

**DER EINFLUSS DES CHEMOKINREZEPTORS CXCR4  
AUF DIE POSITIONIERUNG GABAERGER NEURONE IM  
HIPPOCAMPUS DER MAUS**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades**

*doctor medicinae* (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Oliver Storch

geboren am 08.09.1995 in Friedrichroda

**Gutachter 1:**

Prof. Dr. Ralf Stumm, Universitätsklinikum Jena

**Gutachter 2:**

Prof. Dr. Knut Holthoff, Universitätsklinikum Jena

**Gutachter 3:**

Prof. Dr. Stefan Britsch, Universität Ulm

**Tag der der öffentlichen Verteidigung: 01.09.2020**

**Inhaltsverzeichnis**

**Abkürzungsverzeichnis..... III**

**Zusammenfassung .....IV**

**1 Einleitung ..... 1**

1.1 Das CXCL12/ CXCR4/ CXCR7-System ..... 2

1.2 Die Entwicklung des Hippocampus unter dem Einfluss des CXCL12/ CXCR4/ CXCR7-Systems..... 3

1.2.1 Anatomischer Aufbau und zelluläre Zusammensetzung des Hippocampus ..... 4

1.2.2 Migrationsarten und -strategien neuronaler Zellen ..... 6

1.2.3 Die Migration von GABAergen Neuronen unter dem Einfluss von CXCL12 und CXCR4 ..... 9

*1.2.3.1 Betrachtung der Interneuronenmigration/-verteilung und der Expression von CXCL12 im Hippocampus an verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung..... 9*

*1.2.3.2 CXCR4 hat essentiellen Einfluss auf das Verhalten migrierender Interneurone..... 11*

**2 Ziele der Arbeit..... 13**

**3 Methodik ..... 14**

3.1 Tiere..... 14

3.1.1 Verwendete mausgenetische Modelle ..... 14

*3.1.1.1 Konditionaler Knockout des Cxcr4-Gens und Markierung von Interneuronen mit tdTomato durch die Nkx2.1-Cre..... 14*

*3.1.1.2 Verwendung des Cxcr4<sup>CreER</sup>-Modells zur Markierung aller Cxcr4-positiven Zellen und ihrer Nachkommen ausgehend vom Zeitpunkt der Tamoxifengabe ..... 15*

3.1.2 Maushaltung ..... 16

3.1.3 Tierversuchsgenehmigung..... 16

3.2 Geräte, Chemikalien sowie Puffer und Lösungen..... 17

3.3 Immunhistochemie ..... 17

    3.3.1 Antikörper ..... 17

    3.3.2 Entnahme und Vorbehandlung des Gewebes..... 18

    3.3.3 Kryostatenschnitte ..... 18

3.3.4	Immunfärbung .....	18
3.4	[ <sup>35</sup> S]- <i>In-situ</i> -Hybridisierung .....	20
3.4.1	Entnahme und Vorbehandlung des Gewebes .....	20
3.4.2	Kryostatenschnitte .....	20
3.4.3	Prähybridisierung .....	20
3.4.4	Sequenzen der Plasmide und Herstellung der [ <sup>35</sup> S]-Ribosonden .....	21
3.4.5	Hybridisierung .....	21
3.5	Mikroskopie .....	23
3.6	Auswertung .....	23
3.6.1	Zellzählung .....	23
3.6.2	Statistische Methoden .....	24
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>
4.1	Expression von CXCR4 in GABAergen Vorläufern des medialen Ganglienhügels ...	25
4.2	Darstellung der Nachkommen CXCR4-positiver GABAerger Vorläufer in adulten Tieren mit dem <i>Cxcr4</i> <sup>CreER</sup> -Modell .....	29
4.3	In <i>Nkx2.1</i> -Cre vermittelten <i>Cxcr4</i> cKO-Mäusen ist die Zelldichte GABAerger Vorläufer an P0 reduziert .....	32
4.4	Zellschichtenabhängige Reduktion sowie teilweise prozentuale Umverteilung <i>Lhx6</i> -positiver Zellen an P0 in <i>Cxcr4</i> cKOs .....	35
4.5	In adulten <i>Cxcr4</i> cKO-Mäusen ist die Zelldichte tdTomato-positiver Interneurone besonders in CA2+3 reduziert .....	38
4.6	Reduktion von mpIN in verschiedenen Schichten sowie teilweise prozentuale Umverteilung an P28 in <i>Cxcr4</i> cKOs .....	41
4.7	<i>GAD65/67</i> -positive Zellen sind in <i>Cxcr4</i> cKOs leicht reduziert .....	45
4.8	Starke Reduktion Somatostatin-positiver mpIN in <i>Cxcr4</i> cKOs .....	47
4.9	Die Reduktion Parvalbumin-positiver mpIN durch den <i>Cxcr4</i> cKO erreicht keine statistische Signifikanz .....	50
4.10	Der <i>Cxcr4</i> cKO hat kaum Einfluss auf Calretinin-positive mpIN .....	52
4.11	Der <i>Cxcr4</i> cKO beeinflusst <i>Ndnf</i> -positive Neurone schwach, während er auf <i>Akr1c18</i> -positive Neurone keinen Einfluss nimmt .....	53
4.12	<i>Arg3.1</i> -positive Zellen des <i>stratum granulosum</i> im <i>Gyrus dentatus</i> sind in <i>Cxcr4</i> cKOs leicht erhöht .....	55

<b>5 Diskussion .....</b>	<b>57</b>
5.1 Expression von CXCR4 an bestimmten Entwicklungszeitpunkten des Hippocampus und Abstammungsverfolgung CXCR4-exprimierender GABAerger Vorläufer.....	57
5.2 Bedeutung des CXCR4-Rezeptors für Migration und Integration hippokampaler Interneurone aus medialem Ganglienhügel und präoptischer Region.....	59
5.2.1 Betrachtung des <i>Cxcr4</i> cKO zum Ende der tangentialen Migration (P0).....	59
5.2.2 Betrachtung des <i>Cxcr4</i> cKO im adulten Hippocampus (P28) .....	62
5.2.2.1 <i>Die Somatostatin-Interneuronen-Subpopulation weist schwere Defekte bei Fehlen von CXCR4 auf</i> .....	64
5.2.2.2 <i>Die Parvalbumin- und Calretinin-Interneuronen-Subpopulationen zeigen keine Defekte bei konditionalem Cxcr4-Knockout</i> .....	66
5.2.3 Der <i>Cxcr4</i> cKO nimmt unterschiedlich Einfluss auf den Hippocampus von neugeborenen und adulten Tieren .....	67
5.3 Einfluss von CXCR4 auf die neuronale Aktivität und dessen Bedeutung für mentale Erkrankungen.....	68
<b>6 Schlussfolgerung.....</b>	<b>70</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>8 Anhang .....</b>	<b>78</b>
8.1 Ehrenwörtliche Erklärung .....	78
8.2 Danksagung .....	79
8.3 Lebenslauf .....	80
8.4 Verwendete Geräte, Chemikalien, Puffer/Lösungen und Herstellungsprotokolle .....	81
8.4.1 Geräte .....	81
8.4.2 Chemikalien.....	82
8.4.3 Puffer und Lösungen .....	84
8.4.3.1 <i>Immunhistochemie</i> .....	84
8.4.3.2 <i>In-situ-Hybridisierung</i> .....	85
8.4.4 cDNA-Sequenzen der für die [ <sup>35</sup> S]- <i>In-situ</i> -Hybridisierung genutzten Plasmide ..	88
8.4.5 Protokoll zur Herstellung von [ <sup>35</sup> S]-Ribosonden .....	91

## Abkürzungsverzeichnis

Akr1c18, aldo-keto reductase family 1 member C18	mpIN, Interneurone des medialen Ganglienhügels und der präoptischen Region
BSA, Bovines Serumalbumin	mRNA, <i>messenger</i> Ribonukleinsäure
bzw., beziehungsweise	Ndnf, neuron-derived neutrophilic factor
CA1, Cornu ammonis Region 1	ntg, nicht transgen
CA2+3, Cornu ammonis Regionen 2 und 3	OT, Objektträger
Calret, Calretinin	P..., Postnataltag...
caud, caudal	PFA, Paraformaldehyd
CGE, caudaler Ganglienhügel ( <i>engl.</i> caudal ganglionic Eminence)	p <sub>geno</sub> , P-Wert der Genotypen
Cx, Cortex	P <sub>int</sub> , P-Wert der Interaktion
CXCL12, CXC-Motiv-Chemokinligand 12	POA, Präoptische Region ( <i>engl.</i> preoptic area)
CXCR4, CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4	Pvalb, Parvalbumin
<i>Cxcr4</i> KO, <i>Cxcr4</i> -konditional-Knockout	RFP, rot fluoreszierendes Protein
CXCR7/ACKR3, atypischer Chemokinrezeptor 3	ros, rostral
DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol	RT, Raumtemperatur
DG, Gyrus dentatus ( <i>engl.</i> Dentate Gyrus)	SEM, standard error of the mean
d.h., das heißt	sg, stratum granulosum
E..., Embryonaltag...	slm, stratum lacunosum moleculare
eGFP, verstärktes grün fluoreszierendes Protein ( <i>engl.</i> enhanced green fluorescent protein)	sm, stratum moleculare
etc., et cetera	so, stratum oriens
GABA, $\gamma$ -Aminobuttersäure ( <i>engl.</i> Gamma-aminobutyric acid)	sp, stratum pyramidale
HE, Hämatoxylin-Eosin	sr, stratum radiatum
interm, intermediär	SST, Somatostatin
IRES, interne ribosomale Eintrittsstelle	SVZ, Subventrikulärzone
IZ, Intermediärzone	tdT, tdTomato
<i>Lhx6</i> , LIM/homeobox protein 6	tg, transgen
MGE, medialer Ganglienhügel ( <i>engl.</i> medial ganglionic Eminence)	VZ, Ventrikulärzone
	WT, Wildtyp
	z.B., zum Beispiel

## Zusammenfassung

Das CXCL12/ CXCR4/ CXCR7-Chemokinsystem nimmt wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung verschiedener Organsysteme, unter anderem auch auf die des zentralen Nervensystems. So ist bereits bekannt, dass die Migration GABAerger Neurone des Neocortex durch das Chemokin CXCL12 und seine Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 beeinflusst und reguliert wird. Dieser Sachverhalt wurde für den Hippocampus jedoch noch nicht betrachtet. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde daher der Chemokinrezeptor CXCR4, als Teil dieses Systems, auf seine Bedeutung für die Besiedlung des Hippocampus mit GABAergen Neuronen hin untersucht. Hierfür wurde die Maus als Modellorganismus genutzt.

Es wurden mittels der *Nkx2.1*-Cre genetisch veränderte Mäuse geschaffen. Die *Nkx2.1*-Cre-Rekombinase ist konstitutiv in Interneuronen aus dem medialen Ganglienhügel und der präoptischen Region (Ursprungsgebiete hippocampaler Interneurone) aktiv. Sie wird bereits früh in der Entwicklung GABAerger Vorläufer exprimiert und kann diese während der Migration beeinflussen. Es war dadurch möglich, das mit LoxP-Sequenzen flankierte CXCR4-Gen durch die *Nkx2.1*-Cre ausschließlich in der zu untersuchenden Zellpopulation genetisch auszuschalten. Hierdurch entstand ein konditionaler Knockout des CXCR4-Rezeptors (*Cxcr4*cKO). Zusätzlich wurde ein Cre-Reporter-Protein genutzt, wodurch alle manipulierten Zellen farblich markiert wurden. Die Verteilung der GABAergen Neurone im Hippocampus wurde dann mittels Immunhistochemie (IHC) und *in-situ*-Hybridisierung (ISH) untersucht.

Um zu klären, inwieweit CXCR4 an der Besiedlung des Hippocampus beteiligt sein kann, wurde zuerst dessen Expressionsverteilung in GABAergen Neuronen an unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten des Hipocampus untersucht: Hierbei ergab sich für die späte Embryonalphase (Embryonaltag 16) ein hoher Anteil (59%) CXCR4-positiver Interneuronenvorläufer. Dieser Anteil nahm im weiteren Verlauf der Entwicklung immer weiter ab, bis schließlich zehn Tage nach der Geburt kaum noch CXCR4-positive Interneurone nachweisbar waren. Der Zeitraum hoher CXCR4-Expression trat kongruent mit der Interneuronenmigration in den Hippocampus und CXCL12-Expression in der hippocampalen Fissur und den dem Hippocampus anliegenden Meningen auf.

Die Untersuchung des konditionalen *Cxcr4*-Knockouts erfolgte direkt nach der Geburt und im adulten Tier. Zum Zeitpunkt der Geburt (Ende der Besiedlungsphase) wurde eine Verminderung der Dichte GABAerger Vorläufer nachgewiesen. Die Reduktionen waren in

betroffenen Regionen umso stärker, je weiter diese vom Ursprungspunkt der migrierenden Zellen entfernt lagen bzw. je näher sich die Regionen am Ende des Besiedlungspfad befanden. Es lässt sich vermuten, dass aufgrund des CXCR4-Verlustes die Interneuronenvorläufer nicht in der Lage waren, ihren Migrationsweg vollständig abzuschließen.

In den adulten Tieren wurde durch den *Cxcr4*cKO ebenfalls eine reduzierte Dichte und Anzahl GABAerger Neurone hervorgerufen. Die identifizierten Defekte unterschieden sich jedoch von denen zum Zeitpunkt der Geburt. Es waren sowohl andere Regionen als auch andere Zellschichten von den Verlusten in unterschiedlich starker Ausprägung betroffen. So war direkt nach der Geburt der *Gyrus dentatus* am stärksten von den Reduktionen betroffen, während in den adulten Mäusen die CA2+3-Region die stärkste Verminderung aufwies. Dies lässt vermuten, dass sich die regions- und schichtspezifische Einordnung der GABAergen Neurone postnatal fortsetzt und der Rezeptor sowohl vor- als auch nachgeburtlich hippocampale Interneurone beeinflusst.

Weitere Untersuchungen dieser Arbeit betrachteten den konditionalen *Cxcr4*-Knockout in Bezug auf verschiedene Interneuronen-Subpopulationen. Hier ergab sich, dass die auftretenden Veränderungen im Hippocampus in den adulten Tieren größtenteils auf Reduktionen innerhalb der Somatostatin-Interneuronen-Subpopulation zurückführbar waren. Für diese wurden in einigen Zellschichten (insbesondere im *stratum oriens*) starke Reduktionen um mehr als die Hälfte der Somatostatin-positiven Zellen identifiziert, woran sich eine starke Abhängigkeit dieser Subpopulation von CXCR4 erkennen lässt. Somatostatin-positiv Interneurone kontrollieren die Erregung exzitatorischer Neurone (Pyramidenzellen, Körnerzellen) des Hippocampus. Da diese durch den *Cxcr4*cKO stark reduziert werden, ist ein Einfluss auf die neuronale Funktionalität möglich.

Zusammenfassend wurden sowohl Reduktionen als auch leichte Fehlverteilungen GABAerger Neurone bei Mangel des Rezeptors identifiziert. Somit zeigt diese Arbeit den deutlichen Einfluss des Chemokinrezeptors CXCR4 auf die Besiedlung des Hippocampus mit GABAergen Neuronen.

## 1 Einleitung

Bei den Chemokinen handelt es sich um kleine sezernierte Signalproteine (7-14 kDa), die Zellen zur Wanderung (Chemotaxis) anregen und zur Übergruppe der Zytokine gehören (Guyon 2014). Die Bewegung der Zellen folgt hierbei dem Konzentrationsgradienten des Chemokins, ist also zu seinem Sezernierungsort gerichtet (Fernandez und Lolis 2002).

Der Begriff Chemokin wurde das erste Mal im Zusammenhang mit der chemotaktischen Migration von Granulozyten beschrieben und stellt eine Verschmelzung der Wörter **chemotaktisches Zytokin** dar (Yoshimura et al. 1987). Bisher wurden in etwa 50 Chemokine gefunden, die – abhängig von Anzahl und Positionierung ihrer ersten zwei N-terminalen Zysteinreste – systematisch in vier Untergruppen eingeteilt werden: CC, CXC, C und CX<sub>3</sub>C. Die CXC-Chemokin-Gruppe ist hierbei ein evolutionär junges Phänomen, das ausschließlich in höheren Vertebraten vorkommt.

Chemokine entfalten ihre Wirkung durch Zelloberflächenrezeptoren, von denen bisher 22 charakterisiert wurden (Guyon 2014). Bei diesen handelt es sich immer um G-Proteingekoppelte 7-Transmembranhelix-Rezeptoren, die ihre Signalkaskade meist über ein G<sub>αi</sub>-Protein aktivieren (Lewellis und Knaut 2012).

Eines der wichtigsten Chemokine der CXC-Gruppe stellt CXCL12 (aktuelle Nomenklatur) dar, welches auch *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1) genannt wird. Zusammen mit seinen zwei Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 beeinflusst CXCL12 zahlreiche physiologische Vorgänge, wie z.B. die Proliferation und Migration diverser Zellarten (Deverman und Patterson 2009, Guyon 2014, Lewellis und Knaut 2012).

Im Nervensystem übernehmen CXCL12 und CXCR4 gemeinsam vielfältige Aufgaben. Unter anderem sind sie, wie oben bereits angedeutet, an der Wanderung und Proliferation, aber auch der Integration und Differenzierung von Vorläuferzellen beteiligt. Weiterhin beeinflussen sie auch die Kommunikation zwischen Neuronen, indem sie die Freisetzung von Neurotransmittern regulieren (Stumm et al. 2007, Guyon 2014).

Der Rezeptor CXCR4 ist auch bereits klinisch für die Freisetzung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark von Bedeutung. Hierbei wird CXCR4 über den Wirkstoff Plerixafor antagonisiert, wodurch die Bindung seines Liganden CXCL12 blockiert wird. Die hierdurch ins Blut gelangenden Zellen können anschließend zur Stammzelltransplantation bei Tumorerkrankungen verwendet werden (Hopman und DiPersio 2014).

Pathophysiologisch werden CXCL12 und CXCR4 mit verschiedenen Vorgängen in Verbindung gebracht, unter anderem Tumorwachstum, -metastasierung und -angiogenese (Burns et al. 2006, Li und Ransohoff 2009, Singh et al. 2007, Yu et al. 2006). Weiterhin entstehen schwere Entwicklungsdefekte im kardiovaskulären, hämatopoetischen und neuralen System sowie in Zellen des Immunsystems, wenn CXCL12 oder einer seiner Rezeptoren nicht vorhanden ist (Li und Ransohoff 2008, Nagasawa et al. 1998, Naumann et al. 2010, Sierro et al. 2007, Zou et al. 1998). Ferner werden Veränderungen der Expression von CXCL12, CXCR4 oder CXCR7 mit psychiatrischen Erkrankungen – wie z.B. Schizophrenie, Demenz, Epilepsie, Depression und Autismus – in Verbindung gebracht (Cash-Padgett et al. 2016, Meechan et al. 2012, Parachikova und Cotman 2007, Toritsuka et al. 2013, Trojan et al. 2017, Volk et al. 2015). Deshalb ist das CXCL12/ CXCR4/ CXCR7-System Gegenstand aktueller medizinischer und pharmakologischer Forschung.

### **1.1 Das CXCL12/ CXCR4/ CXCR7-System**

CXCL12 ist eines der evolutionär ältesten und konserviertesten Chemokine in Vertebraten (DeVries et al. 2006), von dem verschiedene Isoformen existieren (sechs humane, drei murine), die sich ausschließlich durch alternatives Spleißen im distalen C-Terminus unterscheiden (Yu et al. 2006). Im Gegensatz hierzu ist der N-Terminus hochkonserviert, da hierüber die Bindung an die Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 geschieht.

CXCR4 und CXCR7 zählen zu den am stärksten konservierten Chemokinrezeptoren der Vertebraten und sind wie CXCL12 essenziell für das Überleben von Mäusen (Bachelierie et al. 2014). Die drei Gene haben einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung verschiedener Systeme, was bei völligem Fehlen von einem dieser Gene schwere Entwicklungsstörungen hervorruft, welche perinatal zum Tod führen (Nagasawa et al. 1998, Naumann et al. 2010, Zou et al. 1998).

CXCR4 ist der einzige bekannte G-Protein-gekoppelte Rezeptor für CXCL12. Seine Struktur und Ligandenbindung wurden durch biochemische und biophysikalische Methoden charakterisiert (Bachelierie et al. 2014).

Die Bindung zwischen CXCL12 und CXCR4 geschieht in zwei Schritten: Initial kommt es zu einer Verbindung der Reste 12-17 von CXCL12 und 2-36 von CXCR4. Dies sorgt für eine Konformationsänderung des Rezeptors, was die Interaktion der ersten acht Aminosäuren von CXCL12 und einer nun freigelegten Bindungstasche von CXCR4 ermöglicht. Hieraus resultiert nun die G-Protein-Aktivierung (Busillo und Benovic 2007).

Der Rezeptor koppelt nach Aktivierung an ein  $G_i$ -Protein, welches in seine Untereinheiten  $G_\alpha$  und  $G_{\beta\gamma}$  dissoziiert.  $G_\alpha$  sorgt z.B. für Adenylatcyclasen-Hemmung, wodurch es zu einer Abnahme des cAMP-Spiegels kommt. Die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit aktiviert Phospholipase C- $\beta$  und den Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweg, was letztlich Prozesse wie Gentranskription, Zellmigration und -adhäsion reguliert (Busillo und Benovic 2007, Li und Ransohoff 2008, Lysko et al. 2011). Besonders die Reduktion von cAMP und die dadurch reduzierte Aktivität von Proteinkinase A nimmt Einfluss auf Richtung und Geschwindigkeit migrierender Vorläuferzellen (Lysko et al. 2011).

Nach Rezeptoraktivierung kommt es weiterhin zu Phosphorylierungen am CXCR4 C-Terminus, die von G-Protein-Rezeptor-Kinasen und Protein-Kinase C vermittelt werden. Die Phosphorylierung erlaubt anschließend die Bindung von  $\beta$ -Arrestinen, was den Rezeptor von G-Proteinen trennt und zu seiner Clathrin-abhängigen Internalisierung führt. Der Rezeptor kann dann entweder abgebaut oder zur Plasmamembran zurück transportiert werden (Busillo und Benovic 2007, Busillo et al. 2010, Li und Ransohoff 2008, Mueller et al. 2013).

Bei langanhaltender CXCL12-Stimulation von CXCR4 wird der Rezeptor vermehrt dem lysosomalen Abbau zugeführt und herunter reguliert (Sanchez-Alcaniz et al. 2011, Tarasova et al. 1998). Der Rezeptor CXCR7 wirkt diesem Vorgang entgegen. Er ist der zweite Rezeptor von CXCL12 und hat eine zehnfach höhere CXCL12-Affinität als CXCR4 (Balabanian et al. 2005). Die Ligandenbindung ruft jedoch keine G-Protein-Aktivierung hervor, weshalb CXCR7 der Gruppe der atypischen Chemokinrezeptoren zugeordnet und auch als ACKR3 (atypischer Chemokinrezeptor 3) bezeichnet wird (Benredjem et al. 2017, Graham et al. 2012). Der Rezeptor übernimmt eine so genannte *scavenging*-Funktion (*engl.* wegfangen), indem er CXCL12 bindet und für dessen Internalisierung und anschließenden Abbau in den Lysosomen sorgt. Danach kehrt CXCR7 zur Plasmamembran zurück (Bachelierie et al. 2014, Hoffmann et al. 2012, Luker et al. 2010). Dadurch wird eine übermäßige Aktivierung und Desensibilisierung von CXCR4 verhindert (Abe et al. 2014, Sanchez-Alcaniz et al. 2011). Zudem ist CXCR7 in der Lage, Chemokingradienten im Extrazellulärraum zu formen (Lewellis und Knaut 2012).

## **1.2 Die Entwicklung des Hippocampus unter dem Einfluss des CXCL12/ CXCR4/ CXCR7-Systems**

Das CXCL12/ CXCR4/ CXCR7-System übernimmt wesentliche Aufgaben bei der embryonalen Entwicklung. Daher kommt es, wie oben bereits erwähnt, zu schweren Entwicklungsdefekten, wenn eines der drei Gene fehlt bzw. entfernt (*ausgeknockt*) wird (Li

und Ransohoff 2008, Nagasawa et al. 1998, Naumann et al. 2010, Sierro et al. 2007, Zou et al. 1998). Das System beeinflusst essentiell die Entwicklung des Nervensystems, da es bedeutende Vorgänge wie die neuronale Proliferation, Migration und Integration antreibt. Folglich kommt es zu embryonalen Defekten, wenn eines der drei beteiligten Gene nicht vorhanden ist (Deverman und Patterson 2009, Li und Ransohoff 2008, Stumm et al. 2007).

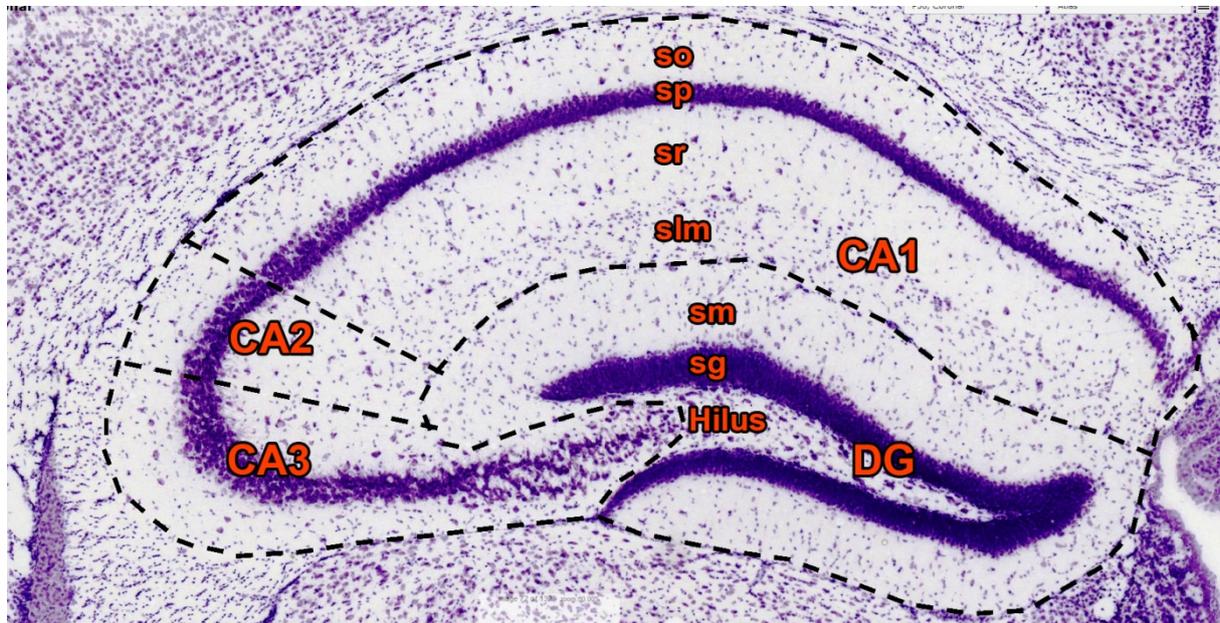
Die Migration von CXCR4 tragenden neuronalen Vorläuferzellen hängt wesentlich von der Signalgebung durch CXCL12 ab. Dies kontrolliert die Wanderung zu Zielstrukturen bzw. die Verteilung im Gewebe (Lewellis und Knaut 2012, Tiveron und Cremer 2008). Betroffen sind beispielsweise Vorläufer von kortikalen GABAergen Neuronen (=Interneurone) (Stumm et al. 2003) sowie Körnerzellvorläufer im *Cerebellum* (Klein et al. 2001) und im *Gyrus Dentatus* (Bagri et al. 2002, Berger et al. 2007).

Die Funktion von CXCR4 wurde besonders intensiv an GABAergen Neuronen des Neocortex untersucht (Abe et al. 2014, Li et al. 2008, Lopez-Bendito et al. 2008, Lysko et al. 2011, Sanchez-Alcaniz et al. 2011, Stumm et al. 2003, Stumm et al. 2007, Wang et al. 2011). Da GABAerge Neurone des Hippocampus und Neocortex einen gemeinsamen ontogenetischen Ursprung haben (Danglot et al. 2006), gestaltet sich ihre Betrachtung innerhalb des Hippocampus umso interessanter. Die bisher bekannten Daten zum Hippocampus, zu den CXCR4-tragenden GABAergen Neuronen und zum Einfluss von CXCL12 auf diese werden deshalb in den folgenden Unterpunkten dargestellt.

### 1.2.1 Anatomischer Aufbau und zelluläre Zusammensetzung des Hippocampus

Der Hippocampus, auch Hippocampusformation genannt, wird seit 1957 mit dem Erinnerungsvermögen und der Gedächtnisbildung in Verbindung gebracht, da es bei vorliegenden Läsionen zu Erinnerungsdefiziten und anterograder Amnesie kommt (Scoville und Milner 1957). Er ist Bestandteil des Archicortex, wobei es sich phylogenetisch um einen älteren Abschnitt des Gehirns (archi = griechisch für Anfang) als den Neocortex handelt. Der Hippocampus besteht aus mehreren Unterstrukturen und Schichten, die zytoarchitektonisch und funktionell unterscheidbar sind (Abb. 1). Hier sind unter anderem das *Cornu ammonis* (CA, unterteilt in CA1, CA2 und CA3), der *Gyrus dentatus* (DG) sowie das Subiculum und der entorhinale Cortex zu nennen. In der Literatur wird häufig zwischen Hippocampus und hippocampaler Formation unterschieden, wobei dem Hippocampus meist nur die CA-Region zugerechnet wird (Amaral und Witter 1989, Andersen et al. 2006, Frotscher und Seress 2006). Wird in dieser Arbeit der Begriff Hippocampus genannt, bezeichnet dies die *Cornu ammonis*-Region sowie den *Gyrus dentatus*.

Das *Cornu ammonis* besteht aus insgesamt vier Schichten (*stratum oriens* (so), *stratum pyramidale* (sp), *stratum radiatum* (sr) und *stratum lacunosum moleculare* (slm)), während es beim *Gyrus dentatus* nur drei sind (*stratum moleculare* (sm), *stratum granulosum* (sg), *Hilus*) (Abb. 1).



**Abbildung 1** Anatomie des Hippocampus. (verändert nach © 2011 Allen Institute for Brain Science. Allen Mouse Brain Atlas. Zugänglich unter: [https://mouse.brain-map.org/experiment/thumbnails/100048576?image\\_type=atlas](https://mouse.brain-map.org/experiment/thumbnails/100048576?image_type=atlas))

Coronarer Schnitt durch den Hippocampus, Nissl-Färbung mit Kresylviolett zur Darstellung der anatomischen Gegebenheiten.

Abkürzungen: CA, Cornu ammonis; DG, Gyrus dentatus; so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum moleculare; sm, stratum moleculare; sg, stratum granulosum

Die Zellschichten beinhalten sowohl exzitatorische, glutamaterge (Pyramidenzellen im CA und Körnerzellen im DG) als auch inhibitorische GABAerge Neurone (Freund und Buzsaki 1996).

Die exzitatorischen Hauptbahnen des Hippocampus werden als *tri-synaptic circuit/pathway* bezeichnet. Sie verschalten entorhinalen Cortex, *Gyrus dentatus*, *Cornu ammonis*, Subiculum und Cortex miteinander und sind hierdurch an komplexen Aufgaben der Gedächtnisbildung sowie der räumlichen Orientierung beteiligt (z.B. Arbeitsgedächtnis, visuelles Gedächtnis, räumliches Gedächtnis) (Khalaf-Nazzal und Francis 2013, O'Mara et al. 2000).

Im Unterschied zu exzitatorischen Neuronen liegen für die Interneurone andere neuronale Verbindungen vor: Statt lange Axone über Gehirnstrukturen hinaus zu bilden, verschalten sie sich eher lokal mit anderen Neuronen. Sie machen nur 10-15% der Gesamtzahl der Neurone im Hippocampus aus. Dennoch haben Interneurone durch ihre inhibitorische Aktivität

entscheidenden Einfluss auf die Funktionalität neuronaler Schaltkreise. Durch den von Interneuronen sezernierten Neurotransmitter GABA und die Bindung an seine Rezeptoren kann ein Chlorid-influx oder Kalium-efflux hervorgerufen werden, wodurch die Zielzelle hyperpolarisiert und das Membranpotential stabilisiert wird. Dies ermöglicht die Kontrolle der Aktivität exzitatorischer Zellen sowie anderer Interneurone.

Man kann Interneurone nach morphologischen (Axone und Dendriten; efferente/afferente Verbindungen), neurochemischen/molekularen (Neurotransmitter, kalziumbindende Proteine, Neuropeptide etc.) und physiologischen Kriterien in verschiedene Untergruppen aufteilen. Zur Unterteilung in Subtypen orientiert sich diese Arbeit hauptsächlich an der neurochemischen/molekularen Charakteristik.

Weiterhin unterscheidet sich die Schichtverteilung grundlegend von der der exzitatorischen Neurone im Hippocampus: Während exzitatorische Neurone (Pyramiden- und Körnerzellen) in ihren namensgleichen Schichten auftreten, sind Interneurone durch eine deutlich breitere Verteilung gekennzeichnet. Bestimmte Subtypen befinden sich bevorzugt in bestimmten Zellschichten des Hippocampus. So sind z.B. Somatostatin-positive Interneurone hauptsächlich im *stratum oriens* und *stratum lacunosum moleculare* anzutreffen, während Parvalbumin-positive Interneurone hauptsächlich im *stratum pyramidale* und im *stratum oriens* vorkommen. Calretinin-positive Interneurone sind hingegen hauptsächlich im *stratum radiatum* zu finden. Im *Gyrus dentatus* sind Parvalbumin-positive Interneurone in oder direkt an der Körnerzellschicht zu finden, Somatostatin-positive kommen hauptsächlich im Hilus vor und Calretinin-positive Interneurone halten sich sowohl im Hilus als auch im *stratum granulosum* auf (Danglot et al. 2006, Freund und Buzsaki 1996, Pelkey et al. 2017).

### 1.2.2 Migrationsarten und -strategien neuronaler Zellen

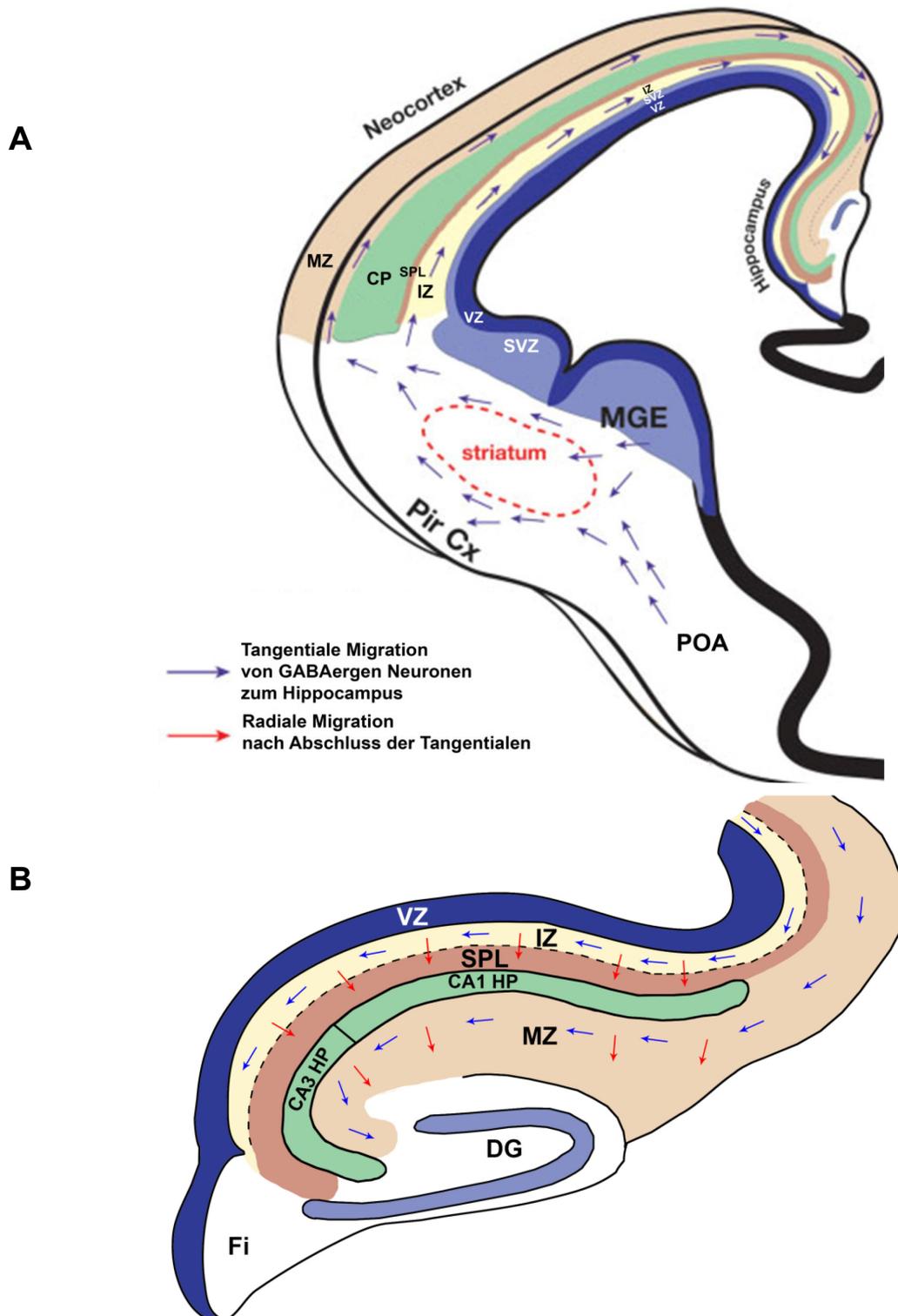
Die komplexe Zusammensetzung des Hippocampus entsteht durch zahlreiche Prozesse, die intrinsische und extrinsische Netzwerke etablieren. Dies umfasst Zellproliferation, Migration und Integration der neugeborenen Neurone.

