ausblick**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werfen viele neue Fragen und Anregungen auf, die es in zukünftigen Studien zu klären gilt:

- o Netrin-1, als lösliches Protein kann bekanntermaßen Bindungen zu verschiedenen Rezeptormolekülen ausbilden. Es stellt sich nun die Frage nach der Verteilung des UNC-5-Rezeptors, des Robo-4-Rezeptors, als Modulator des DCC-Rezeptors, sowie Rig1, die an Kreuzungsstellen des fetalen ZNS in Interaktion treten. Wie sind hier insbesondere das Striatum und die Innere Kapsel determiniert?
- o Können sich die unterschiedlichen Rezeptorkonstellationen für Netrin-1 in der Entwicklung zum reifen Großhirn zeitlich und regional charakterisieren lassen?
- o Welche Rolle spielt die postulierte Netrin-1-abhängige, Integrin-vermittelte radiale Migration, bei Erkrankungen mit bekannter Migrationsstörung, wie beispielsweise der Lissenzephalie?
- o Wie stellt sich das Verteilungsmuster von DCC und Netrin-1 an den Kreuzungsstellen des humanen fetalen Hirnstamms bzw. im gesamten Hirnstamm dar?

- o Können genetische Alterationen der DCC- und Netrin-1-Expression zur Ausbildung kindlicher Hirntumoren führen? Stellen DCC und Netrin-1 ihre multiplen physiologischen Funktionen ebenfalls dem Wachstum dieser malignen Entartungen zur Verfügung?
- o Wie stellen sich DCC und Netrin-1 im humanen neurodegenerativen und ischämischen Gehirn dar? Lassen sich daraus mögliche therapeutische Ansätze ableiten?

## 5 Zusammenfassung

Das primär als axonales Lenkungsmolekül beschriebene Netrin-1 und dessen Rezeptor DCC können im sich entwickelnden fetalen ZNS multimodale Funktionen ausüben. Sie lenken aussprossende Nervenfasern - als einziges aller Lenkungsmoleküle - durch eine attraktive Wirkung, lotsen migrierende Vorläuferzellen aus der Tiefe der Keimzonen zum jeweiligen Bestimmungsort im Kortex oder in subkortikal gelegene Kerngebiete. Darüber hinaus schützen sie via der so genannten „dependence“-Rezeptor-Funktion Zellen vor Apoptose. Dies geschieht dadurch, dass eine DCC exprimierende Zelle in Netrin-1-reichem Milieu vor Apoptose geschützt ist, wohingegen bei Abwesenheit des Liganden Netrin-1 ein bislang noch nicht komplett verstandener Apoptosepfad eingeleitet wird. Netrin-1 zeigt ferner eine proangiogene Wirkung auf fetale Endothelien, wobei hier die Rolle des DCC-Rezeptors noch ungewiss ist.

Es existieren keine Daten, die die Verteilung von DCC und Netrin-1 im menschlichen, fetalen Telencephalon, und hier speziell in den fetalen Rindenschichten, im Ganglien Hügel, im Striatum, sowie in präformierten Gefäßen, über unterschiedliche Entwicklungsstadien hinweg betrachtet, beschreiben. Aus diesem Grund und der mannigfaltig diskutierten multimodalen Funktionen von Netrin-1 und DCC im ZNS wurde die vorliegende Studie an 21 menschlichen, fetalen Großhirnen unterschiedlichen Alters durchgeführt, die keine neuropathologischen Alterationen der Entwicklung zeigten. Ergänzend wurde dazu das Expressionsverhalten von DCC und Netrin-1 im nicht-fetalen Großhirn, mit Fokus auf Expressionsverhalten in Neuronen der Rinde und im Mark an 23, als adulte Normalgehirne definierte Gewebeproben untersucht, um eine möglich Persistenz über die fetalen Entwicklungsstadien hinweg zu beurteilen.

Zunächst wurden nur die fetalen Gewebeproben mit einem Antikörper gegen das Ki-67-Antigen (Proliferationsmarker) zur Ermittlung der fetalen Proliferationsgebiete immunhistochemisch gefärbt. Die Untersuchung des Expressionsverhaltens für Netrin-1 und DCC erfolgte ebenfalls mittels

Immunhistochemie an den fetalen und adulten Gewebeproben. Die Auswertung erfolgte dabei anhand eines histologischen Scores.

Als proliferativ aktivste Gebiete der fetalen Rindenschichten konnten die Ventrikulärzone, Subventrikulärzone und die Intermediärzone ausgemacht werden, die mit zunehmendem Alter der Feten ihre proliferative Aktivität signifikant reduzierten. Im Ganglienhügel zeigte sich die höchste Proliferationsrate aller beurteilten fetalen Großhirnbezirke, wobei sich mit zunehmendem Alter keine Regression des Expressionsverhaltens darbot.