Glutamaterge und GABAerge Neurone entstehen hierbei an unterschiedlichen Orten und nehmen verschiedene Wanderungsrouten, um ihr Migrationsziel zu erreichen. Es gibt zwei Hauptstrategien für die neuronale Migration – tangential und radial.

Die radiale Migration ist zunächst typisch für glutamaterge Neurone, da diese in einer Proliferationszone entstehen, welche an den Ventrikel angrenzt (Ventrikulärzone (VZ)), und drückt eine orthogonal zur Ventrikulärzone und zur Hirnoberfläche gerichtete Bewegung der Neurone aus. Hierdurch können sich die exzitatorischen Neurone von der Ventrikulärzone

ausgehend radial Richtung *Pia mater* bewegen und sich in die für sie vorgesehenen Zellschichten des Cortex und Hippocampus einfügen (Marin et al. 2010, Danglot et al. 2006). Interneurone des Hippocampus entstehen hingegen in Proliferationszonen, welche sich im Subpallium (Teil des basalen Telenzephalons) befinden und aus denen heraus sie zu ihrem Bestimmungsort migrieren. Das Subpallium besteht aus fünf solcher Zonen (Marin 2013), jedoch liefern nur drei von ihnen GABAerge Neurone für den Hippocampus: Es handelt sich hierbei um den medialen (MGE = medial ganglionic eminence) und caudalen Ganglienhügel (CGE = caudal ganglionic eminence) sowie die präoptische Region (POA = preoptic area) (Gelman et al. 2009, Tricoire et al. 2011).

Da inhibitorische GABAerge Neurone im Gegensatz zu exzitatorischen Neuronen in deutlich größerer Entfernung zu ihrer finalen Position entstehen, kommt bei ihnen zunächst die tangentielle Migration zum Einsatz, d.h. von ihren Geburtsorten aus migrieren sie von lateral nach mediodorsal über verschiedene zerebrokortikale Areale bis tief in den Hippocampus. Sie bewegen sich hierbei auf zwei Pfaden im sich entwickelnden Cortex, welche parallel zur Ventrikulärzone und zur *Pia mater* verlaufen. Hierbei unterscheidet man in einen superfizialen Strom in der Marginalzone (MZ) und einen tiefer gelegeneren Strom in der Intermediärzone (IZ)/Subventrikulärzone (SVZ) (Abb. 2 A). Sobald sie ihren tangentialen Bestimmungsort erreichen, wechseln sie ihre Migrationsart und fügen sich über radial oder schräg orientierte Migration in die kortikale bzw. hippokampale Formation ein (Abb. 2 B) (Danglot et al. 2006, Manent et al. 2006, Marin 2013, Tanaka et al. 2006).



**Abbildung 2** Tangentiale und radiale Migration von GABAergen Neuronen zum und im Hippocampus. (verändert nach Danglot et al. 2006)

**A**, Die GABAergen Neurone migrieren ausgehend vom medialen Ganglienhügel und der POA über den Neocortex zum Hippocampus. Hierbei existieren zwei tangential orientierte Ströme (blaue Pfeile) in der Marginalzone und der Intermediärzone. **B**, Sobald die Neurone ihren Bestimmungsort im Hippocampus erreicht haben, beginnen sie sich über radiale Migration (rote Pfeile) in die hippocampalen Schichten einzuordnen.

Abkürzungen: MGE, medialer Ganglienhügel; POA, präoptische Region; Pir Cx, Piriformer Cortex; SVZ, Subventrikulärzone; VZ, Ventrikulärzone; IZ, Intermediärzone; SPL, subplate; CP, kortikale Platte; MZ, Marginalzone; CA, Cornu ammonis; HP, hippocampale Platte; DG, Gyrus dentatus

### 1.2.3 Die Migration von GABAergen Neuronen unter dem Einfluss von CXCL12 und CXCR4

Neugeborene Interneurone legen durch die tangentielle Migration weite Strecken durch das sich entwickelnde Telenzephalon zurück. Ihr Weg kann in drei Phasen gegliedert werden: Erstens die Strecke vom Subpallium zum Pallium, zweitens die Wanderung durch den Cortex und drittens die Integration in ihre Zielstruktur, hier also in spezifische hippocampale Schichten. Während der Übergang vom Subpallium zum Pallium nicht von CXCL12 und seinen Rezeptoren beeinflusst wird (Marin 2013), hat das Chemokin deutlichen Einfluss auf die Migration der Interneurone durch den Cortex, da es besonders stark in der Leptomeninge von nicht-neuronalen, meningealen Zellen und von neuronalen Vorläuferzellen innerhalb der subventrikulären Zone sezerniert wird (Marin 2013, Stumm et al. 2003, Stumm et al. 2007, Tiveron et al. 2006). Da Interneurone den CXCR4-Rezeptor tragen, werden sie durch die Expression an den genannten Orten, die geringe Diffusion *in vivo* und die chemoattraktive Wirkung von CXCL12 innerhalb dieser Migrationsrouten gehalten. CXCL12 ist hierbei das einzige bekannte Molekül, das diese Aufgabe erfüllt (Marin 2013).

#### *1.2.3.1 Betrachtung der Interneuronenmigration/-verteilung und der Expression von CXCL12 im Hippocampus an verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung*

Da das Chemokin CXCL12 Zellen, welche den CXCR4-Rezeptor tragen, über Chemoattraktivität leitet, ist seine Expression im Hippocampus von großer Bedeutung für dessen Entwicklung, was bereits für den *Gyrus dentatus* nachgewiesen wurde.

Die CXCL12 Expression erstreckt sich von der embryonalen Phase bis ins adulte Alter und ist im Hippocampus in Neuronen, Endothelzellen sowie in der dort befindlichen *Pia mater* vorhanden. Letztere faltet sich während der hippocampalen Entwicklung in den Hippocampus ein. Dadurch wird die *Pia mater* um den Hippocampus herum und zwischen CA1 und *Gyrus dentatus* gelegt (hippocampale Fissur). Pränatal und während der ersten postnatalen Wochen wird CXCL12 in den Meningen, im *stratum moleculare* und in reifenden Körnerzellen des *Gyrus dentatus* exprimiert (Berger et al. 2007, Li und Ransohoff 2008, Lu et al. 2002, Stumm et al. 2002, Stumm et al. 2003). Auf einzelne Entwicklungszeitpunkte bezogen, ist CXCL12 zwischen E15 und E17 im Neocortex in der Intermediärzone, in den dem Hippocampus angelagerten Meningen sowie im hippocampalen Primordium in der Nähe der hippocampalen Fissur nachweisbar (Lu et al. 2002).

GABAerge Neurone erreichen das hippocampale Primordium an E15 (Manent et al. 2006), und da CXCL12 zu diesem Zeitpunkt in den dem Hippocampus aufliegenden Meningen und

in der Nähe der hippokampalen Fissur stark exprimiert ist, könnten CXCR4-tragende GABAerge Vorläufer hiervon geleitet werden (Lu et al. 2002). Die Expression von CXCR4 im Hippocampus wurde daher in dieser Arbeit an verschiedenen Entwicklungszeitpunkten untersucht.

Der superfizielle Strom in der Marginalzone befördert zunächst Interneurone zu Subiculum und CA1, während der tiefere Strom in der Intermediär- und Subventrikulärzone an der Grenze zwischen Neocortex und Hippocampus stoppt. An E16 erreicht der superfizielle Strom CA3, während der tiefe Strom CA1 erreicht. An E17 gelangen dann die ersten Interneurone zum Primordium des *Gyrus dentatus* (Manent et al. 2006).

Die Tangentialmigration gilt an P0 schließlich als weitestgehend beendet, die schichtspezifische Lokalisation ist allerdings erst gering ausgeprägt (Danglot et al. 2006).

Die CXCL12-Expression ist zwischen E17 und P0 nur noch schwach im Neocortex, allerdings immer noch deutlich in den dem Hippocampus anliegenden Meningen und Zellen bei der hippokampalen Fissur nachweisbar (Lu et al. 2002). Es ist weiterhin beschrieben, dass es zu einem Anstieg von CXCL12 in CA3 und der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* während der postnatalen Entwicklung kommt (Schonemeier et al. 2008). Das Vorkommen von CXCL12 nach Abschluss der Tangentialmigration weist auf eine Bedeutung für die Schichtzuordnung von Interneuronen hin.

Postnatal befinden sich die Interneurone im *Cornu ammonis* zunächst hauptsächlich im *stratum radiatum* und *stratum oriens*. Zwischen P5 und P15 verlassen jedoch viele das *stratum radiatum*, von wo aus sie sich durch radiale Migration neu einordnen (z.B. in das *stratum pyramidale* oder an der Grenze zwischen *stratum radiatum* und *lacunosum moleculare*). Im *Gyrus dentatus* migrieren die Interneurone radial ausgehend vom *stratum moleculare* durch das *stratum granulosum* Richtung *Hilus*. Nach dieser Radialmigration sind die meisten GABAergen Neurone kurz unterhalb des *stratum granulosum* im *Hilus* lokalisiert (Danglot et al. 2006).

Besonders Zellen im *stratum moleculare* des *Gyrus dentatus* sowie die umliegenden Meningen in der hippokampalen Fissur exprimieren in der ersten postnatalen Woche CXCL12 sehr stark. Ab der zweiten postnatalen Woche kommt es hier zu einer Reduktion der CXCL12-Expression, während sie in den Körnerzellen des *Gyrus dentatus* stark zunimmt. Mit Beginn der vierten postnatalen Woche ist CXCL12 nur noch im *stratum granulosum* des *Gyrus dentatus* nachweisbar (Berger et al. 2007).

Auch in adulten, deutlich älteren Tieren (sechs bis acht Wochen), wird CXCL12 in den Körnerzellen des *Gyrus dentatus* sowie in einzelnen Zellen des *Hilus* exprimiert. Weiterhin

kommt es zur CXCR4-Expression in sich noch teilenden Zellen. Daher wird vermutet, dass CXCL12 und CXCR4 Einfluss auf die adulte Neurogenese im *Gyrus dentatus* nehmen (Lu et al. 2002).

### *1.2.3.2 CXCR4 hat essentiellen Einfluss auf das Verhalten migrierender Interneurone*

Da die chemoattraktive Wirkung von CXCL12 über seine beiden Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 vermittelt wird, kommt es sowohl bei Fehlen des Chemokins als auch einem seiner Rezeptoren zu Fehlern in der Interneuronenmigration (Abe et al. 2014, Sanchez-Alcaniz et al. 2011, Stumm et al. 2003, Wang et al. 2011).

So wird in *Cxcr4*-defizienten Embryonen ein verfrühter Wechsel von tangentialer zu radialer Migration ausgelöst. Infolgedessen verlassen migrierende Interneurone ihre Wanderrouten in der Marginalzone und Intermediär-/Subventrikulärzone und sammeln sich verfrüht in der kortikalen Platte an (Abe et al. 2014, Lopez-Bendito et al. 2008, Stumm et al. 2003).

Postnatale Untersuchungen an interneuronenselektiven *Cxcr4*-Knockouts deuten ebenfalls auf eine entscheidende Funktion für die kortikale schichtspezifische Verteilung bestimmter Interneurone hin. Diese werden unter anderem (wie oben schon erwähnt) aufgrund ihrer Expression von bestimmten kalziumbindenden Proteinen, wie z.B. Parvalbumin (Pvalb) oder Calretinin (Calret), und Neuropeptiden, wie z.B. Somatostatin (SST), in verschiedene Subpopulationen eingeteilt, die jeweils unterschiedlich vom CXCR4-Verlust beeinflusst werden. So kommt es beispielsweise – bei Verlust von CXCR4 an E15.75 – zur Reduktion von Calretinin-positiven Interneuronen in verschiedenen kortikalen Arealen, während für Somatostatin- und Parvalbumin-positive Interneurone keine Reduktion auftritt. Für Somatostatin- und Calretinin-positive Interneurone wurde des Weiteren eine Fehlverteilung zwischen den kortikalen Schichten aufgrund des CXCR4-Mangels festgestellt (Tanaka et al. 2010).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die CXCL12/CXCR4-Interaktion über Aktivierung des G-Protein-Signalwegs die GABAergen Neuronen in Richtung des CXCL12-Ursprungs steuert (Lysko et al. 2011). Dadurch hat CXCR4 mit seinem Liganden besonderen Einfluss auf die tangentiale (Halten der Interneurone auf ihren Hauptmigrationsrouten) und radiale (schichtspezifische Einordnung) Migration sowie die Wanderungsgeschwindigkeit und -richtung von GABAergen Vorläufern (Marin 2013, Lysko et al. 2011).

Inwieweit und auf welche Weise CXCL12 und CXCR4 hippokampale GABAerge Neurone im Unterschied zu kortikalen Interneuronen beeinflussen, ist noch nicht untersucht. Es ist

jedoch wahrscheinlich, dass das Chemokin und seine Rezeptoren Auswirkungen auf deren Wanderung und Integration nehmen, da kortikale und hippocampale Interneurone aus gemeinsamen Proliferationszonen stammen und den selben Wanderungsrouten folgen, um ihre Zielstruktur zu erreichen (Danglot et al. 2006).

## 2 Ziele der Arbeit

GABAerge Neurone des Neocortex und Hippocampus entstammen einem gemeinsamen Ursprung im ventralen Telenzephalon. Ihre Vorläufer erreichen den Hippocampus über den Neocortex. Dies geschieht während der Embryonalzeit über tangentielle Migration, die im Neocortex durch den CXCL12/CXCR4-Signalweg reguliert wird. Innerhalb des Hippocampus erfolgt anschließend postnatal eine schichtspezifische Zuordnung der GABAergen Neurone. Da CXCL12 regional im Hippocampus gebildet wird, wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese verfolgt, dass CXCR4 notwendig ist, damit GABAerge Neurone in den Hippocampus gelangen und sich dort schichtspezifisch integrieren können.

Zahlreiche Publikationen dokumentieren, dass CXCR4 während der frühen Embryonalperiode in den meisten GABAergen Vorläufern des Cortex vorkommt (Sanchez-Alcaniz et al. 2011, Stumm et al. 2003, Stumm et al. 2007, Wang et al. 2011).

In dieser Arbeit sollte erstmals mittels einer Kombination von CXCR4-Immunhistochemie und genetischer Markierung über eine interneuronenspezifische Cre-Rekombinase (siehe 3.1.1) erfasst werden, welcher Anteil der GABAergen Neurone im Hippocampus an definierten Entwicklungszeitpunkten CXCR4-positiv ist. Weiterhin ist noch nicht bekannt, welche GABAergen Subtypen wann in der Entwicklung CXCR4 exprimieren. Dies sollte durch *Lineage Tracing* (= Abstammungsverfolgung) unter Verwendung einer neu entwickelten *Cxcr4-CreER* untersucht werden.

Hiernach galt es zu überprüfen, inwieweit CXCR4 Einfluss auf Anzahl und schichtspezifische Positionierung GABAerger Neurone im sich entwickelnden Hippocampus nimmt. Dazu wurden Mäuse mit einer konditionalen Deletion des *Cxcr4*-Gens in GABAergen Neuronen erzeugt (*Cxcr4cKO*). An diesen Tieren sollte untersucht werden, ob am Ende der embryonalen Migrationsperiode und in voll entwickelten Tieren weniger GABAerge Neurone im Hippocampus vorhanden sind und ob deren regionale Verteilung gestört ist.

Anschließend galt es, den Einfluss des konditionalen Knockouts auf die Anzahl und schichtspezifische Lokalisation einzelner GABAerger Subtypen zu untersuchen. Die Analyse sollte sich auf Somatostatin-, Parvalbumin- und Calretinin-positive Neurone konzentrieren. Darüber hinaus sollten neue GABAerge Marker wie *Ndnf*- und *Akr1c18* (Tasic et al. 2016) untersucht werden.

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob die neuronale Aktivität im *stratum granulosum* der konditionalen *Cxcr4*-knockout Tiere verändert ist, wurde die Expression von *Arg3.1* untersucht, einem Gen, das in Körnerzellen hochempfindlich durch neuronale Aktivität induziert wird.

## 3 Methodik

### 3.1 Tiere

#### 3.1.1 Verwendete mausgenetische Modelle

Die Bedeutung des CXCR4-Rezeptors für die hippocampale Verteilung GABAerger Interneurone wurde im vorliegenden Projekt unter Zuhilfenahme mausgenetischer Modelle untersucht. Hierbei wurden sogenannte Cre-Rekombinasen verwendet. Diese Enzyme katalysieren die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA-Strängen bei spezifischen Basensequenzen. Diese werden als LoxP-Stellen (*locus of crossover x*) bezeichnet und können gezielt vor und hinter eine bestimmte DNA-Sequenz, welche für ein bestimmtes Gen codierend ist, gesetzt werden. Somit ist es möglich, nur das flankierte Gen gezielt mittels der Cre zu entfernen (Müller 1999, Xu et al. 2008).

##### 3.1.1.1 *Konditionaler Knockout des Cxcr4-Gens und Markierung von Interneuronen mit tdTomato durch die Nkx2.1-Cre*

In diesem Projekt wurde die so genannte *Nkx2.1-Cre* verwendet. Der Name rührt daher, dass sie unter dem Promoter von *Nkx2.1* exprimiert wird, einem Gen, das konstitutiv und selektiv in Interneuronen aus medialem Ganglienhügel und präoptischer Region exprimiert wird. Hierzu wurden 15 Basenpaare am 5'-Ende von Exon 2 des *Nkx2.1*-Gens mit einem Cre-polyA-Konstrukt ersetzt (Xu et al. 2008). Es war somit möglich, die mit LoxP-Sequenzen flankierten Rezeptor-Gene von CXCR4 (Nie et al. 2004) durch die *Nkx2.1-Cre*-Rekombinase selektiv in den Interneuronen von medialem Ganglienhügel und präoptischer Region herauszuschneiden bzw. auszuschalten, woraus ein konditionaler Knockout des CXCR4-Rezeptors (*Cxcr4cKO*) resultierte ( $Cxcr4^{LoxP/LoxP} Nkx2.1$  tg). Dadurch konnte die perinatale Letalität eines vollständigen *Cxcr4*-Knockouts verhindert werden. Als Kontrolltiere dienen entweder heterozygote Tiere ( $Cxcr4^{LoxP/WT} Nkx2.1$  tg) oder Wildtypen ( $Cxcr4^{WT/WT} Nkx2.1$  tg).

Es handelte sich weiterhin um Ai14-Cre-Reporter-Mäuse, in denen durch die *Nkx2.1-Cre* von LoxP flankierte Stoppssequenzen (LSL = LoxP – Stopp – LoxP) im *Rosa26* Genlocus entfernt werden, wodurch die Expression des rot fluoreszierenden Proteins tdTomato in der *Nkx2.1*-Population hervorgerufen wurde ( $Rosa26^{LSL-tdTomato} Nkx2.1$  tg) (Madisen et al. 2010).

Die  $Cxcr4^{LoxP/LoxP}$ -Mäuse (B6.129P2-*Cxcr4*<sup>tm2Yzo</sup>/J), Ai14-Cre-Reporter-Mäuse (B6;129S6-*Gt(ROSA)26Sor*<sup>tm14(CAG-tdTomato)Hze</sup>/J) sowie die *Nkx2.1-Cre* transgenen Mäuse (C57BL/6J-Tg(Nkx2-1-cre)2Sand/J) wurden bei The Jackson Laboratory gekauft und anschließend

verpaart, um die gewünschten Genotypen zu erhalten (Cxcr4cKO:  $Cxcr4^{LoxP/LoxP}$ ,  $Rosa26^{LSL-tdTomato}$   $Nkx2.1$  tg; Kontrolle:  $Cxcr4^{WT/WT}/Cxcr4^{LoxP/WT}$ ,  $Rosa26^{LSL-tdTomato}$   $Nkx2.1$  tg).

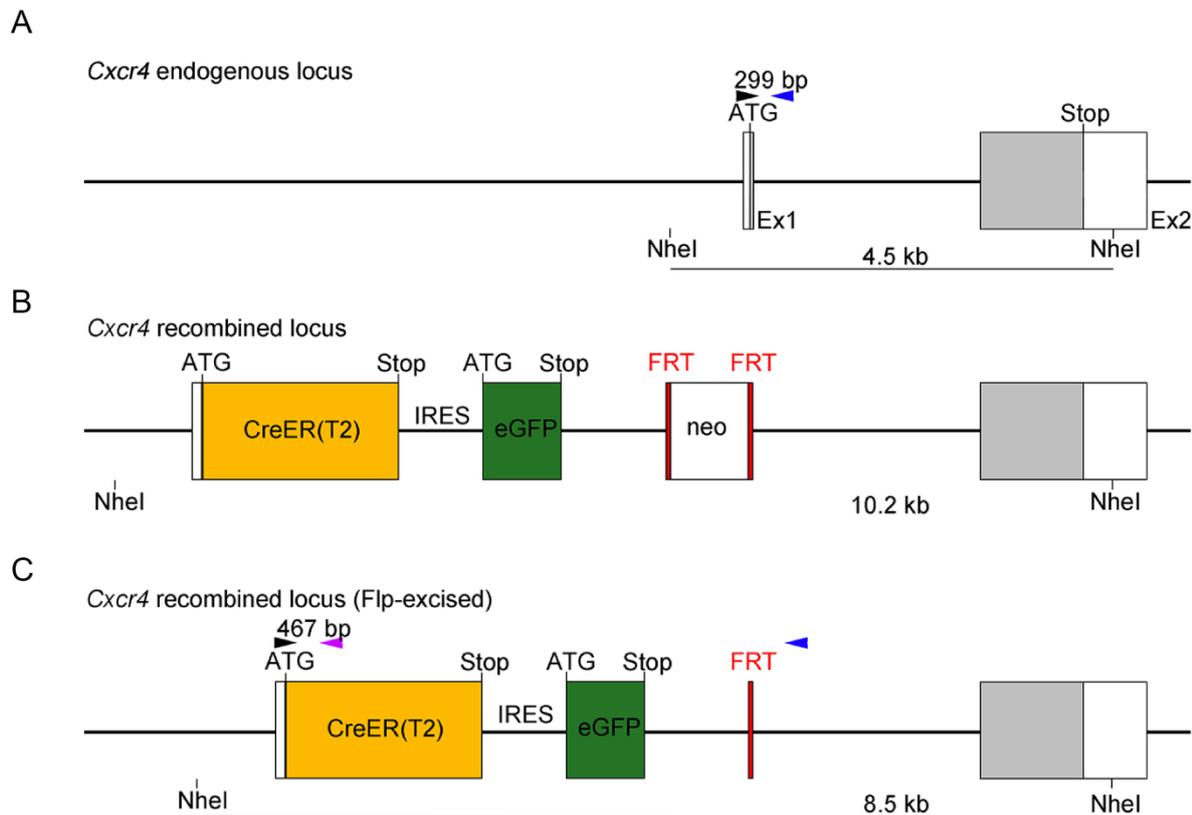
### 3.1.1.2 Verwendung des $Cxcr4^{CreER}$ -Modells zur Markierung aller $Cxcr4$ -positiven Zellen und ihrer Nachkommen ausgehend vom Zeitpunkt der Tamoxifengabe

Die hier verwendete CreER (Tamoxifen-induzierbare Cre) wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Ralf Stumm entwickelt und lag zu Beginn dieser Arbeit vor. Die Generierung wird hier kurz beschrieben (Abb. 3): Es wurde ein  $Cxcr4^{CreER(T2)-IRES-eGFP}$ -knockin-Allel durch homologe Rekombination generiert (Genoway). Zur Konstruktion des Targeting-Vektors wurden DNA-Fragmente, welche die Promotorsequenz von Exon 1 beinhalten, über PCR amplifiziert und über Subklonierung in den pCR4-TOPO-Vektor eingefügt. Eine CreER(T2)-IRES-eGFP-Kassette und eine FRT-Basensequenz-flankierte Neomycin-Kassette wurden in die amplifizierten Fragmente (3,3kb) eingesetzt, die anschließend über Elektroporation in embryonale Mausstammzellen gelangten (positive Zellen wurden über PCR und Southern blot identifiziert). Die positiven Stammzellenklone wurden in Blastozysten injiziert, wodurch die gewünschten Chimären entstanden.

Um schließlich noch die Neomycin-Kassette (Abb. 3 B, C) zu entfernen, wurden besagte Chimären mit Mäusen – welche die FLP-Rekombinase exprimieren (schneidet an FRT-Stellen) – verpaart, wodurch die Exzision der Neomycin-Kassette ermöglicht wurde.

Wie in Abb. 3 zu sehen, wurde die CreER(T2)-IRES-eGFP-Kassette an das Startcodon ATG von Exon 1 gesetzt. Hierdurch wird die  $Cxcr4$ -Gensequenz auf einem Chromosom unterbrochen, woraus ein heterozygoter Genotyp für  $Cxcr4$  resultiert ( $Cxcr4^{CreER/WT}$ ).

Die  $Cxcr4$ -CreER transloziert, im Gegensatz zur  $Nkx2.1$ -Cre, erst nach Tamoxifengabe in den Nucleus. Durch die Verpaarung der  $Cxcr4^{CreER}$ -Mäuse mit Ai14-Cre-Reportermäusen ( $Rosa26^{LSL-tdTomato}$ ) wird die tdTomato-Expression in allen Zellen ermöglicht, die zum Zeitpunkt der Tamoxifengabe den CXCR4-Rezeptor exprimierten bzw. aus diesen Zellen hervorgegangen sind. Das Tamoxifen wurde den Mäusen über die Muttermilch zugeführt. Dazu erhielten die Muttertiere analyseabhängig einmalig oder an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen 1mg Tamoxifen i.p. (Schultheiss et al. 2013).



**Abbildung 3** Grafik zur Generierung des *Cxcr4*<sup>CreER</sup>-Modells durch homologe Rekombination. (Abbildung wurde von der Arbeitsgruppe Stumm zur Verfügung gestellt)

**A**, Exons 1 und 2 (Ex1, Ex2) des Wildtyp-*Cxcr4*-Gens mit der codierenden DNA-Sequenz in grau. **B**, Fusion von ATG (Startcodon) in Exon 1 mit Gensequenzen für CreER(T2), eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) und eGFP (verstärktes grün fluoreszierendes Protein). Eine Neomycinsequenz (neo) wurde auf eGFP folgend für positive Selektion platziert. **C**, Rekombiniertes *Cxcr4*-Allel nach der Exzision der Neomycin-Kassette. Pfeilspitzen symbolisieren die Primer, welche für die Genotypisierung genutzt wurden. Die gezeigten NheI-Schnittstellen wurden für die Southern Blot-Analyse verwendet.

### 3.1.2 Maushaltung

Die Mäuse wurden in kleinen Gruppen in einem Makrolon Typ IV-Käfig unter standardisierten Laborbedingungen gehalten. Es wurde ein 12h/12h Tag/Nacht-Rhythmus sowie eine Raumtemperatur von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  und eine Luftfeuchtigkeit von  $60 \pm 5\%$  aufrechterhalten, wobei eine ständige Versorgung mit Pelletfutter und Wasser gegeben war, dass den Tieren nach eigenem Bedarf zur Verfügung stand.

Die Tiere sind über Nacht verpaart worden, wobei der anschließende Tag als Embryonaltag (E) 0,5 gezählt wurde. Die Trächtigkeit wurde durch die Tierpfleger über Gewichtszunahme des Muttertieres und/oder das Abzeichnen der Embryonalkette am Bauch abgeleitet.

### 3.1.3 Tierversuchsgenehmigung

Alle beschriebenen Experimente, welche unter Tierversuche fallen, wurden gemäß den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes der EU (86/609/EEC) und der Bundesrepublik

Deutschland durchgeführt und ebenfalls vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz genehmigt (Reg.-Nr.: 02-042/13).

### 3.2 Geräte, Chemikalien sowie Puffer und Lösungen

Diese sind im Anhang aufgelistet.

### 3.3 Immunhistochemie

#### 3.3.1 Antikörper

<b>Primärantikörper</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Nummer</b>	<b>Hersteller/Herkunft</b>
mouse-anti-PV	1:400000VV	P-3171	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D
rabbit-anti-Calret	1:5000VV	CR7697	Swant, CHE
rabbit-anti-RFP	1:500 direkt	ab34771-100	Abcam Cambridge, UK
rat-anti-RFP	1:500 direkt	5F8	Chromotek GmbH, D
rat-anti-CD184	1:5000VV	17-9991	Affymetrix, Inc., USA
rat-anti-SST	1:1000VV	MAB354	EMD Millipore Corporation, Merck
<b>Sekundärantikörper Biotinyliert</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Nummer</b>	<b>Hersteller/Herkunft</b>
Donkey anti-mouse bio	1:400	715-065-151	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
Donkey anti-rabbit bio	1:400	W2206	Vektor Laboratories, Peterborough, UK
Donkey anti-rat bio	1:400	712-065-153	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
<b>Sekundärantikörper mit Farbstoff gekoppelt</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Nummer</b>	<b>Hersteller/Herkunft</b>
Donkey anti-rat CY3	1:500	112-165-167	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
Donkey anti-rabbit CY3	1:500	711-165-152	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.

### 3.3.2 Entnahme und Vorbehandlung des Gewebes

Zum definierten Analysezeitpunkt wurden die Mäuse von Fachpersonal mit Isofluran narkotisiert und anschließend eine transkardiale Perfusion mit Tyrodes-Lösung und PFA-Fixativ vollzogen. Das Untersuchungsmaterial, entweder das Gehirn (P4, P7, P10, P28, P30) oder der gesamte Kopf (P0, P2), wurde dann in 4%PFA für 24h aufbewahrt, anschließend in eine 30%-Saccharoselösung verlegt und bei 2-8°C gelagert. Längerfristig wurde das Gewebe bei -80°C gelagert (Stumm et al. 2002).

### 3.3.3 Kryostatenschnitte

Das Gewebe wurde zunächst in TissueTec mithilfe von Trockeneis und Methylbutan eingebettet, tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Einen Tag vor dem Schneiden wurden die Hirne zu -20°C überführt, um sie an die Kryostattemperatur anzupassen.

Darauffolgend wurde das Gewebe mit TissueTec auf Trägern fixiert und bei -18°C geschnitten, wobei die Schnittdicke 40µm betrug. Die Schnitte wurden in Serie auf sechs mit TPBS gefüllte Wells aufgeteilt, sodass der Abstand zwischen den Schnitten in einem Well 240µm betrug.

### 3.3.4 Immunfärbung

Hierbei werden zellspezifische Marker als Epitope genutzt und mit Antikörpern direkt bzw. indirekt, auch vollverstärkt genannt, detektiert. An diese binden dann sekundäre Antikörper, die im Falle der direkten Markierung mit Farbstoffen gekoppelt und im Falle der indirekten Markierung biotinyliert sind. Dies gestattet letztendlich die Sichtbarmachung dieser Marker. Im Rahmen des Projekts wurde mit Doppelimmunfärbung gearbeitet, d.h. indirekte und direkte Markierung wurden beim selben Präparat angewendet, wodurch zwei Zellmarker detektiert werden konnten. Hierbei ist es besonders wichtig, immer Antikörper von zwei verschiedenen Spezies und unterschiedliche Farbstoffe zu verwenden, da sonst die Sekundärantikörper an die beiden Primären binden würden und somit eine Unterscheidung zwischen den Zellmarkern nicht mehr möglich wäre.

Bei dem direkt gefärbten Marker handelte es sich immer um tdTomato, während es sich bei den Vollverstärkten um verschiedene handelte.

*Tag 1:*

Die Schnitte wurden zunächst 20min in TPBS gewaschen und anschließend 30min mit 50%Methanol+0,3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt, um eine Permeabilisierung des Gewebes zu erreichen, was den Antikörpern ein besseres Eindringen ermöglicht. Hierauf wurde weitere 15min mit TPBS gewaschen. Darauf folgend wurde das Gewebe mit Blockierungspuffer (TPBS-T [TPBS+0,3%Triton X100]+3%BSA) für 60min behandelt, wodurch unspezifische Bindungsstellen gesättigt wurden. Zum Abschluss von Tag 1 wurden die primären Antikörper in 1%BSA+TPBS-T in ihrer spezifischen Konzentration auf das Gewebe gegeben, welches über 2,5 Tage bei 4°C inkubierte (Schulz et al. 1998).

*Tag 2:*

Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst 2 mal 10min mit TPBS-T gewaschen und anschließend wurde ein biotinylierter Antikörper in 1%BSA+TPBS-T auf die Schnitte gegeben, der für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubierte. Es wurde erneut mit TPBS-T gewaschen und mit einer peroxidasekonjugierten Avidin/Biotin-Reagenz behandelt, worauf ein erneutes Waschen mit TPBS-T für 15 min folgte. Anschließend erfolgte die Zugabe von biotinyliertem Tyramin, wodurch das Fluoreszenzsignal verstärkt wird. Daraufhin wurde erneut gewaschen und ein farbgekoppeltes Streptavidin (AlexaFluor 488) 1:500 sowie ein sekundärer farbstoffgekoppelter Antikörper 1:500 in 1%BSA+TPBS-T auf die Schnitte gegeben, welche über Nacht bei 4°C inkubierten (Adams 1992).

*Tag 3:*

Am letzten Tag wurden die Schnitte zunächst in TPBS gewaschen, um nicht gebundenen Farbstoff zu entfernen. Anschließend wurde mit DAPI/PBS eine Übersichtsfärbung gemacht, welche die DNA in den Zellkernen markiert. Es wurde dann mit PBS gewaschen, um wieder den nicht gebundenen Farbstoff zu entfernen. Dann wurden die Schnitte auf mit Gelatine beschichtete Objektträger bzw. auf Superfrost+-Objektträger (positiv geladen, wodurch die Schnitte auf dem Objektträger gehalten werden) aufgezogen und getrocknet. Zu guter Letzt wurde eine Alkoholreihe durchgeführt (Isopropanol 50% →70% →80% → 90% → 100% → 2xXylol), wodurch Salzurückstände beseitigt und die Schnitte entwässert wurden (Schulz et al. 1998). Eingedeckelt wurde abschließend mit Histokit.