Gerade diese Proliferationsbereiche des fetalen Großhirns (abgesehen von der Intermediärzone) zeigten keine signifikanten Unterschiede im Expressionsverhalten für DCC und Netrin-1, mit jeweils sehr hohen Expressionsraten. Sowohl die Netrin-1-, als auch die DCC-Expression zeigte in der Subventrikulärzone hingegen eine Regression mit zunehmendem Alter der Feten.

Die Rindenplatte imponierte für DCC als auch für Netrin-1 als Ort mit sehr starker Expression ohne Nachweis einer Regression mit zunehmendem Alter. Im Striatum, als Beispiel für subkortikal gelegene Neuronengruppen, konnten ebenso beide Moleküle nachgewiesen werden, wobei die DCC-Expression mit zunehmendem Alter der Feten rückläufig war.

Präformierte fetale Gefäße zeigten eine sehr starke Netrin-1-Expression in Endothelien, jedoch eine schwache DCC-Expression. Darüber hinaus konnten sowohl im Ependym, als auch im Plexus choroideus der Seitenventrikel starke proliferative Aktivität und Netrin-1- und DCC-Expression detektiert werden.

Als eindrucklich zeigte sich das Färbeverhalten von insbesondere Netrin-1 in der Inneren Kapsel, wo sich Netrin-1 und DCC im Faserverlauf visualisieren ließen.

In den adulten Gehirnen konnten DCC und Netrin-1 ohne Regression mit zunehmendem Alter sowohl in Neuronen der Rinde, als auch in runden Zellen mit perinukleärem Hof, die am ehesten oligodendroglialer Differenzierung entsprechen, im Mark nachgewiesen werden. Die Netrin-1-Expression lag in der Rinde signifikant höher als im Mark.

DCC und Netrin-1 konnten in allen beurteilten fetalen Entwicklungsstadien nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass sie über die gesamte Reifungsperiode an der strukturellen Organisation des Großhirns beteiligt sind. Durch den Nachweis am adulten Gehirn konnte eine Persistenz der Moleküle gezeigt werden. Die heterogene Verteilung von Netrin-1 und DCC suggeriert eine regional unterschiedliche Funktion im fetalen Großhirn. Möglicherweise üben sie in den Keimzonen, in Neuronenverbänden der Rindeplatte und des Striatums, sowie in Plexus und Ependym einen Apoptoseschutz aus, und verhindern dadurch eine verfrühte Ausdifferenzierung der Keimzonen und ein Abschliffen der ventrikelnahen Zellpopulationen. Dem selben Mechanismus folgend könnten auch radiale Gliazellen vor Apoptose geschützt werden, so dass das strukturelle Migrationsgerüst gewahrt bleibt. Präformierte fetale Gefäße exprimieren kaum DCC, so dass hier weiter über die Rolle des Ligand-Rezeptor-Paares diskutiert werden muss. Die hohen Expressionsraten für Netrin-1 in der Rindenplatte und in der Subventrikulärzone können durch die attraktive Wirkung auf aussprossende Gefäße eine ausreichende Vaskularisierung und somit eine Garantie von Substratzu- und -abfuhr für diese sensiblen Regionen gewährleisten. Die starke Anwesenheit von DCC und besonders von Netrin-1 in der Inneren Kapsel deutet auf ein Lenkungsvermögen hin, dass gerade an Knotenpunkten die Richtung auswachsender Fasern reguliert. Der Nachweis von Netrin-1 und DCC im sich entwickelnden menschlichen Telencephalon unter Berücksichtigung der regionalen Verteilung lässt den Stellenwert dieser beiden Proteine für die physiologische Entwicklung des fetalen Großhirns erkennen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ackerman SL, Kozak LP, Przyborski SA, Rund LA, Boyer BB, Knowles BB *The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein* Nature 1997;386(6627):838-842.
2. Aitkenhead M, Christ B, Eichmann A, Feucht M, Wilson DJ, Wilting J *Paracrine and autocrine regulation of vascular endothelial growth factor during tissue differentiation in the quail* Dev Dyn 1998;212(1):1-13.
3. Alcantara S, Ruiz M, de Castro F, Soriano E, Sotelo C *Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system* Development 2000;127(7):1359-1372.
4. Altman J *Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb* J Comp Neurol 1969;137(4):433-457.
5. Alvarez-Buylla A, Herrera DG, Wichterle H *The subventricular zone: Source of neuronal precursors for brain repair* Prog Brain Res 2000;127:1-11.
6. Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein J L *Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes* Science 1997;278(5337):474-476.
7. Anton ES, Kreidberg JA, Rakic P *Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex* Neuron 1999;22(2):277-289.
8. Austin CP, Cepko CL *Cellular migration patterns in the developing mouse cerebral cortex* Development 1990;110(3):713-732.
9. Bär, T *The vascular system of the cerebral cortex* Adv Anat Embryol Cell Biol 1980;59:1-62.
10. Bastiani MJ, Raper JA, Goodman CS *Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. III. Selective affinity of the G growth cone for the P cells within the A/P fascicle* J Neurosci 1984;4(9):2311-2328.
11. Bastiani MJ, du Lac S, Goodman CS *Guidance of neuronal growth cones in the grasshopper embryo. I. Recognition of a specific axonal pathway by the pCC neuron* J Neurosci 1986;6(12):3518-3531.