### 3.4 [<sup>35</sup>S]-*In-situ*-Hybridisierung

#### 3.4.1 Entnahme und Vorbehandlung des Gewebes

Zum definierten Analysezeitpunkt wurden die Mäuse von Fachpersonal mit Isofluran narkotisiert. Anschließend wurde das Gewebe entnommen, mithilfe von Methylbutan auf Trockeneis (-30°C) gefroren und dann bei -80°C gelagert.

#### 3.4.2 Kryostatenschnitte

Mit dem Gewebe wurde zunächst wie bei der Immunhistochemie (siehe 3.5.3) verfahren, wobei die Gehirne hierbei schon zuvor bei -80°C gelagert wurden. Die Schnittdicke betrug für diesen Versuch 20µm. Die Schnitte wurden in Zehner-Serien auf Histobond Objektträger aufgezogen, wobei auf jedem 3 Hirnschnitte aufgebracht wurden, womit zwischen den Schnitten auf einem Objektträger 200µm liegen. Jeder zehnte Schnitt wurde auf Superfrost-Objektträger zur HE-Übersichtsfärbung aufgezogen. Im Anschluss wurden die Schnitte bis zur Prähybridisierung bei -80°C gelagert.

#### 3.4.3 Prähybridisierung

Durch diesen Vorgang wird das Gewebe permeabilisiert, sodass die Sonden besser eindringen und an ihre Ziel-RNA binden können.

Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur zum Auftauen und trocknen flach ausgelegt und wie in der folgenden Tabelle behandelt (Stumm et al. 2001):

PFA-Puffer (4% PFA in 1x PBS; pH 7,4)	60 min	4°C, Rührer
1x PBS pH 7,4 (aus 10x PBS-Stammlösung [100 mM Phosphat; 1,55 M NaCl; pH 6,75])	3*10 min	RT, Rührer
Triton-Puffer (Schaumbildung vermeiden!) kurz in 1xPBS tauchen (Behälter von Schritt 2) kurz in ddH <sub>2</sub> O	10 min	RT (langsam rühren) ~150rpm
TEA-Puffer (0,4% Triton in 1x PBS) + 1880µl Acetic Anhydrid	1 min 10 min	RT, Rührer (stark rühren!) ~350rpm (großer Rührer)
1x PBS pH 7,4 (aus 10x PBS-Stammlösung [100 mM Phosphat; 1,55 M NaCl; pH 6,75])	10 min	RT, Rührer
ddH <sub>2</sub> O	2 min	RT, Rührer
50% Isopropanol	2 min	RT
70% Isopropanol	2 min	RT

Nach den letzten zwei Minuten in 70% Isopropanol wurden die Schnitte flach auf Pappe zum Trocknen ausgelegt und anschließend bei -20°C bis zur eigentlichen Hybridisierung gelagert.

#### 3.4.4 Sequenzen der Plasmide und Herstellung der [<sup>35</sup>S]-Ribosonden

Die cDNA-Sequenzen der für die *In-situ*-Hybridisierung genutzten Plasmide befinden sich im Anhang bzw. sind publiziert (Grigoriou et al. 1998, Lyford et al. 1995, Temple et al. 2003). Die [<sup>35</sup>S]-Ribosonden wurden von Fachpersonal nach dem im Anhang beigefügten Protokoll hergestellt.

#### 3.4.5 Hybridisierung

Der Hintergrund der hier genutzten *In-situ*-Hybridisierung besteht darin, dass die hergestellten RNA-Sonden komplementär zu entsprechenden mRNA-Strängen sind. Die Sonden binden an die mRNA (=hybridisieren) und ermöglichen somit deren Detektion durch die in die Sonden mit eingeflochtenen radioaktiven Abschnitte (Cassidy und Jones 2014).

##### *Tag 1:*

Die Schnitte der verschiedenen Tiere wurden anhand der HE-Übersichtsfärbungen gematcht, so dass sie in gleichen Ebenen liegen. Anschließend wurden die prähybridisierten Schnitte von -20°C zum Auftauen für ca. 30 min flach ausgelegt. Es wurden 45 µl der [<sup>35</sup>S]-Hybridisierungslösung auf ein Deckglas aufgetragen und anschließend der Schnitt mit dem Objektträger langsam mit der Flüssigkeit auf dem Deckglas in Kontakt gebracht, so dass sich dieses luftblasenfrei ansaugen konnte. Die Schnitte wurden darauf folgend in einer mit 50% Formamid (1:1 100% Formamid + H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) gefüllten Hybridisierungsschale bei 60°C über Nacht (laut Protokoll 14-36h) hybridisiert (Stumm et al. 2001).

##### *Tag 2:*

Die Deckgläser wurden mit einer Pinzette vorsichtig entfernt, die Objektträger in 2x SSC geschwenkt und dann in einem Objektträgerhalter in 2x SSC aufbewahrt, bis die Deckgläser überall entfernt wurden (Stumm et al. 2001). Anschließend wurde für 20 min in frischem 2x SSC gewaschen (alle Waschschrte erfolgten unter Rühren), dann für 20 min in 1x SSC, worauf die Schnitte für 30 min in auf 42°C vorgewärmtem RNase-Puffer gewaschen wurden, um nicht gebundene RNA zu entfernen. Die Schnitte wurden kurz in 1x SSC getaucht und dann für 20 min in 0,2x SSC gewaschen, dann für 60 min in 60°C warmem 0,2x SSC und dann noch einmal für 10 min in 0,2x SSC bei Raumtemperatur. Darauf wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> ein letztes Mal gewaschen und die Schnitte schließlich mit 50% und 70% Isopropanol für jeweils zwei Minuten ohne Rühren behandelt, woraufhin diese zum Trocknen auf einer Unterlage flach ausgelegt wurden.

Die Signaldetektion erfolgte mit Röntgenfilmen und später Fotoemulsion (*Emulsion coating*). Die hybridisierten Schnitte wurden in eine Filmkassette gelegt und der Film anschließend in der Dunkelkammer aufgelegt (Stumm et al. 2001).

*Tag 3:*

Die Entwicklung der Filme wurde nach ca. 18h vorgenommen. Dabei (alle Schritte in der Dunkelkammer unter schwachem Rotlicht) wurde ein Film für 6 min in Entwickler geschwenkt, dann 4 min in Wasser gelegt und anschließend für 10 min in Fixierer geschwenkt. Final wurde der Film noch einmal für 5-10 min in Wasser gelegt, um überschüssigen Fixierer zu entfernen und dann zum Trocknen aufgehängt.

Abhängig von der Signalstärke auf den Filmen, wurde nach der Schätzung „ein Tag Filmexposition  $\cong$  einer Woche Fotoemulsionsexposition“ die Expositionsdauer für das *Emulsion coating* abgeschätzt. Hierbei wurden die Objektträger bei Dunkelheit in auf 45°C erwärmte NTB-Emulsion getaucht, über Nacht getrocknet und anschließend lichtdicht verpackt bei 4°C exponiert (Stumm et al. 2001).

*Tag X nach Emulsion coating:*

Die Entwicklung der Objektträger erfolgte meist ca. 6 Tage nach dem Aufbringen der Emulsion in der Dunkelkammer, konnte bei schwächer exprimierten Markern jedoch auch später erfolgen. Die Schnitte wurden zunächst 5 min mit D19-Entwickler (auf 18°C gekühlt) behandelt, dann kurz in H<sub>2</sub>O getaucht, für 10 min mit Fixierer behandelt und anschließend für mindestens eine Stunde in fließendes Wasser gestellt. Die überschüssige Emulsion wurde dann von der Rückseite der Objektträger mithilfe einer Apollo-Rasierklinge abgekratzt, um den Hintergrund zu verringern.

Anschließend wurde eine schwache Nissl-Färbung durchgeführt, wofür die Schnitte kurz in Kresylviolett und dann kurz in H<sub>2</sub>O getaucht wurden. Abschließend wurde eine Alkoholreihe durchgeführt (10s 70% Isopropanol → 20s 80% → 40s 90% → 3min 100% Isopropanol → 2x5min Xylol) und mit DPX eingedeckelt (Stumm et al. 2001).

### 3.5 Mikroskopie

#### *Immunhistochemie:*

Die Schnitte der Immunhistochemie wurden meist mit einem Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop (LSM Meta 510; Software: ZEN SP1.2, 2008, durch Tilescan-Funktion) aufgenommen oder mittels Epi-Fluoreszenz (Zeiss Axio Imager A1, Software: ProgRes®Mac Capture Pro 2.7) fotografiert.

#### *In-situ-Hybridisierung:*

Schnitte, welche die radioaktive *In-situ*-Hybridisierung durchliefen, wurden auf verschiedenen Wegen digitalisiert. P0-Tiere wurden im Hellfeld am Zeiss Axio Imager A1 (Software: ProgRes®Mac Capture Pro 2.7) fotografiert, während P30-Tiere über einen NanoZoomer Digital slide scanner (Modell: C9600-12) im Hellfeld gescannt wurden. Waren diese Bilder aufgrund schwächerer Expression des genutzten Markers nicht auswertbar, wurden die Schnitte am Zeiss Axio Imager A1 im Dunkelfeld fotografiert.

Übersichtsbilder von Kresylviolett- bzw. HE-Färbungen wurden im Hellfeld aufgenommen.

### 3.6 Auswertung

#### 3.6.1 Zellzählung

Die Zählung mittels Immunhistochemie oder *In-situ*-Hybridisierung markierter Zellen erfolgte mit dem Programm Fiji (Schindelin et al. 2012) (<https://fiji.sc/>). Durch die Aufnahme der immungefärbten Schnitte mittels LSM war es möglich, zwischen verschiedenen Kanälen zu unterscheiden und so zu differenzieren, ob zwei verschiedene Marker (in dieser Arbeit immer tdTomato und ein weiterer Marker) in einer Zelle vorhanden sind (copositive Zellen). Es wurde dann sowohl die tdTomato-positiv Zellpopulation gezählt, als auch alle darin enthaltenen copositiven Zellen, die also tdTomato- und Marker-positiv waren.

Bei adulten Tieren konnte für die Ermittlung der Gesamtzellzahl von tdTomato-positiven Zellen eine automatische Zählweise genutzt werden, bei der die Zellgröße und ein Schwellenwert (treshold) bzgl. der Signalstärke vorgegeben wurden, woraufhin das Programm alle Signale bzw. Zellen mit den vorgegebenen Parametern erfasste. Für die Schichtzuordnung der Zellen und Zählungen bei jüngeren Tieren wurde manuell mit einem Cellcounter-PlugIn von Fiji gezählt, da die Differenzierung einzelner Zellen hier für das Programm nicht möglich war. Auch die Zählung von copositiven Zellen wurde manuell durchgeführt.

### 3.6.2 Statistische Methoden

Die absoluten Zellzahlen, wurden in Microsoft Office Excel 2007 überführt. Die Ergebnisse wurden bei Betrachtung der hippokampalen Regionen sowohl in neugeborenen als auch in adulten Tieren in Form der Zelldichte (Zellen/mm<sup>2</sup>) dargestellt. Bei Analyse der Zellschichten wurden bei neugeborenen Tieren die Zelldichte und bei adulten Tieren die absoluten Werte verwendet, da eine Messung der Flächen einzelner Zellschichten hier nicht durchgeführt wurde. Zusätzlich wurden die Ergebnisse relativ betrachtet. Hierbei wurden alle Zellen der jeweiligen Genotypen mit 100% gleichgesetzt und die Verteilung über ihre Regionen bzw. Zellschichten analysiert.

Für die statistische Auswertung wurden verschiedene Mittelwerte gebildet: Bei der Untersuchung von nicht adulten Tieren wurden innerhalb einer Schnittebene die Zählungen aus der rechten und linken Gehirnhälfte gemittelt.

Bei adulten Tieren wurden Mittelwerte mithilfe einer Millimeteinteilung ausgehend vom Bregma gebildet. Für die Untersuchung von tdTomato an P28 zum Beispiel (siehe 4.5) wurden mehrere Schnittebenen untersucht, welche mithilfe der Bregmaeinteilung in rostral (Entfernung vom Bregma: -1,3mm bis -1,6mm), intermediär (-1,7mm bis -2,0mm) und caudal (-2,1mm bis -2,4mm) eingeteilt und anschließend gemittelt wurden. Hierdurch wurden experimentell bedingte Unterschiede herausgemittelt, die z.B. durch voneinander abweichende Ansnittwinkel der Gehirne entstehen können.

Die anschließende Statistik wurde mit GraphPad Prism 6 durchgeführt und umfasste eine 2-Wege-ANOVA sowie dazugehörige Graphen in Form von Säulendiagrammen, wobei die Kontrollen gegen die konditionalen Knockouts aufgetragen wurden. Anschließend wurde der Post-hoc-Test von Sidak (Sidak's multiple comparisons test) durchgeführt, um eine adäquate Power beim Testen zu gewährleisten. Die Daten wurden als Mittelwerte+SEM dargestellt.

Bei Verwendung der mRNA-Sonde *Arg3.1* (siehe 4.12) wurden die erhobenen Daten als Zellen/mm<sup>2</sup> dargestellt und im t-Test miteinander verglichen.

Im Falle der Untersuchung zur Expression von CXCR4 an verschiedenen Entwicklungszeitpunkten in GABAergen Vorläufern mittels der *Nkx2.1-Cre* (siehe 4.1) wurde keine statistische Betrachtung genutzt, da es sich hier um qualitative Ergebnisse handelt. Die Werte wurden in die Zelldichte überführt sowie prozentual betrachtet und für unterschiedliche Zeitpunkte im direkten Vergleich als Säulendiagramm dargestellt. Beim *Cxcr4<sup>CreER</sup>-Lineage Trace* (siehe 4.2) wurde ähnlich verfahren.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expression von CXCR4 in GABAergen Vorläufern des medialen Ganglienhügels

Während der Embryonalperiode ist der CXCR4-Rezeptor in den meisten GABAergen Vorläufern des Cortex vorhanden (Sanchez-Alcaniz et al. 2011, Stumm et al. 2003, Stumm et al. 2007, Wang et al. 2011). Die Migration dieser Zellen wird vom Chemokin CXCL12 geleitet, welches eine starke chemoattraktive Wirkung auf sie ausübt (Stumm et al. 2003, Wu et al. 2016). Die Wanderung der GABAergen Neurone in den Hippocampus hinein ist noch nicht untersucht worden und auch die Verteilung von CXCR4 wurde für den Hippocampus noch nicht exakt ermittelt. Es ist lediglich bekannt, dass an späteren postnatalen Tagen nur noch wenige GABAerge Neurone im Hippocampus CXCR4-positiv sind (Stumm et al. 2002, Stumm et al. 2003).

In dieser Arbeit sollte im Detail geklärt werden, welcher Anteil der GABAergen Vorläufer im Hippocampus an definierten Entwicklungszeitpunkten den CXCR4-Rezeptor exprimiert.

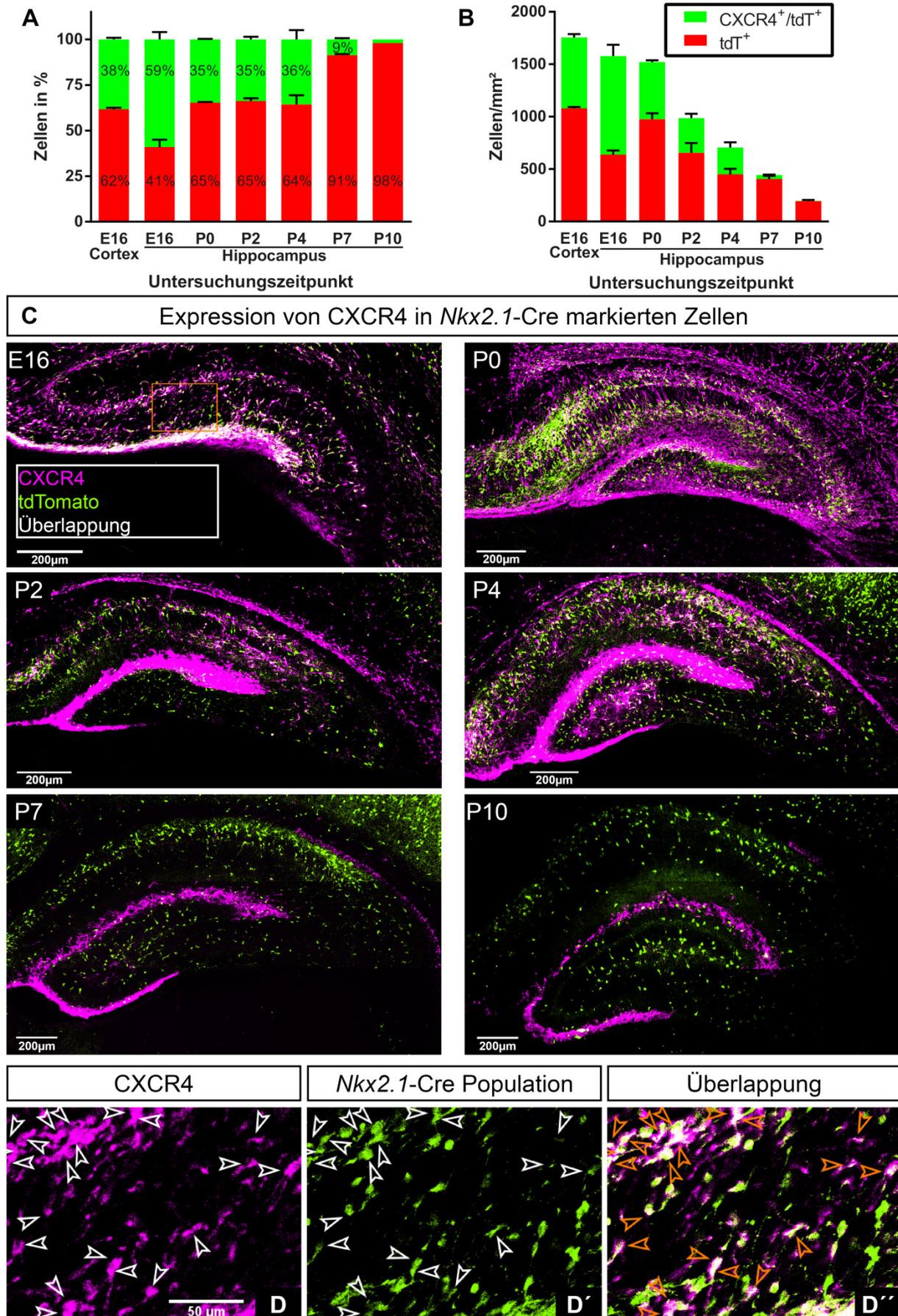
Um GABAerge Vorläufer zu identifizieren, wurde die *Nkx2.1*-Cre mit dem Cre-Reporter Rosa26<sup>LSL-tdTomato</sup> kombiniert (siehe 3.1.1.1) (Madisen et al. 2010). Hierdurch wird das rot fluoreszierende Reporterprotein tdTomato (tdT) in GABAergen Neuronen gebildet, welche aus dem medialen Ganglienhügel und der präoptischen Region stammen (siehe 1.2.2). Die über die *Nkx2.1*-Cre markierte Zellpopulation wird im Folgenden mit der Abkürzung mpIN bezeichnet (für **I**nterneurone des **m**edialen Ganglienhügels und der **p**räoptischen Region).

CXCR4 und tdTomato wurden mittels Doppelimmunfluoreszenz markiert (Abb. 4 C, D, D', D''). Die Tiere wurden im Alter von E16, P0, P2, P4, P7 und P10 untersucht.

An E16 waren 59% der mpIN des Hippocampus CXCR4-positiv. An den nachfolgenden Entwicklungszeitpunkten nahm der prozentuale Anteil stetig ab: an P0 und P2 waren 35%, an P4 36%, an P7 9% und an P10 2% der mpIN CXCR4-positiv (Abb. 4 A). Zusätzlich wurde die Zelldichte der mpIN im Hippocampus ermittelt (Abb. 4 B). Diese nahm mit fortschreitendem Alter kontinuierlich ab. Hierbei war zu erkennen, dass ab P10 nur noch sehr wenige CXCR4-positive mpIN im Hippocampus vorhanden sind.

Da die Tangentialmigration an E16 noch nicht abgeschlossen ist und sich ein Teil der hippokampalen GABAergen Neurone noch im Cortex befindet (Danglot et al. 2006), wurden an diesem Zeitpunkt mpIN auch hier auf ihre CXCR4-Expression hin untersucht. Hierbei ergab sich ein Anteil von 38% CXCR4-positiver Zellen (Abb. 4 A). Somit geht die spätere Entwicklung des Hippocampus (verglichen mit dem Cortex) mit einer höheren CXCR4-Expression einher.

Zusammenfassend wird CXCR4 während der entscheidenden Migrationsphase (embryonal) stark von GABAergen Vorläufern exprimiert, während das Ende der Migrationsphase bzw. die laufende Integrationsphase durch die Abnahme der hippocampalen Zellen, welche den Rezeptor tragen, angezeigt werden.



**Abbildung 4** Expression von CXCR4 in GABAergen Vorläufern des medialen Ganglienügels.

GABAerge Vorläufer werden mittels *Nkx2.1-Cre* und dem Cre-Reporter *Rosa26<sup>LSL-tdTomato</sup>* identifiziert. Das Reporterprotein tdTomato wurde mit einem Kaninchen-anti-RFP und CXCR4 mit einem Rattenantikörper (rat-anti-CD184) doppelimmunfluoreszent detektiert. **A**, Die CXCR4/tdTomato-copositiven Zellen sind prozentual in Bezug auf die Gesamtzahl der tdTomato-positiven Zellen (mpIN-Population) zu definierten Zeitpunkten dargestellt. **B**, Der Graph zeigt die Anzahl CXCR4/tdTomato-copositiver Zellen und die Anzahl tdTomato-positiver Zellen bezogen auf die Fläche. Für den Hippocampus wurde die gesamte Fläche ermittelt, für den Cortex ein Ausschnitt gewählt. Die Flächen wurden dann mit den Zellzahlen verrechnet, um die Zelldichte zu erhalten. Die Werte in *A* und *B* sind Mittelwerte+SEM und wurden an mindestens fünf Hippocampi ermittelt. **C**, Konfokale Aufnahmen der CXCR4/tdT-Doppelimmunfluoreszenz an den angegebenen Zeitpunkten. **D**, Die Hochvergrößerung zeigt den orange umrandeten Ausschnitt aus *C* als einzelne Kanäle und als Überlagerung. CXCR4/tdTomato-copositive Zellen sind durch Pfeilspitzen markiert.

## 4.2 Darstellung der Nachkommen CXCR4-positiver GABAerger Vorläufer in adulten Tieren mit dem *Cxcr4*<sup>CreER</sup>-Modell

In 4.1 wurde die Expression von CXCR4 in GABAergen Vorläufern zu verschiedenen Zeitpunkten gezeigt. Es ist noch nicht bekannt, inwiefern die Expression von CXCR4 Einfluss auf verschiedene Subtypen GABAerger Neurone nimmt. Daher wurde hier nun die weitere Entwicklung der in 4.1 betrachteten Zellen über einen so genannten *Lineage Trace* (engl. *Lineage Trace* = „Abstammungsverfolgung“) mit der *Cxcr4*-CreER zu späteren Entwicklungszeitpunkten für verschiedene Subtypen GABAerger Neurone untersucht.

Das *Cxcr4*<sup>CreER</sup>-Modell wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Ralf Stumm entwickelt (siehe 3.1.1.2). Die CreER unterbricht hierbei die Gensequenz von *Cxcr4* auf einem Chromosom (*Cxcr4*<sup>CreER/WT</sup>) und wird somit in allen Zellen exprimiert, in denen auch CXCR4 exprimiert wird. Durch die Verbindung mit dem Cre-Reporter *Rosa26*<sup>LSL-tdTomato</sup> wurde nach Tamoxifengabe und somit Aktivierung der CreER, eine Detektion aller Zellen ermöglicht, die den CXCR4-Rezeptor exprimierten bzw. aus solch einer Zelle hervor gegangen sind.

Es handelt sich hierbei um eine neu entwickelte Methode. Daher wurde diese Analyse als Pilotexperiment durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Herangehensweisen getestet:

Den Mäusen wurde zu einem frühen postnatalen Zeitpunkt Tamoxifen zur Aktivierung der *Cxcr4*-CreER gegeben. Es wurde den Tieren über die Muttermilch zugeführt, entweder nur an einem bestimmten Tag (Abb. 5 A, P2/P7) oder über einen längeren Zeitraum (Abb. 5 B, P6-10). Die Analysen erfolgten dann in älteren Mäusen (P26 bzw. P21).

Die Schnitte wurden mittels Doppelimmunhistochemie gefärbt: Es wurden Calretinin, Parvalbumin und Somatostatin als Marker für Subtypen GABAerger Neuronen verwendet. Diese kamen auch bei Untersuchungen zum *Cxcr4*cKO zum Einsatz (4.8, 4.9, 4.10). In Kombination mit der *Cxcr4*-CreER und dem Cre-Reporter *Rosa26*<sup>LSL-tdTomato</sup> ließ sich also ermitteln, welche Interneuronensubtypen und welcher Anteil dieser aus CXCR4-exprimierenden Vorläufern hervorgingen.

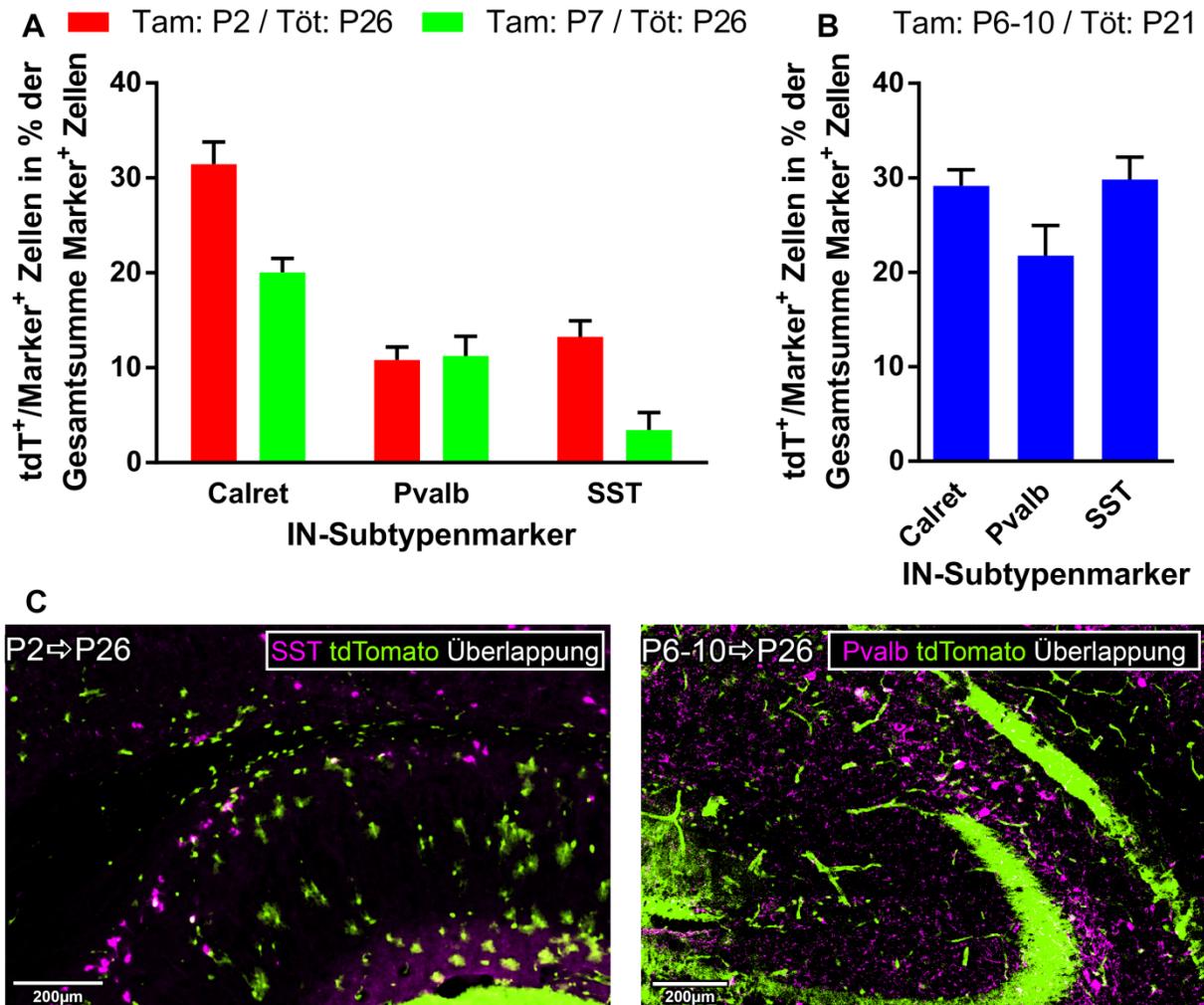
Die Ergebnisse wurden als Marker/tdTomato-positive Zellen in Prozent von allen Marker-positiven Zellen angegeben. Dadurch ließ sich feststellen, wie viele der GABAergen Neurone – bezogen auf die einzelnen Subtypen – aus CXCR4-positiven Zellen hervor gingen.

Die punktuelle Verabreichung von Tamoxifen erfolgte an P2 und P7, während die Analyse dann an P26 durchgeführt wurde. Hierbei zeigte sich eine Reduktion der Calretinin/tdT-positiven Zellen von P2 auf P7 um 11,39%. An P2 wurden 31,49%, an P7 20,06% der Calretinin-positiven als Calretinin/tdT-copositive Zellen identifiziert. Weiterhin wurde eine Verminderung der Somatostatin/tdT-copositiven Zellen um 9,77% festgestellt: An P2 waren

13,23%, an P7 3,47% der Somatostatin-positiven Zellen auch für tdTomato positiv. Für Parvalbumin wurden, im Gegensatz zu den anderen beiden Markern, keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten festgestellt ( $P2_{\text{Pvalb}}$ : 10,83%;  $P7_{\text{Pvalb}}$ : 11,26%) (Abb. 5 A).

Die punktuelle Tamoxifenapplikation diente der Überprüfung von Nachkommen CXCR4-exprimierender Zellen für einen bestimmten Zeitpunkt. Die Verabreichung von Tamoxifen über 5 Tage, von P6-P10 (Analyse an P21), diente hingegen der möglichst vollständigen Markierung dieser Nachkommen. Diese führte bei Parvalbumin und Somatostatin zu einem stärkeren Auftreten Marker/tdT-positiver Zellen, während dies bei Calretinin nicht der Fall war. So wurden für Calretinin 29,15%, für Parvalbumin 21,75% und für Somatostatin 29,83% der Interneuronensubtypenmarker-positiven Zellen auch mit tdTomato markiert und waren somit copositiv (Abb. 5 B). Es scheint also, dass bei längerer Gabe von Tamoxifen, Somatostatin- und Parvalbumin-positive Zellen effektiver als Nachkommen CXCR4-exprimierender Zellen identifiziert werden können.

Da es sich bei dieser Analyse um ein Pilotexperiment handelt (erstmaliger Einsatz der *Cxcr4*-CreER in diesem Zusammenhang), können noch keine abschließenden Aussagen getroffen werden.



**Abbildung 5** Prozentualer Anteil verschiedener Subtypen GABAerger Neurone in adulten Mäusen, die aus CXCR4-exprimierenden GABAergen Vorläufern entstehen.

Nachkommen CXCR4-exprimierender Zellen werden mittels *Cxcr4*-CreER und dem Cre-Reporter *Rosa26<sup>LSL-tdTomato</sup>* identifiziert. Zur Aktivierung der CreER wurde den Mäusen Tamoxifen über die Muttermilch zugeführt. Das Reporterprotein tdTomato wurde mit einem Kaninchen- bzw. Ratte-anti-RFP, Calretinin mit einem Kaninchenantikörper (rabbit-anti-Calret), Parvalbumin mit einem Mausantikörper (mouse-anti-PV) und Somatostatin mit Rattenantikörpern (rat-anti-SST) doppelimmunfluoreszent detektiert. **A, B**, Die Marker/tdTomato-copositiven Zellen sind prozentual in Bezug auf die Gesamtzahl der Interneuronensubtypenmarker-positiven Zellen dargestellt. Tamoxifenverabreichung an P2/P7, Analyse an P26 (**A**) sowie Tamoxifenverabreichung über 5 Tage (P6-10), Analyse an P21 (**B**). Es werden die Subtypen Calretinin, Parvalbumin und Somatostatin betrachtet. **C**, Epifluoreszente Aufnahmen der Doppelimmunfluoreszenz beispielhaft von Somatostatin/tdTomato (Tamoxifengabe an P2; Analyse an P26) und Parvalbumin/tdTomato (Tamoxifengabe von P6 bis P10; Analyse an P21).

Abkürzungen: Calret, Calretinin; Pvalb, Parvalbumin; SST, Somatostatin; tdT, tdTomato; Tam, Tamoxifen; IN, Interneuron

### 4.3 In *Nkx2.1*-Cre vermittelten *Cxcr4*cKO-Mäusen ist die Zelldichte GABAerger Vorläufer an P0 reduziert

Es ist bekannt, dass die konditionale Deletion des *Cxcr4*-Gens in GABAergen Neuronen deren Positionierung sowohl im embryonalen als auch im voll entwickelten Cortex stört (Li et al. 2008, Tanaka et al. 2010). Diese Sachverhalte sind jedoch für den Hippocampus nicht untersucht. Da sich CXCR4, wie in 4.1 beschrieben, während der Migration auf hippokampalen GABAergen Vorläufern befindet, sollte überprüft werden, ob das Fehlen des Rezeptors auch im Hippocampus zu Migrationsdefekten führt.

Dazu wurden mittels *Nkx2.1*-Cre von LoxP-flankierte *Cxcr4*-Allele (*Cxcr4*<sup>LoxP/LoxP</sup>) gezielt aus GABAergen Vorläufern entfernt und *Cxcr4*-konditional-Knockouts erzeugt ( $n=5$  Tiere) (Nie et al. 2004, Xu et al. 2008). Als Kontrollen ( $n=6$  Tiere) dienten Mäuse, welche keine LoxP-Stellen trugen, bzw. nicht transgen für *Nkx2.1*-Cre waren (Genotypen siehe 3.1.1.1).

Zahlreiche Marker, die ausdifferenzierte GABAerge Neurone identifizieren, sind an P0 in den GABAergen Vorläuferzellen schwach oder nicht exprimiert und deshalb für P0 ungeeignet. Die Interneuronenvorläufer, die aus *Nkx2.1*-positiven Stammzellen hervorgehen, lassen sich jedoch über ihre *Lhx6*-mRNA-Expression identifizieren. Hierbei handelt es sich um einen Marker, der ausschließlich in aus dem medialen Ganglienhügel stammenden Interneuronen vorkommt (Du et al. 2008, Li et al. 2008).

Die Tiere wurden an P0 in einer rostralen (Abb. 6 A, A'), einer intermediären (Abb. 6 B, B') und einer caudalen (Abb. 6 C, C') Schnittebene für den Marker *Lhx6* untersucht.

Der Vergleich von Knockout- und Kontrollmäusen zeigte einen signifikanten Unterschied in der hippokampalen Zelldichte ( $F(1, 9)= 7,511$ ;  $p_{Genotyp}= 0,0228$ ; 2-Wege-ANOVA). Diese war rostral um 96 Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\cong -16,09\%$ ), intermediär um 103 Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\cong -19,01\%$ ) und caudal um 90 Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\cong -18,90\%$ ) reduziert (Signifikanzen wurden hierfür im Post-hoc-Test nach Sidak nicht angezeigt) (Abb. 6 D).

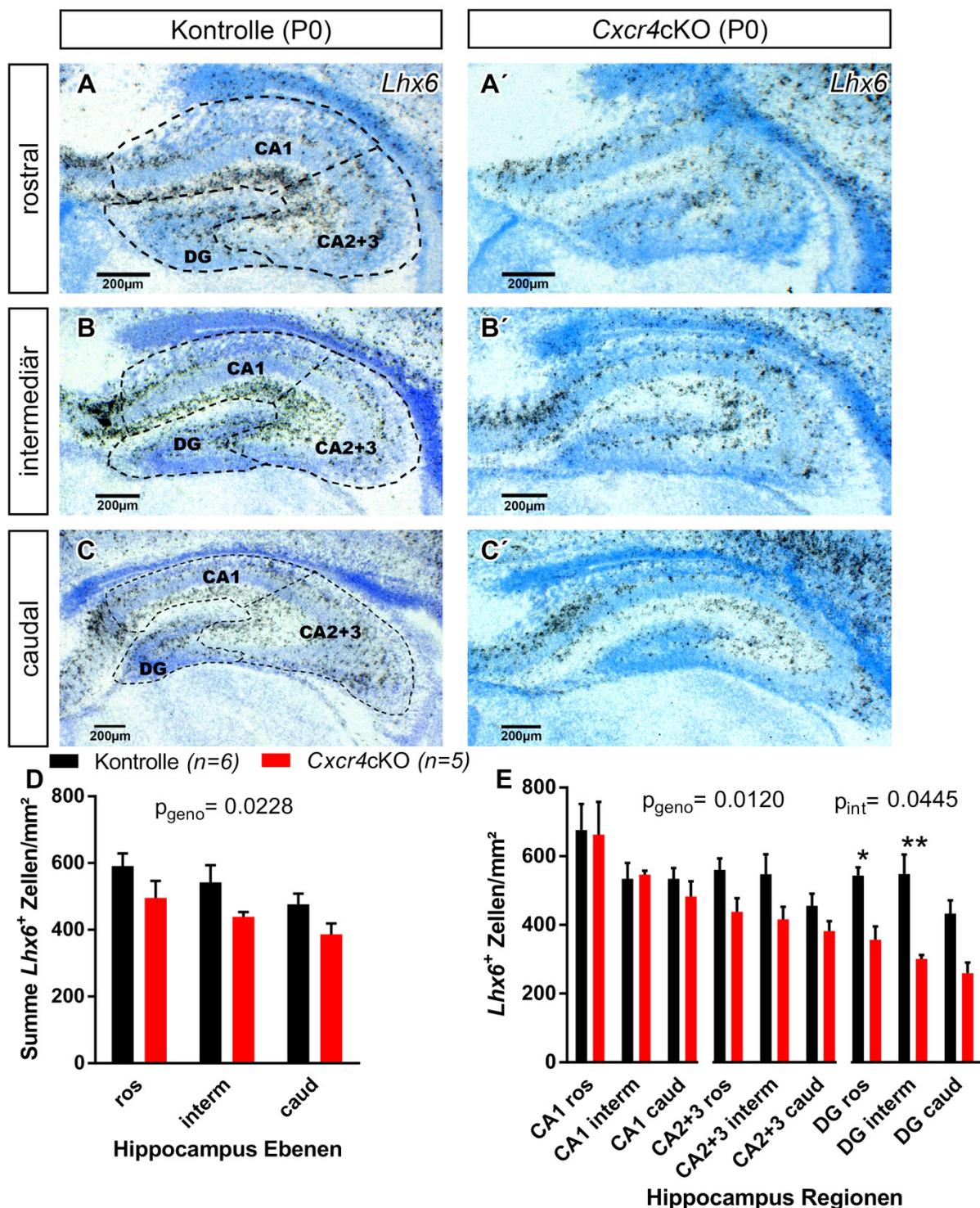
Darauf wurde die Zelldichte in den hippokampalen Unterregionen CA1, CA2+3 und *Gyrus dentatus* untersucht. Die 2-Wege-ANOVA zeigte erneut einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen ( $F(1, 9)= 9,829$ ;  $p_{Genotyp}= 0,0120$ ). Auch trat eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Region auf ( $F(8, 72)= 2,122$ ;  $p_{Interaktion}= 0,0445$ ). Hierdurch ist einerseits eine generelle Reduktion von *Lhx6*-positiven Zellen nachweisbar, aber auch eine unterschiedliche Beeinflussung der Regionen durch den *Cxcr4*cKO. Signifikante Reduktionen wurden insbesondere für den *Gyrus dentatus* in rostraler ( $p=0,0485$ , Post-hoc-Test nach Sidak) und intermediärer ( $p=0,0027$ ) Schnittebene identifiziert, während caudal kein signifikanter Unterschied gefunden wurde ( $p=0,0831$ ). Die Reduktion beläuft sich rostral

auf 186 *Lhx6*<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\cong$  -34,35%), intermediär auf 247 Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\cong$  -45,15%) und caudal auf 133 Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\cong$  -40,08%). In CA1 und CA2+3 konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und Knockouts festgestellt werden, lediglich eine tendenzielle Reduktion in CA2+3 (Abb. 6 E). Die Daten deuten so auf eine nahezu normale Versorgung von CA1 mit *Lhx6*<sup>+</sup> Zellen, während es von CA2+3 bis zum *Gyrus dentatus* zu einem immer stärker werdenden Verlust *Lhx6*-positiver Zellen kommt.

Aufgrund der unterschiedlichen Zelldichte zwischen den Genotypen, wurde weiterführend die relative Verteilung der Zellen im Hippocampus analysiert (Daten nicht graphisch dargestellt). Dabei wurden jeweils alle Zellen eines Genotyps auf 100% gesetzt.

Hier kommt es zu einer hochsignifikanten Interaktion ( $F(8, 81) = 11,37$ ;  $p_{\text{Interaktion}} < 0,0001$ ; 2-Wege-ANOVA), da eine deutliche Erhöhung in CA1 sowie eine deutliche Reduktion im *Gyrus dentatus* vorliegt. In CA1 intermediär kommt es z.B. zu einer Erhöhung *Lhx6*<sup>+</sup> Zellen um 10% (Kontrollen:  $33,2 \pm 0,79$  SEM; *Cxcr4*cKOs:  $43,2 \pm 1,53$  SEM;  $p < 0,0001$ ; Sidak's Post-hoc-Test) und im intermediären *Gyrus dentatus* ebenso zu einer Verminderung um 10% (Kontrollen:  $33,5 \pm 0,85$  SEM; *Cxcr4*cKOs:  $23,8 \pm 0,97$  SEM;  $p < 0,0001$ ) in *Cxcr4*cKOs. Hierdurch entsteht der Eindruck einer möglichen Umverteilung *Lhx6*-positiver Zellen.

Zusammenfassend ruft der Verlust des CXCR4-Rezeptors eine Verminderung der *Lhx6*-positiven Zellen hervor. Diese Reduktion konzentriert sich dem Migrationsweg der GABAergen Vorläufer entlang immer mehr. Folglich ist sie in CA1 kaum merklich und am stärksten im *Gyrus dentatus*. Zieht man die relative Betrachtung hinzu, befinden sich Zellen, welche in den *Gyrus dentatus* migrieren sollten, in *Cxcr4*cKOs möglicherweise in CA1. In Kombination mit den Ergebnissen aus 4.1 lässt sich sagen, dass die Abwesenheit von CXCR4 aufgrund seiner starken Präsenz während der Interneuronenmigration, eine Dezimierung der aus dem medialen Ganglienhügel stammenden GABAergen Vorläufer herbeiführt.



**Abbildung 6** Einfluss des *Cxcr4cKO*s auf *Lhx6*-positive GABAerge Vorläuferzellen an P0. *Lhx6* wurde durch [<sup>35</sup>S]-*In-situ*-Hybridisierung als Marker für GABAerge Vorläufer in *Cxcr4cKO*s (A', B', C') und Kontrollmäusen (A, B, C) an P0 markiert. Es wurden Beispiele mit besonders starkem Effekt gewählt. *Lhx6*-Signale erscheinen schwarz und Nissl-Gegenfärbung blau. D, E, Quantifizierung der Dichte *Lhx6*-positiver Zellen im gesamten Hippocampus (D) und in hippocampalen Subregionen (E). Daten sind Mittelwerte+SEM, Gruppen wurden mittels 2-Wege-ANOVA verglichen. *n*-Zahlen und *p*-Werte für Genotyp ( $p_{\text{geno}}$ ) und Region/Genotyp-Interaktion ( $p_{\text{int}}$ ) sind angegeben. \* $p < 0,05$  und \*\* $p < 0,01$  (Sidak's Post-hoc-Test).

Abkürzungen für Schnittebenen: ros, rostral; interm, intermediär; caud, caudal

#### 4.4 Zellschichtenabhängige Reduktion sowie teilweise prozentuale Umverteilung *Lhx6*-positiver Zellen an P0 in *Cxcr4*cKOs

Nachdem sich in den in 4.3 dargestellten Befunden zeigte, dass die Menge GABAerger Vorläufer im Hippocampus an P0 in *Cxcr4*cKOs reduziert ist, wurde die Untersuchung auf die einzelnen Zellschichten ausgeweitet. Hierbei sollte festgestellt werden, ob die Zelldezimierung in bestimmten Schichten auftritt und ob es hierbei zu relativen Verschiebungen der Zellen zwischen den Schichten kommt.

Dafür wurden Ausschnitte aus CA1 und *Gyrus dentatus* gewählt, die möglichst parallele Zellschichten aufwiesen (Abb. 7 A). Anschließend wurden gleichgroße, parallele Bins (Abgrenzungen) gesetzt – sechs für CA1 und drei für den DG – welche die Zellschichten separierten, in denen gezählt wurde. In CA1 entsprach Bin 1 der Subventrikulärzone (SVZ)/Intermediärzone (IZ), Bin 2 und 3 der Intermediärzone/hippokampalen Platte, die Bins 4 und 5 der Marginalzone (MZ) und Bin 6 der hippokampalen Fissur. Im DG entsprach Bin 1 der dentalen Marginalzone/dentalen Platte, Bin 2 und 3 der dentalen Platte und dem Hilus.

Die Analyse fand in denselben Tieren statt wie in 4.3.

In CA1 (Abb. 7 B, B') wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt, was auf eine Reduktion der Zelldichte *Lhx6*-positiver Zellen in *Cxcr4*cKOs hinweist ( $F(1, 9) = 9,388$ ;  $p_{\text{Genotyp}} = 0,0135$ ; 2-Wege-ANOVA). Weiterhin wurde eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Zellschichten identifiziert ( $F(5, 45) = 4,251$ ;  $p_{\text{Interaktion}} = 0,0030$ ; 2-Wege-ANOVA). Dies zeigt eine unterschiedliche Beeinflussung der Zellschichten durch den *Cxcr4*cKO.

Dementsprechend wurde eine Verminderung der Zelldichte in den Bins 2 (Reduktion um 302 *Lhx6*<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup>  $\triangleq$  -35,57%), 5 (Reduktion um 532 *Lhx6*<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup>  $\triangleq$  -35,57%) und 6 (Reduktion um 502 *Lhx6*<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup>  $\triangleq$  -41,71%) gefunden, wobei die Unterschiede in den Bins 5 und 6 statistisch stark signifikant waren ( $p_{\text{Bin5}} = 0,0009$ ;  $p_{\text{Bin6}} = 0,0018$ ; Sidak's Post-hoc-Test), während für Bin 2 keine Signifikanz vorlag ( $p_{\text{Bin2}} = 0,1333$ ) (Abb. 7 C).

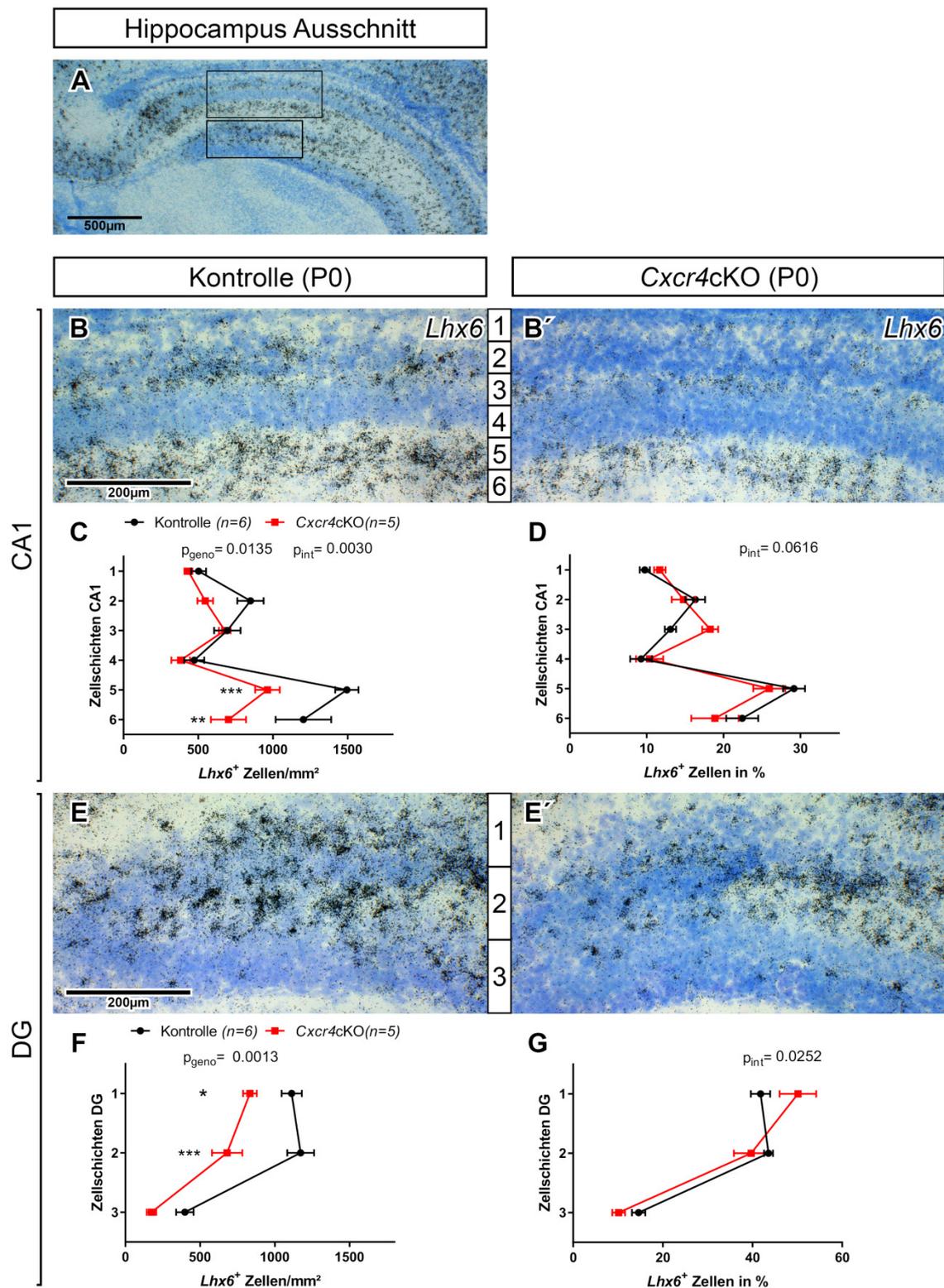
Weiterführend wurden die Unterschiede der prozentualen Verteilung in den Schichten zwischen Kontrollen und *Cxcr4*cKOs betrachtet. Hierbei ergaben sich für CA1 über die 2-Wege-ANOVA keine Signifikanzen, nur eine beinahe signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Zellschichten ( $F(5, 54) = 2,257$ ;  $p_{\text{Interaktion}} = 0,0616$ ), was auf eine Tendenz zu einer Umverteilung zwischen den Zellschichten hinweisen könnte (Abb. 7 D).

Die gleichen Untersuchungen wurden nun auch für den *Gyrus dentatus* durchgeführt (Abb. 7 E, E'). Es wurde ebenfalls eine Reduktion der Zellen festgestellt, die sich, verglichen mit CA1, deutlich gleichmäßiger über die Schichten verteilte. Dies wurde durch einen

signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen ( $F(1, 9) = 21,19$ ;  $p_{Genotyp} = 0,0013$ , 2-Wege-ANOVA) und eine nicht signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Zellschichten untermauert. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zellschichten im Post-hoc-Test traten für Bin 1 mit einer Reduktion von 279 Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\cong -25,09\%$ ) und Bin 2 mit einer Reduktion von 492 Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\cong -41,95\%$ ) auf ( $p_{Bin1} = 0,0298$ ;  $p_{Bin2} = 0,0001$ ; Sidak's Post-hoc-Test), während in Bin 3 kein signifikanter Unterschied identifiziert wurde ( $p_{Bin3} = 0,1031$ ) (Abb. 7 F).

Die relative (prozentuale) Verteilung in den Schichten ergab für den *Gyrus dentatus*, durch die prozentuale Erhöhung *Lhx6*-positiver Zellen in Bin 1, eine Überschneidung der Kurven von Kontrollen und *Cxcr4c*KOs (Abb. 7 G). Da es zusätzlich eine signifikante Interaktion gab ( $F(2, 27) = 4,230$ ;  $p_{Interaktion} = 0,0252$ ; 2-Wege-ANOVA), jedoch nur einen fast signifikanten Unterschied im Post-hoc-Test nach Sidak ( $p_{Bin1} = 0,0732$ ), wies dies in Richtung einer Tendenz zur Umverteilung der Zellen von Bin 2 und 3 nach Bin 1 in *Cxcr4c*KOs.

Abschließend lässt sich sagen, dass der *Cxcr4c*KO in CA1 besonders die Bins 2 (nicht signifikant im Post-hoc-Test), 5 und 6 beeinflusste und dort eine Reduktion verursachte (Abb. 7 C), während es im *Gyrus dentatus* eher zu einer allgemeinen Reduktion über alle drei Bins kam (Abb. 7 F). Auch waren Tendenzen zu Zellshifts zwischen den Schichten zu beobachten.



**Abbildung 7** Einfluss des *Cxcr4cKO*s auf die Schichtverteilung *Lhx6*<sup>+</sup> Zellen an P0. *Lhx6* wurde durch [<sup>35</sup>S]-In-situ-Hybridisierung als Marker für GABAerge Vorläufer an P0 markiert. *Lhx6*-Signale erscheinen schwarz, Nissl-Gegenfärbung blau. **A**, Gewählte Ausschnitte aus dem Hippocampus zur Zählung *Lhx6*<sup>+</sup> Zellen in den Zellschichten von Kontrollmäusen (**B**,**E**) und *Cxcr4cKO*s (**B'**,**E'**). **C**, **F** Quantifizierung der Dichte *Lhx6*-positiver Zellen in Zellschichten von CA1 und DG. **D**, **G**, Daten aus **C** und **F** in Prozent (jeder Genotyp auf 100% gesetzt). Daten sind Mittelwerte+SEM, Gruppen wurden mittels 2-Wege-ANOVA verglichen. n-Zahlen und p-Werte für Genotyp ( $p_{\text{geno}}$ ) und Zellschicht/Genotyp-Interaktion ( $p_{\text{int}}$ ) sind angegeben. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (Sidak's Post-hoc-Test).

#### 4.5 In adulten *Cxcr4*cKO-Mäusen ist die Zelldichte tdTomato-positiver Interneurone besonders in CA2+3 reduziert

Im Neocortex kommt es bei fehlendem CXCL12 oder CXCR4 zu gut charakterisierten Defekten bei der Positionierung GABAerger Neurone, welche besonders an embryonalen Entwicklungsstadien gut zu erkennen sind (Abe et al. 2014, Stumm et al. 2003). Im Gegensatz dazu sind im voll entwickelten Cortex Fehlpositionierungen weniger ausgeprägt als embryonal (Li et al. 2008). Dies kann mit postnatalen Selektions- und späten schichtspezifischen Sortierungsprozessen der GABAergen Neurone – welche frühe Migrationsdefekte teilweise kompensieren können – erklärt werden.

Da bereits Migrationsdefekte der *Cxcr4*cKOs an P0 nachgewiesen wurden (siehe 4.3/4.4), sollte nun an adulten Mäusen (P28) untersucht werden, inwieweit Defekte bestehen bleiben bzw. kompensiert werden.

Hierzu wurden, wie bei 4.3, von LoxP-flankierte *Cxcr4*-Allele gezielt aus GABAergen Interneuronen der mpIN-Population entfernt, um *Cxcr4*cKOs zu erzeugen (Nie et al. 2004, Xu et al. 2008). Zusätzlich handelte es sich bei den untersuchten Tieren um Ai14-Cre-Reporter-Mäuse (*Rosa26*<sup>LSL-tdTomato</sup>), in denen es durch Rekombination zur tdTomato-Expression in mpIN kam (Madisen et al. 2010).

Die Mäuse wurden in drei Ebenen (rostral (Abb. 8 A, A'), intermediär (Abb. 8 B, B') und caudal (Abb. 8 C, C')) untersucht. Diese wurden hier durch mehrere Schnitte gebildet, die mithilfe einer Millimetereinteilung ausgehend vom Bregma den Ebenen zugeordnet wurden (siehe 3.6.2).

Der Vergleich zwischen Kontrollmäusen ( $n=4$  Tiere; *Cxcr4*<sup>LoxP/WT</sup>, *Rosa26*<sup>LSL-tdTomato</sup>) und *Cxcr4*cKOs ( $n=4$  Tiere; *Cxcr4*<sup>LoxP/LoxP</sup>, *Rosa26*<sup>LSL-tdTomato</sup>) zeigte einen signifikanten Unterschied der hippocampalen Zelldichte ( $F(1, 6)= 9,143$ ;  $p_{Genotyp}= 0,0233$ ; 2-Wege-ANOVA). Signifikante Unterschiede für die einzelnen Ebenen wurden für die intermediäre Ebene – mit einer Reduktion von 32 tdT<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\hat{=} -17,71\%$ ;  $p_{interm}=0,0334$ ; Sidak's multiple comparisons test) – und für die caudale Ebene – mit einer Reduktion von 31 tdT<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\hat{=} -18,57\%$ ;  $p_{caud}= 0,0352$ ) – identifiziert (Abb.8 D).

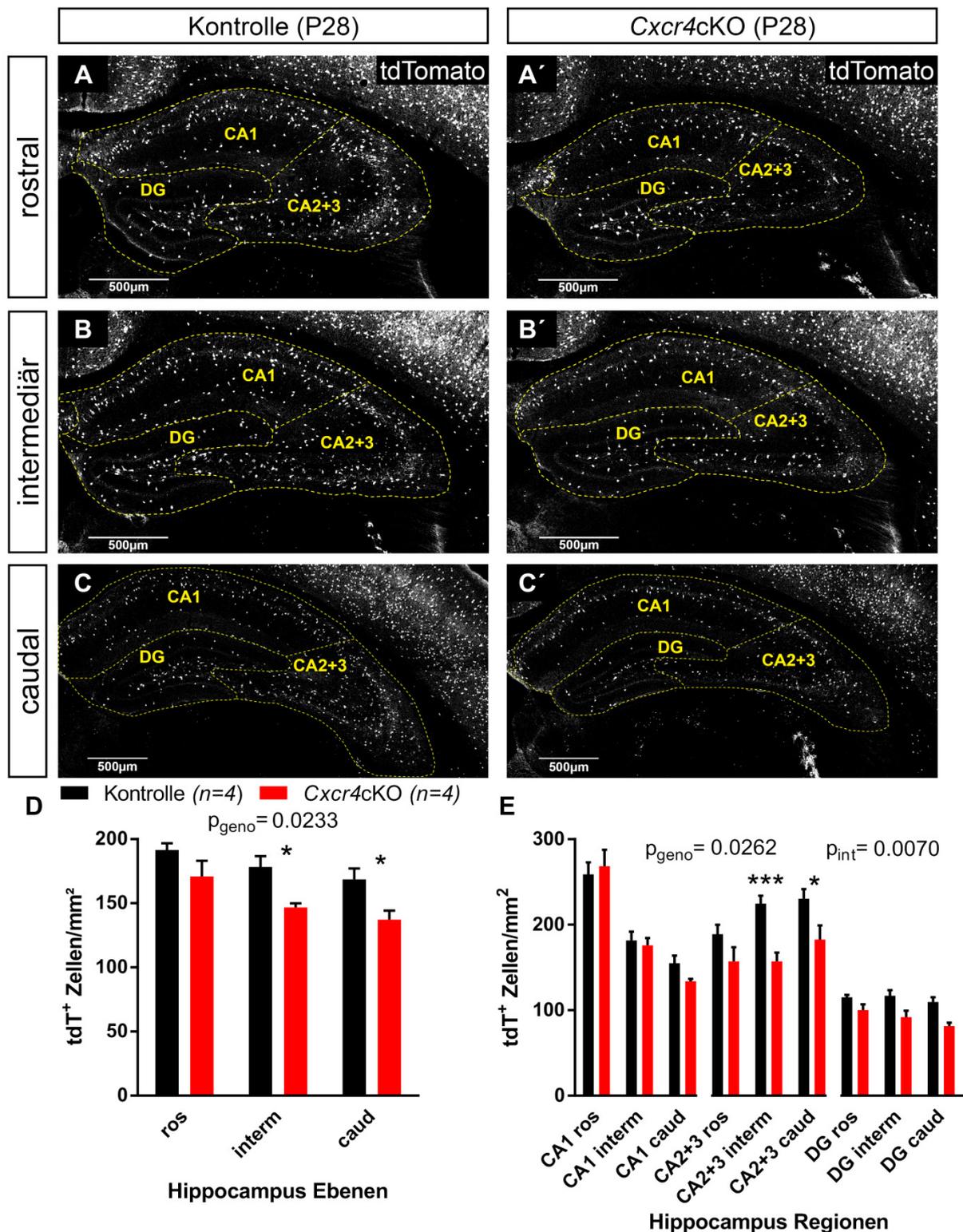
Darauffolgend wurde die Zelldichte in den hippocampalen Unterregionen CA1, CA2+3 und DG untersucht. Beim Vergleich der einzelnen Regionen gegeneinander trat ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen auf ( $F(1, 6)= 8,592$ ;  $p_{Genotyp}= 0,0262$ ; 2-Wege-ANOVA), was die allgemeine Reduktion in Abb. 8 D bestätigte. Weiterhin wurde eine signifikante Interaktion zwischen dem Genotyp und den Regionen identifiziert ( $F(8, 48)=$

3,078;  $p_{\text{Interaktion}} = 0,007$ ). Demgemäß wurden die Regionen unterschiedlich vom Knockout beeinflusst.

Es ergab sich, dass die Zelldichte besonders in CA2+3 reduziert war: Hierbei kam es zu einer Verminderung von 32 tdT<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\cong -16,79\%$ ) im rostralen, 68 tdT<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\cong -30,05\%$ ) im intermediären und 48 tdT<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\cong -20,75\%$ ) im caudalen Hippocampus der Knockoutmäuse. Diese Zahlen scheinen im Vergleich zu den Differenzen, welche bei P0 genannt werden, relativ klein. Dies kann jedoch auf die deutlich größeren Flächen der Hippocampi der adulten Tiere – und somit eine generelle Verminderung der Zelldichte – zurückgeführt werden. Signifikante Unterschiede waren in CA2+3 intermediär ( $p_{CA2+3interm} = 0,0003$ ; Sidak's Post-hoc-Test) und caudal ( $p_{CA2+3caud} = 0,0209$ ) zu verzeichnen, während dies rostral nicht der Fall war ( $p_{CA2+3ros} = 0,2993$ ), obwohl man auch hier eine Reduktion erkennen konnte (Abb. 8 E).

Ferner traten im DG in allen Ebenen und in CA1 caudal schwache Reduktionen der Zelldichte auf. Allerdings waren diese relativ gering und daher nicht signifikant, trugen aber dennoch zur allgemeinen Reduktion in den *Cxcr4*cKO bei, welche in Abb. 8 D zu sehen ist.

Gesamtheitlich betrachtet, verursachte der *Cxcr4*cKO Reduktionen der Zelldichte im ganzen Hippocampus an P28, welche besonders in der CA2+3-Region vertreten waren. Im Vergleich hierzu sind Unterschiede bzgl. der Reduktion an P0 zu erkennen, da sich diese auf den DG konzentrierte (siehe 4.4). Es blieben also weiterhin Defekte der mpIN-Verteilung in adulten Tieren trotz Kompensationsmechanismen bestehen. Diese unterschieden sich jedoch interessanterweise von den in jüngeren Tieren gefundenen Migrationsfehlern.



**Abbildung 8 Einfluss des Cxcr4cKOs auf mpIN an P28.**

mpIN werden mittels *Nkx2.1-Cre* und dem Cre-Reporter *Rosa26<sup>LSL-tdTomato</sup>* identifiziert. tdTomato wurde mit einem Kaninchen-anti-RFP durch Immunhistochemie in Kontrollmäusen (A, B, C) und *Cxcr4cKO*s (A', B', C') an P28 detektiert. tdTomato-Signale erscheinen weiß. Die Hippocampi wurden in CA1, CA2+3 und DG unterteilt. **D, E**, Quantifizierung der Dichte tdT-positiver Zellen im gesamten Hippocampus (**D**) und in hippokampalen Subregionen (**E**). Daten sind Mittelwerte+SEM, Gruppen wurden mittels 2-Wege-ANOVA verglichen. *n*-Zahlen und *p*-Werte für Genotyp ( $p_{\text{geno}}$ ) und Region/Genotyp-Interaktion ( $p_{\text{int}}$ ) sind angegeben. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (Sidak's post-hoc Test).

Abkürzungen für Schnittebenen: ros, rostral; interm, intermediär; caud, caudal

#### 4.6 Reduktion von mpIN in verschiedenen Schichten sowie teilweise prozentuale Umverteilung an P28 in *Cxcr4*cKOs

Wie in 4.5 gezeigt wurde, kam es zu einer deutlichen Reduktion in CA2+3 an P28 in *Cxcr4*cKOs, und wie schon an P0 in 4.3/4.4, war der nächste logische Schritt zu untersuchen, welche Schichten hierbei betroffen waren und ob es zu relativen Umverteilungen der Zellen kam.

In Abb. 9 A und A' ist zunächst die allgemeine Anatomie des adulten Hippocampus mit seinen Schichten zum besseren Verständnis zu sehen.

Es wurden drei Ebenen – rostral (Abb. 9 B, B'), intermediär (Abb. 9 C, C') und caudal (Abb. 9 D, D') – untersucht. Hierbei wurden dieselben Mäuse wie in 4.5 analysiert und zwischen Kontrollen und *Cxcr4*cKOs verglichen. Da sich die stärksten Effekte in CA2+3 zeigten (siehe 4.5), wird diese Hippocampusregion auch in Abb. 9 repräsentativ zur Darstellung der Zellschichten gezeigt.

Die Untersuchungen bestärkten die Ergebnisse von 4.5. Zunächst wurden die tatsächlichen Zellzahlen (Ergebnisse nicht graphisch dargestellt) in den einzelnen Hippocampusregionen (CA1, CA2+3, DG) untersucht: In CA1 wurde ein schwach signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt ( $F(1, 6) = 7,841$ ;  $p_{\text{GenotypCA1}} = 0,0312$ ; 2-Wege-ANOVA). Die hieraus abzuleitende allgemeine leichte Reduktion deckt sich mit 4.5 und wurde durch den Post-hoc-Test nach Sidak unterstützt: Signifikante Unterschiede traten lediglich caudal im *stratum oriens* in Form einer Reduktion um 31% (Kontrolle:  $68,0 \pm 8,87$  SEM; *Cxcr4*cKO:  $47,04 \pm 3,91$  SEM;  $p_{\text{so caud}} = 0,0030$ ) und im *stratum pyramidale* mit einer Reduktion um 30% tdT<sup>+</sup> Zellen auf (Kontrolle:  $55,50 \pm 2,35$  SEM; *Cxcr4*cKO:  $38,83 \pm 1,95$  SEM;  $p_{\text{sp caud}} = 0,0359$ ), was folgerichtig mit der leichten Verminderung in Abb. 8 E CA1 caudal übereinstimmt. In anderen Schichten und Ebenen wurden nur leichte nicht signifikante Reduktionen identifiziert.

In CA2+3 zeigte sich eine generelle Verminderung der Zellen in *Cxcr4*cKOs über fast alle Schichten des Hippocampus ( $F(1, 6) = 19,65$ ;  $p_{\text{GenotypCA2+3}} = 0,0044$ ; 2-Wege-ANOVA), die am stärksten im *stratum oriens* und *pyramidale* vertreten war und sich durch alle Ebenen zog. Aufgrund der unterschiedlich starken Beeinflussung der verglichenen Schichten bzw. Ebenen durch den Knockout, wurde eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Zellschicht/Ebene identifiziert ( $F(11, 66) = 3,854$ ;  $p_{\text{InteraktionCA2+3}} = 0,0003$ ; 2-Wege-ANOVA). Rostral wurden über Sidak's Post-hoc-Test keine statistisch signifikanten Unterschiede identifiziert, aber dennoch zeigt sich eine Reduktion im *stratum oriens* um 53% (Kontrolle:  $32,78 \pm 0,76$  SEM; *Cxcr4*cKO:  $15,36 \pm 3,75$  SEM;  $p_{\text{so ros}} = 0,0678$ ) und im *stratum*

*pyramidale* um 36% (Kontrolle:  $48,79 \pm 5,45$  SEM; *Cxcr4cKO*:  $31,30 \pm 3,26$  SEM;  $p_{sp\ ros} = 0,0658$ ). Intermediär kam es ebenfalls zu Reduktionen tdT-positiver Zellen im *stratum oriens*, die jedoch nicht signifikant waren (Reduktion um 42%; Kontrolle:  $40,0 \pm 4,60$  SEM; *Cxcr4cKO*:  $23,17 \pm 3,66$  SEM;  $p_{so\ interm} = 0,0878$ ; Sidak's Post-hoc-Test). Im *stratum pyramidale* wurde hingegen eine signifikante Reduktion tdT-positiver Zellen um 44% gefunden (Kontrolle:  $62,50 \pm 4,52$  SEM; *Cxcr4cKO*:  $35,04 \pm 6,90$  SEM;  $p_{sp\ interm} = 0,0003$ ). Caudal zeigte sich im *stratum oriens* eine hoch signifikante Reduktion um 54% (Kontrolle:  $64,75 \pm 11,73$ ; *Cxcr4cKO*:  $29,71 \pm 4,97$  SEM;  $p_{so\ caud} < 0,0001$ ). Auch in *stratum pyramidale* und *radiatum* kam es zu Reduktionen (diese waren im Post-hoc-Test jedoch nicht signifikant), während das *stratum lacunosum moleculare* nicht betroffen war.

Im *Gyrus dentatus* wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen identifiziert ( $F(1, 6) = 19,59$ ;  $p_{GenotypDG} = 0,0044$ ; 2-Wege-ANOVA) sowie eine schwach signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Zellschicht/Ebene ( $F(8, 48) = 2,192$ ;  $p_{InteraktionDG} = 0,0447$ ; 2-Wege-ANOVA). In der rostralen Ebene wurde keine Reduktion festgestellt, wohingegen intermediär und caudal Unterschiede zwischen Kontrollen und *Cxcr4cKO*s auftraten. So gab es intermediär eine signifikante Reduktion im *stratum granulosum* um 47% (Kontrolle:  $18,88 \pm 3,41$  SEM; *Cxcr4cKO*:  $10,0 \pm 0,74$  SEM;  $p_{sg\ interm} = 0,0140$ ). Caudal traten signifikante Reduktionen in allen Schichten auf: im *stratum moleculare* um 31% (Kontrolle:  $29,38 \pm 4,53$  SEM; *Cxcr4cKO*:  $20,21 \pm 0,57$  SEM;  $p_{sm\ caud} = 0,0101$ ), im *stratum granulosum* um 43% (Kontrolle:  $18,50 \pm 1,89$ ; *Cxcr4cKO*:  $10,50 \pm 1,43$ ;  $p_{sg\ caud} = 0,0140$ ) und im *Hilus* um 47% (Kontrolle:  $21,13 \pm 2,24$  SEM; *Cxcr4cKO*:  $11,29 \pm 1,00$  SEM;  $p_{Hilus\ caud} = 0,0047$ ).