12. Behar O, Golden JA, Mashimo H, Schoen FJ, Fishman MC *Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart* Nature 1996;383(6600):525-528.
13. Behar TN, Dugich-Djordjevic MM, Li YX, Ma W, Somogyi R, Wen X, Brown E, Scott C, McKay RD, Barker JL *Neurotrophins stimulate chemotaxis of embryonic cortical neurons* Eur J Neurosci 1997;9(12):2561-2570.
14. Behar TN, Scott CA, Greene CL, Wen X, Smith SV, Maric D, Liu QY, Colton CA, Barker JL *Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration* J Neurosci 1999;19(11):4449-4461.
15. Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, Greene CL, Barker JL *GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex* Cereb Cortex 2000;10(9):899-909.
16. Bernier PJ, Vinet J, Cossette M, Parent A *Characterization of the subventricular zone of the adult human brain: evidence for the involvement of Bcl-2* Neurosci Res 2000;37(1):67-78.
17. Bonhoeffer F, Huf J *In vitro experiments on axon guidance demonstrating an anterior-posterior gradient on the tectum* EMBO J 1982;1(4):427-431.
18. Bray D, Chapman K *Analysis of microspike movements on the neuronal growth cone* J Neurosci 1985;5(12):3204-3213.
19. Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME *Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors* Nature 1995;378(6556):498-501.
20. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W *Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation* Development 1992;114(2):521-532.
21. Brückner K, Pasquale EB, Klein R *Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors* Science 1997;275(5306):1640-1643.
22. Brunet I, Weinl C, Piper M, Trembleau A, Volovitch M, Harris W, Prochiantz A., Holt C *The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons* Nature 2005;438(7064):94-98.
23. Cajal, S Ramón y *La Rétine de vertébré* La Cellule 1892;9:119-258.
24. Caroni P, Schwab ME *Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter* Neuron 1988;1(1):85-96.

25. Chan WY, Lorke DE, Tiu SC, Yew DT *Proliferation and apoptosis in the developing human neocortex* Anat Rec 2002;267(4):261-276.
26. Charron F, Stein E, Jeong J, McMahon AP, Tessier-Lavigne M *The morphogen Sonic Hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance* Cell 2003;113(1):11-23.
27. Chauhan AN, Lewis PD *A quantitative study of cell proliferation in ependyma and choroid plexus in the postnatal rat brain* Neuropathol Appl Neurobiol. 1979;5(4):303-309.
28. Chen H, Chedotal A, He Z, Goodman CS, Tessier-Lavigne M *Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III* Neuron 1997;19(3):547-559.
29. Cheng HJ, Nakamoto M, Bergemann AD, Flanagan JG *Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map* Cell 1995;82(3):371-381.
30. Chenn A, McConnell SK *Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis* Cell 1995;82(4):631-641.
31. Chilton JK *Molecular mechanisms of axon guidance* Dev Biol 2006;292(1):13-24.
32. Choi BH. *Developmental events during the early stages of cerebral cortical neurogenesis in man. A correlative light, electron microscopic, immunohistochemical and Golgi study* Acta Neuropathol 1988;75(5):441-447.
33. Chun JJ, Nakamura MJ, Shatz CJ *Transient cells of the developing mammalian telencephalon are peptide-immunoreactive neurons* Nature 1987;325(6105):617-620.
34. Colamarino SA, Tessier-Lavigne M *The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons* Cell 1995;81(4):621-629.
35. Corset V, Nguyen-Ba-Charvet KT, Forcet C, Moyses E, Chedotal A, Mehlen P *Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor* Nature 2000;407(6805):747-750.