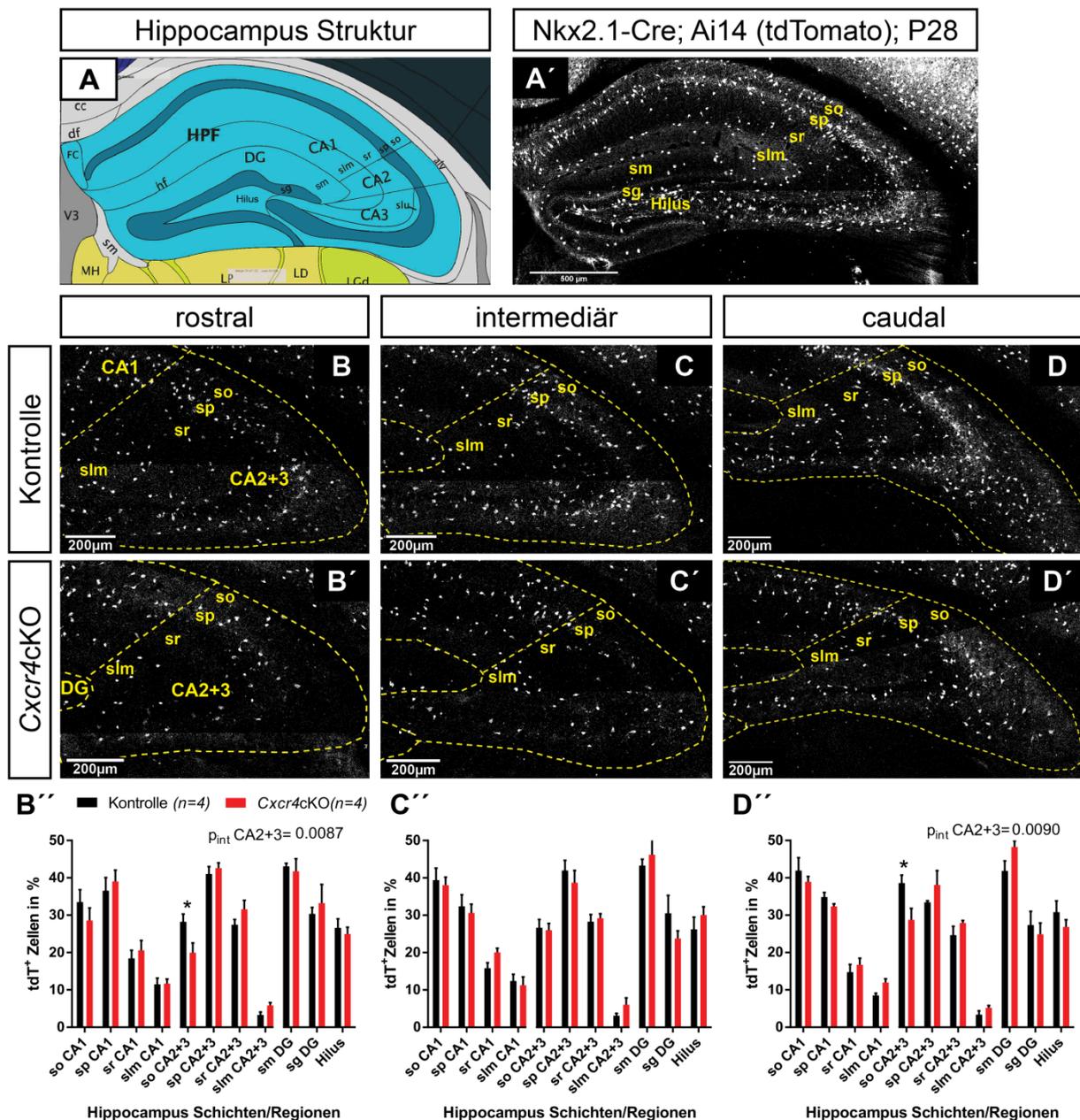
Betrachtet man nun die Verteilung der Zellen in Kontrollen und *Cxcr4cKO*s relativ (in Prozent) (Abb. 9 B'', C'', D''), sind leichte Umverteilungen innerhalb der Ebenen zwischen den Schichten erkennbar, besonders in CA2+3 rostral und caudal. Die Zellen eines Genotyps innerhalb einer Region und Ebene wurden auf 100% gesetzt. Eine 2-Wege-ANOVA und Sidak's Post-hoc-Test wurden für jede Region pro Ebene einzeln angewandt, um einen radialen Shift der Zellen in einer Ebene erkennen zu können. Dieser trat rostral und caudal in CA2+3 tatsächlich auch auf, woraus sich folglich eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Zellschichten ergab ( $F(3, 24) = 4,876$ ,  $p_{InteraktionCA2+3\ ros} = 0,0087$ ;  $F(3, 24) = 5,737$ ,  $p_{InteraktionCA2+3\ caud} = 0,0090$ ). Es wurde eine Reduktion um 8,29% in CA2+3 *stratum oriens* rostral festgestellt, die auch statistische Signifikanz aufwies ( $p_{CA2+3\ so\ ros} = 0,0135$ ; Sidak's Post-hoc-Test), während es in *stratum pyramidale*, *stratum radiatum* und *stratum lacunosum moleculare* zu leichten prozentualen Erhöhungen kam. Wenn man diese Erhöhungen addiert, erhält man die 8,29%, welche im *stratum oriens* fehlen (Abb. 9 B'').

Ähnlich verhielt es sich auch caudal: Hier zeigte sich eine Reduktion um 9,82% im *stratum oriens* ( $p_{CA2+3 \text{ so caud}} = 0,0135$ ), während in *stratum pyramidale*, *stratum radiatum* und *stratum lacunosum moleculare* wieder Erhöhungen auftraten, die zusammengenommen die im *stratum oriens* fehlenden 9,82% ergaben (Abb. 9 D'').

Auch in anderen Regionen schien es eine schwache Tendenz zu Shifts zu geben. Diese Shifts wiesen jedoch weder in der 2-Wege-ANOVA noch in Sidak's Post-hoc-Test statistische Signifikanzen auf.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine durch den *Cxcr4*cKO hervorgerufene Reduktion besonders in *stratum oriens* und *pyramidale* der CA-Regionen auftrat, wobei die Dezimierung in CA2+3 deutlich stärker war. Weiterhin wurden leichte Umverteilungen der tdT-positiven Zellen zwischen den Schichten, besonders in CA2+3 rostral und caudal, festgestellt.

Die in diesen Untersuchungen gefundenen Ergebnisse decken sich mit früheren Resultaten, die sich auf den Cortex beziehen: Bei Deletion von CXCL12 oder CXCR4 sammelten sich GABAerge Zellen ektop in tieferen Schichten des Cortex bzw. in der Mitte (Abe et al. 2014, Sanchez-Alcaniz et al. 2011, Stumm et al. 2003, Wang et al. 2011), ähnlich wie die Zellen hier in tieferen Zellschichten des Hippocampus prozentual erhöht sind. Auch an P0 wurden leichte Umverteilungen zwischen den Schichten nachgewiesen (siehe 4.4), die eine ähnliche Orientierung aufwiesen.



**Abbildung 9 Einfluss des Cxcr4cKOs auf die Schichtung von mpIN an P28.**

mpIN werden mittels *Nkx2.1-Cre* und dem Cre-Reporter *Rosa26<sup>LSL-tdTomato</sup>* identifiziert. tdTomato wurde mit einem Kaninchen-anti-RFP durch Immunhistochemie in *Cxcr4cKO*s (A', B', C') und Kontrollmäusen (A, B, C) an P28 detektiert. tdTomato-Signale erscheinen weiß. A, A', Grafische (A) und reale (A') Darstellung der Anatomie des Hippocampus mit seinen Schichten (A verändert nach © 2011 Allen Institute for Brain Science. Allen Mouse Brain Atlas. Zugänglich unter: [https://mouse.brain-map.org/experiment/thumbnails/100048576?image\\_type=atlas](https://mouse.brain-map.org/experiment/thumbnails/100048576?image_type=atlas)). B'', C'', D'', Vergleich zwischen Kontrollen und *Cxcr4cKO*s tdT<sup>+</sup> Zellen in Prozent (jeder Genotyp wurde pro Region und Ebene auf 100% gesetzt). Daten sind Mittelwerte+SEM, Gruppen wurden mittels 2-Wege-ANOVA verglichen. n-Zahlen und p-Werte für Zellschicht/Genotyp-Interaktion ( $p_{int}$ ) sind angegeben. \* $p < 0,05$  (Sidak's Post-hoc-Test).

Abkürzungen: ros, rostral; interm, intermediär; caud, caudal; so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum moleculare; sm, stratum moleculare; sg, stratum granulosum

#### 4.7 *GAD65/67*-positive Zellen sind in *Cxcr4*cKOs leicht reduziert

In 4.5 und 4.6 wurde eine Reduktion von mpIN in *Cxcr4*cKOs nachgewiesen. Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurde nun analysiert, wie sich der konditionale Knockout auf die gesamte Population GABAerger Neurone (nicht nur mpIN) in adulten Tieren auswirkt.

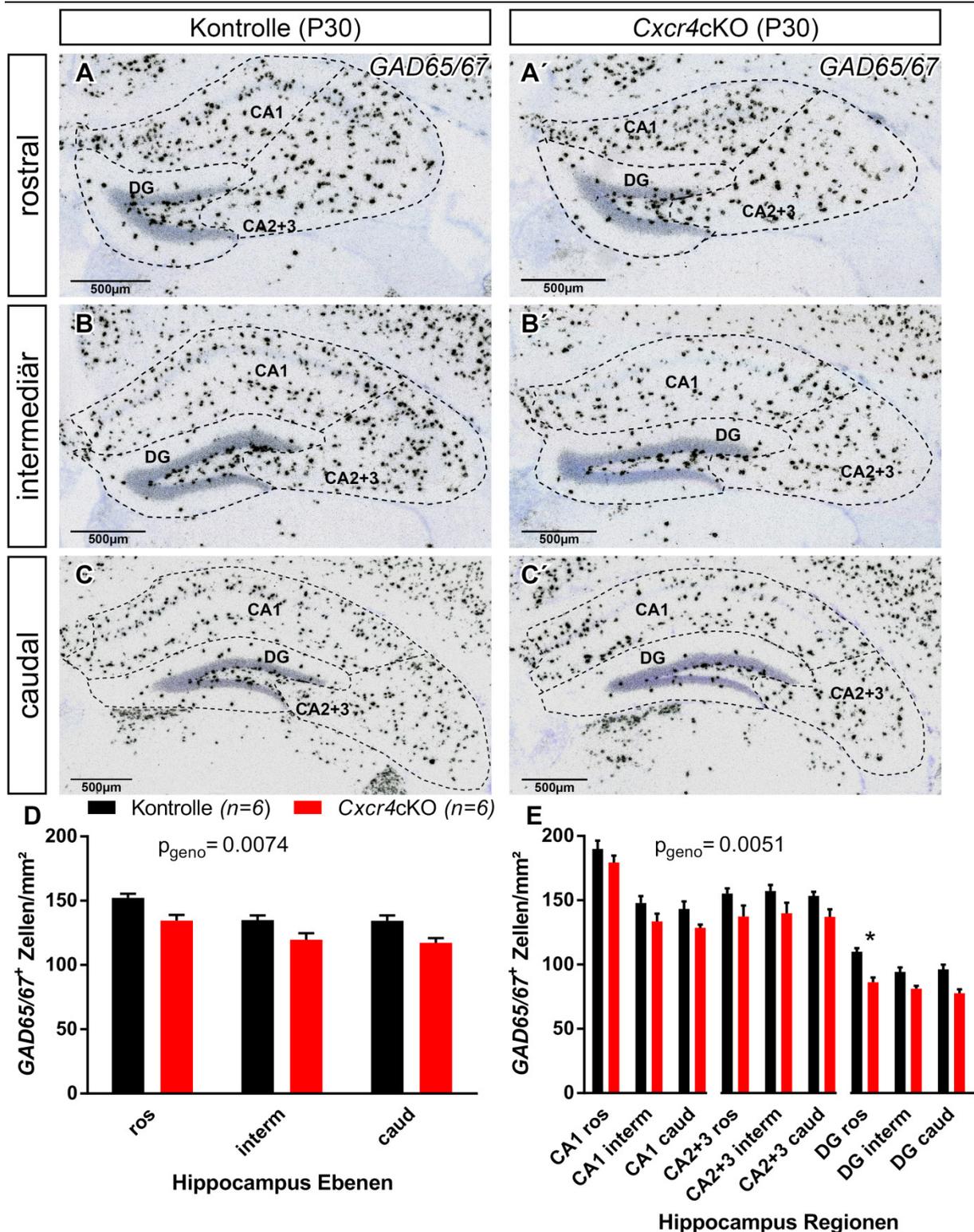
Mittels [<sup>35</sup>S]-*In-situ*-Hybridisierung (siehe 3.4) wurden alle GABAergen Neurone im Hippocampus über die mRNA-Sonde *GAD65/67* detektiert. So wurden alle Zellen, welche das Enzym Glutamatdecarboxylase exprimierten, markiert und somit als GABAerge Neurone identifiziert (Stumm et al. 2004).

Es wurden Kontrollmäuse ( $n=6$  Tiere) mit *Cxcr4*cKOs ( $n=6$  Tiere) an P30 verglichen und in drei Ebenen (rostral (Abb. 10 A, A'), intermediär (Abb. 10 B, B') und caudal (Abb. 10 C, C')) untersucht. Diese wurden, wie in 4.5, durch mehrere Schnitte gebildet, die anhand einer Millimetereinteilung ausgehend vom Bregma in die drei Ebenen eingeteilt wurden.

Der Vergleich zwischen den Genotypen zeigte, dass der *Cxcr4*cKO, ähnlich wie in 4.5, eine allgemeine signifikante Reduktion der hippocampalen Dichte *GAD65/67*-positiver Zellen verursachte ( $F(1, 10)= 11,18$ ;  $p_{Genotyp}= 0,0074$ ; 2-Wege-ANOVA). Diese Reduktion ist jedoch relativ gering, da der Post-hoc-Test nach Sidak keine Signifikanzen für die einzelnen Ebenen ergab (Abb. 10 D).

Daraufhin wurde die Zelldichte in den hippocampalen Unterregionen CA1, CA2+3 und DG untersucht. Die 2-Wege-ANOVA zeigte erneut einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen ( $F(1, 10)= 12,74$ ;  $p_{Genotyp}= 0,0051$ ) und auch im Post-hoc-Test nach Sidak konnte für den *Gyrus dentatus* rostral ein signifikanter Unterschied identifiziert werden ( $p= 0,0116$ ) (Abb. 10 E). Da jedoch keine weiteren Signifikanzen im Post-hoc-Test für andere Regionen und Ebenen festgestellt wurden, war auch für die Analyse in den einzelnen Regionen eher eine allgemeine leichte Reduktion der Dichte *GAD65/67*-positiver Zellen anzunehmen.

Man kann insgesamt sagen, dass durchaus Reduktionen auftraten, diese jedoch nur relativ geringe Ausmaße hatten. Es zeigte sich keine Selektivität der Reduktion für Ebenen oder Regionen, sondern eher eine allgemeine Verminderung der Dichte GABAerger Neuronen im gesamten Hippocampus. Dies wurde durch den signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen und die fehlende Signifikanz für die Interaktion zwischen Genotyp und Ebenen bzw. Regionen gezeigt (Abb. 10 D, E).



**Abbildung 10** Einfluss des *Cxcr4cKO*s auf GABAerge Neurone des Hippocampus an P30. *GAD65/67* wurde durch [<sup>35</sup>S]-*In-situ*-Hybridisierung als Marker für GABAerge Neurone in *Cxcr4cKO*s (A', B', C') und Kontrollmäusen (A, B, C) an P30 markiert. *GAD65/67*-Signale erscheinen schwarz, Nissl-Gegenfärbung blau. Die Hippocampi wurden in CA1, CA2+3 und DG unterteilt. **D**, **E**, Quantifizierung der Dichte *GAD65/67*-positiver Zellen im gesamten Hippocampus (**D**) und in hippocampalen Subregionen (**E**). Daten sind Mittelwerte+SEM, Gruppen wurden mittels 2-Wege-ANOVA verglichen. *n*-Zahlen und *p*-Werte für Genotyp ( $p_{\text{geno}}$ ) und Region/Genotyp-Interaktion ( $p_{\text{int}}$ ) sind angegeben. \* $p < 0,05$  (Sidak's post-hoc Test).

Abkürzungen für Schnittebenen: ros, rostral; interm, intermediär; caud, caudal

#### 4.8 Starke Reduktion Somatostatin-positiver mpIN in *Cxcr4*cKOs

Die GABAergen Neurone werden nach der Geburt auf charakteristische Weise in die Schichten des Hippocampus integriert, wobei unterschiedliche Subtypen eine auffallende Schichtspezifität aufweisen (Danglot et al. 2006). Wie dieser Prozess gesteuert wird, ist nicht geklärt. Verschiedene Interneuronenmarker können hierbei verschiedene Subtypen identifizieren, ohne dass es dabei zu Überlappungen zwischen diesen kommt. Anzuführen sind hier Somatostatin (SST), Parvalbumin (Pvalb) sowie Calretinin (Calret) (Xu et al. 2004). Daher wurde untersucht, ob der CXCL12/CXCR4-Signalweg an der Schichtzuordnung beteiligt ist. Diese Vermutung lag nahe, weil CXCL12 während der frühen postnatalen Periode in den glutamatergen Neuronen definierter Hippokampusschichten hochreguliert wird und CXCR4-positive GABAerge Neurone von diesem Signal geleitet werden können (Stumm et al. 2003). Es wurden dieselben Tiere betrachtet wie in 4.5 und 4.6. In diesen wurden SST (Abb. 11 B, B') und tdTomato (Abb. 11 C, C') mittels Doppelimmunfluoreszenz markiert. Dadurch wurde die Zugehörigkeit der Somatostatin-positiven Zellen (welche auch für tdTomato positiv waren) zu den mpIN gesichert (copositive Zellen; Abb. 11 D, D'). Es wurden drei Ebenen analysiert (rostral, intermediär, caudal) sowie drei Regionen (CA1 (Abb. 11 F), CA2+3 (Abb. 11 G), DG (Abb. 11 H)), wobei zwischen Kontrollmäusen ( $n=4$  Tiere) und *Nkx2.1*-Cre generierten *Cxcr4*cKOs ( $n=4$  Tiere) verglichen wurde.

In 4.5 ergab sich, dass die mpIN in *Cxcr4*cKOs reduziert waren. Diese Reduktion machte sich im besonderen Maße in der Somatostatin-Population bemerkbar, wie deutlich erkennbar ist, wenn man Abb. 11 A, B, C, D (Kontrollmäuse) mit A', B', C', D' (*Cxcr4*cKOs) vergleicht. Es wurde eine generelle Reduktion der hippokampalen Dichte SST/tdT-positiver Zellen in allen Ebenen gefunden. Die 2-Wege-ANOVA zeigte damit übereinstimmend einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen ( $F(1, 6) = 11,99$ ;  $p_{Genotyp} = 0,0134$ ; 2-Wege-ANOVA). Rostral kam es zu einer Reduktion um 7,55 SST<sup>+</sup>/tdT<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\cong -29,88\%$ ;  $p_{ros} = 0,0844$ ; Sidak's multiple comparisons test), intermediär um 9,94 SST<sup>+</sup>/tdT<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\cong 40,16\%$ ;  $p_{interm} = 0,0175$ ) und caudal um 10,94 SST<sup>+</sup>/tdT<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\cong 39,75\%$ ;  $p_{caud} = 0,0088$ ) (Abb. 11 E).

Diese Ergebnisse wurden nun genauer für Regionen und Zellschichten betrachtet (Abb. 11 F, G, H). Es wurden hierbei die absoluten Zellzahlen analysiert.

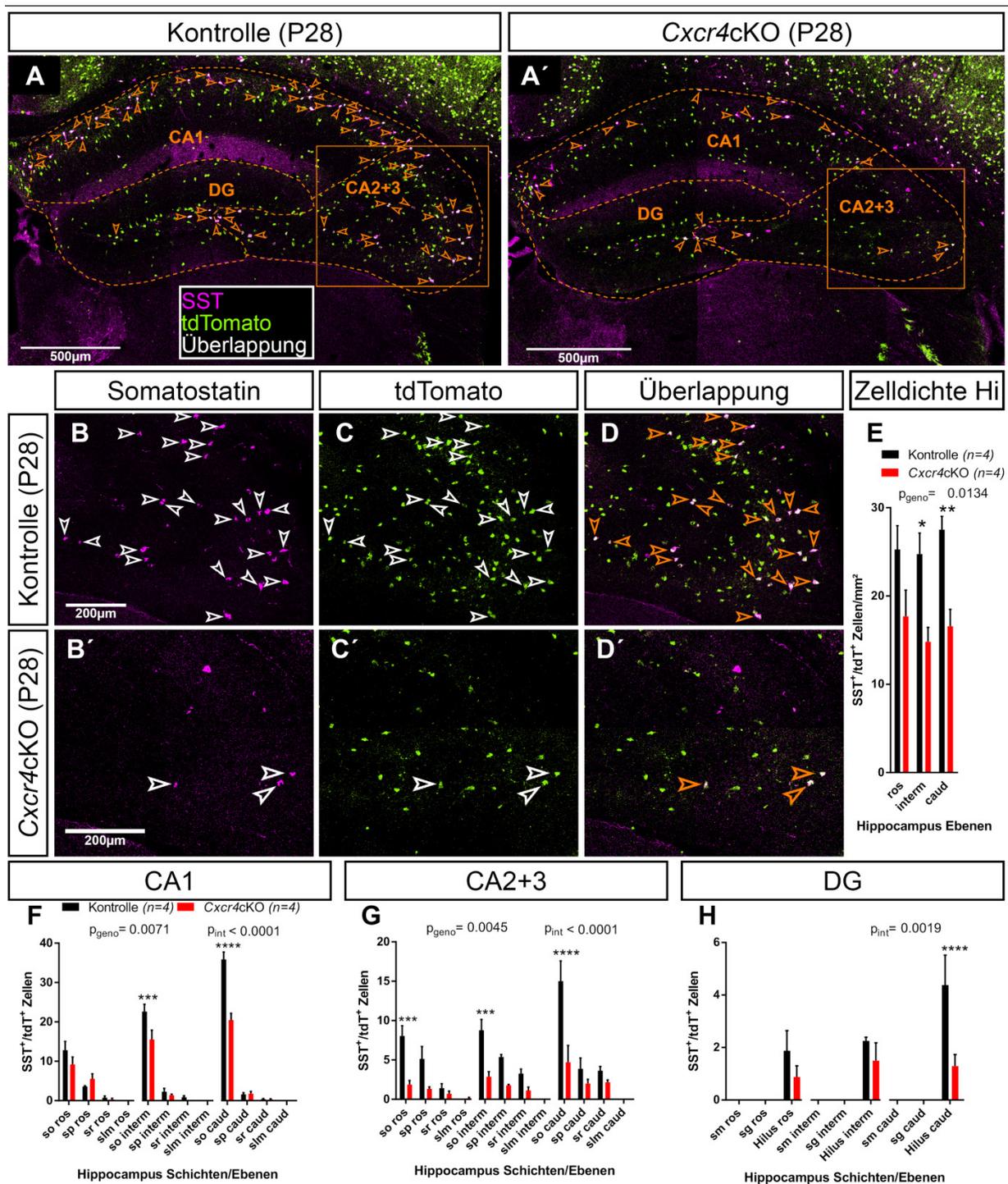
In CA1 und CA2+3 (bestehend aus *stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum radiatum*, und *stratum lacunosum moleculare*) lagen über die 2-Wege-ANOVA hoch signifikante Interaktionen zwischen Genotyp und Zellschichten/Ebenen vor ( $F(11, 66) = 10,45$ ,  $p_{Interaktion\ CA1} < 0,0001$ ;  $F(11, 66) = 6,786$ ,  $p_{Interaktion\ CA2+3} < 0,0001$ ; 2-Wege-ANOVA). Diese wurden

folglich unterschiedlich vom *Cxcr4cKO* beeinflusst. In den CA-Regionen rief der Knockout im *stratum oriens* die stärksten Reduktionen hervor, da dort die meisten Zellen der SST-Population versammelt waren. Daher lagen hier statistisch hoch signifikante Unterschiede zwischen den *Cxcr4cKO*s und den Kontrollen vor: In CA1 kam es intermediär im *stratum oriens* zu einer signifikanten Verminderung um 7,13 ( $\hat{=}$  -31,49%;  $p_{so\ interm}$  = 0,0001; Sidak's Post-hoc-Test) und caudal um 15,42 SST/tdT-positive Zellen ( $\hat{=}$  -42,97%;  $p_{so\ caud}$  < 0,0001); rostral wurden keine signifikanten Unterschiede identifiziert. In den anderen Schichten waren in CA1 kaum copositive Zellen vorhanden und somit auch keine Effekte feststellbar (Abb. 11 F).

In CA2+3 hingegen war eine Reduktion in fast allen Zellschichten zu verzeichnen (außer im *stratum lacunosum moleculare*, da hier keine SST/tdT-positiven Zellen vorlagen), die allerdings wieder nur im *stratum oriens* signifikant war. Rostral kam es hier zu einer Reduktion um 6,17 ( $\hat{=}$  -76,68%;  $p_{so\ ros}$  = 0,0002; Sidak's Post-hoc-Test) intermediär um 5,88 ( $\hat{=}$  -67,14%;  $p_{so\ interm}$  = 0,0005) und caudal um 10,29 SST/tdT-positive Zellen ( $\hat{=}$  -68,61%;  $p_{so\ caud}$  < 0,0001) (Abb. 11 G).

Im *Gyrus dentatus* wurde eine Reduktion SST/tdT-positiver Zellen im Hilus gefunden, da nur hier überhaupt SST-positive Zellen im *Gyrus dentatus* vorhanden waren. Es wurde auch hier eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Zellschichten/Ebenen identifiziert ( $F(8, 48) = 3,716$ ;  $p_{Interaktion\ DG} = 0,0019$ ; 2-Wege-ANOVA). Die Reduktion ist graphisch in allen Ebenen erkennbar (Abb. 11 H), war rostral und intermediär allerdings relativ schwach und nicht signifikant, wohingegen der Unterschied zwischen Kontrollen und konditionalen Knockouts in der caudalen Ebene mit einer Verminderung von 3,08 copositiven Zellen hohe Signifikanz aufwies ( $\hat{=}$  -70,48%;  $p_{Hilus\ caud}$  < 0,0001; Sidak's Post-hoc-Test).

Generell ist festzuhalten, dass es sich bei den SST-positiven Zellen um eine vom *Cxcr4cKO* äußerst stark betroffene Zellsubpopulation handelt, da die Zellen in einigen Schichten (z.B. CA2+3 *stratum oriens*) um mehr als die Hälfte reduziert waren. Dies lässt auf eine starke Abhängigkeit der Somatostatin-positiven mpIN von CXCR4 und dessen Einfluss auf die Zellmigration und -integration schließen.



**Abbildung 11 Einfluss des *Cxcr4cKO* auf *SST<sup>+</sup> mpIN* an P28.**

*mpIN* werden mittels *Nkx2.1-Cre* und dem Cre-Reporter *Rosa26<sup>LSL-tdTomato</sup>* identifiziert. Das Reporterprotein tdTomato wurde mit Kaninchen-anti-RFP und Somatostatin mit einem Rattenantikörper (rat-anti-SST) doppelimmunfluoreszent detektiert. **A, A'**, Repräsentative konfokale Aufnahmen der SST/tdT-Doppelimmunfluoreszenz in Kontrollmäusen und *Cxcr4cKO*s. **B, B', C, C', D, D'**, Hochvergrößerungen zeigen die orangenen Ausschnitte aus **A, A'** als Einzelkanäle und Überlagerung. SST/tdT-positive Zellen sind durch Pfeilspitzen markiert. **E**, Quantifizierung der Dichte *SST<sup>+</sup>/tdT<sup>+</sup>*-Zellen im gesamten Hippocampus. **F, G, H**, Quantifizierung der Zellzahlen (*SST<sup>+</sup>/tdT<sup>+</sup>*) in hippocampalen Subregionen bezogen auf Zellschichten und Ebenen. Daten sind Mittelwerte+SEM, Gruppen wurden mittels 2-Wege-ANOVA verglichen. *n*-Zahlen und *p*-Werte für Genotyp ( $p_{\text{geno}}$ ) und Interaktion zwischen Genotyp und Zellschichten/Ebenen ( $p_{\text{int}}$ ) sind angegeben. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  (Sidak's post-hoc Test).

Abkürzungen: ros, rostral; interm, intermediär; caud, caudal; SST, Somatostatin; so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum moleculare; sm, stratum moleculare; sg, stratum granulosum

#### 4.9 Die Reduktion Parvalbumin-positiver mpIN durch den *Cxcr4*cKO erreicht keine statistische Signifikanz

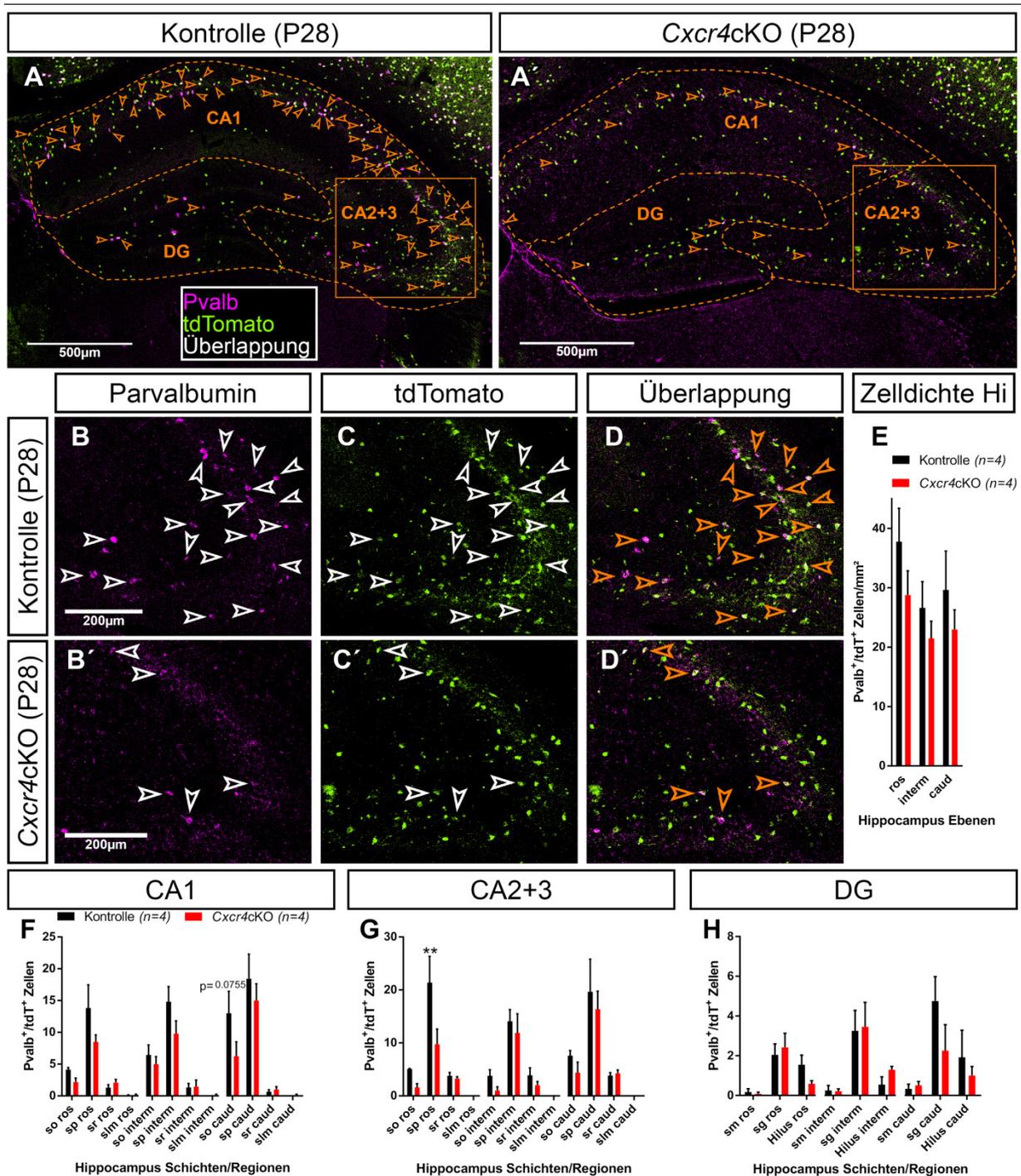
Nachdem in 4.8 gezeigt werden konnte, dass CXCR4 einen sehr starken Einfluss auf die Migration und Integration Somatostatin-positiver mpIN im Hippocampus nimmt, sollte das Gleiche nun auch für den Interneuronensubtypen-Marker Parvalbumin untersucht werden. Es ist bereits bekannt, dass weniger als 5% Parvalbumin-positiver Zellen an P13 und P21 im Cortex CXCR4-positiv sind (Stumm et al. 2007).

Die Analyse erfolgte in denselben Tieren wie für Somatostatin unter denselben Aspekten und Bedingungen.

Vergleicht man Kontrollen ( $n=4$  Tiere) mit *Cxcr4*cKOs ( $n=4$  Tiere), kann man zunächst eine Reduktion der Pvalb/tdT-positiven Zellen erkennen (Abb. 12 A, A'). Es sind im Graphen Verminderungen der Zelldichte in allen Ebenen sichtbar (Abb. 12 E). Jedoch wurden durch die 2-Wege-ANOVA keine Signifikanzen identifiziert. Man kann also festhalten, dass es generell betrachtet keine nachweisbare Reduktion der Dichte Pvalb/tdT-positiver Zellen in *Cxcr4*cKOs, bezogen auf den gesamten Hippocampus, gab.

Bei separater Betrachtung der hippokampalen Regionen waren leichte Defekte in CA1 und CA2+3 feststellbar (Abb. 12 F, G), während es im *Gyrus dentatus* (Abb. 12 H) praktisch keine Unterschiede gab. Für keine Region wurden Signifikanzen über die 2-Wege-ANOVA festgestellt. In CA1 waren die Zellzahlen besonders im *stratum oriens* und *stratum pyramidale* von der Reduktion betroffen, allerdings zeigte sich hier lediglich im *stratum oriens* caudal eine fast signifikante Reduktion von 6,75 Pvalb<sup>+</sup>/tdT<sup>+</sup> Zellen ( $\cong -51,92\%$ ;  $p=0,0755$ , Sidak's Post-hoc-Test) (Abb. 12 F). In CA2+3 traten ebenfalls die größten Reduktionen in diesen Zellschichten auf (was in Abb. 12 B/B', C/C' und D/D' dargestellt wird), wirklich deutlich wurden sie allerdings auch hier nur in einer Schicht und einer Ebene, nämlich im *stratum pyramidale* rostral mit einer signifikanten Verminderung der Pvalb/tdT-positiven Zellen um 11,63 ( $\cong -54,39\%$ ;  $p=0,003$ ; Sidak's Post-hoc-Test) (Abb. 12 G).

Abschließend kann man sagen, dass zwar Reduktionen in den Graphen (Abb. 12 E, F, G, H) zu sehen sind, jedoch praktisch keine Signifikanzen auftraten. Folglich ist eine Reduktion der Pvalb-positiven mpIN in *stratum oriens* und *pyramidale* zwar möglich, konnte hier jedoch nicht statistisch belegt werden. Dies ist kongruent mit den oben erwähnten für den Cortex gefundenen Ergebnissen.



**Abbildung 12 Einfluss des Cxcr4cKOs auf Pvalb-positive mpIN an P28.**

mpIN werden mittels *Nkx2.1*-Cre und dem Cre-Reporter *Rosa26<sup>LSL-tdTomato</sup>* identifiziert. Das Reporterprotein tdTomato wurde mit einem Kaninchen-anti-RFP und Parvalbumin mit einem Mausantikörper (mouse-anti-PV) doppelimmunfluoreszent detektiert. **A, A'**, Konfokale Aufnahmen der Pvalb/tdT-Immunfluoreszenz in Kontrollmäusen und *Cxcr4cKO*s. Es wurden Beispiele mit starken Auswirkungen gewählt. **B, B', C, C', D, D'**, Hochvergrößerungen zeigen die orangenen Ausschnitte aus **A, A'** als Einzelkanäle und Überlagerung. Pvalb/tdT-positive Zellen sind durch Pfeilspitzen markiert. **E**, Quantifizierung der Dichte Pvalb<sup>+</sup>/tdT<sup>+</sup>-Zellen im gesamten Hippocampus. **F, G, H**, Quantifizierung der Zellzahlen (SST<sup>+</sup>/tdT<sup>+</sup>) in hippokampalen Subregionen bezogen auf Zellschichten und Ebenen. Daten sind Mittelwerte+SEM, Gruppen wurden mittels 2-Wege-ANOVA verglichen. *n*-Zahlen sind angegeben. \*\**p*<0,01 (Sidak's post-hoc Test).

Abkürzungen: ros, rostral; interm, intermediär; caud, caudal; Pvalb, Parvalbumin; so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum moleculare; sm, stratum moleculare; sg, stratum granulosum

#### 4.10 Der *Cxcr4*cKO hat kaum Einfluss auf Calretinin-positive mpIN

Bei Calretinin handelt es sich um den dritten und letzten Interneuronensubtypen-Marker, der hier mittels Immunhistochemie betrachtet wurde. Es wurden ein Ratte-anti-RFP und ein Kaninchenantikörper gegen Calretinin (rabbit-anti-Calret) zur Darstellung von tdTomato und Calretinin verwendet.

Untersucht wurden dieselben Tiere wie schon für Somatostatin und Parvalbumin ( $n=4$  Tiere für Kontrollen und *Cxcr4*cKOs).

Es wurden hierbei nur äußerst wenige Calret/tdT-positive Zellen im ganzen Hippocampus, sowohl in Kontrollen als auch in *Cxcr4*cKOs, gefunden (Ergebnisse graphisch nicht dargestellt). Die Zellzahlen wurden gemittelt und beliefen sich rostral in Kontrollen auf  $9,14 \pm 1,88$  SEM, intermediär auf  $12,40 \pm 2,33$  SEM und caudal auf  $15,38 \pm 2,53$  SEM Calret<sup>+</sup>/tdT<sup>+</sup> Zellen, während in *Cxcr4*cKOs die Zählungen rostral  $4,37 \pm 0,60$  SEM, intermediär  $6,33 \pm 0,67$  SEM und caudal  $10,5 \pm 1,35$  SEM Calret<sup>+</sup>/tdT<sup>+</sup> Zellen betragen. Es wurden zwar auch hier leichte Reduktionen in den *Cxcr4*cKOs identifiziert, jedoch waren über die 2-Wege-ANOVA keine Signifikanzen feststellbar. Auch für die einzelnen Regionen und Schichten wurden keine Signifikanzen nachgewiesen, da für einzelne Schichten teilweise kaum copositive Zellen vorhanden waren. So wurden beispielsweise im *Gyrus dentatus* nur in vereinzelt Tieren überhaupt Calret<sup>+</sup>/tdT<sup>+</sup> Zellen gefunden.

Ein Großteil der Calret-positiven Zellen zählt nicht zu den mpIN, weshalb der in diesem Projekt mit der *Nkx2.1*-Cre erzeugte Knockout diese Zellen nicht betraf (Marin 2013, Volk und Lewis 2014, Xu et al. 2004). Folglich waren in den untersuchten Tieren auch nur wenige Zellen copositiv, woraus auch die relativ geringen Veränderungen durch den *Cxcr4*cKO hervorgingen.

#### 4.11 Der *Cxcr4cKO* beeinflusst *Ndnf*-positive Neurone schwach, während er auf *Akr1c18*-positive Neurone keinen Einfluss nimmt

In 4.8, 4.9 und 4.10 wurden mittels Doppelimmunhistochemie die Interneuronensubtypen-Marker Somatostatin, Parvalbumin und Calretinin analysiert. Nun sollte das Gleiche durch [<sup>35</sup>S]-*In-situ*-Hybridisierung für die mRNA-Sonden *Ndnf* (neuron-derived neutrophic factor, Abb. 13 A, A') und *Akr1c18* (aldo-keto reductase family 1 member C18, Abb. 13 B, B') realisiert werden.

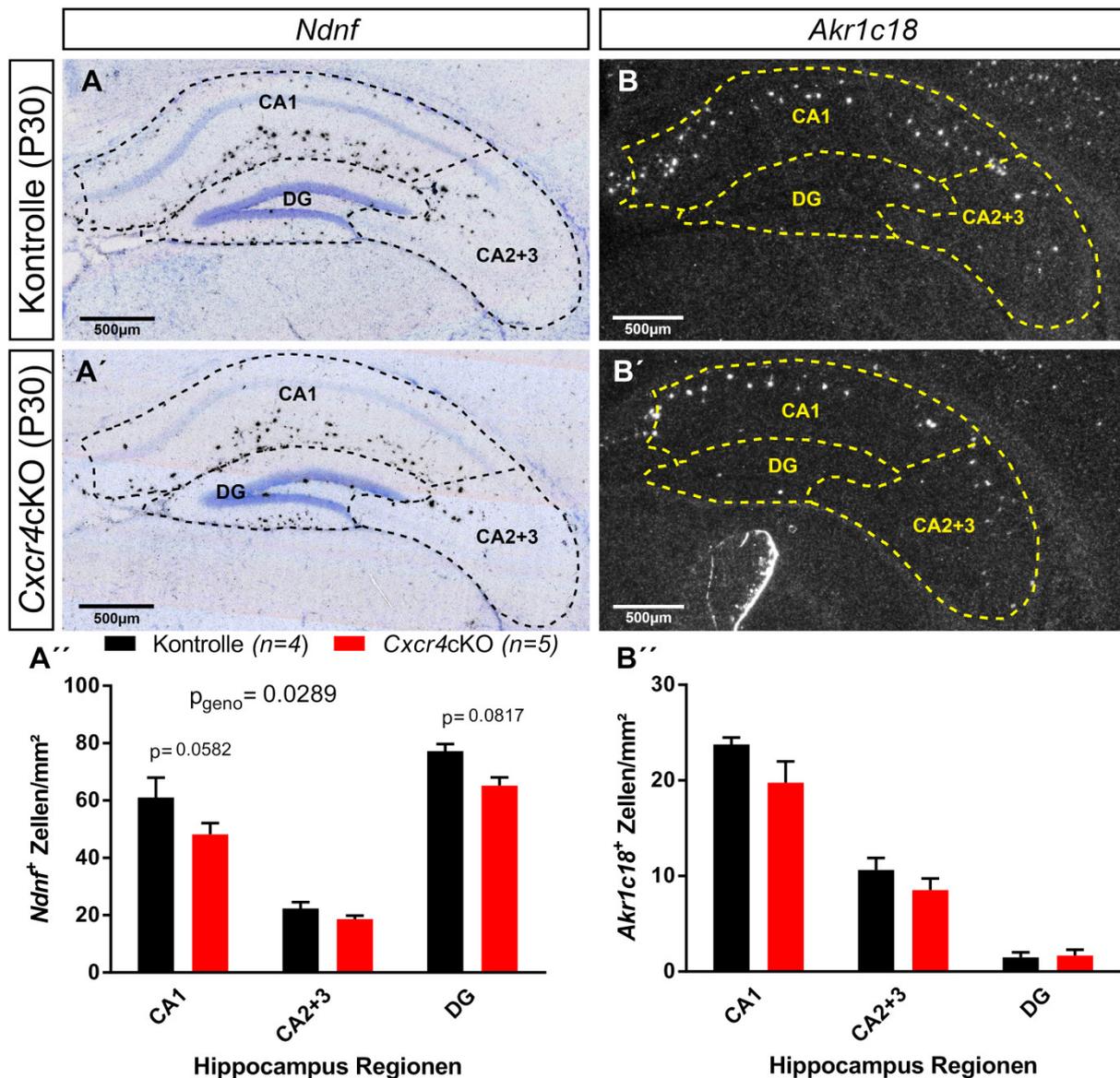
Durch Einzel-Zell-RNA-Sequenzierung wurden die Transkriptome von über 1600 Einzelzellen identifiziert. Anhand dessen wurde eine Taxonomie gebildet, welche die Zellen in Cluster und Untergruppen anhand von deren Genprofil einteilte. *Ndnf* und *Akr1c18* entstammen dieser Taxonomie: Bei *Ndnf*-positiven Zellen handelt es sich, ähnlich wie bei Parvalbumin, Somatostatin und Calretinin, um eine größere Untergruppe inhibitorischer Neurone. *Akr1c18*-positive Zellen hingegen stellen eine Untergruppe dar, welche zur Parvalbuminpopulation gehört (Tasic et al. 2016). Durch die Erstellung dieser Taxonomie war es möglich, den Einfluss des *Cxcr4cKO*s auf weitere Zellpopulationen bzw. -untergruppen zu untersuchen.

Die Tiere wurden an P30 in einer caudalen Schnittebene für beide Marker analysiert. Hierbei wurde zwischen Kontrollen ( $n=4$  Tiere) und *Cxcr4cKO*s ( $n=5$  Tiere) verglichen.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der hippokampalen Dichte *Ndnf*-positiver Zellen zwischen den Genotypen ( $F(1, 7) = 7,509$ ;  $p_{\text{Genotyp}} = 0,0289$ ; 2-Wege-ANOVA). In CA1 kam es zu einer Reduktion um 12,81 Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\cong -20,99\%$ ), im *Gyrus dentatus* um 11,99 Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\cong -15,53\%$ ), während für CA2+3 keine deutliche Reduktion feststellbar war. Der Post-hoc-Test nach Sidak ergab knapp nicht signifikante  $p$ -Werte für CA1 ( $p=0,0582$ ) und *Gyrus dentatus* ( $p=0,0817$ ) (Abb. 13 A'').

Für *Akr1c18* wurden im Gegensatz zu *Ndnf* über die 2-Wege-ANOVA keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen identifiziert ( $F(7, 14) = 1,053$ ;  $p_{\text{Genotyp}} = 0,1171$ ). Im Graphen sind dennoch leichte Reduktionen der Zelldichte in CA1 und CA2+3 sichtbar, diese waren statistisch jedoch nicht belegbar (Abb. 13 B'').

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die Zelldichte der *Ndnf*-Population durch den *Cxcr4cKO* reduziert ist, während die Dichte *Akr1c18*-positiver Zellen unverändert bleibt.



**Abbildung 13** Einfluss des *Cxcr4cKO*s auf *Ndnf*- sowie *Akr1c18*-positive Zellen an P30. *Ndnf* (A, A') und *Akr1c18* (B, B') wurden durch [<sup>35</sup>S]-*In-situ*-Hybridisierung als Marker für Subpopulationen inhibitorischer Neurone in Kontrollmäusen und *Cxcr4cKO*s an P30 markiert. Die *Ndnf*-Markierung wurde im Hellfeld aufgenommen (Signale erscheinen schwarz, Nissl-Gegenfärbung blau), die *Akr1c18*-Markierung im Dunkelfeld (Signale erscheinen weiß). A'', B'', Quantifizierung der Dichte *Ndnf*-positiver (A'') und *Akr1c18*-positiver (B'') Zellen in den hippocampalen Subregionen. Daten sind Mittelwerte+SEM, Gruppen wurden mittels 2-Wege-ANOVA verglichen. *n*-Zahlen und *p*-Werte für den Vergleich der Genotypen ( $p_{\text{Geno}}$ ) sind angegeben. Post-hoc-Test nach Sidak.

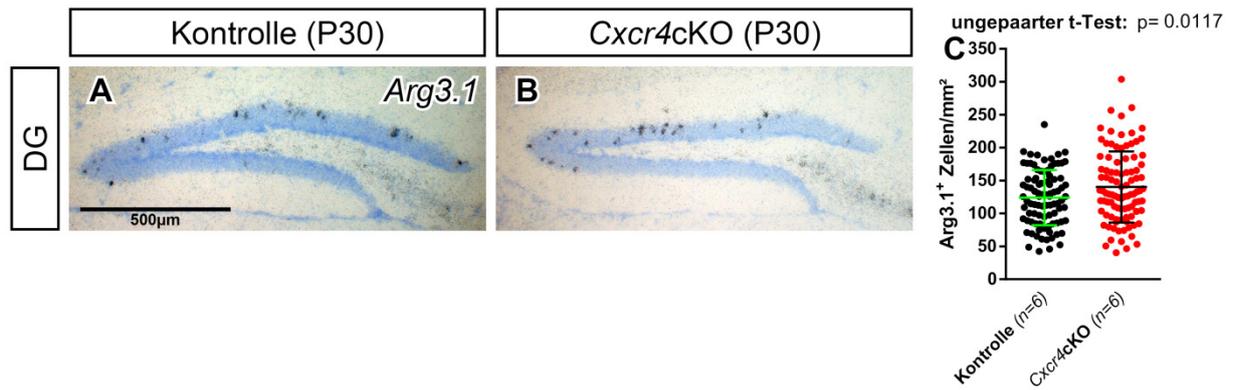
#### 4.12 *Arg3.1*-positive Zellen des *stratum granulosum* im *Gyrus dentatus* sind in *Cxcr4*cKOs leicht erhöht

Eine veränderte Expression von CXCL12, CXCR4 oder CXCR7 wird häufig mit neuropsychiatrischen Erkrankungen in Verbindung gebracht, die mit kognitiven Beeinträchtigungen einhergehen, wie z.B. Schizophrenie (Meechan et al. 2012, Wu et al. 2016). Daher sollte untersucht werden, ob es bei *Cxcr4*-Deletion zu einer veränderten neuronalen Aktivität im Hippocampus kommt.

Mittels [<sup>35</sup>S]-*In-situ*-Hybridisierung wurde die *Arg3.1*-mRNA detektiert. Diese wird zum Zeitpunkt der Untersuchung (also des Todes) in aktivierten Neuronen exprimiert (Gusev et al. 2005, Guzowski et al. 1999). Es wurden *Nkx2.1*-Cre vermittelte *Cxcr4*cKOs ( $n=6$  Tiere; Abb. 14 B) mit Kontrollmäusen ( $n=6$  Tiere; Abb. 14 A) verglichen, wobei jedoch nur der *Gyrus dentatus* bzw. dessen *stratum granulosum* untersucht werden konnte, da die Expression von *Arg3.1* in allen anderen Gebieten des Hippocampus zu stark und diffus war, als dass eindeutig Zellen quantifiziert werden konnten. Die Untersuchung wurde in zehn verschiedenen Schnittebenen durchgeführt. Anschließend wurden alle Werte auf die Zelldichte normalisiert und unabhängig von der Ebene gegeneinander aufgetragen (Abb. 14 C).

Es zeigte sich, dass aus der Deletion des *Cxcr4*-Gens eine Erhöhung der *Arg3.1*<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> resultiert. Für die Kontrollen wurde ein Mittelwert  $\pm$  SEM von  $124,0 \pm 4,412$  *Arg3.1*<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> festgestellt, während in den *Cxcr4*cKOs ein Mittelwert  $\pm$  SEM von  $140,3 \pm 5,521$  *Arg3.1*<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> gefunden wurde. Dies entspricht einer durchschnittlichen Erhöhung um 11,61%. Der Unterschied zwischen Kontrollen und konditionalen Knockouts war jedoch nur schwach signifikant ( $16,27 \pm 7,114$ ;  $t(185) = 2,287$ ;  $p = 0,0117$ , t-Test).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass der Verlust von CXCR4 zu einer leichten Erhöhung der *Arg3.1*<sup>+</sup> Zellen im *Gyrus dentatus* führte, was folglich auf eine verstärkte neuronale Aktivität in dieser Hippocampusregion hindeutet.



**Abbildung 14** Einfluss des Verlustes von CXCR4 auf die neuronale Aktivität im stratum granulosum.

*Arg3.1* wurde durch [<sup>35</sup>S]-*In-situ*-Hybridisierung als Marker für die zum Zeitpunkt des Todes aktiven Neurone in Kontrollmäusen (A) und *Cxcr4cKO*s (B) an P30 markiert. Es ist das stratum granulosum des Gyrus dentatus gezeigt. *Arg3.1*-Signale erscheinen schwarz und Nissl-Gegenfärbung blau. C, Quantifizierung der Dichte *Arg3.1*-positiver Zellen im stratum granulosum des Gyrus dentatus. Daten sind Einzelwerte mit Darstellung der Mittelwerte±SEM. Die Einzelwerte wurden über einen ungepaarten t-Test verglichen. *n*-Zahlen und *p*-Wert des Tests sind angegeben.

## 5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die Bedeutung des Chemokinrezeptors CXCR4 für die Positionierung GABAerger Neurone im Hippocampus zu erlangen. Es gelang, die Expression des Rezeptors an verschiedenen Entwicklungszeitpunkten darzustellen und zu zeigen, dass CXCR4 Einfluss auf die Migration von mpIN zum Hippocampus und deren Verteilung innerhalb des Hippocampus nimmt.

### 5.1 Expression von CXCR4 an bestimmten Entwicklungszeitpunkten des Hippocampus und Abstammungsverfolgung CXCR4-exprimierender GABAerger Vorläufer

Der Chemokinrezeptor CXCR4 wird während der frühen Embryonalperiode in den meisten GABAergen Vorläufern des Cortex exprimiert (Sanchez-Alcaniz et al. 2011, Stumm et al. 2003, Stumm et al. 2007, Wang et al. 2011). Er regelt hier zusammen mit seinem Liganden CXCL12 die Migration und Integration GABAerger Neurone. Diese stammen aus dem Subpallium und werden unter Beteiligung der CXCL12/CXCR4-Signalgebung in verschiedene kortikale Regionen und Zellschichten integriert (Lewellis und Knaut 2012, Li et al. 2008, Lopez-Bendito et al. 2008, Stumm et al. 2003, Tiveron und Cremer 2008).

Um zu klären, ob CXCR4 ebenfalls an der Besiedlung des Hippocampus mit GABAergen Neuronen beteiligt ist, wurde in dieser Arbeit nun erstmals detailliert die Expressionsverteilung von CXCR4 in GABAergen Interneuronen an unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten für den Hippocampus analysiert. Dabei konzentriert sich die Arbeit auf die Interneuronen-Population, die dem medialen Ganglienhügel und der präoptischen Region entstammt. Andere Ursprungsgebiete GABAerger Neurone (z.B. der caudale Ganglienhügel) konnten mit der *Nkx2.1*-Cre nicht betrachtet werden (Xu et al. 2008).

In der späteren Embryonalphase (E16) findet sich ein hoher Anteil CXCR4-positiver mpIN-Vorläufer im Hippocampus. Ausgehend hiervon, ist an dieser Stelle eine Bedeutung von CXCR4 und CXCL12 für die Migration von mpIN in den Hippocampus (ähnlich wie im Cortex) zu vermuten. Der Zeitpunkt hoher CXCR4-Expression passt außerdem zum zeitlichen Ablauf tangentialer Migrationsströme: GABAerge Neurone erreichen die hippokampale Anlage an E15 (Manent et al. 2006). CXCL12 wird zu diesem Zeitpunkt in den dem Hippocampus aufliegenden Meningen und in der Nähe der hippokampalen Fissur stark exprimiert (Lu et al. 2002), was eine Interaktion mit den CXCR4-positiven mpIN-Vorläufern ermöglicht.

Zum Ende der tangentialen Migration (P0) kommt es zu einer Abnahme von CXCR4 auf mpIN-Vorläufern. Der Rezeptor wird herunter reguliert und verbleibt anschließend zunächst für mehrere Tage auf einem gleichbleibenden Plateau. In diesem Zeitraum nimmt CXCR4 wahrscheinlich noch Einfluss auf die Integration der mpIN-Vorläufer in verschiedene Zellschichten. Anschließend wird die CXCR4-Expression weiter vermindert, bis der Rezeptor dann zehn Tage nach der Geburt auf mpIN-Vorläufern kaum noch nachweisbar ist.

Vergleicht man die CXCR4-Expression für Hippocampus und Cortex ist festzustellen, dass es auch im Cortex während der ersten drei postnatalen Wochen zur Abnahme der CXCR4-Expression in kortikalen Interneuronen kommt. Es zeigt sich bei Betrachtung publizierter Daten jedoch auch, dass die Abnahme der CXCR4-Expression im Cortex und im Hippocampus nicht die Ausmaße annahm, wie sie in dieser Arbeit identifiziert wurde (Stumm et al. 2003). Der Grund dafür könnte in Speziesunterschieden (Stumm et al. 2003: Ratte; hier: Maus) oder in der hier vorgenommenen ausschließlichen Betrachtung von mpIN-Vorläufern liegen. Es wurden also nur die aus dem medialen Ganglienhügel und der präoptischen Region stammenden Interneurone auf ihre CXCR4-Expression untersucht.

Bei Analyse der mpIN-Vorläufer im an den Hippocampus angrenzenden Cortex finden sich in der Embryonalphase an E16 deutlich weniger CXCR4-exprimierende mpIN-Vorläufer als zum selben Zeitpunkt im Hippocampus. Dies könnte daran liegen, dass sich der Cortex auf dem Migrationsweg der mpIN vor dem Hippocampus befindet und einwandernde Zellen den Cortex somit früher erreichen als den Hippocampus. Daher kann die Entwicklung im Cortex bereits weiter fortschreiten, während der Migrationsprozess von für den Hippocampus bestimmten Zellen immer noch andauert. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Herunterregulierung von CXCR4 im Cortex bereits an E16, welche für den Hippocampus erst an P0 festgestellt wurde. An früheren Entwicklungszeitpunkten wäre die CXCR4-Expression in mpIN-Vorläufern kortikal vermutlich ähnlich wie im Hippocampus an E16.

Die Hypothese, dass CXCR4 in für den Cortex bestimmten mpIN-Vorläufern früher herunterreguliert wird als in mpIN-Vorläufern des Hippocampus, ließe sich z.B. mit dem in dieser Arbeit vorgestellten *Cxcr4<sup>CreER</sup>-Lineage Trace* überprüfen.

Hierbei sollte erfasst werden, welcher Anteil bestimmter Interneuronen-Subpopulationen von CXCR4-exprimierenden Zellen abstammt. Um zu erkennen, wann welche Zellen CXCR4 exprimierten, wurde eine Tamoxifen-induzierbare Cre eingesetzt. Die Zellen können somit zeitlich kontrolliert und dauerhaft als Nachkommen CXCR4-exprimierender Zellen markiert werden.

In dieser Arbeit wurde ein Pilotexperiment mit dieser Cre durchgeführt: So kam es z.B. zu einer Abnahme der markierten Nachkommen beim Vergleich von Tamoxifengabe an P2 und P7 für Calretinin- und Somatostatin-positive Interneurone (Analyse an P26). Dies ist kongruent mit den vorherigen Ergebnissen (mittels der *Nkx2.1*-Cre wurde ebenfalls eine postnatal fortschreitende Reduktion der CXCR4-Expression identifiziert). Im Gegensatz hierzu stehen jedoch die Ergebnisse bei wiederholter Tamoxifengabe an mehreren Tagen (von P6 bis P10): hier wurde ein gesteigerter Anteil der von CXCR4-positiven Vorläufern abstammenden Interneurone im Vergleich zu den Einzelmarkierungen gefunden.

Da es sich, wie oben erwähnt, um ein Pilotexperiment handelt, sind die Ergebnisse jedoch zu wenig quantitativ, um sichere Aussagen zu treffen. Es ist gut möglich, dass durch die längere Tamoxifengabe eine effektivere Markierung der Zellen erreicht wurde. Die Pilotexperimente zeigen jedoch zweifelsfrei, dass mittels der *Cxcr4*-CreER Interneurone, welche von CXCR4-positiven Vorläufern abstammen, dauerhaft markiert werden können. Damit kann geklärt werden, zu welchen Entwicklungszeitpunkten welche Interneuronen-Subpopulationen das *Cxcr4*-Gen in welchem Ausmaß exprimieren und ob es Unterschiede zwischen Cortex und Hippocampus gibt.

Solche Untersuchungen waren bisher nicht möglich, da einige der zur Identifizierung der Subpopulationen herangezogenen Marker (z.B. Parvalbumin) an früheren Entwicklungszeitpunkten noch nicht exprimiert werden (Stumm et al. 2007). Auch wird CXCR4 (wie in dieser Arbeit nachgewiesen) im Hippocampus postnatal herunter reguliert. Dies macht eine Betrachtung im adulten Tier mit bisherigen Techniken nicht möglich. Durch den *Lineage Trace* könnte diese Problematik jedoch umgangen werden.

## **5.2 Bedeutung des CXCR4-Rezeptors für Migration und Integration hippokampaler Interneurone aus medialem Ganglienhügel und präoptischer Region**

### 5.2.1 Betrachtung des *Cxcr4*cKOs zum Ende der tangentialen Migration (P0)

GABAerge Neurone aus Neocortex und Hippocampus haben einen gemeinsamen ontogenetischen Ursprung im Subpallium (Danglot et al. 2006). CXCL12 und CXCR4 sind im Cortex zu einem Großteil für die Migration und Integration dieser verantwortlich (Marin 2013, Stumm et al. 2003, Stumm et al. 2007, Tiveron et al. 2006, Wang et al. 2011). Deshalb wurde hier die Hypothese aufgestellt, dass gleiches auch in ähnlicher Form für den Hippocampus gilt. Durch den konditionalen *Cxcr4*-Knockout wurde der Einfluss des Rezeptors auf GABAerge Neurone im sich entwickelnden Hippocampus ausgeschaltet und über die entstehenden Defekte untersucht.

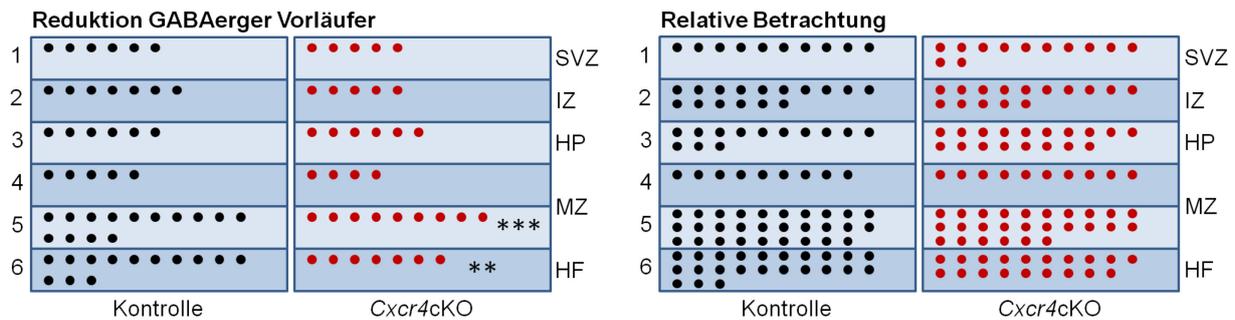
Zunächst wurden Knockout- und Kontrollmäuse am Ende der tangentialen Migrationsperiode untersucht. Diese ist um den Zeitpunkt der Geburt weitestgehend abgeschlossen (Danglot et al. 2006). Hier ergab sich eine Reduktion der hippokampalen Dichte GABAerger Vorläufer. Die stärkste Reduktion der Zelldichte war im *Gyrus dentatus* zu verzeichnen. Auch in CA2+3 waren leichtere Reduktionen erkennbar, während in CA1 keine deutlichen Defekte identifiziert wurden. Es kam somit zu einer prozentualen Erhöhung in CA1 während in den anderen Regionen Reduktionen vorlagen.

Dies weist auf eine regionale Fehlverteilung hin. Es ist denkbar, dass sich die GABAergen Vorläufer, die normalerweise für CA2+3 und den *Gyrus dentatus* bestimmt waren, noch in der CA1-Region befanden. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass sich die Zellreduktion entlang der tangentialen Migrationsroute verstärkte. CA1 liegt im Hippocampus auf dieser Route an erster Stelle. Somit würden GABAerge Vorläufer, die nur einen Teil der für sie vorgesehenen Route durchlaufen und in CA1 (bzw. evtl. auch noch weiter davor liegenden Regionen des Cortex) „liegen bleiben“, zu einer Minderversorgung der nachfolgenden Regionen (CA2+3 und *Gyrus dentatus*) führen. Dies erklärt auch die prozentuale Erhöhung GABAerger Vorläufer in CA1.

Ein weiteres Argument, das für eine Minderversorgung von CA2+3 und *Gyrus dentatus* spricht, ist, dass bei einem defekten CXCL12/ CXCR4/ CXCR7-System GABAerge Vorläufer im Cortex verfrüht von der tangentialen zur radialen Migration übergehen (Abe et al. 2014, Stumm et al. 2003, Wang et al. 2011). Diese Zellen würden ihre Migration zum Hippocampus somit abbrechen und sich in eine andere Region integrieren.

Zellen, welche für den *Gyrus dentatus* und CA2+3 vorgesehen waren, befinden sich in *Cxcr4*CKOs somit möglicherweise in CA1 bzw. noch davor liegenden Regionen (auf der Migrationsroute der GABAergen Vorläufer). Aufgrund der starken Expression von CXCR4 während der tangentialen Migration GABAerger Vorläufer (in dieser Arbeit nachgewiesen für E16-P0), lässt sich das Fehlen des Rezeptors in den konditionalen Knockout-Mäusen dieser Fehlverteilung und Dezimierung von GABAergen Vorläufern sicher zuordnen.

Weiterführend wurden die einzelnen Zellschichten in CA1 und *Gyrus dentatus* am Tag der Geburt betrachtet. In einzelnen Schichten wurden Reduktionen der Zelldichte in CA1 identifiziert. Diese traten vorrangig im Gebiet der Marginalzone/hippokampalen Fissur und der Intermediärzone auf. Bei relativer Betrachtung kam es zusätzlich im Bereich der hippokampalen Platte prozentual zu einer tendenziellen Zunahme der GABAergen Vorläufer (hier jedoch keine statistische Signifikanz; siehe Abb. 15 sowie Abschnitt 4.4).



**Abbildung 15** Einfluss des *Cxcr4cKO*s auf die Zellschichten der CA1-Region an P0 (Schematische Darstellung).

Gezeigt werden die für die Experimente verwendete Schichteinteilung (1-6) sowie die anatomischen Schichtbezeichnungen

**Links:** Reduktionen GABAerger Vorläufer treten besonders in den Schichten 5 und 6 auf.

**Rechts:** Für die relative Betrachtung werden alle Zellen mit 100% gleichgesetzt und den Zellschichten zugeteilt. Eine Zelle  $\triangleq$  1%. Bei relativer Betrachtung zeigen sich sowohl Reduktionen als auch Zunahmen der Zellen unter *Cxcr4cKO* in verschiedenen Schichten. Es wird hierfür jedoch keine Signifikanz erreicht, sodass eine interlaminäre Fehlverteilung nicht bewiesen werden kann.

\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (Sidak's Post-hoc-Test)

Abkürzungen: SVZ, Subventrikulärzone; IZ, Intermediärzone; HP, Hippokampale Platte; MZ, Marginalzone; HF, Hippokampale Fissur

Bei Untersuchung der gesamten CA1-Region wurden im Gegensatz zur Betrachtung der Zellschichten keine Defekte identifiziert. Dieser Sachverhalt lässt sich durch verschiedene Überlegungen erklären:

Bei Analyse der Zellschichten wurde nicht die gesamte Region untersucht, sondern Ausschnitte aus CA1 betrachtet. Diese wurden weit caudal gewählt, um möglichst gerade, parallele Zellschichten für die Auszählung zu erhalten (für CA1 caudal wurden auch bei Gesamtbetrachtung der Region geringfügige Unterschiede gefunden). Weiterhin traten bei Betrachtung der einzelnen Schichten Defekte hervor, welche bei Gesamtbetrachtung der Region durch unbeeinträchtigte Zellschichten verborgen wurden. Auch wurden die absoluten Werte mit den betrachteten Ausschnittsflächen der Zellschichten verrechnet, um die Zelldichte zu erhalten, was – da die Zellen innerhalb der Regionen aber nicht gleichverteilt sind – ebenfalls zu Unterschieden zwischen Gesamtbetrachtung der Regionen und den Zellschichten am Ende der Tangentialmigration geführt haben könnte.

Im *Gyrus dentatus* wurde dann (kongruent mit den Ergebnissen bei Betrachtung der Gesamtregion) eine generelle Reduktion über alle Schichten identifiziert. Eine Verlagerung der GABAergen Vorläufer innerhalb der Schichten des *Gyrus dentatus* (hin zur dentalen Marginalzone) wurde zwar im 2-Wege-ANOVA (signifikante Interaktion), aber nicht im Post-hoc-Test als signifikant identifiziert. Eine Verschiebung zwischen den Zellschichten wird jedoch angedeutet.

Möglicherweise ist besonders der meningennahe Migrationsstrom vom *Cxcr4*cKO betroffen, da besonders die Zellschichten nahe der hippokampalen Fissur in CA1 Reduktionen aufwiesen. Hierzu würde auch passen, dass CXCL12 als Ligand von CXCR4 an P0 und vorherigen Embryonaltagen besonders im Bereich der hippokampalen Fissur und den umliegenden Meningen exprimiert wird (Lu et al. 2002), aufgrund des Rezeptorknockouts die chemotaktische Wirkung jedoch ausbleibt.

Vergleicht man nun letztlich die in dieser Arbeit für den Hippocampus am Ende der tangentialen Migration erhaltenen Ergebnisse mit bereits für den Cortex vorliegenden Daten während der Embryonalperiode, so kann man gewisse Parallelen erkennen. So lagern sich bei Verlust eines Teils des CXCL12/ CXCR4/ CXCR7-Systems Interneurone ektop in der Mitte des Cortex ab, während sie in den anderen Zellschichten vermindert sind (Abe et al. 2014, Sanchez-Alcaniz et al. 2011, Stumm et al. 2003, Wang et al. 2011). Wie oben beschrieben, konnten Tendenzen zur Verlagerung der Zellen in einzelne Schichten auch für den Hippocampus an P0 in CA1 und *Gyrus dentatus* beobachtet werden.

### 5.2.2 Betrachtung des *Cxcr4*cKOs im adulten Hippocampus (P28)

Die Betrachtung von adulten Tieren (an P28) war der nächste wichtige Schritt, weil sich – im Gegensatz zum Ende der tangentialen Migration an P0 – hippokampale Interneurone nun durch radiale Migration in ihre endgültigen Schichten integriert haben. Bislang ist nicht geklärt, ob CXCR4 hieran beteiligt ist. Da es während der postnatalen Entwicklung zu einem Anstieg von CXCL12 in CA3 und der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* kommt (Schonemeier et al. 2008), ist eine Bedeutung der CXCL12/CXCR4-Signalgebung für die radiale Integration von GABAergen Neuronen in den Hippocampus denkbar.

Für den adulten Hippocampus wurde in dieser Arbeit nach konditionalem *Cxcr4*-Knockout eine allgemeine mpIN-Reduktion in den verschiedenen Ebenen identifiziert (besonders intermediär und caudal). Regional betrachtet waren CA2+3 am stärksten beeinträchtigt: Hier zeigte sich eine deutliche Reduktion der mpIN. Auch im *Gyrus dentatus* zeigte sich eine Reduktion, während CA1 praktisch unbeeinflusst blieb.

Betrachtet man diese Ergebnisse nun für die einzelnen Zellschichten, so fällt auf, dass der *Cxcr4*cKO vor allem *stratum oriens* und *stratum pyramidale* von CA2+3 beeinträchtigte (mpIN-Reduktionen um bis zu 50%; siehe Abb. 16 sowie Abschnitt 4.6).



Neocortex lagern sich GABAerge Neurone, wie bereits erwähnt, bei Fehlen von CXCR4 ektop in tieferen Zellschichten bzw. in der Mitte ab (Abe et al. 2014, Stumm et al. 2003, Wang et al. 2011).

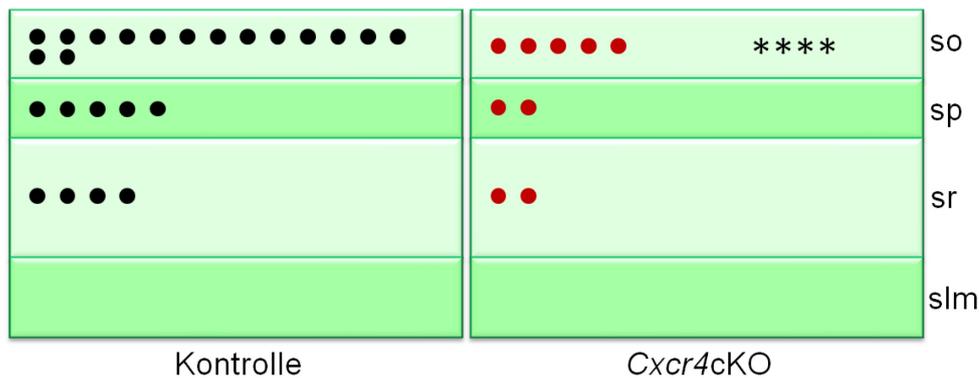
Im adulten Hippocampus liegen Ähnlichkeiten zu den Ergebnissen im Cortex vor, da auch hier Reduktionen von mpIN identifiziert wurden und es bei relativer Betrachtung zur Erhöhung von mpIN in den tieferen Schichten des Hippocampus kommt. Die Stärke der Umverteilungen ist im adulten Hippocampus bei Vergleich mit dem embryonalen Neocortex gering.