36. Cossmann PH, Eggli PS, Christ B, Kurz H *Mesoderm-derived cells proliferate in the embryonic central nervous system: confocal microscopy and three-dimensional visualization* Histochem Cell Biol 1997;107(3):205-213.
37. Del Bigio MR, Bruni JE *Periventricular pathology in hydrocephalic rabbits before and after shunting* Acta Neuropathol 1988;77(2):186-195.
38. Drescher U, Kremoser C, Handwerker C, Loschinger J, Noda M, Bonhoeffer F *In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases* Cell 1995;82(3):359-370.
39. Drescher U *The Eph family in the patterning of neural development* Curr Biol 1997;7(12):R799-R807.
40. du Lac S, Bastiani MJ, Goodman CS *Guidance of neuronal growth cones in the grasshopper embryo. II. Recognition of a specific axonal pathway by the aCC neuron* J Neurosci 1986;6(12):3532-3541.
41. Duckett S *The establishment of internal vascularization in the human telencephalon* Acta Anat (Basel) 1971;80(1):107-113.
42. Eichmann A, Makinen T, Alitalo K *Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation* Genes Dev 2005;19(9):1013-1021.
43. Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RA, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF *Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex* J Neurosci 2005;25(1):247-251.
44. Enomoto T, Fujita M, Cheng C, Nakashima R, Ozaki M, Inoue M, Nomura T *Loss of expression and loss of heterozygosity in the DCC gene in neoplasms of the human female reproductive tract* Br J Cancer 1995;71(3):462-467.
45. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW *Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers* Science 1990;247(4938):49-56.
46. Forcet C, Ye X, Granger L, Corset V, Shin H, Bredesen DE, Mehlen P *The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation* Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98(6):3416-3421.

47. Forcet C, Stein E, Pays L, Corset V, Llambi F, Tessier-Lavigne M, Mehlen P *Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation* Nature 2002;417(6887):443-447.
48. Frisen J, Holmberg J, Barbacid M *Ephrins and their Eph receptors: Multitalented directors of embryonic development* EMBO J 1999;18(19):5159-5165.
49. Furne C, Corset V, Herincs Z, Cahuzac N, Hueber AO, Mehlen P *The dependence receptor DCC requires lipid raft localization for cell death signalling* Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103(11):4128-4133.
50. Gates MA, Thomas LB, Howard EM, Laywell ED, Sajin B, Faissner A, Gotz B, Silver J, Steindler DA *Cell and molecular analysis of the developing and adult mouse subventricular zone of the cerebral hemispheres* J Comp Neurol 1995;361(2):249-266.
51. Georges-Labouesse E, Mark M, Messaddeq N, Gansmuller A *essential role of alpha 6 integrins in cortical and retinal lamination* Curr Biol 1998;8(17):983-986.
52. Goldman SA *Adult neurogenesis: from canaries to the clinic* J Neurobiol 1998;36(2):267-286.
53. Goodman CS, Spitzer NC *Embryonic development of identified neurones: differentiation from neuroblast to neurone* Nature 1979;280(5719):208-214.
54. Graus-Porta D, Blaess S, Senften M, Littlewood-Evans A, Damsky C, Huang Z, Orban P, Klein R, Schittny JC, Muller U *Beta1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar Cortex* Neuron 2001;31(3):367-379.
55. Guijarro P, Simo S, Pascual M, Abasolo I, Del Rio JA, Soriano E *Netrin1 exerts a chemorepulsive effect on migrating cerebellar interneurons in a Dcc-independent way* Mol Cell Neurosci 2006;33(4):389-400.
56. Guirland C, Suzuki S, Kojima M, Lu B, Zheng JQ *Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones* Neuron 2004;42(1):51-62.
57. Hamasaki T, Goto S, Nishikawa S, Ushio Y *A role of netrin-1 in the formation of the subcortical structure striatum: repulsive action on the migration of late-born striatal neurons* J Neurosci 2001;21(12):4272-4280.
58. He Z, Tessier-Lavigne M *Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III* Cell 1997;90(4):739-751.

59. Heffron DS, Golden JA *DM-GRASP is necessary for nonradial cell migration during chick diencephalic development* J Neurosci 2000;20(6):2287-2294.
60. Henkemeyer M, Orioli D, Henderson JT, Saxton TM, Roder J, Pawson T, Klein R *Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system* Cell 1996;86(1):35-46.
61. Herincs Z, Corset V, Cahuzac N, Furne C, Castellani V, Hueber AO, Mehlen P *DCC association with lipid rafts is required for netrin-1-mediated axon guidance* J Cell Sci 2005;118(Pt 8):1687-1692.
62. Hevner RF *From radial glia to pyramidal-projection neuron: transcription factor cascades in cerebral cortex development* Mol Neurobiol 2006;33(1):33-50.
63. Hinrichsen KV *Humanembryologie. Lehrbuch und Atlas der vorgeburtlichen Entwicklung des Menschen* Springer, Berlin; 1990.
64. Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, Takaku F *A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene* Science 1987;238(4834):1717-1720.
65. Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E A *Ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion* Cell 1999;97(7):927-941.
66. Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA *Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations* Nat Genet 2000;26(1):93-96.
67. Hsu SM, Raine L, Fanger H *Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures* J Histochem Cytochem 1981;29(4):577-580.
68. Hsu YH, Shaw CK, Chuong CM *Immunohistochemical localization of Deleted-in-Colon-Cancer (DCC) protein in human epithelial, neural, and neuro-endocrine tissues in paraffin sections with antigen retrieval* Kaohsiung J Med Sci 2001;17(7):351-357.
69. Hu G, Zhang S, Vidal M, Baer JL, Xu T, Fearon ER *Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway* Genes Dev 1997;11(20):2701-2714.
70. Imamura T, Arima T, Kato H, Miyamoto S, Sasazuki T, Wake N *Chromosomal deletions and K-ras gene mutations in human endometrial carcinomas* Int J Cancer 1992;51(1):47-52.

71. Itokazu Y, Kitada M, Dezawa M, Mizoguchi A, Matsumoto N, Shimizu A, Ide C *Choroid plexus ependymal cells host neural progenitor cells in the rat* *Glia* 2006;53(1):32-42.
72. Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, Tessier-Lavigne M *Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor* *Cell* 1996;87(2):175-185.
73. Keleman K, Dickson BJ *Short- and long-range repulsion by the drosophila Unc5 netrin receptor* *Neuron* 2001;32(4):605-617.
74. Kendler A, Golden JA *Progenitor cell proliferation outside the ventricular and subventricular zones during human brain development* *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55(12):1253-1258.
75. Kikuchi K, Ishida H, Kimura T *Molecular cloning of a novel member of semaphorin family genes, semaphorin Z* *Brain Res Mol Brain Res* 1997;51(1-2):229-237.
76. Kitsukawa T, Shimizu M, Sanbo M, Hirata T, Taniguchi M, Bekku Y, Yagi T, Fujisawa H *Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice* *Neuron* 1997;19(5):995-1005.
77. Klagsbrun M, Eichmann A *A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis* *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(4-5):535-548.
78. Kolodkin AL, LeVengood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD *Neuropilin is a semaphorin III receptor* *Cell* 1997;90(4):753-762.
79. Kostovic I, Rakic P *Cytology and time of origin of interstitial neurons in the white matter in infant and adult human and monkey telencephalon* *J Neurocytol* 1980;9(2):219-242.
80. Kostovic I, Rakic P *Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain* *J Comp Neurol* 1990;297(3):441-470.
81. Kotrla KJ, Goodman CS *Transient expression of a surface antigen on a small subset of neurones during embryonic development* *Nature* 1984;311(5982):151-153.
82. Kuban KC, Gilles FH *Human telencephalic angiogenesis* *Ann Neurol* 1985;17(6):539-548.
83. Kurz H *Physiology of angiogenesis* *J Neurooncol* 2000;50(1-2):17-35.

84. Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG *The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex* J Neurosci 1999;19(18):7881-7888.
85. Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M *Vertebrate homologues of C. elegans UNC-5 are candidate netrin receptors* Nature 1997;386(6627):833-838.
86. Letinic K, Rakic P *Telencephalic origin of human thalamic GABAergic neurons* Nat Neurosci 2001;4(9):931-936.
87. Letinic K, Zoncu R, Rakic P *Origin of GABAergic neurons in the human neocortex* Nature 2002;417(6889):645-649.
88. Levitt P, Cooper ML, Rakic P *Early divergence and changing proportions of neuronal and glial precursor cells in the primate cerebral ventricular zone* Dev Biol 1983;96(2):472-484.
89. Liu Y, Stein E, Oliver T, Li Y, Brunken WJ, Koch M, Tessier-Lavigne M, Hogan BL *Novel role for netrins in regulating epithelial behavior during lung branching morphogenesis* Curr Biol 2004;14(10):897-905.
90. Livesey FJ, Hunt SP *Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammalian nervous system suggests roles in retinal, striatal, nigral, and cerebellar development* Mol Cell Neurosci 1997;8(6):417-429.
91. Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P *Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC* EMBO J 2001;20(11):2715-2722.
92. Lu X, Le Noble F, Yuan L, Jiang Q, De Lafarge B, Sugiyama D, Breant C, Claes F, De Smet F, Thomas JL, Autiero M, Carmeliet P, Tessier-Lavigne M, Eichmann A *The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system* Nature 2004;432(7014):179-186.
93. MacCallum DE, Hall PA *The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67* J Pathol 2000;191(3):286-298.
94. Marillat V, Sabatier C, Failli V, Matsunaga E, Sotelo C, Tessier-Lavigne M, Chedotal A *The slit Receptor Rig-1/Robo3 controls midline crossing by hindbrain precerebellar neurons and axons* Neuron 2004;43(1):69-79.
95. Marin-Padilla M *Early prenatal ontogenesis of the cerebral cortex (neocortex) of the cat (Felis domestica). A Golgi study. I. The primordial neocortical organization* Z Anat Entwicklungsgesch 1971;134(2):117-145.