#### *5.2.2.1 Die Somatostatin-Interneuronen-Subpopulation weist schwere Defekte bei Fehlen von CXCR4 auf*

Hippocampale GABAerge Neurone können anhand ihrer neurochemischen/molekularen Eigenschaften in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden (Freund und Buzsaki 1996, Pelkey et al. 2017). Von den in dieser Arbeit analysierten GABAergen Neuronen war die Population Somatostatin-positiver mpIN vom konditionalen *Cxcr4*-Knockout am stärksten betroffen.

Es wurde eine generelle Reduktion der Dichte hippocampaler Somatostatin-positiver mpIN in allen Ebenen identifiziert. In den CA-Regionen traten massive Reduktionen im *stratum oriens* auf (teilweise Dezimierung der SST-positiven mpIN um mehr als die Hälfte). In CA2+3 waren auch die anderen Zellschichten von der Reduktion betroffen (Abb. 17). Bei der Analyse der gesamten mpIN-Population waren, wie eben beschrieben, hauptsächlich *stratum oriens* und *pyramidale* vom *Cxcr4*cKO betroffen. In CA2+3 wurden auch weitere Schichten beeinflusst. Folglich ist es wahrscheinlich, dass ein Großteil der mpIN-Dezimierung auf die Somatostatin-Subpopulation zurückgeht.

Im *Gyrus dentatus* zeigte sich teilweise ebenfalls eine Reduktion im Hilus (hier aufgrund geringer Anzahl Somatostatin-positiver mpIN jedoch auch größere Fehlermöglichkeit).



**Abbildung 17** Starke Reduktion der Somatostatin-positiven mpIN in CA2+3 an P28 durch den *Cxcr4cKO* (Schematische Darstellung).

Die Zellschichten von CA2+3 sind als Rechtecke im Vergleich von Kontrollmäusen und *Cxcr4cKO*s dargestellt. Die unterschiedlichen Höhen der Rechtecke sind am anatomischen Korrelat orientiert.

\*\*\*\* $p < 0,0001$  (Sidak's Post-hoc-Test)

Abkürzungen: so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum moleculare

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass es sich bei den Somatostatin-positiven mpIN um eine vom *Cxcr4cKO* äußerst stark betroffene Zellsubpopulation handelt. Somatostatin-positive Interneurone stammen hauptsächlich aus dem medialen Ganglienhügel und der präoptischen Region (Marin 2013, Xu et al. 2004). Somit konnte der in dieser Arbeit durchgeführte konditionale Knockout seine volle Wirkung entfalten, da die *Nkx2.1-Cre* ebenfalls in diesen Ursprungsgebieten aktiv ist (Xu et al. 2008). Dies beweist eine starke Abhängigkeit Somatostatin-positiver Interneurone von CXCR4 und dessen Wirkung auf Zellmigration und -integration.

Im Neocortex der Ratte wurden Somatostatin-positive Interneurone bereits als postnatale Träger des CXCR4-Rezeptors identifiziert (Stumm et al. 2007). Bei Analysen mit Tamoxifen-induzierter *Dlx1/2-Cre* und daraus folgender Entfernung des Rezeptors an E15.75 wurden jedoch keine Reduktionen im Cortex beobachtet (Tanaka et al. 2010). Dies würde zunächst der Annahme widersprechen, dass CXCR4 postnatal Einfluss auf die Somatostatin-Population im Cortex nimmt, jedoch wurden in derselben Publikation interlaminäre Fehlverteilungen im Cortex identifiziert. In Verbindung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit für den Hippocampus (mit konstitutiv aktiver *Nkx2.1-Cre*) lässt sich vermuten, dass die CXCR4-Expression vor einem bestimmten embryonalen Zeitpunkt hauptsächlich für die richtige regionale Verteilung und somit die korrekte Gesamtzahl von Somatostatin-positiven Interneuronen in den entsprechenden hippocampalen Regionen verantwortlich ist. Die Expression des Rezeptors nach diesem Zeitpunkt wäre dann für die korrekte Integration in die Zellschichten notwendig.

### 5.2.2.2 Die Parvalbumin- und Calretinin-Interneurone-Subpopulationen zeigen keine Defekte bei konditionalem *Cxcr4*-Knockout

Obwohl Parvalbumin-positive Interneurone, ähnlich wie die Somatostatin-positiven Interneurone, aus dem medialen Ganglienhügel und der präoptischen Region stammen (Marin 2013, Xu et al. 2004), wurde bei der Parvalbumin-Subpopulation kein sicherer Effekt des konditionalen *Cxcr4*-Knockouts festgestellt. Zwar waren Tendenzen zu Reduktionen vorhanden, aufgrund großer Heterogenität zwischen den untersuchten Tieren konnte dies jedoch nicht statistisch belegt werden.

Für den Cortex der Ratte ist bereits bekannt, dass weniger als 5% Parvalbumin-positiver Zellen an P13 und P21 CXCR4-positiv sind. An früheren Entwicklungszeitpunkten (P6) ist die Expression von Parvalbumin sehr gering. Somit konnte die Coexpression von CXCR4 und Parvalbumin dort nicht bestimmt werden (Stumm et al. 2007). Dieses Problem lässt sich mit der oben bereits beschriebenen *Cxcr4*-CreER und dem damit durchgeführten *Lineage Trace* umgehen, da hierdurch die Nachkommen von CXCR4-exprimierenden Zellen an späteren Zeitpunkten bestimmt werden können. Dadurch können Parvalbumin-positive Zellen auf frühere CXCR4-Expression überprüft werden. Nach diesem Prinzip ließ sich in dieser Arbeit unter den Parvalbumin-positiven GABAergen Neuronen nur ein geringerer Prozentanteil als Nachkommen von CXCR4-tragenden Zellen für die Zeitpunkte der Tamoxifengabe identifizieren. Da es sich hierbei um ein Pilotexperiment mit der *Cxcr4*-CreER handelte, sind die Ergebnisse jedoch als nicht gesichert einzustufen.

Für den Cortex wurde bereits diskutiert, dass der CXCR4-Rezeptor Interneurone subtypenselektiv beeinflussen könnte (Stumm et al. 2007). Wenn zur Parvalbumin-Subpopulation gehörende Interneurone von Beginn ihrer Entwicklung an nur zu geringen Anteilen CXCR4 tragen, wäre hierdurch zu erklären, warum der konditionale Knockout des Rezeptors keinen (oder wenig) Einfluss auf diese Zellen im Hippocampus und im Cortex nimmt.

Auch bei der Untersuchung der Calretinin-Subpopulation wurde kein Einfluss des konditionalen *Cxcr4*-Knockouts festgestellt. Ein Großteil der Calretinin-positiven Zellen wurde im Cortex an mehreren Entwicklungszeitpunkten jedoch schon als CXCR4-positiv identifiziert (Stumm et al. 2007), und auch bei Verlust des Rezeptors wurde bereits eine Reduktion und interlaminäre Fehlverteilung für Calretinin-positive Interneurone in kortikalen Regionen festgestellt (Tanaka et al. 2010).

Die Calretinin-Subpopulation bleibt in dieser Arbeit aus einem konzeptionellen Grund unbeeinträchtigt: Die verwendete *Nkx2.1-Cre* ist im medialen Ganglienhügel und der präoptischen Region aktiv (Xu et al. 2008), Calretinin-positive Interneurone stammen jedoch hauptsächlich aus dem caudalen Ganglienhügel (Marin 2013, Volk und Lewis 2014, Xu et al. 2004) und sind somit von dem konditionalen Knockout nicht (oder nur wenig) betroffen. Eine weitere Überprüfung der Calretinin-Subpopulation im Hippocampus wäre somit unter Verwendung eines anderen Promotors für die Cre möglich – dieser müsste in der Calretinin-Subpopulation aktiv sein.

### 5.2.3 Der *Cxcr4cKO* nimmt unterschiedlich Einfluss auf den Hippocampus von neugeborenen und adulten Tieren

Im voll entwickelten Cortex sind Fehlpositionierungen weniger ausgeprägt als embryonal (Li et al. 2008). Dieser Sachverhalt wurde in dieser Arbeit durch den Vergleich von neugeborenen und voll entwickelten Tieren für den Hippocampus untersucht.

Zunächst fällt bei Gesamtbetrachtung auf, dass der *Cxcr4cKO* an den beiden Zeitpunkten Reduktionen der Dichte GABAerger Neuronen hervorruft. Diese sind jedoch in verschiedenen Regionen unterschiedlich stark ausgeprägt. So war an P0 der *Gyrus dentatus* die am stärksten von Defekten betroffene Region, während im adulten Tier die CA2+3-Region die stärkste Reduktion aufwies. An P28 wurde ebenfalls eine leichte Reduktion im *Gyrus dentatus* identifiziert, was den Ergebnissen an P0 ähnelt. CA1 zeigte hingegen an beiden Zeitpunkten nur geringe Defekte bzgl. der Zelldichte (siehe 4.3 Abb. 6 und 4.5 Abb. 8).

Bei Vergleich der Zellschichten zeigte sich, dass die ursprünglichen Defekte an P0 als solche nicht erhalten blieben – sie traten im adulten Hippocampus jedoch in anderen Schichten auf. Während an P0 die stärksten Reduktionen noch in den Schichten nahe der hippokampalen Fissur vorlagen, zeigten sie sich an P28 in den oberflächlicheren Zellschichten (*stratum oriens* und *stratum pyramidale*). Für den *Gyrus dentatus* fand sich eine ähnliche Ausprägung der Reduktionen an P0 und P28. Im adulten Tier traten sie jedoch in abgeschwächter Form auf.

Umverteilungen zwischen den Zellschichten bei relativer Betrachtung der Zellzahl lagen im adulten Tier nur noch in CA2+3 vor. Die direkt nach der Geburt ursprünglich vorhandenen interlaminären Fehlverteilungen in CA1 und *Gyrus dentatus* waren an P28 nicht mehr identifizierbar.

Die deutlichen Unterschiede zwischen vorliegenden Defekten in neugeborenen und adulten Tieren weisen auf das Wirken von Kompensationsmechanismen bei Fehlern in der Migration von GABAergen Neuronen hin. Neben der Wirkung von CXCR4 mit CXCL12 scheinen

somit noch andere Vorgänge für die postnatale Entwicklung der mpIN-Population im Hippocampus verantwortlich zu sein. So können postnatale Selektions- und schichtspezifische Sortierungsprozesse vorhandene Migrationsdefekte teilweise kompensieren.

Dafür spricht z.B. auch, dass die Reduktion an P28 im Vergleich zu Differenzen an P0 relativ klein war. Dies liegt einerseits an den deutlich größeren Flächen der Hippocampi der adulten Tiere, was generell zu einer Verminderung der Zelldichte führt. Andererseits kommt es nach dem tangentialen Invasionshöhepunkt hippocampaler Interneurone kurz vor der Geburt (E18) während der ersten postnatalen Woche zu einer drastischen Abnahme der Dichte eingewanderter Interneurone (Tricoire et al. 2011). Es wird diskutiert, dass dies durch Apoptose und Umverteilung der bestehenden Interneuronen-Population innerhalb des wachsenden Hippocampus hervorgerufen wird (Dupuy und Houser 1997, Southwell et al. 2012, Tricoire et al. 2011). Diese Umverteilung erfolgt hauptsächlich während der ersten postnatalen Wochen durch radiale Migration (Danglot et al. 2006). Der während der postnatalen Entwicklung somit zunächst vorhandene Zellüberschuss könnte ebenfalls als möglicher Kompensationsmechanismus bei genetischen Defekten (wie sie in diesem Mausmodell hervorgerufen wurden) dienen. Eine vollständige Reparatur scheint jedoch nicht möglich, da Defekte im adulten Hippocampus in Form von Reduktionen und leichten Fehlverteilungen bestehen bleiben.

### **5.3 Einfluss von CXCR4 auf die neuronale Aktivität und dessen Bedeutung für mentale Erkrankungen**

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es bei *Cxcr4*-Deletion zu einer veränderten neuronalen Aktivität im Hippocampus kommt. Hierbei wurde *Arg3.1* als sensitiver Marker für neuronale Aktivität verwendet (Gusev et al. 2005, Guzowski et al. 1999). Die Deletion des *Cxcr4*-Gens führte zu einer leichten Erhöhung der Dichte von *Arg3.1*-positiven Zellen in der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus*, woraus sich hier eine gesteigerte neuronale Aktivität schlussfolgern lässt.

Beeinträchtigungen des CXCL12/ CXCR4/ CXCR7-Systems wurden bereits mit neuropsychiatrischen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Bedenkt man die Bedeutung des Chemokins und seiner Rezeptoren für die Migration GABAerger Neurone, sind pathologische Erscheinungen bei Fehlfunktionen dieses Systems zu erwarten. Am häufigsten wurden Verbindungen zum Krankheitsbild der Schizophrenie hergestellt (Cash-Padgett et al. 2016, Meechan et al. 2012, Toritsuka et al. 2013). Veränderungen in der Population GABAerger Neurone wurden ebenfalls mit der genannten Erkrankung in Verbindung gebracht (Lewis et

al. 2005, Meechan et al. 2012). Auch wurde ein Zusammenhang zwischen Veränderungen der Somatostatin-Subpopulation und Schizophrenie im Bereich des präfrontalen Cortex beschrieben (Morris et al. 2008).

Die Axone der Somatostatin-positiven Interneurone gehen im Hippocampus vom *stratum oriens* und vom *stratum lacunosum moleculare* aus und innervieren die distalen Dendriten der Pyramidenzellen im Bereich des *stratum lacunosum moleculare*, wo sie den exzitatorischen Input der Pyramidenzellen kontrollieren (Abbas et al. 2018, Danglot et al. 2006, Pelkey et al. 2017). Ein einziges dieser Interneurone im *stratum oriens* ist mit schätzungsweise 1450 Pyramidenzellen verbunden. Im *Gyrus dentatus* kontrollieren die im Hilus liegenden Somatostatin-positiven Interneurone ebenfalls den Input der Körnerzellen aus dem entorhinalen Cortex (Pelkey et al. 2017). Da die Somatostatin-positiven Interneurone durch den *Cxcr4cKO* deutlich dezimiert werden, könnte dieser regulierende Effekt gestört sein (daher die erhöhte Anzahl *Arg3.1*-positiver Zellen).

Die Pyramidenzellen der CA1-Region verbinden den Hippocampus mit dem entorhinalen Cortex und dem Subiculum, während von dort Axone zum *Gyrus dentatus* laufen und so wieder Anschluss an die CA3-Region finden. Hierdurch wird der *trisynaptic circuit* gebildet. Dieser stellt die Verbindung zwischen Cortex und Hippocampus dar. Somit ist der Hippocampus an verschiedenen Formen der Gedächtnisfunktion beteiligt (Khalaf-Nazzal und Francis 2013, O'Mara et al. 2000). Beeinträchtigungen verschiedener Gedächtnisformen, z.B. des episodischen und des Arbeitsgedächtnisses, gelten als Kern-Symptome der Schizophrenie (Danion et al. 2007, Lewis und Hashimoto 2007) und könnten durch Veränderungen der GABAergen Neurone im Hippocampus mitbegründet sein.

Da durch die Reduktion und mögliche Fehlverteilung der Somatostatin-positiven Interneurone kontrollierende Einflüsse auf die exzitatorischen Neurone dieser Verschaltungsreihe gestört werden, kann auch ein Zusammenhang mit der erhöhten neuronalen Aktivität im *Gyrus dentatus* vermutet werden. Der CXCR4-Rezeptor und seine Bedeutung für Migration und Integration von GABAergen Neuronen können somit eine Verbindung zur Schizophrenie bzw. auch anderen mentalen Erkrankungen aufweisen.

Um diese Überlegungen weiter zu verfolgen, wäre eine Analyse des Neocortex mit dem *Cxcr4cKO* unter ähnlichen Bedingungen wie in dieser Arbeit notwendig. Eine klare Kausalkette zwischen der Entstehung neuropsychiatrischer Erkrankungen, GABAergen Neuronen und dem CXCL12/ CXCR4/ CXCR7-System ist bisher noch nicht möglich.

## 6 Schlussfolgerung

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten belegen, dass CXCR4 eindeutig an der Interneuronenbesiedlung des Hippocampus funktionell beteiligt ist. Der Rezeptor wurde sowohl während der Embryonalperiode als auch an frühen postnatalen Tagen in GABAergen Neuronen des Hippocampus nachgewiesen. CXCR4 ist somit während der Migrationsperiode GABAerger Neuronen exprimiert und kann deren regionalen und laminären Positionierungsprozess regulieren.

Die konditionale Entfernung von CXCR4 mit der *Nkx2.1-Cre* führte zu zahlenmäßigen Reduktionen GABAerger Neurone. Dies wurde sowohl in neugeborenen als auch in adulten Tieren nachgewiesen. Weiterhin wurden interregional auftretende Fehlplatzierungen GABAerger Vorläufer für den Zeitpunkt der Geburt nachgewiesen. GABAerge Vorläufer scheinen somit ohne CXCR4 zunächst nicht in der Lage zu sein, ihre embryonale Migration korrekt abzuschließen. Interlaminäre Fehlpositionierungen waren hingegen nicht offensichtlich. Somit lässt sich die zu Beginn dieser Arbeit aufgestellte Hypothese nur teilweise belegen: CXCR4 nimmt beträchtlichen Einfluss auf die Besiedlung des Hippocampus mit GABAergen Neuronen, hat zum Zeitpunkt der Geburt jedoch begrenzte Bedeutung für deren schichtspezifische Positionierung.

Es bestanden weiterhin deutliche Unterschiede zwischen neugeborenen und adulten Tieren bzgl. der Ausprägung der Reduktionen sowie auch der davon betroffenen Regionen und Zellschichten. Es ist somit von postnatal arbeitenden Kompensationsmechanismen auszugehen, welche die durch den konditionalen *Cxcr4*-Knockout zum Zeitpunkt der Geburt hervorgerufenen Defekte teilweise ausgleichen können. Auch wurde durch das Fehlen von CXCR4 kein absoluter Mangel von GABAergen Neuronen – weder bei Geburt noch bei adulten Tieren – im Hippocampus hervorgerufen, wodurch das Wirken anderer Mechanismen, die an der Interneuronenbesiedlung des Hippocampus beteiligt sind, angenommen werden kann. Da Fehler der Besiedlung in den adulten *Cxcr4cKO*-Mäusen trotzdem vorhanden sind, ist CXCR4 in Verbindung mit seinem Liganden als wesentliche Komponente für die hippokampale Entwicklung anzusehen.

Die identifizierten Defekte in adulten Mäusen wurden insbesondere durch Reduktion der Somatostatin-Subpopulation hervorgerufen. Da Somatostatin-positive Interneurone besondere Bedeutung bei der Kontrolle exzitatorischer Neurone im Hippocampus haben und in dieser Arbeit außerdem eine leicht gesteigerte neuronale Aktivität in der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* nachgewiesen werden konnte, ist eine Beeinflussung der neuronalen

Funktionalität des Hippocampus sehr wahrscheinlich und eine Verbindung zu neuropsychiatrischen Krankheitsbildern somit möglich. Die Analyse weiterer Gehirnstrukturen bezüglich des CXCL12/ CXCR4/ CXCR7-Systems, der Somatostatin-Subpopulation und neuronaler Aktivität könnte weitere Verbindungen zu dieser Vermutung herstellen. Experimente zur Untersuchung von Verhalten, Lernen und Gedächtnis bei konditionalen *Cxcr4*-Knockout-Mäusen wären ebenso möglich, um weitere Hinweise auf das Vorliegen von neuropsychiatrischen Erkrankungen, wie z.B. Schizophrenie, aufgrund des Rezeptormangels zu erhalten.

Therapeutisch bietet das CXCL12/ CXCR4/ CXCR7-System in naher Zukunft zunächst keine Ansätze zur Behandlung neuropsychiatrischer Erkrankungen. Die weitere Erforschung des Chemokinsystems und seiner Funktionen in der Entwicklung des zentralen Nervensystems könnte jedoch zum Verständnis der Ätiologie und Pathophysiologie solcher Erkrankungen beitragen. Dies könnte sich als diagnostisch interessant erweisen und auch die Erarbeitung potentieller Therapieoptionen ermöglichen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbas AI, Sundiang MJM, Henoch B, Morton MP, Bolkan SS, Park AJ, Harris AZ, Kellendonk C, Gordon JA. 2018. Somatostatin Interneurons Facilitate Hippocampal-Prefrontal Synchrony and Prefrontal Spatial Encoding. *Neuron*, 100 (4):926-939.e923.
- Abe P, Mueller W, Schutz D, MacKay F, Thelen M, Zhang P, Stumm R. 2014. CXCR7 prevents excessive CXCL12-mediated downregulation of CXCR4 in migrating cortical interneurons. *Development*, 141 (9):1857-1863.
- Adams JC. 1992. Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem*, 40 (10):1457-1463.
- Amaral DG, Witter MP. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31 (3):571-591.
- Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. 2006. Historical Perspective: Proposed Functions, Biological Characteristics, and Neurobiological Models of the Hippocampus. *The Hippocampus Book*. New York: Oxford University Press.
- Bachelier F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD, Mantovani A, Matsushima K, Murphy PM, Nibbs R, Nomiyama H, Power CA, Proudfoot AE, Rosenkilde MM, Rot A, Sozzani S, Thelen M, Yoshie O, Zlotnik A. 2014. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, 66 (1):1-79.
- Bagri A, Gurney T, He X, Zou YR, Littman DR, Tessier-Lavigne M, Pleasure SJ. 2002. The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. *Development*, 129 (18):4249-4260.
- Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F. 2005. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*, 280 (42):35760-35766.
- Benredjem B, Girard M, Rhainds D, St-Onge G, Heveker N. 2017. Mutational Analysis of Atypical Chemokine Receptor 3 (ACKR3/CXCR7) Interaction with Its Chemokine Ligands CXCL11 and CXCL12. *J Biol Chem*, 292 (1):31-42.
- Berger O, Li G, Han SM, Paredes M, Pleasure SJ. 2007. Expression of SDF-1 and CXCR4 during reorganization of the postnatal dentate gyrus. *Dev Neurosci*, 29 (1-2):48-58.
- Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ. 2006. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med*, 203 (9):2201-2213.
- Busillo JM, Benovic JL. 2007. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1768 (4):952-963.
- Busillo JM, Armando S, Sengupta R, Meucci O, Bouvier M, Benovic JL. 2010. Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J Biol Chem*, 285 (10):7805-7817.
- Cash-Padgett T, Sawa A, Jaaro-Peled H. 2016. Increased stereotypy in conditional Cxcr4 knockout mice. *Neurosci Res*, 105:75-79.
- Cassidy A, Jones J. 2014. Developments in in situ hybridisation. *Methods*, 70 (1):39-45.
- Danglot L, Triller A, Marty S. 2006. The development of hippocampal interneurons in rodents. *Hippocampus*, 16 (12):1032-1060.
- Danion JM, Huron C, Vidailhet P, Berna F. 2007. Functional mechanisms of episodic memory impairment in schizophrenia. *Can J Psychiatry*, 52 (11):693-701.

- Deverman BE, Patterson PH. 2009. Cytokines and CNS development. *Neuron*, 64 (1):61-78.
- DeVries ME, Kelvin AA, Xu L, Ran L, Robinson J, Kelvin DJ. 2006. Defining the origins and evolution of the chemokine/chemokine receptor system. *J Immunol*, 176 (1):401-415.
- Du T, Xu Q, Ocbina PJ, Anderson SA. 2008. NKX2.1 specifies cortical interneuron fate by activating Lhx6. *Development*, 135 (8):1559-1567.
- Dupuy ST, Houser CR. 1997. Developmental changes in GABA neurons of the rat dentate gyrus: an in situ hybridization and birthdating study. *J Comp Neurol*, 389 (3):402-418.
- Fernandez EJ, Lolis E. 2002. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42:469-499.
- Freund TF, Buzsaki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6 (4):347-470.
- Frotscher M, Seress L. 2006. Morphological Development of the Hippocampus. *The Hippocampus Book*. New York: Oxford University Press.
- Gelman DM, Martini FJ, Nobrega-Pereira S, Pierani A, Kessaris N, Marin O. 2009. The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. *J Neurosci*, 29 (29):9380-9389.
- Graham GJ, Locati M, Mantovani A, Rot A, Thelen M. 2012. The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. *Immunol Lett*, 145 (1-2):30-38.
- Grigoriou M, Tucker AS, Sharpe PT, Pachnis V. 1998. Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development*, 125 (11):2063-2074.
- Gusev PA, Cui C, Alkon DL, Gubin AN. 2005. Topography of Arc/Arg3.1 mRNA expression in the dorsal and ventral hippocampus induced by recent and remote spatial memory recall: dissociation of CA3 and CA1 activation. *J Neurosci*, 25 (41):9384-9397.
- Guyon A. 2014. CXCL12 chemokine and its receptors as major players in the interactions between immune and nervous systems. *Front Cell Neurosci*, 8:65.
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF. 1999. Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci*, 2 (12):1120-1124.
- Hoffmann F, Muller W, Schutz D, Penfold ME, Wong YH, Schulz S, Stumm R. 2012. Rapid uptake and degradation of CXCL12 depend on CXCR7 carboxyl-terminal serine/threonine residues. *J Biol Chem*, 287 (34):28362-28377.
- Hopman RK, DiPersio JF. 2014. Advances in stem cell mobilization. *Blood Rev*, 28 (1):31-40.
- Khalaf-Nazzal R, Francis F. 2013. Hippocampal development - old and new findings. *Neuroscience*, 248:225-242.
- Klein RS, Rubin JB, Gibson HD, DeHaan EN, Alvarez-Hernandez X, Segal RA, Luster AD. 2001. SDF-1 alpha induces chemotaxis and enhances Sonic hedgehog-induced proliferation of cerebellar granule cells. *Development*, 128 (11):1971-1981.
- Lewellis SW, Knaut H. 2012. Attractive guidance: how the chemokine SDF1/CXCL12 guides different cells to different locations. *Semin Cell Dev Biol*, 23 (3):333-340.
- Lewis DA, Hashimoto T. 2007. Deciphering the disease process of schizophrenia: the contribution of cortical GABA neurons. *Int Rev Neurobiol*, 78:109-131.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. 2005. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*, 6 (4):312-324.
- Li G, Adesnik H, Li J, Long J, Nicoll RA, Rubenstein JL, Pleasure SJ. 2008. Regional distribution of cortical interneurons and development of inhibitory tone are regulated by Cxcl12/Cxcr4 signaling. *J Neurosci*, 28 (5):1085-1098.
- Li M, Ransohoff RM. 2008. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol*, 84 (2):116-131.

- Li M, Ransohoff RM. 2009. The roles of chemokine CXCL12 in embryonic and brain tumor angiogenesis. *Semin Cancer Biol*, 19 (2):111-115.
- Lopez-Bendito G, Sanchez-Alcaniz JA, Pla R, Borrell V, Pico E, Valdeolmillos M, Marin O. 2008. Chemokine signaling controls intracortical migration and final distribution of GABAergic interneurons. *J Neurosci*, 28 (7):1613-1624.
- Lu M, Grove EA, Miller RJ. 2002. Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (10):7090-7095.
- Luker KE, Steele JM, Mihalko LA, Ray P, Luker GD. 2010. Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands. *Oncogene*, 29 (32):4599-4610.
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF. 1995. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*, 14 (2):433-445.
- Lysko DE, Putt M, Golden JA. 2011. SDF1 regulates leading process branching and speed of migrating interneurons. *J Neurosci*, 31 (5):1739-1745.
- Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng H. 2010. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci*, 13 (1):133-140.
- Manent JB, Jorquera I, Ben-Ari Y, Aniksztejn L, Represa A. 2006. Glutamate acting on AMPA but not NMDA receptors modulates the migration of hippocampal interneurons. *J Neurosci*, 26 (22):5901-5909.
- Marin O. 2013. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *Eur J Neurosci*, 38 (1):2019-2029.
- Marin O, Valiente M, Ge X, Tsai LH. 2010. Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2 (2):a001834.
- Meechan DW, Tucker ES, Maynard TM, LaMantia AS. 2012. Cxcr4 regulation of interneuron migration is disrupted in 22q11.2 deletion syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (45):18601-18606.
- Morris HM, Hashimoto T, Lewis DA. 2008. Alterations in somatostatin mRNA expression in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Cereb Cortex*, 18 (7):1575-1587.
- Mueller W, Schutz D, Nagel F, Schulz S, Stumm R. 2013. Hierarchical organization of multi-site phosphorylation at the CXCR4 C terminus. *PLoS One*, 8 (5):e64975.
- Müller U. 1999. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev*, 82 (1-2):3-21.
- Nagasawa T, Tachibana K, Kishimoto T. 1998. A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection. *Semin Immunol*, 10 (3):179-185.
- Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleswar H, Raz E, Zerwes HG, Rot A, Thelen M. 2010. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One*, 5 (2):e9175.
- Nie Y, Waite J, Brewer F, Sunshine MJ, Littman DR, Zou YR. 2004. The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med*, 200 (9):1145-1156.
- O'Mara SM, Commins S, Anderson M. 2000. Synaptic plasticity in the hippocampal area CA1-subiculum projection: implications for theories of memory. *Hippocampus*, 10 (4):447-456.

- Parachikova A, Cotman CW. 2007. Reduced CXCL12/CXCR4 results in impaired learning and is downregulated in a mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis*, 28 (2):143-153.
- Pelkey KA, Chittajallu R, Craig MT, Tricoire L, Wester JC, McBain CJ. 2017. Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiol Rev*, 97 (4):1619-1747.
- Sanchez-Alcaniz JA, Haegel S, Mueller W, Pla R, Mackay F, Schulz S, Lopez-Bendito G, Stumm R, Marin O. 2011. Cxcr7 controls neuronal migration by regulating chemokine responsiveness. *Neuron*, 69 (1):77-90.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Meth*, 9 (7):676-682.
- Schonemeier B, Kolodziej A, Schulz S, Jacobs S, Hoell V, Stumm R. 2008. Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain. *J Comp Neurol*, 510 (2):207-220.
- Schultheiss C, Abe P, Hoffmann F, Mueller W, Kreuder AE, Schutz D, Haegel S, Redecker C, Keiner S, Kannan S, Claasen JH, Pfrieger FW, Stumm R. 2013. CXCR4 prevents dispersion of granule neuron precursors in the adult dentate gyrus. *Hippocampus*, 23 (12):1345-1358.
- Schulz S, Schreff M, Schmidt H, Handel M, Przewlocki R, Holtt V. 1998. Immunocytochemical localization of somatostatin receptor sst2A in the rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci*, 10 (12):3700-3708.
- Scoville WB, Milner B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20 (1):11-21.
- Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, Woehl B, Leung H, Groom J, Batten M, Harvey RP, Martinez AC, Mackay CR, Mackay F. 2007. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (37):14759-14764.
- Singh S, Sadanandam A, Singh RK. 2007. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 26 (3-4):453-467.
- Southwell DG, Paredes MF, Galvao RP, Jones DL, Froemke RC, Sebe JY, Alfaro-Cervello C, Tang Y, Garcia-Verdugo JM, Rubenstein JL, Baraban SC, Alvarez-Buylla A. 2012. Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons. *Nature*, 491 (7422):109-113.
- Stumm R, Culmsee C, Schafer MK, Kriegstein J, Weihe E. 2001. Adaptive plasticity in tachykinin and tachykinin receptor expression after focal cerebral ischemia is differentially linked to gabaergic and glutamatergic cerebrocortical circuits and cerebrovascular endothelium. *J Neurosci*, 21 (3):798-811.
- Stumm R, Kolodziej A, Schulz S, Kohtz JD, Holtt V. 2007. Patterns of SDF-1alpha and SDF-1gamma mRNAs, migration pathways, and phenotypes of CXCR4-expressing neurons in the developing rat telencephalon. *J Comp Neurol*, 502 (3):382-399.
- Stumm RK, Zhou C, Schulz S, Holtt V. 2004. Neuronal types expressing mu- and delta-opioid receptor mRNA in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol*, 469 (1):107-118.
- Stumm RK, Rummel J, Junker V, Culmsee C, Pfeiffer M, Kriegstein J, Holtt V, Schulz S. 2002. A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. *J Neurosci*, 22 (14):5865-5878.

- Stumm RK, Zhou C, Ara T, Lazarini F, Dubois-Dalcq M, Nagasawa T, Holtt V, Schulz S. 2003. CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J Neurosci*, 23 (12):5123-5130.
- Tanaka DH, Maekawa K, Yanagawa Y, Obata K, Murakami F. 2006. Multidirectional and multizonal tangential migration of GABAergic interneurons in the developing cerebral cortex. *Development*, 133 (11):2167-2176.
- Tanaka DH, Mikami S, Nagasawa T, Miyazaki J, Nakajima K, Murakami F. 2010. CXCR4 is required for proper regional and laminar distribution of cortical somatostatin-, calretinin-, and neuropeptide Y-expressing GABAergic interneurons. *Cereb Cortex*, 20 (12):2810-2817.
- Tarasova NI, Stauber RH, Michejda CJ. 1998. Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXCR4 chemokine receptor 4. *J Biol Chem*, 273 (26):15883-15886.
- Tasic B, Menon V, Nguyen TN, Kim TK, Jarsky T, Yao Z, Levi B, Gray LT, Sorensen SA, Dolbeare T, Bertagnolli D, Goldy J, Shapovalova N, Parry S, Lee C, Smith K, Bernard A, Madisen L, Sunkin SM, Hawrylycz M, Koch C, Zeng H. 2016. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat Neurosci*, 19 (2):335-346.
- Temple MD, Worley PF, Steward O. 2003. Visualizing changes in circuit activity resulting from denervation and reinnervation using immediate early gene expression. *J Neurosci*, 23 (7):2779-2788.
- Tiveron MC, Cremer H. 2008. CXCL12/CXCR4 signalling in neuronal cell migration. *Curr Opin Neurobiol*, 18 (3):237-244.
- Tiveron MC, Rossel M, Moepps B, Zhang YL, Seidenfaden R, Favor J, Konig N, Cremer H. 2006. Molecular interaction between projection neuron precursors and invading interneurons via stromal-derived factor 1 (CXCL12)/CXCR4 signaling in the cortical subventricular zone/intermediate zone. *J Neurosci*, 26 (51):13273-13278.
- Toritsuka M, Kimoto S, Muraki K, Landek-Salgado MA, Yoshida A, Yamamoto N, Horiuchi Y, Hiyama H, Tajinda K, Keni N, Illingworth E, Iwamoto T, Kishimoto T, Sawa A, Tanigaki K. 2013. Deficits in microRNA-mediated Cxcr4/Cxcl12 signaling in neurodevelopmental deficits in a 22q11 deletion syndrome mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (43):17552-17557.
- Tricoire L, Pelkey KA, Erkkila BE, Jeffries BW, Yuan X, McBain CJ. 2011. A blueprint for the spatiotemporal origins of mouse hippocampal interneuron diversity. *J Neurosci*, 31 (30):10948-10970.
- Trojan E, Slusarczyk J, Chamera K, Kotarska K, Glombik K, Kubera M, Basta-Kaim A. 2017. The Modulatory Properties of Chronic Antidepressant Drugs Treatment on the Brain Chemokine - Chemokine Receptor Network: A Molecular Study in an Animal Model of Depression. *Front Pharmacol*, 8:779.
- Volk DW, Lewis DA. 2014. Early developmental disturbances of cortical inhibitory neurons: contribution to cognitive deficits in schizophrenia. *Schizophr Bull*, 40 (5):952-957.
- Volk DW, Chitrapu A, Edelson JR, Lewis DA. 2015. Chemokine receptors and cortical interneuron dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Res*, 167 (1-3):12-17.
- Wang Y, Li G, Stanco A, Long JE, Crawford D, Potter GB, Pleasure SJ, Behrens T, Rubenstein JL. 2011. CXCR4 and CXCR7 have distinct functions in regulating interneuron migration. *Neuron*, 69 (1):61-76.
- Wu PR, Cho KK, Vogt D, Sohal VS, Rubenstein JL. 2016. The Cytokine CXCL12 Promotes Basket Interneuron Inhibitory Synapses in the Medial Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex*.
- Xu Q, Tam M, Anderson SA. 2008. Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon. *J Comp Neurol*, 506 (1):16-29.
- Xu Q, Cobos I, De La Cruz E, Rubenstein JL, Anderson SA. 2004. Origins of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci*, 24 (11):2612-2622.

- Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, Leonard EJ. 1987. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (24):9233-9237.
- Yu L, Cecil J, Peng SB, Schrementi J, Kovacevic S, Paul D, Su EW, Wang J. 2006. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene*, 374:174-179.
- Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 393 (6685):595-599.

## 8 Anhang

### 8.1 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Ralf Stumm (Doktorvater), Dr. Philipp Abe (Betreuer), Christine Anders (technische Mitarbeiterin), Heike Stadler (technische Mitarbeiterin),

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 22.11.2019

Ort, Datum

---

Oliver Storch

## 8.2 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Ralf Stumm, für seine umfassende Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit. Er bot mir die Möglichkeit, dieses interessante Thema zu bearbeiten, wofür mir die von ihm etablierten Methoden und Materialien während des gesamten Erstellungsprozesses zur Verfügung standen. Er half mir mit konstruktiven Ideen und Vorschlägen, interessanten und anregenden Gesprächen und Diskussionen sowie fortwährender Unterstützung, was entscheidend zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen hat. An dieser Stelle nochmals herzlichen Dank hierfür!

Ebenso gilt mein besonderer Dank Dr. Philipp Abe, der mich besonders während meiner experimentellen Forschungszeit unterstützt hat. Er leistete viel Vorarbeit für meine Experimente und vermittelte mir die Fähigkeiten zur Durchführung der erforderlichen Analysen und Versuche. Ebenso stand er mir helfend bei der Erhebung und Auswertung der Daten dieser Arbeit und mit konstruktiven Ratschlägen zur Seite.

Weiterhin danke ich der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Ralf Stumm für die freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung. In diesem Rahmen möchte ich mich bei Heike Stadler und Christine Anders für ihre Zuarbeit, Unterstützung und Anleitung bei vielen technischen Fragen sowie hilfreichen Tipps bedanken. Auch gilt mein Dank Dr. Yves Werner und Dr. Friederike Saaber für ihre hilfreichen Ratschläge und die Unterstützung während meiner Forschungszeit.

Ebenso möchte auch den anderen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für die entspannte und unkomplizierte Zusammenarbeit danken.

Weiterhin danke ich dem Leiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, Prof. Dr. Stefan Schulz, für die Möglichkeit, die beschriebenen Analysen und Versuche durchzuführen.

Ferner bedanke ich mich beim Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Promotionsstipendiums während der Erstellung dieser Dissertation.

Außerdem danke ich herzlichst meinen Eltern für ihre moralische und seelische Unterstützung.

Zu guter Letzt ganz herzlichen Dank auch an meine Partnerin für die häufigen Ermutigungen und ihre umfassende Unterstützung während der Erstellung dieser Dissertation.

### 8.3 Lebenslauf

#### Persönliche Daten

<i>Name:</i>	Storch	<i>Vorname:</i>	Oliver
<i>Geburtsdatum:</i>	08.09.1995	<i>Geburtsort:</i>	Friedrichroda

#### Schulische Ausbildung und akademischer Werdegang

2001 – 2005	A.K.T.I.V-Schule Emleben - Grundschulausbildung
2005 – 2013	Gymnasium „Ernestinum“ Gotha - Erwerb der Hochschulreife Abschlussnote: 1,1
Seit Oktober 2013	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
29. September 2015	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit Abschlussnote „gut“
Oktober 2016 – September 2017	Unterbrechung des Studiums im Rahmen der Forschungstätigkeit in der AG Stumm am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Jena Thema der Dissertation: <i>„Der Einfluss des Chemokinrezeptors CXCR4 auf die Positionierung GABAerger Neurone im Hippocampus der Maus“</i> Förderung durch Promotionsstipendium des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung (IZKF) Jena
Oktober 2017	Wiederaufnahme des Medizinstudiums an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
30. Oktober 2019	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit Abschlussnote „gut“

#### Famulaturen

Juli/August 2016	Famulatur in der Allgemeinarztpraxis Dr. Manfred Heimbrodt Gotha
Februar/März 2017	Famulatur in der Zentralklinik Bad Berka (ZBB); Klinik für Neurochirurgie, Station H3
Juli/August 2018	Famulatur im SRH Krankenhaus Waltershausen/ Friedrichroda; Bereich Anästhesie und Intensivmedizin
Februar/März 2019	Famulatur am Universitätsklinikum Jena - Institut für Rechtsmedizin

Jena, 22.11.2019

Ort, Datum

---

Oliver Storch

## 8.4 Verwendete Geräte, Chemikalien, Puffer/Lösungen und Herstellungsprotokolle

### 8.4.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Epi-Fluoreszenz Mikroskop Zeiss Axio Imager A1	Carl Zeiss Jena GmbH (Jena, D)
Feuchtekammer	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Heiz- und Magnetrührer RCT basic safety control	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, D)
HistoBond® adhäsive Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co KG (Lauda-Königshofen, D)
Kofokal Laser scanning Microscope Zeiss LSM Meta 510	Carl Zeiss Jena GmbH (Jena, D)
Kryostat CM3050S	Leica (Wetzlar, D)
Magnetrührer IKA® REO basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, D)
Magnet-Rührfische	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
NanoZoomer Digital slide scanner C9600-12	Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH (Herrsching am Ammersee, D)
OT-Halter	Werkstatt Uniklinikum Jena
Pipetten – research pro	Eppendorf AG (Hamurg, D)
Plastikgefäße	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Plattformschüttler (Unimax 1010)	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG (Schwabach, D)
Waage Sartorius MC1 Laboratory LC 220S	Sartorius AG (Göttingen, D)
Wärmeschrank	Memmet GmbH & Co KG (Schwabach, D)
Wasserbad Julabo SW-21C	ULABO Labortechnik GmbH (Seelbach, D)

## 8.4.2 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
0,5M EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
1M Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
1M Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
ABC-Kit Vecta Stain®	Vector Laboratorys LTD. (Peterborough, UK)
Acetanhydrid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Alexa Fluor® 488 Streptavidin	Invitrogen (Darmstadt, D)
Biotin	Pierce Biotechnology Inc. (Rockford, IL USA)
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratorys GmbH (Cölbe, D)
Chromalaun (Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
DAPI	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
DPX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Eosin G-Lösung 1%	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Fixierer (für Emulison Coating)	Carestream Health Deutschland GmbH (Stuttgart, D)
Gelatine	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Hämalaun-Lösung (nach Mayer)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Hydrochinon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Isofluran	AlleMan Pharma GmbH (Pfullingen, D)
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Kaliumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Kodak Entwickler	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Kodak Fixierer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Kresylviolett	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)

---

Metol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12H <sub>2</sub> O	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Natriumcarbonat (Monohydrat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *1H <sub>2</sub> O	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Natriumhydroxid (NaOH, p.a.)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Natriumsulfit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
NTB-Emulsion	Carestream Health Deutschland GmbH (Stuttgart, D)
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
RNase A, 100 mg/ml	Roche Deutschland Holding GmbH (Grenzach-Wyhlen, D)
RNase T1	Roche Deutschland Holding GmbH (Grenzach-Wyhlen, D)
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Germany GmbH (Staufen, D)
Triethanolamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Tri-Na-Citratdihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Tris Base Ultra Qualität (Mw 121 g/mol)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Tyramin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)

### 8.4.3 Puffer und Lösungen

#### 8.4.3.1 Immunhistochemie

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Herstellung/Chemikalien</b>
4% PFA (in 1x PBS; pH 7,4)	etwa 800 ml $\text{ddH}_2\text{O}$ in 2l-Becherglas auf 55°C erhitzen 40 g PFA unter Abzug einrühren konz. NaOH tropfenweise zugeben bis die Flüssigkeit klar ist Lösung abkühlen lassen mit HCl pH-Wert auf 7,3-7,4 einstellen Lösung filtrieren Lösung bei 4°C lagern (bis zu 7 Tage haltbar)
30%ige Saccharoselösung	30% Saccharose und 0,1% Thiomersal in Phosphatpuffer mit 28mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 2mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
ABC-Lösung	5µl Avidin und 5 µl Biotin (ABC-Kit Vecta Stain®) in 1ml TPBS-T
Arbeitspuffer	1%BSA in TPBS-T
Blockierungspuffer	3% BSA in TPBS-T
DAPI Lösung	50µl Dapi in 50ml $\text{ddH}_2\text{O}$
PBS	Folgende Salze abwiegen: 14,4g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,6g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 18g NaCl mit $\text{ddH}_2\text{O}$ auf 2l auffüllen
Phosphatpuffer (200mM, pH7,4, 100ml)	19ml Puffer A (27,6g $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ in 1 l $\text{ddH}_2\text{O}$ ); 81 ml Puffer B (35,63g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ in 1 l $\text{ddH}_2\text{O}$ ); pH 7,4
TPBS (10mM Tris, 0,05%Thiomersal, 10mM Phosphatpuffer, 0,9%NaCl, pH 7,4)	2,4g Tris; 18g NaCl; 1,0g Thiomersal in 1,8l $\text{ddH}_2\text{O}$ lösen, 100ml Phosphatpuffer hinzufügen mit 10N HCl auf pH 7,4 einstellen und mit Phosphatpuffer auf 2l auffüllen
TPBS-T	TPBS mit 0,3% Triton X-100
Tyrodes-Lösung	160mM NaCl; 2,7mM KCl; 0,5mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,36mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 5,55mM Glucose; 12mM $\text{NaHCO}_3$

8.4.3.2 *In-situ-Hybridisierung*

Präbhybridisierung:

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Herstellung/Chemikalien</b>
10x PBS (100 mM Phosphat; 1,55 M NaCl; pH 6,75, 2l)	Folgende Salze abwiegen und in 2l-Flasche geben: 55,2 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12H <sub>2</sub> O 6,4 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *1H <sub>2</sub> O 180 g NaCl anschließend mit ddH <sub>2</sub> O auf 2 l auffüllen mit NaOH pH 6,75 einstellen nach dem Verdünnen auf 1 x PBS resultiert pH 7,3 - 7,4
PFA-Puffer (4% PFA in 1x PBS; pH 7,4, 1,5l)	etwa 750 ml ddH <sub>2</sub> O in 2l-Becherglas auf 55°C erhitzen 60 g PFA unter Abzug einrühren konz. NaOH tropfenweise zugeben bis die Flüssigkeit klar ist 150 ml 10 x PBS zugeben mit ddH <sub>2</sub> O auf 1,5l auffüllen und Puffer auf 25°C abkühlen pH-Wert mit HCl auf 7,3-7,4 einstellen Puffer filtrieren Puffer muss vor dem Einsatz 4°C haben Puffer bei 4°C lagern (bis zu 7 Tage haltbar)
TEA-Puffer (1,5l)	etwa 1400 ml ddH <sub>2</sub> O in Becherglas geben 20 ml TEA in 50 ml-Falcon abmessen, mit ddH <sub>2</sub> O auswaschen und zu den 1400 ml geben rühren, bis TEA gelöst ist mit HCl auf pH 8.0 einstellen Lösung im Messzylinder mit ddH <sub>2</sub> O auf 1,5l auffüllen
Triton-Puffer (0,4% Triton X-100 in 1x PBS, 1,5l)	150 ml 10x PBS mit ddH <sub>2</sub> O auf 1,5l auffüllen (= 1xPBS) 6 ml Triton X-100 zugeben und gut Rühren bis alle Schlieren weg sind Puffer bei 4°C lagern (bis zu 4 Wochen haltbar!)

## Hybridisierung:

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Herstellung/Chemikalien</b>
1 M Tris-Cl (1l)	121g Tris in etwa 950 ml $\text{ddH}_2\text{O}$ durch kräftiges Schütteln in der Flasche lösen mit HCl pH8,0 einstellen auf 1000 ml im Messzylinder auffüllen autoklavieren und bei RT lagern
20x SSC-Stammlösung (2l)	176g Tri-Na-Citratdihydrat + 350g NaCl + 1,8ml $\text{ddH}_2\text{O}$ (kräftig schütteln) pH mit konz. HCl auf 6,3 einstellen und mit $\text{ddH}_2\text{O}$ auf 2l auffüllen → autoklavieren
5M NaCl (1l)	292g NaCl in etwa 950ml $\text{ddH}_2\text{O}$ durch kräftiges Schütteln in der Flasche lösen und auf 1000 ml im Messzylinder auffüllen → autoklavieren und bei RT lagern
RNase-Puffer	<p><u>a) RNase A Stock (10mg/ml) herstellen:</u> 100mg RNase A werden im Original-Glasgefäß in 5ml Puffer (siehe b) gelöst die 5ml werden in einem 15ml-Röhrchen mit Puffer (siehe b) auf 10ml aufgefüllt die Lösung in 1,5ml Portionen aliquotieren bei <math>-20^\circ\text{C}</math> bis zum Gebrauch lagern</p> <p><u>b) Puffer (10mM Tris-Cl pH8,0; 0,5M NaCl; 1mM EDTA):</u> 15 ml 1M Tris Cl; pH 8.0 150 ml 5 M NaCl 3 ml 0,5M EDTA; pH 8 <math>\text{ddH}_2\text{O}</math> ad 1500ml Puffer wird auf 2 Plastikgefäße (Aufschrift RNase, Datum) verteilt</p> <p>Um final <math>40\mu\text{g/ml}</math> RNase A und <math>1\text{U/ml}</math> RNase T1 zu erhalten, wird pro 750 ml-Gefäß addiert: + 3ml (10 mg/ml RNase A Stock) + <math>7,5\mu\text{l}</math> (<math>100.000\text{U/ml}</math> RNase T1)</p> <p>RNase Puffer wird bei <math>-20^\circ\text{C}</math> eingefroren Puffer wird nach 10fachem Gebrauch entsorgt</p>

## Emulsion Coating:

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Herstellung/Chemikalien</b>
0,5% Kresylviolett; 60mM Natriumacetat; 340mM Essigsäure (1l)	0,5g Kresylviolett in 600ml H <sub>2</sub> O lösen (Rührer) + 60ml 1M Natriumacetat + 340ml 1M Essigsäure in 1l-Flasche geben, mit Alufolie umwickeln und 4-5 Tage rühren → KV-Lösung in KV-Glasbehälter filtrieren
D19-Entwickler (für Emulsion Coating) 750ml	ddH <sub>2</sub> O auf 45°C vorheizen, dann Folgendes unter Rühren hinzu- fügen: 1,5g Metol 67,5g Na-Sulfit 6g Hydrochinon 39,375g Natriumcarbonat (Monohydrat) 3,75g Kaliumbromid zur Benutzung auf 18°C kühlen
Fixierer	138 g Fixierer in 750 ml ddH <sub>2</sub> O lösen (1 l-Flasche, Rührer)
NTB-Emulsion ansetzen/verdünnen (Dunkelkammer)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wasserbad auf 45°C bringen</li> <li>• NTB-Emulsion für 45 min bei 45°C erwärmen</li> <li>• bei Tageslicht 0,05% Triton-X100 ansetzen: 99,95ml H<sub>2</sub>O + 50µl Triton-X100 (durchmischen)</li> <li>• Test-OT in NTB-Emulsion (ohne Triton) dippen und üN trocknen lassen</li> <li>• Test-OT zur Überprüfung der NTB-Qualität entwickeln</li> <li>• in einem 300ml-Becherglas NTB-Emulsion mit 100ml 0,05% Triton-X100 luftblasenfrei vermischen</li> <li>• verdünnte Emulsion in ca. 10-12 Glasfläschchen aliquotieren</li> <li>• Glasfläschchen in Alu-Tuben verschließen und zweimal mit Alufolie umwickeln (mit Datum versehen)</li> <li>• bei 4°C lagern</li> </ul>

#### 8.4.4 cDNA-Sequenzen der für die [<sup>35</sup>S]-*In-situ*-Hybridisierung genutzten Plasmide

##### **Lhx6**

###### *Referenz:*

Grigoriou M, Tucker AS, Sharpe PT, Pachnis V. 1998. Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development*, 125 (11):2063-2074.

##### **GAD65**

Forward Primer: TCT TTT CTC CTG GTG GCG

Reverse Primer: TTG AGA GGC GGC TCA TTC

###### *Sequenz:*

**TCTTTTCTCCTGGTGGCG**CCATCTCCAACATGTATGCCATGCTCATTGCCCGCTATAAGA  
 TGTTTCCAGAAGTCAAGGAGAAGGGGATGGCAGCAGTGCCCAGGCTCATCGCGTTCACAT  
 CAGAGCATAGTCACTTTTCTCTCAAGAAGGGAGCTGCAGCCTTAGGGATTGGAACAGACA  
 GTGTGATTCTGATTAATGTGACGAGAGAGGGAAAATGATTCCATCTGATCTTGAAAGAA  
 GAATCCTTGAAGTCAAACAGAAAGGATTTGTTCTTTTCTGGTGAGTGCCACAGCTGGAA  
 CCACCGTGTATGGGGCTTTTGATCCTCTCTTGGCTGTAGCTGACATCTGCAAAAAGTATAA  
 GATCTGGATGCACGTGGATGCTGCTTGGGGTGGAGGGTTACTGATGTCCCGGAAACACAA  
 GTGGAAGCTGAGTGGAGTAGAGAGGGCCAACCTCTGTGACATGGAATCCTCACAAGATGA  
 TGGGTGTCCCCTTGCAGTGTTTCAGCTCTCCTGGTTAGAGAGGAGGGACTGATGCAGAGCT  
 GCAACCAGATGCATGCTTCCTACCTCTTTCAGCAAGATAAGCACTATGACCTGTCCTATG  
 ACACAGGAGACAAGGCCTTGCAGTGTGGACGCCATGTGGATGTCTTTAAATTATGGCTCA  
 TGTGGAGAGCAAAGGGGACTACTGGGTTTGGAGGCACACATTGATAAGTGTGTTGGAGCTA  
 GCAGAGTATTTATACTATCATAAAAAACCGAGAAGGCTATGAAATGGTGTGTTGATGGG  
 AAGCCTCAACACAAAATGTCTGCTTCTGGTTTGTACCTCCTAGTTTGCGCACTCTGGAAG  
 ACAATGAAGAGAG**GAATGAGCCGCCTCTCAA**

**GAD67**

Forward Primer: TGT GCC CAA ACT GGT CCT

Reverse Primer: TGG CCG ATG ATT CTG GTT

*Sequenz:*

**TGTGCCCAAACTGGTCCT**CTTCACCTCAGAACACAGTCACTATTCCATAAAGAAAGCCG  
 GGGCTGCGCTTGGCTTTGGAACCGACAATGTGATTTTGATAAAGTGCAATGAAAGGGGGA  
 AGATAATTCCGGCTGATTTAGAGGCCAAAAATTCTTGATGCCAAACAAAAGGGCTATGTTC  
 CCCTTTATGTCAATGCAACCGCAGGCACGACTGTTTACGGAGCATTTCGATCCAATCCAGG  
 AAATTGCGGACATATGTGAGAAATACAACCTTTGGCTGCATGTGGATGCTGCCTGGGGTG  
 GTGGACTGCTCATGTCCCGGAAGCACCGCCACAACTCAGCGGCATAGAAAGGGCCAAT  
 TCAGTCACCTGGAACCCTCACAAGATGATGGGCGTGCTGCTCCAGTGCTCTGCCATTCTG  
 GTCAAGGAAAAGGGTATACTCCAAGGATGCAACCAGATGTGTGCAGGCTACCTCTTCCAG  
 CCAGACAAGCAGTATGACGTCTCCTATGACACCGGGGACAAGGCGATTTCAGTGTGGCCG  
 CCATGTGGACATCTTCAAGTTCTGGCTGATGTGGAAAGCAAAGGGCACCGTGGGATTTGA  
 AAACCAGATCAACAAATGCCTGGAGCTGGCTGATTACCTCTACGCCAAGATTA AAAACA  
 GAGAAGAGTTTGAGATGGTTTTTCGATGGTGAGCCTGAGCACACAAATGTCTGTTTCTGGT  
 ACATTCCACAAAGCCTTCGAGGGGTCCAGATAGCCCTGAGCGACGAGAAAAGCTACAC  
 AGGGTGGCTCCCAAGATCAAAGCTCTGATGATGGAGTCAGGAACAACCATGGTGGGCTA  
 CCAGCCTCAAGGGGACAAGGCCAACTTCTTCCGGATGGTCATCTCTAACCAGCCGCCAC  
 CCAGTCTGACATCGATTTCTCATTGAGGAGATAGAGAGGTTGGGTCAGGATCTGTAATC  
 CCTCTTTACAG**AACCAGAATCATCGGCCA**

**Akr1c18**

NCBI Accession NM\_134066.1

GI 19527283

Forward Primer: **CCCCAGTTCTCTTGGATGA**Reverse Primer: **AACTGGGGGTGAGTTGCT***Sequenz:*

CCCCAGTTCTCTTGGATGATCCAGTTCTTTGTGCCATGGCAAAGAAGTACAAGCGGACTC  
 CAGCCCTGATTGCCCTTCGCTACCAGCTGGACCGTGGGATTGTGGCCCTAGCCAAGAGTT  
 TCAATGAGGAGAGAATCAGAGAGAACATGCAGGTCTTTGATTTCCAATTGGCTTCAGATG  
 ACATGAAAATTTTAGATGGCCTGGACAGAAATCTTCGGTACTTTCTGCTGATATGTTTAA  
 GGCTCACCTAACTTTCCATTCTTCGATGAATATTAAGATGGAGGCCCTTGCCACGAGTTC  
 TATTAGAAGATCTTTTGTGTGATGCTGGACTCTCAGATGCCAATAACTCGACACACCGCCT  
 CCAATCACTGCTTAGCAACTCACCCCACT

**Ndnf**

NCBI Accession    NM\_172399.1  
 GI                    27369490  
 Forward Primer:    **GCGATGCACCTTTGGAGT**  
 Reverse Primer:    **GACAGAAGCAGCCTCCCA**

*Sequenz:*

GCGATGCACCTTTGGAGTGGAAAGCTTAGCCTTCAGGAGCTGCATGAGGGGTCCAGTGCAG  
 ATGGATCAGGTGACCCAGAACTACTTGACCAGCAGAAGCAGCAGATGACTGATGTAGAG  
 GGCACAGAACTATTCTCTACAAGGGCAATGATGTAGAGTATTTTCTGTCTTCAAGTTCCC  
 CATCTGGTTTGTATCAGTTGGAGCTTCTTTCAACAGAGAAAGACACACATTTCAAAGTAT  
 ATGCCACCACCACACCAGAATCTGACCAGCCATACCCTGAATTACCATATGACCCCAGAG  
 TTGATGTGACCTCCTTTGGACGTACCACAGTCACTTTGGCCTGGAAGCCAAGCCCTACAG  
 CCTCTATATTGAAACAACCCATAGAGTACTGTGTGGTCATCAACAAGGAGCACAATTTCA  
 AAAGCCTCTGTGCAGCAGAAACAAAGATGAATGCAGATGATGCCTTCATGGTGGCGCCC  
 AAACCTGGTCTAGACTTTAACCCTTTGACTTTGCCATTTTGGATTTCCAACAGATAATT  
 TGGGTAAAGATCGAAGCCTCCTGGCAAAGCCTTCTCCCAAAGTGGGGCGCCATGTCTACT  
 GGAGGCCCAAGGTTGACATTCAAAAAATTTGCATAGGAAATAAAAACATTTTCACAGTCT  
 CTGACCTGAAGCCCGATACCCAATACTACTTTGATGTCTTCATGGTCAATACCAACACCA  
 ACATGAGTACAGCTTATGTGGGTGCCTTTGTCAGGACCAAGGAGGAGGCAAAACAGAAG  
 ACAGTGGAACTCAAAGACGGGAGGGTCACAGATGTGTTTGTAAAAGGAAGGGGAAAAA  
 GTTTCTACGGTTTGCTCCAGTCTCCTCTCACCAAAGGTCACGTTCTTTATTCATTCTTGTA  
 TGGATGCCGTTCAAGTCCAAGTGAGAAGAGATGGGAGGCTGCTTCTGT

**Arg3.1 (Arc)***Referenzen:*

- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF. 1995. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*, 14 (2):433-445.
- Temple MD, Worley PF, Steward O. 2003. Visualizing changes in circuit activity resulting from denervation and reinnervation using immediate early gene expression. *J Neurosci*, 23 (7):2779-2788.

### 8.4.5 Protokoll zur Herstellung von [<sup>35</sup>S]-Ribosonden

#### **Material**

SP6 RNA-Polymerase (Roche, #810274)  
 T7 RNA-Polymerase (Roche, #881767)  
 T3 RNA-Polymerase (Roche, #1031163)  
 10x Transkription Buffer (Roche, wird mit Polymerasen mitgeliefert)  
 100mM DTT (Invitrogen)  
 DTT (Sigma, #D9163; Mw=154,25g/mol)  
 NTPs, Set á 4 Nukleotide (Roche, #1277057)  
 NaCO<sub>3</sub> (Merck, #1.06392.500; Mw=105,99g/mol)  
 HAc, Essigsäure für Analytik (Merck, #1.00063.1000)

#### für 1,1 x Hybridisierungspuffer:

tRNA (Roche, #109541)  
 Formamid (Roche, #1814320)  
 0,5M EDTA (Sigma, #E7889)  
 50x Dextransulfat (Sigma, #D8906)  
 NaCl (Roth, #3957.1; Mw=58,44g/mol)  
 Tris Ultra (Roth, #5429.3; Mw=121,14g/mol)  
 Denhardt-Solution (Sigma, #D9905)  
 Dextransulfat (Sigma, #D8906)  
 frisches H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Mikro-Bio-Spin Columns (Biorad #732-6250)

Rotiszint<sup>®</sup> eco plus (Roth, #Y837.1-Y842.1)  
 Szintiröhrchen

UTP $\alpha$ S, [<sup>35</sup>S]- 1250Ci/mmol, 12.5mCi/ml, 250 $\mu$ Ci oder 1mCi  
 (PerkinElmer, #NEG739H250UC oder #NEG739H001MC)  
 CTP $\alpha$ S, [<sup>35</sup>S]- 1250Ci/mmol, 12.5mCi/ml, 250 $\mu$ Ci oder 1mCi  
 (PerkinElmer, #NEG064H250UC oder #NEG064H001MC)

#### **Richtlinien**

Es dürfen nur berechnigte Personen (mit Anzug und Dosimeter; nach Belehrung!) im Isotopenlabor arbeiten. Hierzu ist der Strahlenschutzbeauftragte zu kontaktieren.

Vor dem Betreten des Isotopenlabors sowie nach Verlassen des Isotopenlabors sind die Arbeitsflächen/Geräte mit einem Geigerzähler zu messen; dies wird in eine Liste eingetragen.

Bei Kontamination (Gerät piepst) sind die dafür zuständigen Personen sofort (!) zu benachrichtigen.

Alle Arbeiten werden am ausgewiesenen Arbeitsplatz im Isotopenlabor (innerhalb der Bleiumrandung) durchgeführt!

Neu gelieferte Isotope sind mit Produktbezeichnung, Produktnummer, Lot-Nummer, Radioaktivität und Lieferdatum in ein dafür vorgesehenes Buch einzutragen.

Wenn neue Isotope geliefert wurden,  $^{35}\text{S}$ -CTP bei  $-20^\circ\text{C}$  und  $^{35}\text{S}$ -UTP bei  $4^\circ\text{C}$  lagern!

## **Puffer und Lösungen**

### **1M DTT:**

1ml ansetzen und bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern (3 Monate haltbar)  
 Rechnung:  $0,0011 \cdot 1\text{mol/l} \cdot 154,25\text{g/mol} = 0,15425\text{g}$   
 0,154g in 1,5ml-Tube abwiegen und 1ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  zugeben

### **1,1 x Hybridisierungspuffer:**

5M NaCl ansetzen und bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern:

- 30ml ansetzen und in 6ml-Aliquots bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern
- Rechnung:  $0,031 \cdot 5\text{mol/l} \cdot 58,44\text{g/mol} = 8,766\text{g}$
- 8,77g in 50ml-Falcon abwiegen und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  auf 30ml auffüllen

1M Tris-Cl ansetzen und bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern:

- 10ml ansetzen und in 600 $\mu\text{l}$ -Aliquots bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern
- Rechnung:  $0,011 \cdot 1\text{mol/l} \cdot 121,14\text{g/mol} = 1,2114\text{g}$
- 1,21g in 15ml-Falcon abwiegen und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  auf 8ml auffüllen
- mit HCl auf pH7.5 einstellen
- mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  auf 10ml auffüllen

20mg/ml tRNA ansetzen und bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern:

- 100mg tRNA + 5ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
- 1,25ml-Aliquots herstellen

50% Dextransulfat frisch ansetzen:

- 5g Dextransulfat + 10ml erwärmtes  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
- gut rühren bis alles gelöst ist

Formamid bei  $50^\circ\text{C}$  im Wasserbad erwärmen

1,1xHybridisierungspuffer in 50ml-Falcon ansetzen:

- 25ml Formamid vorlegen
- + 6ml NaCl (5M)
- + 100 $\mu\text{l}$  EDTA (0,5M)
- + 500 $\mu\text{l}$  Tris-Cl (1M)
- + 1,25ml tRNA (20mg/ml)
- + 1ml Denhardt-Solution (50x)
- + 10ml Dextransulfat (50%)
- + 1,15ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

in 10ml-Aliquots bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern

### **0,2M $\text{NaCO}_3$ pH10,2:**

- 0,21g  $\text{NaCO}_3$  in 10ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  lösen (und pH 10,2 einstellen?)
- Rechnung:  $0,011 \cdot 0,2\text{mol/l} \cdot 105,99\text{g/mol} = 0,212\text{g}$
- in 1,5ml-Aliquots bei  $-20^\circ\text{C}$  wegfrieren

**10% HAc in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>**

10ml ansetzen und in 1,5ml-Aliquots bei -20°C wegfrieren

**Vorgehen****Vorbereitung im Isotopenlabor:**

- Kühlfalle anstellen
- 30µl (15µl = halber Ansatz) des <sup>35</sup>S-CTP/<sup>35</sup>S-UTP-Ansatzes in 0,5ml-Tube geben (Sondenname, Polymerase auf Tube schreiben)
- Tube in SpeedVac stellen, Deckel schließen, Pumpe anstellen
- Radioaktivität trocknen lassen (**Lyophilisierung** regelmäßig überprüfen!)
- auf Eis bereitstellen:
  - frisches H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>;
  - 100mM DTT;
  - 20mM NTP-U-C;
  - 10x Transkriptionspuffer (muss lange gevortext werden, bis alles gelöst ist);
  - linearisierte Plasmide;
  - 0,2M NaCO<sub>3</sub> pH10,2;
  - 10% HAc
  - 1M DTT (darf nicht älter als 3 Monate sein!)

**Transkription:**

- Transkriptions-Mastermix auf Eis in einem 0,5ml-Eppi ansetzen:

<b>ganzer Ansatz (mit 30µl <sup>35</sup>S-CTP/<sup>35</sup>S-UTP)</b>	<b>halber Ansatz (mit 15µl <sup>35</sup>S-CTP/<sup>35</sup>S-UTP)</b>
+ 1µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	+ 0,5µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
+ 1µl NTP-U-C	+ 0,5µl NTP-U-C
+ 1µl 100mM DTT	+ 0,5µl 100mM DTT
+ 1µl 10x Transkriptionspuffer	+ 0,5µl 10x Transkriptionspuffer

- kurz vor Ende der Lyophilisierung 5µl (2,5µl) Plasmid hinzugeben und auf Eis stellen
- Transkriptionsansatz auf <sup>35</sup>S-C/U-Pellet geben und resuspendieren
- 1µl (0,5µl) Polymerase zugeben und mit Pipette mischen  
→ finales Volumen: ganzer Ansatz = 10µl; halber Ansatz = 5µl
- Inkubation (Brutschrank): 2h, 37°C
  - Heizblock auf 60°C vorheizen
  - Hydrolysezeit berechnen nach:  $t = (l_0 - l_f) / (k * l_0 * l_f)$   
[l<sub>0</sub> = Ausgangslänge in kb; l<sub>f</sub> = gewünschte Länge in kb [hier: 0,25kb], k ist Hydrolysekonstante mit 0,11 \* Min<sup>-1</sup> \* kb<sup>-1</sup>)
- nach Inkubation Probe auf Eis stellen:

<b>ganzer Ansatz</b>	<b>halber Ansatz</b>
+ 10µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	+ 15µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
+ 20µl 0,2M NaCO <sub>3</sub> pH10.2	+ 20µl 0,2M NaCO <sub>3</sub> pH10.2
→ finales Volumen: ganzer und halber Ansatz = 40µl	

**Hydrolyse:**

- Hydrolyse (Heizblock): 60°C (Hydrolysezeit genau einhalten!)
  - P-30 Mikrospinsulchen vorbereiten (pro Sonde eine)
    - geschlossene Röhrchen 5x scharf invertieren
    - Röhrchen unten aufbrechen und in Auffangbehälter stellen, Deckel abnehmen
    - ca. 2 Min warten, bis Puffer durchgelaufen ist
    - Sammeltube verwerfen
    - 2 Min bei 3200rpm (1000\*g)
    - trockene Säule in beschriftetes Eppi stellen
  - für jede Sonde zwei Testtubes („vorher“ und „nachher“, Sondename!) jeweils mit 9µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> befüllen
- nach Hydrolyse Probe sofort auf Eis:
  - + 2µl 10% HAc (mit Pipette resuspendieren)

**Sondenaufreinigung:**

- 1µl Transkriptionsprobe in Testtube „vorher“ geben (=1:10), resuspendieren
- Transkriptionsprobe auf Säule geben (Säule steht auf beschriftetem Eppi)
- 4 Min bei 3200rpm (1000\*g)
- Säule verwerfen (Sonde ist im Eppi)
- Sonde auf Eis stellen
- 1µl Transkriptionsprobe in Testtube „nachher“ geben (=1:10), resuspendieren
- pro Sonde 6 Szintirohrchen („vorher“ und „nachher“) mit ca. 2ml Rotiszint<sup>®</sup> eco plus befüllen
- jeweils 1µl der verdünnten Sonde in Szintirohrchen geben, vortexen
- Szintirohrchen in Szinticounter stellen und Counts zählen (cpm)
  - man erwartet mind. 500.000 Counts in der Probe „nachher“

**Sondenverdunnung:**

- Berechnung (Bsp. 1µl der 1:10-verdünnten Sonde enthält 0,5Mio Counts):
  - Gesamtcounts:  $0,5\text{Mio}/\mu\text{l} * 10 * 40\mu\text{l} = 200\text{Mio}$   
(40µl sollen aufgetropft werden)
  - Gesamtvolumen:  $200\text{Mio} / 0,1\text{Mio} / \mu\text{l} = 2000\mu\text{l}$   
(0,1Mio Counts pro µl sollen aufgetropft werden, also insgesamt 4Mio Counts)
- Sonde-Hyb-Mix ansetzen:
  - Vol 1,1xHybridisierungslosung = Gesamtvolumen / 1,1
  - Vol 1M DTT = Gesamtvolumen / 50
  - Vol H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> = Gesamtvolumen – Vol<sub>Sonde</sub> – Vol<sub>DTT</sub> – Vol<sub>1,1xHyb</sub>
- gut vortexen, in Eppis aliquotieren und bei -20°C lagern
- Beschriftung: Sondename, „as“ oder „se“, Datum, <sup>35</sup>S
- 10µl in befülltes Szintirohrchen geben und (zur Überprüfung) in Szinticounter messen