96. Marin-Padilla M *Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex* Trends Neurosci 1998;21(2):64-71.
97. Marin O, Anderson SA, Rubenstein JL *Origin and molecular specification of striatal interneurons* J Neurosci 2000;20(16):6063-6076.
98. Marin O, Yaron A, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JL *Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions* Science 2001;293(5531):872-875.
99. Marin O, Rubenstein JL *Cell migration in the forebrain* Annu Rev Neurosci 2003;26:441-483.
100. Mark MD, Lohrum M, Puschel AW *Patterning neuronal connections by chemorepulsion: the semaphorins* Cell Tissue Res 1997;290(2):299-306.
101. Matsunaga E, Tauszig-Delamasure S, Monnier PP, Mueller BK, Strittmatter SM, Mehlen P, Chedotal A *RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival* Nat Cell Biol 2004;6(8):749-755.
102. Matthes DJ, Sink H, Kolodkin AL, Goodman CS *Semaphorin II can function as a selective inhibitor of specific synaptic arborizations* Cell 1995;81(4):631-639.
103. Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, Pays L, Arnaud S, Gespach C, Bredesen DE, Scoazec JY, Mehlen P *Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis* Nature 2004;431(7004):80-84.
104. Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE *The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis* Nature 1998;395(6704):801-804.
105. Mehlen P, Bredesen DE *The dependence receptor hypothesis* Apoptosis 2004;9(1):37-49.
106. Mehlen P, Thibert C *Dependence receptors: between life and death* Cell Mol Life Sci 2004;61(15):1854-1866.
107. Mehlen P, Furne C *Netrin-1: when a neuronal guidance cue turns out to be a regulator of tumorigenesis* Cell Mol Life Sci 2005;62(22):2599-2616.
108. Messersmith EK, Leonardo ED, Shatz CJ, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Kolodkin AL *Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord* Neuron 1995;14(5):949-959.



109. Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R *Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude* Acta Neuropathol 2001;101(3):249-255.
110. Miyata T, Kawaguchi A, Saito K, Kawano M, Muto T, Ogawa M *Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells* Development 2004;131(13):3133-3145.
111. Mollgard K, Schumacher U *Immunohistochemical assessment of cellular proliferation in the developing human CNS using formalin-fixed paraffin-embedded material* J Neurosci Methods 1993;46(3):191-196.
112. Nguyen A, Cai H *Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC-dependent ERK1/2-eNOS feed-forward mechanism* Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103(17):6530-6535.
113. Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR *Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex* Nature 2001;409(6821):714-720.
114. Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR *Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases* Nat Neurosci 2004;7(2):136-144.
115. Osborne PB, Halliday GM, Cooper HM, Keast JR *Localization of immunoreactivity for deleted in colorectal cancer (DCC), the receptor for the guidance factor netrin-1, in ventral tier dopamine projection pathways in adult rodents* Neuroscience 2005;131(3):671-681.
116. Park KW, Crouse D, Lee M, Karnik, SK, Sorensen LK, Murphy KJ, Kuo CJ, Li DY *The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor* Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101(46):16210-16215.
117. Park S, Frisen J, Barbacid M *Aberrant axonal projections in mice lacking EphA8 (Eek) tyrosine protein kinase receptors* EMBO J 1997;16(11):3106-3114.
118. Polleux F, Giger RJ, Ginty DD, Kolodkin AL, Ghosh A *Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions* Science 1998;282(5395):1904-1906.
119. Polleux F, Morrow T, Ghosh A *Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites* Nature 2000;404(6778):567-573.

120. Przyborski SA, Knowles BB, Ackerman SL *Embryonic phenotype of Unc5h3 mutant mice suggests chemorepulsion during the formation of the rostral cerebellar boundary* Development 1998;125(1):41-50.
121. Rajagopalan S, Deitinghoff L, Davis D, Conrad S, Skutella T, Chedotal A, Mueller BK, Strittmatter SM *Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule* Nat Cell Biol 2004;6(8):756-762.
122. Rakic P *Neuronal migration and contact guidance in the primate telencephalon* Postgrad Med J 1978;54 Suppl 1:25-40.
123. Rakic P *Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia* Cereb Cortex 2003;13(6):541-549.
124. Raper JA, Bastiani MJ, Goodman CS *Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. IV. The effects of ablating the A and P axons upon the behavior of the G growth cone* J Neurosci 1984;4(9):2329-2345.
125. Raper JA, Kapfhammer JP *The enrichment of a neuronal growth cone collapsing activity from embryonic chick brain* Neuron 1990;4(1):21-29.
126. Reyes-Mugica M, Rieger-Christ K, Ohgaki H, Ekstrand BC, Helie M, Kleinman G, Yahanda A, Fearon ER, Kleihues P, Reale MA *Loss of DCC expression and glioma progression* Cancer Res 1997;57(3):382-386.
127. Sabatier C, Plump AS, Le Ma, Brose K, Tamada A, Murakami F, Lee EY, Tessier-Lavigne M *The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of Slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons* Cell 2004;117(2):157-169.
128. Sarnat HB *Regional differentiation of the human fetal ependyma: immunocytochemical markers* J Neuropathol Exp Neurol 1992;51(1):58-75.
129. Sarnat HB *Histochemistry and immunocytochemistry of the developing ependyma and choroid plexus* Microsc Res Tech 1998;41(1):14-28.
130. Scheck AC, Coons SW *Expression of the tumor suppressor gene DCC in human gliomas* Cancer Res 1993;53(23):5605-5609.
131. Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS *Mutations affecting growth cone guidance in Drosophila: genes necessary for guidance toward or away from the midline* Neuron 1993;10(3):409-426.

132. Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M *The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6* Cell 1994;78(3):409-424.
133. Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M *Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system* Cell 1996; 87(6):1001-1014.
134. Sidman RL, Rakic P *Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review* Brain Res 1973;62(1):1-35.
135. Simonati A, Tosati C, Rosso T, Piazzola E, Rizzuto N *Cell proliferation and death: morphological evidence during corticogenesis in the developing human brain* Microsc Res Tech 1999;45(6):341-352.
136. Smart IH *Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the spinal cord in the mouse* J Anat 1972;111(Pt 3):365-380.
137. Spassky N, de Castro F, Le Bras B, Heydon K, Queraud-LeSaux F, Bloch-Gallego E, Chedotal A, Zalc B, Thomas JL *Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1* J Neurosci 2002;22(14):5992-6004.
138. Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A *Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis* J Neurosci 2005;25(1):10-18.
139. Sperry RW *Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections* Proc Natl Acad Sci U S A 1963;50:703-710.
140. Srinivasan K, Strickland P, Valdes A, Shin GC, Hinck L *Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis* Dev Cell 2003;4(3):371-382.
141. Stein E und Tessier-Lavigne M *Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex* Science 2001;291(5510):1928-1938.
142. Stein E, Zou Y, Poo M, Tessier-Lavigne M *Binding of Netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation* Science 2001; 291(5510):1976-82.
143. Taghert PH, Doe CQ, Goodman CS *Cell determination and regulation during development of neuroblasts and neurones in grasshopper embryo* Nature 1984;307(5947):163-165.

144. Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS Jr *Early ontogeny of the secondary proliferative population of the embryonic murine cerebral wall* J Neurosci 1995;15(9):6058-6068.
145. Takahashi T, Fournier A, Nakamura F, Wang LH, Murakami Y, Kalb RG, Fujisawa H, Strittmatter SM *Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors* Cell 1999;99(1):59-69.
146. Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming GI, Song H, Chedotal A, Winberg ML, Goodman CS, Poo M, Tessier-Lavigne M, Comoglio PM *Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates* Cell 1999;99(1):71-80.
147. Taniguchi M, Yuasa S, Fujisawa H, Naruse I, Saga S, Mishina M, Yagi T *Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection* Neuron 1997;19(3):519-530.
148. Tessier-Lavigne M, Placzek M, Lumsden AG, Dodd J, Jessell TM *Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system* Nature 1988;336(6201):775-778.
149. Tessier-Lavigne M, Goodman CS *The molecular biology of axon guidance* Science 1996;274(5290):1123-1133.
150. Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, Schutte M, Hahn SA, Overhauser J, Willson JK, Markowitz S, Hamilton SR, Kern SE, Kinzler KW, Vogelstein B *Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers* Nat Genet 1996;13(3):343-346.
151. Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, et al. *Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype* Science 1995;269(5221):230-234.
152. Tsuchiya A, Hayashi T, Deguchi K, Sehara Y, Yamashita T, Zhang H, Lukic V, Nagai M, Kamiya T, Abe K *Expression of netrin-1 and its receptors DCC and neogenin in rat brain after ischemia* Brain Res 2007;1159:1-7.
153. Uchino S, Tsuda H, Noguchi M, Yokota J, Terada M, Saito T, Kobayashi M, Sugimura T, Hirohashi S *Frequent loss of heterozygosity at the DCC locus in gastric cancer* Cancer Res 1992;52(11):3099-3102.
154. Valverde F, De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L *Time of origin and early fate of preplate cells in the cerebral cortex of the rat* Cereb Cortex 1995;5(6):483-493.

155. Virgintino D, Errede M, Robertson D, Girolamo F, Masciandaro A, Bertossi M *VEGF expression is developmentally regulated during human brain angiogenesis* Histochem Cell Biol 2003;119(3):227-232.
156. Virgintino D, Girolamo F, Errede M, Capobianco C, Robertson D, Stallcup WB, Perris R, Roncali L *An intimate interplay between precocious, migrating pericytes and endothelial cells governs human fetal brain angiogenesis* Angiogenesis 2007;10(1):35-45.
157. Walter J, Henke-Fahle S, Bonhoeffer F *Avoidance of posterior tectal membranes by temporal retinal axons* Development 1987;101(4):909-913.
158. Wilson BD, Li M, Park KW, Suli A, Sorensen LK, Larrieu-Lahargue F, Urness LD, Suh W, Asai J, Kock GA, Thorne T, Silver M, Thomas KR, Chien CB, Losordo DW, Li DY *Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis* Science 2006;313(5787):640-644.
159. Wray S *Development of luteinizing hormone releasing hormone neurones* J Neuroendocrinol 2001;13(1):3-11.
160. Xu Q, Allard G, Holder N, Wilkinson DG *Expression of truncated *Sek-1* receptor tyrosine kinase disrupts the segmental restriction of gene expression in the *Xenopus* and zebrafish hindbrain* Development 1995;121(12):4005-4016.
161. Yazdani U, Terman JR *The semaphorins* Genome Biol 2006;7(3):211.
162. Yebra M, Montgomery AM, Diaferia GR, Kaido T, Silletti S, Perez B, Just ML, Hildbrand S, Hurford R, Florkiewicz E, Tessier-Lavigne M, Cirulli V *Recognition of the neural chemoattractant *netrin-1* by integrins *alpha6beta4* and *alpha3beta1* regulates epithelial cell adhesion and migration* Dev Cell 2003;5(5):695-707.
163. Zecevic N *Cellular composition of the telencephalic wall in human embryos* Early Hum Dev 1993;32(2-3):131-149.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

BDNF	brain derived neurotrophic factor
BMP	bone morphogenetic protein
BrdU	Bromdeoxyuridin
Ca <sup>++</sup>	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Caspase	cystein aspartate protease
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DCC	deleted in colorectal cancer
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EGFR	epidermal growth factor receptor
GABA	gamma amino butyric acid (Gamma-Amino-Buttersäure)
GFAP	glial fibrillary acide protein (saures gliales Faserprotein)
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
IN-1	inhibitor of neurite growth 1
IgG	Immunglobulin G
IPC	intermediate progenitor cell
MMP	Matrix Metalloproteinase
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NT4	Neurotrophin 4
Pax	paired box-Gen
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
RGM	repulsive guidance molecule

Robo	roundabout
Shh	sonic hedgehog
SSW	Schwangerschaftswoche
Tbr	T-box brain-Gen
UNC	uncoordinated
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
ZNS	Zentralnervensystem

## 7.2 Danksagungen

Mein Dank gilt:

...allen Mitarbeitern des Institutes für Hirnforschung in Tübingen für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle Frau Ott, Frau Trautmann und Herrn Schlaszus danken, für die Einarbeitung in die verschiedenen immunhistochemischen Färbeverfahren.

...Herrn Dr. Rudi Beschorner und Dr. Perikles Simon für anregende Diskussionen.

...allen ehemaligen und aktuellen Doktoranden des Institutes, für interessante Beiträge in diversen Seminarveranstaltungen des Institutes, die zu weiteren Diskussionen anregten.

...Herrn Prof. Dietz für die tatkräftige Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

...Herrn Prof. Meyermann für das entgegengebrachte Vertrauen, für das Überlassen des Themas und die Berichterstattung, für die Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Hirnforschung und für die umfassende Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

...ganz besonders Herrn Dr. Michel Mittelbronn.

### 7.3 Lebenslauf

Patrick Nikolaus Harter

23.02.1980 geboren in Böblingen

1986-1990 Grundschule Mötzingen

1990-1999 Otto-Hahn-Gymnasium Nagold

1999 Allgemeine Hochschulreife

1999-2000 Zivildienst im Kreiskrankenhaus Nagold

2001-2008 Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

2005-2008 Promotion am Institut für Hirnforschung, Universität Tübingen

Betreuer: Prof. Dr. R. Meyermann

„Expression des axonalen Lenkungsmoleküls Netrin-1 und seines  
Rezeptors DCC im humanen fetalen Telencephalon“

20.05.2008 Ärztliche Prüfung / Approbation

2006-2007 Praktisches Jahr

1. Klinikum Stuttgart (Innere Medizin)

Prof. Mergenthaler

2. Klinikum Stuttgart (Chirurgie)

Prof. Merkle, Prof. Hupp, Prof. Hopf

3. Klinikum Stuttgart

Prof. Wiethölter (Neurologie)